



UNIWERSYTET MARIII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
W LUBLINIE

Wydział Biologii i Biotechnologii

Magdalena Aneta Kopycińska

Rola egzopolisacharydu w adaptacji bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* do warunków stresowych wywołanych obecnością jonów cynku

(The role of exopolysaccharide in adaptaion of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* to zinc stress)

Rozprawa doktorska

wykonana w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii

Promotor: prof. dr hab. Monika Janczarek

Promotor pomocniczy: dr hab. Jolanta Cieśla

Lublin, 2020

*Chciałabym złożyć serdeczne podziękowania **prof. dr hab. Monice Janczarek** oraz **dr hab. Jolancie Cieśli** za powierzenie ciekawego tematu pracy, opiekę merytoryczną, przekazaną wiedzę oraz pomoc w przygotowywaniu niniejszej pracy*

Dziękuję również wszystkim Pracownikom, Koleżankom i Kolegom z Katedry Genetyki i Mikrobiologii za życzliwość i miłą atmosferę podczas realizacji badań.

Najbliższym dziękuję za wsparcie i wiarę.

Badania eksperymentalne wchodzące w skład niniejszej pracy były częściowo finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki, w ramach projektu "Mechanizmy adaptacyjne *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* do warunków stresu środowiskowego i w symbiozie z koniczyną" (nr DEC-2012/07/B/NZ1/00099, konkurs OPUS, kierownik projektu prof. dr hab. Monika Janczarek).

Część wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie opublikowano w artykule:
Kopycińska, M., Lipa, P., Cieśla, J., Kozieł, M. & Janczarek, M. (2018). Extracellular polysaccharide protects *Rhizobium leguminosarum* cells against zinc stress in vitro and during symbiosis with clover. *Environmental Microbiology Reports*. 10(3), 355–368.
(IF= 2,874; Pkt_{MNiSW}=35)

Spis treści

1. Streszczenie.....	11
2. Abstract	13
3. Wstęp.....	15
3.1. Wprowadzenie	15
3.2. Metale ciężkie w glebie	18
3.3. Charakterystyka cynku i jego rola w przyrodzie	21
3.3.1. Znaczenie biologiczne cynku dla mikroorganizmów	22
3.3.2. Znaczenie biologiczne cynku u roślin	25
3.4. Charakterystyka ryzobiów	27
3.5. Polisacharydy powierzchniowe produkowane przez ryzobia.....	30
3.5.1. Egzopolisacharyd.....	31
3.5.2. Lipopolisacharyd	35
3.5.3. Polisacharyd kapsularny	37
3.5.4. Cykliczne β -glukany.....	38
3.5.5. Glukomannan	39
3.5.6. Celuloza	40
3.5.7. Polisacharyd żelujący	40
3.6. Czynniki abiotycznego stresu środowiskowego i mechanizmy adaptacyjne ryzobiów	41
3.6.1. Osmotyczność.....	42
3.6.2. Temperatura.....	42
3.6.3. Wartość pH.....	43
3.6.4. Zasolenie.....	44
3.6.5. Zawartość składników odżywczych	45
3.6.6. Metale ciężkie.....	46
3.6.6.1. Synteza polisacharydów zewnątrzkomórkowych jako mechanizm obronny bakterii.....	48
3.6.6.2. Systemy aktywnego transportu metali	49
3.6.6.3. Geny oporności na metale ciężkie.....	50
3.6.6.4. Inne mechanizmy obronne bakterii przed metalami ciężkimi	51
3.7. Biotechnologiczne zastosowanie ryzobiów oraz EPS w ochronie środowiska i bioremediacji	52
3.7.1. Degradacja związków organicznych przez ryzobia.....	52

3.7.2.	Remediacja metali ciężkich	53
3.7.3.	Udział ryzobiów w fitoremediacji	55
3.7.4.	Zastosowanie biotechnologiczne egzopolisacharydów syntetyzowanych przez ryzobia	56
4.	Hipoteza i cel pracy	58
5.	Materiały i metody	59
5.1.	Materiały	59
5.1.1.	Szczepy bakteryjne	59
5.1.2.	Odczynniki	60
5.1.2.1.	Odczynniki do oznaczania przeżywalności komórek bakteryjnych	60
5.1.2.2.	Odczynniki do izolacji oraz oznaczenia stężenia polisacharydów	60
5.1.2.3.	Odczynniki do oznaczenia ilości tworzonego biofilmu oraz wizualizacji jego struktury	60
5.1.2.4.	Odczynniki do izolacji białek wewnątrzkomórkowych oraz peryplazmatycznych	61
5.1.2.5.	Odczynniki do oznaczenia aktywności katalazy oraz dysmutazy nadmanganowej	61
5.1.2.6.	Odczynniki do oznaczenia hydrofobowości komórek bakteryjnych	61
5.1.2.7.	Odczynniki do oznaczenia właściwości fizykochemicznych komórek bakteryjnych	62
5.1.2.8.	Odczynniki do doświadczeń roślinnych	62
5.1.3.	Podłoża do hodowli bakterii oraz roślin	62
5.2.	Metody	64
5.2.1.	Hodowla szczepów <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	64
5.2.2.	Określenie przeżywalności komórek <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	64
5.2.3.	Oznaczenie ilości tworzonego biofilmu	65
5.2.4.	Określenie struktury biofilmów z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej	65
5.2.5.	Izolacja polisacharydów ryzobiowych	66
5.2.5.1.	Izolacja egzopolisacharydu (EPS)	66
5.2.5.1.1.	Izolacja frakcji wysokocząsteczkowej EPS	66
5.2.5.1.2.	Izolacja frakcji niskocząsteczkowej EPS	66
5.2.5.2.	Izolacja polisacharydu żelującego (GPS)	66
5.2.5.3.	Izolacja polisacharydu kapsularnego (CPS)	67
5.2.5.4.	Izolacja cyklicznych β -glukanów	67

5.2.6.	Oznaczenie ilości polisacharydów produkowanych przez szczepy <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	67
5.2.7.	Określenie zdolności migracji szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	68
5.2.8.	Oznaczenie zdolności szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> do autoagregacji	68
5.2.9.	Pomiar oddychania komórkowego szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	68
5.2.10.	Otrzymywanie frakcji białek cytoplazmatycznych i peryplazmatycznych <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	69
5.2.10.1.	Izolacja białek cytoplazmatycznych.....	69
5.2.10.2.	Izolacja białek peryplazmatycznych	69
5.2.11.	Oznaczenie stężenia białka metodą Bradford	70
5.2.12.	Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej.....	70
5.2.13.	Oznaczenie aktywności katalazy	71
5.2.14.	Badanie właściwości fizykochemicznych komórek szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	72
5.2.14.1.	Oznaczenie ruchliwości elektroforetycznej komórek bakterii z wykorzystaniem laserowej elektroforezy dopplerowskiej.....	72
5.2.14.2.	Określenie charakteru kwasowo-zasadowego komórek szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	73
5.2.14.3.	Pomiar kątów zwilżania oraz wyznaczenie swobodnej energii powierzchniowej.....	74
5.2.15.	Oznaczenie hydrofobowości komórek szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	74
5.2.16.	Określenie wydajności wiązania jonów Zn^{2+} przez EPS wyizolowany z hodowli szczepu Rt24.2.....	75
5.2.17.	Doświadczenia roślinne	76
5.2.17.1.	Jałowienie nasion koniczyny łąkowej (<i>Trifolium pratense</i>)	76
5.2.17.2.	Określenie wpływu jonów cynku na kiełkowanie koniczyny łąkowej ..	76
5.2.17.3.	Adhezja komórek <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> do korzeni koniczyny ..	76
5.2.17.4.	Testy probówkowe	77
5.2.18.	Analizy statystyczne	78
6.	Wyniki.....	79
6.1.	Określenie wpływu jonów Zn^{2+} na własności fenotypowe szczepów <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> różniących się poziomem syntezy EPS	79
6.1.1.	Wpływ jonów Zn^{2+} na przeżywalność i wzrost <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> ..	79

6.1.2.	Wpływ jonów Zn^{2+} na poziom syntezy EPS przez <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	84
6.1.3.	Wpływ jonów Zn^{2+} na poziom syntezy innych polisacharydów (GPS, CPS oraz CG) przez szczepy <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	87
6.1.4.	Wpływ jonów Zn^{2+} na wytwarzanie biofilmu przez szczepy <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	89
6.1.5.	Wpływ jonów Zn^{2+} na agregację komórek <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	93
6.1.6.	Wpływ jonów Zn^{2+} na ruchliwość komórek <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	94
6.1.7.	Wpływ jonów Zn^{2+} na wydajność oddychania komórkowego szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	97
6.1.8.	Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz katalazy (CAT)	99
6.2.	Charakterystyka właściwości powierzchniowych komórek <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> poddanych działaniu jonów cynku	101
6.2.1.	Wpływ jonów Zn^{2+} na charakter kwasowo-zasadowy powierzchni komórek badanych szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	101
6.2.2.	Wpływ jonów Zn^{2+} na ruchliwość elektroforetyczną komórek bakterii <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	103
6.2.2.1.	Wpływ stężenia $ZnSO_4$ na ruchliwość elektroforetyczną komórek bakterii <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	104
6.2.2.2.	Wpływ jonów Zn^{2+} i fazy wzrostu bakterii na ruchliwość elektroforetyczną komórek szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	106
6.2.2.3.	Wpływ jonów Zn^{2+} oraz wartości pH podłoża hodowlanego na ruchliwość elektroforetyczną komórek szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	108
6.2.3.	Wpływ jonów Zn^{2+} na hydrofobowość komórek <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	110
6.2.4.	Wpływ jonów Zn^{2+} na zwilżalność oraz powierzchniową energię swobodną komórek szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	110
6.3.	Wpływ jonów Zn^{2+} na symbiozę <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> z koniczyną łąkową (<i>Trifolium pratense</i>)	114
6.3.1.	Wpływ jonów cynku na kiełkowanie koniczyny łąkowej (<i>Trifolium pratense</i>)	114
6.3.2.	Wpływ jonów Zn^{2+} na adhezję komórek <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> do korzeni koniczyny łąkowej	116
6.3.3.	Wpływ jonów Zn^{2+} na symbiozę <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> z koniczyną łąkową (<i>Trifolium pratense</i>)	118
6.4.	Charakterystyka procesu sorpcji jonów Zn^{2+} przez EPS wyizolowany z hodowli szczepu Rt24. <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	123

7. Dyskusja 125

8. Podsumowanie i wnioski..... 141

9. Bibliografia..... 144

10. Spis rycin 168

11. Spis tabel 173

12. Aneks – życiorys naukowy..... 175

Wykaz skrótów stosowanych w pracy:

ABC	ATP-binding cassette , kasetta wiążąca ATP
Ac	acetyl group , reszta acetylowa
ASA	Atomic Absorption Spectrometry , Absorpcyjna Spektrometria Atomowa
ASP	acid shock protein , białka szoku kwasowego
ATP	adenosine triphosphate , adenzyno-5'-trifosforan
AZT	azidothymidine ,azydotymidyna
BNF	Biological Nitrogen Fixation , biologiczne wiązanie azotu
CA	contact angle , kąt zwilżania
CDF	cation diffusion faciliator , transporter ułatwiający dyfuzję kationów
CFU	colony forming unit , jednostka bakteryjna tworząca kolonię
CG	cyclic glucans , cykliczne glukany
CPS	capsular polysaccharide , polisacharyd kapsułarny
CSP	cold shock protein , białka szoku zimna
DMSO	dimethyl sulfoxide , dimetylosulfotlenek
DNA	deoxyribonucleic acid , kwas deoksyrybonuklinowy
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid , kwas etylenodiaminotetraoctowy
EM	electrophoretic mobility , ruchliwość elektroforetyczna
EPS	exopolysaccharide , egzopolisacharyd
Fur	ferric uptake regulator , regulator wychwyty żelaza
Gal	galactose , galaktoza
Glc	glucose , glukoza
GlcA	glucuronic acid , kwas glukuronowy
GPS	gel-forming polysaccharide , polisacharyd żelujący
HMW	high molecular weight , forma wysokocząsteczkowa
HSP	heat shock protein , białka szoku cieplnego
IAA	indole-3-acetic acid , kwas indoliloctowy
IRT	iron-regulated transporter , transporter jonów żelaza
Kdo	3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid , kwas 3-deoksy-D- <i>manno</i> -okt-2-ulozonowy
Kdx	1-carboxy-2-keto-3-deoxy sugar , 1-karboksy-2-keto-3-deoksy cukier
Km	kanamycin , kanamycyna
LDE	Laser Doppler Electrophoresis , laserowa dopplerowska elektroforeza
LMW	low molecular weight , forma niskocząsteczkowa

LPS	lipopolysaccharide , lipopolisacharyd
Man	mannose , mannoza
MIC	minimum inhibitory concentration , minimalne stężenie powodujące inhibicję
mRNA	messenger RNA , informacyjny RNA
NF	Nod factor , czynnik Nod
NFR	Nod factor receptor , receptor czynnika Nod
NPS	neutral polysaccharide , polisacharyd neutralny, glukomannan
Nx	nalidixic acid , kwas naldyksowy
OD	optical density , gęstość optyczna
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbons , policykliczne węglowodory aromatyczne
PALS	Phase Analysis Light Scattering , analiza fazowa światła rozpraszanego
PCB	polychlorinated biphenyl , polichlorowane bifenyle
PGPR	plant growth promoting rhizobacteria , bakterie glebowe promujące wzrost roślin
ppm	parts per milion , liczba części na milion
pSym	plazmid symbiotyczny
Pyr	pyruvyl group , reszta pirogronianowa
Rha	rhamnose , ramnoza
Rif	rifampicin , ryfampicyna
RNA	ribonucleic acid , kwas rybonukleinowy
rpm	revolutions per minute , obroty na minutę
SFE	surface free energy , swobodna energia powierzchniowa
SOD	superoxide dismutase , dysmutazonadtlenkowa
Suc	succinyl group , reszta bursztynylowa
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride , chlorowodorek trishydroksometyloaminometanu
VSS	volatile suspended solids , lotne zawiesiny
ZIP	ZRT/IRT-like protein , transporter jonów dwuwartościowych
ZRT	zinc-regulated transporter , transporter jonów cynku
Zur	zinc uptake regulator , regulator wychwytu cynku

1. Streszczenie

Rośliny bobowate (*Fabaceae*) są organizmami odgrywającymi istotną rolę w życiu człowieka. Stanowią one bogate źródło białka, służą jako nawozy naturalne oraz polepszają żyzność gleb. W warunkach niedoboru azotu rośliny bobowate są zdolne do nawiązywania symbiozy z bakteriami glebowymi, które w procesie tzw. biologicznego wiązania azotu (ang. Biological Nitrogen Fixation, BNF), przekształcają wolny azot atmosferyczny w formy amonowe dostępne dla roślin. Do najważniejszej grupy mikroorganizmów zdolnej do przeprowadzania BNF należą bakterie z rodziny *Rhizobiaceae*, zwanymi powszechnie ryzobiami.

Na symbiozę pomiędzy roślinami bobowatymi a ryzobiami wpływa wiele czynników środowiskowych, takich jak: temperatura, pH, zasolenie gleby, potencjał oksydoredukcyjny oraz jony metali ciężkich. Wśród tych czynników najgroźniejszym w kontekście zanieczyszczenia środowiska oraz zdrowia człowieka są metale ciężkie, których obecność w glebie spowodowana jest głównie stale postępującą industrializacją oraz urbanizacją. Akumulacja metali ciężkich w roślinach uprawnych prowadzi do zahamowania ich wzrostu oraz symbiozy z bakteriami wiążącymi azot. Na szczególną uwagę zasługuje tutaj cynk, który w stężeniach fizjologicznych pełni rolę mikroelementu i jest niezbędny do prawidłowego rozwoju oraz funkcjonowania, zarówno roślin, jak i ryzobiów. Natomiast jego stężenie przekraczające zapotrzebowanie organizmów na ten pierwiastek prowadzi do zaburzeń w procesach metabolicznych zachodzących w komórkach. W konsekwencji może dochodzić do ich śmierci. Aby przetrwać niekorzystne warunki oraz zachować zdolność do nawiązywania interakcji symbiotycznych z roślinami, ryzobia wykształciły szereg mechanizmów obronnych, z których do najważniejszych należy zdolność produkcji oraz sekrecji do otoczenia znacznej ilości polisacharydu (EPS). Polimer ten stanowi naturalną barierę chroniącą bakterie wolnożyjące przed niekorzystnymi warunkami panującymi w glebie, a także jest niezbędnym czynnikiem umożliwiającym nawiązanie symbiozy z gospodarzem roślinnym. Co więcej, właściwości EPS dają możliwość na wykorzystanie ryzobiów w różnych technikach remediacyjnych, takich jak bioremediacja, czy też jako organizmy wspomagające wzrost roślin (ang. plant growth promoting rhizobacteria, PGPR).

Dotychczas nie przeprowadzono kompleksowych badań dotyczących wpływu jonów cynku na własności fenotypowe oraz symbiotyczne ryzobiów, a także niewiele jest informacji na temat roli, jaką może pełnić EPS w ochronie tych bakterii przed stresem wywołanym obecnością metali ciężkich w glebie. Dlatego też, przedmiotem badań opisanych w niniejszej rozprawie było ustalenie roli tego polimeru w adaptacji bakterii

Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii* do stresu środowiskowego wywołanego obecnością jonów cynku oraz przeprowadzenie szczegółowej charakterystyki wpływu jonów Zn^{2+} na komórki ryzobiów i układ symbiotyczny ryzobia-rośliny bobowate, a także określenie wydajności biosorpcji tych jonów przez cząsteczki EPS.

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły stwierdzić, że obecność jonów Zn^{2+} negatywnie wpływa na wiele procesów fizjologicznych oraz własności fenotypowych komórek ryzobiów, ale również stymuluje ich mechanizmy ochronne. Wykazano, że jony cynku hamują wzrost badanych mikroorganizmów oraz wpływają negatywnie na ich przeżywalność, jak również powodują obniżenie ruchliwości i wydajności oddychania komórek ryzobiów. Ustalono, że spośród testowanych bakterii, najbardziej odporne na szkodliwe działanie cynku okazały się być szczepy, które produkowały zwiększoną ilość EPS [Rt24.2(pBA1) i Rt24.2(pBR1)] w porównaniu do szczepu dzikiego (Rt24.2). Ponadto, zaobserwowano, że obecność jonów Zn^{2+} w środowisku wzrostu stymuluje bakterie do zwiększonej produkcji EPS i innych polisacharydów powierzchniowych, tworzenia większej ilości biofilmu, a także działa na wzrost aktywności enzymów komórkowych odpowiedzialnych za usuwanie wolnych rodników. Stwierdzono także, że wpływ czynnika stresowego na właściwości fizykochemiczne komórek bakterii, szczególnie na ich ruchliwość elektroforetyczną, zależy od ilości syntetyzowanego EPS, fazy wzrostu bakterii, liczby martwych komórek oraz stężenia jonów cynku i pH środowiska. Wyniki badań pokazały również, że obecność jonów Zn^{2+} istotnie obniża efektywność symbiozy szczepów ryzobiowych z koniczyną łąkową, działając negatywnie zarówno na mikrosymbionta, jak i gospodarza roślinnego. Zauważono, że szczepy nadprodukcujące EPS charakteryzowały się dużo lepszą adhezją do korzeni koniczyny oraz efektywnością symbiozy. Analizy mające na celu określenie wydajności biosorpcji jonów cynku przez EPS wyizolowany ze szczepu Rt24.2 wykazały, że polimer ten posiada dobre właściwości sorpcyjne.

Podsumowując, w niniejszej pracy wykazano, że EPS pełni kluczową rolę w adaptacji wolnożyjących bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do warunków stresowych wywołanych obecnością jonów cynku, jak również podczas ich symbiozy z koniczyną łąkową. Nadprodukcja EPS zapewnia ryzobiom skuteczniejszą adaptację do warunków stresowych, a także zwiększa możliwość ich zastosowania w procesach remediacji. Co więcej, dobre właściwości sorpcyjne EPS dają możliwość zastosowania go w biotechnologii, jako polimeru wydajnie wiążącego jony Zn^{2+} .

Słowa kluczowe: symbioza ryzobia-rośliny bobowate, metale ciężkie, cynk, egzopolisacharyd

2. Abstract

Legumes (*Fabaceae*) are organisms that play an important role in human life. They are a rich source of protein, serve as natural fertilizers and improve soil fertility. Under nitrogen deficiency, legumes are capable of establishing symbiosis with soil bacteria, which transform free atmospheric nitrogen into ammonium (forms available to plants) in the process of so-called Biological Nitrogen Fixation (BNF). The most important group of microorganisms capable of carrying out BNF are bacteria from the *Rhizobiaceae* family, commonly called rhizobia.

The symbiosis between legumes and rhizobia is affected by many environmental factors, such as temperature, pH, soil salinity, oxidoreductive potential and heavy metal ions. The most dangerous among them, in the context of environmental pollution and human health, are heavy metals. Their presence in soil is mainly caused by constantly progressing industrialization and urbanization. The accumulation of heavy metals in crops leads to inhibition of their growth and symbiosis with nitrogen-fixing bacteria. The element that deserves special attention is zinc. On the one hand, in physiological concentrations it plays the role of a micronutrient and it is necessary for the proper development and functioning of both plants and rhizobia. On the other hand, its concentration exceeding the organism's demand leads to disorders in cellular metabolic processes, which may result in their death. To survive adverse conditions and preserve the ability to establish symbiotic interactions with plants, rhizobia has developed a number of defensive mechanisms. The most important among them is the ability to produce and release a significant amount of polysaccharide (EPS) to the environment. This polymer is a natural barrier that protects free-living bacteria against unfavorable soil conditions. It is also an essential factor enabling symbiosis with the plant host. Moreover, the properties of EPS create the opportunity to use rhizobia in various remediation techniques, such as bioremediation, or as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR).

Thus far, no comprehensive research has been conducted into the effects of zinc ions on the phenotypic and symbiotic properties of rhizobia. Not much is known about the contribution of EPS in protecting these bacteria from heavy metal stress. Therefore, the purpose of the experiments described in this dissertation was to determine the role of this polymer in the adaptation of the bacterium *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* to environmental stress caused by the presence of zinc ions. A detailed characterization of the effect of Zn^{2+} ions on rhizobia cells and the rhizobia-legumes symbiosis was conducted.

Additionally, the efficiency of biosorption of these ions by EPS molecules was determined. The conducted experiments showed that the presence of Zn^{2+} ions negatively affects many physiological processes and phenotypic properties of rhizobia cells, but also stimulates their protective mechanisms. Zinc ions have been shown to inhibit the growth of the studied microorganisms and negatively affect their survival rate, as well as reduce the mobility and efficiency of rhizobia cell respiration. Among the tested bacteria, the strains that produced an increased amount of EPS [Rt24.2 (pBA1) and Rt24.2 (pBR1)] proved to be the most resistant to the harmful effects of zinc compared to the wild strain (Rt24.2). In addition, it has been observed that the presence of Zn^{2+} ions in the growth environment stimulates bacteria to increase the production of EPS and other surface polysaccharides, form larger amounts of biofilm, and also increase activity of cellular enzymes responsible for the removal of free radicals. The presence of this stress factor causes a variety of changes in the physicochemical properties of the bacterial cell, especially in electrophoretic mobility, dependingly on the amount of EPS synthesized, the phase of bacterial growth, the number of dead cells as well as the concentration of zinc ions and the pH of environment. Additionally, Zn^{2+} ions reduce effectiveness of the symbiosis between rhizobial strains and clover, negatively affecting both microsymbiont and plant host. It was observed that strains overproducing EPS were characterized by much better adhesion to clover roots and the efficiency of symbiosis. The EPS isolated from the Rt24.2 strain showed good ability to sorb Zn^{2+} ions.

Summarizing, EPS plays a key role in the adaptation of the free-living bacteria *R. leguminosarum* bv. *trifolii* to stress conditions caused by the presence of zinc ions, as well as during their symbiosis with clover. Overproduction of EPS by rhizobia increases the effectiveness of their adaptation to stress conditions, and also applicability in the remediation processes. Moreover, good sorption properties of EPS make it potentially useful in biotechnology.

Key words: *Rhizobium*-legumes symbiosis, heavy metals, zinc, exopolysaccharide

3. Wstęp

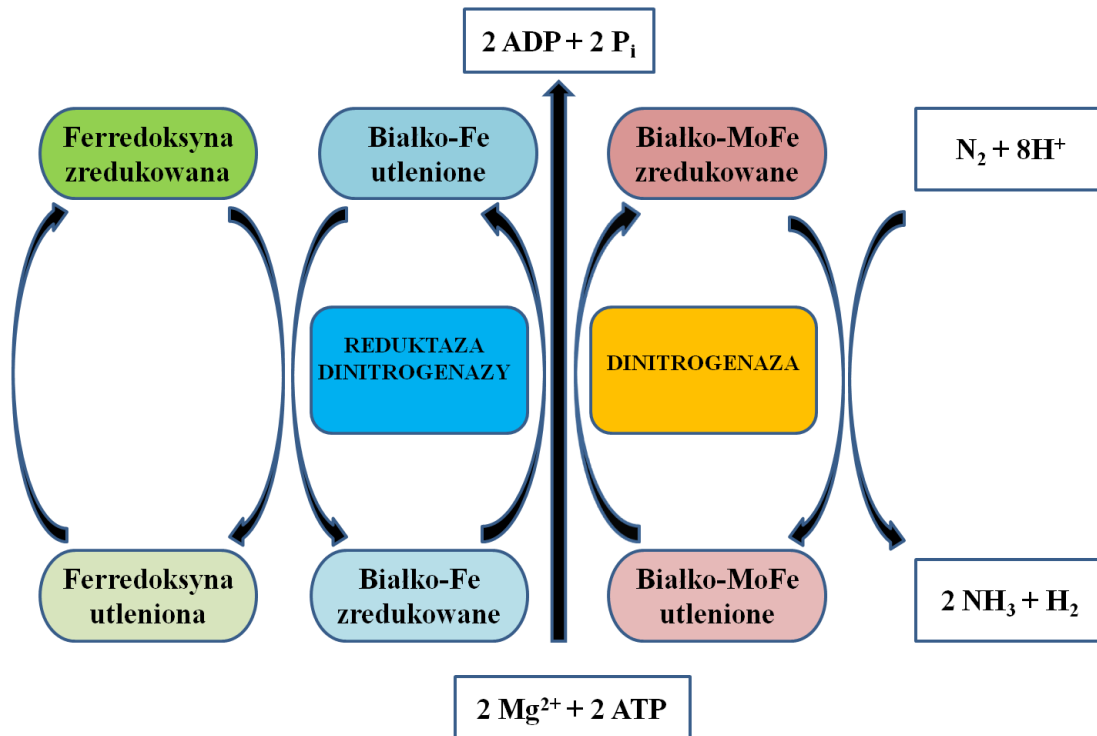
3.1. Wprowadzenie

Problem zanieczyszczenia środowiska glebowego, ze względu na zagrożenie jakie stanowi dla zdrowia człowieka, skupia coraz większą uwagę naukowców na całym świecie. Nieustannie rozwijający się przemysł oraz wzmożone zabiegi urbanizacyjne są główną przyczyną uwalniania do środowiska naturalnego toksycznych odpadów chemicznych, pestycydów oraz związków metali ciężkich. Spośród nich, największy problem stanowią metale ciężkie, które są istotnym czynnikiem ograniczającym wykorzystanie gleb w produkcji rolniczej, a także, poprzez ich akumulację w roślinach, negatywnie wpływają na zdrowie człowieka.

Metale ciężkie znacząco oddziałują również na bytujące w środowisku glebowym mikroorganizmy, działając negatywnie na ich wzrost, przeżywalność oraz bioróżnorodność. Wśród mikroorganizmów glebowych dużą grupę stanowią bakterie z rodziny *Rhizobiaceae* (np. rodzaje: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* i *Bradyrhizobium*), zwane ogólnie ryzobiami, których charakterystyczną cechą jest zdolność nawiązywania symbiozy z roślinami bobowatymi (*Fabaceae*).

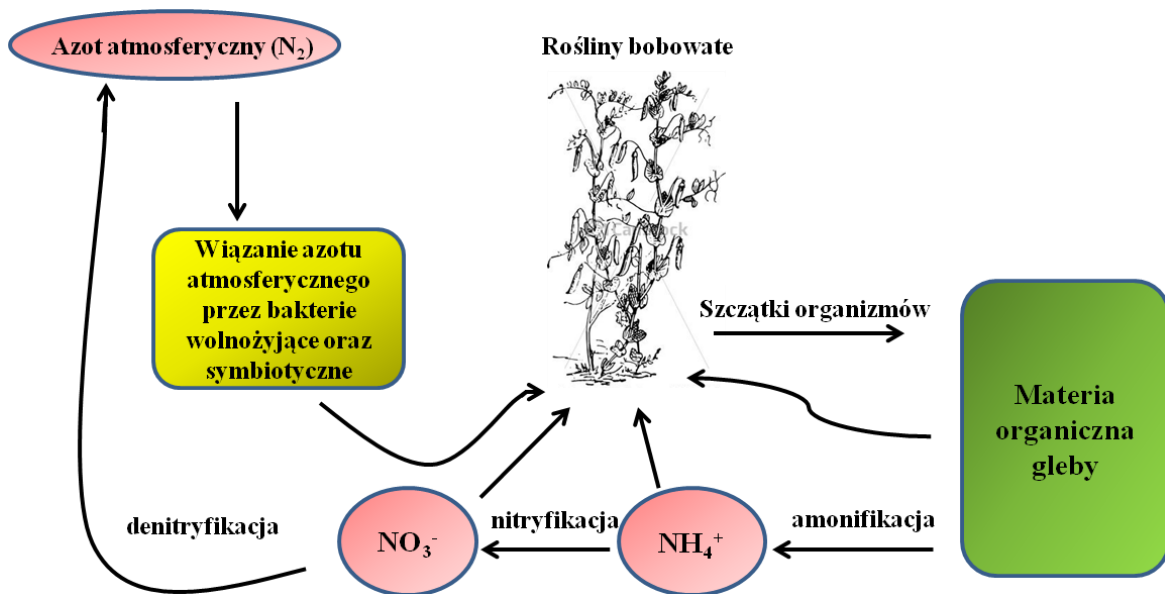
Ryzobia stanowią zróżnicowaną grupę bakterii Gram-ujemnych, które wykorzystując enzymatyczny kompleks nitrogeazy, są zdolne do redukcji azotu atmosferycznego do form amonowych przyswajalnych dla roślin (Ryc. 1) [Downie, 2010].

KOMPLEKS ENZYMATYCZNY NITROGENAZY



Ryc. 1 Schemat działania kompleksu enzymatycznego nitrogenazy [opracowanie własne na podstawie publikacji Rees i Howard, 2000].

Proces ten, nazywany biologicznym wiązaniem azotu (Biological Nitrogen Fixation, BNF), jest bardzo wydajny. Szacuje się, że dostarcza on rocznie około 200 mln ton azotu do globalnego obiegu tego pierwiastka w przyrodzie [Zahran, 1999; Graham i Vance, 2000; Santi i in., 2013]. Azot uzyskany na tej drodze stanowi prawie połowę związków azotowych wprowadzanych do środowiska. Jest to zatem alternatywa dla powszechnie używanych w rolnictwie mineralnych nawozów azotowych. Oddziaływania jakie zachodzą pomiędzy ryzobiami a ich gospodarzami roślinnymi są więc ważne, zarówno z ekonomicznego, jak i ekologicznego punktu widzenia. Dzięki zdolności do wiązania azotu ryzobia wspomagają wzrost roślin bobowatych, które są grupą roślin o dużym znaczeniu użytkowym (należą do nich np. groch, koniczyna, fasola, soja, soczewica, bób), a także przyczyniają się do wzbogacenia gleby w składniki odżywcze, co zwiększa jej żyzność oraz poprawia warunki bytowania organizmów w niej żyjących (Ryc. 2).



Ryc. 2 Obieg azotu w przyrodzie [schemat opracowany na podstawie publikacji Adamczyk i Godlewski, 2010].

Na nawiązanie efektywnej symbiozy pomiędzy ryzobiami a odpowiednim makrosymbiontem mają wpływ warunki panujące w glebie. Wolnożyjące mikroorganizmy (przed znalezieniem partnera symbiotycznego) są narażone na działanie różnych czynników biotycznych i abiotycznych, mogących ograniczać ich rozwój oraz przeżywalność [Zaidi i in., 2012]. Dlatego też, ryzobia w toku ewolucji wykształciły szereg mechanizmów adaptacyjnych umożliwiających im przystosowanie się do trudnych warunków środowiskowych. Dotychczasowe dane literaturowe sugerują, że kluczowym elementem biorącym udział w adaptacji ryzobiów do stresu środowiskowego jest egzopolisacharyd (EPS) – polimer produkowany przez te bakterie w dużej ilości i wydzielany na zewnątrz komórki. Heteropolimer ten tworzy warstwę, luźno związaną z powierzchnią komórki, która stanowi pierwszą linię obrony przed szkodliwymi czynnikami oraz substancjami hamującymi wzrost bakterii [Mandal i in., 2007].

3.2. Metale ciężkie w glebie

Zanieczyszczenie środowiska glebowego powodowane jest m.in. nadmiarem, nieumiejętnym stosowaniem lub/i źle dobranym składem nawozów i środków ochrony roślin ale także obecnością różnych odpadów chemicznych, zawierających związki metali ciężkich. Źródłem tych związków są przede wszystkim ścieki, wody kopalniane i nawozy [Dragović i in., 2008; Fergusson i Kim, 1991; Adelekan i Abegunde, 2011, Cortez i in., 2010], a także naturalne procesy, takie jak erupcje wulkanów czy wietrzenie minerałów [Kimball i in., 2010].

Przyjmuje się, że metalami ciężkimi są te o gęstości wyższej niż $4,5 - 5 \text{ g cm}^{-3}$ [Holleman i Wiberg, 1985]. Ich toksyczność jest zróżnicowana i zależy w głównej mierze od rodzaju metalu, formy występowania oraz stężenia w jakim występują w środowisku. W pracy Ociepa-Kubickiej i Ociepa [2012] zaproponowano podział metali ciężkich na te o potencjalnie bardzo wysokim (np. Cd, Hg, Pb, Zn), wysokim (np. Mo, Mn, Fe, Se), średnim (np. Ni, Co, V, W) oraz niskim (np. Sr, Zr, Nb, Ta) zagrożeniu dla środowiska.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wiele spośród jonów metali ciężkich pełni jednocześnie ważne funkcje w komórkach wszystkich organizmów żywych (Tab. 1).

Do pierwiastków takich zaliczamy, między innymi: miedź, cynk, mangan czy żelazo, które w niskich stężeniach pełnią funkcję mikroelementów. Wchodzą one w skład wielu enzymów, biorą udział w stabilizacji struktury białek i ściany komórkowej, są kofaktorami reakcji chemicznych, a także uczestniczą w utrzymywaniu równowagi osmotycznej w komórce oraz zachodzących w niej reakcjach oksydoredukcyjnych [Kosolapov i in., 2004]. Z drugiej strony, nawet te pierwiastki, jeżeli znajdują się w organizmie w stężeniach przekraczających biologiczne zapotrzebowanie komórek, mogą wywoływać zmiany niepożądane. Przykładem może być cynk, który u mikroorganizmów zaangażowany jest w podziały komórkowe, syntezę białek oraz metabolizm lipidów, cukrów i kwasów nukleinowych [Collins, 1981], natomiast w wyższych stężeniach ogranicza ich wzrost [Wani i Khan, 2011]. Większość metali ciężkich nie odgrywa jednak żadnej roli w prawidłowym funkcjonowaniu organizmów (np. kadm, ołów) a ich akumulacja w komórkach powoduje np. zmiany specyficzności enzymów, prowadzi do uszkodzeń DNA oraz śmierci komórki [Bruins i in., 1999].

Tab. 1 Znaczenie biologiczne wybranych mikroelementów oraz skutki ich niedoboru u różnych organizmów żywych [opracowanie własne na podstawie prac: Farago, 1994; Zoroddu i in., 2019].

Mikroelement	Znaczenie biologiczne	Skutki niedoboru
Bor	<p><u>U roślin:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • składnik ściany komórkowej roślin • udział w metabolizmie kwasów nukleinowych, biosyntezie ligniny oraz w regulacji gospodarki węglowodanowej <p><u>U ludzi i zwierząt:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • regulacja metabolizmu, wzrostu i rozwoju tkanki kostnej 	<p><u>U roślin:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • upośledzenie wzrostu • zaprzestanie wytwarzania nasion <p><u>U ludzi i zwierząt:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • osłabienie zdolności uczenia się • demineralizacja kości
Chrom	<p><u>U ludzi i zwierząt:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • udział w regulacji metabolizmu glukozy • wzmaganie działania insuliny • obniżenie poziomu cholesterolu 	<p><u>U ludzi i zwierząt:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • zaburzenia gospodarki lipidów i białek • hipercholesterolemia • możliwy rozwój cukrzycy
Cynk	<p><u>U roślin:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • regulacja równowagi kwasowo-zasadowej • udział w metabolizmie azotowym • uczestnictwo w syntezie hormonów roślinnych (auksyny) <p><u>U ludzi i zwierząt:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • uczestnictwo w biosyntezie białek, węglowodanów i lipidów • składnik wielu enzymów (polimeraza RNA, dysmutaza nadadtlenkowa typu Cu/Zn, anhydraza węglanowa), udział w replikacji DNA oraz ekspresji genów 	<p><u>U roślin:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • zahamowanie wzrostu i rozwoju • chloroza i skarlłowacenie liści • przedwczesne opadanie liści i kwiatów, skrócenie międzywęźli <p><u>U ludzi i zwierząt:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • zaburzenia biosyntezy białek i kwasów nukleinowych • niedokrwistość
Kobalt	<p><u>U roślin:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • jako składnik ureazy – udział w reakcjach enzymatycznych roślin bobowatych <p><u>U ludzi i zwierząt:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • składnik witaminy B₁₂ (kobalaminy) • udział w biosyntezie hemoglobiny 	<p><u>U roślin i bakterii:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • zahamowanie rozwoju bakterii brodawkowych i procesu wiązania azotu przez rośliny bobowate <p><u>U ludzi i zwierząt:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • anemia i zaburzenia krzepnięcia krwi • zaburzenia biosyntezy białek i kwasów nukleinowych
Mangan	<p><u>U roślin:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • aktywator oraz składnik enzymów biorących udział w fotosyntezie oraz w metabolizmie azotowym <p><u>U ludzi i zwierząt:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • składnik dysmutazy nadadtlenkowej typu MnSOD • aktywator wielu hydrolaz i karboksylaz (np. arginazy) • zwiększenie asymilacji miedzi • udział w metabolizmie białek i węglowodanów 	<p><u>U roślin:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • łamliwość pędów oraz usychanie liści • chloroza <p><u>U ludzi i zwierząt:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • zaburzenia oddychania komórkowego • zahamowanie wzrostu • spowolnienie metabolizmu glukozy

Mikroelement	Znaczenie biologiczne	Skutki niedoboru
Miedź	<u>U roślin:</u> <ul style="list-style-type: none"> składnik enzymów fotosyntetycznych udział w biosyntezie chlorofilu <u>U ludzi i zwierząt:</u> <ul style="list-style-type: none"> składnik i aktywator wielu enzymów (Cu/ZN SOD, oksydaza cytochromowa, ceruloplazmina) udział w syntezie kolagenu, adrenaliny, melaniny składnik hemocyjaniny 	<u>U roślin:</u> <ul style="list-style-type: none"> chloroza utrata turgoru <u>U ludzi i zwierząt:</u> <ul style="list-style-type: none"> zaburzenia biosyntezy białek strukturalnych zaburzenia oddychania komórkowego anemia
Molibden	<u>U roślin:</u> <ul style="list-style-type: none"> udział w biosyntezie witaminy C <u>U ludzi i zwierząt:</u> <ul style="list-style-type: none"> składnik niektórych enzymów flawinowych (oksydazy ksantynowej, nitrogenezy, reduktazy azotanowej) udział w metabolizmie zasad azotowych i detoksyfikacji ksenobiotyków 	<u>U roślin:</u> <ul style="list-style-type: none"> Chloroza <u>U ludzi i zwierząt:</u> <ul style="list-style-type: none"> zahamowanie wzrostu zaburzenia metabolizmu zasad azotowych
Nikiel	<u>U roślin, ludzi i zwierząt:</u> <ul style="list-style-type: none"> składnik ureazy, dysmutazy ponadtlenkowej typu NiSOD, glikozylazy 	<u>U roślin:</u> <ul style="list-style-type: none"> ograniczony wzrost <u>U ludzi i zwierząt:</u> <ul style="list-style-type: none"> zaburzenia metabolizmu azotu i żelaza
Wanad	<u>U ludzi i zwierząt:</u> <ul style="list-style-type: none"> uczestnictwo w metabolizmie cholesterolu oraz węglowodanów aktywator enzymów uczestniczących w biosyntezie ATP stymuluje produkcję glutationu 	<u>U ludzi i zwierząt:</u> <ul style="list-style-type: none"> zahamowanie wzrostu hipercholesterolemia rozwój cukrzycy i miażdżycy
Żelazo	<u>U roślin:</u> <ul style="list-style-type: none"> składnik enzymów fotosyntetycznych oraz enzymów uczestniczących w wiązaniu azotu atmosferycznego katalizator w biosyntezie chlorofilu <u>U ludzi i zwierząt:</u> <ul style="list-style-type: none"> składnik enzymów oddechowych (cytochromów, peroksydaz, katalazy) udział w biosyntezie hemoglobiny, mioglobiny oraz białek hemowych 	<u>U roślin:</u> <ul style="list-style-type: none"> chloroza liści zaburzenia fotosyntezy <u>U ludzi i zwierząt:</u> <ul style="list-style-type: none"> anemia i hipoksja ograniczenie wzrostu zaburzenia wchłaniania witamin z grupy B

3.3. Charakterystyka cynku i jego rola w przyrodzie

Cynk jest jednym z najczęściej zanieczyszczających środowisko glebowe metali ciężkich. Pod względem chemicznym jest to pierwiastek należący do metali przejściowych z grupy cynkowców. Charakteryzuje go niebieskawoszara barwa, heksagonalna struktura krystaliczna a także wysoka temperatura topnienia oraz wrzenia ($T_t = 419,53 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_w = 907 \text{ }^\circ\text{C}$) [Weast, 1984]. Występuje powszechnie w skorupie ziemskiej, a jego zawartość w skałach wynosi 10-120 ppm. Najczęściej spotykaną formą tego pierwiastka jest siarczek cynku (ZnS) oraz węglan cynku (Na_2CO_3). Cynk tworzy minerały krzemowe, a w środowiskach hipergenicznych i glebowych tworzy jony kompleksowe. Najczęściej występuje w postaci dwuwartościowej (Zn^{2+}), jednak ze względu na amfoteryczny charakter jego tlenków i wodorotlenków, spotykane są również formy anionowe: $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ oraz ZnO^{2-} . Wszystkie związki cynku posiadają wysoką rozpuszczalność, szczególnie w środowiskach kwaśnych, a uwalniane jony tworzą połączenia mineralne oraz organiczno-mineralne o dużej mobilności. Kation Zn^{2+} w glebie może być częściowo sorbowany na powierzchni minerałów ilastych, krzemianów i innych cząstek glebowych, posiadających ujemny ładunek elektryczny, oraz przez materię organiczną, szczególnie kwasy huminowe. Dodatkowe unieruchomienie cynku jest skutkiem wyższych zawartości siarczanów i fosforanów w roztworze glebowym. W określonych warunkach pH oraz wilgotności jony cynku uwalniane są do roztworu glebowego, a stąd łatwo pobierane przez rośliny [Kabata-Pendias, 2002; Ahmad i in., 2012]. Roztwór glebowy zapewnia też jonom Zn^{2+} bezpośredni kontakt z komórkami mikroorganizmów.

Według norm podanych przez Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa z 2012 r., prawidłowa zawartość cynku w glebie wynosi 300 mg kg^{-1} [Siebielec i in., 2012]. Stopień zanieczyszczenia gleby cynkiem jest różny w zależności od regionu, dlatego możemy wyróżnić 6 poziomów klasyfikacji gleb ze względu na jego zawartość (pomiar na głębokości gleby 0 – 20 cm) [Siebielec i in., 2012]:

- 0 – od 50 do 100 mg kg^{-1} – naturalny poziom zawartości cynku w glebie
- I – $100 - 300 \text{ mg kg}^{-1}$ – podwyższony poziom zawartości cynku w glebie
- II – $300 - 1000 \text{ mg kg}^{-1}$ – niskie zanieczyszczenie cynkiem
- III – $1000 - 3000 \text{ mg kg}^{-1}$ – średnie zanieczyszczenie cynkiem
- IV – $3000 - 8000 \text{ mg kg}^{-1}$ – wysokie zanieczyszczenie cynkiem
- V – powyżej 8000 mg kg^{-1} – bardzo wysokie zanieczyszczenie cynkiem

Cynk jest potrzebny do prawidłowego funkcjonowania wszystkich grup organizmów żywych, począwszy od bakterii, poprzez grzyby, rośliny, zwierzęta aż do człowieka, dlatego uznaje się go za jeden z najważniejszych mikroelementów. Jego funkcja biologiczna związana jest przede wszystkim z aktywnością katalityczną, gdyż wchodzi w skład centrów aktywnych ponad 200 enzymów uczestniczących w różnego rodzaju procesach komórkowych, w tym wielu przemianach metabolicznych. Ponadto, pierwiastek ten pełni funkcję strukturalną w białkach regulatorowych i oddziałujących z DNA, będąc ważnym elementem tworzącym tzw. motyw „palca cynkowego” [Fuchs, 2003].

3.3.1. Znaczenie biologiczne cynku dla mikroorganizmów

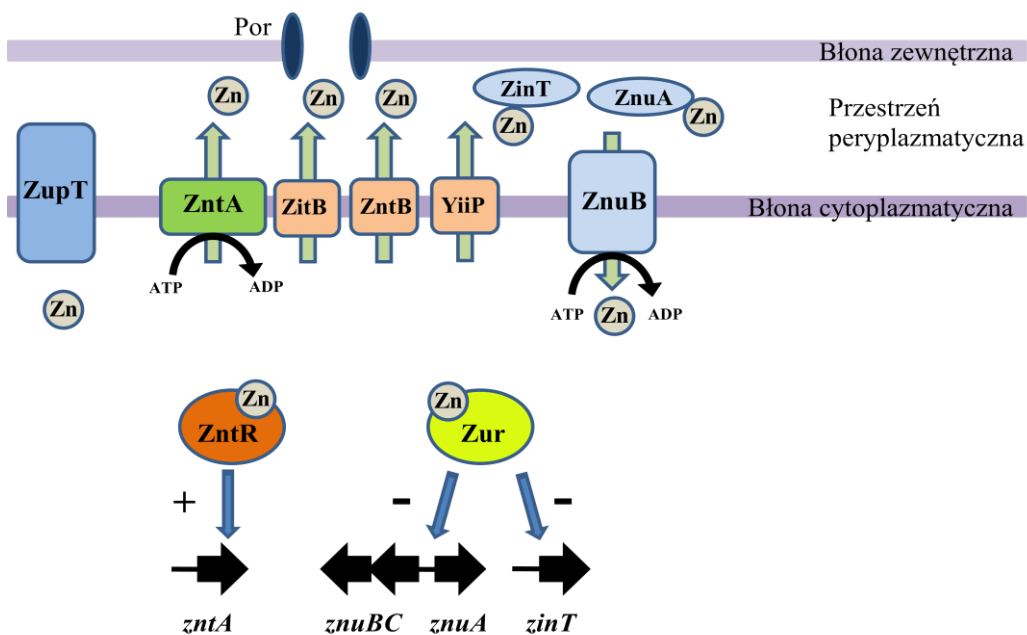
Każda komórka bakteryjna, aby prawidłowo funkcjonować oraz rozwijać się, potrzebuje odpowiedniego stężenia poszczególnych mikroelementów, w tym także cynku. Tak jak w przypadku innych organizmów żywych, cynk jest przede wszystkim składnikiem strukturalnym ogromnej ilości białek oraz centrów aktywnych wielu enzymów [Porcheron i in., 2013].

Przykładem enzymów, w których cynk pełni funkcję strukturalną jest dysmutaza ponadtlenkowa (ang. superoxide dismutase, SOD), katalizująca reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego, czy też anhydraza węglanowa (dehydrataza węglanowa). Pierwiastek ten stanowi też główny składnik domeny białkowej, nazywanej motywem „palca cynkowego”, która występuje przede wszystkim w białkach regulatorowych oraz czynnikach transkrypcyjnych. Struktura „palca cynkowego” jest złożona z kilku występujących po sobie reszt aminokwasowych, w tym histydyny, które tworząc określoną sekwencję, koordynują dwuwartościowe jony cynku. Dzięki temu domena białkowa ma określony kształt i orientację przestrzenną. Motywy te stabilizują również strukturę białka i odpowiadają za jego trwałość, często warunkując tym samym jego funkcję biologiczną w organizmie. Obecność tego motywu wykryto między innymi w globalnym białku regulatorowych RosR u symbiotycznej bakterii *Rhizobium leguminosarum* [Rachwał i in. 2015]. Ponadto, cynk bierze udział w wielu procesach fizjologicznych i metabolicznych bakterii, takich jak biosynteza węglowodanów, białek oraz DNA. Stwierdzono, że niedobór tego metalu wpływa również na wirulencję patogenów bakteryjnych [Hantke, 2005; Zaharik i Finlay, 2004].

U bakterii Gram-ujemnych zidentyfikowano co najmniej kilka białek uczestniczących w homeostazie cynku [Blencowe i Morby, 2003; Hantke, 2005].

W warunkach znacznego niedoboru tego mikroelementu, zapotrzebowanie bakterii na ten metal jest zapewniane poprzez działanie systemu białek o wysokim powinowactwie do jonów Zn^{2+} (ang. high-affinity zinc uptake system) (Ryc. 3). System ten został scharakteryzowany między innymi u *Escherichia coli* oraz *Brucella abortus* [Patzer i Hantke, 1998, 2000]. Składniki tego systemu są kodowane przez geny *znuABC* i należą do rodziny transporterów typu ABC (ang. ATP-binding cassette). Produktami ekspresji tych genów są białka: ZnuA – białko peryplazmatyczne wiążące jony cynku, ZnuB – integralne białko błonowe, które transportuje jony przez błonę cytoplazmatyczną oraz białko ZnuC o funkcji ATP-azy [Berducci i in., 2004; Chandra i in., 2007]. Dodatkowo, w wychwytywaniu jonów cynku ze środowiska bierze udział białko ZinT (wcześniej znane jako YodA) [Kershaw i in., 2007; Graham i in., 2009; Gabbianelli i in., 2011]. Białko ZinT pierwotnie zidentyfikowano jako białko peryplazmatyczne indukowane kadmem [Ferianc i in., 1998], jednakże późniejsze badania wykazały, że białko to wiąże jony cynku [Kershaw i in., 2007; Graham i in., 2009]. Interakcję ZinT z transporterem ZnuABC wykazano m.in. u *Salmonella enterica* [Petrarca i in., 2010]. Choć ZinT nie jest niezbędny podczas eksportu cynku ze środowiska, w którym pośredniczy system ZnuABC u *S. enterica*, to współpraca między ZinT oraz ZnuA zwiększa wydajność pobierania cynku w przypadku poważnego niedoboru tego metalu i może zwiększać przeżywalność komórek bakterii w zmiennych warunkach środowiskowych [Petrarca i in., 2010]. U *E. meliloti* również wykazano, że niedobór cynku indukuje ekspresję genów systemu Znu [Mauchline i in., 2006]. Co ciekawe, stwierdzono że u bakterii z rodzaju *Salmonella* białka ZnuABC są istotne dla ich wirulencji [Ammendola i in., 2007].

Ekspresja genów *znuABC* oraz *zinT* jest regulowana za pośrednictwem białka regulatorowego Zur i jest indukowana przez niedobór cynku. Białko Zur jest regulatorem transkrypcji w rodzinie Fur (regulator wychwyty żelaza, ang. ferric uptake regulator) i działa jako represor ekspresji genów *znuABC* i *zinT*. W warunkach nadmiaru cynku kompleks Zur- Zn^{2+} wiąże się z konserwatywną sekwencją bogatą w AT, znaną jako Zur-box [Panina i in., 2003], która znajduje się w regionie promotora genów wychwytyjących cynk. Powoduje to zahamowanie ekspresji tych genów, co zapobiega nagromadzeniu się zbyt dużej ilości cynku w komórkach [Patzer i Hantke, 2000; Outten i O'Halloran, 2001]. Za usuwanie nadmiaru cynku z komórki odpowiada głównie białko ZntA o aktywności ATP-azy typu P_{1B} , pozytywnie regulowane przez białko ZntR, a także niespecyficzne transportery, takie jak ZntB (rodzina CorA) oraz ZitB i YiiP (rodzina CDF) [Wang i in., 2012].



Ryc. 3 Homeostaza cynku u *S. enterica* [opracowanie własne na podstawie publikacji Bhubhanil i in., 2014].

W homeostazie cynku u bakterii uczestniczą również białka o niskim powinowactwie, takie jak białko ZupT [Grass i in., 2002]. Białko ZupT jest cytoplazmatycznym białkiem błonowym i należy do rodziny ZIP – transporterów jonów metali dwuwartościowych (ang. ZRT/IRT-like protein; ZRT – ang. zinc-regulated transporter; IRT – ang. iron-regulated transporter) [Guerinot, 2000]. Jednak ekspresja *zupT* u *E. coli* nie jest regulowana obecnością metalu lecz ulega konstytutywnej ekspresji [Grass i in., 2005].

Z drugiej strony, nadmiar tego pierwiastka jest toksyczny dla komórek bakterii. Wykazano, że nanocząstki ZnO hamują wzrost *E. coli* (stężenie powyżej 3,4 mM) oraz *Staphylococcus aureus* (powyżej 1 mM) [Reddy i in., 2007]. Przypuszcza się, że jony cynku obecne w wysokim stężeniu przyłączają się do grup sulfhydrylowych białek, co w efekcie prowadzi do ich inaktywacji. Jednocześnie metal ten wywołuje stres oksydacyjny i generuje powstawanie wolnych rodników i reaktywnych form tlenu, które prowadzą do uszkodzeń wielu składników komórkowych i w konsekwencji do śmierci komórek bakteryjnych [Zaidi i in., 2012]. Jony cynku wpływają negatywnie również na pobieranie innych mikroelementów przez bakterie. Doświadczenia przeprowadzone przez McDevitt i in. [2011] wykazały, że nadmiar tego pierwiastka w środowisku hodowli *Streptococcus pneumoniae* prowadzi do niedoborów jonów manganu, poprzez konkurencyjne wiązanie się jonów Zn^{2+} do białka PsaA będącego transporterem jonów

Mn²⁺. Zbyt niskie stężenie manganu w komórkach tych bakterii powodowało ich wolniejszy wzrost oraz większą wrażliwość na komórki układu immunologicznego gospodarza.

3.3.2. Znaczenie biologiczne cynku u roślin

Podobnie jak w przypadku mikroorganizmów, u roślin cynk jest istotnym pierwiastkiem śladowym, który zaangażowany jest w wiele procesów biologicznych zachodzących w tych organizmach. Cynk jest niezbędnym składnikiem wielu białek o funkcjach regulacyjnych i katalitycznych, tworząc strukturę wspomnianego wcześniej motywu „palca cynkowego”. Wchodzi on również w skład centrum aktywnego wielu katalizatorów białkowych, odpowiadających za syntezę, regulację i stabilizację kwasów nukleinowych u roślin (DNA i RNA). Jest ważnym elementem takich enzymów, jak oksydoreduktazy, transferazy czy hydrolazy. Ponadto, pierwiastek ten pełni ważną rolę w syntezie węglowodanów i chlorofilu oraz we wzroście korzeni roślin. Najczęściej występującymi formami tego metalu w glebie są związki cynku w postaci tlenków, siarczków oraz siarczanów, a do wnętrza rośliny dostają się jony Zn²⁺. Biodostępność cynku zależy od wielu czynników środowiskowych, takich jak: całkowite stężenie tego pierwiastka w glebie, zawartość substancji organicznych, rodzaj gleby i jej wartości pH, zasolenie, a także zawartość innych metali. Spośród wymienionych czynników najbardziej istotnym dla biodostępności cynku jest wartość pH gleby. Wyższa wartość pH wpływa negatywnie na efektywność pobierania tego pierwiastka przez rośliny. Jest to spowodowane spadkiem zawartości wymiennego cynku w glebie wraz ze wzrostem jej zasadowości. Przy wartości pH=6,0 dostępność tego pierwiastka jest bardzo niewielka, a dalszy wzrost pH powoduje znaczne zwiększenie powinowactwa cynku względem manganu i tlenków żelaza [Ahmad i in., 2012].

Wysokie stężenia jonów cynku w glebie (powyżej 300 µg g⁻¹) są silnie toksyczne dla roślin [Yadav, 2010], chociaż efekt ich działania zależy od czynników wpływających na biodostępność, rodzaju rośliny oraz jej stadium rozwojowego. Widocznymi objawami nadmiaru Zn²⁺ jest chloroza młodych liści oraz pojawienie się na nich purpurowo-czerwonego zabarwienia (z powodu niedoboru Fe, Mn oraz P). Cynk w nadmiarze jest przez rośliny lepiej przyswajalny niż inne metale, które w normalnych warunkach byłyby przez nie pobierane. Innym objawem toksyczności cynku u roślin jest występowanie miejsc nekrotycznych obecnych pomiędzy żyłkami w blaszce liściowej dojrzałych liści

[Yadav 2010]. Nadmiar cynku w komórkach może prowadzić również do powstawania wolnych rodników i reaktywnych form tlenu, i tym samym negatywnie wpływać na integralność błony komórkowej i jej funkcjonowanie. Toksyczność cynku, podobnie jak innych metali ciężkich, wpływa negatywnie na działanie systemów fotosyntetycznych u różnych gatunków roślin [Vassilev i in., 2011; Mirshekali i in., 2012; Ialelou i in., 2013]. W badaniach przeprowadzonych na fasoli (*Phaseolus* sp.) [Vassilev i in., 2011], sorgo (*Sorghum bicolor* L.) [Mirshekali i in., 2012] oraz dyni (*Cucurbita pepo*) [Ialelou i in., 2013] wykazano, że wysokie stężenia Zn^{2+} obniżają zawartość barwników fotosyntetycznych, takich jak chlorofile a i b, poprzez zaburzenie procesu adsorpcji i translokacji żelaza i magnezu w chloroplastach. Podwyższone stężenie Zn^{2+} powoduje spadek fluorescencji chlorofilu skutkując represją aktywności fotosystemu II (PSII). Dodatkowo, wysoki poziom zawartości jonów cynku wywołuje efekty genotoksyczne w roślinach. Oladele i inni [2013] wykazali, że stężenie cynku w komórkach (100 mg L^{-1}) powoduje zaburzenia podziałów komórkowych w stadium metafazy i przedwczesne rozchodzenie się chromosomów do komórek potomnych, co skutkuje powstawaniem komórek z nieprawidłową liczbą chromosomów. Ponadto, Truta i inni [2013] zaobserwowali, że poziom zaburzeń występujących podczas anafazy i telofazy w komórkach siewek jęczmienia był 2-3 razy wyższy w roślinach traktowanych jonami cynku o stężeniu $250\text{-}500 \mu\text{M}$, niż w przypadku roślin kontrolnych. Z kolei zjawisko niedoboru cynku u roślin występuje najczęściej na glebach zasadowych, piaszczystych oraz bagnistych. Podwyższona zawartość fosforu i miedzi oraz obniżona zawartość azotu w glebie zmniejsza biodostępność cynku, tym samym zwiększając jego niedobór w organizmach roślinnych. Problem z przyswajaniem cynku przez rośliny może również występować w glebach silnie zanieczyszczonych arsenem. Podobnie jak w przypadku nadmiaru cynku, jego niedobór skutkuje wystąpieniem chlorozy na liściach oraz ich skarlłowaceniem. U niektórych roślin mogą wystąpić również miejsca nekrotyczne w obrębie liści [Zhao i in., 2012].

3.4. Charakterystyka ryzobiów

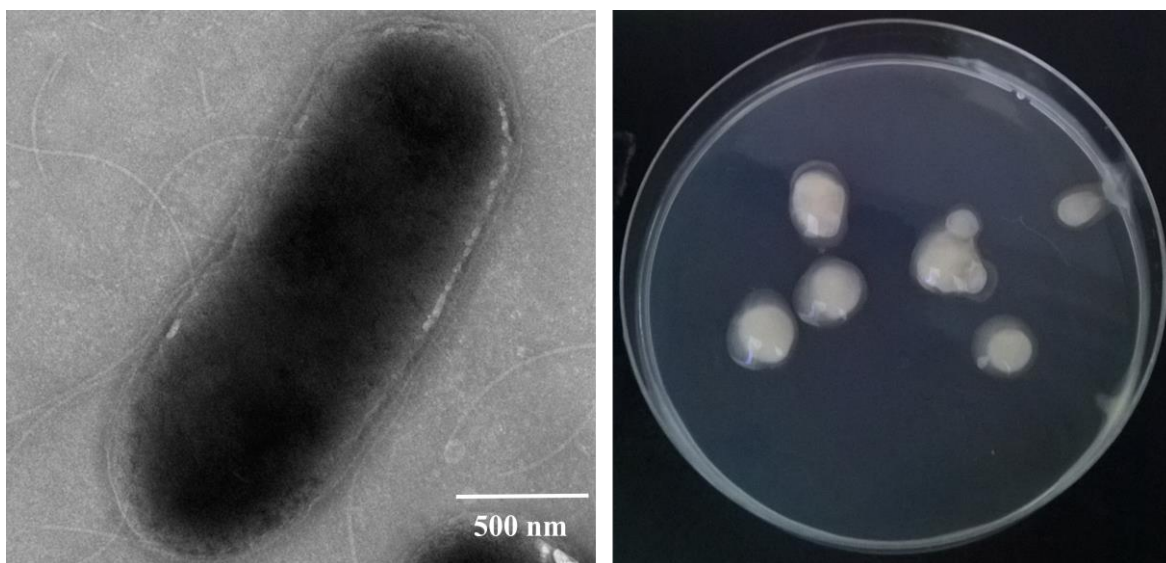
Ryzobia są Gram-ujemnymi bakteriami glebowymi należącymi do α - oraz β -proteobakterii, które ze względu na swoje zróżnicowanie zostały sklasyfikowane w około 100 gatunków zebranych w 13 rodzajów (Tab. 2) [Velázquez i in., 2010; Weir, 2016].

Tab. 2 Taksonomiczny podział bakterii z rodziny *Rhizobiaceae* oraz liczba gatunków w obrębie poszczególnych rodzajów [Velázquez i in., 2010; Weir, 2016].

