

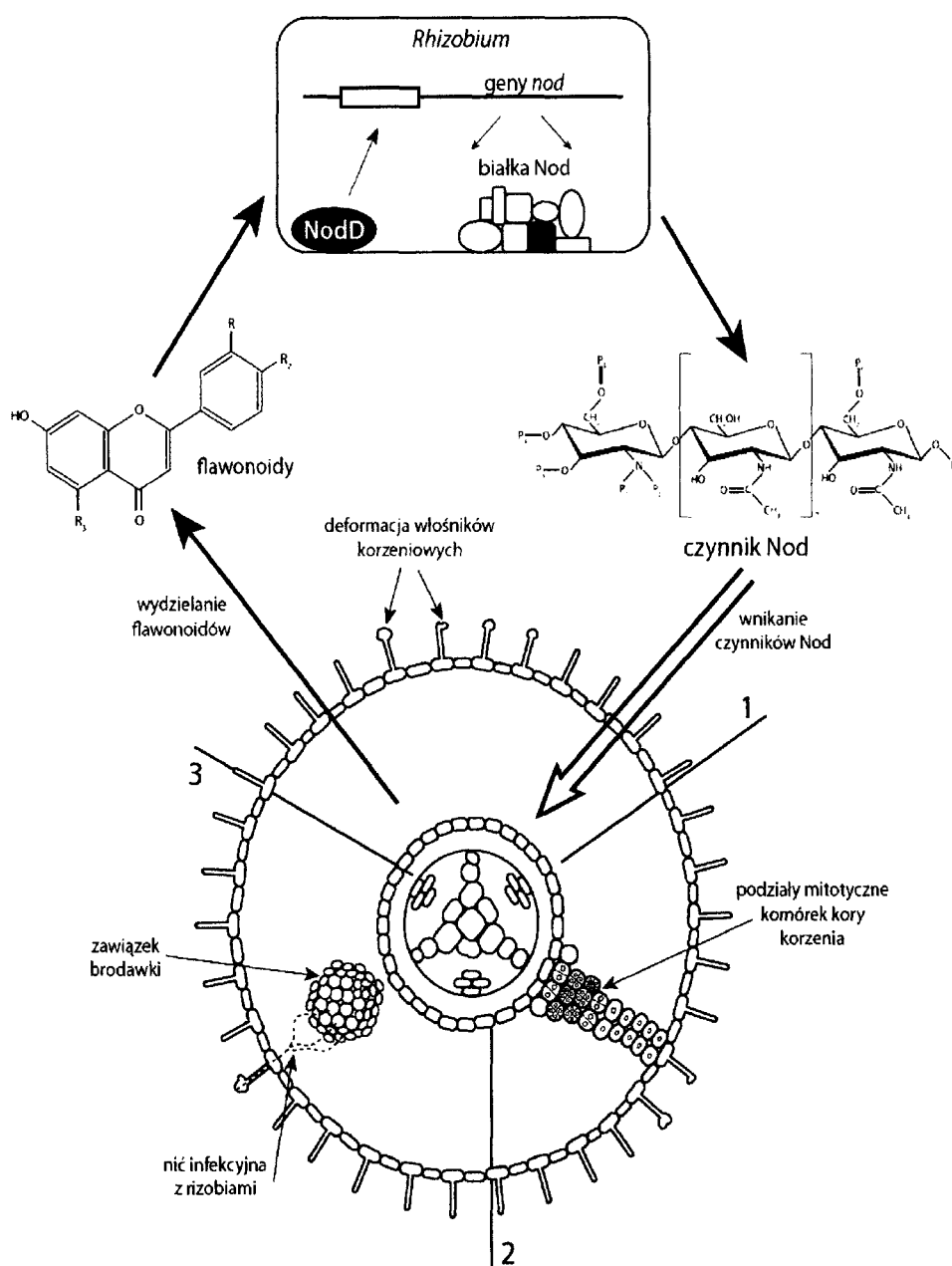
Nowy szczep bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09 do zastosowania w otrzymywaniu bionawozu dla roślin motylkowatych oraz sposób wytwarzania tego bionawozu.

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09 zdeponowany w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie, nr dep. 04/01/2010, wyizolowany z gleby lessowej, którego metabolity jako czynniki Nod, użyto do otrzymywania bionawozu stymulującego kiełkowanie i wzrost roślin motylkowatych, a zwłaszcza grochu oraz sposób otrzymywania tego bionawozu.

