



UMCS

UNIwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
W Lublinie

Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

Dziedzina: **nauki ścisłe i przyrodnicze**

Dyscyplina: **nauki biologiczne**

Wojciech Sokołowski

nr albumu: 299686

**Ocena zdolności endofitów bakteryjnych z rodzajów
Methylobacterium i *Micromonospora*
do realizacji mechanizmów promujących wzrost roślin
in vitro oraz *in planta***

**(Assessment of the ability of *Methylobacterium* and
Micromonospora endophytic strains to implement plant growth
promoting mechanisms *in vitro* and *in planta*)**

Rozprawa doktorska przygotowywana pod kierunkiem naukowym
dr hab. Sylwii Wdowiak-Wróbel, profesor uczelni

Promotor pomocniczy:
dr Monika Marek-Kozaczuk

w Instytucie Nauk Biologicznych

LUBLIN, 2024

Temu, od którego wszystko pochodzi

(Hbr 2, 10)

wyrazy uznania i szacunku,
kieruję do pani **dr hab. Sylwii Wdowiak-Wróbel**
wyrażając wdzięczność za sumienną opiekę merytoryczną,
przykład zaangażowania w pracę naukową,
przekazaną wiedzę oraz zwyczajną,
ludzką życzliwość

równocześnie słowa uznania,
kieruję do pani **dr Moniki Marek-Kozaczuk**
dziękując za nieocenioną pomoc merytoryczną, przekazaną
wiedzę praktyczną, zaangażowanie w prowadzone badania oraz
wrozumiałość

wyrazy szacunku i słowa uznania,
kieruję do pana **dra hab. Michała Kality**
wyrażając wdzięczność za otwartość, możliwość współpracy
oraz cenne wskazówki merytoryczne

*serdeczne podziękowania składam
wszystkim **Pracownikom Katedry Genetyki i Mikrobiologii**,
z których pomocy niejednokrotnie dane mi było korzystać*

*słowa wdzięczności za merytoryczną pomoc i cenne uwagi,
składam pani **prof. Lorenie Carro Gracia**
(Katedra Genetyki i Mikrobiologii,
Uniwersytet w Salamance)*

Autor

Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w pracy	12
Streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim	14
Streszczenie i słowa kluczowe w języku angielskim.....	15
1. WSTĘP	16
1.1. Rośliny i ich mikrobiota	16
1.2. Endofity – mikroorganizmy kolonizujące wewnętrzne tkanki roślin	18
1.3. Bakterie endofityczne.....	20
1.4. Charakterystyka interakcji roślina – bakterie endofityczne	21
1.4.1. Kolonizacja wewnętrznych tkanek roślinnych przez bakterie.....	21
1.4.1.1. Kolonizacja przez korzenie.....	22
1.4.1.2. Kolonizacja przez części nadziemne	23
1.4.2. Rola systemu immunologicznego rośliny w kształtowaniu struktury mikrobioty endofitycznej	24
1.4.3. Mechanizmy promowania wzrostu roślin przez bakterie endofityczne	25
1.4.3.1. Mechanizmy bezpośrednie	26
1.4.3.2. Mechanizmy pośrednie.....	32
1.5. Metody pozyskiwania efektywnych szczepów bakterii endofitycznych	38
1.6. Wykorzystanie endofitów bakteryjnych w rolnictwie	40
1.6.1. Bakterie endofityczne jako alternatywa agrochemikaliów.....	41
1.7. Charakterystyka rodzajów <i>Methylobacterium</i> i <i>Methylorubrum</i> oraz rodzaju <i>Micromonospora</i>	43
2. HIPOTEZA I CEL PRACY	47
3. MATERIAŁY I METODY	49
3.1. Materiały.....	49
3.1.1. Materiał roślinny	49

3.1.2. Izolaty bakterii endofitycznych.....	49
3.1.3. Szczepy bakterii oraz grzybów fitopatogennych	50
3.1.4. Pozostałe mikroorganizmy	50
3.1.5. Podłoża mikrobiologiczne	51
3.1.6. Bufory, roztwory, odczynniki	58
3.1.7. Preparaty i zestawy komercyjne	61
3.1.8. Pozostałe materiały	62
3.2. Metody.....	64
3.2.1. Pozyskanie izolatów bakteryjnych (bakterii endofitycznych)	64
3.2.1.1. Izolacja bakterii endofitycznych z brodawek korzeniowych.....	64
3.2.2. Analiza genetyczna bakterii endofitycznych	64
3.2.2.1. Izolacja genomowego DNA izolatów bakteryjnych	64
3.2.2.2. Genotypowanie izolatów bakteryjnych metodą BOX-PCR	64
3.2.2.3. Amplifikacja genu 16S rRNA.....	65
3.2.2.4. Amplifikacja wybranych genów rdzeniowych (<i>recA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rpoB</i> , <i>atpD</i>).....	66
3.2.2.5. Detekcja i amplifikacja genu <i>mxoF</i> u bakterii z rodzajów <i>Methylobacterium</i> i <i>Methylorubrum</i>	68
3.2.2.6. Detekcja i amplifikacja wybranych genów związanych ze zdolnością bakterii do realizowania mechanizmów promowania wzrostu roślin	69
3.2.2.7. Wizualizacja wyników reakcji amplifikacji w żelu agarozowym.....	70
3.2.2.8. Oczyszczanie zamplifikowanych fragmentów DNA	71
3.2.2.9. Oczyszczanie zamplifikowanych fragmentów DNA z żelu agarozowego.....	71
3.2.2.10. Sekwencjonowanie zamplifikowanych fragmentów DNA.....	71
3.2.2.11. Analiza filogenetyczna genu 16S rRNA.....	72
3.2.2.12. Wielolokusowa analiza sekwencji (MLSA) genów rdzeniowych	72
3.2.2.13. Analiza filogenetyczna genu <i>mxoF</i> oraz genów związanych ze zdolnością bakterii do realizowania mechanizmów promowania wzrostu roślin.....	73

3.2.3. Przygotowanie inokulum bakteryjnego	73
3.2.4. Analiza fenotypowa bakterii endofitycznych	74
3.2.4.1. Analiza cech fenotypowych bakterii z wykorzystaniem zestawu GEN III (system Biolog).....	74
3.2.4.2. Charakterystyka biochemiczna izolatów bakterii Gram ujemnych z wykorzystaniem zestawu Microgen ID	74
3.2.4.3. Określenie zdolności bakterii do produkcji wybranych enzymów hydrolitycznych z wykorzystaniem zestawu API ZYM (bioMérieux).....	74
3.2.4.4. Określenie tolerancji bakterii wobec różnych stężeń NaCl w podłożu	75
3.2.4.5. Określenie zakresu pH wzrostu bakterii	75
3.2.4.6. Określenie zdolności bakterii do wzrostu w różnych temperaturach.....	75
3.2.4.7. Określenie zdolności bakterii do aktywnego ruchu	76
3.2.4.8. Określenie zdolności bakterii do oddziaływań typu <i>quorum sensing</i> (QS).....	76
3.2.4.9. Określenie zdolności bakterii do tworzenia biofilmu metodą barwienia fioletem krystalicznym oraz przeżywalności w biofilmie przy użyciu zestawu LIVE/DEAD® Bac-Light™ Bacterial Viability	76
3.2.4.10. Określenie zdolności bakterii do wykorzystywania kwasu 1-aminocyklopropano- 1-karboksylowego (ACC), jako jedyne źródła azotu	77
3.2.4.11. Określenie zdolności bakterii do wiązania azotu atmosferycznego	78
3.2.4.12. Określenie zdolności bakterii do produkcji kwasu indolilo-3-octowego (IAA) oraz indolu	79
3.2.4.13. Określenie tolerancji bakterii wobec różnych stężeń wybranych pierwiastków (arsenu, glinu, miedzi)	79
3.2.4.14. Określenie zdolności bakterii do produkcji metaloforów.....	80
3.2.4.15. Określenie zdolności bakterii do rozkładu trifosforanów (TCP)	80
3.2.4.16. Określenie zdolności bakterii do rozkładu celulozy.....	80
3.2.4.17. Określenie zdolności bakterii do produkcji enzymów proteolitycznych.....	80

3.2.4.18. Określenie zdolności bakterii do rozkładu węglowodorów zawartych w oleju napędowym oraz przepracowanym oleju silnikowym	81
3.2.4.19. Określenie zdolności bakterii do produkcji cyjanowodoru	81
3.2.5. Analiza właściwości antagonistycznych bakterii endofitycznych	82
3.2.5.1. Ocena zdolności bakterii do hamowania wzrostu fitopatogenów bakteryjnych.....	82
3.2.5.2. Ocena zdolności bakterii do hamowania wzrostu fitopatogenów grzybowych.....	82
3.2.6. Doświadczenia roślinne	83
3.2.6.1. Warunki uprawy	83
3.2.6.2. Jałowienie i siew nasion	84
3.2.6.3. Wpływ inokulacji na energię i zdolność kiełkowania nasion	84
3.2.6.4. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin, uprawianych w substracie torfowym.....	85
3.2.6.5. Wpływ koinokulacji siewek koniczyny białej zawiesinami bakterii endofitycznych i ryzobiowych na wybrane cechy biometryczne roślin, uprawianych w substracie torfowym	85
3.2.6.6. Ocena zdolności bakterii do kolonizacji różnych organów roślin	86
3.2.6.7. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin koniczyny białej, uprawianych w zmodyfikowanym podłożu Hoaglanda	87
3.2.6.8. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin, uprawianych w substracie torfowym zanieczyszczonym metalami ciężkimi.....	87
3.2.6.9. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin, uprawianych w substracie torfowym zanieczyszczonym olejem napędowym	88
3.2.7. Analizy statystyczne.....	88

4. WYNIKI	90
4.1. Izolacja bakterii endofitycznych z brodawek korzeniowych.....	90
4.2. Analiza genetyczna bakterii endofitycznych	90
4.2.1. Izolacja genomowego DNA izolatów bakteryjnych	90
4.2.2. Genotypowanie izolatów metodą BOX-PCR	91
4.2.3. Analiza filogenetyczna genu 16S rRNA	93
4.2.4. Analiza filogenetyczna wybranych genów rdzeniowych (<i>recA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rpoB</i> , <i>atpD</i>)..	97
4.2.5. Detekcja i analiza genetyczna genu <i>mxoF</i> u bakterii z rodzajów <i>Methylobacterium</i> i <i>Methylobacterium</i>	101
4.2.6. Detekcja i analiza genetyczna wybranych genów związanych ze zdolnością bakterii do realizowania mechanizmów promowania wzrostu roślin.....	103
4.2.7. Podsumowanie analiz związanych z obecnością w genomach badanych bakterii genów związanych z promowaniem wzrostu roślin	111
4.3. Analiza fenotypowa bakterii endofitycznych	112
4.3.1. Analiza cech fenotypowych bakterii z wykorzystaniem zestawu GEN III (system Biolog).....	112
4.3.2. Charakterystyka biochemiczna izolatów bakterii Gram ujemnych z wykorzystaniem zestawu Microgen ID	117
4.3.3. Określenie zdolności bakterii do produkcji wybranych enzymów hydrolitycznych z wykorzystaniem zestawu API ZYM (bioMérieux).....	119
4.3.4. Określenie tolerancji bakterii wobec różnych stężeń NaCl w podłożu.....	121
4.3.5. Określenie zakresu pH wzrostu bakterii.....	122
4.3.6. Określenie zdolności bakterii do wzrostu w różnych temperaturach.....	124
4.3.7. Określenie zdolności bakterii do aktywnego ruchu	125
4.3.8. Określenie zdolności bakterii do oddziaływań typu <i>quorum sensing</i> (QS).....	126
4.3.9. Określenie zdolności bakterii do tworzenia biofilmu metodą barwienia fioletem krystalicznym oraz przeżywalności w biofilmie przy użyciu zestawu LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability	127

4.3.10. Określenie zdolności bakterii do wykorzystywania kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboxyowego (ACC), jako jedyne źródła azotu	129
4.3.11. Określenie zdolności bakterii do wiązania azotu atmosferycznego	131
4.3.12. Określenie zdolności bakterii do produkcji kwasu indolilo-3-octowego (IAA) oraz indolu	132
4.3.13. Określenie tolerancji bakterii wobec różnych stężeń wybranych pierwiastków (arsenu, glinu, miedzi)	134
4.3.14. Określenie zdolności bakterii do produkcji metaloforów.....	136
4.3.15. Określenie zdolności bakterii do rozkładu trifosforanów (TCP)	139
4.3.16. Określenie zdolności bakterii do rozkładu celulozy.....	140
4.3.17. Określenie zdolności bakterii do produkcji enzymów proteolitycznych	141
4.3.18. Określenie zdolności bakterii do rozkładu węglowodorów zawartych w oleju napędowym oraz przepracowanym oleju silnikowym	143
4.3.19. Określenie zdolności bakterii do produkcji cyjanowodoru	144
4.4. Analiza właściwości antagonistycznych bakterii endofitycznych	145
4.4.1. Ocena zdolności bakterii do hamowania wzrostu fitopatogenów bakteryjnych.....	145
4.4.2. Ocena zdolności bakterii do hamowania wzrostu fitopatogenów grzybowych.....	148
4.5. Podsumowanie właściwości związanych ze zdolnością bakterii do kolonizacji wnętrza roślin oraz promowania ich wzrostu <i>in vitro</i>	150
4.6. Doświadczenia roślinne.....	154
4.6.1. Wpływ inokulacji na energię i zdolność kiełkowania nasion.....	154
4.6.2. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin, uprawianych w substracie torfowym.....	157
4.6.3. Wpływ koinokulacji siewek koniczyny białej zawiesinami bakterii endofitycznych i ryzobiowych na wybrane cechy biometryczne roślin, uprawianych w substracie torfowym.....	161
4.6.4. Ocena zdolności bakterii do kolonizacji różnych organów roślin	163

4.6.5. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin koniczyny białej, uprawianych w zmodyfikowanym podłożu Hoaglanda	163
4.6.6. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin, uprawianych w substracie torfowym zanieczyszczonym metalami ciężkimi.....	166
4.6.7. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin uprawianych w substracie torfowym zanieczyszczonym olejem napędowym	175
5. DYSKUSJA	180
5.1. Pozyskanie izolatów bakterii endofitycznych z brodawek korzeniowych roślin należących do rodziny bobowate (<i>Fabaceae</i>)	180
5.2. Bakterie z grupy <i>Methylobacterium sensu lato</i> oraz rodzaju <i>Micromonospora</i> jako endofity roślin z rodziny bobowate (<i>Fabaceae</i>).....	182
5.3. Analiza zdolności badanych bakterii do realizowania mechanizmów promowania wzrostu roślin <i>in vitro</i>	186
5.4. Analiza zdolności badanych bakterii do realizowania mechanizmów promowania wzrostu roślin <i>in planta</i>	202
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	208
7. BIBLIOGRAFIA.....	211
8. ANEKS	255

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

ABA	kwask absycsynowy (ang. <i>abscisic acid</i>)
ACC	kwask 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowy (ang. <i>1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid</i>)
AHL	N-acyłohomoserynowe cząsteczki laktonowe (ang. <i>N-acyl homoserine lactone</i>)
ANOVA	analiza wariancji (ang. <i>analysis of variance</i>)
ATP	adenozynotrifosforan (ang. <i>adenosine triphosphate</i>)
BLAST	algorytm Basic Local Alignment Search Tool
CAS	barwnik chrom azurol S (ang. <i>chrome azurol S</i>)
CFU	jednostka tworząca kolonię (ang. <i>colony forming unit</i>)
CTAB	bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (ang. <i>cetyltrimethylammonium bromide</i>)
CWDEs	enzymy degradujące ścianę komórkową (ang. <i>cell-wall degrading enzymes</i>)
DMSO	sulfotlenek dimetylu (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
EDTA	dwuwodna sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate</i>)
EPS	egzopolisacharyd (ang. <i>exopolysaccharide</i>)
FAO	Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (ang. <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
GA3	kwask giberelinowy (ang. <i>gibberellic acid</i>)
GTR	model substytucji nukleotydów zakładający odwracalność ewolucji (ang. <i>general time reversible</i>)
HCN	cyjanowodór (ang. <i>hydrogen cyanide</i>)
HMX	oktogen; 1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetraazacyklooktan (ang. <i>octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine</i>)
IAA	kwask indolilo-3-octowy (ang. <i>indole-3-acetic acid</i>)
ISP	międzynarodowy projekt badawczy dotyczący rodzaju <i>Streptomyces</i> (ang. <i>International Streptomyces Project</i>)
ISR	indukowana odporność systemiczna (ang. <i>induced systemic resistance</i>)
ISTA	Międzynarodowy Związek Oceny Nasion (ang. <i>International Seed Testing Association</i>)

LPS	lipopolisacharyd (ang. <i>lipopolysaccharide</i>)
MAMPs	molekularne wzorce związane z mikroorganizmami (ang. <i>microbe-associated molecular patterns</i>)
MLSA	wielolokusowa analiza sekwencji (ang. <i>multilocus sequence analysis</i>)
PAHs	cykliczne węglowodory aromatyczne (ang. <i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i>)
PAMPs	molekularne wzorce związane z patogenami (ang. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>chain polymerase reaction</i>)
PHs	węglowodory ropopochodne (ang. <i>petroleum hydrocarbons</i>)
PGPB	bakterie promujące wzrost roślin (ang. <i>plant growth promoting bacteria</i>)
PGPE	endofity promujące wzrost roślin (ang. <i>plant growth promoting endophytes</i>)
PIPES	kwasy piperazyno-1,4-bis(2-etanosulfonowy) (ang. <i>piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>)
PPFMs	grupa fakultatywnych metylotrofów, charakteryzujących się różowym zabarwieniem kolonii (ang. <i>pink pigmented facultative methylotrophs</i>)
PRR	receptory rozpoznające wzorce molekularne (ang. <i>pattern recognition receptors</i>)
pz	par zasad; odnosi się do liczby nukleotydów w sekwencji nukleotydowej
QS	oddziaływania typu <i>quorum sensing</i>
RDX	heksogen; heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazyna (ang. <i>hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine</i>)
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
SAM	S-adenozylometionina (ang. <i>S-adenosylmethionine</i>)
SAR	nabyta odporność systemiczna (ang. <i>systemic acquired resistance</i>)
TCP	fosforan (V) wapnia; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (ang. <i>tricalcium phosphate</i>)
Tris	tri(hydroksymetylo)aminometan (ang. <i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>)
UPGMA	metoda średnich połączeń (ang. <i>unweighted pair-group method using arithmetic averages</i>)
VBNC	„żywe, lecz niedające się hodować” (ang. <i>viable but nonculturable state</i>)
VOCs	lotne związki organiczne (ang. <i>volatile organic compounds</i>)

Streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim

W niniejszej pracy oceniono zdolność dwudziestu sześciu szczepów bakterii endofitycznych, wyizolowanych z brodawek korzeniowych roślin z rodziny bobowate (*Fabaceae*) do realizacji mechanizmów promowania wzrostu roślin *in vitro* oraz *in planta*. W celu określenia przynależności taksonomicznej bakterii, pozyskane izolaty poddano analizie porównawczej sekwencji genu 16S rRNA oraz wielolokusowej analizie sekwencji (MLSA) czterech genów rdzeniowych. Scharakteryzowano wybrane cechy biochemiczne bakterii, m.in. określono tolerancję badanych szczepów wobec różnego pH, zdolność do wzrostu w różnych temperaturach, na podłożach zawierających różne stężenia NaCl oraz na podłożach zawierających różne stężenia As, Cu lub Al. Oceniono zdolność bakterii do realizacji mechanizmów zaangażowanych w promocję wzrostu roślin: zdolności do aktywnego ruchu, oddziaływań typu *quorum sensing*, tworzenia biofilmu, degradacji ACC i wiązania azotu; zbadano zdolność do produkcji: IAA, indolu, metaloformów i HCN oraz rozkładu: trifosforanów, celulozy i białek. Określono zdolność bakterii do wykorzystywania węglowodorów zawartych w oleju napędowym jako jedyne źródła węgla i energii. Zbadano potencjał szczepów do hamowania wzrostu fitopatogenów bakteryjnych i grzybowych oraz indukcji kiełkowania nasion. Wyselekcjonowane na podstawie wyników testów *in vitro* szczepy wykorzystano w doświadczeniach roślinnych, w których badano wpływ inokulacji roślin zawiesinami pojedynczych szczepów bakterii (lub w koinokulacji z bakteriami ryzobiowymi) na wybrane cechy biometryczne roślin uprawianych w substracie torfowym lub w substracie torfowym zanieczyszczonym jonami Cu, jonami As lub olejem napędowym.

Na podstawie przeprowadzonych analiz bakterie przyporządkowano do rodzajów *Methylobacterium*, *Methylorubrum* oraz *Micromonospora*. Wykazano, że badane szczepy charakteryzują się zróżnicowanym potencjałem do realizowania badanych mechanizmów związanych z promowaniem wzrostu roślin *in vitro*, tym samym wykazując zróżnicowany potencjał do promowania wzrostu roślin *in vivo*. Szczepy *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Micromonospora* sp. 5056, *Micromonospora* sp. 48 i *Micromonospora* sp. N5 cechowały się efektywnością w promowaniu wzrostu gospodarza roślinnego (*in planta*), co stanowi o możliwości wykorzystania tych bakterii do produkcji preparatów biologicznych, użytecznych w rolnictwie lub fitoremediacji terenów skażonych.

słowa kluczowe: bakterie endofityczne; bakterie promujące wzrost roślin; mechanizmy promowania wzrostu roślin; *Methylobacterium*; *Methylorubrum*; *Micromonospora*

Streszczenie i słowa kluczowe w języku angielskim

In vitro and *in planta* analyses of the potential of twenty-six plant growth-promoting endophytic bacterial strains isolated from root nodules of *Fabaceae* plants have been carried out. The comparative analysis of the 16S rRNA gene and the multilocus sequence analysis (MLSA) of four housekeeping genes were conducted to determine the taxonomic affiliation of the tested isolates. The tolerance to different pH values and the abilities to grow at various temperatures and different NaCl, As, Cu, and Al concentrations were assessed. The abilities of the bacteria towards motility, production of *quorum sensing* signaling molecules, biofilm formation, ACC degradation, and nitrogen fixation were assessed. The evaluation of the bacterial abilities to produce IAA, indole, metallophores, and hydrogen cyanide were carried out. Their capabilities of solubilization of triphosphates, decomposition of cellulose and proteins, and utilization of diesel oil hydrocarbons were tested. The potential of the bacteria to induce the seeds germination process and to inhibit bacterial and fungal phytopathogens growth was tested. The strains selected based on *in vitro* tests results were tested in pot experiments to assess the influence of single bacterial strains (or in co-inoculation with rhizobial bacteria) on the growth properties of inoculated plants cultivated in peat substrate or peat substrate contaminated with copper or arsenic ions or diesel fuel.

Based on the genetic analyses, the bacteria were assigned to the genera *Methylobacterium*, *Methylorubrum* and *Micromonospora*. The tested strains of endophytic bacteria showed different abilities to implement the plant growth mechanisms studied *in vitro*; therefore, the strains exhibited different potential to promote plant growth *in planta*. Strains *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Micromonospora* sp. 5056, *Micromonospora* sp. 48, and *Micromonospora* sp. N5 were effective in promoting the growth of the plant hosts. Thus, we postulate that these selected bacteria have the potential to be used in agriculture or phytoremediation processes as biological agents.

key words: endophytic bacteria; plant growth promoting bacteria; plant growth promoting mechanisms; *Methylobacterium*; *Methylorubrum*; *Micromonospora*

1. WSTĘP

1.1. Rośliny i ich mikrobiota

W warunkach naturalnych, wzrost i rozwój roślin odbywa się w obecności wielu mikroorganizmów, zasiedlających każdy możliwy ekosystem. Taki stan rzeczy implikuje konieczność ciągłych i dynamicznych interakcji pomiędzy rozwijającą się rośliną a mikroorganizmami, jednocześnie prowadząc do formowania się zależności ekologicznych pomiędzy konkretnym parterem roślinnym a drobnoustrojami. Mikroorganizmy (oraz wirusy), pozostające w ścisłych zależnościach ekologicznych z daną rośliną definiuje się jako jej mikrobiotę. Mikrobiota roślinna stanowi więc ogół różnych gatunków bakterii, grzybów, łęgniowców (oraz wirusów), reprezentowanych przez patogeny roślinne (fitopatogeny), komensale oraz dobroczynne mikroorganizmy, promujące wzrost roślin. To dzięki zachowaniu równowagi pomiędzy różnymi grupami mikroorganizmów w obrębie mikrobioty, możliwe jest zachowanie homeostazy partnera roślinnego (Verma i in., 2021; Chialva i in., 2022).

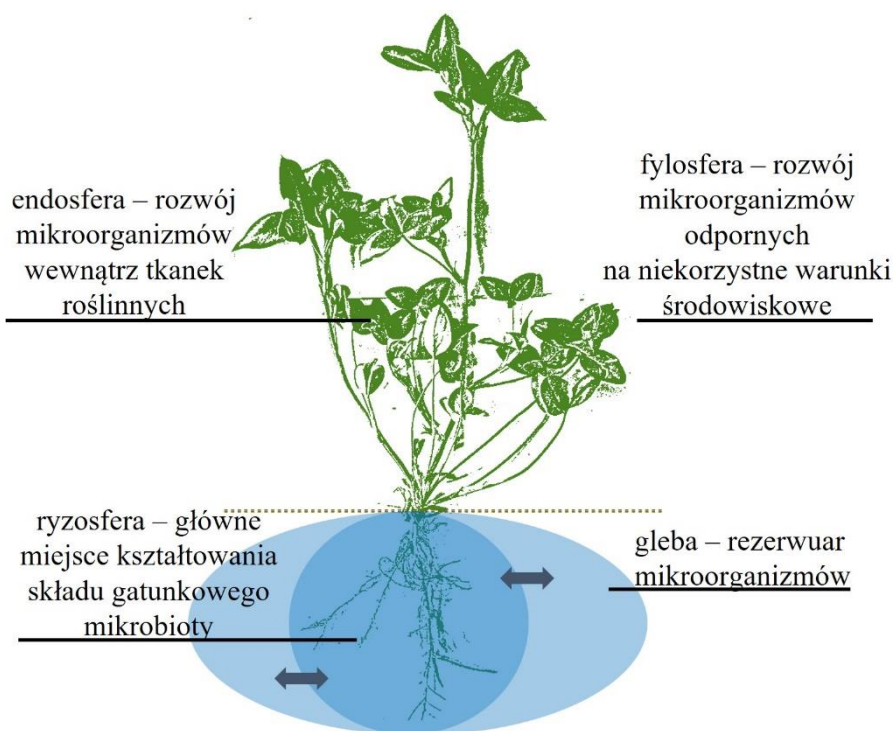


Fig. 1. Miejsca kolonizacji roślin przez mikroorganizmy. Ciemnoniebieskie strzałki obrazują swobodny przepływ mikroorganizmów pomiędzy ryzosferą a środowiskiem glebowym wokół ryzosfery (na podstawie: Vandenkoornhuysse i in., 2015)

Mikroorganizmy tworzące mikrobiotę wykazują zdolność do zasiedlania i kolonizacji różnych nisz ekologicznych, związanych z danym partnerem roślinnym, tworząc w ten sposób mniejsze podgrupy w obrębie mikrobioty (Fig. 1). Siedliskiem o najbardziej zróżnicowanej pod względem gatunkowym i funkcjonalnym zbiorowości mikroorganizmów jest strefa korzeniowa (ryzosfera), definiowana jako ta część gleby, która przylega do korzeni. Ryzosfera kolonizowana jest przez mikroorganizmy glebowe (edafon), stanowiące podstawowe źródło mikroorganizmów endofitycznych. Obejmująca wewnętrzne tkanki roślin endosfera, stanowi miejsce rozwoju mikrobioty endofitycznej, kolonizującej zarówno wewnętrzną przestrzeń korzenia, jak i organy nadziemne. Fylosfera, charakteryzuje się natomiast najmniej korzystnymi warunkami do rozwoju mikroorganizmów; obejmuje ona powierzchnię tkanek okrywających liście oraz pędy (Berlec, 2012; Vandenkoornhuyse i in., 2015).

Fenomen ścisłych zależności pomiędzy roślinami a mikroorganizmami, sięga w swoich początkach czasu pojawienia się pierwszych roślin lądowych; przypuszcza się, że to właśnie zdolność do interakcji z mikroorganizmami, a dokładniej zdolność do wykorzystywania tzw. dobroczynnych właściwości mikroorganizmów, umożliwiła roślinom skuteczną kolonizację stałego lądu. Mikrobiota w sposób istotny wpływa na prawidłowy rozwój partnera roślinnego, uczestnicząc w procesie pozyskiwania substancji mineralnych oraz w produkcji substancji o charakterze fitohormonów, które umożliwiają bezpośrednią regulację wzrostu gospodarza. Warto zaznaczyć, że o niezastąpionej roli mikrobioty w prawidłowym rozwoju roślin, dobitnie świadczą trudności w rozmnażaniu roślin sztucznie pozbawionych naturalnej mikrobioty, do czego dochodzi w czasie procedury rozmnażania metodą kultur *in vitro* (Hardoim i in., 2008).

Na podstawie współczesnej wiedzy należy podkreślić, że pojmowanie rośliny jako pojedynczego, odseparowanego organizmu jest definicją niepełną. Wpływ mikroorganizmów na fenotyp rośliny jest na tyle istotny, że słuszne wydaje się rozszerzenie definicji rośliny, rozumianej odtąd jako „wspólnota organizmów”, tworzona przez roślinę i mikrobiotę jako tzw. „holobiont” czy „superorganizm” (Vandenkoornhuyse i in., 2015; Pathak i in., 2022).

Ostatnia dekada to czas intensywnych badań nad zagadnieniami dotyczącymi interakcji pomiędzy roślinami a mikroorganizmami stanowiącymi ich mikrobiotę, m.in. nad czynnikami kształtującymi jej strukturę gatunkową, szczególnie w kontekście roli systemu immunologicznego roślin oraz wykorzystania w praktyce korzystnych właściwości mikroorga-

nizmów. Pełne zrozumienie relacji zachodzących w obrębie holobiontu roślina – mikroorganizmy, będzie kluczem do ukierunkowanego i praktycznego wykorzystania dobroczynnych mikroorganizmów (Tian i in., 2020; Chialva i in., 2022).

