

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **235220**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **424967**

(22) Data zgłoszenia: **20.03.2018**

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/41 (2006.01)

B09C 1/10 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

(54) **Szczep bakterii Rhizobium leguminosarum bv. trifolii KC3 i jego zastosowanie
do nawożenia roślin bobowatych w procesie rekultywacji biologicznej gleb
skażonych metalami ciężkimi**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
23.09.2019 BUP 20/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
15.06.2020 WUP 07/20

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MARII
CURIE-SKŁODOWSKIEJ, Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**JERZY WIELBO, Janów, PL
MAŁGORZATA WÓJCIK, Lublin, PL
MAREK WÓJCIK, Lublin, PL**

PL 235220 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KC3, zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, za numerem B/00153, znajdujący zastosowanie do nawożenia roślin bobowatych, zwłaszcza koniczyny, w procesie rekultywacji biologicznej gleb skażonych metalami ciężkimi.

Rekultywacja, jako działanie mające na celu przywrócenie użyteczności gospodarczej zdegradowanym terenom, zwykle obejmuje zabiegi techniczne połączone z zagospodarowaniem biologicznym, przyspieszającym pokrycie powierzchni warstwą gruntów żyznych, a więc wzbogacenie gleby w składniki pokarmowe niezbędne do życia roślinom. Typowymi i powszechnie stosowanymi zabiegami biologicznymi są zabiegi agrotechniczne, gdzie oprócz nawożenia organicznego i mineralnego wprowadza się uprawę roślinności pionierskiej czyli takiej, która może rosnąć w bardzo złych warunkach i powoli przygotowywać odpowiednie warunki dla roślin bardziej wymagających. Szczególnych trudności nastręcza rekultywacja biologiczna na terenach bezglebowych lub z niewielką jej ilością, skażonych metalami ciężkimi. Znane sposoby zmierzające w kierunku pokrycia powierzchni rekultwowanych warstwą gruntów żyznych polegają na siewie roślin próchnicotwórczych, takich jak. np., komosa czerwona (*Chenopodium rubrum*), przymiotno kanadyjskie (*Conyza canadensis*) czy rośliny bobowate. Zabiegi tego typu wymagają wielokrotnych wysiewów i trwają czasami przez okres wynoszący od 5 do 10 lat. Dodatkowym utrudnieniem ekologicznej rekultywacji terenów przemysłowych, takich jak np., hałdy, wyrobiska, składowiska czy też terenów zlokalizowanych w sąsiedztwie kopalń, hut i innych uciążliwych zakładów produkcyjnych bądź ciągów komunikacyjnych, jest fakt, iż obecne w glebie znaczne ilości metali ciężkich, niszczą jej mikroflorę. Próby zwiększenia glebowych populacji bakteryjnych w procesach rekultywacyjnych poprzez zasiedlenie terenów skażonych roślinami bobowatymi, nie przynoszą oczekiwanego skutku z uwagi na fakt, iż rośliny te często nie znajdują w glebie zgodnych symbiontów bakteryjnych dla wiązania atmosferycznego azotu, przez co nie mogą rozwinąć swojego potencjału wzrostowego. Z kolei, stosowanie na terenach skażonych jonami metali ciężkich, znanych inokulantów rizobiowych, również nie przynosi korzystnego efektu, ponieważ wprowadzone do gleby komórki bakteryjne masowo giną wskutek kontaktu z jonami metali ciężkich jeszcze przed nawiązaniem symbiozy z roślinami bobowatymi.

Znane dotychczas szczepy bakterii brodawkowych *Rhizobium*, zdolne do nawiązania symbiozy z drobnonasiennymi gatunkami roślin bobowatych, przeznaczone do produkcji bionawozów stosowanych w uprawie roślin takich jak, groch, wyka czy lucerna zostały ujawnione w opisach patentowych US2007/0212772; SU698968; SU1789523; SU1629295; ES2099679; PL213953 i PL185545. Podobne zastosowanie szczepów bakterii brodawkowych *Rhizobium* w preparatach używanych w uprawie koniczyny, ujawniono w opisach patentowych UA21785 i PL212250. W przypadku wszystkich wspomnianych szczepów *Rhizobium* wykazano pozytywny ich wpływ do zastosowania w biopreparatach w uprawie roślin bobowatych, jedynie na glebach użytkowanych rolniczo, nie wykazując ich przydatności do inokulacji takich roślin w zabiegach rekultywacyjnych gleb. W opisach patentowych CN104498410, CN106167774 oraz RU2012144318 ujawniono kilka szczepów bakteryjnych takich jak *Rhizobium* Scot1305, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM 1066 oraz bakterie z rodzaju *Mesorhizobium*, opornych na jony metali ciężkich, przeznaczonych do stosowania w skażonych środowiskach w roli mikroorganizmów wspomagających prowadzoną przez rośliny fitoekstrakcję jonów metali ciężkich z gleby. Nie ujawniono żadnych danych na temat wpływu tego typu bakterii na rozwój symbiozy w układzie ryzobia – drobnonasienne rośliny bobowate.

Ekologiczna rekultywacja zdegradowanych terenów wymagała więc podjęcia badań w kierunku zastosowania takich bakterii symbiotycznych zasiedlających brodawki korzeniowe roślin bobowatych, które byłyby zdolne zarówno do samodzielnego funkcjonowania w glebach skażonych jako saprofity, a także do symbiotycznych interakcji prowadzących do wiązania azotu atmosferycznego w tkankach roślin bobowatych, dzięki czemu mogłyby stymulować wzrost wspomnianych roślin i tym samym przyspieszać procesy rekultywacyjne gleb na zdegradowanych terenach.

