

JAK AZOTOBACTER WSPOMAGA PRODUKCJĘ ROŚLINNĄ?

IZOLACJA I OCENA BAKTERII WIĄŻĄCYCH AZOT DLA ZRÓWNOWAŻONEGO ROLNICTWA

Sabina Łukaszewicz¹, Aleksandra Kowalska¹, Agnieszka Wita¹, Paulina Worsztynowicz¹,
Roman Marecik¹, Wojciech Białas¹

¹SMP Agro sp. z o. o, Komorniki 44, 63-004 Tulce

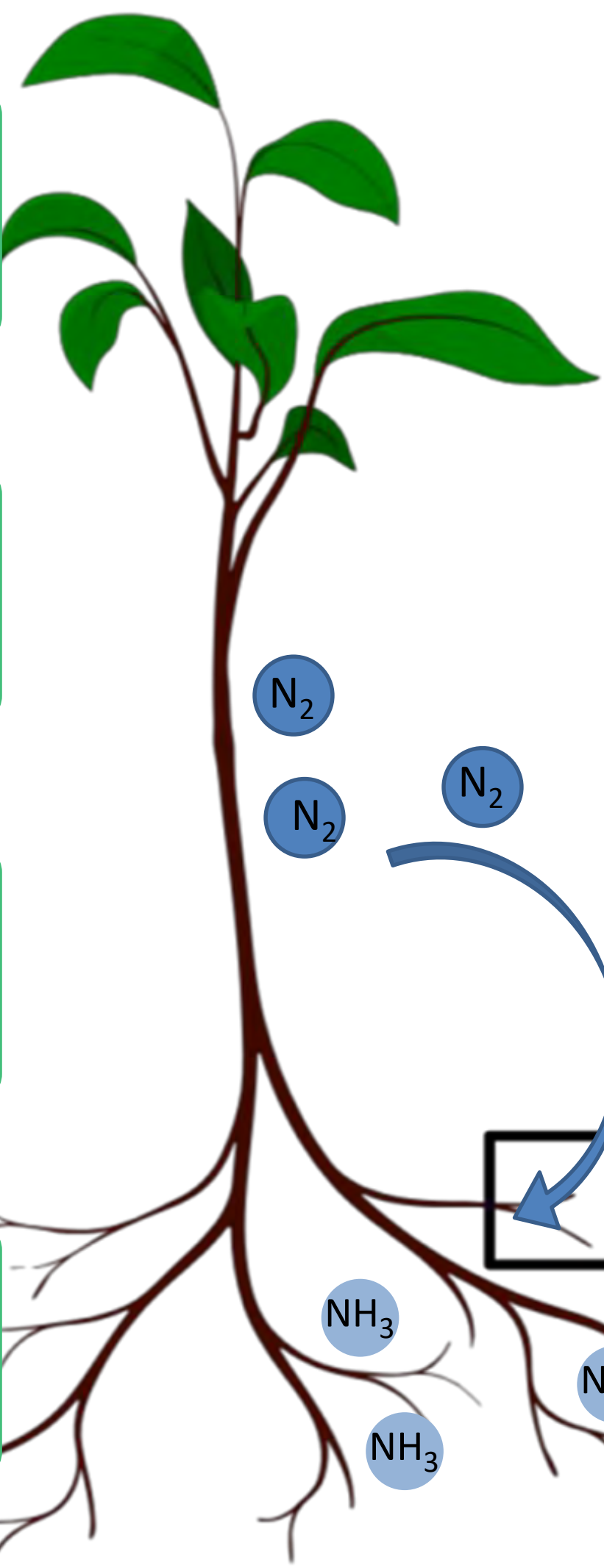
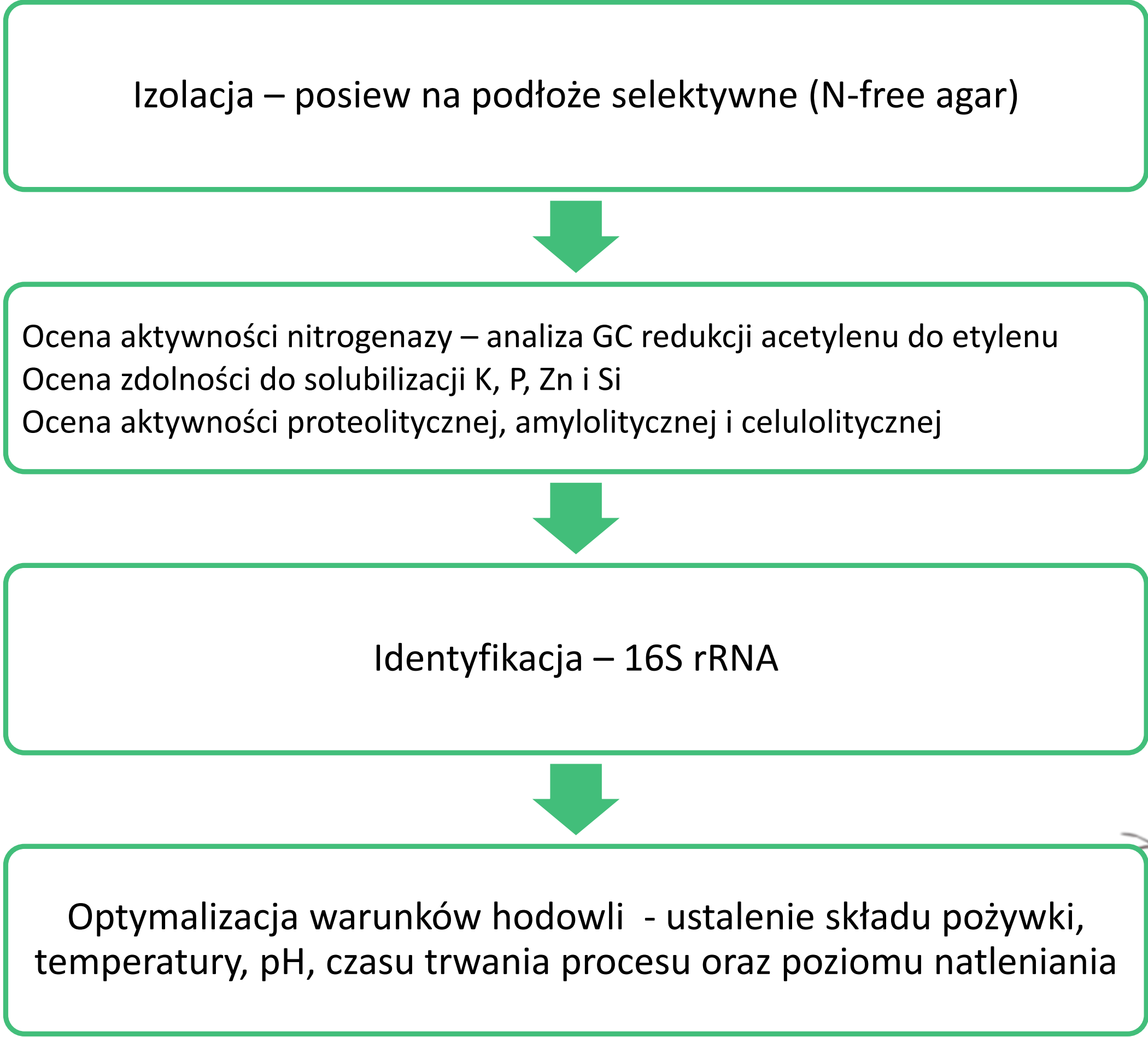
²Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dostosowanie współczesnego rolnictwa do zasad zrównoważonej produkcji i zapewnienia bezpieczeństwa żywności wymaga poszukiwania alternatyw dla tradycyjnych nawozów mineralnych. Jednym z rozwiązań jest wykorzystanie mikroorganizmów o wysokiej aktywności biologicznej w biopreparatach, które:

