

Izolacja mikroorganizmów środowiskowych w celu opracowania i wdrożenia preparatów mikrobiologicznych dla zrównoważonego rolnictwa

Agnieszka Wita¹, Anna Dobrowolska¹, Katarzyna Zarobkiewicz¹, Roman Marecik¹,
Wojciech Białas¹, Sabina Łukaszewicz², Aleksandra Kowalska²

¹Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

²SMP Agro sp. z o. o, Komorniki 44, 63-004 Tulce

1 WSTĘP

Prezentowana praca stanowi punkt wyjścia do opracowania i wdrożenia nowoczesnych preparatów mikrobiologicznych dedykowanych dla zrównoważonego rolnictwa, pozwalających na ograniczenie zużycia nawozów sztucznych i chemicznych środków ochrony roślin. W skład tych biopreparatów wchodzić będą mikroorganizmy wyizolowane z naturalnego środowiska, które będą działać w systemach hybrydowych z produktami syntetycznymi stosowanymi w rolnictwie.

Wzrastająca świadomość konieczności ograniczenia chemizacji rolnictwa spowodowała zwiększenie zainteresowania naturalnymi środkami produkcji, wykorzystującymi biotechnologiczne cechy i właściwości drobnoustrojów. Produkcja nawozów wzbogaconych mikrobiologicznie jest obecnie jednym z najszybciej rozwijających się gałęzi rynku rolnospożywczego, a aplikacyjny charakter badań nad biologią endofitów znajduje odzwierciedlenie w prowadzonych badaniach nad ich praktycznym wykorzystaniem.

Najbardziej rozpowszechnioną metodą pozyskania nowych, efektywnych szczepów endofitycznych jest ich bezpośrednia izolacja z wnętrza tkanek roślinnych, kluczowym jednak czynnikiem tego procesu jest dobór odpowiednich technik jałowienia powierzchni tych tkanek. Pozyskane szczepy endofityczne poddaje się następnie wielokierunkowej analizie biochemicznej, mającej na celu wyselekcjonowanie izolatów charakteryzujących się zdolnością do bezpośredniego lub pośredniego promowania wzrostu roślin. Uzupełnieniem tych badań są analizy genetyczne, które pozwalają ustalić pozycję taksonomiczną oraz detekcję genów odpowiedzialnych za promowanie wzrostu roślin.

Celem niniejszych badań była izolacja szczepów bakterii promujących wzrost roślin (w tym bakterii endofitycznych oraz wiążących azot atmosferyczny), a także grzybów entomopatogennych.