W trakcie badań nad szczepami ryzobiów zasiedlających brodawki korzeniowe drobnonasiennych roślin bobowatych takich jak koniczyna, nieoczekiwanie wyizolowano i zidentyfikowano nowy szczep bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KC3, a następnie zbadano jego oporność na występujące najczęściej w skażonych glebach jony cynku, kadmu i ołowiu. Badania wykazały wysoką tolerancję tego szczepu na powyższe jony metali ciężkich. Zaskakująco pozytywne rezultaty przyrostu

zielonej masy pędów i korzeni koniczyny otrzymano po wprowadzeniu bakterii nowego szczepu KC3 do gleby skażonej jonami metali ciężkich.

Istotą wynalazku jest szczep bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KC3, zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, za numerem B/00153.

Istotą wynalazku jest również szczep bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KC3, do zastosowania w nawożeniu roślin bobowatych w procesie rekultywacji biologicznej gleb skażonych metalami ciężkimi.

Wynalazki zostały przedstawione przykładowo w uprawie koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense*) na podłożach skażonych najczęściej i w dużej mierze, jonami Zn^{2+} , Cd^{2+} lub Pb^{2+} .

P r z y k ł a d 1. Wyizolowanie i genetyczna identyfikacja nowego szczepu *Rhizobium leguminosarum*.

Z gleby ze składowiska odpadów cynkowo-ołowiowych, wykopano korzenie koniczyny czerwonej *Trifolium pratense*. Po umyciu i powierzchniowym wyjąłowaniu za pomocą 0,1% $HgCl_2$ a następnie 70% etanolu, obcięto brodawki korzeniowe i pobrano z nich wewnętrzne tkanki roślinne zawierające bakterie, które potem wysiewano na płytki Petriego z pożywką 79CA zestaloną 1,4% agarem i pasażowano do etapu otrzymania czystych kultur z pojedynczych kolonii. Z czystej kultury bakteryjnej wyizolowano znaną metodą całkowite DNA, z którego amplifikowano 3 regiony genetyczne wykorzystane do identyfikacji szczepu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: marker genetyczny 16S rDNA, który amplifikowano z całkowitego DNA *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KC3 z zastosowaniem znanych primerów 16S63f 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' oraz 16S1387r. 5'-GGGCGG WGTGTACAAGGC-3', marker genetyczny 16-23S który amplifikowano z zastosowaniem znanych primerów FGPS1490 5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3' oraz FGPL132 5'-CCGGGTTTCCCCAT TCGG-3' oraz marker genetyczny *nodD* z zastosowaniem znanych primerów NBA12 5'-GG ATSGCA ATCATCTAYRGMRTGG-3' i NBF12 5'-GGATCRAAAGCATCCRCATATGG-3'. Przeprowadzono sekwencjonowanie opisanych wyżej markerów genetycznych 16S rDNA, 16-23S rDNA oraz *nodD*, a otrzymane sekwencje: Nr 1 – 16S rDNA (1140 pz), Nr 2 – 16-23S rDNA (1092 pz) oraz Nr 3 – *nodD* (1042 pz) przedstawiono w załączonym wykazie sekwencji. Otrzymany wynik w postaci ciągu opisującego 3 sekwencje DNA jest charakterystyczny i powtarzalny, co pozwala na dokładną identyfikację szczepu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KC3.

P r z y k ł a d 2. Badanie oporności szczepu bakterii według wynalazku na jony metali ciężkich.

Badanie oporności *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KC3, otrzymanego jak opisano w przykładzie 1, na występujące najczęściej w skażonych glebach jony Zn^{2+} , Cd^{2+} oraz Pb^{2+} , w porównaniu z innymi szczepami *Rhizobium leguminosarum*, przeprowadzono za pomocą testów na płytkach Petriego. Sporządzono wodne zawiesiny rizobiów o gęstości optycznej 0,05 jednostki ($OD_{550}=0,05$) zawierającą 5×10^7 bakterii w 1 ml. Na płytki Petriego z pożywką 79CA naniesiono odpowiednią ilość jonów Zn^{2+} podanych w formie wodnego roztworu $ZnSCO_4$, jonów Cd^{2+} podanych w formie wodnego roztworu CdN_2O_6 oraz jonów Pb^{2+} podanych w formie wodnego roztworu $Pb(NO_3)_2$, w ilościach odpowiadających stężeniu molowemu poszczególnych jonów Zn^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+} jak: 10 μM ; 33 μM ; 100 μM ; 330 μM ; 1 mM; 3,3 mM; 10 mM i 33 mM. Czyste podłoże, nie zawierające jonów Zn^{2+} , Cd^{2+} lub Pb^{2+} stanowiło kontrolę. Na tak przygotowane płytki naniesiono po 10 μl zawiesin z bakteriami *Rhizobium leguminosarum*, takimi jak: *R. leguminosarum* bv. *trifolii* KC3, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* KB7 i *R. leguminosarum* bv. *trifolii* KO17, po czym płytki inkubowano w ciągu 48 godz. w temp. 28°C. Doświadczenie przeprowadzono w 3 powtórzeniach. Po tym czasie wizualnie oceniano wzrost bakterii. Na płytkach kontrolnych, bez dodatku Zn^{2+} , Cd^{2+} czy Pb^{2+} , zaobserwowano wzrost wszystkich badanych szczepów. Pojawienie się kolonii lub murawy bakteryjnej interpretowano jako oporność szczepu na zastosowane stężenie Zn^{2+} , Cd^{2+} czy Pb^{2+} , natomiast brak kolonii lub murawy jako wrażliwość na zastosowane stężenia badanych jonów.

