



UNIwersytet PRZYRODNICZY W POZNANIU

Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii

**mgr inż. Damian Nikodem**

**Wpływ wybranych metali ciężkich na interakcje łubinu wąskolistnego  
z jego mikrosymbiontami z rodzaju *Bradyrhizobium***

(Influence of selected heavy metals on the interactions of narrow-leaved lupine  
with its microsymbionts of the genus *Bradyrhizobium*)

**PRACA DOKTORSKA**

wykonana w Katedrze Biochemii i Biotechnologii

Promotor: prof. UPP. dr hab. Dorota Narożna

Poznań, 2024

Dziękuję prof. UPP. dr hab. Dorocie Narożnej za przekazaną wiedzę,  
opiekę merytoryczną oraz pomoc w przygotowywaniu niniejszej pracy.

Dziękuję wszystkim Pracownikom, z Katedry Biochemii i Biotechnologii  
za życzliwość i miłą atmosferę podczas realizacji badań.

Najbliższym, a w szczególności żonie Agacie, dziękuję za nieustające wsparcie i wiarę.

## Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w pracy: .....	6
1. Streszczenie .....	7
2. Abstract .....	9
3. Wstęp.....	11
3.1. Wprowadzenie.....	11
3.2. Metale ciężkie w glebie .....	15
3.3. Miedź i jej rola w przyrodzie.....	19
3.3.1. Znaczenie biologiczne miedzi dla mikroorganizmów .....	20
3.3.2. Znaczenie biologiczne miedzi u roślin .....	20
3.4. Nikiel i jego rola w przyrodzie .....	21
3.4.1. Znaczenie biologiczne niklu dla mikroorganizmów .....	21
3.4.2. Znaczenie biologiczne niklu u roślin .....	22
3.5. Mangan i jego rola w przyrodzie .....	24
3.5.1. Znaczenie biologiczne manganu dla mikroorganizmów .....	24
3.5.2. Znaczenie biologiczne manganu u roślin.....	25
3.6. Kadm i jego rola w przyrodzie .....	25
3.6.1. Znaczenie biologiczne kadmu dla mikroorganizmów .....	26
3.6.2. Znaczenie biologiczne kadmu u roślin .....	27
3.7. Łubin wąskolistny i jego mikrosymbionty z rodzaju <i>Bradyrhizobium</i> .....	27
3.8. Mechanizmy adaptacyjne roślin na stres abiotyczny .....	34
3.9. Mechanizmy adaptacyjne rizobiów na stres abiotyczny .....	40
3.10. Wpływ metali ciężkich na rośliny oraz symbiotyczne bakterie glebowe.....	41
3.11. Biotechnologiczne zastosowanie rizobiów oraz łubinu wąskolistnego w ochronie środowiska i bioremediacji .....	44
4. Hipoteza i cel pracy .....	45
5. Materiały i metody .....	47
5.1. Materiały.....	47
5.1.1 Materiał biologiczny .....	47
5.1.1.1 Łubin wąskolistny .....	47
5.1.1.2. Szczepy bakteryjne.....	47
5.1.2. Odczynniki i zestawy .....	47
5.1.2.1. Zestawy do izolacji i detekcji kwasów nukleinowych .....	48

5.1.3. Podłoża do hodowli bakterii oraz roślin .....	48
5.2. Metody .....	49
5.2.1. Ocena tolerancji szczepów bakteryjnych UPP 133, 213, 242 i 331 na stres wywołany obecnością wybranych metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd) .....	49
5.2.2. Analiza wpływu badanych metali ciężkich na mikrobiom gleby pola uprawnego. 50	
5.2.2.1. Izolacja DNA z próbek gleby .....	50
5.2.2.2. Amplifikacja fragmentów DNA różnych grup mikroorganizmów zasiedlających glebę .....	52
5.2.3. Oznaczanie kwasu indolilo-3-octowego (IAA) syntetyzowanego przez szczepy bakteryjne UPP 133, 213, 242 i 331 w obecności wybranych metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd) .....	54
5.2.4. Oznaczanie zewnątrzkomórkowych polisacharydów (EPS) syntetyzowanych przez szczepy bakteryjne 133, 213, 242 i 331 w obecności wybranych metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd).....	55
5.2.5. Oznaczenie sideroforów syntetyzowanych przez szczepy bakteryjne UPP 133, 213, 242 i 331 w obecności wybranych metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd).....	56
5.2.6. Ocena morfologii komórek szczepów bakteryjnych UPP 133, 213, 242 i 331 hodowanych w obecności wybranych metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd).....	57
5.2.7. Analiza ekspresji wybranych genów <i>Bradyrhizobium</i> (UPP 133, 213, 242 i 331) w obecności jonów metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd).....	58
5.2.8. Powierzchniowa sterylizacja nasion łubinu wąskolistnego .....	61
5.2.9. Kielkowanie nasion łubinu wąskolistnego w obecności miedzi, niklu, manganu i kadmu.....	61
5.2.10. Wpływ miedzi, niklu, manganu i kadmu na liczebność brodawek korzeniowych łubinu wąskolistnego .....	62
5.2.11. Wpływ inokulacji nasion szczepami UPP 133, 213, 242 i 331 hodowanymi w obecności metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd), na rozwój systemów korzeniowych łubinu wąskolistnego.....	62
5.2.12. Wpływ miedzi, niklu, manganu i kadmu na ekspresję wybranych genów ze szlaku syntezy fenylopropanoidów .....	63
6. Wyniki i dyskusja.....	64
6.1. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na przeżywalność i wzrost szczepów bakteryjnych UPP 133, 213, 242 i 331 .....	64
6.2. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na mikrobiom gleby pola uprawnego 71	
6.3. Biosynteza kwasu indolilo-3-octowego (IAA) w szczepach <i>Bradyrhizobium</i> (UPP 133, 213, 242 i 331) w obecności jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu .....	80

6.4. Biosynteza zewnątrzkomórkowych polisacharydów (EPS) w szczepach <i>Bradyrhizobium</i> (UPP 133, 213, 242 i 331) w obecności jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu .....	87
6.5. Biosynteza sideroforów w szczepach <i>Bradyrhizobium</i> (UPP 133, 213, 242 i 331) w obecności jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu.....	91
6.6. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na morfologię komórek szczepów bakteryjnych UPP 133, 213, 242 i 331 .....	98
6.7. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na aktywność transkrypcyjną wybranych genów bakteryjnych .....	104
6.7.1. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na aktywność transkrypcyjną genu kodującego syntazę trehalozy ( <i>treS</i> ) .....	104
6.7.2. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na aktywność transkrypcyjną genu kodującego receptor sideroforów ( <i>fegA</i> ).....	107
6.7.3. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na aktywność transkrypcyjną genu kodującego białko regulatorowe egzopolisacharydów ( <i>exoR</i> ).....	109
6.7.4. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na aktywność transkrypcyjną genu kodującego ATPazę typu P transportującą metale ciężkie ( <i>cueA</i> ).....	111
6.7.5. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na aktywność transkrypcyjną genu kodującego czynnik nodulacji NodA ( <i>nodA</i> ).....	114
6.8. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na kiełkowanie nasion łubinu wąskolistnego. ....	116
6.9. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na ilość brodawek korzeniowych w układach symbiotycznych łubin wąskolistny/ <i>Bradyrhizobium</i> .....	120
6.10. Wpływ inokulów szczepów <i>Bradyrhizobium</i> (UPP 133, 213, 242 i 331) przygotowanych w pożywkach zawierających jony miedzi, niklu, manganu i kadmu na systemy korzeniowe łubinu wąskolistnego .....	122
6.11. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na ekspresję wybranych genów ze szlaku syntezy fenylopropanoidów .....	127
7. Podsumowanie i wnioski.....	130
8. Literatura .....	134
9. Spis rycin.....	147
10. Spis tabel .....	150

## Wykaz skrótów stosowanych w pracy:

<b>ACCd</b>	deaminaza 1-aminocyklopropano-1-karboksylianowa, <i>1-aminocyclopropane-1-carboxylic deaminase</i>
<b>BNF</b>	biologiczne wiązanie azotu, <i>biological nitrogen fixation</i>
<b>CAD</b>	dehydrogenaza kwasu cynamonowego, <i>cinnamyl alcohol dehydrogenase</i>
<b>CAS</b>	chrom azaurol S
<b>cDNA</b>	komplementarny kwas deoksyrybonuklinowy, <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
<b>CCR</b>	reduktaza 4-kumaroilo-CoA, <i>cinnamoyl-Co:NADPH Oxidoreductase</i>
<b>CH4</b>	4-hydroksylaza kwasu cynamonowego, <i>cinnamate-4-hydroxylase</i>
<b>CHI</b>	izomeraza chalkonowa, <i>chalcone isomerase</i>
<b>CHR</b>	reduktaza chalkonowa, <i>chalcone reductase</i>
<b>CHS</b>	syntaza chalkonowa, <i>chalcone synthase</i>
<b>DNA</b>	kwas deoksyrybonuklinowy, <i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>EPS</b>	egzopolisacharyd, exopolysaccharide
<b>HM</b>	metale ciężkie, heavy metals
<b>IAA</b>	kwas indolilo-3-octowy, <i>indole-3-acetic acid</i>
<b>IFS</b>	syntaza izoflawonowa, <i>isoflavone synthase</i>
<b>OD</b>	gęstość optyczna, <i>optical density</i>
<b>PAL</b>	amoniakoliza fenyloalaninowa, <i>phenylalanine ammonia-lyase</i>
<b>PCR</b>	łańcuchowa reakcja polimerazy, <i>polymerase chain reaction</i>
<b>PGPR</b>	rhizobia promujące wzrost roślin, <i>plant growth-promoting rhizobacteria</i>
<b>pz</b>	par zasad
<b>qPCR</b>	ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym, <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>QS</b>	quorum sensing
<b>RNA</b>	kwas rybonukleinowy, <i>ribonucleic acid</i>
<b>ROS</b>	reaktywne formy tlenu, <i>reactive oxygen species</i>
<b>SEM</b>	skaningowa mikroskopia elektronowa <i>scanning electron microscopy</i>
<b>TAL</b>	amoniakoliza tyrozynowa, <i>Tyrosine Ammonia-Lyase</i>
<b>UV</b>	promieniowanie ultrafioletowe
<b>4CL</b>	ligaza 4-kumaran-CoA, <i>p-coumaroyl-Co Ligase</i>

## 1. Streszczenie

Rośliny bobowate, w tym łubin wąskolistny, są zyskującymi popularność roślinami o dużym potencjale ze względu na zdolność do nawiązywania symbiozy z bakteriami glebowymi, które w procesie tzw. biologicznego wiązania azotu (ang. Biological Nitrogen Fixation, BNF), przekształcają wolny azot atmosferyczny w dostępne dla roślin formy amonowe. Właściwość ta znacznie zmniejsza zapotrzebowanie na drogie syntetyczne nawozy oraz wzbogaca glebę pod kolejne uprawy. Poza przekształcaniem azotu atmosferycznego w formy biodostępne dla roślin, bakterie z grupy *Bradyrhizobium* przyczyniają się do ich wzrostu również poprzez czynny udział w rozkładzie związków chemicznych obecnych w glebie na formy, które są łatwiej dostępne dla roślin, a także są zdolne do zewnątrzkomórkowego wydzielania metabolitów wtórnych, które mogą indukować wzrost roślin, a także pomagać w ochronie przed chorobami i stresem abiotycznym.

Na nawiązanie efektywnego układu symbiotycznego pomiędzy rizobiami a odpowiednim makrosymbiontem ma wpływ wiele czynników. Zarówno rośliny jak i wolno żyjące mikroorganizmy są narażone na działanie różnych czynników biotycznych i abiotycznych, mogących ograniczać ich rozwój, przeżywalność i zdolności do wchodzenia w relację symbiotyczną.

Pomimo faktu, iż wiele z metali ciężkich (ang. Heavy Metals, HM) w śladowych ilościach, jest niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych, w podwyższonych stężeniach, charakteryzują się one wysoką toksycznością, stanowiąc zagrożenie dla zarówno bakterii jak i roślin, wywierając znaczny wpływ na układ symbiotyczny. Homeostaza jonów metali ciężkich to wrażliwa na zmiany równowaga, w której komórki bakteryjne muszą utrzymywać wystarczający poziom metali, aby zapewnić prawidłowe funkcjonowanie niezbędnych enzymów, jednocześnie zapobiegając toksyczności powodowanej wyższymi ich stężeniami.

Do tej pory nie zrealizowano kompleksowych analiz badających wpływ różnych metali ciężkich na mechanizmy molekularne, cechy fenotypowe oraz profile metaboliczne łubinu wąskolistnego oraz jego mikrosymbiontów. W związku z tym, celem prezentowanej pracy było badanie interakcji wybranych metali ciężkich (miedź, nikiel, mangan i kadm) z wolno żyjącymi komórkami bakterii symbiotycznych z rodzaju *Bradyrhizobium* (dwa

szczyepy *B. japonicum* UPP 133, UPP 331 oraz dwa szczepy *B. canariense* UPP 213, UPP 242), oraz ich wpływ na symbiotyczny układ roślin bobowatych z bakteriami glebowymi.

Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że jony metali ciężkich, takie jak  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$ , mają istotny wpływ na wzrost komórek szczepów *Bradyrhizobium spp.* Wysokie stężenia tych jonów hamują wzrost komórek, przy czym jony  $\text{Cd}^{2+}$  wykazują największą toksyczność dla tych mikroorganizmów. Ponadto, jony  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$  wykazały zdolność do stymulowania procesu syntezy kwasu indolilo-3-octowego (IAA), jednocześnie największą biosyntezę IAA odnotowano dla szczepu *B. canariense* UPP 242, w stężeniu 0,5 mM  $\text{CuCl}_2$ , która wyniosła 8,09 g/mL. Natomiast jony  $\text{Cd}^{2+}$  wykazywały działanie inhibujące ten proces. Jony  $\text{Cu}^{2+}$  w stężeniach 0,5 mM i 1 mM,  $\text{Ni}^{2+}$  w stężeniach 0,5 mM i 1 mM oraz  $\text{Mn}^{2+}$  w stężeniach 0,125 mM i 5 mM, wykazywały znaczny wpływ na zwiększenie biosyntezy egzopolisacharydów (EPS). Dodatkowo jony  $\text{Mn}^{2+}$  w największym stopniu stymulowały wzrost biosyntezy sideroforów przez szczepy UPP 133, UPP 213 oraz UPP 242. Analiza ekspresji genów *treS*, *cueA*, *exoR*, *fegA* wykazała, że badane metale ciężkie mają wpływ na poziom ekspresji tych genów, przy czym zmiany te są zależne od czasu. Zmiany w ekspresji genu *treS* były dodatkowo gatunkowo specyficzne. Z wyjątkiem jonów  $\text{Cu}^{2+}$ , których obecność zwiększyła ekspresję genu *treS* po 24h o 170%, wszystkie z badanych jonów metali ciężkich nie wykazywały znacznego wpływu na poziom ekspresji czynnika nodulacji NodA. Dodatkowo stwierdzono istotny wpływ jonów wybranych metali ciężkich na kiełkowanie nasion łubinu wąskolistnego. Wszystkie z nich w niskich stężeniach wykazywały pozytywny wpływ na ten proces, podczas gdy ich wyższe stężenia prowadziły do jego spowolnienia, a nawet nekrotycznych zmian. Wynikiem stanowiącym duży potencjał dla dalszych badań był wpływ inokulacji nasion szczepami *Bradyrhizobium spp.* hodowanymi przed inokulacją w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$  w stężeniu 0,5mM. Systemy korzeniowe rozwijające się z tych nasion były bardziej rozbudowane i charakteryzowały się większą masą niż korzenie w próbach kontrolnych.

Podsumowując, wyniki badań otwierają nowe możliwości badawcze w zakresie adaptacji roślin i mikroorganizmów do warunków zanieczyszczenia metalami ciężkimi. Ich zrozumienie może prowadzić do opracowania strategii poprawy wydajności upraw oraz metod bioremediacji gleb, w rezultacie, przyczyniając się do rozwoju zrównoważonych praktyk rolniczych i ochrony środowiska.

## 2. Abstract

Leguminous plants, including narrow-leaved lupine, are gaining popularity due to their potential to form symbiotic relationships with soil bacteria, which through the process of Biological Nitrogen Fixation (BNF), convert atmospheric nitrogen into forms biologically available to plants. This property significantly reduces the need for expensive synthetic fertilizers and enriches soils for subsequent crops. In addition to nitrogen fixation, Bradyrhizobia also contribute to plant growth by actively participating in the breakdown of compounds in soil into forms more available to plants. They are also capable of extracellular secretion of secondary metabolites, which may induce plant growth and assist in protection against diseases and abiotic stress.

The establishment of an effective symbiotic relationship between rhizobia and the appropriate macro-symbiont is influenced by various factors. Both plants and free-living microorganisms are exposed to various biotic and abiotic factors that may limit their development, survival, and ability to enter into a symbiotic relationship.

Despite the fact that many heavy metals (HMs) are essential trace elements for the proper functioning of living organisms, at elevated concentrations, they exhibit high toxicity, posing a threat to both bacteria and plants and significantly impacting the symbiotic system. The homeostasis of heavy metal ions is a sensitive balance in which bacterial cells must maintain sufficient levels of metals to ensure the proper functioning of essential enzymes while preventing toxicity caused by their higher concentrations.

Comprehensive studies on the impact of many heavy metals on the molecular mechanisms, phenotypic properties, and metabolic profiles of microsymbionts and macro-symbionts such as *Lupinus angustifolius* have not yet been conducted. Therefore, the subject of the research described in this dissertation was an attempt to understand the mechanisms underlying the interactions of selected heavy metals (copper, nickel, manganese, and cadmium) with free-living bacterial cells of symbiotic bacteria from the genus *Bradyrhizobium* (two strains of *B. japonicum* (UPP 133, UPP 331) and two strains of *B. canariense* (UPP 213, UPP 242)), as well as their impact on the symbiotic relationship between leguminous plants and soil bacteria.

Conducted experiments have shown that heavy metal ions, such as  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ , and  $\text{Mn}^{2+}$ , have a significant impact on the growth of *Bradyrhizobium spp.* cells. High

concentrations of these ions inhibit cell growth, with  $\text{Cd}^{2+}$  ions exhibiting the greatest toxicity to these microorganisms. Furthermore,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , and  $\text{Mn}^{2+}$  ions demonstrated the ability to stimulate the synthesis of indole-3-acetic acid (IAA), with the highest production of IAA observed for the strain *B. canariense* UPP 242, at a concentration of 0,5 mM  $\text{CuCl}_2$ , reaching 8.09 g/mL. Conversely,  $\text{Cd}^{2+}$  ions exhibited inhibitory effects on this process.  $\text{Cu}^{2+}$  ions at concentrations of 0,5 mM and 1 mM,  $\text{Ni}^{2+}$  ions at concentrations of 0,5 mM and 1 mM, and  $\text{Mn}^{2+}$  ions at concentrations of 0,125 mM and 5 mM significantly increased the production of exopolysaccharides (EPS). Additionally,  $\text{Mn}^{2+}$  ions most strongly stimulated the production of siderophores by strains UPP 133, UPP 213, and UPP 242.

Analyses of the expression of the *treS*, *cueA*, *exoR*, and *fegA* genes showed that the selected heavy metals have an impact on the expression levels of these genes, with these changes being time-dependent. Changes in *treS* gene expression were also species-specific. Except for  $\text{Cu}^{2+}$  ions, whose presence increased gene expression by 170% after 24 hours, all of the studied heavy metal ions had no significant effect on the expression levels of the nodulation factor NodA.

Furthermore, a significant impact of selected heavy metal ions on the germination of narrow-leaved lupine seeds was observed. All of them at low concentrations showed a positive effect on this process, while their higher concentrations led to its slowing down and even necrotic changes.

Impact of seed inoculation with *Bradyrhizobium spp.* strains grown in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  ions at a concentration of 0,5 mM is showing a significant potential for further research. The root systems developed from these seeds were more abundant and had a greater mass than those in control trials.

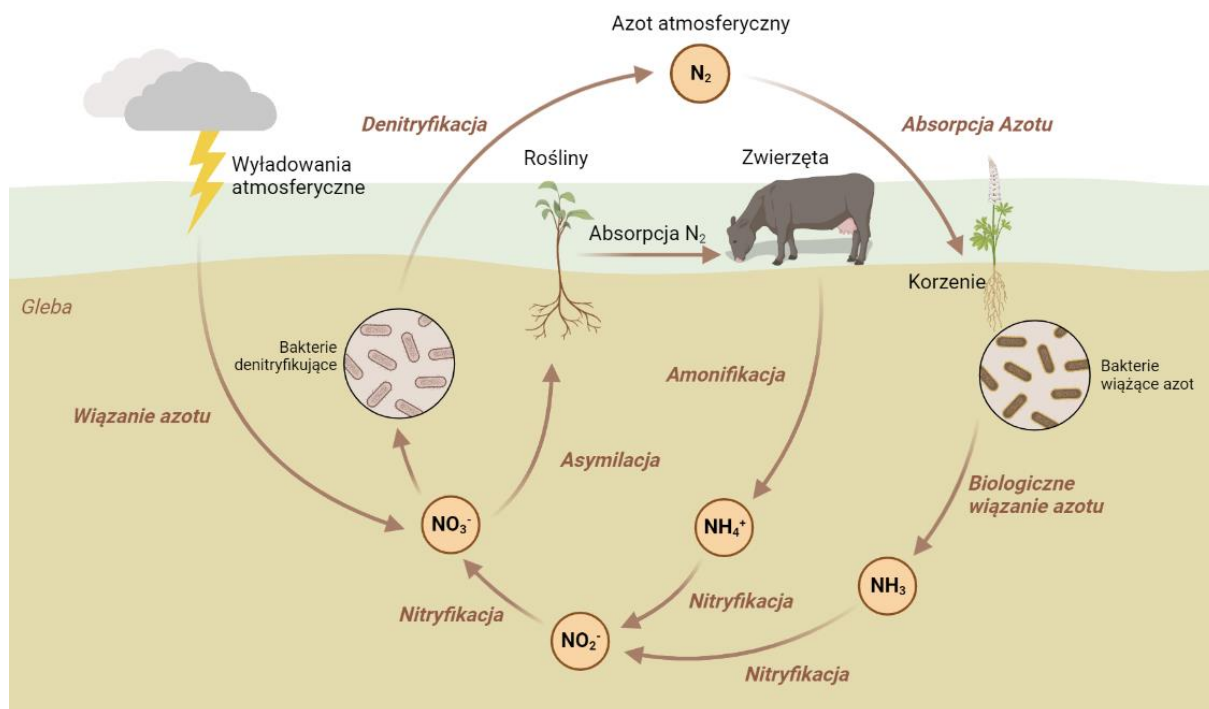
In summary, the research results open up new research possibilities regarding the adaptation of plants and microorganisms to conditions of heavy metal pollution. Understanding these interactions may lead to the development of strategies to improve crop productivity and soil bioremediation methods, ultimately contributing to the development of sustainable agricultural practices and environmental protection.

### 3. Wstęp

#### 3.1. Wprowadzenie

Na przestrzeni ostatnich 50 lat populacja Ziemi zwiększyła się o ponad 4 miliardy. Przewiduje się, że do roku 2100 wzrośnie ona do nawet 12,3 miliardów (Gerland i in., 2014). Wraz ze stale rosnącą populacją rośnie również zapotrzebowanie na żywność, dlatego zapewnienie bezpieczeństwa żywnościowego będzie jednym z głównych priorytetów wśród wyzwań społeczno-politycznych na poziomie globalnym i krajowym. Żeby sprostać temu zadaniu światowe rolnictwo powinno promować i zwiększać różnorodność upraw wielofunkcyjnych, takich jak uprawy roślin bobowatych, do których należą różne gatunki łubinu w tym łubin wąskolistny (*Lupinus angustifolius* L.).

Łubin wąskolistny jest rośliną bobowatą o rosnącym znaczeniu gospodarczym, z wykazanymi właściwościami nutraceutycznymi. Ziarna łubinu zawierają przeciwutleniacze i witaminy, a także są bogate w białko i błonnik pokarmowy. Ponadto w porównaniu z innymi roślinami bobowatymi, łubin ma niską zawartość czynników antyżywnościowych, takich jak inhibitory tripsyny i saponiny (Martínez-Villaluenga i in., 2006). To również roślina wykazująca wiele korzyści dla rolnictwa. Jest w stanie zwalczać choroby w płodozmianie a dzięki zdolności do tworzenia układów symbiotycznych z rizobiami, które wykorzystując enzymatyczny kompleks nitrofikacji są zdolne do redukcji azotu atmosferycznego do form amonowych, przyswajalnych dla roślin. Tworzenie układów symbiotycznych rośliny bobowate-rizobia powoduje wzbogacenie gleby w azot, przez co znacznie zmniejsza się zapotrzebowanie na drogie nawozy azotowe (Lucas i in., 2015). Szacuje się, że w uprawach polowych roślin bobowatych ilość azotu związanego w brodawkach korzeniowych może dochodzić do 120 kg/ha w sezonie wegetacyjnym (Bending, 2003).



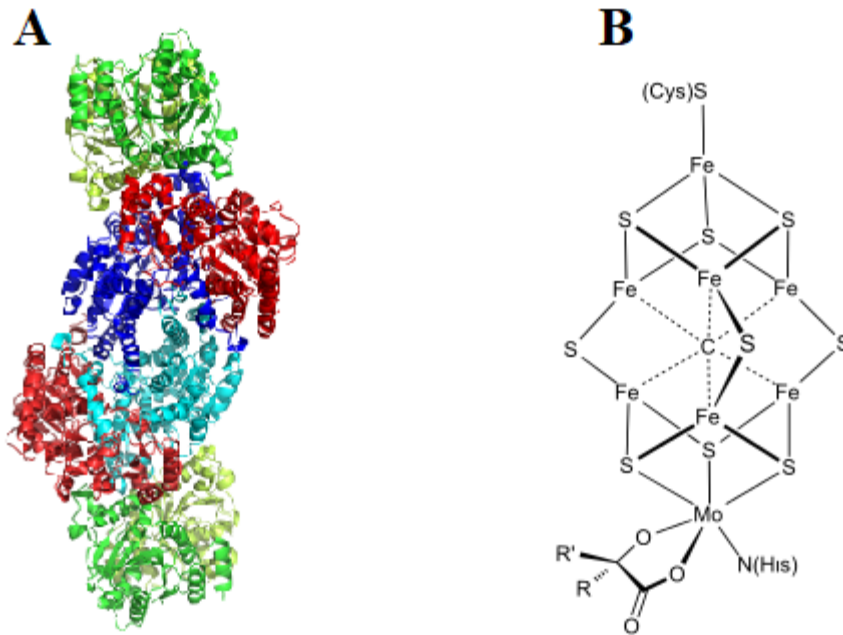
**Ryc. 1. Obieg azotu w przyrodzie**

Poprzez serię przemian mikrobiologicznych azot atmosferyczny staje się dostępny dla roślin, stając się podstawą dla życia wszystkich zwierząt. Etapy, które nie są całkowicie sekwencyjne, można podzielić następująco: wiązanie azotu, asymilacja azotu, amonifikacja, nitryfikacja i denitryfikacja. Wiązanie azotu, podczas którego gazowy azot przekształca się w organiczne związki azotu, odbywa się głównie (90%) przez niektóre bakterie i sinice. Znacznie mniejsza ilość wolnego azotu jest wiązana środkami abiotycznymi (np. wyładowania atmosferyczne, promieniowanie ultrafioletowe) oraz przez syntetyczną konwersję do amoniaku w procesie Habera-Boscha. Azotany i amoniak powstałe w wyniku wiązania azotu są asymilowane do specyficznych związków wchodzących w skład tkanek glonów i roślin wyższych. Następnie zwierzęta zjadając je, wbudowują azot we własne związki organiczne. Pozostałości wszystkich żywych istot oraz produktów ich metabolizmu są rozkładane przez mikroorganizmy w procesie amonifikacji, w wyniku której powstaje amoniak ( $NH_3$ ) i amon ( $NH_4^+$ ). W procesie nitryfikacji, bakterie nitryfikacyjne, przekształcają amoniak w azotany ( $NO_3^-$ ), które rośliny mogą wchłaniać do własnych tkanek. Azotany są również metabolizowane przez bakterie denitryfikacyjne, które są szczególnie aktywne w podmokłych glebach beztlenowych. Działanie tych bakterii ma tendencję do zubożenia azotanów w glebie, tworząc wolny azot atmosferyczny (Nitrogen Fixation, Britannica 2023)

Rośliny bobowate są zatem istotnym elementem obiegu azotu w przyrodzie (Ryc. 1), dostarczając ludzkości ponad 30% azotu odżywczego i stanowią znaczący potencjał dla produktywności upraw, wśród których dostępność azotu jest ograniczona. Od dawna niedobór azotu dla wzrastających roślin uzupełniany jest przez stosowanie syntetycznych nawozów bogatych w ten pierwiastek. Stosowanie coraz większych ilości nawozów znacznie zwiększyło plony roślin uprawnych, takich jak zboża, lecz wiąże się z wysokimi kosztami ekonomicznymi i środowiskowymi (Ferguson et al. 2010). Przemysłowa produkcja nawozów azotowych jest bardzo kosztowna, ponieważ redukcja wiązania potrójnego w azocie

cząsteczkowym ( $N_2$ ) jest prowadzona w wysokiej temperaturze i ciśnieniu, przez co wymaga nakładu dużych ilości energii, zazwyczaj dostarczanej z paliw kopalnych, których dostępność jest ograniczona. W związku z tym koszty nawozów są wysokie, co dotyka zwłaszcza ubogich w zasoby rolników na całym świecie. Ponadto stosowanie nawozów sztucznych ma poważny wpływ na środowisko, ze względu na spływanie nadmiaru nieprzyswojonych azotanów czemu towarzyszy eutrofizacja rzek, jezior i oceanów oraz zanieczyszczanie wody pitnej (de Bruijn, 2015).

Łubiny są zdolne do wiązania azotu atmosferycznego dzięki symbiotycznej interakcji z Gram-dodatnimi bakteriami z rodzaju *Bradyrhizobium ssp.* Brodawkujące szczepy *Bradyrhizobium* są przyciągane przez flawonoidy uwalniane przez rośliny bobowate. W odpowiedzi bakterie wytwarzają zewnątrzkomórkowe czynniki nod, które indukują zmiany morfologiczne rośliny, umożliwiając bakteriom wnikięcie do komórek korowych korzenia. Po infekcji błona roślinna pokrywa bakterie, które następnie różnicują się w bakteroidy. W takiej formie są w stanie wiązać azot z powietrza (Gano-Cohen i in., 2016). Enzymatyczna konwersja azotu do amoniaku jest katalizowana przez nitrogenazę - kompleks enzymatyczny, który jest wysoce konserwatywny u wolno żyjących i symbiotycznych diazotrofów. Konwencjonalna nitrogenaza lub mo-nitrogenaza zawiera grupę protetyczną z molibdenem (Iron-Molybdenumcofactor; FeMoco) (Ryc. 2). Enzym ten składa się z dwóch metaloprotein. Pierwsza z nich, określana również jako białko MoFe, jest tetramerem składającym się z dwóch nieidentycznych podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ , podczas gdy druga, określana również jako białko Fe, jest dimerem składającym się z identycznych podjednostek. Dwa FeMoco są związane z podjednostkami  $\alpha$  białka MoFe. Wiązanie azotu to bardzo złożony proces, który nie został jeszcze w pełni wyjaśniony (Newton, 2015).



**Ryc. 2. Model wstęgowy białka nitrogenazy (A) i struktura kofaktora żelazowo-molibdenowego (FeMoco)**

Na modelu wstęgowym nitrogenazy kolorem czerwonym zaznaczono podjednostkę  $\alpha$  oraz kolorem niebieskim podjednostkę  $\beta$  białka FeMo. Kolorem zielonym zaznaczono cząsteczki białka Fe

Bakterie z rodzaju *Bradyrhizobium* zaliczane są do mikroorganizmów mikroflory ryzosferowej wywierających korzystny wpływ na rozwój roślin (PGPR ang. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Mikroorganizmy te są traktowane jako biologiczne czynniki nawożeniowe (z ang. biofertilizers). Mimo iż mechanizm pobudzania wzrostu roślin przez PGPR jest wciąż poznawany, udało się wskazać wśród tych bakterii szereg różnych cech, odpowiedzialnych za działania promujące ich wzrost. Wpływają one pozytywnie na wegetację roślin poprzez stymulowanie ich w sposób bezpośredni i pośredni. Wspomaganie bezpośrednie polega między innymi na dostarczeniu roślinie składników mineralnych (np. poprzez ułatwienie pobierania azotu, rozpuszczanie związków fosforu czy wiązanie żelaza przez siderofory), syntezie fitohormonów wpływających na rozwój roślin, tj. auksyn, giberelin, cytokinin. Natomiast pośredni sposób stymulacji głównie polega na biologicznym zwalczaniu fitopatogenów (Pociejowska i in., 2014).

Na nawiązanie efektywnej symbiozy pomiędzy rizobiami a odpowiednim makrosymbiontem (rośliną gospodarzem) mają wpływ warunki panujące w glebie. Zarówno rośliny jak i wolno żyjące mikroorganizmy są narażone na działanie różnych czynników biotycznych i abiotycznych, mogących ograniczać ich rozwój, przeżywalność i zdolności do tworzenia układów symbiotycznych (Kopcińska, 2020). Jednym z głównych czynników abiotycznych, którego wpływ na mikroorganizmy i rośliny jest wciąż badany, jest obecność w środowisku metali ciężkich. Spektrum rezultatów wywoływanych obecnością tych pierwiastków, od pozytywnych efektów hormetycznych po zmiany nekrotyczne jest wciąż odkrywane, jednak zagrożenie wywierane przez te związki sprawiło, że organizmy te wykształciły szereg mechanizmów obronnych oraz adaptacyjnych umożliwiających im przystosowanie się do niekorzystnych warunków środowiskowych i stworzenie symbiotycznych relacji.

### **3.2. Metale ciężkie w glebie**

Szacuje się, że stresy abiotyczne do których zaliczany jest również stres wywołany przez metale ciężkie, są główną przyczyną globalnego zmniejszenia plonów nawet do 70% i w znaczny sposób ograniczają produkcję roślinną. Sytuacja ta niekorzystnie wpływa na zapewnienie bezpieczeństwa żywnościowego i stale ulega pogorszeniu z powodu zachwiania równowagi między produktywnością upraw a przyrostem ludności. Dlatego szczególnie ważne jest poznanie reakcji danych ekosystemów na takie czynniki stresowe jak metale ciężkie (S. Singh i in., 2016).

Pierwiastki należące do bloku d zostały sklasyfikowane jako „metale ciężkie” na podstawie ich gęstości ( $>5 \text{ g/cm}^3$ ). W wyniku ewolucji roślin okrytonasiennych dziewiętnaście z nich: C, O, H, Mg, S, N, Ca, P i K (makroelementy) oraz Cu, Zn, Mn, Fe, Mo, B, Ni, Co, Cl, i B (mikroskładniki odżywcze) zaczęło pełnić rolę w podstawowym metabolizmie (Ernst, 2006). Oprócz pierwiastków wymienionych powyżej, również krzem jest uważany za pierwiastek sprzyjający rozwojowi ze względu na fakt, że bierze udział w utrzymaniu niektórych struktur roślinnych. Makro i mikroelementy odgrywają ważną rolę w procesach fizjologicznych i biochemicznych roślin, takich jak biosynteza chlorofilu, fotosynteza, synteza DNA, modyfikacje białek, reakcje redoks w chloroplastach i mitochondriach, metabolizm cukrów czy wiązanie azotu. Na przykład cynk (Zn) jest

kofaktorem dla ponad 300 enzymów i 200 czynników transkrypcyjnych związanych z utrzymaniem integralności błony, metabolizmem auksyn i reprodukcją (S. Singh i in., 2016). Pomimo wszystkich korzystnych właściwości, które zapewniają te pierwiastki w odpowiednio niskich stężeniach, w podwyższonych stężeniach charakteryzują się wysoką toksycznością, stanowiąc zagrożenie dla organizmów żywych. Oddziałują na wszystkie ogniwa łańcucha pokarmowego, tj. na drobnoustroje żyjące w glebie, rośliny i zwierzęta oraz na ludzi, czyniąc ich podatnymi na szereg chorób, od zapalenia skóry po różne rodzaje nowotworów (McLaughlin i in., 1999).

**Tabela 1. Przemysłowe źródła metali ciężkich w środowisku****Przemysłowe źródła metali ciężkich**

<b>METALE CIĘŻKIE</b>	<b>ŹRÓDŁA</b>
<b>Arsen</b>	Nawozy fosforowe, górnictwo, hutnictwo, hartowanie metali, farby, tekstylia, pyły przemysłowe, lecznicze, farmaceutyczne, ścieki, pestycydy, wytop złota, ołowiu, miedzi i niklu, produkcja żelaza i stali, odpady przemysłowe, spalanie paliw kopalnianych.
<b>Kadm</b>	Górnictwo i hutnictwo, nawozy fosforowe, elektronika, pigmenty i farby, pyły i dymy przemysłowe, ścieki, pestycydy, baterie, produkty z PCW, kolorowe pigmenty.
<b>Chrom</b>	Górnictwo i hutnictwo, galwanizacja, przemysł gumowy, fotografia, pył przemysłowy i opary, garbarstwo, przemysł skórzany, chemiczny, nawozy, tekstylia.
<b>Ołów</b>	Górnictwo i hutnictwo, pyły i opary przemysłowe, zastosowanie ołowiu w benzynie, spalanie paliw kopalnianych, spalanie odpadów stałych. Odpady przemysłowe, farby i pigmenty, materiały wybuchowe, ceramika i naczynia, niektóre rodzaje PCW, pestycydy, nawozy, produkcja akumulatorów kwasowo-ołowiowych.
<b>Rtęć</b>	Górnictwo, hutnictwo, produkcja chemikaliów, pyły i dymy przemysłowe, ścieki przemysłowe, spalanie paliw kopalnianych, spalanie odpadów stałych i komunalnych. Nawozy, pestycydy, żarówki fluorescencyjne, łuk rtęciowy lampy. Produkcja wyrobów rtęciowych, materiałów wybuchowych, gumy i tworzyw sztucznych oraz papieru.
<b>Nikiel</b>	Górnictwo i hutnictwo, galwanizacja, produkcja żelaza i stali, areozole przemysłowe, spalanie odpadów i węgla, nawozy, akumulatory, przemysł chemiczny i spożywczy.
<b>Cynk</b>	Górnictwo i hutnictwo, galwanizacja, produkcja żelaza i stali, nawozy, odpady metalowe.
<b>Miedź</b>	Górnictwo i hutnictwo, galwanizacja, odpady elektryczne i elektroniczne, pestycydy, farby i pigmenty, przemysł włókienniczy, materiały wybuchowe.

Wiele metali ciężkich występuje naturalnie w skorupie ziemskiej na różnych jej poziomach. Przedostają się one do środowiska w wyniku uwalniania ze skał macierzystych w procesach glebotwórczych, podczas erupcji wulkanów lub wskutek pożarów. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat wzmożona industrializacja i nowoczesne praktyki rolnicze spowodowały zwiększenie zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi (Tabela 1). Duże obszary gleby zostały skażone metalami ciężkimi w wyniku stosowania pestycydów, nawozów sztucznych, odpadów komunalnych i kompostowych, a także w wyniku uwalniania metali ciężkich w procesach wykorzystywanych w przemyśle hutniczym i kopalniach metali. Niektóre metale ciężkie, takie jak Cd, Cr, Pb, Al, Hg itp., nie pełnią funkcji fizjologicznych i są wysoko toksyczne nawet w bardzo niskich stężeniach. Zarówno niezbędne i te nieistotne dla funkcjonowania roślin i mikroorganizmów metale ciężkie, w odpowiednio wysokim stężeniu, wywołują u roślin skutki powszechnie uważane za toksyczne, takie jak: niska akumulacja biomasy, chloroza, hamowanie wzrostu i fotosyntezy, zmieniony bilans wodny i asymilacja składników odżywczych, starzenie się, które ostatecznie powodują śmierć roślin (S. Singh i in., 2016).

Podobna sytuacja dotyczy wolno żyjących w glebie bakterii, w tym rizobiów. Wiele z metali ciężkich pobieranych w śladowych ilościach, niezbędnych jest do prawidłowego działania kluczowych enzymów i związków chemicznych kontrolujących funkcjonowanie mikroorganizmów. Doniesiono, że niektóre metale ciężkie w zbyt wysokim stężeniu powodują zmniejszenie ilości powstających brodawek korzeniowych i wiązanego azotu, poprzez negatywny wpływ na ilość wody komórkowej, zmniejszenie pobierania składników odżywczych oraz indukcję stresu oksydacyjnego (Haddad i in., 2015). Na poziomie molekularnym toksyczne metale ciężkie mogą zmieniać ekspresję różnych genów, w tym tych kodujących enzymy kluczowych szlaków metabolicznych. Stres wywołany metalami może również powodować zmiany w profilu białkowym (S. Singh i in., 2016). Homeostaza jonów metali to wrażliwa na zmiany równowaga, w której komórki bakteryjne muszą utrzymywać wystarczający poziom metali, aby zapewnić prawidłowe funkcjonowanie niezbędnych enzymów, jednocześnie zapobiegając toksyczności powodowanej wyższymi ich stężeniami. Chociaż homeostaza metali w bakteriach jest badana od wielu lat, dopiero niedawno naukowcy zaczęli rozumieć molekularne podstawy procesów buforowania metali, funkcjonowania białek opiekuńczych i zmian w proteomie zapewniających wydajną metalację kluczowych enzymów podczas niedoboru konkretnych metali. Również stosunkowo niedawno zaczęto odkrywać wewnątrzkomórkowe miejsca przechowywania i sekwestracji

nadmiaru metali, jednak kluczowe pytania w odniesieniu do charakteru labilnej puli metali, oraz wpływu czynników środowiskowych na ich zapotrzebowanie wciąż pozostają bez odpowiedzi (Chandrangu i in., 2017).

Oprócz niekorzystnego wpływu na rośliny i bakterie glebowe, metale ciężkie stanowią zagrożenie dla zdrowia ludzi ze względu na długi czas retencji w glebie.

### **3.3. Miedź i jej rola w przyrodzie**

Wśród żywych organizmów jako pierwsze, miedź (Cu) do repertuaru pierwiastków niezbędnych do życia włączyły fotosyntetyzujące cyjanobakterie. Z powodu pojawiającego się w atmosferze tlenu, żelazo zaczęło wytrącać się w postaci nierozpuszczalnych, utlenionych wodorotlenków żelaza (III) powodując spadek biodostępności tego pierwiastka. Doprowadziło to do włączenia miedzi do systemów wychwytyjących energię, takich jak oksydaza cytochromowa (Crichton i Pierre, 2001). Miedź jest istotnym pierwiastkiem ze względu na jej skłonność do pobierania i oddawania elektronu w czasie zmiany stopnia utlenienia w reakcjach redoks. Jako lekki kwas wg. Teorii Lewisa, Cu(I) sprzyja tworzeniu tetraedrycznych struktur z lekkimi zasadami, takimi jak wodoroki, grupy alkilowe, fosfiny, tiole i tioeter metioniny. Cu(II) jako średni kwas Lewisa, tworzy wiązania między innymi z siarczanami, donorami azotu, takimi jak histydyna oraz donorami tlenu, takimi jak glutaminiany i asparaginiany. Zdolność miedzi do zmian formy w reakcjach redoks między Cu(I) a Cu(II) nadaje enzymom zawierającym miedź potencjał redoks w przedziale +0,25 a +0,75V, umożliwiając usuwanie elektronów z różnych substratów, takich jak katechole, nadtlarki, czy askorbiniany. W konsekwencji enzymy zależne od miedzi w różnych królestwach organizmów żywych działają w różnych kluczowych procesach, w tym fosforylacji oksydacyjnej (oksydaza cytochromowa), homeostazie żelaza (ceruloplazmina, hefaestyna), pigmentacji (tyrozinaza; lakaza), dysmutacji ponadtlenkowej (dysmutazy ponadtlenkowe) i tworzeniu tkanki łącznej (oksydazy lizylove) (Ladomersky i Petris, 2015).

Miedź jest ważnym elementem gleby oraz mikroelementem, który jest niezbędny dla roślin. Pomimo tego pierwiastek ten charakteryzuje się toksycznością w każdym układzie, w którym jego poziomy występują powyżej supraoptymalnych. To czy zwiększone stężenie tego pierwiastka w glebie, będzie wywoływać toksyczne efekty zależy jednak od różnych czynników. Biodostępność miedzi jest wyższa w glebie o odczynie kwaśnym, niż w glebie

zasadowej, a na jej pobieranie mają wpływ różne parametry fizjologiczne roślin (Alengebawy i in., 2021). Wysoki wskaźnik akumulacji miedzi w glebie jest często spowodowany stosowaniem fungicydów na bazie tego pierwiastka lub innymi działaniami rolniczymi. Naturalnie zakres stężenia Cu w glebie uprawnej mieści się w przedziale od 5 do 30 mg/kg, ale poziom ten zależy od stanu i położenia gleby (Alengebawy i in., 2021).

### **3.3.1. Znaczenie biologiczne miedzi dla mikroorganizmów**

Miedź jest dla mikroorganizmów niezbędnym mikroelementem. Jako kofaktor dla wielu białek uczestniczy w reakcjach redoks umożliwiając transport elektronów, oddychanie oksydacyjne, denitryfikację itp., a w niektórych przypadkach jest także elementem strukturalnym. Fizjologiczna sprawność komórek wymaga mechanizmów utrzymujących homeostazę Cu, które kontrolują dystrybucję i kierowanie tego metalu do cuproenzymów (metaloenzymów zawierających jeden lub więcej atomów miedzi). Zadanie to realizowane jest poprzez mechanizmy homeostatyczne obejmujące sensory, transportery, białka opiekuńcze oraz chelatory. Natomiast zbyt wysokie stężenie Cu może prowadzić do wytwarzania wysoce reaktywnych rodników tlenowych poprzez reakcję Fentona i interferencję z zestawem białek klastrowych (Fe-S) (Arguello i in., 2013). Liczne badania wykazały, że toksyczność miedzi może znacząco hamować aktywność mikroflory glebowej między innymi poprzez zdolność do uszkodzania błon komórkowych i denaturacji białek w drobnoustrojach. Wang i in. (2019) badali toksyczny wpływ Cu na mikroorganizmy glebowe i biomasę drobnoustrojów. Stwierdzono, że mikroorganizmy najbardziej podatne na toksyczny wpływ miedzi to bakterie, następnie promieniowce, a najbardziej odporne na stres wywołowany zwiększonym stężeniem miedzi w glebie były grzyby (Alengebawy i in., 2021).

### **3.3.2. Znaczenie biologiczne miedzi u roślin**

Pod względem światowego zużycia we wszystkich gałęziach przemysłu miedź zajmuje trzecie miejsce po stali i aluminium. Miedź w odpowiednio niskich stężeniach jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego rozwoju roślin i produkcji nasion. Jednak w wysokich stężeniach jest uważana za bardzo toksyczny metal. Naturalne stężenie miedzi

w korzeniach jest wyższe niż w pędach, ponieważ za pobieranie jonów Cu z gleby odpowiada system korzeniowy, przy czym najwyższe stężenie Cu występuje w epidermie korzenia (Kopittke i in., 2011). Toksyczność miedzi jest w stanie doprowadzić do obniżenia ilości biosyntezowanego chlorofilu i produktywności roślin poprzez modyfikację procesu fotosyntezy i wpływ na przyswajalność składników pokarmowych co prowadzi do spadku ilości plonów (Adrees i in., 2015).

### **3.4. Nikiel i jego rola w przyrodzie**

Nikiel (Ni) plasuje się na 22 miejscu wśród najbardziej rozpowszechnionych pierwiastków w skorupie ziemskiej i stanowi około 0,008% jej masy (M. B. Hussain i in., 2013). Nikiel ma kilka stopni utlenienia w zakresie od -1 do 4, jednak Ni (II) jest najczęściej występującym stanem utlenienia w systemach biologicznych.

Naturalnie występujące stężenie niklu (Ni) w glebie i wodach powierzchniowych nie przekracza odpowiednio 100 mg/kg i 0,005 mg/L (Shahzad i in., 2018). Jednak działalność człowieka wpływa na zwiększone uwalnianie tego pierwiastka do gleby. Spośród antropogenicznych źródeł możemy wyróżnić: spalanie paliw kopalnych do wytwarzania energii, górnictwo, hutnictwo, emisje z pojazdów, gospodarkę odpadów domowych, komunalnych i przemysłowych, produkcja stali i przemysł cementowy. Ni jest szeroko stosowany jako surowiec w przemyśle metalurgicznym i galwanicznym, jako katalizator w przemyśle chemicznym i spożywczym oraz jako składnik baterii elektrycznych (Salt i in., 2000). Na przestrzeni lat badania gleb w różnych rejonach świata wykazały wzrastające zanieczyszczenie środowiska niklem. Według szacunków na zanieczyszczonych terenach stężenie Ni może sięgać do 26 g/kg w glebie i do 0,2 mg/l w wodach powierzchniowych, czyli 20 do 30 razy więcej niż na obszarach niezanieczyszczonych (Shahzad i in., 2018).

#### **3.4.1. Znaczenie biologiczne niklu dla mikroorganizmów**

Nikiel jest używany jako kofaktor przez kilka dobrze scharakteryzowanych bakteryjnych enzymów, w tym przez ureazę, hydrogenazę (NiFe), dysmutazę nadtlenku niklu, dehydrogenazę tlenku węgla, syntazę/dekarbonylazaę acetylo-CoA,

dioksygenazę reduktonu, a także niektóre formy glioksalazy I. Ponadto opisano aktywności enzymów zależnych od niklu, w tym dehydrogenazę 1-fosforanu glicerolu z *Bacillus pasteurii* i kwercetynazę z gatunku *Streptomyces*. Aby utrzymać nikiel w odpowiednim stężeniu mikroorganizmy w procesie ewolucji wytworzyły mechanizmy pobierania, usuwania a także w przypadku niektórych drobnoustrojów magazynowania tego metalu (Salt i in., 2000).

Do niedawna uważano, że toksyczność niklu wśród mikroorganizmów jest problemem ograniczonym do bakterii bytujących w glebach zanieczyszczonych przez przemysł lub glebach o naturalnie podwyższonym stężeniu niklu. Założenie to zostało jednak obalone, gdy scharakteryzowano system obronny przed niklem (RcnA) w mezofilnych bakteriach *Escherichia coli*. Ponadto domniemane homologi RcnA wykryto u archeonów i innych bakterii. To odkrycie sugeruje, że stres wywołowany obecnością niklu jest powszechnie występującym fizjologicznym problemem mikroorganizmów. Pomimo licznych dobrze opisanych mechanizmów toksyczności niklu wśród wyższych form życia (reakcje oksydacyjne z udziałem lipidów, białek i kwasów nukleinowych, jak również wiązanie z różnymi biomolekułami i zmienianie ich właściwości) mechanizm toksyczności niklu wobec mikroorganizmów jest nieznan i prawdopodobnie będzie różny w zależności od specyficznej fizjologii danej komórki (Macomber i Hausinger, 2011).

### **3.4.2. Znaczenie biologiczne niklu u roślin**

Nikiel jest niezbędnym mikroelementem i odgrywa znaczącą rolę we wzroście i rozwoju siewek. W bardzo małych stężeniach jest niezbędny dla optymalnego wzrostu roślin między innymi dlatego, że jest wymagany do optymalnego funkcjonowania enzymów biorących udział w szeregu procesów fizjologicznych i biochemicznych, począwszy od wzrostu wegetatywnego do zawiązywania nasion (Harish i in., 2008).

Pierwiastek ten w roślinach wyższych jest integralną częścią enzymów kluczowych w procesie asymilacji azotu, takich jak glioksalaza-I i ureaza. Bierze również udział w mechanizmach obronnych roślin wobec stresów biotycznych i abiotycznych. Dlatego niedobór Ni w roślinach może prowadzić do negatywnych skutków takich jak: opóźniony wzrost, starzenie się, zakłócenie metabolizmu azotu i pobierania żelaza (Shahzad i in., 2018).