1.2. Endofity – mikroorganizmy kolonizujące wewnętrzne tkanki roślin

Kiedy w 1866 roku niemiecki botanik i mikrobiolog Anton De Bary po raz pierwszy użył terminu „endofit” w celu zdefiniowania odkrytych wewnątrz tkanek roślinnych niepatogennych mikroorganizmów, wielu współczesnych badaczy nadal uważało, że w tkankach zdrowej rośliny nie bytują żadne mikroorganizmy (Kumar i in., 2020). Dziś, choć dokładna definicja terminu „endofit” oraz kierunki jej rozwoju podlegają ciągłym dyskusjom, społeczność naukowców akceptuje definicję zredagowaną wg Hardoima i wsp. (2015), obejmującą wszystkie organizmy, które przynajmniej część cyklu życiowego realizują wewnątrz tkanek roślinnych, nie powodując przy tym objawów chorobowych u partnera roślinnego (Card i in., 2016; Mishra i in., 2021). Występowanie mikrobioty endofitycznej jest zjawiskiem na tyle powszechnym u roślin, że ewentualny brak bakterii endofitycznych wewnątrz konkretnej rośliny, należałoby rozpatrywać jako osobliwy wyjątek (Partida-Martínez i Heil, 2011; Dudeja i Giri, 2014). Stanowiące wewnętrzną (endosferyczną) mikrobiotę endofity zwyczajowo zalicza się do dwóch grup: endofitów właściwych (obligatoryjnych) oraz przejściowych (fakultatywnych). Endofity właściwe charakteryzują się stałą obecnością wewnątrz tkanek rośliny; w związku z wertykalnym sposobem zasiedlania roślin (z rośliny matcznej na rośliny potomne), wykazują oporność na działanie metabolitów roślinnych oraz pozostają w stałych zależnościach mutualistycznych z partnerem roślinnym, niezależnie od warunków środowiska oraz zdrowotności rośliny. Endofity przejściowe to te mikroorganizmy, których przynajmniej część cyklu życiowego przebiega wewnątrz roślin. W zależności od genotypu gospodarza oraz zmieniających się warunków wewnętrznych i zewnętrznych (osłabienie rośliny, występowanie czynników stresowych) mogą wykazywać działanie antagonistyczne wobec gospodarza, przechodząc od mutualizmu do pasożytnictwa. W przeciwieństwie do endofitów obligatoryjnych, zasiedlanie kolejnych roślin, w tym przypadku odbywa się głównie poprzez wnikanie mikroorganizmów wolnożyjących do wnętrza rośliny, czyli horyzontalnie (Wani i in., 2015; Kumar i in., 2020).

Badania dotyczące mikroorganizmów endofitycznych nabierają szczególnego znaczenia w kontekście wykorzystania dobroczynnych mikrobów lub ich metabolitów w medycy-

nie oraz przemyśle i rolnictwie. Użyteczność aplikacyjna stała się przyczynkiem do szerszego zainteresowania naukowców biologią mikroorganizmów endofitycznych, szczególnie w odniesieniu do relacji pomiędzy gospodarzem roślinnym a mikrobiotą endosfery roślinnej oraz pomiędzy poszczególnymi grupami mikroorganizmów endofitycznych (Fig. 2). Zastosowanie nowoczesnych technik, szczególnie interdyscyplinarnej systemiki, pozwala dziś na zrozumienie oraz identyfikację genetycznych i metabolicznych podstaw interakcji pomiędzy partnerem roślinnym oraz mikroorganizmami endofitycznymi (Wani i in., 2015; Tiwari i in., 2023).

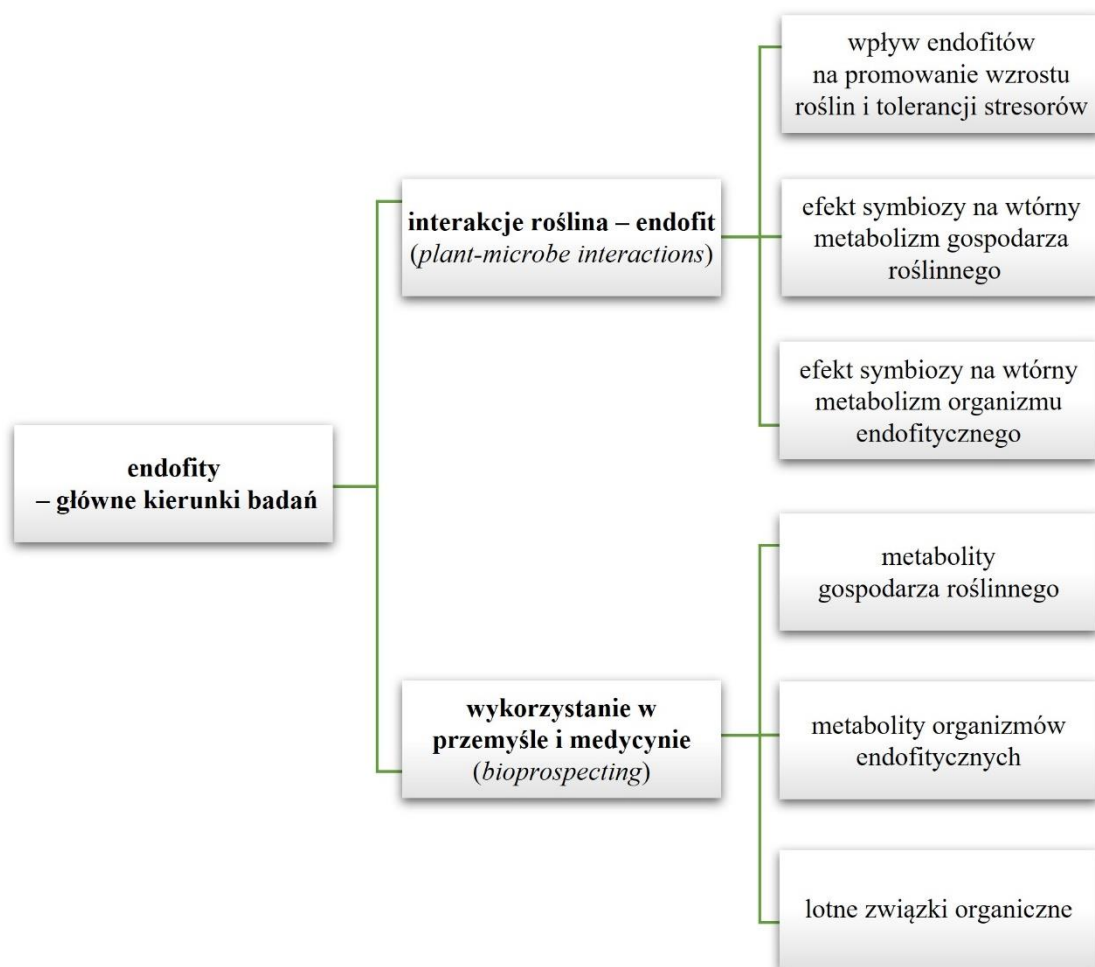


Fig. 2. Główne kierunki badań endofitów (na podstawie: Wani i in., 2015)

Należy jednak podkreślić, że pomimo stosowania zaawansowanych technik i metod badawczych, fenomen interakcji pomiędzy roślinami a endofitami oraz pomiędzy poszczególnymi grupami endofitów nie został jeszcze w pełni wyjaśniony (Afzal i in., 2019; Tiwari i in., 2023), zaś dotychczas wykorzystywane techniki badawcze, obejmujące metody hodowlane oraz testy roślinne, wciąż stanowią ważny i integralny element badań interakcji

roślin oraz endofitów, stanowiąc uzupełnienie systemiki (biomiki) (Papik i in., 2020; Orozco-Mosqueda i Santoyo, 2021).

1.3. Bakterie endofityczne

Aplikacyjny charakter badań nad biologią endofitów, znajduje odzwierciedlenie w prowadzonych od dekad badaniach nad praktycznym wykorzystaniem dobroczynnych szczepów bakterii endofitycznych, ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystywania produktów przemian metabolicznych tych bakterii oraz ich korzystnych właściwości w promowaniu wzrostu i rozwoju roślin (Glick i in., 2020a; Eid i in., 2021). Szacuje się, że dotychczas scharakteryzowane szczepy bakterii endofitycznych, należące zarówno do grupy bakterii wykazujących wzrost na podłożach mikrobiologicznych oraz VBNC („żywe, lecz nie-dające się hodować”, ang. *viable but nonculturable state*), reprezentują ponad 200 różnych rodzajów, należących do 23 typów. Najliczniej reprezentowany jest typ *Proteobacteria* (ponad połowa wszystkich sklasyfikowanych endofitów bakteryjnych); następnie typ *Actinobacteria* (promieniowce), typ *Firmicutes* oraz typ *Bacteroidetes* (Fig. 3). Do najliczniej reprezentowanych rodzajów zalicza się należące do typu *Proteobacteria* rodzaje: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Massilia*, *Variovorax* oraz *Collimonas*. Typ *Actinobacteria* reprezentują rodzaje: *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter* oraz *Curtobacterium*, natomiast do typu *Firmicutes* należą rodzaje: *Bacillus*, *Paenibacillus* i *Staphylococcus* (Malfanova i in., 2013; Hardoim i in., 2015; Khan i in., 2020).

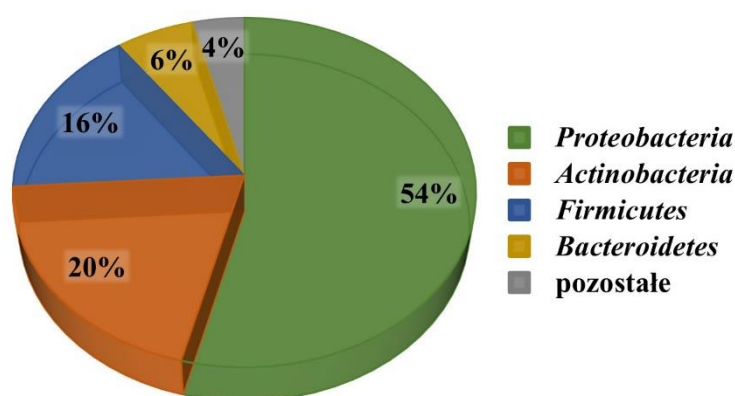


Fig. 3. Procentowy udział poszczególnych typów bakterii w zbiorowości scharakteryzowanych dotychczas szczepów bakterii endofitycznych (na podstawie: Hardoim i in., 2015; Khan i in., 2020)

Struktura gatunkowa bakterii wchodzących w skład mikrobioty endofitycznej zmienia się w wyniku działania wielu czynników, poczynając od gatunku rośliny oraz jej genotypu, typu gleby oraz ewentualnych zabiegów agrotechnicznych, szerokości geograficznej, zdrowotności rośliny, czy fazy jej rozwoju (Edwards i in., 2015; Naylor i in., 2017). W efekcie wzajemnego oddziaływania czynników biotycznych i abiotycznych, struktura gatunkowa mikrobioty endofitycznej podlega licznym fluktuacjom; nie należy więc oczekiwać, iż należące do tego samego gatunku rośliny uprawiane w tym samym typie gleby, charakteryzować się będą identycznym składem gatunkowym bakterii endofitycznych (Germida i in., 1998; Siciliano i in., 2001).

1.4. Charakterystyka interakcji roślina – bakterie endofityczne

1.4.1. Kolonizacja wewnętrznych tkanek roślinnych przez bakterie

Proces kolonizacji wewnętrznych tkanek roślinnych przez szczepy bakteryjne jest wieloetapowy (Fig. 4) i polega na wzajemnej komunikacji pomiędzy komórkami bakterii a partnerem roślinnym, dokonującej się na poziomie molekularnym i sekrecyjnym. W przypadku bakterii, o możliwości komunikacji z roślinami decydują tzw. zdolności kolonizacyjne (ang. *colonization traits*): obecność dwuskładnikowego systemu regulacyjnego (ang. *two-component regulatory system*), zdolność do aktywnego ruchu, chemotaksji oraz formowania biofilmu; ponadto obecność struktur komórkowych takich jak flagelle oraz pilusy. Kolonizacja wewnętrznych tkanek roślin przez szczepy bakteryjne dokonuje się zazwyczaj poprzez wnikanie bakterii do przestrzeni międzykomórkowych wewnętrznych tkanek korzenia, skąd mogą one migrować do innych części gospodarza roślinnego (Kumar i in., 2020; Noman i in., 2021).

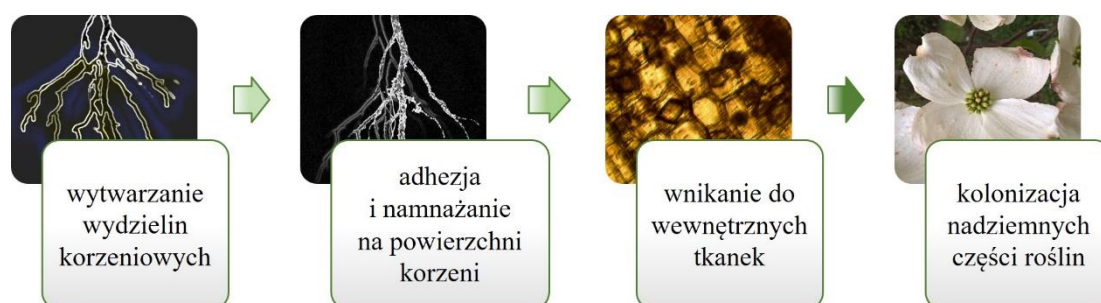


Fig. 4. Etapy procesu kolonizacji wewnętrznych tkanek roślinnych przez bakterie endofityczne (na podstawie: Kumar i in., 2020)

1.4.1.1. Kolonizacja przez korzenie

Sygnałem do rozpoczęcia kolonizacji tkanek korzenia jest zapoczątkowywany przez roślinę proces wytwarzania wydzielin korzeniowych – związków chemicznych o charakterze selektywnych, organicznych chemoatraktantów. Wydzielane szczególnie przez włósniki oraz szczytowe części nowo powstających korzeni substancje (głównie węglowodory, lipidy, fenole, aminokwasy oraz flawonoidy i strigolaktyny), mogą być wykorzystywane przez bakterie jako źródło energii i składników odżywczych, co umożliwia ich rozwój w bezpośredniej bliskości tkanek okrywających korzenie oraz – w późniejszym etapie – adhezję do komórek ryzodermy. Co ważne, skład chemiczny wydzielin korzeniowych różni się nie tylko w zależności od genotypu rośliny, ale także jej kondycji fizjologicznej (wiek, zdrowotność), co pozwala na aktywne modelowanie składu mikrobioty endofitycznej przez partnera roślinnego (Sharma i in., 2020; Taulé i in., 2021).

Obecność wydzielin korzeniowych umożliwia promowanie wzrostu wielu szczepów bakterii, wykazujących dodatnią chemotaksję w stosunku do wytwarzanych przez roślinę substancji. Pomimo to, adhezja komórek bakteryjnych do powierzchni rośliny jest newralgicznym etapem kolonizacji i tylko szczepy zdolne do wytworzenia biofilmu i/lub zagregowania komórek bakteryjnych na powierzchni tkanki okrywającej korzeń mogą w sposób skuteczny skolonizować wnętrze rośliny. Na tym etapie, bakterie wykazują daleko posuniętą adaptację do warunków środowiskowych panujących w ryzopłanie. Kluczową rolę w procesie adhezji odgrywają również struktury komórkowe: flagelle, fimbrie oraz pilusy; ponadto wydzielany EPS (egzopolisacharyd), obecność LPS (lipopolisacharyd) oraz białka błony zewnętrznej (w tym poryny) ułatwiają konstytuowanie się komórek bakteryjnych na powierzchni skórki korzenia (Bogino i in., 2013; Pinski i in., 2019).

Wnikanie bakterii do wnętrza roślin z zasady odbywa się w sposób pasywny, często poprzez przenikanie w miejscach naturalnych otarć powstałych w efekcie intensywnego wzrostu komórek włósnikowych lub w miejscach wzrostu apikalnego nowopowstających korzeni bocznych. Ponadto, bakterie mogą penetrować korzenie w sposób aktywny, dzięki wytwarzaniu enzymów degradujących ścianę komórkową, tzw. CWDEs (ang. *cel-wall degrade enzymes*) takich jak endoglukanazy oraz pektynazy, zaangażowanych w degradację polimerów ścian komórkowych komórek korzenia. Co ciekawe, zdolność do produkcji CWDE jest cechą wspólną dla endofitów oraz fitopatogenów, jednak jak zauważają Bulgarelli i wsp. (2013) oraz Afzal i wsp. (2019), w przypadku bakterii endofitycznych ilość pro-

dukowanych CWDEs jest mniejsza niż w przypadku fitopatogenów i zazwyczaj nie prowadzi do indukowania odpowiedzi systemów obronnych rośliny-gospodarza.

Migracja bakterii do oddalonych części roślin odbywa się systemicznie, z wykorzystaniem elementów ksylemu oraz tzw. strumienia transpiracyjnego, polegającego na stałej migracji wody z korzeni i przemieszczaniu jej w kierunku liści, będących zarazem najczęstszym miejscem lokowania się bakterii endofitycznych w nadziemnych częściach roślin (Afzal i in., 2019). Należy podkreślić, że istotnym czynnikiem ułatwiającym czy umożliwiającym migrację bakterii są ich własne struktury komórkowe, takie jak flagelle oraz pilusy (Kumar i in., 2020). W naturalnych warunkach, liczba CFU (jednostek tworzących kolonię, ang. colony forming unit) bakterii w częściach nadziemnych roślin jest o wiele mniejsza, niż w tkankach korzeni i sięga od 10^3 do 10^4 CFU/g świeżej masy. Szacuje się, że liczebność endofitów wewnątrz korzeni waha się pomiędzy 10^4 a 10^8 CFU/g świeżej masy korzeni. Liczby te wyraźnie kontrastują z szacowaną liczebnością bakterii w ryzosferze oraz w glebie – liczebność między 10^6 a 10^9 CFU/g (Compant i in., 2010; Bulgarelli i in., 2013). Co ważne, kolonizacja tkanek korzenia nie musi pociągać za sobą transmisji bakterii do dalej oddalonych tkanek (Prieto i in., 2011).

1.4.1.2. Kolonizacja przez części nadziemne

Mechanizm kolonizacji endosfery roślin poprzez organy nadziemne pozostaje stosunkowo słabo poznany procesem, charakterystycznym raczej dla mikroorganizmów fitopatogennych, niż dla endofitów. Źródłem mikroorganizmów jest mikrobiota fyllosfery, w tym bakterie lub spory przenoszone przez wiatr, deszcz czy owady. Proces wnikania może odbywać się przez naturalne otwory w tkankach okrywających, czyli aparaty szparkowe, hydrotody, a nawet organy rozmnażania generatywnego lub w przypadku roślin okrytonasiennych – owoce. Co więcej, bakterie mogą także wnikać do wnętrza roślin poprzez otwory powstające pod wpływem czynników biotycznych i abiotycznych, szczególnie poprzez uszkodzenia mechaniczne spowodowane przez czynniki atmosferyczne lub żerowanie szkodników (Bodenhausen i in., 2013).

1.4.2. Rola systemu immunologicznego rośliny w kształtowaniu struktury mikrobioty endofitycznej

Naruszenie integralności tkanek rośliny skutkuje uruchomieniem reakcji obronnych, będących jednym z wielu elementów systemu odpornościowego roślin. W wielu przypadkach, reakcja immunologiczna partnera roślinnego uniemożliwia penetrację endosfery przez endofity oraz wytworzenie się ścisłych interakcji roślina – endofit. Jednocześnie wiadomo, że wnikające do wnętrza tkanek roślinnych bakterie endofityczne nie zaburzają homeostazy gospodarza roślinnego, choć różnice pomiędzy bakteriami endofitycznymi a patogennymi mogą być nieznaczne (López-Fernández i in., 2015; Sheibani-Tezerji i in., 2015). Wydaje się, że istotną rolę w procesie identyfikacji bakterii jako potencjalnych endofitów (w odróżnieniu od potencjalnych fitopatogenów) odgrywa właśnie system odpornościowy roślin (Fessel i Zuccaro, 2016).

Kolonizujące powierzchnię roślin czy tkanki wewnętrzne mikroorganizmy, charakteryzują się występowaniem tzw. molekularnych wzorców związanych z patogenami (PAMP, ang. *pathogen-associated molecular patterns*) lub w przypadku innych drobnoustrojów, molekularnych wzorców związanych z mikroorganizmami (MAMP, ang. *microbe-associated molecular patterns*). Wśród nich szczególną rolę odgrywają flagelle, LPS, EPS czy wchodzący w skład ściany komórkowej peptydoglikan. Komórki roślinne, dzięki obecności błonowych receptorów określanych jako receptory rozpoznające wzorce molekularne (PRR, ang. *pattern recognition receptors*) wiążące cząsteczki typu MAMP/PAMP, wykazują zdolność do rozpoznawania zagrożeń związanych z atakiem patogenów (PAMP), w wyniku czego uruchomione zostają mechanizmy obronne, współtworzące tzw. pierwszą linię obrony: produkcja reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*), wytwarzanie określonych metabolitów wtórnych oraz aktywacja genów związanych z reakcjami odpornościowymi (Pinski i in., 2019; Dubey i in., 2020; Kumar i in., 2020). W przypadku roślinnej odpowiedzi na MAMP bakterii endofitycznych, zazwyczaj nie dochodzi do silnych reakcji obronnych (lub nie występują wcale). W toku koewolucji z roślinami, endofity wykształciły bowiem zdolność do „unikania” indukcji systemu immunologicznego, chociażby poprzez wytwarzanie substancji częściowo maskujących własne MAMP czy produkowanie enzymów antyoksydacyjnych, zdolnych do częściowej obrony przed ROS (Alquéres i in., 2013; Fukami i in., 2016; Deng i in., 2019).

1.4.3. Mechanizmy promowania wzrostu roślin przez bakterie endofityczne

Bakterie endofityczne promujące wzrost roślin stanowią szczególną część szerszej grupy dobroczynnych mikroorganizmów, tzw. bakterii promujących wzrost roślin (ang. *plant growth promoting bacteria*, PGPB) i jako takie, charakteryzują się zdolnością do realizowania niejednokrotnie takich samych mechanizmów promowania wzrostu gospodarza roślinnego, jak pozostałe PGPB. Należy jednak podkreślić, że o ile w przypadku grupy PGPB, zrozumienie istoty tych mechanizmów w dużej mierze zawdzięcza się badaniom związanym z bakteriami glebowymi, o tyle w przypadku bakterii endofitycznych, w wielu przypadkach pozostają one nie w pełni wyjaśnione (Etesami i in., 2017).

Bakterie endofityczne mogą promować wzrost gospodarza roślinnego w sposób bezpośredni lub pośredni (Fig. 5); to rozróżnienie, stało się podstawą do szeroko akceptowanego podziału poznanych jak dotąd mechanizmów promowania wzrostu roślin (Santoyo i in., 2016; Prasad i in., 2020).

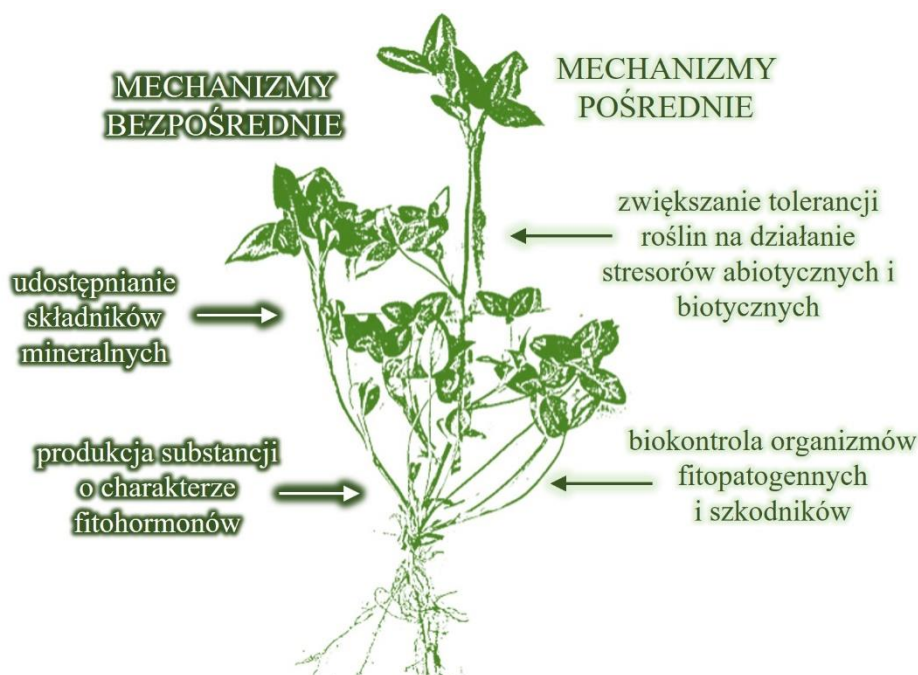


Fig. 5. Bezpośrednie i pośrednie mechanizmy promowania wzrostu roślin przez bakterie endofityczne (na podstawie: Santoyo i in., 2016; Prasad i in., 2020)

1.4.3.1. Mechanizmy bezpośrednie

Bezpośrednie mechanizmy promowania wzrostu roślin przez bakterie endofityczne obejmują szereg reakcji biochemicznych, związanych z udostępnianiem roślinom składników mineralnych oraz produkcją substancji chemicznych, pełniących w roślinie rolę hormonów roślinnych (Fig. 6).

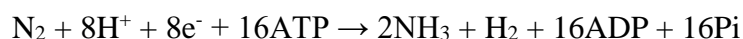


Fig. 6. Bezpośrednie mechanizmy promowania wzrostu roślin przez bakterie endofityczne (opracowanie własne)

Udostępnianie składników mineralnych

Azot (N) jest jednym z pierwiastków biogennych, którego niedobór w sposób istotny ogranicza zdolności plonotwórcze roślin. Dominującą w przyrodzie formą tego pierwiastka jest forma gazowa (N_2), która choć biologicznie niedostępna dla roślin, może być w sposób efektywny przekształcana przez niektóre bakterie do postaci amoniaku (NH_3), którego jony są w pełni przyswajalne przez rośliny. Proces biologicznego wiązania (redukcji) azotu atmosferycznego przez bakterie endofityczne możliwy jest dzięki obecności w komórkach bakteryjnych kompleksu enzymatycznego zwanego nitrogenazą. Enzym ten, wrażliwy na działanie tlenu cząsteczkowego, składa się z dwóch komponentów – nitrogenazy oraz reduktazy nitrogenazowej. Nitrogenaza, nazywana białkiem *Mo-Fe*, charakteryzuje się obecnością jonów molibdenu, żelaza i siarki, choć znane są również alternatywne wersje tego białka, zawierające jedynie żelazo i siarkę lub wanad, żelazo i siarkę. Nitrogenaza odpowiada za redukcję azotu cząsteczkowego do amoniaku. Rozerwanie potrójnego, kowalencyjnego wiązania występującego pomiędzy atomami pojedynczej cząsteczki azotu ($N\equiv N$)

jest procesem kosztownym energetycznie i odbywa się z wykorzystaniem energii pochodzącej z hydrolizy 16 cząsteczek adenozyntrifosforanu (ATP), według wzoru:



Reduktaza nitrogenazowa, zwana również białkiem *Fe*, zawiera w swojej strukturze jony żelaza oraz siarki, i odpowiada za transport elektronów z donora (ferrodoksyna) na akceptor, którym jest utleniona dinitrogenaza, przez co przywrócony zostaje jej pierwotny charakter oraz zdolność do ponownego katalizowania reakcji redukcji azotu cząsteczkowego. Zdolne do diazotrofii bakterie endofityczne (zwane diazotrofami), uważane są za szczególne źródło azotu dla roślin nienależących do rodziny bobowate. Co więcej, endosfera, rozpatrywana jako siedlisko dla diazotrofów, charakteryzuje się lepszymi warunkami do wiązania azotu atmosferycznego niż ryzosfera (Demtröder i in., 2019; Li i in., 2019; Rana i in., 2023). Zdolność endofitów do diazotrofii wykazano w przypadku wielu rodzajów, m.in. *Azoarcus*, *Gluconacetobacter*, *Pantoea* czy *Enterobacter* (Cocking i in., 2005; Ullah i in., 2019; Guo i in., 2020; Singh i in., 2021).

Fosfor (P), jest makroelementem, który powszechnie występuje w glebie, jednak w ponad 95 % w formie niedostępnej dla roślin. Jest on pierwiastkiem niezbędnym dla prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Odgrywa ważną rolę w metabolizmie komórki, między innymi w procesie fotosyntezy, czy też akumulowania energii. Zarówno nieorganiczne, jak i organiczne związki fosforu mogą być udostępniane roślinom na drodze rozpuszczania czy mineralizacji za pośrednictwem bakterii endofitycznych, wykazujących zdolność do produkcji kwasów organicznych czy enzymów takich jak fosfatazy czy fitazy, uczestniczących w hydrolizie form organicznych fosforu. Co więcej bakterie endofityczne mogą przyczyniać się do zwiększania biodostępności fosforu poprzez chelatację jonów odpowiedzialnych za jego precypitację (Sharma i in., 2013; Prasad i in., 2020; Divjot i in., 2021). Zdolność do udostępniania jonów fosforanowych stwierdzono m.in. u endofitycznych szczepów z rodzajów *Pseudomonas* czy *Enterobacter* (Oteino i in., 2015; Lucero i in., 2021).

Kolejny pierwiastek biogeny – **potas (K)**, niezbędny m.in. w procesach regulacji wymiany gazowej oraz transportu wody i składników odżywczych wewnątrz roślin, występuje zazwyczaj w glebie w postaci trudno rozpuszczalnych związków nieorganicznych. Podobnie jak w przypadku fosforu, uwalnianie tego pierwiastka zachodzi przy udziale mikroorganizmów, a dokładniej dzięki produkowanym przez nie kwasom organicznym, takim jak kwas

cytrynowy, jabłkowy, szczawiowy czy glukonowy. Chociaż w przypadku nierozpuszczalnych form potasu, zdolność do solubilizacji tych związków jest raczej domeną bakterii glebowych, bakterie endofityczne, m.in. należące do rodzajów *Bacillus* oraz *Pseudomonas*, również mogą wykazywać zdolność do udostępniania roślinom tego pierwiastka w formie łatwo przyswajalnej, tj. jonów kationowych (K^+) (Etesami i in., 2017; Bolivar-Anillo i in., 2021; Rana i in., 2021).