- wzbogacają glebę w łatwo przyswajalne składniki pokarmowe, w tym azot amonowy,
- stymulują wzrost i plonowanie roślin,
- pozwalają ograniczyć zużycie (a tym samym koszty) nawozów azotowych, takich jak mocznik czy saletra.

Celem badań była izolacja i identyfikacja bakterii z rodzaju *Azotobacter* oraz ocena ich zdolności do wiązania azotu atmosferycznego, jak również do solubilizacji potasu, fosforu, cynku i krzemu. Analizie poddano również ich aktywność enzymatyczną (proteolityczną, amylolityczną i celulolityczną). Dodatkowo przeprowadzono testy mające na celu określenia optymalnych warunków hodowli umożliwiających produkcję biopreparatów z udziałem szczepu o najwyższym potencjale do konwersji N₂ do NH₃.

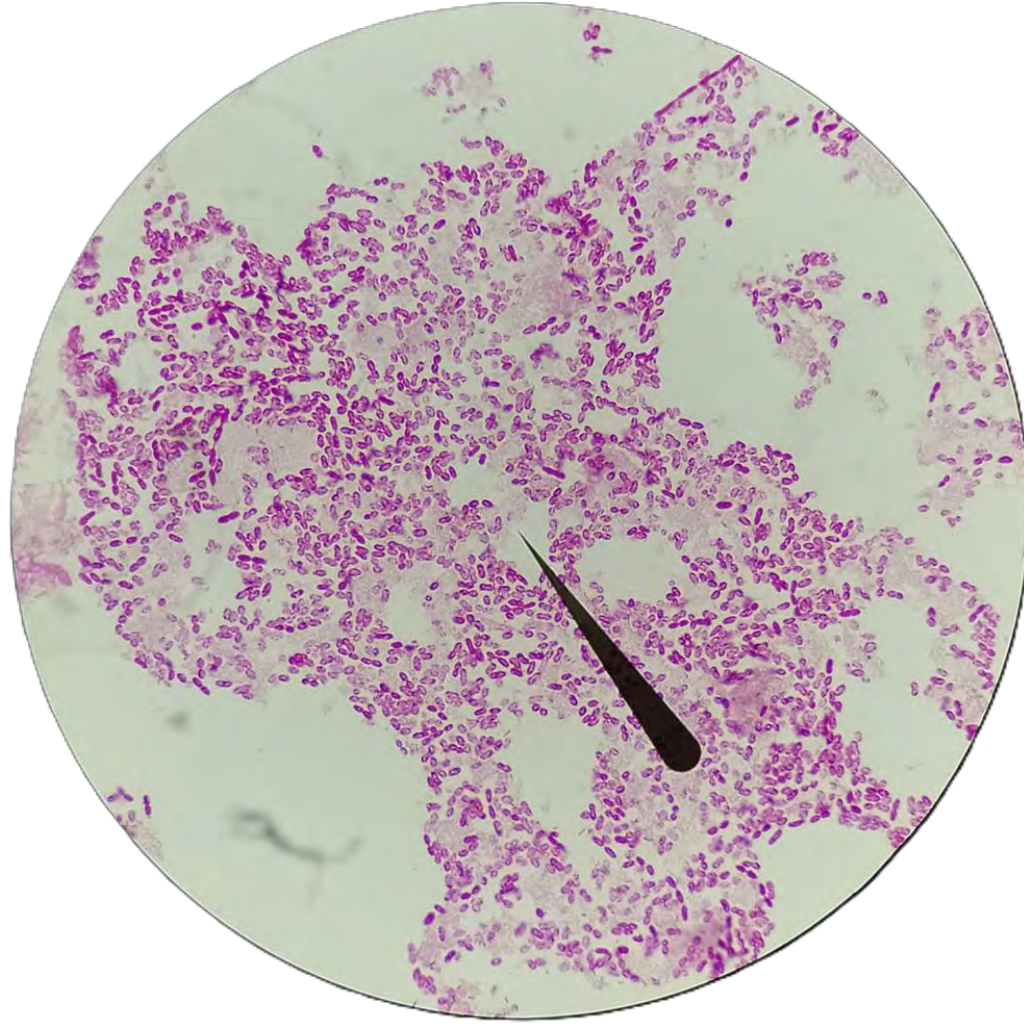
METODY



IZOLACJA W LICZBACH

- materiał do izolacji bakterii (gleba, korzenie, brodawki) pobrano z upraw grochu, bobu, wyki, lucerny, soi, łubinu, nostryka i fasolki szparagowej
- **90 izolatów** (33 izolaty z gleby, 57 izolatów z brodawek) wykazało **wzrost na podłożu stałym N-free**
- **9 szczepów *Azotobacter chroococcum* i 1 szczep *Stenotrophomonas rhizophila*** - identyfikacja wykonana w oparciu o analizę sekwencji fragmentu genu 16S rRNA