Symbioza pomiędzy bakteriami z rodzaju *Rhizobium* a roślinami motylkowatymi jest zjawiskiem powszechnie spotykanym w przyrodzie. W układzie takim bakterie żyją w brodawkach korzeniowych roślinnych gospodarzy i redukują nieprzyswajalny dla roślin azot atmosferyczny (N_2) do azotu amonowego, który jest wykorzystywany przez rośliny i zwiększa tym samym ich plonowanie [Jones i wsp., Nature, 2007, 5]. Brodawki korzeniowe powstają w wyniku działania na korzenie roślin specyficznych bakteryjnych molekuł [D'Haeze i Holsters, Glycobiology, 2002, 12]. Metabolity te są pod względem budowy chemicznej chitolipooligosacharydami i znane jako czynniki Nod. Rizobia można wykorzystać do produkcji czynników Nod, jeżeli zostaną poddane aktywacji przy pomocy związków flawonoidowych. W warunkach naturalnych flawonoidy wydzielane są do środowiska glebowego przez korzenie roślin motylkowatych [Spaink, Annu. Rev. Microbiol., 2000, 54]. Różnice w poziomie syntezy bakteryjnych czynników Nod wpływają na liczbę brodawek powstających na korzeniach roślin i przez to na efektywność symbiozy (wydajność wiązania azotu atmosferycznego), co z kolei może mieć wpływ na wielkość plonu roślin uprawnych.

Rizobia powszechnie występują w polskich glebach uprawnych w ilościach dochodzących do 10^5 żywych komórek na 1 g gleby, ale ich liczebność

może się zmieniać w zależności od rodzaju gleby [Martyniuk i wsp., Bot. Lithuanica, 1999, Suppl. 3]. Zdarza się również, że mimo dużej liczebności rizobiów w danej glebie, przeważają wśród nich szczepy o niskiej efektywności symbiotycznej redukcji azotu. W takich przypadkach zaleca się stosowanie bionawozów zawierających żywe, wysoko aktywne bakterie z rodzaju *Rhizobium* [Toro, World J. Microbiol. Biotech., 1996, 12].



Rys.1. Schemat wymiany sygnałów molekularnych pomiędzy rizobiami a roślinami motylkowatymi oraz zmian morfogenetycznych (1-3) wywołanych przez czynniki Nod w obrębie korzenia rośliny – gospodarza.

Opatentowano kilka szczepów bakterii brodawkowych przeznaczonych do produkcji bionawozów i/lub biopreparatów zawierających takie szczepy, między innymi:

- a) *Rhizobium meliloti* [PL 185 545], przeznaczony do stosowania w uprawie lucerny;
- b) *Rhizobium leguminosarum* S012-A2 [US2006/0258534 A1], przeznaczony do stosowania w uprawie grochu i soczewicy;
- c) *Rhizobium leguminosarum* Z25 [ES2099679 A1], przeznaczony do stosowania w uprawie wyki;
- d) *Bradyrhizobium japonicum* [Zhang i Smith, Advances in Agronomy, 2002, 76], przeznaczony do stosowania w uprawie soi;
- e) *Rhizobium leguminosarum* M1 [UA81577 C2], przeznaczony do stosowania w uprawie grochu;
- f) *Rhizobium leguminosarum* 240b [SU698968 A1], przeznaczony do stosowania w uprawie grochu;
- g) *Rhizobium leguminosarum* 250b [SU979307 A1], przeznaczony do stosowania w uprawie grochu;
- h) *Rhizobium leguminosarum* 1078 [SU1789523 A1], przeznaczony do stosowania w uprawie grochu;
- i) *Rhizobium leguminosarum* 0622 [SU1629295 A1], przeznaczony do stosowania w uprawie wyki.

W przypadku szczepów *Rhizobium leguminosarum* S012-A2, M1, Z25, 240b, 250b, 1078, 0622 oraz *Bradyrhizobium japonicum* wykazano wprowadzić pozytywny wpływ stosowania ich jako biopreparatów w uprawie roślin motylkowatych, jednakże wysoka specyficzność zjawiska symbiozy w odniesieniu do roślin motylkowatych oznacza, że określony szczep bakterii może być symbiontem tylko jednego lub wyjątkowo kilku spośród licznych gatunków roślin motylkowatych [Wilems, Plant Soil, 2006, 287], tak więc z tego powodu powyższe szczepy można użyć tylko i wyłącznie w uprawie grochu lub gatunków bardzo blisko z nim spokrewnionych np. peluszek, wyki.