Żelazo (Fe) pełni rolę kofaktora w wielu procesach enzymatycznych w roślinie. Jest również niezbędne w procesie fotosyntezy oraz akumulacji azotu. Jednym z mechanizmów ułatwiających pobieranie łatwo przyswajalnych form tego pierwiastka, uwolnionych z dominujących w glebie, trudno rozpuszczalnych związków żelaza (III), jest produkcja sideroforów, produkowanych m.in. przez bakterie endofityczne, w warunkach niskiej zawartości biodostępnego żelaza. Siderofory są niskocząsteczkowymi, organicznymi związkami, których podstawową funkcją jest chelatowanie jonów żelaza (Fe^{3+}) i ich redukcja do jonów (Fe^{2+}), przez co jony te stają się dostępne dla roślin. Ze względu na charakter strukturalny, większość produkowanych sideroforów zalicza się do klasy sideroforów hydroksamowych (pochodnych kwasów hydroksamowych) lub katecholowych (pochodne fenolu); ponadto, siderofory jako takie zalicza się do szerszej grupy związków zwanych metaloforami, charakteryzujących się wysokim powinowactwem nie tylko do żelaza, ale również do innych metali (Gałązka i in., 2015; Glick, B.R., 2020b). Metalofory produkowane m.in. w celu ułatwienia pobierania mikroelementów, wykazują zdolność do adsorpcji różnych metali i półmetali (m.in. jonów Al^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+}). Metalofory odgrywają szczególną rolę w warunkach wzrostu rośliny w glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi, zwiększając tolerancję roślin na stres wywołany obecnością szkodliwych pierwiastków oraz ułatwiając bioimmobilizację metali ciężkich wewnątrz tkanek roślinnych, co znajduje szczególne zastosowanie w przypadku tzw. roślin hiperakumulatorowych, szczególnie przydatnych w procesach fitoremediacji. Co ciekawe, niewielkie ilości metali ciężkich mogą nawet stymulować wzrost bakterii (Kraemer i in., 2014; Cuaxinque-Flores i in., 2020). Zdolność do wytwarzania metaloforów stwierdzono m. in. u endofitycznych szczepów należących do rodzajów *Micromonospora*, *Frankia* czy *Pseudomonas* (Chen, 2014; Deicke i in., 2019; Ortúzar i in., 2020).

Cykl ryzofagii (rhizophagy cycle)

Na szczególną uwagę zasługuje proces uzupełniania składników mineralnych przez rośliny, zwany cyklem ryzofagii (Fig. 7). Opisany pierwotnie przez Paungfoo-Lonhienne i

wsp. (2010), cykl ten wydaje się zjawiskiem właściwym dla wszystkich roślin wytwarzających włósniki, zaś samo pozyskiwanie związków mineralnych (szczególnie azotu oraz mikroelementów) w wyniku cyklu ryzofagii może być istotnym mechanizmem wspomagającym wzrost i rozwój roślin (Verma i in., 2017).

Żyjące w ryzosferze bakterie, namnażające się w wyniku wykorzystywania wydzielin korzeniowych, wnikają do przestrzeni międzykomórkowych merystemu apikalnego korzenia. Bakterie endofityczne zostają następnie uwolnione do przestrzeni peryplazmatycznych komórek merystemu; tam, w wyniku działania reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) zostają pozbawione ściany komórkowej i przyjmują charakterystyczny kształt litery „L”.

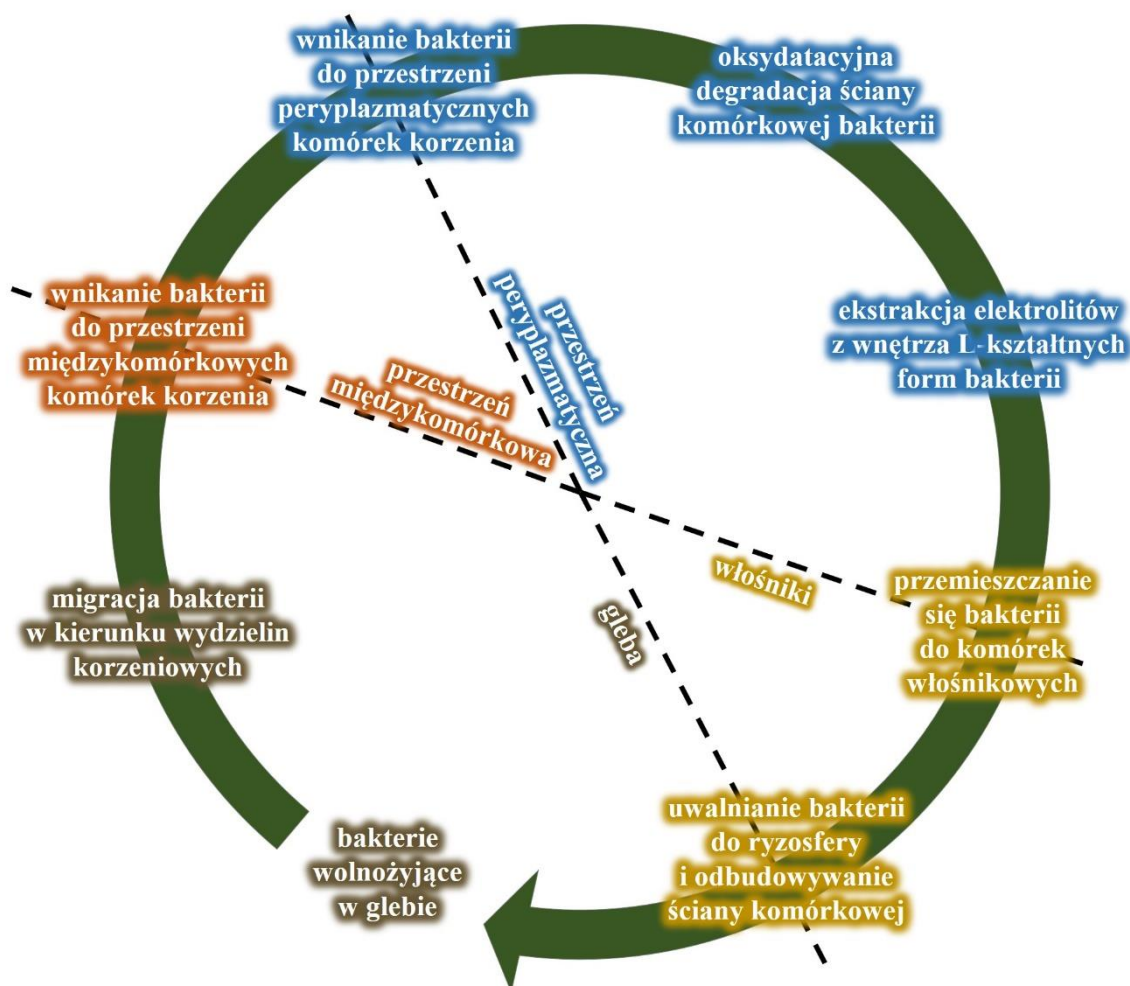


Fig. 7. Schematyczny przebieg cyklu ryzofagii
(opracowanie własne)

W miarę dojrzewania komórek korzenia, część bakterii zostaje ponownie poddawana działaniu reaktywnych form tlenu powstających przy udziale oksydazy NADPH na błonach plazmatycznych komórek korzenia, co prowadzi do uszkodzenia komórki bakteryjnej i pozyskania przez roślinę składników odżywczych. Bakterie, które przeżyją w komórkach korzenia, gromadzą się w szczytowych częściach komórek włóśnikowych. Co ciekawe, ich obecność w komórkach włóśnikowych jest obligatoryjna w procesie elongacji włóśników. Endofity zostają następnie uwolnione do środowiska glebowego poprzez pory w komórkach włóśnikowych; tu następuje proces odbudowy ściany komórkowej oraz uzupełniania składników mineralnych przez bakterie, które następnie mogą zostać ponownie włączone do cyklu (White i in., 2018).

Produkcja substancji o charakterze fitohormonów

Bakterie endofityczne mogą w sposób bezpośredni ingerować w procesy związane ze wzrostem i rozwojem rośliny poprzez produkcję i sekrecję związków chemicznych pełniących w roślinach rolę hormonów (fitohormonów) oraz regulatorów wzrostu.

Auksyny odpowiadają za wzrost wydłużeniowy korzeni oraz części nadziemnych. Ponadto regulują wytwarzanie wydzielin korzeniowych oraz uczestniczą w regulacji mechanizmów obronnych przeciwko fitopatogenom. Biosynteza kwasu indolilo-3-octowego (IAA, ang. *indole-3-acetic acid*) oraz związków podobnych do IAA (m.in. kwasy indolilo-3-masłowy czy indolilo-3-mlekowy) przez bakterie endofityczne może przebiegać z wykorzystaniem co najmniej kilku zachodzących na siebie szlaków metabolicznych, co dowodzi o istotności tego mechanizmu dla PGPB (Goswami i in., 2015; Orozco-Mosqueda i in., 2023). Produkcja dużych ilości IAA, charakterystyczna raczej dla fitopatogenów niż PGPE, nie zawsze jest korzystna dla roślin, może bowiem skutkować ich karłowaceniem lub powstawaniem narośli (Rashid i in., 2012; Morales-Cedeño i in., 2021). Zdolność do produkcji auksyn jest jednak jedną z charakterystycznych cech endofitycznych PGPB. Jak wykazano, skuteczność w promowaniu wzrostu gospodarza roślinnego wykazano w przypadku rodzaju *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* czy *Enterobacter* (Bhutani i in., 2018; Adeleke i in., 2022; Tian i in., 2023).

Chociaż do najczęściej produkowanych przez bakterie endofityczne fitohormonów zalicza się IAA i jego pochodne, endofity bakteryjne mogą również produkować związki o charakterze aktywnych biologicznie **giberelin**, **cytokinin** lub jak w przypadku niektórych szczepów – obydwu hormonów jednocześnie, co wykazano m.in. w przypadku opisanego przez Hamzah i wsp. (2017) szczepu *Bacillus amyloliquefaciens* LKM-UL. Gibereliny

uczestniczą w procesach wzrostu siewek, liści i pędów, rozwoju organów generatywnych oraz opóźnianiu starzenia się rośliny. Spośród ponad stu substancji chemicznych, zaklasyfikowanych do grupy giberelin, jedynie nieliczne związki wykazują aktywność biologiczną wobec roślin, m.in. produkowany przez bakterie endofityczne kwas giberelinowy (GA3). Co ważne, wpływ giberelin na procesy fizjologiczne zachodzące w roślinie może się różnić w zależności od jej gatunku. W przypadku roślin należących do rodziny *Fabaceae* – gibereliny uczestniczą w procesie regulacji brodawkowania z udziałem tzw. bakterii ryzobiowych (Hedden, 2020).

Cytokiny odpowiadają m.in. za dzielenie i różnicowanie się komórek, co w sposób bezpośredni przekłada się na opóźnianie procesów starzenia się roślin. Ponadto, stymulują elongację korzeni oraz zwiększanie odporności rośliny na działanie stresorów. Wytwarzane są zarówno przez mikroorganizmy promujące wzrost roślin jak i przez fitopatogeny, jednak – podobnie jak w przypadku IAA – ilości cytokinin produkowanych przez fitopatogeny prowadzi raczej do zahamowania wzrostu rośliny niż stymulacji (Glick, 2012). Zdolność do syntezy giberelin lub cytokinin wykazano m.in. u endofitów z rodzajów *Methylobacterium*, *Azospirillum*, *Sphingomonas*, *Serratia* czy *Bacillus* (Cohen i in., 2009; Shahzad i in., 2016; Asaf i in., 2017; Jorge i in., 2019).

Kolejnym fitohormonem, który może być produkowanym przez bakterie jest **kwas abscysynowy** (ABA, ang. *abscisic acid*), pełniący szczególną rolę w procesie dojrzewania nasion oraz w aktywacji mechanizmów obronnych związanych z działaniem niektórych stresorów (m.in. stresu wodnego). Inokulacja ryżu (*Oryza sativa* L.) z wykorzystaniem endofitycznego szczepu *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1, zdolnego do produkcji ABA w warunkach *in vitro*, skutkowała zwiększeniem tolerancji roślin na stres solny *in planta*; podobny efekt uzyskano w przypadku soi (*Glycine max* L.), inokulowanej endofitycznym szczepem *Curtobacterium* sp. SAK1 zdolnym do produkcji kwasu abscysynowego (Shahzad i in., 2016; Khan i in., 2019; Ali i in., 2021). Zdolność bakterii endofitycznych do produkcji ABA ma również niebagatelne znaczenie w przypadku procesów związanych z fitoremediacją. Produkowany przez mikroorganizmy kwas abscysynowy odpowiada za zwiększenie tolerancji roślin na stres związany z obecnością metali ciężkich w podłożu poprzez zmniejszenie akumulacji metali wewnątrz rośliny. Mechanizm ten, związany z promowaniem wzrostu gospodarza roślinnego, może okazać się niepożądany w przypadku wykorzystywania w procesach remediacji terenów skażonych z wykorzystaniem roślin hiperakumulatorowych, których działanie opiera się m.in. na bioakumulacji zanieczyszczeń wewnątrz tkanek roślinnych (Lu i in., 2020).

1.4.3.2. Mechanizmy pośrednie

Bakterie endofityczne mogą wykazywać zdolność do promowania wzrostu gospodarza roślinnego w sposób pośredni, przyczyniając się zwiększenia tolerancji rośliny na działanie stresorów biotycznych i abiotycznych. Dodatkowo, bakterie endofityczne mogą promować wzrost roślin poprzez szeroko pojętą biokontrolę szkodliwych organizmów, w szczególności fitopatogenów oraz szkodników roślin (Fig. 8).

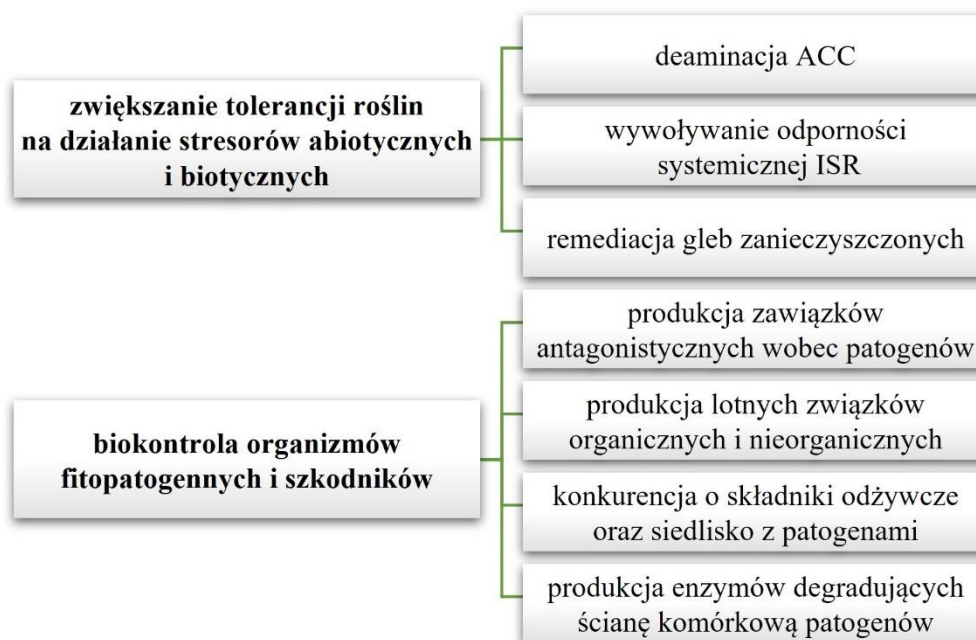


Fig. 8. Pośrednie mechanizmy promowania wzrostu roślin przez bakterie endofityczne (opracowanie własne)

Zwiększanie tolerancji roślin na działanie stresorów abiotycznych i biotycznych

Ekspozycja roślin na niekorzystne czynniki środowiska skutkuje tzw. stanem stresu rośliny. Susza, zalanie, zasolenie, niedobór składników mineralnych, ekstremalne temperatury (stresory abiotyczne) czy atak mikroorganizmów fitopatogennych lub szkodników (stresory biotyczne) mogą powodować poważne zachwianie homeostazy rośliny, co w konsekwencji prowadzi do jej zamierania (Liu i in., 2020). Jedną z kluczowych funkcji, jaką bakterie endofityczne mogą pełnić w warunkach stresu jest zdolność do zwiększania tolerancji gospodarza roślinnego na niekorzystne warunki środowiskowe m.in. poprzez rozkład etylenu (Glick, 2020a; Orozco-Mosqueda i in., 2023). Etylen to gazowy fitohormon, pełniący w roślinie wiele funkcji, związanych m.in. z syntezą antocyjanów, transportem auksyn czy pobudzaniem procesu kiełkowania nasion. Etylen odpowiada również za procesy starzenia

się roślin i jako tzw. hormon stresu, wytwarzany jest w odpowiedzi na pojawienie się stresorów biotycznych i abiotycznych, przy czym zarówno nadmierne ilości etylenu, jak też kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyowego (ACC, ang. *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid*), będącego prekursorem etylenu, wywołują szereg reakcji fizjologicznych, prowadzących do stopniowego zamierania rośliny (Vanderstraeten i in., 2019). Biosynteza etylenu w tkankach roślinnych rozpoczyna się od konwersji S-adenozylometioniny (SAM, ang. *S-adenosylmethionine*) do kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyowego, który następnie przekształcany jest przy udziale enzymu oksydazy ACC do gazowego etylenu. Rozkład ACC, zachodzący przy udziale enzymu deaminazy ACC skutkuje więc zmniejszeniem końcowej ilości wytwarzanego fitohormonu, zaś w wyniku tej reakcji powstaje α -ketomasłan oraz amoniak, który z powodzeniem może być wykorzystywany przez osłabione występowaniem długotrwałego stresu rośliny jako źródło azotu (Glick, 2014). Zdolność do rozkładu ACC wykazano między innymi u endofitycznych szczepów reprezentujących rodzaje *Sphingomonas*, *Methylobacterium* czy *Arthrobacter* (Alemneh i in., 2021; Choudhury i in., 2021; Sriwati i in., 2023).

Kolonizujące wewnętrzne tkanki roślin bakterie endofityczne, mogą wywoływać u gospodarza roślinnego szereg niespecyficznych reakcji obronnych przeciwko innym mikroorganizmom (fitopatogenom) oraz szkodnikom (tzw. odporność horyzontalna) przygotowując w ten sposób roślinę na ewentualny stres biotyczny. Dzięki produkcji związków chemicznych, będących w istocie cząsteczkami sygnałowymi zaangażowanymi w indukcję roślinnych mechanizmów obronnych, endofity bakteryjne mogą wyzwać tzw. indukowaną odporność systemiczną (**ISR**, ang. *induced systemic resistance*) (Miliute i in., 2015; Oukala i in., 2021). Wyzwalanie mechanizmów ISR, związanych m.in. z intensyfikacją procesu lignifikacji ścian komórkowych rośliny oraz zwiększeniem aktywności enzymów peroksydazy i dysmutazy ponadtlenkowej, następuje w efekcie produkcji kwasu jasmonowego lub etylenu, chociaż w przypadku indukcji systemicznych mechanizmów obronnych przez bakterie endofityczne, molekularne podłoże wywoływania ISR wydaje się bardziej skomplikowane. W ostatnich latach wykazano, że bakterie endofityczne mogą wywoływać ISR także poprzez produkcję kwasu salicylowego, zaangażowanego przede wszystkim w indukcję nabytej odporności systemicznej (SAR, ang. *systemic acquired resistance*), uruchamianej w odpowiedzi na atak fitopatogenów czy szkodników. Indukcję ISR poprzez produkcję SA wykazano w przypadku *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pieterse i in., 2014, Jacob i in., 2020; Srebot i in., 2023). Jak wykazano na przykładzie bakterii z grupy PGPB, do elicytorów

ISR należy zaliczyć również komponenty komórkowe bakterii, m.in. flagelle, LPS czy siderofory (Rumyantsev i in., 2023). Należy jednak podkreślić, iż zdolność szczepów endofitycznych bakterii do wzbudzania ISR odnosi się raczej do konkretnego genotypu rośliny i jako taka może nie wywoływać podobnego skutku w wyniku inokulacji innych gatunków roślin z wykorzystaniem tych samych szczepów (Bakker i in., 2007; Glick, 2020c). Wyzwalanie ISR gospodarza roślinnego, jakkolwiek wciąż pozostawia wiele niejasności, potwierdzono m.in. w przypadku endofitów należących do rodzajów *Bacillus* czy *Micromonospora* (Martínez-Hidalgo i in., 2015; Hossain i in., 2019).

Wykorzystanie endofitów bakteryjnych w remediacji gleb skażonych

Istotną cechą niektórych gatunków bakterii endofitycznych, jest promowanie wzrostu roślin wykorzystywanych w procesie fitoremediacji. Istotą tej techniki jest remediacja środowisk zanieczyszczonych zarówno w sposób naturalny, jak i w efekcie przemian antropogenicznych, związanych m.in z industrializacją czy urbanizacją. Dzięki wykorzystaniu tzw. roślin hiperakumulatorowych, charakteryzujących się wysoką tolerancją na znajdujące się w środowisku zanieczyszczenia oraz zdolnością do ich akumulowania wewnątrz tkanek roślinnych, możliwe staje się usuwanie takich zanieczyszczeń jak metale ciężkie, pozostałości herbicydów czy substancji organicznych, m.in. węglowodorów ropopochodnych (PHs, ang. *petroleum hydrocarbons*) czy cyklicznych węglowodorów aromatycznych (PAHs, ang. *polycyclic aromatic hydrocarbons*). Co ważne, fitoremediacja jest w pełni ekologiczną, powszechnie akceptowaną techniką remediacji, charakteryzującą się skutecznością oraz stosunkowo niskimi nakładami ekonomicznymi, co w sposób jednoznaczny przemawia za wykorzystywaniem tej techniki w praktyce. Szczególnym typem fitoremediacji jest tzw. fitoremediacja wspomagana mikroorganizmami, w tym szczepami bakterii endofitycznych (Feng i in., 2017b; Kafle i in., 2022; Pouresmaieli i in., 2022).

Wykorzystywane w fitoremediacji rośliny pobierają zanieczyszczenia głównie poprzez korzenie w celu ich zakumulowania lub degradacji wewnątrz tkanek roślinnych, m.in. w procesie fitotransformacji (transformacji toksycznych substancji w celu zmniejszenia ich toksyczności z udziałem enzymów roślinnych), fitowolatylicacji (polegającej na przemianie niektórych substancji w związki lotne i uwolnienie do atmosfery) lub przemianom związanym z działalnością mikroorganizmów endofitycznych (Ijaz i in., 2015). Rozwijające się wewnątrz rośliny bakterie, dzięki możliwości rozwoju w siedlisku o mniejszej presji środowiskowej w porównaniu do mikrobioty stanowiącej edafon, mogą w sposób bardziej efektywny uczestniczyć w procesie biodegradacji zanieczyszczeń wewnątrz tkanek roślinnych

(Stępniewska i Kuźniar, 2013). Bakterie endofityczne mogą uczestniczyć w procesach bioakumulacji niebezpiecznych substancji, polegających na inkorporacji toksycznych związków do wnętrza komórek bakteryjnych, co umożliwia czasowe wycofanie tych substancji z obiegu wewnątrz rośliny. Dzięki wytwarzanym enzymom, takim jak hydrolazy, transferazy, katalazy czy peroksydazy, bakterie uczestniczą w bezpośredniej degradacji lub stabilizacji złożonych związków chemicznych, umożliwiając m.in. ich inkorporację przez rośliny. Co więcej, bakterie nie działają „w pojedynkę” ale w układzie roślina – mikroorganizmy, uczestnicząc w procesach degradacji toksycznych związków chemicznych w ramach tzw. kometabolizmu, gdy produkt metabolizmu jednego gatunku, staje się substratem w procesach degradacji realizowanych przez inne gatunki. Dzięki aktywności enzymatycznej bakterii endofitycznych, zakumulowane w roślinie toksyczne związki organiczne mogą zostać zmineralizowane, a następnie wykorzystane do budowy biomasy rośliny. Ponadto, bakterie endofityczne mogą uczestniczyć w degradacji zakumulowanych w roślinie lotnych związków organicznych, które zanim zostaną uwolnione do atmosfery, zalegają w przestrzeniach międzykomórkowych rośliny. W przypadku zanieczyszczeń związanych z występowaniem w glebie metali ciężkich, bakterie przyczyniają się do ich ekstrakcji poprzez produkcję metaloforów, jak również poprzez syntezę ułatwiających demineralizację gleby kwasów organicznych oraz zdolnych do redukcji napięcia powierzchniowego biosurfaktantów, uczestniczących w akumulacji zanieczyszczeń. Co więcej, bakterie endofityczne mogą przyczyniać się do zwiększonej bioakumulacji jonów metali wewnątrz tkanek roślinnych, m.in. dzięki wytwarzaniu substancji białkowych (poryny, białka transportowe, metalotioneiny). Związki te uczestniczą w procesach związanych ze zmniejszeniem fitotoksyczności pobranych przez roślinę jonów, przez co ich pobieranie przez roślinę może być bardziej efektywne (Weyens i in., 2010; Yu i Powles, 2014; Choppala i in., 2014; He i in., 2020; Gavrilescu, 2022). Nie należy zapominać, że obecność endofitycznych PGPB wewnątrz roślin wykorzystywanych w procesach fitoremediacji, wiąże się również z innymi, „tradycyjnymi” procesami promowania wzrostu roślin. Bakterie mogą ułatwiać wzrost partnera roślinnego poprzez ułatwianie pobierania składników mineralnych (azot, fosfor, potas), czy produkcję fitohormonów (szczególnie auksyn) przy jednoczesnym zwiększeniu tolerancji rośliny na stres wywołany obecnością chemicznych zanieczyszczeń, m.in. poprzez produkcję deaminazy ACC.

Wykazano, że szczepy należące do rodzajów *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas* czy *Serratia* wykazują zdolność do promowania wzrostu roślin narażonych na stres spowodowany obecnością toksycznych metali w glebie (Mello i in., 2020; Ma i in., 2022).

Podobnie udowodniono, że należące do rodzajów *Sphingomonas* oraz *Enterobacter* endofityczne izolaty bakteryjne wykazują zdolność do degradacji chloropiryfosu, będącego substancją czynną popularnych niegdyś insektycydów (Li i in., 2007; Feng i in., 2017a; Proadhan i in., 2023). Ponadto, jak donoszą Mitter i wsp. (2019) oraz Fang i wsp. (2023), bakterie z rodzaju *Pseudomonas* czy *Bacillus* wykazują zdolność do degradacji niebezpiecznych dla środowiska węglowodorów, promując wzrost inokulowanych roślin uprawianych odpowiednio w glebie zanieczyszczonej olejem napędowym lub pierścieniowym węglowodorem – fenantrenem.

Biokontrola organizmów fitopatogennych i szkodników

Endofity bakteryjne mogą skutecznie ograniczać rozwój fitopatogenów oraz szkodników roślin. Dzięki zdolności do produkcji związków o charakterze antagonistycznym względem fitopatogennych bakterii czy grzybów, a nawet szkodników roślin, bakterie endofityczne mogą uczestniczyć w ich biokontroli, tj. procesach biologicznego ograniczania liczebności szkodliwych organizmów (Aravind i in., 2009; Narayanan i Glick, 2022).

Bakterie endofityczne mogą wykazywać zdolność do produkcji substancji chemicznych umożliwiających bezpośrednią inhibicję wzrostu mikroorganizmów, szczególnie poprzez produkcję **antybiotyków**. Bakterie endofityczne (zwłaszcza fakultatywne), uważa się za szczególnie cenne źródło antybiotyków, ponieważ mikroorganizmy te wykazują większe przystosowanie do produkcji wielu biologicznie czynnych substancji chemicznych, koniecznych do realizacji endofitycznego trybu funkcjonowania (Narayanan i Glick, 2022). Produkowane przez bakterie endofityczne antybiotyki charakteryzują się działaniem antybakteryjnym, przeciwgrzybiczym i antywirusowym; ponadto mogą chronić roślinę przed atakiem szkodników. Szczególną rolę w procesie biosyntezy antybiotyków odgrywają bakterie należące do rodzajów *Bacillus*, *Pseudomonas* oraz typu *Actinobacteria* (Ma i in., 2013; Azevedo i in., 2000; Gamalero i Glick, 2020). Fikri i wsp. (2018) wykazali potencjał dwóch endofitycznych szczepów, należących do rodzajów *Pseudomonas* i *Bacillus*, do hamowania wzrostu patogennych bakterii oraz fitopatogennych grzybów z rodzaju *Fusarium*. Diale i wsp. (2018) wykazali natomiast zdolność endofitycznych szczepów *Bacillus*, *Enterobacter* oraz *Pseudomonas* do hamowania wzrostu patogennych bakterii z rodzajów *Escherichia* czy *Staphylococcus*. Z kolei jak wykazano w pracy Jiang i wsp. (2018), blisko połowa bakterii należących do typu *Actinobacteria*, wyizolowanych z tkanek wewnętrznych roślin namorzynowych, wykazywała zdolność do hamowania wzrostu innych bakterii w wyniku wydzielania substancji o charakterze antybiotycznym.

Bakterie endofityczne mogą wykazywać zdolność do syntezy **CWDE**, związków szczególnie użytecznych w biokontroli fitopatogennych grzybów. Uczestniczące w degradacji polimerów wchodzących w skład ścian komórkowych patogenów enzymy bakteryjne (m.in. chitynazy, glukanazy czy lipazy) prowadzą do lizy komórek patogenów, ograniczając lub uniemożliwiając ich wzrost, co wykazano m.in. w przypadku gatunków z rodzajów *Bacillus*, *Paenibacillus* czy *Stenotrophomonas* (Ma i in., 2013; Mamangkey i in., 2022). Co więcej, endofity bakteryjne mogą charakteryzować się zdolnością do pasożytnictwa. Wytworzone w niewielkich ilościach CWDE mogą zostać wykorzystane przez bakterie w procesach degradacji ściany komórkowej fitopatogenów oraz przyswajania pozyskanych w ten sposób składników odżywczych (Spadaro i Droby, 2016).