Azotobacter chroococcum – obraz makro- i mikroskopowy



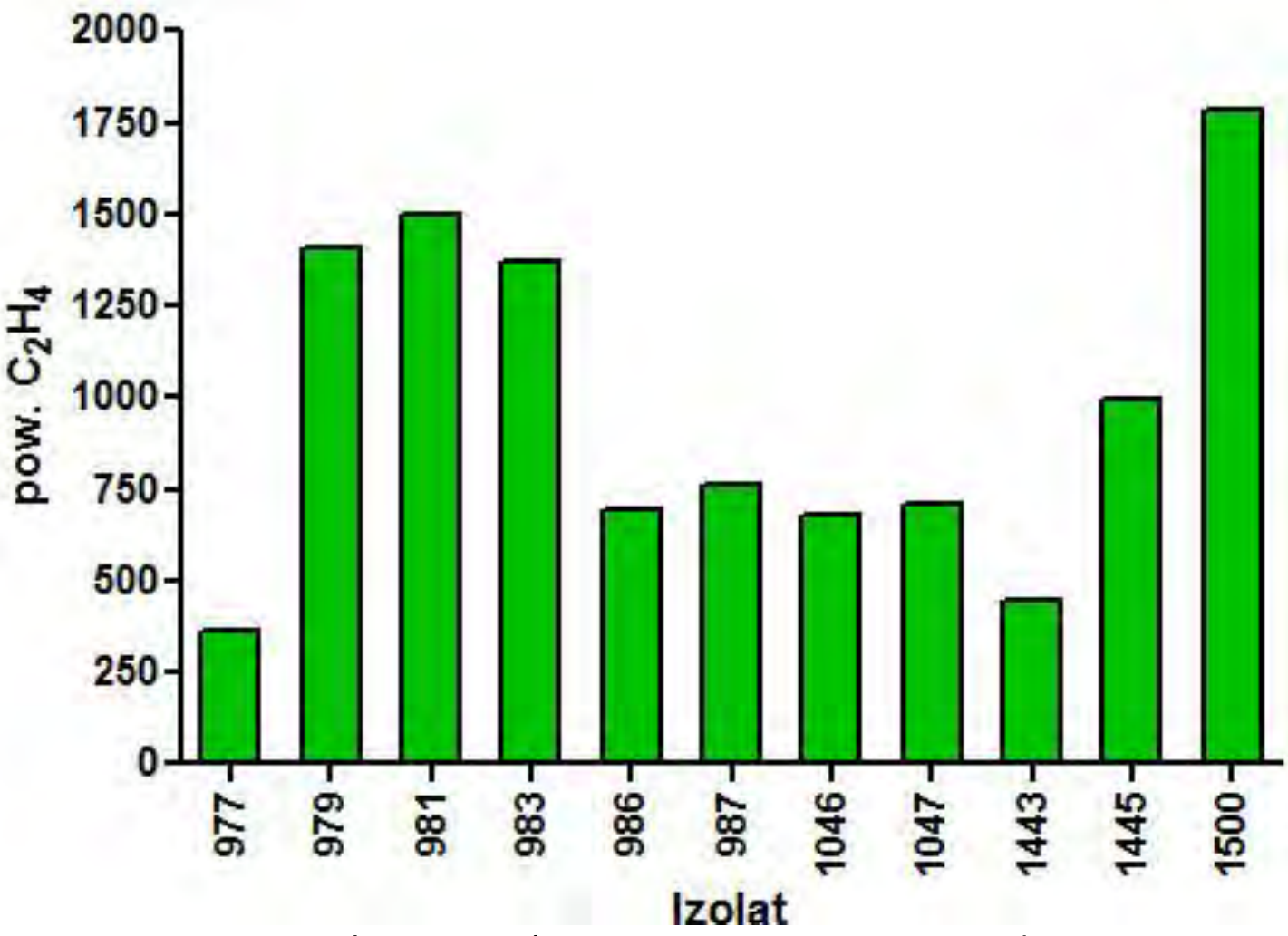
WYNIKI

OCENA ZDOLNOŚCI WYIZOLOWANYCH BAKTERII DO ENZYMATYCZNEJ KONWERSJI N₂ DO NH₃ w teście redukcji acetyleny do etylenu z zastosowaniem techniki chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID)