W przytoczonych opisach patentowych zakłada się wykorzystanie całych i żywych komórek bakteryjnych. Z takim rozwiązaniem wiąże się szereg niedogodności, gdyż stosowanie żywych bakterii wymaga namnażania ich w dużych objętościach, hodowli każdorazowo przed wyprodukowaniem biopreparatu oraz konieczności utrzymywania żywotności bionawozu w okresie od chwili namnożenia bakterii do czasu zastosowania go podczas wysiewu nasion. Trudno jest wówczas zagwarantować, że taki bionawóz będzie zawierał bakteryjne metabolity do zastosowania w każdych warunkach glebowych, istotne i niezbędne dla nawiązania wydajnej symbiozy pomiędzy rizobiami a roślinami. Ponadto szczepy wprowadzone do środowiska muszą konkurować z populacjami autochtonicznymi w procesach kolonizacji ryzosfery i kolonizacji brodawek, a to dodatkowo zmniejsza ich korzystne działanie jako bionawozu.

Celem wynalazku było opracowanie bionawozu do zastosowania w uprawie wielu roślin motylkowatych, w każdych warunkach glebowych, ułatwiającego w dużym stopniu nawiązanie symbiozy roślin z bakteriami autochtonicznymi w celu zredukowania nieprzyswajalnego azotu atmosferycznego do wykorzystywanego przez rośliny azotu amonowego, a także sposobu otrzymywania tego bionawozu na skalę przemysłową.

Nieoczekiwanie, w trakcie badań nad szczepami rizobium występującymi w glebach lessowych, wyizolowano i zidentyfikowano nowy szczep bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09, a następnie zbadano jego metabolity - czynniki Nod, w kierunku morfogenetycznych właściwości dla komórek i tkanek roślinnych.

Zaskakujące rezultaty otrzymano w trakcie wprowadzania do środowiska kiełkowania nasion i wzrostu roślin motylkowych metabolitów nowego szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09 indukowanych pod wpływem związków flawonoidowych, izolowanych z kiełkujących nasion grochu.

Wyniki badań wykorzystano do opracowania nowego bionawozu stymulującego kiełkowanie i wzrost roślin motylkowatych, a zwłaszcza grochu, a także sposobu otrzymywania tego bionawozu.

Istotą wynalazku jest nowy szczep bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09, zdeponowany w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie za

numerem 04/01/2010 do zastosowania w otrzymywaniu bionawozu stymulującego kiełkowanie i wzrost roślin motylkowatych, a także sposób otrzymywania tego bionawozu.

Bionawóz, według wynalazku charakteryzuje się tym, że jego czynnikiem aktywnym są metabolity nowego szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09, numer dep. 04/01/2010, będące chitolipooligosacharydami - czynnikami Nod, indukowanymi w komórkach bakteryjnych pod wpływem związków flawonoidowych, wyizolowanych z kiełkujących nasion grochu.

Potraktowanie nasion grochu preparatem zawierającym czynniki Nod powoduje zwiększenie liczby brodawek na korzeniach grochu, co skutkuje lepszą kolonizacją korzeni przez symbiotyczne rizobia, redukujące azot do formy przyswajalnej przez rośliny.

Optymalna dawka czynników Nod w preparacie, określona została w granicach 10^{-10} - 10^{-12} M na 1 l wody.

Sposób otrzymywania bionawozu dla roślin motylkowych według wynalazku charakteryzuje się tym, że do nowego szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09 nr dep. 04/01/2010, wyhodowanego do miana w granicach od 5×10^8 do 5×10^9 na 1 ml płynnego podłoża, korzystnie w pożywce TY i z wytrząsaniem, dodaje się przygotowany i oznaczony znanymi sposobami wyciąg flawonoidowy wyizolowany z kiełkujących nasion grochu aż do uzyskania stężenia końcowego w danej objętości hodowli w granicach od 5 do 15 μ M, po czym hodowlę kontynuuje się w niezmiennych warunkach, przez co najmniej 2 doby, a uzyskane metabolity nowego szczepu bakterii jako czynniki Nod odwirowuje się, korzystnie duże obroty ok. 10 tys. obr./min i poddaje ekstrakcji z płynu pohodowlanego za pomocą n-butanolu, a następnie znanymi metodami oznacza się ich stężenie w celu sporządzenia wodnego roztworu bionawozu.

Tak uzyskane czynniki Nod działają w bardzo niskich stężeniach, co umożliwia otrzymanie stosunkowo dużej ilości bionawozu z niewielkiej objętości hodowli. Ich trwałość jest znacznie wyższa niż żywych komórek bakteryjnych, a tym samym łatwiejsze jest ich przechowywanie do czasu sporządzania bionawozu z wykorzystaniem go podczas siewu roślin motylkowych.