Ze względu na udział w procesach związanych z asymilacją azotu nikiel jest szczególnie ważnym pierwiastkiem dla roślin bobowatych. Po raz pierwszy kluczowe funkcje Ni w roślinach soi (*Glycin max L. Merrill*) zweryfikował w 1983 Eskew i in., w swoich badaniach udowodnili, że rośliny pozbawione niklu akumulowały toksyczne stężenia mocznika (2,5%) wywołując nekrotyczne zmiany na końcach liści. Działo się tak niezależnie od tego, czy rośliny były suplementowane azotem nieorganicznym, czy też były uzależnione od wiązania azotu atmosferycznego. Pozbawienie dostępu do niklu spowodowało opóźnione tworzenie się brodawek korzeniowych i ograniczenie ich wzrostu od wczesnych stadiów rozwoju. Dodatek niklu (1 mikrogram na litr) do pożywki zapobiegał gromadzeniu się mocznika, martwicy i redukcji wzrostu (Eskew i in., 1983). Niezbędność Ni jako mikroskładnika odżywczego u innych roślin wyższych została potwierdzona, kiedy rośliny jęczmienia (*Hordeumvulgare L.*) uprawiane w kontrolowanych warunkach zubożonych w Ni, nie były w stanie wytworzyć nasion zdolnych do kiełkowania przez trzy kolejne pokolenia (Brown i in., 1987). Przez pewien okres ureaza była uważana za jedyny enzym zawierający nikiel jako niezbędny składnik. Jednak obecnie wiadomo, że istnieje wiele innych enzymów które do prawidłowego funkcjonowania wymagają tego metalu, między innymi: hydrogenaza, dehydrogenaza tlenku węgla, deformylaza peptydowa, syntazaacetylo-S-koenzymu A, reduktaza metylokoenzymu M, dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca Ni (NiSOD), glioksalazy-I. Obecność niklu w odpowiednio niskim stężeniu jest również ważna w procesie biologicznego wiązania azotu w roślinach bobowatych, gdzie Ni jest funkcjonalną częścią hydrogenazy (Ni-Fe), ważnego enzymu biorącego udział w gospodarce H<sub>2</sub>, będącego produktem redukcji N<sub>2</sub>. Potwierdzono również, że suplementacja niklu promuje tworzenie brodawek korzeniowych i aktywność ureazy w soi. Ponadto zwiększenie stężenia Ni z 0,1 do 10 mg/kg w glebie spowodowało wzrost akumulacji azotu w roślinach z 42 do 50% (Shahzad i in., 2018).

Chociaż nikiel jest pierwiastkiem niezbędnym dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania roślin, w wyższych stężeniach jest w stanie powodować szkodliwe zmiany. Nadmiar Ni może wywoływać: spadek wydajności fotosyntezy, zahamowanie wzrostu, chlorozę liści, zaburzenie pobierania składników mineralnych oraz transportu cukrów i gospodarki wodnej, zniekształcenia ultrastruktury liści, jak również zmniejszenie grubości komórek mezofilu, wielkości wiązek naczyniowych, średnicy naczyń i szerokości komórek naskórka liści (Seregin i Kozhevnikova, 2006). Toksyczność Ni znacznie przyczynia się do hamowania wzrostu korzeni roślin. Trudno jednak przedstawić kompleksowy mechanizm

wywołujący ten efekt, ponieważ nikiel wpływa na aktywność kilku innych jonów metali oraz różne szlaki metaboliczne (Baccouch i in., 2001).

### **3.5. Mangan i jego rola w przyrodzie**

Mangan (Mn) to pierwiastek zaliczany do grona metali ciężkich. Posiada 15 izotopów, spośród których trwały jest tylko izotop 55, który stanowi niemal 100% składu izotopowego manganu występującego w naturze. Mangan jest dwunastym najliczniej występującym pierwiastkiem na planecie a jego występowanie obejmuje znaczną ilość skorupy ziemskiej. Naturalne stężenie manganu w glebie waha się od 40 do 900 mg/kg. Pierwiastek wykorzystuje się w różnych gałęziach przemysłu, obecny jest w produktach, takich jak: stal, baterie, pasze dla zwierząt, pigmenty i ceramika (Erikson i Aschner, 2019).

Istnieje wiele grup enzymów, które jako kofaktor wykorzystują mangan, między innymi: oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomeryzy i ligazy. Inne enzymy zawierające mangan to arginaza i dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca mangan (ang. manganese-dependent superoxide dismutase Mn-SOD). Mangan zawiera również odwrotna transkryptaza wielu retrowirusów, z wyjątkiem lentiwirusów, np. HIV (Law i in., 1998). Powszechnie związki manganu uważane są za mniej toksyczne niż związki innych szeroko rozpowszechnionych metali, takich jak między innymi nikiel i miedź (Hasan, 2008).

#### **3.5.1. Znaczenie biologiczne manganu dla mikroorganizmów**

Mangan jest niezbędny do prawidłowego wzrostu wielu bakterii. Na poziomie molekularnym Mn jest kofaktorem różnych enzymów zaangażowanych w metabolizm węglowodanów i kwasów nukleinowych oraz przekazywanie sygnałów. Mangan chroni również komórki przed stresem oksydacyjnym, poprzez rozkład reaktywnych form tlenu (ang. Reactive Oxygen Species ROS) (Waters, 2020).

W większych stężeniach mangan niekorzystnie wpływa na wewnątrzkomórkowe stężenia innych jonów metali, powoduje błędne składanie ważnych regulatorów i enzymów, zwiększa wrażliwość na ROS oraz zmniejsza zjadliwość bakterii (Chandrangsu i in., 2017).

Utrzymanie manganu w optymalnym wewnątrzkomórkowym stężeniu jest więc niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania mikroorganizmów. Bakterie kontrolują wewnątrzkomórkowe poziomy tego pierwiastka za pomocą importerów i eksporterów Mn. Ekspresja białek tych transporterów jest regulowana przez wykrywające Mn czynniki transkrypcyjne i ryboprzełączniki (ang. riboswitches). Po wejściu do komórki Mn wiąże się z różnymi cząsteczkami, w tym z białkami, kwasami nukleinowymi i różnymi metabolitami, znacząco wpływając na funkcjonowanie całego mikroorganizmu (Chandrangsu i in., 2017).

### **3.5.2. Znaczenie biologiczne manganu u roślin**

Mangan pobierany w śladowych ilościach jest integralną częścią kilku kluczowych fizjologicznie właściwości roślin. Związki posiadające w swej budowie ten pierwiastek biorą udział między innymi w procesach: fotosyntezy, łagodzenia uszkodzeń spowodowanych przez reaktywne formy tlenu oraz w procesach redoks. Mangan pozytywnie wpływa na integralność strukturalną i wychwytywanie światła przez blaszki chloroplastów. Nadmierne stężenie wewnątrzkomórkowe tego pierwiastka może prowadzić do negatywnych skutków takich jak: synteza ROS czy antagonizm z podobnymi jonami, w skutek czego niektóre związki nie mogą pełnić swoich funkcji (Fernando i Lynch, 2015). Nadmierna ekspozycja roślin na Mn objawia się chlorozą, ciemnymi inkluzjami i/lub marszczeniem liści.

### **3.6. Kadm i jego rola w przyrodzie**

Kadm (Cd) jest pierwiastkiem chemicznym o masie atomowej 48, wykazującym w większości swoich związków stopień utlenienia +2. Średnie stężenie kadmu w skorupie ziemskiej wynosi od 0,1 do 0,5 ppm.

Pierwiastek ten występuje jako drugorzędny składnik większości rud cynku i jest produktem ubocznym jego produkcji. Kadm był używany przez długi czas jako powłoka odporna na korozję na powierzchni stali. Jego związki są używane jako czerwone, pomarańczowe i żółte pigmenty, do barwienia szkła i plastiku. Ze względu na wysoką toksyczność został szczegółowo wymieniony w europejskiej dyrektywie w sprawie ograniczenia stosowania substancji niebezpiecznych, przez co stopniowo zmniejsza się jego

wykorzystanie na świecie. Akumulatory niklowo-kadmowe zostały zastąpione akumulatorami niklowo-metalowo-wodorkowymi i litowo-jonowymi. Jednym z nielicznych stosunkowo nowych zastosowań kadmu są panele słoneczne z tellurku kadmu (Morrow, 2010). Cd przenika do środowiska w sposób naturalny poprzez erupcje wulkanów, wietrzenie skał i pożary lasów, a najpowszechniejszymi działaniami człowieka powodującymi zanieczyszczenie gleby kadmem są osady ściekowe, nawozy sztuczne, przemysł cementowy oraz przemysł metalurgiczny (Naveed i in., 2020).

Największy wpływ na przyswajalność kadmu mają odczyn gleby i zawartość materii organicznej. Wraz ze spadkiem pH gleby i ilości materii organicznej zwiększa się biodostępność Cd, skutkująca toksycznością wobec roślin i mikroorganizmów.

Chociaż kadm nie pełni żadnej znanej funkcji biologicznej w organizmach wyższych, w okrzemkach morskich wykryto zależną od kadmu anhydrazę węglanową.

### **3.6.1. Znaczenie biologiczne kadmu dla mikroorganizmów**

Kadm charakteryzuje się wysoką toksycznością, nie jest biodegradowalny i przez długi czas utrzymuje się w glebie, przez co następuje jego akumulacja, która może powodować poważne zagrożenie dla bytujących w glebie mikroorganizmów oraz roślin. Zanieczyszczenie kadmem nie tylko wpływa na żyzność gleby, ale także zaburza strukturę społeczności drobnoustrojów i zmniejsza ich bioróżnorodność. Badania prowadzone w ekosystemie użytków rolnych zanieczyszczonych Cd wykazały, że niektóre drobnoustroje tolerujące Cd stają się drobnoustrojami dominującymi, a różnorodność gatunkowa się zmniejsza (Sun i in., 2022).

Kadm interkaluje z DNA, zakłóca główne mechanizmy jego naprawy, takie jak: naprawa pęknięć podwójnej helisy, naprawa niedopasowanych nukleotydów, naprawa wycinanych zasad (Adrees i in., 2015). Pierwiastek ten oddziałuje również z enzymami takimi jak ureaza, kwaśna fosfataza czy dehydrogenaza zmniejszając ich aktywność (Pan i Yu, 2011).

Min Liao wraz ze swym zespołem badali toksyczny wpływ Cd na mikroorganizmy. Ich wyniki wykazały, że kadm wpływa inhibująco na aktywność, wzrost i procesy metaboliczne drobnoustrojów glebowych (Liao i in., 2005). Również wyniki uzyskane przez

zespół Oumenskou (2018) potwierdziły, że Cd jest wysoce mobilny w glebie, co w konsekwencji skutkuje wysoką jego toksycznością, która hamuje aktywność drobnoustrojów i absorbuje materię organiczną w glebie, zmieniając jej właściwości fizykochemiczne.

### **3.6.2. Znaczenie biologiczne kadmu u roślin**

Cd jest pierwiastkiem zbędnym dla wzrostu roślin, łatwo gromadzi się w korzeniach i innych jadalnych ich częściach, powodując zaburzenia metaboliczne, fizjologiczne i biochemiczne poprzez zmniejszoną biosyntezę chlorofilu, zaburzenia w pobieraniu składników odżywczych i w procesie fotosyntezy, co skutkuje zahamowaniem wzrostu roślin i znacznym ograniczeniem produkcji roślinnej (Naveed i in., 2020). Dowiedziono również, że toksyczność Cd, hamuje kiełkowanie nasion, zmniejsza biomasę oraz utrudnia wzrost i rozwój korzeni roślin (Alengebawy i in., 2021).

### **3.7. Łubin wąskolistny i jego mikrosymbionty z rodzaju *Bradyrhizobium***

W zakresie produkcji mięsa, kraje Unii Europejskiej są samowystarczalne – 96% dostępnego mięsa jest produkowane w krajach UE. Zupełnie inną sytuację obserwujemy jeśli chodzi o produkcję białka roślinnego, zwłaszcza pozyskiwanego z soi, które stanowi podstawę żywienia zwierząt w Europie. W 2017 roku tylko 5% zapotrzebowania na soję pochodziło z krajów Unii Europejskiej, co czyni UE największym importerem soi na świecie. W związku z tym produkcja zwierzęca w UE jest w dużym stopniu uzależniona od importowanej soi. Zależność ta jest większa w przypadku zwierząt jednożołądkowych (trzody chlewnej i drobiu) w porównaniu z przeżuwaczami, co naraża system hodowli zwierząt w UE (szczególnie w Polsce, będącej liderem europejskiej produkcji drobiu) na ryzyko związane z wahaniami na światowym rynku soi. Oczekiwany jest wzrost spożycia mięsa i mleka na świecie odpowiednio o 68% i 57% do 2030 r., a w konsekwencji wzrost zapotrzebowania na pasze dla zwierząt, co prawdopodobnie przyczyni się do zmian w dostępności i cenach soi (Abraham i in., 2019).

Rozwiązaniem problemu braku równowagi między podażą a popytem na białka roślinne jest strategia promowania europejskich roślin wysokobiałkowych jako substytutu dla soi. W ostatnich latach konsumenci stają się coraz bardziej świadomi kwestii dotyczących produktów pochodzenia zwierzęcego, takich jak dobrostan zwierząt, ich żywienie (pasze ekologiczne lub niezawierające roślin genetycznie modyfikowanych) oraz wpływ na środowisko. Tendencja ta jest szczególnie zauważalna w przypadku produktów pochodzących od zwierząt karmionych paszami zawierającymi w swym składzie rośliny niemodyfikowane genetycznie. Na przykład w Niemczech w 2012 roku takie pasze stanowiły tylko 9% wszystkich pasz dla bydła, podczas gdy w 2017 roku było to już ponad 40%. Ponadto ekologiczna produkcja zwierzęca w UE stale rośnie. Stosowanie pasz modyfikowanych genetycznie jest niedozwolone w rolnictwie ekologicznym. Jednak dostępność soi niemodyfikowanej genetycznie jest bardzo niska, a cena bardzo wysoka. W związku z tym zainteresowanie rodzimymi roślinami wysokobiałkowymi, w tym łubinami, stale wzrasta (Abraham i in., 2019).

Obok łubinu żółtego, łubin wąskolistny jest najczęściej uprawianym gatunkiem z rodzaju *Lupinus*. Jest on uprawiany głównie, jako roślina pastewna wykorzystywana w żywieniu zwierząt lub rotacyjna ze zbożami. Do wzrostu zainteresowania łubinem oprócz sytuacji na rynku roślin wysokobiałkowych w ostatnich latach przyczyniło się także wyselekcjonowanie odmian tej rośliny o polowej odporności na antraknozę oraz obniżenie poziomu alkaloidów w nasionach. Przełomem w badaniach nad łubinem wąskolistnym było wyprowadzenie przez badaczy rekombinowanych linii wsobnych RILs, umożliwiających opracowanie map genetycznych jak i zsekwencjonowanie genomów niektórych odmian (Galek i in., 2019).

Łubin wąskolistny jest często stosowany jako składnik paszy dla zwierząt hodowlanych, takich jak krowy, owce, konie i trzoda chlewna. Jeśli chodzi o wartości odżywcze, jest bogatym źródłem białka, zawierając około 35-40% białka w suchej masie. Białka te są wysokiej jakości, ponieważ zawierają wszystkie niezbędne aminokwasy, w tym lizynę, metioninę i treoninę. Dodatkowo są łatwo przyswajalne przez zwierzęta i mają wysoką wartość biologiczną co jest szczególnie ważne w żywieniu młodych zwierząt, które potrzebują dużych ilości białka do wzrostu i rozwoju. Łubin wąskolistny jest również dobrym źródłem błonnika, witamin i minerałów. Ich zawartości w łubinie wąskolistnym mogą się różnić w zależności od warunków uprawy i metod przetwarzania. Według badań, *L. angustifolius* jest bogaty w witaminę A, witaminę E, witaminę B, kwas foliowy oraz

minerały takie jak magnez, fosfor, potas, wapń, żelazo, miedź i cynk (Bartkiene i in., 2016). Jest również źródłem przeciwutleniaczy i flawonoidów, które posiadają kilka ważnych właściwości w żywieniu zwierząt takich jak:

- Właściwości antyoksydacyjne: flawonoidy mają silne właściwości antyoksydacyjne, co oznacza, że pomagają neutralizować szkodliwe wolne rodniki, które mogą uszkadzać komórki i prowadzić do chorób.
  - Właściwości immunomodulacyjne: flawonoidy mogą pomagać w regulacji odporności organizmu zwierzęcia, co może przyczyniać się do lepszego zdrowia i mniejszej podatności na choroby.
  - Właściwości przeciwzapalne: flawonoidy mogą hamować procesy zapalne, co może pomóc w zapobieganiu lub leczeniu chorób związanych ze stanami zapalnymi, takimi jak choroby układu trawiennego czy choroby skóry.
  - Wpływ na układ hormonalny: niektóre badania sugerują, że flawonoidy mogą mieć pozytywny wpływ na układ hormonalny zwierząt, co może przyczyniać się do lepszego funkcjonowania układu rozrodczego i produkcji mleka.
  - Wpływ na trawienie: flawonoidy mogą pomagać w trawieniu, poprzez stymulację produkcji soków trawiennych i poprawę motoryki przewodu pokarmowego.
- (Kalantar, 2018).

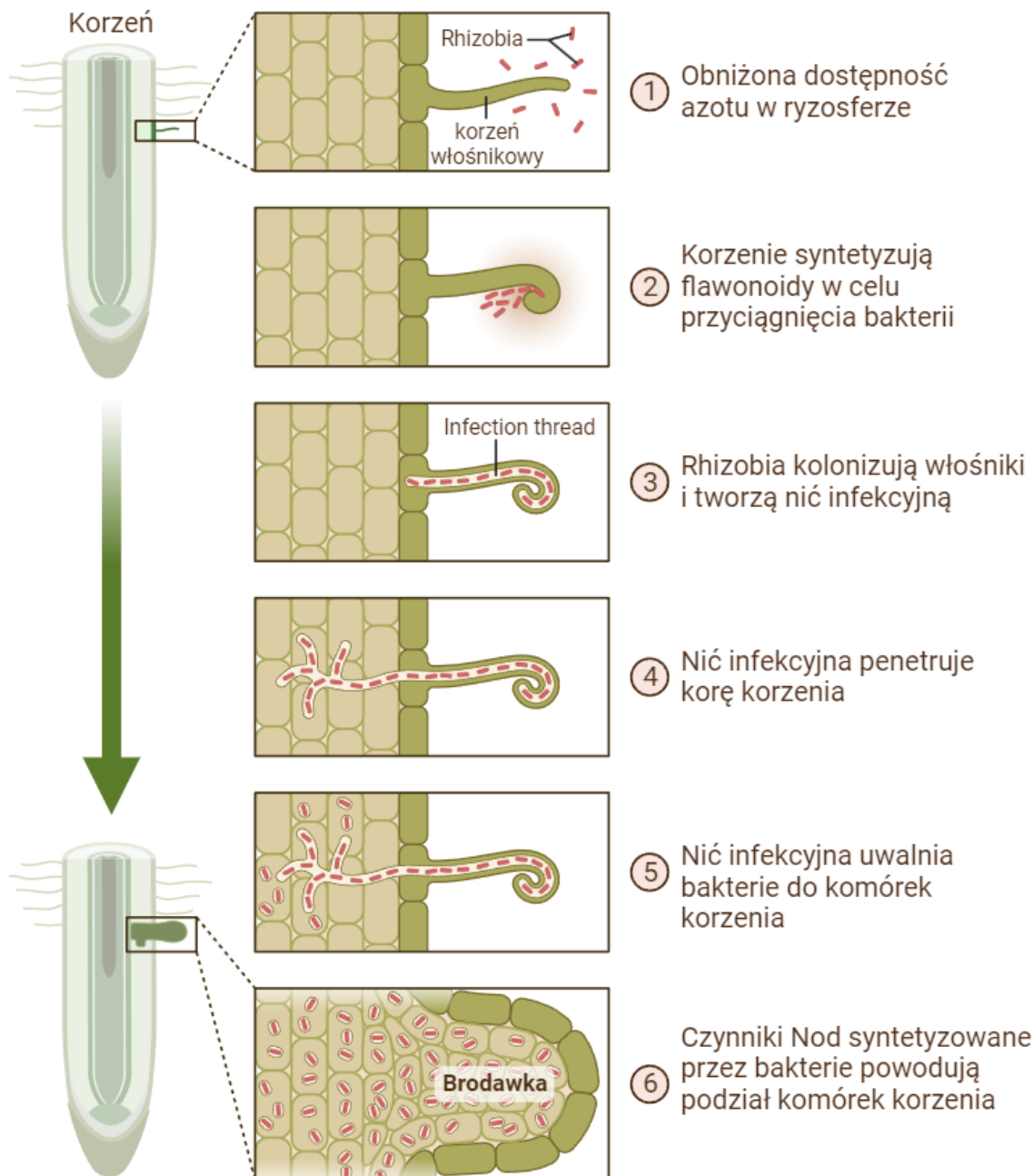
Łubin wąskolistny jest rośliną z rodziny bobowatych i jego składnik białkowy - lupanina jest trujący dla ludzi i zwierząt. Dlatego też przed dodaniem łubinu do paszy dla zwierząt, powinien on być odpowiednio przetworzony (np. gotowanie, fermentacja, ekstrakcja) aby usunąć lupaninę.

Szacuje się że w 2017r. światowa produkcja łubinu wyniosła około 1 610 969 ton, a powierzchnia upraw około 930 717 ha. Odsetek światowej produkcji przypadającej na Europę znacznie wzrósł z 17,6% w 2013 r. do 29% w 2017r. sprawiając, że Europa zajmuje drugie miejsce za Oceanią, która jest największym producentem, z odpowiednio 64% światowej produkcji i 55% światowych obszarów upraw łubinu. *L. angustifolius* jest głównym gatunkiem uprawnym w Australii i Europie północnej, natomiast w Europie południowej dominuje *L. albus*. Oczekuje się, że pojawienie się odmian z lepszą tolerancją na szereg stresów abiotycznych (gleby wapienne, susze, sporadyczne przymrozki itp.) rozszerzy uprawę łubinu na tereny o szerszym spektrum warunków rolno-klimatycznych w całej Europie. Inną kluczową kwestią jest rozwój adaptacyjnych szczepów mikrosymbiontów

łubinu wąskolistnego z rodzaju *Bradyrhizobium*, które sprzyjają lepszemu wzrostowi i wydajności tych roślin (Abraham i in., 2019)

*Bradyrhizobium spp.* to rodzaj Gram-ujemnych tlenowych lub fakultatywnie beztlenowych, nie tworzących przetrwalników bakterii z rodziny *Bradyrhizobiaceae*. Są jednymi z kilku rodzajów bakterii wiążących azot, zdolnych do tworzenia brodawek w korzeniach roślin bobowatych. Szczepy *Bradyrhizobium* były wcześniej określane jako wolno rosnące bakterie z rodzaju *Rhizobium* i dopiero w 1982 r. zostały wyodrębnione jako niezależny rodzaj. Rosnące zainteresowanie tymi bakteriami doprowadziło do znacznego wzrostu liczby sklasyfikowanych gatunków w ostatnich latach. Obecnie publicznie dostępne są genomy setek szczepów *Bradyrhizobium spp.* *Bradyrhizobia* mają charakterystycznie duży genom, który składa się z nukleoidu wraz z kilkoma plazmidami, wśród których brak jest plazmidów symbiotycznych. Jedynym wyjątkiem jest szczep *Bradyrhizobium sp.* DOA9, posiadający jeden plazmid symbiotyczny (Okazaki i in., 2015). W chromosomach *Bradyrhizobium* znajdują się natomiast wyspy symbiotyczne, na których znajdują się loci genów *nod* i *nif* biorących udział odpowiednio w tworzeniu brodawek i wiązaniu azotu atmosferycznego. Istnieje duża różnorodność genów nodulacji *nod*, a filogenezy tych genów wskazują na powszechnie występujący pionowy, a także poziomy transfer tych genów między *Bradyrhizobiami*. Warto zauważyć, że wśród *Bradyrhizobium spp.* znajdują się szczepy bakterii fotosyntetyzujących, które nie potrzebują czynników Nod do indukowania powstawania brodawek, co otworzyło nowy obszar badań układów symbiotycznych (Ormeño-Orrillo i Martínez-Romero, 2019).

Różne gatunki *Bradyrhizobium* są głównymi mikrosymbiontami ważnych dla rolnictwa roślin bobowatych, takich jak soja, fasola, orzacha podziemna czy łubin. Inne szczepy zostały wyizolowane z brodawek wielu roślin bobowatych strefy tropikalnej i umiarkowanej. Co więcej, badania wykazały, że niektóre szczepy bakterii z tego rodzaju mogą tworzyć symbiotyczne układy z korzeniami roślin niebędących bobowatymi, takimi jak ryż, kukurydza czy nawet sosna. Tego rodzaju zdolność świadczy o wysokiej zdolności do adaptacji i symbiotycznej wszechstronności (Chaintreuil i in., 2000; Tan i in., 2001).



**Ryc. 3. Proces powstawania brodawki korzeniowej**

Główne etapy powstawania brodawki korzeniowej od rozpoznania rośliny żywicielskiej przez bakterie do uformowania dojrzałej brodawki

Proces brodawkowania korzeni łubinu przez bakterie *Bradyrhizobium spp.* jest procesem złożonym i wieloetapowym (Ryc. 3). Rozpoczyna się on od rozpoznania rośliny gospodarza przez bakterie dzięki wydzielanym przez bobowate do ryzosfery związkom o charakterze fenolowym, głównie flawonoidów, które mogą biernie dyfundować przez błonę bakteryjną. Po recepcji sygnałów flawonoidowych, dochodzi do aktywacji bakteryjnych genów nodulacji (np. *nodA*), które kodują enzymy biorące udział w syntezie lipochitooligosacharydów niezbędnych do rozwoju brodawek zwanych czynnikami Nod,

które są odbierane przez roślinę. Cząsteczki te indukują tworzenie się włośników i indukują podziały komórkowe kory korzenia, będące początkiem organogenezy brodawek. Następnie bakterie kolonizują włośniki i tworzą nić infekcyjną, która jest wyspecjalizowaną strukturą umożliwiającą bakteriom penetrację komórek roślinnych i dotarcie do kory korzenia. Po wnikięciu do korzenia bakterie indukują tworzenie zawiązka brodawki, który rozwinię się w dojrzałą brodawkę, w której bakterie kontynuować będą namnażanie i różnicowanie w bakteroidy, będące formą bakterii zdolną do biologicznego wiązania azotu (Pudełko i in., 2017). Wewnątrz brodawki bakteroidy otoczone są błoną pochodzenia roślinnego która izoluje je od cytozolu rośliny. Bakterie wykorzystują związki dostarczane przez roślinę do produkcji energii niezbędnej do wiązania azotu atmosferycznego i przekształcania go w amoniak, który jest następnie transportowany przez błonę okołobakteryjną do cytozolu rośliny.

Poza przekształcaniem azotu atmosferycznego w formy biodostępne dla roślin, *Bradyrhizobia* przyczyniają się do ich wzrostu również poprzez czynny udział w rozkładzie związków chemicznych obecnych w glebie na formy, które są łatwiej dostępne dla roślin. *Bradyrhizobia* mają również zdolność do syntezy i zewnątrzkomórkowego wydzielania metabolitów wtórnych, które mogą indukować wzrost roślin a także pomagać w ochronie przed chorobami i stresem abiotycznym.

Podczas symbiozy rizobiów z roślinami bobowatymi, istotną rolę odgrywają również zewnątrzkomórkowe polisacharydy (EPS ang. Extracellular Polymeric Substance). Są to bakteryjne heteropolimery, często specyficzne dla danego rodzaju lub gatunku, których powtarzające się podjednostki zbudowane są z monosacharydów, takich jak D-glukoza, D-galaktoza, D-mannoza, L-ramnoza, kwas D-glukuronowy i kwas D-galaktouronowy. Dodatkowo, główny rdzeń podjednostki EPS jest modyfikowany podstawnikami niecukrowymi takimi jak reszty acetylowe, metylowe, pirogronianowe, czy bursztynylowe, które determinują kwasowy charakter polimeru (Janczarek i Skorupska, 2007, 2011). W pierwszych etapach interakcji roślina – komórka bakteryjna, polisacharydy te powodują supresję reakcji obronnej gospodarza roślinnego umożliwiając mikrosymbiontom infekcję komórek włośników korzeniowych. Dodatkowo chronią bakterie przed wolnymi rodnikami tlenowymi; stanowią istotny składnik nici infekcyjnej oraz oddziałują z lektynami obecnymi na korzeniach rośliny, co pozytywnie wpływa na wiązanie się bakterii do ich powierzchni (Fujishige i in., 2006). Jednym z genów kodujących białko zaangażowane w biosyntezę EPS jest gen *exoR* odpowiedzialny za syntezę regulatora biosyntezy egzopolisacharydów ExoR.

Wytworzenie oraz funkcjonowanie układu symbiotycznego jest zależne od żelaza. Pierwiastek ten jest potrzebny do wytworzenia brodawek oraz syntezy leghemoglobiny, kompleksu azotazy, ferredoksyny i innych białek transportujących elektrony w celu pobudzenia układu azotaz podczas symbiozy. *Bradyrhizobium* dzięki zdolności do biosyntezy sideroforów posiadają właściwości wychwytywania żelaza co dodatnio koreluje ze wzrostem ryzosferycznym i skutecznością tworzenia się brodawek u roślin bobowatych (Ahemad i Saghir Khan, 2011).

Siderofory to niskocząsteczkowe związki organiczne o właściwościach chelatujących jony metali. Charakteryzują się one stosunkowo wysokim powinowactwem do pierwiastków, takich jak: żelazo, glin, kadm, miedź, ołów czy cynk oraz małą selektywnością. Dzięki temu jony metali ciężkich, w tym żelaza mogą być w prosty sposób pobierane przez rośliny jak i bakterie. Zdolność do wytwarzania sideroforów pomaga w utrzymaniu roślin oraz rizobiów w glebach z deficytem tego pierwiastka (Lesueur i in., 1995). Wykazano, że szczep *Rhizobium sp.* dzięki biosyntezie sideroforów zwiększa biodostępność jonów cynku oraz niklu roślinom bobowatym (Wani i in., 2007). Gdy gen *fegA* z jego natywnym promotorem sklonowano i przeniesiono do *Mesorhizobium sp.* GN25, transkoniuganty stały się bardziej wydajne symbiotycznie, co wskazuje na istotny wpływ sideroforów w symbiozie rizobiów z roślinami bobowatymi (Benson i in., 2005).

Niektóre szczepy z rodzaju *Bradyrhizobium* są zdolne do wytwarzania kwasu indolilo-3-octowego (IAA), który jest najbardziej aktywnym fitohormonem w klasie auksyn i jest niezbędny do wzrostu i rozwoju roślin, w tym podziału i wydłużania komórek, różnicowania tkanek, inicjacji wierzchołka wzrostu korzenia i ruchów fototropicznych (Duca i in., 2014). U dwuliściennych IAA indukuje tworzenie korzeni bocznych, a u jednoliściennych wywołuje powstawanie korzeni przybyszowych (McSteen, 2010). Bakteryjny IAA stymuluje tworzenie się włośników, jednocześnie zwiększając liczbę i długość korzeni (bocznych i głównego). Kwas indolilo-3-octowy odgrywa również rolę cząsteczki sygnałowej w interakcjach roślin-drobnoustrój. Szczególnie między roślinami bobowatymi a bakteriami brodawkującymi IAA odpowiada za utrzymanie związku symbiotycznego (Malhotra i Srivastava, 2009).

Ze względu na korzystny wpływ na wzrost roślin *Bradyrhizobia* są zaliczane do grupy PGPR. PGPR to bakterie bytujące w ryzosferze, które mogą wspomagać wzrost roślin poprzez różnorodne mechanizmy, takie jak:

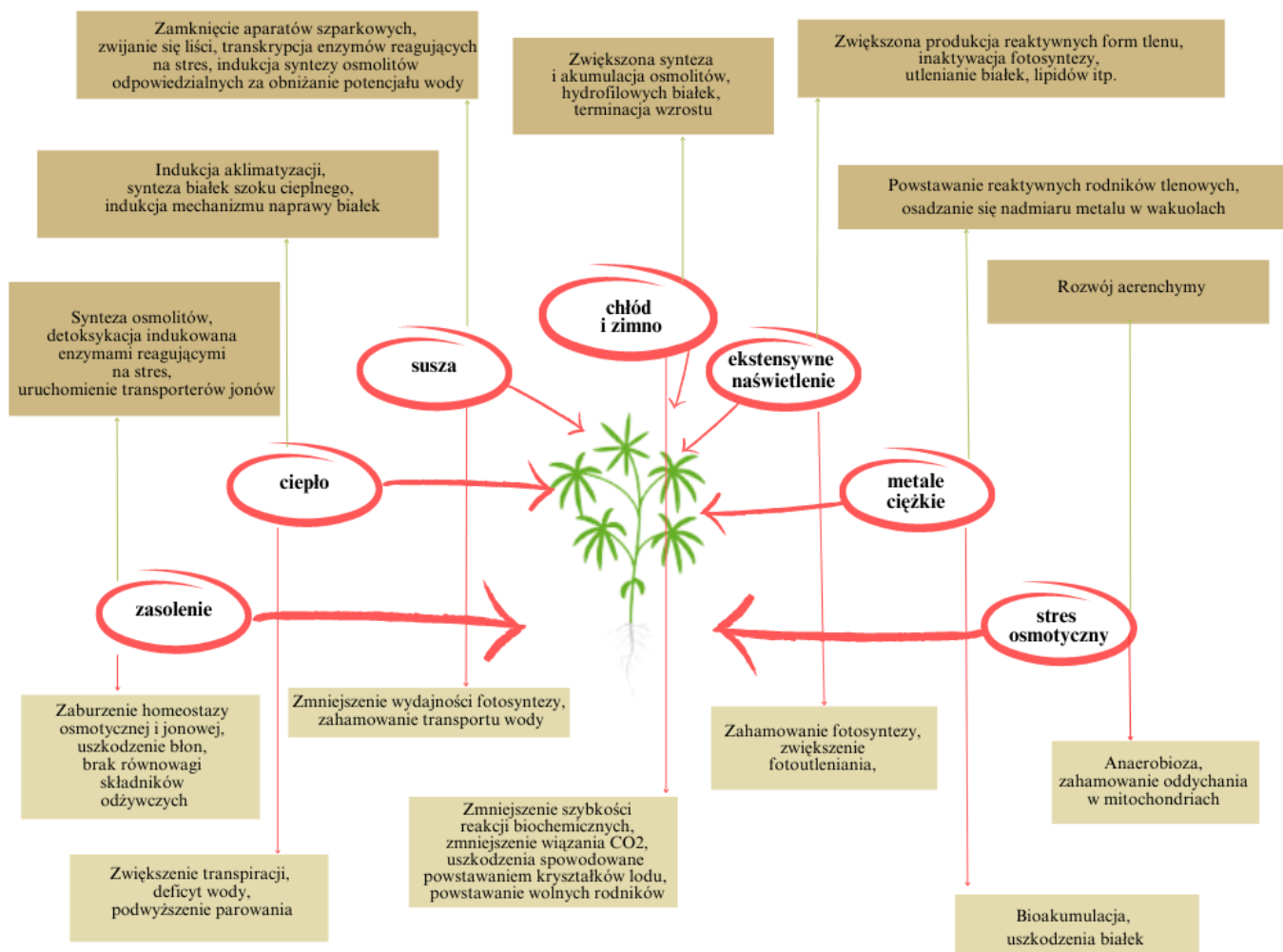
- solubilizacja fosforanów,

- biosynteza sideroforów,
- biologiczne wiązanie azotu,
- biosynteza deaminazy 1-aminocyklopropano-1-karboksylianowej (ACCd),
- interferencja sygnału quorum sensing (QS) i hamowanie tworzenia biofilmu,
- biosynteza fitohormonów,
- wytwarzanie lotnych związków organicznych,
- indukowanie odporności ustrojowej,
- sprzyjanie korzystnym symbiozom roślin z drobnoustrojami,
- ingerencja w biosyntezę toksyn patogenów itp.

Potencjał PGPR w rolnictwie stale wzrasta ponieważ oferują one atrakcyjną alternatywę dla nawozów chemicznych, pestycydów i innych sztucznych dodatków stosowanych w rolnictwie. Substancje produkowane w dużych ilościach przez te mikroorganizmy, stymulujące wzrost roślin mogą mieć również wpływ na ich ogólną morfologię. Niedawny postęp w zrozumieniu różnorodności PGPR w ryzosferze wraz z ich zdolnością do kolonizacji i mechanizmem działania, powinien ułatwić ich zastosowanie, jako ważnego elementu w prowadzeniu zrównoważonego systemu upraw.

### **3.8. Mechanizmy adaptacyjne roślin na stres abiotyczny**

Od momentu pojawienia się na Ziemi rośliny lądowe żyją warunkach, w których występuje wiele czynników fizycznych, mechanicznych lub chemicznych, niesprzyjających ich rozwojowi. Spośród wielu możemy wyróżnić czynniki zaliczane do grupy stresów abiotycznych: niską lub wysoką temperaturę, niedobór lub nadmiar wody, wysokie zasolenie, niedobór składników odżywczych, obecność metali ciężkich czy promieniowanie ultrafioletowe (UV). Ze względu na niezdolność roślin do przemieszczania się, stesy te, stanowią poważne zagrożenie dla rolnictwa, powodując duże straty w plonach. Niedawny postęp w zrozumieniu mechanizmów molekularnych leżących u podstaw reakcji roślin na stesy abiotyczne, uwidoczniał ich wielopoziomowy charakter i złożoność. W odpowiedzi na dany stres często zaangażowanych jest wiele procesów, na różnych poziomach w tym: wykrywanie, sygnalizacja, transkrypcja, translacja i potranslacyjne modyfikacje białek (Ryc. 4).



**Ryc. 4. Różne stresy abiotyczne i roślinne mechanizmy obronne wobec nich**

Na czerwono zaznaczono czynniki stresowe, poniżej rośliny wypisano efekty oddziaływania danego czynnika, powyżej rośliny wypisano mechanizmy obronne indukowane danym czynnikiem

Chociaż konsekwencje upałów, suszy, zasolenia i zimna są różne, reakcje biochemiczne wydają się mniej więcej podobne. Wysokie natężenie światła i toksyczność wywoływana obecnością metali ciężkich również powodują podobne skutki, natomiast stres powodowany nadmiarem wody prowadzi do charakterystycznych reakcji zwyrodnieniowych. Nadmiar wody inicjuje u roślin dotkniętych tym stresem abiotycznym rozwijanie się aerenchymy, aby mogły one poradzić sobie w warunkach beztlenowych. Jest zatem jasne, że strategie adaptacyjne roślin wobec różnych stresów abiotycznych w zależności od presji mogą być analogiczne. Może to stanowić ważny klucz do budowania strategicznej tolerancji na połączone stresy abiotyczne w roślinach uprawnych.

Temperatura jest jednym z ważnych czynników utrzymania metabolizmu komórkowego, a jej wzrost powyżej poziomu optymalnego odbierany jest przez rośliny jako stres cieplny. W odróżnieniu do szoku cieplnego, który jest przejściowym wzrostem temperatury o ok. 10°C do 15°C, stres cieplny jest kombinacją złożonych procesów, uwzględniających czas trwania i tempo wzrostu temperatury powyżej poziomów optymalnych, które często doprowadzają rośliny do nieodwracalnych szkód. Nadmiar ciepła może zakłócić homeostazę komórkową, prowadząc do opóźnienia wzrostu, a nawet obumierania roślin stanowiąc jedno z głównych zagrożeń dla produkcji roślinnej na całym świecie. Wzrost średniej temperatury w strefie umiarkowanej może prowadzić do geograficznej redystrybucji gatunkowej i zmian w sezonach wegetacyjnych upraw ważnych dla rolnictwa, takich jak ryż, pszenica i kukurydza. Odpowiedź rośliny na stres cieplny obejmuje złożone mechanizmy regulacji fizjologicznej (między innymi zmiany w procesie fotosyntezy, termostabilności błony komórkowej czy uszkodzenia oksydacyjne), transkrypcyjnej i posttranskrypcyjnej (niekodujące RNA) oraz regulacji epigenetycznej (metylacja DNA, modyfikacja histonów i przebudowa chromatyny) (Zhao i in., 2020).

Również pod wpływem innych stresów abiotycznych rośliny wykazują szerokie spektrum odpowiedzi na poziomie molekularnym, komórkowym jak i ogólnoustrojowym. Należą do nich zmiany morfologiczne i rozwojowe między innymi: modyfikacja długości, struktury i funkcji korzeni, aby np. poprawić ich zdolność do pobierania wody z gleby (Xiong i Zhu, 2002). Niektóre rośliny rozwijają głębokie korzenie, aby wykorzystać źródła wody znajdujące się głębiej w glebie, podczas gdy inne rozwijają korzenie powierzchniowo, aby wykorzystać akumulację wody z opadów atmosferycznych. Rośliny są również w stanie wpływać na transport jonów oraz zmiany w metabolizmie. Odpowiedzi te mogą być wyzwalane przez pierwotne sygnały stresu abiotycznego, lub mogą wynikać z wtórnych sygnałów. Wtórnymi sygnałami mogą być fitohormony (np. kwas abscysynowy, etylen), reaktywne formy tlenu i wewnątrzkomórkowe, wtórne przekaźniki (np. fosfolipidy). Niektóre z tych wtórnych sygnałów, wywołując odpowiedź nie ograniczają się do miejsc wyeksponowanych na stres, a ich zdolność do przemieszczania się do innych części organizmu przyczynia się do koordynacji reakcji całej rośliny na warunki stresowe. Na przykład, pod wpływem stresu związanego z suszą, kwas abscysynowy pochodzący z korzeni może być transportowany wraz z przepływem transpiracyjnym, aby regulować otwory szparkowe w liściach (He i in., 2018).

Bardzo ważnym czynnikiem dla rozwoju i przystosowania roślin do zmieniających się warunków środowiskowych oraz dla ochrony ich integralności strukturalnej i metabolicznej jest ich (w tym łubinów) zdolność, do syntezy flawonoidów. Oprócz wspomnianych wcześniej pozytywnych właściwości w żywieniu zwierząt oraz pełnionej funkcji w procesie tworzenia układów symbiotycznych, ta grupa związków chemicznych pełni wiele istotnych funkcji dla roślin.

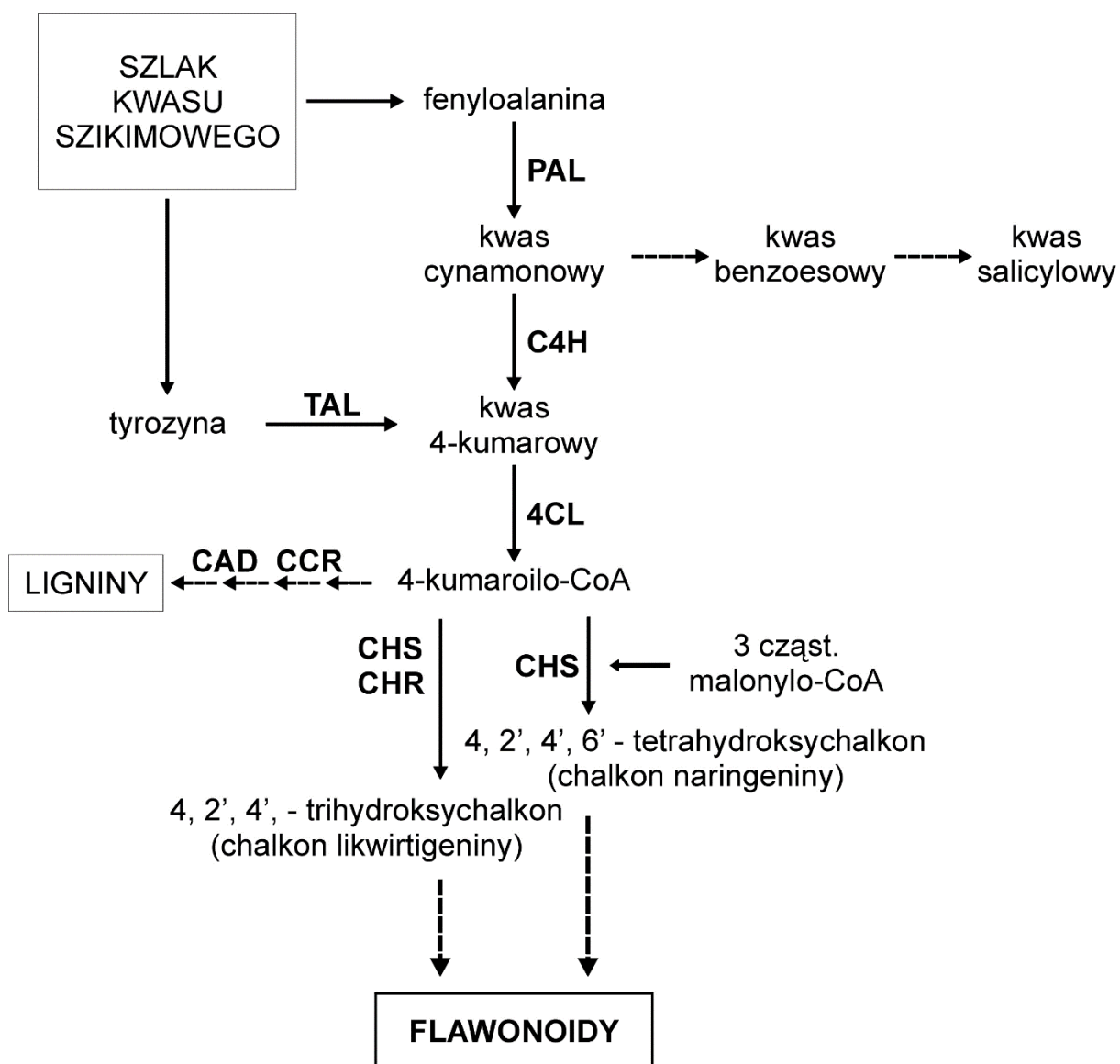
Flawonoidy są syntetyzowane przez komórki roślinne w określonych miejscach i kontrolują różne czynności fizjologiczne, takie jak kiełkowanie zarodników i nasion, a także wabienie zapylaczy (rozwój zapachu i koloru kwiatów, wzrost siewek) (Shomali i in., 2022).

Te wtórne metabolity uczestniczą w procesach obronnych, inicjując określone działania biologiczne w celu ochrony rośliny przed wpływem różnorodnych stresów. Udowodniono wzmożoną syntezę oraz gromadzenie flawonoidów w roślinach w odpowiedzi na różne stresy abiotyczne, w tym temperaturę, ciepło, zamarzanie, światło, promieniowanie UV, niedobór azotu, niedobór fosforanów i suszę. Dodatkowo ze względu na fakt iż posiadają właściwości przeciwutleniające, flawonoidy mogą usuwać reaktywne formy tlenu (ROS) biorąc czynny udział w odpowiedzi na stres oksydacyjny (Baskar i in., 2018). Flawonoidy biorą również udział w odpowiedzi na stres związany z obecnością w środowisku metali ciężkich. Zgodnie z danymi literaturowymi, antyoksydacyjna rola flawonoidów jest jednym z branych pod uwagę, udokumentowanych mechanizmów łagodzenia stresu wywołanego metalami ciężkimi u roślin. Preinkubacja sadzonek łubinu przez 48h z flawonoidami osłabiła niekorzystne skutki stresu ołowiowego. Wobec stresu wywołanego obecnością jonów ołowiu udokumentowano między innymi zwiększony wzrost korzeni, zmniejszoną akumulację ROS oraz inicjację peroksydacji lipidów w roślinach inkubowanych z flawonoidami w porównaniu z kontrolą bez flawonoidów (Shomali i in., 2022).

Flawonoidy powstają z fenyloalaniny w szlaku fenylopropanoidowym (Ryc. 5), podczas gdy fenyloalanina jest syntetyzowana w szlaku szikimowym. W pierwszych trzech etapach szlaku fenylopropanoidowego fenyloalanina, aminokwas aromatyczny, jest przekształcana w p-kumaroilo-CoA poprzez aktywność amoniako-liazy fenyloalaninowej (PAL), 4-hydroksylazy kwasu cynamonowego (C4H) i ligazy 4-kumaranu: CoA (4CL). PAL katalizuje pierwszy etap w szlaku fenylopropanoidowym, a mianowicie deaminację fenyloalaniny do kwasu trans-cynamonowego (Narożna i Mądrzak, 1999). Ponadto PAL odgrywa kluczową rolę w pośredniczeniu w przepływie węgla z metabolizmu pierwotnego do

wtórnego w roślinach (Liu i in., 2021). Drugi etap szlaku fenylopropanoidowego obejmuje aktywność C4H, monooksygenazy cytochromu P450 w roślinach, która katalizuje hydroksylację kwasu trans-cynamonowego w celu wytworzenia kwasu p-kumarowego. Jest to również pierwsza reakcja utleniania na szlaku syntezy flawonoidów. W trzecim etapie szlaku fenylopropanoidowego 4CL katalizuje tworzenie p-kumarylo-CoA przez dodanie jednostki koenzymu A (CoA) do kwasu p-kumarowego. U roślin aktywność 4CL jest dodatnio skorelowana z zawartością antocyjanów i flawonoli w odpowiedzi na stres, podczas gdy PAL, C4H i 4CL są często syntetyzowane w skoordynowany sposób (Mizutani i in., 1997). Te trzy pierwsze etapy szlaku fenylopropanoidowego są wspólne dla wszystkich dalszych metabolitów, takich jak flawonoidy, ligniny, stilbeny, aurony, flawony, izoflawony, flawonole, flobafeny, proantocyjanidyny i antocyjany - oraz cztery ważne metabolity pośrednie, a mianowicie chalkony, flawanony, dihydroflawonole i leukoantocyjanidyny.

Wejście p-kumarylo-CoA na szlak biosyntezy flawonoidów stanowi początek syntezy określonych flawonoidów, który zaczyna się od powstania cząsteczki chalkonu. Jedna cząsteczka p-kumarylo-CoA i trzy cząsteczki malonylo-CoA, pochodzące z acetylo-CoA poprzez aktywność karboksylazy acetylo-CoA (ACCasa), generują chalkon naringeniny (4,2',4',6'-tetrahydroksychalkon (THC)) poprzez działanie syntazy chalkonowej (CHS) (Narożna i Mądrzak, 1999). CHS, jest kluczowym i pierwszym enzymem ograniczającym szybkość w szlaku biosyntezy flawonoidów. Reduktaza chalkonowa (CHR), działa na związek pośredni reakcji CHS, katalizując jego dehydroksylację C-6', dając izoliquiritigeninę (4,2',4'-trihydroksychalkon (chalkon likwiritigeniny)). Chalkon jest pierwszym kluczowym produktem pośrednim w szlaku metabolicznym flawonoidów, zapewniającym podstawowy szkielet do dalszej syntezy flawonoidów (Liu i in., 2021).



**Ryc. 5. Szlak biosyntezy fenylopropanoidów**

Uproszczony schemat szlaku biosyntezy fenylopropanoidów. Strzałki - przerywana linia – odgałęzienia szlaku biosyntezy fenylopropanoidów, prowadzące do powstania uniwersalnych dla roślin metabolitów wtórnych

### 3.9. Mechanizmy adaptacyjne rizobów na stres abiotyczny

Dla odpowiedniego wzrostu mikroorganizmów, muszą być spełnione odpowiednie warunki. Spośród nich wyróżnić możemy:

- Odpowiednią temperaturę (dla rizobów optymalna temperatura wzrostu wynosi 25-30°C) (Chen i in., 2002).
- Odpowiednia dostępność wody zapewniająca niezbędny turgor w komórkach.
- Zapewnienie określonego mikrośrodowiska przez cytoplazmę (jej gęstość i skład jonów), pozwalającego na stabilizację aktywności białek – w tym enzymów (Fiedurek i Trytek, 2016).
- optymalne pH (dla wzrostu rizobów zawiera się w przedziale pomiędzy 6,0 a 7,0) (Hungria i Vargas, 2000).
- Równowaga składników odżywczych w glebie - przypuszcza się, że blisko 40% powierzchni uprawnej ziemi ma zbyt wysoką zawartość soli, co znacznie ogranicza przeżywalność rizobów, produktywność roślin oraz proces efektywnej symbiozy (Mohammadi i in., 2012).