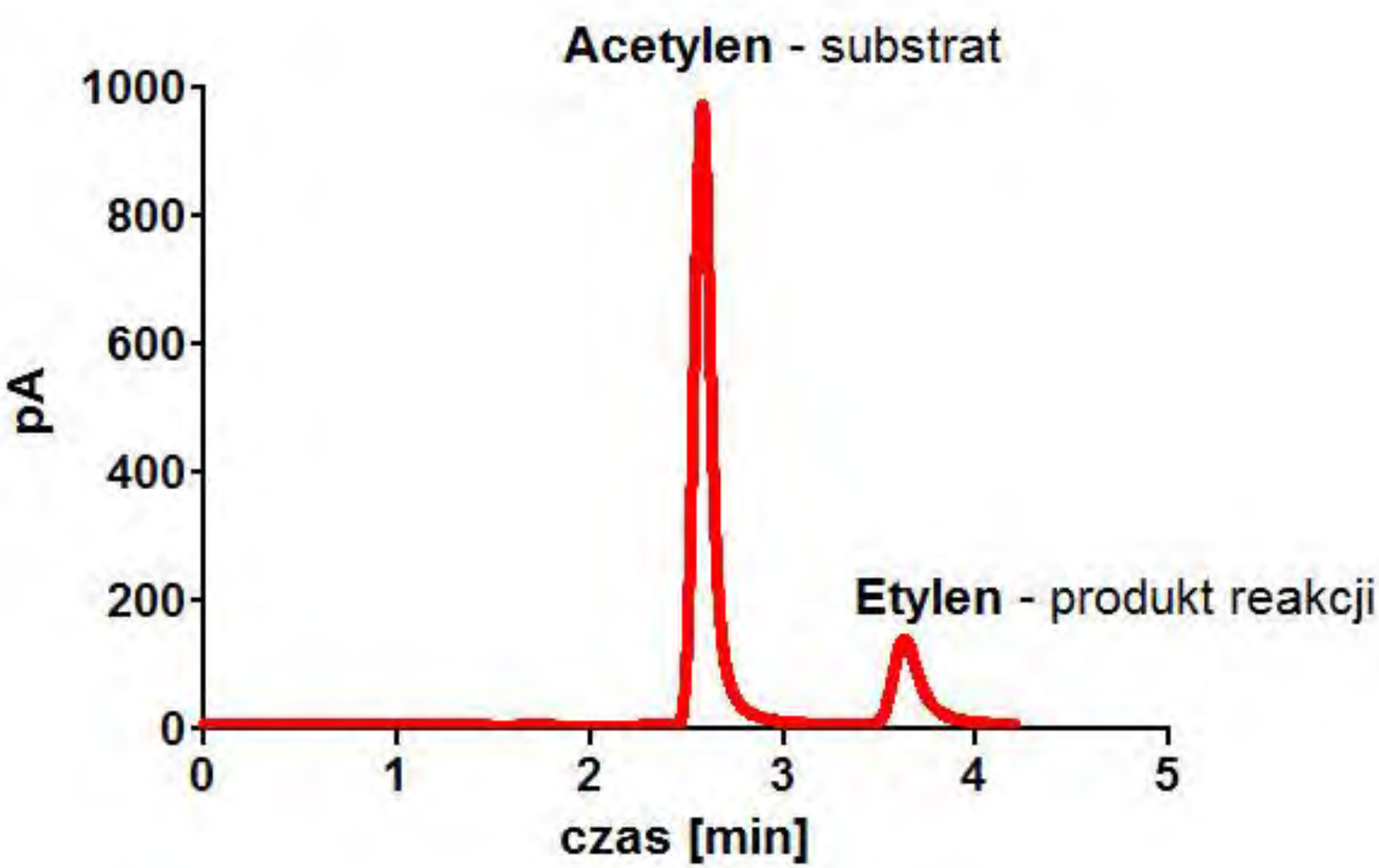
- 11 izolatów wykazało aktywność nitrogenazy (Rys. 1)
- aktywność kompleksu nitrogenazy wynosiła odpowiednio od 363 do 1750 [pow. C₂H₄] (Rys. 1, 2)

OCENA ZDOLNOŚCI DIAZOTOTROFÓW DO SOLUBILIZACJI: P, K, Si, Zn oraz OCENA AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

- 4 szczepy bakterii diazototroficznych wykazały zdolność do solubilizacji badanych pierwiastków: szczep 986 – wobec P, K i Zn, natomiast szczepy 1047, 1443, 1445 wobec P i Zn (Tab. 1)
- 2 szczepy charakteryzowały się aktywnością enzymatyczną : szczep 986 wykazał aktywność amylolityczną i celulolityczną , a szczep 1047 – aktywność hydrolityczną wobec wszystkich testowanych związków (Tab.1)



Rys. 1 Ocena aktywności nitrogenazy metodą GC-FID.



Rys. 2 Przykładowy chromatogram uzyskany podczas analizy GC-FID.