Klasa	Rodzaj	Liczba gatunków należących do rodzaju	Przykłady gatunków z danego rodzaju
α - proteobakterie	<i>Rhizobium</i>	49	<i>R. alamii</i> , <i>R. etli</i> , <i>R. fabae</i> , <i>R. leguminosarum</i> , <i>R. oryzae</i> , <i>R. phaseoli</i>
	<i>Mesorhizobium</i>	31	<i>M. albiziae</i> , <i>M. ciceri</i> , <i>M. loti</i> , <i>M. mediterraneum</i> ,
	<i>Ensifer</i> (<i>Sinorhizobium</i>)	17	<i>E. fredii</i> , <i>E. medicae</i> , <i>E. meliloti</i>
	<i>Bradyrhizobium</i>	9	<i>B. elkanii</i> , <i>B. japonicum</i> ,
	<i>Phyllobacterium</i>	3	<i>P. trifolii</i>
	<i>Microvirga</i>	3	<i>M. lupini</i>
	<i>Azorhizobium</i>	2	<i>A. caulinodans</i>
	<i>Ochrobactrum</i>	2	<i>O. lupini</i>
	<i>Methylobacterium</i>	1	<i>M. nodulans</i>
	<i>Devosia</i>	1	<i>D. neptuniae</i>
β - proteobakterie	<i>Shinella</i>	1	<i>S. kummerowiae</i>
	<i>Burkholderia</i>	7	<i>B. nodosa</i> , <i>B. tuberum</i>
	<i>Cupriavidus</i>	1	<i>C. taiwanesis</i>

Pod względem morfologicznym ryzobia są średniej wielkości pałeczkami (0,5 – 0,9 μm szerokości i 1,2 – 3,0 μm długości), które nie są zdolne do wytwarzania endospor (Ryc. 4). Na podłożu agarowym tworzą one mlecznobiałe, śluzowate, okrągłe kolonie. Są to chemoautotrofy i aeroby, dla których optymalnymi warunkami wzrostu jest temperatura w zakresie 25-32 °C oraz wartości pH zawarte w przedziale od 6,0 do 8,0 [Somasegaran i Hoben, 1994; Tambalo i in., 2010]. Ryzobia w stanie wolnożyjącym są zdolne do ruchu dzięki obecności rzęsek. Mogą one posiadać jedną rzęskę ułożoną na biegunie komórki

байдь од 2 до 6 ржєсек уложєных пєрытрычалнє. Подчас сымбїозы, на єтапє засєдлєннє бродавєк коржєнїowych, та здолнєсть жєст траcona [Tambalo i in., 2010].

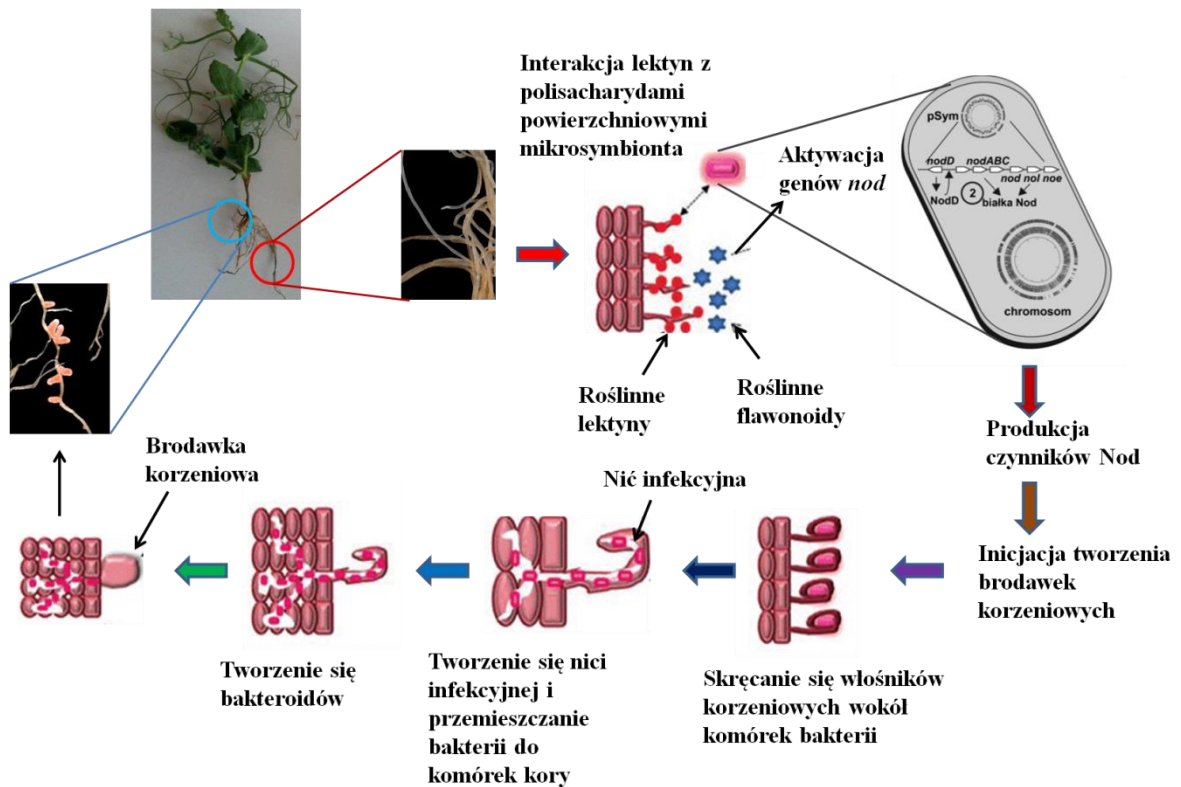


Ryc. 4 Morfologia bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii*; A) zdjєcie z mikroskopu transmisyjnego, B) zdjєcie kolonїї na płytcє z agarem [zdjєcia wlasne].

Ze względu na częste niedobory skłадników odżywczych i mineralnych oraz zmieniające się warunki bytowania, gleba stanowi bardzo wymagające środowisko do wzrostu bakterii. Jest ono zdominowane przez takie gatunki bakterii, jak te z rodziny *Rhizobiaceae*, które posiadają duże oraz złożone genomy. Genomy ryzobiów są wieloczęściowe, składające się z kolistego chromosomu stanowiącego rdzeń (ang. core genome) oraz od jednego do kilku plazmidów (ang. accessory genome), które mogą stanowić 30% - 50% całego genomu [López-Guerrero i in., 2012]. Plazmidy, czyli pozachromosomalne cząsteczki DNA zdolne do autonomicznej replikacji, charakteryzują się dużą heterogennością i zmiennością. Ich obecność w komórkach bakterii przyczynia się do istotnego zwiększenia metabolicznych zdolności ryzobiów, co umożliwia im lepsze przystosowanie do różnych warunków środowiskowych [Wielbo i in., 2010; Mazur i in., 2013]. Geny odpowiedzialne za nawiązywanie symbiozy ryzobiów z roślinami bobowatymi są zazwyczaj ulokowane na jednym plazmidzie, nazywanym plazmidem symbiotycznym (pSym) (np. u bakterii z rodzaju *Rhizobium*) bądź na chromosomie w postaci tak zwanych wysp symbiotycznych (np. u bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium*) [Marczak i in., 2017; Long, 1996; Masson-Boivin i in., 2009]. Oprócz plazmidu pSym, również inne części genomu ryzobiów mogą wpływać na wydajność symbiozy, poprzez kodowanie dodatkowych czynników, takich jak białka i polisacharydy powierzchniowe,

które wpływają na kompetycję bakterii oraz wiązanie azotu [Downie, 2010; Gibson i in., 2008].

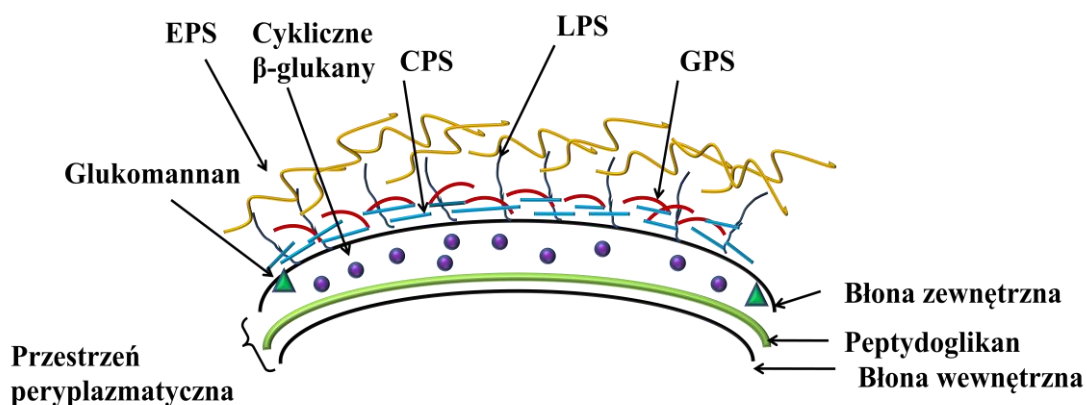
Symbioza pomiędzy ryzobiami a roślinami bobowatymi jest specyficznym procesem, który zależy w głównej mierze od wymiany cząsteczek sygnałnych, tworzących swoisty „dialog molekularny”, pomiędzy kompetentnymi mikrosymbiontami a ich gospodarzem roślinnym. W momencie niedoboru azotu, rośliny wydzielają do otaczającej je gleby flawonoidy, które poprzez interakcję z ryzobiowymi białkami regulatorowymi NodD, indukują ekspresję genów nodulacji (*nod*) [Cooper, 2004]. Enzymy będące produktami ekspresji tych genów są niezbędne do syntezy specyficznych lipochitoooligosacharydów, nazywanych czynnikami Nod (ang. Nod factor, NF) [Janczarek i in., 2014; Jones i in., 2007]. NF są kluczowym sygnałem rozpoznawanym przez roślinne receptory NFR (ang. Nod factor receptor, NFR) o dużym powinowactwie do czynników Nod. NFR są zlokalizowane w epidermie korzenia i po aktywacji czynnikami Nod wywołują kaskadę sygnałów, która powoduje w roślinie szereg reakcji prowadzących do utworzenia brodawki [Stasiak i in., 2016]. Ryzobia wnikają do korzenia makrosymbionta przez włósniki korzeniowe, w których dochodzi do utworzenia specyficznych struktur, zwanych nićmi infekcyjnymi. W powstałych brodawkach korzeniowych komórki ryzobiów różnicują się w tak zwane bakteroidy – formy bakterii zdolne do wiązania azotu atmosferycznego, które przeprowadzają jego redukcję do amoniaku, będącego źródłem azotu dla rośliny. Gospodarz roślinny dostarcza mikrosymbiontowi składniki odżywcze, które są źródłem węgla oraz energii, a także zapewnia niszę odpowiednią do podziałów i wzrostu [Janczarek i in., 2014] (Ryc. 5).



Ryc. 5 Schemat symbiozy pomiędzy ryzobiami a roślinami bobowatymi [opracowano na podstawie publikacji Stasiak i in., 2016; Singh i in., 2019].

3.5. Polisacharydy powierzchniowe produkowane przez ryzobia

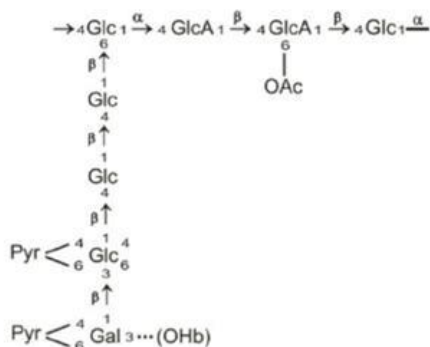
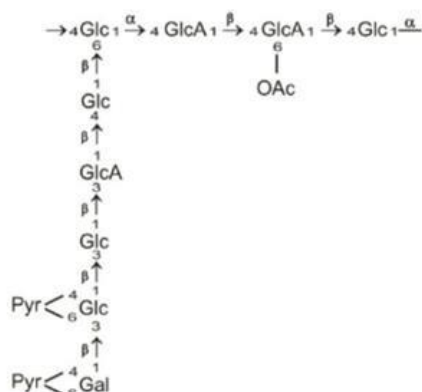
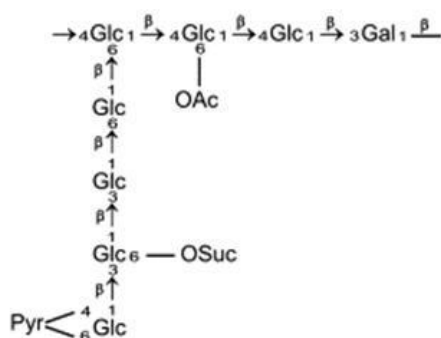
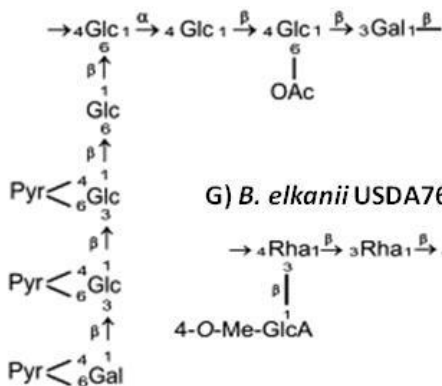
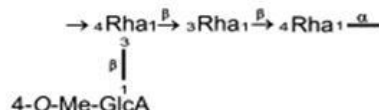
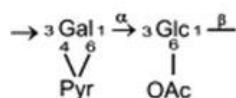
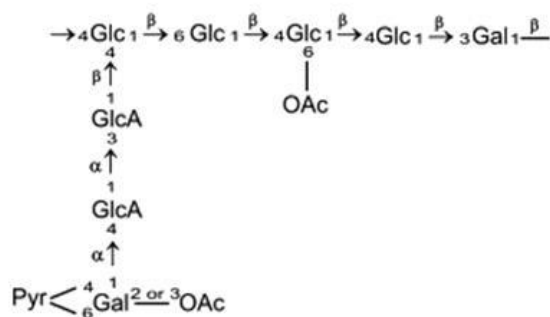
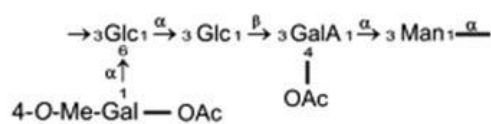
Charakterystyczną cechą ryzobiów, oprócz nawiązywania efektywnej symbiozy z roślinami bobowatymi, jest zdolność produkcji polisacharydów powierzchniowych. Obecność tych polimerów jest niezbędna tym bakteriom na różnych etapach interakcji symbiotycznych, wliczając w to rozpoznanie gospodarza roślinnego, adhezję do korzeni, formowanie nici infekcyjnej czy zasiedlanie brodawek korzeniowych. Ponadto, wiele polisacharydów pełni funkcję protekcyjną, chroniąc bakterie przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi, takimi jak susza, zasolenie czy obecność toksycznych substancji w glebie. Ryzobia produkują co najmniej siedem różnych polisacharydów powierzchniowych, do których zaliczane są: egzopolisacharyd (ang. exopolysaccharide, EPS), lipopolisacharyd (ang. lipopolysaccharide, LPS), polisacharyd kapsularny (ang. capsular polysaccharide, CPS), cykliczne β -glukany (ang. cyclic glucans, CG), glukomannan (ang. neutral polysaccharide, NPS), celuloza oraz polisacharyd żelujący (ang. gel-forming polysaccharide, GPS) [Janczarek i in., 2015] (Ryc. 6).



Ryc. 6 Schemat przedstawiający lokalizację polisacharydów w komórce bakterii *R. leguminosarum* [opracowano na podstawie publikacji Lepek i D'Antuono, 2005; Laus i in., 2006].

3.5.1. Egzopolisacharyd

Ryzobiowe polisacharydy słabo związane z powierzchnią komórki i wydzielane w dużych ilościach do środowiska, noszą nazwę egzopolisacharydów (EPS). Są to specyficzne dla danego rodzaju bądź też gatunku bakterii heteropolimery, których powtarzające się podjednostki złożone są z powszechnie występujących monosacharydów, takich jak D-glukoza, D-mannoza, D-galaktoza, L-ramnoza, kwas D-glukuronowy i kwas D-galaktouronowy. Dodatkowo, główny rdzeń podjednostki EPS jest modyfikowany podstawnikami niecukrowymi, takimi jak reszty acetylowe, pirogronianowe, metylowe czy bursztynylowe, które determinują kwasowy charakter polimeru (Ryc. 7) [Downie 2010, Janczarek 2011, Skorupska i in., 2006].

A) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RBL5599B) *R. leguminosarum* bv. *viciae* 248C) EPS I *E. meliloti* Rm1021E) *R. tropici* CIAT899G) *B. elkanii* USDA76D) EPS II *E. meliloti* Rm1021F) *E. meliloti* sp. NGR234H) *B. japonicum* USDA110

Ryc. 7 Chemiczna struktura podjednostek EPS u różnych gatunków ryzobiów. A) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RBL5599, B) *R. leguminosarum* bv. *viciae* 248, C) EPS I *E. meliloti* Rm1021, D) EPS II *E. meliloti* Rm1021, E) *R. tropici* CIAT899, F) *E. meliloti* sp. NGR234, G) *B. elkanii* USDA76, H) *B. japonicum* USDA110; Skróty: Ac – acetyl, Gal- galaktoza, Glc – glukoza, GlcA – kwas glukuronowy, Man – mannoza, Pyr - pirogronian, Rha – ramnoza, Suc - bursztynian, [Janczarek, 2011; Marczał i in., 2017].

Większość EPS, których struktura chemiczna została dotychczas scharakteryzowana, składa się z ośmiocukrowych podjednostek złożonych z czterocukrowego szkieletu oraz czterocukrowego łańcucha bocznego (np. EPS *R. leguminosarum*, *R. tropici*, *E. meliloti*). Największe różnicowanie tych polimerów dotyczy przede wszystkim składu cukrowego, typu wiązań glikozydowych, stopnia polimeryzacji oraz rodzaju i rozmieszczenia reszt

niecukrowych. Co jest niezwykle ciekawe, wykazano że u *R. leguminosarum* wzorzec modyfikacji niewęglowodanowych może być różny w obrębie tego samego gatunku i zależy od fazy wzrostu bakterii i składu podłoża hodowlanego [McNeil i in., 1986; Philip-Hollingsworth i in., 1989; Canter-Cremers i in., 1991]. Co więcej, cząsteczki EPS u ryzobiów występują w dwóch formach: nisko- (ang. low molecular weight, LMW) oraz wysokocząsteczkowej (ang. high molecular weight, HMW). Frakcja HMW EPS zawiera polimery o masie molekularnej pomiędzy 10^6 a 10^7 Da, natomiast frakcja LMW EPS złożona jest z monomerów, dimerów oraz trimerów powtarzających się podjednostek i jest formą egzopolisacharydu biologicznie aktywną, funkcjonującą jako cząsteczka sygnałna podczas symbiozy, za co odpowiadają m.in. reszty niecukrowe zlokalizowane w obrębie łańcucha bocznego jednostki EPS [Fraysse i in., 2003; Ivashina i Ksenzenko, 2012; Ivashhina i in., 2010].

Podczas symbiozy ryzobiów z roślinami bobowatymi, EPS odgrywa istotną rolę przede wszystkim w pierwszych etapach interakcji roślina – komórka bakteryjna, tj. adhezji, oraz wnikanii do korzeni. Polisacharyd ten powoduje supresję reakcji obronnej gospodarza roślinnego umożliwiając mikrosymbiontom infekcję włóśników korzeniowych, chroni je przed wolnymi rodnikami tlenowymi oraz stanowi istotny składnik nici infekcyjnej [D’Haeze i Holsters, 2004; Janczarek i in., 2010; Russo i in., 2006; Fujishige i in., 2006]. Wykazano również, że EPS oddziałuje z lektynami obecnymi na korzeniach rośliny, co wpływa na wiązanie się bakterii do ich powierzchni [Chen i in., 2006; Rodriguez-Navarro i in., 2007]. Ponadto, cząsteczki EPS są szczególnie istotne w przypadku symbiozy bakterii z roślinami tworzącymi brodawki typu niezdeterminowanego, jako składnik niezbędny do tworzenia nici infekcyjnej, uwalniania z niej bakterii oraz rozwoju bakteroidów [Skorupska i in., 2006; Ivashina i Ksenzenko, 2012].

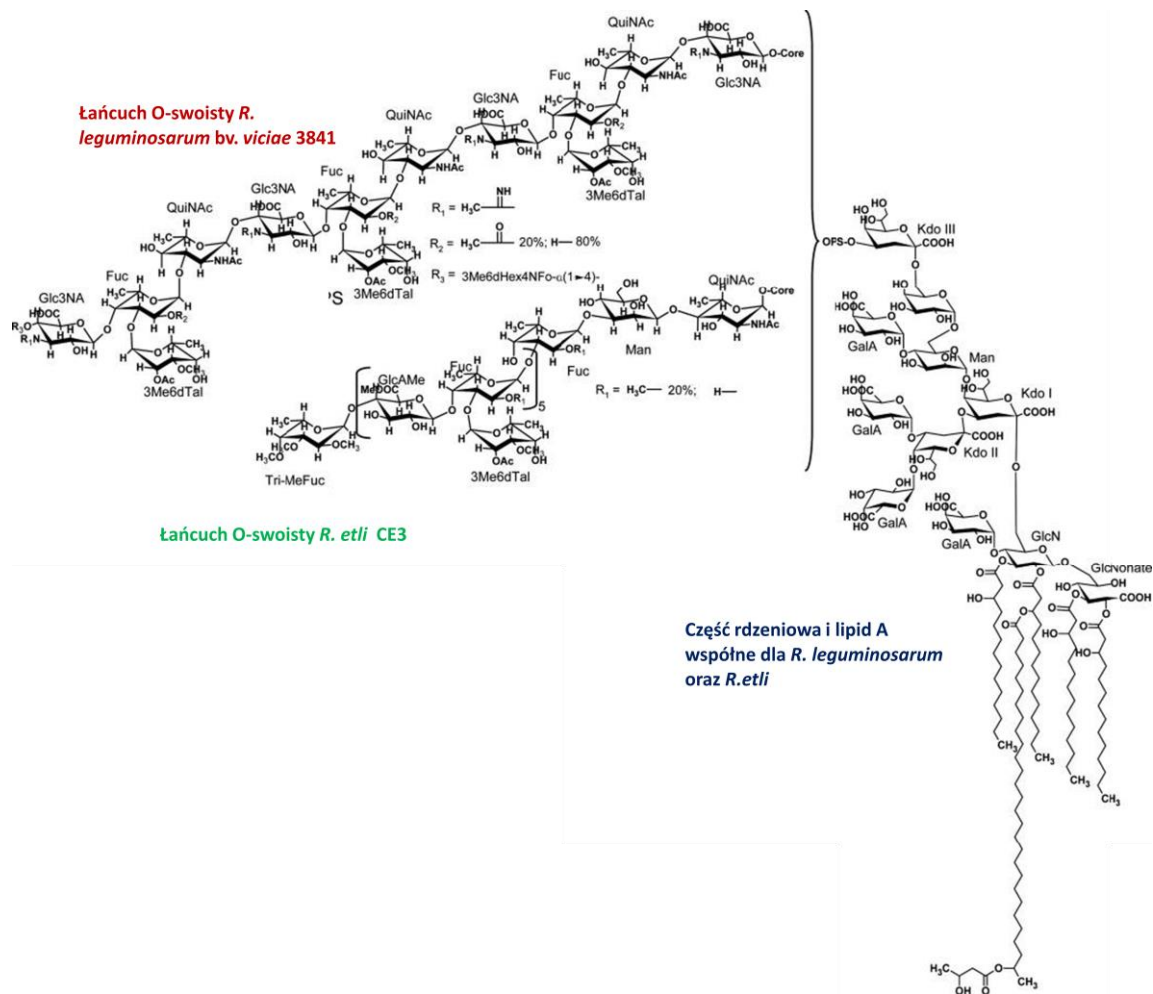
EPS pełni także istotną rolę u bakterii wolnożyjących, gdyż tworzy najbardziej zewnętrzną warstwę otaczającą komórki. Stanowi on więc pierwszą linię obrony bakterii przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi. Jak opisano powyżej, EPS produkowany przez ryzobia jest bardzo zróżnicowany, zarówno pod względem składu, jak i struktury chemicznej. Wykazano, że szczepy bakteryjne o wysokim poziomie produkcji EPS są bardziej odporne na warunki kwasowe i zasolenie gleby niż szczepy wytwarzające mniej tego polisacharydu [Cunningham i Munns, 1984; Eaglesham i in., 1987; Xavier i in., 1998; Xavier i in., 2007]. W przypadku stresu związanego z wysokim zasoleniem, EPS działa protekcyjnie otaczając komórki bakteryjne, zmniejszając tym samym kontakt

powierzchni komórki ze środowiskiem oraz zwiększając ich odporność na negatywne efekty osmotyczne [Elsheikh i Wood, 1990]. Zaobserwowano również, że szczepy *B. elkanii* BR 29 oraz SEMIA 587, które są mikrosymbiontami soi, produkują zwiększoną ilość EPS w warunkach wysokiej kwasowości w stosunku do hodowli prowadzonej w pH zbliżonym do obojętnego [Barberi i in., 2004; Miguel i Moreira, 2001]. Taką samą tendencję zaobserwowano w przypadku szczepu *Bradyrhizobium sp.* USDA 3187, w warunkach ograniczonego dostępu jonów Ca^{2+} oraz kwaśnym pH [Macció i in., 2002]. Ograniczenie niektórych składników odżywczych, takich jak wapń czy fosfor, również może prowadzić do zwiększonej produkcji EPS przez ryzobia. U bakterii *Ensifer meliloti*, która produkuje dwa rodzaje EPS, stężenie fosforanu w pożywce reguluje wytwarzanie jednego rodzaju EPS kosztem drugiego. W warunkach niskiego stężenia fosforanów przeważa produkcja EPS II, a kolonie tych bakterii mają wtedy bardziej śluzowatą morfologię, natomiast w warunkach optymalnych produkowany jest EPS I [Zhan i in., 1991; Mendrygal i Gonzalez, 2000].

Ze względu na anionowy charakter EPS, polimery te mają zdolność silnego oddziaływania z kationami metali i odgrywają ważną rolę w wychwytywaniu i unieruchamianiu tych jonów w środowisku [De Philippis i Vincenzini, 1998]. Jednakże, pomimo zwiększonej produkcji EPS w odpowiedzi na metale ciężkie u innych gatunków bakterii, dotychczas przeprowadzono niewiele takich badań w kontekście ryzobiów [Santamaría i in., 2003]. Wykazano, że EPS wytwarzany przez szczepy *Bradyrhizobium* w obecności jonów Fe^{3+} , Al^{3+} i Th^{4+} tworzy galaretowaty osad złożony z EPS związanego z tymi metalami [Corzo i in., 1994; Santamaría i in., 2003; Diaz -Marrero i in., 2004]. Wykazano także, że EPS *Rhizobium etli* również jest zdolny do adsorpcji jonów metali i szybko wiąże jony Mn^{2+} i Pb^{2+} [Foster i in., 2000]. Kompleksowanie jonów Cd^{2+} przez bakterię *E. meliloti* również może być wynikiem przyłączenia tego jonu do jego zewnątrzkomórkowych polimerów. Ilość kadmu wiązanego przez EPS zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia tego metalu w otoczeniu komórek bakteryjnych, co sugeruje potencjalne zastosowanie tego biopolimeru w bioremediacji [Slaveykova i in., 2010].

3.5.2. Lipopolisacharyd

Lipopolisacharyd (LPS) jest złożonym heteropolimerem, którego cząsteczki są zakotwiczone w zewnętrznej błonie otoczki bakteryjnej bakterii Gram-ujemnych. Polimer ten, podobnie jak EPS, również odgrywa istotną rolę w symbiozie, ale na późniejszych etapach (tj. różnicowanie bakterii w bakteroidy). Składa się on z trzech odrębnych regionów, do których zaliczany jest lipid A, polisacharydowa część stanowiąca rdzeń LPS oraz przyłączony do niego łańcuch O-swoisty, obecny jedynie u bakterii wytwarzających tzw. LPS „gładki” (Ryc. 8). Części tej brak w przypadku LPS „szorstkiego”, który charakteryzuje się niższą masą cząsteczkową niż LPS „gładki” [Becker i in., 2005; Muszyński i in., 2011]. Lipid A stanowi lipofilową część LPS, która dzięki oddziaływaniom hydrofobowym i elektrostatycznym kotwiczony makrocząsteczkę LPS w błonie zewnętrznej bakterii [Raetz i in., 2007]. Domena ta wykazuje pomiędzy różnymi gatunkami ryzobiów znaczne różnice w składzie cukrowym szkieletu oraz we wzorze acylacji [Que i in., 2000]. Obecność długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w lipidzie A zwiększa stabilność błony bakteryjnej i hydrofobowość powierzchni komórek ryzobiów. Rdzeń oligosacharydowy jest połączony z lipidem A poprzez kwas 3-deoksy-D-manno-okt-2-ulozonowy (Kdo), który może być traktowany jako marker obecności LPS. W przeciwieństwie do lipidu A, rdzeń oligosacharydowy nie ulega modyfikacjom podczas infekcji gospodarza roślinnego [Frayse i in., 2003]. Ostatnią częścią LPS jest łańcuch O-swoisty, złożony z powtarzających się oligosacharydowych jednostek, których liczba nieznacznie różni się pomiędzy poszczególnymi gatunkami ryzobiów (np. 5 u *R. etli* i 3-4 u *R. leguminosarum* bv. *viciae*) [Noel i in., 2000; Muszyński i in., 2011].



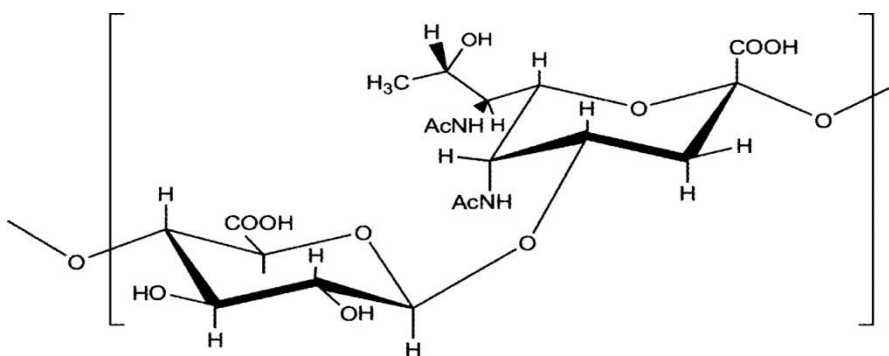
Ryc. 8 Schemat struktury cząsteczki LPS *R. etli* CE3 oraz *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 [Forsberg i Carlson, 2008; Muszyński i in., 2011].

Lipopolisacharydy stanowią efektywnie działającą barierę, która chroni bakterie Gram-ujemne przed różnymi czynnikami środowiskowymi, lekami oraz toksycznymi substancjami posiadającymi charakter hydrofobowy [Raetz i Whitfield, 2002]. Wykazano również, że LPS posiadający łańcuch O-swoisty jest niezwykle istotny w procesie symbiozy, a szczepy bakteryjne posiadające mutacje skutkujące brakiem łańcucha O-swoistego są niezdolne do prawidłowego infekowania komórek gospodarza oraz wiązania azotu [Lerouge i Vanderleyden, 2012; Forsberg i in., 2003; Fraysse i in., 2005]. Udowodniono także, że kompletny LPS stabilizuje błonę zewnętrzną bakterii oraz powoduje supresję mechanizmów obronnych gospodarza roślinnego, dzięki czemu mikrosymbionty mogą bezpiecznie przemieszczać się i proliferować wewnątrz nici infekcyjnych [Fraysse i in., 2003]. Jest to szczególnie ważne w przypadku nici infekcyjnych o wąskim przekroju, które występują u roślin tworzących małe brodawki

korzeniowe. LPS pełni również ważną rolę podczas tworzenia symbiosomów oraz adaptacji do endosymbiotycznych warunków wewnątrz brodawek [Frayse i in., 2003].

3.5.3. Polisacharyd kapsularny

Polisacharyd kapsularny (CPS), zwany inaczej antygenem K, jest polimerem ściśle związanym z zewnętrzną błoną bakteryjną, co odróżnia go od luźno związanego z otoczką EPS [Le Quere i in., 2006]. Ryzobiowe CPS są antygenami swoistymi dla danego szczepu, strukturalnie analogicznymi do grupy II antygenów K *E. coli*, które są liniowymi polisacharydami o charakterze kwasowym, mającymi proste (zwykle disacharydowe) powtarzające się podjednostki (Ryc. 9) [Kannenberga i in., 1998; Reuhs i in., 1993]. Wyniki badań dotyczące różnych szczepów ryzobiów sugerują, że istnieje wspólny motyw strukturalny obejmujący większość cząsteczek CPS, taki jak Kdo, będący również komponentem LPS, lub Kdx, czyli analog Kdo posiadający obojętną heksozę bądź kwas uronowy [Reuhs i in., 1998; Forsberg i Reuhs, 1997]. Istnieją również wyjątki od tego motywu, takie jak CPS posiadający w swojej strukturze wiązania glikozydowe oraz amidowe [Gil-Serrano i in., 1999]. Co ciekawe, badania dotyczące szczepów *Rhizobium fredii* pokazały, że możliwa jest korelacja pomiędzy strukturą CPS a swoistością zakresu gospodarza [Rodriguez- Carvajal i in., 2005].



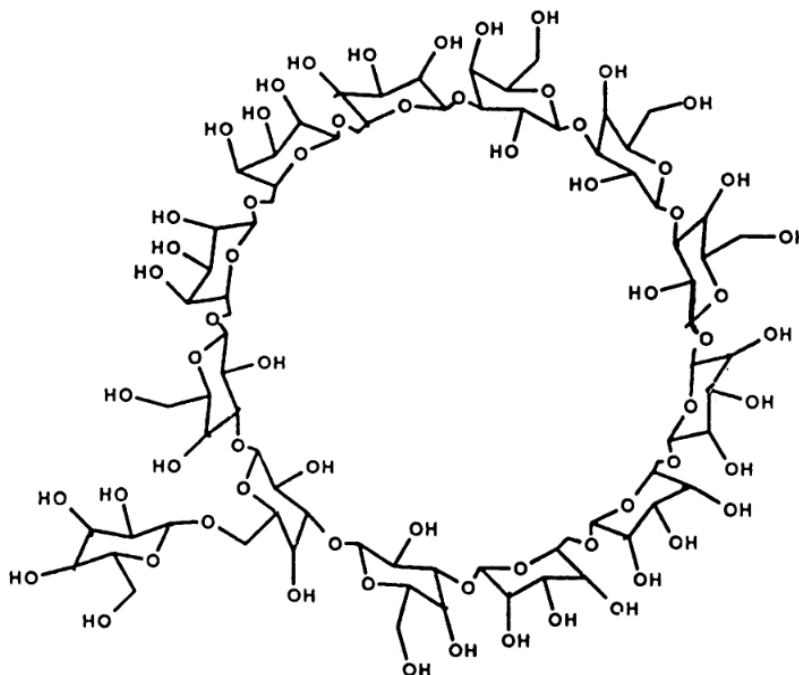
Ryc. 9 Struktura disacharydowej podjednostki CPS *Rhizobium* sp. NGR234 [Le Quéré i in., 2006].

Polisacharyd kapsularny u wolnożyjących ryzobiów zapewnia ochronę przed niekorzystnymi czynnikami stresowymi, substancjami obronnymi wydzielanymi przez rośliny, a także zwiększa odporność na działanie bakteriofagów. CPS jest zdolny także do wiązania jonów metali ciężkich, co potwierdzają badania nad *Rhizobium alarii*, gdzie wykazano, że obecność kadmu w środowisku wzrostu aktywuje produkcję tego polimeru [Schue i in., 2011]. Co więcej, antygeny te mogą działać jako cząsteczki sygnałne na wczesnych etapach symbiozy, takich jak rozpoznanie gospodarza roślinnego, infekcja oraz

brodawkowanie [Frayse i in., 2003]. Wykazano, że w układzie symbiotycznym *Medicago sativa* (lucerna) – *Ensifer meliloti*, CPS może rekompensować brak EPS (bursztynyloglikan i galaktoglikan), pozwalając na efektywne wytwarzanie brodawek przez makrosymbionta [Frayse i in., 2003; Le Quere i in., 2006; Downie, 2010].

3.5.4. Cykliczne β -glukany

Cykliczne β -glukany (CG) są kolistymi oligomerami cukrowymi wydzielanymi przez komórki ryzobiów do przestrzeni peryplazmatycznej oraz w niewielkiej ilości do środowiska zewnętrznego bakterii. Ryzobiowe CG składają się zazwyczaj z 17-40 reszt glukozy połączonych wiązaniami glikozydowymi β -(1,2) lub β -(1,3) i β -(1,6) (np. 17-22 u *R. radiobacter* i 17-28 u *E. meliloti*) podstawionymi dodatkowo anionowymi grupami niecukrowymi (np. bursztynyłowymi, acetylowymi czy fosfocholinowymi) (Ryc. 10) [Schue i in., 2011; Lepek i D'Antuono, 2005; Qu i in., 2018; Venkatachalam i in., 2014].



Ryc. 10 Struktura cyklicznych β -(1,3)- β -(1,6)-glukanów *B. japonicum* [Breedveld i Miller, 1994].

Poziom produkcji CG różni się znacząco pomiędzy szczepami ryzobiowymi i zależy w dużej mierze od fazy wzrostu bakterii oraz składu podłoża hodowlanego. Obecność cyklicznych β -glukanów jest niezbędna, aby zaszła efektywna symbioza, co zbadano u *E. meliloti*. Bakterie posiadające mutację w genie *nvdB*, odpowiedzialnym za biosyntezę CG, wywoływały przerwanie nici infekcyjnej i tworzenie przez makrosymbionta

pseudobrodawek [Dylan i in., 1990; Kucho i in., 2010]. Cykliczne β -glukany mogą również pełnić rolę supresora mechanizmów obronnych gospodarza [Bhagwat i in., 1999; Mithöfer i in., 1996; Mithöfer i in., 2002]. U *Mesorhizobium loti*, *Agrobacterium tumefaciens* oraz *Brucella abortus* zaobserwowano, że brak tego oligosacharydu w przestrzeni peryplazmatycznej powoduje mniejszą ruchliwość bakterii i większą wrażliwość na detergenty [D'Antuono i in., 2005; Briones i in., 2001]. Ponadto, CG pełni funkcję osmoprotekcyjną, jest zdolny do ochrony błony bakteryjnej przed niszczącym działaniem wapnia oraz zwiększa rozpuszczalność roślinnych flawonoidów, co znacznie poprawia efektywność symbiozy [Choma i Komaniecka, 2003; D'Antuono i in., 2005].

3.5.5. Glukomannan

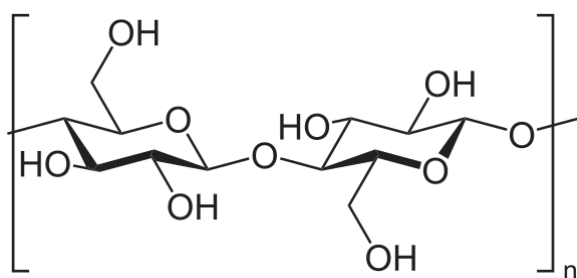
Jednym z pierwszych etapów infekcji roślin bobowatych przez kompatybilne mikrosymbionty jest adhezja komórek bakteryjnych do włóśników korzeniowych. Jest to proces złożony, w którym zaangażowane są zarówno cząsteczki wydzielane przez roślinę, jak i składniki znajdujące się na powierzchni bakterii [Matthysse i Kijne, 1998; Downie, 2010]. W procesie tym wyróżnia się dwa główne etapy. W pierwszym etapie zaangażowane są, w zależności od pH środowiska, ryzobiowe adhezyny (pH powyżej 7) bądź glukomannan oraz lektyny (pH poniżej 7) produkowane przez rośliny. W drugim etapie komórki bakteryjne przyczepiają się do włóśników korzeniowych za pośrednictwem włókien celulozowych, aczkolwiek nie udowodniono, aby etap ten był niezbędny dla efektywnej infekcji korzeni [Laus i in., 2005].

Glukomannan, znany również jako polisacharyd neutralny (NPS), jest rozpuszczalnym w wodzie heteropolimerem, zawierającym w swojej strukturze głównie glukozę oraz mannozę (95%) z niewielką ilością galaktozy i ramnozy (5%) [Laus i in., 2006]. Reszty cukrowe tego polimeru są połączone wiązaniami β -(1,4)-glikozydowymi i posiadają niewielką ilość rozgałęzień, gdzie występują wiązania β -(1,6)-glikozydowe [Katsuraya i in., 2003]. Jak wykazano dla *R. leguminosarum*, polisacharyd ten jest niezbędny do prawidłowej adhezji tej bakterii do włóśników korzeniowych roślin *Vicia sativa* oraz *Pisum sativum*, w której biorą udział roślinne lektyny [Laus i in., 2006]. Ponadto, proces ten wymaga, aby wartość pH środowiska interakcji była niższa niż 7. Co jest szczególnie interesujące, u szczepów *R. leguminosarum* defektywnych w syntezie glukomannanu zaobserwowano, że posiadają one zdolność do przytwierdzenia się oraz formowania normalnego biofilmu w warunkach *in vitro*, lecz niezdolne są do tworzenia go na włóśnikach korzeniowych. Sugeruje to, że biofilm powstający na korzeniach różni się

od tego formowanego w warunkach *in vitro* na powierzchniach abiotycznych [Williams i in., 2008].

3.5.6. Celuloza

Celuloza jest polisacharydem złożonym z kilkuset do kilku tysięcy reszt glukozy połączonych wiązaniami β -(1,4)-glikozydowymi (Ryc. 11) [Crawford, 1981].

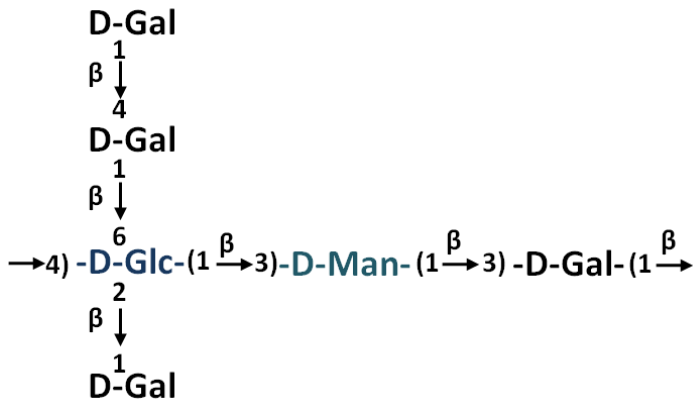


Ryc. 11 Chemiczna struktura celulozy (https://www.wikiwand.com/en/Bacterial_cellulose).

Włókna celulozowe produkowane przez ryzobia są zaangażowane w drugi etap adhezji bakterii do włóśników korzeniowych gospodarza roślinnego oraz w formowanie na ich powierzchni biofilmu [Laus i in., 2005, 2006]. Pomimo tego, że włókna celulozowe nie są niezbędne do skutecznej infekcji roślin bobowatych przez ryzobia, to jednak bardzo ułatwiają ten proces, poprzez stymulację agregacji bakterii po przytwierdzeniu się ich do włóśników korzeniowych oraz podczas tworzenia się biofilmu. Podobnie jak w przypadku glukomannanu, wykazano, że szczepy bakteryjne *R. leguminosarum* bv. *viciae*, defektywne w syntezie celulozy, nie są zdolne do tworzenia biofilmu na włóśnikach korzeniowych, chociaż mają zdolność do tworzenia tej struktury w warunkach *in vitro* [Downie, 2010; Williams i in., 2008].

3.5.7. Polisacharyd żelujący

Polisacharyd żelujący (GPS) jest heteropolimerem złożonym z powtarzających się podjednostek zawierających galaktozę, mannozę i glukozę w stosunku molowym 4:1:1 (Ryc. 12). Wykazano, że w hodowlach *R. leguminosarum* produkowany on jest w późnej fazie stacjonarnej, lecz nieznaną jest jego funkcja w symbiozie [Laus i in., 2006]. Wykazano, że szczepy tej bakterii posiadające mutację w genie *gela*, uczestniczącym w syntezie tego polimeru, prawidłowo przeprowadzały proces adhezji do korzeni roślin oraz tworzyły biofilm na włóśnikach korzeniowych, co wskazuje, że GPS nie odgrywa istotnej roli w tym etapie symbiozy [Williams i in., 2008].



Ryc. 12 Struktura podjednostki GPS *R. leguminosarum*; Skrót: Gal-galaktoza, Glc-glukoza; Man-mannoza [Laus i in., 2006].

3.6. Czynniki abiotycznego stresu środowiskowego i mechanizmy adaptacyjne ryzobiów

Warunki środowiskowe, które panują w glebie, często prowadzą do ograniczenia wzrostu i prawidłowego funkcjonowania mikroorganizmów. Stres ten powodowany jest zarówno przez czynniki biotyczne, jak i abiotyczne. Wśród tych ostatnich można wyróżnić czynniki klimatyczne, takie jak: wysoka i niska temperatura, susza, niedobór wody oraz właściwości gleby (np. wartość pH, zasolenia czy stopień zanieczyszczeń szkodliwymi związkami). Do stresogennych czynników środowiskowych, które w znacznym stopniu oddziałują na ryzobia, należą przede wszystkim temperatura, zasolenie, susza, pH gleby oraz zawartość w niej metali ciężkich. Wywołują one u bakterii szereg zmian na poziomie molekularnym i fizjologicznym. Dodatkowo efekt działania różnych stresorów może mieć charakter addytywny.

Według dotychczasowych badań ryzobia są najbardziej wrażliwe na niski poziom opadów atmosferycznych, skrajnie wysokie bądź niskie temperatury, duży stopień zakwaszenia, niedobór składników odżywczych oraz suszę. W odpowiedzi na ekspozycję na takie czynniki stresowe ryzobia wykształciły szereg mechanizmów adaptacyjnych, pozwalających przetrwać im w niekorzystnych warunkach.

3.6.1. Osmotyczność

Woda jest jednym z najbardziej istotnych czynników środowiskowych, który wpływa na wzrost oraz przeżywalność mikroorganizmów, a także ma znaczenie dla prawidłowego rozwoju roślin [Potts, 1994; Kramer, 1995; Costa, 2011]. Jej zawartość w glebie pośrednio ma wpływ na osmotyczność środowiska. W przypadku bakterii zmiany ciśnienia osmotycznego objawiają się między innymi zmienionym turgorem komórek, deformacją błon, a także zmianą struktury białek błonowych [Poolman i in., 2002]. Szczepy ryzobiów różnią się zdolnością tolerancji stresu osmotycznego. U ryzobiów istnieją dwa główne mechanizmy odpowiedzialne za zainicjowanie przepływu wody przez błonę bakteryjną w warunkach niskiej zawartości wody. Pierwszym z nich jest prosta dyfuzja wody przez błonę, która zazwyczaj wystarcza aby wyrównać i zrównoważyć poziom jonów rozpuszczonych w cytoplazmie w warunkach niskiej osmotyczności. Drugim z nich jest obecność specyficznych kanałów wodnych, za pośrednictwem których bakterie osiągają znacznie szybszy przepływ wody, aniżeli w przypadku zwykłej dyfuzji [Bramer i Kramer, 2001].

Ryzobia posiadają dodatkowy mechanizm adaptacji do warunków hypoosmotycznych, w którym istotną rolę pełnią peryplazmatyczne β -glukany stanowiące ważny składnik otoczki bakteryjnej [Komaniecka i Choma, 2008]. Akumulacja cząsteczek β -glukanów jest odwrotnie proporcjonalna do siły osmotycznej środowiska. W warunkach niskiej osmolarności ryzobia syntetyzują znaczne ilości tego oligosacharydu i kumulują go w peryplazmie. Glukany mogą stanowić od 5 do nawet 20 % całkowitej suchej masy bakterii. Ilość produkowanego CG zależy od gatunku bakterii, warunków hodowli oraz fazy wzrostu. Dodatkowo, makrocząsteczki te pełnią istotną rolę w symbiotycznej interakcji ryzobiów z ich gospodarzem roślinnym [Komaniecka i Choma, 2008].

3.6.2. Temperatura

W suchych oraz bardzo suchych regionach tropikalnych temperatura gleby blisko powierzchni bywa bardzo wysoka i może wynosić nawet 60 °C, kiedy temperatura powietrza osiąga 40 °C. Temperatura gleby jednak szybko spada wraz z głębokością, osiągając umiarkowany poziom (około 35 °C) na głębokości 15 cm. Temperatura odgrywa istotną rolę w wymianie sygnałów molekularnych pomiędzy ryzobiami i ich gospodarzami roślinnymi, wpływając na efektywność procesu brodawkowania. Niska temperatura hamuje swoisty „dialog molekularny” pomiędzy symbiotycznymi partnerami, wpływając

na biosyntezę i wydzielanie do strefy korzeniowej cząsteczek sygnałowych oraz na poziom zasiedlenia brodawek przez bakterie [Abd-Alla, 2014]. Z kolei wysoka temperatura wpływa negatywnie na adhezję bakterii do korzeni roślin, tworzenie nici infekcyjnych oraz brodawek korzeniowych, a także na syntezę roślinnego białka leghemoglobiny i aktywność nitrogeazy [Hungria i Vargas, 2000]. Generalnie, optymalna temperatura wzrostu dla ryzobiów wynosi 25-30 °C. Wykazano, że jej podwyższenie do 40 °C powoduje znaczące obniżenie tempa wzrostu bakterii izolowanych z brodawek korzeniowych soi oraz jego całkowite zahamowanie w przypadku temperatury wynoszącej 45 °C [Chen i in., 2002].

Stres termiczny można podzielić na dwa rodzaje: szok cieplny oraz szok zimna. Odpowiedź na szok cieplny u ryzobiów jest podobna jak na zakwaszenie i skutkuje syntezą specyficznych białek, zwanych białkami szoku cieplnego (ang. heat shock proteins, HSP). Białka HSP przyczyniają się do zwiększenia tolerancji na wysoką temperaturę, ale nie powodują zmian temperatury wewnątrz komórek [Yura i in., 2000]. HSP są odpowiedzialne za prawidłowe fałdowanie i oligomeryzację białek, ich translokację wewnątrzkomórkową oraz degradację. Z kolei w przypadku szoku wywołanego niską temperaturą (ang. cold shock), zamiast denaturacji i nieprawidłowego fałdowania białek, następuje utrata przepuszczalności błony, płynności cytoplazmy oraz zmiany w drugorzędowej strukturze RNA i DNA [Phadtare i in., 2000]. Odpowiedź bakterii na ten stres jest natychmiastowa i umożliwia przystosowanie się bakterii do tych warunków wraz ze spadkiem temperatury. W przypadku bardzo niskiej temperatury następuje indukcja ekspresji genów i synteza białek CSP (ang. cold shock proteins). Te niskocząsteczkowe białka są zdolne do wiązania kwasów nukleinowych i stabilizowania struktur cząsteczek mRNA, umożliwiając ich translację w warunkach stresu wywołanego niską temperaturą.

3.6.3. Wartość pH

Jednym z najważniejszych czynników wpływających na symbiozę pomiędzy ryzobiami a roślinami bobowatymi jest wartość pH gleby. Skrajne wartości pH mają istotny wpływ na przeżywalność oraz podziały komórkowe ryzobiów, jak również na wzrost roślin. Ustalono, że optymalne pH dla wzrostu ryzobiów zawiera się w przedziale pomiędzy 6,0 a 7,0 [Hungria i Vargas, 2000]. Jednakże poszczególne szczepy tych bakterii różnią się między sobą pod względem tolerancji na zakwaszenie środowiska. Wykazano, że niektóre mutanty *R. leguminosarum* są zdolne do wzrostu w pH równym 4,5 [Chen i in., 1993], bakteria *E. meliloti* namnaża się przy pH 5,5 [Foster, 2000], a *S. fredii* wykazuje

dobry wzrost w przedziale wartości pH 4,0 - 9,5. Natomiast w przypadku *B. japonicum* nie zaobserwowano wzrostu w skrajnym pH (4,0 oraz 8,0 – 10,0) [Fujihara i Yoneyama, 1993].

Mechanizmy adaptacyjne ryzobiów do zakwaszenia środowiska są różne. Do mechanizmów tych zalicza się między innymi wpływ protonów (H^+) z wnętrza komórki, zwiększenie zawartości jonów potasowych oraz glutaminianu w cytoplazmie, zmiany w składzie LPS oraz akumulację poliamidów [Priefer i in., 2001]. U *R. leguminosarum* zidentyfikowano co najmniej 20 genów, określanych jako „act genes”, które są specyficzne dla odpowiedzi bakterii na zakwaszenie [Kurchak i in., 2001]. Innym rodzajem odpowiedzi bakterii na nadmierne zakwaszenie środowiska jest synteza białek ASP (ang. acid shock proteins), które zwiększają tolerancję bakterii na ten czynnik stresowy, nie wpływając jednocześnie na wewnątrzkomórkowe pH [Kajić i in., 2016]. Ponadto wykazano, że część genów, takich jak: *actA*, *actP*, *exoR*, *lpiA*, *actR*, *actS*, czy *phrR*, pełni istotną rolę w przystosowaniu bakterii do wzrostu w niskim pH [Abd-Alla, 2014].

3.6.4. Zasolenie

Zasolenie jest jednym z głównych czynników zagrażających uprawom roślin bobowatych, szczególnie na obszarach suchych i średnio suchych. Tym terminem określa się stężenie rozpuszczonych soli mineralnych, które obejmuje kationy i aniony zawarte w glebie oraz w wodzie. Na wartość zasolenia główny wpływ ma obecność jonów, takich jak: Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CO_3^- oraz NO_3^- [Aggarwal i in., 2013]. Przypuszcza się, że blisko 40% powierzchni uprawnej ziemi ma zbyt wysoką zawartość soli [Niste i in., 2013]. Główną przyczyną tego stanu jest brak równowagi składników odżywczych w glebie, co znacznie ogranicza przeżywalność ryzobiów, produktywność roślin oraz proces efektywnej symbiozy [Mohammadi i in., 2012]. Wysoka zawartość soli mineralnych rozpuszczonych w glebie hamuje początkowe etapy symbiozy, wpływa niekorzystnie na proces brodawkowania oraz aktywność bakteryjnego enzymu odpowiedzialnego za redukcję azotu (nitrogenazy) [Aggarwal i in., 2013].

Wrażliwość na warunki stresowe związane z zasoleniem różni się u poszczególnych gatunków ryzobiów, ale zazwyczaj ich wzrost jest hamowany przy stężeniu NaCl równym 100 mM. Do gatunków ryzobiów, które są bardziej odporne na wysokie zasolenie należą m.in. *E. meliloti*, które tolerują stężenia NaCl w zakresie od 300 do nawet 700 mM oraz *R. leguminosarum*, u których zaobserwowano wzrost w obecności 350 mM NaCl [Zahran,

1999]. Wysokie stężenia soli wywołują u ryzobiów zmiany rozmiarów oraz morfologii komórek, a także modyfikacje w strukturze polisacharydów zewnątrzkomórkowych oraz lipopolisacharydów [Ventorino i in., 2012]. Ryzobia wykorzystują szereg mechanizmów adaptacyjnych umożliwiających im przetrwanie w takich warunkach. Zaliczyć tutaj można przede wszystkim akumulację niskocząsteczkowych związków organicznych, takich jak aminokwasy, cukry czy poliamidy, a także gromadzenie niektórych jonów (np. K^+) [Zahran, 1999].

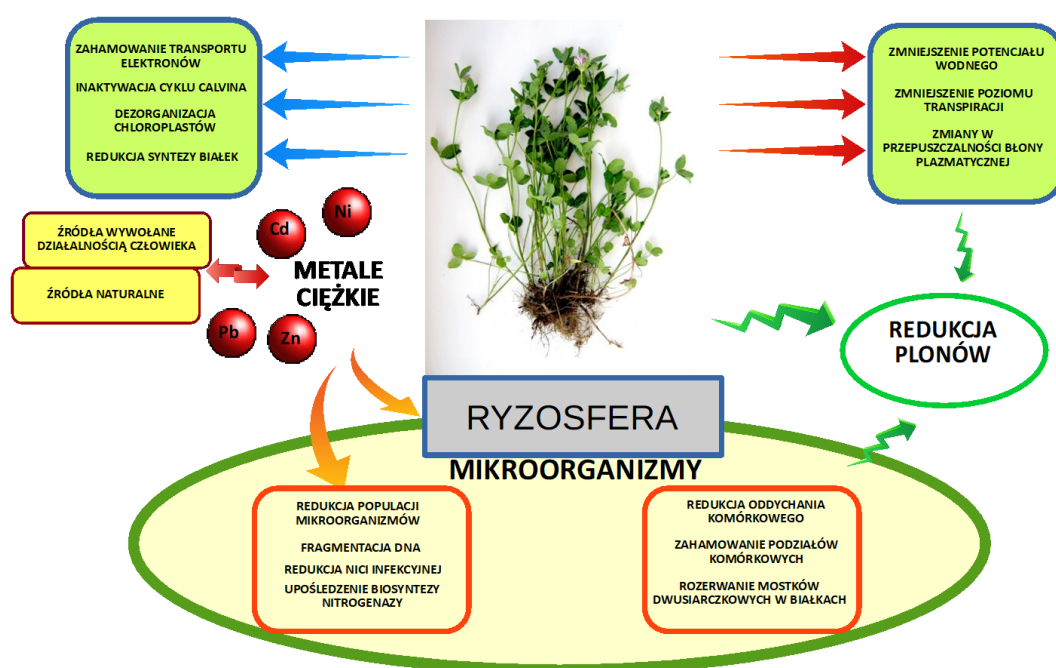
3.6.5. Zawartość składników odżywczych

Żyzność gleby ma również istotny wpływ na przeżywalność wolnożyjących ryzobiów w takim środowisku, jak też na proces symbiozy z roślinami bobowatymi. Odpowiednia zawartość składników odżywczych jest niezbędna do prawidłowego wzrostu, rozwoju i funkcjonowania obu partnerów symbiotycznych. Głównymi substancjami negatywnie wpływającymi na proces symbiozy są azotany. Zbyt duże stężenie tych związków może prowadzić do zahamowania procesu brodawkowania i wiązania wolnego azotu przez bakterie symbiotyczne. Obecność w glebie jonów NO_3^- negatywnie wpływa na tworzenie nici infekcyjnych, rozwój brodawek oraz aktywność nitrogenazy [Luciński i in., 2002]. Wykazano również, że dodatek jonów NO_3^- (w stężeniu 5 - 16 mM) do środowiska wzrostu siewek lucerny znacząco redukuje adhezję komórek ryzobiowych do korzeni tych roślin [Zahran i in., 1999].

U niektórych gatunków ryzobiów obecność zbyt wysokiego stężenia azotanów podczas infekcji i brodawkowania prowadzi do indukcji wytwarzania hydrogenazy. Enzym ten obecny w błonie bakteryjnej jest charakterystyczny dla diazotrofów i może zwiększać tolerancję tych bakterii na obecność azotanów. Dodatkowo, hydrogenaza prowadzi do powstawania gradientu H^+ w poprzek błony bakteroidów i tym samym pozwala na syntezę ATP [Luciński i in., 2002].

3.6.6. Metale ciężkie

Na przebieg symbiozy ryzobiów z roślinami bobowatymi, jak i na wolnożyjące ryzobia oprócz wartości pH mają również wpływ: potencjał oksydo-redukcyjny, napowietrzenie gleby oraz zawartość w niej minerałów czy stopień utlenienia metali. Część z tych parametrów może wzmacniać toksyczne działanie metali, prowadząc do zwiększenia ich szkodliwości wobec mikroorganizmów oraz upośledzania procesów zachodzących w glebie (Ryc. 13).

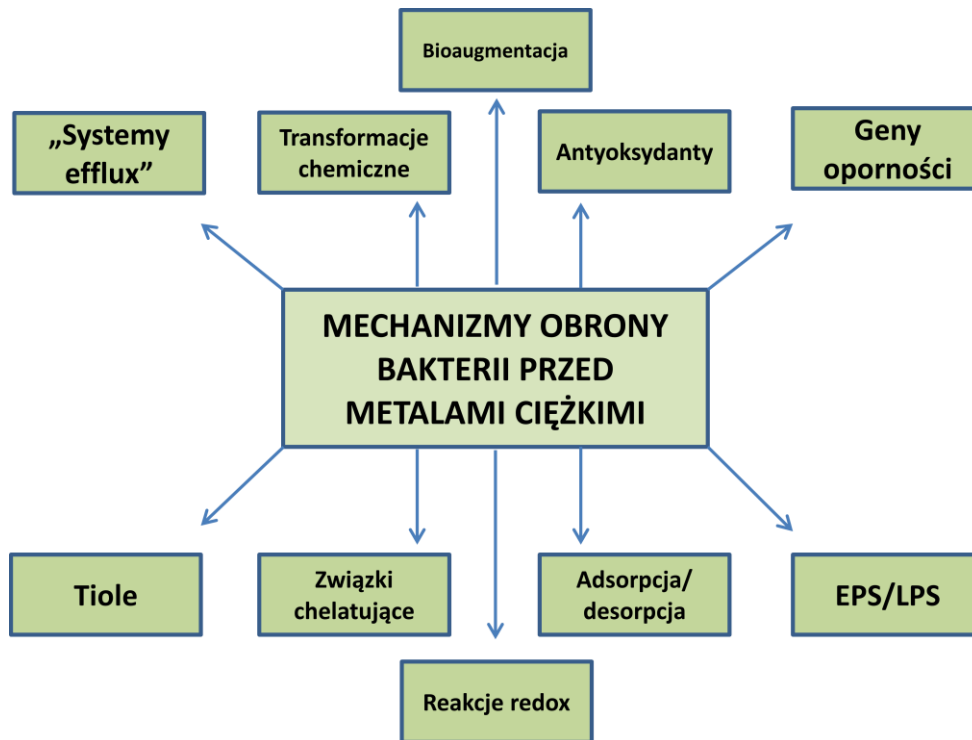


Ryc. 13 Wpływ metali ciężkich na rośliny oraz symbiotyczne bakterie glebowe [schemat opracowany na podstawie publikacji Zaidi i in., 2012].

Wysokie stężenia jonów metali ciężkich, takich jak kadm (15 mg kg^{-1}), miedź (250 mg kg^{-1}), cynk (500 mg kg^{-1}) i nikiel (50 mg kg^{-1}) mają negatywny wpływ na rodzime populacje wielu gatunków ryzobiów, takich jak np. *R. leguminosarum* bv. *trifolii* [Giller i in., 1998]. W przypadku długotrwałej ekspozycji ryzobiów i innych bakterii glebowych na metale ciężkie, może zmieniać się skład gatunkowy i procentowe proporcje mikrobiomu glebowego, jak również może obniżać się zdolność infekowania gospodarza roślinnego przez bakterie symbiotyczne oraz efektywność wiązania azotu cząsteczkowego [Purchase i in., 1997]. Tego typu zależności zaobserwowano w przypadku bakterii należących do gatunku *R. leguminosarum* bv. *trifolii* izolowanych z gleb nawożonych osadem ściekowym. Choć bakterie te indukowały powstawanie brodawek na korzeniach koniczyny białej (*Trifolium repens*), to przeprowadzały redukcję azotu z dużo niższą

efektywnością [Ibekwe i in., 1995]. W glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi produktywność roślin bobowatych wynikająca z ich symbiozy z ryzobiami zależy przede wszystkim od liczebności przeżywających oraz prawidłowo funkcjonujących w takich warunkach bakterii.