Abiotyczne czynniki stresogenne bezpośrednio wpływając na warunki wymienione powyżej, w znaczny sposób przyczyniają się do ograniczenia wzrostu i prawidłowego funkcjonowania mikroorganizmów, wywołując szereg zmian na poziomie molekularnym i fizjologicznym. Dotychczasowe badania wskazują, iż rizobia największą wrażliwość wykazują wobec, skrajnie niskich lub wysokich temperatur, niskiego poziomu opadów atmosferycznych, dużego stopnia zakwaszenia, suszy oraz niedoboru składników odżywczych. Aby przetrwać w niekorzystnych warunkach rizobia wykształciły szereg mechanizmów adaptacyjnych, pozwalających niwelować wpływ ekspozycji na czynniki stresowe oraz zachować zdolność do nawiązywania interakcji symbiotycznych z roślinami (Kopycińska, 2020).

Do najważniejszych mechanizmów obronnych zaliczyć można:

- biosynteza oraz sekrecja do otoczenia wyspecjalizowanych związków,
- tworzenie biofilmu,
- dyfuzja wody oraz związków czynnych przez błonę,

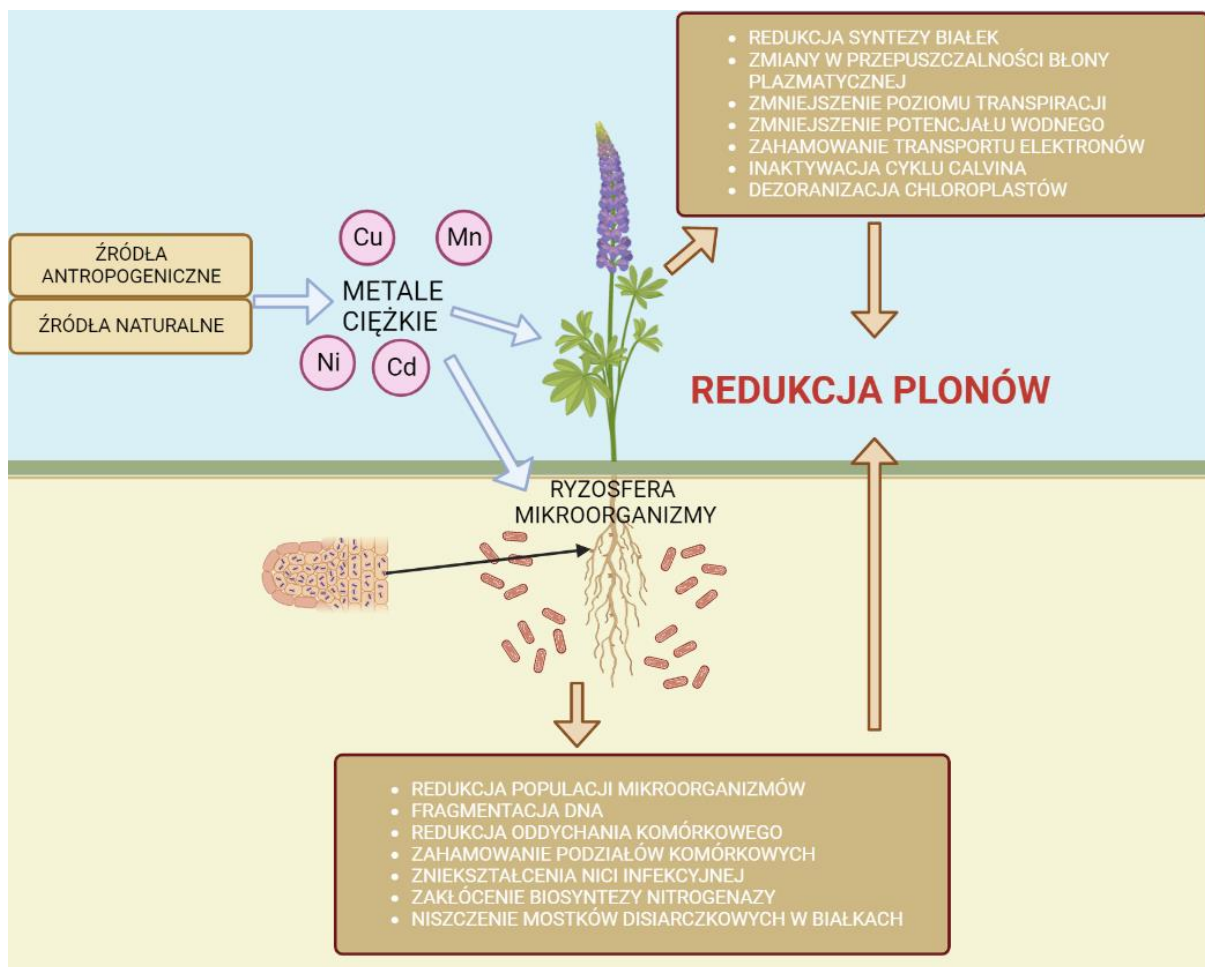
- obecność specyficznych kanałów wodnych, pomp błonowych, umożliwiającą transport związków i pierwiastków,
- akumulację niskocząsteczkowych związków organicznych,
- synteza specyficznych białek np. HSP (ang. Heat Shock Proteins) lub ASP (ang. Acid Shock Proteins),
- transkrypcja genów oporności na dany stres (w przypadku metali ciężkich np. *cueA*)
- synteza związków chelatujących.

Trehaloza, zwana także tremalożą lub mykozą, to nieredukujący disacharyd, który jest szeroko rozpowszechniony w układach biologicznych: bakteriach, drożdżach, grzybach, roślinach niższych i wyższych, a także owadach i bezkręgowcach, a jej funkcja jest związana z tolerancją na liczne stesy abiotyczne. W przypadku mikroorganizmów trehaloza działa jako źródło energii na pewnych etapach rozwoju. Wiadomo, że u organizmów anhydrobitycznych trehaloza gromadzi się w wysokich stężeniach, aby przetrwać całkowite odwodnienie, chroniąc błony komórkowe podczas okresu suszy. U *E. coli* trehaloza chroni przed stresem wywoływanym niskimi temperaturami, prawdopodobnie poprzez stabilizację błon komórkowych i zapobieganie denaturacji białek, podczas gdy u *S. cerevisiae* odgrywa istotną rolę w budowaniu tolerancji osmotycznej, cieplnej i tolerancji na wysychanie, dodatkowo biorąc udział w neutralizowaniu wolnych rodników. (Iordachescu i in., 2011)

U bakterii trehaloza syntetyzowana jest w szlaku syntazy trehalozy (TreS). Szlak TreS to odwracalna reakcja transglikozylacji, podczas której syntaza trehalozy, kodowana przez gen *treS* przekształca disacharyd maltozę, w trehalozę. (Paul i in., 2008)

### **3.10. Wpływ metali ciężkich na rośliny oraz symbiotyczne bakterie glebowe**

Metale ciężkie uwalniane do środowiska w wyniku działalności przemysłowej i w konsekwencji gromadzące się w różnych ekosystemach stanowią ogromne zagrożenie dla różnorodnych agroekosystemów. W skutek bezpośredniego lub pośredniego oddziaływania metali, kondycja roślin w tym roślin bobowatych, takich jak groszek zielony (*Pisum sativum* L.) ciecierzycy (*Cicer arietinum* L.) czy łubin, jest naruszana (Ryc. 6). Ponadnormatywne stężenia metali wykazują toksyczność dla różnych procesów fizjologicznych, takich jak synteza barwników chlorofilowych czy inaktywacja syntezy funkcyjnych białek, co w konsekwencji prowadzi do znacznego zmniejszenia plonów.



**Ryc. 6. Wpływ metali ciężkich na rośliny oraz symbiotyczne bakterie glebowe**

Obecność metali ciężkich w środowisku w zbyt wysokich stężeniach powoduje szereg nieporządných skutków dla roślin jak i mikroorganizmów glebowych, co w szerszej perspektywie znacznie przyczynia się do obniżenia wydajności upraw

Ponadto istnieje wiele doniesień, w których stwierdzono, że wyższe stężenia metali ciężkich ograniczają wzrost rizobiów, również bezpośrednio wpływając na zmniejszenie plonów (Zaidi i in., 2012). Z powodu zbyt wysokiego stężenia metali ciężkich może również obniżyć się zdolność bakterii symbiotycznych do infekowania gospodarza roślinnego oraz efektywność wiązania azotu cząsteczkowego (Purchase i in., 1997). Przykładem jest szczep *Rhizobium leguminosarum* który na polstkach skażonych metalami ciężkimi zdolny jest do wzrostu, lecz w układzie symbiotycznym z koniczyną białą (*Trifolium repens L.*) nie jest w stanie wiązać azotu atmosferycznego (Hirsch i in., 1993). Jony metali ciężkich, takich jak kadm, miedź, cynk i nikiel w wysokich stężeniach mają negatywny wpływ na rodzime populacje wielu gatunków rizobiów (Giller i in., 1998). W przypadku długotrwałej ekspozycji

bakterii glebowych na metale ciężkie, zmianie może ulegać skład gatunkowy jak i procentowe proporcje mikrobiomu glebowego (Zaidi i in., 2012).



**Ryc. 7. Mechanizmy warunkujące tolerancję metali ciężkich przez mikroorganizmy**

Szereg ewolucyjnie wykształconych przez bakterie mechanizmów obronnych wobec obecności w środowisku metali ciężkich w stresogennych stężeniach

Presja niesprzyjających warunków środowiskowych wywoływana przez obecność metali ciężkich w glebie przyczyniła się do wykształcenia w toku ewolucji szeregu mechanizmów pozwalających na adaptację mikroorganizmów (Ryc. 7). Wśród mechanizmów tych wyróżnić możemy:

- usuwanie toksycznych metali ciężkich z komórek przez system pomp jonowych (ang. efflux system) (Nies, 2003),
- wytrącanie metali w postaci nierozpuszczalnych soli (Blake II i in., 1993),
- biosyntezę związków o właściwościach chelatujących (Ow, 1993),
- biosyntezę zewnątrzkomórkowych polisacharydów EPS
- biosyntezę specyficznych białek, enzymów wewnątrzkomórkowych, białek tiolowych oraz antyoksydantów
- obecność genów nadających oporność na metale ciężkie (Kopycińska, 2020),

### **3.11. Biotechnologiczne zastosowanie rizobiów oraz lubinu wąskolistnego w ochronie środowiska i bioremediacji**

Sukces fitoremediacyjnych gatunków roślin zależy nie tylko od ich tolerancji/odporności na metale ciężkie, ale także od predyspozycji rośliny do szybkiego tempa wzrostu, wysokiej produkcji biomasy oraz zdolności akumulacji w niej szkodliwych pierwiastków jak i zdolności do pozyskiwania azotu w symbiozie z bakteriami wiążącymi azot atmosferyczny (ang. Nitrogen-fixing bacteria NFB). Symbioza między tolerującymi metale lub odpornymi na metale NFB i roślinami bobowatymi ma ogromny wpływ na skuteczność fitoremediacji. Promując wzrost roślin, zwiększają w ten sposób ich biomasę w warunkach stresu wywołwanego obecnością wysokich stężeń metali ciężkich. Ponadto biologiczne wiązanie azotu może złagodzić toksyczne działanie HM, rekompensować stres wywołany przez metale ciężkie i poprawiać adaptacyjne możliwości przeżycia na skażonym metalami terenie w procesie rekultywacji. Tak więc wykorzystanie roślin bobowatych i ich mikrosymbiontów do fitoremediacji ma wiele korzyści takich jak:

- poprawę właściwości gleby, umożliwiającą wzrost innych roślin poprzez unieruchomienie zanieczyszczeń, zwiększenie zawartości substancji organicznych i modyfikację populacji ryzosfery;
- zwiększenie różnorodności mikroorganizmów, zwłaszcza ryzobakterii i grzybów mikoryzy arbuskularnej w celu poprawy i stabilizacji właściwości biologicznych zanieczyszczonych i skażonych gleb pod uprawy;
- dodatkowe dostarczenie związków azotu i fosforu do gleby uprawnej w celu poprawy jej żyzności i zdolności do wspomagania wzrostu biologicznego;
- poprawę warunków bytowania roślin, umożliwiającą wzrost roślin bobowatych i innych w obecności HM i innych czynników stresogennych; (Jach i in., 2022).

#### 4. Hipoteza i cel pracy

Wzrost urbanizacji, nieodpowiednie gospodarowanie sztucznymi nawozami w dynamicznie rozwijającym się rolnictwie oraz rozwój przemysłu spowodowały zwiększenie obecności toksycznych związków, w tym jonów metali ciężkich, w środowisku glebowym. Problem ten, który dotyczy wielu obszarów rolnych na całym świecie stale się powiększa. Metale ciężkie w glebie wpływają nie tylko na rośliny, ale także na rozwój i aktywność mikroorganizmów występujących w glebie, ich liczebność i różnorodność gatunkową, morfologię komórek, jak również profil ekspresji genów oraz wydzielanych zewnątrzkomórkowo metabolitów. Stres wywołany przez wysokie stężenie metali ciężkich w podłożu negatywnie wpływa na symbiozę roślin bobowatych z ich mikrosymbiontami. Powoduje obniżenie poziomu inokulacji korzeni roślin przez *Rhizobium*, obniża tempo wzrostu i rozwoju brodawek, przez co negatywnie wpływa na wiązanie azotu atmosferycznego. Niektóre metale ciężkie powodują zmiany w strukturze brodawek korzeniowych, np. pogrubienie ścian komórkowych, rozbudowanie przestworów międzykomórkowych i liczne degeneracje w wykształconych brodawkach. Efekt toksyczności metali ciężkich zależy od dawki, małe dawki mogą powodować stymulację wzrostu pędów i korzeni, przyrost biomasy, kiełkowania nasion, wzrost hipokotyli i liścieni, podczas gdy ich większe stężenia tych samych jonów powodować mogą hamowanie tempa wzrostu, a nawet śmierć siewek czy roślin.

W związku z powyższym, celem przedstawionej pracy doktorskiej było określenie wpływu jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na obu partnerów uczestniczących w symbiotycznym wiązaniu azotu atmosferycznego; bakterie z rodzaju *Bradyrhizobium* (cztery scharakteryzowane szczepy UPP 133, 213, 242 i 331) i łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.)

Cel rozprawy doktorskiej został zrealizowany przy wykorzystaniu klasycznych technik mikrobiologii, metod biologii molekularnej, oraz zaawansowanych metod obrazowania elektronowego, przez następujące cele szczegółowe:

- Badanie mikrobiomu gleby poddanej działaniu różnych stężeń wybranych jonów metali ciężkich ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$ ).
- Określenie wpływu wybranych jonów metali ciężkich ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$ ) w różnych stężeniach na właściwości fenotypowe, biosyntezę metabolitów i ekspresję

wybranych genów (*treS*, *cueA*, *exoR*, *fegA*, *nodA*) przez bakterie *Bradyrhizobium* UPP 133, UPP 213, UPP 242 i UPP 331 zdolne do symbiozy z łubinem wąskolistnym.

- Określenie wpływu wybranych jonów metali ciężkich ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$ ) w różnych stężeniach na kiełkowanie, wzrost oraz ekspresję wybranych genów łubinu wąskolistnego (*PAL*, *CHS*, *IFS*)
- Badanie układów symbiotycznych roślin bobowatych poddanych działaniu różnych stężeń wybranych jonów metali ciężkich ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$ ).

## 5. Materiały i metody

### 5.1. Materiały

#### 5.1.1 Materiał biologiczny

##### 5.1.1.1 Łubin wąskolistny

Nasiona łubinu wąskolistnego dostarczone zostały z pól badawczych Zakładu Hodowli Roślin w Smolicach (Polska).

##### 5.1.1.2. Szczepy bakteryjne

Szczepy *Bradyrhizobium japonicum* (UPP 331 i UPP 133) oraz *Bradyrhizobium canariense* (UPP 242 i UPP 213) pochodziły z kolekcji Zakładu Biologii Molekularnej UPP. Wybrane z kolekcji szczepy zostały oczyszczone z brodawek korzeniowych (UPP 133 z *L. albus*, UPP 331 z *L. luteus* a UPP 213 i UPP 242 z *L. angustifolius*) i zklasyfikowane na podstawie sekwencji genów niesymbiotycznych (*atpD*, *glnII*, i *recA*) i symbiotycznych (*nodA*): jako *B. japonicum* i *B. canariense* (Stępkowski i in., 2011) Wszystkie szczepy użyte w eksperymentach były zdolne do tworzenia brodawek w warunkach polowych.

##### 5.1.2. Odczynniki i zestawy

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Chempur)

$\text{NiCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$  (Chempur)

$\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Chempur)

$\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$  (Chempur)

$\text{FeCl}_3$  (Chempur)

$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Chempur)

$\text{HClO}_4$  (Chempur)

Tris-HCl (Chempur)

EDTA (Sigma-Aldrich)

PBS (Chempur)

CTAB (Sigma-Aldrich)

SDS (Sigma-Aldrich)

Chloroform (Chempur)

Alkohol etylowy (Chempur)

Alkohol izoamylowy (Chempur)

Lizozym (Pol-Aura)

Proteinaza K (Pol-Aura)

Polimeraza Allegro Taq DNA (Novazym)

Agaroza (MAXIMUS – Polskie Agarozy)

Perlit (PERLIPOL)

Wermikulit (PERLIPOL)

#### **5.1.2.1. Zestawy do izolacji i detekcji kwasów nukleinowych**

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

SV Total RNA (Promega)

High Capacity DNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

SsoAdvanced Universal IT SYBR Green SMx (BIO-RAD)

#### **5.1.3. Podłoża do hodowli bakterii oraz roślin**

Skład pożywek i podłoży do hodowli szczepów *Bradyrhizobium spp.* oraz do hodowli łubinu wąskolistnego podano w Tabeli 2.

**Tabela 2. Skład pożywek i podłoży zastosowanych do hodowli bakterii oraz łubinu wąskolistnego**

Pożywka	Składnik	Zawartość (g/dm <sup>3</sup> )
<b>TY*</b>	Trypton (Millipore)	5
	Ekstrakt drożdżowy (Milipore)	3
	CaCl <sub>2</sub> (Chempur)	0,657
<b>King's B*</b>	Pepton (Millipore)	20
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O(Chempur)	2,22
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Chempur)	0,486
	Gliceryna (Chempur)	12,6
	CAS (Chrome Azurol Sulphonate) (Sigma-Aldrich)	0,078
	HDTMA (Sigma-Aldrich)	0,091
	FeCl <sub>2</sub> (Chempur)	0,034
	HCl (Chempur)	0,004
	<b>Bezazotowa Dilwortha</b>	CaCl · 2H <sub>2</sub> O (Chempur)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Chempur)		0,06805
FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> · 3H <sub>2</sub> O (Sigma-Aldrich)		0,00335
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O(Chempur)		0,06165
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Chempur)		0,0435
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O(Chempur)		1,69·10 <sup>-4</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Chempur)		1,235·10 <sup>-4</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O(Chempur)		1,44·10 <sup>-4</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O(Chempur)		5·10 <sup>-5</sup>
CoSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O(Chempur)		2,8·10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O(Sigma-Aldrich)		2,4·10 <sup>-5</sup>

\* Stałe podłoże zawierało 1% (w/v) agaru (OXOID)

## 5.2. Metody

### 5.2.1. Ocena tolerancji szczepów bakteryjnych UPP 133, 213, 242 i 331 na stres wywołany obecnością wybranych metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd)

W celu oceny tolerancji na stres wywoływany obecnością metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd) szczepy bakteryjne najpierw hodowano w płynnej pożywce TY w temperaturze 28°C (120 rpm) do uzyskania gęstości optycznej OD=1, a następnie po 5 µl każdej hodowli poszczególnych szczepów bakteryjnych UPP 133, 213, 242 i 331 przenoszono do próbek zawierających pożywkę TY z dodatkiem odpowiednich stężeń Cu, Ni, Mn i Cd. Tak przygotowane hodowle inkubowano w temperaturze 28°C (120 rpm) przez 96 godzin. Stężenia metali ciężkich w płynnych pożywkach TY były w zakresie od 0,125 mM do 3 mM

dla miedzi, niklu, kadmu oraz od 0,125 mM do 120 mM dla manganu. Próby kontrolne stanowiły hodowle badanych szczepów bakteryjnych w pożywkach TY bez dodatku metali ciężkich. Wszystkie warianty hodowli badanych szczepów bakteryjnych wykonano w trzech powtórzeniach. Wzrost badanych szczepów bakteryjnych, zarówno prób kontrolnych jak i wszystkich wariantów zawierających różne stężenia metali ciężkich analizowano po 96 godzinach metodą spektrofotometryczną przy długości fali 600nm. Ponadto, dodatkowo 5  $\mu$ l zawiesiny komórek bakteryjnych wszystkich badanych szczepów wysiano na płytki ze stałą pożywką TY (Tryptone Yeast z dodatkiem 1% w/v agaru). Po upływie 1 godziny od momentu wysiania na powierzchnię stałej pożywki nałożono krążki bibułowe nasączone roztworami metali ciężkich o odpowiednich stężeniach (od 0,25 mM do 2 mM (Cu, Ni), od 0,1 mM do 1mM (Cd), lub od 20 mM do 100 mM (Mn)). Po 96 godzinach inkubacji w temperaturze 28°C oceniano wzrost bakterii i porównywano z próbą kontrolną (krążki nasączone dejonizowaną wodą).

### **5.2.2. Analiza wpływu badanych metali ciężkich na mikrobiom gleby pola uprawnego**

Gleba z pola uprawnego (Rolnicze Gospodarstwo Doświadczalne UPP w Gorzynie) została podzielona na próbki o objętości 1 litra, do każdej próbki dodano badanych metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd) w dwóch stężeniach: Cu i Ni 0,5mM i 1mM, Mn 5mM i 80 mM oraz Cd 0,01 i 0,1 mM. Gleba została dokładnie wymieszana, następnie przez 4 tygodnie kontrolowano jej wilgotność (była podlewana) a następnie pobrano 10 gramowe próbki z których izolowano genomowe DNA. Jako kontrolę stosowano próbki gleby bez dodatku metali ciężkich, z których izolowano genomowy DNA.

#### **5.2.2.1. Izolacja DNA z próbek gleby**

Genomowy DNA z pobranych próbek gleby traktowanych metalami ciężkimi (5.2.2.) izolowano w oparciu o metodę opisaną przez Zhou (Zhou i in., 1996). Do metody wprowadzono modyfikacje mające na celu zwiększenie wydajności i uzyskanie materiału o jak największej czystości. Odważono po 0,5 g gleby z każdej pobranej próbki, dodano 1,35 ml buforu Zhou (pH 8) (Tabela 3) i tak przygotowane próby ucierano. Do mieszaniny dodano 10 $\mu$ l lizozymu (10 mg/ml). Mieszaninę worteksowano i inkubowano przez 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 65°C. Po inkubacji dodano 10  $\mu$ l proteiny K (20 mg/ml),

próby wymieszano i ponownie inkubowano 30 minut w takich samych warunkach. Następnie dodano 150 µl 20% SDS i inkubowano przez 2 godziny, przy czym próby regularnie mieszano. Po dwóch godzinach próby zwirowano przez 10 minut w temperaturze 21°C, 6000\*g. Zebrano supernatant, a do osadu glebowego dodano 450 µl buforu Zhou oraz 50 µl 20 % SDS, po dokładnym wymieszaniu próby inkubowano przez 10 minut w łaźni wodnej (65°C) i zwirowano (6000\*g, 10 min., 21°C). Ponownie zebrano supernatant. Do całkowitej objętości supernatantu z każdej próby dodano mieszaninę chloroform-alkohol izoamylowy (24:1 v/v) w równej objętości (stosunek 1:1), delikatnie mieszano i wirowano przez 10 minut (6000\*g, 21°C). Po wirowaniu zebrano fazę wodną zawierającą kwasy nukleinowe. Tak przygotowane fazy wodne z próbek gleby, zawierające DNA i znaczne ilości zanieczyszczeń w postaci kwasów humusowych oczyszczano przez elektroforezę w żelu agarozowym. Fragmenty żelu zawierające genomowe DNA z próbek gleby wycięto, a następnie odzyskano z żelu za pomocą zestawu Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System. Stężenie genomowego DNA w poszczególnych próbkach gleby określono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm, a następnie doprowadzono stężenia wszystkich oczyszczonych preparatów DNA do 10 ng/ul i ponownie wykonano pomiary spektrofotometryczne. Tak przygotowane preparaty DNA użyto jako matryce w łańcuchowej reakcji polimerazy PCR (z ang. polymerase chain reaction).

**Tabela 3. Skład buforu Zhou**

<b>Składnik</b>	<b>Ilość / 1 L buforu</b>
Tris-HCl (pH 8)	100 mmol/dm <sup>3</sup>
Sól sodowa EDTA (pH 8)	100 mmol/dm <sup>3</sup>
Bufor fosforanowy (pH 8)	100 mmol/dm <sup>3</sup> NaCl
CTAB	1%

### **5.2.2.2. Amplifikacja fragmentów DNA różnych grup mikroorganizmów zasiedlających glebę**

Do przeprowadzenia reakcji PCR wykorzystano pary starterów specyficznych dla różnych grup mikroorganizmów zasiedlających glebę. Sekwencje starterów przedstawiono w Tabeli 4. Skład użytej mieszaniny reakcyjnej pokazano w Tabeli 5. PCR przeprowadzono przy użyciu polimerazy Allegro Taq DNA w następujących warunkach: początkowa denaturacja w 95°C przez 2 min; 30 cykli po 30s w 95°C, 30s przyłączanie starterów (temperatury podano w Tabeli 4), 1 min elongacji w 72°C; i końcowy etap wydłużania 5 min w 72°C. Reakcje prowadzono w termocyklerze GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems. Produkty PCR analizowano na 1.5% żelach agarozowych. Intensywności poszczególnych produktów PCR odczytywano wykorzystując oprogramowanie GeneSys firmy Syngene a następnie porównano je względem najbardziej intensywnego.

**Tabela 4. Sekwencje starterów poszczególnych grup mikroorganizmów użytych w reakcji PCR (Fierer i in., 2005) (Stępkowski i in., 2011)**

<b>Grupa mikroorganizmów</b>	<b>Sekwencje starterów</b>	<b>Nazwy starterów</b>	<b>Długość Amplikonu (pz)</b>	<b>temp (°C) przyłączenia starterów</b>
Wszystkie grupy bakterii	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG	Eub 338 Eub 518	200	53
<i>α-Proteobacterie</i>	TCTACGRATTTACCYCTAC ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Alf685 Eub338	365	60
<i>β-Proteobacterie</i>	TCACTGCTACACGYG ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	Bet680 Eub338	360	60
<i>Actinobacteria</i>	CGCGGCCTATCAGCTTGTTG ATTACCGCGGCTGCTGG	Actino 235 Eub 518	300	53
<i>Bacteroides</i>	GTACTGAGACACGGACCA ATTACCGCGGCTGCTGG	Cfb 319 Eub 518	220	65
<i>Firmicutes</i>	GCAGTAGGGAATCTTCCG ATTACCGCGGCTGCTGG	Lgc 353 Eub 518	180	60
<i>Bradyrhizobium</i>	CTCGGGCGACAGGGATTG AGTTCTGGCCCGTTCCGTTTC	PnodA1F PnodA1R	181	62

**Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do reakcji PCR**

<b>Składnik mieszaniny reakcyjnej</b>	<b>Ilość / 1 reakcję (µl)</b>
Bufor do polimerazy	2,5
dNTP	1
Matryca – DNA	1
Starter forward	1
Starter revers	1
Polimeraza DNA	0,2
Woda	18,3

### **5.2.3. Oznaczanie kwasu indolilo-3-octowego (IAA) syntetyzowanego przez szczepy bakteryjne UPP 133, 213, 242 i 331 w obecności wybranych metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd)**

Kwas indolilo-3-octowy syntetyzowany przez szczepy bakteryjne UPP 133, 213, 242 i 331 w obecności wybranych metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd) oznaczano metodą kolorymetryczną Salkovskiego. Przygotowano hodowle wyjściowe badanych szczepów *Bradyrhizobium* UPP 133, 213, 242 i 331 w płynnej pożywce TY o gęstości optycznej  $OD_{600nm}=1$ , następnie z każdej hodowli pobrano po 20 µl, które przeniesiono do 5 ml świeżej pożywki TY zawierającej od 0,125 mmol/dm<sup>3</sup> do 3 mmol/dm<sup>3</sup> Cu, Ni, Cd i od 0,125 mmol/dm<sup>3</sup> do 120 mmol/dm<sup>3</sup> Mn. Próby kontrolne stanowiły hodowle bakteryjne bez dodatku metali ciężkich. Wszystkie hodowle bakteryjne inkubowano w temperaturze 28°C (120 rpm) przez 96 godzin. Po 96 godzinach hodowle bakteryjne wirowano przy 12000 rpm, w temperaturze pokojowej przez 10 minut, w celu usunięcia komórek bakteryjnych, a następnie po 1 ml poszczególnych supernatantów przenoszono do probówek zawierających 2 ml odczynnika Salkovskiego (Tabela 6) (Glickmann i Dessaux, 1995). Tak przygotowane próby inkubowano 20 minut w ciemności w temperaturze pokojowej, następnie mierzono

spektrofotometrycznie ich absorbancję przy długości fali 530 nm. Oznaczenie IAA wykonano w trzech powtórzeniach dla każdego wariantu doświadczenia.

**Tabela 6. Skład odczynnika Salkovskiego**

Składnik	Zawartość (% w/v)
0,5M FeCl <sub>3</sub>	2
70% HClO <sub>4</sub>	49
H <sub>2</sub> O	49

#### **5.2.4. Oznaczenie zewnątrzkomórkowych polisacharydów (EPS) syntetyzowanych przez szczepy bakteryjne 133, 213, 242 i 331 w obecności wybranych metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd)**

W celu oznaczenia frakcji zewnątrzkomórkowych polisacharydów (EPS), szczepy bakteryjne UPP 133, 213, 242 i 331 hodowano w pożywce TY zawierającej różne stężenia metali ciężkich, w zakresie od 0,125 mM do 3 mM dla miedzi oraz niklu, od 0,125 mM do 80 mM dla manganu oraz 0,125 mM do 1 mM dla kadmu przez 96 godzin w 28 °C (120 rpm). Następnie 50ml hodowli odwirowano (15 min, 14000 rpm). EPS obecne w supernatach strącono wychłodzonym 95% etanolem, w stosunku objętościowym 3:1 (etanol : supernatant) i przechowywano przez 24 godziny w temperaturze 4 °C. Po tym czasie EPS osadzono przez wirowanie (20 min, 14000 rpm), supernatant odrzucono a osad suszono w 40°C przez 24 godziny. Następnie dokonano pomiaru suchej masy osadzonych, zewnątrzkomórkowych polisacharydów. Doświadczenie wykonano w 3 powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu i badanego wariantu.

### **5.2.5. Oznaczenie sideroforów syntetyzowanych przez szczepy bakteryjne UPP 133, 213, 242 i 331 w obecności wybranych metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd)**

Zdolność do syntezy sideroforów przez szczepy bakteryjne UPP 133, 213, 242 i 331 w obecności wybranych metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd) określano na stałych, minimalnych pożywkach agarowych zawierających chrom azurol S (CAS) i bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (HDTMA), umożliwiającymi monitorowanie biosyntezy sideroforów. Badane szczepy bakteryjne hodowano w pożywce TY w obecności metali ciężkich, w zakresie od 0,125 mM do 2 mM dla miedzi oraz niklu, od 0,125 mM do 100 mM dla manganu oraz 0,125 mM do 1 mM dla kadmu przez 96 godzin w temperaturze 28°C (120 rpm), następnie bakterie osadzano przez wirowanie przy 12000 rpm, w temperaturze pokojowej przez 2 minuty. Osadzone bakterie przepłukiwano dwukrotnie wodą dejonizowaną, a następnie zawieszono w 1ml pożywki TY. 10 µl zawiesiny każdego szczepu przeniesiono na stałą pożywkę King's B z dodatkiem CAS i inkubowano przez 48 godzin. W warunkach niedoboru żelaza bakterie produkujące siderofory uwalniały je zewnątrzkomórkowo w celu pozyskania tego pierwiastka z pożywki. Pomarańczowa strefa halo, dobrze widoczna na niebiesko zabarwionej pożywce, wskazywała na zdolność do wydzielania sideroforów przez dany szczep. Wielkość przebarwionych stref halo rejestrowano dla każdego ze szczepów.

Biosyntetyzowane siderofory ilościowo oznaczano metodą spektrofotometryczną. Badane szczepy bakteryjne UPP 133, 213, 242 i 331 hodowano w obecności określonych stężeń wybranych metali ciężkich (0,5 mM, 1 mM, 3 mM Cu; 0,5 mM, 1 mM, 3 mM Ni; 0,125 mM, 5 mM, 80 mM Mn oraz 0,125 mM, 0,5 mM, 1 mM Cd) w płynnej pożywce King's B pozbawionej żelaza, uzupełnionej 0,2% glukozą przez 96 godzin w 28°C z wytrząsaniem przy 120 rpm. Po inkubacji komórki bakteryjne z wszystkich wariantów hodowli wirowano przy 12000 rpm przez 10 minut w celu ich usunięcia. Ilość biosyntetyzowanych sideroforów oznaczano w zebranych supernatantach. Pobrano po 0,5 ml supernatantów z każdego wariantu hodowli, dodano do nich 0,5 ml odczynnika CAS (Tabela 7) i 10 µl 4 mM roztworu kwasu sulfosalicylowego. Całość inkubowano przez 6 godzin. Utratę niebieskiego koloru mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 630 nm. Pożywkę minimalną zastosowano jako ślepą próbę, a pożywkę minimalną plus roztwór CAS zastosowano jako odniesienie.

**Tabela 7. Skład odczynnika do barwienia pożywek CAS (Chrom Azurol S)**

<b>Składnik</b>	<b>Zawartość (g/dm<sup>3</sup>)</b>
CAS	0,078
HDTMA	0,091
FeCl <sub>2</sub>	0,034
HCl	0,004

### **5.2.6. Ocena morfologii komórek szczepów bakteryjnych UPP 133, 213, 242 i 331 hodowanych w obecności wybranych metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd)**

Ocena morfologii komórek szczepów *Bradyrhizobium* UPP 133, 213, 242 i 331 hodowanych w obecności wybranych metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd) została wykonana na podstawie obrazów uzyskanych metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Preparaty do badań mikroskopowych zostały przygotowane z płynnych hodowli poszczególnych szczepów bakteryjnych z dodatkiem miedzi i niklu w stężeniu 0,5 mM, manganu w stężeniu 5mM oraz kadmu w stężeniu 0,125 mM. Jako próbę kontrolną stosowano komórki poszczególnych szczepów bakteryjnych hodowane w płynnej pożywce TY bez dodatku metali ciężkich. W celu przygotowania preparatów mikroskopowych wszystkie warianty hodowli bakteryjnych zwirowano, następnie komórki bakteryjne zostały przemyte buforem PBS i zawieszono w tym buforze do osiągnięcia gęstości optycznej  $OD_{600nm} = 1$ . Z tak przygotowanych komórek bakteryjnych każdego wariantu pobrano po 5 ul i utrwalano w 2,5% (obj./obj.) aldehydzie glutarowym przygotowanym w buforze PBS (pH=7) przez 4 godziny. Po utrwaleniu komórki bakteryjne ponownie przemywano buforem PBS. Następnie przemyte komórki bakteryjne odwodniono w gradiencie alkoholu etylowego (20%, 40%, 60%, 80% 100%). Tak przygotowane preparaty komórek bakteryjnych umieszczono na szkiełkach nakrywkowych, powlekało złotem i generowano obrazy mikroskopowe SEM.

### 5.2.7. Analiza ekspresji wybranych genów *Bradyrhizobium* (UPP 133, 213, 242 i 331) w obecności jonów metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd)

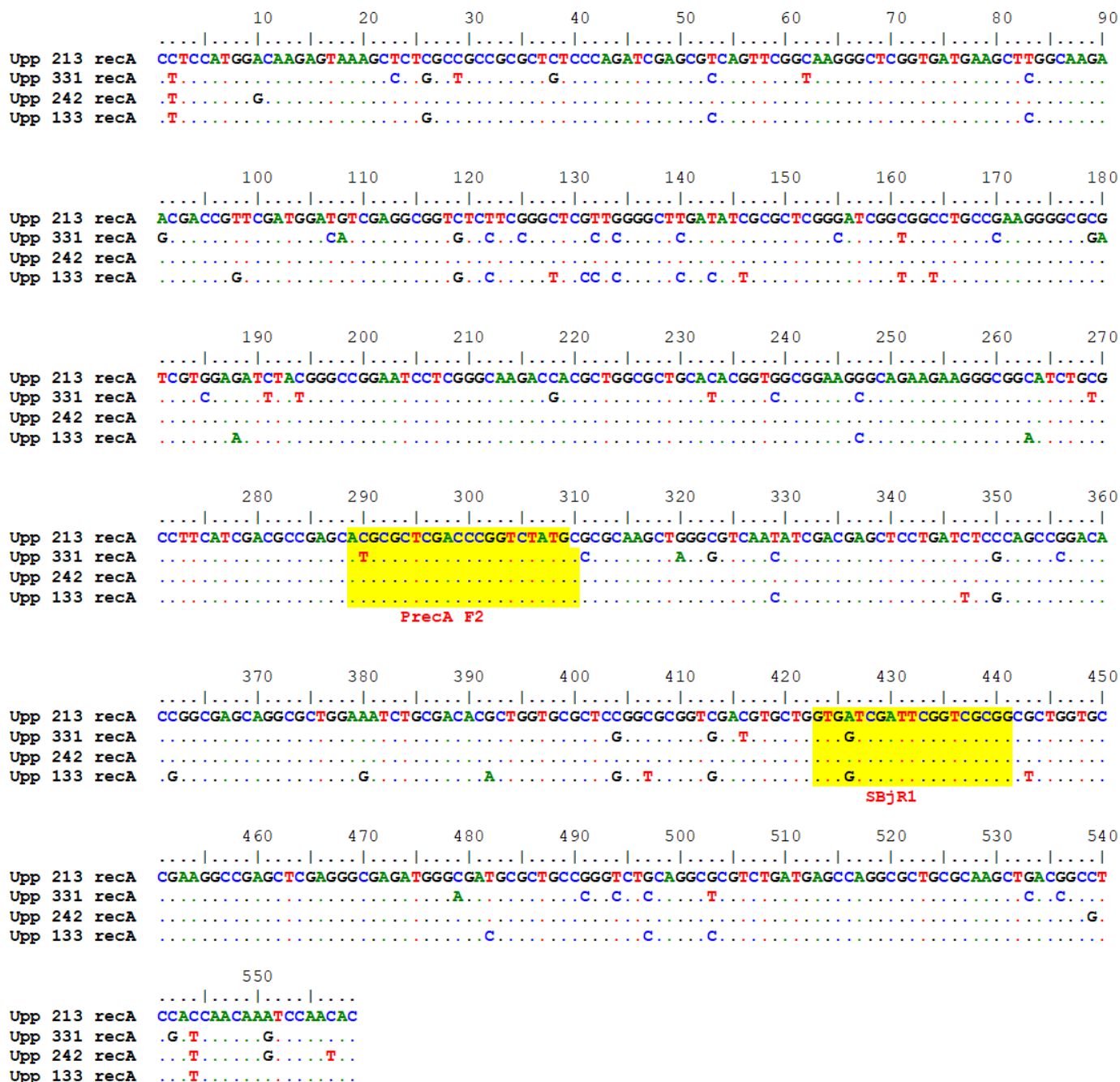
Do analizy ekspresji genów *Bradyrhizobium* w obecności metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd), wybrano gen *treS* kodujący syntazę trehalozy, *cueA* kodujący ATPazę typu P transportującą metale ciężkie, *exoR* kodujący białko regulatorowe egzopolisacharydów, *fegA* kodujący białko receptora sideroforowego oraz gen *nodA* kodujący czynnik nodulacji *nodA*.

Do płynnych hodowli szczepów bakteryjnych *Bradyrhizobium* (133, 213, 242 i 331) w pożywce TY ( $OD_{600nm}=1$ ) dodano odpowiednio wybrane stężenia metali ciężkich: 0,5 i 1 mM Cu i Ni, 5 i 80 mM Mn oraz 0,01 i 0,1 mM Cd. RNA izolowano z prób pobranych po 3 i 24 godzinach od dodania do hodowli soli metali ciężkich, stosując system izolacji SV Total RNA. Próbki cDNA do ilościowych eksperymentów qPCR (z ang. quantitative PCR) zsyntetyzowano z 500ng całkowitego RNA i starterów oligo(dT)18, stosując zestaw High Capacity DNA Reverse Transcription Kit. 1  $\mu$ l produktu reakcji (cDNA) służył jako matryca do reakcji qPCR, przeprowadzonych z jedną parą specyficznych starterów PCR dla każdego genu. Sekwencje starterów wraz z temperaturami przyłączenia przedstawiono w Tabeli 8. Startery zaprojektowano na podstawie analizy sekwencji genów kodujących: syntazę trehalozy, ATPazę typu P transportującą metale ciężkie, białko regulatorowe egzopolisacharydów, białko receptora sideroforowego oraz czynnik nodulacji *NodA*, zdeponowanych w bazie danych NCBI. Fragment sekwencji kodującej białko *RecA* (Ryc. 8) zamplifikowano jako gen referencyjny przy użyciu starterów *PrecA F2* oraz *SBjR1*. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 9. Przeprowadzono trzy powtórzenia techniczne. Odchylenie standardowe obliczono w programie Excel z zakresu trzech powtórzeń.

**Tabela 8. Sekwencje starterów użytych w analizie ekspresji wybranych genów *Bradyrhizobium***

Nazwa genu	Sekwencje starterów	Nazwy starterów	Długość Amplikonu (pz)	temp (°C) przyłączenia starterów
<i>treS</i>	GAATTCGAGACGCTGGTGGTGC ATCCAAGGCCTGTTGTCGCCGA	treS F treS R	197	60
<i>cueA</i>	CGGTCGCCGTCTATTTTCGAGGC GGCATGGAGCGTGTTCGATCTCG	cueA F cueA R	191	60
<i>exoR</i>	GATGCGCAGTACGATCTCGCCC CAGGTTTCCTCGATACCGGCGC	exoR F exoR R	230	60
<i>fegA</i>	GACGGCATGCAGCTGTTCTACAC TAGGCGTTGCCGAAATTGTTGA	fegA F fegA R	206	54
<i>recA</i>	ACGCGCTCGACCCGGTCTATG CGCCGCGACCGAATCGATCAC	PrecA F2 SBjR1	152	60
<i>nodA</i>	CTCGGGCGACAGGGATTG AGTTCTGGCCCGTCCGTTC	PnodA1F PnodA1R	181	62

*treS* - syntaza trehalozy, *cueA* - ATPaza typu P transportująca metale ciężkie, *exoR* - białko regulatorowe egzopolisacharydów, *fegA* - białko receptora sideroforowego, *recA* - rekombinacyjne białko bakteryjne, *nodA* czynnik nodulacji A



Ryc. 8. Porównanie sekwencji genu referencyjnego *recA* szczepów UPP 133, UPP 213, UPP 242 oraz UPP 331 wraz z zaznaczonymi miejscami przyłączenia starterów użytych do jego amplifikacji

**Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do reakcji qPCR**

<b>Składnik mieszaniny reakcyjnej</b>	<b>Ilość / 1 reakcję (µl)</b>
SsoAdvanced Universal IT SYBR Green SMx	4
Matryca – cDNA	1
Starter forward	1
Starter revers	1
Woda	13

#### **5.2.8. Powierzchniowa sterylizacja nasion łubinu wąskolistnego**

Nasiona łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L., odmiana Homer) pozyskane z zakładu Hodowli Roślin Smolice w Smolicach, sterylizowano powierzchniowo przez 30 sekund w 70% etanolu, następnie przez 2 minuty w wybielaczu ACE (wodna mieszanina podchlorynu sodu <5% (V/V), wodorotleneku sodu <1% (V/V) i węglanu sodu <5%(V/V)). Po czym nasiona płukano kilkakrotnie w sterylnej wodzie destylowanej i wykładano na podłoża hodowlane.

#### **5.2.9. Kiełkowanie nasion łubinu wąskolistnego w obecności miedzi, niklu, manganu i kadmu**

Wpływ wybranych metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd) w różnych stężeniach na kiełkowanie nasion łubinu wąskolistnego badano na podłożach z bibuły filtracyjnej w sterylnych szalkach Petriego o średnicy 90 mm. Podłoża z bibuły filtracyjnej nasączono wodnymi roztworami soli metali ciężkich w stężeniach 0,125 mM, 0,5 mM i 3 mM dla Cu i Ni; 0,125 mM, 0,5 mM i 5 mM dla Mn oraz 0,125 mM, 0,5 mM i 1 mM dla Cd. Na tak przygotowane podłoża wykładano nasiona łubinu wąskolistnego. Płytki inkubowano w temperaturze 21°C w ciemności do momentu kiełkowania. Jako kontrolę użyto podłoże z bibuły filtracyjnej nasączonej wodą.

### **5.2.10. Wpływ miedzi, niklu, manganu i kadmu na liczebność brodawek korzeniowych łubinu wąskolistnego**

Eksperyment przeprowadzono w szklarni, gdzie rośliny łubinu wąskolistnego uprawiano w naczyniach hydroponicznych metodą słoika Leonarda (Leonard, 1943) zawierających mieszaninę płukanego perlitu i wermikulitu w stosunku 1:1 o pH=7. W dolnej części naczyń znajdowała się bezazotowa pożywka Dilwortha z dodatkiem wybranych metali ciężkich w stężeniach 0,5 mM i 1 mM Cu i Ni; 0,5 mM i 5 mM Mn oraz 0,125 mM, 1 mM Cd. Próby kontrolne stanowiły naczynia z bezazotową pożywką Dilwortha bez dodatku metali ciężkich. Nasiona łubinu zostały powierzchniowo wysterylizowane, a następnie umieszczone na 24 godziny w 21 °C w szalkach Petriego, zawierających podłoże z bibuły filtracyjnej nasączonej wodą. W każdym naczyniu zasadzono pięć wyselekcjonowanych nasion i każde zaszczerpiono 1 mL hodowli szczepów *Bradyrhizobium* (UPP 133, 331, 213 i 242). Powierzchnia każdego naczynia została pokryta cienką warstwą folii aluminiowej aby uniknąć kontaminacji. Uprawy przerzedzono trzy do pięciu dni po kiełkowaniu do trzech roślin na słoik. Następnie przez 4 tygodnie kontrolowano wilgotność podłoża uzupełniając okresowo sterylną pożywkę bezazotową zgodnie z tempem pobierania jej przez rośliny. Tę samą objętość roztworu uzupełniającego dodawano do wszystkich słoików w każdym z zabiegów. Następnie zbierano brodawki korzeniowe w stadium niepełnego kwitnienia roślin i liczono je osobno dla każdej rośliny bezpośrednio po zbiorze.

### **5.2.11. Wpływ inokulacji nasion szczepami UPP 133, 213, 242 i 331 hodowanymi w obecności metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd), na rozwój systemów korzeniowych łubinu wąskolistnego**

Eksperyment przeprowadzono w szklarni, gdzie rośliny łubinu wąskolistnego uprawiano w doniczkach wypełnionych sterylną mieszaniną płukanego perlitu i wermikulitu w stosunku 1:1, o pH=7. Nasiona łubinu wąskolistnego zostały powierzchniowo wysterylizowane a następnie umieszczone na 24 godziny w 21 °C w szalkach Petriego, zawierających podłoże z bibuły filtracyjnej nasączonej wodą. W każdej doniczce zasadzono osiem wyselekcjonowanych nasion i każde zaszczerpiono 1 mL hodowli szczepów *Bradyrhizobium* (UPP 133, 331, 213 i 242) hodowanych uprzednio przez 96 godzin

w obecności wybranych metali ciężkich w stężeniu 0,5 mM Cu i Ni, 5 mM Mn oraz 0,125 mM Cd. Uprawy przerzedzono trzy do pięciu dni po kiełkowaniu do pięciu roślin na doniczkę. Następnie przez 4 tygodnie kontrolowano wilgotność podłoża (podlewano je wodą destylowaną). Następnie zbierano systemy korzeniowe, odcinając je około 2 mm poniżej hipokotylu, w stadium niepełnego kwitnienia roślin. Następnie dokładnie płukano w celu pozbycia się resztek podłoża, suszono przez 1h w 21°C i dokonywano pomiaru świeżej masy dla pojedynczych roślin.

#### **5.2.12. Wpływ miedzi, niklu, manganu i kadmu na ekspresję wybranych genów ze szlaku syntezy fenylopropanoidów**

Do analizy ekspresji wybrano cztery geny kodujące syntazę chalkonową (CHS), 3 geny kodujące syntazę izoflawonową (IFS) i gen amoniakolizy fenyloalaninowej (PAL). RNA izolowano z 90 mg świeżej tkanki roślinnej 28-dniowych korzeni łubinu wąskolistnego zebranych z roślin rosnących w podłożach zawierających 0,5 i 2mmol/dm<sup>3</sup> Cu i Ni, 0,5 i 5 mmol/dm<sup>3</sup> Mn oraz 0,1 i 1 mmol/dm<sup>3</sup> Cd, stosując zestaw do izolacji SV Total RNA. Metodą spektrofotometryczną określono stężenia izolowanych RNA, następnie 500 ng każdego RNA użyto do syntezy cDNA za pomocą zestawu High Capacity DNA Reverse Transcription Kit zgodnie z protokołem producenta. Komplementarne cDNA ze wszystkich wariantów doświadczenia rozcieńczono 10-krotnie i użyto jako matrycę w reakcjach qPCR ze starterami specyficznymi dla genów kodujących CHS, IFS i PAL. Każdą reakcję wykonano w trzech powtórzeniach technicznych. Startery zaprojektowano na podstawie analizy sekwencji kodujących poszczególnych genów dostępnych w bazie danych NCBI. Jako gen referencyjny stosowano fragment sekwencji kodującej aktywną. Startery dla genu referencyjnego zaprojektowano na podstawie sekwencji zdeponowanej w bazie danych NCBI (KP257588) Analizę ekspresji poszczególnych genów wykonano w trzech powtórzeniach technicznych. Odchylenie standardowe obliczono w programie Excel z zakresu trzech powtórzeń.

## 6. Wyniki i dyskusja

### 6.1. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na przeżywalność i wzrost szczepów bakteryjnych UPP 133, 213, 242 i 331

Metale ciężkie charakteryzują się wysoką toksycznością i mogą powodować wiele szkodliwych skutków nie tylko u ludzi i zwierząt, ale także u roślin i mikroorganizmów glebowych. Mikroorganizmy wykazują zróżnicowaną reakcję na metale ciężkie, która wynika z różnic gatunkowych, odmiennych układów enzymatycznych czy warunków fizykochemicznych. HM zakłócają wiele czynności biochemicznych i fizjologicznych bakterii, które przyczyniają się do zahamowania ich wzrostu lub spadku biomasy i liczebności. W celu określenia wpływu wybranych jonów metali ciężkich: miedzi, niklu, manganu i kadmu, na tolerancję i zdolność adaptacyjną szczepów *Bradyrhizobium spp.* dokonano oceny toksyczności tych jonów, stanowiącą wprowadzenie do prób zrozumienia mechanizmów obronnych tych mikroorganizmów, ale również eksploracji potencjalnych zastosowań w zrównoważonym rolnictwie. W tym celu przeprowadzono doświadczenia w stałych i płynnych pożywkach TY. Wyniki tego badania stanowiły podstawę do wybrania odpowiednich stężeń poszczególnych jonów metali do dalszych eksperymentów.

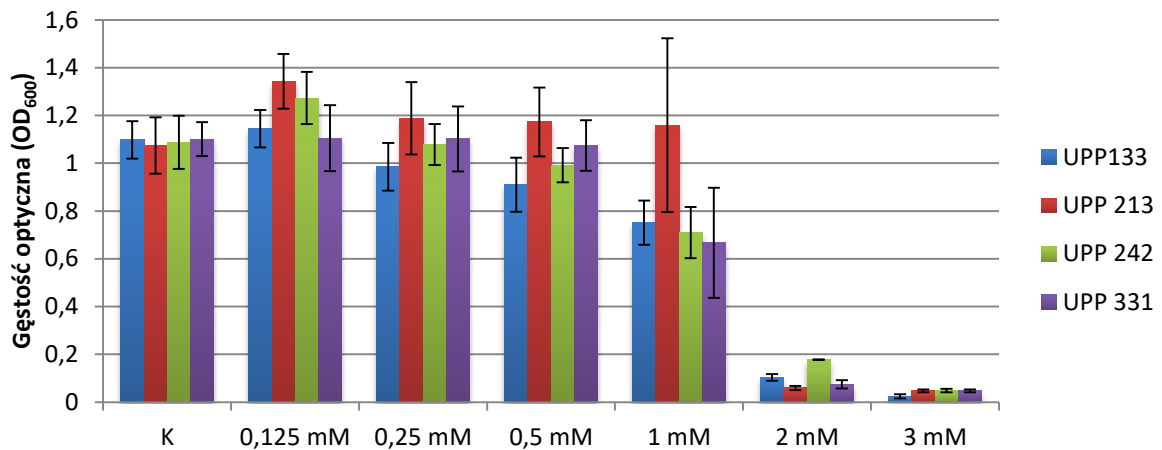
Obecność jonów miedzi powodowała istotne zmiany w gęstości optycznej ( $OD_{600}$ ) (Ryc. 9 A) począwszy od stężenia 1 mM  $Cu^{2+}$ . W tym stężeniu, jedynie szczep UPP 213 zachował pełną zdolność do wzrostu, natomiast pozostałe trzy szczepy (UPP 113, 133 i 242) wykazały znacznie niższą gęstość optyczną. Wyższe stężenia jonów miedzi hamowały wzrost wszystkich badanych szczepów.