W tabeli 1, zamieszczonej na rysunku, zestawiono wartości stężeń Zn^{2+} , Cd^{2+} oraz Pb^{2+} hamujące wzrost badanych szczepów rizobiów. Wśród szczepów *Rhizobium leguminosarum*, szczep bv. *trifolii* KC3, według wynalazku, wykazuje najwyższą tolerancję na stężenia jonów metali ciężkich, najczęściej występujących w skażonych glebach.

Inne badania tolerancji szczepu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KC3 na jony Zn^{2+} , Cd^{2+} oraz Pb^{2+} przeprowadzono z zużyciem mikroskopu fluorescencyjnego. Do badań używano po 1 ml zawiesiny rizobiów w płynnym podłożu TY, umieszczonych w probówkach Eppendorfa oraz roztworów poszczególnych jonów metali ciężkich, jak opisano powyżej. Próbkę inkubowano przez 1 godzinę

w temperaturze pokojowej, a następnie dodawano do nich po 25 μl wodnego roztworu jodku propidyny (5 $\mu\text{g/ml}$) barwiącego komórki martwe na kolor czerwony oraz po 10 μl roztworu dwuocianu fluoresceiny w dimetylosulfotlenku (20 $\mu\text{g/ml}$), pobieranego przez komórki żywe i barwiącego je na kolor zielony. Wybarwione preparaty mikroskopowe, oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym, zliczając poszczególne rodzaje komórek obecnych w 5 losowo wybranych polach widzenia. Doświadczenia przeprowadzono trzykrotnie, a wyniki w postaci średnich wartości procentowego udziału komórek martwych w populacjach bakterii badanych szczepów *R. leguminosarum* zadawanych różnymi stężeniami jonów Zn^{2+} , Cd^{2+} lub Pb^{2+} , przedstawiono na rysunku jako:

– Fig. 1 – udział komórek żywych i martwych w populacji szczepu *R. leguminosarum* bv. *trifolii* KB7 po potraktowaniu różnymi stężeniami jonów Zn^{2+}

– Fig. 2 – udział komórek żywych i martwych w populacji szczepu *R. leguminosarum* bv. *trifolii* KC17 po potraktowaniu różnymi stężeniami jonów Zn^{2+}

– Fig. 3 udział komórek żywych i martwych w populacji szczepu *R. leguminosarum* bv. *trifolii* KC3 po potraktowaniu różnymi stężeniami jonów Zn^{2+}

– Fig. 4 udział komórek żywych i martwych w populacji szczepu *R. leguminosarum* bv. *trifolii* KB7 po potraktowaniu różnymi stężeniami jonów Cd^{2+}

– Fig. 5 udział komórek żywych i martwych w populacji szczepu *R. leguminosarum* bv. *trifolii* KC17 po potraktowaniu różnymi stężeniami jonów Cd^{2+}

– Fig. 6 udział komórek żywych i martwych w populacji szczepu *R. leguminosarum* bv. *trifolii* KC3 po potraktowaniu różnymi stężeniami jonów Cd^{2+}

– Fig. 7 udział komórek żywych i martwych w populacji szczepu *R. leguminosarum* bv. *trifolii* KB7 po potraktowaniu różnymi stężeniami jonów Pb^{2+}

– Fig. 8 udział komórek żywych i martwych w populacji szczepu *R. leguminosarum* bv. *trifolii* KC17 po potraktowaniu różnymi stężeniami jonów Pb^{2+}

– Fig. 9 – udział komórek żywych i martwych w populacji szczepu *R. leguminosarum* bv. *trifolii* KC3 po potraktowaniu różnymi stężeniami jonów Pb^{2+}

Wśród szczepów *Rhizobium leguminosarum*, szczep bv. *trifolii* KC3, wykazuje najwyższą tolerancję na stężenia jonów metali ciężkich, objawiającą się jako najniższy udział komórek martwych w populacjach zadawanych określonymi stężeniami jonów Zn^{2+} , Cd^{2+} lub Pb^{2+} , co predestynuje ten szczep do zastosowania jako czynnik wspomagający wzrost koniczyny na terenach skażonych jonami Zn^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+} .

P r z y k ł a d 3. Wpływ szczepu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KC3 na wzrost koniczyny w warunkach zanieczyszczenia podłoża jonami Zn^{2+} , Cd^{2+} lub Pb^{2+}

Dla potwierdzenia aktywności symbiotycznej szczepu według wynalazku, badano przyrosty świeżej masy pędów, świeżej masy korzeni oraz liczbę brodawek korzeniowych koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense*), uprawianej na podłożu skażonym, o różnej zawartości poszczególnych jonów metali ciężkich. Rośliny tej koniczyny hodowano w pojemnikach zawierających podłoże w formie 500 ml mieszaniny perlitu i niesterylnego piasku (1 : 1 v/v) podlewano płynną bezazotową pożywką Fahreusa wzbogaconą w jony Zn^{2+} , podane w formie wodnego roztworu ZnSO_4 w stężeniach od 0 μM do 20 mM, jony Cd^{2+} podane w formie wodnego roztworu CdN_2O_6 w stężeniach od 0 μM do 500 μM oraz jony Pb^{2+} podane w formie wodnego roztworu $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ w stężeniach od 0 μM do 200 μM . Po takim nawilżeniu podłoża, w pojemnikach wysiano nasiona koniczyny czerwonej. W części pojemników prowadzono hodowlę kontrolną, a część pojemników zakażano 10 ml wodnej zawiesiny szczepu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KC3 zawierającej 5×10^8 komórek/ml. Wszystkie rośliny hodowano w tych samych warunkach w szklarni, w temperaturze 19–24°C, podlewając niesterylną wodą 2 razy w tygodniu, przy świetle dziennym uzupełnianym oświetleniem sztucznym 14 godzin dzień / 10 godzin noc. Po 6 tygodniach od zakażenia bakteriami według wynalazku, zebrano rośliny, zważono ich poszczególne części i policzono brodawki korzeniowe. W zakresie stężeń poszczególnych jonów metali porównywano masy pędów i korzeni oraz liczbę brodawek korzeniowych roślin nie inokulowanych, rosnących na podłożu z jonami metali ciężkich i roślin inokulowanych szczepem *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KC3, również rosnących na podłożu z jonami metali ciężkich, a wyniki zestawiono w tabelach.