Niektóre z bakterii, charakteryzujące się zdolnością do produkcji niskocząsteczkowych, **lotnych związków organicznych** (VOCs, ang. *volatile organic compounds*), wykazujących antagonistyczną aktywność wobec fitopatogenów już w niewielkich stężeniach (alkohole, terpeny, estry, aldehydy i inne), mogą równie skutecznie ograniczać wzrost fitopatogenów. Antagonistyczne właściwości związane z wydzielaniem VOCs wykazano m.in. na przykładzie endofitycznych bakterii z rodzaju *Streptomyces* oraz *Pantoea*, charakteryzujących się zdolnością do produkcji lotnych związków organicznych oraz antagonizmem wobec fitopatogennej bakterii *Bacillus pumilus*. W literaturze opisano również endofityczny szczep bakterii z rodzaju *Bacillus*, zdolny do produkcji VOCs, który wykazywał jednocześnie działanie antibakteryjne wobec patogennych *Klebsiella pneumoniae* i *Staphylococcus aureus* oraz antygrzybiczne w stosunku do fitopatogennych szczepów należących do rodzajów *Rhizoctonia* oraz *Sclerotium* (Jasim i in., 2016; Eid i in., 2021; Safara i in., 2022).

Bakterie endofityczne mogą również produkować **cyjanowodór** (HCN), gazowy związek nieorganiczny ograniczający wzrost patogenów grzybowych m.in. poprzez blokowanie oksydazy cytochromu C. Efektywność cyjanowodoru jako substancji ograniczającej proliferację grzybów zależy w dużym stopniu od stężenia tego związku w tkankach roślinnych. Niestety, ze względu na gazowy charakter HCN, utrzymanie podwyższonego stężenia tego związku jest trudne do osiągnięcia. Zdolność do produkcji tego związku stwierdzono m.in. u szczepów należących do rodzaju *Pseudomonas*, charakteryzujących się również produkcją antibiotyków, co może sugerować pomocniczy charakter cyjanowodoru jako czynnika antygrzybowego (Ramette i in., 2006). Zdolność do biosyntezy cyjanowodoru wykazano u wielu bakterii endofitycznych, szczególnie u gatunków rodzaju *Pseudomonas* i *Bacillus* (Etesami i in., 2014; da Silveira i in., 2019).

Endofity bakteryjne mogą ograniczać rozwój fitopatogenów poprzez **konkurencję o składniki odżywcze oraz siedlisko** (miejsce bytowania) (Afzal i in., 2019; Glick, 2020a). W pracy przedstawionej przez Lecomte i wsp. (2016), opisano endofityczny szczep rodzaju *Pseudomonas*, który dzięki produkcji sideroforów efektywniej konkurował o dostępność żelaza, ograniczając rozwój fitopatogenicznego szczepu *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Ponadto, jak wykazali Achari i Ramesh (2019), zdolność do skutecznej kolonizacji wewnętrznych tkanek oberżyny (*Solanum melongena* L.) przez endofityczny szczep *Bacillus cereus* skutkowało zwiększeniem ochrony gospodarza roślinnego przed patogenicznym szczepem *Ralstonia solanacearum*.

1.5. Metody pozyskiwania efektywnych szczepów bakterii endofitycznych

Pozyskiwanie nowych szczepów bakterii endofitycznych, charakteryzujących się zdolnością do wzrostu na podłożach mikrobiologicznych, stoi u podstaw wykorzystywania efektywnych szczepów endofitów bakteryjnych w szeroko rozumianym rolnictwie oraz w przemyśle. Najbardziej rozpowszechnioną metodą pozyskiwania izolatów bakterii endofitycznych jest bezpośrednia izolacja z wnętrza tkanek roślinnych (w tym nasion). Kluczowym czynnikiem tego procesu jest dobór odpowiedniej metody jałowienia powierzchni tkanek roślinnych, dokonywanej zazwyczaj metodami chemicznymi (np. z wykorzystaniem 70 % roztworu etanolu, 10 % roztworu podchlorynu sodu czy soli metali ciężkich, np. $HgCl_2$). Zewnętrznie jałowe części roślin poddaje się maceracji. Pozyskany macerat (lub jego rozcieńczenia), zawierający endofityczne mikroorganizmy, przenosi się na podłoża mikrobiologiczne, gdzie następuje wzrost tych izolatów, które wykazują zdolność do wzrostu na podłożach sztucznych (szacuje się, że jest to ok. 10 % endofitycznej populacji) (Liu i in., 2012; Narayanan i Glick, 2022; Kashyap i in., 2023).

Na uwagę zasługuje również proces ukierunkowanego pozyskiwania bakterii endofitycznych. Metoda ta, wykorzystywana w wielu współczesnych pracach badawczych, zakłada izolację bakterii o pożądanym cechach, takich jak np. oporność na zasolenie czy obecność metali ciężkich w podłożu, zaś bakterie pozyskiwane są wówczas z roślin uprawianych lub dziko rosnących w miejscach, w których roślina narażona jest na działanie danego czynnika stresowego. Podejście ukierunkowanej izolacji bakterii endofitycznych z powodzeniem wykorzystano m.in. w pracy Mahgoub i wsp. (2021) czy Li i wsp. (2023).

Według niektórych autorów, zdolność bakterii endofitycznych do enzymatycznego rozkładu ACC jawi się jako kluczowy mechanizm promowania wzrostu i rozwoju roślin

przez bakterie, dlatego izolacja bakterii endofitycznych w celu pozyskiwania nowych, efektywnych szczepów PGPB powinna polegać na selektywnej izolacji tych szczepów, które wykazują zdolność do produkcji tego enzymu. Ponadto, za takim podejściem przemawia fakt, iż występująca u bakterii endofitycznych zdolność do deaminacji ACC zazwyczaj nie stanowi jedynej cechy promującej wzrost roślin, lecz współtworzy jeden z wielu różnych mechanizmów promowania wzrostu i rozwoju gospodarza roślinnego (Hardoim i in., 2008; Glick, 2020a; Orozco-Mosqueda i in., 2023).

Pozyskane izolaty bakterii endofitycznych poddaje się wieloetapowej ewaluacji, której celem jest wyselekcjonowanie bakterii charakteryzujących się zdolnością do pośredniego lub bezpośredniego promowania wzrostu roślin (Afzal i in., 2019; Maela i Serepa-Dlamini, 2019). Dzięki wykorzystaniu analiz biochemicznych *in vitro*, możliwa jest ocena zdolności pojedynczych izolatów do realizowania konkretnych mechanizmów, charakterystycznych dla PGPB, jak chociażby zdolność do wiązania azotu atmosferycznego wg metody Baldaniego i wsp. (2014), zdolność do produkcji sideroforów wg metody Schwyna i Neilandsa (1987) czy zdolność do produkcji IAA wg Salkowskiego (Usmanova i in., 2021). W ujęciu klasycznym wykorzystuje się także metodę badania zdolności bakterii do produkcji cyjanowodoru (Khatri i in., 2018), wykorzystywania ACC jako jedyne źródła węgla i energii (Husen i in., 2009), degradacji węglowodorów (Waghmode i in., 2012), uwalnianiu jonów fosforu (Sharon i in., 2016) lub potasu (Breitkreuz i in., 2021) z trudno rozpuszczalnych związków tych pierwiastków.

Uzupełnieniem badań biochemicznych są analizy genetyczne, mające na celu zarówno ustalenie pozycji taksonomicznej izolatów, jak i detekcję w genomie bakterii genów związanych ze zdolnością do kolonizacji oraz promowania wzrostu roślin (Carro i Nouioui, 2017; Afzal i in., 2019; Maela i Serepa-Dlamini, 2019). Szeroko rozpowszechnionym narzędziem, umożliwiającym oznaczenie przynależności taksonomicznej izolatów (przynajmniej na poziomie rodzaju) jest analiza filogenetyczna genu 16S rRNA, kodującego rybosomalne RNA oraz genów metabolizmu podstawowego, takich jak kodujący białko rekombinazy A gen *recA*, kodujący podjednostkę β gyrazy gen *gyrB*, kodujący podjednostkę β polimerazy RNA gen *rpoB*, kodujący podjednostkę β syntetazy adenozynotrifosforanu (ATP) gen *atpD* czy kodujący jedno z białek szoku cieplnego gen *dnaK* (Yarza i in., 2014; Glaeser i Kämpfer, 2015).

Wykorzystanie techniki PCR umożliwia detekcję w genomie pozyskanych bakterii obecności genów charakterystycznych dla grupy PGPB, m.in. genu *nifH*, kodującego pod-

jednostkę nitrogenazy, tzw. białko *Fe* (Terakado-Tonooka i in., 2008), genu *acdS*, kodującego deaminazę ACC (Zúñiga i in., 2013), genu kodującego monoooksygenazę alkanową (*alkB*), związanego z degradacją oleju napędowego (Andria i in., 2009), genów *ipdC/ppdC*, związanych z produkcją IAA (Bruto i in., 2014) czy chociażby genów *PKS*, kodujących syntazy poliketydowe, związane z produkcją metabolitów wtórnych niekodowanych genomowo (Vargas-Bautista i in., 2014). Obecnie, coraz szerzej stosowaną praktyką jest sekwencjonowanie pełnych genomów bakterii endofitycznych. Dzięki uzyskaniu sekwencji całego materiału genetycznego, możliwa jest pełna charakterystyka taksonomiczna bakterii. Ponadto, dzięki możliwości scharakteryzowania genów występujących w genomie danego szczepu, możliwa jest eksploracja genomu (ang. *genome mining*), umożliwiająca detekcję genów kodujących cechy charakterystyczne dla endofitycznych szczepów PGPB, z uwzględnieniem genów charakterystycznych dla poszczególnych typów, czy nawet rodzajów bakterii (Carro i Nouioui, 2017; Gamalero i in., 2022).

Potwierdzona *in vitro* lub *in silico* zdolność bakterii do promowania wzrostu roślin, musi zostać potwierdzona *in vivo/in planta*, z wykorzystaniem roślin poddanych technice inokulacji (zakażania). Dzięki rozwojowi nowoczesnych technik, związanych m.in. ze znakowaniem bakterii, możliwa jest ocena zdolności bakterii do wnikania oraz rozwoju w roślinie. Wykorzystanie wysoce zaawansowanych technik „omicznych”, w tym metagenomiki, metatranskryptomiki czy metabolomiki, pozwala natomiast ocenić przemiany zachodzące w roślinie pod wpływem bakterii endofitycznych. Niemniej jednak, wykorzystanie tradycyjnych technik, związanych m.in. z analizą chemiczną tkanek roślinnych czy oceną parametrów fizjologicznych, nadal wykorzystuje się do oceny efektywności szczepów bakterii endofitycznych jako PGPB (ALKahtani i in., 2020; Orozco-Mosqueda i Santoyo, 2021; Gamalero i in., 2022).

1.6. Wykorzystanie endofitów bakteryjnych w rolnictwie

Zwiększenie produkcji zdrowej żywności przy jednoczesnej dbałości o środowisko naturalne, stanowi obecnie największe wyzwanie rolnictwa XXI wieku. Według statystyk i prognoz FAO (Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa), w najbliższych dziesięcioleciach światowa populacja przekroczy liczbę 10 miliardów, zaś produkcja żywności dla stale zwiększającej się populacji musi, do 2050 roku, zwiększyć się o 70 % w stosunku do roku 2005 (Noel i in., 2015; Arora, 2019).

Konieczność intensyfikacji produkcji rolniczej w najbliższych dziesięcioleciach przypada na okres globalnych zmian klimatycznych. Towarzyszące tym procesom niekorzystne zjawiska pogodowe, takie jak: susze, powodzie, występowanie ekstremalnych temperatur czy proces pustynnienia terenów uprawowych, w sposób istotny przyczyniają się do obniżki plonów. W przypadku upraw pszenicy, globalne zwiększenie temperatury o 1 °C wiąże się z 4-6 % obniżką plonu (Asseng i in., 2015). Jednocześnie poważnym zagrożeniem dla produktywności upraw rolniczych są choroby roślin powodowane przez fitopatogeny oraz żerowanie szkodników, które – pomimo często nadmiernego stosowania pestycydów – przyczyniają się do poważnych strat, szacowanych na około 20-40 % ilości plonów. Co więcej, zapoczątkowany w czasach „Zielonej Rewolucji” model niekontrolowanego stosowania nawozów sztucznych i innych agrochemikaliów doprowadził do zanieczyszczenia środowiska rolniczego oraz przenikania substancji chemicznych do wód i ekosystemów naturalnych. Z kolei ekstensywne wykorzystywanie gruntów uprawnych w sposób istotny ograniczyły produktywność gleby, zaś postępująca urbanizacja w zasadzie uniemożliwia zwiększenie obszaru terenów uprawnych (Syed Ab Rahman i in., 2018; Kopittke i in., 2019; Mamangkey i in., 2022; Cao i in., 2023).

1.6.1. Bakterie endofityczne jako alternatywa agrochemikaliów

Konkludując przedstawione powyżej wyzwania związane z produkcją żywności oraz dbałością o środowisko naturalne, należy z całą stanowczością podkreślić konieczność poszukiwania alternatywnych rozwiązań, których zastosowanie we współczesnym rolnictwie pozwoliłoby na realną redukcję ilości stosowanych nawozów sztucznych i chemicznych pestycydów, przy jednoczesnym zwiększaniu produktywności upraw.

Współczesną alternatywą dla agrochemikaliów jest stosowanie biopreparatów wykorzystujących endofityczne bakterie z grupy PGPB lub ich metabolity (Olanrewaju i in. 2017; Glick 2020a). Biopreparaty to nowoczesne preparaty wykorzystywane w uprawie i ochronie roślin oraz remediacji terenów skażonych. Ukierunkowany dobór szczepów bakteryjnych (lub ich metabolitów), wykorzystywanych do produkcji biopreparatów umożliwia produkcję preparatów o z góry określonych właściwościach, związanych z mechanizmami promocji wzrostu roślin realizowanymi przez wyselekcjonowane szczepy, co przekłada się na powszechnie stosowany podział biopreparatów na bionawozy, biostymulatory i biopestycydy (Santos i in., 2019; Chaudhary i in., 2020). Bionawozy oparte na PGPB to preparaty zawierające w swoim składzie mikroorganizmy zdolne do kolonizacji roślin lub ich ryzosfery. W

efekcie ich działania (wiązaną i udostępnianą azotu atmosferycznego czy upłynnianie trudno rozpuszczalnych soli) zwiększeniu ulega pula składników mineralnych, dostępnych dla uprawianych roślin. Zwiększenie biodostępności makro- i mikroelementów w glebie skutkuje z kolei zwiększeniem ich pobierania przez roślinę, co bezpośrednio przekłada się na wyższe plony przy niższym zaangażowaniu energetycznym rośliny, związanym chociażby z rozbudową systemu korzeniowego. Z kolei biostymulatory oparte na bakteriiach promujących wzrost roślin definiuje się jako preparaty biologiczne, których zastosowanie pozytywnie wpływa na procesy fizjologiczne rośliny, przekłada się na większe plony. Biostymulatory to preparaty różne od bionawozów, które mogą stymulować pobieranie składników mineralnych przez rośliny, jak również wpływać na ich metabolizm, zwiększając wydajność związaną z gospodarowaniem składnikami mineralnymi pobranymi już przez roślinę. Biostymulatory mogą przyczyniać się także do zwiększenia tolerancji roślin na warunki stresowe związane z niedoborem wody czy zasoleniem, a także indukować odporność roślin na atak ze strony patogenów. Biopestycydy oparte na mikroorganizmach to biopreparaty wykorzystywane do ochrony roślin przed patogenami i szkodnikami oraz w celu regulacji zachwaszczenia. Co ważne, wykorzystywane w biopestycydach mikroorganizmy charakteryzują się zazwyczaj wąskim zakresem patogenów, szkodników lub roślin (chwastów), wobec których wykazują działanie o charakterze antagonistycznym, hamującym. Wykorzystanie takich mikroorganizmów w produkcji biopreparatów umożliwia produkcję preparatów celowanych lub o wąskim zakresie działania. Warto zauważyć, że utrzymujący się w ostatnich latach trend systematycznego zwiększania się udziału biopestycydów w produkcji rolniczej utrzymuje się na stałym poziomie i wynosi ok. 10 % rok do roku (Hamid i in., 2021; Yadav, 2022; Ibáñez i in., 2023; Jacob i Paranthaman, 2023; Singh i in., 2024). Należy jednak podkreślić, że biopreparaty charakteryzują się mniejszą skutecznością działania „tu i teraz” niż stosowane doraźnie agrochemikalia. Działanie chemicznych pestycydów i nawozów sztucznych opiera się bowiem na szybkim, niemal skokowym działaniu. W przypadku biopreparatów, działanie jest rozciągnięte w czasie i polega na przywróceniu właściwej równowagi pomiędzy rośliną, mikroorganizmami i środowiskiem glebowym. Co więcej, dzięki wielokierunkowym badaniom dotyczącym interakcji pomiędzy roślinami a mikroorganizmami, producenci biopreparatów dysponują wiedzą, umożliwiającą coraz bardziej skuteczną introdukcję bakterii endofitycznych (m.in. poprzez odpowiednią formułę preparatów) oraz produkcję selektywnych biopestycydów o wąskim, celowanym spektrum działania (Santos i in., 2019; Thakur i in., 2020). Warto zauważyć, że wpisująca się w strategię „Europejskiego Zielonego Ładu” idea wykorzystywania PGPB (w tym bakterii endofitycznych)

w rolnictwie rozwija się, pomimo braku odpowiednich uregulowań prawnych, dotyczących m.in. rejestracji nowych preparatów na terenie Unii Europejskiej (Mazurek, 2023).

1.7. Charakterystyka rodzajów *Methylobacterium* i *Methylobacterium* oraz rodzaju *Micromonospora*

Rodzaje *Methylobacterium* i *Methylobacterium* (rodzina *Methylobacteriaceae*) oraz rodzaj *Micromonospora* (rodzina *Micromonosporaceae*) charakteryzują się dużą plastycznością ekologiczną, a co za tym idzie, występują powszechnie w wielu naturalnych siedliskach, w tym w przestrzeni endofitycznej roślin. Wiele spośród dotychczas wyizolowanych i scharakteryzowanych szczepów, należących do wspomnianych rodzajów, cechuje się zdolnością do promowania wzrostu roślin, zmniejszania ich podatności na stres biotyczny i abiotyczny, czy zdolnością do wytwarzania związków użytecznych w bioremediacji (Ortúzar i in., 2020; Photolo i in., 2020; Abdul Rahim i Ishak, 2022; Koskimäki i in., 2022). Zdolność bakterii endofitycznych, należących do rodzajów *Methylobacterium*, *Methylobacterium* oraz *Micromonospora*, do realizowania różnych mechanizmów zaangażowanych bezpośrednio lub pośrednio w promowanie wzrostu roślin, podsumowano w Tabeli 1.

Tabela 1. Bakterie endofityczne należące do rodzajów: *Methylobacterium*, *Methylobacterium* oraz *Micromonospora*, o potwierdzonych aktywnościach związanych z promowaniem wzrostu roślin (opracowanie własne)

szczep	mechanizmy promowania wzrostu roślin	źródło
<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060	zdolność do wiązania azotu atmosferycznego	Jourand i in., 2004
<i>Micromonospora</i> sp. MM18	promocja wzrostu siewek <i>Discaria trinervis</i> , rośliny z rodziny szakłakowatych (<i>Rhamnaceae</i>)	Solans, 2007
<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	zdolność do degradacji RDX (heksogen) oraz HMX (oktogen)	Van Aken i in., 2011
<i>Micromonospora</i> sp.	zdolność do wzbudzania ISR	Martínez-Hidalgo i in., 2015
<i>Micromonospora</i> spp.	zdolność do produkcji IAA <i>in vitro</i> oraz promocji wzrostu lucerny siewnej (<i>Medicago sativa</i> L.) <i>in planta</i>	Martínez-Hidalgo i in., 2014a
<i>Methylobacterium</i> sp.	zwiększenie bioakumulacji jonów arsenu w tkankach rośliny hiperakumulatorowej <i>Acacia farnesiana</i>	Alcántara-Martínez i in., 2018

<i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20	zwiększanie tolerancji ryżu siewnego (<i>Oryza sativa</i> L.) na stres solny poprzez deaminację ACC	Chatterjee i in., 2019
<i>Micromonospora chalcea</i> UAE1	zdolność do deaminacji ACC	El-Tarabily i in., 2019
<i>Methylobacterium radiotolerans</i> MAMP 4754	zdolność do produkcji metabolitów wtórnych, związanych z aktywnością antyoksydacyjną oraz zdolnością do antagonizmu przeciwko patogenicznym bakteriom (m.in. <i>Klebsiella oxytoca</i> i <i>Mycolicibacterium smegmatis</i> syn. <i>Mycobacterium smegmatis</i>)	Photolo i in., 2020
<i>Methylobacterium</i> spp.	zdolność do produkcji IAA oraz rozpuszczania trudno rozpuszczalnych związków fosforu <i>in vitro</i>	Rahim i in., 2021
<i>Methylorubrum</i> spp.	zdolność do produkcji IAA oraz rozpuszczania trudno rozpuszczalnych związków fosforu <i>in vitro</i> ; zdolność do zwiększania wigoru siewek fasoli mung (<i>Vigna radiata</i> L.)	Abdul Rahim i Is-hak, 2022
<i>Methylorubrum extorquens</i> DSM 13060	zwiększenie tolerancji na stres oraz promocja wzrostu siewek sosny (<i>Pinus sylvestris</i> L.)	Koskimäki i in., 2022

Bakterie z rodzaju *Methylobacterium* oraz bakterie należące do rodzaju *Methylorubrum* (Green i Ardley, 2018) należą do klasy α -*Proteobacteria* i zaliczane są do tzw. grupy fakultatywnych metylotrofów (PPFMs, ang. *pink pigmented facultative methylotrophs*). Cechą charakterystyczną większości szczepów tych bakterii jest zdolność do oksydacji metanolu (z wykorzystaniem enzymów dehydrogenaz metanolowej MxaF i XoxF) oraz wykorzystywania innych jednowęglowych związków organicznych, takich jak metyloamina, mrówczan, formaldehyd, a nawet metan, jako jedyne źródła węgla i energii. Bakterie należące do rodzaju *Methylobacterium* lub rodzaju *Methylorubrum* to Gram ujemne, zdolne do aktywnego ruchu, tlenowe pałeczki, charakteryzujące się zazwyczaj różowym do czerwono-pomarańczowego zabarwieniem kolonii (Fig. 9AB), związanym ze zdolnością tych bakterii do produkcji barwników – karotenoidów. Bakterie należące do rodzaju *Methylobacterium* występują powszechnie w glebie, osadach dennych wód słonych i słodkich, w powietrzu, na powierzchni roślin oraz w ryzosferze. Dzięki zdolności do produkcji związków biologicznie czynnych (aminokwasów, fitohormonów), mogą pozytywnie wpływać na metabolizm roślin, zwłaszcza w warunkach stresowych. Zdolność niektórych szczepów do produkcji biofilmu oraz wykorzystywania metanolu jako źródła węgla i energii, uznaje się za szczególnie ważne w procesie kolonizacji wnętrza roślin (Dourado i in. 2015; Gamit i in., 2023) Rodzaj

Methylobacterium obecnie liczy 69 opisanych gatunków, natomiast *Methylorubrum* – 11 (<https://lpsn.dsmz.de>).

Rozdzielenie opisywanych rodzajów bakterii nastąpiło w 2018 roku, w wyniku przeprowadzonych analiz filogenetycznych i biochemicznych dotyczących opisanych gatunków należących do rodzaju *Methylobacterium*. Decydujące znaczenie miał stosunkowo niski stopień podobieństwa, poniżej 97 %, dla sekwencji genu 16S rRNA w puli badanych 61 szczepów, co na podstawie ustaleń taksonomicznych sugeruje obecność więcej niż jednego rodzaju w puli analizowanych mikroorganizmów (Yarza i in., 2014). Wątpliwości co do jednorodności rodzaju *Methylobacterium* budził również fakt występowania w obrębie rodzaju gatunków o cechach atypowych, tj. charakteryzujących się brakiem pigmentacji czy zdolnością do indukowania procesu brodawkowania. W związku z tymi różnicami genotypowymi oraz fenotypowymi przeprowadzono rewizję rodzaju *Methylobacterium*, w wyniku czego powstał nowy rodzaj – *Methylorubrum*. Co ważne, przynajmniej kilka gatunków w obrębie nowopowstałego rodzaju *Methylorubrum*, charakteryzuje się dalej niepewną pozycją taksonomiczną (*incertae sedis*); dlatego wciąż niewykluczone pozostaje ponowne (przynajmniej czasowe) włączenie wybranych gatunków rodzaju *Methylorubrum* do rodzaju *Methylobacterium* (Green i Ardley, 2018; Hördt i in., 2020).

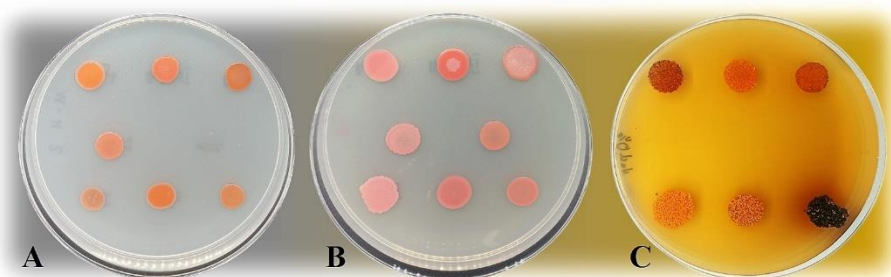


Fig. 9. Kolonie bakterii endofitycznych należących do rodzaju *Methylobacterium* (A) oraz *Methylorubrum* (B) na podłożu stałym 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v) oraz *Micromonospora* (C) na podłożu stałym ISP2

Rodzaj *Micromonospora* obejmuje Gram dodatnie, tlenowe, należące do klasy *Actinobacteria* bakterie, wytwarzające rozgałęzione strzępki i zdolne do sporulacji. Na podłożach stałych tworzą kolonie o zabarwieniu od żółtego do pomarańczowoczerwonego; w trakcie sporulacji czarnozielone do czarnych (Fig. 9C). Wytwarzanie pojedynczych (najczęściej) spor, umieszczonych na krótkich trzonkach powietrznych jest uznawane za cechę charakterystyczną tego rodzaju. Szczepy należące do rodzaju *Micromonospora* są szeroko rozpowszechnione w środowisku, jednak ich głównym rezerwuarem jest gleba. Bakterie należące

do tego rodzaju izolowane są również z tzw. środowiskach ekstremalnych (pustynie, osady morskie czy siedliska o wysokim stopniu zasolenia) co wskazuje na wysoki stopień tolerancji niektórych gatunków wobec stresorów abiotycznych. Bakterie te charakteryzują się zdolnością do produkcji bioaktywnych metabolitów wtórnych, w tym antybiotyków (m.in. gentamycyny oraz netamycyny) oraz substancji przeciwnowotworowych, ustępując liczbą opisanych substancji bioaktywnych jedynie bakteriom należącym do rodzaju *Streptomyces*. Ze względu na szczególną aktywność biologiczną, bakterie należące do rodzaju *Micromonospora* uznaje się za źródło metabolitów użytecznych nie tylko w medycynie, ale i w rolnictwie, ochronie roślin czy nawet produkcji biopaliw (Hirsch i Valdés, 2010; Genilloud, 2015). Obecnie, rodzaj obejmuje 158 opisanych gatunków (<https://lpsn.dsmz.de>).

2. HIPOTEZA I CEL PRACY

Na podstawie kwerendy literaturowej, sformułowano następującą hipotezę badawczą: *Endofity bakteryjne wyizolowane z brodawek korzeniowych roślin z rodziny bobowate (Fabaceae), mogą wykazywać zdolność do promowania wzrostu roślin, zarówno w sposób bezpośredni (poprzez udostępnianie roślinom składników mineralnych czy produkcję fitohormonów), jak i pośrednio (poprzez hamowanie wzrostu fitopatogenów czy ograniczanie skutków działania stresorów abiotycznych). Szczepy te mogą być wykorzystywane w postaci preparatów biologicznych, użytecznych w szeroko rozumianym rolnictwie, co może przyczynić się do ograniczenia stosowania agrochemikaliów w ekosystemach rolniczych.*

W celu zweryfikowania postawionej hipotezy, wyznaczono następujące cele badawcze:

- **izolacja bakterii endofitycznych z brodawek korzeniowych roślin należących do rodziny bobowate (*Fabaceae*)**
 - pozyskanie czystych kultur bakterii endofitycznych z wykorzystaniem podłoża ograniczającego wzrost ryzobiów;
 - genotypowanie bakterii i selekcja izolatów o zróżnicowanych profilach genetycznych.
- **klasyfikacja taksonomiczna pozyskanych izolatów**
 - amplifikacja i sekwencjonowanie fragmentów genu 16S rRNA oraz wybranych genów rdzeniowych, następnie analiza filogenetyczna uzyskanych sekwencji oraz klasyfikacja taksonomiczna izolatów na poziomie rodzaju;
 - detekcja, amplifikacja, sekwencjonowanie i analiza filogenetyczna wybranych genów związanych ze zdolnością bakterii do promowania wzrostu roślin.
- **wielokierunkowa analiza zdolności badanych bakterii do realizowania mechanizmów związanych z promowaniem wzrostu roślin (badania *in vitro*)**
 - określenie tolerancji bakterii wobec różnego pH podłoża, stopnia zasolenia oraz stężenia wybranych metali ciężkich;
 - ocena zdolności bakterii do aktywnego ruchu, oddziaływań typu *quorum sensing* oraz tworzenia biofilmu;

- ocena zdolności szczepów do deaminacji kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACC), wiązania azotu atmosferycznego, produkcji metaloformów, rozpuszczania trudno rozpuszczalnych fosforanów, produkcji indolu, kwasu indolilo-3-octowego (IAA) oraz cyjanowodoru;
 - określenie zdolności do rozkładu białek, celulozy oraz utylizacji węglowodorów;
 - ocena zdolności szczepów do hamowania wzrostu wybranych mikroorganizmów fitopatogennych.
- **ocena skuteczności wybranych, potencjalnie dobroczynnych szczepów do promowania wzrostu wybranych roślin uprawnych (doświadczenia *in planta*)**
- przeprowadzenie testów roślinnych w warunkach szklarniowych lub w warunkach fitotronu, z wykorzystaniem wybranych roślin rolniczych uprawianych w Polsce.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiały

3.1.1. Materiał roślinny

Bakterie endofityczne pozyskano z roślin należących do rodziny bobowate (*Fabaceae*): koniczyny białej (*Trifolium repens* L.), koniczyny długokłosowej (*Trifolium rubens* L.), szczodrzeńca zmiennego (*Chamaecytisus albus* (Hacq.) Rothm.) oraz soi warzywnej (*Glycine max* L.) Zebrane rośliny pochodziły z obszaru Polski południowo-wschodniej oraz Republiki Południowej Afryki (okolice miasta Pretoria).