Dla jonów niklu uzyskano podobne wyniki, z tą różnicą, że przy stężeniu 1 mM najniższą zdolność do wzrostu wykazał szczep UPP 213, natomiast gęstość optyczna komórek pozostałych szczepów bakteryjnych w porównaniu do prób kontrolnych była nieznacznie obniżona Ryc. 9 B.

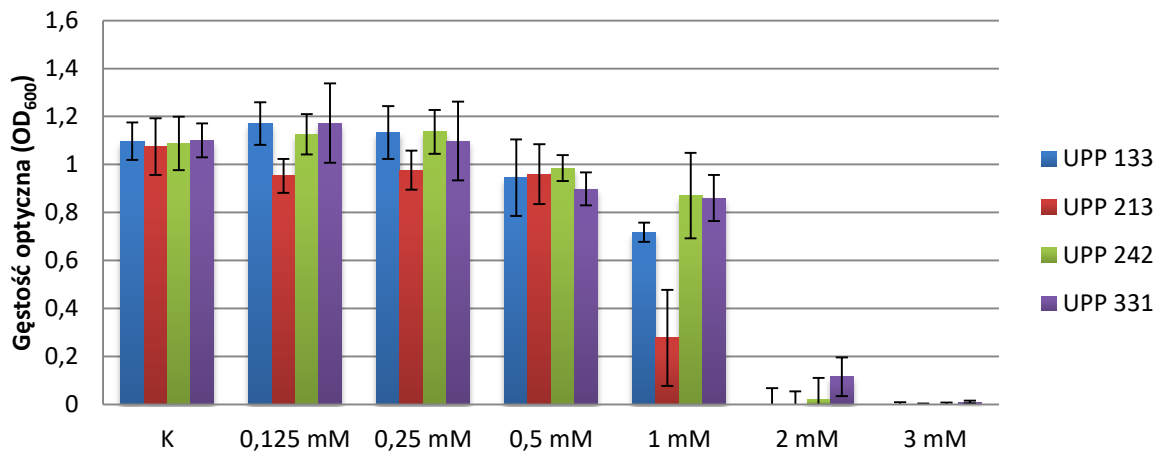
W przypadku jonów manganu, postępujący spadek gęstości optycznej wszystkich szczepów *Bradyrhizobium* obserwowano od stężenia 50 mM, lecz nawet stężenie 120 mM nie powodowało całkowitego zahamowania ich wzrostu, co sugeruje relatywnie mniejszą toksyczność jonów manganu dla badanych szczepów (Ryc. 9 C).

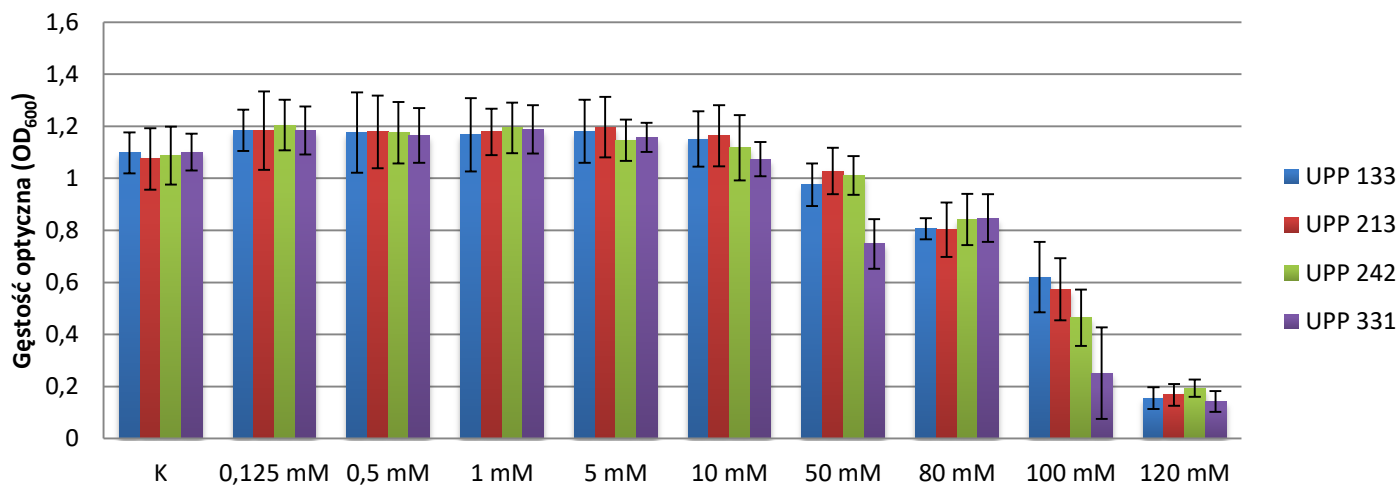
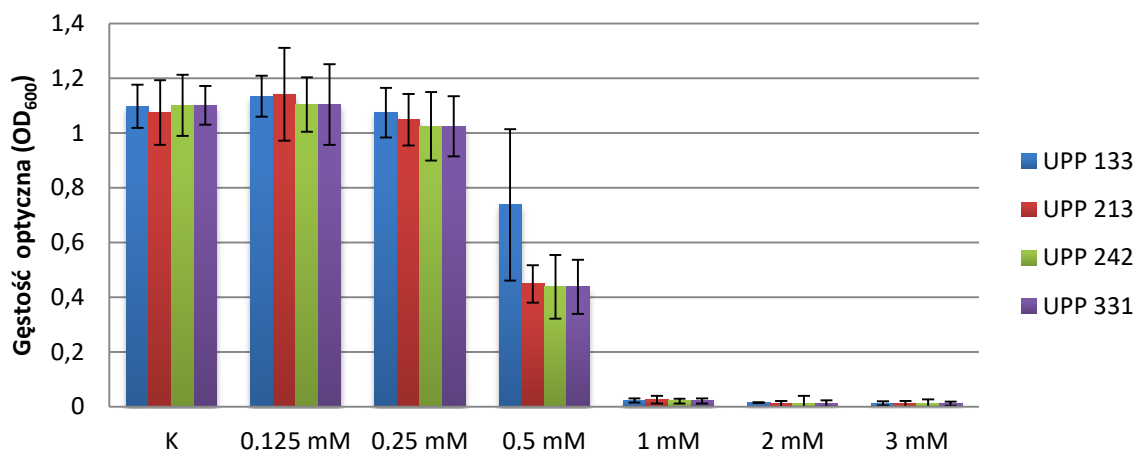
Przy ekspozycji na jony kadmu, znaczny spadek gęstości optycznej wszystkich szczepów *Bradyrhizobium* obserwowano już przy stężeniu 0,5 mM. Każde wyższe stężenie jonów kadmu (1, 2 i 3 mM) hamowało rozwój komórek bakteryjnych prawie całkowicie Ryc. 9D, co świadczy o wysokiej toksyczności  $Cd^{2+}$  w stosunku do badanych szczepów *Bradyrhizobium*.

**A**



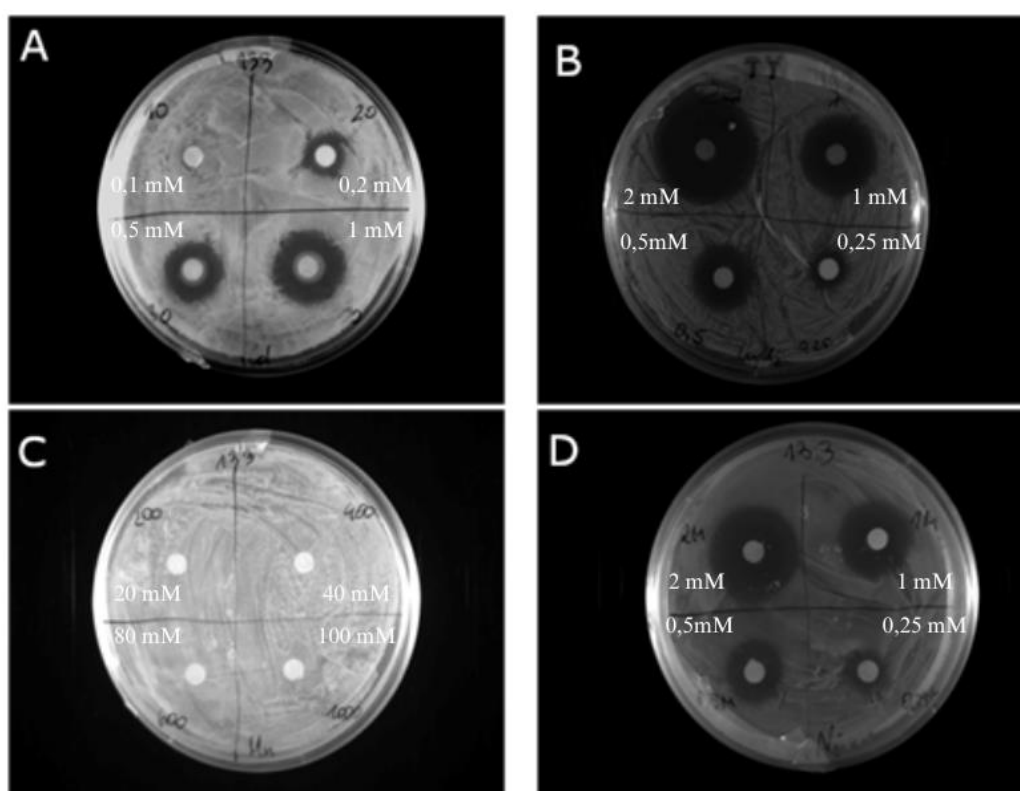
**B**



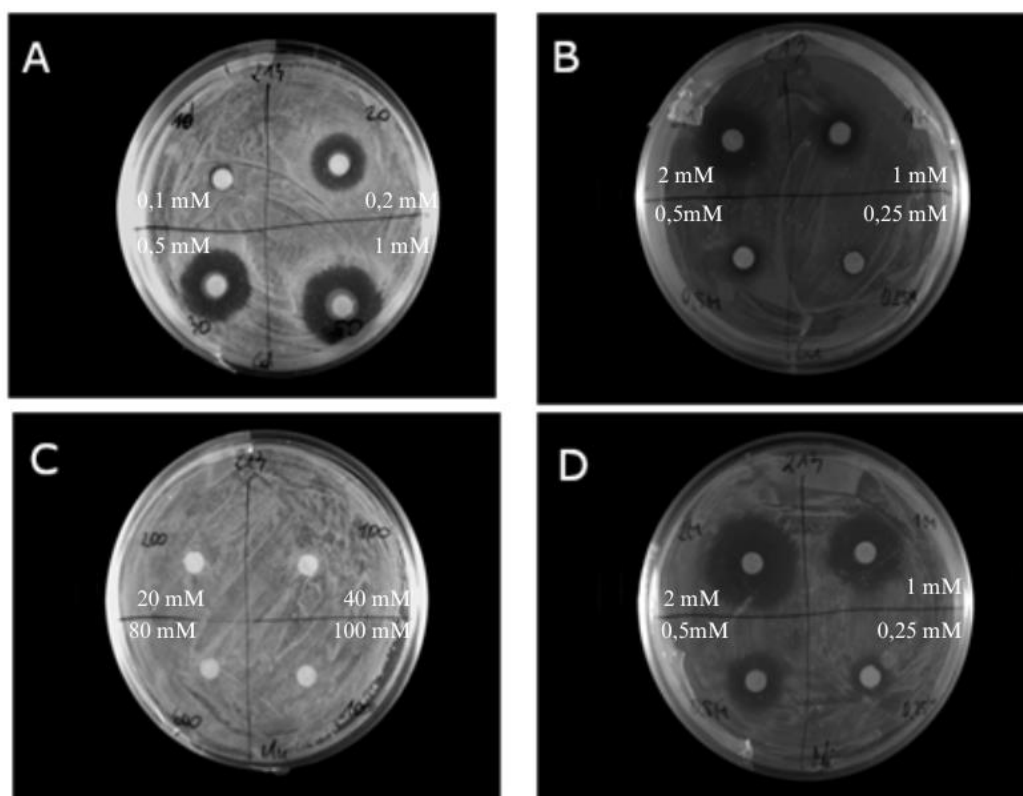
**C****D**

**Ryc. 9. Wzrost i przeżywalność szczepów *Bradyrhizobium* UPP 133, 213, 242 i 331 w pożywkach płynnych TY zawierających różne stężenia Cu, Ni, Mn i Cd. Pożywki płynne zawierały odpowiednio: **A** – jony Cu<sup>2+</sup> o stężeniach 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM i 3 mM, **B** – jony Cu<sup>2+</sup> o stężeniach 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM i 3 mM, **C** – jony Mn<sup>2+</sup> o stężeniach 0,125 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM i 10 mM 50 mM, 80 mM, 100 mM i 120 mM roztworem Mn<sup>2+</sup>, **D** – jony Cd<sup>2+</sup> o stężeniach 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM i 3 mM. Próby kontrolne stanowiły hodowle poszczególnych szczepów bakteryjnych w pożywkach TY**

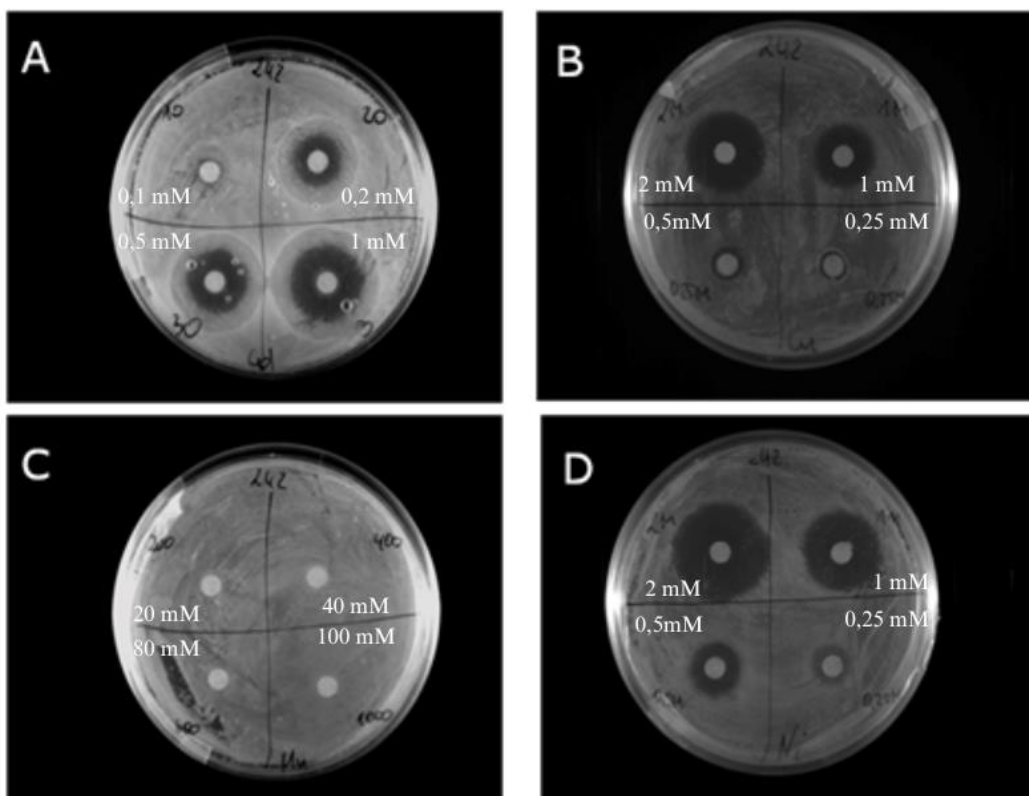
Podobnie jak w testach zdolności do wzrostu w pożywce płynnej TY zawierającej metale ciężkie, na stałym podłożu TY (w szalkach Petriego), najmniejszą toksycznością charakteryzował się mangan, który nawet wokół krążka nasączonego roztworem o stężeniu 100mM nie powodował wystąpienia strefy halo (Ryc. 10, 11,12 i 13 C). Dla pozostałych trzech metali najniższym stężeniem powodującym wystąpienie strefy halo było stężenie 0,25mM. Wokół każdego kolejnego krążka nasączonego roztworem o wyższym stężeniu, rozmiar strefy halo rósł proporcjonalnie (Ryc. 10-13 A, B, D).



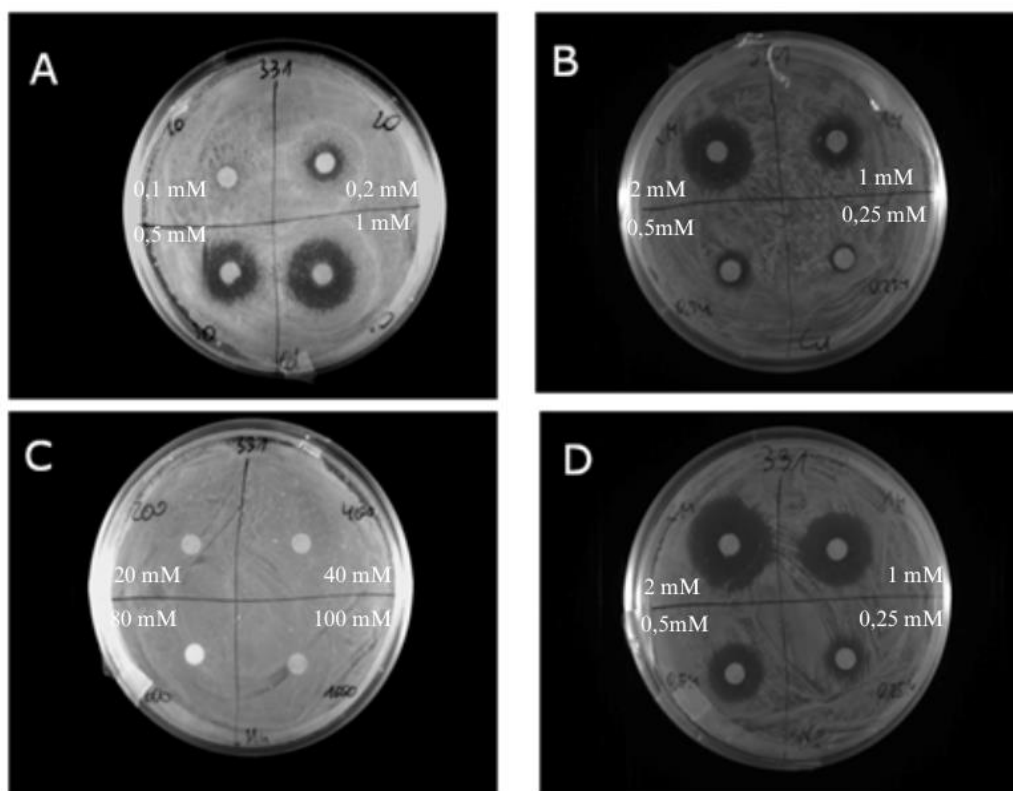
**Ryc. 10. Wzrost szczepu *Bradyrhizobium* UPP 133 na pożywkach stałych TY zawierających różne stężenia jonów  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$ . Krążki bibułowe nasączone odpowiednio: **A** – 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM i 1 mM roztworem  $\text{Cd}^{2+}$ , **B** – 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM roztworem  $\text{Cu}^{2+}$ , **C** - 20 mM, 40 mM, 80 mM i 100 mM roztworem  $\text{Mn}^{2+}$  i **D** - 0,25mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM roztworem  $\text{Ni}^{2+}$**



**Ryc. 11. Wzrost szczepu *Bradyrhizobium* UPP 213 na pożywkach stałych TY zawierających różne stężenia jonów  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$ . Krążki bibułowe nasączono odpowiednio: **A** – 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM i 1 mM roztworem  $\text{Cd}^{2+}$ , **B** – 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM roztworem  $\text{Cu}^{2+}$ , **C** - 20 mM, 40 mM, 80 mM i 100 mM roztworem  $\text{Mn}^{2+}$  i **D** - 0,25mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM roztworem  $\text{Ni}^{2+}$**



**Ryc. 12.** Wzrost szczepu *Bradyrhizobium* UPP 242 na pożywkach stałych TY zawierających różne stężenia jonów  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$ . Krążki bibułowe nasączone odpowiednio: **A** – 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM i 1 mM roztworem  $\text{Cd}^{2+}$ , **B** – 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM roztworem  $\text{Cu}^{2+}$ , **C** - 20 mM, 40 mM, 80 mM i 100 mM roztworem  $\text{Mn}^{2+}$  i **D** - 0,25mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM roztworem  $\text{Ni}^{2+}$



**Ryc. 13. Wzrost szczepu *Bradyrhizobium* UPP 331 na pożywkach stałych TY zawierających różne stężenia jonów  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$ . Krążki bibułowe nasączone odpowiednio: **A** – 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM i 1 mM roztworem  $\text{Cd}^{2+}$ , **B** – 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM roztworem  $\text{Cu}^{2+}$ , **C** - 20 mM, 40 mM, 80 mM i 100 mM roztworem  $\text{Mn}^{2+}$  i **D** - 0,25mM, 0,5 mM, 1 mM i 2 mM roztworem  $\text{Ni}^{2+}$**

Kadm nie jest pierwiastkiem niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania roślin i bakterii, ponadto dla większości z nich jest toksyczny i ma negatywny wpływ na większość żywych organizmów (Chauhan i in., 2017). Miedź, nikiel i mangan są niezbędnymi pierwiastkami śladowymi dla wszystkich organizmów tlenowych, w tym bakterii i roślin. Pomimo faktu, że miedź jest uważana za środek przeciwdrobnoustrojowy, ma ona również kluczowe znaczenie dla mikroorganizmów ze względu na swoją funkcję kofaktora w enzymach, które katalizują szeroką gamę reakcji redoks (Ladomersky i Petris, 2015). Nikiel również pełni istotne funkcje u wielu różnych mikroorganizmów, które włączają jon tego metalu do centrów katalitycznych swoich enzymów. Zidentyfikowano dziewięć enzymów posiadających w swej strukturze nikiel, które odgrywają kluczową rolę w globalnych cyklach azotu, węgla i wodoru (Zeer-Wanklyn i Zamble, 2017). Mangan jest niezbędnym kofaktorem dla wszystkich bakterii i jest istotnym elementem w procesie kolonizacji roślin żywicielskich w procesie symbiotycznym, ale zapotrzebowanie na jony manganu podczas infekcji nie jest

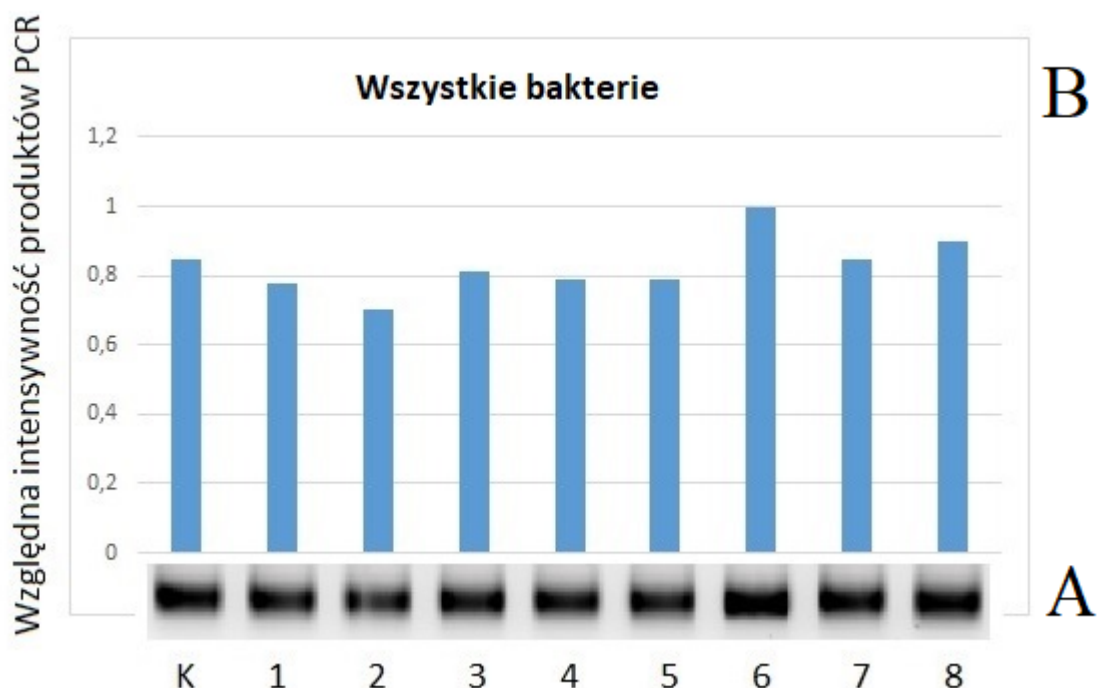
w pełni poznane (Juttukonda i Skaar, 2015). Jednak wszystkie te metale w wyższych stężeniach są uważane za czynniki wywołujące stres, a ich wpływ na bakterie i rośliny jest niekorzystny.

## 6.2. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na mikrobiom gleby pola uprawnego

Równowaga mikrobiologiczna gleb odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu zdrowych ekosystemów i wspieraniu rolnictwa zrównoważonego. Mikroorganizmy glebowe, w tym grupy takie jak *Bacteroidetes*,  $\beta$ -*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* oraz *Bradyrhizobium* są niezbędne dla procesów biogeochemicznych, takich jak cykl azotu i fosforu, co przekłada się na żyzność gleby i wydajność upraw. Obecność metali ciężkich stanowi poważne zagrożenie dla tej mikrobiologicznej równowagi, potencjalnie zaburzając funkcjonowanie ekosystemów. Zrozumienie wpływu metali ciężkich na mikroflorę glebową ma również znaczenie praktyczne, oferując możliwości do poprawy praktyk rolniczych poprzez optymalizację stosowania mikroorganizmów w celu zwiększenia odporności roślin na stresy środowiskowe i poprawę żyzności gleby. Analiza populacji mikroorganizmów zasiedlających glebę po traktowaniu wybranymi stężeniami metali ciężkich została wykonana metodami molekularnymi. Półilościowa analiza (na podstawie intensywności fragmentów PCR) pozwoliła określić zmiany w populacjach wszystkich bakterii,  $\alpha$ -*Proteobakteria*,  $\beta$ -*Proteobakteria*, *Bacteroides*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* i *Bradyrhizobium* (bakterie zdolne do symbiozy z łubinami).

Analiza populacji wszystkich grup bakterii zasiedlających gleby do których wprowadzono badane metale ciężkie wykazała, że populacje wszystkich grup bakterii uległy niewielkim zmianom w porównaniu z próbą kontrolną (gleba nie traktowana metalami ciężkimi) (Ryc. 14). Spadek populacji wszystkich bakterii obserwowano w glebie, do której dodano jony miedzi o stężeniu 1 mM, natomiast niewielki wzrost populacji bakterii obserwowano w obecności jonów manganu w stężeniu 80 mM (Ryc. 14). Interesujące wyniki uzyskano dla próbek gleby traktowanych  $Cd^{2+}$ , w których populacje bakterii były porównywalne z populacją w próbie kontrolnej (Ryc. 14). Co ciekawe, bakterie zasiedlające badane próbki gleby wykazywały dużą tolerancję na obecność badanych HM. Najpewniej spowodowane jest to faktem, iż biodostępna frakcja metali ciężkich w próbkach gleby jest stosunkowo niewielka w porównaniu do całkowitej zawartości HM. Efekt ten może być

związany z pH gleby i innymi kluczowymi czynnikami determinującymi dostępność HM w glebie. Niskie wartości pH zmniejszają absorpcję HM na minerałach ilastych, uwodnionych tlenkach i powierzchniach organicznych (Guo i in., 2018). Inne parametry fizykochemiczne gleby mogą również przyczyniać się do negatywnego wpływu HM na populacje drobnoustrojów glebowych. Wyniki tych badań są zgodne z innymi badaniami sugerującymi, że pH i zawartość wody mają znaczący wpływ na ilość i różnorodność mikroorganizmów w glebie (Jarosławiecka i Piotrowska-Seget, 2022).



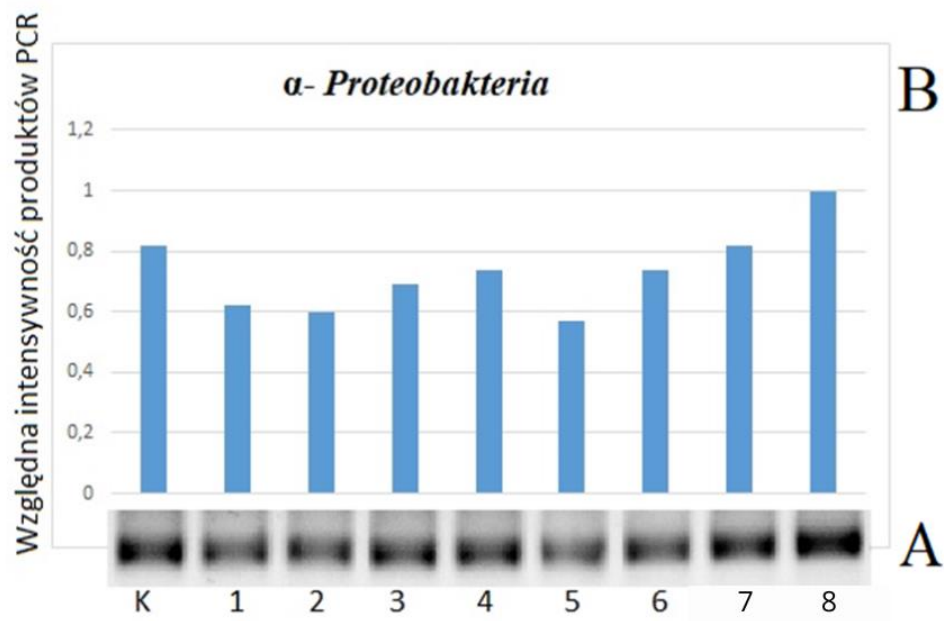
**Ryc. 14. Wszystkie bakterie zasiedlające próbki gleby. Poszczególne ścieżki w żelu agarozowym (A) i słupki na wykresie (B) odpowiadają: K - gleba bez dodatku metali ciężkich, 1 - gleba po dodaniu 0,5 mM Cu, 2 - gleba po dodaniu 1 mM Cu, 3 - gleba po dodaniu 0,5 mM Ni, 4 - gleba po dodaniu 1 mM Ni, 5 - gleba po dodaniu 5 mM Mn, 6 - gleba po dodaniu 80 mM Mn, 7 - gleba po dodaniu 0,01 mM Cd i 8 - gleba po dodaniu 0,1 mM Cd**

Analiza populacji mikroorganizmów z grupy *Bacterioides* wykazała nieznaczne różnice w obecności jonów miedzi i niklu, natomiast obecność jonów manganu (80 mM) i kadmu (0,01 i 0,1 mM) powodowała przyrost liczebności tej populacji (Ryc. 17). Nieznaczny spadek w liczebności populacji, w obecności wszystkich badanych metali charakteryzował bakterie z grupy  $\beta$ - *Proteobakteria* (Ryc. 16). Populacja

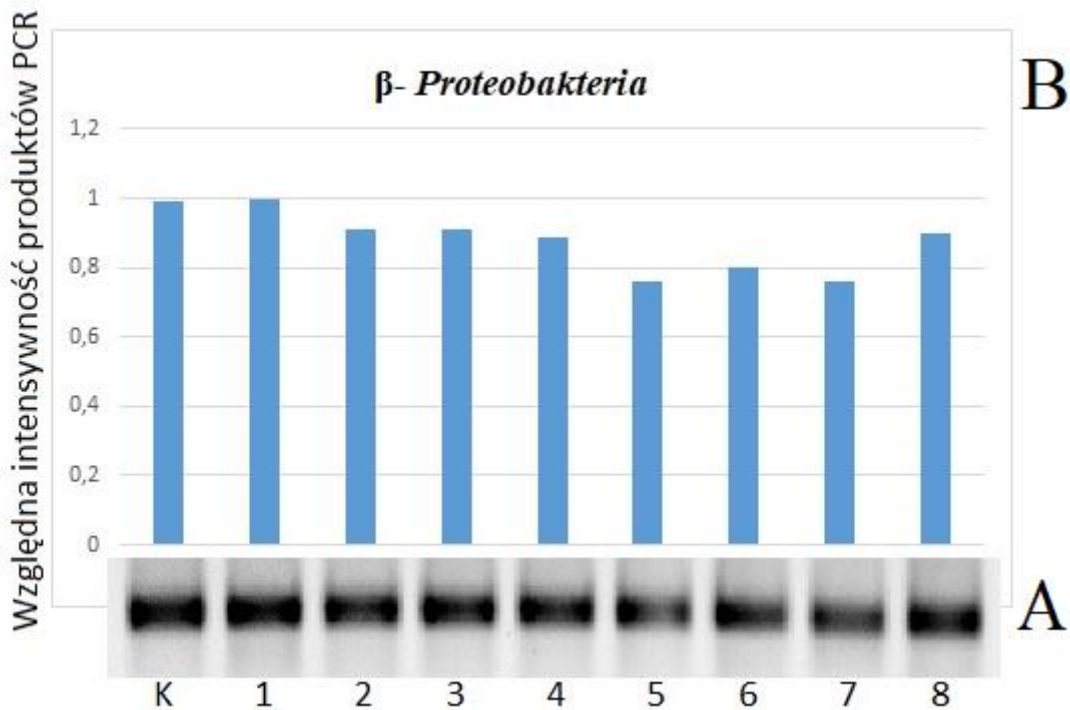
*α-Proteobacteria* wykazała tendencje spadkowe w obecności jonów miedzi, niklu i manganu, natomiast obecność jonów kadmu o stężeniu 1 mM powodowała jej przyrost (Ryc. 15). Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki można przypuszczać, że mikroorganizmy z tej grupy wykazują wyższą tolerancję na obecność kadmu w porównaniu do innych mikroorganizmów, co umożliwi im dominację gatunkową.

Mikroorganizmy z populacji *Firmicutes* w obecności jonów miedzi, niklu, 5mM manganu i 0,1 mM kadmu wykazywały nieznaczne tendencje spadkowe w porównaniu z próbą kontrolną, natomiast mangan o stężeniu 80 mM powodował przyrost tej populacji (Ryc. 19). Populacja *Actinobacteria* okazała się najbardziej wrażliwa na obecność jonów miedzi, niklu manganu i kadmu, ponieważ wszystkie stężenia badanych metali powodowały spadek populacji w porównaniu z próbą kontrolną (Ryc. 18). Wyniki te nie są zbieżne z innymi badaniami sugerującymi, że *Actinobacteria* tolerują znacznie wyższe stężenia HM niż inne bakterie glebowe w tych samych warunkach (Alvarez i in., 2017; Pereira i in., 2014).

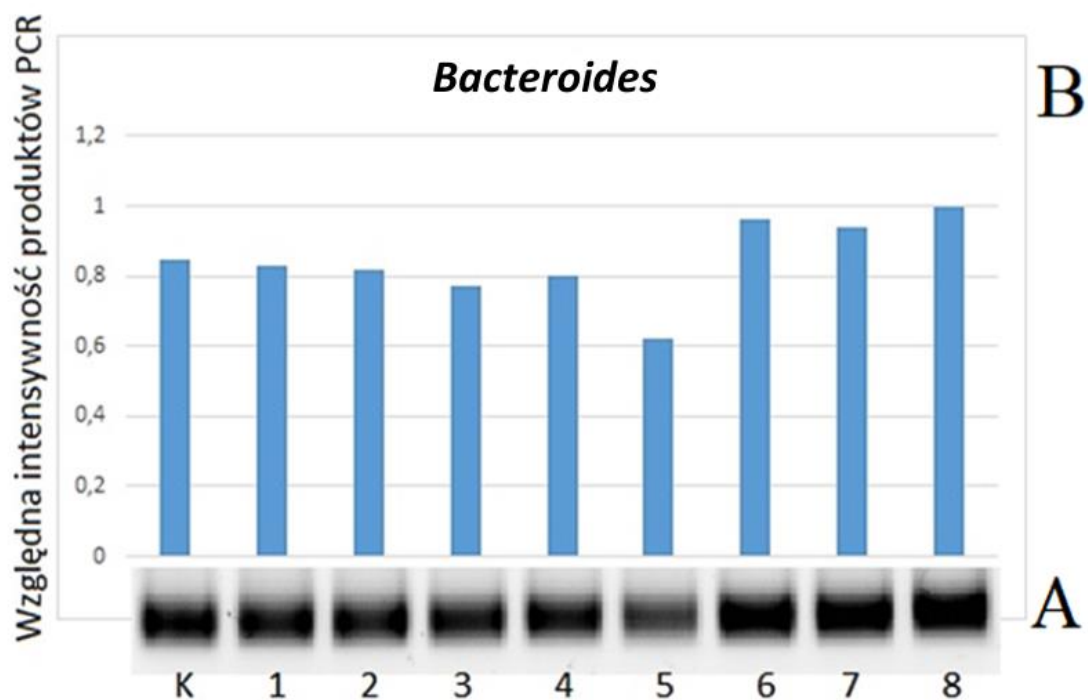
Negatywny wpływ wszystkich badanych metali ciężkich odnotowano także wobec bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* zdolnych do tworzenia układów symbiotycznych z łąbinami, w przypadku których obserwowano zauważalny spadek liczebności populacji. Najmniejszy spadek populacji obserwowano w obecności jonów miedzi (1mM) (Ryc. 20).



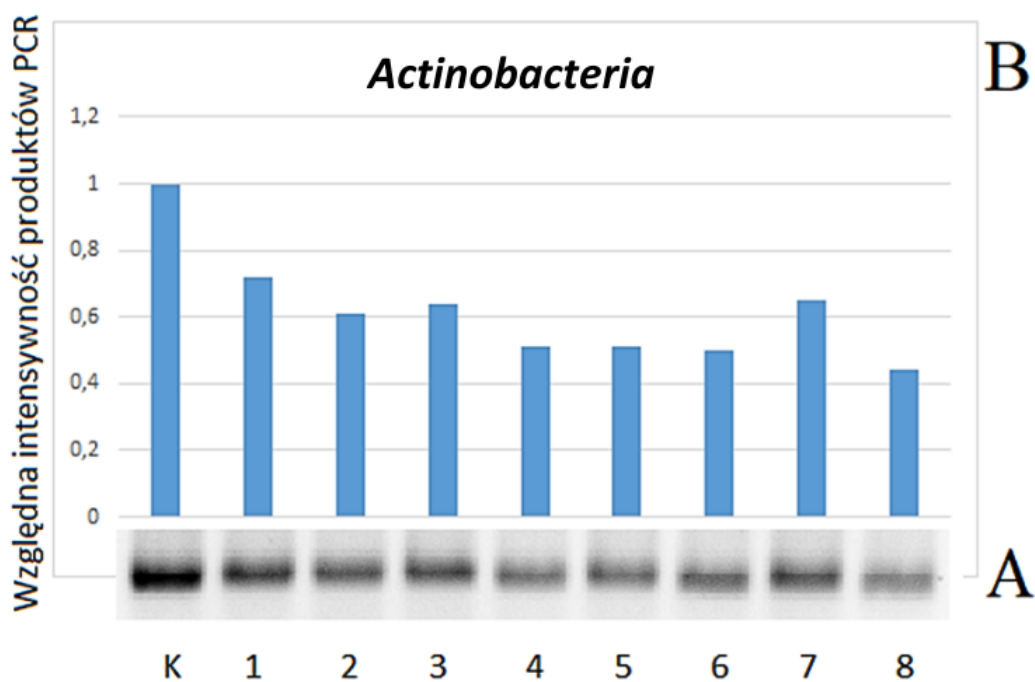
**Ryc. 15. *α-Proteobacteria* zasiedlające próbki gleby. Poszczególne ścieżki w żelu agarozowym (A) i słupki na wykresie (B) odpowiadają: K - gleba bez dodatku metali ciężkich, 1 - gleba po dodaniu 0,5 mM Cu, 2 - gleba po dodaniu 1 mM Cu, 3 - gleba po dodaniu 0,5 mM Ni, 4 - gleba po dodaniu 1 mM Ni, 5 - gleba po dodaniu 5 mM Mn, 6 - gleba po dodaniu 80 mM Mn, 7 - gleba po dodaniu 0,01 mM Cd i 8 - gleba po dodaniu 0,1 mM Cd**



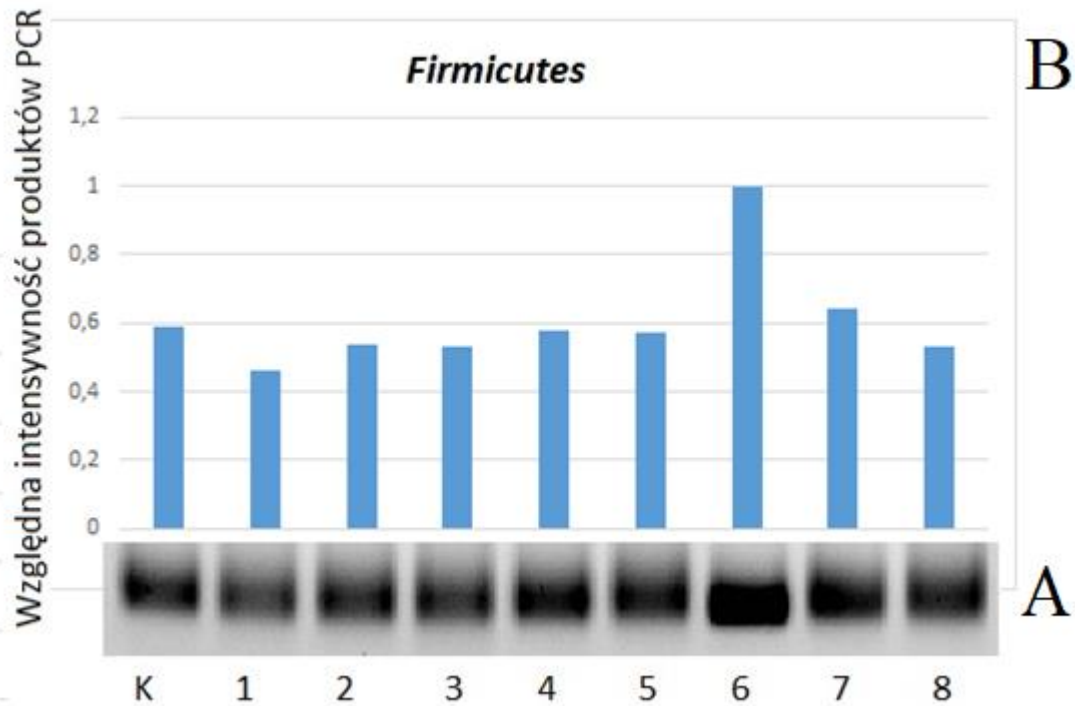
**Ryc. 16.  $\beta$ - Proteobacteria zasiedlające próbki gleby. Poszczególne ścieżki w żelu agarozowym (A) i słupki na wykresie (B) odpowiadają: K - gleba bez dodatku metali ciężkich, 1 - gleba po dodaniu 0,5 mM Cu, 2 - gleba po dodaniu 1 mM Cu, 3 - gleba po dodaniu 0,5 mM Ni, 4 - gleba po dodaniu 1 mM Ni, 5- gleba po dodaniu 5 mM Mn, 6 - gleba po dodaniu 80 mM Mn, 7 - gleba po dodaniu 0,01 mM Cd i 8 - gleba po dodaniu 0,1 mM Cd**



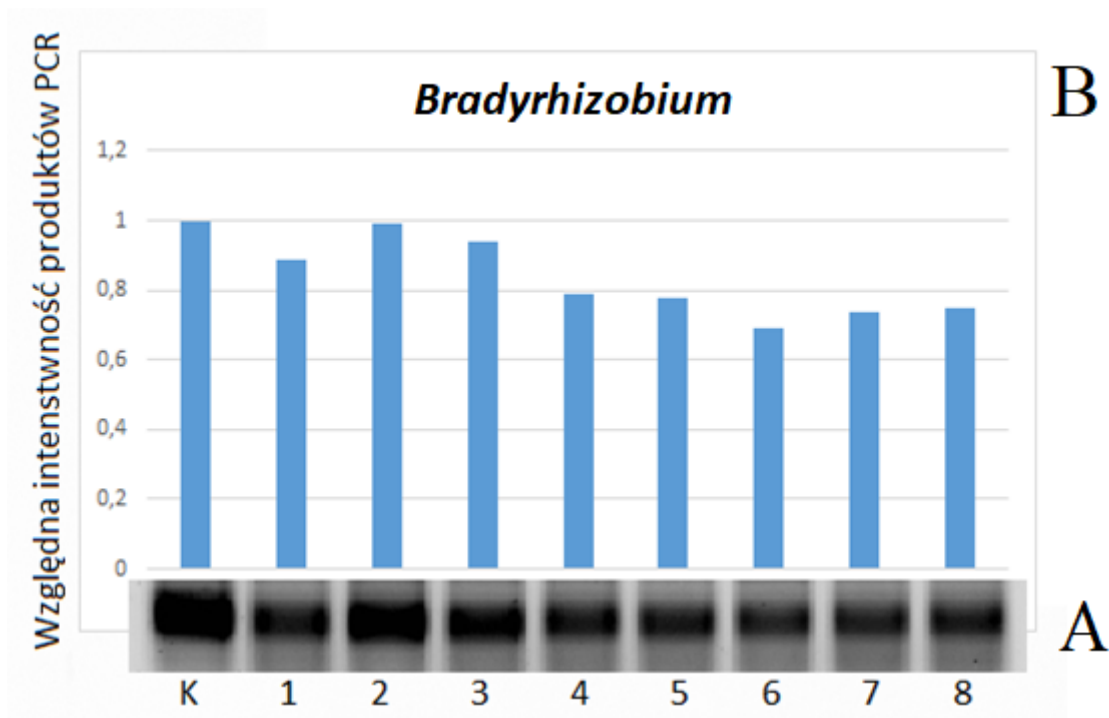
**Ryc. 17. *Bacteroides* zasiedlające próbki gleby. Poszczególne ścieżki w żelu agarozowym (A) i słupki na wykresie (B) odpowiadają: K - gleba bez dodatku metali ciężkich, 1 - gleba po dodaniu 0,5 mM Cu, 2 - gleba po dodaniu 1 mM Cu, 3 - gleba po dodaniu 0,5 mM Ni, 4 - gleba po dodaniu 1 mM Ni, 5 - gleba po dodaniu 5 mM Mn, 6 - gleba po dodaniu 80 mM Mn, 7 - gleba po dodaniu 0,01 mM Cd i 8 - gleba po dodaniu 0,1 mM Cd**



**Ryc. 18.** *Actinobacteria* zasiedlające próbki gleby. Poszczególne ścieżki w żelu agarowym (A) i słupki na wykresie (B) odpowiadają: **K** - gleba bez dodatku metali ciężkich, **1** - gleba po dodaniu 0,5 mM Cu, **2** - gleba po dodaniu 1 mM Cu, **3** - gleba po dodaniu 0,5 mM Ni, **4** - gleba po dodaniu 1 mM Ni, **5** - gleba po dodaniu 5 mM Mn, **6** - gleba po dodaniu 80 mM Mn, **7** - gleba po dodaniu 0,01 mM Cd i **8** - gleba po dodaniu 0,1 mM Cd



**Ryc. 19.** *Firmicutes* zasiedlające próbki gleby. Poszczególne ścieżki w żelu agarozowym (A) i słupki na wykresie (B) odpowiadają: **K** - gleba bez dodatku metali ciężkich, **1** - gleba po dodaniu 0,5 mM Cu, **2** - gleba po dodaniu 1 mM Cu, **3** - gleba po dodaniu 0,5 mM Ni, **4** - gleba po dodaniu 1 mM Ni, **5** - gleba po dodaniu 5 mM Mn, **6** - gleba po dodaniu 80 mM Mn, **7** - gleba po dodaniu 0,01 mM Cd i **8** - gleba po dodaniu 0,1 mM Cd



**Ryc. 20. *Bradyrhizobium* zasiedlające próbki gleby. Poszczególne ścieżki w żelu agarozowym (A) i słupki na wykresie (B) odpowiadają: K - gleba bez dodatku metali ciężkich, 1 - gleba po dodaniu 0,5 mM Cu, 2 - gleba po dodaniu 1 mM Cu, 3 - gleba po dodaniu 0,5 mM Ni, 4 - gleba po dodaniu 1 mM Ni, 5 - gleba po dodaniu 5 mM Mn, 6 - gleba po dodaniu 80 mM Mn, 7 - gleba po dodaniu 0,01 mM Cd i 8 - gleba po dodaniu 0,1 mM Cd**

Zanieczyszczenie gleby HM stanowi istotny problem współczesnego świata, a zwłaszcza rolnictwa, od którego w dużej mierze zależy „zdrowie” gleby. Badanie zbiorowisk bakterii glebowych jest obecnie szeroko stosowane do oceny stopnia negatywnego wpływu działalności człowieka, jednakże na podstawie przeprowadzonych badań, trudno jednoznacznie określić, w jaki sposób zanieczyszczenia wpływają na skład taksonomiczny i różnorodność bakterii glebowych. Może to wynikać z faktu, że gleba jest siedliskiem niezwykle heterogenicznym, na które nakłada się wiele czynników: pH, tekstura, zawartość materii organicznej, wilgotność, temperatura, szata roślinna itp. Ponadto wykazano różnicę w wynikach długoterminowych badań terenowych i krótkoterminowych badań laboratoryjnych.

Szereg badań wykazało możliwość adaptacji bakteriocenozy gleby do długotrwałego (wieloletniego) oddziaływania zanieczyszczeń, natomiast ostre, stosunkowo krótkotrwałe oddziaływanie niekorzystnie wpływa na bogactwo i różnorodność bakterii glebowych. Na

przykład długotrwałe narażenie na HM może prowadzić do pojawienia się tolerancji w społeczności bakteryjnej, ponieważ wrażliwe bakterie wymierają, a tolerancyjne taksony przeżywają w stresujących warunkach. W ten sposób bakterie glebowe mogą przystosować się do długotrwałego zanieczyszczenia metalami ciężkimi, zmieniając skład taksonomiczny i strukturę społeczności bakteryjnej, zachowując jednocześnie różnorodność funkcjonalną i rolę ekologiczną mikrobiomu. Z drugiej strony, HM w niskich stężeniach (Zn, Cu, Cd, Hg) mogą nawet zwiększyć liczbę i różnorodność bakterii. Toksyczność substancji zanieczyszczającej w dużej mierze zależy od dawki, jak np. w przypadku Fe, Ni, Cd, dla których stwierdzono m.in. słabą korelację z różnorodnością bakteryjną.

Odporność zbiorowisk bakterii glebowych można prawdopodobnie wytłumaczyć redundancją funkcjonalną, tj. faktem, że funkcje gatunków wrażliwych na zanieczyszczenia można zastąpić funkcjami gatunków odpornych na zanieczyszczenia, które występowały już w glebie w małych ilościach. Bakterie są również w stanie przetrwać szeroki zakres zmian środowiskowych poprzez zmiany w ekspresji genów, co skutkuje zwiększoną odpornością na zanieczyszczenia. Zatem społeczności bakterii glebowych są złożonymi, precyzyjnie regulowanymi systemami, wrażliwymi na zanieczyszczenia, a jednocześnie posiadającymi niesamowity potencjał adaptacji i przywracania struktury i funkcji, nawet w najbardziej niesprzyjających warunkach. (Sazykin i in., 2023)

### **6.3. Biosynteza kwasu indolilo-3-octowego (IAA) w szczepach *Bradyrhizobium* (UPP 133, 213, 242 i 331) w obecności jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu**

Wydzielanie IAA, najważniejszej auksyny (fitohormonu), jest cechą charakterystyczną dla większości pożytecznych mikroorganizmów glebowych. Odgrywa kluczową rolę w wielu czynnościach fizjologicznych i metabolicznych, takich jak inicjacja wzrostu korzeni, rozwój zarodka, tworzenie liści i owoców itp. IAA jest syntetyzowany głównie z tryptofanu w wielu szlakach enzymatycznych, przez wiele różnych rodzajów PGPR.