Tabela 2 – wpływ inokulacji szczepem *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KC3 na brodawkowanie i wzrost koniczyny czerwonej rosnącej na podłożu skażonym w różnym zakresie stężeń jonów Zn^{2+} .

Tabela 3 – wpływ inokulacji szczepem *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KC3 na brodawkowanie i wzrost koniczyny czerwonej rosnącej na podłożu skażonym w różnym zakresie stężeń jonów Cd^{2+} .

Tabela 4 – wpływ inokulacji szczepem *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KC3 na brodawkowanie i wzrost koniczyny czerwonej rosnącej na podłożu skażonym w różnym zakresie stężeń jonów Pb^{2+} .

Przedstawione w tabelach wyniki, dowodzą, że zastosowanie szczepu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* KC3 w uprawie koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense*) na podłożach zawierających różne stężenia jonów Zn^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+} istotnie zwiększa liczbę brodawek korzeniowych, masę korzeni oraz masę pędów koniczyny, co z wykazaną wcześniej opornością szczepu na działanie tych jonów, predystynuje go do zastosowania w stosunkowo szybkim i skutecznym procesie rekultywacji biologicznej gleb skażonych najczęściej występującymi metalami ciężkimi.

Wykaz sekwencji

Sekwencja 1: 16S rDNA (1140 pz)

TAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAA
GATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGG
GTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGA
TCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGC
CGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGA
AGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGG
CGTAAAGCGCACGTAGGTGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCAG
GGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTTCGATCTGGAGTATGGAA
GAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGG
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGA
GGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCAGTATACTGTTTCGGTG
GCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
TTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATG
CCCGGCTACTTGCAGAGATGCAAGGTTCCCTTCGGGGACCGGGACACA
GGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGG
GCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTAC
AATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTC
CAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCAT

Sekwencja 2: 16-23S rDNA (1092 pz)

GATATGAACCTTCCCGTGCTTTTTAGAACATAGATGGCACCAGTCAGG
TGACTATCGAAACGTAATACGCCGCGATGACTTCGGTCACGACGGTAT
GGCGAGCTTTCGCCGTCCACGTTTCTCTTTCTTCAAAAGGATATCGAAC
CATGGGTTTGGCTCGCGCGCTGTTTCGCACCTTCGGTGCTGCGCTCCGC
GAGGGCGCCGGACGACCGGCGACGGCCTCTGGCCTGTATGGGCGACC
CTTTCCGAGGTTTTGCTTAGGATTGGCGTCGACGCAGAGAGATGGGCC
CGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGGGGTCGGAA
GTTCAAGTCTTCCCGGGCCACCATTTCACCAGCAAATGAGGTTTGC
TGTAGCGAATTGTGGTTTGTGGGTTTACCTGATCCTGGCGGTTTGCT
GTCAGGTGTTTTCGATGGTTGGGGCTGTAGCTCAGCTGGGAGAGCACC
TGCTTTGCAAGCAGGGGGTCAGCGGTTTCGATCCCGCTCAGCTCCACCA
ATTCGCTTGGTGTGAGACTGAGAGAGATATCCTTTGAAGAAATAAAA
GTTTTGCATCGGCTTATGGCTGGTGCCTGTTCTGCATACATTGTGAAGA
GAAGATTGATCTGGAGGCTTCCAGGTGTTTTGGGTTTTGCCCAAGGCG
TCCGAGCCCAGTTCTGATGATCCCATGGATGGCCTAGCCGGCCGGATA
TGGGTGAAGGACTGGAGGTAGGAAGGAAGCTTGTCGCTCTGGGTCGTT
GTTGTTTGCTGTCTTTAGGGATGAGCATCTGACGGACGACTTGATTACC
GTTGCCTGACCGCGCGGTATCGGATCATATCTCGAGAAGCTGGTCTTA
AGACAGGCTGCAAGCGAGCTGCTCGGCGTAGCTCCAATAAAGCAGAC
CTGTCGAACACGTTAATGGCATCATGAAATGATCCGGTTGTAAAAGGT
AACCGGATTTTTGGACTGGCCGCACGGCAATCGCAAGGTTGCCCTGAT
GGTCGCACGTCCAAATATGGATGAGCATTGGCAATGAGAACGATTAA
GTGTCGTAAGGGCATTGTTGGTGGATGCCTTGGCAT

Sekwencja 3: *nodD* (1042 pz)