3.1.2. Izolaty bakterii endofitycznych

Przedmiotem badań była grupa dwudziestu sześciu izolatów bakteryjnych (Tabela 2), wyizolowanych z brodawek korzeniowych roślin bobowatych (podrozdział 3.1.1).

Tabela 2. Wykaz izolatów bakterii endofitycznych, wyizolowanych z brodawek korzeniowych roślin należących do rodziny bobowate (*Fabaceae*)

nazwa izolatu	gospodarz roślinny	pochodzenie
29	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
30	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
33	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
43	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
45	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
48	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
50	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
53	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
55	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
66	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
124	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
126	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
152	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
230	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
249	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
N2	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
N4	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
N5	koniczyna biała	Republika Południowej Afryki
5052	koniczyna biała	Polska
5056	koniczyna biała	Polska
Red Mix I	koniczyna długokłosowa	Polska
Red Cyt	szczodrzeniec zmienny	Polska
1117	szczodrzeniec zmienny	Polska
MV6II	szczodrzeniec zmienny	Polska
C2III _s	soja warzywna	Polska
C44 _s	soja warzywna	Polska

3.1.3. Szczepy bakterii oraz grzybów fitopatogennych

W Tabeli 3 oraz w Tabeli 4 przedstawiono wykaz szczepów mikroorganizmów fitopatogennych (odpowiednio bakterii i grzybów) wykorzystanych w badaniach.

Tabela 3. Wykaz szczepów fitopatogennych bakterii

nazwa szczepu	źródło
<i>Erwinia amylovora</i> 659	KGiM, UMCS
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (syn. <i>Rhizobium radiobacter</i>) C58	KGiM, UMCS
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> NCCB 92059	KGiM, UMCS
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2905	KGiM, UMCS
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> NCCB 100429	KGiM, UMCS

Tabela 4. Wykaz szczepów fitopatogennych grzybów

nazwa szczepu	źródło
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 10Ss01	ZOR, IO-PIB
<i>Botrytis cinerea</i> 10Bc01	ZOR, IO-PIB
<i>Fusarium oxysporum</i> 10Fo01	ZOR, IO-PIB
<i>Fusarium equiseti</i>	KOR, UP
<i>Verticillium albo-atrum</i> CBS 745.83	KGiM, UMCS

KGiM, UMCS Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie;

ZOR, IO-PIB Zakład Ochrony Roślin, Instytut Ogrodnictwa, Państwowy Instytut Badawczy w Skierniewicach;

KOR, UP Katedra Ochrony Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

3.1.4. Pozostałe mikroorganizmy

W Tabeli 5 przedstawiono wykaz pozostałych mikroorganizmów wykorzystanych w badaniach.

Tabela 5. Pozostałe szczepy bakteryjne wykorzystane w badaniach

nazwa szczepu	źródło
<i>Pseudomonas</i> sp. 267	KGiM, UMCS
<i>Escherichia coli</i> K12	KGiM, UMCS
<i>Proteus mirabilis</i>	KGiM, UMCS
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KGiM, UMCS
<i>Azospirillum lipoferum</i> D74	KGiM, UMCS
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	KGiM, UMCS
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> TA1	KGiM, UMCS

3.1.5. Podłoża mikrobiologiczne

Podłoża mikrobiologiczne sterylizowano w autoklawie w standardowych warunkach (temperatura: 121 °C, ciśnienie: 1,8 Bara, czas: 15 min). Substancje ulegające degradacji podczas autoklawowania sterylizowano poprzez sączenie z wykorzystaniem jałowych filtrów strzykawkowych (Chemland) i dodawano do jałowego podłoża, wystudzonego do około 50 °C. Odczyn podłoży regulowano poprzez dodanie roztworów: 35 % kwasu solnego (HCl) lub 50 % wodorotlenku potasu (KOH).

podłoże 79CA (Vincent, 1970)

mannitol	10 g
KH ₂ PO ₄	500 mg
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	200 mg
NaCl	100 mg
glicerofosforan wapnia	100 mg
wyciąg drożdżowy	1 g
kwaśny hydrolizat kazeiny	1 g
H ₂ O MilliQ	do 1000 ml
pH 7,2	

wykorzystywano podłoże płynne, półpłynne (3,5 g agaru × 1000 ml⁻¹ podłoża) oraz stałe (13 g agaru × 1000 ml⁻¹ podłoża)

podłoże ISP2 (Shirling i Gottlieb, 1966)

glukoza	4 g
wyciąg drożdżowy	4 g
wyciąg słodowy	10 g
agar	13 g
H ₂ O MilliQ	do 1000 ml
pH 7,2	

podłoże minimalne MM (Hopwood, 1967)

(modyfikacja własna)

L-asparagina (bezwodna)	500 mg
K ₂ HPO ₄	500 mg

MgSO ₄ × 7 H ₂ O	200 mg
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	10 mg
mannitol	10 g
agar	13 g
H ₂ O MilliQ	do 1000 ml
pH 7,2	

podłoże AMS (Whittenbury i in., 1970)

K ₂ HPO ₄	700 mg
KH ₂ PO ₄	540 mg
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	1 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	200 mg
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	4 mg
NH ₄ Cl	500 mg
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	100 µg
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	30 µg
H ₃ BO ₃	300 µg
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	200 µg
CuSO ₄	100 µg
NiSO ₄ × 7 H ₂ O	40 µg
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	60 µg
agar	13 g
H ₂ O MilliQ	do 1000 ml
pH 6,8	

po autoklawowaniu i wystudzeniu podłoża dodawano:

metanol	5 ml
---------	------

podłoże SA1 (Trujillo i in., 2005)

glukoza	10 g
wyciąg drożdżowy	3 g
trypton	5 g
tryptoza	2 g
skrobia (rozpuszczalna w wodzie)	2 g
CaCO ₃	100 mg

CoCl ₂	śladowe ilości
cytrynian żelaza	śladowe ilości
agar	13 g
H ₂ O MilliQ	do 1000 ml
pH 7,2	

podłoże GYM (Větrovsky i in., 2014)

glukoza	4 g
wyciąg drożdżowy	4 g
wyciąg słodowy	10 g
CaCO ₃	2 g
agar	13 g
H ₂ O MilliQ	do 1000 ml
pH 7,2	

podłoże Dworkina i Fostera (Husen i in., 2009)

KH ₂ PO ₄	4 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	200 mg
glukoza	2 g
kwask glukonowy	2 g
kwask cytrynowy	2 g
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	1 mg
H ₃ BO ₃	10 µg
MnSO ₄	10 µg
ZnSO ₄	70 µg
CuSO ₄	50 µg
MoO ₃	10 µg
pH 7,2	

podłoże NFb (Baldani i in., 2014)

(modyfikacja własna)

mannitol	5 g
K ₂ HPO ₄	500 mg

MgSO ₄ × 7 H ₂ O	200 mg
NaCl	100 mg
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	20 mg
roztwór soli NFb	2 ml
NaFeEDTA × 2 H ₂ O	66 mg
KOH	4,5 g
czerwień fenolowa	50 mg
agar	1,6 g
H ₂ O MilliQ	do 1000 ml
pH 6,5	

po autoklawowaniu i wystudzeniu podłoża dodawano:

roztwór witamin	1 ml
-----------------	------

roztwór soli NFb:

CuSO ₄ × 5 H ₂ O	40 mg
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	120 mg
H ₃ BO ₃	1,4 g
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	1 g
MnSO ₄ × H ₂ O	1,175 g
H ₂ O MilliQ	do 1000 ml

roztwór witamin:

biotyna	10 mg
chlorowodorek pirydoksalu	20 mg
H ₂ O MilliQ	do 100 ml

roztwór witamin jałowiono poprzez filtrację

podłoże TMRT (Manassila i in., 2007)

roztwór I

mannitol	10 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	200 mg
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	250 mg
wyciąg drożdżowy	200 mg
L-tryptofan	61 mg

H₂O MilliQ do 500 ml
pH 7,2

roztwór II

Tris 1,21 g
H₂O MilliQ do 500 ml
pH 7,2

roztwory połączono przed autoklawowaniem

podłoże CAS (Mehnert i in., 2017)

roztwór I

A) 1 mM roztwór FeCl₃ × 6 H₂O (lub CuSO₄,
Na₂HAsO₄ × 7 H₂O, AlCl₃ × 6 H₂O)

w 10 mM HCl 10 ml

roztwór wodny CAS

(1,21 mg × ml⁻¹) 50 ml

B) roztwór wodny CTAB

(1,82 mg × ml⁻¹) 40 ml

ciemnofioletowy roztwór A dodawano powoli, do roztworu B, ciągle mieszając

roztwór II

PIPES 30,24 g

agar 13 g

H₂O MilliQ do 900 ml

pH 6,8

roztwory I oraz II autoklawowano i połączono po wcześniejszym wystudzeniu do temperatury ok. 50 °C

podłoże Pikovskaya (Sharon i in., 2016)

(modyfikacja własna)

glukoza 10 g

wyciąg drożdżowy 500 mg

(NH₄)₂SO₄ 500 mg

MgSO₄ × 7 H₂O 200 mg

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5 g
KCl	200 mg
$\text{MnSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	2 mg
agar	13 g
H_2O MilliQ	do 1000 ml

Podłoże z karboksymetylocelulozą (Pawlik, 2018)

karboksymetyloceluloza	10 g
FeCl_3	4 mg
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g
NaCl	600 mg
K_2HPO_4	500 mg
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	500 mg
KH_2PO_4	500 mg
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	2 mg
wyciąg drożdżowy	100 mg
agar	13 g
H_2O MilliQ	do 500 ml
pH 7,2	

podłoże z mlekiem w proszku (Guzzo i in., 1991)

(modyfikacja)

roztwór I

mannitol	10 g
KH_2PO_4	500 mg
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	200 mg
NaCl	100 mg
glicerofosforan wapnia	100 mg
wyciąg drożdżowy	1 g
kwaśny hydrolizat kazeiny	1 g
agar	13 g
H_2O MilliQ	do 500 ml
pH 7,2	

roztwór II

odtłuszczone mleko w proszku	50 g
H ₂ O MilliQ	do 500 ml

roztwory I oraz II autoklawowano i połączono po wystudzeniu do temperatury ok. 50 °C

podłoże Bushnell Haas (Waghmode i in., 2012)

MgSO ₄	200 mg
CaCl ₂	20 mg
KH ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NH ₄ NO ₃	1 g
FeCl ₃	50 mg
H ₂ O MilliQ	do 1000 ml
pH 7,2	

podłoże Luria-Bertani (LB) (Sezonov i in., 2007)

LB Agar (A&A Biotechnology)	40 g
H ₂ O MilliQ	do 1000 ml

podłoże PDA (Griffith i in., 2007)

Potato Dextrose Broth (Biomaxima)	26,5 g
agar	20 g
H ₂ O MilliQ	do 1000 ml

podłoże Hoaglanda zmodyfikowane (Zhour i in., 2022)

KNO ₃	10 mg
CaCl ₂	222 mg
KCl	373 mg
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	493 mg
KH ₂ PO ₄	136 mg
H ₃ BO ₃	775 µg
MnCl ₂	252 µg
ZnSO ₄	483 µg
CuSO ₄	80 µg

Na_2MoO_4	20,6 μg
NiSO_4	15,5 μg
$\text{NaFeEDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$	42 mg
agar	13 g
H_2O MilliQ	do 1000 ml
pH 7,2	

podłoże Fahraeusa (Catoira i in., 2000)

CaCl_2	0,132 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,12 g
KH_2PO_4	0,1 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,075 g
cytrynian żelaza	0,005 g
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	0,07 mg
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,07 mg
ZnCl_2	0,07 mg
H_3BO_3	0,07 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,07 mg
agar	13 g
H_2O MilliQ	do 1000 ml
pH 7,5	

3.1.6. Bufory, roztwory, odczynniki

bufory:

bufor TE (1×) (Vincent, 1970)

Tris	1,21 g
EDTA	372 mg
H_2O MilliQ	do 1000 ml
pH 8,0	

bufor sterylizowano przez autoklawowanie

bufor TAE (50×) (Ausubel, i in., 2003)

Tris	242 g
kwask octowy lodowaty	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml
H ₂ O MilliQ	do 1000 ml
pH 8,0	

bufor glicyna-wodorotlenek sodu (Mohan, 2003)

0,1 M roztwór glicyny	50 ml
0,1 M roztwór wodorotlenku sodu	X ml
H ₂ O MilliQ	do 100 ml
X = 8,8 ml dla podłoża o pH 9	
X = 32 ml dla podłoża o pH 10	

0,1 M roztwór glicyny

glicyna	0,75 g
H ₂ O MilliQ	do 100 ml

*sterylizowano przez autoklawowanie**0,1 M roztwór NaOH*

NaOH	0,4 g
H ₂ O MilliQ	do 100 ml

*sterylizowano przez autoklawowanie***bufor kwas cytrynowy-Na₂HPO₄** (Carro, 2011)

0,2 M roztwór kwasu cytrynowego	Y ml
0,4 M roztwór Na ₂ HPO ₄	X ml
X = 45,4 ml, Y = 54,6 ml dla podłoża o pH 4,5	
X = 56,9 ml, Y = 43,1 ml dla podłoża o pH 5,5	

0,2 M roztwór kwasu cytrynowego

kwask cytrynowy (jednowodny)	4,2 g
H ₂ O MilliQ	do 100 ml

sterylizowano przez autoklawowanie

0,4 M roztwór Na₂HPO₄

Na ₂ HPO ₄	5,68 g
H ₂ O MilliQ	do 100 ml

sterylizowano przez autoklawowanie

odczynniki:**odczynnik Kovacs (Kędzia, 1990)**

p-dimetyloaminobenzaldehyd	10 g
alkohol n-amylowy	150 ml
35 % HCl	50 ml

odczynnik ninhydrynowy (Li i in., 2011)

ninhydryna	500 mg
kwask askorbinowy	15 mg
glikol etylenowy	60 ml
bufor cytrynianowy 1M (pH 6)	60 ml

bufor cytrynianowy 1M (pH 6):

cytrynian sodu dwuwodny	24,27 g
kwask cytrynowy	3,36 g
H ₂ O MilliQ	do 100 ml
pH 6	

odczynnik Salkowskiego (Usmanova i in., 2021)

FeCl ₃ × 6 H ₂ O	270 mg
HClO ₄ (35 %)	100 ml

3.1.7. Preparaty i zestawy komercyjne

preparaty DNA:

Wykaz oligonukleotydów wykorzystanych w badaniach przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Oligonukleotydy (startery) wykorzystane w badaniach

nazwa startera	sekwencja docelowa	sekwencja startera	źródło
Box-A1	regiony międzygenowe BOX	5'-TACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'	Durlik, 2021
fD1d	16S rRNA	5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGA-3'	Parker, 1999
rPla	16S rRNA	5'-TTCAGCATTGTTCCATCGGCATC-3'	Parker, 1999
RAU	<i>recA</i>	5'-GGYAARGGYKCBGYNATGCG-3'	Carro, 2011
RAD	<i>recA</i>	5'-CTTVRMSCGGGTGCGGTT-3'	Carro, 2011
GYF3	<i>gyrB</i>	5'-ACsGTCGACTTCGACTTCCA-3'	Carro, 2011
GYR3B	<i>gyrB</i>	5'-CAGCACsAyCTTGTGGTA-3'	Carro, 2011
MYCOF	<i>rpoB</i>	5'-GGYAAGGTCACSCCSAAGGG-3'	Carro, 2011
MYCOR	<i>rpoB</i>	5'-ARCGGCTGCTGGGTRATC-3'	Carro, 2011
ATPDF1	<i>atpD</i>	5'-AAGGGsmAsGTmTTCAA-3'	Carro, 2011
ATPDF3	<i>atpD</i>	5'-GTsCTsATyCAGGAGATGATC-3'	Carro, 2011
ATPDR3	<i>atpD</i>	5'-GAAGAAsgCCTGyTCnGG-3'	Carro, 2011
recAF	<i>recA</i>	5'-CGAACTGCATGGTC(G)ATCTTC-3'	Dourado i in., 2013
recAR	<i>recA</i>	5'-ATGTCGAACTCGACCTGCTT-3'	Dourado i in., 2013
1MetgyrB	<i>gyrB</i>	5'-GAGGTCATCATGACC-CAGCTsCAyGCCGGCGGwAAG-3'	ta praca
2rMetgyrB	<i>gyrB</i>	5'-AGCGGGTACGGATGTGCGAGCCrT-CnACrTCnGCrTCnGTC-3'	ta praca
MethylRPOF	<i>rpoB</i>	5'-ATGGCCAACACGCTGGTCGGT-3'	ta praca
MethylRPOR	<i>rpoB</i>	5'-TCGAyCTCGCCCTTGCCGTC-3'	ta praca
MethylATPF	<i>atpD</i>	5'-GGCAAGATCACCCAGGTyAT-3'	ta praca
MethylATPR	<i>atpD</i>	5'-CTTCTTGGCCTTyTCCTGGG-3'	ta praca
A3	<i>NRPS</i>	5'-GCsTACsysATsTACACsTCsGG-3'	Ayuso-Sacido i Genilloud, 2005
A7R	<i>NRPS</i>	5'-sAsGTCvCCsGTsCGGTAs-3'	Ayuso-Sacido i Genilloud, 2005
K1	<i>PKS I</i>	5'-TsAAGTCsAACATCGGbCA-3'	Ayuso-Sacido i Genilloud, 2005
M6R	<i>PKS I</i>	5'-CGCAGGTTsCsGTACCAGTA-3'	Ayuso-Sacido i Genilloud, 2005
IIPF6	<i>PKS II</i>	5'-TsGCsTGCTTCGAyGCsATC-3'	Sun i in., 2012
IIPR6	<i>PKS II</i>	5'-TGGAAnCCGCCGAAbCCGCT-3'	Sun i in., 2012

ACCMet1f	<i>acdS</i>	5'-GACCGGGTCGGCAACATC-3'	Dourado i in., 2013
ACCMet2r	<i>acdS</i>	5'-AGCCCGCCGTACTTGTGC-3'	Dourado i in., 2013
nifH-F	<i>nifH</i>	5'-CGGGAAGGGCGGAATCGGCAAG-3'	ta praca
nifH-R	<i>nifH</i>	5'-GCATGTCCTCGAGCTCwTCCAT-3'	ta praca
f1003	<i>mxoF</i>	5'-GCGGCACCAACTGGGGCTGGT-3'	Mcdonald i Murrel, 1997
r1561	<i>mxoF</i>	5'-GGGCAGCATGAAGGGCTCCC-3'	Mcdonald i Murrel, 1997

wzorzec mas cząsteczkowych DNA:

GeneRuler DNA Ladder Mix (100-10 000 pz) Thermo Scientific SM0331

pozostale:

Taq PCR Master Mix (2×)	EURx
REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix	EURx
6× Loading Buffer BLUE	EURx
SimplySafedye	EURx
lizozym (228 U × μl ⁻¹)	EURx
mutanolizyna (10 U × μl ⁻¹)	(A&A Biotechnology)
TestOxidase Reagent	(Biomaxima)

zestawy komercyjne:

Clean-up	(A&A Biotechnology)
ExTerminator	(A&A Biotechnology)
Gel-Out	(A&A Biotechnology)
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	(Applied Biosystems)
API ZYM	(bioMérieux)
LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit	(Invitrogen)

3.1.8. Pozostałe materiały

alkohol etylowy

alkohol izoamyłowy

alkohol izopropylowy

alkohol metylowy

alkohol skażony

bufor PBS
chlerek rtęci
chloroform
chlorotalonil
cykloheksimid
czerwień fenolowa
fenol
filtry strzykawkowe polipropylenowe o średnicy Ø 25mm, średnica porów Ø 0,22 µm
fiolet krystaliczny
kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy
kwas nalidyksowy
kwas octowy
kwas pikrynowy
kwas solny
lignina
nasiona koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) odm. Grasslands Huia
nasiona pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) odm. Foxx (odmiana ozima)
nasiona rzepaku (*Brassica napus* L.) odm. Goliat (odmiana jara)
octan amonu
olej napędowy
olej silnikowy (przepracowany)
perlit ogrodniczy
płyn fizjologiczny
płytki GEN III MicroPlate (Biolog, Inc.)
płyn inokulacyjny GEN III MicroPlate IFA (Biolog, Inc.)
płyn inokulacyjny GEN III MicroPlate IFC (Biolog, Inc.)
podchloryn sodu
substrat torfowy (ziemia uniwersalna)
sulfotlenek dimetylu
woda MilliQ
wodorotlenek potasu

3.2. Metody

3.2.1. Pozyskanie izolatów bakteryjnych (bakterii endofitycznych)

3.2.1.1. Izolacja bakterii endofitycznych z brodawek korzeniowych

Odseparowane brodawki korzeniowe (po 50 brodawek z każdego gatunku pozyskanych roślin) przepłukano w strumieniu bieżącej wody w celu usunięcia zanieczyszczeń. Osuszone brodawki poddano procedurze powierzchniowej sterylizacji, wykorzystując metodę opisaną przez Vincenta (1970): brodawki moczo w 0,1 % roztworze HgCl₂ przez 1 minutę, następnie w 75 % roztworze etanolu, również przez 1 minutę. Zewnętrznie jałowe brodawki pięciokrotnie płukano w jałowej wodzie destylowanej i jałowo rozcierano. Uzyskaną zawiesinę przenoszono za pomocą ezy na podłoże stałe 79CA oraz podłoże stałe 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v). Szalki inkubowano w temperaturze 28 °C przez 30 dni; pojawiające się kolonie bakterii, wyraźnie różniące się morfologią kolonii od typowych bakterii ryzobiowych pasażowano na nowe szalki z podłożem stałym 79CA oraz podłożem stałym 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v), otrzymując kolekcję czystych kultur bakterii, które przechowywano na skosach agarowych 79CA oraz w 15 % roztworze glicerolu, w temperaturze -70 °C.

3.2.2. Analiza genetyczna bakterii endofitycznych

3.2.2.1. Izolacja genomowego DNA izolatów bakteryjnych

Izolację genomowego DNA izolatów przeprowadzono na podstawie metody Pitchera i wsp. (1989), modyfikując sposób degradacji ściany komórkowej bakterii: 15-minutową inkubację komórek bakteryjnych (zawieszonych w buforze TE) z odczynnikami GES zamieniono na 16-godzinną inkubację zawiesiny bakteryjnej, przeprowadzoną w 37 °C, z dodatkiem 20 µl lizozymu (4560 U) oraz 10 µl mutanolizyny (100 U). Stężenie i czystość wyizolowanego DNA oznaczono za pomocą spektrofotometru Thermo Scientific NANODROP 2000 (Thermo Fisher Scientific).

3.2.2.2. Genotypowanie izolatów bakteryjnych metodą BOX-PCR

Stopień zróżnicowania genomowego badanych izolatów określono techniką BOX-PCR (Rademaker i in., 2004). Reakcje przeprowadzono przy użyciu startera Box-A1 (Tabela 6). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 12,5 µl 2× Ready-Mix PCR, 0,5 µl startera

Box-A1 (stężenie 100 μM) oraz x μl matrycy DNA o stężeniu 100 $\text{ng} \times \text{ml}^{-1}$; całość uzupełniono jałową wodą wolną od nukleaz do objętości końcowej 25 μl . Reakcje amplifikacji przeprowadzono w następujących warunkach:

❖ wstępna denaturacja	95 °C	4 min
❖ 35 cykli:		
denaturacja	94 °C	1 min
hybrydyzacja starterów (annealing)	53 °C	1 min
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	65 °C	8 min
❖ końcowe wydłużanie	65 °C	10 min

Produkty PCR poddano rozdzielni elektroforetycznemu (120 min, 100 V, 400 mA) w 1,5 % żelu agarozowym, następnie przeprowadzono wizualizację prążków w świetle UV. Na podstawie uzyskanego obrazu profili badanych izolatów przeprowadzono analizę numeryczną podobieństwa genomowego, wykorzystując oprogramowanie BIO1D v. 11.10 (Vilber-Lourmat).

3.2.2.3. Amplifikacja genu 16S rRNA

Amplifikację fragmentu genu 16S rRNA przeprowadzono z wykorzystaniem starterów fD1d oraz rPl_a (Tabela 6). Mieszanka reakcyjna (25 μl) zawierała 12,5 μl Taq PCR Master Mix 2 \times , 0,25 μl każdego z oligonukleotydów (100 μM), x μl genomowego DNA o stężeniu 100 $\text{ng} \times \text{ml}^{-1}$ oraz wodę wolną od nukleaz (x μl); amplifikację przeprowadzono w następujących warunkach:

❖ wstępna denaturacja	95 °C	4 min
❖ 35 cykli:		
denaturacja	95 °C	45 s
hybrydyzacja starterów (annealing)	53-59 °C	1 min
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	72 °C	2 min
❖ końcowe wydłużanie	72 °C	7 min

3.2.2.4. Amplifikacja wybranych genów rdzeniowych (*recA*, *gyrB*, *rpoB*, *atpD*)

Amplifikację fragmentów genów rdzeniowych (*recA*, *gyrB*, *rpoB* oraz *atpD*) przeprowadzono w objętości 25 µl mieszaniny reakcyjnej, zawierającej 12,5 µl Taq PCR Master Mix 2×, 0,25 µl każdego z oligonukleotydów (100 µM), 100-150 ng genomowego DNA oraz wodę wolną od nukleaz (x µl).

rodzaje *Methylobacterium* i *Methylobacterium*

Amplifikację genu *recA* wykonano zgodnie z procedurą opisaną przez Dourado i wsp. (2013), wykorzystując startery *recAF* oraz *recAR* (Tabela 6):

❖ wstępna denaturacja	94 °C	5 min
❖ 35 cykli:		
denaturacja	94 °C	1 min
hybrydyzacja starterów (annealing)	54 °C	45 s
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	72 °C	2 min
❖ końcowe wydłużanie	72 °C	7 min

Reakcję amplifikacji genu *gyrB* przeprowadzono z wykorzystaniem starterów 1MetgyrB oraz 2rMetgyrB (Tabela 6) i przeprowadzono w następujących warunkach:

❖ wstępna denaturacja	94 °C	5 min
❖ 35 cykli:		
denaturacja	94 °C	1 min
hybrydyzacja starterów (annealing)	52-55 °C	45 s
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	72 °C	2 min
❖ końcowe wydłużanie	72 °C	7 min

Startery MethyLRPOF oraz MethyLRPOR (Tabela 6) wykorzystano w celu amplifikacji genu *rpoB*, z zastosowaniem poniższych warunków reakcji:

❖ wstępna denaturacja	94 °C	5 min
❖ 35 cykli:		
denaturacja	94 °C	1 min
hybrydyzacja starterów (annealing)	57 °C	45 s

synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	72 °C	2 min
❖ końcowe wydłużanie	72 °C	7 min

W celu amplifikacji genu *atpD* wykorzystano startery MethylATPF oraz MethylATPR (Tabela 6); reakcję amplifikacji przeprowadzono w następujących warunkach:

❖ wstępna denaturacja	94 °C	5 min
❖ 35 cykli:		
denaturacja	94 °C	1 min
hybrydyzacja starterów (annealing)	50 °C	45 s
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	72 °C	2 min
❖ końcowe wydłużanie	72 °C	7 min

rodzaj *Micromonospora*

Reakcje amplifikacji genów rdzeniowych przeprowadzono z wykorzystaniem warunków reakcji opublikowanych przez Carro (2011).

Amplifikację genu *recA* przeprowadzono z wykorzystaniem starterów RAU i RAD (Tabela 6):

❖ wstępna denaturacja	95 °C	9 min
❖ 35 cykli:		
denaturacja	94 °C	1 min
hybrydyzacja starterów (annealing)	55-62 °C	1 min
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	72 °C	2 min
❖ końcowe wydłużanie	72 °C	7 min

Reakcja amplifikacji genu *gyrB* została przeprowadzona z wykorzystaniem starterów GYF3 oraz GYR3B (Tabela 6):

❖ wstępna denaturacja	95 °C	9 min
❖ 35 cykli:		
denaturacja	94 °C	1 min
hybrydyzacja starterów (annealing)	55-62 °C	1 min
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	72 °C	2 min
❖ końcowe wydłużanie	72 °C	7 min

W celu amplifikacji genu *rpoB* wykorzystano startery MYCOF oraz MYCOR (Tabela 6):

❖ wstępna denaturacja	95 °C	9 min
❖ 35 cykli:		
denaturacja	94 °C	1 min
hybrydyzacja starterów (annealing)	52-60 °C	1 min
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	72 °C	2 min
❖ końcowe wydłużanie	72 °C	7 min

Do amplifikacji genu *atpD* wykorzystano pary starterów ATPDF1 i ATPDR3 oraz ATPDF3 i ATPDR3 (Tabela 6):

❖ wstępna denaturacja	95 °C	9 min
❖ 35 cykli:		
denaturacja	94 °C	1 min
hybrydyzacja starterów (annealing)	55-62 °C	1 min
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	72 °C	2 min
❖ końcowe wydłużanie	72 °C	7 min

3.2.2.5. Detekcja i amplifikacja genu *mxoF* u bakterii z rodzajów *Methylobacterium* i *Methylobacterium*

Detekcję genu *mxoF* przeprowadzono z wykorzystaniem starterów f1003 oraz r1561 (Tabela 6). Reakcje amplifikacji przeprowadzono w objętości 25 µl, w skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 12,5 µl 2× Ready-Mix PCR, 0,25 µl każdego z oligonukleotydów (100 µM), x µl genomowego DNA o stężeniu 100 ng × ml⁻¹ oraz woda wolna od nukleaz (x µl). Reakcje amplifikacji przeprowadzono w następujących warunkach:

❖ wstępna denaturacja	94 °C	5 min
❖ 40 cykli:		
denaturacja	95 °C	30 s
hybrydyzacja starterów (annealing)	54 °C	1 min
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	72 °C	2 min
❖ końcowe wydłużanie	72 °C	7 min

3.2.2.6. Detekcja i amplifikacja wybranych genów związanych ze zdolnością bakterii do realizowania mechanizmów promowania wzrostu roślin

Reakcje amplifikacji genów *nifH* oraz *acdS* dla rodzajów *Methylobacterium* i *Methylobacterium* przeprowadzono w objętości 50 μl . W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 25 μl 2 \times Ready-Mix PCR, 0,5 μl każdego z oligonukleotydów (100 μM), x μl genomowego DNA o stężeniu 100 $\text{ng} \times \text{ml}^{-1}$ oraz woda wolna od nukleaz (x μl).