Biorąc pod uwagę powszechne występowanie szczepów *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* w polskich glebach, otrzymywany według wynalazku

bionawóz może być powszechnie stosowanym zamiennikiem azotowych nawozów sztucznych w ekologicznych uprawach roślin motylkowych.

W przykładach wynalazku zostały przedstawione badania nad identyfikacją nowego szczepu *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09 nr dep. 04/01/2010, a także badania potwierdzające obecność czynników Nod w płynie pochodzonym z tego szczepu bakterii, indukowanych wyciągiem flawonoidowym z kiełkujących nasion grochu. Przedstawiono również badania określające optymalną dawkę biopreparatu i sposoby otrzymywania bionawozu.

Przykład 1. Badania w kierunku izolacji i selekcji nowego szczepu.

Szczep *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09 pochodzi z gleby lessowej, z Felina k. Lublina - 51.226345, 22.635612. Szczep wyizolowano znanymi metodami z brodawki korzeniowej grochu *Pisum sativum* cv. Ramrod.

Z gleby wykopywano korzenie grochu będącego w fazie kwitnienia. Korzenie myto i wyjałowiano powierzchniowo za pomocą 0,1% HgCl_2 a następnie 70% etanolu. Z korzeni odcinano brodawki korzeniowe i pobierano znajdujące się wewnątrz tkanki roślinne zawierające bakterie. Bakterie wysiewano na płytki Petriego z pożywką 79CA zestaloną 1,4% agaru i pasażowano do etapu otrzymania czystych kultur z pojedynczych kolonii. Otrzymano 14 szczepów *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, które następnie zbadano pod kątem ich właściwości symbiotycznych.

Miernikiem aktywności symbiotycznej szczepu były: świeża masa roślin, sucha masa roślin oraz liczba brodawek tworzonych na korzeniach grochu. Rośliny hodowano w pojemnikach zawierających 600 g płukanego i jałowego piasku, który jednorazowo nasączono płynną bezazotową pożywką Fahreusa w ilości 150 ml. Do tak przygotowanych pojemników wysiewano nasiona grochu, wyjałowione powierzchniowo w 0,1% roztworze HgCl_2 a następnie 70% etanolu, po czym zakażano je zawiesinami szczepów rizobiowych o gęstości optycznej równej 0,1 mierzonej przy długości fali 550 nm. Liczba roślin przypadająca na pojemnik wynosiła 5 sztuk, a doświadczenie przeprowadzono w 3 powtórzeniach. Rośliny hodowano przez 6 tygodni, podlewając je jałową wodą destylowaną 3

razy w tygodniu. Wykorzystywano światło dzienne uzupełnione oświetleniem sztucznym (14/10 godz. dzień/noc, 24/19°C). Po sześciu tygodniach rośliny zebrano, zważono oraz policzono brodawki korzeniowe.

Tabela 1. Właściwości symbiotyczne badanych szczepów *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

Symbol szczepu	Zielona masa rośliny ^a (g)	Sucha masa rośliny ^a (g)	Liczba brodawek / roślinę ^a
GR01	3,34 ± 0,72	0,44 ± 0,12	34,8 ± 15,6
GR02	3,07 ± 1,15	0,45 ± 0,16	30,3 ± 14,6
GR03	3,36 ± 0,95	0,49 ± 0,12	27,4 ± 7,5
GR04	3,98 ± 0,91	0,55 ± 0,15	22,0 ± 7,8
GR05	3,38 ± 1,86	0,49 ± 0,27	20,6 ± 9,7
GR06	3,95 ± 1,45	0,55 ± 0,23	19,0 ± 9,6
GR07	3,84 ± 1,41	0,56 ± 0,18	25,6 ± 5,3
GR08	4,30 ± 1,26	0,68 ± 0,20	31,3 ± 8,9
GR09	4,31 ± 1,69	0,73 ± 0,30	38,8 ± 10,3
GR10	3,70 ± 1,25	0,62 ± 0,28	35,6 ± 15,6
GR11	3,65 ± 1,30	0,51 ± 0,22	35,3 ± 19,6
GR12	3,42 ± 0,63	0,39 ± 0,13	33,7 ± 12,6
GR13	3,32 ± 0,90	0,43 ± 0,13	34,7 ± 11,7
GR14	3,54 ± 1,36	0,51 ± 0,19	34,3 ± 16,4
Groch nie zakażony rizobiami (kontrola)	3,45 ± 0,73	0,47 ± 0,13	0