GCTCACCGCGGCAGCGCGCAGCATCAACCTCAGTCAACCAGCCATGAG
CGCAGCCATCGGCAGGTTGCGCGCCTACTTCAATGACGAGCTGTTTGT
GATGCAGAAGCGCAGACTTGTCCCGACACCGCGAGCCGAGGCGCTCG
CCCCTGCGGTTTCGCGAAGCTCTACTTCAGATTCAGCTCTCGGTGATTGC
GTGGGATCCATTGGTCCCGGCGGAATCTGACCGGTGCTTCAGAATCGT
TCTGTCCGATTTTCATGACGCTGGTATTCTTCGAAAAGGTCATAAAGCG
CGTAGCGCGAGAGGCACCCGGCGTCAGTTTTGAATTACTCCACATGAT
TGATTATCCGGACGAACGTCTCCACGGCGGAGATGTGGATTTTTTTGAT
CCTTCCAAAACAGTTCATGTCAGCCCCCTCATCCAGTGCGAAGCTGTTT
GGGGAGAACTCGTGTGTGTCGGCTGCCCTAATAATCAACAGCTGCAC
GGGAAGCTTTCCCTTGAGCAATTTATGTCGATGGGACACGTCGCGACC
ATGTTTGGGCGTACTTTGAAGCCATCCGTTGAACAATGGCTATTGCTG
GAGCACGGTTTTTAAGCGGCGTATCGAAATCGTGGTCCAGGGCTTTAAC
GCGATCCCGATGTTACTACAGGGGACGAATCGGATATCAACCCTTCCC
TTGCGGCTTGTCAGACATTTTCGCACCGACGATTCCCTTACAGATCGTAG
ATCATCCACTGCCTCCTCTTTTCGTTACAGAAGCTATACAGTGGCCCTT
GCTTCACAATTCCGATCCCGGCAACATCTGGATGCGTAACATAATTTT
GGAGGAGGCTTCGCGCATGGAGGCATCCGCTGAAGGATGCTCTCAAG
CGGCCAGAGCGGCCTAATTCTGGTTCGAGCTGCATTAGCTCGAAGGATG
TCGCTTCAGGTGGTGGCATCTCGCCCACTTCCTGCATTGATCAATCGAA
TCGGTTTTTGGTTTTCGCGATTGATTATGATGAACTGGTGAAGCTGTGCCA
TCGCTGCATTTCCACCCGTTACGATCCTGG

Zastrzeżenia patentowe

1. Szczep bakterii *Rhizobium, leguminosarum* *bv. trifolii* KC3, zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, za numerem B/00153.
2. Szczep bakterii *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii* KC3, jak określono w zastrz. 1, do zastosowania w nawożeniu roślin bobowatych w procesie rekultywacji biologicznej gleb skażonych metalami ciężkimi.

Rysunki

Tabela 1

Szczep	Pochodzenie	Stężenie hamujące wzrost rizobiów (mM)		
		Pb ²⁺	Zn ²⁺	Cd ²⁺
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> KB7	Brodawki korzeniowe koniczyny białej	3,3	3,3	3,3
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> KO17	(szczep referencyjny)	1	0,33	0,033
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> KC3	Brodawki korzeniowe koniczyny czerwonej	10	3,3	10