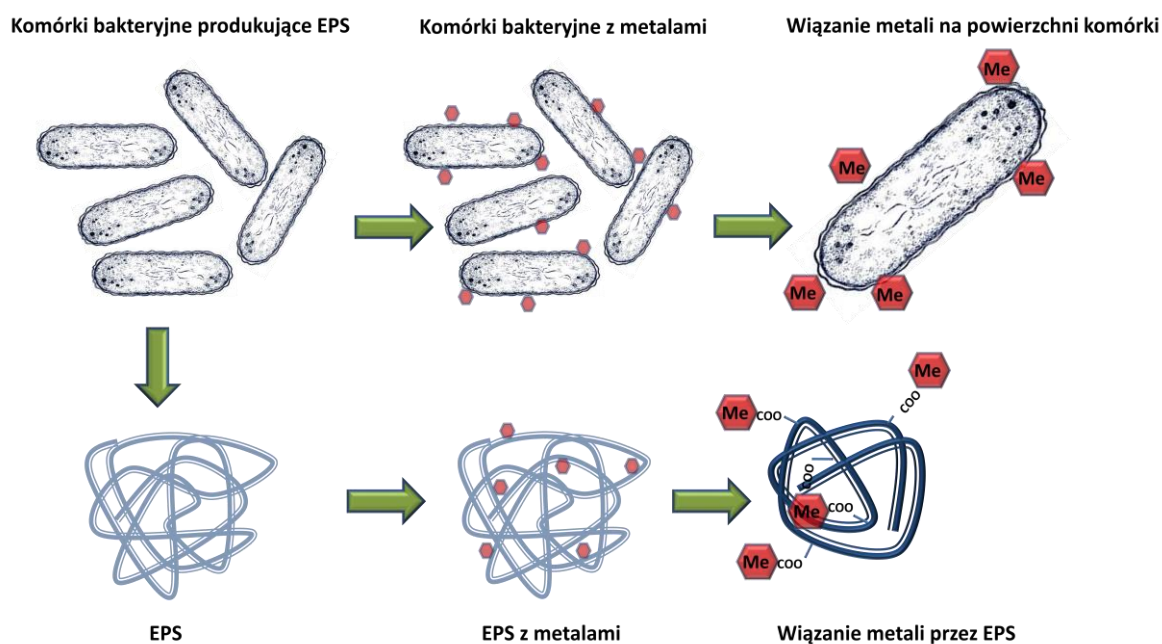
Niesprzyjające warunki środowiskowe spowodowane obecnością metali ciężkich w glebie, przyczyniły się do wykształcenia przez mikroorganizmy w toku ewolucji szeregu mechanizmów adaptacyjnych, pozwalających na ich przeżycie (Ryc. 14). Do mechanizmów tych zalicza się przede wszystkim wytrącanie metali w postaci nierozpuszczalnych soli [Blake i in., 1993], usuwanie toksycznych metali z komórki poprzez specyficzny system pomp jonowych (ang. efflux system) [Nies, 1992] i syntezę związków o właściwościach chelatujących [Ow, 1993]. Bardzo ważne są również specyficzne białka i enzymy wewnątrzkomórkowe, zewnątrzkomórkowe polisacharydy (EPS i LPS), a także białka tiolowe oraz antyoksydanty, które mają istotny udział w ochronie komórek przed negatywnym działaniem metali ciężkich. Spośród wymienionych mechanizmów najbardziej efektywne i najczęściej spotykane u bakterii należących do rodzaju *Rhizobium* wydają się być: produkcja zewnątrzkomórkowych polisacharydów, usuwanie metali ciężkich za pomocą systemów transportu metali na zewnątrz komórki oraz obecność genów nadających oporność na metale ciężkie.



Ryc. 14 Mechanizmy warunkujące tolerancję metali ciężkich przez mikroorganizmy [schemat opracowany na podstawie publikacji Zaidi i in., 2012].

3.6.6.1. Synteza polisacharydów zewnątrzkomórkowych jako mechanizm obronny bakterii

Jak już pisano poprzednio, charakterystyczną cechą ryzobiów jest zdolność produkcji EPS, który jest wydzielany w dużych ilościach do środowiska. Struktura chemiczna tego polimeru umożliwia niespecyficzne wiązanie różnych jonów metali, co zapobiega lub ogranicza ich wnikanie do wnętrza komórki [Downie, 2010]. Ponadto, ryzobia zawierają w błonie zewnętrznej LPS, który wpływa istotnie na stabilność błony bakteryjnej. Zarówno LPS, jak i EPS mogą wiązać większość metali ciężkich, stanowiąc pierwszą ochronną barierę bakterii przeciwko niekorzystnym warunkom środowiska (Ryc. 15).

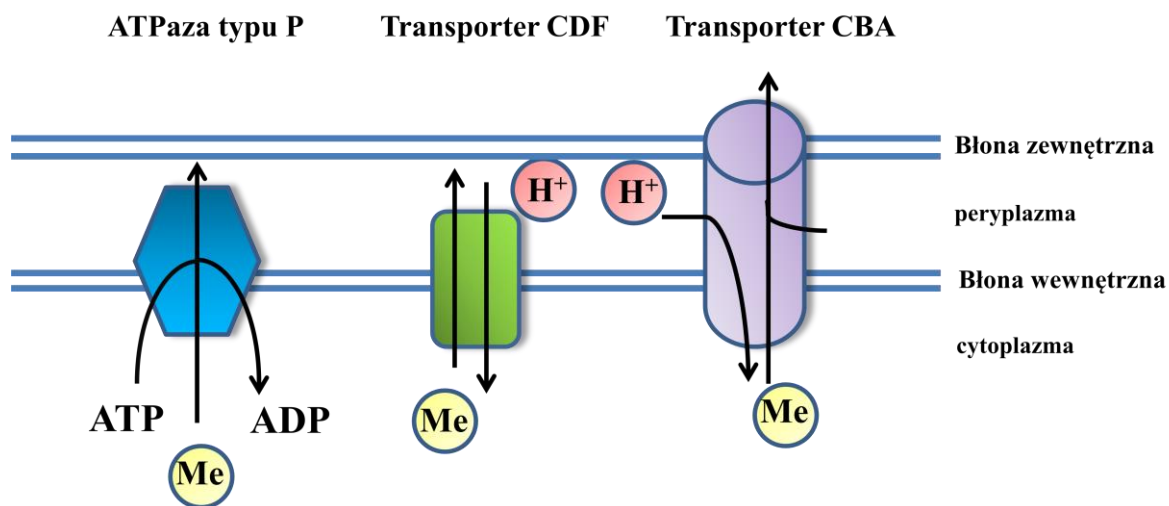


Ryc. 15 Schemat mechanizmu wiązania metali przez EPS [opracowano na podstawie Mohite i in., 2017].

Jednakże zdolność absorpcyjna powyższych polisacharydów jest niewystarczająca dla pełnej ochrony mikroorganizmów przed tymi metalami. W przypadku bardzo wysokiego stężenia metali toksycznych w środowisku, ilość miejsc w strukturze tych polisacharydów, do których przyłączać się mogą jony metali, ulega wysyceniu, umożliwiając tym samym ich wnikanie do wnętrza komórek [Pereira i in., 2006].

3.6.6.2. Systemy aktywnego transportu metali

System efflux to najbardziej efektywny sposób usuwania metali z cytoplazmy poza komórkę. Występowanie tego mechanizmu potwierdzono między innymi u bakterii *Escherichia coli* oraz *Staphylococcus aureus* [Bruins i in., 1999]. Pompy jonowe, będące integralną częścią tego systemu, mogą być zależne od energii zakumulowanej w ATP, bądź mogą działać na zasadzie wymiany jonów na drodze gradientu chemiosmotycznego. Błonowe ATPazy typu P czerpią energię z hydrolizy ATP [Nies, 2003], natomiast działanie kanałów jonowych zbudowanych z transporterów należących do rodziny białek CDF (ang. cation diffusion facilitator) lub CBA opiera się na chemiosmotycznym antyporcie z jonami wodoru (Ryc. 16).



Ryc. 16 Rodzaje pomp zaangażowanych w transport jonów metali z cytoplazmy komórki bakterii [schemat opracowany na podstawie Bruins i in., 1999].

ATPazy typu P oraz transportery CDF transportują jony metali jedynie do przestrzeni peryplazmatycznej komórek, natomiast pompy CBA transportują jony na zewnątrz komórki i, w przeciwieństwie do dwóch pierwszych pomp, są charakterystyczne jedynie dla bakterii Gram-dodatnich [Nies, 2003]. Systemy efflux charakteryzują się wysoką specyficnością w stosunku do transportowanych metali. Do metali ciężkich aktywnie wydzielanych poza komórkę za pomocą tego mechanizmu należą: kadm, miedź, arsen oraz ołów.

3.6.6.3. Geny oporności na metale ciężkie

Wiele mechanizmów oporności na stres wywołany metalami ciężkimi wykształconych u bakterii, w głównej mierze opiera się na obecności plazmidów zawierających geny oporności na pierwiastki toksyczne [Silver i Walderhaug, 1992]. Ekspresja genów zaangażowanych w odpowiedź mikroorganizmów na obecność metali ciężkich w środowisku jest indukowana, kiedy stężenie ich jonów wzrośnie do poziomu toksycznego [Singh i in., 2001]. Odkryto, że geny *actA*, odpowiedzialne za tolerancję bakterii na niskie pH środowiska, są w przypadku *E. meliloti* niezbędne do wykształcenia oporności na miedź oraz cynk [Tiwari i in., 1996]. Mutacje w genach *actA*, *actR* i *actS*, których ekspresja zachodzi w warunkach kwaśnego pH środowiska, powodują zwiększenie wrażliwości tych bakterii na miedź oraz cynk [Reeve i in., 2002].

Niektóre mikroorganizmy są zdolne do wykorzystania zarówno utlenionych, jak i zredukowanych form jonów niektórych metali ciężkich na potrzeby swojego metabolizmu. Przykładem jest dysymilacyjna redukcja arsenu na piątym stopniu utlenienia

(As(V)) do arsenu na trzecim stopniu utlenienia (As(III)) przez *Sulfurospirillum arsenophilum*. Bakterie te w środowisku beztlenowym wykorzystują As(V) jako alternatywny w stosunku do tlenu akceptor elektronów [Oremland i Stolz, 2003]. Natomiast szczep NT-26 należący do rodzaju *Rhizobium* może przeżyć w warunkach głodowych dzięki chemoautotroficznemu utlenianiu związków As(III). Bakterie są odporne na toksyczne działanie arsenu dzięki operonowi *ars* [Oremland i Stolz, 2003]. Mandal i wsp. [2008] scharakteryzowali geny oporności na arsen (*arsC*) w niektórych gatunkach ryzobiów, natomiast Sa-Pereira i wsp. [2007] zidentyfikowali gen *arsA* u innej symbiotycznej bakterii, *M. loti*.

Dodatkowo, geny oporności mogą się znajdować na chromosomach lub być zlokalizowane na mobilnych elementach genetycznych – transpozonach. Ruchome elementy genetyczne biorą udział w przekazywaniu genów pomiędzy bakteriami tego samego lub różnych gatunków bakterii w procesie tzw. horyzontalnego transferu genów. Proces ten sprzyja bioróżnorodności mikroorganizmów, ale też rozprzestrzenianiu się genów determinujących oporność, a tym samym zwiększaniu liczebności populacji bakterii opornych na metale ciężkie.

3.6.6.4. Inne mechanizmy obronne bakterii przed metalami ciężkimi

W komórkach niektórych ryzobiów (np. *R. leguminosarum*) wykryto wewnątrzkomórkowe węglowodany, które w sposób istotny zwiększały ich oporność na kadm, miedź, cynk oraz nikiel. Ponadto, w odpowiedzi na stres oksydacyjny wywołany przez metale obserwowano zwiększoną produkcję białek tiolowych [Balestrasse i in., 2001]. Tiole wiążą jony metali ciężkich tworząc kompleksy, co powoduje eliminację potencjału oksydoredukcyjnego tych jonów i tym samym zapobiega uszkodzeniom komórki. Wykazano, że związki tiolowe są skutecznym sposobem detoksyfikacji takich metali ciężkich, jak: kadm, złoto, rtęć oraz ołów [Singh i in., 2001]. Przykładem takiego mechanizmu obronnego u *R. leguminosarum* jest chelatowanie jonów kadmu przez glutation [Lima i in., 2006].

3.7. Biotechnologiczne zastosowanie ryzobiów oraz EPS w ochronie środowiska i bioremediacji

Istotną cechą mikroorganizmów jest ich zdolność do przekształcania niektórych naturalnych oraz syntetycznych związków chemicznych w pochodne związki, które następnie mogą być wykorzystane przez nie do wzrostu lub jako źródło energii. Do organizmów tych należą między innymi ryzobia. Wyniki ostatnich badań pokazują, że bakterie te są zdolne do usuwania ze środowiska różnego typu zanieczyszczeń organicznych, takich jak: aromatyczne i liniowe węglowodory, związki chlorowcowe, związki fenolowe, czy pestycydy [Teng i in., 2015]. Kaiya i in. [2012] wykazali, że bakterie należące do rodzaju *Rhizobium* stanowią najliczniejszą grupę mikroorganizmów degradujących dibenzofuran z obszarów skażonych, jednak ani enzymy, ani szlaki zaangażowane w neutralizację tych związków nie zostały dotychczas dokładnie poznane. Oprócz związków organicznych ryzobia posiadają również potencjał remediacyjny wobec metali ciężkich i metaloidów [Hao i in., 2014]. Bakterie te mogą redukować toksyczne działanie tych związków poprzez ich adsorpcję i akumulację na drodze enzymatycznej, a także poprzez wiązanie do zewnątrzkomórkowego polisacharydu (EPS), którego produkcja na wysokim poziomie jest cechą charakterystyczną ryzobiów. Na uwagę zasługuje również fakt, że obecność tych bakterii symbiotycznych w glebie pozytywnie wpływa na zdolności remediacyjne roślin bobowatych. Ryzobia wpływają na zwiększenie biomasy tych roślin, poprawiają żyzność gleb, zwiększają biodostępność zanieczyszczeń oraz ich pobieranie i transport do rośliny oraz wspomagają je w stabilizacji metali [Fester i in., 2014]. Tym samym symbiotyczne oddziaływanie pomiędzy ryzobiami a roślinami bobowatymi przyczynia się do efektywniejszego usuwania toksycznych związków z gleby [Glick, 2010].

3.7.1. Degradacja związków organicznych przez ryzobia

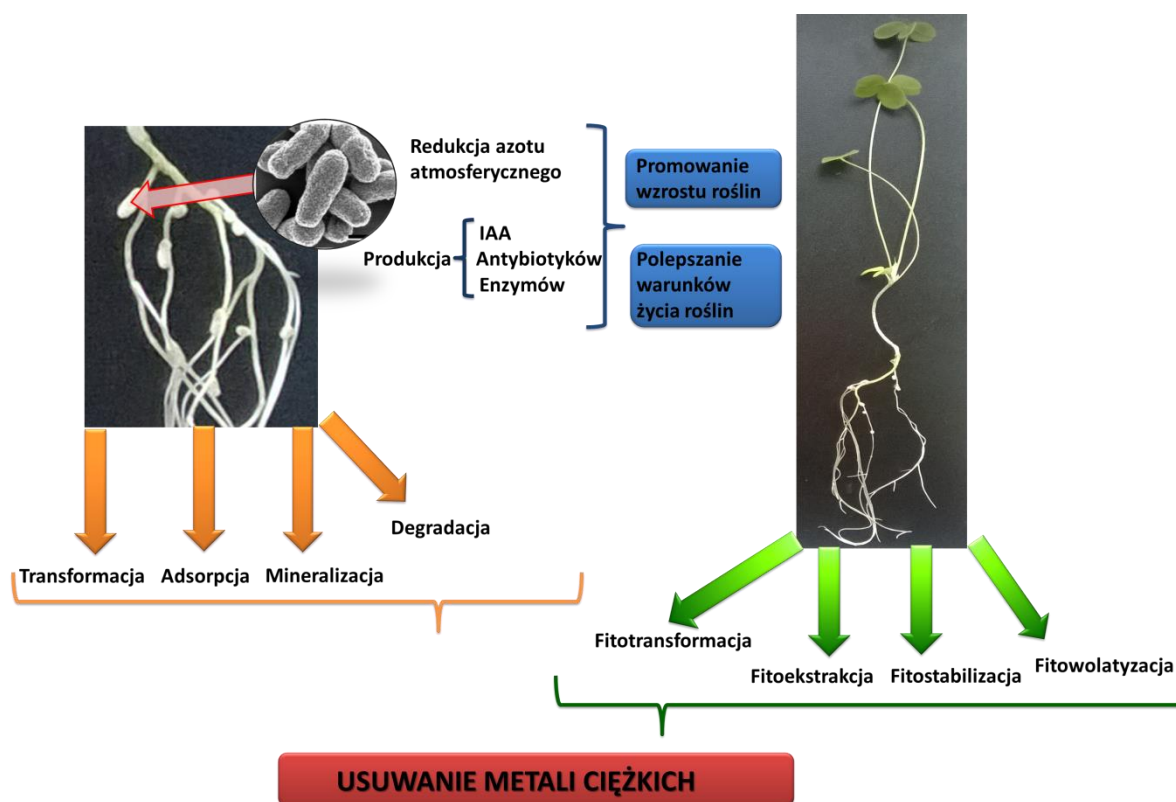
Wiele bakterii należących do rodzajów: *Rhizobium*, *Ensifer*, *Bradyrhizobium* i *Agrobacterium*, posiada zdolność wykorzystywania bądź wzrostu w obecności różnych związków organicznych, takich jak: policykliczne węglowodory aromatyczne (ang. polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH), polichlorowane bifenyle (ang. polychlorinated biphenyl, PCB) czy aromatyczne związki heterocykliczne (np. pirydyna) [Keum i in., 2006; Poonthirigpun i in., 2006; Tu i in., 2011]. Hussein i in. [1974] po raz pierwszy wyizolowali 22 szczepy *Rhizobium* zdolne do degradowania związków fenolowych (katechol, kwas

protokatechowy, kwas *p*-hydroksybenzoesowy i kwas salicylowy). Spośród tych szczepów *Rhizobium phaesoli* 405 przeprowadzał dysymilację *p*-hydroksybenzoesanu do kwasu salicylowego, a następnie do kwasu gentyzynowego. Policykliczne węglowodory aromatyczne klasyfikowane są jako substancje wysoce szkodliwe, posiadające silne właściwości genotoksyczne, mutagenne i kancerogenne. Zawierają one w swojej cząsteczce dwa lub więcej skondensowanych pierścieni benzenowych w różnych konfiguracjach strukturalnych [Poonthrigpun i in., 2006]. Ahmad i in. [1997] wyizolowali i scharakteryzowali różne szczepy *E. meliloti* w glebach zanieczyszczonych PAH. Wykazali również, że wśród badanej populacji występowały zróżnicowane fenotypowo i genetycznie szczepy bakteryjne, które efektywnie przeprowadzały proces wiązania azotu atmosferycznego. Do popularnych policyklicznych węglowodorów aromatycznych powszechnie występujących w skażonych glebach należą acenaftylen oraz fenantren. Poonthrigpun i in. [2006] wykazali, że szczep *Rhizobium sp.* CU-A1 w ciągu trzech dni był w stanie rozłożyć acenaftylen, którego stężenie w podłożu wynosiło 600 mg L⁻¹. Dodatkowo wykazano, że fenantren jest wykorzystywany przez *Sinorhizobium sp.* C4 jako jedyne źródło węgla w 16-etapowym szlaku metabolicznym [Keum i in., 2006]. Polichlorowane bifenyle są również klasyfikowane jako trwałe, silnie toksyczne i rakotwórcze związki, które w środowisku ulegają bardzo powolnemu rozkładowi. Wykazano, że szczep *S. meliloti* ACCC17519 jest zdolny do rozkładu PCB [Tu i in., 2009]. Przypuszcza się, że ryzobia wykształciły systemy enzymatyczne, umożliwiające rozkład takich związków organicznych, ponieważ bakterie te były często wystawiane na ich działanie. Co więcej, geny zaangażowane w rozkład tych substancji są szeroko rozpowszechnione w genomach tych bakterii i charakteryzują się wysoką konserwatywnością.

3.7.2. Remediacja metali ciężkich

Metale ciężkie oraz metaloidy są w wysokich stężeniach toksyczne dla organizmów żywych. Do najczęściej występujących metali ciężkich w zanieczyszczonych środowiskach należą: kadm, chrom, miedź, cynk, ołów oraz nikiel. Chociaż część z tych pierwiastków w niewielkich ilościach jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania, zarówno roślin, jak i mikroorganizmów, to ich nadmierna akumulacja prowadzi do zaburzeń metabolizmu, procesów komórkowych, uszkodzenia DNA i w konsekwencji do śmierci komórek. Niekorzystne warunki środowiskowe spowodowane obecnością tych pierwiastków doprowadziły do rozwoju populacji mikroorganizmów charakteryzujących

się wysoką tolerancją na metale, a także zdolnością do ich hiperakumulacji [Pereira i in., 2006]. Zwiększona oporność bakterii na takie metale jak: arsen, kadm, cynk, miedź czy ołów, zwróciła uwagę naukowców na ich potencjalne zastosowanie w bioremediacji (Ryc. 17).



Ryc. 17 Mechanizmy biodegradacji uczestniczące w usuwaniu metali ciężkich z wykorzystaniem układu symbiotycznego rośliny bobowate-ryzobia [opracowano na podstawie Teng i in., 2015].

Smith i Giller [1992] po raz pierwszy wyizolowali szczepy *R. leguminosarum* cechujące się wysoką tolerancją na metale w środowisku (kadm, cynk oraz miedź). Co więcej, stwierdzono, że na obszarach o wysokim stopniu tego rodzaju zanieczyszczeń, spośród szczepów ryzobiowych, najczęściej występują szczepy *Rhizobium sp.* oraz *Bradyrhizobium sp.* [Sriprang i in., 2002]. Badania prowadzone na *Rhizobium tropici* wykazały, że bakteria ta jest zdolna do remediacji kadmu ze środowiska wzrostu. Jak podają w swojej pracy Gupta i Diwan [2017], wydajność bioremediacji dla tego szczepu wynosi aż 80% dla jonów Cd^{2+} , których początkowe stężenie w środowisku wzrostu wynosiło 10 ppm.

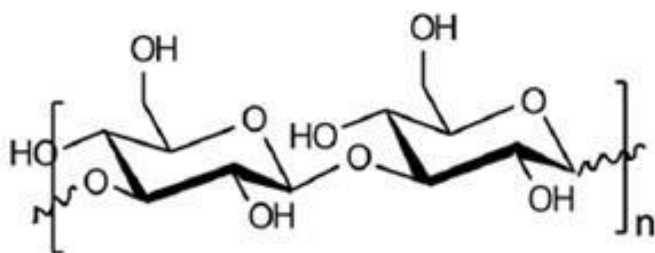
3.7.3. Udział ryzobiów w fitoremediacji

Znaczna część mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę, które są zasocjowane z systemem korzeniowym roślin, pozytywnie wpływa na wzrost roślin, stąd określane są mianem bakterii promujących wzrost roślin (ang. plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) [Glick, 2010; Fester i in., 2014]. Do mikroorganizmów tych należą również ryzobia, które dzięki swojej zdolności nawiązywania symbiozy z roślinami bobowatymi wpływają pozytywnie na ich biomasę oraz zwiększają ich zdolność pobierania, gromadzenia oraz usuwania toksycznych związków i metali ciężkich [Abhilash i in., 2012; Carrasco i in., 2005]. Proces ten jest możliwy głównie dzięki produkowanym przez glebowe bakterie niskocząsteczkowym kwasom organicznym (kwas szczawiowy, kwas cytrynowy, kwas 2-ketoglutarynowy), które w zależności od formy metalu oraz pH gleby mogą wpływać na ich wiązanie i desorpcję. Nie bez znaczenia są również produkowane przez bakterie siderofory, niskocząsteczkowe związki organiczne o właściwościach chelatujących jony metali, które charakteryzują się małą selektywnością i stosunkowo wysokim powinowactwem do pierwiastków, takich jak: żelazo, glin, kadm, miedź, ołów czy cynk. Siderofory, które zwiążą jony metali ciężkich mogą być następnie w prosty sposób pobierane, zarówno przez bakterie, jak i rośliny, zwiększając tym samym akumulację tych związków w tkankach roślinnych. Wykazano, że szczep *Rhizobium* sp. dzięki produkcji sideroforów zwiększa biodostępność jonów cynku oraz niklu roślinom bobowatym [Wani i in., 2007]. Ponadto siderofory uwalniane przez PGPR, w tym ryzobia [Wani i in., 2008; Ahemad i Khan, 2011a, 2011b] w ryzosferze służą jako źródło żelaza dla roślin [Burd i in., 2000], a zatem uzupełniają pulę żelaza w glebie, która jest wykorzystywana przez rośliny. Dodatkowo, ryzobia posiadają zdolność akumulowania szkodliwych substancji wewnątrz brodawek korzeniowych [Sun i in., 2011]. Wykazano, że gromadzenie policyklicznych bifenyli w lucernie było wyższe w brodawkach korzeniowych niż w innych częściach rośliny. W przeprowadzonym doświadczeniu wazonowym Li i in. [2013] pokazali, że bakterie *E. meliloti* w symbiozie z lucerną były efektywne w usuwaniu związków PCB.

3.7.4. Zastosowanie biotechnologiczne egzopolisacharydów syntetyzowanych przez ryzobia

Ryzobia są organizmami zdolnymi do produkcji ogromnej ilości zewnątrzkomórkowych polisacharydów (EPS). Wzrost zainteresowania naturalnymi polimerami spowodował, że w ostatnich latach nastąpił znaczny postęp w odkrywaniu oraz izolacji nowych EPS bakteryjnych, w tym ryzobiowych, posiadających innowacyjne zastosowanie w przemyśle [Nicolau i in., 2010]. Dotychczas poznane i opisane EPS znalazły zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu, takich jak: spożywczy, farmaceutyczny czy kosmetyczny. Przykładem takich polimerów może być bursztynoglikan EPS I *E. meliloti*, celuloza *R. leguminosarum* bv. *viciae* czy kurdlan *R. trifolii* [Sharma i in., 2015; Castellane i in., 2015; Ribeiro i Burkert, 2016; Ahmed i in., 2017]. Modelowym organizmem produkującym bursztynoglikan jest szczep *E. meliloti* RM 1201. Polimer ten znalazł zastosowanie w przemyśle spożywczym jako czynnik żelujący, a także ze względu na swój kwasowy charakter używany jest do produkcji środków czystości o niskiej wartości pH. Znalazł również zastosowanie w procesie wydobywania ropy naftowej [Sworn i Kerdvaid, 2012]. Kolejnym przykładem zastosowania EPS jest kurdlan produkowany m.in. przez *Rhizobium trifolii* [Turkiewicz i Czub, 1997] (Ryc. 18).

Kurdlan



Ryc. 18 Struktura chemiczna kurdlanu [Schmid i in., 2015].

Kurdlan znalazł wiele zastosowań przede wszystkim w przemyśle spożywczym jako czynnik żelujący przy produkcji wyrobów cukierniczych, deserów oraz zup. Ponadto, polisacharyd ten może być stosowany jako matryca do immobilizacji enzymów, a w połączeniu z azydetymidyną (AZT) wykazuje obiecującą, wysoką aktywność antyretrowirusową (lek przeciw AIDS) [Patel i Prajapati, 2013]. Natomiast ze względu na swoją biokompatybilność oraz nietoksyczność, bakteryjna celuloza znalazła szerokie zastosowanie w medycynie. Powszechnie używana jest do produkcji opatrunków, a także

stosowana jest jako tymczasowa sztuczna skóra przy gojeniu ran chirurgicznych oraz poparzeń, jako rusztowanie w inżynierii tkankowej, zamiennik tkanek miękkich oraz składnik sztucznych naczyń krwionośnych czy też jako substancja wypełniająca do produkcji tabletek i kapsulek (przemysł farmaceutyczny) [Chawla i in., 2009]. Ponadto, celuloza ma szereg zastosowań w innych gałęziach przemysłu, jak na przykład w przemyśle papierniczym do produkcji papieru o bardzo wysokiej wytrzymałości oraz papieru elektronicznego, w przemyśle spożywczym do produkcji żywności dietetycznej oraz deserów, a także jako adsorbent w technikach separacyjnych (chromatografia cienkowarstwowa i kolumnowa), składnik organicznych diod elektroluminescencyjnych czy jako membrany akustyczne w wysokiej klasy słuchawkach [Patel i Prajapati, 2013].

Co ciekawe, wiele ryzobiowych egozpolisacharydów ma udokumentowane właściwości flokulacyjne [Castellane i in., 2017; Alvarez i in., 2017]. Alvarez i wsp. [2017] badali bioemulsyfikatory produkowane przez *Ensifer adhaerens* JHT oraz ich potencjał w przemyśle spożywczym, jako dodatek emulsyfikujący do oliwy oraz oleju rzepakowego, sojowego, kukurydzianego oraz palmowego. Natomiast Castellane i in. [2017] poprzez przeprowadzone doświadczenia wykazali, że EPS produkowany przez szczep *Rhizobium tropici* SEMIA 4080 oraz może mieć potencjalne zastosowanie jako bioemulgator w degradacji węglowodorów.

Obecnie bardzo duży problem w gospodarce rolnej stanowią zanieczyszczenia dostające się do środowiska glebowego. Ze względu na szybko rozwijający się przemysł oraz stale postępującą urbanizację, do gleby dostaje się duża ilość toksycznych substancji, w tym jonów metali ciężkich. Zbyt wysokie stężenia tych pierwiastków negatywnie wpływają na rośliny oraz mikroorganizmy ryzosfery, zaburzając ich prawidłowy rozwój oraz przebieg procesów metabolicznych zachodzących w komórkach. Dotychczas nie przeprowadzono kompleksowych badań dotyczących wpływu metali ciężkich na własności fenotypowe ryzobiów oraz przebieg ich symbiozy z roślinami bobowatymi. Pomimo prowadzonych badań, niewiele jest informacji na temat roli jaką może pełnić EPS w ochronie ryzobiów przed stresem wywołanym obecnością tych metali w glebie oraz jego potencjalnym zastosowaniu w przemyśle. Istnieje zatem potrzeba przeprowadzenia dalszych badań, które pozwolą na szczegółową charakterystykę wpływu metali ciężkich na same komórki ryzobiów, na układ symbiotyczny ryzobia-rośliny bobowate, a także na sprawdzenie wydajności wiązania metali przez cząsteczki EPS.

4. Hipoteza i cel pracy

Wzrost urbanizacji oraz rozwój przemysłu spowodowały zwiększenie obecności toksycznych związków, w tym jonów metali ciężkich, w środowisku glebowym. Jest to stale pogłębiający się problem, który dotyczy wielu obszarów rolnych na całym świecie. Spowodowało to potrzebę poszukiwania przez naukowców skutecznych oraz nieingerujących w środowisko naturalnych metod usuwania toksycznych odpadów z gleby. Obecnie coraz większą popularność zdobywają metody bioremediacyjne, wykorzystujące potencjał mikroorganizmów w oczyszczaniu gleby. Do organizmów takich zaliczamy m. in. bakterie z rodzaju *Rhizobium*, które charakteryzują się zdolnością do nawiązywania symbiozy z roślinami bobowatymi (*Fabaceae*), a także syntezą ogromnej ilości, wydzielanego na zewnątrz komórki, polisacharydu (EPS). Polimer ten stanowi naturalną barierę ochronną bakterii, chroniąc je przed niekorzystnymi warunkami panującymi w glebie. Dotychczas nie przeprowadzono kompleksowych badań dotyczących wpływu jonów metali ciężkich, w tym jonów cynku, na własności fenotypowe oraz zdolności symbiotyczne ryzobiów. Aspekt ten jest niezwykle istotny dla bardziej efektywnego wykorzystania tych bakterii w remediacji.

Rola egzopolisacharydu w adaptacji *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* do warunków stresowych wywołanych obecnością jonów cynku

W związku z powyższym, celem tej pracy było ustalenie roli EPS w adaptacji bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* do stresu środowiskowego wywołanego obecnością jonów cynku. Cel rozprawy doktorskiej został realizowany przez następujące cele szczegółowe:

1. określenie wpływu jonów Zn^{2+} na własności fenotypowe szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* różniących się poziomem syntezy EPS;
2. określenie właściwości powierzchniowych komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* poddanych działaniu jonów Zn^{2+} ;
3. określenie wpływu jonów Zn^{2+} na własności symbiotyczne szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną łąkową (*Trifolium pratense*) jako gospodarzem roślinnym;
4. określenie wydajności wiązania jonów Zn^{2+} przez EPS wyizolowany ze szczepu dzikiego *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.


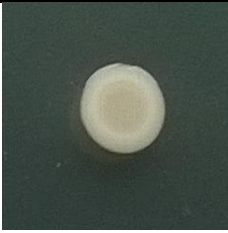


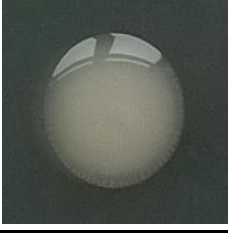
5. Materiały i metody

5.1. Materiały

5.1.1. Szczepy bakteryjne

Szczepy bakteryjne *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* użyte w tej pracy oraz ich charakterystykę i morfologię zamieszczono w Tabeli 3.

Tab. 3 Szczepy bakteryjne użyte w badaniach

Szczepy	Morfologia	Charakterystyka	Literatura
Rt24.2		Szczep dziki <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> , Rif ^R , Nx ^R	Janczarek i Skorupska, 2007
Rt5819(<i>pssA</i>)		Pochodna szczepu Rt24.2 zawierająca transpozon mini-Tn5 zlokalizowany pomiędzy 363 a 364 nukleotydem genu <i>pssA</i> ; szczep ten nie produkuje EPS; Rif ^R , Km ^R	Janczarek i in., 2009
Rt2472(<i>rosR</i>)		Pochodna szczepu Rt24.2 zawierająca transpozon mini-Tn5 zlokalizowany pomiędzy 151 a 152 nukleotydem genu <i>rosR</i> ; szczep ten produkuje 3-krotnie mniej EPS od szczepu dzikiego; Rif ^R , Km ^R	Janczarek i in., 2009
Rt24.2(pBA1)		Pochodna szczepu Rt24.2 zawierająca dodatkowe kopie genu <i>pssA</i> na plazmidzie pBBR1MCS-2; szczep ten produkuje zwiększoną ilość EPS (~150%) w porównaniu do szczepu dzikiego; Rif ^R , Km ^R	Janczarek i in., 2009
Rt24.2(pBR1)		Pochodna szczepu Rt24.2 zawierająca dodatkowe kopie genu <i>rosR</i> na plazmidzie pBBR1MCS-2; szczep ten produkuje zwiększoną ilość EPS (~150%) w porównaniu do szczepu dzikiego; Rif ^R , Km ^R	Janczarek i in., 2009

Km – kanamycyna, Rif – ryfampicyna, Nx- kwas nalidyksowy

5.1.2. Odczynniki

5.1.2.1. Odczynniki do oznaczania przeżywalności komórek bakteryjnych

- zestaw LIVE/DEAD *BacLight*TM (Life Technologies, Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

Zestaw ten zawiera dwa barwniki fluorescencyjne: SYTO9 o stężeniu 3,34 mM oraz jodek propidyny o stężeniu 20 mM. Barwniki te zmieszano w proporcji 1:1, a następnie rozcieńczono 10-krotnie w dimetylosulfotlenku (DMSO (Sigma-Aldrich)).

- wodny roztwór 0,9% NaCl (POCh)

5.1.2.2. Odczynniki do izolacji oraz oznaczenia stężenia polisacharydów

- 95% etanol (POCh)
- 2M NaOH (POCh)
- 1N NaOH (POCh)
- 95% kwas octowy (POCh)
- 75% kwas siarkowy (POCh)
- 1% indol w 95% etanolu (Sigma-Aldrich)
- wzorcowe roztwory glukozy (Sigma-Aldrich) o stężeniach: 0; 5; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 200; 400; 600; 800 i 1000 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

5.1.2.3. Odczynniki do oznaczenia ilości tworzonych biofilmu oraz wizualizacji jego struktury

- 0,9% NaCl (POCh)
- 0,1 % fiolet krystaliczny w 95% etanolu (POCh)
- 95% etanol (POCh)
- zestaw LIVE/DEAD *BacLight*TM (Life Technologies, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

5.1.2.4. Odczynniki do izolacji białek wewnątrzkomórkowych oraz peryplazmatycznych

- 50 mM bufor Tris-HCl (pH 8,0) (POCh)
- lizozym (12 mg ml⁻¹) (Thermo Scientific)
- Bufor hiperosmotyczny zawierający:
 - 20% Sacharoza (w/v) (Sigma-Aldrich)
 - 3 mM Tris-HCl (pH 8,0) (POCh)
 - 1 mM EDTA (POCh)

5.1.2.5. Odczynniki do oznaczenia aktywności katalazy oraz dysmutazy ponadtlenkowej

- 50 mM bufor Tris-HCl (pH 8,5) z dodatkiem 1 mM EDTA (POCh)
- 5 mM pirogalol w 10 mM HCl (POCh)
- Bufor Mc Ilvaine'a (pH 5,2)
Bufor ten zawiera roztwory A i B zmieszane w proporcji: 46,4 ml (roztwór A) i 53,6 ml (roztwór B).
 - Roztwór A: 2,1 g kwasu cytrynowego rozpuszczono w 100 ml wody dejonizowanej (POCh)
 - Roztwór B: 3,562 g Na₂HPO₄ rozpuszczono w 100 ml wody dejonizowanej (POCh)
- 30 mM H₂O₂ (otrzymano przez rozcieńczenie 30% H₂O₂ w 0,1M buforze Mc Ilvaine'a)

5.1.2.6. Odczynniki do oznaczenia hydrofobowości komórek bakteryjnych

- Bufor PUM:
 - K₂HPO₄ × H₂O 2,2% (w/v) (POCh)
 - KH₂PO₄ 0,73% (w/v) (POCh)
 - mocznik 0,18% (w/v) (Sigma-Aldrich)
 - MgSO₄ × 7H₂O 0,02% (w/v) (POCh)
 - H₂O destylowana (dopełniono do 1l)
- Dodekan (Sigma-Aldrich)

5.1.2.7. Odczynniki do oznaczenia właściwości fizykochemicznych komórek bakteryjnych

- 1 M HCl (POCh)
- 0,1 M NaOH (POCh)
- Formamid (Sigma-Aldrich)
- Dijodometan (Sigma-Aldrich)

5.1.2.8. Odczynniki do doświadczeń roślinnych

- 0,1% HgCl₂ (Merck)
- 70% etanol (POCh)
- 0,05% Tween-20 (Sigma-Aldrich)

5.1.3. Podłoża do hodowli bakterii oraz roślin

Skład pożywek i podłoży do hodowli szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* oraz do badania kiełkowania i hodowli koniczyny łąkowej podano w Tabeli 4. W zależności od prowadzonego eksperymentu skład ten modyfikowano przez dodatek odpowiedniej ilości ZnSO₄ lub/i zmianę pH.

Tab. 4 Skład pożywek i podłoża zastosowanych do hodowli bakterii oraz koniczyny łąkowej

Podłoża do hodowli szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>				Podłoża do hydroponicznej hodowli koniczyny łąkowej					
79CA*		TY		Podłoże do hodowli roślin (wg. Fåhræus'a)**		Podłoże do kiełkowania nasion**		Roztwór mikroelementów	
Składnik	Zawartość (% w/v)	Składnik	Zawartość (% w/v)	Składnik	Zawartość (% w/v)	Składnik	Zawartość (% w/v)	Składnik	Zawartość (% w/v)
ekstrakt drożdżowy	0,1	ekstrakt drożdżowy	0,3	CaCl ₂	0,01	NH ₄ H ₂ PO ₄	0,0115	H ₃ BO ₃	0,286
glicerol	1***	trypton	0,5	MgSO ₄ x7H ₂ O	0,012	KNO ₃	0,06	MnCl ₂ x4H ₂ O	0,203
hydrolizat kazeiny	0,1	CaCl ₂ x2H ₂ O	0,1	KH ₂ PO ₄	0,01	Ca(NO ₃)x4H ₂ O	0,095	ZnSO ₄ x7 H ₂ O	0,022
K ₂ HPO ₄	0,05			Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	0,015	MgSO ₄ x7H ₂ O	0,012	CuSO ₄ x5H ₂ O	0,008
NaCl	0,01			FeC ₆ H ₅ O ₇	0,0005	KH ₂ PO ₄	0,01	Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,014
glicerofosforan wapnia	0,01			Roztwór mikroelementów	0,1***	Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O	0,015		
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,02					FeC ₆ H ₅ O ₇	0,0005		
						Roztwór mikroelementów	0,1***		
pH (20 °C)	7,4	pH (20 °C)	7,2	pH (20 °C)	7,0	pH (20 °C)	7,0		

* Stałe podłoże zawierało 1% (w/v) agaru (Difco) ** Stałe podłoże zawierało 0,8% (w/v) agaru *** % (v/v) Do przygotowania podłoży wykorzystano wodę destylowaną. Pożywki i podłoża 79CA i TY do hodowli szczepów Rt24.2(pBA1) i Rt24.2(pBR1) zawierały kanamycynę (w końcowych stężeniach 20 µg/ml – hodowle płynne oraz 40 µg/ml – hodowle stałe) (roztwór wyjściowy zawierał 20 mg kanamycyny w 1 ml jałowej wody)

5.2. Metody

5.2.1. Hodowla szczepów *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

Szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* hodowano na podłożach pełnych 79CA [Vincent, 1970] oraz TY [Beringer, 1974], które są bogate w składniki odżywcze. W przypadku szczepów Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1) podłoża zawierały dodatkowo kanamycynę o stężeniu 20 µg/ml (hodowle na pożywce) oraz 40 µg/ml (hodowle na podłożu stałym).

W celu określenia wpływu jonów cynku na kinetykę wzrostu badanych szczepów, bakterie hodowano w 5 ml 79CA w obecności różnych stężeń ZnSO₄ (0; 0,05; 0,1; 0,5; 1 oraz 5 mM) przez 4 dni w temperaturze 28 °C w warunkach wytrząsania (160 rpm). Co 24 godz. wykonywano pomiary gęstości optycznej hodowli (OD₆₀₀) oraz odbierano po 100 µl w celu określenia miana bakterii w hodowli (ang. colony forming unit per ml; CFU/ml) z wykorzystaniem techniki seryjnych rozcieńczeń hodowli, wysiewu na płytki zawierające podłoże 79CA oraz liczenie pojawiających się kolonii. Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie w trzech powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu i badanego stężenia jonów cynku.

5.2.2. Określenie przeżywalności komórek *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

Proporcje żywych i martwych komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* określano dla bakterii hodowanych przez 24 godz. w 28 °C w warunkach wytrząsania (160 rpm) w pożywce 79CA o różnym stężeniu ZnSO₄ (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 oraz 10 mM). W tym celu hodowle odwirowywano (10 min, 10000 rpm), a osad bakteryjny dwukrotnie przemywano 0,9% NaCl i zawieszano w 100 µl wody dejonizowanej. W celu wizualizacji żywych oraz martwych komórek zawiesina bakterii była barwiona mieszaniną dwóch barwników fluorescencyjnych: SYTO-9 (komórki żywe – kolor zielony) oraz jodkiem propidyny (komórki martwe - kolor czerwony) (20 min, bez dostępu światła) (zestaw LIVE/DEAD *BacLight*TM (Life Technologies, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)). Komórki były następnie obserwowane z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego Axiowert 200M z głowicą skanującą LSM5 Pascal (Carl Zeiss, Jena, Niemcy). Dla każdego preparatu wykonano po 10 zdjęć dla długości fali 470 nm (fluorescencja zielona) oraz 546 nm (fluorescencja czerwona). Doświadczenie wykonano trzykrotnie w trzech powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu oraz testowanego wariantu.

5.2.3. Oznaczenie ilości tworzonego biofilmu

Do określenia wpływu jonów cynku na tworzenie biofilmu przez szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* zastosowano metodę opisaną przez Rinaudi i González [2009]. W tym celu dwudniowe hodowle bakteryjne rosnące w warunkach kontrolnych (w 79CA bez dodatku jonów cynku) oraz w obecności 0,1 mM, 0,5 mM i 1 mM ZnSO₄ rozcieńczono do wartości OD₆₀₀=0,4, naniesiono po 100 µl do 96-dołkowych, polistyrenowych płytek titracyjnych i inkubowano przez 4 dni w 28 °C w warunkach stacjonarnych (po 10 dołków na każdy szczep oraz testowane stężenie metalu). Po tym czasie mierzono gęstość optyczną hodowli (OD₆₀₀). Hodowle z dołków delikatnie usuwano i pozostały na dnie biofilm 3-krotnie przepłukiwano 0,9% roztworem NaCl. Następnie biofilm barwiono 0,1% roztworem fioletu krystalicznego w 95% etanolu przez 15 minut, a po tym czasie płukano 3-krotnie wodą dejonizowaną. Wybarwiony biofilm rozpuszczano w 95% etanolu i mierzono OD₅₆₀ próbek na czytniku płytek (Biochrom Asys UVM340, Biochrom, UK). Eksperyment przeprowadzono 3-krotnie w 5 powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu i wariantu.

5.2.4. Określenie struktury biofilmów z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej

Strukturę przestrzenną biofilmów tworzonych przez badane szczepy na powierzchni dołków płytek polistyrenowych określono z wykorzystaniem zestawu LIVE/DEAD *BacLight*TM (Life Technologies, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) według metody opisanej w pracy Janczarek i wsp. [2015]. 48-godz. hodowle w 79CA bez oraz z dodatkiem 1 mM ZnSO₄ x H₂O rozcieńczono do wartości OD₆₀₀=0,2 i naniesiono po 0,5 ml do 48-dołkowej, polistyrenowej płytki titracyjnej. Płytke inkubowano przez 4 dni w 28 °C. Po tym czasie hodowle delikatnie usuwano, a biofilm przepłukiwano 3-krotnie 0,9% NaCl i barwiono barwnikami fluorescencyjnymi przez 20 minut. Wybarwione biofilmy obserwowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Olympus SV1000 (Carl Zeiss, Jena, Niemcy). Doświadczenie przeprowadzono 2-krotnie w trzech powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu i wariantu, po 3 dołki na każde powtórzenie.

Dodatkowo z każdego dołka wykonano po 10 zdjęć, na podstawie których obliczono następujące parametry biofilmów: procent pokrycia powierzchni dna dołka przez biofilm, grubość biofilmu oraz stosunek liczby żywych do martwych komórek bakterii.

5.2.5. Izolacja polisacharydów rizobiowych

5.2.5.1. Izolacja egzopolisacharydu (EPS)

5.2.5.1.1. Izolacja frakcji wysokocząsteczkowej EPS

W celu izolacji frakcji wysokocząsteczkowej (ang. high-molecular-weight, HMW) EPS, szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* hodowano w 79CA o różnym stężeniu $ZnSO_4 \times H_2O$ (0; 0,1; 0,5 oraz 1 mM) przez 72 godz. w 28 °C (160 rpm). Po tym czasie odebrano z hodowli po 100 µl w celu obliczenia miana bakterii (CFU/ml), a pozostałą objętość hodowli odwirowano (15 min, 14000 rpm). HMW EPS obecny w supernatancie strącono zimnym 95% etanolem, w stosunku objętościowym 3:1 (etanol : supernatant) (24 godz. w temperaturze 4 °C). Następnie EPS osadzono przez wirowanie (20 min, 14000 rpm) i rozpuszczono w wodzie dejonizowanej [Janczarek i in., 2009]. Doświadczenie wykonano dwukrotnie w 4 powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu i badanego wariantu.

5.2.5.1.2. Izolacja frakcji niskocząsteczkowej EPS

Ilość niskocząsteczkowej frakcji (ang. low-molecular-weight, LMW) EPS produkowanego przez badane szczepy hodowane w 79CA (warunki kontrolne) oraz w obecności 1 mM jonów cynku określono według metody Venkatachalam i wsp. [2014]. W tym celu, supernatant uzyskany po wirowaniu 72-godz. hodowli bakteryjnych i pozbawiony frakcji HMW EPS (poprzez wytrącenie 95% etanolem w proporcji 3:1), strącono następnie zimnym 95% etanolem w stosunku objętościowym 10:1 i inkubowano przez 24 godz. w 4 °C. Wytrącona frakcja LMW EPS została odwirowana (40 min, 14000 rpm, 4 °C) i rozpuszczona w wodzie dejonizowanej. Doświadczenie wykonano dwukrotnie w 4 powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu i badanego wariantu.

5.2.5.2. Izolacja polisacharydu żelującego (GPS)

Do izolacji polisacharydu żelującego (GPS), polisacharydu kapsularnego (CPS) oraz cyklicznych β-glukanów (CG) posłużyły 3-dniowe hodowle badanych szczepów w pożywce 79CA bez oraz z dodatkiem 1 mM $ZnSO_4$.

W celu ekstrakcji GPS z powierzchni komórek, osad bakterii uzyskany ze 100 ml hodowli (20 min, 4 °C, 8000 rpm) zawieszono w 20 ml wody dejonizowanej, dodano 20 ml 2M NaOH, a następnie mieszano przez 2 godz. w temperaturze pokojowej. Po tym

czasie zawiesiny odwirowano aby usunąć komórki bakterii (20 min, 4 °C, 8000 rpm), a klarowny supernatant zakwaszono 5 ml 99,5% kwasu octowego w celu wytrącenia GPS. Polisacharyd wytrącano przez noc w 4 °C, a następnie wirowano (40 min, 8000 rpm, 4 °C), suszono i rozpuszczano w wodzie dejonizowanej [Zevenhuizen i van Neerven, 1983].

5.2.5.3. Izolacja polisacharydu kapsularnego (CPS)

Osad bakterii uzyskany po wirowaniu 100 ml hodowli zawieszono w 40 ml 1N NaOH i mieszano przez 2 godz. w temp. pokojowej, a następnie wirowano (20 min, 8000 rpm, 4 °C). Polisacharyd obecny w uzyskanym supernatancie wytrącano 95% etanolem (w stosunku objętościowym 1:1) przez noc w 4 °C, a następnie ponownie wirowano (40 min, 8000 rpm, 4 °C), suszono i rozpuszczono w wodzie dejonizowanej [Breedveld i in., 1993].

5.2.5.4. Izolacja cyklicznych β -glukanów

W celu izolacji cyklicznych β -glukanów, osad uzyskany ze 100 ml hodowli bakterii zawieszono w 20 ml wody dejonizowanej, mieszano z dodatkiem 20 ml 1 N NaOH przez 2 godz. w temp. pokojowej i wirowano (20 min, 8000 rpm, 4 °C), a do uzyskanego supernatantu dodano 1 objętość zimnego 95% etanolu. Następnie mieszaninę ponownie wirowano, a w supernatancie zawierającym 50% alkoholu oznaczono stężenie glukozy [Breedveld i in., 1993].

5.2.6. Oznaczenie ilości polisacharydów produkowanych przez szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

Ilość poszczególnych polisacharydów produkowanych przez badane szczepy wyrażono jako ekwiwalent glukozy, wykorzystując metodę opisaną przez Loewus [Loewus, 1952]. Do 20 μ l wodnych roztworów badanych próbek dodawano 0,5 ml 75% kwasu siarkowego oraz 20 μ l 1% indolu rozpuszczonego w 95% etanolu. Mieszaninę inkubowano przez 15 minut w 100 °C, a następnie odczytywano absorbancję przy długości fali $\lambda=470$ nm wobec próby kontrolnej zawierającej wodę zamiast próby. Stężenie cukrów odczytywano z krzywej wzorcowej wykonanej dla szeregu stężeń glukozy.

5.2.7. Określenie zdolności migracji szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

Zdolność migracji bakterii określono wykorzystując metodę opisaną przez Rachwał i wsp. [2015]. Dla badanych szczepów wykonano testy płytkowe na podłożu 79CA o różnym stopniu zestalenia oraz różnym stężeniu jonów cynku (w zakresie od 0 do 1 mM $ZnSO_4 \times H_2O$). W celu określenia ruchliwości bakterii, 5 μ l zawiesin bakteryjnych o $OD_{600}=0,4$ wkluwano w płytki 79CA zawierające 0,3% agaru (ang. swimming motility) oraz nakraplano na powierzchnię podłoża zawierającego 0,7% agaru (ang. swarming motility). Płytki inkubowano w 25 °C przez 4 dni i po tym czasie obserwowano różnice w migracji komórek, mierząc średnicę obszaru zajmowanego przez bakterie. Doświadczenie przeprowadzono 3-krotnie w trzech powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu oraz stężenia jonów cynku.

5.2.8. Oznaczenie zdolności szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do autoagregacji

Badane szczepy *R.leguminosarum* bv. *trifolii* hodowano przez 24 godz. (160 rpm, 28 °C) w 5 ml pożywki 79CA o różnym stężeniu $ZnSO_4$ (od 0 do 5 mM). Po tym czasie, hodowle odstawiano na kolejne 24 godz. (temp. pokojowa, warunki statyczne), a następnie pobierano 0,3 ml z górnej fazy każdej zawiesiny bakteryjnej i mierzono jej gęstość optyczną przy długości fali 600 nm (A_2). Pozostałą objętość zawiesiny energicznie mieszano, pobierano 0,3 ml roztworu i ponownie mierzono jej gęstość optyczną (A_1). Zdolność komórek do autoagregacji obliczano według poniższego wzoru, na podstawie wartości OD_{600} pobieranych próbek i przedstawiano jako % komórek ulegających autoagregacji [Sorroche i in., 2012]:

$$\% \text{ autoagregacji} = 100 \times \left[1 - \frac{A_2}{A_1} \right]$$

5.2.9. Pomiar oddychania komórkowego szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

Zawiesiny bakteryjne badanych szczepów o $OD_{600}= 1,0$ przygotowane w pożywce 79CA o pH=7,4 niezawierającej ekstraktu drożdżowego oraz hydrolizatu kazeiny, inkubowano przez 2 godz. bez oraz w obecności 1 mM oraz 10 mM $ZnSO_4$ (160 rpm, 28 °C). Następnie hodowle dodawano do kolbek miarowych zawierających dobrze napowietrzoną, tak samo zmodyfikowaną pożywkę 79CA w stosunku 1:2 (hodowla

bakterii : podłoże) i szczelnie zatykano korkami ligninowymi, całkowicie ograniczając dostęp powietrza. Pomiar spadku stężenia tlenu w hodowlach bakteryjnych mierzono za pomocą elektrody tlenowej (VisiFerm DO Arc 225, Hamilton Robotics, Bonaduz, GR, Szwajcaria) podłączonej do bioreaktora (Jupiter 2.0 Multi, Solaris) w czasie $t=0$ (A_0) oraz przez następne 20 minut, odczytując wyniki co 2 minuty (A_1). Doświadczenie prowadzono w stałej temperaturze 28 °C oraz w warunkach ciągłego mieszania (200 rpm). Procent zużycia tlenu przez bakterie obliczono według wzoru:

$$\text{zużycie } O_2 = \frac{A_1}{A_0} \times 100\%$$

5.2.10. Otrzymywanie frakcji białek cytoplazmatycznych i peryplazmatycznych *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

W celu oznaczenia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy we frakcji białek cytoplazmatycznych i peryplazmatycznych, badane szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* hodowano przez 2 dni w 100 ml 79CA bez dodatku oraz w obecności 1 mM ZnSO₄. Po tym czasie hodowle wirowano (45 minut, 8000 rpm, 4 °C), a uzyskany osad bakteryjny użyto do izolacji wymienionych frakcji białkowych.

5.2.10.1. Izolacja białek cytoplazmatycznych

W celu izolacji frakcji białek cytoplazmatycznych, osad bakteryjny uzyskany po wirowaniu przemyto 0,9% roztworem NaCl, zawieszono w 2 ml 50 mM buforu Tris-HCl (pH 8,0), dodano 20 µl lizozymu (12 mg ml⁻¹) i inkubowano przez 30 minut w 37 °C. Tak przygotowane preparaty poddano homogenizacji z użyciem prasy (Thermo Electron Corporation, USA), a uzyskane lizaty wirowano (30 min, 10000 rpm, 4 °C) [Krehenbrink i Downie, 2011]. W klarownych supernatantach zmierzono stężenie białka metodą Bradford [Bradford, 1976] oraz aktywność enzymatyczną dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy.

5.2.10.2. Izolacja białek peryplazmatycznych

W celu uzyskania frakcji białek peryplazmatycznych, osad bakteryjny uzyskany po wirowaniu przemyto 0,9% roztworem NaCl i zawieszono w 10 ml buforu hiperosmotycznego. Następnie zawiesinę bakterii inkubowano przez 15 minut w 28 °C i ponownie odwirowano (15 min, 8000 rpm, temp. pokojowa). Osad bakterii zawieszono w 10 ml lodowatej wody dejonizowanej i inkubowano w lodzie kolejne 15 minut.

W supernatancie uzyskanym po osadzeniu bakterii (30 min, 8000 rpm, 4 °C) oznaczono stężenie białka metodą Bradford oraz aktywność enzymatyczną dysmutazy ponadtlenkowej [Krehenbrink i Downie, 2011].

5.2.11. Oznaczenie stężenia białka metodą Bradford

Do próbek typu Eppendorf zawierających 160 µl roztworów badanych preparatów białkowych dodano 40 µl odczynnika Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, USA). Próbki mieszano i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Stężenie białka w próbkach określono poprzez pomiar spektrofotometryczny przy długości fali $\lambda=595$ nm wobec próby kontrolnej zawierającej wodę dejonizowaną zamiast roztworu białka (Biochrom Asys UVM340, Biochrom, UK). Stężenie białka w próbce odczytywano na podstawie krzywej wzorcowej wykonanej dla albuminy surowicy bydlęcej [Bradford, 1976].

5.2.12. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej

Mieszaninę reakcyjną zawierającą 700 µl 50 mM buforu Tris-HCl (pH 8,5) i 50 µl próby badanej inkubowano przez 5 minut w temperaturze 30 °C. Reakcję rozpoczynano poprzez dodanie 50 µl 5 mM pirogalolu rozpuszczonego w 10 mM HCl. Mierzono przyrost absorbancji przy długości fali $\lambda=320$ nm wobec próby odczynnikowej, zawierającej wodę dejonizowaną zamiast próby badanej (Cary Win 300 Bio, Varian, USA). Jako jednostkę aktywności przyjęto procent zahamowania samoutlenienia pirogalolu wyrażony stosunkiem przyrostu absorbancji próby badanej i kontrolnej:

$$\text{Aktywność SOD} = \frac{\frac{\Delta E_A - E_B}{E_A} \times 100\%}{50\%} \times V_{MR} \times \frac{1}{V_P} \times D$$

gdzie:

ΔE_A – przyrost absorbancji (przy długości fali $\lambda = 320$ nm) w próbce kontrolnej w czasie 60 s wywołany samoutlenieniem pirogalolu

ΔE_B – przyrost absorbancji (przy długości fali $\lambda = 320$ nm) w próbce badanej w czasie 60 s

V_{MR} – objętość mieszaniny reakcyjnej [ml]

V_P – objętość próby badanej [ml]

D – rozcieńczenie próby badanej

Aktywność specyficzną SOD wyrażono w jednostkach aktywności SOD na mg białka zawartego w próbce badanej [U/ mg białka] [Marklund, 1974].

5.2.13. Oznaczenie aktywności katalazy

Aktywność katalazy oznaczano spektrofotometrycznie monitorując rozkład nadtlenu wodoru w obecności enzymu zawartego w próbce badanej [Aebi, 1984]. W tym celu, do 750 μ l przygotowanego substratu (30 mM H₂O₂ w 0,1 M buforze Mc Ilvaine'a) dodano 7,5 μ l próby badanej. Wymieszaną próbkę umieszczano w komorze spektrofotometru i mierzono spadek absorbancji w czasie 30 s przy długości fali $\lambda=240$ nm wobec próby odczynnikowej (Cary Win 300 Bio, Varian, USA). Aktywność katalazy obliczono ze wzoru:

$$\text{Aktywność CAT} = \frac{(\Delta A_P - \Delta A_K) \times V_{MR} \times 10^3}{\varepsilon \times V_P}$$

gdzie:

ΔA_P - spadek absorbancji w próbce badanej w czasie 30 s (przy długości fali $\lambda = 240$ nm)

ΔA_K - spadek absorbancji w próbce kontrolnej w czasie 30 s (przy długości fali $\lambda = 240$ nm)

V_{MR} – objętość mieszaniny reakcyjnej [ml]

V_P – objętość próby badanej [ml]

ε – molowy współczynnik absorpcji dla katalazy równy 39,40 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹

Aktywność specyficzną CAT wyrażono jako [U/ mg białka].

5.2.14. Badanie właściwości fizykochemicznych komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

5.2.14.1. Oznaczenie ruchliwości elektroforetycznej komórek bakterii z wykorzystaniem laserowej elektroforezy dopplerowskiej

Pomiar ruchliwości elektroforetycznej (ang. electrophoretic mobility, EM) komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* stanowił jeden z etapów badań dotyczących wpływu jonów cynku na fizyko-chemiczne właściwości powierzchniowe komórek bakteryjnych. Do przeprowadzenia tego eksperymentu wybrano podłoże TY ze względu na niską zawartość składników mineralnych, mogących wchodzić w interakcję z zewnątrzkomórkowymi polimerowymi składnikami otoczki bakterii. Podłoże to filtrowano (Whatman Anodisc Membrane Filter, średnica porów 0,02 μm) w celu usunięcia zanieczyszczeń stałych, których obecność w zawieszynie mogłaby wpłynąć na wynik pomiaru. Analizy wykonano dla:

- 24-godz. hodowli bakteryjnych inkubowanych w pożywce TY o różnym stężeniu ZnSO_4 (0; 1; 10; 50; 200 mM)
- hodowli prowadzonych przez różny okres czasu (24, 48 oraz 96 godz.) w pożywce TY niezawierającej jonów cynku oraz zawierającej 1 mM ZnSO_4
- 24-godz. hodowli bakteryjnych w pożywce TY zawierającej ZnSO_4 o stężeniu odpowiednio: 0 mM i 1 mM oraz pH w zakresie od 3 do 7.

Eksperyment przeprowadzono 3-krotnie w trzech powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu oraz wariantu. Przygotowanie próbek oraz wykonanie pomiarów realizowano w oparciu o wcześniej opracowaną metodykę [Cieśla i in., 2011]. W tym celu gęstość optyczną wszystkich zawiesin bakteryjnych doprowadzono do wartości $\text{OD}_{600}=0,4$ stosując podłoże TY o składzie odpowiednim dla danego wariantu doświadczenia.