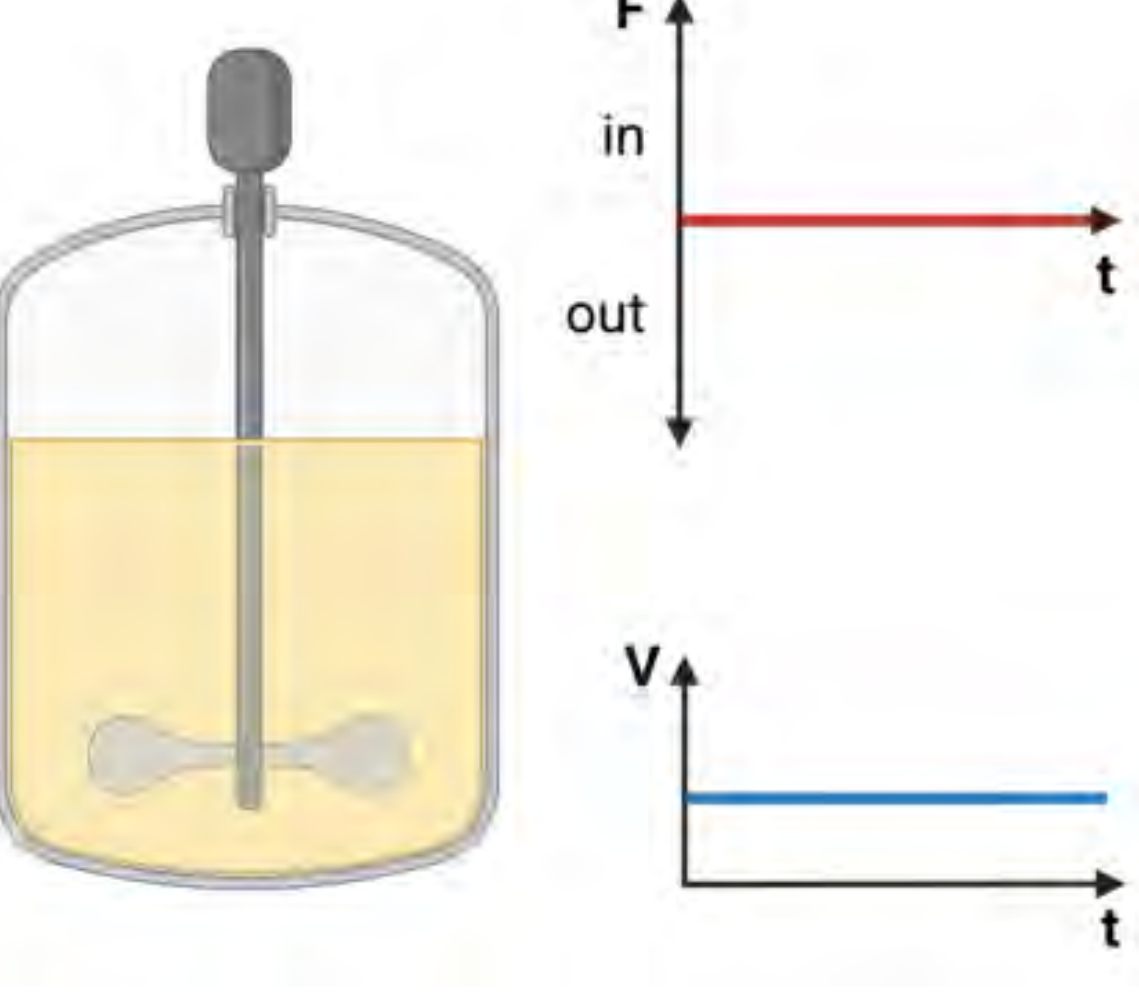
ID izolatu	Gatunek	Solubilizacja				Aktywność enzymatyczna		
		P	K	Si	Zn	amylolityczna	proteolityczna	celulolityczna
977	<i>A. chroococcum</i>	-	-	-	-	-	-	-
979	<i>A. chroococcum</i>	-	-	-	-	-	-	-
983	<i>A. chroococcum</i>	-	-	-	-	-	-	-
986	<i>S. rhizophila</i>	+	+	-	+	+	-	+
987	<i>A. chroococcum</i>	-	-	-	-	-	-	-
1046	<i>A. chroococcum</i>	-	-	-	-	-	-	-
1047	<i>A. chroococcum</i>	+	-	-	+	+	+	+
1443	<i>A. chroococcum</i>	+	-	-	+	-	-	-
1445	<i>A. chroococcum</i>	+	-	-	+	-	-	-
1500	<i>A. chroococcum</i>	-	-	-	-	-	-	-

Tab.1 Ocena zdolności bakterii diazototroficznych do solubilizacji P, K, Si i Zn oraz analiza ich aktywności enzymatycznej.