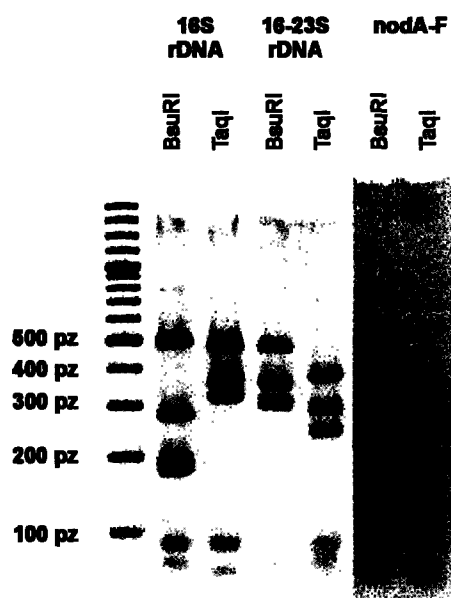
^a średnia ± SD

Przedstawione w tabeli mierniki aktywności symbiotycznej badanych szczepów *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* wskazują, że nowy szczep *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* oznaczony symbolem GR09 charakteryzuje się względnie wysokimi wartościami wszystkich trzech badanych parametrów, co przesądza o jego wyborze do produkcji metabolitów wspomagających symbiozę i stymulujących wzrost roślin motylkowatych.

Przykład 2. Genetyczna identyfikacja nowego szczepu GR09.

Do identyfikacji *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* używano trzech markerów genetycznych: genu 16S rDNA, regionu międzygenowego 16-23S rDNA oraz genu *nodD* wraz z sąsiadującymi regionami międzygenowymi.

Region 16-23S rDNA amplifikowano z całkowitego DNA *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09 z zastosowaniem primerów FGPS1490-5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3' i FGPL132'-5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3' [Laguerre i wsp., Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 2029-2036], region *nodA-F* za pomocą primerów NBA12-5'-GGATSGCAATCATCTAYRGMRTGG-3' i NBF12-5'-GGATCRAAAGCATCCRCASATGG-3' [Laguerre i wsp., Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 2029-2036], natomiast region 16S rDNA za pomocą primerów 16S63f-5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' i 16S1387r-5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3' [Marchesi i wsp., Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64]. Otrzymane fragmenty o długości ok. 1200 pz trawiono endonukleazami *Bsu*RI lub *Taq*I. Otrzymane fragmenty restrykcyjne rozdzielano elektroforetycznie na 3% żelu agarozowym w buforze TBE, prowadząc elektroforezę przez 3 godz. przy napięciu 7 V/cm (Rys. 2). Przedstawiony wynik (wzorzec restrykcyjny wybranych i amplifikowanych regionów genetycznych) jest powtarzalny, więc metoda PCR-RFLP pozwala na szybką identyfikację szczepu *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09.



Rys. 2

Zamplifikowane techniką PCR markery genetyczne 16S rDNA oraz 16-23S rDNA (warunki amplifikacji jak opisane wyżej) poddano sekwencjonowaniu. Wyniki przedstawiono poniżej.

Sekwencja genu 16S rDNA *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09:

ttcatgcactcgagttgcagagtgcgaatccgaactgagatggcttttggagatta
gctcacactcgctgctcgctgccc
actgtcaccaccattgtagcacgtgtgtagcccagycgtaagggccatgaggac
ttgacgtcatccccaccttcctctc
ggcttatcaccggcagtcctccttagagtgcccaactgaatgctggcaactaaggg
cgaggggttgcgctcggttgcgggact
taacccaacatctcacgacacgagctgacgacagccatgcagcacctgtgtccc
gtccccgaagggaaccttgcatctc
tgcaagtagccgggcatgtcaagggctggtaaggttctgcgcggttgcttcgaatt
aaaccacatgctccaccgcttgctgc
gggcccccgtaattcctttgagttttaatcttgcgaccgtactccccaggcgga
atgtttaatgcgttagctgcgccac
cgaacagtatactgcccagcggttaacattcatcgctttacggcggtggactaccag
ggtatctaatactgctttgctcccc
cgctttcgcacctcagcgctcagtaatggaccagtgagccgccttcgccactggg
ttcctccgaatatctacgaatttca
cctctacactcggaattccactcacctcttccatactccagatcgacagtatcaa
aggcagttccagggttgagccctgg
gatttcacccctgactgatcgatccgcctacgtgcgctttacgcccagtaattcc
gaacaacgctagcccccttcgtatt
accgcggtgctggcacgaagttagccggggcttcttctccggataaccgtcatta
tcttctccgggtgaaagagctttaca
accctagggccttcactcacgcggcatggctggatcaggccttgcgccattg
tccaatattccccactgctgcctcc
cgtaggagtttgggcccgtgtctcagtcaccaatgtggctgatcatcctctcagacc
agctatggatcgctgccttgstagg
cctttacccccaccaactagctaatacaacgcgggctcatccttgaccgataaatc
tttctcccgaaggacacatacggta
ttagcacaagtttccctgcgcttattccgtagtcaagggtagattcccacgcgtta
ctcacccgctc