W celu detekcji genu *nifH* wykorzystano startery nifH-F oraz nifH-F (Tabela 6) z zastosowaniem następujących warunków:

❖ wstępna denaturacja	94 °C	5 min
❖ 40 cykli:		
denaturacja	95 °C	30 s
hybrydyzacja starterów (annealing)	54 °C	1 min
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	72 °C	2 min
❖ końcowe wydłużanie	72 °C	7 min

Amplifikację genu *acdS* przeprowadzono wykorzystując wcześniej opublikowane warunki reakcji (Dourado i wsp., 2013) oraz sekwencje starterów ACCMet1f i ACCMet2r (Tabela 6):

❖ wstępna denaturacja	94 °C	5 min
❖ 35 cykli:		
denaturacja	95 °C	30 s
hybrydyzacja starterów (annealing)	55-59 °C	1 min
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	72 °C	1 min
❖ końcowe wydłużanie	72 °C	5 min

Reakcje amplifikacji genów *NRPS*, *PKS I* oraz *PKS II* dla rodzaju *Micromonospora* przeprowadzono w objętości 50 μl . W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 25 μl 2 \times Ready-Mix PCR, 0,5 μl każdego z oligonukleotydów (100 μM), x μl genomowego DNA o stężeniu 100 $\text{ng} \times \text{ml}^{-1}$, 3 μl DMSO oraz woda wolna od nukleaz (x μl).

W celu amplifikacji genu *NRPS*, wykorzystano startery A3 oraz A7R (Tabela 6) oraz następujące warunki reakcji:

❖ wstępna denaturacja	95 °C	9 min
❖ 35 cykli:		
denaturacja	94 °C	1 min
hybrydyzacja starterów (annealing)	48 °C	1 min
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	72 °C	2 min
❖ końcowe wydłużanie	72 °C	7 min

Amplifikację genu *PKS I*, przeprowadzono z wykorzystaniem starterów K1 oraz M6R (Tabela 6), w opisanych wcześniej warunkach reakcji (Ayuso-Sacido i Genilloud, 2005):

❖ wstępna denaturacja	95 °C	5 min
❖ 35 cykli:		
denaturacja	95 °C	30 s
hybrydyzacja starterów (annealing)	53°C	2 min
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	72 °C	4 min
❖ końcowe wydłużanie	72 °C	10 min

Detekcję genu *PKS II* przeprowadzono z wykorzystaniem starterów IIPF6 oraz IIPR6 (Tabela 6), w następujących warunkach (Sun i in., 2012):

❖ wstępna denaturacja	94 °C	4 min
❖ 35 cykli:		
denaturacja	94 °C	1 min
hybrydyzacja starterów (annealing)	60 °C	30 s
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	72 °C	1,5 min
❖ końcowe wydłużanie	72 °C	10 min

3.2.2.7. Wizualizacja wyników reakcji amplifikacji w żelu agarozowym

W celu wizualizacji wyników reakcji PCR oraz przybliżonej oceny ilości otrzymanego materiału DNA po procedurze oczyszczania, przygotowywano 1 % żel agarozowy z dodatkiem barwnika SimplySafe dye. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w obecności wzorca mas cząsteczkowych GeneRuler DNA Ladder Mix (100-10 000 pz) przez 30 min

(120 V, 400 mA) w 1× stężonym buforze TAE. Wyniki elektroforezy wizualizowano w świetle UV.

3.2.2.8. Oczyszczanie zamplifikowanych fragmentów DNA

W przypadku otrzymania pojedynczego produktu o spodziewanej wielkości (bez produktów niespecyficznych), otrzymane fragmenty DNA oczyszczano z wykorzystaniem zestawu Clean-up (A&A Biotechnology), stosując się do procedury zalecanej przez producenta.

3.2.2.9. Oczyszczanie zamplifikowanych fragmentów DNA z żelu agarozowego

W przypadku otrzymania dodatkowych, niespecyficznych produktów reakcji, zamplifikowany materiał genetyczny oczyszczano z żelu agarozowego z wykorzystaniem zestawu Gel-Out (A&A Biotechnology). Rozdział elektroforetyczny produktów PCR prowadzono w obecności wzorca mas cząsteczkowych GeneRuler DNA Ladder Mix (100-10 000 pz) w 1 % żelu agarozowym przy parametrach elektroforezy: 70 min, 90 V, 400 mA. Następnie postępowano zgodnie z protokołem załączonym przez producenta.

3.2.2.10. Sekwencjonowanie zamplifikowanych fragmentów DNA

Przed właściwą reakcją sekwencjonowania (tzw. PCR sekwencyjny), w celu ustalenia przybliżonego stężenia matrycy DNA, oczyszczone produkty reakcji wizualizowano na 1 % żelu agarozowym w świetle UV. W skład mieszaniny reakcyjnej (10 µl) wchodziły: 2 µl BDx64 (BigDye[®] Enhancing Buffer), 0,2 µl BigDye 3.1, 1 µl 5x Sequencing Buffer (BigDye[™] Terminator v1.1, v3.1), 1 µl odpowiedniego startera (stężenie 5 µM), od 1 do 5,8 µl matrycy DNA oraz woda wolna od nukleaz (x µl). Reakcję sekwencjonowania przeprowadzono w następujących warunkach:

❖ wstępna denaturacja	96 °C	3 min
❖ 30 cykli:		
denaturacja	96 °C	10 s
hybrydyzacja starterów (annealing)	50 °C	5 s
synteza amplifikowanych fragmentów (elongacja)	60 °C	2 min

Produkty reakcji sekwencjonowania oczyszczano za pomocą zestawu ExTerminator (A&A Biotechnology) zgodnie z instrukcją użytkownika; odczyt sekwencji tak przygotowanych preparatów zlecono firmie zewnętrznej (Genomed S.A., Warszawa).

3.2.2.11. Analiza filogenetyczna genu 16S rRNA

Uzyskane odczyty sekwencji fragmentów genu 16S rRNA porównano z sekwencjami DNA zdeponowanymi w bazie danych GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), wykorzystując narzędzie BLAST (Altschul i in., 1990). Oprogramowanie MEGA7 (Kumar i in., 2016) wykorzystano do skonstruowania drzewa filogenetycznego obrazującego stopień podobieństwa sekwencji badanych izolatów do sekwencji pozyskanych z bazy GenBank, wykazujących najwyższy stopień podobieństwa w stosunku do sekwencji badanych bakterii. Filogram zbudowano w oparciu o metodę największej wiarygodności (ang. *Maximum Likelihood*), z zastosowaniem analizy „bootstrap” (1000 powtórzeń) oraz odpowiedniego modelu ewolucyjnego, obliczonego przez oprogramowanie MEGA7 na podstawie dopasowanych sekwencji. Program BioEdit 7.2 (Hall, 1999) wykorzystano do skonstruowania macierzy podobieństwa sekwencji oraz określenia ich podobieństwa.

3.2.2.12. Wielolokusowa analiza sekwencji (MLSA) genów rdzeniowych

Wielolokusową analizę sekwencji, przeprowadzoną na podstawie sekwencji czterech genów rdzeniowych (*recA*, *gyrB*, *rpoB* oraz *atpD*), rozpoczęto od przyrównania sekwencji poszczególnych genów z sekwencjami zdeponowanymi w bazie GenBank, wykorzystując algorytm BLAST. Następnie, sekwencje badanych izolatów oraz bakterii wykazujących najwyższy stopień podobieństwa sekwencji połączono w kolejności *recA-gyrB-rpoB-atpD* i dopasowano do siebie w programie MEGA7. Tak skonstruowana biblioteka posłużyła do przygotowania drzewa filogenetycznego, obrazującego podobieństwo połączonych sekwencji badanych izolatów oraz sekwencji pozyskanych z bazy GenBank. Drzewo filogenetyczne skonstruowano w oparciu o metodę największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), zaś wiarygodność poszczególnych węzłów poparto analizą „bootstrap” (1000 powtórzeń). Odpowiedni model ewolucyjny dobrano na podstawie obliczeń dokonanych przez program MEGA7. Program BioEdit 7.2 wykorzystano do skonstruowania macierzy podobieństwa sekwencji.

3.2.2.13. Analiza filogenetyczna genu *mxoF* oraz genów związanych ze zdolnością bakterii do realizowania mechanizmów promowania wzrostu roślin

Sekwencje genów badanych izolatów porównano z odpowiednimi sekwencjami genów szczepów referencyjnych, zdeponowanymi w bazie danych GenBank. Program MEGA7 wykorzystano do skonstruowania drzew filogenetycznych (dla każdego genu z osobna), obrazujących stopień podobieństwa sekwencji badanych izolatów oraz sekwencji o najwyższym stopniu podobieństwa, pozyskanych z bazy danych GenBank. Drzewa filogenetyczne skonstruowano z zastosowaniem metody największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), wskaźnik poparcia określono metodą „bootstrap” opartą na 1000 powtórzeń, zaś odpowiedni model ewolucyjny dobrano na podstawie wyliczeń programu MEGA7. Do skonstruowania macierzy podobieństwa sekwencji oraz określenia procentowego podobieństwa sekwencji wykorzystano program BioEdit 7.2.

3.2.3. Przygotowanie inokulum bakteryjnego

W celu przygotowania zawiesiny bakteryjnej, bakterie hodowano w temperaturze 28 °C na podłożu stałym 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v) (rodzaje *Methylobacterium* i *Methylorubrum*) przez 5 dni lub przez 8 dni na podłożu stałym ISP2 dla szczepów z rodzaju *Micromonospora*. Po tym czasie, bakterie należące do rodzajów *Methylobacterium*/*Methylorubrum* zbierano za pomocą jałowej ezy i zawieszano w probówkach zawierających 5 ml płynu fizjologicznego. W przypadku szczepów należących do rodzaju *Micromonospora*, masę bakteryjną zbierano za pomocą jałowej ezy i zawieszano w probówkach typu Eppendorf, zawierających 1 ml płynu fizjologicznego. Mieszaniny worteksowano i odstawiano na około 10 min, aż do momentu osadzenia się zagregowanej masy na dnie probówki; supernatant rozcieńczano w celu uzyskania odpowiedniej gęstości optycznej. W przypadku niektórych testów biochemicznych proces przygotowania inokulum modyfikowano, co zaznaczono w opisie metody.

3.2.4. Analiza fenotypowa bakterii endofitycznych

3.2.4.1. Analiza cech fenotypowych bakterii z wykorzystaniem zestawu GEN III (system Biolog)

Zdolność badanych izolatów do utylizacji różnych związków chemicznych, wykorzystywanych przez mikroorganizmy jako jedyne źródło węgla i energii, oraz wrażliwości na wybrane substancje chemiczne, badano z wykorzystaniem mikroplutek GEN III (system Biolog), postępując zgodnie z instrukcją producenta. Szczepy przyporządkowane do rodzaju *Micromonospora* hodowano przez 5 dni na podłożu GYM i badano z wykorzystaniem płynu inokulacyjnego IF C ($OD_{600} = 0,02$); szczepy należące do rodzajów *Methylobacterium* i *Methylorubrum* hodowano na podłożu 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v) przez 3 dni, zaś zawiesinę przygotowywano z wykorzystaniem płynu inokulacyjnego IF A (OD_{600} inokulum = 0,2). Płytki inkubowano w temperaturze 28 °C przez 5 (rodzaje *Methylobacterium* i *Methylorubrum*) lub 9 dni (rodzaj *Micromonospora*), tj. do momentu pełnego wybarwienia dołków kontrolnych (kontrola pozytywna).

3.2.4.2. Charakterystyka biochemiczna izolatów bakterii Gram ujemnych z wykorzystaniem zestawu Microgen ID

Gram ujemne szczepy należące do rodzajów *Methylobacterium* i *Methylorubrum* scharakteryzowano wykorzystując zestaw Microgen ID. Zgodnie z opisaną procedurą, przed przystąpieniem do wykonania testu przeprowadzono badanie na aktywność oksydazy (wykorzystano odczynnik TestOxidase Reagent). Przygotowaną zawiesinę bakteryjną wykorzystano do inokulacji pasków GN A oraz GN B; wyniki odczytano po 48 godzinnej inkubacji testów w temperaturze 37 °C.

3.2.4.3. Określenie zdolności bakterii do produkcji wybranych enzymów hydrolitycznych z wykorzystaniem zestawu API ZYM (bioMérieux)

Aktywność enzymatyczną szczepów oceniono z wykorzystaniem zestawu API ZYM (bioMérieux), postępując zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Zawiesinę bakteryjną o gęstości optycznej 6 w skali McFarland'a wykorzystano do inokulacji studzienek, które następnie inkubowano przez 4,5 godziny w temperaturze 37 °C, w ciemności. Po tym

czasie kontynuowano procedurę poprzez dodanie odczynników ZYM A oraz ZYM B; wyniki odczytano po upływie 10 minut. Zgodnie z adnotacją producenta, test na aktywność esteraz uznano za nieważny.

3.2.4.4. Określenie tolerancji bakterii wobec różnych stężeń NaCl w podłożu

Badane szczepy wysiewano na podłoża stałe 79CA z metanolem (1 % v/v; rodzaje *Methylobacterium* oraz *Methylorubrum*) lub ISP2 (rodzaj *Micromonospora*) z dodatkiem NaCl w stężeniu końcowym 1 %; 2 %; 3 % i 4 % poprzez nakropienie 15 µl zawiesiny bakteryjnej ($OD_{600} = 0,2$). Płytki inkubowano w temperaturze 28 °C przez dwa tygodnie; bakterie wysiane na podłoża 79CA lub ISP2 o standardowym składzie stanowiły kontrolę pozytywną.

3.2.4.5. Określenie zakresu pH wzrostu bakterii

Bakterie wysiewano na podłoża stałe 79CA (rodzaj *Micromonospora*) lub 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v) (w przypadku szczepów należących do rodzaju *Methylobacterium/Methylorubrum*), o różnym pH (4,5; 5,5; 6; 7; 8; 9; 10) poprzez nakropienie 15 µl zawiesiny bakteryjnej o $OD_{600} = 0,2$. Podłoża o pH 4,5 oraz 5,5 sporządzono w oparciu o metodę opisaną przez Carro (2011), mieszając jałowy bufor kwas cytrynowy- Na_2HPO_4 z 2× stężonym, jałowym podłożem agarowym w stosunku 1:1 (po wystudzeniu obydwu roztworów); w przypadku podłoży o pH 9 oraz 10, zastosowano bufor glicyna-wodorotlenek sodu i zmieszano po wystudzeniu z 2× stężonym, jałowym podłożem agarowym w stosunku 1:1. Roztwory stężonego HCL oraz 50 % KOH wykorzystano do przygotowania podłoży o pH równym 6, 7 oraz 8.

3.2.4.6. Określenie zdolności bakterii do wzrostu w różnych temperaturach

Do probówek zawierających po 5 ml podłoża płynnego 79CA dla rodzaju *Micromonospora* lub 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v) dla rodzajów *Methylobacterium/Methylorubrum*, dodawano po 100 µl zawiesiny bakteryjnej o gęstości $OD_{600} = 0,2$, następnie mierzono gęstość optyczną w czasie T_0 i inkubowano w temperaturach: 8 °C, 28 °C, 37 °C, 42 °C i 45 °C przez dwa tygodnie. Po tym czasie powtórnie mierzono gęstość optyczną.

3.2.4.7. Określenie zdolności bakterii do aktywnego ruchu

Szczepy bakteryjne wysiewano poprzez punktowe wklucie masy bakteryjnej za pomocą ezy w 0,35 % podłoże agarowe 79CA w przypadku szczepów z rodzaju *Micromonospora* lub 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v) w przypadku szczepów należących do rodzaju *Methylobacterium/Methylorubrum*. Kontrolę pozytywną stanowił szczep należący do gatunku *Pseudomonas fluorescens*.

3.2.4.8. Określenie zdolności bakterii do oddziaływań typu *quorum sensing* (QS)

W celu detekcji autoinduktorów produkowanych przez badane bakterie Gram ujemne, szczepy należące do grupy *Methylobacterium/Methylorubrum* wysiewano na podłoże 79CA; równocześnie wykonywano posiew szczepu wskaźnikowego: *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClean i in., 1997) w taki sposób, aby szczep badany oraz szczep wskaźnikowy tworzyły literę „T”, zachowując ok. 3 mm odstęp pomiędzy nimi. Szalki inkubowano w temperaturze 28 °C przez 7 dni.

3.2.4.9. Określenie zdolności bakterii do tworzenia biofilmu metodą barwienia fioletem krystalicznym oraz przeżywalności w biofilmie przy użyciu zestawu LIVE/DEAD® Bac-Light™ Bacterial Viability

W celu oceny zdolności szczepów z rodzajów *Methylobacterium* i *Methylorubrum* do tworzenia biofilmu, wykonano test barwienia fioletem krystalicznym (Xu i in., 2014) z modyfikacjami oraz test oceny przeżywalności bakterii z wykorzystaniem zestawu LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit.

Test barwienia fioletem krystalicznym poprzedzono hodowlą wstępną: bakterie wsiewano do probówek zawierających 5 ml podłoża płynnego 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v) i wytrząsano w temperaturze 28 °C przez 48 godzin. Po tym czasie hodowle zwirowano, osad przepłukano jałowym buforem PBS i zawieszono w nowej porcji jałowego podłoża 79CA, ustalając gęstość optyczną na poziomie $OD_{600} = 0,1$. Tak uzyskaną zawiesinę, po 100 µl, nanoszono na płytki 96-dołkowe (7 dołków na każdy szczep; dodatkowo dwa dołki zawierające niezainokulowane podłoże potraktowano jako kontrolę negatywną). Płytki inkubowano w temperaturze 28 °C przez 90 godzin przy 90 rpm. Następnie usuwano hodowle tak, aby nie naruszyć biofilmu, studzienki przepłukiwano buforem PBS i pozostawiano do

wysuszenia (15 min w temperaturze 28 °C). Po tym czasie dodawano 180 µl 0,1 % roztworu fioletu krystalicznego i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie fiolet usuwano, dołki płukano dwukrotnie jałową wodą destylowaną i наносzono po 180 µl 30 % kwasu octowego; po 15 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej wynik odczytano za pomocą spektrofotometru Biotek Synergy H1 Hybrid Microplate Reader przy długości fali 595 nm. Otrzymane wyniki porównano z odczytami uzyskanymi w przypadku dołek kontrolnych.

W przypadku oceny przeżywalności bakterii z wykorzystaniem zestawu LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, szczepy hodowano w takich samych warunkach, jak opisano powyżej z tą różnicą, że po usunięciu hodowli z dołek i jednokrotnym przepłukaniu buforem PBS, przystąpiono do procedury barwienia bakterii zgodnie z instrukcją producenta zestawu. Przeżywalność komórek bakterii oceniono we współpracy z Katedrą Anatomii Funkcjonalnej i Cytobiologii UMCS, przy użyciu laserowego mikroskopu konfokalnego Zeiss Axiovert 200M.

3.2.4.10. Określenie zdolności bakterii do wykorzystywania kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACC), jako jedynego źródła azotu

Doświadczenie jakościowe przeprowadzono bazując na metodzie opisanej przez Penrose i Glicka (2003) z modyfikacjami, wykorzystując czerwień fenolową jako wskaźnik zmiany odczynu podłoża, a tym samym identyfikującego wzrost bakterii (Maheshwari i wsp., 2020).

Bakterie z rodzajów *Methylobacterium* i *Methylorubrum* hodowano na podłożu Dworckina i Foster (Husen i in., 2009), w następujących wariantach:

- z dodatkiem kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (próba badana);
- z dodatkiem NH_4SO_4 ($2 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$) (kontrola pozytywna);
- bez dodatku związków azotu (kontrola negatywna).

Szczepy z rodzaju *Micromonopora* hodowano na podłożu minimalnym MM:

- z dodatkiem kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego zamiast L-asparaginy (próba badana);
- podłoże niezmodyfikowane (kontrola pozytywna);
- bez dodatku źródła azotu (kontrola negatywna).

Kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowy наносzono na podłoże w postaci 0,5 M roztworu (30 µM ACC na jedną płytkę) i rozprowadzano po powierzchni podłoża za pomocą

jałowej głaszczy. Bakterie wysiewano poprzez nakropienie 15 μ l zawiesiny bakteryjnej o gęstości optycznej $OD_{600} = 0,2$; szczepy hodowano przez okres 21 dni w temperaturze 28 °C.

Oceniono także aktywność enzymu deaminazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego dla wybranych szczepów, wykorzystując metodę opisaną przez Li i wsp. (2011). W tym celu, 100 μ l zawiesiny bakteryjnej ($OD_{600} = 0,2$) wsiewano do próbek zawierających 5 ml podłoża AMS, w którym chlorek amonu zastąpiono roztworem ACC (stężenie końcowe 3 mM). Hodowle wytrząsano z prędkością 160 rpm przez 6 dni, w temperaturze 28 °C. Następnie hodowle bakteryjne wirowano przez 5 minut z prędkością 11 000 rpm. Supernatant z poszczególnych hodowli bakteryjnych pobierano i mieszano z odczynnikiem ninhydrynowym (podrozdział 3.1.6) w stosunku 1:2 i poddawano inkubacji w łaźni wodnej, zgodnie z procedurą. W celu oceny ilości wykorzystanego ACC, uzyskane roztwory наносono po 300 μ l na płytki 96-dołkowe i określano absorbancję przy długości fali równej 570 nm z wykorzystaniem spektrofotometru Biotek Synergy H1 Hybrid Microplate Reader. Wyniki porównywano z wartościami krzywej wzorcowej wykonanej dla ACC, sporządzonej w oparciu o wartości absorbancji (długość fali 570 nm) roztworów ACC o znanym stężeniu molowym w podłożu AMS (0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,03; 0,04; 0,5 mM \times l⁻¹), wymieszanych z odczynnikiem ninhydrynowym (podrozdział 3.1.6) w stosunku 1:2 i inkubowanych w łaźni wodnej zgodnie z procedurą (Li i in., 2011).

3.2.4.11. Określenie zdolności bakterii do wiązania azotu atmosferycznego

Zdolność bakterii do wiązania azotu atmosferycznego oceniono z wykorzystaniem procedury opisanej przez Baldaniego i wsp. (2014), wykorzystując własną modyfikację podłoża NFb (podrozdział 3.1.5). Dodatkowo, w przypadku szczepów należących do rodzaju *Methylobacterium/Methylorubrum*, do podłoża dodawano metanol (1 % v/v).

5 ml podłoża inokulowano odpowiednimi szczepami bakterii i inkubowano przez okres 3 tygodni w temperaturze 28 °C. W przypadku pojawienia się charakterystycznej „błony bakteryjnej”, umiejscowionej tuż pod powierzchnią podłoża, błonę pobierano za pomocą pipety i wsiewano do nowego podłoża (drugi pasaż); pojawienie się charakterystycznej „błony” również w wyniku trzeciego pasażu uznawano za wynik pozytywny. Jako szczep kontrolny wykorzystano diazotroficzną bakterię *Azospirillum lipoferum* D74.

3.2.4.12. Określenie zdolności bakterii do produkcji kwasu indolilo-3-ocetowego (IAA) oraz indolu

100 μl zawiesiny bakteryjnej ($\text{OD}_{600} = 0,2$) wsiewano do probówek zawierających 5 ml podłoża TMRT z dodatkiem metanolu (1 % v/v; szczepy *Methylobacterium* i *Methylorubrum*) lub płynnego ISP2 z dodatkiem L-tryptofanu (0,2 % w/v), w przypadku szczepów z rodzaju *Micromonospora*. Hodowle wytrząsano z prędkością 160 rpm przez 14 dni, w temperaturze 28 °C; po tym czasie pobierano po 1 ml hodowli i wirowano z prędkością 11 000 rpm przez 5 minut. W celu oceny zdolności szczepów do produkcji IAA, 100 μl supernatantu z każdej hodowli mieszano z 200 μl odczynnika Salkowskiego. Mieszaninę inkubowano w ciemności przez 25 min, następnie mierzono absorbancję za pomocą spektrofotometru Biotek Synergy H1 Hybrid Microplate Reader przy długości fali 530 nm. Sporządzoną uprzednio krzywą wzorcową IAA (10-100 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) wykorzystano do oszacowania zawartości kwasu indolilo-3-ocetowego (IAA) w supernatancie. Zdolność szczepów do produkcji indolu badano poprzez dodanie kilku kropeł odczynnika Kovacs do hodowli bakteryjnych (ok. 4 ml), pozostałych w probówkach. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano szczep *Escherichia coli* K12, natomiast kontrolą negatywną był szczep *Proteus mirabilis*.

3.2.4.13. Określenie tolerancji bakterii wobec różnych stężeń wybranych pierwiastków (arsenu, glinu, miedzi)

Zawiesiny badanych szczepów nakropiono (15 μl , $\text{OD}_{600} = 0,2$) na podłoża stałe 79CA w przypadku szczepów *Micromonospora* lub 79CA z dodatkiem 1 % v/v metanolu w przypadku szczepów należących do rodzaju *Methylobacterium/Methylorubrum*. Do podłoży dodawano jałowe roztwory wodne następujących związków chemicznych: $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (jony arsenu), $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (jony glinu) oraz CuSO_4 (jony miedzi). Stężenie molowe wskazanych jonów w podłożach wynosiło 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 15, 18 mM; szczepy hodowano przez 2 tygodnie w temperaturze 28 °C. Szczepy z rodzaju *Methylobacterium/Methylorubrum* wysiane na podłożu 79CA z dodatkiem 1 % v/v metanolu oraz szczepy reprezentujące rodzaj *Micromonospora* hodowane na podłożu stałym 79CA stanowiły kontrolę pozytywną.

3.2.4.14. Określenie zdolności bakterii do produkcji metaloforów

Zdolność bakterii do sekwestracji jonów żelaza, miedzi, glinu oraz arsenu oceniono przy użyciu podłoża CAS z modyfikacjami wynikającymi z niezdolności promieniowców do wzrostu na podłożu zawierającym CTAB (Rungin i in., 2012). W tym celu wykonywano posiew dywanowy bakterii na podłoża stałe i hodowano w 28 °C przez 5 dni na podłożu 79CA z dodatkiem metanolu 1 % v/v (rodzaje *Methylobacterium* i *Methylobacterium*) lub 8 dni na podłożu ISP2 (rodzaj *Micromonospora*). Następnie z hodowli wycinano korki agarowe o średnicy 0,7 cm i przenoszono na podłoża CAS zawierające jony odpowiednich metali. Całość inkubowano w temperaturze 28 °C przez 14 dni; korki agarowe wycięte z nieinkulowanych podłoży stanowiły kontrolę negatywną.

3.2.4.15. Określenie zdolności bakterii do rozkładu trifosforanów (TCP)

15 µl zawiesiny bakteryjnej każdego z badanych szczepów ($OD_{600} = 0,2$) wysiewano na zmodyfikowane podłoże stałe Pikovskaya (podrozdział 3.1.5) i inkubowano w temperaturze 28 °C przez 28 dni. Kontrolę pozytywną stanowił szczep *Pseudomonas* sp. 267.

3.2.4.16. Określenie zdolności bakterii do rozkładu celulozy

15 µl zawiesiny bakteryjnej każdego z badanych szczepów ($OD_{600} = 0,2$) wysiewano na podłoże stałe z karboksymetylocelulozą. Hodowlę prowadzono przez 14 dni w temperaturze 28 °C; po tym czasie na powierzchnię podłoża наносzono płyn Lugola w celu wybarwienia pozostałej w podłożu celulozy; płyn Lugola zlewano po upływie 5 minut, zaś powierzchnię podłoża płukano wodą destylowaną. Kontrolę pozytywną stanowił szczep *Pseudomonas* sp. 267.

3.2.4.17. Określenie zdolności bakterii do produkcji enzymów proteolitycznych

15 µl zawiesiny bakteryjnej każdego z badanych szczepów ($OD_{600} = 0,2$) wysiewano na podłoże stałe z dodatkiem mleka w proszku (podrozdział 3.1.5). Bakterie hodowano w temperaturze 28 °C przez 14 dni.

3.2.4.18. Określenie zdolności bakterii do rozkładu węglowodorów zawartych w oleju napędowym oraz przepracowanym oleju silnikowym

Określenie zdolności bakterii do rozkładu węglowodorów przeprowadzono w oparciu o wcześniej opisaną metodę (Waghmode i in., 2012), wykorzystując olej napędowy jako jedyne źródło węgla i energii. W tym celu, 100 μ l zawiesiny bakteryjnej ($OD_{600} = 0,2$) wsiewano do probówek zawierających 4,75 ml płynnego podłoża Bushnell Haas (Waghmode i in., 2012) uzupełnionego olejem napędowym (filtrowanym przez jałowy filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 μ m) do objętości końcowej 5 ml. Bakterie wytrząsano z prędkością 160 rpm w temperaturze 28 °C przez 28 dni (pierwszy pasaż); po tym czasie pobierano 0,5 ml hodowli, przenoszono do nowych probówek z tym samym podłożem (drugi pasaż) i hodowano przez kolejne 28 dni; po upływie tego czasu ponownie pobierano 0,5 ml hodowli, wsiewano do nowych probówek z podłożem (trzeci pasaż). Przy trzecim pasażu mierzono gęstość optyczną hodowli (OD_{600}) w czasie 0 oraz po 28 dniach.