Pomiary wykonano za pomocą urządzenia Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK), wykorzystującego metodę laserowej dopplerowskiej elektroforezy (ang. Laser Doppler Electrophoresis, LDE) w połączeniu z analizą fazową światła rozpraszanego (ang. Phase Analysis Light Scattering, PALS). Źródłem światła o długości fali 633 nm był laser helowo-neonowy. Wiązka światła przechodzącego rozproszonego pod kątem 17° po nałożeniu z wiązką referencyjną trafiała na detektor urządzenia, a następnie sygnał podlegał obróbce cyfrowej za pomocą procesora i trafiał do komputera, gdzie był analizowany przez oprogramowanie (Zetasizer Nano Series User Manual, 2004). Pomiary ruchliwości elektroforetycznej bakterii wykonywano w temperaturze 20°C .

5.2.14.2. Określenie charakteru kwasowo-zasadowego komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

W celu określenia wpływu jonów cynku na udział specyficznych grup funkcyjnych obecnych na powierzchni komórek w generowaniu powierzchniowego ładunku elektrycznego wykonano miareczkowanie potencjometryczne, stosując wcześniej opracowaną metodykę [Cieśla i in., 2016]. W doświadczeniu tym użyto 100 ml 24-godz. hodowli bakteryjnych w TY (stężenie $ZnSO_4$ równe 0 mM i 1 mM) o $OD_{600} = 0,4$. Za pomocą 1 M HCl doprowadzono pH zawiesin bakteryjnych do wartości 3, a następnie miareczkowano w zakresie wartości pH od 3 do 7, przy użyciu 0,1 M NaOH. W tym samym zakresie pH przeprowadzono miareczkowanie podłoża. Analizy wykonywano w temperaturze 20 °C z zastosowaniem stacji miareczkującej Titralab TIM 965 (Radiometer Analytical SAS, Lyon, Francja).

Korzystając z dostępnych w literaturze równań [Nederlof i in., 1993; Józefaciuk i Szatanik-Kloc, 2004; Cieśla i in., 2016] obliczono wartości funkcji rozkładu pozornych stałych dysocjacji powierzchniowych grup funkcyjnych ($f(pK_{app})$) oraz średnią pozorną stałą dysocjacji ($pK_{app,av}$), przy czym pojęcie „stała dysocjacji” odnoszono tu do stałej dysocjacji (K_{app}) wyrażonej w formie zlogarytmowanej ($pK_{app} = -\log(K_{app})$).

Funkcja rozkładu pozornych stałych dysocjacji [$f(pK_{app})$] przyjmuje wartości od 0 do 1. Jej przebieg odzwierciedla udział grup funkcyjnych, charakteryzowanych przez poszczególne wartości pK_{app} , w generowaniu całkowitego ładunku elektrycznego powierzchni komórek.

Do oceny ogólnego charakteru kwasowego powierzchni komórek bakteryjnych posłużono się wartością średniej pozornej stałej dysocjacji ($pK_{app,av}$), obliczoną na podstawie wzoru:

$$pK_{app,av} = \sum_{i=1}^n pK_{app_i} f(pK_{app_i})$$

gdzie: pK_{app_i} - pozorna stała dysocjacji grup funkcyjnych i , $f(pK_{app_i})$ - wartość funkcji rozkładu pozornych stałych dysocjacji uzyskana dla grup funkcyjnych i .

Niskie wartości pK_{app} są charakterystyczne dla mocnych kwasów. Zatem im niższa jest wartość $pK_{app,av}$, tym bardziej kwasowy charakter przejawiają otoczki komórek bakteryjnych.

5.2.14.3. Pomiar kątów zwilżania oraz wyznaczenie swobodnej energii powierzchniowej

Hydrofobowe/hydrofilowe właściwości powierzchniowe komórek badanych szczepów określono wykorzystując metodę osadzonej kropli (ang. sessile drop technique) oraz wcześniej opracowaną metodykę [Cieśla i in., 2016]. Jednodniowe hodowle bakteryjne w TY (stężenie ZnSO₄ równe 0 mM i 1 mM) rozcieńczono do wartości OD₆₀₀=0,4, a następnie z wykorzystaniem podciśnienia naniesiono na membrany celulozowe o średnicy porów 0,45 μm (Whatman, GE Helathcare UK Ltd., Little Chalfont, UK). Membrany mocowano za pomocą taśmy dwustronnej na szkiełkach mikroskopowych, suszono 40 minut w komorze laminarnej w temperaturze pokojowej i mierzono kąty zwilżania dla trzech cieczy: wody, formamidu oraz dijdometanu [Busscher i in., 1984]. Pomiary wykonano 3-krotnie w trzech powtórzeniach biologicznych dla każdego szczepu i wariantu, w stałej temperaturze 20 °C z zastosowaniem mikroskopu DSA100 wyposażonego w goniometr oraz kamerę CCD (KRÜSS GmbH, Hamburg, Niemcy). Do wyznaczenia swobodnej energii powierzchniowej (ang. surface free energy, SFE) wykorzystano metodę opisaną przez van Ossa i wsp. (1987).

5.2.15. Oznaczenie hydrofobowości komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

W celu określenia hydrofobowości powierzchni komórek badanych szczepów zastosowano metodę opracowaną przez Neu i Poralla [1990]. W tym celu wykorzystano 24-godz. hodowle w 79CA zawierające różne stężenia ZnSO₄ (0 – 50 mM). Osady bakterii uzyskane przez wirowanie (12 min, 10000 rpm) zawieszano w buforze PUM, doprowadzając ich gęstość optyczną do wartości ~ 1,0, mierzonej przy długości fali λ = 405 nm (OD₁) (Biochrom Asys UVM340, Biochrom, UK). Następnie do 600 μl zawiesin bakteryjnych dodawano 300 μl dodekanu, mieszaninę intensywnie wytrząsano przez 2 minuty i odstawiano na 15 minut w celu rozdzielenia się fazy wodnej oraz organicznej. Po tym czasie mierzono OD₄₀₅ fazy wodnej (OD_a) i obliczano stopień hydrofobowości komórek ze wzoru:

$$\text{hydrofobowość (\%)} = 100 - 100 \times \frac{OD_a}{OD_1}$$

5.2.16. Określenie wydajności wiązania jonów Zn^{2+} przez EPS wyizolowany z hodowli szczepu Rt24.2

W celu określenia wydajności wiązania jonów Zn^{2+} przez EPS wyizolowany ze szczepu Rt24.2 metodą opisaną w podrozdziale 2.5.1. uzyskany polisacharyd oczyszczono poprzez 2-krotne strącanie etanolem, wirowanie oraz dializę w wodzie (24 h), a następnie w roztworze HCl (pH 4) (24 h) w celu eliminacji jonów zaadsorbowanych z pożywki 79CA. W otrzymanym preparacie oznaczono stężenie białka metodą Bradford [Bradford, 1976], a następnie poddano go liofilizacji. Czysty preparat EPS o stężeniu 1 mg ml^{-1} dodawano do wodnych roztworów $ZnCl_2$, a następnie dializowano w warunkach wytrząsania (24h, 100 rpm, temp. pokojowa). Po tym czasie uzyskane dializaty zakwaszono 20% HCl i oznaczono stężenie jonów Zn^{2+} metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA). Doświadczenie przeprowadzono w 2 powtórzeniach biologicznych dla szeregu stężeń $ZnCl_2$ (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 5; 10; 15; 20 oraz 50 mM).

Proces adsorpcji jonów Zn^{2+} na powierzchni EPS został opisany za pomocą równania Langmuira. Izoterma adsorpcji Langmuira opisuje zależność ilości zaadsorbowanej substancji od stężenia adsorbantu przy ustalonej temperaturze i zakłada, że adsorbat może tworzyć na powierzchni adsorbentu monowarstwę cząsteczek, które oddziałują z miejscami adsorpcyjnymi, ale nie wchodzi w interakcje ze sobą. W teorii tej zakłada się również, że cząsteczki adsorbantu nie mogą tworzyć na powierzchni adsorbentu wielowarstwy oraz energia adsorpcji jest stała, czyli powierzchnia adsorbentu jest energetycznie jednorodna. W stanie równowagi termodynamicznej szybkość adsorpcji jest równa szybkości desorpcji. Izoterma adsorpcji Langmuira opisana jest następującym równaniem (Vijayaraghavan i in., 2006):

$$q = \frac{q_{max} \times K \times c}{1 + K \times c}$$

gdzie c – stężenie równowagowe adsorbantu w roztworze [$\text{mg (dm}^3)^{-1}$],

q – stężenie adsorbantu w fazie stałej bioadsorbentu [mg g^{-1}],

q_{max} – maksymalne stężenie adsorbantu w fazie stałej bioadsorbentu

(pojemność monowarstwy) [mg g^{-1}],

K – stała równowagi reakcji [$\text{dm}^3 \text{ g}^{-1}$].

Do wyznaczenia adsorpcji jonów cynku na EPS i wyliczenia pojemności monowarstwy (q_{max}), posłużyło zlinearyzowane równanie adsorpcji Langmuira:

$$\frac{c}{q} = \frac{c}{q_{max}} + \frac{1}{q_{max} \times K}$$

5.2.17. Doświadczenia roślinne

5.2.17.1. Jałowienie nasion koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*)

Nasiona koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*, odmiana Dajana) płukano 3-krotnie w wodzie jałowej dejonizowanej, a następnie inkubowano przez 1 min w 0,1% HgCl₂. Po tym czasie nasiona ponownie płukano 3-krotnie w wodzie jałowej, inkubowano przez 1 min w 70% etanolu, a następnie płukano 3-krotnie w wodzie jałowej i wykorzystywano do dalszych analiz.

5.2.17.2. Określenie wpływu jonów cynku na kiełkowanie koniczyny łąkowej

Przeprowadzono eksperyment mający na celu zbadanie wpływu jonów cynku na kiełkowanie nasion koniczyny łąkowej. Nasiona wykładano na płytki Petriego (30 nasion na płytkę), zawierające płynne bądź stałe podłoże do kiełkowania nasion (Tab. 4) wzbogacone o ZnSO₄ (w zakresie stężeń od 0 do 1mM), zachowując jałowe warunki. Płytki inkubowano przez 7 dni w 24 °C, a po tym czasie liczono ilość wykiełkowanych nasion oraz mierzono długość łodygi i korzenia kiełków. Eksperyment przeprowadzono 2-krotnie w trzech powtórzeniach biologicznych.

5.2.17.3. Adhezja komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do korzeni koniczyny

Wpływ jonów cynku na adhezję bakterii do korzeni koniczyny określono wykorzystując metodę opisaną przez Fujishige i wsp. [2006]. Trzydniowe kiełki koniczyny inkubowano w pożywce Fåhræus'a bez oraz z dodatkiem 0,1 mM ZnSO₄. Inkubację prowadzono w jałowych warunkach przez 24 godz. w 24 °C. Po tym czasie kiełki przemywano nową porcją pożywki Fåhræus'a. Równocześnie przygotowano zawiesiny bakteryjne badanych szczepów. W tym celu bakterie hodowano przez 24 godz. w pożywce 79CA niezawierającej jonów Zn²⁺ (warunki kontrolne) oraz zawierającej 0,1 mM Zn²⁺. Następnie hodowle wirowano (7 min, 8000 rpm), a uzyskany osad przemywano pożywką

Fåhræus'a w celu usunięcia nadmiaru jonów metalu. Osad bakteryjny zawieszono w pożywce Fåhræus'a i rozcieńczono do wartości $OD_{600} = 0,1$.

Doświadczenie przeprowadzono w 4 wariantach. Pierwszy wariant (I) stanowiła kontrola doświadczenia, w której zarówno kielki, jak i bakterie nie były poddane działaniu jonów Zn^{2+} . W drugim wariantcie (II) sprawdzono zdolność adhezji bakterii hodowanych w obecności jonów Zn^{2+} do korzeni roślin kontrolnych. W trzecim wariantcie (III) określono zdolność adhezji bakterii nie poddanych działaniu tych jonów do korzeni koniczyny inkubowanych wcześniej w pożywce zawierającej jony Zn^{2+} . W ostatnim wariantcie (IV) zbadano adhezję bakterii do korzeni, gdzie zarówno szczepy, jak też ich gospodarz były inkubowane uprzednio w obecności tych jonów.

Kielki koniczyny inkubowano w 500 μ l odpowiednich zawiesin bakteryjnych w warunkach stacjonarnych przez 24 godz. w 24 °C. Po tym czasie odcinano jałowo korzenie roślin, płukano je przez 1 godz. w 0,05% Tween-20 (100 rpm) w celu usunięcia bakterii niezwiązanych z korzeniem, a następnie usuwano płyn i ważono. Każdy korzeń homogenizowano w 300 μ l jałowej wody dejonizowanej, a następnie wysiewano metodą seryjnych rozcieńczeń na płytki zawierające 79CA. Kolonie bakteryjne zliczano po 4 dniach inkubacji w 28 °C. Eksperyment przeprowadzono w dwóch powtórzeniach, wykorzystując 5 kielków koniczyny na każdy szczep oraz wariant.

5.2.17.4. Testy próbówkowe

Właściwości symbiotyczne badanych szczepów określono z użyciem koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*, odmiana Dajana) jako gospodarza roślinnego. Nasiona koniczyny po powierzchniowej sterylizacji wykładano na płytki z podłożem Fåhræus'a [Vincent, 1970], po wykiełkowaniu przenoszono do szklanych probówek zawierających podłoże Fåhræus'a z różnym stężeniem $ZnSO_4$ (0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 i 1mM). Po 4 dniach, dodawano zawiesiny bakterii o $OD_{600} = 0,2$ przygotowane w wodzie jałowej (100 μ l na roślinę) i rośliny hodowano przez 5 tygodni w warunkach szklarniowych przy naturalnym świetle wspomaganym oświetleniem sztucznym (14 godz. w 24 °C – dzień i 10 godz. w 18 °C – noc). Co 7 dni liczono ilość brodawek pojawiających się na korzeniach koniczyny, a po 5 tygodniach ważono część nadziemną oraz podziemną roślin. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych, wykorzystując 30 roślin dla każdego badanego szczepu oraz wariantu.

5.2.18. Analizy statystyczne

Otrzymane wartości liczbowe określające własności komórek szczepów Rt24.2, Rt2472, Rt5819, Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1) porównywano z użyciem programu Statistica 12.5 (StatSoft). Do analizy istotności statystycznej wykorzystano jedno- oraz wieloczynnikową analizę wariancji.

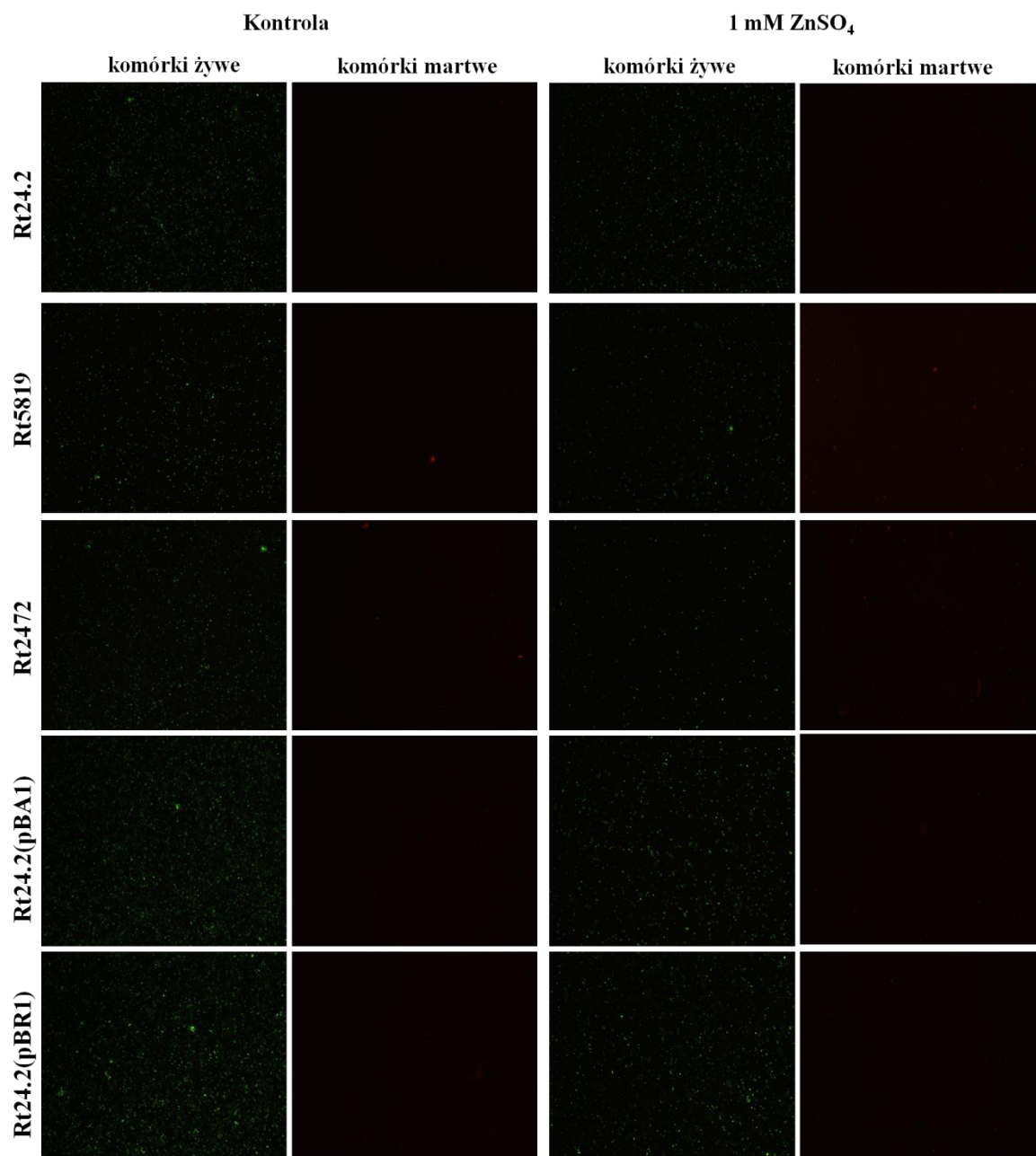
6. Wyniki

6.1. Określenie wpływu jonów Zn^{2+} na własności fenotypowe szczepów *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* różniących się poziomem syntezy EPS

Bakterie z rodziny *Rhizobiaceae* należą do powszechnie bytujących w glebie mikroorganizmów i często są narażone na działanie różnego rodzaju czynników środowiskowych, m. in. na obecność metali ciężkich. W pracy tej przeprowadzono szereg eksperymentów mających na celu określenie wrażliwości szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* różniących się ilością produkowanego EPS, na obecność jonów cynku w podłożu. Ustalono wpływ jonów tego metalu na różne własności fenotypowe badanych szczepów.

6.1.1. Wpływ jonów Zn^{2+} na przeżywalność i wzrost *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

W pierwszej części doświadczenia zbadano wpływ jonów Zn^{2+} na przeżywalność badanych szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Analizę wykonano dla 24-godz. bakteryjnych hodowli inkubowanych przy różnym stężeniu $ZnSO_4$ (zakres stężeń: 0 – 10 mM). Aby określić procentowy udział bakterii żywych i martwych w hodowlach, odpowiednio przygotowane bakterie barwiono zestawem barwników fluorescencyjnych (SYTO-9 dla wizualizacji bakterii żywych oraz jodek propidyny dla uwidocznienia bakterii martwych) i obserwowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego (Ryc. 19). Wykazano, że w warunkach braku jonów cynku wszystkie szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* charakteryzują się wysoką przeżywalnością (94,69% - 99,02% żywych bakterii) (Tab. 5). Stwierdzono również, że niskie stężenia $ZnSO_4$ (0,01 – 0,1 mM) nie powodowały znaczącego obniżenia żywotności komórek badanych szczepów, z wyjątkiem Rt5819. Jednakże, zwiększenie stężenia $ZnSO_4$ powyżej 1 mM skutkowało zmniejszeniem się liczby komórek żywych w hodowlach tych szczepów. Różnice w przeżywalności bakterii przy różnych stężeniach jonów Zn^{2+} dla poszczególnych szczepów były istotne statystycznie. Mutanty defektywne w syntezie EPS (Rt2472 oraz Rt5819) wykazały się największą wrażliwością na obecność cynku.

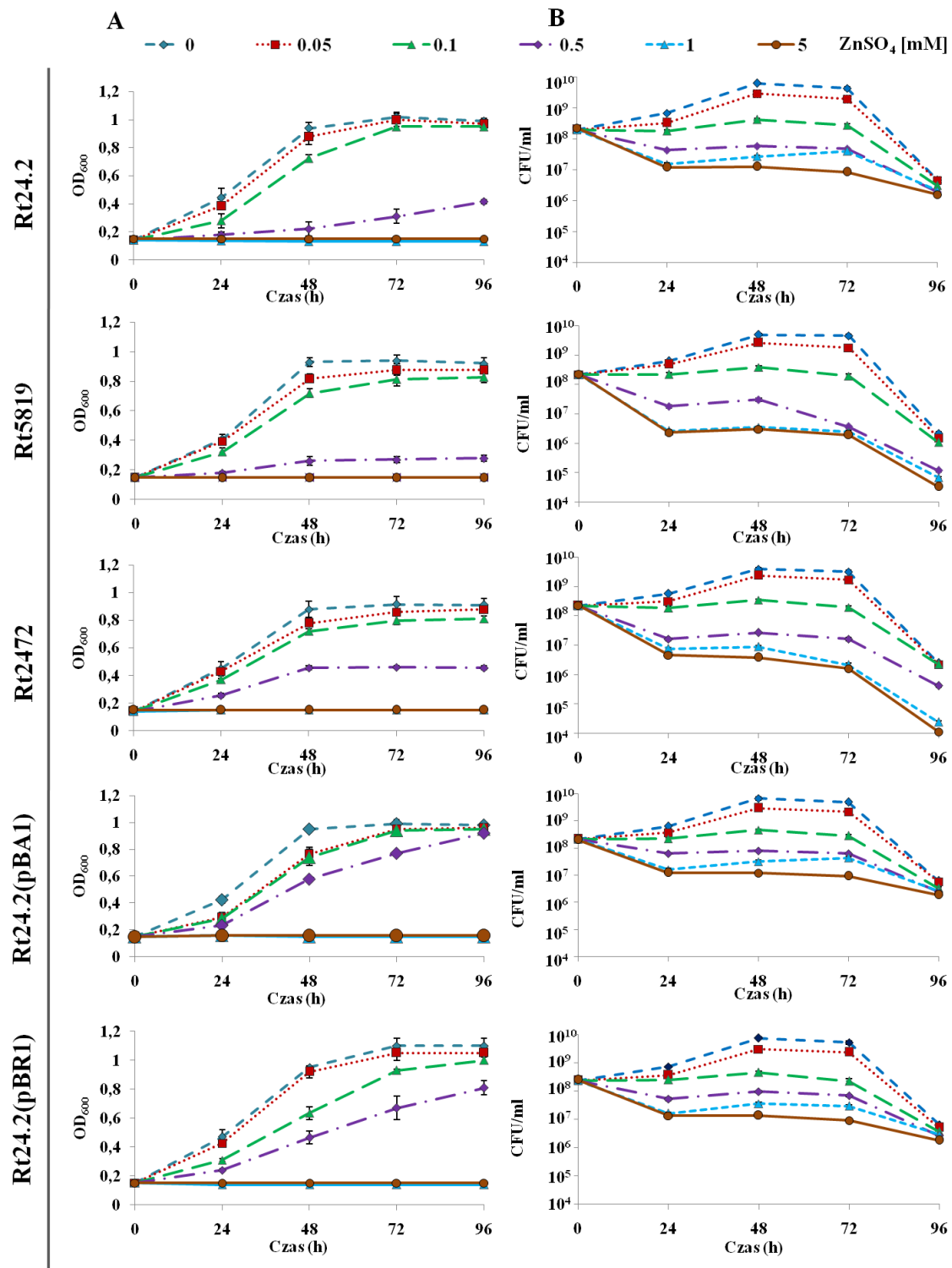


Ryc. 19 Wizualizacja komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* hodowanych przez 24 godz. w warunkach kontrolnych oraz w obecności 1 mM ZnSO₄, wykonana z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej (zielony kolor – komórki żywe, czerwony kolor – komórki martwe).

Tab. 5 Wpływ jonów Zn^{2+} na przeżywalność szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Różnice istotne statystycznie pomiędzy stężeniami $ZnSO_4$ dla każdego badanego szczepu zostały oznaczone różnymi literami ($\alpha=0,05$; ANOVA jednoczynnikowa; test Tukey'a).

$ZnSO_4$ (mM)	Szczepy <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (% żywych komórek)				
	Rt24.2	Rt5819	Rt2472	Rt24.2(pBA1)	Rt24.2(pBR1)
0	99,02 ± 0,19 ^A	94,69 ± 1,48 ^A	95,54 ± 0,42 ^{AB}	98,17 ± 0,13 ^{AB}	98,62 ± 0,22 ^A
0,01	98,86 ± 0,12 ^A	93,46 ± 1,16 ^{AB}	98,41 ± 0,35 ^A	98,78 ± 0,12 ^A	98,48 ± 0,41 ^A
0,05	98,45 ± 0,74 ^{AB}	92,60 ± 1,72 ^{AB}	98,02 ± 0,45 ^A	95,45 ± 1,13 ^{BC}	98,68 ± 0,29 ^A
0,10	98,15 ± 0,58 ^{AB}	87,66 ± 1,01 ^{CD}	96,53 ± 0,76 ^A	97,65 ± 0,78 ^{AB}	98,68 ± 0,17 ^A
0,50	97,27 ± 1,05 ^{ABC}	89,72 ± 1,45 ^{BC}	90,61 ± 1,25 ^{BC}	95,68 ± 1,15 ^{BC}	96,61 ± 0,64 ^B
1,0	95,44 ± 0,44 ^C	88,91 ± 0,55 ^{BC}	87,95 ± 1,27 ^C	93,33 ± 1,12 ^{CD}	95,92 ± 0,39 ^B
5,0	96,46 ± 0,93 ^{BC}	87,80 ± 3,07 ^C	86,59 ± 0,82 ^C	94,69 ± 0,94 ^C	96,39 ± 0,39 ^B
10,0	92,06 ± 1,25 ^D	83,10 ± 1,36 ^D	74,60 ± 4,85 ^D	91,16 ± 1,55 ^D	92,79 ± 1,19 ^C

W dalszym etapie badań określono wpływ jonów cynku na kinetykę wzrostu szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Doświadczenia te przeprowadzono w czasie 96 godzin (h) dla szerokiego spektrum stężeń $ZnSO_4$ (0; 0,05; 0,1; 0,5; 1 oraz 5 mM). Kinetykę wzrostu tych szczepów wyznaczono na podstawie dwóch parametrów: gęstości optycznej hodowli (OD_{600}) oraz miana bakterii (CFU/ml), aby określić czy EPS produkowany przez te bakterie ma wpływ na wartości OD_{600} ich hodowli (Ryc. 20).



Ryc. 20 Wpływ jonów Zn^{2+} na wzrost szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*: szczepu dzikiego Rt24.2 oraz jego pochodnych różniących się ilością produkowanego EPS, określony na podstawie pomiarów gęstości optycznej hodowli (OD_{600}) (panel A) oraz ich wartości CFU/ml (panel B).

Pomiary gęstości optycznej hodowli wykazały, że w warunkach kontrolnych (bakterie nie poddane ekspozycji na jony cynku) wszystkie szczepy charakteryzowały się dość podobnym tempem wzrostu i osiągały fazę stacjonarną po 48-72 godz., a maksymalne wartości OD₆₀₀ hodowli (~1,0) po 72 godz. (Ryc. 20, panel A). W przypadku dwóch szczepów Rt2472 i Rt5819, zawierających odpowiednio mutacje w genach *rosR* i *pssA*, zaobserwowano nieco wolniejszy wzrost i niższe wartości OD₆₀₀ w porównaniu do szczepu dzikiego Rt24.2 i dwóch szczepów Rt24.2(pBA1) i Rt24.2(pBR1) produkujących zwiększone ilości EPS w porównaniu do szczepu Rt24.2. Podobne wyniki w warunkach kontrolnych uzyskano dla badanych szczepów stosując parametr CFU/ml, który jest niezależny od obecności EPS w hodowli (Ryc. 20, panel B). Zaobserwowano intensywne namnażanie się szczepów w warunkach kontrolnych i osiągnięcie przez nie fazy stacjonarnej wzrostu po 48 godz. Również i w tym doświadczeniu uzyskano nieco niższe wartości CFU/ml dla hodowli mutantów Rt2472 i Rt5819 w porównaniu do szczepu dzikiego Rt24.2 i szczepów nadprodukujących EPS [Rt24.2(pBA1) i Rt24.2(pBR1)]. Ponadto wykazano dla 72-godz. hodowli szczepów produkujących EPS, że wzrost gęstości optycznej tych hodowli w porównaniu do 48-godz. hodowli wynika przede wszystkim z produkcji i sekrecji tego polimeru do pożywki, a nie z namnażania się bakterii.

Na podstawie pomiarów OD₆₀₀ hodowli wykazano, że obecność jonów Zn²⁺ powodowała nieznaczne obniżenie tempa wzrostu badanych szczepów przy stężeniu 0,05 mM, a stopniowy wzrost stężenia metalu powodował spowolnienie wzrostu bakterii, doprowadzając do jego całkowitego zahamowania przy wartości 1 mM. Na podstawie tego doświadczenia wykazano również, że szczep Rt5819 nieprodukujący EPS jest najbardziej wrażliwym szczepem na obecność jonów cynku w podłożu ze wszystkich badanych szczepów.

Podobne zależności pomiędzy szczepami oraz stosowanym stężeniem jonów Zn²⁺ zaobserwowano przy użyciu parametru CFU/ml. W oparciu o analizy wartości CFU/ml stwierdzono, że obecność jonów tego metalu w stężeniach 0,05 i 0,1 mM powodowała obniżenie tempa wzrostu badanych szczepów, a zahamowanie wzrostu wszystkich szczepów zaobserwowano dla wartości 0,5 mM (Ryc. 20, panel B). Uzyskano niższe wartości CFU/ml dla hodowli Rt5819 i Rt2472, zaś wyższe wartości CFU/ml dla szczepów Rt24.2(pBA1) i Rt24.2(pBR1), w stosunku do parametru CFU/ml szczepu kontrolnego Rt24.2. Na tej podstawie wykazano, że mutanty defektywne w syntezie EPS charakteryzują się niższą tolerancją na jony Zn²⁺ w porównaniu do szczepu dzikiego

Rt24.2, natomiast szczepy nadprodukujące EPS wykazują wyższą tolerancję na ten czynnik stresowy w porównaniu do szczepu Rt24.2.

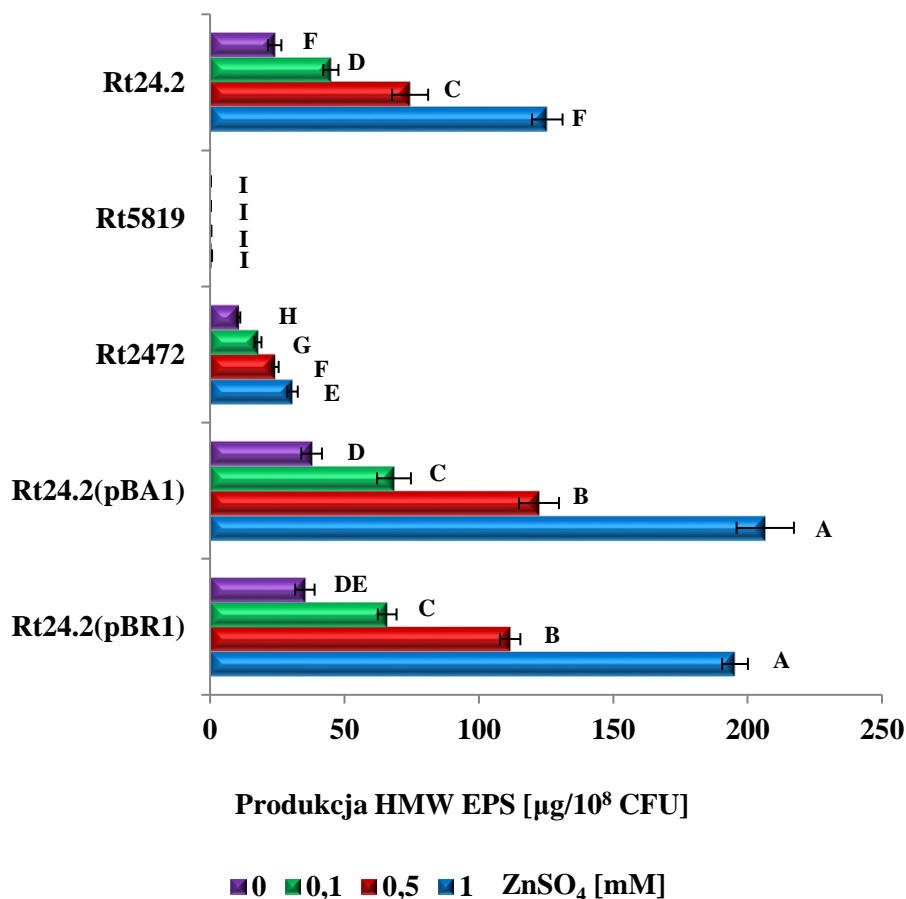
Liniowe korelacje pomiędzy wartościami OD₆₀₀ i CFU/ml udało się otrzymać tylko dla niskich stężeń jonów cynku (0 - 0,1 mM) w pierwszych dwóch dobach eksperymentu. Po 72-godz. wartość OD₆₀₀ hodowli zwiększała się u wszystkich badanych bakterii, z wyjątkiem szczepu Rt5819, co było wyraźnie związane z produkcją EPS. Natomiast w tych samych hodowlach parametr CFU/ml nie zmieniał się znacząco w porównaniu do wartości osiąganych dla 48-godz. hodowli. Z kolei po 96-godz. inkubacji wartości CFU/ml wyraźnie obniżały się, natomiast gęstość tych hodowli pozostawała bez zmian. Wyniki te wskazują, że do precyzyjnego ustalenia wrażliwości szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* na obecność cynku w środowisku wzrostu, niezbędne jest określenie zarówno gęstości optycznej hodowli, która jest ściśle związana z ilością produkowanego EPS, jak i miana żywych bakterii (CFU/ml), który jest lepszym wskaźnikiem toksyczności badanego czynnika stresowego.

Podsumowując, przeprowadzone doświadczenia wykazały, że szczepy Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1), wytwarzające znaczne ilości EPS, charakteryzują się zwiększoną przeżywalnością, szybszym tempem wzrostu i wyższymi parametrami CFU/ml hodowli w porównaniu do szczepów defektywnych w syntezie EPS: Rt2472 i Rt5819. Uzyskane wyniki sugerują, że wrażliwość testowanych szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* na obecność ZnSO₄ w środowisku wzrostu jest w znacznym stopniu zależna od ilości syntetyzowanego EPS [Kopycińska i in., 2018].

6.1.2. Wpływ jonów Zn²⁺ na poziom syntezy EPS przez *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

Dotychczasowe dane literaturowe wskazują, że EPS odgrywa ważną rolę w adaptacji różnych bakterii do stresu środowiskowego. W związku z tym postanowiono zbadać w jaki sposób obecność jonów cynku wpływa na syntezę tego polimeru u *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. We wcześniejszych pracach naszego zespołu wykazano, że badane szczepy różnią się znacząco ilością wytwarzanego EPS i można je pod tym względem uszeregować od najmniej produkującego do najwięcej produkującego w następujący sposób: Rt5819 < Rt2472 < Rt24.2 < Rt24.2(pBR1) < Rt24.2(pBA1) [Janczarek i in., 2009]. Celem kolejnych badań było ustalenie wpływu jonów cynku na wytwarzanie EPS przez wymienione szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifoli*. W pierwszym etapie badań sprawdzono

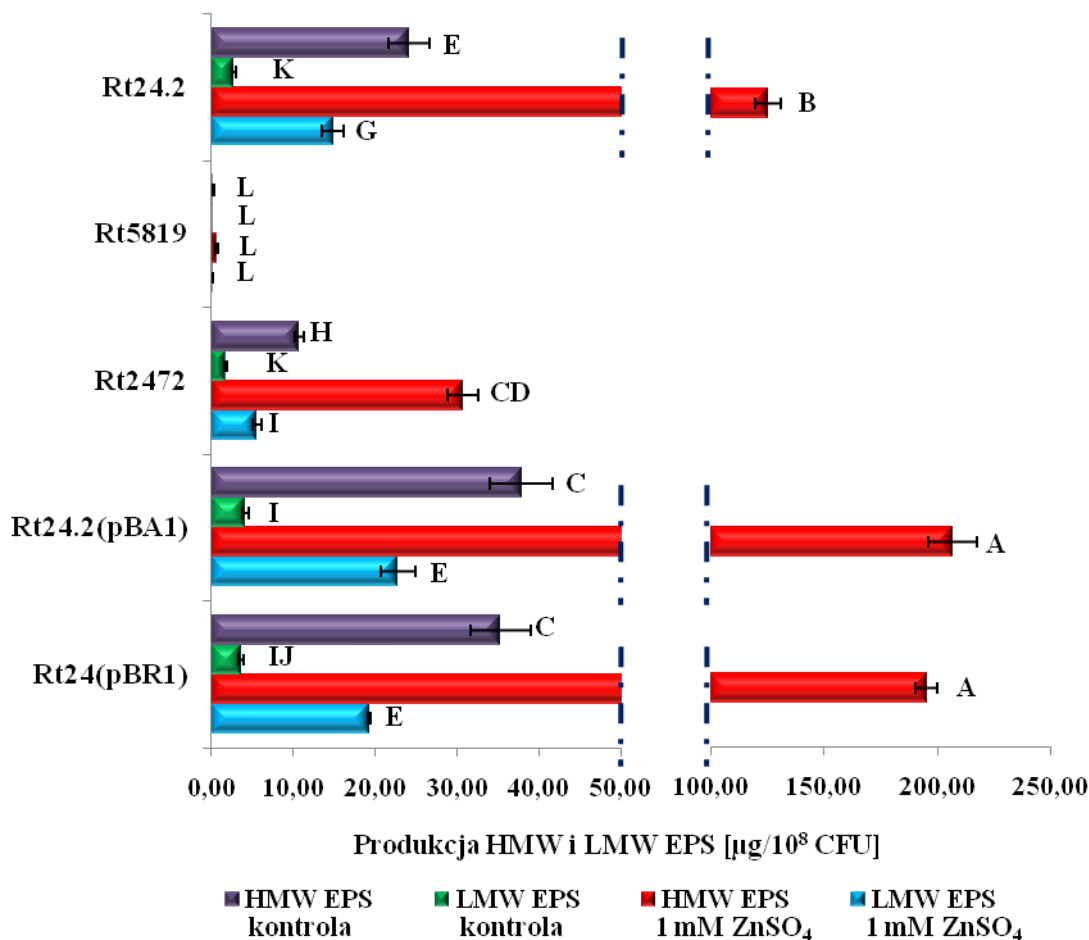
wpływ różnych stężeń $ZnSO_4$ (0,1 mM; 0,5 mM oraz 1 mM) na poziom syntezy wysokocząsteczkowej frakcji (ang. high molecular weight, HMW) EPS (Ryc. 21). Na podstawie uzyskanych wyników wybrano następnie jedno stężenie cynku do określenia ilości syntetyzowanej frakcji niskocząsteczkowej (ang. low molecular weight, LMW) EPS.



Ryc. 21 Wpływ jonów Zn^{2+} na poziom syntezy frakcji wysokocząsteczkowej egzopolisacharydu (HMW EPS) przez szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami $ZnSO_4$ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a).

Wykazano, że obecność jonów cynku pozytywnie wpływa na syntezę HMW EPS przez badane szczepy, z wyjątkiem szczepu Rt5819 (Ryc. 21). Zaobserwowano, że już najniższe zastosowane stężenie $ZnSO_4$ (0,1 mM) powoduje zwiększenie syntezy EPS u szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* zdolnych do wytwarzania tego polimeru, a także że jego ilość rośnie wraz ze wzrostem stężenia jonów metalu. W przypadku szczepu dzikiego Rt24.2, jak i szczepów Rt24.2(pBR1) oraz Rt24.2(pBA1), zaobserwowano około 5-krotny wzrost ilości produkowanego EPS w obecności 1 mM $ZnSO_4$ w stosunku do warunków kontrolnych.

Na podstawie wyników powyższych analiz, w dalszych badaniach zastosowano stężenie 1 mM dla porównania wpływu jonów Zn^{2+} na produkcję wysokocząsteczkowych i niskocząsteczkowych frakcji EPS wytwarzanych przez szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifoli* (Ryc. 22).



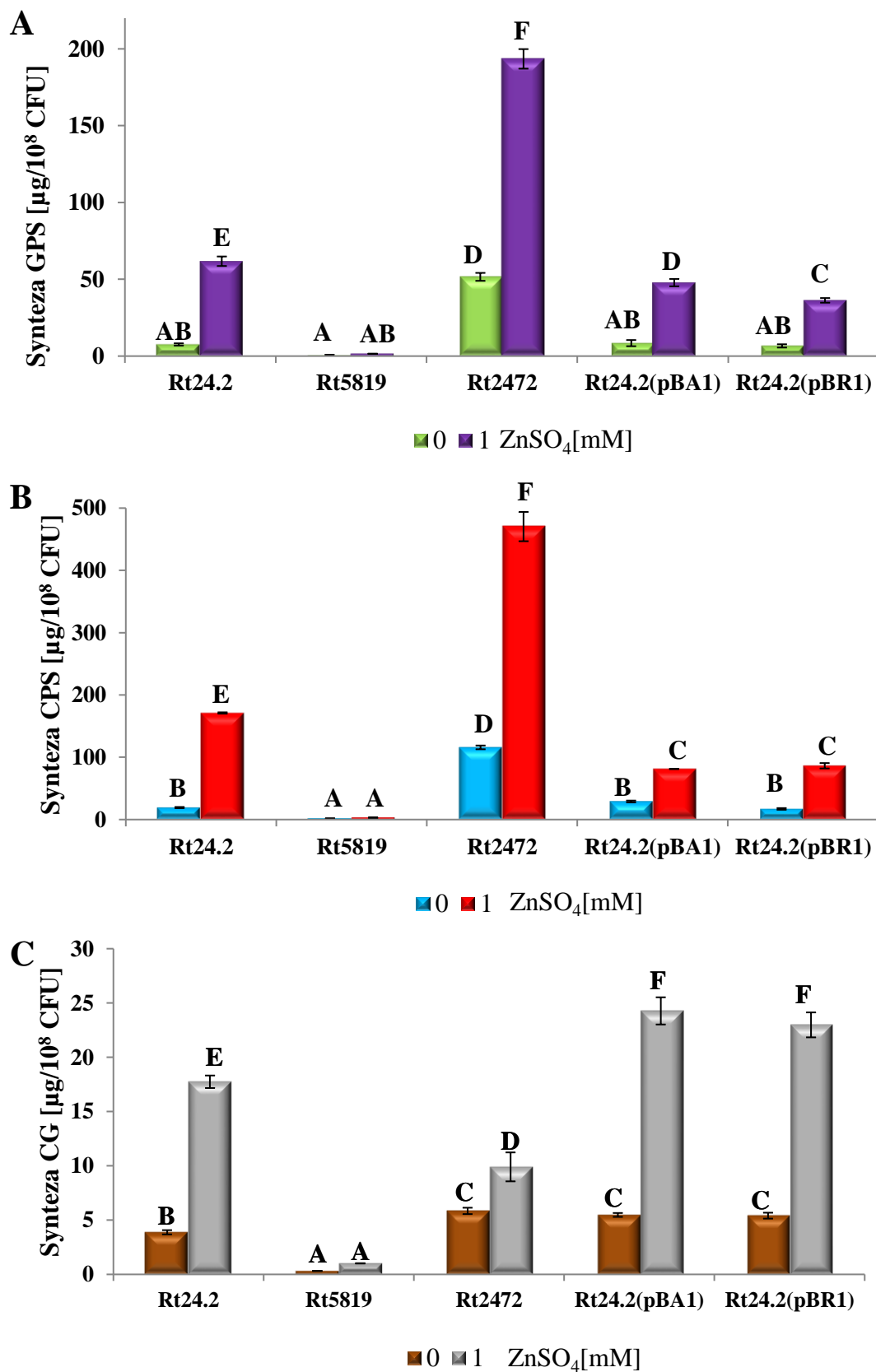
Ryc. 22 Wpływ jonów Zn^{2+} na produkcję HMW oraz LMW EPS przez szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifoli*. Istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami $ZnSO_4$ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a).

W warunkach kontrolnych badane szczepy (z wyjątkiem Rt5819) wytwarzają obie frakcje EPS i proporcja HMW:LMW wynosi zależnie od szczepu od 6,3:1 dla Rt2472 do 9,6:1 dla Rt24.2(pBR1). Zaobserwowano, że w obecności 1 mM jonów Zn^{2+} , szczepy zdolne do syntezy tego polimeru (Rt24.2, Rt2472, Rt24.2(pAB1) i Rt24.2(pBR1)) wytwarzają zwiększoną ilość zarówno frakcji HMW, jak i LMW EPS oraz że te bakterie, z wyjątkiem szczepu Rt2472, wytwarzają około 10-krotnie więcej frakcji HMW niż LMW EPS (kolejno dla wymienionych szczepów wartości te wynoszą: 8,5; 5,5; 9 oraz 10). Wyjątkiem jest szczep Rt5819 niewytwarzający żadnej z frakcji EPS. Podsumowując,

uzyskane wyniki wskazują, że jony cynku wpływają na zwiększenie syntezy EPS u *R. leguminosarum* bv. *trifoli*, natomiast nie wpływają na proporcje syntetyzowanych frakcji HMW i LMW tego polimeru, które są bardzo podobne w warunkach kontrolnych i stresowych [Kopycińska i in., 2018].

6.1.3. Wpływ jonów Zn^{2+} na poziom syntezy innych polisacharydów (GPS, CPS oraz CG) przez szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

Wcześniejsze doświadczenia wykazały, że jony Zn^{2+} powodują wzrost syntezy EPS przez testowane szczepy bakteryjne (z wyjątkiem mutantu Rt5819), dlatego postanowiono sprawdzić czy ten czynnik stresowy ma również wpływ na wytwarzanie innych polisacharydów powierzchniowych, takich jak: polisacharyd żelujący (GPS), polisacharyd kapsułarny (CPS) oraz zlokalizowane w przestrzeni peryplazmatycznej cykliczne β -glukany (CG). Przeprowadzono analizy, w których wykorzystano 3-dniowe hodowle bakteryjne niezawierające (warunki kontrolne) oraz zawierające 1 mM $ZnSO_4$. Wykazano, że mutant Rt2472 wytwarza w warunkach kontrolnych znacznie większą ilość GPS, CPS oraz CG w porównaniu do pozostałych badanych szczepów (Ryc. 23 A-C). Ustalono, że szczep ten syntetyzuje 10-krotnie więcej GPS, 7-krotnie więcej CPS oraz 2-krotnie więcej CG w stosunku do szczepu dzikiego Rt24.2. Natomiast szczepy Rt24.2(pBA1) i Rt24.2(pBR1) wytwarzały zbliżone ilości tych polisacharydów w porównaniu do szczepu Rt24.2.

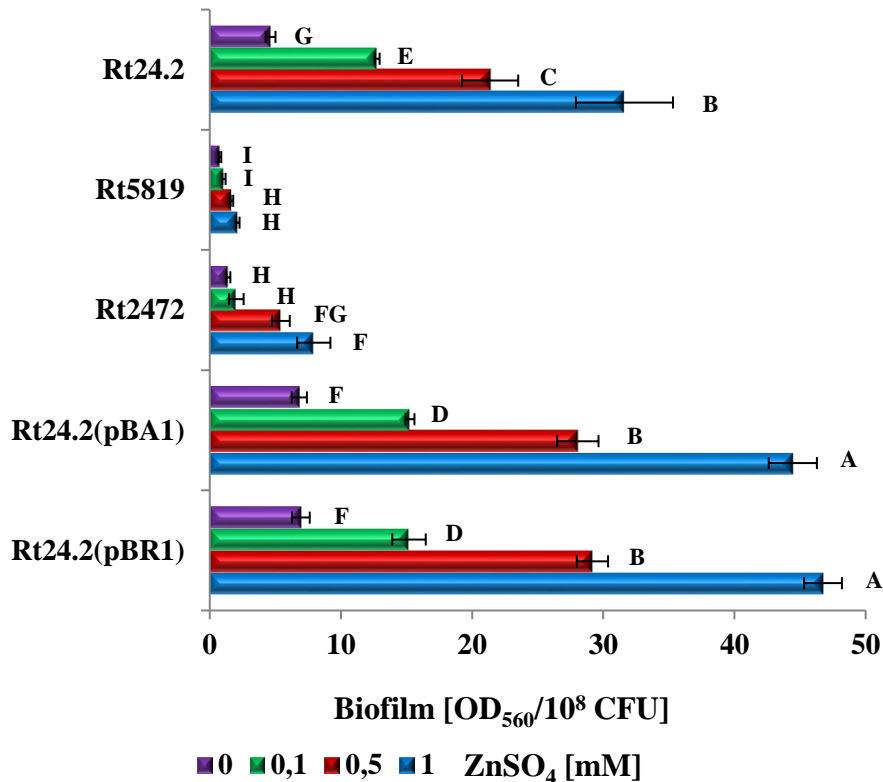


Ryc. 23 Wpływ jonów Zn^{2+} na syntezę GPS (A), CPS (B) oraz cyklicznych β -glukanów (C) przez szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami ZnSO_4 oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a).

Wykazano również, że szczep Rt5819 syntetyzuje w warunkach kontrolnych jedynie niewielkie ilości GPS ($0,37 \mu\text{g}/10^8 \text{ CFU}$), CPS ($1,56 \mu\text{g}/10^8 \text{ CFU}$) oraz obniżone ilości CG ($0,32 \mu\text{g}/10^8 \text{ CFU}$) w porównaniu do szczepu Rt24.2. Zaobserwowano, że obecność jonów Zn^{2+} wpływa pozytywnie na produkcję analizowanych polisacharydów u wszystkich badanych szczepów, a efekt ten był najbardziej widoczny w przypadku szczepu Rt2472. Porównując ilości poszczególnych polisacharydów syntetyzowanych przez badane szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* w warunkach braku oraz obecności jonów cynku, należy podkreślić, że spośród nich największą ilość stanowi EPS, który jest najbardziej zewnętrzną warstwą ochronną tych bakterii (wyjątek stanowi szczep Rt2472). Ustalono, że stosunek ilości EPS do sumarycznej ilości pozostałych polisacharydów syntetyzowanych w warunkach stresowych (GPS, CPS, CG) dla poszczególnych szczepów (z wyjątkiem szczepu Rt5819, który nie produkuje EPS) wynosił: Rt24.2 – 1:0,35; Rt2472 – 1:2,44; Rt24.2(pBA1) – 1:0,19; Rt24.2(pBR1) – 1:0,19).

6.1.4. Wpływ jonów Zn^{2+} na wytwarzanie biofilmu przez szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

Kolejnym etapem badań było określenie wpływu jonów Zn^{2+} na ilość oraz strukturę biofilmu tworzonego przez szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. W celu określenia ilości biofilmu wytwarzanego przez badane szczepy w warunkach stresowych, zastosowano stężenia cynku identyczne jak w przypadku analiz HMW EPS (tj. 0,1 mM; 0,5 mM i 1 mM). Doświadczenie wykonano na polistyrenowych płytkach titracyjnych, oznaczając metodą kolorymetryczną ilość biofilmu powstałego po 4 dniach inkubacji hodowli bakteryjnych. Wykazano, że ilość produkowanego biofilmu jest skorelowana z ilością tworzonego EPS. Pod tym względem badane szczepy można również uszeregować w następujący sposób: Rt5819 < Rt2472 < Rt24.2 < Rt24.2(pBR1) < Rt24.2(pBA1). Tendencję taką zaobserwowano zarówno dla bakterii hodowanych w warunkach kontrolnych, jak i w obecności jonów Zn^{2+} (Ryc. 24).

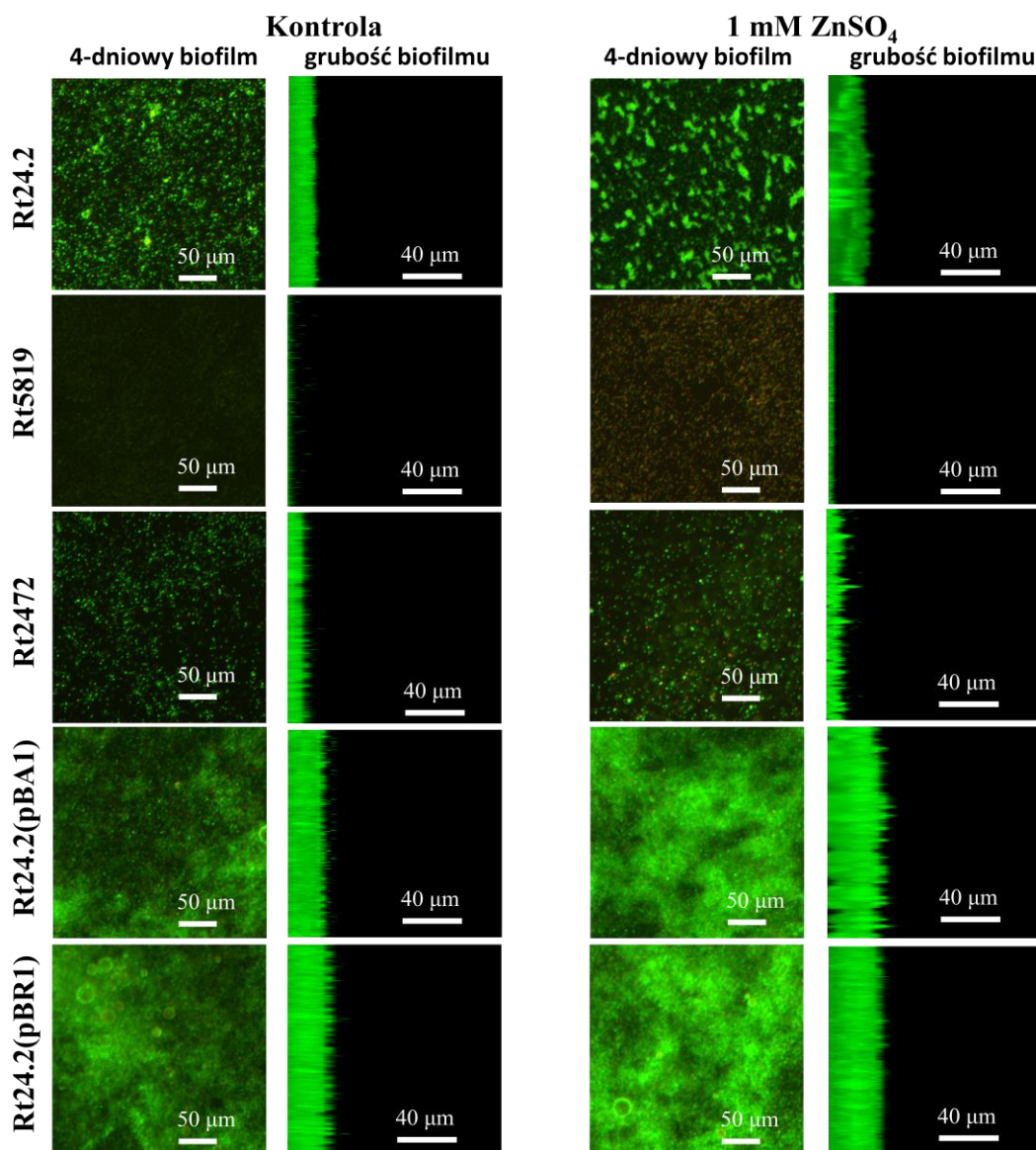


Ryc. 24 Wpływ jonów Zn^{2+} na ilość biofilmu tworzonego przez szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Istotnie statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami $ZnSO_4$ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a).

Dodatkowo wykazano, że wzrastające stężenie jonów tego metalu powoduje zwiększenie ilości tworzonego biofilmu. Obecność 1 mM $ZnSO_4$ skutkowało około 6-krotnym wzrostem ilości produkowanego biofilmu w przypadku szczepów Rt24.2, Rt2472, Rt24.2(pBA1) i Rt24.2(pBR1) w porównaniu do warunków kontrolnych (dla szczepu Rt24.2 – 6,82 razy więcej tworzonego biofilmu; dla szczepu Rt2472 – 5,60 razy więcej; dla szczepu Rt24.2(pBA1) – 6,51 razy więcej; dla szczepu Rt24.2(pBR1) – 6,73 razy więcej). Co ciekawe, nieznaczny pozytywny wpływ cynku na tworzenie biofilmu zaobserwowano również w przypadku szczepu Rt5819, co sugeruje udział w tym procesie, oprócz EPS, innych składników bakteryjnych (np. białek zewnątrzkomórkowych).

W celu zobrazowania struktury biofilmów tworzonych przez badane szczepy w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem czynnika stresowego (1 mM $ZnSO_4$), biofilmy utworzone na polistyrenowych płytkach titracyjnych były barwione barwnikami fluorescencyjnymi (SYTO9 i jodkiem propidyny) i oglądane z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego. Zaobserwowano, że w warunkach kontrolnych (bez jonów cynku) szczepy Rt24.2, Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1) tworzyły tzw. „dojrzały” biofilm, posiadający

wysoko zorganizowaną strukturę przestrzenną z kanałami wodnymi oraz gęsto upakowanymi licznymi komórkami bakteryjnymi (Ryc. 25).



Ryc. 25 Struktura biofilmu tworzonego przez szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* w warunkach kontrolnych oraz w obecności jonów Zn²⁺.

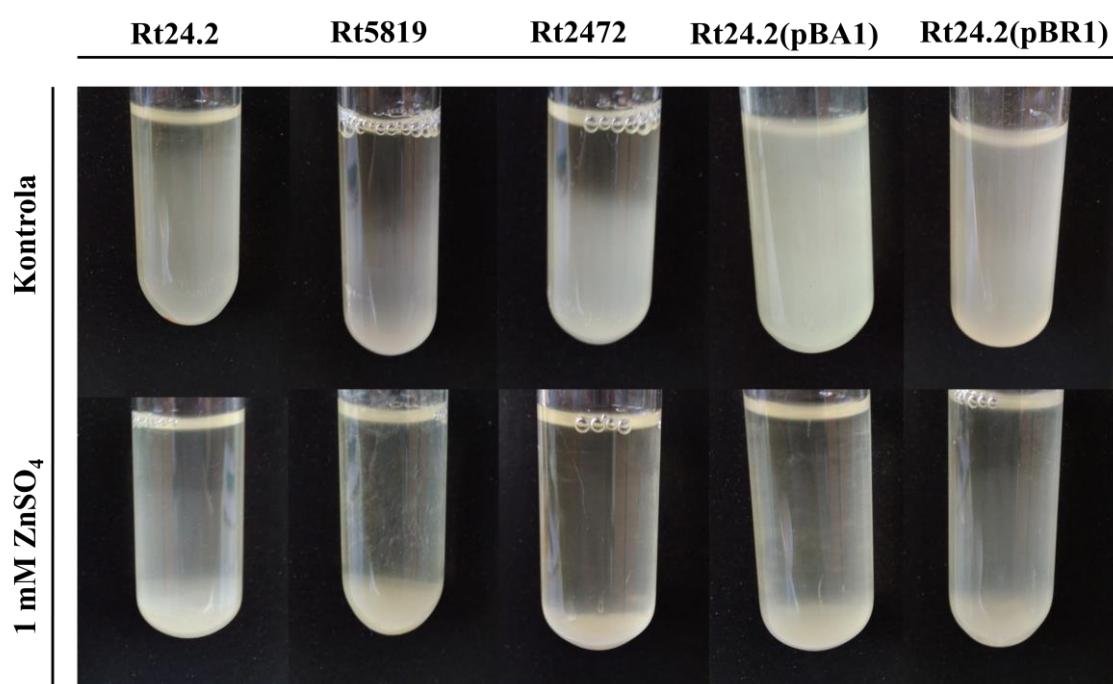
W przypadku szczepów defektywnych w syntezie EPS (Rt5819 i Rt2472) zaobserwowano, że nie tworzyły one typowego „dojrzałego” biofilmu, a do powierzchni płytki zaadsorbowane były jedynie pojedyncze komórki bakteryjne. Wykazano również, że obecność jonów cynku stymulowała szczepy produkujące EPS do tworzenia grubszego i gęściej upakowanego biofilmu w porównaniu do warunków kontrolnych. Stwierdzono także, że obecność ZnSO₄ wpływała na inne parametry charakteryzujące biofilm – zwiększała procent pokrycia powierzchni dołka na płytce titracyjnej oraz negatywnie wpływała na stosunek komórek żywych do martwych (Tab. 6) [Kopcińska i in., 2018].

Tab. 6 Wpływ jonów Zn^{2+} na parametry charakteryzujące biofilm tworzony przez szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami $ZnSO_4$ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a).

Szczep	Stosunek liczby komórek żywych do martwych w biofilmie		Pokrycie powierzchni dolka przez biofilm (%)		Grubość biofilmu (μm)	
	0	1 mM $ZnSO_4$	0	1 mM $ZnSO_4$	0	1 mM $ZnSO_4$
Rt24.2	22,81 \pm 3,2 ^A	6,27 \pm 0,9 ^C	94,7 \pm 3,9 ^A	100 \pm 0,0 ^A	33,34 \pm 3,47 ^D	42,70 \pm 5,66 ^{AD}
Rt5819	2,31 \pm 0,4 ^D	1,84 \pm 0,3 ^D	24,59 \pm 4,3 ^D	32,97 \pm 4,1 ^C	3,19 \pm 0,35 ^B	3,75 \pm 1,03 ^B
Rt2472	4,58 \pm 0,7 ^C	2,49 \pm 0,5 ^D	39,62 \pm 4,9 ^D	56,12 \pm 6,2 ^B	14,56 \pm 0,53 ^C	17,76 \pm 1,14 ^C
Rt24.2(pBA1)	26,51 \pm 4,2 ^A	11,10 \pm 2,2 ^B	100 \pm 0,0 ^A	100 \pm 0,0 ^A	48,10 \pm 5,10 ^A	80,31 \pm 3,94 ^E
Rt24.2(pBR1)	24,05 \pm 3,8 ^A	12,11 \pm 1,8 ^B	98,29 \pm 1,8 ^A	100 \pm 0,0 ^A	49,65 \pm 2,18 ^A	79,23 \pm 8,18 ^E

6.1.5. Wpływ jonów Zn^{2+} na agregację komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

W kolejnym doświadczeniu określono zdolność agregacji komórek badanych szczepów w 24-godz. hodowlach w podłożach o różnym stężeniu $ZnSO_4$ (0,01 – 5 mM). Zaobserwowano, że komórki szczepu Rt2472 w warunkach kontrolnych w większym stopniu ulegają agregacji w stosunku do pozostałych testowanych szczepów. Ponadto, wykazano że ekspozycja bakterii na czynnik stresowy w postaci jonów cynku powoduje zwiększenie agregacji komórek wszystkich testowanych szczepów (Ryc. 26, Tab. 7).