sekwencja regionu 16S-23S rDNA *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09:

cttggactggtagacgaccttccgacaagtctttgacttgtctcgaggtatgaac
cttcccgtgctttttagaacataga
tggcaccagtcaggtgaccatcgaaacgtaatacgccgcatgacttcgggtcacg
acgggtatggcgagctttcgccgtcc
acgtttctctttcttcaaaaggatatcgaaacctgggtttgcgctcgcgcgctgt
tcgcaccttcgggtgctgcgctccgc
gagggcgccggacgaccggcgacggcctctggcctgtatggcgggctctttctga
ggttttgctcaggttaggcgtcaac
gcagagagatgggcccgtagctcagttgggttagagcacacgcttgataagcgtgg
ggtcggaagttcaagtccttcccggg

```
cccaccatttgcaccggcaaatgaggtttgctgtagcgaattgtggtttgtttgg  
gtttacctgatcctggcggtttgct  
gtcaggtgtttgcgatgggtggggctgtagctcagctgggagagcacctgctttg  
caagcaggggggtcagcggttcgatc  
ccgctcagctccaccaattcgcttgggtgctgagactgagagatatcctttgaaga  
aataaaagttttgcaccggcttcga  
gctggtgcgtgttctgcatacattgtgaagagaagattgatctggaggcttccag  
gtgttgtgggttttgcctatgatgt  
ccgagcccagttcctgtgaaaccatggatggcctagccggccggatgtggtggag  
ggattggaggtaggttaggaagcttg  
tcgctctggatcgtccagcgtaaaccgcgtagcggtttatcgcggtgttgttcgtt  
gcctttgggcatcgtctgacggacg  
atcggattaccgttgctgaccgcgcggtatcggatccaatctcgagaagctggt  
cttaagacaggctgcaagcgagctg  
ctcggcgtagctccaataaagcagacctgtcgaacacgttaatggcattgttggg  
ttgactgggttgtaaaaggtaacct  
ggctgttggcgttccttatggagcgagcaacgagatgatgagcattgrcaatga  
gaacgattaagtgtcgtgaagggcat  
ttggtggatgccttggcatgcacaggcgatgaaggacgtgatacgctgcgaaaag  
ccgtggggagc
```

Otrzymany wynik w postaci ciągu opisującego 2 sekwencje DNA jest charakterystyczny i powtarzalny, co pozwala na dokładną identyfikację szczepu *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09.

Przykład 3. Ilościowe oznaczenie poziomu syntezy czynników Nod w biopreparacie metodą chromatografii gazowej.

Ponieważ główny szkielet czynnika Nod zbudowany jest z 3-5 reszt N-acetylo-D-glukozaminy badania oparto na analizie ilościowej aminocukrów. Poszczególne rodzaje czynników Nod różnią się jedynie dodatkowymi podstawnikami.

Do 250 µg suchej próbki zawierającej czynniki Nod, otrzymane w drodze indukcji flawonoidowej szczepu GR09, dodano 30 µg wzorca - GalNAc, a następnie hydrolizowano w 1 ml kwasu trójfluorooctowego - TFA w temperaturze 120 °C przez 2 godziny. TFA wyeliminowano z próby poprzez dwukrotne przemycie wodą dejonizowaną i wysuszenie pod N₂. Wolne kwasy tłuszczowe usunięto dodając 0,5 ml 10% heksanu (v/v). Procedurę powtórzono trzykrotnie. Próbkę redukowano dodając szczyptę NaBH₄ i inkubując w ciemności w 0 °C przez 12 godzin. Następnie próbkę poddano acetylacji dodając

25 µl Ac₂O i 50 µl pirydyny a potem inkubacji w 85 °C przez 30 minut. Próbkę suszono pod N₂, zawieszono w 10–15 µl chloroformu i poddano analizie GC .

Stężenie czynników Nod w mieszaninie określono na wartość 260 nM poprzez pomiar pola powierzchni pików otrzymanych dla N-acetylo-D-glukozaminy oraz uwzględnieniu, że na jedną cząsteczkę czynnika Nod przypadają średnio 4 reszty cukrowe.