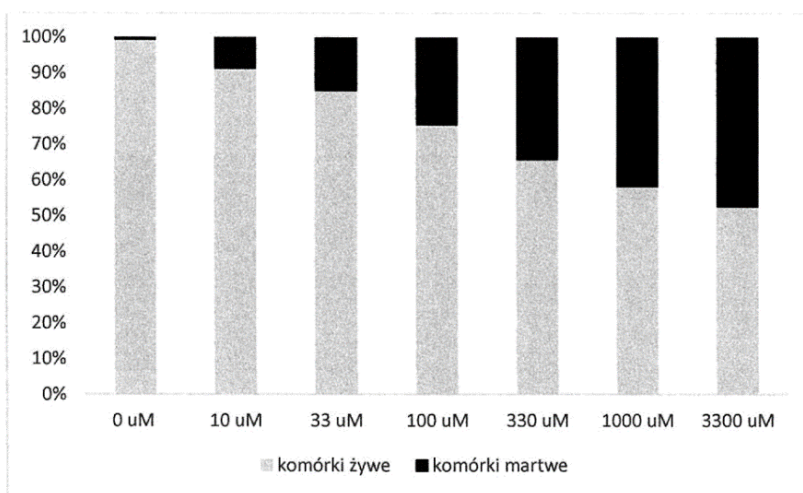


Fig.1

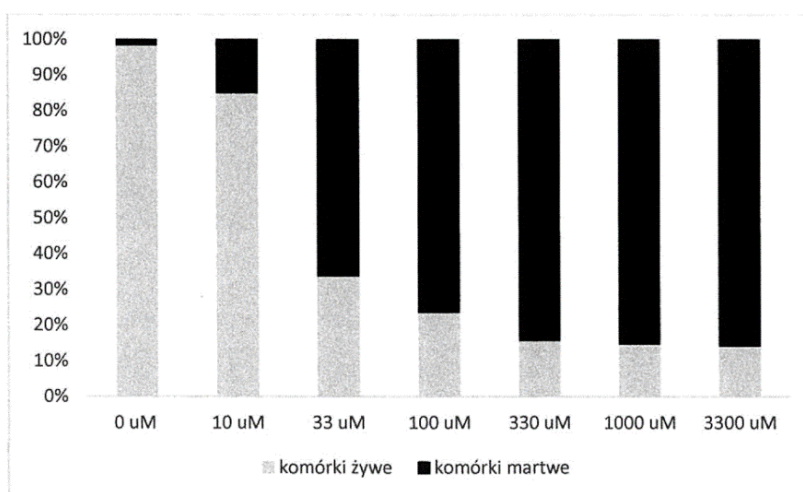


Fig.2

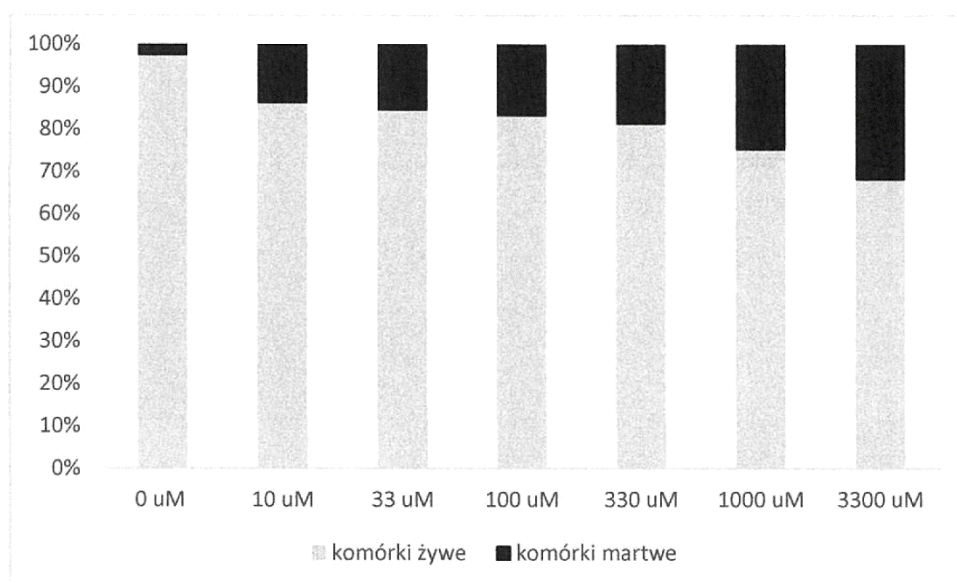


Fig. 3

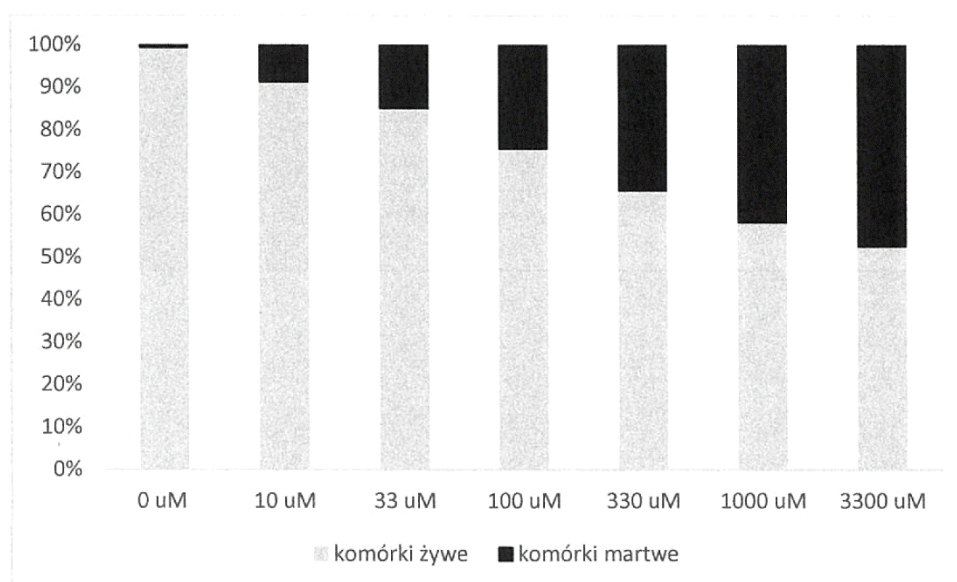


Fig. 4

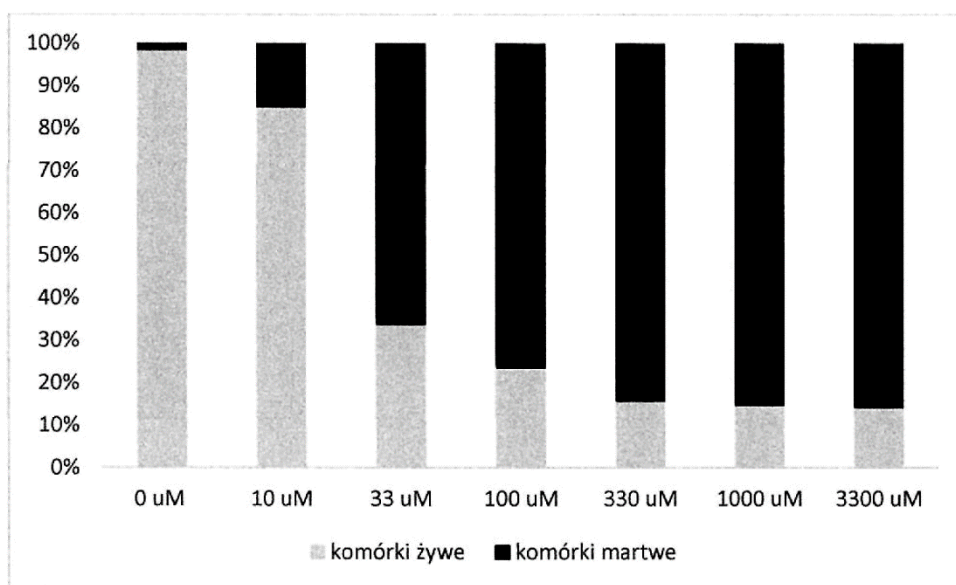


Fig. 5

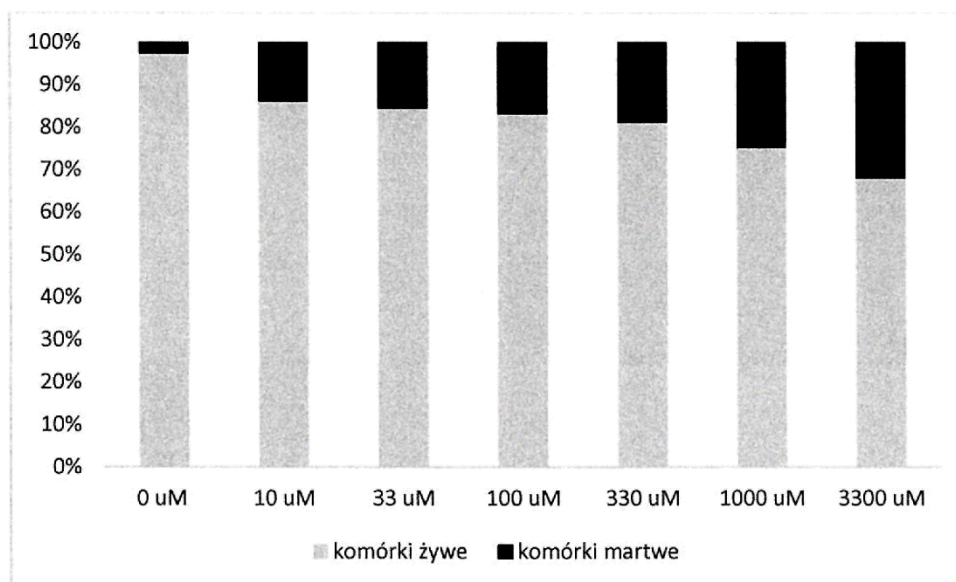


Fig. 6

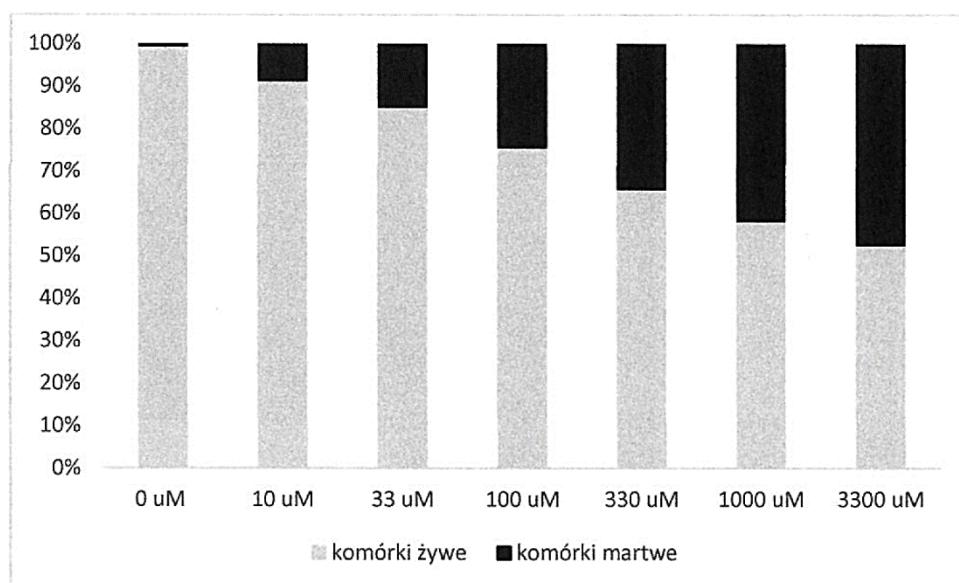


Fig. 7

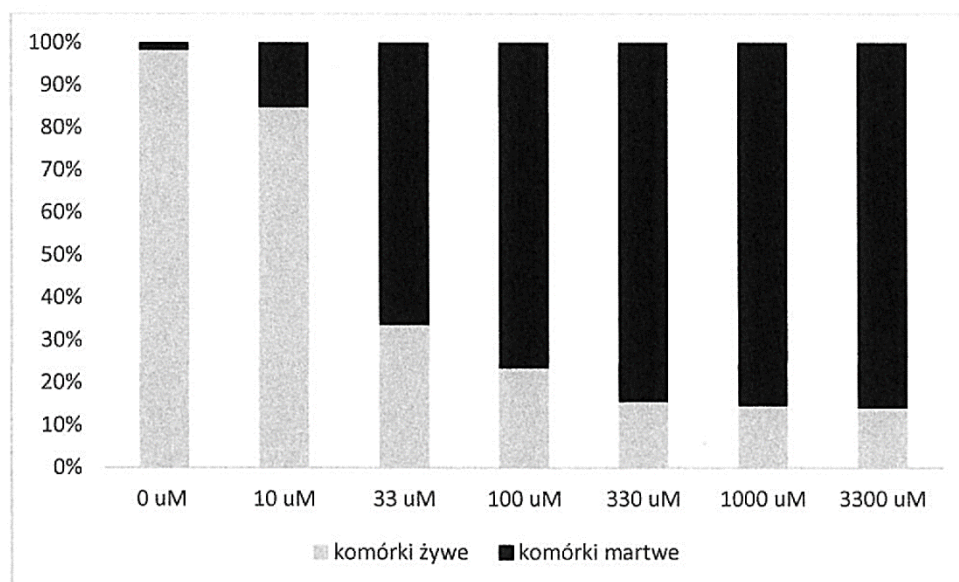


Fig. 8

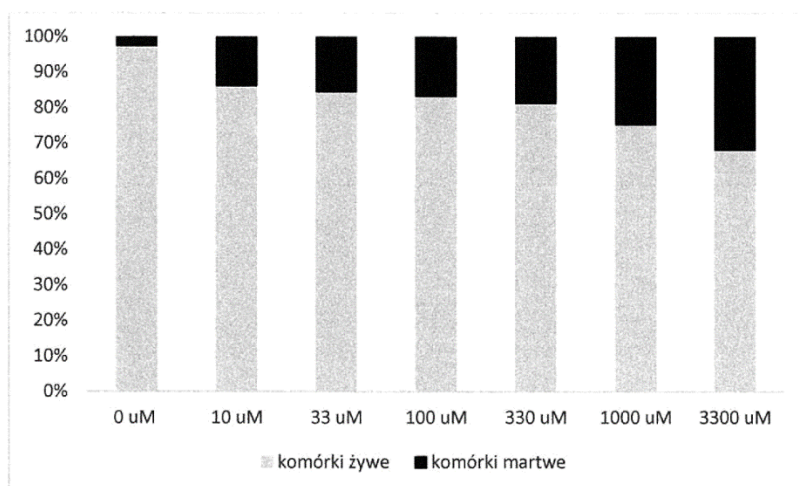


Fig. 9

Tabela 2

Stężenie jonów Zn^{2+}	Mienniki aktywności symbiotycznej	Koniczyna rosnąca na podłożu skażonym	Koniczyna rosnąca na podłożu skażonym inokulowana szczepem <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> KC3
0 mM	Liczba brodawek / roślinę	$16,0 \pm 4,0^a$	$22,8 \pm 3,1^b$
	Świeża masa pędu (mg)	226 ± 54^a	257 ± 63^b
	Świeża masa korzeni (mg)	224 ± 63^a	323 ± 99^b
5 mM	Liczba brodawek / roślinę	$13,5 \pm 2,9^a$	$23,1 \pm 4,4^b$
	Świeża masa pędu (mg)	199 ± 48^a	264 ± 60^b
	Świeża masa korzeni (mg)	190 ± 61^a	291 ± 70^b
10 mM	Liczba brodawek / roślinę	$10,7 \pm 2,5^a$	$15,6 \pm 4,0^b$
	Świeża masa pędu (mg)	$111 \pm 31,2^a$	175 ± 36^b