Ryc. 26 Agregacja komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* w warunkach kontrolnych oraz w obecności jonów Zn^{2+} .

Tab. 7 Porównanie wpływu jonów Zn^{2+} na autoagregację szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Istotnie statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami $ZnSO_4$ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA jednoczynnikowa, test Tukey'a).

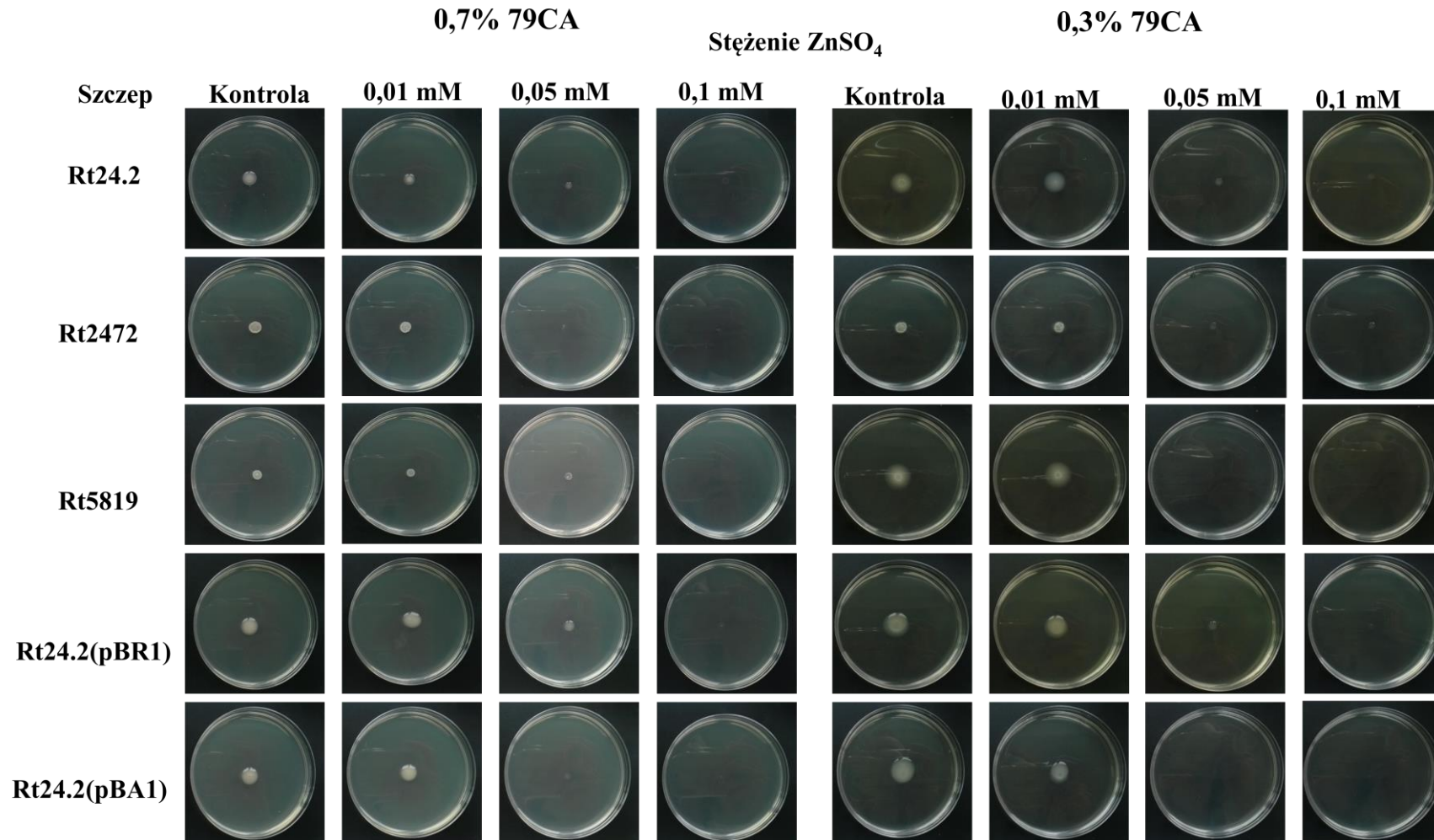
Stężenie $ZnSO_4$ (mM)	Stopień autoagregacji komórek (%)				
	Rt24.2	Rt5819	Rt2472	Rt24.2(pBA1)	Rt24.2(pBR1)
0	18,02±1,26 ^A	45,74±3,20 ^A	50,00±3,50 ^A	20,08±1,41 ^A	25,47±1,78 ^A
0,01	34,43±2,41 ^B	49,18±3,44 ^A	56,70±3,97 ^A	23,67±1,66 ^A	29,43±2,06 ^A
0,05	47,10±3,30 ^C	66,13±4,63 ^B	56,50±3,96 ^A	25,22±1,77 ^A	30,91±2,16 ^A
0,1	48,45±3,39 ^C	68,70±4,81 ^B	58,66±4,11 ^A	27,20±1,90 ^A	38,42±2,69 ^A
0,5	65,23±4,57 ^D	75,50±5,28 ^B	71,78±5,02 ^B	61,51±4,31 ^B	62,99±4,41 ^B
1	69,29±4,85 ^D	72,99±5,11 ^B	75,02±5,25 ^B	70,74±4,95 ^B	65,68±4,60 ^{BC}
5	72,21±5,05 ^D	72,84±5,10 ^B	75,32±5,27 ^B	82,45±5,77 ^C	74,95±5,25 ^C

6.1.6. Wpływ jonów Zn^{2+} na ruchliwość komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

W następnym doświadczeniu wykonano oznaczenia mające na celu określenie zdolności migracji komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Parametr ten określono dla wszystkich bakterii na podłożu stałym, zawierającym 0,7% agaru oraz półpłynnym, zawierającym 0,3% agaru (Ryc. 27).

Zdolność migracji jest istotną cechą fizjologii komórek bakteryjnych. Wyróżnia się dwa typy ruchliwości. Pierwszy z nich tzw. „swimming motility”, który charakteryzuje bakterie poruszające się w środowiskach płynnych, w odpowiedzi na różne czynniki chemotaktyczne oraz bodźce zewnętrzne. Ten typ poruszania się umożliwiają bakteriom różne mechanizmy i struktury motoryczne, tj. wici, rzęski czy pilusy typu IV [Merz i in., 2000]. Drugim typem migracji bakterii jest tzw. „swarming motility”, który jest zjawiskiem zbiorowym angażującym całą populację bakterii w kolonii. Ruchliwość tego typu jest szybką (2-10 $\mu\text{m/s}$) i skoordynowaną translokacją populacji bakterii na powierzchniach stałych oraz półstałych i jest przykładem wielokomórkowości bakterii i zjawiska quorum-sensing [Breaken i in., 2008]. Migracja tego typu jest procesem wymagającym wysokiego zużycia energii i syntezy licznych wici [Harshey, 2003; Verstraeten i in., 2008].

Zaobserwowano, że jony cynku negatywnie wpływają na migrację komórek, zarówno w podłożu stałym, jak i półpłynnym. Szczepy Rt24.2, Rt24.2(pBA1) i Rt24.2(pBR1) wykazywały wysoką i podobną ruchliwość, podczas gdy szczepy Rt2472 oraz Rt5819 charakteryzowały się obniżoną zdolnością do migracji (Tab. 8). Co więcej, całkowite zahamowanie migracji komórek następowało przy stężeniu 0,1 mM $ZnSO_4$ w przypadku szczepów produkujących EPS oraz przy stężeniu 0,05 mM dla mutantów Rt2472 i Rt5819, wskazując na ich wysoką wrażliwość na ten metal [Kopycińska i in., 2018].



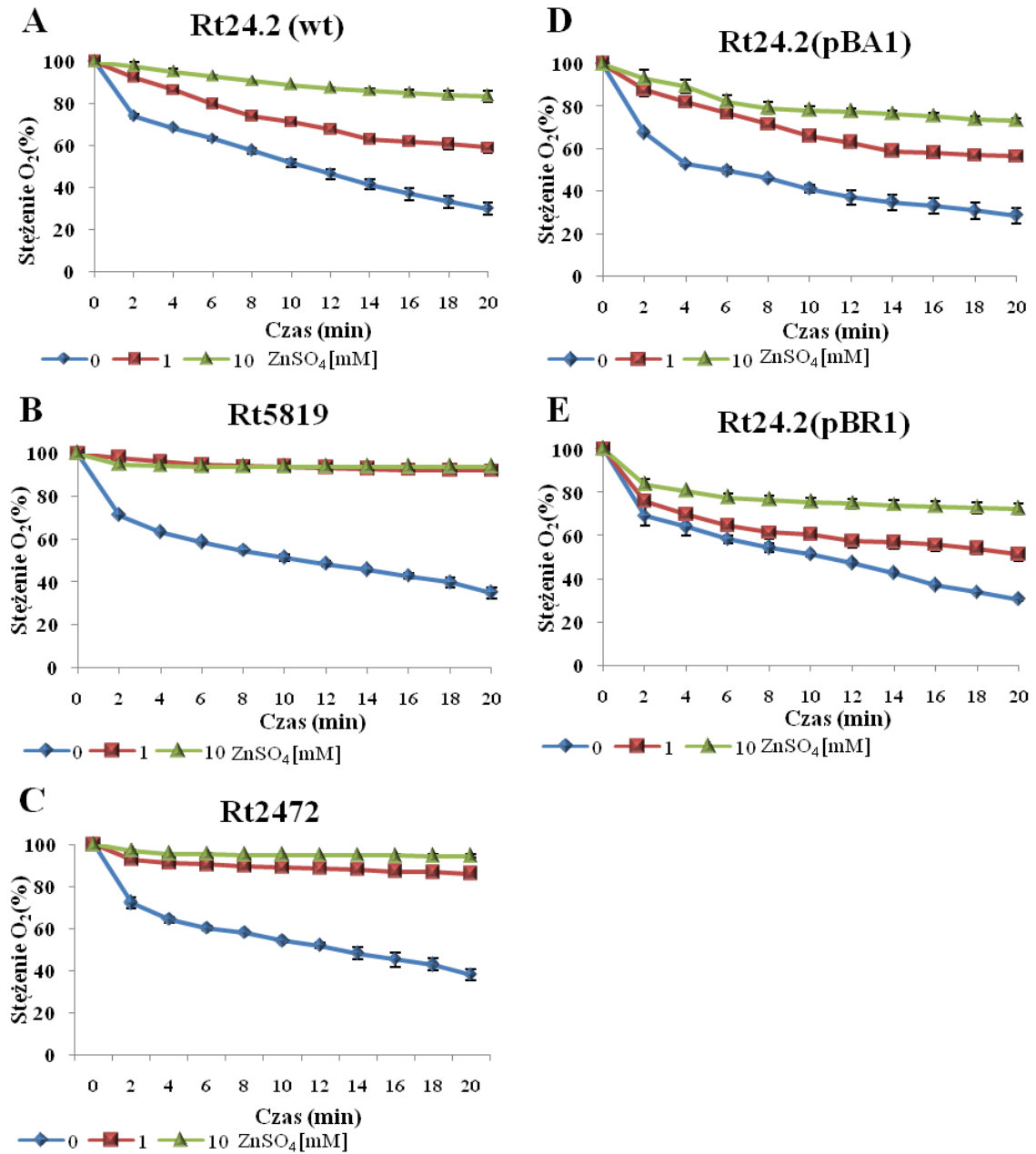
Ryc. 27 Wpływ jonów Zn^{2+} na ruchliwość szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* w podłożu 79CA zawierającym 0,7% oraz 0,3% agaru.

Tab. 8 Wpływ jonów Zn^{2+} na ruchliwość szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* na półpłynnym oraz stałym podłożu 79CA. Istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami $ZnSO_4$ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA trójczynnika, test Tukey'a).

Szczep	Rt24.2		Rt5819		Rt2472		Rt24.2(pBA1)		Rt24.2(pBR1)	
	0,3% 79CA	0,7% 79CA	0,3% 79CA	0,7% 79CA	0,3% 79CA	0,7% 79CA	0,3% 79CA	0,7% 79CA	0,3% 79CA	0,7% 79CA
0	14,5 ± 0,5 ^B	9,0 ± 0,5 ^H	6,5 ± 0,5 ^{IJ}	7,0 ± 0,0 ^I	7,0 ± 0,0 ^I	6,0 ± 0,5 ^{JK}	16,0 ± 0,5 ^A	12,0 ± 0,5 ^{DE}	16,5 ± 0,5 ^A	11 ± 0,5 ^{DE}
0,01	12,5 ± 0,5 ^{CD}	7,0 ± 0,5 ^I	5,0 ± 0,5 ^L	7,0 ± 0,5 ^I	7,0 ± 0,5 ^I	5,0 ± 0,0 ^L	13,0 ± 1,0 ^C	11,0 ± 0,0 ^{FG}	11,5 ± 0,5 ^{EF}	10,5 ± 0,5 ^G
0,05	4,0 ± 0,0 ^M	5,0 ± 0,5 ^L	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	5,5 ± 0,5 ^{KL}	6,0 ± 0,0 ^{JK}	6,0 ± 0,5 ^{JK}	5,0 ± 0,0 ^M
0,1	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N
0,5	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N
1	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N	0 ± 0 ^N

6.1.7. Wpływ jonów Zn^{2+} na wydajność oddychania komórkowego szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

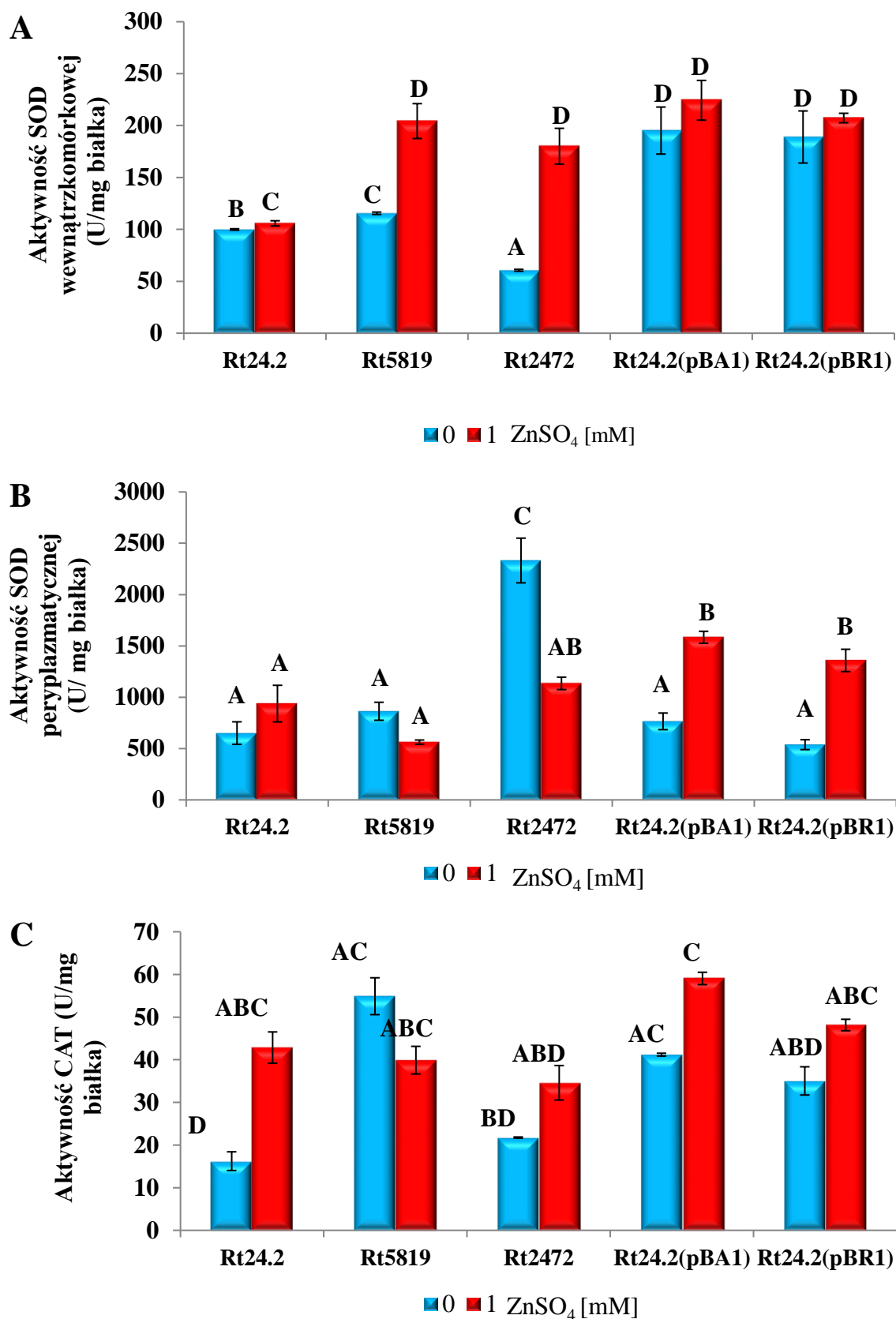
W celu zbadania wpływu jonów cynku na oddychanie komórkowe testowanych szczepów ryzobiowych przeprowadzono oznaczenia zużycia tlenu przez zawiesiny bakterii poddanych 2-godz. ekspozycji na dwa stężenia $ZnSO_4$ (1 mM oraz 10 mM). Po tym czasie za pomocą elektrody tlenowej mierzono spadek stężenia tlenu w próbce przez 20 minut i porównywano zużycie tlenu przez bakterie poddane czynnikowi stresowemu w stosunku do bakterii inkubowanych w warunkach kontrolnych. Analizy te wykazały, że obecność jonów cynku znacznie zaburza proces oddychania komórkowego bakterii (Ryc. 28). Efekt ten był szczególnie widoczny dla stężenia 10 mM $ZnSO_4$. Spośród testowanych szczepów, szczepy Rt2472 oraz Rt5819 okazały się być najbardziej wrażliwe na działanie jonów Zn^{2+} . W przypadku tych bakterii zużycie tlenu było istotnie zahamowane już przy stężeniu 1 mM $ZnSO_4$.



Ryc. 28 Wpływ jonów Zn²⁺ na proces oddychania komórkowego szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (A-E).

6.1.8. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz katalazy (CAT)

W następnym etapie badań przeprowadzono doświadczenia mające na celu porównanie aktywności enzymów, biorących udział w mechanizmach antyoksydacyjnych u bakterii hodowanych bez dodatku oraz z dodatkiem 1 mM ZnSO₄. W tym celu zmierzono aktywność enzymatyczną katalazy (CAT) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) we frakcji białek wewnątrzkomórkowych oraz dodatkowo zmierzono aktywność enzymatyczną SOD we frakcji białek peryplazmatycznych, uzyskanych z 48-godz. hodowli bakteryjnych. Ustalono, że w warunkach kontrolnych najniższą aktywność SOD we frakcji wewnątrzkomórkowej posiadał mutant w genie *rosR* (Rt2472), natomiast we frakcji peryplazmatycznej szczep ten charakteryzował się wyższą aktywnością SOD od pozostałych szczepów [R24.2, Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1)]. Analizy wykazały także, że zarówno aktywność SOD we frakcjach wewnątrzkomórkowej i peryplazmatycznej, jak i aktywność CAT we frakcji białek wewnątrzkomórkowych izolowanych ze szczepów, wzrastała po dodaniu jonów cynku do środowiska wzrostu (Ryc. 29A-C). Wyjątek stanowiły mutanty Rt5819 i Rt2472 dla SOD we frakcji peryplazmatycznej (Ryc. 29B) oraz Rt5819 dla CAT (Ryc. 29C).



Ryc. 29 Wpływ jonów Zn²⁺ na aktywność SOD wewnątrzkomórkowej (A), peryplazmatycznej (B) oraz CAT wewnątrzkomórkowej (C) szczepów *R. leguminosarum* by. *trifolii*. Istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami ZnSO₄ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a).

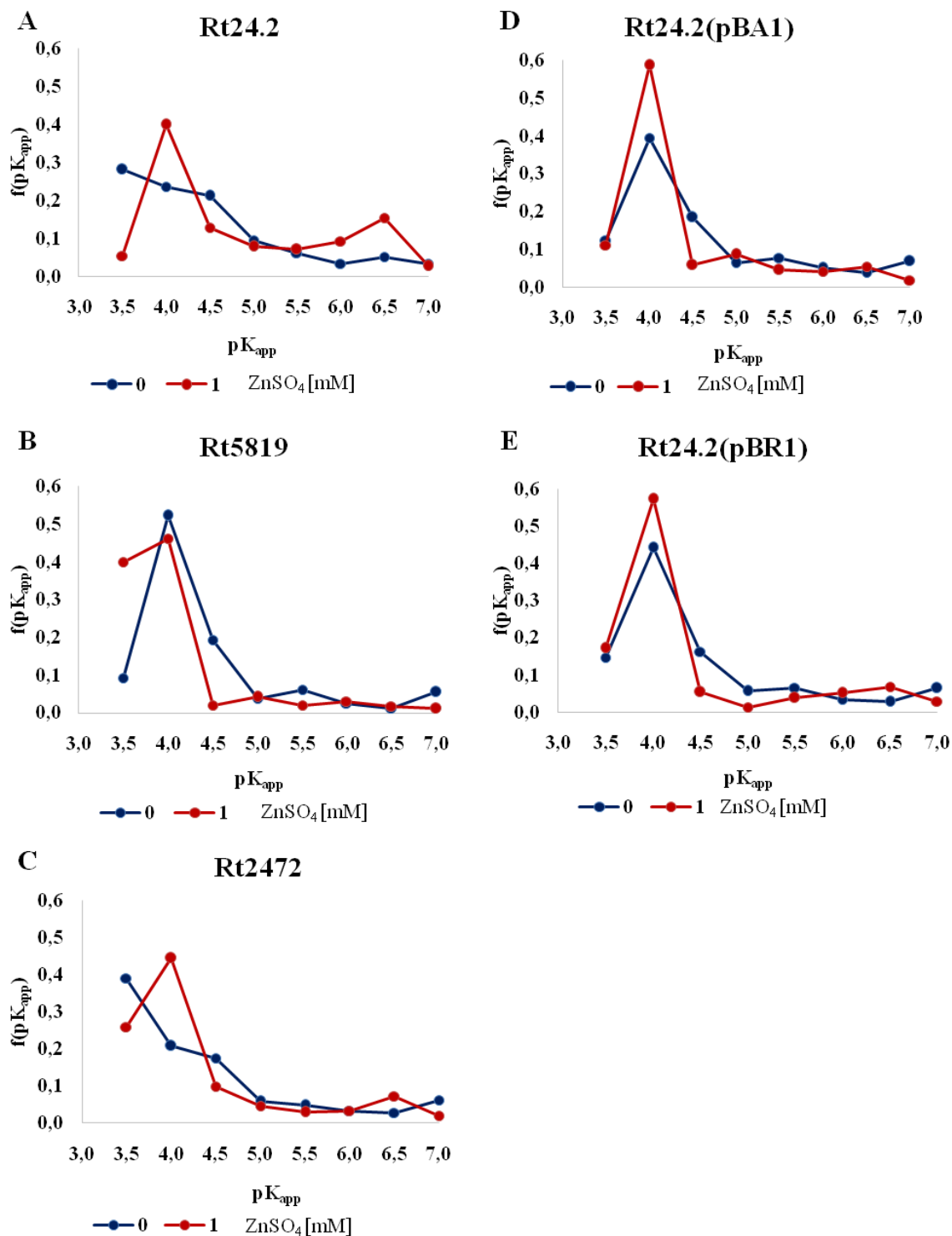
6.2. Charakterystyka właściwości powierzchniowych komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii* poddanych działaniu jonów cynku

6.2.1. Wpływ jonów Zn^{2+} na charakter kwasowo-zasadowy powierzchni komórek badanych szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

Wcześniejsze badania naszego zespołu potwierdziły, że EPS produkowany przez badane szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ma charakter kwasowy [Cieśla i in., 2016]. Celem obecnej pracy było określenie wpływu obecności jonów Zn^{2+} w podłożu na właściwości kwasowo-zasadowe otoczki komórek bakteryjnych.

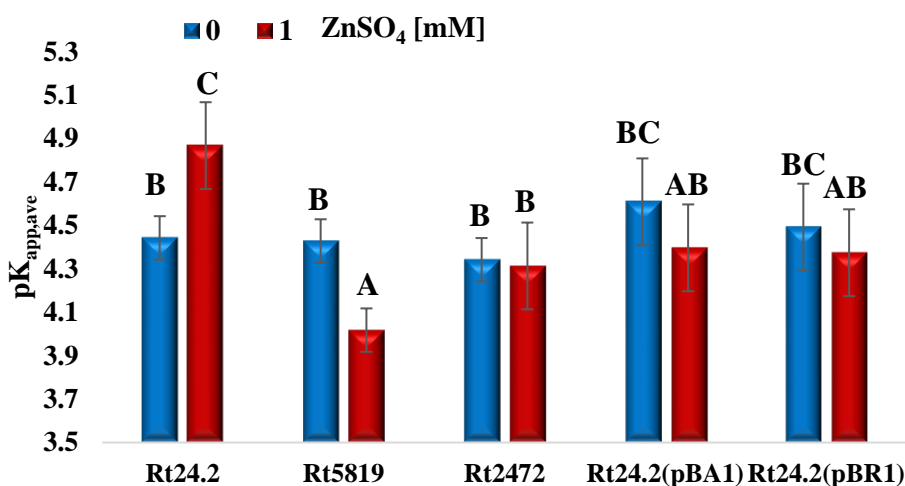
Przeprowadzono miareczkowanie potencjometryczne 24-godz. hodowli bakteryjnych inkubowanych w podłożu o różnej zawartości $ZnSO_4$ (0 mM i 1 mM). Uzyskane wyniki pozwoliły na otrzymanie funkcji rozkładu pozornych stałych dysocjacji ($f(pK_{app})$) powierzchniowych grup funkcyjnych, które przedstawiono na Ryc. 30.

W przypadku szczepów produkujących EPS (Rt24.2, Rt24.2(pBA1) i Rt24.2(pBR1)) oraz szczepu Rt2472 obecność jonów cynku w podłożu skutkowała wzrostem udziału grup funkcyjnych o $pK_{app}=4,0$ w generowaniu powierzchniowego ładunku elektrycznego. Towarzyszył temu spadek udziału grup o $pK_{app}=4,5$ oraz $pK_{app}=3,5$ (tylko dla szczepu dzikiego oraz Rt2472). W przypadku szczepu Rt24.2 zaobserwowano jednocześnie wzrost udziału grup funkcyjnych charakteryzujących się wartościami pK_{app} zawartymi w przedziale 6,0 – 6,5. Dla komórek szczepu Rt5819, który nie syntezuje EPS, dodatek Zn^{2+} do podłoża spowodował zmniejszenie udziału grup o $pK_{app}=4,5$ oraz wzrost udziału grup o $pK_{app}=3,5$ w generowaniu elektrycznego ładunku powierzchniowego.



Ryc. 30 Wpływ jonów Zn^{2+} na funkcje rozkładu pozornych stałych dysocjacji powierzchniowych grup funkcyjnych $f(pK_{app})$, biorących udział w tworzeniu ładunku powierzchniowego komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (A-E).

Wszystkie badane szczepy zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w obecności jonów Zn^{2+} wykazywały silnie kwasowy charakter powierzchni komórek. Obecność jonów cynku nieznacznie zmieniała wartości $pK_{app,ave}$ i tylko dla szczepu dzikiego spowodowała statystycznie istotne osłabienie charakteru kwasowego (wzrost $pK_{app,ave}$), natomiast dla mutantu Rt5819 – jego wzrost (czyli zmniejszenie $pK_{app,ave}$) (Ryc. 31).



Ryc. 31 Wpływ jonów Zn^{2+} na wartości średnich pozornych stałych dysocjacji ($pK_{app,ave}$) powierzchniowych grup funkcyjnych, biorących udział w tworzeniu ładunku powierzchniowego komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Istotne statystycznie różnice pomiędzy stężeniami $ZnSO_4$ dla każdego badanego szczepu zostały oznaczone różnymi literami ($\alpha=0,05$; ANOVA jednoczynnikowa; test Tukey'a).

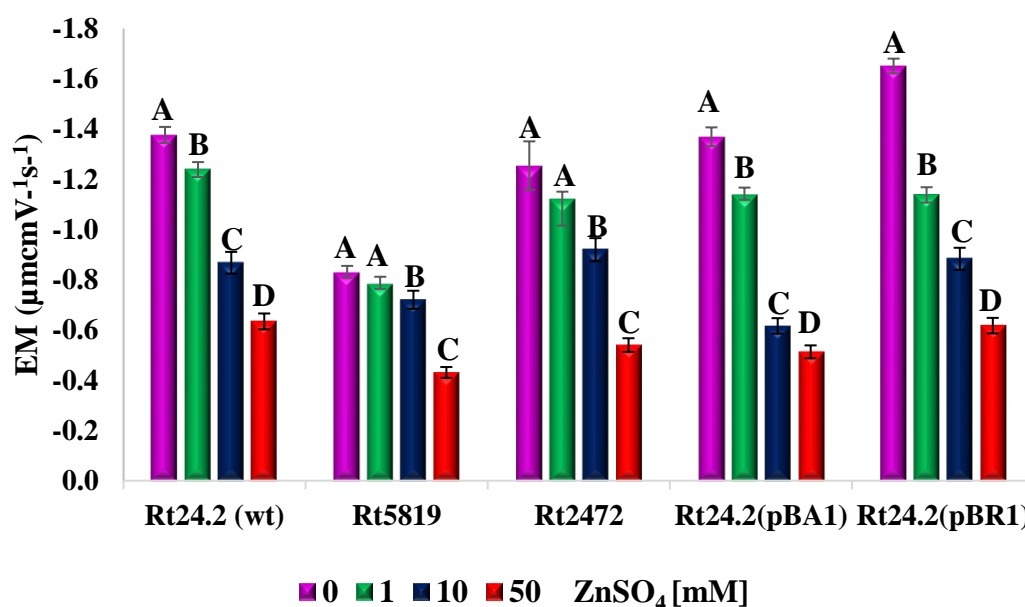
6.2.2. Wpływ jonów Zn^{2+} na ruchliwość elektroforetyczną komórek bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

Ruchliwość elektroforetyczna (ang. electrophoretic mobility, EM) jest parametrem charakteryzującym ruch cząstki, posiadającej powierzchniowy ładunek elektryczny, w polu elektrycznym. EM wyrażona w $m^2V^{-1}s^{-1}$ odpowiada temu, że w polu elektrycznym o natężeniu $V m^{-1}$ cząstka porusza się z szybkością $m s^{-1}$. Ze względu na lepszą formę prezentacji liczb znaczących, na wykresach przedstawionych w niniejszej pracy użyto jednostki $\mu mcmV^{-1}s^{-1}$. Ruchliwość elektroforetyczna jest wprost proporcjonalna do ładunku powierzchniowego cząstek, a jej znak jest tożsamy ze znakiem ładunku, zaś odwrotnie proporcjonalna do ich wielkości. Na ruchliwość elektroforetyczną komórek bakterii mają wpływ różne czynniki, takie jak skład podłoża hodowlanego, faza wzrostu bakterii czy ilość produkowanego EPS [Cieśla i in., 2016].

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie wpływu jonów Zn^{2+} na EM bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Analizy wykonano w różnych wariantach, w których sprawdzono: 1) wpływ stężenia $ZnSO_4$ na EM komórek bakterii, 2) wpływ wybranego stężenia jonów cynku (1 mM $ZnSO_4$) na EM komórek bakterii znajdujących się w różnej fazie wzrostu oraz 3) wpływ 1 mM $ZnSO_4$ na EM komórek bakterii hodowanych w podłożach o różnych wartościach pH.

6.2.2.1. Wpływ stężenia $ZnSO_4$ na ruchliwość elektroforetyczną komórek bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

W celu zbadania wpływu jonów Zn^{2+} na EM komórek bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii* oraz wybrania stężenia jonów cynku do dalszych analiz, doświadczenie wykonano stosując szereg stężeń $ZnSO_4$ (0; 1; 10; 50 mM). Na Ryc. 32. przedstawiono wpływ stężenia Zn^{2+} na EM komórek badanych szczepów.



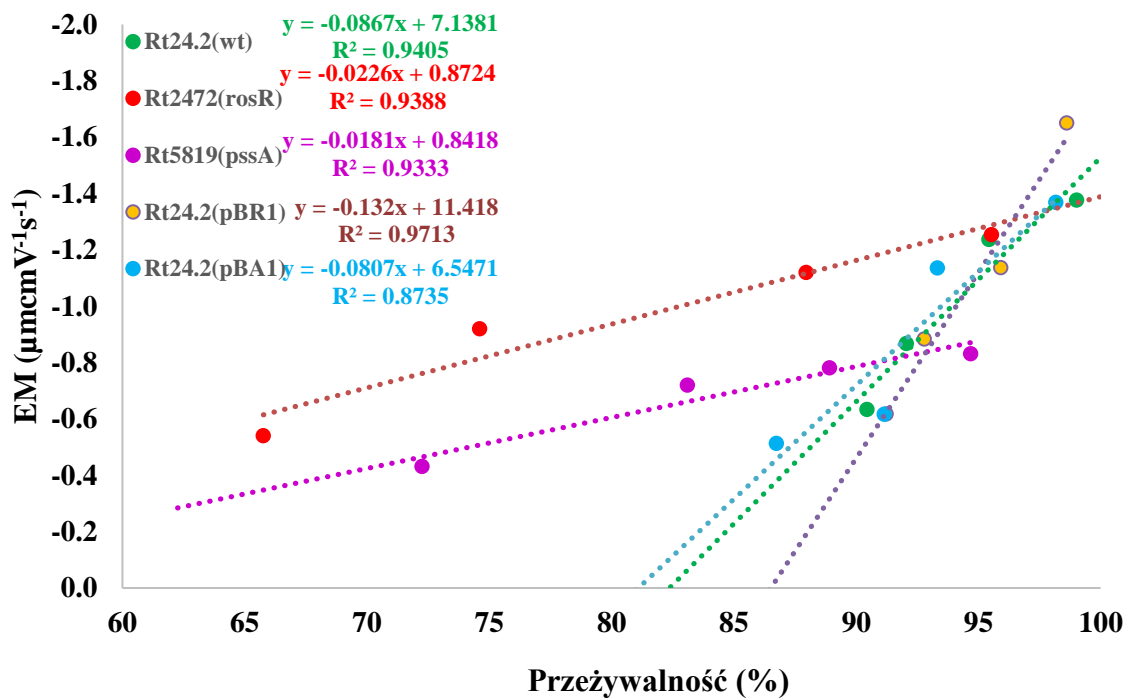
Ryc. 32 Wpływ różnych stężeń jonów Zn^{2+} na ruchliwość elektroforetyczną komórek bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Istotne statystycznie różnice pomiędzy stężeniami $ZnSO_4$ dla każdego badanego szczepu zostały oznaczone różnymi literami ($\alpha=0,05$; ANOVA jednoczynnikowa; test Tukey'a).

Zaobserwowano, że wszystkie badane szczepy bakteryjne charakteryzowały się ujemnymi wartościami EM, co związane jest z ich ujemnym ładunkiem powierzchniowym. Najniższe wartości bezwzględne EM wśród bakterii zawieszonych w czystym podłożu odnotowano dla szczepu Rt5819 ($0,83 \pm 0,02 \mu\text{mcmV}^{-1}\text{s}^{-1}$). Wartości bezwzględne EM komórek szczepu Rt2472 ($1,25 \pm 0,10 \mu\text{mcmV}^{-1}\text{s}^{-1}$) w warunkach kontrolnych były

nieznacznie niższe od wartości EM komórek bakterii szczepu dzikiego Rt24.2 ($1,38 \pm 0,03 \mu\text{mcmV}^{-1}\text{s}^{-1}$) i znacznie wyższe niż komórek bakterii szczepu Rt5819. Najwyższą wartością bezwzględną EM charakteryzował się szczep Rt24.2(pBR1) ($1,65 \pm 0,03 \mu\text{mcmV}^{-1}\text{s}^{-1}$). Wyniki uzyskane dla poszczególnych szczepów bakterii w czystym podłożu były zgodne z wcześniej publikowanymi [Cieśla i in., 2016], potwierdzając, że komórki bakterii syntezujących większe ilości EPS charakteryzują się wyższymi wartościami bezwzględnymi EM.

Wzrost stężenia jonów Zn^{2+} prowadził do zmniejszenia wartości bezwzględnej EM komórek bakteryjnych wszystkich szczepów bakterii. W obecności 50 mM ZnSO_4 , wartości bezwzględne EM były najniższe i wynosiły dla poszczególnych bakterii odpowiednio: Rt24.2 – $0,63 \pm 0,06 \mu\text{mcmV}^{-1}\text{s}^{-1}$, Rt5819 – $0,43 \pm 0,02 \mu\text{mcmV}^{-1}\text{s}^{-1}$, Rt2472 – $0,54 \pm 0,03 \mu\text{mcmV}^{-1}\text{s}^{-1}$, Rt24.2(pBA1) – $0,51 \pm 0,02 \mu\text{mcmV}^{-1}\text{s}^{-1}$ oraz Rt24.2(pBR1) – $0,62 \pm 0,03 \mu\text{mcmV}^{-1}\text{s}^{-1}$.

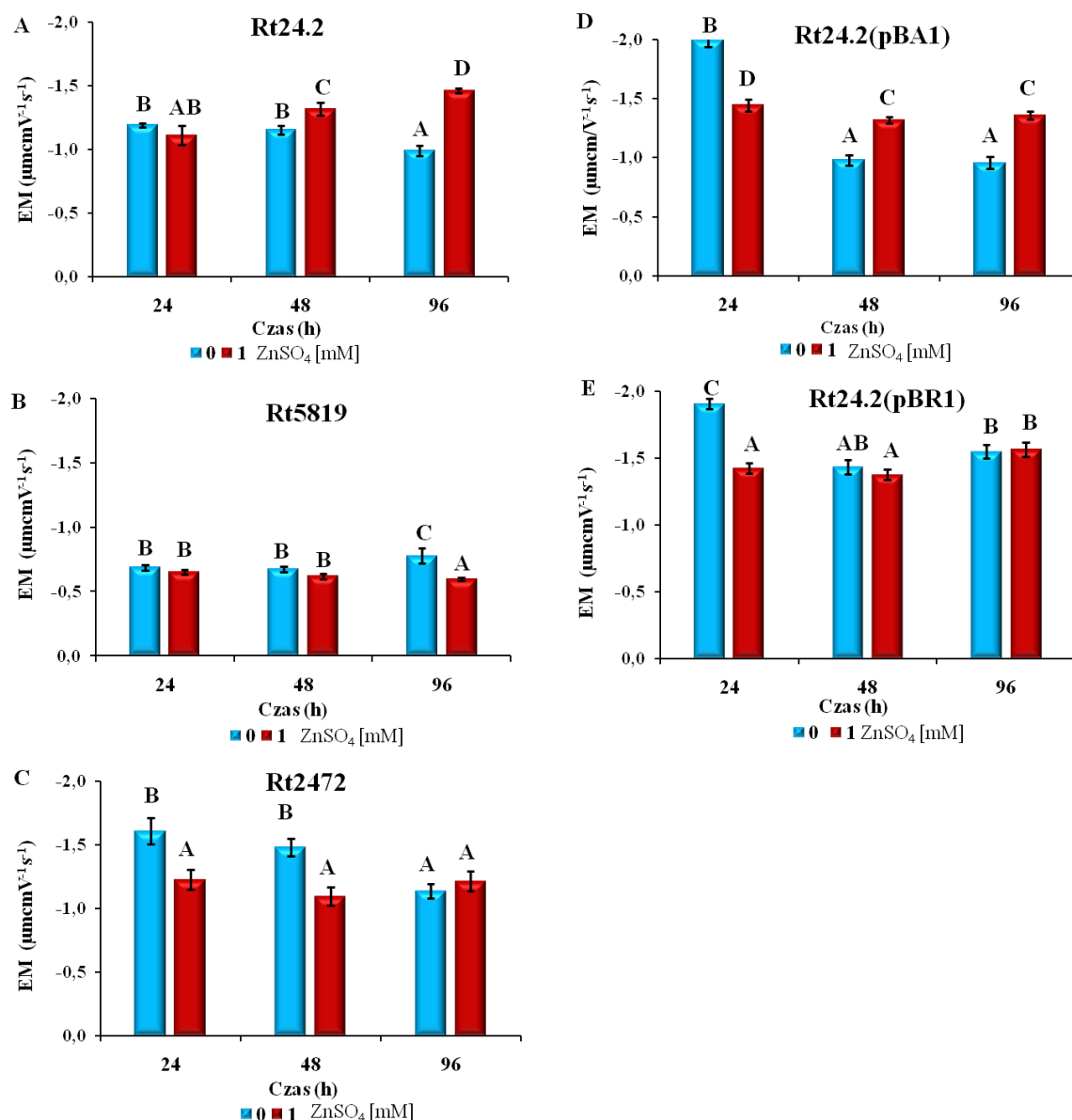
Zmniejszenie wartości bezwzględnej EM komórek bakterii wynikało z neutralizacji ujemnego ładunku elektrycznego powierzchni komórek przez kationy Zn^{2+} , ale również ze zwiększenia się liczby martwych komórek w populacji bakteryjnej w związku ze wzrostem toksyczności jonów cynku. Jak pokazano na Ryc. 33, w przypadku wszystkich szczepów bakterii ($\text{OD}_{600}=0,4$) poddanych wpływowi różnego stężenia jonów cynku, wartości EM korelowały z przeżywalnością komórek (współczynniki determinacji wynosiły od 0,8735 dla szczepu Rt24.2(pBA1) do 0,9713 dla szczepu Rt24.2(pBR1)). Im przeżywalność komórek była niższa, tym niższe były wartości bezwzględne EM. Ruchliwość elektroforetyczna może być zatem wskaźnikiem toksyczności jonów cynku.



Ryc. 33 Zależność EM komórek bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii* od ich przeżywalności.

6.2.2.2. Wpływ jonów Zn^{2+} i fazy wzrostu bakterii na ruchliwość elektroforetyczną komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

Ze względu na to, że stężenie jonów cynku wynoszące 1 mM działało stymulująco na produkcję EPS (Rozdz. 4.1.2.) oraz rzutowało na wartości EM komórek bakteryjnych (Rozdz. 4.2.2.2), zastosowano je w kolejnych doświadczeniach. Zbadano wpływ fazy wzrostu bakterii w podłożu czystym oraz zawierającym jony Zn^{2+} na wartości EM. Wyniki przedstawiono na Ryc. 34.



Ryc. 34 Wpływ fazy wzrostu bakterii na ruchliwość elektroforetyczną komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii* w warunkach kontrolnych oraz w obecności 1 mM ZnSO₄ (A-E). Dla każdego szczepu statystycznie istotne różnice między uzyskanymi wynikami zaznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukeya).

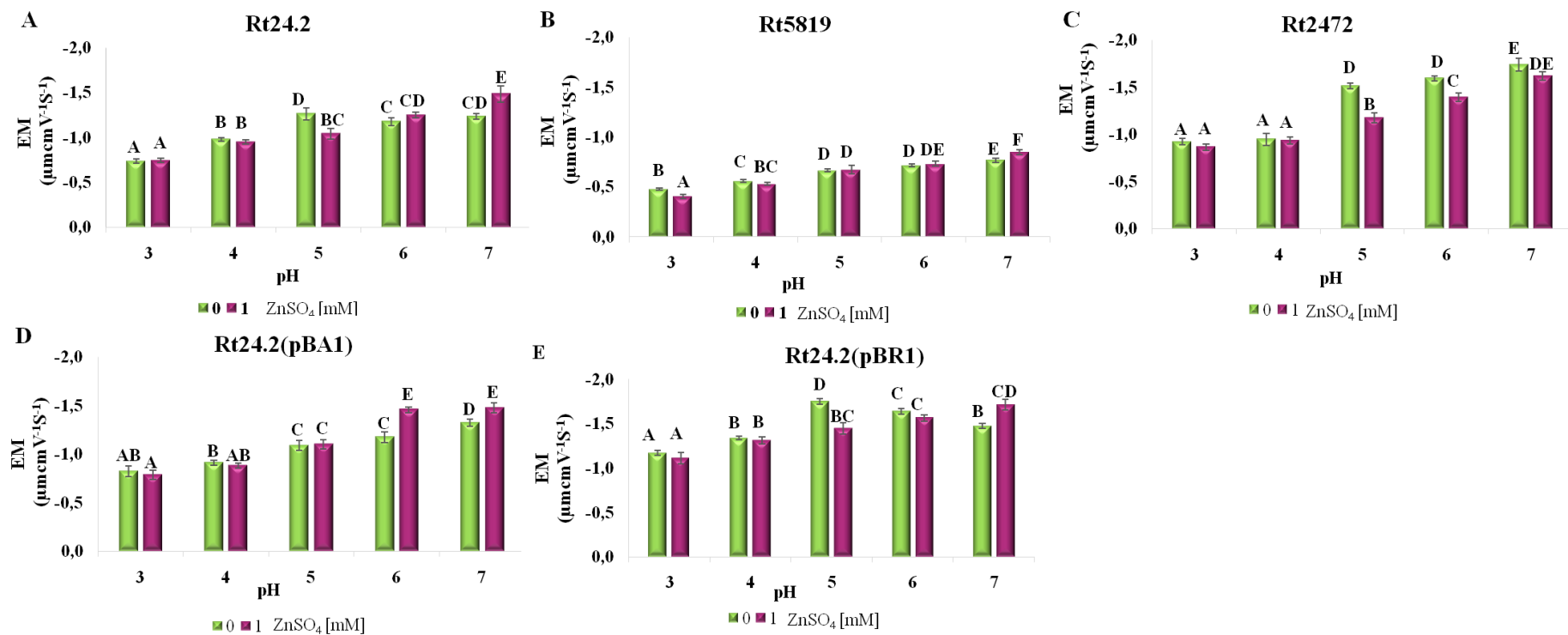
Zaobserwowano, że w warunkach kontrolnych po 24-godz. hodowli najwyższymi wartościami bezwzględnymi EM charakteryzowały się szczepy nadprodukujące EPS: Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1) (wartość bezwzględna EM dla tych szczepów wynosiła odpowiednio: $2,00 \pm 0,06 \mu\text{mcmV}^{-1}\text{s}^{-1}$ oraz $1,90 \pm 0,04 \mu\text{mcmV}^{-1}\text{s}^{-1}$). Najniższą wartość bezwzględną EM wykazywał szczep defektywny w syntezie EPS – Rt5819 ($0,69 \pm 0,02 \mu\text{mcmV}^{-1}\text{s}^{-1}$). Zaobserwowano również, że w przypadku szczepów produkujących EPS: Rt24.2, Rt2472, Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1) dłuższy czas hodowli wpływał negatywnie na wartości bezwzględne EM, co potwierdzałoby, że na spadek ruchliwości

elektroforetycznej ma wpływ również liczba martwych komórek w populacji. Badania wykazały również, że dla mutantów defektywnych w syntezie EPS jony cynku powodowały obniżenie wartości bezwzględnych EM we wszystkich badanych wariantach czasu. Natomiast dla szczepów Rt24.2 oraz Rt24.2(pBA1) jony cynku powodowały wzrost wartości EM zarówno po 48-godz., jak i po 96-godz. hodowli.

6.2.2.3. Wpływ jonów Zn^{2+} oraz wartości pH podłoża hodowlanego na ruchliwość elektroforetyczną komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

W następnym eksperymencie badano EM komórek bakterii szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* hodowanych w podłożach o różnych wartościach pH (3,0-7,0) oraz stężeniach jonów cynku, wynoszących 0 mM i 1 mM. Wyniki przedstawiono na Ryc. 35.

Zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w obecności jonów Zn^{2+} , dla wszystkich badanych szczepów zaobserwowano wzrost wartości bezwzględnej EM ze wzrostem pH podłoża. Przy pH podłoża wynoszącym 3,0 najniższą wartość bezwzględną EM otrzymano dla szczepu Rt5819 ($0,48 \pm 0,01 \mu\text{mcmV}^{-1}\text{S}^{-1}$), zaś najwyższą dla szczepu Rt24.2(pBR1) ($1,17 \pm 0,03 \mu\text{mcmV}^{-1}\text{S}^{-1}$). Zaobserwowano również, że szczep Rt5819 we wszystkich badanych wariantach pH charakteryzował się najniższymi wartościami bezwzględnymi EM. W przypadku szczepów Rt24.2, Rt24.2(pBA1), Rt24.2(pBR1) oraz Rt2472 i podłoży o pH=3,0 i 4,0 nie odnotowano istotnego wpływu jonów Zn^{2+} na wartość EM. Dla szczepów Rt24.2, Rt24.2(pBR1), Rt24.2(pBA1) oraz Rt5819 hodowanych w podłożach o pH 7,0, wartości bezwzględne EM były wyższe w warunkach stresowych niż kontrolnych. Dla szczepu Rt2472 zaobserwowano, że wartość bezwzględna EM była niższa w obecności jonów cynku, niż w warunkach kontrolnych, przy pH podłoża mieszczącym się w zakresie 5,0-7,0, co może być związane z dużą zdolnością tego mutantu do tworzenia agregatów.



Ryc. 35 Wpływ wartości pH podłoża hodowlanego na ruchliwość elektroforetyczną komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii* w warunkach kontrolnych oraz w obecności 1 mM ZnSO₄ (A-E). Dla każdego szczepu statystycznie istotne różnice między uzyskanymi wynikami zaznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a).

6.2.3. Wpływ jonów Zn^{2+} na hydrofobowość komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

W celu ustalenia czy jony cynku wpływają na własności powierzchniowe komórek *R. leguminosarum*, określono hydrofobowość komórek badanych szczepów, poddanych 24-godz. ekspozycji na szereg stężeń $ZnSO_4$ (zastosowane stężenia: 0; 0,1; 0,5; 1; 10 mM). Wykazano, że hydrofobowość powierzchni komórek różni się pomiędzy szczepami oraz między zastosowanymi stężeniami cynku (Tab. 9).

Tab. 9 Wpływ jonów Zn^{2+} na hydrofobowość komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Różnice istotne statystycznie pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami $ZnSO_4$ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a).

ZnSO ₄ (mM)	Hydrofobowość komórek szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (%)				
	Rt24.2	Rt5819	Rt2472	Rt24.2(pBA1)	Rt24.2(pBR1)
0	10,08±0,8 ^{ABC}	3,59±0,89 ^A	26,96±3,59 ^{EFG}	7,83±0,64 ^{ABC}	7,22±1,3 ^{ABC}
0,1	11,66±0,33 ^{ABC}	5,95±1,82 ^{AB}	29,15±5,39 ^{FG}	11,31±0,56 ^{ABC}	9,29±1,5 ^{ABC}
0,5	12,34±1,19 ^{ABC}	6,21±0,29 ^{AB}	30,43±1,51 ^{FG}	11,64±0,33 ^{ABC}	10,08±4,12 ^{ABC}
1	12,16±1,9 ^{ABC}	10,50±0,6 ^{ABC}	32,65±1,8 ^{FG}	13,26±1,5 ^{ABCD}	15,70±1,6 ^{BCD}
10	23,75±2,6 ^{DEF}	10,77±2,5 ^{ABC}	36,55±3,9 ^G	15,02±1,2 ^{BCD}	17,21±3,7 ^{CDE}

Spośród szczepów testowanych w warunkach kontrolnych największą hydrofobowość komórek wykazywał szczep Rt2472 (27,95%±3,53), natomiast najmniejszą szczep Rt5819 (4,21%±1,49). Co więcej, wykazano że wzrost stężenia jonów cynku skutkowało zwiększeniem hydrofobowości komórek wszystkich badanych bakterii. Jony cynku obecne w podłożu miały zatem wpływ na własności powierzchniowe komórek ryzobiów [Kopycińska i in., 2018].

6.2.4. Wpływ jonów Zn^{2+} na zwilżalność oraz powierzchniową energię swobodną komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

Zwilżalność powierzchni komórek bakterii szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* przez ciecze o charakterze polarnym (woda i formamid) i apolarnym (dijodometan) oceniano w oparciu o wyniki pomiarów kąta zwilżania (θ , ang. contact angle, CA). Jest to kąt pomiędzy powierzchnią ciała stałego a styczną do powierzchni kropli poprowadzoną z punktu, w którym stykają się trzy fazy: ciało stałe-ciecz-powietrze [Barnat-Hunek, 2016]. Jeżeli wartość kąta zwilżania jest mniejsza niż 90° , to powierzchnia jest dobrze zwilżana przez daną ciecz. Powierzchnia dobrze zwilżana przez wodę ($\theta < 90^\circ$) wykazuje charakter

hydrofilowy, natomiast gdy $\theta > 90^\circ$, charakter powierzchni jest hydrofobowy. Na wartość CA mogą wpływać różne czynniki, m. in.: jednorodność powierzchni pod kątem fizycznym i chemicznym, chropowatość, zanieczyszczenia powierzchni, a także rodzaj oraz wielkość kropli pomiarowej. CA można stosować w celu określenia różnych parametrów charakteryzujących powierzchnię, takich jak swobodna energia powierzchniowa czy własności adhezyjne.

Wyniki pomiarów kąta zwilżania powierzchni, utworzonej przez osadzoną na celulozowym filtrze i wysuszoną (temperatura 20 °C) warstwę komórek bakterii, przedstawiono w Tabeli 10. Stosowano ciecze o różnej polarności. Eksperyment wykonano dla bakterii hodowanych w czystym podłożu oraz zawierającym 1 mM ZnSO₄.

Tab. 10 Wpływ jonów Zn²⁺ na wartości kątów zwilżania powierzchni komórek bakterii różnych szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, uzyskane dla wody (θ_w), dijdometanu (θ_a) oraz formamidu (θ_f).

Szczep <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	ZnSO ₄ [mM]	CA [°]		
		θ_w	θ_a	θ_f
Rt24.2	0	66,5 ± 0,9	44,1 ± 1,3	59,0 ± 0,8
	1	47,9 ± 0,1	43,4 ± 0,9	56,5 ± 0,5
Rt5819	0	46,1 ± 1,1	50,8 ± 1,0	53,6 ± 2,6
	1	57,9 ± 0,9	44,7 ± 1,3	52,1 ± 0,6
Rt2472	0	76,3 ± 2,0	49,9 ± 1,0	57,1 ± 0,9
	1	80,4 ± 0,8	50,0 ± 0,4	60,0 ± 1,0
Rt24.2(pBA1)	0	66,2 ± 0,9	42,9 ± 1,3	64,1 ± 1,0
	1	53,6 ± 0,4	46,6 ± 0,4	49,2 ± 0,7
Rt24.2(pBR1)	0	75,2 ± 1,1	45,5 ± 1,5	54,8 ± 0,9
	1	76,8 ± 0,9	42,6 ± 0,6	59,0 ± 0,5

Wszystkie zastosowane ciecze zwilżały powierzchnie tworzone przez komórki bakteryjne badanych szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ($\theta < 90^\circ$). Wskazuje to na złożony charakter hydrofilowo/hydrofobowy tych powierzchni. Mniejsze wartości kątów zwilżania uzyskano stosując ciecz apolarną (dijdometan) niż ciecze polarne (woda i formamid). Przy zastosowaniu wody jako cieczy zwilżającej, udało się zaobserwować (szczególnie dla bakterii hodowanych w warunkach kontrolnych), że szczepy produkujące EPS: Rt24.2, Rt2472, Rt24(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1) charakteryzowały się wysokimi wartościami CA, natomiast mutant Rt5819, nieprodukujący EPS, wykazywał ok. 1,5 razy

mniejszy kąt zwilżania niż pozostałe szczepy. Zatem w badanych warunkach (wysuszona warstwa komórek) powierzchnia komórek szczepu Rt5819 była najbardziej hydrofilowa spośród badanych. Najwyższymi wartościami kąta zwilżania wodą (czyli najmniejszą hydrofilowością) charakteryzowała się powierzchnia komórek bakterii szczepu Rt2472. Otrzymane wyniki korespondowały z wcześniej publikowanymi dla badanych szczepów [Cieśla i in., 2016]. Obecność jonów Zn^{2+} nie miała jednoznacznego wpływu na wartości CA. W przypadku zwilżania wodą zaobserwowano nieznaczny wzrost wartości CA względem warunków kontrolnych dla szczepów Rt5819 i Rt2472 oraz zmniejszenie wartości CA dla szczepów Rt24.2 i Rt24.2(pBR1). W przypadku formamidu, czyli drugiej cieczy o charakterze polarnym, odnotowano zwiększenie wartości CA dla szczepów Rt2472 i Rt24.2(pBR1) oraz zmniejszenie CA dla szczepów Rt24.2 i Rt24.2(pBA1). Obecność jonów Zn^{2+} skutkowała znaczącym zmniejszeniem wartości kąta zwilżania powierzchni cieczą polarną jedynie w przypadku bakterii szczepu Rt5819 oraz wzrostem wartości CA dla bakterii szczepu Rt2472.

Otrzymane wartości kątów zwilżania zostały użyte do obliczenia całkowitej swobodnej energii powierzchniowej (SFE) oraz jej składowych: polarnej (oddziaływania kwasowo-zasadowe) oraz apolarnej (oddziaływania dalekiego zasięgu) (Tab. 11).

Tab. 11 Wpływ jonów Zn^{2+} na wartości swobodnej energii powierzchniowej oraz jej składowych dla szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

Szczep <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	ZnSO ₄ [mM]	Swobodna energia powierzchniowa i jej składowe (mJ m ⁻²)		
		AB	LW	SFE całkowita
Rt24.2	0	8,2 ± 1,0	38,9 ± 0,7	47,1 ± 1,7
	1	9,5 ± 0,6	39,3 ± 0,5	48,8 ± 1,1
Rt5819	0	14,5 ± 3,1	35,1 ± 0,6	49,6 ± 3,7
	1	12,3 ± 1,0	38,6 ± 0,7	50,8 ± 1,7
Rt2472	0	6,2 ± 1,7	35,6 ± 0,6	41,8 ± 2,2
	1	4,4 ± 0,8	35,6 ± 0,2	40,0 ± 1,0
Rt24.2(pBA1)	0	5,6 ± 1,0	39,6 ± 0,7	45,2 ± 1,7
	1	14,7 ± 0,8	37,5 ± 0,2	52,2 ± 1,0
Rt24.2(pBR1)	0	6,0 ± 1,1	38,1 ± 0,8	44,1 ± 1,9
	1	5,1 ± 0,7	39,8 ± 0,4	44,9 ± 1,0

Swobodna energia powierzchniowa (ang. surface free energy, SFE) uważana jest za kluczowy parametr opisujący zjawiska powierzchniowe, ponieważ jest miarą siły przyciągania pomiędzy cząsteczkami, które znajdują się w warstwie powierzchniowej, a stykającą się z nimi substancją [Barnat-Hunek, 2016].

Badane szczepy bakteryjne nie różniły się znacząco pod względem wartości całkowitej swobodnej energii powierzchniowej. W przypadku bakterii hodowanych w warunkach kontrolnych, najniższymi wartościami SFE charakteryzował się szczep Rt2472, natomiast najwyższymi szczep Rt5819. Dominujący wkład do SFE miała składowa LW. Jej wartości dla wszystkich badanych szczepów były podobne [od 35,1 mJ m⁻² dla szczepu Rt5819 do 39,6 mJ m⁻² dla szczepu Rt24.2(pBA1)]. Większe zróżnicowanie pomiędzy szczepami zaobserwowano w przypadku składowej AB obliczanej dla warunków kontrolnych, gdzie najwyższe wartości uzyskano dla szczepu Rt5819. Obecność jonów Zn²⁺ miała znaczący wpływ na wartości SFE tylko w przypadku szczepu Rt24.2(pBA1), prowadząc do ich wzrostu. Dla tego szczepu odnotowano także wzrost wartości składowej AB.

6.3. Wpływ jonów Zn^{2+} na symbiozę *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną łąkową (*Trifolium pratense*)

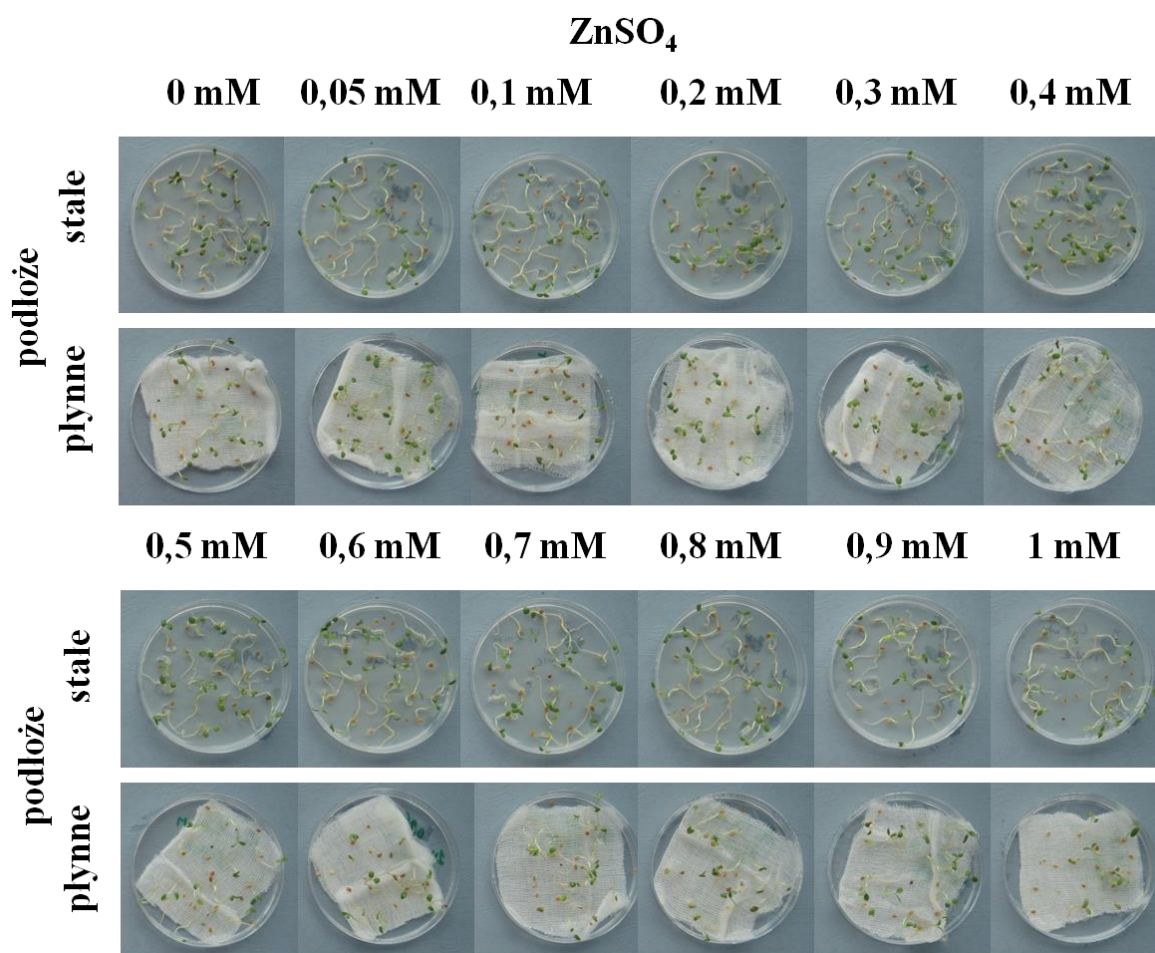
6.3.1. Wpływ jonów cynku na kiełkowanie koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*)

Wstępnym etapem wszystkich wykonywanych doświadczeń roślinnych było określenie wpływu różnych stężeń jonów cynku na kiełkowanie nasion koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*) i wybranie odpowiedniego zakresu stężeń do dalszych analiz. W tym celu zbadano wpływ $ZnSO_4$ w zakresie stężeń od 0 do 1 mM na kiełkowanie nasion koniczyny w płynnym oraz stałym podłożu do kiełkowania nasion. Na podstawie uzyskanych wyników określono siłę kiełkowania nasion (% nasion wykiełkowanych), a także sprawdzono wpływ jonów cynku na długość łodyg oraz korzeni 7-dniowych kiełków (Tab. 12, Ryc. 36).