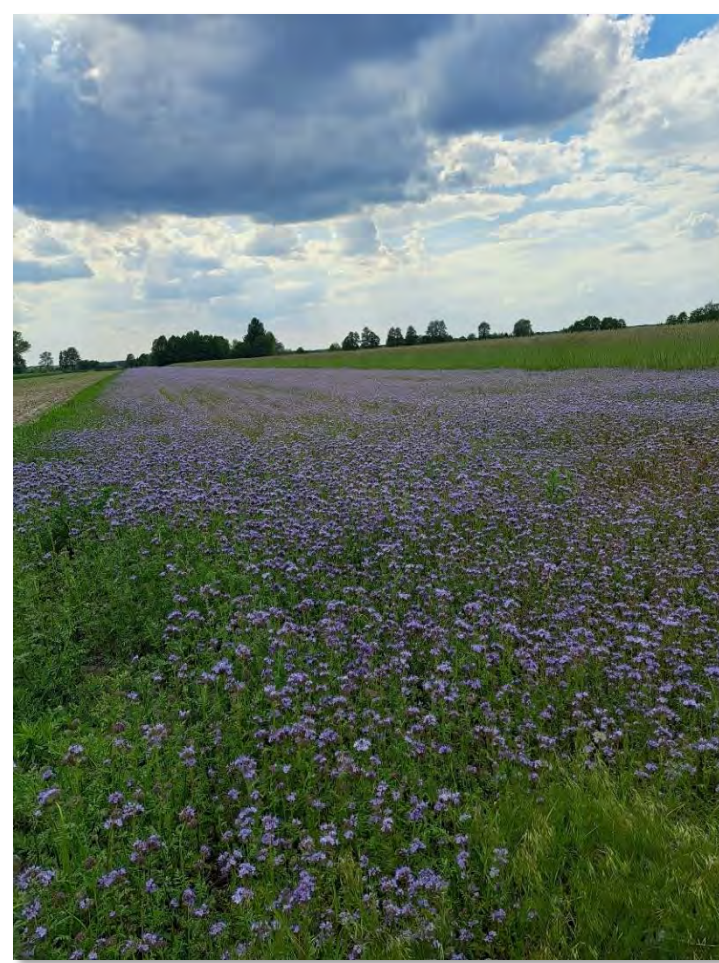
2 METODYKA

- Pobór prób środowiskowych:** Materiał do badań stanowiły próby pobrane w okresie czerwiec-październik 2025 r. na terenie Polski.
- Sterylizacja powierzchniowa:** W celu przygotowania prób do badań izolacyjnych wykorzystano tzw. sterylizację powierzchniową. Tkanę roślinną tj. korzenie, brodawki, łodygi i liście przepłukiwano sterylną wodą destylowaną, a następnie cięto na 1-2 cm fragmenty, które wytrząsano w 1% roztworze Tween 80 przez 15 min. Po tym czasie fragmenty tkanek przenoszono kolejno do roztworu podchlorynu sodu (0,01%), H₂O₂ (10%) oraz etanolu (70%). Czas każdego zanurzenia tkanek wynosił 2 minuty. Po tym czasie materiał badawczy przepłukiwano sterylną wodą, a następnie rozcierano w moździerzu. Z otrzymanego homogenatu wykonano serię rozcieńczeń dziesiętnych (Ryc. 1.)
- Izolacja mikroorganizmów:** Mikroorganizmy izolowano z próbek środowiskowych takich jak: gleba, korzenie, łodygi i liście roślin uprawnych (m. in. soja, łubin, facelia, bób, burak, kukurydza, fasola), resztek pożywnych zbóż i rzepaku, a także z gleb pozyskanych z nieużytków rolnych, zadrzewień śródlęsnych oraz lasów (Ryc. 2.) Izolację mikroorganizmów przeprowadzono metodą posiewu powierzchniowego w kierunku pozyskania grup mikroorganizmów tj. bakterie endofityczne, bakterie z rodzaju *Bacillus*, bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, bakterie z rodzaju *Streptomyces*, bakterie z rodzaju *Azotobacter* oraz grzyby entomopatogenne.
- Identyfikacja mikroorganizmów:** Identyfikację wyizolowanych mikroorganizmów przeprowadzono z wykorzystaniem techniki spektrometrii mas typu MALDI-TOF z użyciem desorpcji/ionizacji laserowej, wspomaganej matrycą z analizatorem czasu przelotu.