	Świeża masa korzeni (mg)	105 ± 32^a	179 ± 50^b
20 mM	Liczba brodawek / roślinę	$7,6 \pm 2,3^a$	$9,2 \pm 2,7^b$
	Świeża masa pędu (mg)	76 ± 20^a	89 ± 25^a
	Świeża masa korzeni (mg)	75 ± 23^a	95 ± 34^b

a, b, c... wartości w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p < 0,05$

Tabela 3

Stężenie jonów Cd^{2+}	Mierniki aktywności symbiotycznej	Koniczyna rosnąca na podłożu skażonym	Koniczyna rosnąca na podłożu skażonym inokulowana szczepem <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> KC3
0 μM	Liczba brodawek / roślinę	$14,7 \pm 2,8^a$	$20,0 \pm 2,5^b$
	Świeża masa pędu (mg)	204 ± 48^a	264 ± 54^b
	Świeża masa korzeni (mg)	217 ± 72^a	330 ± 80^b
100 μM	Liczba brodawek / roślinę	$12,9 \pm 3,8^a$	$20,4 \pm 3,7^b$
	Świeża masa pędu (mg)	191 ± 44^a	223 ± 41^b
	Świeża masa korzeni (mg)	196 ± 66^a	278 ± 71^b
250 μM	Liczba brodawek / roślinę	$15,0 \pm 3,0^a$	$20,9 \pm 3,4^b$
	Świeża masa pędu (mg)	180 ± 41^a	229 ± 37^b
	Świeża masa korzeni (mg)	211 ± 69^a	280 ± 60^b
500 μM	Liczba brodawek / roślinę	$9,9 \pm 3,7^a$	$16,7 \pm 3,8^b$