Tab. 12 Wpływ jonów Zn^{2+} na kiełkowanie nasion koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*). W tabeli porównano średnie długości korzeni i łodyg oraz siłę kiełkowania nasion w płynnym oraz na stałym podłożu do kiełkowania nasion. Istotnie statystycznie różnice mierzonych parametrów pomiędzy stężeniami $ZnSO_4$ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$; ANOVA jednoczynnikowa; test Tukey'a).

ZnSO ₄ (mM)	Podłoże do kiełkowania nasion					
	Stałe			Płynne		
	Łodyga (mm)	Korzeń (mm)	Siła kiełkowania (%)	Łodyga (mm)	Korzeń (mm)	Siła kiełkowania (%)
0	31,45±0,94 ^A	17,95±1,15 ^A	91,11	37,00±1,83 ^A	16,06±2,17 ^A	83,33
0,05	25,54±1,23 ^B	14,53±1,79 ^{AB}	83,33	35,21±0,79 ^{AB}	14,10±1,40 ^{AB}	83,33
0,1	25,08±1,23 ^B	14,29±0,32 ^{ABC}	83,33	34,44±1,23 ^{AB}	13,86±0,61 ^{AB}	81,11
0,2	21,89±1,97 ^{BC}	14,02±1,97 ^{ABC}	78,89	32,85±1,63 ^{ABC}	13,59±2,29 ^{AB}	74,44
0,3	21,75±1,24 ^{BC}	13,89±1,53 ^{ABC}	76,67	32,87±1,85 ^{ABC}	11,61±2,18 ^{ABC}	71,11
0,4	20,77±2,65 ^{BC}	13,52±1,91 ^{ABC}	76,67	32,69±1,19 ^{ABC}	11,35±1,03 ^{ABC}	65,56
0,5	19,57±2,06 ^{CD}	12,27±2,13 ^{BC}	75,56	30,26±2,97 ^{BCD}	10,19±1,31 ^{BC}	62,22
0,6	16,71±0,99 ^{CDE}	11,30±0,3 ^{BC}	74,44	29,95±0,59 ^{BCD}	9,62±1,92 ^{BC}	62,22
0,7	14,91±1,43 ^{DEF}	10,32±0,3 ^{BCDE}	68,89	27,92±2,58 ^{CD}	9,32±1,05 ^{BC}	53,33
0,8	12,48±2,10 ^{EF}	9,85±0,98 ^{CDE}	68,89	27,70±1,80 ^{CD}	8,71±1,87 ^{BC}	47,78
0,9	10,95±1,28 ^{FG}	9,03±1,30 ^{DE}	67,78	26,97±2,87 ^{CD}	7,66±1,07 ^C	42,22
1,0	5,90±1,55 ^G	6,81±0,79 ^E	62,22	26,28±1,94 ^D	7,56±2,49 ^C	25,00

Przeprowadzone analizy wykazały, że cynk miał istotny wpływ na kiełkowanie nasion koniczyny i przy najwyższym zastosowanym stężeniu (1 mM) powodował obniżenie efektywności ich kiełkowania do około 60% w przypadku podłoża stałego oraz 25% dla podłoża płynnego (Tab. 12). Ponadto zaobserwowano, że w obu rodzajach podłoży, wzrastające stężenie $ZnSO_4$ negatywnie wpływało na długość, zarówno łodyg, jak i korzeni 7-dniowych kiełków. Doświadczenie prowadzone w podłożu stałym wykazało, że obecność jonów cynku w stężeniu 1 mM powodowała około 5-krotne skrócenie długości łodyg oraz 3-krotne skrócenie długości korzeni kiełków w porównaniu do kiełków hodowanych w warunkach kontrolnych. Na podstawie otrzymanych wyników, do badań wpływu jonów Zn^{2+} na adhezję bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do korzeni koniczyny łąkowej wybrano stężenie 0,1 mM, natomiast do analiz wpływu tego jonu na symbiozę badanych szczepów bakteryjnych z koniczyną stężenia 0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 i 1mM $ZnSO_4$.

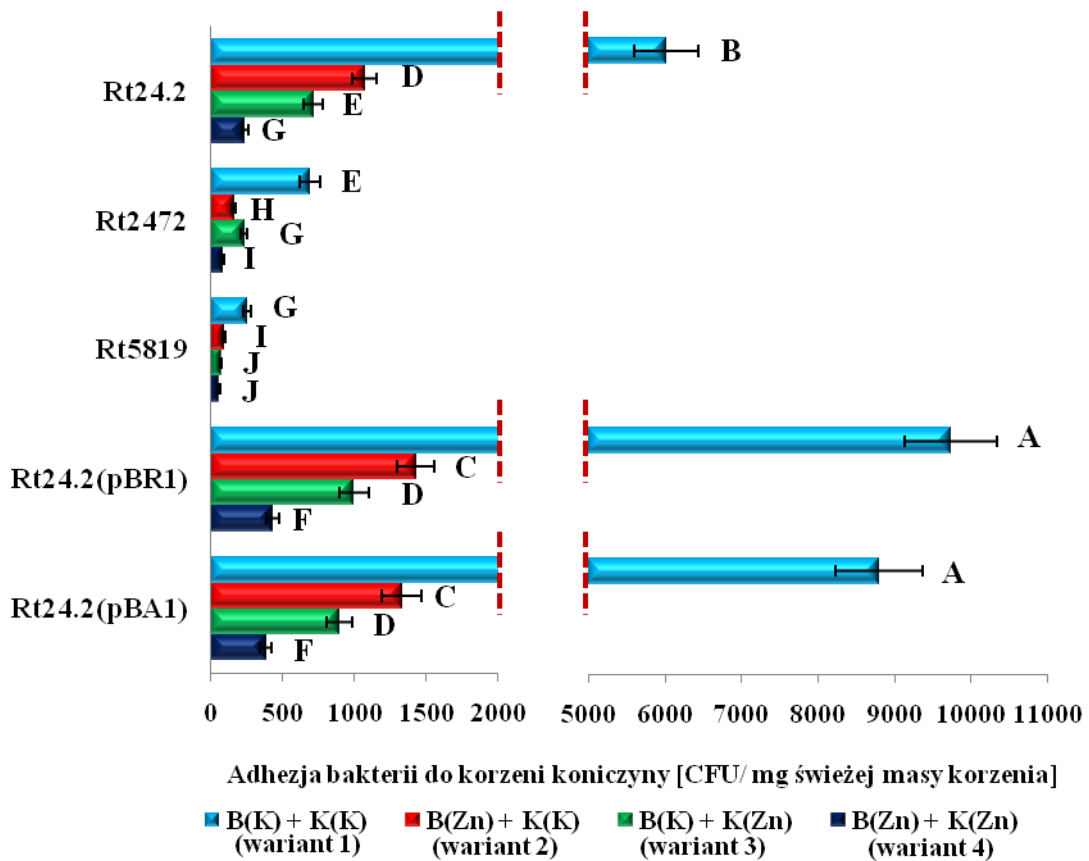


Ryc. 36 Wpływ jonów Zn^{2+} na kiełkowanie nasion koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*).

6.3.2. Wpływ jonów Zn^{2+} na adhezję komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do korzeni koniczyny łąkowej

We wcześniejszych badaniach naszego zespołu ustalono, że szczepy Rt24.2, Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1) efektywnie adsorbują się na korzeniach koniczyny, podczas gdy zdolność adhezji mutantów defektywnych w syntezie EPS (Rt5819 oraz Rt2472) jest znacząco obniżona [Janczarek i in., 2015]. Na podstawie uzyskanych wyników dotyczących wpływu jonów Zn^{2+} na efektywność kiełkowania nasion koniczyny i wzrostu młodych kiełków, do tego doświadczenia wybrano 0,1 mM stężenie jonów cynku. Aby ocenić, który z partnerów symbiotycznych jest bardziej wrażliwy na działanie tego metalu, bakterie oraz kiełki koniczyny były niezależnie traktowane jonami Zn^{2+} , a następnie odpowiednio przygotowane i wykorzystane w eksperymencie. Wpływ jonów cynku na adhezję bakterii do korzeni koniczyny zbadano w 4 wariantach. Pierwszy z nich stanowiła kontrola doświadczenia, w której zarówno kiełki, jak i bakterie nie były poddane działaniu jonów Zn^{2+} . W drugim oraz w trzecim wariacie sprawdzono adhezję bakterii uprzednio traktowanych cynkiem do korzeni roślin kontrolnych (wariant 2) oraz bakterii kontrolnych do korzeni koniczyny poddanej wcześniej ekspozycji na cynk (wariant 3). W ostatnim wariacie (4) zbadano efektywność adhezji bakterii do korzeni roślin, gdzie zarówno mikrosymbiont, jak też jego gospodarz, były wcześniej traktowane jonami Zn^{2+} .

Badania wykazały, że obecność cynku wpływa negatywnie na adhezję komórek wszystkich badanych szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do korzeni koniczyny. Największy spadek adhezji komórek tych szczepów w porównaniu do warunków kontrolnych zaobserwowano w przypadku wariantu 4. Wykazano, że ~23-krotnie mniej komórek szczepów Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1) było na powierzchni korzeni koniczyny w obecności jonów Zn^{2+} w stosunku do warunków kontrolnych (Ryc. 37). W przypadku mutantów defektywnych w syntezie EPS (Rt5819 oraz Rt2472), których zdolności adhezyjne są relatywnie niskie, obecność tego czynnika stresowego powodowała dodatkową redukcję ich efektywności adhezji do korzeni koniczyny. Porównanie wyników otrzymanych dla wariantu 2 oraz 3 wykazało, że adhezja wszystkich badanych szczepów do korzeni gospodarza roślinnego była niższa, kiedy traktowane $ZnSO_4$ były kiełki koniczyny, a nie bakterie (wariant 3), co sugeruje że spośród partnerów symbiotycznych makrosymbiont jest bardziej wrażliwy na działanie jonów tego metalu [Kopycińska i in., 2018].



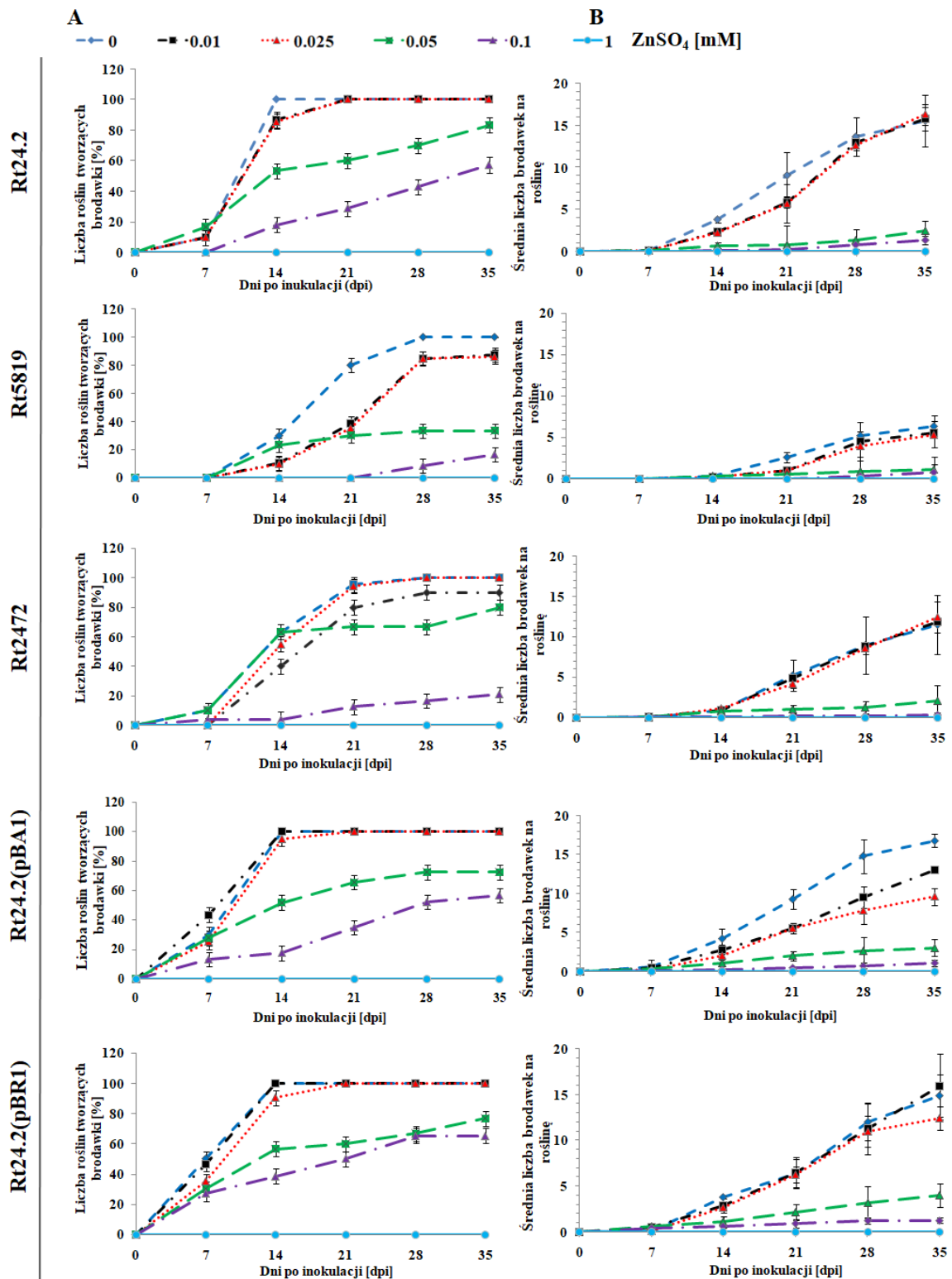
Ryc. 37 Wpływ jonów Zn^{2+} na adhezję komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do korzeni koniczyny; B(K) – bakterie kontrolne (nie poddane działaniu jonów Zn^{2+}), B(Zn) – bakterie inkubowane w obecności 0,1 mM jonów Zn^{2+} , K(K) – kielki koniczyny kontrolne, K(Zn) – kielki koniczyny inkubowane w obecności 0,1 mM jonów Zn^{2+} . Istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi wariantami oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukeya).

6.3.3. Wpływ jonów Zn^{2+} na symbiozę *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną łąkową (*Trifolium pratense*)

W celu określenia wpływu obecności jonów Zn^{2+} na efektywność nawiązywania symbiozy pomiędzy badanymi szczepami *R. leguminosarum* bv. *trifolii* a koniczyną łąkową, przeprowadzono doświadczenia, w których kielki koniczyny były umieszczone w probówkach z podłożem roślinnym Fåhræus bez źródła azotu, przy różnym stężeniu $ZnSO_4$ (0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 1mM). Kielki inokulowano zawiesinami bakteryjnymi badanych szczepów i hodowano przez 5 tygodni w warunkach szklarniowych. W trakcie trwania eksperymentu co 7 dni określano liczbę pojawiających się brodawek korzeniowych. Ustalono takie parametry jak: efektywność infekcji korzeni gospodarza przez bakterie *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, kinetykę brodawkowania, a także masę części nadziemnej oraz korzeni roślin.

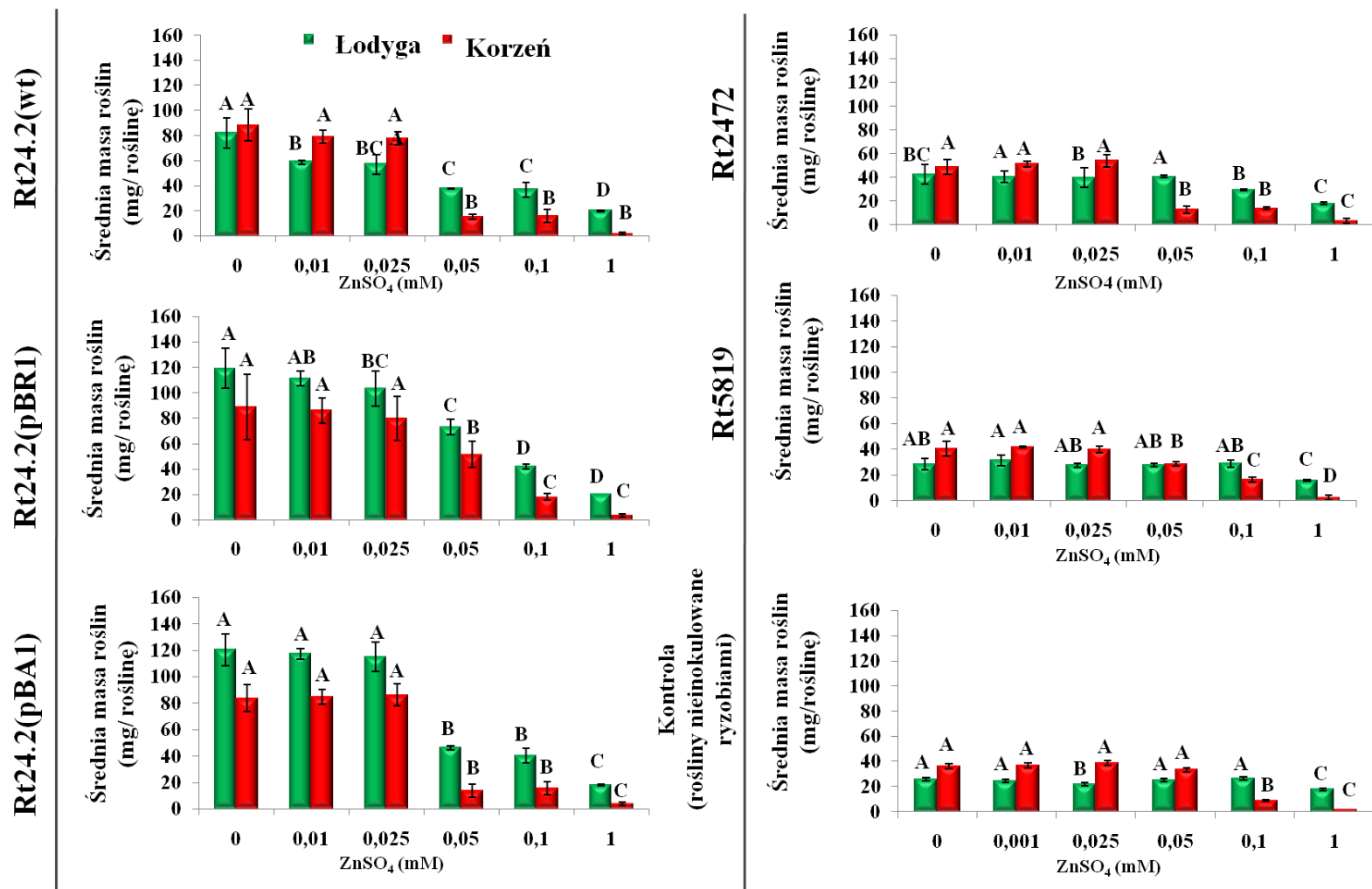
Badania wykazały, że w warunkach kontrolnych szczepy Rt24.2, Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1) bardzo efektywnie zakażały koniczynę oraz stymulowały rośliny do wykształcania brodawek korzeniowych. Jednocześnie zaobserwowano niską wydajność nawiązywania symbiozy pomiędzy koniczyną a szczepami Rt5819 i Rt2472, co miało swoje odzwierciedlenie w niewielkiej liczbie zakażonych roślin oraz tworzonych brodawek, które były nieefektywne w wiązaniu azotu atmosferycznego (brodawki małe, zdeformowane i białe, co wskazywało na brak leghemoglobiny) (Ryc. 38 A i B; Ryc. 40).

Ustalono, że niskie stężenia jonów Zn^{2+} (0,01 oraz 0,025 mM) nie wpływały znacząco na efektywność infekcji korzeni gospodarza oraz tworzenie brodawek korzeniowych w przypadku wszystkich testowanych szczepów. Natomiast wyższe stężenia metalu (0,05 oraz 0,1 mM) wpływały negatywnie na proces symbiozy. W obecności 0,1 mM $ZnSO_4$ zaobserwowano, że tylko 50% roślin inokulowanych szczepami Rt24.2, Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1) tworzyło brodawki korzeniowe. Stwierdzono również, że tylko 20% roślin inokulowanych mutantami defektywnymi w syntezie EPS wykształciło brodawki. Dodatkowo wykazano, że w obecności wyższych stężeń $ZnSO_4$ na korzeniach koniczyny powstawało znacząco mniej brodawek w przypadku wszystkich badanych szczepów w porównaniu do warunków kontrolnych. Natomiast stężenie 1 mM $ZnSO_4$ powodowało całkowite zahamowanie procesu nawiązywania symbiozy pomiędzy badanymi szczepami *R. leguminosarum* bv. *trifolii* a koniczyną [Kopycińska i in., 2018].



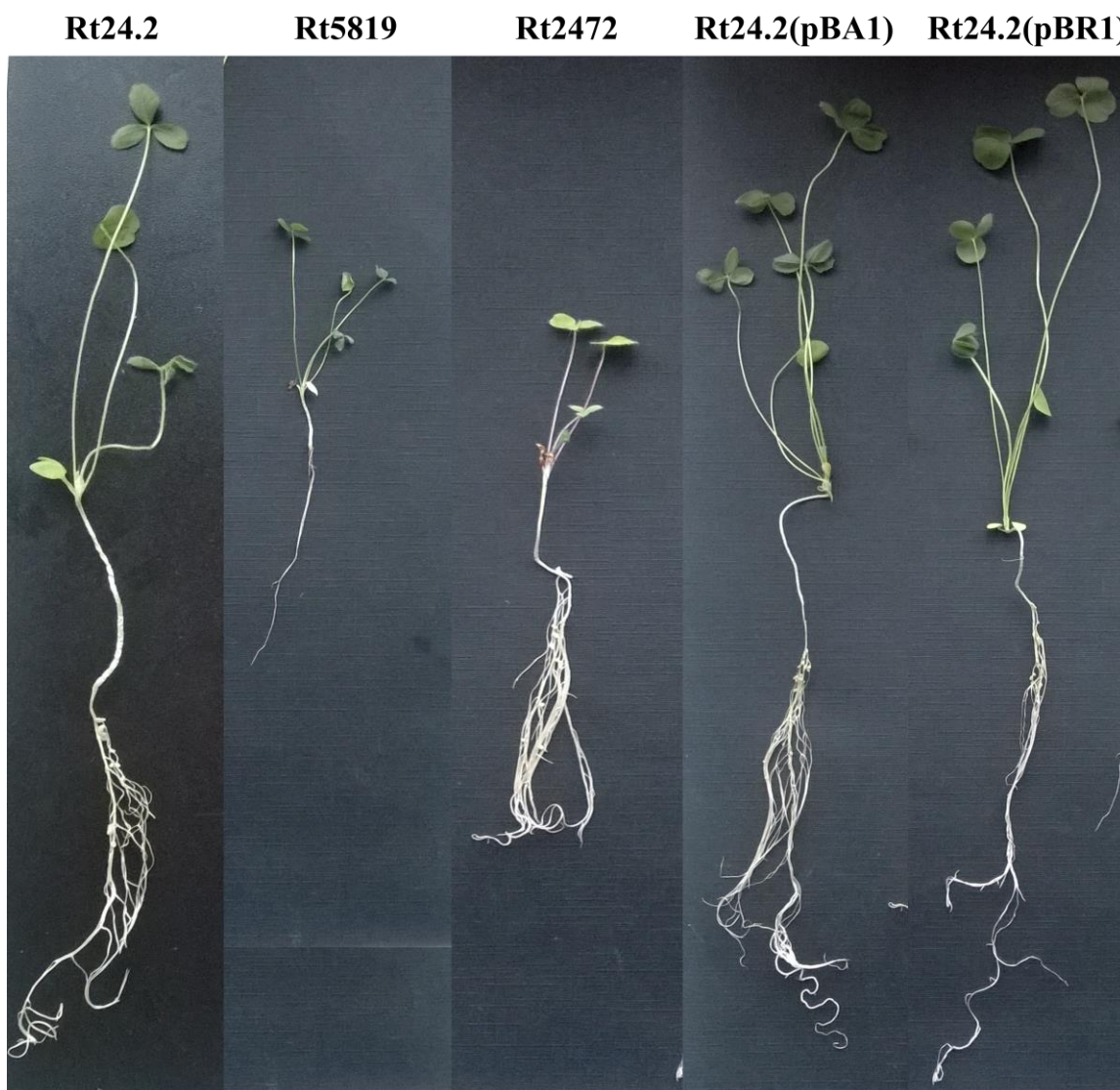
Ryc. 38 Wpływ jonów Zn²⁺ na efektywność infekcji korzeni koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*) i indukowania na nich brodawek przez bakterie *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

Obecność jonów Zn^{2+} wpływała również na wygląd zakażonych roślin koniczyny. Rośliny rosnące w warunkach stresowych były mniejsze, miały żółte liście, a świeża masa łodyg oraz korzeni była znacząco niższa niż roślin hodowanych w warunkach kontrolnych (Ryc. 39). Wraz ze wzrostem stosowanych stężeń jonów Zn^{2+} zaobserwowano spadek masy roślin, jednakże efekt ten był mniej widoczny w przypadku koniczyny inokulowanej szczepami Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1) w porównaniu do roślin inokulowanych mutantami Rt2472 i Rt5819. Różnice w wyglądzie roślin były również widoczne w warunkach kontrolnych. W tym przypadku rośliny zakażone szczepami produkującymi zwiększoną ilość EPS były bardziej zielone, wyższe, z wieloma prawidłowo wykształconymi brodawkami (tj. dużymi o różowym kolorze, świadczącym o obecności leghemoglobiny), co wskazywało na ich efektywność w wiązaniu azotu.



Ryc. 39 Wpływ jonów Zn^{2+} na świeżą masę lodyg oraz korzeni roślin koniczyny inokulowanych szczepami *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Średnią masę lodyg i korzeni podano dla 5-tygodniowych roślin koniczyny (po 30 roślin na dany wariant). Istotnie statystycznie różnice pomiędzy stężeniami $ZnSO_4$ dla mierzonych parametrów oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$; ANOVA jednoczynnikowa; test Tukeya).

Podsumowując, z przeprowadzonych analiz wynika, że obecność jonów cynku negatywnie wpływa na symbiotyczne interakcje zachodzące pomiędzy bakteriami *R. leguminosarum* bv. *trifolii* a koniczyną, a także że szczepy Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1), produkujące zwiększone ilości EPS, lepiej adaptują się do warunków stresowych w porównaniu do mutantów defektywnych w syntezie tego polisacharydu (Rt5819 i Rt2472) [Kopycińska i in., 2018].

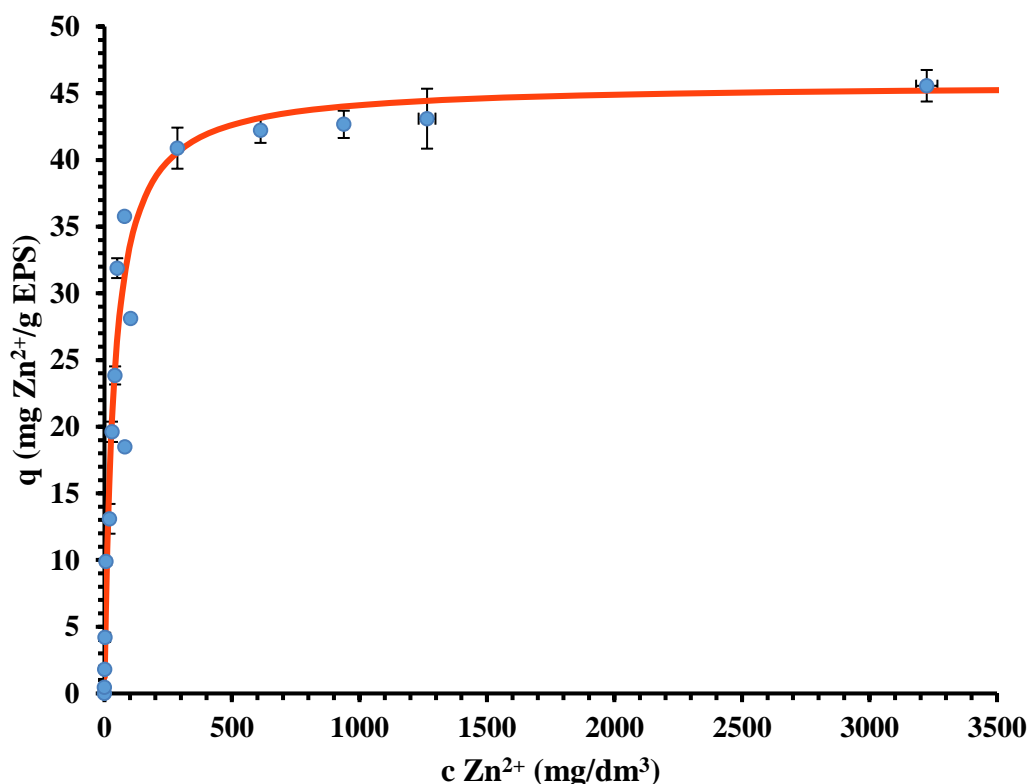


Ryc. 40 Pokrój 5-tygodniowych roślin koniczyny łąkowej inokulowanych szczepami *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, hodowanych w warunkach kontrolnych.

6.4. Charakterystyka procesu sorpcji jonów Zn^{2+} przez EPS wyizolowany z hodowli szczepu Rt24. *R. leguminosarum* bv. *trifolii*

W celu określenia właściwości sorpcyjnych EPS produkowanego przez bakterie *R. leguminosarum* bv. *trifolii* w stosunku do jonów cynku, wykonano dwuetapowe doświadczenie, obejmujące uzyskanie czystego preparatu EPS syntetyzowanego przez szczep Rt24.2, a następnie wyznaczenie izoterm adsorpcji jonów Zn^{2+} . Zaadsorbowaną ilość jonów cynku określano stosując absorpcyjną spektrometrię atomową (ASA). Pomiary wykonano dla szeregu stężeń $ZnCl_2$: 0 ; 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 5; 10; 15; 20 oraz 50 mM.

Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono zależność stężenia jonów cynku zaadsorbowanych przez EPS od stężenia równowagowego jonów cynku w roztworze (Ryc. 41).

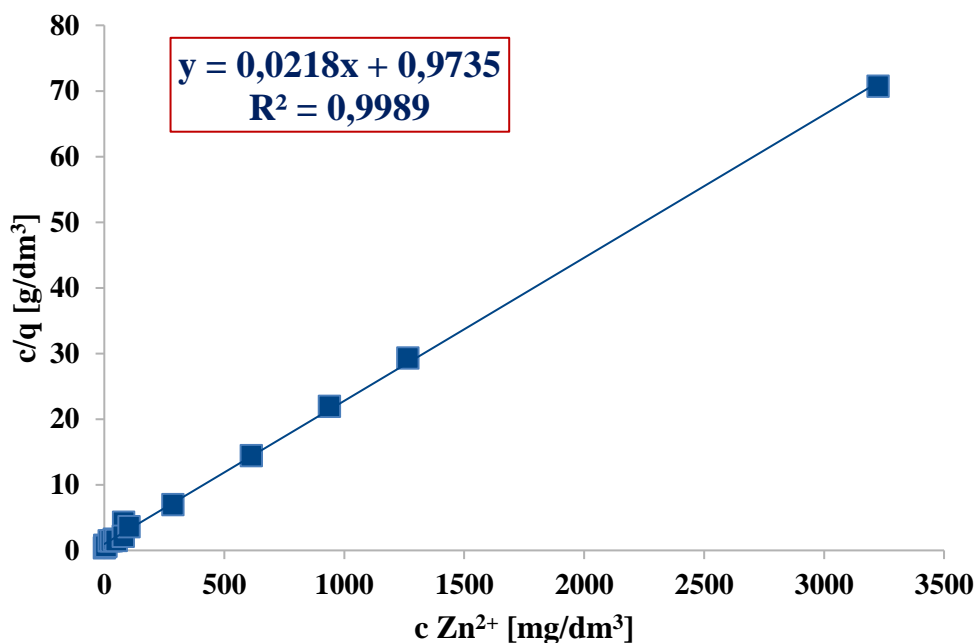


Ryc. 41 Wykres zależności stężenia jonów Zn^{2+} zaadsorbowanych przez EPS wyizolowany ze szczepu Rt24.2 *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (q) od stężenia równowagowego w roztworze (c).

Korzystając ze zlinearyzowanego równania izoterm adsorpcji Langmuira wyznaczono zależność ilorazu stężenia równowagowego Zn^{2+} (c) i stężenia adsorbentu

w fazie stałej adsorbentu (q) od stężenia równowagowego jonów cynku (c) (Ryc. 42). Była ona opisana równaniem:

$$y = 0,0218x + 0,9735$$



Ryc. 42 Wykres zależności ilarazu stężenia równowagowego Zn^{2+} (c) i stężenia jonów Zn^{2+} zaadsorbowanych na powierzchni EPS (q) od stężenia równowagowego jonów cynku w roztworze (c).

Pojemność monowarstwy (q_{max}) obliczona w oparciu o to równanie wynosiła 45,7 mg Zn^{2+} na 1 g EPS (tj. 0.67 mM Zn^{2+} na 1 g EPS), natomiast stała równowagi procesu sorpcji była równa 0,0225 dm³/g. Wysoka pojemność monowarstwy EPS wyizolowanego z bakterii *R. legumnosarum* bv. *trifolii* stwarza możliwość potencjalnego zastosowania tego polimeru w bioremediacji metali ciężkich.

7. Dyskusja

Symbioza roślin bobowatych (*Fabaceae*) z bakteriami symbiotycznymi z rodziny *Rhizobiaceae* jest istotnym dla rolnictwa procesem, zachodzącym w przyrodzie, ze względu na dużą wartość użytkową roślin biorących w nim udział. Rośliny te stanowią bardzo bogate w białko źródło pożywienia (np. groch, fasola), pasz dla zwierząt (np. koniczyna, lucerna), służą jako tzw. zielone nawozy, a także znajdują zastosowanie w przemyśle, będąc źródłem naturalnych gum, garbników oraz drewna (np. robinia, akacja) [Vessey, 2003; Hinsinger i in., 2009]. Symbioza roślin bobowatych z bakteriami glebowymi, zwanymi ogólnie ryzobiami, pozwala im na wzrost w warunkach niedoboru azotu. Ryzobia to Gram-ujemne pałeczki, które mogą występować w przyrodzie w dwóch formach: wolnożyjącej saprofitycznej lub w symbiotycznej, zasiedlającej specjalne struktury, zwane brodawkami korzeniowymi, wytworzone przez korzenie gospodarza roślinnego. Wewnątrz brodawek ryzobia przeprowadzają proces redukcji azotu atmosferycznego do amoniaku, który jest dalej przekształcany w formę amonową, łatwo dostępną dla roślin [Oldroyd i in., 2011; Janczarek i in., 2014]. Bardzo ważnym czynnikiem biorącym udział w nawiązywaniu efektywnej symbiozy jest egzopolisacharyd (EPS), produkowany przez bakterie w dużych ilościach i wydzielany na zewnątrz komórki. W procesie symbiozy ten heteropolimer pełni rolę cząsteczki sygnałnej oraz uczestniczy w adhezji bakterii do korzeni roślin, tworzeniu nici infekcyjnych oraz zasiedlaniu brodawek korzeniowych [Broughton i in., 2003; Janczarek, 2011]. Ponadto, EPS chroni bakterie przed niekorzystnymi warunkami środowiska, takimi jak susza czy zasolenie.

Obecnie bardzo duży problem w gospodarce rolnej stanowią zanieczyszczenia dostające się do środowiska glebowego. Ze względu na szybko rozwijający się przemysł oraz stale postępującą urbanizację, do gleby dostaje się duża ilość toksycznych substancji, w tym jonów metali ciężkich. Zbyt wysokie stężenia metali ciężkich negatywnie wpływają na rośliny oraz mikroorganizmy ryzosfery, zaburzając ich prawidłowy rozwój oraz przebieg procesów metabolicznych zachodzących w komórkach. Dotychczas nie przeprowadzono kompleksowych badań dotyczących wpływu metali ciężkich na właściwości fenotypowe ryzobiów oraz przebieg ich symbiozy z roślinami bobowatymi. Dodatkowo, na szczególną uwagę zasługuje rola, jaką może pełnić EPS w ochronie ryzobiów przed stresem wywołanym obecnością jonów tych metali w glebie oraz jego potencjalne zastosowanie w bioremediacji.

Pierwszym etapem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy było określenie wpływu jonów cynku na własności fenotypowe szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* różniących się poziomem syntezy EPS. Wcześniej wykazano [Cieśla i in., 2016], że najlepszym podłożem do optymalnego wzrostu badanych bakterii i syntezy EPS jest podłoże 79CA. Jest ono bogate w łatwo dostępne oraz przyswajalne dla bakterii związki węgla oraz azotu, co sprzyja intensywnym podziałom komórkowym oraz produkcji EPS przez ryzobia. Na podstawie wyników kolejnych badań [Kopycińska i in., 2018] stwierdzono, że obecność w środowisku wzrostu jonów Zn^{2+} negatywnie wpływała na wzrost szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Dwa szczepy, u których synteza EPS była znacząco zredukowana (Rt2472), a nawet całkowicie zablokowana (Rt5819), charakteryzowały się gorszym wzrostem niż szczep dziki Rt24.2, zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w obecności $ZnSO_4$. Co więcej, ich wrażliwość na jony cynku również była istotnie wyższa w porównaniu do pozostałych szczepów. Natomiast szczepy Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1), u których ilość produkowanego EPS była wyższa niż w przypadku szczepu Rt24.2 (~150%), cechowały się lepszym wzrostem zarówno w obecności, jak i przy braku jonów cynku w pożywce (Ryc. 20). Dodatkowo, określenie przeżywalności badanych szczepów w warunkach stresowych wykazało, że mikroorganizmy te, pomimo zahamowania wzrostu i podziałów komórkowych w stężeniach $ZnSO_4$ tak niskich jak 0,5 mM, są w stanie przetrwać w obecności wyższych stężeń jonów cynku (Tab. 5). Otrzymane wyniki sugerują, że odporność szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* jest w znacznym stopniu zależy od ilości syntetyzowanego EPS. Podobne zależności dotyczące hamowania wzrostu bakterii, w tym ryzobiów, otrzymali inni autorzy [Smith, 1997; Chaudri i in., 2000; Khan i Scullion, 2002; Broos i in., 2004; Macdonald i in., 2011]. Jak podają McGrath i wsp. [1995], stężenie jonów cynku w glebie wynoszące 200 mg kg^{-1} powodowało około 1000-krotny spadek liczebności bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Według Lakzian i in., [2002] liczebność komórek *R. leguminosarum* bv. *viciae* w glebie niezanieczyszczonej jonami cynku wynosiła 105 komórek na 1 g gleby i wyraźnie spadała (ze 102 do 7 komórek bakterii na 1 g gleby) wraz ze zwiększeniem się zawartości Zn^{2+} (z 50 do 400 mg kg^{-1}). Co ciekawe, Chaudri i wsp. [2008] nie zaobserwowali znaczącego, negatywnego wpływu jonów cynku na liczebność populacji ryzobiów nawet po 11 latach bytowania tych bakterii w glebie silnie zanieczyszczonej tym pierwiastkiem. Ponadto, Delorme i in. [2003] na podstawie prowadzonych badań ustalili, że cynk działa pozytywnie na wzrost bioróżnorodności mikroorganizmów w glebie. Izolaty bakteryjne uzyskane z gleby zanieczyszczonej Zn^{2+}

były bardziej zróżnicowane pod względem fenotypowym oraz bardziej tolerancyjne na obecność jonów cynku (MIC = 93 μM , ang. minimum inhibitory concentration, MIC) niż bakterie wyizolowane z gleby kontrolnej (MIC = 42 μM). Rozbieżności wyników prezentowanych przez różnych autorów pokazują, że ocena wpływu jonów cynku, a także innych metali ciężkich, na ryzobia jest niezwykle trudna, a toksyczność tego metalu zależy od wielu czynników środowiskowych, takich jak stężenie i biodostępność metalu a także wartość pH, temperatura czy wilgotność środowiska wzrostu.

Ryzobia są organizmami zdolnymi do syntezy i sekrecji poza komórkę dużej ilości EPS. Jest to polimer o charakterze kwasowym, który tworzy najbardziej zewnętrzną warstwę otaczającą komórkę [Ivashina i Ksenzenko, 2012; Margaret-Oliver i in., 2012; Janczarek i in., 2015; Lopez-Baena i in., 2016]. Z tego względu stanowi on pierwszą barierą chroniącą ryzobia, która uczestniczy w sekwestracji jonów metali ciężkich, aby nie dostały się do wnętrza komórki. Wydajność procesu wiązania jonów metali przez EPS jest ograniczona ilością dostępnych miejsc wiążących w cząsteczce polimeru, dlatego też przy zbyt wysokich stężeniach pierwiastków toksycznych następuje wysycenie EPS, a nadmiar jonów metali dostaje się do wnętrza komórki [Pereira i in., 2006]. Dlatego też w niniejszej pracy postanowiono zbadać wpływ jonów cynku na produkcję EPS, z podziałem na frakcję LMW oraz HMW, przez szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, a także określić maksymalną ilość jonów Zn^{2+} , jaka może być zaadsorbowana przez EPS wyizolowany ze szczepu dzikiego Rt24.2. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że obecność jonów cynku w środowisku wzrostu wpływa na zwiększenie syntezy EPS, zarówno formy HMW, jak i LMW (Ryc. 21), ale nie wpływa istotnie na proporcje między nimi (Ryc. 22). Otrzymane wyniki są zgodne z danymi podawanymi przez innych autorów. Foster i wsp. [2000] pokazali, że zarówno komórki, jak i EPS *R. etli* M4 (bakterii blisko spokrewnionej z analizowanym w tej pracy szczepem Rt24.2) są w stanie wiązać duże ilości różnych jonów metali ciężkich, w tym jonów cynku. Zarówno komórki *R. etli* M4, jak i EPS wiązały odpowiednio 20% i 12% jonów Zn^{2+} , których stężenie w środowisku wzrostu wynosiło 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Również Redmile-Gordon i Chen [2017] potwierdzili, że obecność cynku w glebie stymuluje produkcję EPS przez mikroorganizmy. Wykazali oni, że całkowita frakcja EPS produkowana przez mikroorganizmy glebowe zwiększyła się 4,5-krotnie w obecności jonów Zn^{2+} (300 $\mu\text{g Zn}^{2+}$ na 1 g gleby) w porównaniu do warunków kontrolnych. W badaniach nad wpływem jonów cynku na produkcję EPS przez *Bacillus vallismortis*, Ding i in. [2018] wykazali, że ilość produkowanego EPS zwiększała się (z 50

do 100 mg EPS na g VSS, ang. volatile suspended solids) w obecności jonów Zn^{2+} (0 - 12 mg L⁻¹).

Metale ciężkie są powszechnie stosowane w różnych procesach przemysłowych (m.in. galwanizacja, spawanie elektroniczne, górnictwo), podczas których są uwalniane do środowiska [Gadd, 2004]. Ze względu na to, że nawet śladowe ilości metali ciężkich mogą powodować poważne szkody w środowisku wodnym czy lądowym, istnieje kilka metod usuwania tych pierwiastków, w tym procesy strącania, metody elektrochemiczne, układy membranowe czy żywice chelatujące [Fleming i Trevors, 1989; Ratte, 2009; Volesky, 2007]. Alternatywą dla konwencjonalnych metod, które są często drogie, nieefektywne i niebezpieczne, jest biosorpcja metali ciężkich oparta na zdolnościach sorpcyjnych materiałów biologicznych [Gadd, 2009; Park i in., 2007; Vieira i Volesky, 2010]. Wśród licznych biosorbentów, bakteryjne EPS są skuteczne i z powodzeniem stosowane do usuwania metali ciężkich ze środowiska [Comte i in., 2006; Loaec i in., 1998; Loaec i in., 1997; Moppert i in., 2009]. Zalety bakteryjnych EPS, w porównaniu do polimerów produkowanych przez rośliny czy glony są związane z ich właściwościami chemicznymi i fizycznymi, z obecnością w ich strukturze licznych jonizowanych grup funkcyjnych (np. karboksylowych, octanowych, hydroksylowych, aminowych, fosforanowych), które stanowią potencjalne miejsca sekwestracji metali [Liu i Fang, 2002; Guezennec, 2002]. Interakcje pomiędzy kationem metalu a powierzchniowymi grupami funkcyjnymi opierają się na fizycznej sorpcji, wymianie jonowej, kompleksowaniu i/lub wytrącaniu. Skuteczność biosorpcji zależy od wielu czynników zewnętrznych, takich jak pH roztworu i stężenie metalu [Gadd i White, 1989]. Jak ustalono dla EPS szczepów Rt24.2 oraz *S. meliloti* 1021, wartość pH środowiska wzrostu znacznie wpływa na liczbę zdysocjowanych grup karboksylowych w tych polimerach. Największa ilość grup COO⁻ występuje w przedziale wartości pH od 4 do 7 [Szewczuk-Karpisz i in., 2014; Cieśla i in., 2016]. Wpływa to na wysoką zdolność wiązania metali przez EPS. W niniejszej pracy zbadano zdolność sorpcji jonów cynku przez EPS wyizolowany ze szczepu Rt24.2 *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono, że pojemność monowarstwy (q_{max}), czyli maksymalna ilość jonów Zn^{2+} jaka może być zaadsorbowana przez 1 g EPS wynosi 45,72 mg Zn^{2+} (0,67 mM Zn^{2+} na 1 g EPS)(Ryc. 42). Jak podają źródła literaturowe EPS jest polimerem pełniącym w głównej mierze funkcję ochronną, zarówno u ryzobiów, jak i u innych mikroorganizmów zdolnych do produkcji tego polisacharydu [Cunningham i Munns, 1984; Eaglesham i in., 1987; Xavier i in., 1998; Xavier i in., 2007; Elsheikh i Wood, 1990; De Philippis i Vincenzini, 1998;

Corzo i in., 1994; Santamaría i in., 2003; Diaz -Marrero i in., 2004; Foster i in., 2000]. Biosorpcja metali ciężkich zachodzi poprzez interakcję ujemnie naładowanych cząsteczek EPS z posiadającymi ładunek dodatni jonami metali [Gupta i Diwan, 2016]. Bardzo dobrymi właściwościami sorpcyjnymi charakteryzują się EPS izolowane z bakterii morskich. Zawierają one duże ilości kwasów uronowych, nadających im makrocząsteczkom silnie anionowy charakter [Gupta i Diwan, 2016]. Jak wykazali Bhaskar i in. [2006], EPS uzyskany z *Marinobacter* sp. posiadał bardzo dobre zdolności do wiązania jonów Cu^{2+} i Pb^{2+} . Ponadto w środowisku o pH obojętnym jony miedzi były silniej sorbowane przez EPS niż jony ołowiu. Iyer i wsp. [2004, 2005] wykazali, że EPS produkowany przez *Enterobacter cloacae* wydajnie cheltował jony kadmu oraz miedzi. Stwierdzili, że EPS *E. cloacae* wiązał 65% oraz 20% odpowiednio jonów Cd^{2+} i Cu^{2+} , których początkowe stężenie wynosiło 100 ppm. Wykazano natomiast, że EPS tej bakterii w niewielkim stopniu adsorbował jony kobaltu (wydajność 8%) [Iver i in., 2005]. Ponadto zaobserwowano, że *E. cloacae*, dzięki obecności EPS, charakteryzował się zwiększoną tolerancją oraz pobieraniem chromu ze środowiska. EPS oraz komórki *E. cloacae* wspólnie sekwestrowały 75% jonów chromu przy początkowym stężeniu tego metalu wynoszącym 100 ppm. Co więcej, w doświadczeniu tym wykazano, że wyizolowany EPS miał większą zdolność wiązania jonów Cr^{6+} w porównaniu do komórek bakterii [Iver i in., 2004]. Jak wykazali Morillo-Pérez i in. [2008] maksymalna biosorpcja jonów Zn^{2+} przez EPS *Paenibacillus jamilae* wynosiła 15,73 mg Zn^{2+} na 1 g EPS. Jak ustalono dla szczepu *Rhizobium radiobacter* F2 [Wang i in., 2013], EPS wydajnie wiązał jony ołowiu oraz cynku. Autorzy wykazali, że optymalne wartości pH biosorpcji dla tego polimeru wynosiły 5,0 dla Pb(II) oraz 6,0 dla Zn(II), zaś pojemność monowarstwy (q_{max}) w tych warunkach była równa 461,56 mg g^{-1} oraz 169,58 mg g^{-1} odpowiednio dla jonów Pb^{2+} i Zn^{2+} . Można więc zauważyć, że bakteryjne zewnątrzkomórkowe polisacharydy wykazują różną zdolność do wiązania jonów metali ciężkich, zależnie od rodzaju bakterii, struktury polimeru, rodzaju jonu metalu oraz warunków przebiegu procesu biosorpcji. W niniejszej rozprawie ustalono, że EPS uzyskany ze szczepu Rt24.2 *R. leguminosarum* bv. *trifolii* posiadał dobre właściwości sorpcyjne w stosunku do jonów cynku i może być potencjalnie stosowany w remediacji, jako polimer wiążący jony Zn^{2+} z gleby.

R. leguminosarum bv. *trifolii* oprócz EPS syntetyzuje również inne polisacharydy powierzchniowe, w tym polisacharydy będące składnikami błony zewnętrznej (LPS), polimery ściśle związane z komórką bakteryjną (CPS, GPS, NPS), a także cząsteczki cukrowe znajdujące się w przestrzeni peryplazmatycznej (CG) [Zevenhuizen i van

Neerven, 1983; Choma i Komaniecka, 2011; Laus i in., 2006; Venkatachalam i in., 2013; Russo i in., 2015]. Pełnią one ważną rolę podczas symbiozy ryzobiów z gospodarzem roślinnym, ale również wykazują funkcję ochronną, jak np. LPS czy cykliczne β -glukany. Jednakże, jak podaje Williams i wsp. [2008], ilość syntetyzowanych polisacharydów powierzchniowych stanowi jedynie około 60% ilości EPS. W pewnych warunkach wzrostu również CG są wydzielane przez ryzobia do środowiska [Geiger i in., 1991; Venkatachalam i in., 2013], lecz ich ilość jest niewielka w stosunku do ilości EPS. W niniejszej rozprawie określono wpływ obecności jonów Zn^{2+} na produkcję wybranych polisacharydów ryzobiowych: CPS, GPS oraz CG. Zaobserwowano, że jony cynku pozytywnie wpływały na produkcję analizowanych polimerów (Ryc. 23), których ilość stanowiła jednak jedynie niewielki procent syntetyzowanego w tych samych warunkach EPS (dla szczepów Rt24.2, Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1) polisacharydy te nie przekraczają 35% ilości EPS). Wyjątek stanowił szczep Rt2472, który produkował znacząco więcej GPS oraz CPS w stosunku do szczepu dzikiego, co wynikało z mutacji w genie *rosR*. Jak wcześniej wykazano [Rachwał i in., 2015], białko RosR reguluje ekspresję genów związanych z syntezą oraz sekrecją polisacharydów powierzchniowych. Podobne wyniki uzyskano dla szczepu HH103 *E. fredii* z mutacją w genie *mucR*. W przypadku tej bakterii mutacja skutkowała znaczącym wzrostem produkcji CG oraz spadkiem syntezy EPS [Acosta-Jurado i in., 2016]. Niewiele jest informacji na temat wpływu jonów metali ciężkich na produkcję CPS, GPS oraz CG u bakterii. Scott i wsp. [1986] wykazali, że CPS produkowany przez *Pseudomonas putida* lepiej adsorbował ze środowiska kadm (wydajność sorpcji w zakresie stężenia Cd^{2+} : 0,5 - 1,5 mg L⁻¹ - 100%, 2,5 mg L⁻¹ - 98% oraz 100 mg L⁻¹ - 29%) niż *P. cruciviae*, nie tworzący CPS (0,5 - 2,5 mg L⁻¹ - 86 - 79% oraz 100 mg L⁻¹ - 19%). Zdolność sorpcji metali przez CPS wynika przede wszystkim z podobieństwa strukturalnego między tym polimerem a EPS. Jak wykazano dla *R. leguminosarum*, CPS jest polisacharydem posiadającym bardzo podobną lub nawet identyczną strukturę do EPS [Skorupska i in., 2006; Król i in., 2007; Ghosh i Maiti, 2016]. W niniejszej rozprawie dowiedziono, że jony cynku mają pozytywny wpływ na syntezę CPS, GPS oraz CG u *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, jednakże sumaryczna ilość tych polimerów jest niewielka, co potwierdza, że EPS (a dokładniej frakcja HMW EPS) odgrywa dominującą rolę w ochronie *R. leguminosarum* bv. *trifolii* w warunkach stresu cynkowego.

Mikroorganizmy są zdolne w określonych warunkach do tworzenia biofilmu, czyli specjalnej struktury chroniącej je przed stresem środowiskowym [Flemming i Wingender,

2001; Singh i in., 2006; Ahimou i in., 2007]. EPS stanowi jeden z kluczowych elementów tworzących strukturę przestrzenną macierzy biofilmu [Rinaudi i Giordano, 2010; Bogino i in., 2013]. Bierze on udział w początkowych etapach tworzenia biofilmu, w przyłączaniu się komórek do różnych powierzchni biotycznych oraz abiotycznych, a także chroni bakterie przed szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi oraz odwodnieniem. Powstawanie biofilmu w środowisku naturalnym oraz przemysłowym pozwala mikroorganizmom rozwinąć odporność na bakteriofagi, chemiczne biocydy, antybiotyki czy odpowiedź immunologiczną gospodarza [Costerton i in., 1999; Vu i in., 2009]. Z tego względu postanowiono sprawdzić w jaki sposób obecność jonów cynku w środowisku wzrostu bakterii wpływa na tworzenie biofilmu przez *R. leguminosarum* bv. *trifoli*. Uzyskane wyniki zostały opublikowane [Kopycińska i in., 2018]. Przeprowadzone badania wykazały, że jony Zn^{2+} powodują u badanych szczepów bakteryjnych wzrost ilości tworzonego biofilmu, nawet u szczepów posiadających mutację w genach związanych z syntezą EPS (Rt2472 oraz Rt5189)(Ryc. 24). Dowodzi to, że pomimo, iż EPS stanowi kluczowy element macierzy biofilmu, również inne składniki komórkowe są zaangażowane w proces tworzenia tej struktury. Szczep Rt5819, który nie syntetyzuje EPS tworzył płaski, poprzerwany, nieregularny biofilm o niewielkiej powierzchni. Podobne wyniki uzyskano dla mutantu *pssA* *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Bakteria ta nie była zdolna do tworzenia mikrokoloni oraz bardziej złożonej struktury biofilmu [Russo i in., 2006; Williams i in., 2008]. Natomiast biofilm tworzony przez szczepy produkujące EPS w warunkach stresowych był grubszy, posiadał wysoko zorganizowaną strukturę i pokrywał większą powierzchnię podłoża, na którym się formował (Ryc. 25, Tab. 6). W innych doświadczeniach realizowanych w ramach niniejszej rozprawy wykazano, że jony Zn^{2+} pozytywnie wpływają na produkcję EPS u *R. leguminosarum* bv. *trifolii* co mogło rzutować na ilość tworzonego biofilmu. Podobne doniesienia podali Amya-Gomez i wsp. [2015]. Wykazali oni, że wysokie stężenie żelaza hamuje ruchliwość komórek *E. melilitu* 1021, ale sprzyja rozwojowi biofilmu na powierzchniach abiotycznych. Inni autorzy pokazali, że jony Cd^{2+} pozytywnie wpływały na tworzenie biofilmu przez bakterię symbiotyczną *R. alamii* [Schue i in., 2011]. Giovanella i wsp. [2017] potwierdzili zwiększone tworzenie biofilmu przez *Pseudomonas* sp. w obecności jonów rtęci, a Harrison i wsp. [2004] dowiedli, że wzrost stężenia jonów Cd^{2+} pozytywnie koreluje z ilością tworzonego biofilmu u *R. alamii* YAS34. Badania te pokazują, że metale mogą wpływać na różne etapy tworzenia i rozwoju biofilmu, na przyczepność komórek do powierzchni abiotycznych i biotycznych, a także powodować zmiany strukturalne

w macierzy biofilmu [Koechler i in., 2015]. Wyniki badań przeprowadzonych w niniejszej pracy potwierdzają więc, że komórki bakteryjne ekspozycje na działanie metali ciężkich na ogół reagują indukcją procesów adhezji, a w konsekwencji tworzeniem biofilmu, zaś główną rolę w tym procesie odrywa EPS.

Skład i struktura składników budujących otoczki komórkowe ryzobiów (np. EPS), mogą wpływać na właściwości fizykochemiczne ich powierzchni, które odgrywają istotną rolę w różnych procesach fizjologicznych, takich jak: wzrost i podziały komórek, adhezja do powierzchni biotycznych oraz abiotycznych, a także agregacja i ruchliwość komórek [Mozes i in., 1988; Cieśla i in., 2016]. Wzrost tworzenia biofilmu oraz produkcji EPS u *R. leguminosarum* bv. *trifolii* w odpowiedzi na obecność w środowisku wzrostu jonów cynku sugerował, że metal ten może również powodować zmiany w stopniu agregacji komórek ryzobiów. Istnieją dwa typy agregacji: autoagregacja, określana jako adhezja tego samego gatunku bakterii oraz koagregacja, czyli adhezja co najmniej dwóch różnych gatunków bakterii [Ramalingam i in., 2013]. Koagregacja jest wysoce specyficznym procesem adhezji, zachodzącym poprzez interakcję adhezyn znajdujących się na jednej komórce a komplementarnym receptorem na drugiej. Natomiast oddziaływania autoagregacyjne są silniejsze niż w przypadku koagregacji i zależą przede wszystkim od właściwości fizykochemicznych komórek i ich hydrofobowości. Wraz ze wzrostem hydrofobowości rosną zdolności agregacyjne oraz adhezyjne komórek, co umożliwia bakteriom przyleganie do abiotycznych i biotycznych powierzchni, prowadzące do powstawania biofilmu [Basson i in., 2008; Ramalingam, 2013; Pal i Paul, 2008; Prabhakaran, 2016]. Badania prezentowane w niniejszej rozprawie, dotyczące wpływu jonów Zn^{2+} na stopień agregacji komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ujawniły, że metal ten zwiększa autoagregację komórek wszystkich badanych szczepów. Podobne wyniki były uzyskane dla *Xylella fastidiosa* przy zastosowaniu nieinhibitorujących stężeń manganu i cynku [Navarrete i in., 2014; Conibe i in., 2013]. W niniejszej rozprawie wykazano, że spośród badanych szczepów komórki szczepu Rt2472 w największym stopniu ulegają agregacji. Wynika to z faktu, że białko RosR, w którego genie mutację posiada szczep Rt2472, wpływa na poziom syntezy oraz sekrecję białek podobnych do kadheryn oraz białek autoagregacji (RapA1), które są zaangażowane w adhezję [Rachwał i in., 2015]. Odpowiedź ryzobiów na stres cynkowy, który skutkuje powstawaniem biofilmu, musi powodować również zwiększenie agregacji komórek oraz zwiększenie produkcji EPS. Potwierdzają to badania przeprowadzone w niniejszej dysertacji. Szczepy Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1) nadprodukuje EPS, charakteryzowały się w warunkach stresowych

zwiększoną syntezą EPS i wyższym stopniem autoagregacji, co miało odzwierciedlenie w ilości tworzonego biofilmu.

Jak wcześniej wspomniano, komponenty otoczki komórkowej bakterii wpływają na różne procesy fizjologiczne, m.in. na ruchliwość bakterii. Cecha ta odgrywa ważną rolę w kolonizacji nowych środowisk przez mikroorganizmy. Wyróżnia się dwa główne typy ruchliwości, tzw. „swimming” oraz „swarming”. Ruchliwość typu „swimming” charakteryzuje poruszanie się bakterii w środowiskach płynnych w odpowiedzi na różnego rodzaju bodźce zewnętrzne. Migracja typu „swarming” jest zupełnie odmiennym sposobem poruszania się bakterii, angażującym całą populację kolonii bakteryjnej. Komórki wegetatywne rozpoczynają proces różnicowania w komórki wielojądrowe, o wydłużonym kształcie (ang. swarm cells) z licznymi flagellami, a ich szybkiemu przemieszczaniu się na krawędzi kolonii towarzyszy wzrost komórek w obrębie kolonii, co powoduje szybką kolonizację dostępnego obszaru. Ten typ migracji nie jest ani reakcją głodową populacji bakteryjnej, ani obowiązkowym etapem rozwoju, ale skoordynowaną i odwracalną zmianą zachowania w odpowiedzi na czynniki środowiskowe [Senesi i in., 2010]. Taka zbiorowa aktywność populacji ma kilka zalet w stosunku do aktywności pojedynczych komórek: pozwala bakteriom na migrację w kierunku składników odżywczych [Wei i in., 2011], umożliwia oddalenie się od repelentów [Macfarlane, i in., 2001], pozwala chronić się przed działaniem antybiotyków [Overhage i in., 2008; Butler i in., 2010] oraz uniknąć konkurencji pomiędzy komórkami [Taylor i Buckling, 2010], a także bardziej efektywnie zaangażować się w procesy „współpracy”, takie jak tworzenie biofilmu [Blair i in., 2008] oraz kolonizacja roślin [Ghelardi i in., 2007]. Zjawisko migracji typu „swarming” stwierdzono u wielu rodzajów bakterii, w tym *Aeromonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas* [Daniels i in., 2004] oraz u gatunków ryzobiowych takich jak: *Ensifer meliloti* [Soto i in., 2002; Nogales i in., 2010, 2012], *Rhizobium etli* [Daniels i in., 2002; Braeken i in., 2008] oraz *R. leguminosarum* [Tambalo i in., 2010]. Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie pokazały, że szybszą migracją, zarówno w podłożu stałym (migracja typu „swarming”) jak i półpłynnym (migracja typu „swimming”), charakteryzowały się szczepy produkujące EPS. Ponadto, zaobserwowano, że obecność jonów cynku negatywnie wpływała na ruchliwość *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Obecność oraz ilość EPS na powierzchni komórek miała istotny wpływ na poruszanie się ryzobiów, co wcześniej wykazano w pracy Rachwał i wsp. [2015]. Autorzy wykazali, że mutacja w genie *rosR* powoduje zaburzenia w tworzeniu oraz funkcjonowaniu rzęsek, a także niestabilność aparatu w błonie zewnętrznej szczepu, posiadającego mutację w tym genie.