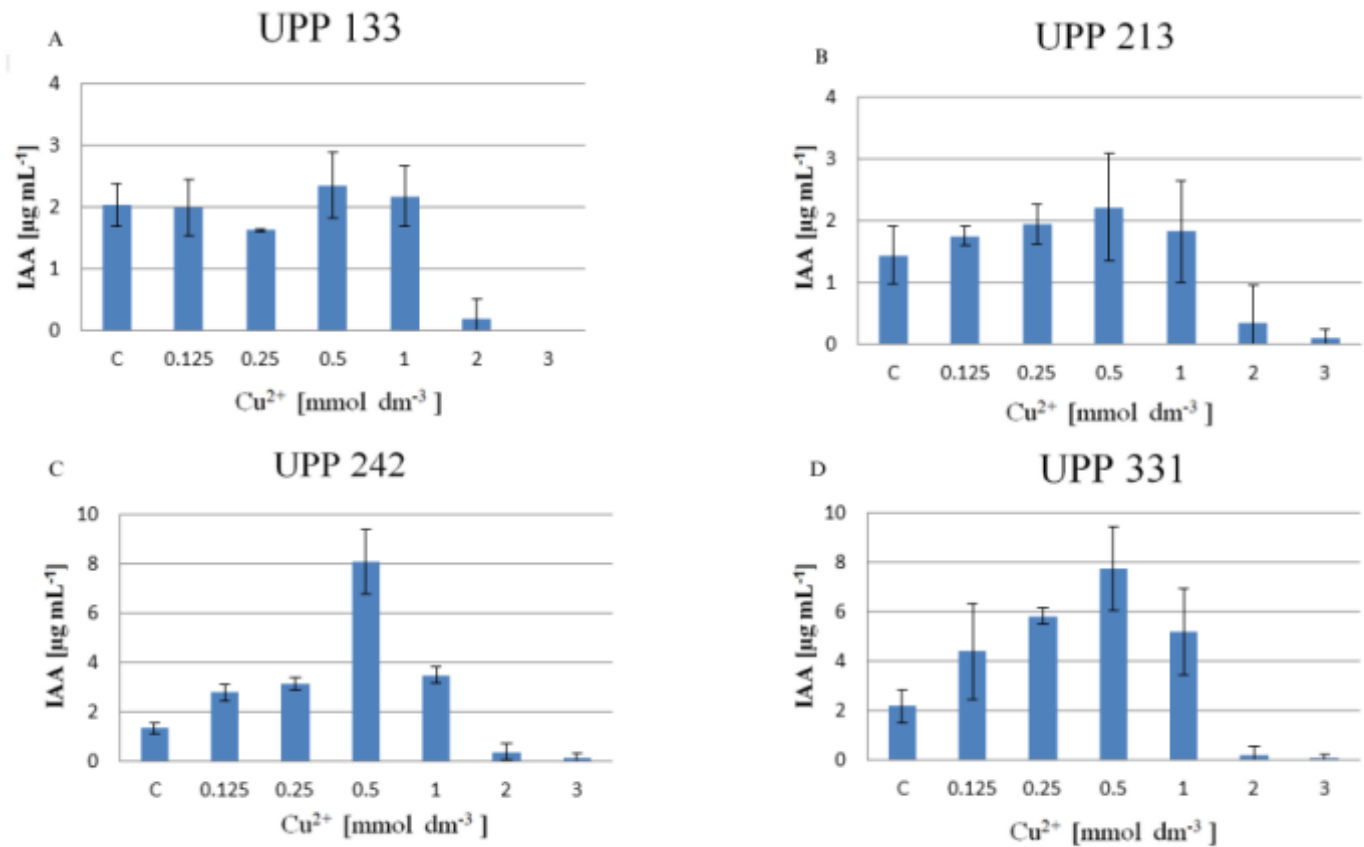
Biosynteza IAA przez wszystkie wykorzystywane w doświadczeniach szczepy *Bradyrhizobium* jest stymulowana obecnością badanych jonów metali ciężkich: miedzi, niklu, kadmu i manganu w różnych stężeniach

Badane szczepy *Bradyrhizobium* (UPP 113, 133 213 i 242) hodowane w obecności miedzi w zakresie stężeń od 0,125 mM do 1 mM wytwarzały więcej IAA niż próby kontrolne. Najwyższy poziom biosyntezy IAA obserwowano dla szczepu UPP 242, przy stężeniu 0,5 mM  $\text{Cu}^{2+}$ , który wyniósł 8,09 g/mL. (Ryc. 21).

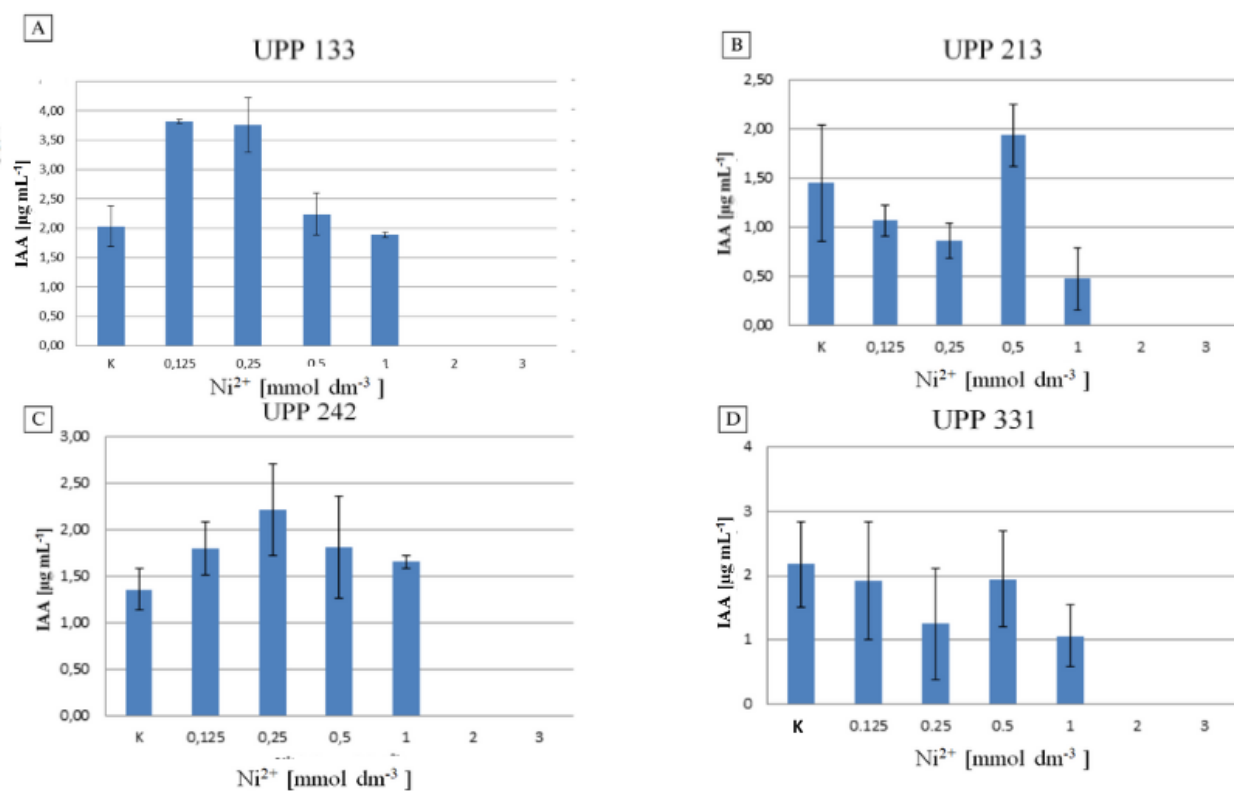
Szczepy UPP 133, UPP 213 i UPP 242 poddane działaniu różnych stężeń jonów niklu wytwarzały więcej IAA niż próba kontrolna. Największą ilość IAA obserwowano w stężeniach 0,125 mM i 0,25 mM dla szczepów UPP 133 i UPP 242 oraz w stężeniu 0,5 mM dla szczepu UPP 213. Najwyższy poziom syntezy IAA równy 3,86 g/mL odnotowano dla szczepu UPP 133 przy stężeniu 0,125 mM i był on prawie dwukrotnie wyższy niż w próbie kontrolnej. Szczep UPP 331 jako jedyny syntetyzował mniej IAA w porównaniu do próby kontrolnej w każdym z badanych stężeń  $\text{Ni}^{2+}$  (Ryc. 22). Poziom biosyntezy IAA dla szczepów UPP 242 oraz UPP 331 był znacznie niższy niż w przypadku tych samych szczepów eksponowanych na działanie  $\text{Cu}^{2+}$ .

Testy z płynnymi hodowlami i inhibicji strefowej wykazały bardzo wysoką tolerancję *Bradyrhizobium spp.* na obecność jonów  $\text{Mn}^{2+}$ , w porównaniu do trzech pozostałych metali ciężkich. Dlatego zdolność do biosyntezy IAA przeprowadzono w stężeniach  $\text{Mn}^{2+}$  w zakresie od 0,125 mM do 125 mM. Wszystkie szczepy syntetyzowały więcej IAA niż w próbach kontrolnych w zakresie stężeń od 0,125 mM do co najmniej 10 mM. Szczep UPP 242 charakteryzował się wyższą biosyntezą IAA w stężeniach do 80 mM, a szczep UPP 331 do 50 mM (Ryc. 23).

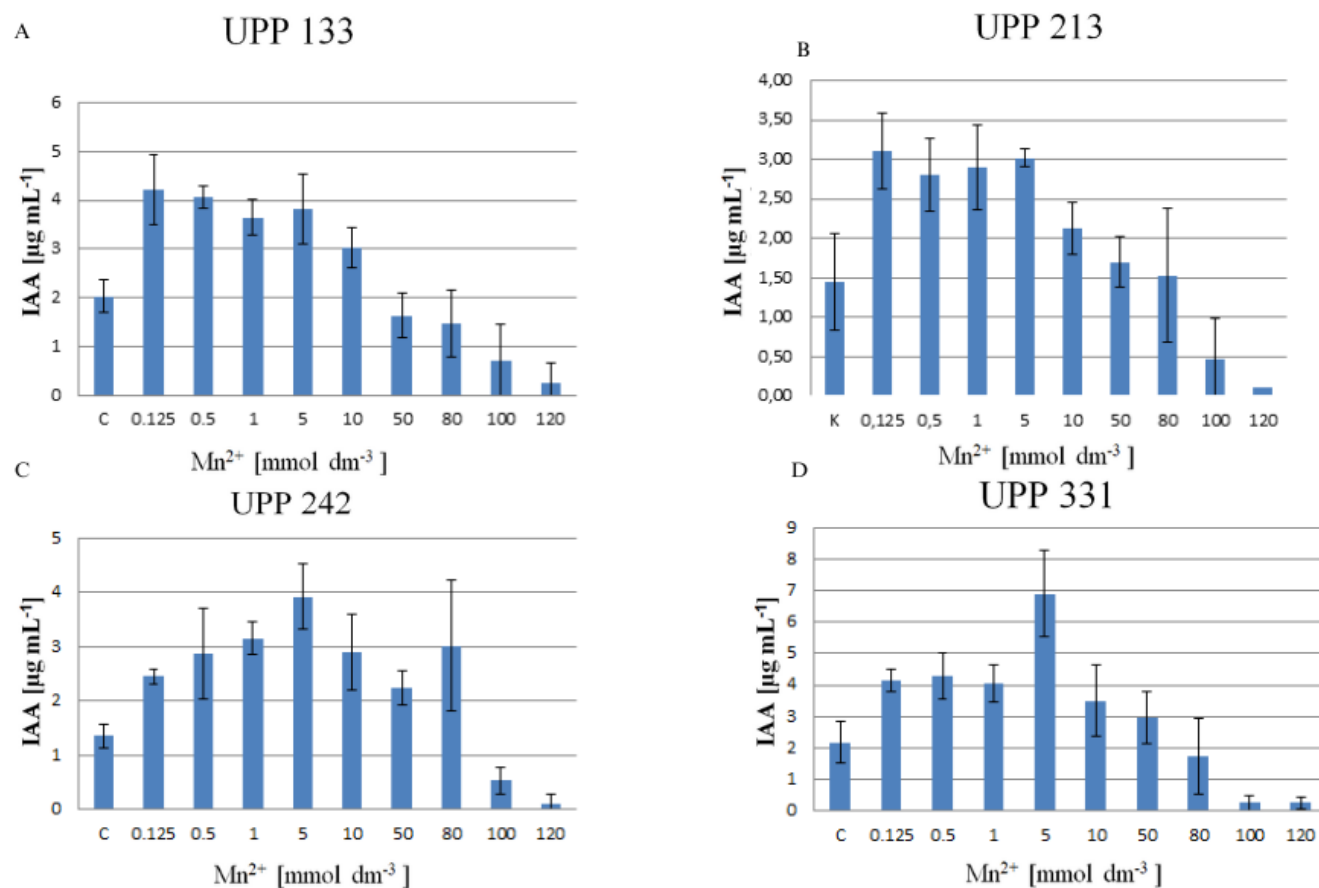
Kadm wykazywał toksyczność w stosunku do wszystkich badanych szczepów *Bradyrhizobium* co korelowało z obniżeniem poziomu biosyntezy IAA przez szczepy UPP 113 i 242 w zakresie wszystkich stężeń  $\text{Cd}^{2+}$ . W przypadku dwóch szczepów UPP 133 oraz UPP 331 hodowle wytwarzały mniej IAA niż próba kontrolna dla każdego stężenia  $\text{Cd}^{2+}$ . Dwa szczepy *Bradyrhizobium canariense*, UPP 213 i UPP 242, przy stężeniu 0,125 mM  $\text{Cd}^{2+}$  syntetyzowały większą ilość IAA niż w próbie kontrolnej (Ryc. 24).



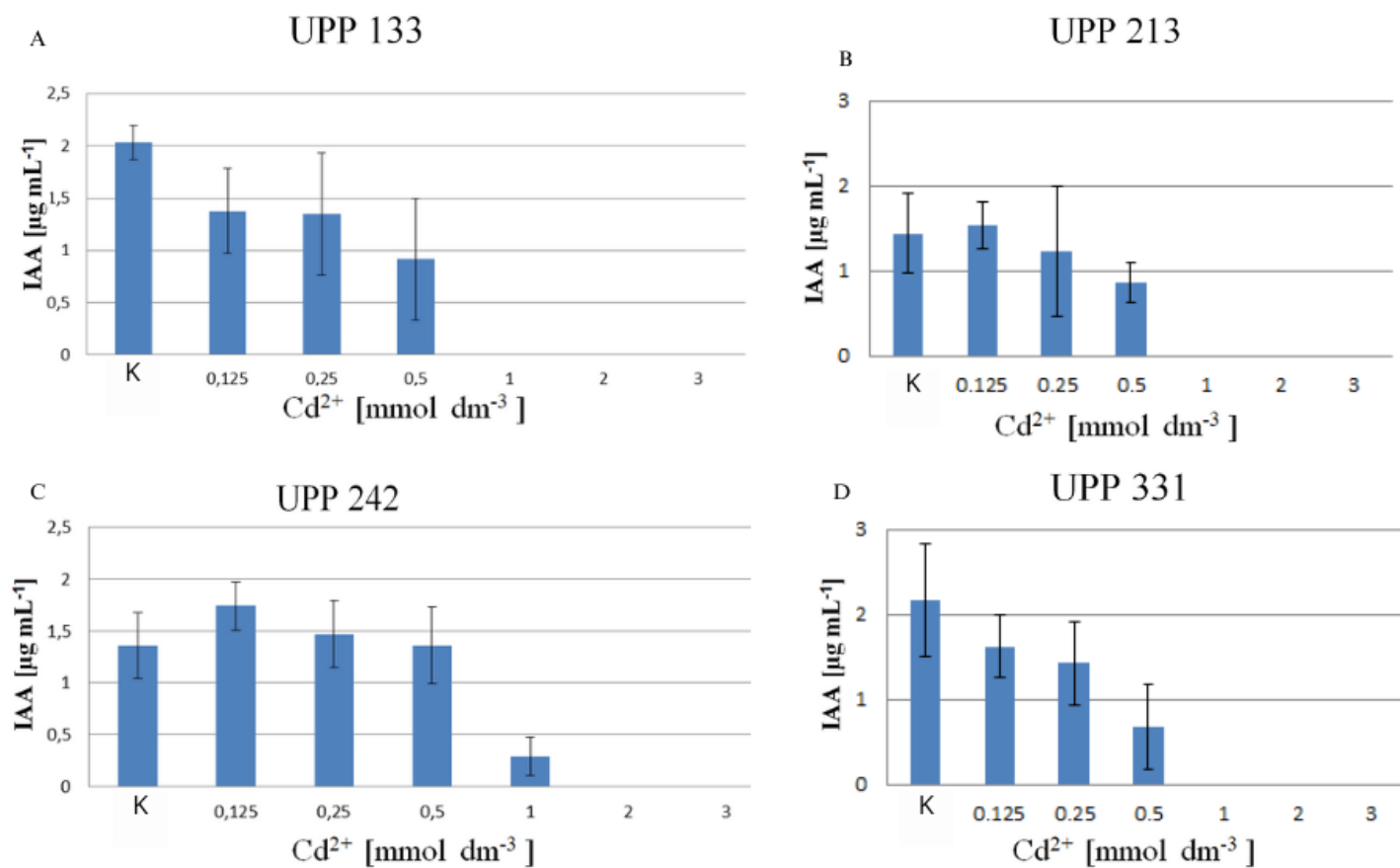
**Ryc.21. Synteza IAA przez szczepy *Bradyrhizobium* UPP 133, 213,242 i 331 w pożywkach płynnych TY zawierających różne stężenia jonów Cu<sup>2+</sup>. Pożywki płynne zawierały jony Cu<sup>2+</sup> o stężeniach 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM i 3 mM. **A** – szczep UPP 133, **B** - szczep UPP 213, **C** - szczep UPP 242 i **D** - szczep UPP 331. Próby kontrolne stanowiły hodowle poszczególnych szczepów bakteryjnych w pożywkach TY**



**Ryc. 22. Synteza IAA przez szczepy *Bradyrhizobium* UPP 133, 213,242 i 331 w pożywkach płynnych TY zawierających różne stężenia jonów Ni<sup>2+</sup>** Pożywki płynne zawierały jony Ni<sup>2+</sup> o stężeniach 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM i 3 mM. **A** – szczep UPP 133, **B** - szczep UPP 213, **C** - szczep UPP 242 i **D** - szczep UPP 331. Próby kontrolne stanowiły hodowle poszczególnych szczepów bakteryjnych w pożywkach TY



**Ryc. 23. Synteza IAA przez szczepy *Bradyrhizobium* UPP 133, 213, 242 i 331 w pożywkach płynnych TY zawierających różne stężenia jonów Mn<sup>2+</sup>. Pożywki płynne zawierały jony Mn<sup>2+</sup> o stężeniach 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM, 80 mM, 100 mM i 120 mM. **A** – szczep UPP 133, **B** - szczep UPP 213, **C** - szczep UPP 242 i **D** - szczep UPP 331. Próby kontrolne stanowiły hodowle poszczególnych szczepów bakteryjnych w pożywkach TY**



**Ryc. 24. Synteza IAA przez szczepy *Bradyrhizobium* UPP 133, 213,242 i 331 w pożywkach płynnych TY zawierających różne stężenia jonów Cd<sup>2+</sup>. Pożywki płynne zawierały jony Cd<sup>2+</sup> o stężeniach 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM i 3 mM. **A** – szczep UPP 133, **B** - szczep UPP 213, **C** - szczep UPP 242 i **D** - szczep UPP 331. Próby kontrolne stanowiły hodowle poszczególnych szczepów bakteryjnych w pożywkach TY**

Podsumowując wyniki powyższego doświadczenia, gdy niektóre z wybranych metali ciężkich były obecne w pożywce wzrostowej w niskich stężeniach, bakterie były pobudzane do wytwarzania większej ilości IAA w porównaniu z próbami kontrolnymi. Metale ciężkie użyte w tym eksperymencie są odpowiedzialne za wywoływanie stresu między innymi utrudniając komórkowe reakcje biochemiczne poprzez wytwarzanie reaktywnych form tlenu lub przyłączanie do enzymów, zmieniając ich konformację (Seneviratne i in., 2017). Rozsądna interpretacja sugeruje, że podwyższona biosynteza IAA przez bakterie poddane stresowi związanemu z ekspozycją na toksyczne stężenia metali ciężkich może być odpowiedzią obronną. Dzięki wychwytywaniu jonów metali ciężkich za pomocą IAA zmniejsza się ekspozycja i toksyczny efekt obecności metali, umożliwiając jednocześnie ich sekwestrację do celów biologicznych. Zdolność do prawidłowego funkcjonowania w wyższych stężeniach  $Mn^{2+}$  w porównaniu do pozostałych trzech metali ciężkich może być związana z funkcjonowaniem specyficznych dla manganu systemów eksportu, które bakterie posiadają w celu przeciwdziałania przeciążeniu tym pierwiastkiem (Juttukonda i Skaar, 2015). To może wyjaśniać, dlaczego najwyższą odporność na wzrastające stężenie metalu ciężkiego zaobserwowano w przypadku manganu, mimo że najwyższą biosyntezę IAA zaobserwowano w przypadku miedzi. Warto zauważyć, że żaden ze szczepów nie wykazywał zwiększonej biosyntezy IAA po ekspozycji na działanie zbędnego dla komórek bakteryjnych i toksycznego dla nich kadmu, w badanym zakresie stężeń. Możliwe, że zwiększona biosynteza IAA byłaby obserwowana przy niższych niż zastosowane w doświadczeniu stężeniach, zwłaszcza dla szczepu UPP 242, który wykazywał wstępnie wyższą biosyntezę IAA niż kontrola dla najniższego z badanych stężenia – 0,125 mM.

Naturalnie występujące w glebie bakterie z rodzaju *Bradyrhizobium spp.* Posiadają zdolność do infekowania komórek korzeni roślin bobowatych, tworząc brodawki. W postaci bakteroidów wewnątrz brodawki korzeniowej są mniej narażone na szkodliwy wpływ wyższych stężeń metali ciężkich. IAA wytwarzane przez bakterie zmniejszają integralność ścian komórkowych gospodarza i może wpływać na sygnalizację roślin z wykorzystaniem auksyn, pomagając bakteriom uniknąć systemu obronnego roślin (A. Hussain i in., 2015). Dlatego zwiększona biosynteza IAA indukowana wyższym stężeniem metali ciężkich może dodatkowo zmniejszyć niekorzystny wpływ metali ciężkich, poprzez ułatwienie infekcji korzeni roślin.

Barnawal i in., (2017) przetestowali wybrane szczepy PGPR pod wpływem stresu solnego i zauważyli, że bakterie zwiększają biosyntezę IAA, aby zwiększyć tolerancję roślin

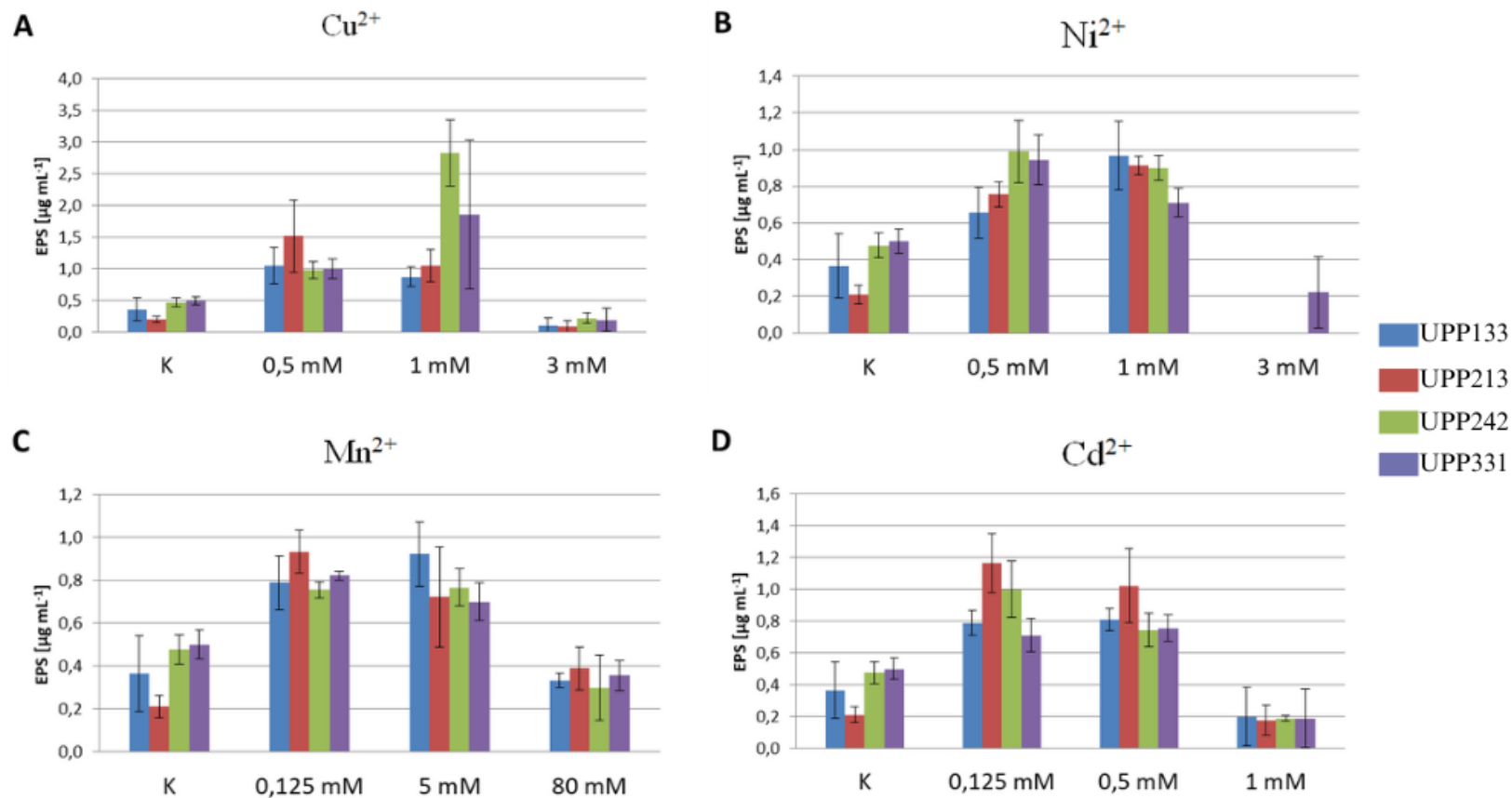
bytujących w ich środowisku na stres wywołany ekstensywnym zasoleniem. Azcon i in. (2010) oraz Luo i in. podobnie wykazali, że inokulacja nasion szczepami PGPR spowodowała zmniejszenie fitotoksyczności metali ciężkich dla *Trifolium repens* oraz *Solanum nigrum*. W obu przypadkach bakterie wytwarzały zewnątrzkomórkowo IAA. W symbiozie z rośliną żywicielską zwiększona biosynteza IAA może również pełnić rolę w ochronie rośliny żywicielskiej, która zapewnia bezpieczne środowisko dla PGPR. Uzyskane w powyższym doświadczeniu wyniki mogą sugerować, że fitohormon ten jest wytwarzany przez mikroorganizmy w odpowiedzi na stres związany z wysokimi stężeniami metali ciężkich w celu zapewnienia korzyści zarówno dla mikrosymbiontów, jak i gospodarza roślinnego. Dodatkowo zwiększona biosynteza kwasu indolilo-3-octowego przez rizobia może przyczyniać się do intensyfikacji rozwoju systemu korzeniowego roślin bobowatych. Hipotetycznie, bardziej rozbudowany system korzeniowy ułatwia kolonizację mikrobiologiczną oraz promuje formowanie brodawek korzeniowych. Obfitsze korzenie mogą lepiej absorbować wodę i składniki odżywcze, co z kolei może mieć bezpośredni wpływ na zwiększenie odporności roślin na inne stresy abiotyczne, takie jak susza czy deficyty składników mineralnych.

#### **6.4. Biosynteza zewnątrzkomórkowych polisacharydów (EPS) w szczepach *Bradyrhizobium* (UPP 133, 213, 242 i 331) w obecności jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu**

Dane literaturowe sugerują, że zewnątrzkomórkowe polisacharydy (EPS) odgrywają istotną rolę w procesie adaptacji, trwałej kolonizacji, tworzeniu biofilmu oraz tolerancji na stres biotyczny i abiotyczny. Jeśli EPS występują jako część ściany komórkowej, mogą zapewnić komórce bakteryjnej integralność strukturalną i pewne specyficzne właściwości ochronne. EPS otaczające komórki bakteryjne są głównym składnikiem ułatwiającym przyleganie komórek do powierzchni (Kaur i Dey, 2023).

W związku z tym zbadano wpływ różnych stężeń jonów  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  na syntezę EPS przez 4 szczepy *Bradyrhizobium*: UPP 113, 133, 242 i 331. Wykazano, że obecność jonów wszystkich badanych metali ciężkich w określonych stężeniach pozytywnie wpływa na syntezę EPS przez badane szczepy (Ryc. 25). Podwyższony poziom syntezy EPS obserwowano po dodaniu do płynnej pożywki TY jonów  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  w stężeniach 0,5 mM

i 1 mM, jonów  $Mn^{2+}$  w stężeniu 0,125 mM i 5 mM oraz jonów  $Cd^{2+}$  w stężeniu 0,125mM i 0,5 mM. Wzrost stężenia badanych jonów metali ciężkich nie ma przełożenia na zwiększanie syntezy EPS. Stężenia wszystkich jonów metali ciężkich, które nie powodowały hamowania wzrostu szczepów *Bradyrhizobium* indukowały od 5 do 10 krotnie większy poziom biosyntezy EPS w porównaniu do warunków kontrolnych.

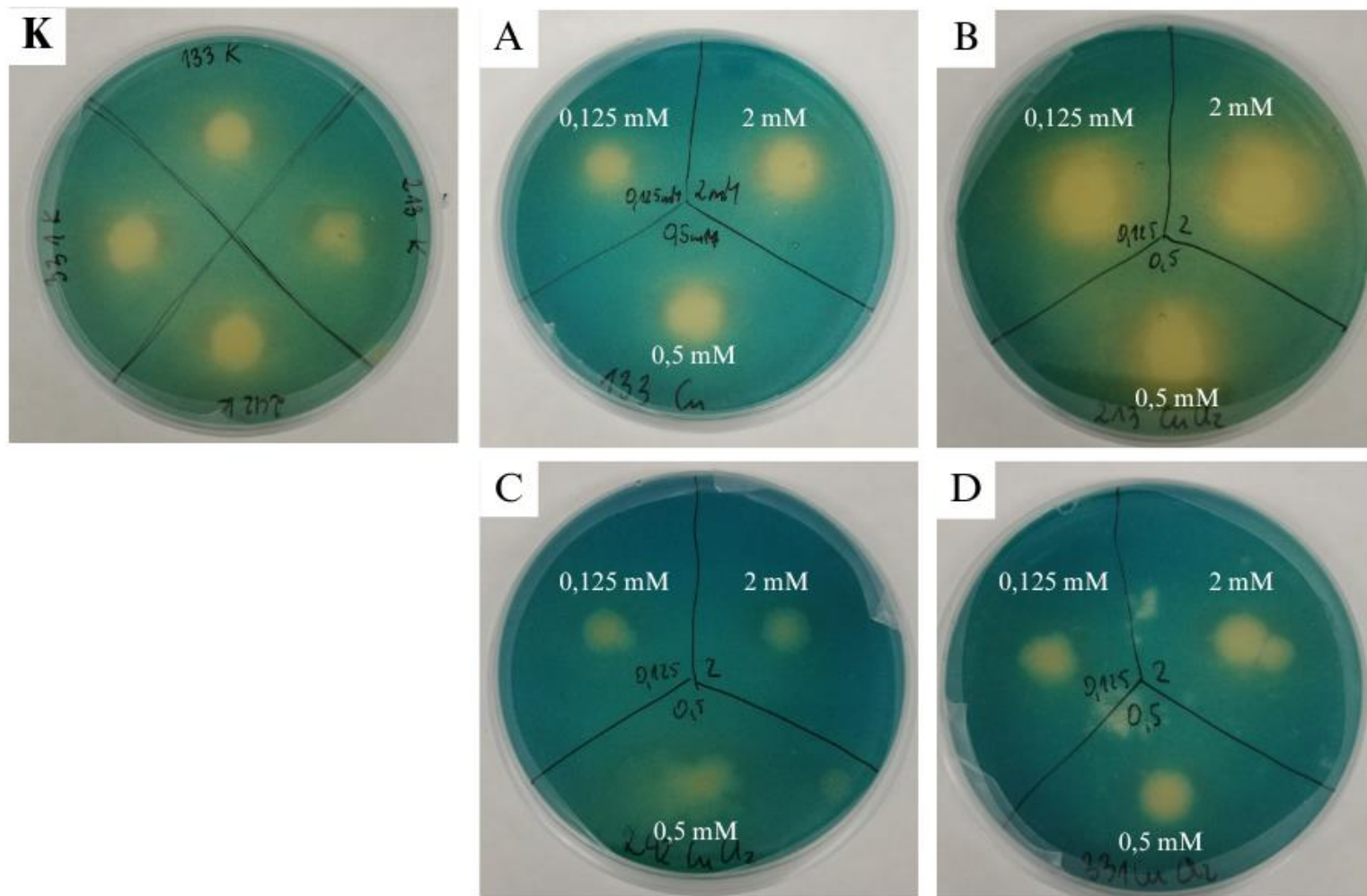


**Ryc. 25. Synteza EPS przez szczepy *Bradyrhizobium* UPP 133, 213,242 I 331 w pożywkach płynnych TY zawierających różne stężenia Cu, Ni, Mn i Cd.** Pożywki płynne zawierały odpowiednio: **A** – jony Cu<sup>2+</sup> o stężeniach 0,5 mM, 1 mM i 3 Mm, **B** – jony Ni<sup>2+</sup> o stężeniach 0,5 mM, 1 mM i 3 mM, **C**– jony Mn<sup>2+</sup> o stężeniach 0,125 mM, 5 mM i 80 mM, **D** – jony Cd<sup>2+</sup> o stężeniach 0,125 mM, 0,5 mM i 1 mM. Próby kontrolne stanowiły hodowle poszczególnych szczepów bakteryjnych w pożywkach TY

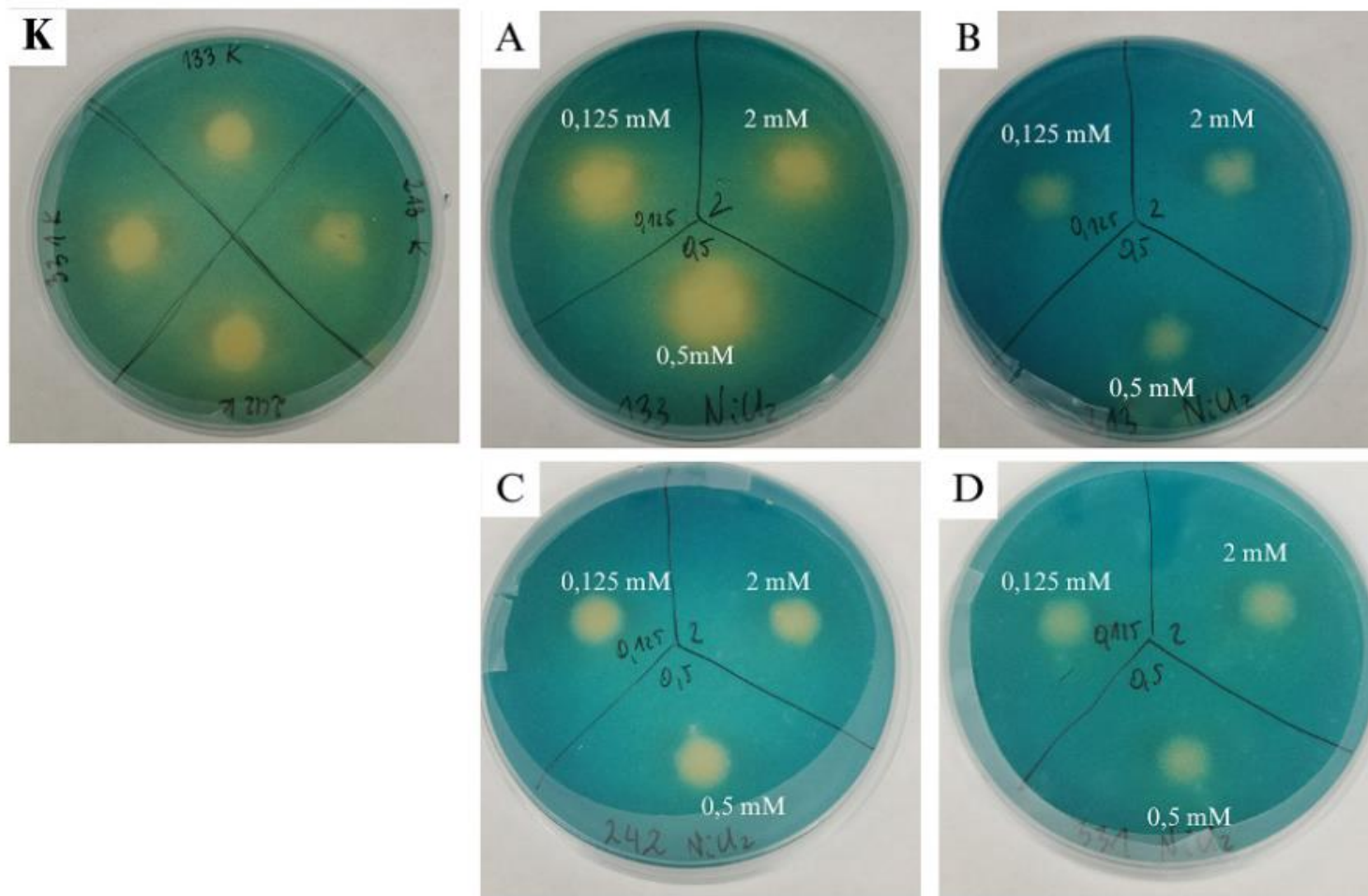
Wyniki te potwierdzają, że szczepy *Bradyrhizobium* zaliczane do PGPR mogą posiadać również potencjał remediacyjny wobec metali ciężkich i metaloidów. Bakterie te mogą redukować toksyczne działanie metali ciężkich poprzez ich adsorpcję i akumulację poprzez wiązanie do egzopolisacharydów, których biosynteza na wysokim poziomie jest ich cechą charakterystyczną (Hao i in., 2014). Uzyskany wynik jest zgodny z rezultatami eksperymentów podawanymi przez innych autorów, którzy wykazywali wzrost poziomu biosyntezy EPS w odpowiedzi na obecność metali ciężkich u innych gatunków bakterii (Deepika i in., 2016). Podobne obserwacje wykazano w przypadku doświadczeń przeprowadzonych przez Kopycińską (2020), w których szczepy rizobiów wykazywały zwiększoną syntezę EPS w obecności jonów cynku, z jedyną różnicą, że ilość biopolimeru rosła wraz ze wzrostem stężenia jonów metalu w zakresie badanych stężeń. Ten sam efekt odnotowano również w badaniach dotyczących wpływu jonów toru na *Bradyrhizobium* (Santamaría i in., 2003). Ponadto w doniesieniu Slaveykova i in., (2010) poddane stresowi wywołanemu przez jony  $Cd^{2+}$  komórki *S. meliloti* przyłączały jon metalu do EPS syntetyzowanego przez bakterie, wykazano także, że ilość  $Cd^{2+}$  związanego z EPS wzrasta przy wysokich stężeniach tego jonu, co sugeruje potencjalne zastosowanie EPS w bioremediacji. Jedną z metod usuwania metali ciężkich ze środowiska jest będąca alternatywą dla konwencjonalnych metod, biosorpcja metali ciężkich oparta na zdolnościach sorpcyjnych materiałów biologicznych. Spośród wielu biosorbentów, między innymi, bakteryjne EPS są wykorzystywane do usuwania metali ciężkich ze środowiska (Moppert i in., 2009). Przewaga bakteryjnego EPS w porównaniu z polimerami wytwarzanymi przez inne organizmy (glony czy rośliny) wynika z ich właściwości chemicznych i fizycznych, gdyż w ich strukturze obecne są liczne, jonizowane grupy funkcyjne (np. octanowe, karboksylowe, aminowe, fosforanowe, hydroksylowe), które stanowią potencjalne miejsca sekwestracji metali (Guezennec, 2002). Fakt ten może sugerować, że zwiększona biosynteza EPS indukowana obecnością jonów metali ciężkich w środowisku, jest metodą obrony przed stresem, który te pierwiastki mogą wywoływać, co może mieć bezpośredni wpływ na tworzenie optymalnych warunków dla zawiązywania układów symbiotycznych.

## **6.5. Biosynteza sideroforów w szczepach *Bradyrhizobium* (UPP 133, 213, 242 i 331) w obecności jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu**

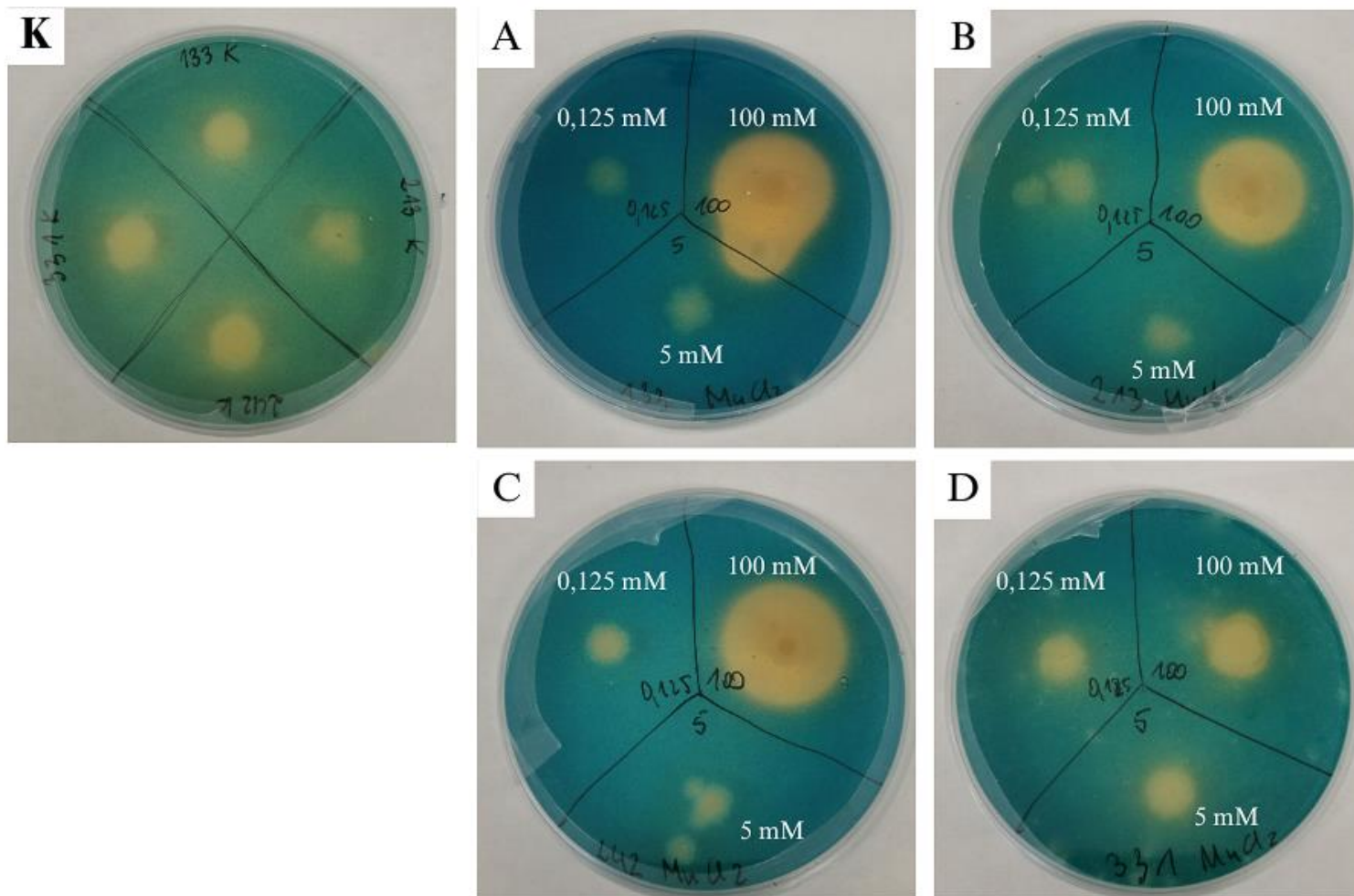
Siderofory mają niezwykle wysokie powinowactwo do żelaza, lecz tworzą także kompleksy z metalami innymi niż Fe, chociaż z niższym powinowactwem. Metale inne niż żelazo mogą stymulować lub hamować produkcję sideroforów w bakteriach. Biosynteza sideroforów przez bakterie w obecności metali toksycznych wskazuje na ich potencjał w zakresie wchłaniania, mobilizacji metali ciężkich lub rozwijania oporności na metale. Interesującym więc wydawało się określić jaki wpływ na syntezę sideroforów przez szczepy *Bradyrhizobium*, będą miały badane metale ciężkie. Do analizy poziomu syntetyzowanych sideroforów przez szczepy *Bradyrhizobium* (UPP 113, 133, 242 i 331) w obecności badanych metali ciężkich wykorzystano 96 godzinne hodowle bakteryjne nie zawierające (warunki kontrolne) oraz zawierające wybrane stężenia metali (stężenia metali wybrano na podstawie wcześniej prowadzonych doświadczeń). Syntezę sideroforów przez szczepy *Bradyrhizobium* analizowano zarówno w pożywkach stałych jak i w pożywkach płynnych.