Przykład 4. Określenie optymalnej dawki biopreparatu w doświadczeniach laboratoryjnych - wpływ czynnika aktywnego biopreparatu (czynników Nod) na kiełkowanie grochu.

Nasiona grochu wyjałowiano 0,1% sublimatem i 70% alkoholem etylowym. Preparat czynników Nod rozcieńczono w jałowej wodzie do stężeń w granicach 10⁻⁹ do 10⁻¹³M. Nasiona moczono w preparacie (1 ml na 1 nasiono) przez 30 minut. Kontrolę stanowiły nasiona moczone w jałowej wodzie. Następnie nasiona umieszczano w płaskich plastikowych pudełkach z podłożem Fahreusa (1% agaru) w ilości 10 sztuk na pudełko. Dla każdego stężenia czynników Nod przygotowano 15 powtórzeń. Pudełka zawijano w folię aluminiową i ustawiano w pozycji pionowej. Po 3 i 4 dobach liczono ilość skielkowanych nasion oraz mierzono długość kiełków.

Tabela. 2.

stężenie czynnika Nod (M)	liczba skielkowa- nych nasion (%)	długość korzenia (mm)	liczba skielkowa- nych nasion (%)	długość korzenia (mm)
	3 dzień		4 dzień	
kontrola	76a	13,9b	87a	27,7b
10 ⁻⁹	81a	10,3a	88a	22,7a
10 ⁻¹⁰	82a	14,3b	93b	26,7b
10 ⁻¹¹	85a	15,1b	97b	28,4b
10 ⁻¹²	85a	13,2b	96b	25,9b
10 ⁻¹³	83a	11,2a	95b	23,9a

Wartości są średnią ± SD ze 150 roślin w każdej grupie. Wartości w tej samej kolumnie oznaczone taką samą literą nie różnią się w sposób statystycznie istotny (P<0,05) w teście Tukeya (ANOVA).

Przykład 5. Określenie optymalnej dawki biopreparatu w doświadczeniach laboratoryjnych - wpływ biopreparatu na wzrost grochu w warunkach sterylnych.

Nasiona grochu wyjałowiano jak w przykładzie 4, a następnie pikowano po 5 sztuk do pojemników zawierających 600 g płukanego i jałowego piasku

nasączonego przed wysianiem nasion 50 ml płynnej pożywki Fahreusa z dodatkiem 5 mM KNO₃. Dla każdego rozcieńczenia czynników Nod przygotowano po 10 pojemników po 50 roślin. Po sześciu tygodniach rośliny usunięto z pojemników, a następnie zważono ich pędy i korzenie.

Tabela. 3.

stężenie czynnika Nod (M)	czas kiełkowania (dni)	świeża masa pędu (g)	świeża masa korzeni (g)	sucha masa pędu (g)	sucha masa korzeni (g)
kontrola	5,0 ± 0,4a	0,77 ± 0,21a	0,96 ± 0,21a	0,15 ± 0,06a	0,15 ± 0,02a
10 ⁻⁹	4,1 ± 0,9a	0,69 ± 0,41a	0,66 ± 0,4a	0,13 ± 0,03a	0,12 ± 0,09a
10 ⁻¹⁰	4,2 ± 0,3a	0,95 ± 0,19a	1,08 ± 0,14a	0,12 ± 0,02a	0,15 ± 0,06a
10 ⁻¹¹	3,4 ± 0,5b	1,48 ± 0,33b	1,38 ± 0,52b	0,26 ± 0,04b	0,18 ± 0,09b
10 ⁻¹²	4,0 ± 0,3a	0,87 ± 0,09a	0,96 ± 0,25a	0,15 ± 0,03a	0,15 ± 0,05a
10 ⁻¹³	4,8 ± 0,4a	0,65 ± 0,4a	0,66 ± 0,38a	0,11 ± 0,02a	0,11 ± 0,06a

Wartości są średnią ± SD z 50 roślin w każdej grupie. Wartości w tej samej kolumnie oznaczone tą samą literą nie różnią się w sposób statystycznie istotny (P<0,05) w teście Tukeya (ANOVA).

Przykład 6. Wpływ biopreparatu na wzrost grochu w warunkach niesterylnego doświadczenia wazonowego.