Tłumaczy to zaburzenia migracji szczepu Rt2472 w porównaniu do szczepów produkujących EPS. Negatywny wpływ jonów metali ciężkich (w tym jonów Zn^{2+}) na ruchliwość bakterii, została potwierdzona również u bakterii *Pseudomonas veronii* 2E oraz *Delftia acidovorans* AR [Barrionuevo i Vullo, 2012]. Wykazano, że jony Cd^{2+} (0,1-0,2 mM), Zn^{2+} (powyżej 1 mM) oraz Cr^{4+} (0,1-0,5 mM) istotnie obniżają lub nawet hamują migrację typu „swarming” szczepu *P. veronii* 2E. Dla szczepu *D. acidovorans* AR ustalono negatywny wpływ jonów Cu^{2+} (powyżej 0,1 mM), Cd^{2+} (powyżej 0,01 mM) oraz Zn^{2+} (0,2 – 1 mM) zarówno na ruchliwość typu „swimming”, jak i „swarming” [Barrionuevo i Vullo, 2012]. W niniejszej rozprawie wykazano również, że najwyższą tolerancją na jony cynku, a także wynikającym z tego słabszym wpływem jonów cynku na ruchliwość bakterii, wykazywały się szczepy Rt24.2(pBA1) i Rt24.2(pBR1). Wyniki te potwierdzają zatem ochronną rolę EPS w przypadku ekspozycji ryzobiów na stres cynkowy.

Obecność metali ciężkich w środowisku oraz ich napływ i gromadzenie się w komórkach organizmów żywych, powoduje generowanie wolnych rodników i powstawanie stresu oksydacyjnego. Prowadzi to do zaburzeń równowagi pomiędzy działaniem reaktywnych form tlenu, a mechanizmami, które je usuwają. Cynk jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania komórek żywych, lecz w większych stężeniach jest dla nich toksyczny. Z tego względu kolejnym etapem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy było określenie wpływu jonów cynku na procesy oddechowe komórek ryzobiów, a także na aktywność dwóch enzymów, zaangażowanych w usuwanie wolnych rodników: dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy. Ustalono, że нефизjologiczne stężenia jonów Zn^{2+} powodują wyraźne zahamowanie zużycia tlenu przez wszystkie badane szczepy ryzobiowe. Najwyższą tolerancją na jony cynku charakteryzowały się szczepy Rt24.2(pBA1) i Rt24.2(pBR1), co wiązało się z produkcją przez nie zwiększonej ilości EPS. Negatywny wpływ jonów metali ciężkich (tj. Cd, Zn, Cu, Ni) na procesy oddechowe mikroorganizmów potwierdzili już w 1967 r. Sadler i Trudinger [Sadler i Trudinger, 1967] podczas badań nad *Pseudomonas* sp., a także inni autorzy [Shi i Ma, 2017; Liu i in., 2009; Rajapaksha i in., 2004]. Shi i Ma [2017] wykazali negatywny wpływ stresu kadmowego na intensywność oddychania mikroorganizmów w próbkach gleby, co potwierdziły również informacje podane przez Liu i in. [2009]. Wykazano również, że dodatek jonów Zn^{2+} (128 mmol kg^{-1}) do próbek gleby powodował spadek aktywności oddechowej mikroorganizmów o 30% [Rajapaksha i in., 2004]. Obecność metali ciężkich w środowisku i generowany przez nie stres

oksydacyjny istotnie wpływają na aktywność specyficznych enzymów komórkowych bakterii, odpowiedzialnych za dezaktywację wolnych rodników tlenowych. W niniejszej pracy zmierzono aktywność katalazy (CAT) oraz dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) we frakcjach białek wewnątrzkomórkowych szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* w obecności 1 mM ZnSO₄ i porównywano z wynikami otrzymanymi w warunkach optymalnych do wzrostu bakterii. Krehenbrink i in., [2011] wykazali obecność SOD również w peryplazmie szczepu *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, dlatego też w pracy tej zbadano dodatkowo aktywność SOD we frakcji peryplazmatycznej białek. Ustalono, że obecność cynku powoduje wzrost aktywności zarówno SOD we frakcjach wewnątrzkomórkowej i peryplazmatycznej, jak i aktywności CAT we frakcji białek wewnątrzkomórkowych (Ryc. 29). Wyjątek stanowiły mutanty Rt5819 i Rt2472, dla SOD we frakcji peryplazmatycznej oraz Rt5819 dla CAT. Sugeruje to, że szczepy produkujące EPS charakteryzują się prawidłową reakcją obronną i pod wpływem stresu cynkowego zaczynają syntezę enzymów chroniących przed wolnymi rodnikami. Jak zostało wykazane przez Janczarek i wsp. [2009, 2010], mutacje w genach *rosR* oraz *pssA* wywołują efekt plejotropowy, powodujący m. in. zaburzenia w integralności błony komórkowej bakterii, które skutkowały niekontrolowanym wyciekiem białek z wnętrza komórki, co wraz z obecnością jonów cynku w środowisku może tłumaczyć niższą aktywność SOD i CAT u mutantów Rt2472 oraz Rt5819. Ponadto, w badaniach nad tymi samymi ryzobiami Jaszek i in. [2014] wykazali, że dodatek H₂O₂ oraz menandionu do środowiska powoduje wzrost aktywności CAT szczepu Rt24.2 oraz spadek aktywności tego enzymu w przypadku szczepu Rt5819, a także wzrost aktywności SOD we frakcji wewnątrzkomórkowej białek dla wszystkich badanych ryzobiów. Jednakże, jak podają Shi i Ma [2017] a także Gao i wsp. [2012], aktywność CAT w próbkach gleby maleje wraz ze zwiększającym się stężeniem jonów Cd²⁺. Natomiast de Silva i wsp. [2012] nie wykazali istotnego wpływu chromu, srebra oraz rtęci na aktywność CAT u bakterii izolowanych z zanieczyszczonych gleb (tj. *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp.). Z kolei Behera i in. [2014] wykazali pozytywny wpływ CdCl₂ na aktywność SOD oraz negatywny na aktywność CAT u *Bacillus cereus*, co sugeruje, że wpływ metali ciężkich na aktywność tych enzymów jest w dużym stopniu zależny od biodostępności tych metali dla organizmów oraz różnych czynników, takich jak rodzaj metalu ciężkiego czy występowanie innych mechanizmów obronnych.

Kolejnym etapem niniejszej pracy była charakterystyka własności powierzchniowych komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Został określony wpływ jonów

cynku na takie właściwości powierzchniowe, jak charakter kwasowo-zasadowy i hydrofilowo/hydrofobowy otoczek komórkowych oraz ruchliwość elektroforetyczna (EM) komórek ryzobiów w różnych warunkach hodowli. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że istnieje silny związek pomiędzy produkcją EPS przez szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* w różnych warunkach hodowli (zależność od wartości pH podłoża, czasu hodowli oraz stężenia jonów cynku), a właściwościami fizykochemicznymi powierzchni komórek bakteryjnych. Znak oraz wielkość EM komórek bakterii są często wykorzystywane jako wskaźniki ładunku elektrycznego powierzchni komórek [Wilson i in., 2001]. W przeprowadzonych eksperymentach wszystkie analizowane szczepy posiadały ujemne wartości EM. Było to spowodowane dominacją zdysocjowanych kwasowych grup funkcyjnych (np. karboksylowych, fosforylowych lub grup sulfhydrylowych węglowodanów i białek) na powierzchni komórek [Rutter i Vincent, 1984; Wilson i in., 2001; Cieśla i in., 2016]. W przypadku bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, źródłem ujemnego ładunku elektrycznego powierzchni komórek są reszty fosforylowe oraz karbosylowe kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonowego (Kdo), będącego składnikiem LPS w zewnętrznej błonie bakteryjnej [Bushby, 1990; Wilson i in., 2001; Cieśla i in., 2016]. We wcześniejszych badaniach [Cieśla i in., 2016] wykazano, że poszczególne powierzchniowe grupy funkcyjne komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii* mają różny wkład w generowanie ładunku elektrycznego powierzchni, zależnie od składu podłoża oraz szczepu bakteryjnego (a tym samym budowy otoczki komórkowej). W przypadku hodowli w podłożu TY bez dodatku jonów Zn^{2+} , ładunek powierzchniowy był generowany głównie przez grupy silnie kwasowe ($K_{app} < 4,0$) [Poortinga i in., 2002]. Wyniki badań zaprezentowane w tej rozprawie pokazały, że wszystkie analizowane szczepy, zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w obecności jonów Zn^{2+} charakteryzowały się silnie kwasowym charakterem powierzchni komórek. Wykazano, że obecność jonów cynku dla większości szczepów powodowała wzrost udziału grup funkcyjnych o charakterze kwasowym ($pK_{app}=4,0$), z wyjątkiem szczepu Rt24.2, u którego widoczny był udział grup o $pK_{app}=6,5$ (Ryc. 30). Nie tylko EPS, ale inne polisacharydy (tj. GPS czy glukomannan) syntetyzowane przez ryzobia mogą modyfikować ich ładunek powierzchniowy, a w konsekwencji zmniejszać lub zwiększać oddziaływanie elektrostatyczne z różnymi powierzchniami. Otrzymane wyniki potwierdziły jednak, że obecność EPS na powierzchni komórek ryzobiów ma istotny wpływ na wartość EM komórek bakterii. Wartość bezwzględna EM rosła ze wzrostem syntetyzowanego przez ryzobia polimeru. Mutant w genie *rosR* (Rt2472), dla którego synteza EPS jest ok. 3-krotnie niższa niż dla szczepu

dzikiego (Rt24.2), charakteryzował się niższymi wartościami bezwzględными EM niż szczep Rt24.2, ale wyższymi niż mutant Rt5819. Było to potwierdzeniem obserwacji poczynionych przez innych autorów dla *R. leguminosarum* [Janczarek i in., 2015; Cieśla i in., 2016] oraz *Synechocystis* [Planchon i in., 2013].

Jednakże, odnotowano, że wartość bezwzględna EM komórek badanych szczepów ryzobiowych malała wraz ze wzrostem stężenia jonów Zn^{2+} obecnych w pożywce (Ryc. 32), co nie było wcześniej prezentowane. Z jednej strony efekt ten był najprawdopodobniej związany z neutralizacją ujemnego ładunku powierzchniowego komórek bakterii, z drugiej strony z toksycznym działaniem cynku, prowadzącym do zwiększenia się ilości komórek martwych w badanej puli bakteryjnej, co było widoczne na Ryc. 33. W kolejnym wariancie doświadczenia badano wpływ wieku hodowli, zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w obecności 1 mM $ZnSO_4$, na wartości EM komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Stwierdzono, że niezależnie od wieku hodowli obecność jonów cynku skutkowała zmniejszeniem się wartości bezwzględnych EM u mutantów defektywnych w syntezie EPS, co mogło wynikać z toksycznego działania jonów Zn^{2+} (brak ochronnego EPS) i wzrostu liczby komórek martwych [Cieśla i in., 2016]. W przypadku szczepów Rt24.2 oraz Rt24.2(pBA1) jony cynku powodowały wzrost wartości bezwzględnej EM dla 48-godz. i 96-godz. hodowli. Wzrost wartości pH podłoża od 3,0 do 7,0, powodował wzrost wartości bezwzględnych EM u wszystkich badanych szczepów, związany ze wzrostem ilości zdysocjowanych powierzchniowych grup funkcyjnych. W obecności jonów Zn^{2+} w ośrodku o pH 7,0 szczepy produkujące znaczne ilości EPS [Rt24.2, Rt24.2(pBA1) i Rt24.2(pBR1)] charakteryzowały się znacząco wyższymi wartościami bezwzględными EM niż w warunkach kontrolnych. Było to prawdopodobnie związane z większą ilością EPS, syntetyzowaną w tych warunkach. Właściwości fizykochemiczne powierzchni komórek ryzobiów, a także skład ich otoczki, stanowią ważny element w procesie ich adhezji do powierzchni abiotycznych oraz biotycznych, takich jak korzenie roślin. Proces ten jest kluczowym elementem w przebiegu symbiozy. Obecność substancji polimerowych na zewnątrz komórek ma również wpływ na ich właściwości hydrofobowe i hydrofilowe [Postma i in., 1991; Van Loosdrecht i in., 1989, 1990a, 1990b]. W niniejszej pracy wykazano, że badane szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* różnią się od siebie stopniem hydrofobowości w zależności od ilości syntetyzowanego EPS. Ponadto, obecność jonów cynku zwiększa hydrofobowość badanych komórek, która rośnie wraz ze wzrostem stężenia metalu (Tab. 9). Do oceny stopnia hydrofobowości komórek *R. leguminosarum* wykorzystano również pomiary

kątowność zwilżania. Zastosowanie w tym celu cieczy o różnej polarności pokazało złożony charakter hydrofilowo/hydrofobowy powierzchni komórek. Była ona zwilżalna zarówno przez ciecze polarne (formamid i woda), jak i apolarny diiodometan. Dało się zaobserwować, że im więcej EPS było syntetyzowane przez dany szczep, tym mniej hydrofilowy charakter wykazywała powierzchnia pokryta jego komórkami w stanie powietrznie suchym. Niezależnie od składu podłoża wartości swobodnej energii powierzchniowej komórek bakterii były zdominowane przez wkład pochodzący od składowej LW, która rzutuje na ich zdolności adhezyjne [Cieśla i in., 2016]. Właściwości powierzchniowe komórek są determinowane przez złożony skład otoczki komórkowej oraz macierz zewnątrzkomórkową złożoną z polisacharydów (40-95%), białek (1-60%) oraz lipidów (1-10%) [More i in., 2014 ; Hori i Matsumoto, 2010]. Hydrofobowość powierzchni komórek ryzobiów jest niezwykle istotna w procesach adhezyjnych do powierzchni biotycznych, co ma bardzo duży wpływ na pierwsze etapy nawiązywania symbiozy ryzobiów z roślinami bobowatymi [Chen i in., 2006; Rodriguez-Navarro i in., 2007; D’Haeze i Holsters, 2004; Janczarek i in., 2010; Russo i in., 2006; Fujishige i in., 2006].

Kolejnym etapem niniejszej pracy było zbadanie wpływu jonów cynku na właściwości symbiotyczne szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, różniących się poziomem syntezy EPS, z koniczyną łąkową. Większość z tych wyników została opublikowana w pracy Kopycińska i in., [2018]. Na wstępie sprawdzono wpływ różnych stężeń jonów cynku na kiełkowanie nasion koniczyny (*Trifolium pratense*). Zaobserwowano, że stężenie jonów cynku wyższe niż 0,6 mM miało negatywny wpływ na długość łodyg oraz korzeni 7-dniowych kiełków koniczyny. Taki sam efekt uzyskali Stravinskiene i Racaite [2014] dla koniczyny białej. Zaobserwowali oni, że stężenie jonów cynku wyższe niż 0,1 mM powodowało znaczne zahamowanie wzrostu zarówno korzeni, jak i łodyg kiełków koniczyny białej (*Trifolium repens*) [Stravinskiene i Racaite, 2014]. Wysokie stężenia jonów Zn^{2+} zakłócają procesy metaboliczne roślin i powodują zaburzenia w prawidłowym wzroście korzeni i łodyg [Yadav, 2010; Vassilev i in., 2011; Mirshekali i in., 2012; Ialelou i in., 2013; Oladele i in., 2013; Tsonev i Lidon, 2012; Truta i in., 2013, Rout i Das, 2003]. Jak wykazali Bekiaroglou i Karataglis [2002], obecność w pożywce jonów Zn^{2+} o stężeniu 6 μ M powodowała skrócenie długości korzenia *Mentha spicata* L. o prawie połowę w porównaniu do roślin hodowanych w warunkach kontrolnych. Wyniki uzyskane w kolejnych doświadczeniach w ramach tej rozprawy, mających na celu zbadanie wpływu jonów cynku na adhezję *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do korzeni koniczyny łąkowej, ujawniły, że metal ten ma znaczny wpływ na obu

partnerów symbiotycznych, przy czym koniczyna jest bardziej wrażliwa na ten czynnik stresowy aniżeli mikrosymbiont. Sugeruje to, że obecność EPS jest zarówno kluczowym elementem biorącym udział w ochronie ryzobiów przed szkodliwym działaniem jonów Zn^{2+} , jak i niezbędnym składnikiem biorącym udział w adhezji tych mikroorganizmów do korzeni gospodarza roślinnego. Na podstawie porównania efektywności adhezji bakterii w warunkach kontrolnych do warunków stresowych, stwierdzono, że cynk negatywnie działa na ten proces, co może być związane również ze zmianą hydrofobowości powierzchni komórek ryzobiów, słabszymi oddziaływaniami z powierzchnią biotyczną i w efekcie gorszym przyczepianiem się do korzeni roślin [Janczarek i in., 2015; Cieśla i in., 2016]. Ponadto, jak wykazano w pracy Janczarek i wsp. [2010], mutacje w genach *rosR* oraz *pssA* skutkują drastycznym obniżeniem efektywności przyczepiania się komórek ryzobiów do powierzchni korzeni. W porównaniu do szczepu Rt24.2, komórki szczepu Rt2472 sporadycznie ulegały adhezji do korzeni i w konsekwencji rzadko inicjowały tworzenie nici infekcyjnej przez roślinę [Janczarek i in., 2010]. Podobne doniesienia dotyczące mutanta w genie *pssA* pokazali Williams i in., [2008]. W ostatnim etapie pracy wykazano, że obecność jonów cynku negatywnie wpływa na nawiązywanie efektywnej symbiozy badanych ryzobiów z koniczyną oraz na tworzenie brodawek korzeniowych. Stężenie $ZnSO_4$ wynoszące 1 mM całkowicie hamuje ten proces, co wskazuje, że jest ono toksyczne dla obu partnerów symbiotycznych [Broos i in., 2004; Weisany i in., 2013; Emamverdian i in., 2015]. Stwierdzono jednak, że przy stężeniach cynku niższych niż 1 mM, symbiotyczne zdolności szczepów nadprodukcujących EPS [Rt24.2(pbA1) i Rt24.2(pBR1)] są lepsze od szczepu dzikiego Rt24.2. Szczepy te z większą wydajnością zakażały koniczynę łąkową, tworzyły na ich korzeniach większą liczbę brodawek, a rośliny inokulowane tymi szczepami posiadały większą masę, zarówno łodyg, jak i korzeni. Wyniki te potwierdziły zatem, że EPS odgrywa bardzo ważną rolę w adaptacji tych bakterii do stresu cynkowego.

Współistnienie roślin i bakterii gwarantuje ich przetrwanie, a złożone interakcje występujące między nimi odgrywają istotną rolę w ich adaptacji do stresu środowiskowego wywołanego obecnością metali ciężkich [Ma i in., 2016]. Oprócz obecności polisacharydów na powierzchni komórek ryzobiów skutecznymi strategiami zwiększania tolerancji bakteryjnej na obecność metali ciężkich są transfer genów, obecność specjalnych pomp umożliwiających usuwanie toksycznych pierwiastków na zewnątrz komórki czy też synteza związków o właściwościach chelatujących [Blake i in., 1993; Nies, 1992; Ow i in., 1993].

Podsumowując niniejszą pracę należy podkreślić, że obecność jonów cynku w środowisku wzrostu szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* negatywnie wpływa na różne procesy fizjologiczne tych bakterii, takie jak wzrost czy przeżywalność, a także na ich ruchliwość, zdolność do przyczepiania się do korzeni makrosymbionta i nawiązywanie efektywnej symbiozy z gospodarzem roślinnym. Stres cynkowy stymuluje jednak te organizmy do produkcji większej ilości polisacharydów powierzchniowych, tworzenia większej ilości biofilmu o grubszej, bardziej złożonej strukturze oraz wzmożoną aktywnością enzymów komórkowych odpowiedzialnych za dezaktywację wolnych rodników tlenowych. Produkowany przez bakterie EPS znacząco wpływa na fizykochemiczne właściwości powierzchniowe komórek. Szczepy Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1) nadprodukuje EPS lepiej adaptują się do negatywnych warunków środowiskowych w porównaniu do szczepu dzikiego Rt24.2 czy też mutantów Rt5819 i Rt2472 defektywnych w syntezie tego polimeru, co pozwala wysnuć wniosek, że polisacharyd ten pełni bardzo ważną funkcję w ochronie wolnożyjących ryzobiów przed szkodliwym działaniem metali ciężkich oraz zwiększa skuteczność nawiązywania symbiozy z gospodarzem roślinnym. Zintensyfikowana synteza EPS przez bakterie w warunkach stresu wywołanego obecnością jonów cynku poszerza ich możliwości aplikacyjne w technikach remediacyjnych. Polisacharyd ten charakteryzuje się dobrymi właściwościami sorpcyjnymi, co stwarza szanse na zastosowanie go w biotechnologii, jako polimeru wysokowydajnie wiążącego jony Zn^{2+} .

8. Podsumowanie i wnioski

Bakterie z rodzaju *Rhizobium* stanowią grupę mikroorganizmów o potencjalnym zastosowaniu biotechnologicznym. Ich zdolność do nawiązywania symbiozy z roślinami bobowatymi, a także zdolność produkcji oraz wydzielania do środowiska glebowego ogromnej ilości EPS, daje naukowcom możliwość wykorzystania tych bakterii w różnych technikach remediacyjnych (np. bioremediacji czy jako PGPR (ang. plant growth promoting rhizobacteria)). Usuwanie toksycznych odpadów oraz związków metali ciężkich z gleby, których stężenie wciąż rośnie w tym środowisku wraz z postępem urbanizacji oraz rozwojem przemysłu, stanowi ważny i aktualny temat badań. Cynk w niskich stężeniach jest istotnym mikroelementem niezbędnym do wzrostu wielu organizmów, w tym bakterii. Jednakże, jego wyższe stężenia są dla organizmów toksyczne.

Dlatego w tej pracy podjęto próbę ustalenia wpływu jonów cynku na własności fenotypowe oraz symbiotyczne bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Ponadto, określono wydajność sorpcji jonów Zn^{2+} przez EPS wyizolowany z tej bakterii, co pozwoliło na kompleksowe opisanie zmian właściwości powierzchniowych komórek tych bakterii w warunkach stresowych. Przeprowadzone badania pozwoliły również ustalić jaką rolę odgrywa EPS w adaptacji *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do warunków stresowych wywołanych obecnością jonów cynku, a także określić jego potencjał biotechnologiczny w technikach remediacyjnych, zarówno czystego preparatu EPS, jak i szczepów charakteryzujących się zwiększoną produkcją tego polimeru (w stanie wolnożyjącym oraz w symbiozie z koniczyną). Wyniki uzyskane w ramach tej pracy pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. jony Zn^{2+} w stężeniach powyżej 1 mM hamują wzrost komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, ale nie wpływają istotnie na ich przeżywalność. Spośród badanych szczepów, Rt24.2(pBA1) oraz Rt24.2(pBR1), produkujące zwiększone ilości EPS, charakteryzują się zwiększoną przeżywalnością, szybszym tempem wzrostu i wyższymi parametrami CFU/ml hodowli w porównaniu do szczepów defektywnych w syntezie EPS: Rt2472 i Rt5819;

2. jony Zn^{2+} stymulują proces syntezy EPS oraz tworzenie biofilmu w warunkach *ex planta*. Szczepy o zwiększonej produkcji EPS (Rt24.2(pBA1) i Rt24.2(pBR1)) wykazują wyższą przeżywalność, wzmożoną syntezę EPS i tworzenie biofilmu w obecności jonów Zn^{2+} w porównaniu do szczepów defektywnych w syntezie tego polimeru;

3. obecność jonów cynku w środowisku wzrostu testowanych szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* powoduje wzrost produkcji innych polisacharydów powierzchniowych (GPS, CPS, CG), zwiększenie agregacji oraz zmniejszenie ruchliwości komórek, natomiast wpływa negatywnie na wydajność oddychania komórkowego oraz wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy;

4. obecność EPS wpływa na własności powierzchniowe komórek ryzobiów (kwasowy charakter powierzchni komórek oraz jej ujemny ładunek elektryczny);

5. wpływ jonów Zn^{2+} na wartości ruchliwości elektroforetycznej komórek zależy od ilości syntezowanego EPS, fazy wzrostu bakterii i liczby żywych komórek w populacji oraz od zastosowanego stężenia jonów cynku i pH środowiska. Neutralizacja ujemnego ładunku powierzchniowego przez jony Zn^{2+} , występująca u 24-h hodowli szczepów syntezujących EPS powoduje obniżenie ruchliwości elektroforetycznej. W przypadku starszych hodowli wzmożona produkcja EPS w warunkach stresowych prowadzi do zwiększenia ruchliwości elektroforetycznej względem kontroli. Efekt ten nie występuje u szczepów defektywnych w syntezie tego polimeru. Wzrost stężenia jonów cynku skutkuje zmniejszeniem ruchliwości elektroforetycznej komórek wszystkich badanych szczepów, skorelowanym ze zmniejszeniem się liczby żywych komórek w populacji, a zatem również ze wzrostem toksyczności Zn^{2+} ;

6. jony Zn^{2+} powodują wzrost hydrofobowości komórek szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*; mutant Rt2472 charakteryzuje się najwyższą hydrofobowością spośród badanych szczepów;

7. obecność jonów cynku ma nieznaczny wpływ na wartości swobodnej energii powierzchniowej komórek, jedynie w przypadku szczepu (Rt24.2(pBA1), nadprodukującego EPS, powoduje wzrost jej wartości;

8. jony Zn^{2+} negatywnie wpływają na kiełkowanie nasion i wzrost kiełków koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*).

9. jony Zn^{2+} istotnie obniżają efektywność symbiozy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną; szczepy nadprodukujące EPS charakteryzowały się znacznie lepszą wydajnością adhezji komórek do korzeni koniczyny i efektywnością symbiozy w warunkach stresu (liczba infekowanych roślin, tworzonych brodawek i produktywność roślin);

10. EPS wyizolowany ze szczepu dzikiego Rt24.2 charakteryzuje się wysoką wydajnością wiązania jonów Zn^{2+} (pojemność monowarstwy dla tego polimeru w stosunku do jonów cynku wynosi prawie 46 mg Zn^{2+} na 1 g EPS).

Podsumowując, przeprowadzone analizy wykazują, że EPS pełni ważną rolę w ochronie przed toksycznym działaniem jonów cynku zarówno wolnożyjących bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, jak również podczas interakcji tych bakterii z gospodarzem roślinnym. Nadprodukcja EPS zapewnia bakteriom skuteczniejszą adaptację do warunków stresowych, a także zwiększa ich możliwości wykorzystania w technikach remediacyjnych. Ponadto, wysoka wydajność wiązania jonów Zn^{2+} przez EPS wyizolowany z tych bakterii, daje możliwość zastosowania go w biotechnologii, jako polimeru o zdolnościach sorpcyjnych.

9. Bibliografia

1. Abd-Alla, M.H., Issa, A.A. & Ohyama, T. (2014). Impact of harsh environmental conditions on nodule formation and dinitrogen fixation of legumes. In book: *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*, Edition: First, Chapter: Chapter 7: Impact of Harch Environmental Conditions on Nodule Formation and Dinitrogen Fixation of Legumes., Publisher: InTech, Editors: Takuji Ohyama, str.131-193.
2. Abhilash, P.C., Powell, J.R., Singh, H.B. & Singh, B.K. (2012). Plant-microbe interactions: novel applications for exploitation in multipurpose remediation Technologies. *Trends in Biotechnology*. 30(8), 416-420.
3. Acosta-Jurado, S., Alias-Villegas, C., Navarro-Gómez, P., Zehner, S., Murdoch, P.D., Rodríguez-Carvajal, M.A., Soto, M.J., Ollero, F-J., Ruiz-Sainz, J.E., Göttfert, M. & Vinardell, J-M. (2016). The *Sinorhizobium fredii* HH103 MucR1 global regulator is connected with the *nod* regulon and is required for efficient symbiosis with *Lotus burttii* and *Glycine max* cv. Williams. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 29(9), 700-712.
4. Adamczyk, B. & Godlewski, M. (2010). Różnorodność strategii pozyskiwania azotu przez rośliny. *Kosmos*. 59(1-2), 211-222.
5. Adelekan, B.A. & Abegunde, K.D. (2011). Heavy metals contamination of soil and groundwater at automobile mechanic villages in Ibadan Nigeria. *International Journal of Physical Sciences*. 6(5), 1045–1058.
6. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105, 121-126.
7. Aggarwal, A., Kadian, N., Karishma, N., Tanwar, A. & Gupta, A.A. (2012). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of salinity stress. *Journal of Applied and Natural Sciences*. 4(1), 144-155.
8. Ahemad, M. & Khan, M.S. (2011a). Assessment of plant growth promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under insecticide-stress. *Microbiology Journal*. 1, 54–64.
9. Ahemad, M. & Khan, M.S. (2011b). Effect of tebuconazole-tolerant and plant growth promoting *Rhizobium* isolate MRP1 on pea-*Rhizobium* symbiosis. *Scientia Horticulturae*. 129(2), 266–272.
10. Ahimou, F., Semmens, M.J., Haugstad, G. & Novak, P.J. (2007). Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(9), 2905-2910.
11. Ahmad, D., Mehmannavaz, R. & Damaj, M. (1997). Isolation and characterization of symbiotic N₂-fixing *Rhizobium meliloti* from soils contaminated with aromatic and chloroaromatic hydrocarbons: PAHs and PCBs. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 39(1), 33-43.
12. Ahmad, W., Watts, M.J., Imtiaz, M., Ahmed, I. & Zia, M.H. (2012). Zinc deficiency in soil, crops and humans. *Agrochimica*. 2, 86-97.
13. Ahmed, S.A., Kazim, A.R. & Hassan, H.M. (2017). Increasing Cellulose Production from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Journal of Al-Nahrain University*. 20(1), 120-155.

14. Alvarez, V.M., Jurelevicius, D., Serrato, R.V., Barreto-Bergter, E. & Seldin, L. (2017). Chemical characterization and potential application of exopolysaccharides produced by *Ensifer adhaerens* JHT2 as a bioemulsifier of edible oils. *International Journal of Biological Macromolecules*. 114, 18-25.
15. Amaya-Gomez, C.V., Hirsch, A.M. & Soto, M.J. (2015). Biofilm formation assessment in *Sinorhizobium meliloti* reveals interlinked control with surface motility. *BMC Microbiology*. 15(1), 390.
16. Ammendola, S., Pasquali, P., Pistoia, C., Petrucci, P., Petrarca, P., Rotilio, G. & Battistoni, A. (2007). High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*. 75(12), 5867-5876.
17. Balestrasse, K.B., Gardley, L., Gallego, S.M. & Tomaro, M.L. (2001). Response of antioxidant defense system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28(6), 497-504.
18. Barberi, A., Moreira, F.M.S., Florentino, L.A. & Rodrigues, M.I.D. (2004). Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de pH inicial. *Ciência e Agrotecnologia*. 28(2), 397-404.
19. Barnat-Hunek, D. (2016). Swobodna energia powierzchniowa jako czynnik kształtujący skuteczność hydrofobizacji w ochronie konstrukcji budowlanych. Politechnika Lubelska, str. 23-39.
20. Barrionuevo, M.R. & Vullo, D.L. (2012). Bacterial swimming, swarming and chemotactic response to heavy metal presence: which could be the influence on wastewater biotreatment efficiency? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(9), 2813–2825.
21. Basson, A., Flemming, L.A. & Chenia, H.Y. (2008). Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. *Microbial Ecology*. 55(1), 1–14.
22. Becker, A., Fraysse, N. & Sharypova, L. (2005). Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Molecular Plant–Microbe Interactions*. 18(9), 899–905.
23. Behera, M., Dundapat, J. & Chandi, C.R. (2014). Effect of heavy metals on growth response and antioxidant defense protection in *Bacillus cereus*. *Journal of Basic Microbiology*. 54(11), 1201-1209.
24. Bekiaroglou, P. & Karataglis, S. (2002). The Effect of Lead and Zinc on *Mentha spicata*. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 188(3), 201-205.
25. Berducci, G., Mazzetti, A.P., Rotilio, G. & Battistoni, A. (2004). Periplasmic competition for zinc uptake between the metallochaperone ZnuA and Cu, Zn superoxide dismutase. *FEBS Letters*. 569(1-3), 289–292.
26. Beringer, J.E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*. 84(1), 188–198.
27. Bhagwat, A.A., Mithofer, A., Pfeffer, P.E., Kraus, C., Spickers, N., Hotchkiss, A., Ebel, J. & Keister, D.L. (1999). Further studies of the role of cyclic beta-glucans in symbiosis. An NdvC mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesizes cyclodecakis-(1->3)-beta-glucosyl. *Plant Physiology*. 119(3), 1057–1064.

28. Bhaskar, P., Bhosle, N.B. (2006). Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food-chain. *Environment International*. 32(2), 191–198.
29. Bhubhanil, S., Sittipo, P., Chaoprasid, P., Nookabkaew, S., Sukchawalit, R. & Mongkolsuk, S. (2014). Control of zinc homeostasis in *Agrobacterium tumefaciens* via *zur* and the zinc uptake genes *znuABC* and *zinT*. *Microbiology*. 160(11), 2452-2463.
30. Blair, K.M., Turner, L., Winkelman, J.T., Berg, H.C. & Kearns, D.B. (2008). A molecular clutch disables flagella in the *Bacillus subtilis* biofilm. *Science*. 320(5883), 1636–1638.
31. Blake, R.C., Choate, D.M., Bardhan, S. & Revis, N. (1993). Chemical transformation of toxic metals by a *Pseudomonas* strains from toxic wastes site. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 12(8), 1365-1376.
32. Blencowe, K., & Morby, P. (2003). Zn(II) metabolism in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. 27(2-3), 291–311.
33. Bogino, P., Abod, A., Nievas, F. & Giordano, W. (2013). Water-limiting conditions alter the structure and biofilm-forming ability of bacterial multispecies communities in the Alfalfa rhizosphere. *PLoS ONE*8:e79614.
34. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
35. Braeken, K., Daniels, R., Vos, K., Fauvart, M., Bachaspatimayum, D., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2008). Genetics determinants of swarming in *Rhizobium etli*. *Microbial Ecology*. 55(1), 54–64.
36. Braeken, K., Daniels, R., Vos, K., Fauvart, M., Bachaspatimayum, D., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2008). Genetic determinants of swarming in *Rhizobium etli*. *Microbial Ecology*. 55(1), 54–64.
37. Breedveld, M.W. & Miller, K.J. (1994). Cyclic beta-glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiology Reviews*. 58(2), 145–16.
38. Breedveld, M.W., Cremers, H.C., Batley, M., Posthumus, M.A., Zevenhuizen, L.P., Wijffelman, C.A. & Zehnder, A.J. (1993). Polysaccharide synthesis in relation to nodulation behavior of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Bacteriology*. 175(3), 750–757.
39. Bremer, A. & Kramer, R. (2001). Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 130(3), 437-460.
40. Briones, G., Iñon De Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Silva Paulo, P. & Ugalde, R. (2001). *Brucella abortus* cyclic β -1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infection and Immunity*. 69(7), 4528-4535.
41. Broos, K., Uyttebroek, M., Mertens, J. & Smolders, E. (2004). A survey of symbiotic nitrogen fixation by white clover grown on metal contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 36(4), 633–640.

42. Broughton, W.J., Zhang, F., Perre, X. & Staehelin, C. (2003). Signals exchanged between legumes and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. *Plant and Soil*. 252(1), 129–137.
43. Bruins, M.R., Kapil, S. & Oehme, F.W. (1999). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(3), 198-207.
44. Burd, G.I., Dixon, G.D. & Glick, B.R. (2000). Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology*. 46(3), 237–245.
45. Bushby, H.V.A. (1990). The role of bacterial surface charge in the ecology of root-nodule bacteria: A hypothesis. *Soil Biology and Biochemistry*. 22(1), 1-9.
46. Busscher, H.J., Weerlamp, A.H., Van der Mei, H.C., Van Pelt, A.W.J., De Jong, H.P. & Arends, J. (1984). Measurements of the surface free energy of bacterial cells and its relevance for adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*. 48(5), 980-983.
47. Butler, M.T., Wang, Q. & Harshey, R.M. (2010). Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(8), 3776–3781.
48. Canter Cremers, H.C.J., Stevens, K., Lugtenberg, B.J.J., Wijffelman, C.A., Batley, M., Redmond, J.W., Breedveld, M. & Zevenhuizen, L.P.T.M. (1991). Unusual structure of the exopolysaccharide of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain 248. *Carbohydrate Research*. 218, 185-200.
49. Carrasco, A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M.A., Lopez, R., Chamber, M.A. & Palomares, A.J. (2005). Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil Biology and Biochemistry*. 37(6), 1131-1140.
50. Castellane, T.C.L., Campanharoa, J.C., Colnago, L.A., Coutinho, I.D., Lopes, É.M., Lemos, M.V.F. & de Macedo Lemos, E.G. (2017). Characterization of new exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. *International Journal of Biological Macromolecules*. 96, 361–369.
51. Castellane, T.C.L., Otoboni, A.M.M.B. & de Macedo Lemos, E.G. (2015). Characterization of Exopolysaccharides Produced by Rhizobia Species. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 39(6), 1566-1575.
52. Chandra, B.R., Yogavel, M. & Sharma, A. (2007). Structural analysis of ABC-family periplasmic zinc binding protein provides new insights into mechanism of ligand uptake and release. *Journal of Molecular Biology*. 367(4), 970–982.
53. Chaudri, A., McGrath, S., Gibbs, P., Chambers, B., Carlton-Smith, C., Bacon, J., Campbell, C. & Aitken, M. (2008). Population size of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in long-term field experiments with sewage sludge cake, metal-amended liquid sludge or metal salts: effects of zinc, copper and cadmium. *Soil Biology and Biochemistry*. 40(7), 1670–1680.
54. Chaudri, A.M., Allain, C.M., Barbosa-Jefferson, V.L., Nicholson, F.A., Chambers, B.J. & McGrath, S.P. (2000). A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long term field experiment. *Plant and Soil*. 221(2), 167–179.
55. Chawla, P., Bajaj, I. & Survase, S. (2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technology and Biotechnology*. 47(2), 107-124.

56. Chen, H., Richardson, A.E. & Rolfe, B.G. (1993). Studies of the physiology and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(6), 1798-1804.
57. Chen, J.L., Lin, S. & Lin, L.P. (2006). Rhizobial surface biopolymers and their interaction with lectin measured by atomic force microscopy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22(6), 565–570.
58. Chen, L.S., Figuerdo, A., Villani, H., Michajluk, J. & Hungria, M. (2002). Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean in Paraguay. *Biology and Fertility of Soils*. 35(6), 448-457.
59. Choma, A. & Komanięcka, I. (2011). Characterisation of cyclic β -glucans of *Bradyrhizobium* by MALD ITOF mass spectrometry. *Carbohydrate Research*. 346(13), 1945-1950.
60. Cieřła, J., Bieganowski, A., Janczarek, M. & Urbanik-Sypniewska, T. (2011). Determination of the electrokinetic potential of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2 using Laser Doppler Velocimetry - a methodological study. *Journal of Microbiological Methods*. 85(3), 199-205.
61. Cieřła, J., Kopycińska, M., Łukowska, M., Bieganowski, A. & Janczarek, M. (2016). Surface properties of wild-type *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain 24.2 and its derivatives with different extracellular polysaccharide content. *PloS One*. 11, e0165080.
62. Collins, J.C. (1981). Zinc. In: Effect of heavy metal pollution on plants. 1(5)Lepp, N.W. (ed). Applied Science, London, str. 145 – 169.
63. Comte, S., Guibaud, G. & Baudu, M. (2006). Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: Soluble or bound. *Process Biochemistry*. 41(4), 815-823.
64. Conibe, P.A., Cruz, L.F., Navarrete, F., Ducan, D., Tygart, M. & De La Fuente, L. (2013). *Xylella fastidiosa* differentially accumulates mineral elements in biofilm na planktonic cells. *PLoS One*. 8:e54936.
65. Cooper, J.E. (2004). Multiple Responses of Rhizobia to Flavonoids during Legume Root Infection. *Advances in Botanical Research*, 41(41), 1-62.
66. Cortez, H., Pingarron, J., Munoz, J.A., Ballester, A., Blazquez, M.L., Gonzalez, F., Garcia, C. & Coto, O. (2010). Bioremediation of soils contaminated with metalliferous mining wastes. In: Plaza G(ed) Trends bioremediation phytoremediation. ResearchSignpost, Trivandrum, str. 283–299.
67. Corzo, J., Leon-Barrios, M., Hernando-Rico, V. & Gutierrez-Navarro, A.M. (1994). Precipitation of metallic cations by the acidic exopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium* (*Chamaecytisus*) strain BGA-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(12), 4531–4535
68. Costa, R.C.L., Lobato, A.K.S., Silveira, J.A.G. & Laughinghouse, H.D. (2011). ABA-mediated proline synthesis in cowpea leaves exposed to water deficiency and rehydration. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 35(3), 309-317.
69. Costerton, J.W., Stewart, P.S. & Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*. 284(5418), 1318-1322.
70. Crawford, R.L. (1981) Lignin biodegradation and transformation. Wiley, New York.

71. Cunningham, S.D. & Munns, D.N. (1984). The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in *Rhizobium*. *Soil Science Society of America Journal*. 48(6), 1273-1276.
72. D'antuono, A.L., Casabuono, A., Couto, A., Uglade, R.A. & Lepek, V.L. (2005). Nodule development induced by *Mesorhizobium loti* mutant strains affected in polysaccharide synthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18(5), 446-457.
73. D'Haese, W., Glushka, J., De Rycke, R., Holsters, M. & Carlson, R.W. (2004). Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. *Molecular Microbiology*. 52(2), 485-500.
74. Daniels, R., De Vos, D.E., Desair, J., Raedschelders, G., Luyten, E., Rosemeyer, V., Verreth, C., Schoeters, E., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2002). The *cin* quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Biology Chemistry*. 277(1), 462-468.
75. Daniels, R., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 28(3), 261-289.
76. De Philipps, R. & Vicenzini, M. (1998). Extracellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*. 22(3), 151-175.
77. Delorme, T.A., Gagliardi, J.V. Angle, J.S. van Berkum, P. & Chaney, R.L. (2003). Phenotypic and Genetic Diversity of Rhizobia Isolated from Nodules of Clover Grown in a Zinc and Cadmium Contaminated Soil. *Soil Science Society of America Journal*. 67(6), 1746-1754.
78. Diaz-Marrero, A.R., Santamaria, M., Hernandez, J. & Corzo, J. (2004). Coprecipitation of Th⁴⁺ and the purified extracellular polysaccharide produced by bacterium *Bradyrhizobium (Chamaecytisus)* strain BGA-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(3), 356-362.
79. Ding, P., Song, W., Yang, Z. & Jian, J. (2018). Influence of Zn(II) stress-induction on component variation and sorption performance of extracellular polymeric substances (EPS) from *Bacillus vallismortis*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 41(6), 781-791.
80. Downie, J.A. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), 150-170.
81. Dragovic, S., Uscumlic, M., Radojevic, V. & Cicmil, M. (2008). Water quality for vegetable irrigation from the aspect of safety. *Ekoloski Pokret Novog Sada, Novi Sad, special edition, II international ECO-conference "SAFE FOOD"*, str. 75-81.
82. Dylan, T., Nagpal, P., Helinski, D.R. & Ditta, G.S. 1990. Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti ndv* mutants. *Journal of Bacteriology*. 172(3), 1409-1417.
83. Eaglesham, A.R.J., Stowers, M.D., Maina, M.L., Goldman, B.J., Sinclair, M.J. & Ayanaba, A. (1987), Physiological and biochemical aspects of diversity of *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) from three West African soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 19(5), 575-581.

84. Elsheikh, E.A. E. & Wood, M. (1990). Salt effects on survival and multiplication of chickpea and soybean rhizobia. *Soil Biology Biochemistry*. 22(3), 343-347.
85. Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F. Xie, Y. (2015). Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Scientific World Journal*. 2015, 756120.
86. Farago, M.E. (1994). Plants and the Chemical Elements Biochemistry: Uptake, Tolerance and Toxicity. Margaret E. Farago (red.). Weinheim, Nowy Jork: VCH.
87. Fergusson, J.E. & Kim, N.D. (1991). Trace elements in street and house dusts: sources and speciation. *Science of Total Environment*, 100, 125–150.
88. Ferianc, P., Farewell, A. & Nyström T. (1998). The cadmium-stress stimulon of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*. 144(4), 1045–1050.
89. Fester, T., Giebler, J., Wick, L.Y., Schlosser, D. & Kästner, M. (2014). Plant-microbe interactions as drivers of ecosystem functions relevant for the biodegradation of organic contaminants. *Current Opinion in Biotechnology*. 27, 168-75.
90. Flemming, C.A. & Trevors, J.T. (1989). Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air and Soil Pollution*. 44, 143-158.
91. Flemming, H.C. & Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*. 43(6), 1-8.
92. Forsberg, L. S., & Reuhs, B.L. (1997). Structural characterization of the K antigens from *Rhizobium fredii* USDA257: evidence for a common structural motif, with strain-specific variation, in the capsular polysaccharides of *Rhizobium* spp. *Journal of Bacteriology*. 179(17), 5366–5371.
93. Forsberg, L.S. & Carlson, R.W. (2008). Structural characterization of the primary O-antigenic polysaccharide of the *Rhizobium leguminosarum* 3841 lipopolysaccharide and identification of a new 3-acetimidoylamino-3-deoxyhexuronic acid glycosyl component: a unique O-methylated glycan of uniform size, containing 6-deoxy-3-O-methyl-D-talose, N-acetylquinovosamine, and rhizoaminuronic acid (3-acetimidoylamino-3-deoxy-D-gluco-hexuronic acid). *Journal of Biological Chemistry*. 283(23), 16037–16050.
94. Forsberg, L.S., Noel, K.D., Box, J. & Carlson, R.W. (2003). Genetic locus and structural characterization of the biochemical defect in the O-antigenic polysaccharide of the symbiotically deficient *Rhizobium etli* mutant, CE166: replacement of an N-acetylquinovosamine with its hexosyl-4-ulose precursor. *Journal of Biological Chemistry*. 278(51), 51347–51359.
95. Foster, L.J.R., Moy, Y.P. & Rogers, P.L. (2000). Metal binding capabilities of *Rhizobium etli* and its extracellular polymeric substances. *Biotechnology Letters*. 22, 1757-1760.
96. Fraysse, N., Couderc, F. & Poinot, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry*, 270(7), 1365–1380.
97. Fraysse, N., Lindner, B., Kaczynski, Z., Sharypova, L., Holst, O., Niehaus, K. & Poinot, V. (2005). *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 produces a low-molecular-mass capsular polysaccharide that is a homopolymer of 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid harboring a phospholipid anchor. *Glycobiology*. 15(1), 101–108.

98. Fuchs, O., Babusiak, M., Vyoral, D. & Petrak, J. (2003). Role of zinc in eukaryotic cells, zinc transporters and zinc-containing proteins. *Sborník Lékařský*. 104(2), 157-170.
99. Fujihara, S. & Yoneyama, T. (1993). Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean *Rhizobia fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(4), 1104-1109.
100. 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.
101. Gabbianelli, R., Scotti, R., Ammendola, S., Petrarca, P., Nicolini, L. & Battistoni, A. (2011). Role of ZnuABC and ZinT in *Escherichia coli* O157:H7 zinc acquisition and interaction with epithelial cells. *BMC Microbiology*. 11, 36.
102. Gadd, G.M. & White, C. (1989). Uptake and intracellular compartmentation of thorium in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental Pollution*. 61(3), 187-197.
103. Gadd, G.M. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*. 122(1-2), 109-119.
104. Gadd, G.M. (2009). Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 84(1), 13-28.
105. Gao, X., Xin, W., Ran, Y. (2012). Effects of heavy metal accumulation on soil enzyme activities. *Asian Journal of Ecotoxicology*. 7(3), 331-336.
106. Geiger, O., Weissborn, A.C. & Kennedy, E.P. (1991). Biosynthesis and excretion of cyclic glucans by *Rhizobium meliloti* 1021. *Journal of Bacteriology*. 173(9), 3021-3024.
107. Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Ceragioli, M., Beecher, D.J., Senesi, S. & Wong, A.C. (2007). Swarming behaviour of and hemolysin BL secretion by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(12), 4089-4093.
108. Ghosh, P.K. & Maiti, K.M. (2016). Structure of extracellular polysaccharides (EPS) produced by rhizobia and their functions in legume-bacteria symbiosis: — A review. *Achievements in the Life Science*. 10(2), 136-143.
109. Gibson, K.E., Kobayashi, H. & Walker, G.C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics*, 42, 413-441.
110. Giller, K.E., Witter, E. & 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), 273-278.
111. Gil-Serrano, A. M., Rodriguez-Carvajal, M. A., Tejero-Mateo, P., Espartero, J. L., Menendez, M., Corzo, J., Ruiz-Sainz, J. E. & Buendi'a- Claveri'a, A. M. (1999). Structural determination of a 5-acetamido-3,5,7,9-tetra-deoxy-7-(3-hydroxybutyramido)-L-glycero-L-manno-nonulosonic acid-containing homopolysaccharide isolated from *Sinorhizobium fredii* HH103. *Biochemical Journal*. 342(3), 527-535.
112. Giovanella, P., Cabral, L., Costa, A.P., de Oliveira Camargo, F.A., Gianello, C. & Bento, F.M. (2017). Metal resistance mechanisms in Gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 140, 162-169.

113. Glick, B.R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*. 28(3), 367-374.
114. Graham, A.I., Hunt, S., Stokes, S.L., Bramall, N., Bunch, J., Cox, A.G., McLeod, C.W. & Poole, R.K. (2009). Severe zinc depletion of *Escherichia coli*: roles for high affinity zinc binding by ZinT, zinc transport and zinc-independent proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 284(27), 18377–18389.
115. Graham, P.H. & Vance, C.P. (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, 65(2-3), 93-106.
116. Grass, G., Franke, S., Taudte, N., Nies, D.H., Kucharski, L.M., Maguire, M.E. & Rensing, C. (2005). The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *Journal of Bacteriology*. 187(5). 1604–1611.
117. Grass, G., Wong, M.D., Rosen, B.P., Smith, R.L. & Rensing, C. (2002). ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 184(3), 864–866.
118. Gueriot, M.L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1465(1-2), 190–198.
119. Guezennec, J. (2002). Deep-sea hydrothermal vents: A new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest? *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 29(4), 204-208.
120. Gupta, P. & Diwan, B. (2006). Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*. 13, 58-71.
121. Hantke, K. (2005). Bacterial zinc uptake and regulators. *Current Opinion in Microbiology*. 8(2), 196–202.
122. 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.
123. Harrison, J.J., Ceri, H., Stremick, C. & Turner, R.J. (2004). Differences in biofilm and planktonic cell mediate reduction of metalloids. *FEMS Microbiology Letters*. 235(2), 357-362.
124. Harshey, M.R. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology*. 57, 249–73.
125. Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D. & Young, I.M. (2009). Rhizosphere: Biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil*. 321(1-2), 117-152.
126. Holleman, A.F. & Wiberg, E. (1985). *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Von Hollemann-Wiberg. Walter de Gruyter Verlag & Co. Berlin – New York.
127. Hori, K. & Matsumoto, S. (2010). Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*. 48(3), 424-434.
128. Hungria, M. & Vargas, M. A. T. (2000). Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*. 65(2), 151-164.
129. Hussein, Y.A., Tewfik, M.S. & Hamdi, Y.A. (1974). Degradation of certain aromatic compounds by rhizobia. *Soil Biology and Biochemistry*. 6(6), 377-381.

130. Ialelou, F.S., Shafagh-Kolvanagh, J. & Fateh, M. (2013). Effect of various concentrations of zinc on chlorophyll, starch, soluble sugars and proline in naked pumpkin (*Cucurbita pepo*). *International Journal of Farming and Allied Sciences*. 2(24), 1198-1202.
131. Ibekwe, A.M., Angle, J.S., Chaney, R.L. & van Berkum, P. (1995). Sewage sludge and heavy metal effects on nodulation and nitrogen fixing legumes. *Journal of Environmental Quality*. 24(6), 1199-1204.
132. Ivashina, T. & Ksenzenko, V.N. (2012). Exopolysaccharide biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*: from genes to functions. W: The complex world of polysaccharides, InTech: Rijeka, Croatia, s. 99 – 127.
133. Ivashina, T.V., Fedorova, E.E., Ashina, N.P., Kalinchuk, N.A., Druzhinina, T.N., Shashkov, A.S., Shibaev, V.N. & Ksenzenko, V.N. (2010). Mutation in the *pssM* gene encoding ketal pyruvate transferase leads to disruption of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*-*Pisum sativum* symbiosis. *Journal of Applied Microbiology*. 109(2), 731-742.
134. Iyer, A., Mody, K. & Jha, B. (2004). Accumulation of hexavalent chromium by an exopolysaccharide producing marine *Enterobacter cloacae*. *Marine Pollution Bulletin*. 49(11-12), 974-977.
135. Iyer, A., Mody, K. & Jha, B. (2005). Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Marine Pollution Bulletin*. 50(3), 340-343.
136. Janczarek, M. & Skorupska, A. (2007). The *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* RosR: transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20(7), 867–881.
137. 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.
138. Janczarek, M., Jaroszuk-Ścisieł, J. & Skorupska, A. (2009). Multiple copies of *rosR* and *pssA* genes enhance exopolysaccharide production, symbiotic competitiveness and clover nodulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 96(4), 471–486.
139. Janczarek, M., Kutkowska, J., Piersiak, T. & Skorupska, A. (2010). *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosRis* required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment. *BMC Microbiology*. 10, 284.
140. Janczarek, M., Rachwał, K., Cieśla, J., Ginalska, G. & Bieganski, A. (2015). Production of exopolysaccharide by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in bacterial attachment and surface properties. *Plant and Soil*. 388(1-2), 211–227.
141. Janczarek, M., Rachwał, K., Marzec, A., Grądziel, J. & Palusińska-Szys, M. (2014). Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. *Applied Soil Ecology*, 85, 94-113.
142. Jaszek, M., Janczarek, M., Kuczyński, K., Piersiak, T. & Grzywnowicz, K. (2014). The response of the *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* wild-type and exopolysaccharide-deficient mutants to oxidative stress. *Plant and Soil*. 376, 75–94.

143. Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E. & Walker, G.C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 619-633.
144. Józefaciuk, G. & Szatanik-Kloc, A. (2004). Decrease in variable charge and acidity of root surface under Al treatment are correlated with Al tolerance of cereal plants. *Plant and Soil*. 260(1), 137-145.
145. Kabata-Pendias, A. (2002). Biochemia cynku. *Zeszyty Naukowe PAN „Człowiek i Środowisko”*. 33, 11-18.
146. Kaiya, S., Utsunomiya, S., Suzuki, S., Yoshida, N., Futamata, H., Yamada, T. & Hiraishi, A. (2012). Isolation and functional gene analyses of aromatic-hydrocarbon-degrading bacteria from a polychlorinated-dioxin-dechlorinating process. *Microbes and Environment*. 27(2), 127-135.
147. Kajić, S., Hulak, N. & Sikora, S. (2016). Environmental stress response and adaptation mechanisms in rhizobia. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 81(1), 15-19.
148. Kannerberg, E. L., Reuhs, B. L., Forsberg, L. S., & Carlson, R. W. (1998). In: *The Rhizobiaceae* (Spaink, H. P., Kondorosi, A., and Hooykaas, P. J., eds), str.119–154, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
149. Katsuraya, K., Okuyama, K., Hatanaka, K., Oshima, R., Sato, T. & Matsuzaki, K. (2003). Constitution of konjac glucomannan: chemical analysis and ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*. 53(2), 183-189.
150. Kershaw, C.J., Brown, N.L. & Hobman, J.L. (2007). Zinc dependence of *zinT* (*yodA*) mutants and binding of zinc, cadmium and mercury by ZinT. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 364(1), 66–71.
151. Keum, Y.S., Seo, J.S., Hu, Y.T. & Li, Q.X. (2006). Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71(6), 935-941.
152. Khan, M. & Scullion, J. (2002). Effects of metal (Cd, Cu, Ni, Pb or Zn) enrichment of sewage-sludge on soil microorganisms and their activities. *Applied Soil Ecology*. 20(2), 145–150.
153. Kimball, B.A., Runkel, R.L. & Walton-Day, K. (2010). An approach to quantify sources, seasonal change, and biogeochemical processes affecting metal loading: facilitating decisions for remediation of mine drainage. *Applied Geochemistry*, 25(5), 728–740.
154. Koechler, S., Farasin, J., Cleiss-Arnold, J. & Arsene-Ploetze, F. (2015). Toxic metal resistance in biofilms: Diversity of microbial responses and their evolution. *Research in Microbiology*. 166(10), 764-7730.
155. Komaniecka, I. & Choma, A. (2008). Peryplazmatyczne β-glukany bakterii Gram-ujemnych. *Postępy Mikrobiologii*. 47(1), 35-42.
156. Kopycińska, M., Lipa, P., Cieśla, J., Kozieł, M. & Janczarek, M. (2018). Extracellular polysaccharide protects *Rhizobium leguminosarum* cells against zinc stress in vitro and during symbiosis with clover. *Environmental Microbiology Reports*. 10(3), 355–368.
157. Kosolapov, D.B., Kusch, P., Vainshtein, M.B., Vatsourina, A.V., Wiebner, A., Kastner, M. & Muller, R.A. (2004). Microbial processes of heavy metal removal from

- carbon-deficient effluents in constructed wetlands. *Engineering in Life Sciences*, 4(5), 403–411.
158. Kramer, P.J. & Boyer, J.S. (1995). Water relations of plant and soils. Academic Press, New York.
159. Krehenbrink, M., Edwards, A. & Downie, J.A. (2011). The superoxide dismutase SodA is targeted to the periplasm in a SecA-dependent manner by a novel mechanism. *Molecular Microbiology*. 82(1), 164-179.
160. Król, J.E., Mazur, A., Marczak, M. & Skorupska, A. (2007). Syntenic arrangements of the surface polysaccharide biosynthesis genes in *Rhizobium leguminosarum*. *Genomics*. 89(2), 237-47.
161. Kucho K., Hay A-E., & Normand, P. (2010) The Determinants of the Actinorhizal Symbiosis. *Microbes and Environments*. 25(4), 241-252.
162. Kurchak, O. N., Provorov, N. A. & Simarov, B. V. (2001). Plasmid pSym1-32 of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Controlling Nitrogen Fixation Activity, Effectiveness of Symbiosis, Competitiveness and Acid Tolerance. *Russian Journal of Genetics*. 37, 1025 – 1031.
163. Lakzian, A., Murphy, P., Turner, A., Beynon, J.L. & Giller, K.E. (2002). *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biology and Biochemistry*. 34(4), 519–529.
164. Laus, M.C., Brussel, A.A. & Kijne, J.W. (2005). Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18(6), 533–538.
165. Laus, M.C., Logman, T.J., Lamers, G.E., Van Brussel, A.A., Carlson, R.W. & Kijne, J.W. (2006). A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Molecular Microbiology*. 59(6), 1704–1713.
166. Le Quéré, A.J., Deakin, W.J., Schmeisser, C., Carlson, R.W., Streit, W.R., Broughton, W.J. & Forsberg, L.S. (2006). Structural characterization of a K-antigen capsular polysaccharide essential for normal symbiotic infection in *Rhizobium* sp. NGR234: deletion of the *rkpMNO* locus prevents synthesis of 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetra-deoxy-non-2-ulonic acid. *Journal of Biological Chemistry*. 281(39), 28981-28992.
167. Lepek, V.C. & D'Antuono, A.L (2005). Bacterial surface polysaccharides and their role in the rhizobia–legume association. *Lotus Newsletter*. 35(1), 93–105.
168. Lerouge, I. & Vanderleyden, J. (2002). O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant–microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews*. 26(1), 17–47.
169. Li, Y., Liang, F., Zhu, Y.F. & Wang, F. (2013). Phytoremediation of a PCB-contaminated soil by alfalfa and tall fescue single and mixed plants cultivation. *Journal of Soils and Sediments*. 13(5), 925-931.
170. Lima de Silva, A.A., de Carvalho, M.A., de Souza, S.A., Dias, P.M., da Silva Filho, R.G., de Meirelles Saramago, C.S., de Melo Bento, C.A. & Hofer, E. (2012). Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolated from sewage. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43(4), 1620-1631.

- 171.Lima, A.I.G., Pereira, S.I.A. & Figueira, E.M.A.P. (2006). Cadmium detoxification in roots of *Pisum sativum* seedlings: relationship between toxicity levels, thiol pool alterations and growth. *Environmental and Experimental Botany*. 55(1-2), 149-162.
- 172.Liu, H. & Fang, H.H.P. (2002). Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnology and Bioengineering*. 80(7), 806-811.
- 173.Liu, Y., Ding, K. & Wang, R. (2009). Effects of Cu and butachlor on soil respiration. *Journal of anhui agricultural sciences*. 37(36), 18073–18074.
- 174.Loaëc, M., Olier, R. & Guezennec, J. (1997). Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Research*. 31(5), 1171-1179.
- 175.Loaëc, M., Olier, R. & Guezennec, J. (1998). Chelating properties of bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydrate Polymers*. 35(1-2), 65-70.
- 176.Loewus, F.A. (1952). Improvement in the anthrone method for determination of carbohydrates. *Analytical Chemistry*. 24(1), 219-219.
- 177.Long, S.R. (1996). *Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell*,8(10), 1885-1898.
- 178.Lopez-Baena, F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Rodriguez-Carvajal, M.A. & Vinardell, J.M. (2016). Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii* - soybean symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(5), 755.
- 179.López-Guerrero, M.G., Ormeño-Orrillo, E., Acosta, J.L., Mendoza-Vargas, A., Rogel, M.A., Ramírez, M.A., Rosenblueth, M., Martínez-Romero, J. & Martínez-Romero, E. (2012). Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. *Plasmid*. 68(3), 149–158.
- 180.Luciński, R., Polcyn, W. & Ratajczak, L. (2002). Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. *Acta Biochimica Polonica*. 49(2), 537-546.
- 181.Ma, Y., Oliveira, R.S., Freitas, H. & Zhang, C. (2016). Biochemical and molecular mechanisms of plant microbe-metal interactions: relevance for phytoremediation. *Frontiers in Plant Science*. 7, 918.
- 182.Macció, D., Fabra, A. & Castro, S. (2002). Acidity and calcium interaction affect the growth of *Bradyrhizobium* sp. and attachment to peanut roots. *Soil Biology and Biochemistry*. 34(2), 201-208.
- 183.Macdonald, C.A., Clark, I.M., Hirsch, P.R., Zhao, F.J. & McGrath, S.P. (2011). Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Rhizobium leguminosarum* bacteria and discrimination between different biovars in zinc-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(13), 4626–4633.
- 184.Macfarlane, S., Hopkins, M.J. & Macfarlane, G.T. (2001). Toxin synthesis and mucin breakdown are related to swarming phenomenon in *Clostridium septicum*. *Infection and Immunity*. 69(2), 1120–1126.
- 185.Mandal, S.M., Dey, S., Ray, B. & Pati, B.R. (2007) Production and composition of extracellular polysaccharide synthesized by a *Rhizobium* isolate of *Vigna mungo* (L.) Hepper. *Biotechnology Letters*. 29(8), 1271–1275.