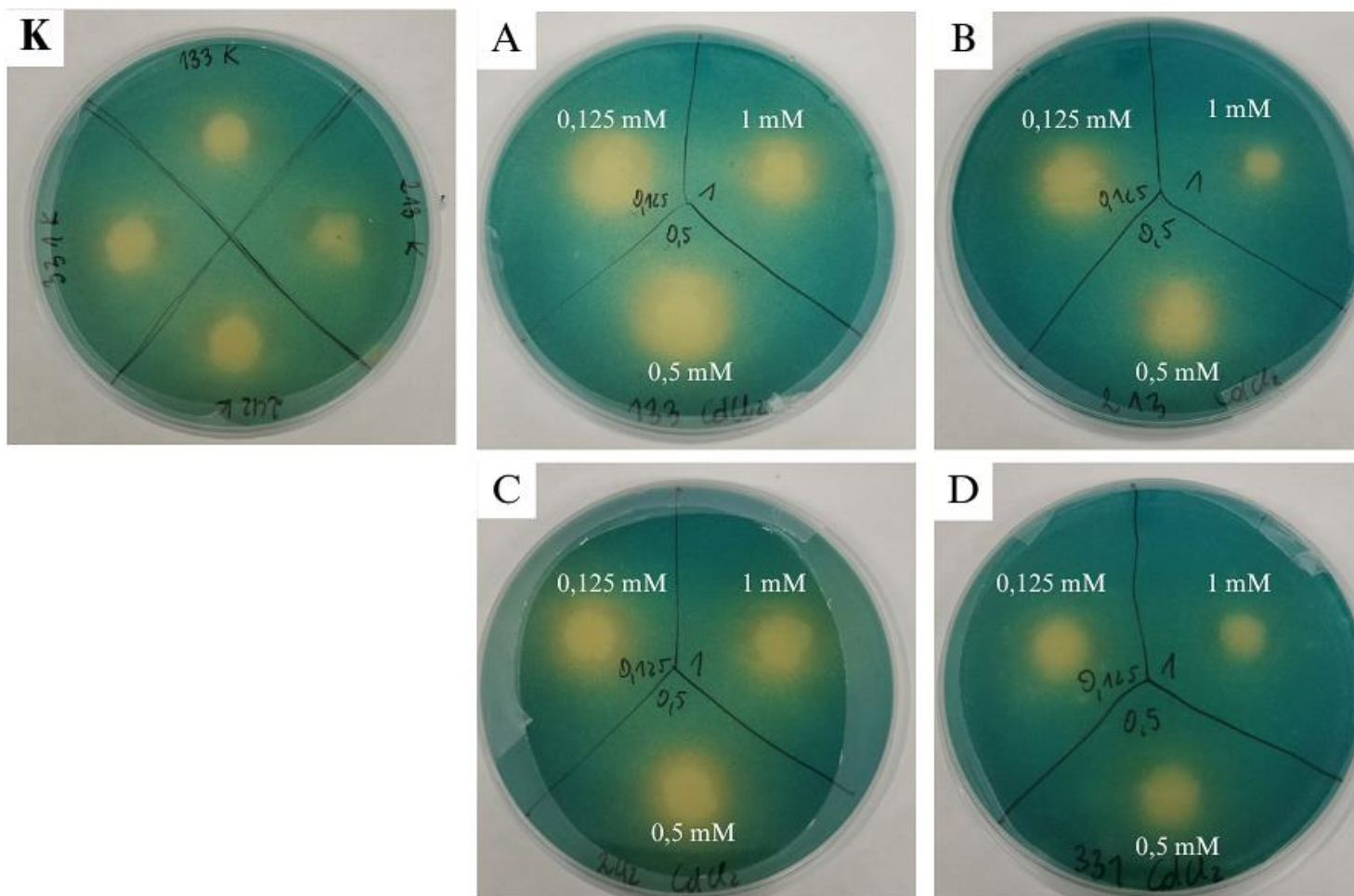
**Ryc. 26. Biosynteza sideroforów na stałych pożywkach TY przez szczepy UPP 133 (A) UPP 213 (B) UPP 242 (C) UPP 331 (D) w obecności jonów miedzi. Stałe pożywki TY zawierały jony Cu<sup>2+</sup> o stężeniach 0,125 mM, 0,5 mM i 2 mM. Zmiana niebieskiej barwy podłoża świadczy o zdolności szczepu do syntezy sideroforów**



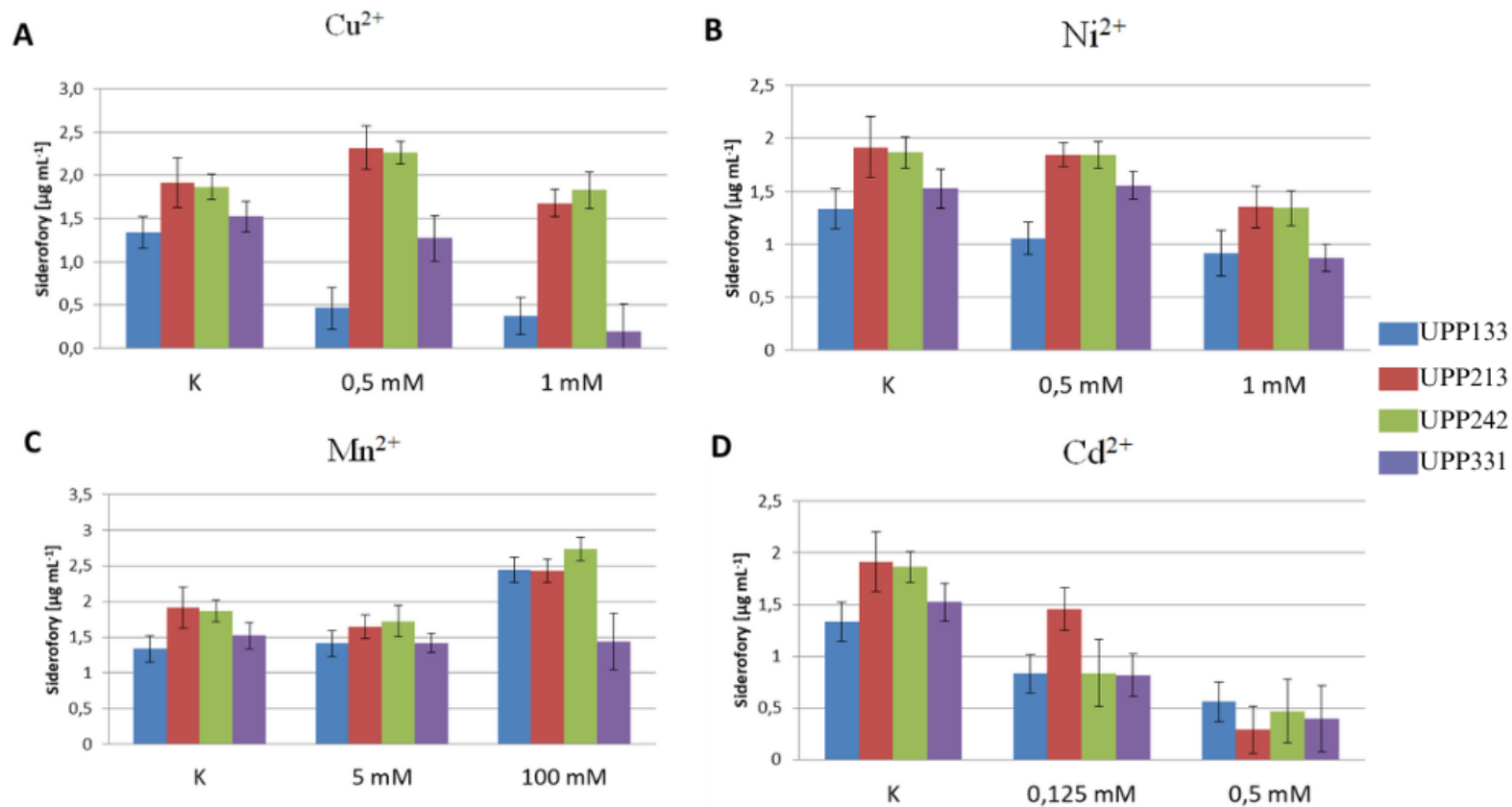
**Ryc. 27. Biosynteza sideroforów na stałych pożywkach TY przez szczepy UPP 133 (A) UPP 213 (B) UPP 242 (C) UPP 331 (D) w obecności jonów niklu.** Stałe pożywki TY zawierały jony  $\text{Ni}^{2+}$  o stężeniach 0,125 mM, 0,5 mM i 2 mM. Zmiana niebieskiej barwy podłoża świadczy o zdolności szczepu do syntezy sideroforów



**Ryc. 28. Biosynteza sideroforów na stałych pożywkach TY przez szczepy UPP 133 (A) UPP 213 (B) UPP 242 (C) UPP 331 (D) w obecności jonów manganu.** Stałe pożywki TY zawierały jony Mn<sup>2+</sup> o stężeniach 0,125 mM, 5 mM i 100 mM. Zmiana niebieskiej barwy podłoża świadczy o zdolności szczepu do syntezy sideroforów



**Ryc. 29. Biosynteza sideroforów na stałych pożywkach TY przez szczepy UPP 133 (A) UPP 213 (B) UPP 242 (C) UPP 331 (D) w obecności jonów kadmu.** Stałe pożywki TY zawierały jony  $\text{Cd}^{2+}$  o stężeniach 0,125 mM, 0,5 mM i 1 mM. Zmiana niebieskiej barwy podłoża świadczy o zdolności szczepu do syntezy sideroforów



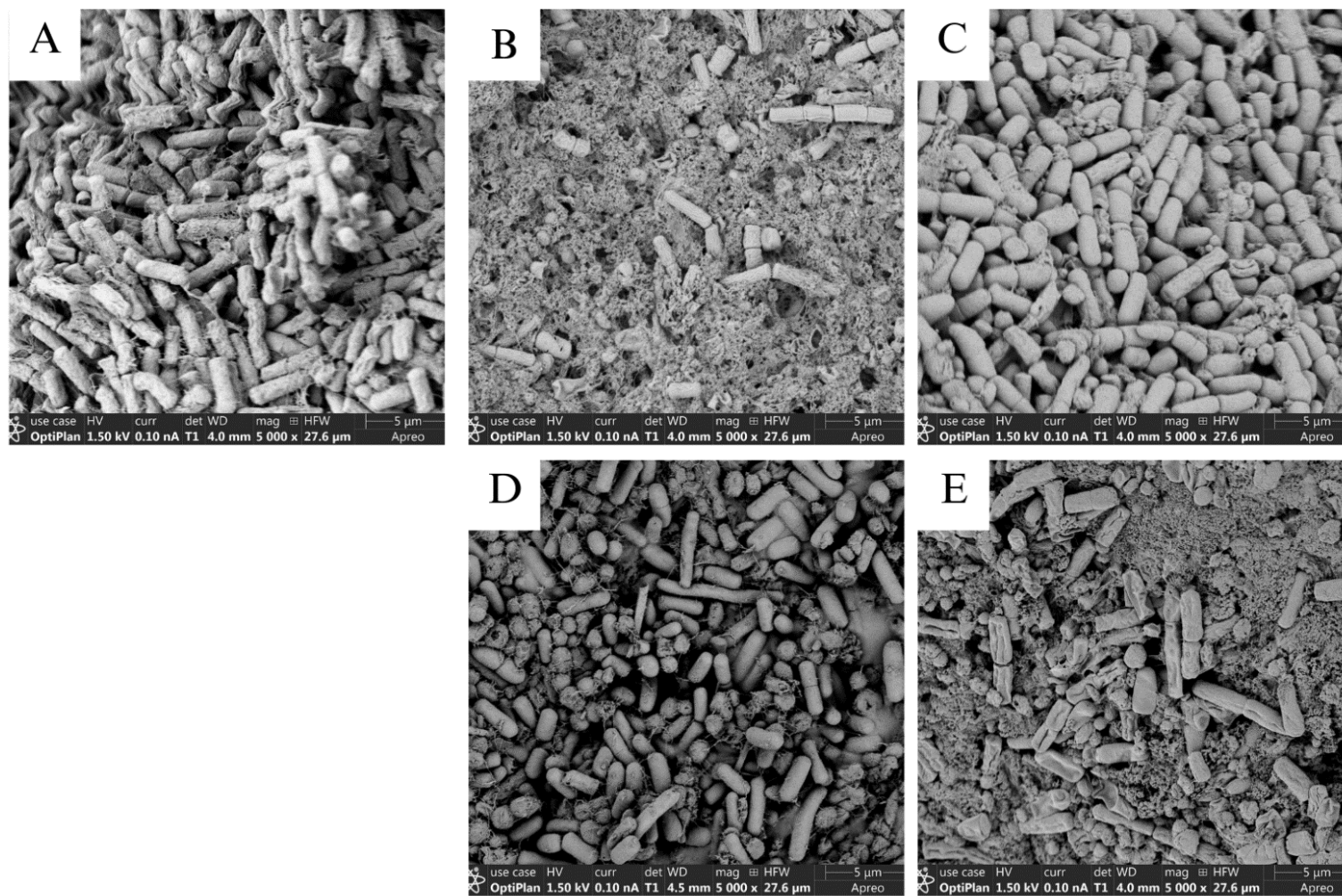
**Ryc. 30.** Biosynteza sideroforów przez szczepy *Bradyrhizobium* UPP 133, 213,242 i 331 w pożywkach płynnych TY zawierających różne stężenia jonów Cu<sup>2+</sup> (A), Ni<sup>2+</sup> (B), Mn<sup>2+</sup> (C) i Cd<sup>2+</sup> (D). Płynne pożywki TY zawierały odpowiednio jony Cu<sup>2+</sup> i Ni<sup>2+</sup> o stężeniach 0,5 mM i 1 mM, jony Mn<sup>2+</sup> o stężeniach 5 mM i jony Cd<sup>2+</sup> o stężeniach 0,125 i 0,5. Próby kontrolne stanowiły hodowle poszczególnych szczepów bakteryjnych w pożywkach TY

Wykazano, że szczepy z gatunku *Bradyrhizobium canariense* (UPP 213, UPP 242) już w warunkach kontrolnych wytwarzają większą ilość sideroforów w porównaniu do pozostałych badanych szczepów z gatunku *Bradyrhizobium japonicum* (UPP 133, UPP 331) (Ryc. 30). W obecności jonów niklu oraz kadmu biosynteza sideroforów dla każdego szczepu malała wraz z rosnącym stężeniem jonów tych metali, przy czym efekt ten był silniejszy w przypadku kadmu. W obecności jonów miedzi szczepy UPP 133 i UPP 331 również charakteryzowały się malejącą biosyntezą sideroforów wraz ze wzrostem stężenia jonów  $\text{Cu}^{2+}$ . Szczepy *B. canariense* (UPP 213, UPP 242) w stężeniu 0,5 mM  $\text{Cu}^{2+}$  produkowały więcej sideroforów, a w stężeniu 1 mM, ilości podobne lub nieznacznie mniejsze. W obecności jonów manganu trzy z czterech badanych szczepów syntetyzowały o 27% (UPP 213), 47% (UPP 242) i 83% (UPP 133) więcej sideroforów niż w próbach kontrolnych. Wyniki te pokrywają się z wynikami uzyskanymi w doświadczeniach na pożywkach stałych, w których obszar odbarwienia koloru niebieskiego pożywki, świadczący o zdolności szczepu do biosyntezy sideroforów, był również największy w obecności jonów  $\text{Mn}^{2+}$  o stężeniu równym 100 mM (Ryc. 27-30).

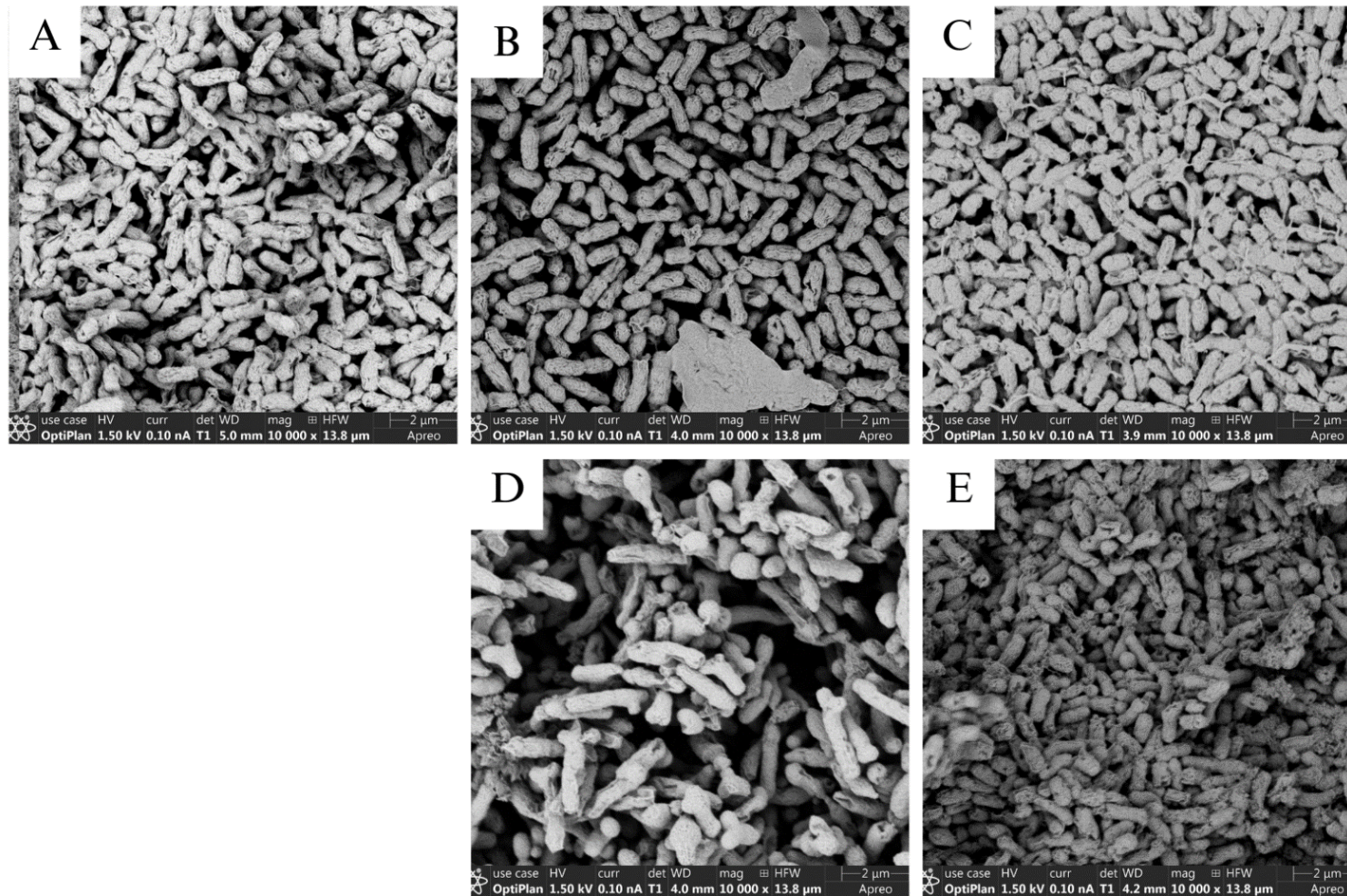
Mangan jest pierwiastkiem śladowym niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania bakterii, a u prokariotów metaloproteiny zawierające Mn pełnią różne funkcje, od fotosyntezy po obronę przed stresem oksydacyjnym. Opisany dobrze paradygmat o wychwytywaniu metali przez bakterie w obronie żywiciela, w odniesieniu do żelaza zdaje się dotyczyć również manganu (Kehl-Fie i Skaar, 2010). Systemy wychwytu manganu oparte na białkach zostały opisane w szczepach Gram-ujemnych i Gram-dodatnich bakterii, a dalsze badania wciąż ujawniają, w jaki sposób te białka przyczyniają się do homeostazy tego pierwiastka (Johnstone i Nolan, 2015). Johnstone i Nolan (2015) w swej pracy wskazują również, że siderofory produkowane przez *P. putida* posiadają nawet 1000 krotnie większe powinowactwo do manganu niż do żelaza a różne siderofory hydroksamianowe i katecholowe ułatwiają rozpuszczanie minerałów tlenowodorowych zawierających Mn, a także Co, Cr i Fe. Wyniki uzyskane w powyższym doświadczeniu mogą wskazywać, że obecność wyższych stężeń tego pierwiastka szczególnie mocno indukuje wzmożoną biosyntezę sideroforów, co może korzystnie wpływać na układ symbiotyczny rizobiów z roślinami bobowatymi, ze względu na zdolność tych związków do inhibowania szkodliwego wpływu roślinnych patogenów. Dodatkowo ich zdolność do tworzenia kompleksów siderofor-metal obniża toksyczny wpływ takich metali jak glin, kadm, miedź, ołów i cynk, a także uran, umożliwiając wydajniejszą symbiozę w zanieczyszczonych glebach (Fahde i in., 2023).

## 6.6. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na morfologię komórek szczepów bakteryjnych UPP 133, 213, 242 i 331

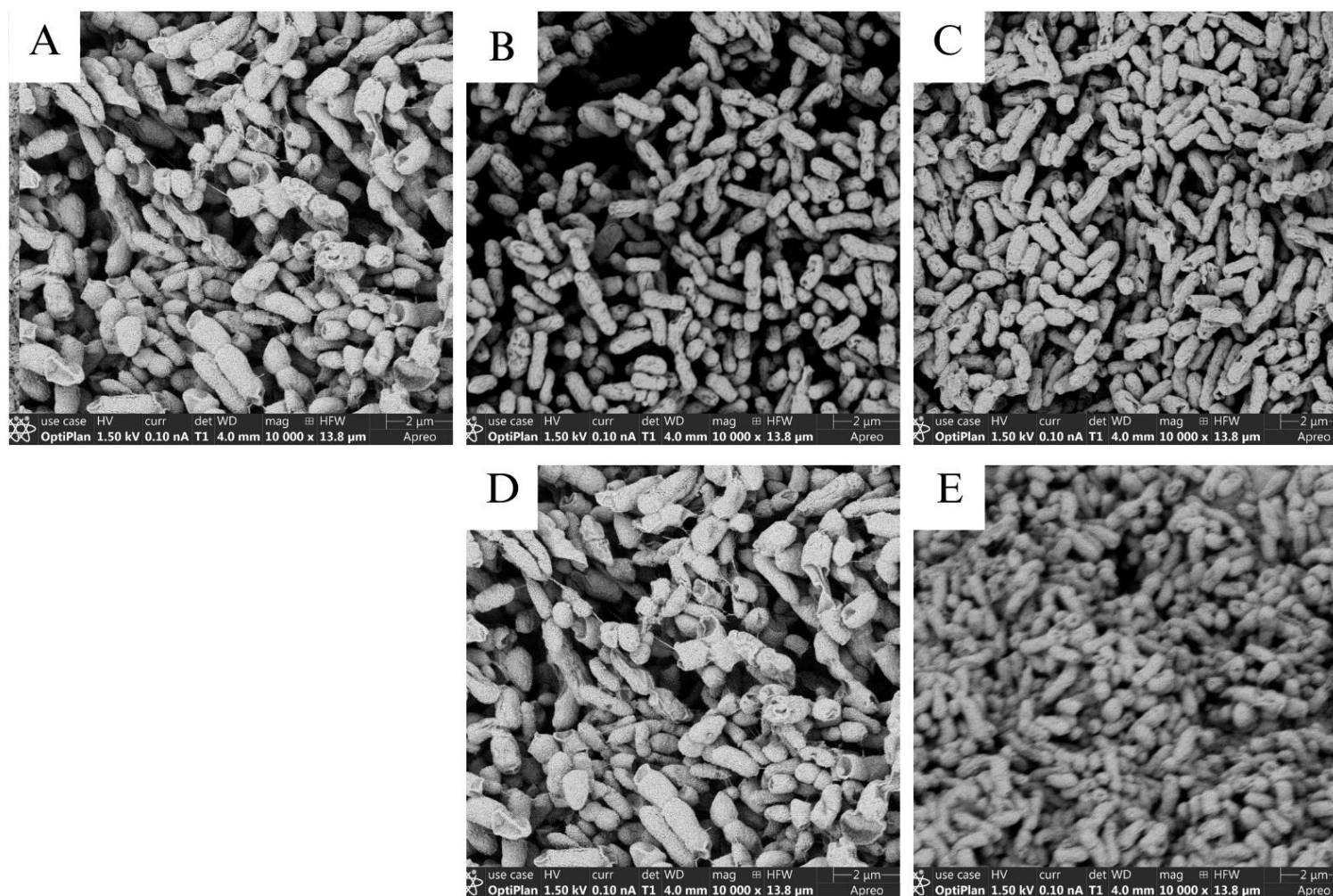
Kolejnym etapem badań było określenie wpływu jonów  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  oraz  $\text{Cd}^{2+}$  na morfologię komórek wybranych szczepów *Bradyrhizobium spp.* Metale ciężkie, są znane ze swojej toksyczności wobec mikroorganizmów. Niektóre gatunki bakterii wykazują jednak ponadprzeciętną zdolność do adaptacji i przetrwania w obecności wysokich stężeń poszczególnych metali. Zrozumienie mechanizmów tej odporności i strategii adaptacyjnych jest nie tylko ważne z punktu widzenia ekologii gleby, ale również może prowadzić do potencjalnych zastosowań w bioremediacji zanieczyszczonych środowisk. W dostępnej literaturze znaleźć można publikacje opisujące wpływ metali ciężkich na zmiany morfologiczne i strukturalne zachodzące w komórkach bakteryjnych. Badania przeprowadzone przez Mohite i innych (2018), oraz przez zespół Mathivanan (2021) wskazały, jak ekspozycja na chrom, ołów, rtęć, miedź i kadm prowadzi do zmian w morfologii bakterii, w tym kurczenia się komórek oraz zmian w syntezie egzopolisacharydów (EPS), będących istotnym składnikiem biofilmu jak i czynnikiem umożliwiającym zmniejszenie biodostępności jonów metali ciężkich poprzez ich wiązanie. Celem tego eksperymentu była szczegółowa analiza morfologiczna komórek *Bradyrhizobium* przy użyciu mikroskopii skaningowej (SEM), mająca na celu określenie, jak obecność jonów wybranych metali ciężkich wpływa na ich strukturę. Badanie to pozwala nie tylko na wizualizację zmian morfologicznych wywołanych stresem związanym z obecnością metali ciężkich, ale również na głębsze zrozumienie adaptacyjnych i obronnych strategii komórek w obliczu toksycznych stężeń metali. W tym celu wykonano zdjęcia skaningowym mikroskopem elektronowym bakterii hodowanych przez 96 godzin w pożywce z określonymi stężeniami jonów metali ciężkich. Zastosowano stężenia, które w poprzednich doświadczeniach wywierały relatywnie duży wpływ na funkcjonowanie komórek bakteryjnych tj. dla  $\text{Cu}^{2+}$  - 0,5 mM, dla  $\text{Ni}^{2+}$  - 0,5 mM, dla  $\text{Mn}^{2+}$  - 5 mM oraz dla  $\text{Cd}^{2+}$  - 0,5 mM. Morfologię komórek poszczególnych szczepów *Bradyrhizobium* UPP 133, 213, 232 i 331 przedstawiono na Ryc. 31, 32, 33 i 34.



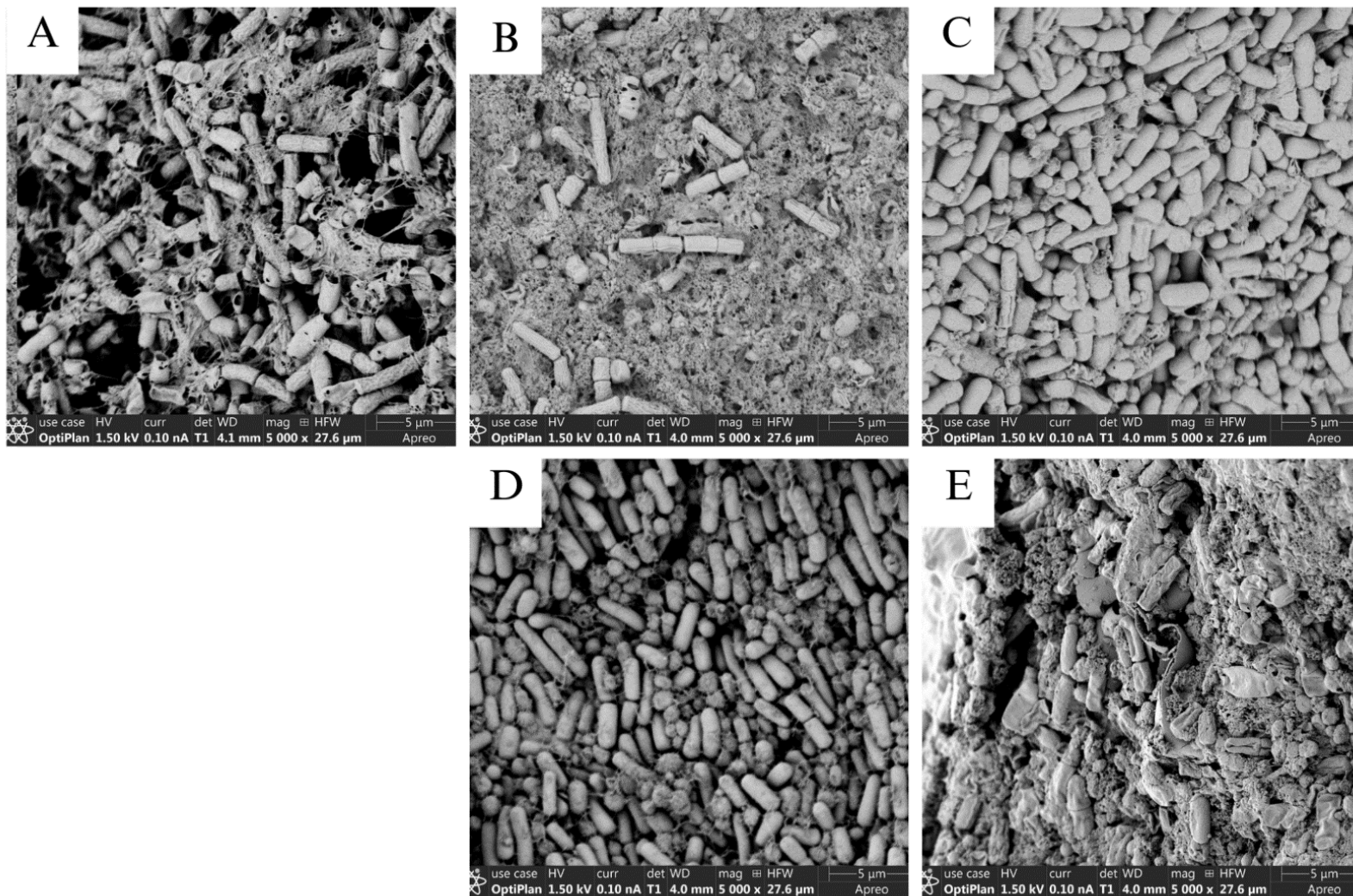
**Ryc. 31. Morfologia komórek szczepu UPP 133 w warunkach kontrolnych (A) oraz w obecności jonów miedzi w stężeniu 0,5 mM (B), jonów niklu w stężeniu 0,5 mM (C), jonów manganu w stężeniu 5 mM (D) oraz jonów kadmu w stężeniu 0,5 mM (E)**



**Ryc. 32. Morfologia komórek szczepu UPP 213 w warunkach kontrolnych (A) oraz w obecności jonów miedzi w stężeniu 0,5 mM (B), jonów niklu w stężeniu 0,5 mM (C), jonów manganu w stężeniu 5 mM (D) oraz jonów kadmu w stężeniu 0,5 mM (E)**



**Ryc. 33. Morfologia komórek szczepu UPP 242 w warunkach kontrolnych (A) oraz w obecności jonów miedzi w stężeniu 0,5 mM (B), jonów niklu w stężeniu 0,5 mM (C), jonów manganu w stężeniu 5 mM (D) oraz jonów kadmu w stężeniu 0,5 mM (E)**



**Ryc. 34. Morfologia komórek szczepu UPP 331 w warunkach kontrolnych (A) oraz w obecności jonów miedzi w stężeniu 0,5 mM (B), jonów niklu w stężeniu 0,5 mM (C), jonów manganu w stężeniu 5 mM (D) oraz jonów kadmu w stężeniu 0,5 mM (E)**

Obrazy szczepów *Bradyrhizobium spp.* ze skaningowego mikroskopu elektronowego wykazały, że funkcjonują one jako kolonie bakterii o kształcie pałeczek. Morfologia komórek szczepów z gatunku *B. japonicum* różniła się rozmiarem i kształtem pałeczek od szczepów z gatunku *B. canariense*. Wszystkie badane szczepy w próbach kontrolnych wykazywały normalną morfologię, natomiast w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$ , obserwowano wyraźne zmiany w morfologii komórek. W przypadku bakterii z gatunku *B. canariense* wystawionych na działanie jonów  $\text{Cu}^{2+}$  obserwowano kurczenie się komórek, natomiast gdy szczepy z gatunku *B. japonicum* hodowano w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$ , były one bardziej pomarszczone i wydłużone niż komórki w próbie kontrolnej, dodatkowo widoczne były duże ilości biofilmu. Wyniki te są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Adarsh i in. (2007). Obrazy SEM z próby, w której bakterie traktowano jonami Cu, charakteryzowały się zmianą rozmiaru komórek wraz z rozwojem grubej warstwy wełnistego płaszcza wokół komórki, który mógł być wydzielanym egzopolisacharydem.

Efekt wydłużonych i pomarszczonych komórek również występował w przypadku obecności jonów  $\text{Cd}^{2+}$ , z tą różnicą, że jony te dodatkowo przyczyniały się do zauważalnie większego odsetka komórek uszkodzonych/nieprawidłowo wykształconych (Ryc. 31-34). Obrazy te potwierdzają wyniki z eksperymentów badających wpływ wybranych metali na przeżywalność komórek bakteryjnych, w których jony  $\text{Cd}^{2+}$  były najbardziej toksyczne dla komórek *Bradyrhizobium spp.* Podobne efekty obserwowano gdy komórki rizobiów hodowano w obecności arsenu. Wskazywać to może na ingerencję kadmu w regulację biosyntezy ściany komórkowej. Zmiany w morfologii komórki można jednak również przypisać faktowi, że za przyczyną metali ciężkich ściana komórkowa bakterii może ulec perforacji z uwolnieniem materiału wewnątrzkomórkowego, co powoduje jej deformację i pogrubienie (Diaz-Visurraga i in., 2010).

Gdy komórki były wystawione na działanie jonów  $\text{Mn}^{2+}$  o stężeniu 5 mM widocznie gładza stawała się powierzchnia komórek bakteryjnych. Zauważalny wpływ na morfologię komórek obu szczepów *B. canariense* miały również jony  $\text{Ni}^{2+}$ , które powodowały, że niektóre komórki przybierały kształt znacznie krótszych pałeczek w porównaniu do komórek nietraktowanych metalami ciężkimi, co zgodne jest z obserwacjami (Behera i in., 2019) gdzie jony Ni w interakcji z komórkami bakteryjnymi powodowały uszkodzenia błony bakteryjnej, a obserwowane obrazy SEM komórek bakteryjnych traktowanych Ni wykazywały anormalną teksturę oraz skurczone komórki.

## **6.7. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na aktywność transkrypcyjną wybranych genów bakteryjnych**

Do analizy ekspresji genów *Bradyrhizobium* w obecności metali ciężkich (Cu, Ni, Mn i Cd), wybrano dwa geny biorące udział w odpowiedzi na stres abiotyczny, kodujące syntazę trehalozy (*treS*) i ATPazę typu P transportującą metale ciężkie (*cueA*) oraz dwa geny kodujące białka biorące udział w zarządzaniu metabolitami wtórnymi, które zwiększają odporność mikroorganizmów na stres wywołany metalami ciężkimi: gen *exoR* kodujący białko regulatorowe egzopolisacharydów i gen *fegA* kodujący białko receptora sideroforowego. Dodatkowo w celu oceny wpływu tych metali na układ symbiotyczny, na poziomie molekularnym wybrano do analizy ekspresji gen *nodA* kodujący czynnik nodulacji, biorący udział w inicjacji powstawania brodawek korzeniowych.

### **6.7.1. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na aktywność transkrypcyjną genu kodującego syntazę trehalozy (*treS*)**

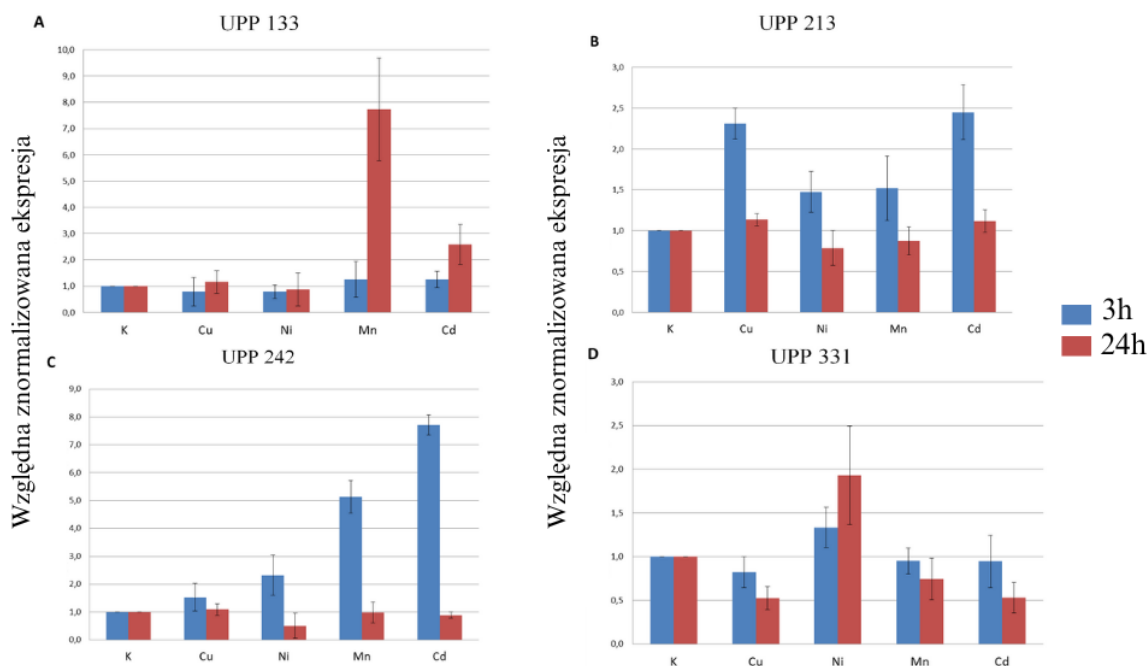
Gen *treS* koduje syntazę trehalozy, która odgrywa kluczową rolę w metabolizmie trehalozy, cukru zaangażowanego w wiele funkcji komórkowych, w tym w odpowiedzi na stres abiotyczny. Trehaloza jest znanym czynnikiem ochronnym, który pomaga komórkom przetrwać w trudnych warunkach środowiskowych poprzez stabilizowanie białek i membran komórkowych oraz ochronę przed denaturacją. W odpowiedzi na stres abiotyczny, a takim jest ekspozycja na metale ciężkie, wzrasta poziom ekspresji genu *treS*, co może powodować wzrost stężenia trehalozy, co z kolei może zwiększyć odporność komórki na niekorzystne warunki.

Szczepy *Bradyrhizobium* poddane działaniu jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu wykazywały różnice w poziomie ekspresji genu *treS*. Szczególnie widoczne były różnice między szczepami *B. japonicum* (UPP 133 i 331) oraz *B. canariense* (UPP 213 i 242), zarówno w kontekście zróżnicowanych poziomów ekspresji genu *treS* wywołanych obecnością poszczególnych jonów metali ciężkich, jak i czasem utrzymania się efektu wobec ekspozycji bakterii na warunki stresowe. (Ryc. 35).

Obydwa szczepy *B. canariense* (UPP 213 i 242) charakteryzował wyższy poziom ekspresji genu *treS* po krótszym czasie (3 godziny) ekspozycji na wszystkie jony badanych

metali, natomiast po 24 godzinnym kontakcie następowało obniżenie poziomu ekspresji i była ona porównywalna bądź nieco wyższa niż w próbie kontrolnej. Szczególnie wysoki poziom ekspresji obserwowano dla szczepu UPP 213 w obecności jonów miedzi (0,5 mM) oraz kadmu (0,01mM). Szczep UPP 242 w obecności jonów manganu (5 mM) i kadmu (0,01 mM) również wykazywał znacznie podwyższony poziom ekspresji genu *treS* w porównaniu z pozostałymi jonami metali jak i próbą kontrolną (Ryc. 35 B i C).

Szczepy *B. japonicum* (UPP 133 i 331) różniły się między sobą poziomami ekspresji genu *treS*. Poziom ekspresji pierwszego z nich (UPP 133) w obecności jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu po 3-godzinnej ekspozycji był porównywalny z próbą kontrolną. Podobny zrównoważony poziom ekspresji obserwowano po 24 godzinach pod wpływem jonów miedzi i niklu, natomiast obecność jonów manganu (5 mM) powodowała 8-krotny wzrost poziomu ekspresji genu *treS*. Drugi szczep (UPP 331) w obecności jonów miedzi, manganu i kadmu w obu punktach czasowych (3 i 24 godziny) wykazywał niższy lub porównywalny z próbą kontrolną poziom ekspresji, tylko obecność jonów niklu (w obu punktach czasowych) powodowała wzrost poziomu ekspresji tego genu (Ryc. 35 A i D).



**Ryc. 35. Analiza ekspresji genu kodującego syntazę trehalozy (*treS*) w szczepach *Bradyrhizobium* UPP 133 (A), UPP 213 (B), UPP 242 (C) i UPP 331 (D).** Szczepy *Bradyrhizobium* hodowano w płynnych pożywkach TY zawierających 0,5mM Cu<sup>2+</sup>, 0,5 mM Ni<sup>2+</sup>, 5 mM Mn<sup>2+</sup> i 0,01 mM Cd<sup>2+</sup>, RNA izolowano z hodowli bakteryjnych po 3 i 24 godzinach ekspozycji na badane metale ciężkie. Kontrolę stanowiły szczepy bakteryjne hodowane w płynnych pożywkach TY

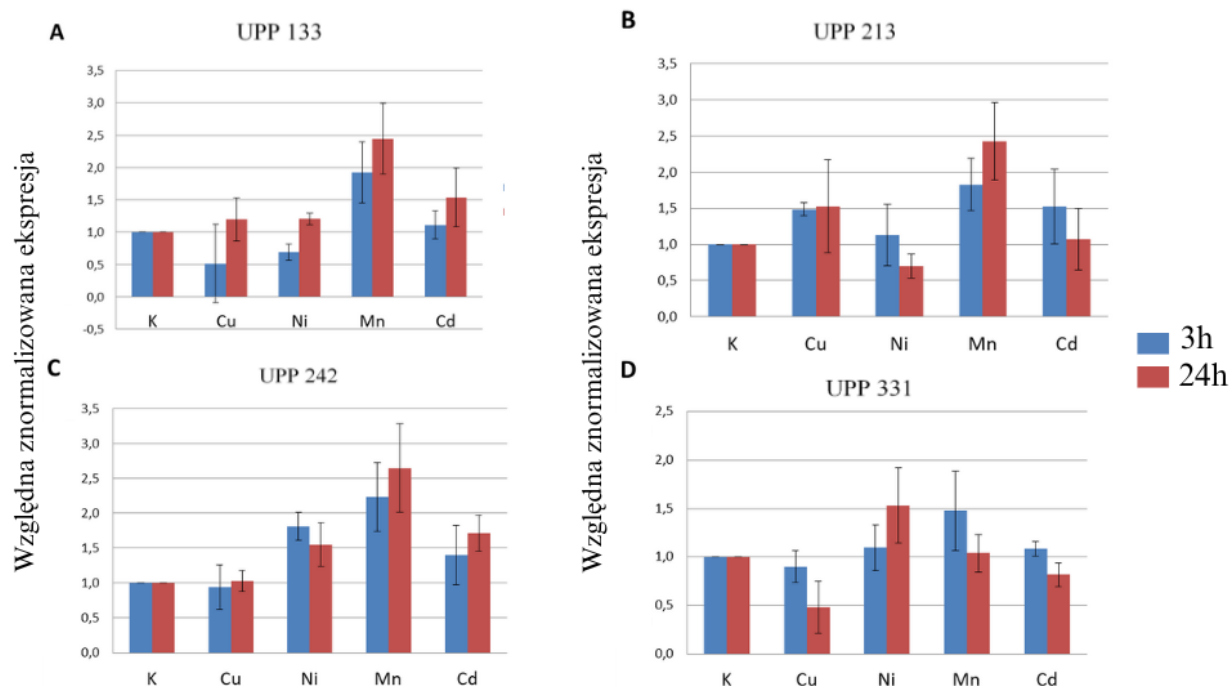
Ekspresja genu *treS* wykazuje znaczną zmienność w obecności jonów metali ciężkich, co koreluje z badaniami, które wykazały, że metale ciężkie mogą indukować lub hamować ekspresję genów w zależności od ich stężenia i czasu ekspozycji (R. Singh i in., 2011). Dodatkowo, badania przeprowadzone przez Li i współautorów (2017) wskazują, że niektóre metale ciężkie mogą aktywować ścieżki sygnałowe, które wpływają na ekspresję genów związanych ze stresem oksydacyjnym i metabolizmem energetycznym. Gen *treS* jest również zaliczany do grona genów powiązanych z odpowiedzią na stres oksydacyjny, więc jego wzmożona ekspresja, szczególnie w krótkim czasie od zainicjowania ekspozycji na wybrane metale świadczy o ich stresogennym działaniu.

### 6.7.2. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na aktywność transkrypcyjną genu kodującego receptor sideroforów (*fegA*)

Siderofory biorą udział w ułatwianiu przyswajania żelaza, odgrywają również istotną rolę w odpowiedzi na stres abiotyczny, niwelując szkodliwy wpływ wielu czynników takich jak wolne rodniki, toksyczne metale (np. ołów, kadm, rtęć) oraz inne zanieczyszczenia środowiskowe (Ahmed i Holmström, 2014). Te unikalne właściwości czynią siderofory nie tylko kluczowym czynnikiem w homeostazie żelaza, ale również ważnymi elementami systemu obronnego komórek bakteryjnych wobec spektrum czynników stresowych. Wpływ metali ciężkich na aktywność transkrypcyjną genu *fegA* pozostaje stosunkowo słabo zbadany, szczególnie w kontekście potencjalnej interakcji między toksycznością metali a homeostazą żelaza w komórkach bakteryjnych. Metale ciężkie mogą zakłócać gospodarkę żelazową w komórkach, co może wpływać na ekspresję genów związanych z chelatacją i transportem żelaza, takich jak *fegA*.

Badane szczepy *Bradyrhizobium* (UPP 133, 213, 242 i 331) charakteryzowały się zróżnicowanymi poziomami ekspresji genu *fegA*, zależnymi zarówno od rodzaju jonów metali, jak i od czasu ekspozycji. Szczepy *B. canariense* (UPP 213 i 242) wykazywały porównywalny lub wyższy poziom ekspresji genu *fegA* spowodowany przez wszystkie badane jony metali w odniesieniu do prób kontrolnych. Wyjątkiem było oddziaływanie jonów niklu na szczep UPP 213, który po 24 godzinnej ekspozycji obniżał poziom ekspresji zarówno w porównaniu do próby kontrolnej, jak i pozostałych jonów metali ciężkich w obu punktach czasowych (Ryc. 36 B i C). Szczep *B. japonicum* UPP 133, po 3 godzinach ekspozycji na badane metale ciężkie wykazywał obniżony lub porównywalny poziom ekspresji genu *fegA* w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$ , natomiast w obecności jonów  $\text{Mn}^{2+}$  odnotowano wzrost poziomu ekspresji w obu punktach czasowych (Ryc.36. A.).

W przypadku szczepu UPP 331 obserwowano wyższy poziom ekspresji genu *fegA* w przypadku jonów manganu po 3 godzinach i jonów niklu po 24 godzinach ekspozycji. Poziom ekspresji genu *fegA* dla pozostałych badanych metali ciężkich w obu punktach czasowych był porównywalny do próby kontrolnej. Po 24 godzinach ekspozycji na jony miedzi, manganu i kadmu, obserwowano obniżenie poziomu ekspresji. Jedynym wyjątkiem był wzrost poziomu ekspresji w odpowiedzi na obecność jonów niklu (Ryc. 36 D).



**Ryc. 36. Analiza ekspresji genu receptora sideroforów (*fegA*) w szczepach *Bradyrhizobium* UPP 133 (A), UPP 213 (B), UPP 242 (C) i UPP 331 (D). Szczepy *Bradyrhizobium* hodowano w płynnych pożywkach TY zawierających 0,5mM  $\text{Cu}^{2+}$ , 0,5 mM  $\text{Ni}^{2+}$ , 5 mM  $\text{Mn}^{2+}$  i 0,01 mM  $\text{Cd}^{2+}$ , RNA izolowano z hodowli bakteryjnych po 3 i 24 godzinach ekspozycji na badane metale ciężkie. Kontrolę stanowiły szczepy bakteryjne hodowane w płynnych pożywkach TY**

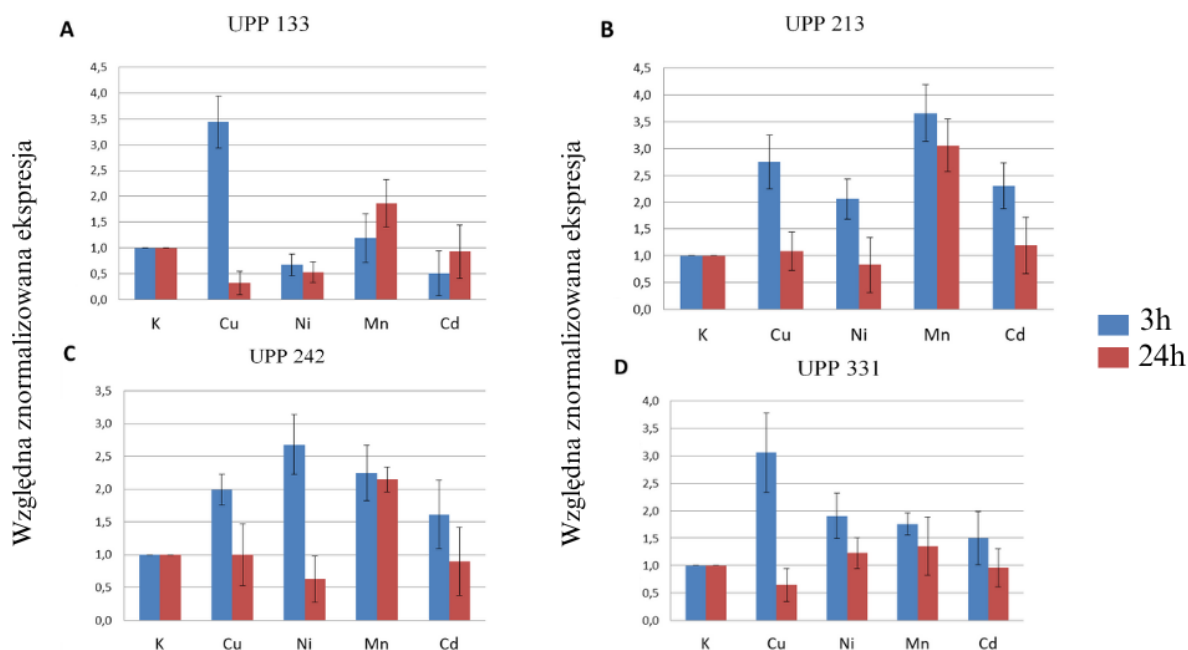
Poziomy ekspresji genu *fegA* w badanych szczepach *Bradyrhizobium* korelują z wynikami doświadczenia, w którym badano zdolność do biosyntezy sideroforów na stałych pożywkach TY z CAS, zaobserwowano wówczas, że szczepy UPP 133, UPP 213 oraz UPP 242 w obecności wysokiego stężenia jonów manganu syntetyzowały największe ilości sideroforów (Ryc. 29). Szczepy te po ekspozycji na działanie jonów  $\text{Mn}^{2+}$  charakteryzował wyższy poziom ekspresji genu *fegA*. W literaturze istnieje ogólny konsensus dotyczący zdolności metali ciężkich do powodowania wzmożonej biosyntezy sideroforów przez różne gatunki bakterii. Indukcja syntezy większej ilości sideroforów przez *Bradyrhizobium* w obecności jonów  $\text{Ni}^{2+}$  oraz  $\text{Mn}^{2+}$  wpisuje się w tę ogólną zasadę. Mangan i nikiel należące do metali ciężkich, wywołują odpowiedź adaptacyjną u bakterii, skutkującą zwiększoną

syntezą sideroforów w celu sekwestracji jonów metali i zmniejszenia ich toksycznego wpływu na komórki bakteryjne. Jest to zgodne z obserwacjami Hussein i Joo (2014), które wskazują na stymulujący wpływ metali ciężkich na biosyntezę sideroforów przez bakterie izolowane z gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Podobne wnioski wysnuli Shi i inni (2017), wskazując, że *Pseudomonas aeruginosa* ZGKD3 zwiększa biosyntezę sideroforów w odpowiedzi na obecność metali ciężkich, co sugeruje uniwersalność tego mechanizmu obronnego wśród różnych gatunków bakterii. (Shi i in., 2017)

### **6.7.3. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na aktywność transkrypcyjną genu kodującego białko regulatorowe egzopolisacharydów (*exoR*)**

Białko ExoR odgrywa kluczową rolę w regulacji syntezy EPS w wielu gatunkach bakterii, działając jako czynnik regulatorowy, który może modulować odpowiedź komórki na stres środowiskowy, w tym odpowiedzi na obecność w środowisku metali ciężkich. Zrozumienie mechanizmów molekularnych, za pomocą których jony metali ciężkich wpływają na aktywność transkrypcyjną genu *exoR*, może dostarczyć cennych informacji na temat strategii mikroorganizmów związanych ze stresem wywołanym obecnością metali ciężkich, a także ewentualnych, potencjalnych zastosowań bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* w bioremediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi.

Poziom ekspresji genu *exoR* szczepów *B. canariense* po 3 godzinach ekspozycji na wszystkie jony metali ciężkich był wyższy niż w próbach kontrolnych, przy czym najwyższy jej poziom obserwowano w obecności jonów manganu dla szczepu UPP 213 i jonów niklu dla szczepu UPP 242. Po 24 godzinach poziom ekspresji ulegał obniżeniu dla obu szczepów w obecności jonów miedzi, niklu i kadmu, i był na poziomie ekspresji próby kontrolnej po 24 godzinach. Jony manganu po 24 godzinach wywoływały niewielki spadek ekspresji w porównaniu do jej poziomu po 3 godzinach (Ryc. 37 B i C).



**Ryc. 37. Analiza ekspresji genu kodującego białko regulatorowe egzopolisacharydów (*exoR*) w szczepach *Bradyrhizobium* UPP 133 (A), UPP 213 (B), UPP 242 (C) i UPP 331 (D).** Szczepy *Bradyrhizobium* hodowano w płynnych pożywkach TY zawierających 0,5mM  $\text{Cu}^{2+}$ , 0,5 mM  $\text{Ni}^{2+}$ , 5 mM  $\text{Mn}^{2+}$  i 0,01 mM  $\text{Cd}^{2+}$ , RNA izolowano z hodowli bakteryjnych po 3 i 24 godzinach ekspozycji na badane metale ciężkie. Kontrolę stanowiły szczepy bakteryjne hodowane w płynnych pożywkach TY

Profile poziomu ekspresji genu *exoR* szczepów *B. japonicum* (UPP 133 i 331) były zróżnicowane. Podwyższenie poziomu ekspresji następowało dla wszystkich badanych jonów po 3 godzinach w przypadku szczepu UPP 331, a szczególnie widoczny wpływ miały jony miedzi. Po 24 godzinach ekspozycji następował spadek ekspresji, przy czym we wszystkich przypadkach z wyjątkiem miedzi był on nieznaczny (Ryc. 37 D). Podobnie zachowywał się szczep UPP133 w obecności jonów miedzi, dla którego najpierw po 3 godzinach ekspresja znacząco wzrastała, po czym po 24 godzinach następował jej gwałtowny spadek (Ryc. 37 A). Natomiast jony niklu i kadmu w obu punktach czasowych powodowały, że poziom ekspresji był na niższym poziomie niż w próbach kontrolnych. Dla jonów manganu ekspresja genu *exoR* wzrastała w czasie i była wyższa po 24 godzinach ekspozycji na ten jon w porównaniu z ekspozycją 3-godzinną (Ryc. 37A).

Wysoka ekspresja genu *exoR* po ekspozycji na jony miedzi dla szczepów UPP 133 oraz UPP 331 koreluje z obrazami spod skaningowego mikroskopu elektronowego, na których widoczna jest znaczna ilość zewnątrzkomórkowych EPS syntetyzowanych przez te szczepy w obecności jonów miedzi (Ryc. 31, 34). Może to sugerować, że szczepy *B. japonicum* są bardziej podatne na indukcję wzmożonej biosyntezy EPS niż szczepy *B. canariense*. Podobne wyniki uzyskał Leonel i inni (2019), badając ekspresję genów *exoR* i *exoZ* w *Rhizobium tropici*. W przeprowadzonych przez nich eksperymentach wykazali, że obecność  $\text{Cu}^{2+}$  powodowała wzrost biosyntezy EPS o 48%. Obserwowana w eksperymentach indukcja wzmożonej ekspresji genu *exoR* w obecności jonów metali ciężkich może być częścią kompleksowej odpowiedzi obronnej bakterii na stres wywołany obecnością metali ciężkich. EPS mogą działać jako bariera ochronna, sekwestrując metale ciężkie i zmniejszając ich oddziaływanie na komórki, co zmniejsza ich toksyczność i niweluje stres. Niemniej jednak, wraz z upływem czasu, ekspresja genu *exoR* może być wygaszana, ponieważ komórki zsyntetyzowały już wystarczającą ilość EPS, by zabezpieczyć się przed stresem, który wywołuje obecność metali ciężkich. Wyniki uzyskane w doświadczeniu, dotyczące szczepów *Bradyrhizobium* są analogiczne do obserwacji z badań zespołów S. Silambarasan (2019) oraz V. Sandhya (2015) w których stres abiotyczny również indukował zwiększoną biosyntezę EPS przez mikroorganizmy.