W przypadku wybranych szczepów, charakteryzujących się intensywnym wzrostem w podłożu zawierającym olej napędowy jako jedyne źródło węgla i energii, testowano również zdolność tych bakterii do wzrostu w podłożu zawierającym przepracowany olej silnikowy jako jedyne źródło węgla. Do hodowli szczepów wykorzystano podłoże Bushnell Haas uzupełnione przepracowanym olejem silnikowym, filtrowanym przez jałowy filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 μ m, do objętości końcowej 5 ml. Bakterie wytrząsano z prędkością 160 rpm w temperaturze 28 °C przez 28 dni (pierwszy pasaż); po tym czasie pobierano 0,5 ml hodowli, przenoszono do nowych probówek z tym samym podłożem (drugi pasaż) i hodowano przez następne 28 dni. Po upływie czasu inkubacji pobierano 0,5 ml hodowli, wsiewano do nowych probówek z takim samym podłożem (trzeci pasaż). W czasie 0 i po 28 dniach hodowli mierzono gęstość optyczną OD_{600} .

3.2.4.19. Określenie zdolności bakterii do produkcji cyjanowodoru

100 μ l zawiesiny bakteryjnej ($OD_{600} = 0,2$) wsiewano do probówek z 5 ml płynnego podłoża 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v) w przypadku szczepów należących do rodzaju *Methylobacterium/Methylorubrum* lub podłoża ISP2 dla szczepów z rodzaju *Micromonospora*, uzupełnionych dodatkiem glicyny, której końcowe stężenie wynosiło 4,4 mg \times l⁻¹. Hodowle wytrząsano z prędkością 160 rpm przez 5 dni w temperaturze 28 °C; po tym czasie do probówek wkładano paski jałowej bibuły (5 cm \times 0,8 cm) nasączonej do połowy roztworem 2 % Na₂CO₃ w 0,5 % roztworze kwasu pikrynowego (Khatri i in., 2018). Paski

umieszczano w taki sposób, aby nienasączony koniec znajdował się między ścianką próbówki a korkiem; całość uszczelniano parafilmem i wytrząsano przez 14 dni z prędkością 160 rpm, w temperaturze 28 °C.

3.2.5. Analiza właściwości antagonistycznych bakterii endofitycznych

3.2.5.1. Ocena zdolności bakterii do hamowania wzrostu fitopatogenów bakteryjnych

15 µl zawiesiny bakteryjnej każdego z badanych szczepów ($OD_{600} = 0,2$) wysiewano na podłoże SA1 (podrozdział 3.1.5) i hodowano przez 7 dni w temperaturze 20 °C (doświadczenie I) lub 28 °C (doświadczenie II). Po tym czasie, 15 µl zawiesiny bakteryjnej poszczególnych szczepów fitopatogennych (Tabela 3) o gęstości optycznej $OD_{600} = 0,1$, wysiewano w pobliżu kolonii bakterii endofitycznych (0,5 cm, +/- 0,1 cm). Następnie kontynuowano inkubację w dotychczasowych warunkach. Stopień zahamowania wzrostu bakterii fitopatogennych oceniano po upływie 48 godzin. Próbę kontrolną stanowiły szczepy testowanych bakterii fitopatogennych, które wysiewano pojedynczo na podłoże SA1.

3.2.5.2. Ocena zdolności bakterii do hamowania wzrostu fitopatogenów grzybowych

Zdolność bakterii do hamowania fitopatogennych grzybów (Tabela 4) oceniono z wykorzystaniem metody podwójnych kultur z wykorzystaniem podłoża SA1 (podrozdział 3.1.5). 15 µl zawiesiny bakteryjnej ($OD_{600} = 0,2$) wysiewano na podłoże SA1 (w pobliżu brzegów szalki) i hodowano przez 7 dni w temperaturze 20 °C (doświadczenie I) lub 28 °C (doświadczenie II). Po tym czasie, w centrum szalki umieszczano inokulum grzybowe w postaci korka agarowego i kontynuowano inkubację w dotychczasowych warunkach. Kontrolę stanowiły szalki z podłożem SA1, zaszczerpione tylko inokulum grzybowym; do pomiaru strefy zahamowania wzrostu grzybni przystępowano po upływie 4 dni (rodzaje *Sclerotinia* oraz *Botrytis*), lub 6 dni (rodzaj *Fusarium*), lub 28 dni (rodzaj *Verticilium*).

3.2.6. Doświadczenia roślinne

3.2.6.1. Warunki uprawy

Uprawa w szklarni

Uprawę roślin prowadzono w doniczkach o wymiarach 14×14×14 cm, odkażonych z użyciem skażonego alkoholu oraz poddanych działaniu promieniowania UV przez 25 min. Rośliny uprawiano w następujących podłożach ogrodnich:

❖ podłoże torfowe:

Substrat torfowy (pH 6,8-7) wymieszano z perlitem ogrodnim w stosunku 1:3 i autoklawowano (1×).

❖ *podłoże torfowe zanieczyszczone jonami miedzi (1 g Cu × kg⁻¹ podłoża):*

2 kg powietrznie suchego, jałowionego przez autoklawowanie (1×) substratu torfowego (pH 6,8-7) wymieszano z 11 g Cu w formie roztworu CuSO₄ × 7 H₂O. Tak przygotowany koncentrat przetrzymywano w worku foliowym przez 4 tygodnie w celu stabilizacji jonów w podłożu; po tym okresie przygotowany substrat dodawano do 9 kg jałowej mieszanki powietrznie suchego substratu torfowego i perlitu (w stosunku 1:3).

❖ *podłoże torfowe zanieczyszczone jonami arsenu (24 mg As × kg⁻¹ podłoża):*

2 kg powietrznie suchego, jałowionego przez autoklawowanie (1×) substratu torfowego (pH 6,8-7) wymieszano z 264 mg As w formie roztworu Na₂HAsO₄ × 7 H₂O. Przygotowany koncentrat przetrzymywano w worku foliowym przez 4 tygodnie; następnie przygotowany substrat wymieszano z 9 kg powietrznie suchego, jałowego substratu torfowego i jałowego perlitu (w stosunku 1:3).

❖ *podłoże torfowe zanieczyszczone olejem napędowym (6 g × kg⁻¹ podłoża):*

2 kg powietrznie suchego, jałowionego przez autoklawowanie (1×) substratu torfowego (pH 6,8-7) wymieszano z 54 g oleju napędowego i przetrzymywano w worku foliowym przez 4 tygodnie; następnie podłoże wymieszano z 7 kg powietrznie suchego substratu torfowego i jałowego perlitu (w stosunku 1:3).

Rośliny doświetlano za pomocą lamp sodowych w warunkach 10 godzinnego dnia i 14 godzinnej nocy, w temperaturze ok. 20 °C (+/- 4 °C) i wilgotności wahającej się w granicach 50-70 %. Do momentu inokulacji, rośliny podlewano jałową wodą destylowaną, następnie zastosowano nawadnianie kropelkowe w celu zapewnienia stałego nawodnienia podłoża (w zależności od fazy rozwojowej roślin, od 50 do 120 ml do jednej doniczki dziennie).

Uprawa w komorze fitotronowej

Rośliny uprawiano na skosach agarowych ze zmodyfikowanym podłożem Hoaglanda w probówkach szklanych o objętości 30 ml. Uprawę prowadzono w warunkach 10 godzinnego dnia i 14 godzinnej nocy, w temperaturze 20 °C i wilgotności ok. 90 %.

3.2.6.2. Jałowienie i siew nasion

Powierzchnię nasion koniczyny białej jałowiono według następujących etapów, modyfikując metodę opisaną przez Mierzwę (2008):

- 1) 1× płukanie jałową wodą destylowaną
- 2) jałowienie przez 5 min w 0,1 % roztworze HgCl₂
- 3) 1× płukanie jałową wodą destylowaną
- 4) jałowienie przez 3 min w 75 % roztworze etanolu
- 5) 3× płukanie jałową wodą destylowaną

Nasiona pszenicy oraz rzepaku poddano powierzchniowemu jałowieniu, wykorzystując metodę Canbolata i wsp. (2006):

- 1) 1× płukanie jałową wodą destylowaną
- 2) jałowienie przez 2 min w 70 % etanolu
- 3) 1× płukanie jałową wodą destylowaną
- 4) jałowienie przez 10 min w 1,2 % NaClO
- 5) 5× płukanie jałową wodą destylowaną

Jałowione zewnętrznie nasiona wysiewano w nadmiarze do doniczek z podłożem; następnie nadmiar siewek usuwano przed inokulacją (Tabela 7):

Tabela 7. Norma siewu nasion oraz liczba siewek pozostawionych (w jednej doniczce)

gatunek rośliny	liczba wysianych nasion	liczba pozostawionych siewek
pszenica zwyczajna	30	10
koniczyna biała	20	15
rzepak	5	4

3.2.6.3. Wpływ inokulacji na energię i zdolność kiełkowania nasion

Wpływ badanych bakterii na energię i zdolność kiełkowania nasion przeprowadzono na podstawie opisanej wcześniej metody (Anwar i in., 2016) z modyfikacjami. Powierzchniowo wyjałowione nasiona koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) odm. Grasslands Huia oraz pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) odm. Foxx (po 30 nasion każdego gatunku)

wytrząsano przez 20 minut w szklanych szalkach Petriego, zawierających po 24 ml zawiesiny bakteryjnej każdego z badanych szczepów w podłożu Fahraeusa ($OD_{600} = 0,2$). Tak zaprawione nasiona przenoszono do jałowych szalek Petriego wyłożonych trzema warstwami jałowej ligniny, zwilżonej jałową wodą destylowaną (10 ml). Nasiona wytrząsane w jałowym podłożu Fahraeusa stanowiły próbę kontrolną. Szalki z nasionami inkubowano w temperaturze 20 °C, w ciemności. Zgodnie z zaleceniami ISTA (Międzynarodowy Związek Oceny Nasion, ang. *International Seed Testing Association*, 2006), energię kiełkowania oceniono w czwartej dobie doświadczenia, natomiast zdolność kiełkowania, w ósmej dobie.

3.2.6.4. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin, uprawianych w substracie torfowym

W doświadczeniu oceniono wpływ wybranych szczepów bakterii endofitycznych na długość i masę części nadziemnej roślin koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) odm. Grasslands Huia oraz pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) odm. Foxx. W tym celu, 30 roślin koniczyny białej oraz 30 roślin pszenicy zwyczajnej przeznaczono do inokulacji zawiesiną pojedynczego szczepu (1 ml zawiesiny bakteryjnej, $OD_{600} = 0,2$ w podłożu płynnym Fahraeusa nanoszono na podłoże wokół pojedynczej siewki); rośliny uprawiano w odkażonym podłożu torfowym i poddano jednorazowej inokulacji (w 5 dniu od momentu siewu). Rośliny nieinokulowane (do podłoża wprowadzono 1 ml jałowego podłoża Fahraeusa) stanowiły próbę kontrolną. Uprawę prowadzono w warunkach szklarniowych przez 30 dni (pszenica zwyczajna) lub 63 dni (koniczyna biała). Po tym czasie rośliny usuwano, część nadziemną ważono i mierzono.

3.2.6.5. Wpływ koinokulacji siewek koniczyny białej zawiesinami bakterii endofitycznych i ryzobiowych na wybrane cechy biometryczne roślin, uprawianych w substracie torfowym

W doświadczeniu badano wpływ koinokulacji roślin koniczyny białej zawiesinami bakterii endofitycznych i ryzobiowych na długość i masę części nadziemnej roślin. W tym celu zastosowano te same szczepy endofityczne oraz warunki uprawy jak w doświadczeniu 3.2.6.4; 30 roślin koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) odm. Grasslands Huia poddano jednorazowej inokulacji doglebowej zawiesiną pojedynczego szczepu endofitycznego (1 ml za-

wiesiny bakteryjnej, $OD_{600} = 0,2$ w podłożu płynnym Fahraeusa nanoszono na podłoże workół pojedynczej siewki); dodatkowo, rośliny koniczyny koinokulowano wykorzystując 1 ml zawiesiny szczepu ryzobiowego na każdą roślinę ($OD_{600} = 0,2$ w podłożu płynnym Fahraeusa). Do koinokulacji wykorzystano szczep *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1, wykazujący zdolność do indukcji procesu brodawkowania na badanych roślinach. Podobnie jak w doświadczeniu 3.2.6.4, określano masę i długość części nadziemnej. Rośliny inokulowane jedynie zawiesiną szczepu ryzobiowego stanowiły próbę kontrolną.

3.2.6.6. Ocena zdolności bakterii do kolonizacji różnych organów roślin

Zdolność poszczególnych szczepów kolonizacji wewnętrznych tkanek roślinnych z wykonanych doświadczeń (podrozdziały 3.2.6.4. oraz 3.2.6.5.) oceniono poprzez wysiewanie maceratu z odkażonych zewnętrznie brodawek korzeniowych, fragmentów korzeni, łodyg i liści na odpowiednie podłoża selektywne, ograniczające wzrost innych mikroorganizmów. W tym celu materiał roślinny jałowiono według następującej procedury:

- 1) 1× płukanie w wodzie kranowej
- 2) 1× płukanie w jałowej wodzie destylowanej
- 3) jałowienie w 70 % roztworze etanolu przez 1 min
- 4) jałowienie w 3,5 % roztworze NaClO przez 2 min
- 5) 5× płukanie w jałowej wodzie destylowanej

Zewnętrznie jałowe fragmenty roślin macerowano i wysiewano na podłoża hodowlane z dodatkiem związków chemicznych o właściwościach ograniczających wzrost mikroorganizmów innych niż badane szczepy endofityczne, wykorzystane do inokulacji roślin. Na podstawie oceny wrażliwości tych bakterii na różne antybiotyki i substancje o działaniu bakteriobójczym/grzybobójczym (gentamycyna, streptomycyna, kanamycyna, kwas nalidyksowy, chlorotalonil, cykloheksimid) ustalono, że badane szczepy bakteryjne charakteryzują się opornością na kwas nalidyksowy oraz chlorotalonil (*Methylobacterium* i *Methylorubrum*) lub kwas nalidyksowy oraz cykloheksimid (*Micromonospora*), co mogło stanowić czynnik selekcyjny przy hodowli bakterii z maceratów.

W przypadku fragmentów roślin inokulowanych szczepami z rodzajów *Methylobacterium* i *Methylorubrum*, tkanki roślinne macerowano w probówkach typu Eppendorf (dla każdego organu osobno) i rozcieńczano w płynie fizjologicznym (1:100); macerat roślinny

wysiewano w objętości 50 μl na podłoże 79CA z dodatkiem metanolu ($50 \text{ ml} \times \text{l}^{-1}$), chlorotalonilu ($400 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$) oraz kwasu nalidyksowego ($20 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$) oraz na podłoże AMS z dodatkiem chlorotalonilu ($400 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$) oraz kwasu nalidyksowego ($20 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$). Fragmenty roślin zaszczerpionych zawiesiną poszczególnych szczepów z rodzaju *Micromonospora* podobnie macerowano i rozcieńczano macerat (1:100), wykorzystując w tym celu jałową wodę destylowaną z dodatkiem fenolu (1,5 % w/v) i inkubowano 30 minut w temperaturze 30 °C (Hayakawa i in., 1991). Następnie, 50 μl mieszaniny wysiewano na podłoże SCA z dodatkiem metanolu ($50 \text{ ml} \times \text{l}^{-1}$), cykloheksimidu ($50 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$) oraz kwasu nalidyksowego ($20 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$).

3.2.6.7. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin koniczyny białej, uprawianych w zmodyfikowanym podłożu Hoaglanda

Zewnętrznie jałowe nasiona koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) odm. Grasslands Huia wysiewano na podłoże 79CA i inkubowano w temperaturze 20 °C przez dwa dni w celu pobudzenia kiełkowania. Uzyskane po tym czasie siewki koniczyny przenoszono jałowo do probówek o objętości 30 ml, na skosy agarowe ze zmodyfikowanym podłożem Hoaglanda i inokulowano zawiesiną wybranych szczepów endofitycznych ($\text{OD}_{600} = 0,2$ w podłożu płynnym Fahraeusa nanoszono na podłoże wokół pojedynczej siewki w objętości 0,5 ml na jedną roślinę). W doświadczeniu wykorzystano 20 roślin koniczyny białej na jeden szczep; dodatkowe 20 siewek pozostawiono bez inokulowania, jako próbę kontrolną. Rośliny uprawiano w komorze fitotronowej przez 40 dni. Po tym czasie mierzono i porównywano masę oraz długość części nadziemnej oraz korzeni.

3.2.6.8. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin, uprawianych w substracie torfowym zanieczyszczonym metalami ciężkimi

W doświadczeniu oceniono wpływ inokulacji roślin koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) odm. Grasslands Huia oraz rzepaku (*Brassica napus* L.) odm. Goliat zawiesinami bakterii endofitycznych na długość i masę części nadziemnych badanych roślin, uprawianych w substracie torfowym zanieczyszczonym jonami metali ciężkich. W tym celu rośliny (15 roślin koniczyny białej oraz 12 roślin rzepaku przeznaczono do inokulacji zawiesiną pojedynczego szczepu endofitycznego) uprawiano w podłożu zanieczyszczonym jonami

miedzi lub jonami arsenu inokulowano w 5 dniu od momentu siewu nasion zawiesinami wybranych szczepów endofitycznych (1 ml zawiesiny bakteryjnej, $OD_{600} = 0,2$ w podłożu płynnym Fahraeusa nanoszono na podłoże wokół pojedynczej siewki). Próbę kontrolną stanowiły rośliny nieinokulowane (do podłoża wokół roślin wprowadzono 1 ml jałowego podłoża Fahraeusa), uprawiane w podłożu niezanieczyszczonym (kontrola I), uprawiane w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi (kontrola II) lub uprawiane w podłożu zanieczyszczonym jonami arsenu (kontrola III), po 15 roślin koniczyny białej i 12 roślin rzepaku na każdy układ. Uprawę prowadzono w warunkach szklarniowych (koniczyna biała 45 dni, rzepak 40 dni). Po tym czasie rośliny usuwano, części nadziemne roślin ważono i mierzono.

3.2.6.9. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin, uprawianych w substracie torfowym zanieczyszczonym olejem napędowym

W doświadczeniu oceniono wpływ inokulacji roślin koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) odm. Grasslands Huia oraz rzepaku (*Brassica napus* L.) odm. Goliat zawiesinami bakterii endofitycznych na długość i masę części nadziemnych tych roślin. Rośliny uprawiano w podłożu zanieczyszczonym olejem napędowym (15 roślin koniczyny białej oraz 12 roślin rzepaku przeznaczono do inokulacji zawiesiną pojedynczego szczepu endofitycznego). Inokulację roślin przeprowadzono w 5 dniu od momentu siewu nasion zawiesinami wybranych szczepów endofitycznych (1 ml zawiesiny bakteryjnej, $OD_{600} = 0,2$ w podłożu płynnym Fahraeusa nanoszono na podłoże wokół pojedynczej siewki). Próbę kontrolną stanowiły rośliny nieinokulowane (w przypadku których do podłoża wokół rośliny wprowadzono 1 ml jałowego podłoża Fahraeusa), uprawiane w podłożu niezanieczyszczonym (kontrola I) lub uprawiane w podłożu zanieczyszczonym olejem napędowym (kontrola II), po 15 roślin koniczyny białej i 12 roślin rzepaku na każdy układ. Uprawę prowadzono w warunkach szklarniowych (koniczyna biała 45 dni, rzepak 40 dni). Po tym czasie rośliny usuwano, części nadziemne roślin ważono i mierzono.

3.2.7. Analizy statystyczne

Doświadczenia *in vitro*, wykonywane w ramach analizy fenotypowej i biochemicznej bakterii endofitycznych wykonywano w co najmniej 3 powtórzeniach; za końcowy wynik uznawano średnią z trzech powtórzeń, jeśli nie zaznaczono inaczej. Wyniki doświadczeń

roślinnych poddawano analizom statystycznym z wykorzystaniem oprogramowania Statistica (wersja 13). Ocenę istotności różnic pomiędzy średnimi wartościami w próbach badawczych oraz próbie kontrolnej stosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Różnice uznawano za istotne, jeśli zostały wykazane z ryzykiem popełnienia błędu I rodzaju mniejszym niż 5 % (poziom istotności $\alpha < 0,05$); wówczas stosowano odpowiednie testy *post hoc* (Stanisz, 2006).

4. WYNIKI

4.1. Izolacja bakterii endofitycznych z brodawek korzeniowych

Podczas izolacji bakterii z brodawek korzeniowych roślin należących do rodziny bobowate (podrozdział 3.1.1), oprócz typowych pod względem morfologii szczepów ryzobio-
wowych, wyizolowano szczepy o odmiennej strukturze kolonii (podrozdział 3.2.1.1). W ten sposób pozyskano pięćdziesiąt izolatów bakteryjnych, charakteryzujących się barwą o róż-
nych odcieniach koloru czerwonego/pomarańczowego, które ze względu na różnice w mor-
fologii kolonii, podzielono na dwie grupy. Grupę I stanowiło dziesięć izolatów, charaktery-
zujących się wzrostem w postaci niewielkich, lekko wypukłych, śluzowatych kolonii o za-
barwieniu od blad różowego do ciemnoczerwonego (Fig. 10A). Pozostałe czterdzieści izo-
latów (grupa II) tworzyło niewielkie, suche, wypukłe, i wrastające w podłoże kolonie o za-
barwieniu od jasnopomarańczowego do ciemnopomarańczowego (Fig. 10B), o charaktery-
stycznym dla promieniowców (*Actinobacteria*), zapachu „wilgotnej gleby”, związanym z
produkcją geosminy (1,10-dimetylo-9-dekalol).

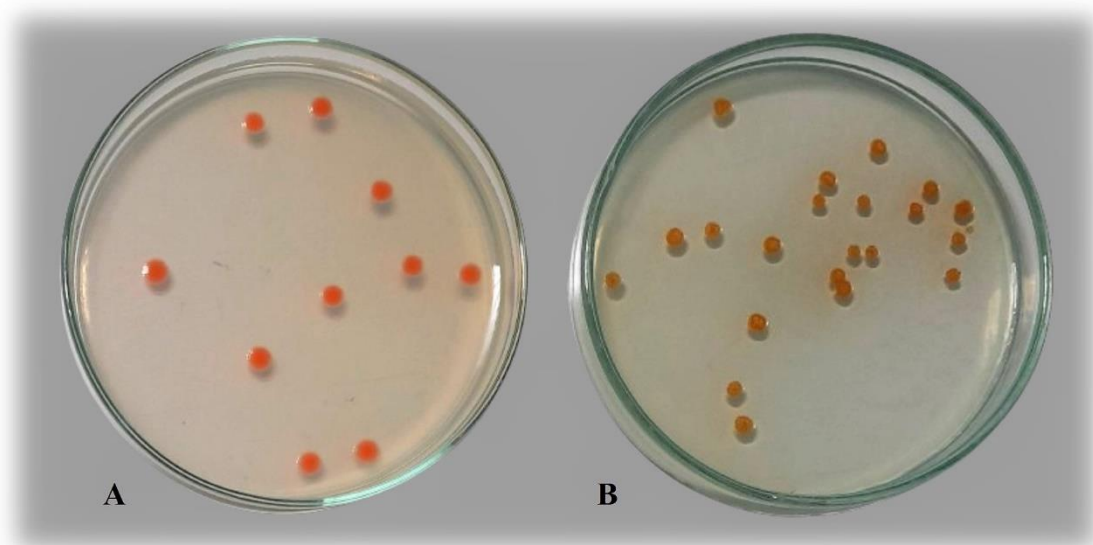


Fig. 10. Wzrost pojedynczych kolonii izolatów bakteryjnych na podłożu 79CA z dodatkiem meta-
nolu (1 % v/v); A) izolat Red Cyt, należący do grupy I; B) izolat 43, reprezentujący grupę II

4.2. Analiza genetyczna bakterii endofitycznych

4.2.1. Izolacja genomowego DNA izolatów bakteryjnych

Po uzyskaniu czystych kultur bakterii przeprowadzono procedurę izolacji genom-
owego DNA bakterii przy użyciu tiocyjanianu guanidyny (podrozdział 3.2.2.1). W przypadku
izolatów grupy II, opisana technika okazała się niewystarczająca ze względu na niewielką

wydajność metody. W związku z tym, metoda izolacji genomowego DNA została zmodyfikowana. W celu usunięcia ściany komórkowej bakterii, zastosowano enzym mutanolizynę, (N-acetylmuramidaza odpowiedzialna za hydrolizę występujących w ścianie komórkowej bakterii wiązań β -1,4-glikozydowych) oraz działający synergistycznie lizozym (podrozdział 3.2.2.1). Dalszą część procedury izolacji wykonano bez zmian, uzyskując materiał genetyczny dla wszystkich 50 izolatów, charakteryzujący się wysokim stopniem czystości (absorbancja przy długości fali 260nm/280nm pomiędzy 1,8 a 2,0) oraz stężeniem powyżej 100 ng \times ml⁻¹.

4.2.2. Genotypowanie izolatów metodą BOX-PCR

Analiza genetyczna techniką rep-PCR (metoda BOX-PCR) z wykorzystaniem startera Box-A1 (Tabela 6) pozwoliła, w oparciu o występujące w genomie bakteryjnym sekwencje powtórzone, na ustalenie zróżnicowania genomowego pięćdziesięciu badanych izolatów (podrozdział 3.2.2.2). W wyniku rozdziału elektroforetycznego uzyskanych produktów reakcji PCR, otrzymano obraz profili genomowych charakterystycznych dla poszczególnych izolatów. Wykorzystując metodę średnich połączeń (UPGMA, ang. *unweighted pair-group method using arithmetic averages*) w programie BIO1D v. 11.10 (Vilber-Lourmat) skonstruowano dendrogramy obrazujące stopień podobieństwa i zróżnicowanie genomowe analizowanych izolatów. Stwierdzono, że większość z izolatów charakteryzowała się niepowtarzalnymi wzorami genomowymi.

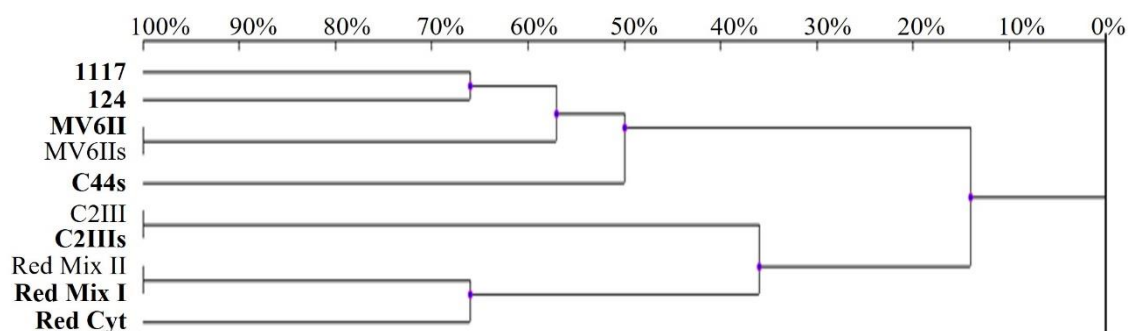


Fig. 11. Dendrogram przedstawiający zróżnicowanie wzorców genetycznych izolatów bakteryjnych należących do grupy I, uzyskanych metodą BOX-PCR. Do konstrukcji dendrogramu wykorzystano metodę UPGMA, przy 3 % współczynnika podobieństwa. Izolaty wyselekcjonowane do dalszych badań zaznaczono pogrubioną czcionką

Jak wykazano na dendrogramie (Fig. 11), izolaty I grupy utworzyły, przy współczynniku podobieństwa wynoszącym 15 %, dwie grupy (obydwie obejmowały po 5 izolatów). Zastosowanie metody BOX-PCR pozwoliło na uzyskanie 27 amplikonów DNA (średnio po 2-3 amplikony dla każdego izolatu), których wielkość mieściła się w zakresie od ok. 660 do 1680 pz. Stopień podobieństwa genomowego dla badanych izolatów grupy I wyniósł od 15 do 100 %.

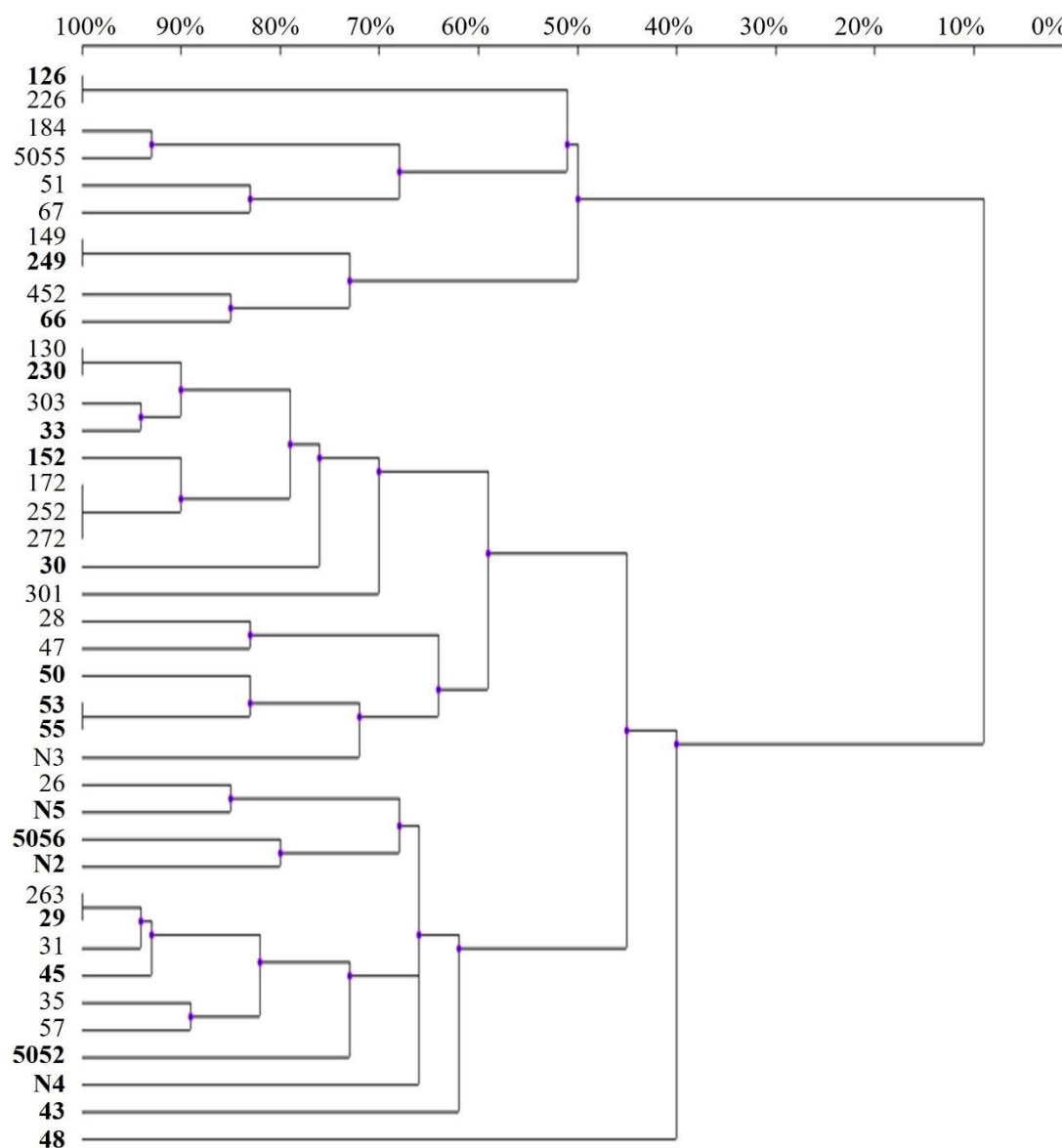


Fig. 12. Dendrogram przedstawiający zróżnicowanie wzorców genetycznych izolatów bakteryjnych należących do grupy II, uzyskanych metodą BOX-PCR. Do konstrukcji dendrogramu wykorzystano metodę UPGMA, przy 3 % współczynniku podobieństwa. Izolaty wyselekcjonowane do dalszych badań zaznaczono pogrubioną czcionką

W przypadku przedstawicieli II grupy również wyodrębniono dwie grupy (współczynnik podobieństwa 10 %) obejmujące 10 oraz 30 izolatów bakterii (Fig. 12). W wyniku zastosowanej metody BOX-PCR, uzyskano łącznie 216 amplikonów (średnio po 5-6 amplikonów dla każdego szczepu); ich wielkość mieściła się w granicach od ok. 310 do 1460 pz. Stopień podobieństwa genomowego izolatów wynosił od 10 do 100 %.