OPTYMALIZACJA SKŁADU POŻYWKI STOSOWANEJ DO NAMNAŻANIA WYIZOLOWANYCH SZCZEPÓW ORAZ WARUNKÓW ICH HODOWLI W BIOREAKTORACH

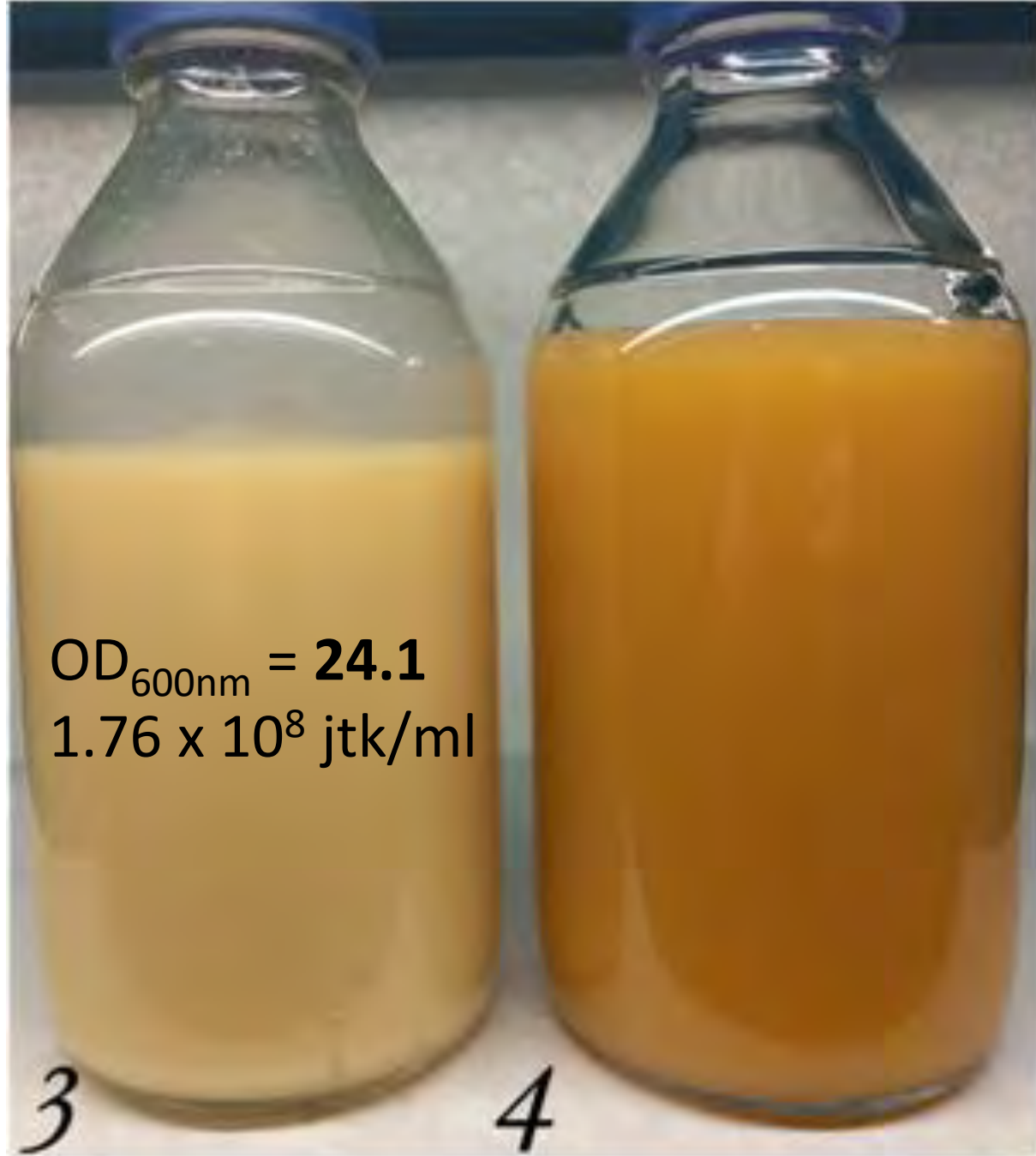
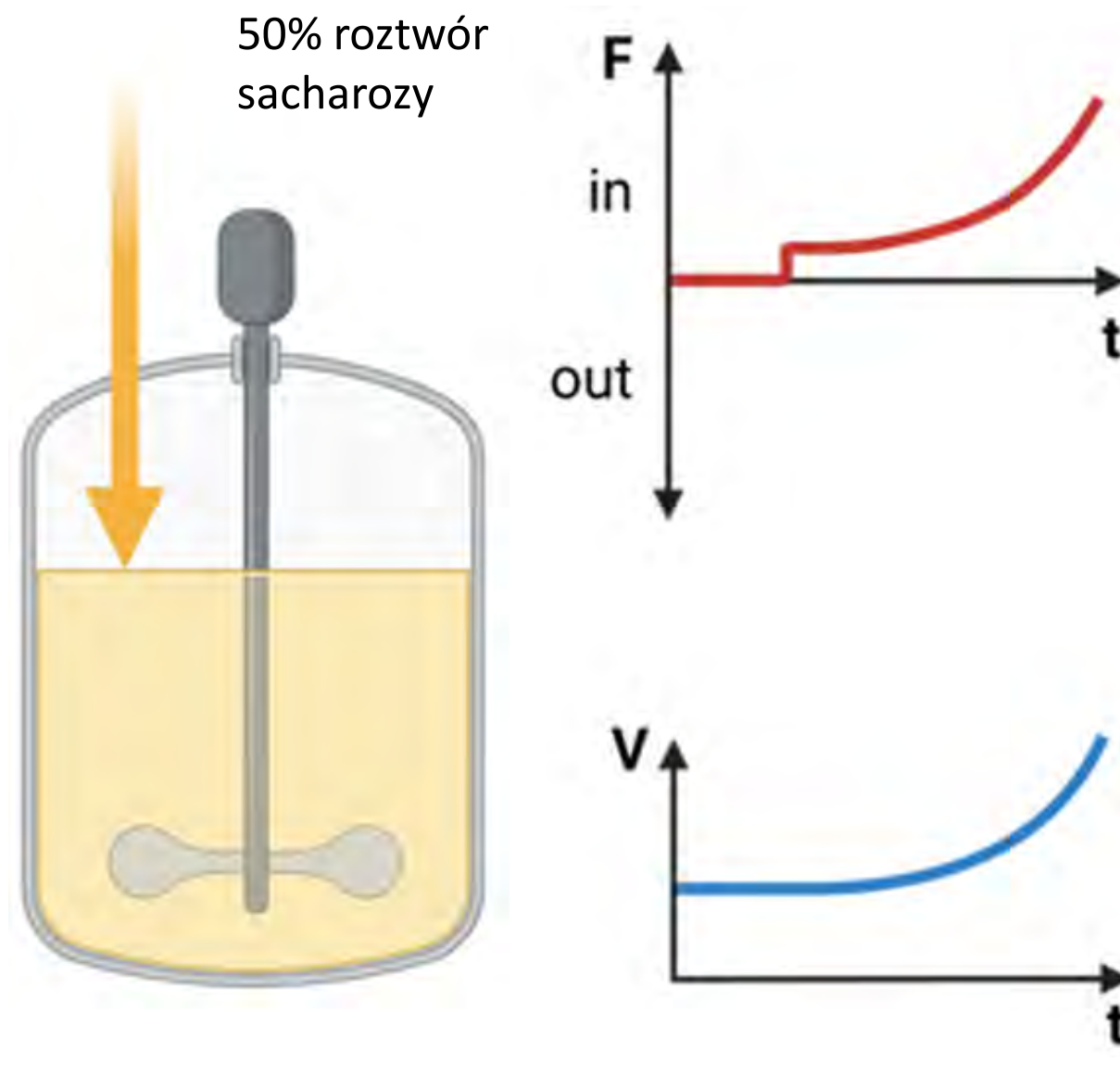
HODOWLA OKRESOWA