186. Mandal, S.M., Pati, B.R., Das, A.K. & Ghosh, A.K. (2008). Characterization of a symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic: isolated from the root nodules of *Vigna mungo* (L.) Hepper grown in an arsenic-contaminated field. *Journal of General and Applied Microbiology*. 54(2), 93–99.
187. Marczak, M., Mazur, A., Koper, P., Żebracki, K. & Skorupska A. (2017). Synthesis of rhizobial exopolysaccharides and their importance for symbiosis with legume plants. *Genes*, 8(12), 360.
188. Margaret-Oliver, I., Lei, W., Parada, M., Rodriguez-Carvajal, M.A., Crespo-Rivas, J.C., Hidalgo, A., Gil-Serrano, A., Moreno, J., Rodríguez-Navarro, D.N., Buendía-Clavería, A., Ollero, J., Ruiz-Sainz, J.E. & Vinardell, J.M. (2012). *Sinorhizobium fredii* HH103 does not strictly require KPS and/or EPS to nodulate *Glycyrrhiza uralensis*, an indeterminate nodule-forming legume. *Archives of Microbiology*. 194(2), 87–102.
189. Marklund, S. & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 47(3), 469-474.
190. Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X. & Batut, J. (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology*, 17(10), 458-466.
191. Matthyse, A.G. & Kijne, J.W. (1998). Attachment of *Rhizobiaceae* to plant cells. In: Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P.J.J. (Eds.), *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Plant-Associated Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, str. 235–249.
192. Mauchline, T.H., Fowler, J.E., East, A.K., Sartor, A.L., Zaheer, R., Hosie, A.H., Poole, P.S. & Finan, T.M. (2006). Mapping the *Sinorhizobium meliloti* 1021 solute-binding protein-dependent transportome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(47), 17933-17938.
193. Mazur, A., Stasiak, G., Wielbo, J., Koper, P., Kubik-Komar, A. & Skorupska, A. (2013). Phenotype profiling of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* clover nodule isolates reveal their both versatile and specialized metabolic capabilities. *Archives of Microbiology*, 195(4), 255–267.
194. McDevitt, C.A., Ogunniyi, A.D., Valkov, E., Lawrence, M.C., Kobe, B., McEwan, A. G. & Paton, J.C. (2011). A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc. *PLoS Pathogens*, 7(11), e1002357.
195. McGrath, S.P., Chaudri, A.M. & Giller, K.E. (1995). Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 14(2), 94–104.
196. McNeil, M., Darvill, J., Darvill, A.G. & Albersheim, P. (1986). The discernible structural features of the acidic polysaccharides secreted by different *Rhizobium* species are the same. *Carbohydrate Research*. 146, 307-326.
197. Mendrygal, K.E. & Gonzalez, J.E. (2000). Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*. 182(3), 599-606.

198. Merz, A.J., So, M. & Sheetz, M.P. (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature*. 407(6800):98-102.
199. Miguel, D.L. & Moreira, F.M.S. (2002). Influência do pH do meiodectivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 25(4), 873-883.
200. Mirshekali, H., Hadi, H., Amirnia, R. & Khodaverdilo, H. (2012). Effect of zinc toxicity on plant productivity, chlorophyll and Zn contents of sorghum (*Sorghum bicolor*) and common lambsquarter (*Chenopodium album*). *International Journal of Agriculture: Research and Review*. 2(3), 247-254.
201. Mithöfer, A. (2002). Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis. *TRENDS in Plant Science*. 7(10), 440-444.
202. Mithöfer, A., Bhagwat, A.A., Feger, M. & Ebel, J. (1996). Suppression of fungal β -glucan-induced plant defence in soybean (*Glycine max* L.) by cyclic 1,3-1,6- β -glucans for the symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *Planta*. 199, 270-275.
203. Mohammadi, K., Sohrabi, Y., Heidari, G., Khalesro, S. & Majidi M. (2012). Effective factors on biological nitrogen fixation. *African Journal of Agricultural Research*. 7(12): 1782-1788.
204. Mohite, B.V., Koli, S.H., Narkhede, C.P., Patil, S.N. & Patil, S.V. (2017). Prospective of Microbial Exopolysaccharide for Heavy Metal Exclusion. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 183(2), 582-600.
205. Moppert, X., Le Costaouec, T., Raguene, 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.
206. More, T.T., Yadav, J.S., Yan, S., Tyagi, R.D. & Surampalli, R.Y. (2014). Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management*. 144, 1-25.
207. Morillo-Pérez, J.A., Garcia-Ribera, R., Quesada, T., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A. & Monteoliva-Sanchez, M. (2008). Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24(11), 2699-2704.
208. Mozes, N., Léonard, A.J. & Rouxhet, P.G. (1988). On the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 945(2), 324-334.
209. Muszyński, A., Laus, M., Kijne, J.W. & Carlson, R.W. (2011). The structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium leguminosarum* RBL5523 and its UDP-glucose dehydrogenase mutant (*exo5*). *Glycobiology*. 21(1), 55-68.
210. Navarrete, F. & De La Fuente, L. (2014). Response of *Xylella fastidiosa* to zinc: Decreased culturability, increased exopolysaccharide production, and formation of resilient biofilms under flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(3), 1097-1107.

211. Nederlof, M.M., De Wit, J.C., Riemsdijk, W.H. & Koopal, L.K. (1993). Determination of proton affinity distributions for humic substances. *Environmental Science & Technology*. 27(5), 846-856.
212. Neu, T.R. & Poralla, K. (1990). Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 32(5), 521-525.
213. Nicolaus, B., Kambourova, M & Oner, E.T. (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environmental Technology*. 31(10), 1145-1158.
214. Nies, D.H. (1992). Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes. *Plasmid*. 27(1), 17-28.
215. Nies, D.H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Review*. 27(2-3), 313-339.
216. Niste, M., Vidican, R., Pop, R. & Rotar, I. (2013). Stress factors affecting symbiosis activity and nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured in vitro. *ProEnvironment/ProMediu*. 6(13): 42-45.
217. Noel, K.D., Forsberg, L.S. & Carlson, R.W. (2000). Varying the abundance of O antigen in *Rhizobium etli* and its effect on symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Bacteriology*. 182(19), 5317-5324.
218. Nogales, J., Bernabeu-Roda, L., Cuellar, V. & Soto, M.J. (2012). ExpR is not required for swarming but promotes sliding in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*. 194(8), 2027-2035.
219. Nogales, J., Dominguez-Ferreras, A., Amaya-Gomez, C.V., van Dillewijn, P., Cuellar, V., Sanjuan, J., Oliveras, J. & Soto, M.J. (2010). Transcriptome profiling of a *Sinorhizobium meliloti fadD* mutant reveals the role of rhizobactin 1021 biosynthesis and regulation genes in the control of swarming. *BMC Genomics*. 11, 157.
220. Ociepa-Kubicka, A. & Ociepa, E. (2012). Toksyczne oddziaływanie metali ciężkich na rośliny, zwierzęta i ludzi. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, 15(2), 169-180.
221. Oladele, E.O., Odeigah, P.G.C. & Taiwo, I.A. (2013). The genotoxic effect of lead and zinc on bambara groundnut (*Vigna subterranean*). *African Journal of Environmental Science and Technology*. 7(1), 9-13.
222. Oldroyd, G.E., Murray, J.D., Poole, P.S. & Downie, J.A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*. 45(1), 119-144.
223. Oremland, R.S. & Stolz, J.F. (2003). The ecology of arsenic. *Science*. 300(5631), 939-944.
224. Outten, C.E., O'Halloran, T.V. (2001). Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*. 292(5526), 2488-2492.
225. Overhage, J., Bains, M., Brazas, M.D. & Hancock, R.E. (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*. 190(8), 2671-2679.

226. Ow, D.W. (1993). Phytochelatin-mediated cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 29(4), 213–219.
227. Pal, A. & Paul, A.K. (2008). Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 48(1), 49–64.
228. Panina, E.M., Mironov, A.A. & Gelfand, M.S. (2003). Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(17), 9912–9917.
229. Park, D., Yun, Y.S. & Park, J.M. (2010). The past, present, and future trends of biosorption. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 15(1), 86–102.
230. Patel, A. & Prajapati, J.B. (2013). Food and Health Applications of Exopolysaccharides produced by Lactic acid Bacteria. *Advances in Dairy Research*. 1:2.
231. Patzer, S., & Hantke, K. (1998). The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 28(6), 1199–1210.
232. Patzer, S.I. & Hantke, K. (2000). The zinc-responsive Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 275(32), 24321–24332.
233. Pereira, S.I., Lima, A.I. & Figueira, E.M. (2006). Screening possible mechanisms mediating cadmium resistance in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from contaminated Portuguese soils. *Microbial Ecology*. 52(2), 176–186.
234. Petrarca, P., Ammendola, S., Pasquali, P. & Battistoni, A. (2010). The Zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage. *Journal of Bacteriology*. 192(6), 1553–1564.
235. Phadtare, S., Yamanaka, K. & Inouye, M. (2000). The cold shock response. In G. Storz & R. Hengge-Aronis (ed.). *Bacterial Stress Response*. ASM Press, Washington, D.C. str. 33–45.
236. Philip-Hollingsworth, S., Hollingsworth, R.I. & Dazzo, F.B. (1989). Host-range related structural features of the acidic extracellular polysaccharides of *Rhizobium trifolii* and *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Biological Chemistry*. 264(3), 1461–1466.
237. Planchon, M., Jittawuttipoka, T., Cassier-Chauvat, C., Guyot, F., Chauvat, F. & Spalla, O. (2013). Influence of exopolysaccharides on the electrophoretic properties of the model cyanobacterium *Synechocystis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 110, 171–177.
238. Poolman, B., Blount, P., Folgering, J. H. A., Friesen, R. H. E., Moe, P.C. & van der Heide, T. (2002). How do Membrane Proteins Sense Water Stress? *Molecular Microbiology*. 44(4), 899 – 902.
239. Poonthrigpun, S., Pattaragulwanit, K., Paengthai, S., Kriangkripipat, T., Juntongjin, K., Thaniyavarn, S., Petsom, A. & Pinphanichakarn, P. (2006). Novel intermediates of acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. strain CU-A1: evidence for

- naphthalene-1,8-dicarboxylic acid metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(9), 6034-6039.
240. Poortinga, A.T., Bos, R., Norde, W. & Busscher, H.J. (2002). Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface Science Reports*. 47(1), 1-32.
241. Porcheron, G., Garénaux, A., Proulx, J., Sabri, M. & Dozois, C.M. (2013). Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3, 90.
242. Postma, J., Hok-A-Hin, C.H., Schotman, J.M.T., Wijffelman, C.A. & van Veen, J.A. (1991). Population dynamics of *Rhizobium leguminosarum* Tn5 mutants with altered cell surface properties introduced into sterile and non-sterile soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(3), 649–654.
243. Potts, M. (1994). Desiccation Tolerance of Prokaryotes. *Microbiology Review*. 58(4), 755 –805.
244. Prabhakaran, P., Ashraf, M.A. & Aqma, W.S. (2016). Microbial stress response to heavy metals in the environment. *RSC Advances*. 6(111), 109862–109877.
245. Priefer, U. B., Aurag, J., Boeste, B., Bouchmouch, I., Defez, R., Filali-Maltouf, A., Miklis, M., Moawad, H., Mouhsine, B., Prell, J., Schlüter, A. & Senatore, B. (2001). Characterisation of Phaseolus Symbionts Isolated from Mediterranean Soils and Analysis of Genetic Factors Related to pH Tolerance. *Journal of Biotechnology*. 91(2-3), 223 – 236.
246. 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.
247. Qu, J., Zhan, X., Zhang, Hg., Zhou, X., Jia, Y. & Cao, Y. (2018). Identification of Cyclic β -1,2-glucan Produced under pH Control. *China Biotechnology*. 38(6), 43-51.
248. Que, N.L., Ribeiro, A.A. & Raetz, C.R. (2000). Two-dimensional NMR spectroscopy and structures of six lipid A species from *Rhizobium etli* CE3. Detection of an acyloxyacyl residue in each component and origin of the aminogluconate moiety. *Journal of Biological Chemistry*. 275(36), 28017–28027.
249. Rachwał, K., Matczyńska, E. & Janczarek, M. (2015). Transcriptome profiling of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* mutant reveals the role of the transcriptional regulator RosR in motility, synthesis of cell-surface components, and other cellular processes. *BMC Genomics*, 16, 1111.
250. Raetz, C.R., Reynolds, C.M., Trent, M.S. & Bishop, R.E. (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 76, 295–329.
251. Raetz, C.R.H. & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*. 71, 635-700.
252. Rajapaksha, R.M.C.P., Tobor-Kapłon, M.A. & Baath, E. (2004). Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently. *Applied And Environmental Microbiology*. 70(5), 2966–2973.

253. Ramalingam, B., Sekar, R., Boxall, J. B. & Biggs, C. (2013). Aggregation and biofilm formation of bacteria isolated from domestic drinking water. *Water Science Technology: Water Supply*. 13(4), 1016–1023.
254. Ratte, H.T. (2009). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18(1), 89-108.
255. Reddy, K.M., Feris, K., Bell, J., Wingett, D.G., Hanley, C. & Punnoose, A. (2007). Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied Physics Letters*, 90(213902), 2139021–2139023.
256. Redmile-Gordon, M. & Chen, L. (2017). Zinc toxicity stimulates microbial production of extracellular polymers in a copiotrophic acid soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 119, 413-418.
257. Rees D.C., Howard J.B., (2000). Nitrogenase: standing of the crossroads. *Current Opinion in Chemical Biology*. 4(5), 559-566.
258. Reeve, W.G., Tiwari, R.P., Kale, N.B., Dilworth, M.J. & Glenn, A.R. (2002). ActP controls copper homeostasis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* preventing low pH-induced copper toxicity. *Molecular Microbiology*. 43(4), 981-991.
259. Reuhs, B. L., Carlson, R. W., & Kim, J. S. (1993). *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 175(11), 3570–3580.
260. Reuhs, B. L., Geller, D. P., Kim, J. S., Fox, J. E., Kolli, V. S. K., and Pueppke, S. G. (1998). *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(12), 4930–4938.
261. Ribeiro, V.A. & Burkert C.A.V. (2016). Exopolysaccharides Produced by *Rhizobium*: Production, Composition and Rheological Properties. *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry*. 4(1), 1-6.
262. Rinaudi, L.V. & Giordano, W. (2010). An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*. 304(1), 1-11.
263. Rinaudi, L.V., & Gonzalez, J.E. (2009). The low molecular-weight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation. *Journal of Bacteriology*. 191(23), 7216–7224.
264. Rodríguez-Carvajal, M. A., Rodrigues, J. A., Soria-Díaz, M. E., Tejero-Mateo, P., Buendía-Clavería, A., Gutierrez, R., Ruiz-Sainz, J. E., Thomas-Oates, J. & Gil-Serrano, A. M. (2005). Structural Analysis of the Capsular Polysaccharide from *Sinorhizobium fredii* HWG35. *Biomacromolecules*. 6(3), 1448–1456.
265. Rodríguez-Navarro, D.N., Dardanelli, M.S. & Ruiz-Sainz, J.E. (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters*. 272(2), 127–136.
266. Rout, G.R. & Das, P. (2003). Effect of Metal Toxicity on Plant Growth and Metabolism: I. Zinc. *Agronomie*. 23(1), 3-11.
267. Russo, D.M., Williams, A., Edwards, A., Posadas, D.M., Finnie, C., Dankert, M., Downie, J.A. & Zorreguieta, A. (2006). Proteins exported via the PrsD–PrsE type I

- secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Bacteriology*. 188(12), 4474–4486.
268. Rutter, P.R. & Vincent, B. (1984). Physicochemical interactions of the substratum, microorganisms, and the fluid phase. In: Marshall, K.C. (ed.) *Microbial adhesion and aggregation*. Springer, Berlin Heidelberg, New York. str. 21-38.
269. Sadler, W.R. & Trudinger, P.A. (1967). The inhibition of microorganisms by heavy metals. *Mineral. Deposita*. 2, 158–168.
270. Santamaría, M., Díaz-Marrero, A., 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.
271. Santi, C., Bogusz, D. & Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals Botany*, 111(5), 743-767.
272. Sa-Pereira, P., Rodrigues, M., Videira e Castro, I. & Simoes, F. (2007). Identification of an arsenic resistance mechanism in rhizobial strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(10), 1351-1356.
273. Schmid, J., Sieber, V. & Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*. 6, 496.
274. Schue, M., Fekete, A., Ortet, P., Brutesco, C., Heulin, T., Schmitt-Kopplin, P., Achouak, W. & Santaella, C. (2011). Modulation of metabolism and switching to biofilm prevail over exopolysaccharide production in the response of *Rhizobium alamii* to cadmium. *PLoS One*. 6e:26771.
275. Scott, J.A., Sage, G.K., Palmer, S.J. & Powell, D.S. (1986). Cadmium adsorption by bacterial capsular polysaccharide coatings. *Biotechnology Letters*. 8(10), 711-714.
276. Senesi, S., Salvetti, S., Celandroni, F. & Ghelardi, E. (2010). Features of *Bacillus cereus* swarm cells. *Research in Microbiology*. 161(9), 743–749.
277. Sharma, S.K., Gautam, N. & Atri, N.S. (2015). Optimization, Composition, and Antioxidant Activities of Exo- and Intracellular Polysaccharides in Submerged Culture of *Cordyceps gracilis* (Grev.) Durieu & Mont. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 462864.
278. Shi, W. & Ma, X. (2017). Effects of heavy metal Cd pollution on microbial activities in soil. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 24(4), 722–725.
279. Siebielec, G., Smreczak, B., Klimkowicz-Pawlas, A., Maliszewska-Kordybach, B., Terelak, H., Koza, P., Łysiak, M., Gałązka, R., Pecio, M., Suszek, B., Miturski, T. & Hryńczuk, B. (2012). Monitoring chemizmu gleb ornych w Polsce w latach 2010-2012. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa.
280. Silver, S. & Walderhaug, M. (1992). Gene regulation of plasmid- and chromosomal-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiological Reviews*. 56(1), 195-228.
281. Singh P., Rajput R.S., Ram R.M., Singh H.B. (2019). A Deeper Insight into the Symbiotic Mechanism of *Rhizobium* spp. from the Perspective of Secondary Metabolism. In: Singh H., Keswani C., Reddy M., Sansinenea E., García-Estrada C. (eds) *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms*. Springer, Singapore.

282. Singh, R., Paul, D. & Jain, R.K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology*. 14(9), 389-397.
283. Singh, S., Kayastha, A.M., Asthana, R.K. i in. (2001). Response of *Rhizobium leguminosarum* to nickel stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17(7), 667-672.
284. Skorupska, A., Janczarek, M., Marczak, M., Mazur, A. & Król, J. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: Genetic control and symbiotic functions. *Microbial. Cell Factories*. 5(7), 1-19.
285. Slaveykova, V.I., Parthasarathy, N., Dedieu, K. & Toescher, D. Role of extracellular compounds in Cd-sequestration relative to Cd uptake by bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Environmental Pollution*. 158(8), 2561-2565.
286. Smith, S.R. & Giller, K.E. (1992). Effective *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* present in five soils contaminated with heavy metals from long-term application of sewage sludge or metal mine spoil. *Soil Biology and Biochemistry*. 24(8), 781-788.
287. Smith, S.R. (1997). *Rhizobium* in soils contaminated with copper and zinc following the long-term application of sewage sludge and other organic wastes. *Soil Biology and Biochemistry*. 29(9-10), 1475-1489.
288. Somasegaran, P. & Hoben, H. J. (1994). Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-Rhizobium Technology. Springer, New York.
289. Sorroche, F.G., Spesia, M.B., Zorreguieta, A. & Giordano, W.A. (2012). A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(12), 4092-4101.
290. Soto, M.J., Fernandez-Pascual, M., Sanjuan, J., (2002). A *fadD* mutant of *Sinorhizobium meliloti* shows multicellular swarming migration and is impaired in nodulation efficiency on alfalfa roots. *Molecular Microbiology*. 43(2), 371-382.
291. Sriprang, R., Hayashi, M., Yamashita, M. Ono, H., Saeki, K. & Murooka, Y. (2002). A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. *Journal of Biotechnology*. 99(3), 279-293.
292. Stasiak, G., Mazur, A., Koper, P., Żebracki, K. & Skorupska, A. (2016). Symbioza rizobiów z roślinami bobowatymi (Fabaceae). *Postępy Mikrobiologii*, 55(3), 289-299.
293. Stravinskiene, V. & Racaite, M. (2014). Impact of cadmium and zinc on the growth of white clover (*Trifolium repens* L.) shoots and roots. *Polish Journal of Environmental Studies*. 23(4), 1355-1359.
294. Sun, X.H., Teng, Y., Luo, Y.M., Tu, C. & Li, Z. (2011). Accumulation, distribution and chemical speciation of PCBs in different parts of alfalfa. *Soils*. 43. 595-599.
295. Sworn, G. & Kerdvaid, E.A. (2012). Comparison of the Rheological Properties of Succinoglycan with Xanthan Gum, In: Gums and Stabilisers for the Food Industry 16, Ed: Williams PA, Phillips GO, str. 89-98, Royal Society of Chemistry, Great Britain.
296. Szewczuk-Karpisz, K., Wisniewska, M., Pac, M., Choma, A. & Komaniecka, I. (2014). *Sinorhizobium meliloti* 1021 exopolysaccharide as a flocculant improving chromium(III) oxide removal from aqueous solutions. *Water, Air, & Soil Pollution*. 225, 2052.

297. Tambalo, D.D., Yost, C.K. & Hynes, M.F. (2010). Characterization of swarming motility in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *FEMS Microbiology Letters*. 307(2), 165-174.
298. Taylor, T.B. & Buckling, A. (2010). Competition and dispersal in *Pseudomonas aeruginosa*. *The American Naturalist*. 176(1), 83–89.
299. Teng, Y., Wang, X., Li, L., Li, Z. & Luo, Y. (2015). Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. *Frontiers in Plant Science*. 6, 32.
300. Tiwari, R.P., Reeve, W.G., Dilworth, M.J. & Glenn, A.R. (1996). Acid tolerance in *Rhizobium meliloti* strain WSM419 involves a two component sensor regulator system. *Microbiology*. 142(7), 1693-1704.
301. Truta, E.C., Gherghel, D.N., Bara, I.C.I. & Vochita, G. (2013). Zinc-induced genotoxic effects on root meristems of barley seedlings. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanica Cluj-Napoca*. 41(1), 150-156.
302. Tsonev, T. & Lidon, F.C. (2012). Zinc in plants – An Overview. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 24(3), 322-333.
303. Tu, C., Teng, Y., Luo, Y.M., Li, X., Sun, X., Li, Z., Liu, W. & Christie, P. (2011). Potential for biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Hazardous Materials*. 186(2-3), 1438-1444.
304. Turkiewicz, M. & Czub, W. (1997). Kurdlan - struktura, właściwości, wykorzystanie. *Biotechnologia*. 38, 16-26.
305. Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W. & Zehnder, A.J.B. (1989). Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microbial Ecology*. 17(1), 1–15.
306. Van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W. & Zehnder, A.J.B. (1990a). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiology Reviews*. 54(1), 75–87.
307. Van Loosdrecht, M.C.M., Norde, W., Lyklema, J. & Zehnder, A.J.B. (1990b). Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion. *Aquatic Sciences*. 52, 103–114.
308. Van Oss, C.J., Chaudhury, M.K. & Good, R.J. (1987). Monopolar surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*. 28, 35-64.
309. Vassilev, A., Nikolova, A., Koleva, L. & Lidon, F.C. (2011). Effects of excess Zn on growth and photosynthetic performance of young bean plants. *Journal of Phytology*. 3(6), 58-62.
310. Velázquez, E., Palomo, J.L., Rivas, R., Guerra, H., Peix, A., Trujillo, M.E., Garcia-Benavides, P., Mateos, P.F., Wabiko, H. & Martinez-Molina, E. (2010). Analysis of core genes supports the reclassification of strains *Agrobacterium radiobacter* K84 and *Agrobacterium tumefaciens* AKE10 into the species *Rhizobium rhizogenes*. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(5), 247–251.
311. Venkatachalam, G., Nandakumar, V., Suresh, G. & Doble, M. (2014). Characterization and applications of cyclic β -(1,2)-glucan produced from *R. meliloti*. *RSC Advances*. 4(22), 11393.
312. Ventrino, V., Caputo, R., De Pascale, S., Fagnano, M., Pepe, O. & Moschetti, G. (2012). Response to salinity stress of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains in the presence of different legume host plants. *Annals of Microbiology*. 62(2), 811-823.

313. Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J. & Michiels, J. (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiology*. 16(10), 496–506.
314. Vesssey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. *Plant and Soil*. 255(2). 571-586.
315. Vieira, R.H.S.F. & Volesky, B. (2010). Biosorption: a solution to pollution? *International Microbiology*. 3(1), 17-24.
316. Vijayaraghavan, K., Padmesh, T.V., Palanivelu, K. & Velan, M. (2006). Biosorption of nickel(II) ions onto *Sargassum wightii*: application of two-parameter and three-parameter isotherm models. *Journal of Hazardous Materials*. 133(1-3), 304-308.
317. Vincent, J.M. (1970). A manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. W: International Biological Program Handbook no 15, Blackwell Scientific Publications Ltd.: Oxford, UK.
318. Volesky, B. (2007). Biosorption and me. *Water Research*. 41(18), 4017-4029.
319. Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J. & Ivanova, E.P. (2009). Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules*. 14(7), 2535-2554.
320. Wang, D., Hosteen, O. & Fierke, C.A. (2012) ZntR-mediated transcription of *zntA* responds to nanomolar intracellular free zinc. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 111, 173-181.
321. Wang, L., Yang, J., Chen, Z., Liu, X. & Ma, F. (2013). Biosorption of Pb(II) and Zn(II) by extracellular polymeric substance (EPS) of *Rhizobium Radiobacter*: equilibrium, kinetics and reuse studies. *Archives of Environmental Protection*. 39(2), 129-140.
322. 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.
323. Wani, P.A., Khan, M.S. & Zaidi, A. (2008). Chromium reducing and plant growth promoting *Mesorhizobium* improves chickpea growth in chromium amended soil. *Biotechnology Letters*. 30, 159–163.
324. Wani, P.A., Khan, M.S. (2011). Heavy metal toxicity and their remediation by soil microbes: effect of heavy metals and their detoxification by plant growth promoting rhizobacteria. LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG, Saarbrücken.
325. Weast, R. (1984). CRC, Handbook of Chemistry and Physics. Boca Raton, Florida: Chemical Rubber Company Publishing. pp. E110.
326. Wei, Y., Wang, X., Liu, J., Nememan, I., Singh, A.H., Weiss, H. & Levin, B.R. (2011). The population dynamics of bacteria in physically structured habitats and the adaptive virtue of random motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(10), 4047–4052.
327. Weir, B.S. (2016). The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobi0061>
328. Weisany, W., Raei, Y. & Allahverdipoor, K.H. (2013). Role of some mineral nutrients in biological nitrogen fixation. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. 2, 77–84.

329. Wielbo, J., Marek-Kozaczuk M, Mazur A, Kubik-Komar A, Skorupska A (2010). Genetic and metabolic divergence within a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* population recovered from clover nodules. *Applied Environmental Microbiology*. 76(14), 4593–4600.
330. Williams, A., Wilkinson, A., Krehenbrink, M., Russo, D.M., Zorreguieta, M. & Downie, J.A. (2008). Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. *Journal of Bacteriology*. 190(13), 4706–4715.
331. Wilson, W.W., Wade, M.M., Holman, S.C. & Champlin, F.R. (2001). Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods*. 43(3), 153-164.
332. Xavier, G.R., Martins, L.M., Runjanek, N.G. & Neves, M.C.P. (2007) Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição in vitro. *Caatinga*. 20(4), 1-9.
333. Xavier, G.R., Martins, L.M.V., Neves, M.C.P. & Rumjanek, N.G. (1998). Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. *Biology and Fertility of Soils*. 27(4), 386-392.
334. Yadav, S.K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance in plants. *South African Journal of Botany*. 76(2), 167-179.
335. Yura, T., Kanemori, M. & Morita, M.T. (2000). The heat shock response: regulation and function. In G. Storz & R. Hengge-Aronsis (ed.). *Bacterial Stress Response*. ASM Press, Washington, D.C. str. 3-18.
336. Zaharik, M.L., & Finlay., B.B. (2004). Mn²⁺ and bacterial pathogenesis. *Frontiers in Bioscience*. 9, 1035–1042.
337. Zahran, H.H. (1999). *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 968-989.
338. Zaidi, A., Parvaze, A.W. & Khan, M.S. (2012). Toxicity of heavy metals to Legumes and bioremediation. Springer, Pondicherry, India.
339. Zevenhuizen, L.P.T.M. & van Neerven, A.R.W. (1983). Surface carbohydrates of *Rhizobium* IV. Gel-forming capsular polysaccharide of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Carbohydrates Research*. 124(1), 166–171.
340. Zhan, H., Lee, C.C. & Leigh, J.A. (2000). Induction of second exopolysaccharide (EPS_b) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. *Journal of Bacteriology*. 173(22), 7391-7394.
341. Zhao, H., Wu, L., Chai, T., Zhang, Y., Tan, J. & Ma, S. (2012). The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *Journal of Plant Physiology*. 169(13), 1243-1252.
342. Zoroddu, M.A., Aashet, J., Crisponi, G., Medici, S., Peana, M. & Nurchi, V.M. (2019). The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 195, 120–129.

10. Spis rycin

Ryc. 1 Schemat działania kompleksu enzymatycznego nitrogenazy [opracowanie własne na podstawie publikacji Rees i Howard, 2000].	16
Ryc. 2 Obieg azotu w przyrodzie [schemat opracowany na podstawie publikacji Adamczyk i Godlewski, 2010].	17
Ryc. 3 Homeostaza cynku u <i>S. enterica</i> [opracowanie własne na podstawie publikacji Bhubhanil i in., 2014].	24
Ryc. 4 Morfologia bakterii <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> ; A) zdjęcie z mikroskopu transmisyjnego, B) zdjęcie kolonii na płytce z agarem [zdjęcia własne]	28
Ryc. 5 Schemat symbiozy pomiędzy ryzobiami a roślinami bobowatymi [opracowano na podstawie publikacji Stasiak i in., 2016; Singh i in., 2019].	30
Ryc. 6 Schemat przedstawiający lokalizację polisacharydów w komórce bakterii <i>R. leguminosarum</i> [opracowano na podstawie publikacji Lepek i D'Antuono, 2005; Laus i in., 2006].	31
Ryc. 7 Chemiczna struktura podjednostek EPS u różnych gatunków ryzobiów. A) <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> RBL5599, B) <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 248, C) EPS I <i>E. meliloti</i> Rm1021, D) EPS II <i>E. meliloti</i> Rm1021, E) <i>R. tropici</i> CIAT899, F) <i>E. meliloti</i> sp. NGR234, G) <i>B. elkanii</i> USDA76, H) <i>B. japonicum</i> USDA110; Skróty: Ac – acetyl, Gal-galaktoza, Glc – glukoza, GlcA – kwas glukuronowy, Man – mannoza, Pyr - pirogronian, Rha – ramnoza, Suc - bursztynian, [Janczarek, 2011; Marczak i in., 2017].	32
Ryc. 8 Schemat struktury cząsteczki LPS <i>R. etli</i> CE3 oraz <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841 [Forsberg i Carlson, 2008; Muszyński i in., 2011].	36
Ryc. 9 Struktura disacharydowej podjednostki CPS <i>Rhizobium</i> sp. NGR234 [Le Quéré i in., 2006].	37
Ryc. 10 Struktura cyklicznych β -(1,3)- β -(1,6)-glukanów <i>B. japonicum</i> [Breedveld i Miller, 1994].	38
Ryc. 11 Chemiczna struktura celulozy (https://www.wikiwand.com/en/Bacterial_cellulose).	40
Ryc. 12 Struktura podjednostki GPS <i>R. leguminosarum</i> ; Skróty: Gal-galaktoza, Glc-glukoza; Man-mannoza [Laus i in., 2006].	41

Ryc. 13 Wpływ metali ciężkich na rośliny oraz symbiotyczne bakterie glebowe [schemat opracowany na podstawie publikacji Zaidi i in., 2012].....	46
Ryc. 14 Mechanizmy warunkujące tolerancję metali ciężkich przez mikroorganizmy [schemat opracowany na podstawie publikacji Zaidi i in., 2012]	48
Ryc. 15 Schemat mechanizmu wiązania metali przez EPS [opracowano na podstawie Mohite i in., 2017].....	49
Ryc. 16 Rodzaje pomp zaangażowanych w transport jonów metali z cytoplazmy komórki bakterii [schemat opracowany na podstawie Bruins i in., 1999].....	50
Ryc. 17 Mechanizmy biodegradacji uczestniczące w usuwaniu metali ciężkich z wykorzystaniem układu symbiotycznego rośliny bobowate-ryzobia [opracowano na podstawie Teng i in., 2015].	54
Ryc. 18 Struktura chemiczna kurdlanu [Schmid i in., 2015]	56
Ryc. 19 Wizualizacja komórek szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> hodowanych przez 24 godz. w warunkach kontrolnych oraz w obecności 1 mM ZnSO ₄ , wykonana z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej (zielony kolor – komórki żywe, czerwony kolor – komórki martwe).	80
Ryc. 20 Wpływ jonów Zn ²⁺ na wzrost szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> : szczepu dzikiego Rt24.2 oraz jego pochodnych różniących się ilością produkowanego EPS, określony na podstawie pomiarów gęstości optycznej hodowli (OD ₆₀₀) (panel A) oraz ich wartości CFU/ml (panel B).	82
Ryc. 21 Wpływ jonów Zn ²⁺ na poziom syntezy frakcji wysokocząsteczkowej egzopolisacharydu (HMW EPS) przez szczepy <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> . Istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami ZnSO ₄ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a)...	85
Ryc. 22 Wpływ jonów Zn ²⁺ na produkcję HMW oraz LMW EPS przez szczepy <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> . Istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami ZnSO ₄ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a).....	86
Ryc. 23 Wpływ jonów Zn ²⁺ na syntezę GPS (A), CPS (B) oraz cyklicznych β -głukanów (C) przez szczepy <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> . Istotne statystycznie różnice pomiędzy	

badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami ZnSO ₄ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a).....	88
Ryc. 24 Wpływ jonów Zn ²⁺ na ilość biofilmu tworzego przez szczepy <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> . Istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami ZnSO ₄ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a).....	90
Ryc. 25 Struktura biofilmu tworzego przez szczepy <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> w warunkach kontrolnych oraz w obecności jonów Zn ²⁺	91
Ryc. 26 Agregacja komórek szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> w warunkach kontrolnych oraz w obecności jonów Zn ²⁺	93
Ryc. 27 Wpływ jonów Zn ²⁺ na ruchliwość szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> w podłożu 79CA zawierającym 0,7% oraz 0,3% agaru.	95
Ryc. 28 Wpływ jonów Zn ²⁺ na proces oddychania komórkowego szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (A-E).....	98
Ryc. 29 Wpływ jonów Zn ²⁺ na aktywność SOD wewnątrzkomórkowej (A), peryplazmatycznej (B) oraz CAT wewnątrzkomórkowej (C) szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> . Istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami ZnSO ₄ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a).....	100
Ryc. 30 Wpływ jonów Zn ²⁺ na funkcje rozkładu pozornych stałych dysocjacji powierzchniowych grup funkcyjnych $f(pK_{app})$, biorących udział w tworzeniu ładunku powierzchniowego komórek szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (A-E).	102
Ryc. 31 Wpływ jonów Zn ²⁺ na wartości średnich pozornych stałych dysocjacji ($pK_{app,ave}$) powierzchniowych grup funkcyjnych, biorących udział w tworzeniu ładunku powierzchniowego komórek szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> . Istotne statystycznie różnice pomiędzy stężeniami ZnSO ₄ dla każdego badanego szczepu zostały oznaczone różnymi literami ($\alpha=0,05$; ANOVA jednoczynnikowa; test Tukey'a).....	103
Ryc. 32 Wpływ różnych stężeń jonów Zn ²⁺ na ruchliwość elektroforetyczną komórek bakterii <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> . Istotne statystycznie różnice pomiędzy stężeniami ZnSO ₄ dla każdego badanego szczepu zostały oznaczone różnymi literami ($\alpha=0,05$; ANOVA jednoczynnikowa; test Tukey'a).	104

Ryc. 33 Zależność EM komórek bakterii <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> od ich przeżywalności.	106
Ryc. 34 Wpływ fazy wzrostu bakterii na ruchliwość elektroforetyczną komórek <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> w warunkach kontrolnych oraz w obecności 1 mM ZnSO ₄ (A-E). Dla każdego szczepu statystycznie istotne różnice między uzyskanymi wynikami zaznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukeya).....	107
Ryc. 35 Wpływ wartości pH podłoża hodowlanego na ruchliwość elektroforetyczną komórek <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> w warunkach kontrolnych oraz w obecności 1 mM ZnSO ₄ (A-E). Dla każdego szczepu statystycznie istotne różnice między uzyskanymi wynikami zaznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a).	109
Ryc. 36 Wpływ jonów Zn ²⁺ na kiełkowanie nasion koniczyny łąkowej (<i>Trifolium pratense</i>).	115
Ryc. 37 Wpływ jonów Zn ²⁺ na adhezję komórek <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> do korzeni koniczyny; B(K) – bakterie kontrolne (nie poddane działaniu jonów Zn ²⁺), B(Zn) – bakterie inkubowane w obecności 0,1 mM jonów Zn ²⁺ , K(K) – kiełki koniczyny kontrolne, K(Zn) – kiełki koniczyny inkubowane w obecności 0,1 mM jonów Zn ²⁺ . Istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi wariantami oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukeya).	117
Ryc. 38 Wpływ jonów Zn ²⁺ na efektywność infekcji korzeni koniczyny łąkowej (<i>Trifolium pratense</i>) i indukowania na nich brodawek przez bakterie <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	119
Ryc. 39 Wpływ jonów Zn ²⁺ na świeżą masę łodyg oraz korzeni roślin koniczyny inokulowanych szczepami <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> . Średnią masę łodyg i korzeni podano dla 5-tygodniowych roślin koniczyny (po 30 roślin na dany wariant). Istotne statystycznie różnice pomiędzy stężeniami ZnSO ₄ dla mierzonych parametrów oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$; ANOVA jednoczynnikowa; test Tukeya).	121
Ryc. 40 Pokrój 5-tygodniowych roślin koniczyny łąkowej inokulowanych szczepami <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> , hodowanych w warunkach kontrolnych.	122
Ryc. 41 Wykres zależności stężenia jonów Zn ²⁺ zaadsorbowanych przez EPS wyizolowany ze szczepu Rt24.2 <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> (q) od stężenia równowagowego w roztworze(c).	123

Ryc. 42 Wykres zależności ilorazu stężenia równowagowego Zn^{2+} (c) i stężenia jonów Zn^{2+} zaadsorbowanych na powierzchni EPS (q) od stężenia równowagowego jonów cynku w roztworze (c)..... 124

11. Spis tabel

Tab. 1 Znaczenie biologiczne wybranych mikroelementów oraz skutki ich niedoboru u różnych organizmów żywych [opracowanie własne na podstawie prac: Farago, 1994; Zoroddu i in., 2019].....	19
Tab. 2 Taksonomiczny podział bakterii z rodziny <i>Rhizobiaceae</i> oraz liczba gatunków w obrębie poszczególnych rodzajów [Velázquez i in., 2010; Weir, 2016].....	27
Tab. 3 Szczepy bakteryjne użyte w badaniach	59
Tab. 4 Skład pożywek i podłoży zastosowanych do hodowli bakterii oraz koniczyny łąkowej	63
Tab. 5 Wpływ jonów Zn^{2+} na przeżywalność szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> . Różnice istotne statystycznie pomiędzy stężeniami $ZnSO_4$ dla każdego badanego szczepu zostały oznaczone różnymi literami ($\alpha=0,05$; ANOVA jednoczynnikowa; test Tukey'a).	81
Tab. 6 Wpływ jonów Zn^{2+} na parametry charakteryzujące biofilm tworzony przez szczepy <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> . Istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami $ZnSO_4$ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a).....	92
Tab. 7 Porównanie wpływu jonów Zn^{2+} na autoagregację szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> . Istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami $ZnSO_4$ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA jednoczynnikowa, test Tukey'a).....	93
Tab. 8 Wpływ jonów Zn^{2+} na ruchliwość szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> na półpłynnym oraz stałym podłożu 79CA. Istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami $ZnSO_4$ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA trójczynnikowa, test Tukey'a).....	96
Tab. 9 Wpływ jonów Zn^{2+} na hydrofobowość komórek szczepów <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> . Różnice istotne statystycznie pomiędzy badanymi szczepami oraz zastosowanymi stężeniami $ZnSO_4$ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$, ANOVA dwuczynnikowa, test Tukey'a).....	110

Tab. 10 Wpływ jonów Zn^{2+} na wartości kątów zwilżania powierzchni komórek bakterii różnych szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, uzyskane dla wody (θ_w), diiodometanu (θ_d) oraz formamidu (θ_f). 111

Tab. 11 Wpływ jonów Zn^{2+} na wartości swobodnej energii powierzchniowej oraz jej składowych dla szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. 112

Tab. 12 Wpływ jonów Zn^{2+} na kiełkowanie nasion koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*). W tabeli porównano średnie długości korzeni i łodyg oraz siłę kiełkowania nasion w płynnym oraz na stałym podłożu do kiełkowania nasion. Istotne statystycznie różnice mierzonych parametrów pomiędzy stężeniami $ZnSO_4$ oznaczono różnymi literami ($\alpha=0,05$; ANOVA jednoczynnikowa; test Tukey'a). 114

12. Aneks – życiorys naukowy

Imię i nazwisko Magdalena Aneta Kopycińska
E-mail magdalena.kopycinska@poczta.umcs.lublin.pl

WYKSZTAŁCENIE

2009 Absolwentka II Liceum Ogólnokształcącego
im. Hetmana Jana Zamoyskiego w Lublinie

2012 Tytuł zawodowy **licencjata** na kierunku **Biologia**,
specjalność **Biochemia**, Tytuł pracy licencjackiej:
*Stabilność enzymów i metody ich stabilizacji w środowisku
wodnym i niewodnym*;
promotor – dr Jolanta Polak

2014 Tytuł zawodowy **magistra** na kierunku **Biologia**,
specjalność **Biochemia**, Tytuł pracy magisterskiej:
*Badanie właściwości barwiących i antyoksydacyjnych
substancji barwnych syntetyzowanych przez lakazę
grzybową*;
promotor – prof. dr hab. Anna Jarosz-Wilkołazka

od 2014 Uczestniczka studiów III stopnia na kierunku
Biotechnologia

UDZIAŁ W GRANTACH I PROJEKTACH BADAWCZYCH

2014-2016 Członek zespołu realizującego grant "Mechanizmy adaptacyjne *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* do warunków stresu środowiskowego i w symbiozie z koniczyną" (nr DEC-2012/07/B/NZ1/00099) finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) w ramach projektu kierowanego przez prof. dr hab. Monikę Janczarek.

2016 Kierownik grantu zespołowego dla młodych pracowników i doktorantów pt. „*Wpływ wybranych jonów metali ciężkich na kiełkowanie i wzrost koniczyny*” (nr PSP: BS-M-11-010-16-2-06) przyznawany przez Komisję ds. Badań Naukowych Młodych Pracowników Naukowych i Doktorantów.

- 2017** Kierownik grantu zespołowego dla młodych pracowników i doktorantów pt. „*Badanie wpływu mutacji w genach uczestniczących w syntezie egzopolisacharydu na własności fenotypowe oraz zdolności adaptacyjne Rhizobium leguminosarum do warunków stresowych*” (nr PSP: BS-M-11-010-17-2-04) przyznawany przez Komisję ds. Badań Naukowych Młodych Pracowników Naukowych i Doktorantów.
- 2018** Kierownik grantu zespołowego dla młodych pracowników i doktorantów pt. „*Analiza porównawcza fosfoproteomu bakterii Rhizobium leguminosarum bv. trifolii szczepu dzikiego (Rt24.2) i mutanta w genie pssZ (Rt297)*” (nr PSP: BS-M-11-010-18-2-01) przyznawany przez Komisję ds. Badań Naukowych Młodych Pracowników Naukowych i Doktorantów.

WYKAZ PUBLIKACJI RECENZOWANYCH W CZASOPISMACH NAUKOWYCH WYRÓŻNIONYCH PRZEZ JOURNAL CITATION REPORTS (JCR)

1. Polak, J., Jarosz-Wilkolażka, A., Szuster-Ciesielska, A., Wlizio, K., **Kopycińska, M.**, Sojka-Ledakowicz, J. & Lichawska-Olczyk, J. 2015. Toxicity and dyeing properties of dyes obtained through laccase-mediated synthesis. *Journal of Cleaner Production*. 112(5), 4265-4272. (IF₂₀₁₅ =3,844; Pkt_{MNiSW2015}=40 / IF₂₀₁₈=6,395; Pkt_{MNiSW2020}=140)
2. Janczarek, M., Rachwał, K., **Kopycińska, M.** & Urbanik-Sypniewska, T. 2016. Production of polysaccharides with a biotechnological potential by the *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* mutant Rt2472. *New Biotechnology* 33:S193 (IF₂₀₁₆= 2,898; Pkt_{MNiSW2016}=30 / IF₂₀₁₈=3,739; Pkt_{MNiSW2020}=100)
3. Cieśla, J., **Kopycińska, M.**, Łukowska, M., Bieganski, A. & Janczarek M. 2016. Surface properties of wild-type *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain 24.2 and its derivatives with different extracellular polysaccharide content. *PloS One*. 11(10): e0165080. (IF₂₀₁₆=3; Pkt_{MNiSW2016}=40 / IF₂₀₁₈=2,776; Pkt_{MNiSW2020}=100)
4. **Kopycińska, M.**, Lipa, P., Rachwał, K., Koziel, M. & Janczarek, M. 2017. Influence of zinc ions on EPS production and biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain Rt24.2 and its derivatives. *Postępy Mikrobiologii*. 56: S71 (IF₂₀₁₇=0,311; Pkt_{MNiSW2017}=15 / IF₂₀₁₈=0,298; Pkt_{MNiSW2020}=20)
5. Lipa, P., **Kopycińska, M.**, Rachwał, K., Pawlikowska-Pawłęga, B., Koziel, M. & Janczarek, M. 2017. Differences in cell morphology of the wild-type strains *R. leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2 and its derivative *rosR* mutant. *Postępy Mikrobiologii*. 56: S73 (IF₂₀₁₇=0,311; Pkt_{MNiSW2017}=15 / IF₂₀₁₈=0,298; Pkt_{MNiSW2020}=20)

6. **Kopycińska, M.**, Lipa, P., Cieśla, J., Koziel, M. & Janczarek M. 2018. Extracellular polysaccharide protects *Rhizobium leguminosarum* cells against zinc stress in vitro and during symbiosis with clover. *Environmental Microbiology Reports*. 10(3), 355–368. (IF₂₀₁₈= 2,874; Pkt_{MNiSW2018}=35 / Pkt_{MNiSW2020}=100)

WYKAZ MONOGRAFII I ROZDZIAŁÓW W MONOGRAFIACH

1. **Kopycińska, M.**, Rachwał, K. & Janczarek M. 2017. Adaptacja *Rhizobium* do stresu wywołanego obecnością jonów metali ciężkich. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-65362-48-3. Poznań. str. 42-48. (Pkt_{MNiSW}=5)
2. **Kopycińska, M.**, Rachwał, K. & Janczarek, M. 2017. Zastosowanie bakterii z rodziny *Rhizobiaceae* w bioremediacji zanieczyszczonych środowisk. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-65362-48-3. Poznań. str. 49-54. (Pkt_{MNiSW}=5)
3. Rachwał, K., **Kopycińska, M.** & Janczarek, M. 2017. Polisacharydy i białka zaangażowane w tworzenie biofilmu przez *Rhizobium leguminosarum*. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-65362-48-3. Poznań. str. 108-113. (Pkt_{MNiSW}=5)
4. Rachwał, K., **Kopycińska, M.** & Janczarek, M. 2017. Chemotaksja bakterii symbiotycznych z rodzaju *Rhizobium*. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-65362-48-3. Poznań. str. 114-121. (Pkt_{MNiSW}=5)
5. Janczarek, M., Rachwał, K. & **Kopycińska M.** 2017. Egzopolisacharydy *Rhizobium leguminosarum*: struktura, biosynteza i funkcja w symbiozie. Enzymologia w obliczu wyzwań i możliwości XXI wieku. Wydawnictwo Naukowe TYGIEL. ISBN 978-83-65598-47-9. Lublin. str.43-51. (Pkt_{MNiSW}=5)
6. **Kopycińska, M.**, Lipa, P. & Janczarek, M. 2017. Mechanizmy adaptacyjne bakterii symbiotycznych z rodziny *Rhizobiaceae* do abiotycznego stresu środowiskowego. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-65677-19-8. Poznań. str. 73-79. (Pkt_{MNiSW}=5)
7. **Kopycińska, M.**, Lipa, P. & Janczarek, M. 2017. Znaczenie biologiczne cynku. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-65677-19-8. Poznań. str. 80-85. (Pkt_{MNiSW}=5)
8. Lipa, P., **Kopycińska, M.** & Janczarek, M. 201 Systemy sekrecji bakterii z rodziny *Rhizobiaceae* i ich rola w symbiozie z roślinami bobowatymi. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-65677-19-8. Poznań. str. 90-97. (Pkt_{MNiSW}=5)
9. Lipa, P., **Kopycińska, M.** & Janczarek, M. 2017. Biologiczne właściwości roślinnych flawonoidów. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-65677-19-8. Poznań, str. 98-105. (Pkt_{MNiSW}=5)
10. **Kopycińska, M.**, Lipa, P. & Koziel, M. 2018. Biotechnologiczne zastosowanie egzopolisacharydów bakteryjnych. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-65677-93-8. Poznań. str. 99-107. (Pkt_{MNiSW}=5)

11. **Kopycińska, M.**, Koziół, M. & Lipa, P. 2018. Charakterystyka czynników Nod: struktura, synteza, rola w symbiozie. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-65677-93-8. Poznań. str. 108-114. (Pkt_{MNiSW}=5)
12. Lipa, P., Koziół, M. & **Kopycińska M.** 2018. Wpływ kadmu na bioróżnorodność i funkcjonowanie roślin oraz bakterii glebowych. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-65677-93-8. Poznań. str. 76-83. (Pkt_{MNiSW}=5)
13. Lipa, P., Koziół, M. & **Kopycińska, M.** 2018. Rhizobia jako bakterie promujące wzrost roślin (PGPR). Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-65677-93-8. Poznań. str. 84-91. (Pkt_{MNiSW}=5)
14. Koziół M., Lipa P., **Kopycińska M.**, Janczarek M. 2018. Roślinne analogi AHL jako nowa strategia ochrony roślin i zwierząt przed patogennymi bakteriami. Wydawca: Instytut Promocji Kultury i Nauki Dr Jerzy Bednarski, ISBN 978-83-950719-2-8, Lublin 2018, str. 115-137. (Pkt_{MNiSW}=8)

WYKAZ KOMUNIKATÓW ZJAZDOWYCH

O zasięgu międzynarodowym

1. Janczarek, M., **Kopycińska, M.** & Rachwał K. The influence of cadmium ions on growth and survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain Rt24.2 and its derivatives. 6th International Weigl Conference on Microbiology. 8-10.07.2015. Gdańsk.
2. Janczarek, M., Rachwał, K. & **Kopycińska, M.** Comparative transcriptome analysis of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* wild-type strain Rt24.2 and its *rosR* mutant Rt2472. 6th International Weigl Conference on Microbiology. 8-10.07.2015. Gdańsk.
3. Janczarek, M., Rachwał, K., **Kopycińska, M.**, Boguszewska, A. & Tchórzewski, M. A regulatory protein encoded by *rosR* affects protein secretion and envelope integrity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. 12th European Nitrogen Fixation Conference. 25-28.08.16. Budapest.
4. **Kopycińska M.**, Lipa P., Rachwał K., Tchorzewska K., Karaś M., Mazur A., Janczarek M. The influence of various nitrogen sources on transcription of *pss* genes involved in the synthesis of exopolysaccharide in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. 7th International Weigl Conference, 26-29.09.2017, Lwów, Ukraina.
5. Lipa P., **Kopycińska M.**, Rachwał K., Pyśniak S., Karaś M., Mazur A., Janczarek M. Transcriptional analysis of *gms* genes involved in synthesis of glucomannan in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. 7th International Weigl Conference, 26-29.09.2017, Lwów, Ukraina.

6. Cieśla, J., **Kopycińska, M.**, Łukowska, M. & Janczarek, M. An influence of exopolysaccharide on the selected surface properties of *Rhizobium leguminosarum* cells. Tenth International Symposium Effect of Surface Heterogeneity in Adsorption, Catalysis and related Phenomena, 27 – 31.08.2018. Lublin.
7. Cieśla, J., **Kopycińska, M.**, Łukowska, M. & Janczarek, M. The effect of zinc ions on the surface properties of *Rhizobium leguminosarum* cells. Tenth International Symposium Effect of Surface Heterogeneity in Adsorption, Catalysis and related Phenomena, 27 – 31.08.2018. Lublin.
8. Kozieł, M., Lipa P., **Kopycińska, M.**, Janczarek, M. Roślinne analogi AHL jako nowa strategia ochrony roślin i zwierząt przed patogennymi bakteriami. International Conference of Natural and Medical Sciences: Young Scientists, PhD Students, and Students. 1-3.12.2017. Lublin.

O zasięgu krajowym

1. **Kopycińska, M.**, Rachwał, K. & Janczarek, M. Wpływ jonów metali ciężkich na symbiozę roślin motylkowatych z bakteriami wiążącymi azot. Konferencja Naukowa TYGIEL 2015 “Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”. 21-22.03.2015. Lublin.
2. Rachwał, K., **Kopycińska, M.** & Janczarek, M. Własności bakteryjnych egzopolisacharydów oraz ich biotechnologiczne zastosowania VII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2015 „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”. 21-22.03.2015. Lublin.
3. **Kopycińska, M.**, Rachwał, K., Gęca, M. & Janczarek, M. Wpływ jonów niklu na wzrost i przeżywalność szczepu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2 i jego pochodnych różniących się poziomem syntezy egzopolisacharydu. Mikrobiologia w medycynie, przemyśle i ochronie środowiska 24-25.10.2015. Łódź.
4. Rachwał, K., **Kopycińska, M.**, Gęca, M. & Janczarek, M. Wpływ czynników środowiskowych na ekspresję genu *rosR* *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 24.2. Mikrobiologia w medycynie, przemyśle i ochronie środowiska. 24-25.10.2015. Łódź.
5. **Kopycińska, M.**, Rachwał, K. & Janczarek, M. Wpływ jonów cynku na wzrost i przeżywalność szczepu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2 i jego pochodnych różniących się poziomem syntezy egzopolisacharydu. I konferencja naukowa Enzymos „Enzymy w nauce i przemyśle” 14-15.11.2015. Lublin.
6. Rachwał, K., **Kopycińska, M.** & Janczarek, M. Znaczenie glukozylotransferazy PssA w adaptacji *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* do warunków środowiskowych. I konferencja naukowa Enzymos „Enzymy w nauce i przemyśle”. 14-15.11.2015. Lublin.

7. **Kopycińska, M.**, Rachwał, K. & Janczarek, M. Wpływ jonów kadmu na symbiozę z koniczyną szczepów *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: Rt24.2 oraz mutantu Rt2472*rosR*. Warsztaty naukowe „Mikroorganizmy symbiotyczne w nauce i praktyce”. 19.02.16. Puławy.
8. Rachwał, K., **Kopycińska, M.** & Janczarek, M. Rola genu *rosR* w nawiązaniu efektywnej symbiozy pomiędzy *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 24.2 a koniczyną. Warsztaty naukowe „Mikroorganizmy symbiotyczne w nauce i praktyce”. 19.02.16. Puławy.
9. **Kopycińska, M.**, Rachwał, K., Gęca, M. & Janczarek, M. Wpływ genu *rosR* na efektywność symbiozy *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną w obecności jonów cynku. XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Mikrobiologia – nowe wyzwania, nowe możliwości” 25-27.09.2016. Bydgoszcz.
10. Rachwał, K., **Kopycińska, M.**, Gęca, M. & Janczarek, M. Efektywność symbiozy szczepów *Rhizobium leuminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2, Rt2472 i Rt24.2pBR1 z koniczyną w obecności jonów miedzi. XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Mikrobiologia – nowe wyzwania, nowe możliwości” 25-27.09.2016. Bydgoszcz.
11. Janczarek, M., Rachwał, K. & **Kopycińska M.** Wpływ czynników środowiskowych na ekspresję genów *pss* biorących udział w syntezie egzopolisacharydu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. II Ogólnopolska Konferencja Naukowa ENZYMOŚ „Enzymy w nauce i przemyśle” 5-6.11.2016. Lublin
12. **Kopycińska, M.**, Rachwał, K. & Janczarek, M. Wpływ jonów niklu na produkcję egzopolisacharydu oraz tworzenie biofilmu przez szczep *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2 oraz jego pochodne Rt2472 i Rt24.2(pBR1). IV Ogólnokrajowa Konferencja „Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój”. 26.11.2016. Lublin.
13. Rachwał, K., **Kopycińska, M.** & Janczarek, M. Wpływ czynników środowiskowych na aktywność transkrypcyjną genów związanych z syntezą polisacharydów u *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2. IV Ogólnokrajowa Konferencja „Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój”. 26.11.2016. Lublin.
14. **Kopycińska, M.**, Rachwał, K. & Janczarek, M. Wpływ genu *pssA* i jonów cynku na efektywność symbiozy: *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* - koniczyna łąkowa. III Toruńskie Sympozjum Doktorantów Nauk Przyrodniczych. 1-2.04.2017. Toruń.
15. Rachwał, K., **Kopycińska, M.** & Janczarek, M. Wybrane właściwości fizykochemiczne egzopolisacharydu produkowanego przez *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. III Toruńskie Sympozjum Doktorantów Nauk Przyrodniczych. 1-2.04.2017. Toruń.

16. Rachwał, K., Lipa, P., **Kopycińska, M.** & Janczarek, M. Rola białka PssA w tworzeniu rzęsek oraz ruchliwości *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Konferencja naukowa „Bioróżnorodność środowiska – znaczenie, problemy, wyzwania”. 30-31 maja 2017. Puławy.
17. **Kopycińska, M.**, Lipa, P., Rachwał, K. & Janczarek, M. Kielkowanie i wzrost koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*) w obecności jonów miedzi. Konferencja naukowa „Bioróżnorodność środowiska – znaczenie, problemy, wyzwania”. 30-31 maja 2017. Puławy.
18. Lipa, P., **Kopycińska, M.**, Rachwał, K. & Janczarek, M. Wpływ mutacji w genie *exoP* kodującą fosfatazę na efektywność symbiozy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną łąkową (*Trifolium pratense*). Konferencja naukowa „Bioróżnorodność środowiska – znaczenie, problemy, wyzwania”. 30-31 maja 2017. Puławy.
19. Janczarek, M., **Kopycińska, M.**, Rachwał, K. & Lipa, P. Wpływ jonów kadmu na kiełkowanie i wzrost koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*). Konferencja naukowa „Bioróżnorodność środowiska – znaczenie, problemy, wyzwania”. 30-31 maja 2017. Puławy.
20. **Kopycińska, M.**, Lipa, P., Rachwał, K. & Janczarek, M. Wykorzystanie bakterii z rodziny *Rhizobiaceae* w bioremediacji środowiska skażonego metalami ciężkimi. V Ogólnokrajowa Konferencja „Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój”. 13.05.2017. Lublin.
21. Lipa, P., **Kopycińska, M.**, Rachwał, K. & Janczarek, M. Polisacharydy bakterii z rodzaju *Rhizobium* i ich rola w procesie symbiozy z roślinami bobowatymi (*Fabaceae*). V Ogólnokrajowa Konferencja „Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój”. 13.05.2017. Lublin.
22. **Kopycińska, M.**, Lipa, P., Kozieł, M. & Janczarek, M. Rola PGPR w ochronie roślin przed abiotycznym stresem środowiskowym. V Ogólnokrajowa Konferencja „Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój”. 24.11.2017. Lublin.
23. **Kopycińska, M.**, Lipa, P., Kozieł, M., Gęca, M. & Janczarek, M. Rola glukozylotransferazy PssA w adaptacji bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* do warunków stresowych wywołanych obecnością jonów miedzi. III Konferencja Naukowa ENZYMOS „Enzymy w nauce i przemyśle”. 18.11.2017. Lublin.
24. Lipa, P., Kozieł, M., **Kopycińska, M.**, Urbanik-Sypniewska, T., Janczarek M. & Marek-Kozaczuk, M. Aktywność hydrolityczna depolimerazy faga 7b wobec polisacharydów produkowanych przez szczepy *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2 oraz Rt2472. III Konferencja Naukowa ENZYMOS „Enzymy w nauce i przemyśle”. 18.11.2017. Lublin.
25. Janczarek, M., Kozieł, M., Lipa, P., **Kopycińska, M.**, Urbanik-Sypniewska, T., Gęca, M. & Marek-Kozaczuk, M. Wrażliwość polisacharydów produkowanych przez szczep dziki *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2 oraz mutantu Rt2472*rosR* na depolimerazę faga 9a. III Konferencja Naukowa ENZYMOS „Enzymy w nauce i przemyśle”. 18.11.2017. Lublin.

PRACA NA RZECZ UCZELNI I WYDZIAŁU

2014 - 2017	Udział w organizacji „Nocy Biologów” Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS
2017	Udział w organizacji „Drzwiach Otwartych” Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS
2014 - 2018	Udział w Festiwalu Nauki
2017	Udział w organizacji warsztatów „ Mikrobiologia, genetyka, spektrometria – narzędzia w identyfikacji mikroorganizmów, ale nie tylko... ” - Prowadzenie warsztatów dla uczniów I Liceum Ogólnokształcącego im. Stanisława Staszica w Lublinie

INNE

1. Laureatka „**Miejskiego programu stypendialnego dla studentów i doktorantów**” przyznanego przez Prezydenta Miasta Lublin, rok akademicki 2017/2018
2. Certyfikat *TOEIC Listening & Reading* z języka angielskiego na poziomie B2