Ryc. 1. Etapy izolacji mikroorganizmów z próbek środowiskowych

3 MATERIAŁY



Ryc. 3. Miejsca poboru próbek środowiskowych

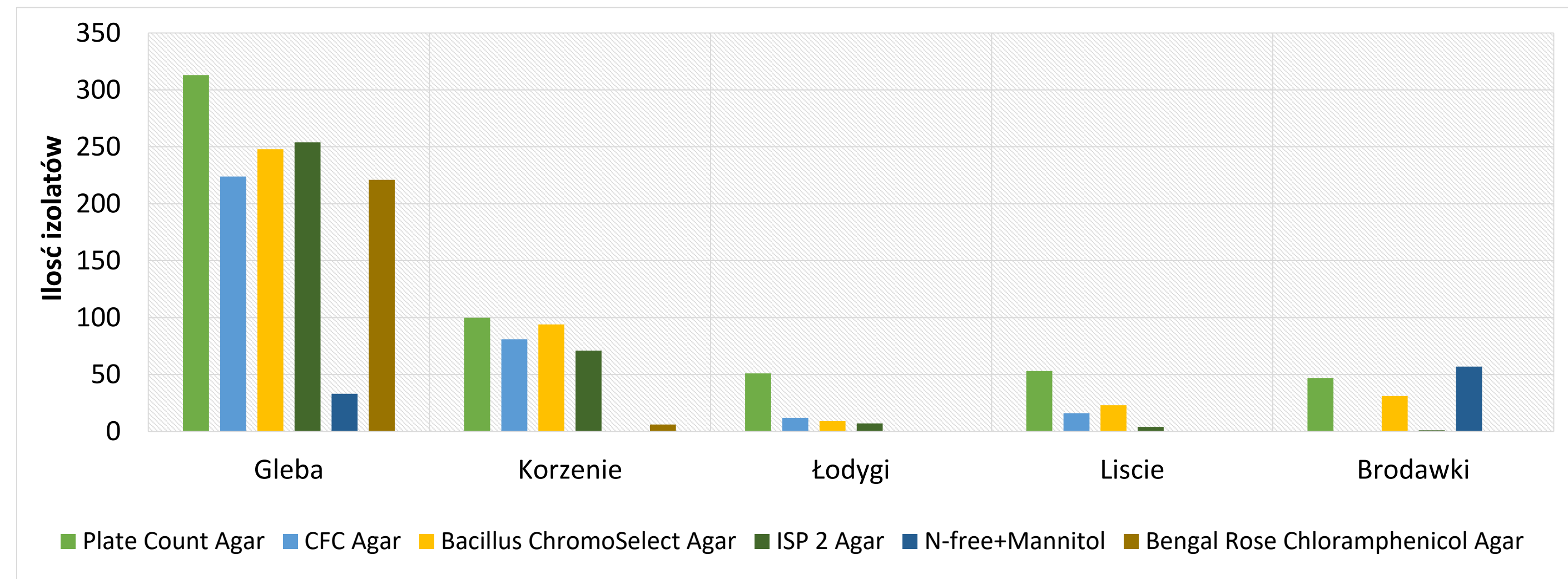
4 WYNIKI

Tab. 1. Porównanie liczby wyizolowanych szczepów z różnych siedlisk izolacyjnych

Liczba:	Wiosna			Jesień			SUMA
	Ochrona Chemiczna	Brak ochrony chemicznej		Ochrona Chemiczna	Brak ochrony chemicznej		
	Grunty orne	Zadrzewienia śródpolne	Las	Grunty orne	Zadrzewienia śródpolne	Las	
Prób	40	21	2	21	4	29	117
Izolatów bakteryjnych	1090	342	17	223	17	33	1722
Izolatów grzybowych	34	10	0	14	0	169	227

Tab. 2. Liczba wyizolowanych szczepów w zależności od zastosowanego podłoża izolacyjnego

Podłoże	Gleba n=1293	Korzenie n=352	Łodygi n=79	Liście n=96	Brodawki n=136	Razem 1956
Plate Count Agar	313	100	51	53	47	564
CFC Agar	224	81	12	16	0	333
Bacillus ChromoSelect Agar	248	94	9	23	31	405
ISP2 Agar	254	71	7	4	1	337
N-free+Mannitol Agar	33	0	0	0	57	90
Bengal Rose Chloramphenicol Agar	221	6	0	0	0	227



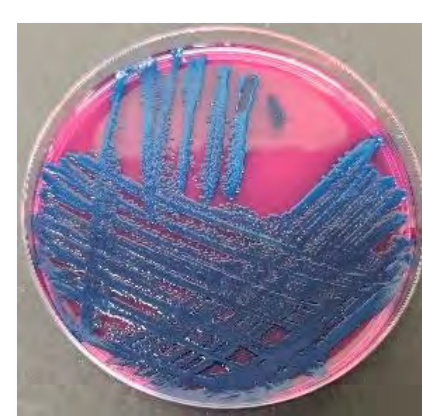
Ryc. 4. Liczba wyizolowanych szczepów w zależności od rodzaju materiału izolacyjnego



Plate Count Agar



CFC Agar



Bacillus ChromoSelect Agar



ISP2 Agar



Nfree+Mannitol Agar



Bengal Rose Chloramphenicol Agar

Ryc. 6. Kierunki posiewów mikrobiologicznych

- W tkankach roślinnych oraz w badanych glebach występowały szczepy promujące wzrost roślin (PGPR) – łącznie z 117 prób wyizolowano 1956 szczepów. Próby do badań pobierano w dwóch okresach: wiosną oraz jesienią - z siedlisk, w których stosowano ochronę chemiczną oraz bez jej udziału (Tab. 1.)
- Mikroorganizmy te wyizolowano z gleby, korzeni, łodyg, liści oraz brodawek (Ryc. 4). Najwięcej izolatów pozyskano z prób gleb (66%) oraz z korzeni (18%) (Ryc. 5.).
- W badaniach izolacyjnych zastosowano 6 kierunków posiewów (Ryc. 6.) Najwięcej izolatów bakteryjnych pozyskano z podłoża PCA.
- W wyniku identyfikacji metodą MALDI-Tof wyizolowane bakterie zakwalifikowano do rodzajów zgrupowanych w klasach *Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria* oraz *Actinobacteria*. Izolaty endofityczne należały głównie do klasy *Gammaproteobacteria*, wśród których dominował rodzaj *Pseudomonas* oraz do klasy *Bacilli* z rodzajem *Bacillus* na czele. Brodawki roślin bobowatych stanowiły rezerwuariusz bakterii azotowych (*Azotobacter* sp.)

5 WNIOSKI

Badanie różnorodności biologicznej stanowi podstawowy krok w poszukiwaniu mikroorganizmów wykazujących pożądane cechy biotechnologiczne

Wyizolowane szczepy stanowią punkt wyjścia do opracowania wieloszczepowych preparatów nawozowych o szerokim zakresie promowania wzrostu roślin jak i preparatów jednoszczepowych o działaniu celowanym tj. np. aktywność przeciw pleśniom w stosunku do konkretnego patogenu roślinnego.

6 PODZIĘKOWANIE

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: **FFNG 01.01-IP.02-0903/24**. Beneficjent: SMP Agro sp. z o.o z siedzibą w Komornikach, Komorniki 44, 63-004 Tulce