źródło C: mannitol/sacharoza
natlenianie: 5%/20%
temp. 30°C
pH 7.0



HODOWLA OKRESOWO-DOLEWOWA

źródło C: mannitol/sacharoza
natlenianie: 5%/20%
temp. 30°C
pH 7.0



Rys.3. Płyny pohodowlane uzyskane w hodowlach okresowych prowadzonych na podłożach: 1 – z mannitolem (OD_{600nm} = 4.6); 2 – z sacharozą (OD_{600nm} = 4.0).

Rys. 4. Płyny pohodowlane uzyskane w hodowlach okresowo-dolewowych prowadzonych na podłożach: 3 – z mannitolem z zasilaniem roztworem sacharozy (OD_{600nm} = 24.1); 4 – z sacharozą z zasilaniem roztworem sacharozy (OD_{600nm} = 13.5).

PODSUMOWANIE

Szeroko zakrojone badania doprowadziły do wyizolowania dziesięciu szczepów bakterii — dziewięciu należących do gatunku *Azotobacter chroococcum* oraz jednego szczepu *Stenotrophomonas rhizophila* — zdolnych do enzymatycznej konwersji azotu atmosferycznego do łatwo przyswajalnej dla roślin formy azotu amonowego. Ponadto wykazano, że część z tych mikroorganizmów posiada zdolność solubilizacji fosforu, potasu i cynku oraz charakteryzuje się aktywnością hydrolityczną, co czyni je obiecującymi kandydatami do wykorzystania w produkcji biopreparatów. Optymalizacja warunków hodowli wykazała, że zastosowanie modelu okresowo-dolewowego, przy jednoczesnej kontroli natlenienia, temperatury i pH, umożliwia uzyskanie hodowli o wysokiej gęstości, osiągającej 1.76 × 10⁸ jtk/ml.

Badania realizowane w ramach projektu „Opracowanie i wdrożenie bezpiecznych preparatów mikrobiologicznych dla zrównoważonego rolnictwa ograniczających zużycie pestycydów i nawozów sztucznych” współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Funduszy Europejskich dla Nowoczesnej Gospodarki. Projekt realizowany w ramach działania 1.1. Ścieżka SMART, nr umowy: FENG.01.01-IP.02-0903/24. Beneficjent: SMP Agro sp. z o.o z siedzibą w Komornikach, Komorniki 44, 63-004 Tulce