	Świeża masa pędu (mg)	124 ± 37^a	190 ± 34^b
	Świeża masa korzeni (mg)	148 ± 42^a	209 ± 61^b

a, b, c ... wartości w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p < 0,05$

Tabela 4

Stężenie jonów Pb^{2+}	Mierniki aktywności symbiotycznej	Koniczyna rosnąca na podłożu skażonym	Koniczyna rosnąca na podłożu skażonym inokulowana szczepem <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> KC3
0 mM	Liczba brodawek / roślinę	$5,7 \pm 1,3^a$	$10,0 \pm 2,2^b$
	Świeża masa pędu (mg)	65 ± 11^a	91 ± 15^b
	Świeża masa korzeni (mg)	77 ± 14^a	110 ± 27^b
1 mM	Liczba brodawek / roślinę	$4,1 \pm 0,8^a$	$8,2 \pm 1,7^b$
	Świeża masa pędu (mg)	53 ± 9^a	74 ± 13^b
	Świeża masa korzeni (mg)	64 ± 12^a	91 ± 19^c
2 mM	Liczba brodawek / roślinę	$4,4 \pm 1,0^a$	$6,7 \pm 1,1^b$
	Świeża masa pędu (mg)	55 ± 10^a	67 ± 12^b
	Świeża masa korzeni (mg)	65 ± 12^a	82 ± 13^b
5 mM	Liczba brodawek / roślinę	$3,0 \pm 0,8^a$	$4,5 \pm 0,9^b$
	Świeża masa pędu (mg)	50 ± 10^a	58 ± 8^b
	Świeża masa korzeni (mg)	62 ± 17^a	66 ± 16^a

^{a, b} ... wartości w wierszu oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p < 0,05$