Doświadczenie przeprowadzono w Stacji Doświadczeń Wegetacyjnych Instytutu Nawożenia, Uprawy i Gleboznawstwa w Puławach. Nasiona grochu pikowano po 3 sztuki do wazonów Mitcherlicha wypełnionych 7 kg gleby (2:1 mieszanina piasku i gleby gliniastej). Wazony podlewano tak, aby utrzymać wilgotność gleby na poziomie ok 60% pojemności wodnej. Groch hodowany był w wazonach przez 6 tygodni w maju i czerwcu 2009. Założono 2 grupy doświadczalne:

1. Nasiona moczone przez 30 min w wodzie (1 ml na 1 nasiono)
2. Nasiona moczone przez 30 minut w roztworze czynników Nod (~10⁻¹¹ M) w objętości jak wyżej

Dla każdej grupy doświadczalnej wykonano 5 powtórzeń (5 wazonów), co w sumie dało 15 roślin grochu na grupę. Wyniki przedstawiono w tabeli.

Tabela. 4.

grupa	liczba brodawek	świeża masa pędu (g)	sucha masa pędu (g)	liczba strąków
bez czynnika Nod	61,6±7a	71,6±5,3a	11±0,6a	8,6±0,6a
z czynnikiem Nod	102,6±23,6b (wzrost o 67%)*	90±8b (wzrost o 25%)*	13±1,3b (wzrost o 18%)*	12±1,6b (wzrost o 39%)*

Wartości są średnią ± SD z 15 roślin w każdej grupie. Wartości w tej samej kolumnie oznaczone różnymi literami różnią się w sposób statystycznie istotny (P<0,05) w teście Tukeya (ANOVA).

* w stosunku do wiersza powyżej

Wyniki badań przedstawione w przykładach 4, 5 i 6 pozwalają stwierdzić, iż najbardziej aktywna dawka czynników Nod w preparacie, zawiera się w granicach 10^{-10} - 10^{-12} M na 1 litr wody.

Przykład 7. Sposób otrzymywania bionawozu.

Etap 1. Przygotowanie wyciągu flawonoidowego z kiełkujących nasion grochu.

Okolo 100 sztuk nasion wyłuskiwano powierzchniowo wstrząsając po 3 min. kolejno w 0,1% roztworze HgCl_2 , a po dwukrotnym przepłukaniu jałową wodą, w 70% etanolu. Powtórnie nasiona płukano jałową wodą, po czym wytrząsano przez 4 dni / 120 obr./min/, w ciemności i temp. 28 °C, stosując 1 ml sterylnej wody na 1 nasiono. Następnie usuwano skielkowane nasiona, a z supernatantu ekstrahowano związki flawonoidowe za pomocą octanu etylu w stosunku objętościowym do płynu pohodowlanego 1:10. Po odparowaniu octanu etylu osad zawierający flawonoidy rozpuszczono w 50 ml 95% etanolu i przechowywano w 4 °C. W tak otrzymanym wyciągu oznaczono ilość flawonoidów susząc 1 ml ekstraktu etanolowego i ważąc pozostałą suchą masę. Ilość flawonoidów określono w odniesieniu do masy molowej czystego izoflawonu.

Etap 2. Do szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09, wyhodowanego do miana 5×10^8 na 1 ml, na płynnym podłożu TY z wytrząsaniem, dodawano przygotowany wyciąg flawonoidowy, o stężeniu wyjściowym 5 mM, aż do uzyskania 5 μM stężenia końcowego na 1 l objętości hodowli. Hodowlę kontynuowano w niezmienionych warunkach przez 48 godzin, a uzyskane metabolity - czynniki Nod odwirowywano, przy obrotach ok. 10 tys. obr./min i poddawano ekstrakcji z płynu pohodowlanego za pomocą n-butanolu. Następnie metodą analizy aminocukrów chromatografii gazowej (GC), oznaczano stężenie czynników Nod w wyjściowym roztworze n-butanolowym i sporządzano roztwór wodny o stężeniu czynników Nod w granicach 10^{-10} - 10^{-12} M/l wody, gotowy do zastosowania w uprawie roślin motylkowatych.

Czynniki Nod jako metabolity bakteryjne nowego szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* GR09 działają w bardzo niskich stężeniach, co umożliwia otrzymanie stosunkowo dużej ilości bionawozu z niewielkiej objętości hodowli. Ich trwałość jest znacznie wyższa niż żywych komórek

bakteryjnych, a tym samym łatwiejsze jest ich przechowywanie do czasu sporządzania bionawozu z wykorzystaniem go na określonym etapie wegetacji roślin motylkowych.

Biorąc pod uwagę powszechne występowanie szczepów *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* w polskich glebach, otrzymywany według wynalazku bionawóz może być powszechnie stosowanym zamiennikiem azotowych nawozów sztucznych w ekologicznych uprawach roślin motylkowych.

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
pl. Marii Curie-Skłodowskiej 5
20-031 LUBLIN

PROREKTOR


prof. dr hab. Ryszard Dębicki