#### **6.7.4. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na aktywność transkrypcyjną genu kodującego ATPazę typu P transportującą metale ciężkie (*cueA*)**

Ważnym elementem wśród adaptacyjnych odpowiedzi na stres wywołany metalami ciężkimi, jest gen *cueA*, który koduje ATPazę typu P zaangażowaną w transport metali ciężkich. Białko to odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy metali w komórkach bakteryjnych, co umożliwia detoksykację i utrzymanie odpowiedniego stężenia jonów metali wewnątrz komórki. Aktywność transkrypcyjna genu *cueA* stanowiła zatem warty zbadania element w mechanizmie obronnym bakterii przed szkodliwym działaniem jonów metali ciężkich.

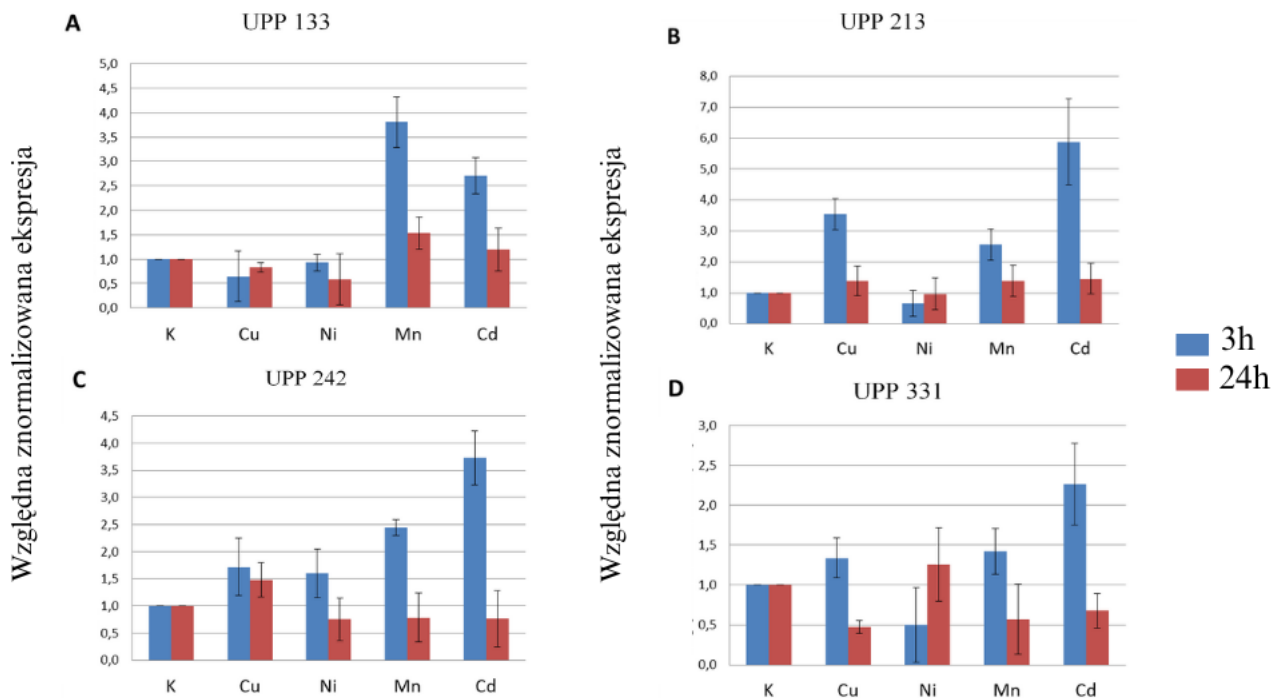
Analiza poziomu ekspresji genu *cueA* w szczepach *Bradyrhizobium* poddanych działaniu jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu wykazała różne profile ekspresji. Szczep UPP 133, po 3 godzinach ekspozycji na jony manganu i kadmu, wykazywał znaczący wzrost

poziomu ekspresji genu *cueA*, podczas gdy w przypadku jonów  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  był niższy. Po 24 godzinach, ekspresja genu *cueA* znacząco malała w obecności jonów manganu i kadmu, natomiast w przypadku jonów miedzi i niklu nie odnotowano tak znacznych różnic (Ryc. 38A).

W przypadku szczepu UPP 213, wykazano wysoki poziom ekspresji genu *cueA* szczególnie w odpowiedzi na obecność jonów  $\text{Cu}^{2+}$  (0,5 mM) i jonów  $\text{Cd}^{2+}$  (0,01mM). Obecność jonów  $\text{Ni}^{2+}$  w pożywce wywołała spadek poziomu ekspresji *cueA* po 3 godzinach ekspozycji. Poziom ekspresji mierzonej po 24h ekspozycji był we wszystkich przypadkach porównywalny do poziomu ekspresji w próbie kontrolnej (Ryc. 38B).

Szczep UPP 242 wykazywał wzrost poziomu ekspresji po 3 godzinach ekspozycji na wszystkie testowane jony metali ciężkich, przy czym najwyższy (ponad 3,5 krotnie), odnotowano w obecności jonów  $\text{Cd}^{2+}$ . Po 24 godzinach ekspozycji, poziom ekspresji genu *cuaA* był znacznie niższy niż po 3h (Ryc. 38C).

Szczep UPP 331 wykazywał zróżnicowane reakcje po 3 godzinach ekspozycji na metale ciężkie. Obserwowano zarówno wzrost ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ), jak i spadek poziomu ekspresji ( $\text{Ni}^{2+}$ ). Po 24 godzinach poziomy ekspresji genu *cueA* były na ogół niższe w porównaniu do prób kontrolnych, z wyjątkiem jonów  $\text{Ni}^{2+}$ , w przypadku których obserwowano wzrost poziomu ekspresji (Ryc. 38D).



**Ryc. 38. Analiza ekspresji genu ATPazy typu P transportującej metale ciężkie (*cueA*) w szczepach *Bradyrhizobium* UPP 133 (A), UPP 213 (B), UPP 242 (C) i UPP 331 (D).** Szczepy *Bradyrhizobium* hodowano w płynnych pożywkach TY zawierających 0,5mM Cu<sup>2+</sup>, 0,5 mM Ni<sup>2+</sup>, 5 mM Mn<sup>2+</sup> i 0,01 mM Cd<sup>2+</sup>, RNA izolowano z hodowli bakteryjnych po 3 i 24 godzinach ekspozycji na badane metale ciężkie. Kontrolę stanowiły szczepy bakteryjne hodowane w płynnych pożywkach TY

Analiza ekspresji genu *cueA* w czterech szczepach *Bradyrhizobium* wykazała, że obecność różnych metali ciężkich może prowadzić do zróżnicowanych zmian w poziomie ekspresji tego genu.

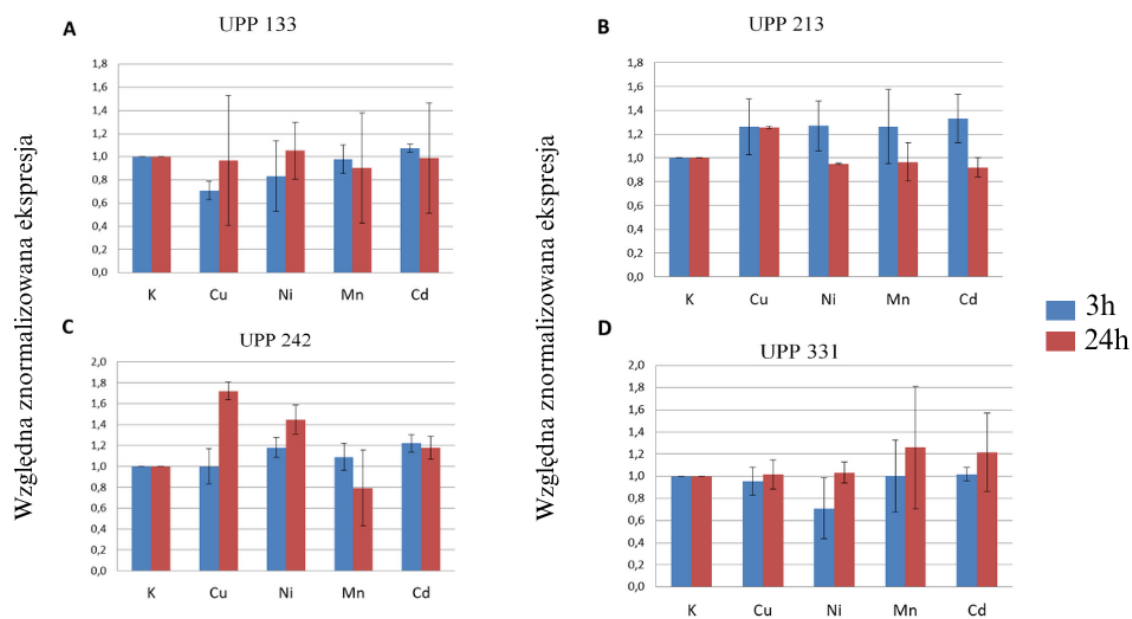
Te obserwacje korelują z wynikami dostępnymi w literaturze. Rademacher i Masepohl (2012) wskazują na znaczenie genu *cueA* w odpowiedzi bakteryjnej na obecność jonów miedzi w środowisku, co jest zgodne z obserwowaną indukcją wzmożonej ekspresji tego genu przez jony Cu<sup>2+</sup> w tej pracy. Dodatkowo, badanie przeprowadzone przez Liang i współautorów (2016) dotyczące tolerancji miedzi, cynku i kadmu przez *Bradyrhizobium liaoningense*, wskazuje na uniwersalny charakter odpowiedzi genów takich jak *cueA* na różne jony metali ciężkich, co znajduje odzwierciedlenie w naszych obserwacjach dotyczących indukcji wzmożonej ekspresji, wywołanej obecnością jonów Ni<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> a w szczególności Cd<sup>2+</sup>.

Interesujący jest także zaobserwowany spadek ekspresji genu *cueA* po 24h od ekspozycji, który może świadczyć o mechanizmach adaptacyjnych mikroorganizmów do długotrwałego stresu związanego z obecnością w środowisku metali ciężkich. Możliwe, że w fazie początkowej ekspozycji na metale ciężkie, aktywacja genów takich jak *cueA* służy jako natychmiastowa odpowiedź obronna, natomiast zmniejszenie ekspresji w czasie może odzwierciedlać adaptację komórkową do zmienionego środowiska, poprzez aktywację innych ścieżek regulacyjnych zmniejszających toksyczny wpływ jonów metali ciężkich.

#### **6.7.5. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na aktywność transkrypcyjną genu kodującego czynnik nodulacji NodA (*nodA*)**

Synteza czynników nodulacji (w tym *nodA*), które są niezbędne dla inicjacji procesu formowania brodawek korzeniowych, jest kluczowym elementem w procesie tworzenia relacji symbiotycznej pomiędzy bobowatymi a ich mikrosymbiontami. Niemniej jednak, dane dotyczące wpływu metali ciężkich na ekspresję genu *nodA* są ograniczone. W związku z tym, celem poniższego doświadczenia było dostarczenie informacji na temat regulacji tego kluczowego dla roślin bobowatych procesu.

Analiza poziomu ekspresji genu *nodA* w bakteriach *Bradyrhizobium* (szcepki UPP 133, UPP 213, UPP 242, UPP 331) w obecności badanych jonów metali ciężkich ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ) wykazała, że ich obecność w środowisku bakterii nie powoduje istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *nodA* w porównaniu z próbkami kontrolnymi (Ryc. 39 A, B, C i D). Dla wszystkich szcepów ekspresja genu *nodA* pozostała na poziomie równym bądź porównywalnym do ekspresji odpowiednich próbek kontrolnych zarówno po 3, jak i 24 godzinach ekspozycji na badane jony metali. Jedynym wyjątkiem był szcep UPP 242, dla którego odnotowano 1,7 razy wyższy poziom ekspresji genu *nodA* po 24h ekspozycji na jony miedzi (Ryc. 39 C).



**Ryc. 39. Analiza ekspresji genu czynnika nodulacji NodA (*nodA*) w szczepach *Bradyrhizobium* UPP 133 (A), UPP 213 (B), UPP 242 (C) i UPP 331 (D).** Szczepy *Bradyrhizobium* hodowano w płynnych pożywkach TY zawierających 0,5mM Cu<sup>2+</sup>, 0,5 mM Ni<sup>2+</sup>, 5 mM Mn<sup>2+</sup> i 0,01 mM Cd<sup>2+</sup>, RNA izolowano z hodowli bakteryjnych po 3 i 24 godzinach ekspozycji na badane metale ciężkie. Kontrolę stanowiły szczepy bakteryjne hodowane w płynnych pożywkach TY

Na symbiozę *Rhizobium* i roślin bobowatych mogą wpływać różne czynniki środowiskowe, w tym metale ciężkie. W glebie skażonej ich związkami potencjał symbiotyczny połączenia *Rhizobium* i roślin bobowatych w celu wiązania azotu, zależy zasadniczo od odporności populacji ryzobiów na te metale. Dane literaturowe zazwyczaj wskazują na podwyższoną biosyntezę czynników nodulacji w warunkach stresu abiotycznego, w tym *nodA*. Między innymi w pracy del Cerro i współautorów (2017) wykazano, podwyższoną ekspresję genu *nodA*, jednocześnie wskazując że efekt ten nie ogranicza się do warunków stresu solnego, ponieważ inne stesy środowiskowe, takie jak kwasowość lub ciśnienie osmotyczne (wysokie stężenie mannitolu) również indukują wzmożoną ekspresję tego genu. Brak danych odnoszących się bezpośrednio do wpływu jonów metali ciężkich na ekspresję tego genu pozwala domniemać, że gen *nodA* może być regulowany w bardziej złożony sposób, w zależności od rodzaju stresu abiotycznego, co może tłumaczyć stabilność poziomu jego ekspresji w badanych szczepach *Bradyrhizobium*. Aby przetrwać w warunkach narażenia na

metale, mikroorganizmy, takie jak rizobia opracowały różnorodne mechanizmy adaptacyjne mające na celu ograniczanie i przeciwdziałanie niekorzystnemu wpływowi metali ciężkich. Do mechanizmów tych należy między innymi immobilizacja metali ciężkich na ścianie bakteryjnej poprzez produkcję EPS. Badane szczepy *Bradyrhizobium* syntetyzowały EPS w obecności jonów metali ciężkich bardziej wydajnie niż próby kontrolne. Innym takim mechanizmem jest aktywny transport metali ciężkich przez błonę komórkową zachodzący wbrew gradientowi stężeń za pomocą pomp Efflux (Lebrazi i Fikri-Benbrahim, 2018). Oba te mechanizmy w przypadku szczepów *Bradyrhizobium* mogą tłumaczyć niewielkie zmiany w poziomie ekspresji genu *nodA*.

#### **6.8. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na kiełkowanie nasion łubinu wąskolistnego.**

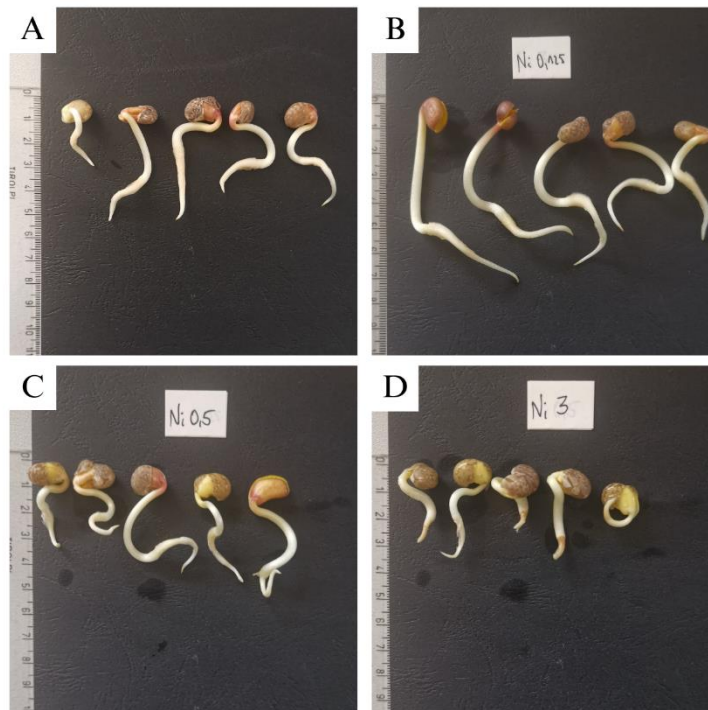
Nasiona zawierają zarodek jako nową miniaturową roślinę i pełnią dwie główne funkcje: reprodukcję i rozprzestrzenianie. Tworzenie się nasion kończy proces reprodukcji rośliny, a wraz z kiełkowaniem nasion rozpoczyna się kolejne pokolenie rośliny. Biorąc pod uwagę stale rosnące zanieczyszczenie środowiska metalami, zaskakujące może być to, że stosunkowo niewiele prac opisuje wpływ metali na metabolizm, żywotność i kiełkowanie nasion w porównaniu z licznymi publikacjami na temat wpływu metali na tkanki wegetatywne, zwłaszcza korzenie i pędy. W doświadczeniu badano wpływ wybranych metali ciężkich w różnych stężeniach na proces kiełkowania nasion łubinu wąskolistnego.

Na podstawie wyników doświadczeń można stwierdzić, że stres wywołany obecnością wyższych stężeń jonów Cu, Ni oraz Cd miał negatywny wpływ na kiełkowanie nasion *L. angustifolius*. Kiełkujące siewki rozwijały się w wolniejszym tempie, często wykazując nekrotyczne zmiany (Ryc. 40, 41 i 43). Podobny efekt przy zastosowaniu różnych metod ekspozycji na metale ciężkie odnotowano w przypadku kiełkowania nasion kilku gatunków roślin bobowatych, pod wpływem Cd, Cu, Ni i Pb (Abusriwil i in., 2011). Hamujący wpływ badanych metali ciężkich (Cu, Ni oraz Cd) na kiełkowanie nasion *L. angustifolius* może wynikać z toksyczności tych jonów, na fizjologię siewek i/lub z efektu osmotycznego badanych roztworów, zaburzającego pobieranie wody przez nasiona, najważniejszy czynnik procesu kiełkowania. Wiele innych możliwych przyczyn negatywnego wpływu na kiełkowanie pod wpływem stresu wywołanego metalami ciężkimi zostało opisane we

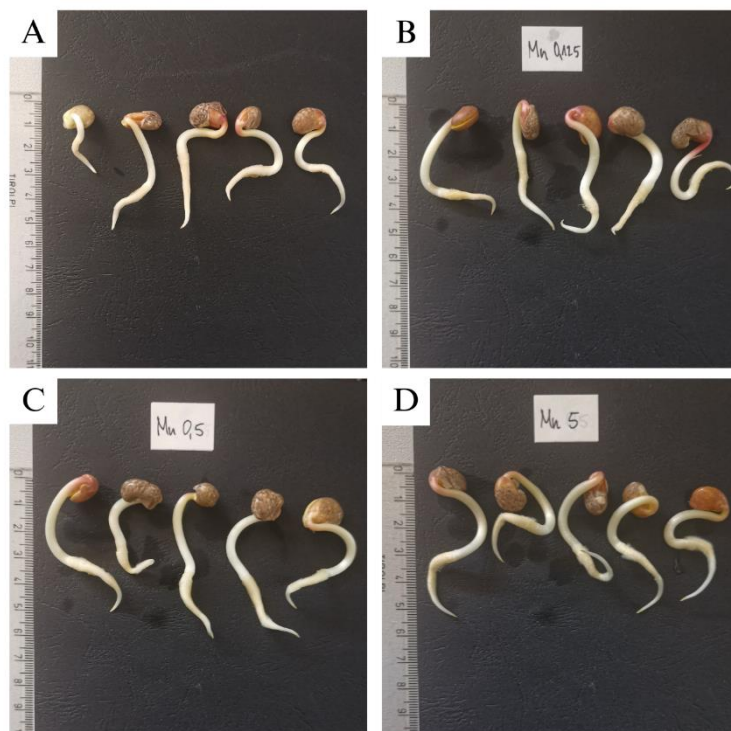
wcześniejszych badaniach, np. zmiany w przepuszczalności selekcyjnej błony komórkowej, przyspieszony rozkład składników odżywczych zgromadzonych w bielmie, zmniejszenie enzymatycznej hydrolizy skrobi, stres oksydacyjny powodujący zaburzenia homeostazy komórkowej (w tym zmiany w enzymach systemu obrony antyoksydacyjnej), czy regulacja ekspresji niektórych białek związanych z odpowiedzią na stres abiotyczny (Bezini i in., 2019). Szkodliwy wpływ wybranych metali ciężkich na kiełkowanie nasion można również przypisać zaburzeniom równowagi hormonalnej lub żywieniowej. Metale ciężkie mogą wchodzić w interakcje z innymi toksycznymi i niezbędnymi makro- i mikroelementami, co może powodować niedobór innych pierwiastków, niezbędnych do kiełkowania nasion, a tym samym słabe kiełkowanie (Fodor, 2002).



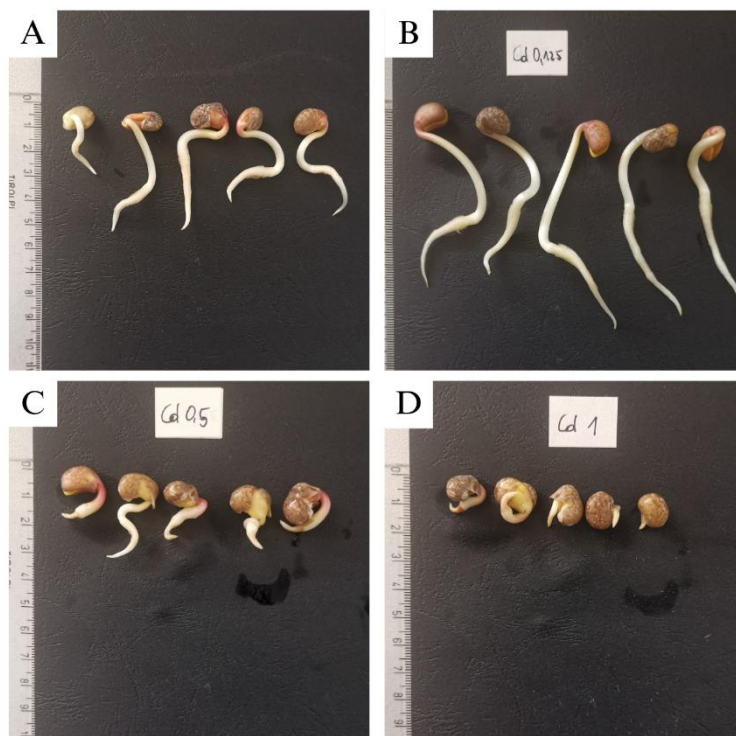
**Ryc. 40. Kiełkowanie nasion łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$ .** Nasiona kiełkowano na podłożu z bibuły nasączonej wodą (A), roztworem zawierającym jony  $\text{Cu}^{2+}$  o stężeniu 0,125 mM (B) 0,5 mM (C) oraz 3 mM (D)



**Ryc. 41. Kielkowanie nasion łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) w obecności jonów  $\text{Ni}^{2+}$ . Nasiona kielkowano na podłożu z bibuły nasączonej wodą (A), roztworem zawierającym jony  $\text{Ni}^{2+}$  o stężeniu 0,125 mM (B) 0,5 mM (C) oraz 3 mM (D)**



**Ryc. 42. Kielkowanie nasion łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) w obecności jonów  $\text{Mn}^{2+}$ . Nasiona kielkowano na podłożu z bibuły nasączonej wodą (A), roztworem zawierającym jony  $\text{Mn}^{2+}$  o stężeniu 0,125 mM (B) 0,5 mM (C) oraz 3 mM (D)**



**Ryc. 43. Kielkowanie nasion łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*) w obecności jonów  $\text{Cd}^{2+}$ .** Nasiona kielkowano na podłożu z bibuły nasączonej wodą (A), roztworem zawierającym jony  $\text{Cd}^{2+}$  o stężeniu 0,125 mM (B) 0,5 mM (C) oraz 1 mM (D)

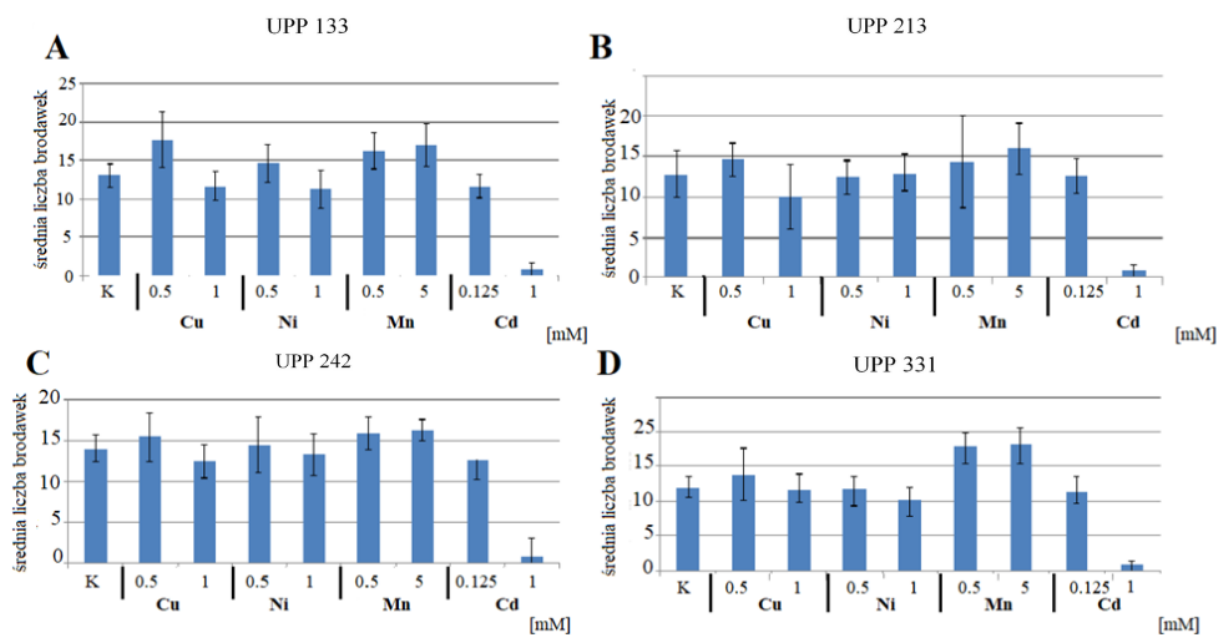
Nasiona kielkujące w obecności manganu (Ryc. 42) oraz niższych stężeń  $\text{Cu}^{2+}$  nie wykazywały znaczących różnic zarówno w tempie wzrostu jak i morfologii siewek, natomiast traktowanie najniższymi stężeniami jonów  $\text{Ni}^{2+}$  oraz  $\text{Cd}^{2+}$  wpływało pozytywnie na tempo kielkowania siewek i ich wzrost (Ryc. 41, 43). Obserwacje te mogą sugerować, że niskie stężenia jonów niklu i kadmu są zdolne do wywoływania efektu hormezy wobec nasion łubinu wąskolistnego. Termin hormeza opisuje dwufazową odpowiedź na szerokie spektrum związków, obserwowaną w wielu organizmach żywych (bakterie, rośliny, zwierzęta itp.) i charakteryzującą się przeciwstawnymi efektami wywieranymi przez niskie i wysokie dawki tej samej substancji. Przyjmuje się, że hormeza jest adaptacyjną odpowiedzią na stres, wywołaną prawdopodobnie początkowym zaburzeniem homeostazy przez niski poziom stresorów biotycznych lub abiotycznych, po którym często następuje proces nadmiernej kompensacji mającej na celu przywrócenie poprzedniego stanu i ochronę organizmu poprzez stymulację komórkowych mechanizmów obronnych (Salinitro i in., 2021). Kilka badań wykazało, że niektóre metale ciężkie mogą mieć pozytywny wpływ na kielkowanie. Donoszono, że kielkowanie nasion *M. sativa* jest stymulowane między innymi niskim stężeniem jonów Zn (Abusriwil i in., 2011). Również kielkowanie *Ulmus pumila* zostało wzmocnione przez traktowanie niskimi stężeniami Cd i Pb (Djukic i in., 2014).

## **6.9. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na ilość brodawek korzeniowych w układach symbiotycznych łubinu wąskolistny/*Bradyrhizobium***

Rośliny bobowate są w stanie regulować ilość powstających brodawek korzeniowych, wykorzystując mechanizm zwany autoregulacją nodulacji. Proces ten pozwala roślinom tworzącym układy symbiotyczne kontrolować liczbę brodawek korzeniowych, co jest kluczowe dla zapewnienia zbilansowanej wymiany składników odżywczych między rośliną a jej mikrosymbiontami, a także dla ochrony przed potencjalnie patogennym wpływem nadmiernej kolonizacji przez rhizobia (Nelson i Sadowsky, 2015). W poniższym doświadczeniu dokonano oceny wpływu obecności w podłożu hodowlanym jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na ilość brodawek korzeniowych, tworzonych w układzie symbiotycznym łubinu wąskolistnego z jego mikrosymbiontami z rodzaju *Bradyrhizobium* (UPP 133, 213, 242 i 331).

Spośród badanych metali ciężkich widoczny wpływ na liczebność brodawek na korzeniach łubinu wąskolistnego miała obecność w podłożu jonów  $\text{Cu}^{2+}$  w stężeniu 0,5mM oraz  $\text{Mn}^{2+}$  w stężeniach 0,5 mM oraz 5mM. W przypadku wszystkich badanych szczepów *Bradyrhizobium* obecność tych metali powodowała wzrost liczby brodawek (Ryc. 44).

Istotny wpływ na liczbę tworzonych brodawek miała również obecność w podłożu jonów  $\text{Cd}^{2+}$  w stężeniu równym 1mM, która powodowała drastyczny spadek liczebności brodawek lub całkowity ich brak (Ryc. 44).



**Ryc. 44. Liczba brodawek korzeniowych w łubinie wąskolistnym inokulowanym szczepami *Bradyrhizobium* UPP 133 (A), 213 (B), 242 (C) i 331 (D).** Rośliny łubinu wąskolistnego uprawiano w podłożach zawierających jony metali ciężkich w stężeniach 0,5 i 1 mM  $\text{Cu}^{2+}$  oraz  $\text{Ni}^{2+}$  0,5 i 5 mM  $\text{Mn}^{2+}$ , stężenie  $\text{Cd}^{2+}$  wynosiło 0,125 i 1 mM

Wyniki tego doświadczenia pokrywają się z doniesieniami innych autorów. W swoich badaniach Vesper i Weidensaul (1978) wykazali, że zwiększenie stężenia  $\text{Cd}^{2+}$  w glebie znacznie zmniejszyło liczbę brodawek, suchą masę i zdolność wiązania  $\text{N}_2$  przez soję. Zróżnicowany wpływ badanych jonów metali ciężkich uzyskany w powyższym doświadczeniu był spodziewany ze względu na fakt, że różne jony metali mogą wpływać na szerokie spektrum reakcji chemicznych i biochemicznych, które wpływają na ich rozpuszczalność i dostępność dla roślin. Czynnikiem równie ważnym jest zgłaszana przez innych autorów możliwość modyfikacji wydajności reakcji enzymatycznych zachodzących w glebie, która wpływa na zdolność tworzenia brodawek korzeniowych, co przekłada się na wiązanie azotu atmosferycznego (Haddad i in., 2015).

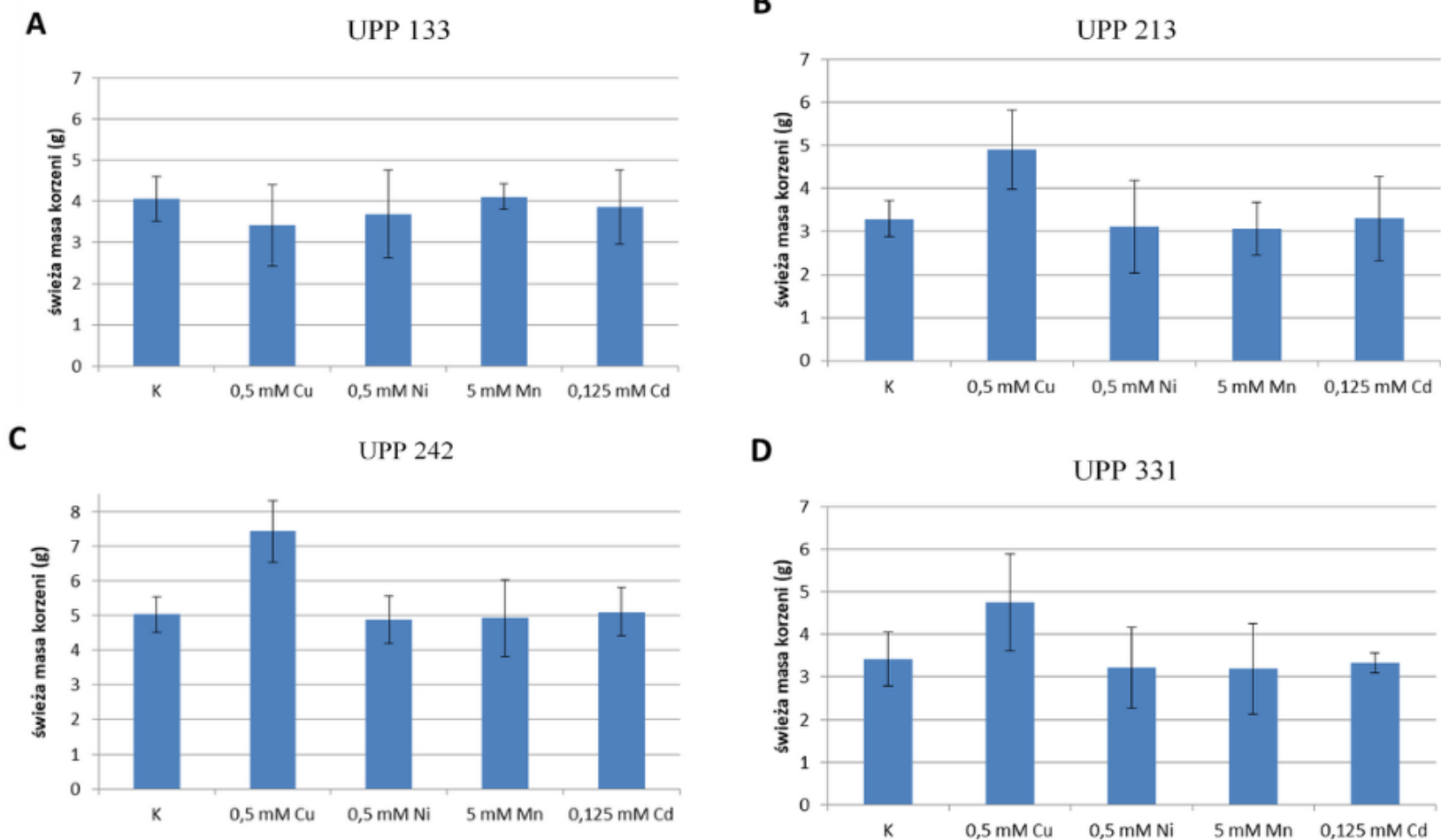
Czynnikiem odpowiedzialnym za utworzenie większej liczby brodawek w próbach, w których obecne były jony miedzi, w stężeniu równym 0,5 mM, może być fakt, że we wcześniejszych doświadczeniach wykazano, że jony tego metalu w określonych stężeniach zwiększają

zewnątrzkomórkową biosyntezę IAA. Dostępne dane wskazują że ten fitohormon może być bezpośrednio zaangażowany w kontrolowanie liczby powstających brodawek. W badaniach przeprowadzanych na Fasoli Mungo wykazano, że już niskie stężenia IAA (około  $10^{-8}$  M) wywierają korzystny, stymulujący wpływ na rozwój korzeni, pobieranie składników pokarmowych i mineralnych przez rośliny oraz tworzenie brodawek przez bakterie symbiotyczne (Jach i in., 2022). Wpływ jonów  $Mn^{2+}$  na zwiększoną liczbę brodawek może być natomiast spowodowany faktem, iż w procesie nodulacji istotną rolę odgrywają zewnątrzkomórkowe polisacharydy. Wyniki tego eksperymentu pokrywają się z wynikami z wcześniejszego doświadczenia, w którym obecność jonów manganu stymulowała syntezę EPS. Wyniki te są również zgodne z doniesieniami zespołu Abreu (2019) wskazującymi, że szczepy bakterii brodawkujących wyizolowane z gleby zanieczyszczonej manganem z terenów górniczych, wykazywały wyższą efektywność w tworzeniu brodawek niż szczepy natywne.

#### **6.10. Wpływ inokulów szczepów *Bradyrhizobium* (UPP 133, 213, 242 i 331) przygotowanych w pożywkach zawierających jony miedzi, niklu, manganu i kadmu na systemy korzeniowe łubinu wąskolistnego**

Analiza wyników doświadczeń, w których badano wpływ metali ciężkich na biosyntezę IAA oraz zbieżne z nimi wyniki z analizy wpływu metali ciężkich na liczebność brodawek na korzeniach, była inspiracją do wykonania kolejnego etapu badań, w którym określono wpływ inokulacji nasion łubinu wąskolistnego czterema szczepami *Bradyrhizobium* (UPP 133, 213, 242 i 331). Inokulaty hodowano wcześniej w obecności jonów wybranych metali ciężkich w stężeniach  $0,5\text{mM Cu}^{2+}$ ,  $0,5\text{ mM Ni}^{2+}$ ,  $5\text{ mM Mn}^{2+}$  oraz  $0,125\text{ mM Cd}^{2+}$ . Przed inokulacją wysterylizowanych nasion łubinu wąskolistnego, 96 godzinne hodowle bakteryjne przepłukano dwukrotnie sterylną pożywką TY. Rośliny uprawiano przez 4 tygodnie w warunkach szklarniowych, w podłożach wolnych od łubinowych mikrosymbiontów, po czym obrazowano systemy korzeniowe (5 siewek) oraz dokonano pomiaru świeżej masy korzeni (Ryc. 45). We wszystkich próbach, wszystkie szczepy zdolne były do tworzenia brodawek na korzeniach łubinu. Ze względu na to, iż istotne zmiany zaobserwowano tylko dla próby, w której bakterie przed inokulacją hodowano w obecności jonów miedzi o stężeniu  $0,5\text{ mM}$ , to obrazy systemów korzeniowych wyłącznie tej próby pokazano na rycinie 46.

Wyniki tego doświadczenia wyraźnie wskazują, że widoczny istotny wpływ na masę korzeni łąbinu wąskolistnego miało inokulowanie ich bakteriami szczepów UPP 213, UPP 242 oraz UPP 331 hodowanymi w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$  o stężeniu równym 0,5 mM (Ryc. 45 i 46). To samo stężenie wywierało największy wpływ na produkowany przez te szczepy kwas indolilo-3-octowy, co sugerować może znaczny wpływ bakteryjnego IAA na stymulację rozwoju systemów korzeniowych łąbinu wąskolistnego.

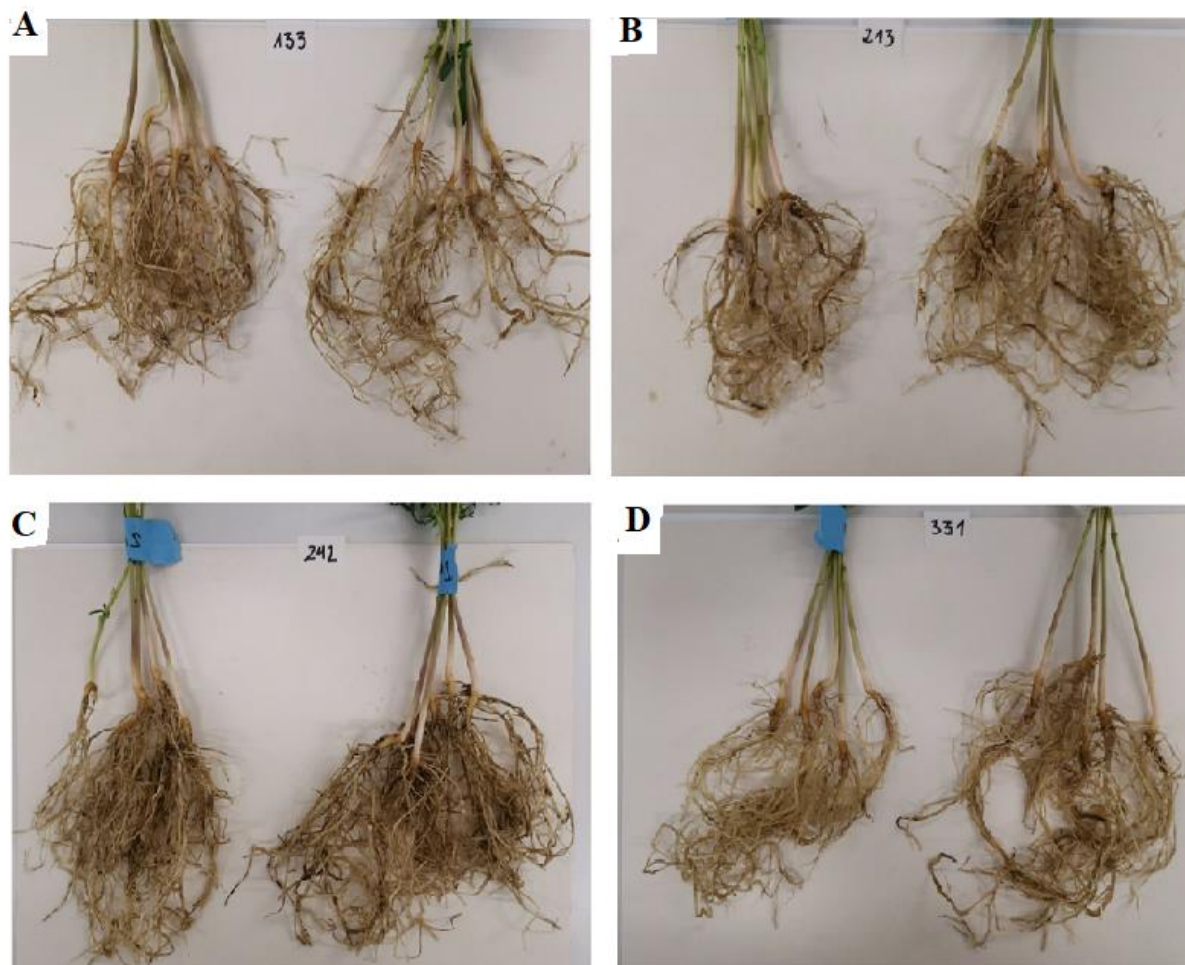


**Ryc. 45.** Świeża masa korzeni łubinu wąskolistnego inokulowanego szczepami *Bradyrhizobium* UPP 133 (A), 213 (B), 242 (C) i 331 (D). Bakterie szczepów *Bradyrhizobium* hodowano przed inokulacją w pożywce zawierającej jony metali ciężkich w stężeniu 0,5mM Cu<sup>2+</sup> oraz Ni<sup>2+</sup>, 5 mM Mn<sup>2+</sup>, oraz 0,125 mM Cd<sup>2+</sup>

Dotychczasowe doniesienia wskazują, że głównym efektem inokulacji nasion bakteriami wytwarzającymi IAA jest zazwyczaj przyspieszenie rozwoju korzeni, a w konsekwencji zwiększenie efektywności pozyskiwania wody, składników odżywczych i wykorzystania objętości gleby, co pozwala na zmniejszenie dawki nawozów sztucznych (Lobo i in., 2022). Odzwierciedleniem tych wyników są uzyskane w doświadczeniu wyraźnie widoczne różnice w wielkości systemów korzeniowych roślin rozwijających się z nasion łubinu wąskolistnego, inokulowanych bakteriami, które wzrastały w obecności jonów miedzi (Ryc. 46).

Wyniki te są zbieżne z wynikami badań Herlina i wsp. (2017), w których pokazano, że izolaty bakteryjne wytwarzające IAA miały wpływ na systemy korzeniowe fasoli złotej (*Vigna radiata*). Bakteryjny IAA najprawdopodobniej przyczynił się do rozluźniania roślinnej ściany komórkowej, czego konsekwencją było zwiększenie liczby tworzących się korzeni bocznych, co zwiększało powierzchnię układu korzeniowego, dostarczając dodatkowych składników odżywczych.

Również wyniki opisane przez zespół profesor Lobo (2022), na przykładzie pomidora, dowodzą, że inokulacja drobnoustrojami zdolnymi do zewnątrzkomórkowej biosyntezy IAA powoduje powstawanie bardziej rozwiniętych systemów korzeniowych.



**Ryc. 46. Systemy korzeniowe łubinu wąskolistnego inokulowanego szczepami *Bradyrhizobium* UPP 133 (A), 213 (B), 242 (C) i 331 (D). Bakterie szczepów *Bradyrhizobium* w próbie kontrolnej (na obrazach po lewej stronie) hodowano przed inokulacją w pożywce pozbawionej dodatku jonów metali ciężkich, natomiast w próbie eksperymentalnej bakterie hodowano w pożywce zawierającej jony miedzi w stężeniu 0,5 mM (na obrazach po prawej stronie)**

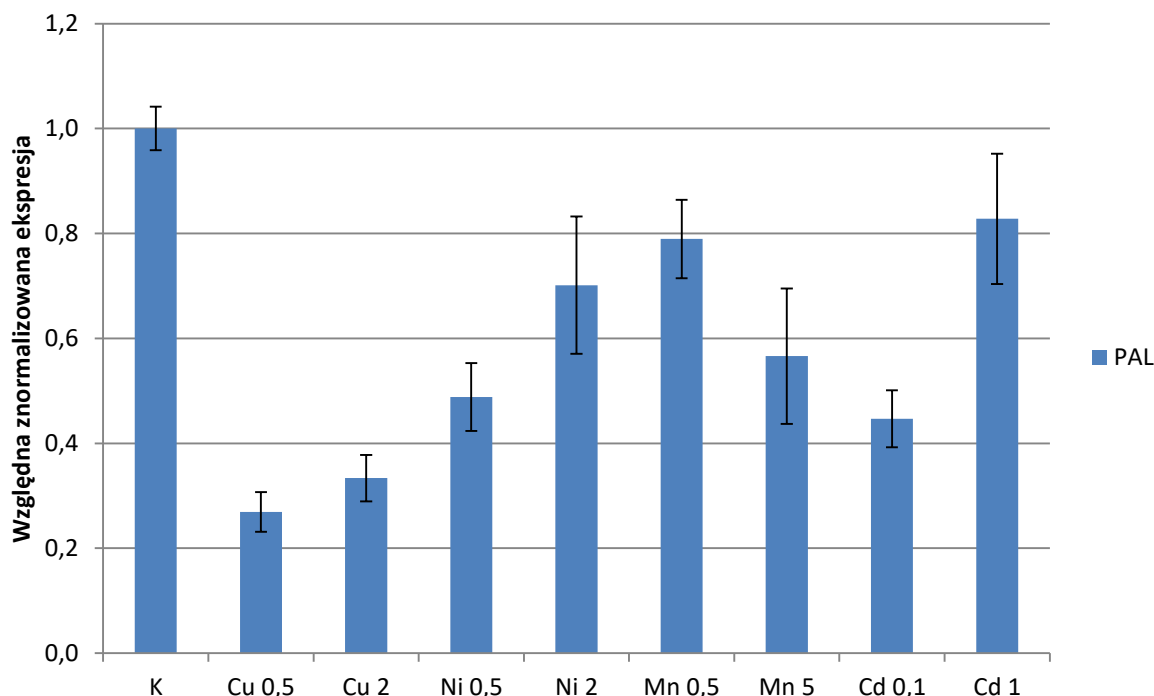
## 6.11. Wpływ jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu na ekspresję wybranych genów ze szlaku syntezy fenylopropanoidów

Metale ciężkie działając jako czynniki stresu abiotycznego, powodują uszkodzenia oksydacyjne komórek roślinnych. Rośliny potrafią rozpoznać te sygnały zagrożenia i aktywować różne reakcje obronne. Zwiększona produkcja metabolitów wtórnych jest istotnym mechanizmem detoksykacji, który rozwinął się w roślinach w celu łagodzenia szkodliwych skutków powodowanych przez toksyczne metale. Metabolizm fenylopropanoidów w roślinach jest ważnym źródłem wielu metabolitów wtórnych o ogromnym znaczeniu rozwojowym i obronnym. Flawonoidy w szczególności odgrywają znaczącą rolę jako związki sygnałowe, fitoaleksyny, środki chroniące przed promieniowaniem UV, pigmenty itp. Liczne enzymy (PAL, CHS, CHI, CHR, IFR, IFS i wiele innych) biorą udział w tym rozgałęzionym szlaku metabolicznym. Kluczowymi enzymami biosyntezy fenylopropanoidów są amoniakoliaza fenyloalaninowa (PAL), syntaza chalkonowa (CHS) i syntaza izoflawonowa (IFS). Enzymy te są kodowane przez małe rodziny wielogenowe.

Metale ciężkie są czynnikami stresowymi dla roślin, mogą zatem wpływać na poziom ekspresji genów szlaku syntezy fenylopropanoidów, dlatego dokonano analizy poziomu ekspresji genów *PAL*, *CHS* i *IFS* w korzeniach łubinu wąskolistnego zebranych z roślin uprawianych w podłożach, które zawierały różne stężenia jonów  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ . Do analizy poziomu ekspresji *PAL* wykorzystano specyficzną parę starterów obejmującą wszystkich przedstawicieli tej rodziny wielogenowej, występujących w łubinie wąskolistnym (3 geny *PAL*, Narożna, dane nieopublikowane). Dla pozostałych dwóch rodzin wielogenowych (*CHS* i *IFS*) analizę poziomu ekspresji wykonano dla poszczególnych przedstawicieli danej rodziny wielogenowej (*CHS* w łubinie wąskolistnym jest kodowany przez cztery geny (Narożna, 2014), natomiast *IFS* jest kodowany przez trzy geny (Narożna i in., 2017)).

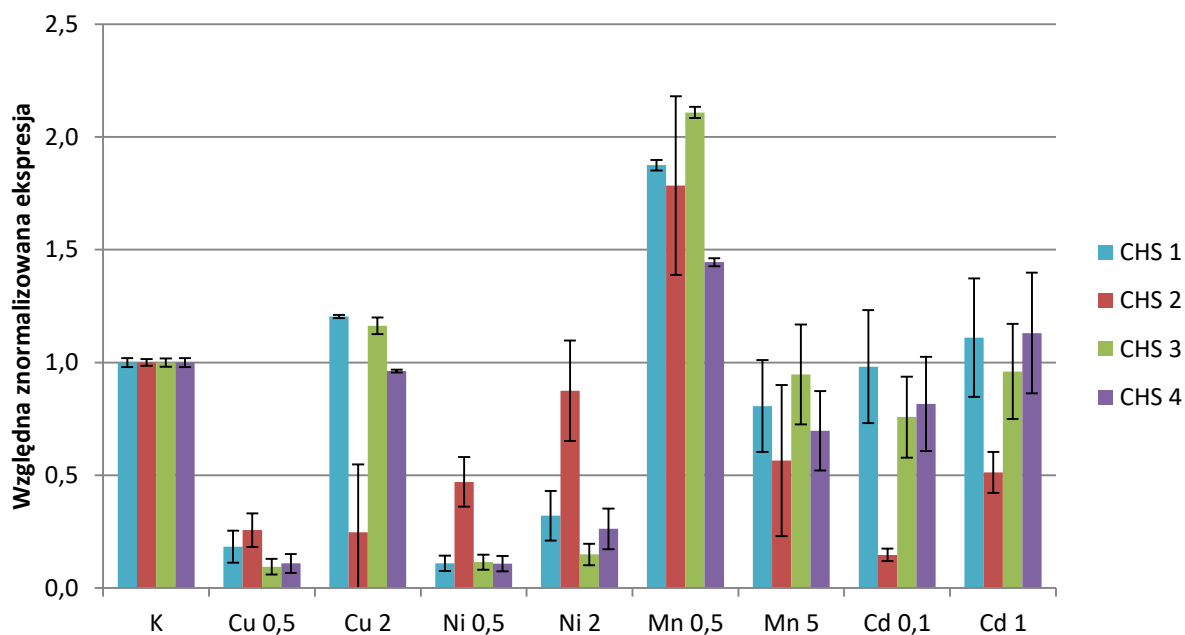
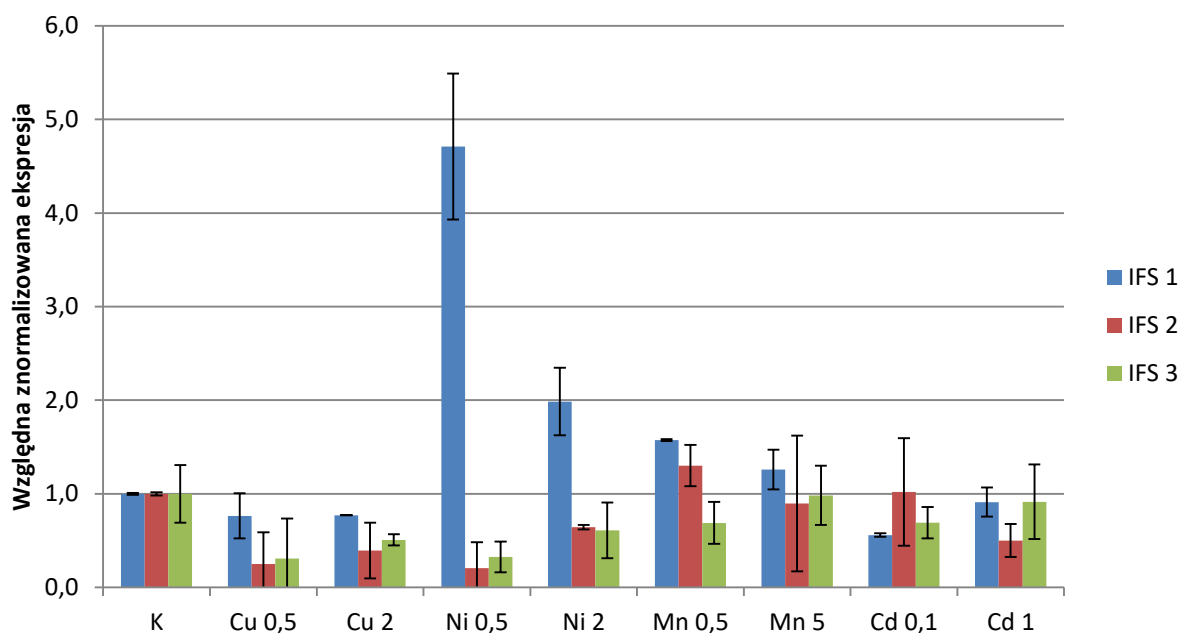
Poziomy ekspresji rodziny genów *PAL* w łubinie wąskolistnym w obecności badanych metali ciężkich, ulegały obniżeniu w odniesieniu do próby kontrolnej, przy czym największy spadek poziomu ekspresji obserwowano w obecności obu stężeń jonów miedzi (0,5 i 2 mM) (Ryc. 47). Najwyższy poziom ekspresji genu *PAL* dotyczył jonów niklu o stężeniu 2 mM,

jonów manganu w obu stężeniach (0,5 i 5 mM) oraz jonów kadmu o stężeniu 1 mM, jednak wciąż były niższe od poziomu ekspresji w próbce kontrolnej (Ryc. 47).



**Ryc. 47. Ekspresja genów PAL w korzeniach łubinu wąskolistnego.** Rośliny uprawiano w naczyniach Leonarda w bezazotowej pożywce, z dodatkiem jonów  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  o stężeniu 0,5 mM i 2 mM,  $\text{Mn}^{2+}$  o stężeniu 0,5 mM, 5 mM i  $\text{Cd}^{2+}$  o stężeniu 0,1 mM, 1 mM

Rodzina genów *CHS* (*CHS1*, *CHS2*, *CHS 3* i *CHS4*) wykazała różne profile ekspresji, zależne od stężenia jonów metali ciężkich. Znaczny spadek poziomu ekspresji trzech genów *CHS* (*CHS 1*, *3* i *4*) w porównaniu z próbą kontrolną obserwowano przy stężeniu 0,5 mM  $\text{Cu}^{2+}$  i obu stężeń jonów niklu (0,5 i 2 mM). Porównywalnymi z próbkami kontrolnymi poziomami ekspresji charakteryzowały się geny *CHS 1*, *3* i *4* w obecności jonów miedzi o stężeniu 2 mM, 5mM manganu i 0,1 i 1 mM kadmu w przeciwieństwie do genu *CHS 2*, którego poziom ekspresji wykazywał tendencje spadkowe przy tych stężeniach metali. Szczególną uwagę zwraca podwyższenie poziomu ekspresji wszystkich czterech genów *CHS* w obecności niższego stężenia jonów manganu (0,5 mM) (Ryc. 48A).

**A****B**

**Ryc. 48. Ekspresja rodzin genów *CHS* (A) i *IFS* (B) w korzeniach łubinu wąskolistnego.** Rośliny uprawiano w naczyniach Leonarda w bezazotowej pożywce, z dodatkiem jonów  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  o stężeniu 0,5 mM i 2 mM,  $\text{Mn}^{2+}$  o stężeniu 0,5 mM, 5 mM i  $\text{Cd}^{2+}$  o stężeniu 0,1 mM, 1 mM

Zróznicowane poziomy ekspresji rodzin genów ze szlaku syntezy fenylopropanoidów wskazują na złożoność interakcji między roślinami a środowiskiem, w którym obecność metali ciężkich może modulować ekspresję kluczowych genów tego szlaku, odgrywających ważną rolę w obronie i adaptacji roślin. Wzmoczona ekspersja genu *CHS* pod wpływem jonów manganu oraz genu *IFS* indukowana obecnością jonów niklu koreluje z wynikami badań opublikowanymi w literaturze. Badanie przeprowadzone przez zespół Pawlak-Sprady (2011) wskazuje na wzmoczoną aktywację szlaku fenylopropanoidów w roślinach bobowatych narażonych na działanie metali ciężkich, co może sugerować ogólny mechanizm obronny roślin wobec stresu wywołanego przez metale ciężkie. Wyniki opisane przez Yadav i współautorów (2019) sugerują, że stres wywołany metalami ciężkimi może powodować zarówno wzrost jak i spadek poziomu ekspresji genów związanych z metabolizmem wtórnym, w tym genów szlaku fenylopropanoidów, w zależności od warunków i czynnika stresogennego. Wyniki te potwierdzają, że rośliny bobowate dysponują złożonymi mechanizmami regulacji ekspresji genów szlaku fenylopropanoidów w odpowiedzi na stesy abiotyczne, w tym stres wywołany obecnością metali ciężkich. Dodatkowo zróżnicowana odpowiedź ekspresji genów *PAL*, *CHS*, i *IFS* na obecność jonów metali ciężkich może odzwierciedlać tę złożoność w strategii adaptacyjnej roślin do specyficznych warunków środowiskowych, zapewniającą elastyczność w regulacji syntezy związków fenylopropanoidowych.

## 7. Podsumowanie i wnioski

Powszechnie wiadomo, że symbioza roślin bobowatych i mikrosymbiontów z rodzaju *Rhizobium* pozwala na zwiększenie produktywności i odporności roślin bobowatych. Skuteczność tego wzajemnego powiązania silnie zależy od precyzyjnej regulacji złożonych interakcji między rośliną a rizobiami. Ich molekularny dialog stanowi złożony, wieloetapowy proces, którego każdy etap ma kluczowe znaczenie dla ogólnego powodzenia symbiozy, a zrozumienie wpływu czynników środowiskowych zarówno na bakterie jak i rośliny a także na mechanizmy molekularne stojące za tworzeniem i funkcjonowaniem układów symbiotycznych, może umożliwić zwiększenie wydajności upraw przy jednoczesnym ograniczeniu użycia syntetycznych nawozów oraz środków ochrony roślin.

Szczepy *Bradyrhizobium* (zaliczane do grona PGPR) wywierają różnorodny, korzystny wpływ na rośliny bobowate. Pobudzają ich wzrost, a także wydzielają do środowiska

glebowego wiele metabolitów wtórnych takich jak siderofory czy EPS, co powoduje, że stanowią one ogromny potencjał nie tylko w kwestii zrównoważonego zwiększania plonów lecz także w bioremediacji poprzez fitoekstrakcję i detoksykację spektrum substancji zanieczyszczających środowisko (Nagrale i in., 2023).

W pracy tej podjęto badania, które pozwoliły określić wpływ jonów miedzi, niklu, manganu oraz kadmu na obu partnerów uczestniczących w symbiotycznym wiązaniu azotu atmosferycznego: łubin wąskolistny i bakterie z rodzaju *Bradyrhizobium* (*B. japonicum* i *B. canariense*). Szczepy *Bradyrhizobium* nie zostały wybrane przypadkowo. Podstawą ich wyboru było występowanie w środowisku naturalnym, ponieważ *B. japonicum* preferuje gleby o lekko kwaśnym pH, natomiast *B. canariense* jest odporne nawet na niskie pH gleby.

Wyniki badań można podsumować następująco:

1. Jony miedzi i niklu w stężeniach powyżej 2 mM, kadmu w stężeniach powyżej 1mM oraz manganu w stężeniach powyżej 120 mM hamują wzrost badanych szczepów *Bradyrhizobium*. Wszystkie badane szczepy, cechuje większa odpornością na negatywny wpływ jonów manganu w hodowlach na stałych oraz płynnych pożywkach TY. Jony kadmu okazały się być najbardziej toksyczne w stosunku do badanych szczepów *Bradyrhizobium*.

2. Proces biosyntezy IAA przez badane szczepy *Bradyrhizobium* jest stymulowany przez jony miedzi, niklu i manganu i zależy od ich środowiskowego stężenia. Najsilniejszy stymulujący wpływ odnotowano dla szczepów UPP 242 i UPP 331 w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$  o stężeniu 0,5 mM. Stężenia poniżej 0,5 mM nie wywoływały tak silnej reakcji, natomiast stężenia wyższe niż 0,5 mM powodowały stopniowy spadek biosyntezy IAA. Obecność jonów kadmu powyżej stężenia 0,5 mM hamowała całkowicie biosyntezę IAA.

3. Wzrost poziomu biosyntezy EPS, wydzielanych zewnątrzkomórkowo w obecności wszystkich badanych jonów metali zależy od ich stężeń. Znaczny wzrost biosyntezy EPS przez *Bradyrhizobium* indukują jony  $\text{Cu}^{2+}$  (0,5 mM i 1 mM),  $\text{Ni}^{2+}$  (0,5 mM i 1 mM) oraz  $\text{Mn}^{2+}$  (0,125 mM i 5 mM). 3 mM stężenie jonów  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$ , 100 mM jonów  $\text{Mn}^{2+}$  oraz 1 mM jonów  $\text{Cd}^{2+}$  obniża, lub nie wpływa na poziom biosyntezy EPS w porównaniu z próbą kontrolną. Takie działanie badanych jonów miedzi, niklu manganu i kadmu na szczepy *Bradyrhizobium* zostało potwierdzone przez analizę ekspresji genu *exoR* i obrazowanie SEM.

4. Szczepy *Bradyrhizobium* (UPP 133, 213, 242, 331) syntetyzują siderofory, zarówno w próbach kontrolnych jak i pod wpływem jonów badanych metali ciężkich. Poziom

ich biosyntezy przez szczepy *Bradyrhizobium canariense* jest na wyższym poziomie w porównaniu ze szczepami *B. japonicum*. Jony  $Mn^{2+}$  stymulują wzrost biosyntezy sideroforów dla szczepów UPP 133, UPP 213 oraz UPP 242, co dodatkowo potwierdziła analiza ekspresji genu *fegA* jak i hodowle bakterii w obecności barwnika CAS.

5. Szczepy *B. canariense* charakteryzuje podwyższona ekspresja genu *treS* (syntazy trehalozy) w obecności wszystkich metali ciężkich, jednak efekt ten zależny jest od czasu ekspozycji na jony metali.

6. Wszystkie jony badanych metali ciężkich wywierają nieznaczny wpływ na poziom ekspresji czynnika nodulacji *NodA*, z wyjątkiem jonów  $Cu^{2+}$  po 24h ekspozycji dla szczepu UPP 213.

7. Zmiany w populacjach różnych grup mikroorganizmów zasiedlających próbki gleby traktowane jonami miedzi, niklu, manganu i kadmu są zależne od ich stężenia i czasu ekspozycji.

8. Kiełkowanie nasion i wzrost siewek łąbinu wąskolistnego zależne są od stężenia jonów miedzi, niklu, manganu i kadmu. Najmniejsze stężenia jonów tych metali, szczególnie niklu i kadmu, pozytywnie wpływają na kiełkowanie nasion i wzrost siewek łąbinu wąskolistnego, co może być związane z efektem hormezy. Natomiast wyższe stężenia hamują kiełkowanie i wzrost siewek *L. angustifolius*.

9. Obecność w podłożu jonów  $Cu^{2+}$  w stężeniu 0,5 mM oraz jonów  $Mn^{2+}$  w stężeniach 0,5 mM oraz 5 mM ma pozytywny wpływ na liczbę powstających brodawek na korzeniach łąbinu wąskolistnego, w próbach ze wszystkimi badanymi szczepami *Bradyrhizobium*.

10. Inokula szczepów *Bradyrhizobium* przygotowane w hodowlach zawierających jony miedzi, niklu, manganu i kadmu wywierają wpływ na obraz systemów korzeniowych łąbinu wąskolistnego. Szczególnie widoczny efekt obserwowano dla inokulum wzrastającego w obecności jonów  $Cu^{2+}$  o stężeniu 0,5 mM. Tak przygotowane inokulum powodowało tworzenie przez rośliny bardziej rozbudowanych systemów korzeniowych, co przekładało się na ich większą masę. Może to sugerować, że biosynteza metabolitów wtórnych wywołana obecnością miedzi ma pozytywny wpływ na wzrost roślin.

11. Poziomy ekspresji rodzin genów *PAL*, *CHS* i *IFS* charakteryzują różne profile ekspresji zależne od stężenia jonów metali ciężkich.

Podsumowując, przedstawione wyniki badań stanowią istotny wkład w zrozumienie wpływu wybranych metali ciężkich na obu partnerów uczestniczących w symbiotycznym wiązaniu azotu atmosferycznego: łubin wąskolistny i mikrosymbionty z rodzaju *Bradyrhizobium*. Otwierają one również nowe perspektywy dla przyszłych badań naukowych, szczególnie w zakresie dalszych eksploracji mechanizmów molekularnych zaangażowanych w odpowiedzi bakterii na stres wywołany przez metale ciężkie, a także adaptacji roślin bobowatych do takich warunków.

Ponadto, lepsze zrozumienie tych interakcji może mieć istotne implikacje dla praktyki rolniczej i biotechnologii przyczyniając się do opracowania innowacyjnych rozwiązań w dziedzinie rolnictwa i ochrony środowiska, które będą bardziej zrównoważone i przyjazne dla ekosystemów glebowych oraz ludzkiego zdrowia. Dalsze badania mogą przyczynić się do opracowania strategii poprawy wydajności upraw, poprzez selekcję lub inżynierię genetyczną roślin oraz mikroorganizmów, które wykazują pożądane cechy. Dodatkowo, może pozwolić to na rozwój metod bioremediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi, poprzez wykorzystanie specjalnie wyselekcjonowanych mikroorganizmów, zdolnych do usuwania tych substancji, lub ograniczania ich toksyczności wobec roślin.

## 8. Literatura

- Abraham, E., Ganopoulos, I., Madesis, P., Mavromatis, A., Mylona, P., Nianiou-Obeidat, I., Parissi, Z., Polidoros, A., Tani, E., i Vlachostergios, D. (2019). The Use of Lupin as a Source of Protein in Animal Feeding: Genomic Tools and Breeding Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 851.
- Abreu, M. G. P. D., Filho, P. F. M., Garcia, K. G. V., Silva Junior, J. M. T. D., Albuquerque, G. H. D. S., Araujo, J. M., i Tavella, L. B. (2019). Effect of Manganese on Growth and Nodulation of *Mimosa caesalpiniaefolia* (Benth.). *Journal of Agricultural Science*, 11(2), 339.
- Abusriwil, L. M. H., Bayoumi, H., i Elfoughi, A. A. (2011). Seed germination, growth and metal uptake of *Medicago Sativa* L. grown in heavy metal contaminated clay loam brown forest soil. *Journal of Landscape Ecology*, 9, 111–125.
- Adarsh, V. K., Mishra, M., Chowdhury, S., Sudarshan, M., Thakur, A. R., i Chaudhuri, S. R. (2007). Studies on Metal Microbe Interaction of Three Bacterial Isolates From East Calcutta Wetland. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 7(2), 80–88.
- Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., Zia-Ur-Rehman, M., Irshad, M. K., i Bharwana, S. A. (2015). The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: A review. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(11), 8148–8162.
- Ahemad, M., Saghir Khan, M. (2011). Assessment of Plant Growth Promoting Activities of *Rhizobacterium Pseudomonas putida* under Insecticide-Stress. *Microbiology Journal*, 1(2), 54–64.
- Ahmed, E., i Holmström, S. J. M. (2014). Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196–208.
- Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., i Wang, M.-Q. (2021). Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications. *Toxics*, 9(3), 42.
- Alvarez, A., Saez, J. M., Davila Costa, J. S., Colin, V. L., Fuentes, M. S., Cuozzo, S. A., Benimeli, C. S., Polti, M. A., Amoroso, M. J. (2017). Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere*, 166, 41–62.

- Arguello, J., Raimunda, D., Padilla-Benavides, T. (2013). Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3.
- Azcón, R., Perálvarez, M. del C., Roldán, A., Barea, J.-M. (2010). Arbuscular mycorrhizal fungi, *Bacillus cereus*, and *Candida parapsilosis* from a multicontaminated soil alleviate metal toxicity in plants. *Microbial Ecology*, 59(4), 668–677.
- Baccouch, S., Chaoui, A., El Ferjani, E. (2001). Nickel Toxicity Induces Oxidative Damage in *Zea Mays* Roots. *Journal of Plant Nutrition*, 24(7), 1085–1097.
- Barnawal, D., Bharti, N., Pandey, S. S., Pandey, A., Chanotiya, C. S., i Kalra, A. (2017). Plant growth-promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and TaCTR1/TaDREB2 expression. *Physiologia Plantarum*, 161(4), 502–514.
- Bartkiene, E., Bartkevics, V., Starkute, V., Lele, V., Cizeikiene, D., Zadeike, D., Gražina, J., Maknickiene, Z. (2016). Chemical composition and nutritional value of seeds of *Lupinus luteus* L., *L. angustifolius* L. and new hybrid lines of *L. angustifolius* L. *Zemdirbyste-Agriculture*, 103, 107–116.
- Baskar, V., Venkatesh, R., i Ramalingam, S. (2018). Flavonoids (Antioxidants Systems) in Higher Plants and Their Response to Stresses. W D. K. Gupta, J. M. Palma, i F. J. Corpas (Red.), *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants* (s. 253–268). Springer International Publishing.
- Behera, N., Arakha, M., Priyadarshinee, M., S. Pattanayak, B., Soren, S., Jha, S., i C. Mallick, B. (2019). Oxidative stress generated at nickel oxide nanoparticle interface results in bacterial membrane damage leading to cell death. *RSC Advances*, 9(43), 24888–24894.
- Bending, G. D. (2003). ROOT DEVELOPMENT | The Rhizosphere and its Microorganisms. W B. Thomas (Red.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (s. 1123–1129). Elsevier.
- Benson, H. P., Boncompagni, E., i Guerinot, M. L. (2005). An iron uptake operon required for proper nodule development in the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 18(9), 950–959.
- Bezini, E., Abdelguerfi, A., Nedjimi, B., Touati, M., Benziane, A., Yabrir, B. (2019). Effect of Some Heavy Metals on Seed Germination of *Medicago arborea* L. (Fabaceae). *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 84, 357–364.

- Blake II, R. C., Choate, D. M., Bardhan, S., Revis, N., Barton, L. L., Zocco, T. G. (1993). Chemical transformation of toxic metals by a *Pseudomonas* strain from a toxic waste site. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(8), 1365–1376.
- Brown, P. H., Welch, R. M., Cary, E. E. (1987). Nickel: A Micronutrient Essential for Higher Plants 1. *Plant Physiology*, 85(3), 801–803.
- Chaintreuil, C., Giraud, E., Prin, Y., Lorquin, J., Bâ, A., M, G., P, de L., i B, D. (2000). Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12).
- Chandrangsu, P., Rensing, C., Helmann, J. D. (2017). Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 15(6), Article 6.
- Chauhan, M., Solanki, M., Nehra, K. (2017). *Putative Mechanism of Cadmium Bioremediation Employed by Resistant Bacteria*. 10(2), 9.
- Chen, L., Figueredo, A., Villani, H., Michajluk, J., Hungria, M. (2002). Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. *Biology and Fertility of Soils*, 35(6), 448–457.
- Crichton, R. R., i Pierre, J. L. (2001). Old iron, young copper: From Mars to Venus. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 14(2), 99–112.
- de Bruijn, F. J. (2015). Biological Nitrogen Fixation. W B. Lugtenberg (Red.), *Principles of Plant-Microbe Interactions* (s. 215–224). Springer International Publishing.
- Deepika, K. V., Raghuram, M., Kariali, E., i Bramhachari, P. V. (2016). Biological responses of symbiotic *Rhizobium radiobacter* strain VBCK1062 to the arsenic contaminated rhizosphere soils of mung bean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 134, 1–10.
- del Cerro, P., Pérez-Montaña, F., Gil-Serrano, A., López-Baena, F. J., Megías, M., Hungria, M., i Ollero, F. J. (2017). The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. *Scientific Reports*, 7(1), 46712.
- Díaz-Visurraga, J., Garcí'a, A., Ca'rdenas, G. (2010). Lethal effect of chitosan-Ag (I) films on *Staphylococcus aureus* as evaluated by electron microscopy. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 633–646.
- Djukic, M., Bojović, D., Samuilov, S. (2014). The influence of cadmium and lead on *Ulmus pumila* L. seed germination and early seedling growth. *Archives of Biological Sciences*, 66, 253–259.

- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., i Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(1), 85–125.
- Erikson, K. M., Aschner, M. (2019). 10. Manganese: Its Role in Disease and Health. W *Essential Metals in Medicine: Therapeutic Use and Toxicity of Metal Ions in the Clinic* (s. 253–266). De Gruyter.
- Ernst, W. (2006). Evolution of metal tolerance in higher plants. *Forest Snow and Landscape Research*, 80, 251–274.
- Eskew, D. L., Welch, R. M., i Cary, E. E. (1983). Nickel: An essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. *Science (New York, N.Y.)*, 222(4624), 621–623.
- Fahde, S., Boughribil, S., Sijilmassi, B., Amri, A. (2023). Rhizobia: A Promising Source of Plant Growth-Promoting Molecules and Their Non-Legume Interactions: Examining Applications and Mechanisms. *Agriculture*, 13(7), Article 7.
- Fernando, D. R., i Lynch, J. P. (2015). Manganese phytotoxicity: New light on an old problem. *Annals of Botany*, 116(3), 313–319.
- Fiedurek, J., Trytek, M. (2016). *Wpływ stresu kwasowego i osmotycznego na wytwarzanie metabolitów przy użyciu mikroorganizmów*.
- Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., i Jackson, R. B. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4117–4120.
- Fodor, F. (2002). Physiological Responses of Vascular Plants to Heavy Metals. W M. N. V. Prasad K. Strzałka (Red.), *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants* (s. 149–177). Springer Netherlands.
- Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., De Hoff, P. L., Hirsch, A. M. (2006). Investigations of Rhizobium biofilm formation. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), 195–206.
- Galek, R., Kozak, B., Zalewski, D., Sawicka-Sienkiewicz, E., Adamus, A., i Kiełkowska, A. (2019). Badania nad gametyczną embriogenezą u *Lupinus angustifolius* L. —Indukcja haploidów i analiza genetycznego podłoża tego procesu. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 286, 347–355.
- Gano-Cohen, K. A., Stokes, P. J., Blanton, M. A., Wendlandt, C. E., Hollowell, A. C., Regus, J. U., Kim, D., Patel, S., Pahua, V. J., i Sachs, J. L. (2016). Nonnodulating Bradyrhizobium spp. Modulate the Benefits of Legume-Rhizobium Mutualism. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5259–5268.

- Gerland, P., Raftery, A. E., Ševčíková, H., Li, N., Gu, D., Spoorenberg, T., Alkema, L., Fosdick, B. K., Chunn, J., Lalic, N., Bay, G., Buettner, T., Heilig, G. K., i Wilmoth, J. (2014). World population stabilization unlikely this century. *Science*, 346(6206), 234–237.
- Giller, K. E., Witter, E., i McGrath, S. P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(10–11), 1389–1414.
- Glickmann, E., i Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 793–796.
- Guezennec, J. (2002). Deep-sea hydrothermal vents: A new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 204–208.
- Guo, X., Zhao, G., Zhang, G., He, Q., Wei, Z., Zheng, W., Qian, T., i Wu, Q. (2018). Effect of mixed chelators of EDTA, GLDA, and citric acid on bioavailability of residual heavy metals in soils and soil properties. *Chemosphere*, 209, 776–782.
- Haddad, S. A., Tabatabai, M. A., Abdel-Moneim, A.-M. A., Loynachan, T. E. (2015). Inhibition of Nodulation and Nitrogen Nutrition of Leguminous Crops by Selected Heavy Metals. *Air, Soil and Water Research*, 8, ASWR.S21098.
- Hao, X., Taghavi, S., Xie, P., Orbach, M. J., Alwathnani, H. A., Rensing, C., Wei, G. (2014). Phytoremediation of heavy and transition metals aided by legume-rhizobia symbiosis. *International Journal of Phytoremediation*, 16(2), 179–202. h
- Harish, S, S., D, K., Sg, V. (2008). A new chlorophycean nickel hyperaccumulator. *Bioresource Technology*, 99(9).
- Hasan, H. (2008). *Manganese*. The Rosen Publishing Group, Inc.
- He, M., He, C.-Q., Ding, N.-Z. (2018). Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Herlina, L., Pukan, K. K., Mustikaningtyas, D. (2017). The endophytic bacteria producing IAA (Indole Acetic Acid) in *Arachis hypogaea*. *Cell Biology and Development*, 1(1), 31–35.
- Hirsch, P. R., Jones, M. J., McGrath, S. P., Giller, K. E. (1993). Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of rhizobium leguminosarum biovar trifolii populations. *Soil Biology and Biochemistry*, 25(11), 1485–1490.

- Hungria, M., Vargas, M. A. (2000). Environmental Factors Affecting N<sub>2</sub> Fixation in Grain Legumes in the Tropics, with an Emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65, 151–164.
- Hussain, A., Shah, S. T., Rahman, H., Irshad, M., Iqbal, A. (2015). Effect of IAA on in vitro growth and colonization of Nostoc in plant roots. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Hussain, M. B., Ali, S., Azam, A., Hina, S., Farooq, M. A., Ali, B., Bharwana, S. A., Gill, M. B. (2013). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to nickel stress: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 8(17), 1596–1602.
- Hussein, K. A., Joo, J. H. (2014). Potential of Siderophore Production by Bacteria Isolated from Heavy Metal: Polluted and Rhizosphere Soils. *Current Microbiology*, 68(6), 717–723.
- Iordachescu, M., Imai, R., Iordachescu, M., Imai, R. (2011). Trehalose and Abiotic Stress in Biological Systems. W *Abiotic Stress in Plants—Mechanisms and Adaptations*. IntechOpen.
- Jach, M. E., Sajnaga, E., Ziaja, M. (2022). Utilization of Legume-Nodule Bacterial Symbiosis in Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils. *Biology*, 11(5), 676.
- Janczarek, M., Skorupska, A. (2007). The Rhizobium leguminosarum bv. trifolii RosR: Transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 20(7), 867–881.
- Janczarek, M., Skorupska, A. (2011). Modulation of rosR Expression and Exopolysaccharide Production in Rhizobium leguminosarum bv. Trifolii by Phosphate and Clover Root Exudates. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(6), 4132–4155.
- Jarosławiecka, A. K., Piotrowska-Seget, Z. (2022). The Effect of Heavy Metals on Microbial Communities in Industrial Soil in the Area of Piekary Śląskie and Bukowno (Poland). *Microbiology Research*, 13(3), Article 3.
- Johnstone, T. C., Nolan, E. M. (2015). Beyond iron: Non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Transactions*, 44(14), 6320–6339.
- Juttukonda, L. J., Skaar, E. P. (2015). Manganese homeostasis and utilization in pathogenic bacteria: Manganese utilization and bacterial virulence. *Molecular Microbiology*, 97(2), 216–228.
- Kalantar, M. (2018). The Importance of Flavonoids in Ruminant Nutrition. *Archives of Animal Husbandry Dairy Science*, 1(1), 1–4.

- Kaur, N., Dey, P. (2023). Bacterial exopolysaccharides as emerging bioactive macromolecules: From fundamentals to applications. *Research in Microbiology*, 174(4), 104024.
- Kehl-Fie, T. E., Skaar, E. P. (2010). Nutritional immunity beyond iron: A role for manganese and zinc. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(2), 218–224.
- Kopittke, P. M., Menzies, N. W., de Jonge, M. D., McKenna, B. A., Donner, E., Webb, R. I., Paterson, D. J., Howard, D. L., Ryan, C. G., Glover, C. J., Scheckel, K. G., Lombi, E. (2011). In Situ Distribution and Speciation of Toxic Copper, Nickel, and Zinc in Hydrated Roots of Cowpea. *Plant Physiology*, 156(2), 663–673.
- Kopycińska, M. A. (2020). Rola egzopolisacharydu w adaptacji bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* do warunków stresowych wywołanych obecnością jonów cynku.
- Ladomersky, E., Petris, M. J. (2015). Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics*, 7(6), 957–964.
- Law, N. A., Caudle, M. T., Pecoraro, V. L. (1998). Manganese Redox Enzymes and Model Systems: Properties, Structures, and Reactivity. W A. G. Sykes (Red.), *Advances in Inorganic Chemistry* (T. 46, s. 305–440). Academic Press.
- Lebrazi, S., Fikri-Benbrahim, K. (2018). Rhizobium-Legume Symbioses: Heavy Metal Effects and Principal Approaches for Bioremediation of Contaminated Soil. W R. S. Meena, A. Das, G. S. Yadav, R. Lal (Red.), *Legumes for Soil Health and Sustainable Management* (s. 205–233). Springer.
- Leonard, L. T. (1943). A Simple Assembly for Use in the Testing of Cultures of Rhizobia. *Journal of Bacteriology*, 45(6), 523–527.
- Leonel, T., Moretto, C., Castellane, T. C., Costa, P., Lemos, E. (2019). The Influence of Cooper and Chromium Ions on the Production of Exopolysaccharide and Polyhydroxybutyrate by *Rhizobium tropici* LBMP-C01. *Journal of Polymers and the Environment*, 27.
- Lesueur, D., Carro Del Rio, M., Diem, H. G. (1995). *Modification of the growth and the competitiveness of a Bradyrhizobium strain obtained through affecting its siderophore producing ability*. Iron Nutrition in Soils and Plants; Kluwer Academic Publishers.
- Li, X., Meng, D., Li, J., Yin, H., Liu, H., Liu, X., Cheng, C., Xiao, Y., Liu, Z., Yan, M. (2017). Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 231, 908–917.

- Liang, J., Zhang, M., Lu, M., Li, Z., Shen, X., Chou, M., Wei, G. (2016). Functional characterization of a *csoR-cueA* divergon in *Bradyrhizobium liaoningense* CCNWSX0360, involved in copper, zinc and cadmium cotolerance. *Scientific Reports*, 6(1), 35155.
- Liao, M., Luo, Y.-K., Zhao, X.-M., Huang, C.-Y. (2005). Toxicity of cadmium to soil microbial biomass and its activity: Effect of incubation time on Cd ecological dose in a paddy soil. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 6(5), 324–330.
- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., Yin, H. (2021). The Flavonoid Biosynthesis Network in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), Article 23.
- Lobo, L. L. B., de Andrade da Silva, M. S. R., Castellane, T. C. L., Carvalho, R. F., Rigobelo, E. C. (2022). Effect of Indole-3-Acetic Acid on Tomato Plant Growth. *Microorganisms*, 10(11), Article 11.
- Lucas, M. M., Stoddard, F. L., Annicchiarico, P., Frías, J., Martínez-Villaluenga, C., Sussmann, D., Duranti, M., Seger, A., Zander, P. M., Pueyo, J. J. (2015). The future of lupin as a protein crop in Europe. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Luo, S., Chen, L., Chen, J., Xiao, X., Xu, T., Wan, Y., Rao, C., Liu, C., Liu, Y., Lai, C., Zeng, G. (2011). Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. *Chemosphere*, 85(7), 1130–1138.
- Macomber, L., Hausinger, R. (2011). Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. *Metallomics : integrated biometal science*, 3, 1153–1162.
- Malhotra, M., Srivastava, S. (2009). Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 73–80.
- Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., Vidal-Valverde, C. (2006). Functional lupin seeds (*Lupinus albus* L. and *Lupinus luteus* L.) after extraction of  $\alpha$ -galactosides. *Food Chemistry*, 98(2), 291–299.
- Mathivanan, K., Chandirika, J. U., Mathimani, T., Rajaram, R., Annadurai, G., Yin, H. (2021). Production and functionality of exopolysaccharides in bacteria exposed to a toxic metal environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111567.
- McLaughlin, M. J., Parker, D. R., Clarke, J. M. (1999). Metals and micronutrients – food safety issues. *Field Crops Research*, 60(1), 143–163.
- McSteen, P. (2010). Auxin and Monocot Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3).

- Mizutani, M., Ohta, D., Sato, R. (1997). Isolation of a cDNA and a Genomic Clone Encoding Cinnamate 4-Hydroxylase from Arabidopsis and Its Expression Manner in Planta. *Plant Physiology*, 113(3), 755–763.
- Mohammadi, K., Sohrabi, Y., Gholamreza, H., Khalesro, S., Majidi, M. (2012). Effective factors on biological nitrogen fixation. *African Journal of Agricultural Research*, 7(12).
- Mohite, B. V., Koli, S. H., Patil, S. V. (2018). Heavy Metal Stress and Its Consequences on Exopolysaccharide (EPS)-Producing *Pantoea agglomerans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186(1), 199–216.
- Moppert, X., Le Costaouec, T., Raguenes, G., Courtois, A., Simon-Colin, C., Crassous, P., Costa, B., Guezennec, J. (2009). Investigations into the uptake of copper, iron and selenium by a highly sulphated bacterial exopolysaccharide isolated from microbial mats. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(4), 599–604.
- Morrow, H. (2010). Cadmium and Cadmium Alloys. W *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (s. 1–36). John Wiley & Sons, Ltd.
- Nagrle, D. T., Chaurasia, A., Kumar, S., Gawande, S. P., Hiremani, N. S., Shankar, R., Gokte-Narkhedkar, N., Renu, null, Prasad, Y. G. (2023). PGPR: The treasure of multifarious beneficial microorganisms for nutrient mobilization, pest biocontrol and plant growth promotion in field crops. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 39(4), 100.
- Narożna, D. (2014). Analiza fragmentów genomu łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.) zawierających sekwencje kodujące syntazę chalkonową. *Rozprawy Naukowe. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*, 473.
- Narożna, D., Książkiewicz, M., Przysiecka, Ł., Króliczak, J., Wolko, B., Naganowska, B., Mądrzak, C. J. (2017). Legume isoflavone synthase genes have evolved by whole-genome and local duplications yielding transcriptionally active paralogs. *Plant Science*, 264, 149–167.
- Narożna, D., Mądrzak, C. J. (1999). *Geny roślinne kodujące niektóre enzymy szlaku metabolizmu fenylopropanoidów*.
- Naveed, M., Mustafa, A., Majeed, S., Naseem, Z., Saeed, Q., Khan, A., Nawaz, A., Baig, K. S., Chen, J.-T. (2020). Enhancing Cadmium Tolerance and Pea Plant Health through *Enterobacter* sp. MN17 Inoculation Together with Biochar and Gravel Sand. *Plants*, 9(4), 530.

- Nelson, M. S., Sadowsky, M. J. (2015). Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Frontiers in Plant Science*, 6, 491.
- Newton, W. E. (2015). Recent Advances in Understanding Nitrogenases and How They Work. W F. J. de Bruijn (Red.), *Biological Nitrogen Fixation* (s. 5–20). John Wiley Sons, Inc.
- Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), 313–339.
- Nitrogen fixation / Definition, Process, Examples, Types, Facts / Britannica.*
- Okazaki, S., Noisangiam, R., Okubo, T., Kaneko, T., Oshima, K., Hattori, M., Teamtisong, K., Songwattana, P., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Saeki, K., Sato, S., Uchiumi, T., Minamisawa, K., Teaumroong, N. (2015). Genome Analysis of a Novel Bradyrhizobium sp. DOA9 Carrying a Symbiotic Plasmid. *PLOS ONE*, 10(2), e0117392.
- Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E. (2019). A Genomotaxonomy View of the Bradyrhizobium Genus. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Oumenskou, H., El Baghdadi, M., Barakat, A., Aquit, M., Ennaji, W., Karroum, L. A., Aadraoui, M. (2018). Assessment of the heavy metal contamination using GIS-based approach and pollution indices in agricultural soils from Beni Amir irrigated perimeter, Tadla plain, Morocco. *Arabian Journal of Geosciences*, 11(22), 1–18.
- Ow, D. W. (1993). Phytochelatin-mediated cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 29(4), 213–219.
- Pan, J., Yu, L. (2011). Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure. *Ecological Engineering*, 37(11), 1889–1894.
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., Zhang, Y. (2008). Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 417–441.
- Pawlak-Sprada, S., Arasimowicz-Jelonek, M., Podgórska, M., Deckert, J. (2011). Activation of phenylpropanoid pathway in legume plants exposed to heavy metals. Part I. Effects of cadmium and lead on phenylalanine ammonia-lyase gene expression, enzyme activity and lignin content. *Acta Biochimica Polonica*, 58(2), Article 2.
- Pereira, L. B., Vicentini, R., Ottoboni, L. M. M. (2014). Changes in the bacterial community of soil from a neutral mine drainage channel. *PloS One*, 9(5), e96605.
- Pociejowska, M., Natywa, M., Gałązka, A. (2014). *Stymulacja wzrostu roślin przez bakterie PGPR.*

- Pudelko, K., Narożna, D., Króliczak, J., Kidaj, D., Wielbo, J., Skorupska, A., Mądrzak, C. (2017). *Czynniki NOD jako potencjalne stymulatory*.
- Purchase, D., Miles, R. J., Young, T. W. K. (1997). Cadmium uptake and nitrogen fixing ability in heavy-metal-resistant laboratory and field strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *FEMS Microbiology Ecology*, 22(1), 85–93.
- Rademacher, C., Masepohl, B. (2012). Copper-responsive gene regulation in bacteria. *Microbiology*, 158(10), 2451–2464.
- Salinitro, M., Mattarello, G., Guardigli, G., Odajiu, M., Tassoni, A. (2021). Induction of hormesis in plants by urban trace metal pollution. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1.
- Salt, D. E., Kato, N., Kramer, U., Smith, R. D., Raskin, I. (2000). The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Phytoremediation of contaminated soil and water*, 189–200.
- Sandhya, V., Ali, Sk. Z. (2015). The production of exopolysaccharide by *Pseudomonas putida* GAP-P45 under various abiotic stress conditions and its role in soil aggregation. *Microbiology*, 84(4), 512–519.
- Santamaría, M., Díaz-Marrero, A. R., Hernández, J., Gutiérrez-Navarro, A. M., Corzo, J. (2003). Effect of thorium on the growth and capsule morphology of *Bradyrhizobium*. *Environmental Microbiology*, 5(10), 916–924.
- Sazykin, I., Khmelevtsova, L., Azhogina, T., Sazykina, M. (2023). Heavy Metals Influence on the Bacterial Community of Soils: A Review. *Agriculture*, 13(3), Article 3.
- Seneviratne, M., Weerasundara, L., Ok, Y. S., Rinklebe, J., Vithanage, M. (2017). Phytotoxicity attenuation in *Vigna radiata* under heavy metal stress at the presence of biochar and N fixing bacteria. *Journal of Environmental Management*, 186, 293–300.
- Seregin, I. V., Kozhevnikova, A. D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2), 257–277.
- Shahzad, B., Tanveer, M., Rehman, A., Cheema, S. A., Fahad, S., Rehman, S., Sharma, A. (2018). Nickel; whether toxic or essential for plants and environment—A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 641–651.
- Shi, P., Xing, Z., Zhang, Y., Chai, T. (2017). Effect of heavy-metal on synthesis of siderophores by *Pseudomonas aeruginosa* ZGKD3. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 52(1), 012103.
- Shomali, A., Das, S., Arif, N., Sarraf, M., Zahra, N., Yadav, V., Aliniaiefard, S., Chauhan, D. K., Hasanuzzaman, M. (2022). Diverse Physiological Roles of Flavonoids in Plant Environmental Stress Responses and Tolerance. *Plants*, 11(22), 3158.

- Silambarasan, S., Logeswari, P., Cornejo, P., Kannan, V. R. (2019). Evaluation of the production of exopolysaccharide by plant growth promoting yeast *Rhodotorula* sp. Strain CAH2 under abiotic stress conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 55–62.
- Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., Gupta, R. (2011). Heavy metals and living systems: An overview. *Indian Journal of Pharmacology*, 43(3), 246–253.
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., Prasad, S. M. (2016). Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Slaveykova, V., N, P., K, D., D, T. (2010). Role of extracellular compounds in Cd-sequestration relative to Cd uptake by bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 158(8).
- Stepkowski, T., Żak, M., Moulin, L., Króliczak, J., Golińska, B., Narożna, D., Safronova, V. I., Małdrzak, C. J. (2011). *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(5), 368–375.
- Sun, H., Shao, C., Jin, Q., Li, M., Zhang, Z., Liang, H., Lei, H., Qian, J., Zhang, Y. (2022). Effects of cadmium contamination on bacterial and fungal communities in *Panax ginseng*-growing soil. *BMC Microbiology*, 22(1), 77.
- Tan, Z., Hurek, T., Vinuesa, P., Müller, P., Ladha, J. K., Reinhold-Hurek, B. (2001). Specific Detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* Strains Colonizing Rice (*Oryza sativa*) Roots by 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer-Targeted PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3655–3664.
- Vesper, S. J., Craig Weidensaul, T. (1978). Effects of cadmium, nickel, copper, and zinc on nitrogen fixation by soybeans. *Water, Air, and Soil Pollution*, 9(4), 413–422.
- Wang, L., Xia, X., Zhang, W., Wang, J., Zhu, L., Wang, J., Wei, Z., Ahmad, Z. (2019). Separate and joint eco-toxicological effects of sulfadimidine and copper on soil microbial biomasses and ammonification microorganisms abundances. *Chemosphere*, 228, 556–564.
- Wani, P. A., Khan, M. S., Zaidi, A. (2007). Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram plants. *Chemosphere*, 70(1), 36–45.
- Waters, L. S. (2020). Bacterial manganese sensing and homeostasis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 55, 96–102.

- Xiong, L., Zhu, J.-K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 131–139.
- Yadav, B. S., Singh, S., Srivastava, S., Singh, N. K., Mani, A. (2019). Whole transcriptome expression profiling and biological network analysis of chickpea during heavy metal stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 28(3), 345–352.
- Zaidi, A., Wani, P. A., Khan, M. S. (Ed.). (2012). *Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation*. Springer Vienna.
- Zeer-Wanklyn, C. J., Zamble, D. B. (2017). Microbial nickel: Cellular uptake and delivery to enzyme centers. *Current Opinion in Chemical Biology*, 37, 80–88.
- Zhao, J., Lu, Z., Wang, L., Jin, B. (2020). Plant Responses to Heat Stress: Physiology, Transcription, Noncoding RNAs, and Epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 117.
- Zhou, J., Bruns, M. A., Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 316–322.

## 9. Spis rycin

Ryc. 1. Obieg azotu w przyrodzie.....	12
Ryc. 2. Model wstęgowy białka nitrogenazy (A) i struktura kofaktora żelazowo- molibdenowego (FeMoco).....	14
Ryc. 3. Proces powstawania brodawki korzeniowej.....	31
Ryc. 4. Różne stresy abiotyczne i roślinne mechanizmy obronne wobec nich .....	35
Ryc. 5. Szlak biosyntezy fenylopropanoidów.....	39
Ryc. 6. Wpływ metali ciężkich na rośliny oraz symbiotyczne bakterie glebowe.....	42
Ryc. 7. Mechanizmy warunkujące tolerancję metali ciężkich przez mikroorganizmy.....	43
Ryc. 8. Porównanie sekwencji genu referencyjnego recA szczepów UPP 133, UPP 213, UPP 242 oraz UPP 331 wraz z zaznaczonymi miejscami przyłączenia starterów użytych do jego amplifikacji .....	60
Ryc. 9. Wzrost i przeżywalność szczepów <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133, 213, 242 i 331 w pożywkach płynnych TY zawierających różne stężenia Cu, Ni, Mn i Cd.....	66
Ryc. 10. Wzrost szczepu <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133 na pożywkach stałych TY zawierających różne stężenia jonów Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> i Cd <sup>2+</sup> .....	67
Ryc. 11. Wzrost szczepu <i>Bradyrhizobium</i> UPP 213 na pożywkach stałych TY zawierających różne stężenia jonów Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> i Cd <sup>2+</sup> .....	68
Ryc. 12. Wzrost szczepu <i>Bradyrhizobium</i> UPP 242 na pożywkach stałych TY zawierających różne stężenia jonów Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> i Cd <sup>2+</sup> .....	69
Ryc. 13. Wzrost szczepu <i>Bradyrhizobium</i> UPP 331 na pożywkach stałych TY zawierających różne stężenia jonów Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> i Cd <sup>2+</sup> .....	70
Ryc. 14. Wszystkie bakterie zasiedlające próbki gleby .....	72
Ryc. 15. $\alpha$ - <i>Proteobakteria</i> zasiedlające próbki gleby .....	74
Ryc. 16. $\beta$ - <i>Proteobakteria</i> zasiedlające próbki gleby .....	75
Ryc. 17. <i>Bacteroides</i> zasiedlające próbki gleby.....	76
Ryc. 18. <i>Actinobacteria</i> zasiedlające próbki gleby.....	77
Ryc. 19. <i>Firmicutes</i> zasiedlające próbki gleby .....	78
Ryc. 20. <i>Bradyrhizobium</i> zasiedlające próbki gleby.....	79
Ryc. 21. Synteza IAA przez szczepy <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133, 213,242 i 331 w pożywkach płynnych TY zawierających różne stężenia jonów Cu <sup>2+</sup> .....	82

Ryc. 22. Synteza IAA przez szczepy <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133, 213,242 I 331 w pożywkach płynnych TY zawierających różne stężenia jonów Ni <sup>2+</sup> .....	83
Ryc. 23. Synteza IAA przez szczepy <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133, 213,242 I 331 w pożywkach płynnych TY zawierających różne stężenia jonów Mn <sup>2+</sup> .....	84
Ryc. 24. Synteza IAA przez szczepy <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133, 213,242 I 331 w pożywkach płynnych TY zawierających różne stężenia jonów Cd <sup>2+</sup> .....	85
Ryc. 25. Synteza EPS przez szczepy <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133, 213,242 I 331 w pożywkach płynnych TY zawierających różne stężenia Cu, Ni, Mn i Cd .....	89
Ryc. 26. Biosynteza sideroforów na stałych pożywkach TY przez szczepy UPP 133, UPP 213, UPP 242, UPP 331, w obecności jonów miedzi.....	92
Ryc. 27. Biosynteza sideroforów na stałych pożywkach TY przez szczepy UPP 133, UPP 213, UPP 242, UPP 331, w obecności jonów niklu.....	93
Ryc. 28. Biosynteza sideroforów na stałych pożywkach TY przez szczepy UPP 133, UPP 213, UPP 242, UPP 331 w obecności jonów manganu.....	94
Ryc. 29. Biosynteza sideroforów na stałych pożywkach TY przez szczepy UPP 133, UPP 213, UPP 242 UPP 331 w obecności jonów kadmu .....	95
Ryc. 30. Biosynteza sideroforów przez szczepy <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133, 213,242 I 331 w pożywkach płynnych TY zawierających różne stężenia jonów Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> i Cd <sup>2+</sup> .....	96
Ryc. 31. Morfologia komórek szczepu UPP 133 w warunkach kontrolnych oraz w obecności jonów miedzi w stężeniu 0,5 mM, jonów niklu w stężeniu 0,5 mM, jonów manganu w stężeniu 5 mM oraz jonów kadmu w stężeniu 0,5 mM.....	99
Ryc. 32. Morfologia komórek szczepu UPP 213 w warunkach kontrolnych oraz w obecności jonów miedzi w stężeniu 0,5 mM, jonów niklu w stężeniu 0,5 mM, jonów manganu w stężeniu 5 mM oraz jonów kadmu w stężeniu 0,5 mM.....	100
Ryc. 33. Morfologia komórek szczepu UPP 242 w warunkach kontrolnych oraz w obecności jonów miedzi w stężeniu 0,5 mM, jonów niklu w stężeniu 0,5 mM, jonów manganu w stężeniu 5 mM oraz jonów kadmu w stężeniu 0,5 mM .....	101
Ryc. 34. Morfologia komórek szczepu UPP 331 w warunkach kontrolnych oraz w obecności jonów miedzi w stężeniu 0,5 mM, jonów niklu w stężeniu 0,5 mM, jonów manganu w stężeniu 5 mM oraz jonów kadmu w stężeniu 0,5 mM .....	102
Ryc. 35. Analiza ekspresji genu kodującego <i>treS</i> w szczepach <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133 , UPP 213 , UPP 242 i UPP 331 .....	106
Ryc. 36. Aanaliza ekspresji genu <i>fegA</i> w szczepach <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133 (A), UPP 213 (B), UPP 242 (C) i UPP 331 (D).....	107

Ryc. 37. Analiza ekspresji genu <i>exoR</i> w szczepach <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133 (A), UPP 213 (B), UPP 242 (C) i UPP 331 (D).....	110
Ryc. 38. Analiza ekspresji genu <i>cueA</i> w szczepach <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133 (A), UPP 213 (B), UPP 242 (C) i UPP 331 (D).....	113
Ryc. 39. Analiza ekspresji genu <i>nodA</i> w szczepach <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133 (A), UPP 213 (B), UPP 242 (C) i UPP 331 (D).....	115
Ryc. 40. Kiełkowanie nasion łubinu wąskolistnego ( <i>Lupinus angustifolius</i> ) w obecności jonów Cu <sup>2+</sup> .....	117
Ryc. 41. Kiełkowanie nasion łubinu wąskolistnego ( <i>Lupinus angustifolius</i> ) w obecności jonów Ni <sup>2+</sup> .....	118
Ryc. 42. Kiełkowanie nasion łubinu wąskolistnego ( <i>Lupinus angustifolius</i> ) w obecności jonów Mn <sup>2+</sup> .....	118
Ryc. 43. Kiełkowanie nasion łubinu wąskolistnego ( <i>Lupinus angustifolius</i> ) w obecności jonów Cd <sup>2+</sup> .....	119
Ryc. 44. Liczba brodawek korzeniowych w łubinie wąskolistnym inokulowanym szczepami <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133 (A), 213 (B), 242 (C) i 331 (D).....	121
Ryc. 45. Świeża masa korzeni łubinu wąskolistnego inokulowanego szczepami <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133 (A), 213 (B), 242 (C) i 331 (D).....	124
Ryc. 46. Systemy korzeniowe łubinu wąskolistnego inokulowanego szczepami <i>Bradyrhizobium</i> UPP 133 (A), 213 (B), 242 (C) i 331 (D).....	126
Ryc. 47. Ekspresja genów <i>PAL</i> w korzeniach łubinu wąskolistnego .....	128
Ryc. 48. Ekspresja rodzin genów <i>CHS</i> (A) i <i>IFS</i> (B) w korzeniach łubinu wąskolistnego ...	129

## 10. Spis tabel

Tabela 1. Przemysłowe źródła metali ciężkich w środowisku .....	17
Tabela 2. Skład pożywek i podłoży zastosowanych do hodowli bakterii oraz łubinu wąskolistnego.....	49
Tabela 3. Skład buforu Zhou .....	51
Tabela 4. Sekwencje starterów poszczególnych grup mikroorganizmów użytych w reakcji PCR.....	53
Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do reakcji PCR .....	54
Tabela 6. Skład odczynnika Salkovskiego .....	55
Tabela 7. Skład odczynnika do barwienia pożywek CAS (Chrom Azurol S).....	57
Tabela 8. Sekwencje starterów użytych w analizie ekspresji wybranych genów <i>Bradyrhizobium</i> .....	59
Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do reakcji qPCR .....	61