Wyniki wskazują, że izolaty I grupy reprezentują siedem różnych profili genetycznych, natomiast w obrębie II grupy można wyróżnić trzydzieści trzy różne profile genetyczne. Na podstawie analizy numerycznej stopnia podobieństwa badanych izolatów oraz cech morfologicznych kolonii bakteryjnych (m.in. zdolności do produkcji pigmentów dyfundujących w głąb podłoża), wybrano siedem różnych izolatów z grupy I oraz dziewiętnaście izolatów z grupy II, które poddano dalszym analizom.

4.2.3. Analiza filogenetyczna genu 16S rRNA

W celu określenia pokrewieństwa i relacji filogenetycznych badanych izolatów z innymi bakteriami, przeprowadzono amplifikację genu 16S rRNA z wykorzystaniem startów fD1d oraz rPl_a (podrozdział 3.2.2.3). Następnie przeprowadzono analizę porównawczą sekwencji genu 16S rRNA badanych bakterii oraz odpowiednich sekwencji tego genu, należących do szczepów referencyjnych dostępnych w bazie danych GenBank (podrozdział 3.2.2.11). W oparciu o stopień podobieństwa tych sekwencji, ustalony za pomocą programu komputerowego BioEdit 7.2, skonstruowano filogramy przedstawiające pokrewieństwo badanych izolatów bakteryjnych oraz szczepów referencyjnych. Drzewa filogenetyczne skonstruowano przy użyciu metody największej wiarygodności (ang. *Maximum Likelihood*), z zastosowaniem trójparametrycznego modelu Tamury i z uwzględnieniem rozkładu gamma oraz parametru „I” opisującego udział miejsc niezmiennych (Tamura, 1992); do oceny wiarygodności poszczególnych węzłów zastosowano analizę „bootstrap” (1000 powtórzeń). Uzyskane sekwencje zostały zdeponowane w bazie danych GenBank (numery akcesyjne sekwencji umieszczono na drzewach filogenetycznych, w nawiasach; dla izolatów grupy I – Fig. 13 oraz izolatów grupy II – Fig. 14).

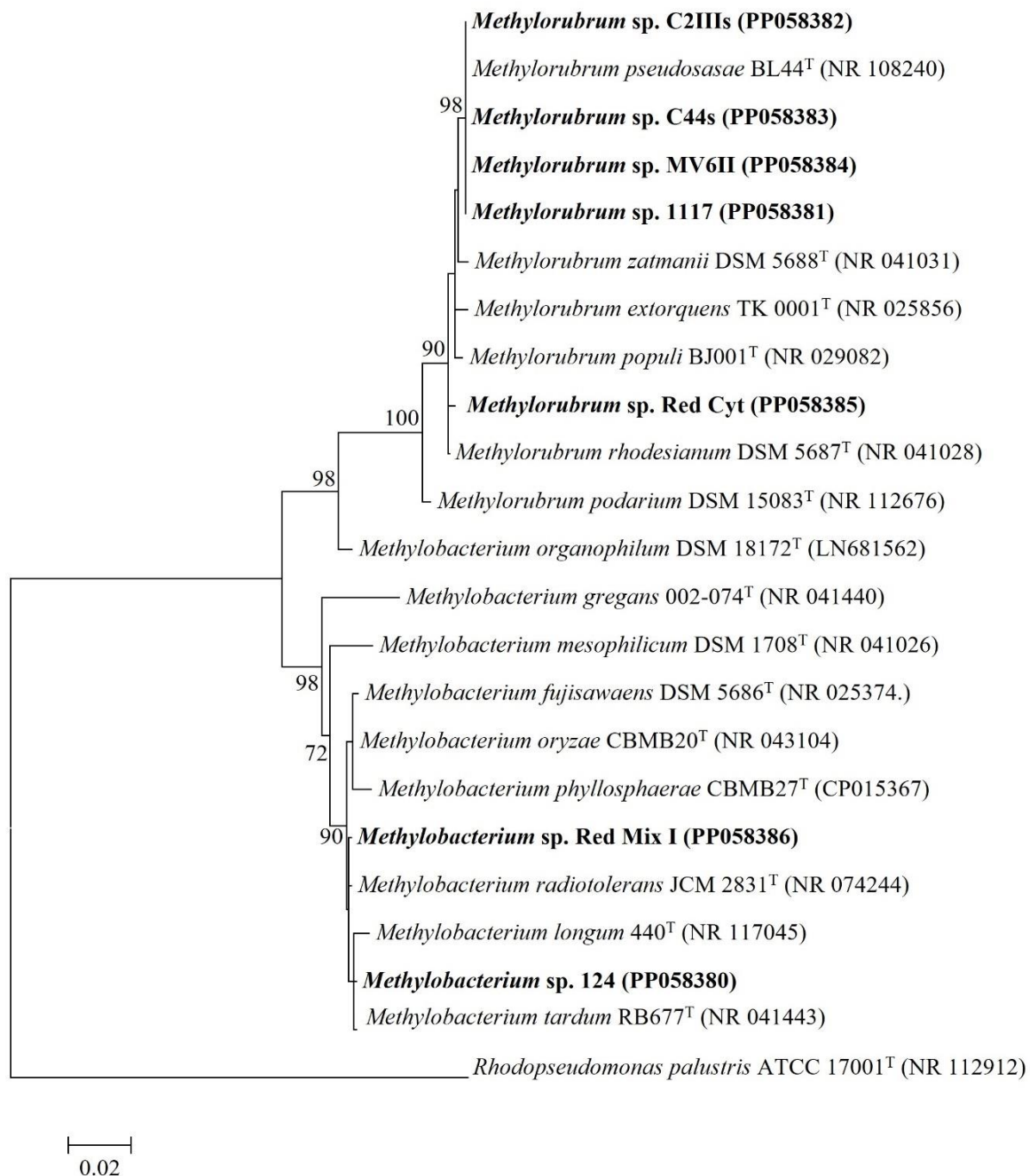


Fig. 13. Drzewo filogenetyczne dla genu 16S rRNA, skonstruowane w oparciu o 1330-nukleotydowe sekwencje siedmiu szczepów grupy I oraz sekwencje szczepów referencyjnych z bazy danych GenBank. Drzewo wykonane metodą największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), przy zastosowaniu trójparametrycznego modelu Tamury z uwzględnieniem rozkładu gamma oraz parametru „*r*” opisującego udział miejsc niezmiennych. Do oceny wiarygodności poszczególnych węzłów zastosowano analizę „bootstrap” (1000 powtórzeń). Jako grupę zewnętrzną wykorzystano referencyjny szczep *Rhodopseudomonas palustris* ATCC 17001^T

Analiza podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA badanych izolatów ze szczepami referencyjnymi z bazy danych GenBank wykazała, że najbliższym filogenetycznie rodzajem dla izolatów I grupy był rodzaj *Methylobacterium/Methylobacterium*. Izolaty 1117, C2III_s, C44_s oraz MV6II wykazały 100 % podobieństwo uzyskanych fragmentów sekwencji genu 16S rRNA do szczepu typowego reprezentującego gatunek *Methylobacterium pseudosasaie*, tworząc z nim wspólne grono przy współczynniku poparcia wynoszącym 98 % (Fig. 13). Izolat Red Cyt charakteryzował się 99,8 % podobieństwem sekwencji genu 16S rRNA do sekwencji szczepu referencyjnego *Methylobacterium rhodesianum*. Izolat Red Mix I wykazał największe podobieństwo sekwencji (99,8 %) do sekwencji genu 16S rRNA szczepu referencyjnego *Methylobacterium radiotolerans*, natomiast izolat 124, do sekwencji szczepu referencyjnego *Methylobacterium tardum* (99,8 %).

Stopień podobieństwa sekwencji genu kodującego 16S rRNA izolatów grupy I mieścił się w zakresie 94,6-100 %. Podobieństwo pomiędzy sekwencjami izolatów grupy I, a sekwencjami szczepów referencyjnych reprezentującymi rodzaj *Methylobacterium* wynosiło od 94,6 do 99,8 %, natomiast podobieństwo pomiędzy sekwencjami grupy I a sekwencjami szczepów referencyjnych reprezentującymi rodzaj *Methylobacterium* – od 94,7 do 99,8 %.

W wyniku przeprowadzonej analizy porównawczej sekwencji genu 16S rRNA izolatów grupy II oraz sekwencji genu 16S rRNA szczepów referencyjnych, pozyskanych z bazy GenBank (Fig. 14) wykazano, że najbliższym filogenetycznie rodzajem w stosunku do izolatów tej grupy był rodzaj *Micromonospora*. Izolaty 29, 30, 33, 45, 66, 126, 230 oraz 249 wykazały 99,9 % podobieństwo sekwencji badanego genu do sekwencji szczepów referencyjnych *Micromonospora chokoriensis* oraz *Micromonospora inaquosa*. Izolat 152 zgrupował się z referencyjnym szczepem *M. inaquosa* przy współczynniku poparcia wynoszącym 61 %, wykazując 100 % podobieństwo sekwencji genu 16S rRNA do tego gatunku. Izolat 43 wykazał 100 % podobieństwo sekwencji badanego genu do sekwencji szczepu referencyjnego *M. chokoriensis*, natomiast izolat N2 charakteryzował się 99,8 % podobieństwem sekwencji do sekwencji gatunków *M. chokoriensis* oraz *M. inaquosa*. Izolat 5052 utworzył na filogramie (Fig. 14) wspólny kład wraz ze szczepami referencyjnymi *Micromonospora lupini*, *Micromonospora parathelypteridis* oraz *Micromonospora luteifusca*, natomiast izolaty 50, 53 i 55 wykazały 100 % podobieństwo sekwencji do sekwencji genu 16S rRNA szczepu referencyjnego *M. alfalfae*.

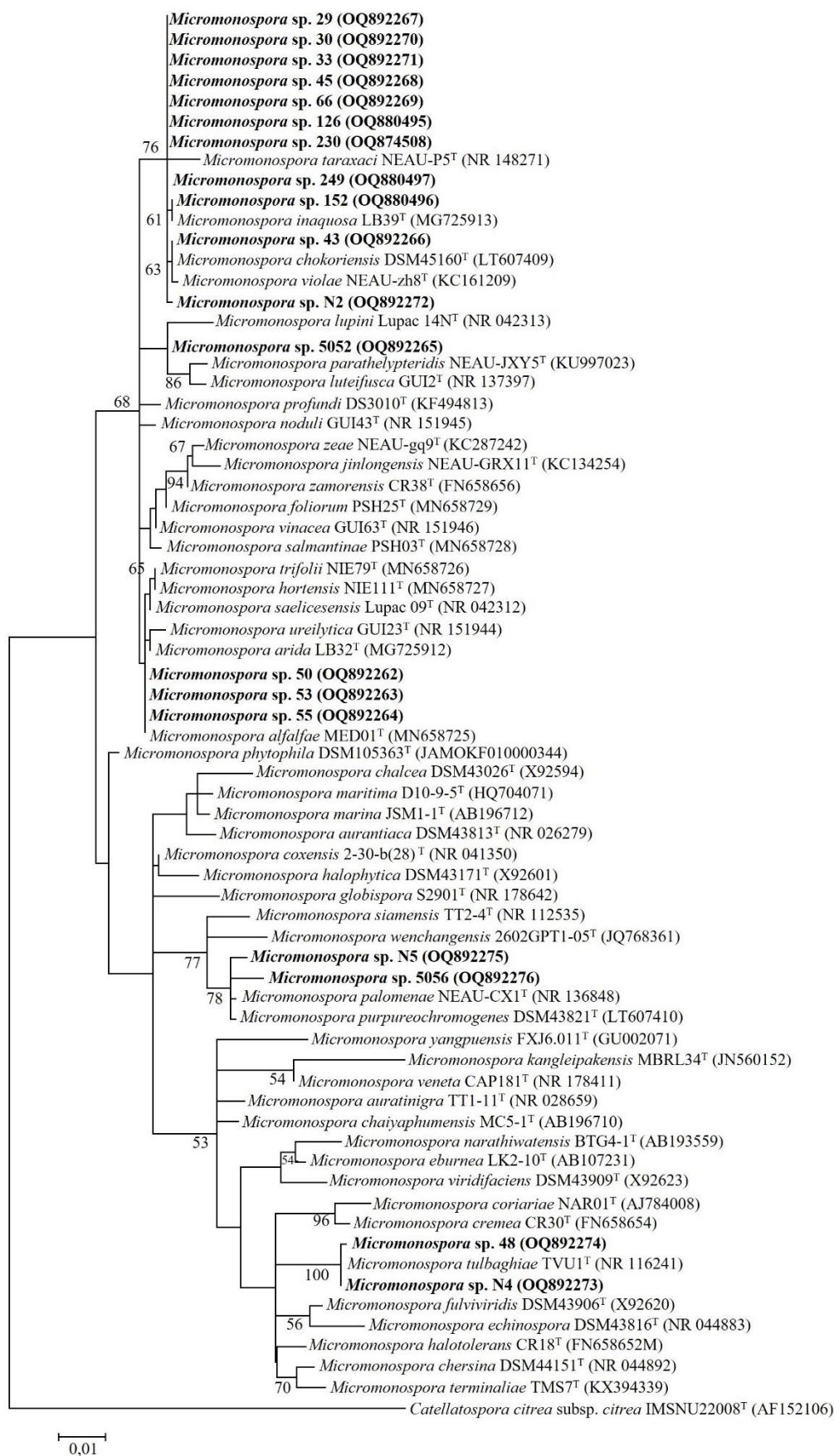


Fig. 14. Drzewo filogenetyczne dla genu 16S rDNA, skonstruowane w oparciu o 1298-nukleotydowe sekwencje dziewiętnastu szczepów grupy II oraz sekwencje szczepów referencyjnych z bazy

danych GenBank. Filogram wykonany metodą największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), przy zastosowaniu trójparametrycznego modelu Tamury z uwzględnieniem rozkładu gamma oraz parametru „I” opisującego udział miejsc niezmiennych (Tamura, 1992). Do oceny wiarygodności poszczególnych węzłów zastosowano analizę „bootstrap” (1000 powtórzeń). Jako grupę zewnętrzną wykorzystano szczep referencyjny *Catellatospora citrea* subsp. *citrea* IMSNU22008^T

Izolaty N5 oraz 5056 wykazały 99,6 % stopień podobieństwa sekwencji do sekwencji szczepu referencyjnego *Micromonospora palomenae* oraz odpowiednio 99,6 % oraz 99,4 % podobieństwo do sekwencji gatunku *M. purpureochromogenes*. Izolaty 48 oraz N4 zgrupowały się z referencyjnym szczepem *Micromonospora tulbaghia*, przy współczynniku poparcia 100 %, wykazując odpowiednio 99,9 % oraz 100 % podobieństwo sekwencji genu 16S rRNA do sekwencji gatunku *M. tulbaghia*.

Stopień podobieństwa sekwencji pomiędzy izolatami grupy II mieścił się w zakresie 97,1-100 %, natomiast podobieństwo sekwencji pomiędzy izolatami grupy II a sekwencjami genu 16S rRNA szczepów referencyjnych z rodzaju *Micromonospora* wynosiło od 99,6 % do 100 %.

4.2.4. Analiza filogenetyczna wybranych genów rdzeniowych (*recA*, *gyrB*, *rpoB*, *atpD*)

W celu określenia stopnia pokrewieństwa filogenetycznego oraz potwierdzenia przynależności taksonomicznej badanych izolatów do bakterii rodzaju *Methylobacterium*/*Methylorubrum* oraz *Micromonospora* wykonano wielolokusową analizę sekwencji czterech genów metabolizmu podstawowego (MLSA, ang. *multilocus sequence analysis*) (podrozdział 3.2.2.12). Sekwencje połączono w kolejności: *recA*, *gyrB*, *rpoB*, *atpD*, uzyskując konstrukt o długości 2396 pz dla izolatów grupy I oraz 2620 pz dla izolatów grupy II. Uzyskane dla pojedynczych genów sekwencje zostały zdeponowane w bazie danych GenBank (numery akcesyjne sekwencji umieszczono na drzewach filogenetycznych, w nawiasach, w kolejności *recA-gyrB-rpoB-atpD*). Przy zastosowaniu metody największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*) oraz modelu odwracalnego w czasie (GTR, ang. *general time reversible*) (Nei i Kumar, 2000) utworzono drzewa filogenetyczne dla połączonych sekwencji genów izolatów grupy I (Fig. 15) oraz II (Fig. 16).

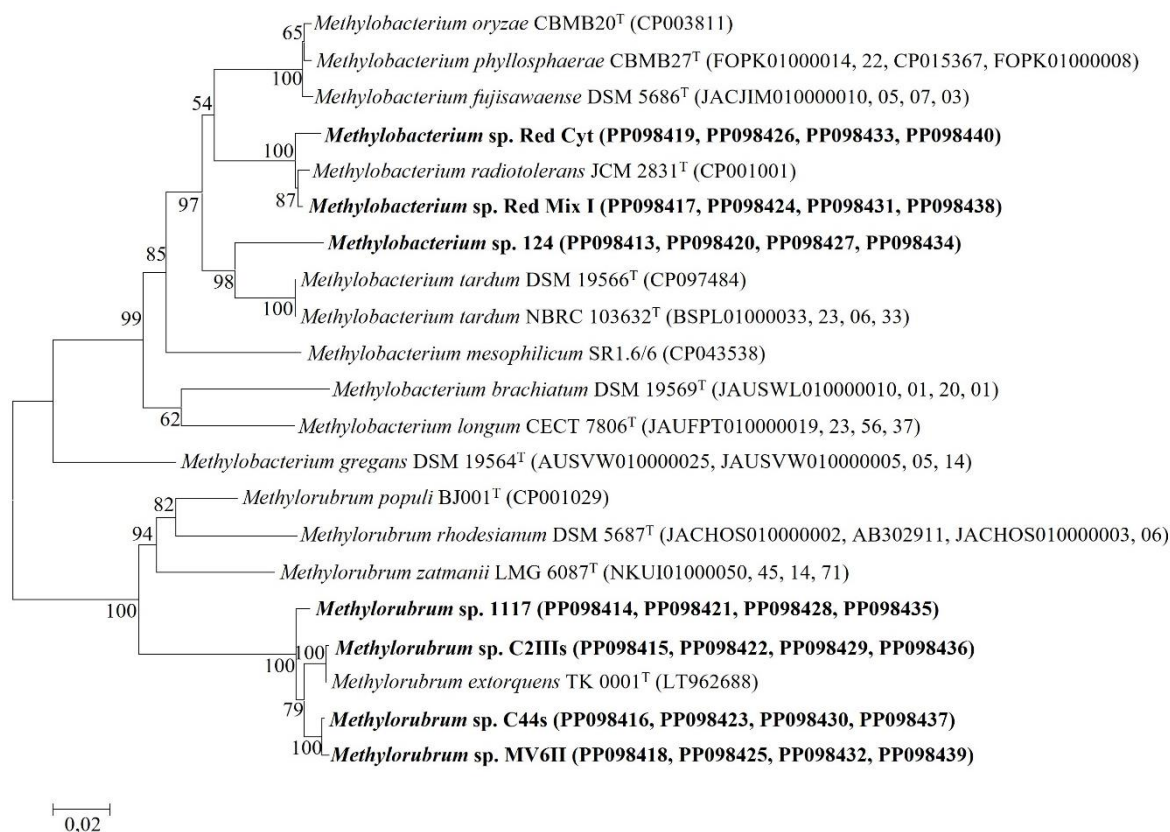


Fig. 15. Drzewo filogenetyczne utworzone w oparciu o wyniki wielolokusowej analizy sekwencji genów metabolizmu podstawowego (MLSA), skonstruowane w oparciu o 2396-nukleotydową sekwencję połączonych genów *recA*, *gyrB*, *rpoB* i *atpD* siedmiu szczepów grupy I oraz szczepów referencyjnych z bazy GenBank. Filogram został wykonany metodą największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), przy zastosowaniu modelu odwracalnego w czasie (GTR) z uwzględnieniem rozkładu gamma oraz parametru „*F*” opisującego udział miejsc niezmiennych. Do oceny wiarygodności poszczególnych węzłów zastosowano analizę „bootstrap” (1000 powtórzeń)

W wyniku przeprowadzonej analizy MLSA wykazano, że badane izolaty grupy I charakteryzują się największym podobieństwem sekwencji do sekwencji różnych gatunków należących do rodzajów *Methylobacterium* oraz *Methylorubrum*. Izolat Red Cyt charakteryzował się największym stopniem podobieństwa sekwencji (98,7 %) do sekwencji szczepu referencyjnego *Methylobacterium radiotolerans*. Z kolei izolat Red Mix I, wykazujący podobieństwo sekwencji do sekwencji *M. radiotolerans* na poziomie 99,4 %, utworzył z tym szczepem wspólne grono (Fig. 15), przy współczynniku poparcia równym 87 %. Izolat 124 wykazał 95,5 % podobieństwo sekwencji do sekwencji szczepów referencyjnych należących do gatunku *Methylobacterium tardum*. Izolaty 1117 oraz C2IIIIs cechowały się podobieństwem sekwencji do sekwencji referencyjnego szczepu *Methylorubrum extorquens*, odpowiednio na poziomie 98,4 % i 99,9 %. Izolaty C44s oraz MV6II, tworzące wspólne grono

przy współczynniku poparcia 100 %, charakteryzowały się odpowiednio 98,5 % oraz 98,3 % stopniem podobieństwa sekwencji do szczepu referencyjnego *M. extorquens*.

Na podstawie analizy MLSA potwierdzono, że izolaty grupy II wykazują największe podobieństwo sekwencji do sekwencji rodzaju *Micromonospora*. Izolaty: 50, 53 i 55 utworzyły na filogramie wspólne grono (Fig. 16) przy współczynniku poparcia wynoszącym 100 %; izolaty te charakteryzowały się podobieństwem sekwencji do sekwencji szczepu referencyjnego *Micromonospora alfalfae* na poziomie 99,1 %. Izolat 5052 utworzył na filogramie wspólne grono z referencyjnym szczepem *M. lupini*, wykazując podobieństwo sekwencji do sekwencji *M. lupini* na poziomie 98,5 %. Izolat 43 wykazał najwyższy stopień podobieństwa sekwencji do sekwencji szczepu referencyjnego *Micromonospora violae*, wynoszący 97 %, natomiast izolaty 249, 29, 45, 66, 126 utworzyły wspólne grono przy współczynniku poparcia 100 %, wykazując podobieństwo sekwencji do sekwencji *M. violae* na poziomie 97,4 %. Izolaty N2, 152, 30, 33, 230 utworzyły wspólną grupę przy współczynniku poparcia wynoszącym 100 %. Wykazały one największe podobieństwo sekwencji nukleotydowej połączonych genów *recA*, *gyrB*, *rpoB* i *atpD* do referencyjnego szczepu *Micromonospora inaquosa* (w zakresie od 97,3 % do 97,8 %). Izolat 5056 utworzył z referencyjnym szczepem *Micromonospora purpureochromogenes* wspólne grono, przy współczynniku poparcia 99 %, wykazując podobieństwo sekwencji do sekwencji *M. purpureochromogenes* na poziomie 98,8 %, natomiast izolat N5, charakteryzował się 97,6 % podobieństwem sekwencji do sekwencji *M. purpureochromogenes*. Izolaty 48 i N4 zgrupowały się ze szczepem referencyjnym *Micromonospora tulbaghiaie* (współczynnik poparcia 100 %). Izolaty te charakteryzowały się podobieństwem sekwencji do sekwencji *M. tulbaghiaie*, odpowiednio na poziomie 99,5 % oraz 99,1 %.

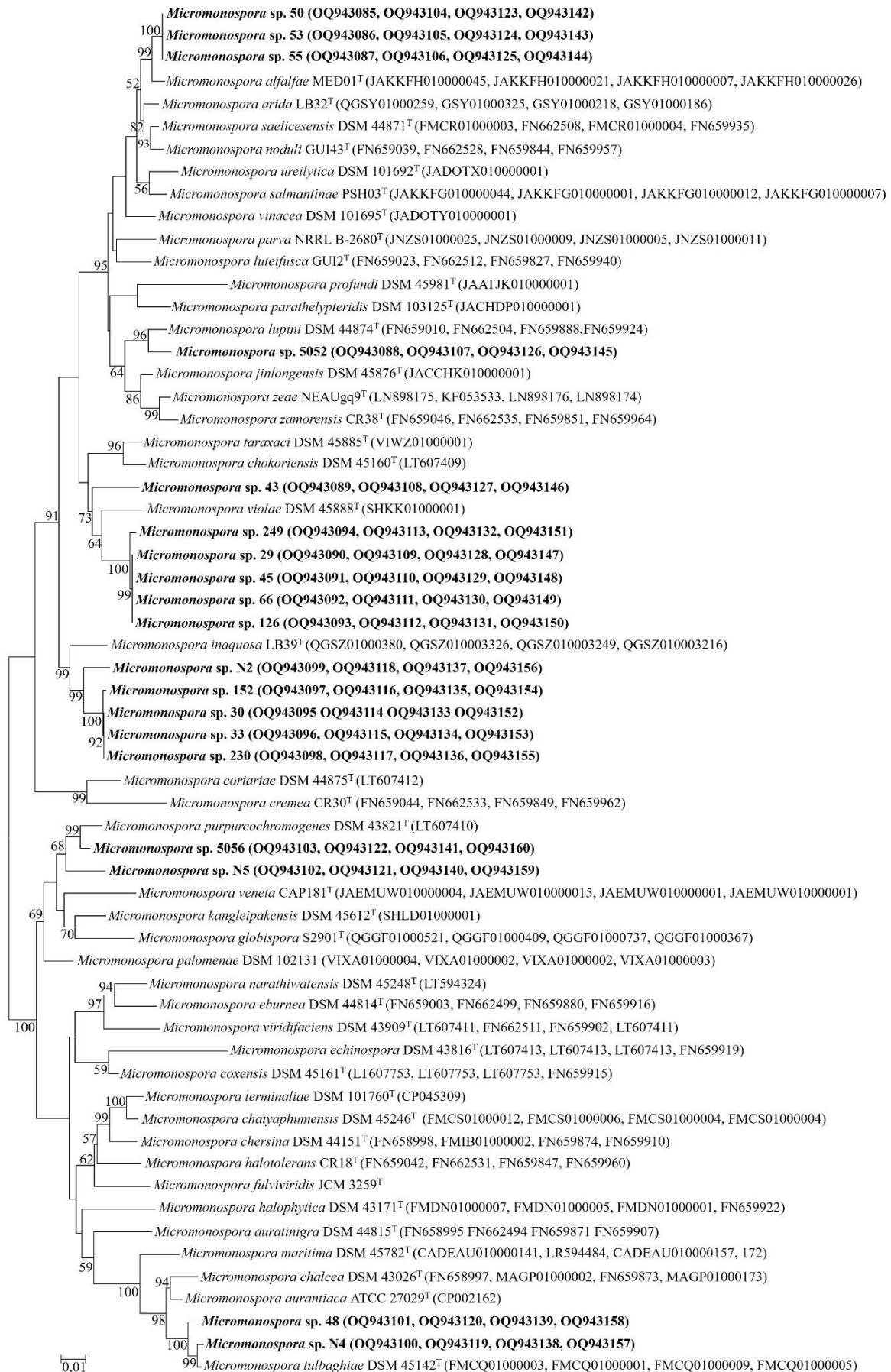


Fig. 16. Drzewo filogenetyczne przedstawiające wyniki wielolokusowej analizy sekwencji genów metabolizmu podstawowego (MLSA), skonstruowane w oparciu o 2620-nukleotydową sekwencję połączonych genów *recA*, *gyrB*, *rpoB* i *atpD* dziewiętnastu szczepów grupy II oraz szczepów referencyjnych z bazy GenBank. Drzewo wykonane metodą największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), przy zastosowaniu modelu odwracalnego w czasie (GTR) z uwzględnieniem rozkładu gamma oraz parametru „*I*” opisującego udział miejsc niezmiennych. Do oceny wiarygodności poszczególnych węzłów zastosowano analizę „bootstrap” (1000 powtórzeń)

4.2.5. Detekcja i analiza genetyczna genu *mxoF* u bakterii z rodzajów *Methylobacterium* i *Methylorubrum*

Gen *mxoF* koduje większą podjednostkę dehydrogenazy metanolowej, enzymu uczestniczącego w procesie wykorzystywania metanolu jako źródła węgla i energii. Wysoce konserwatywny gen *mxoF* stosuje się jako marker genetyczny, pomocny w określeniu relacji filogenetycznych między bakteriami należącymi do grupy metylotrofów (Lau i in., 2013).

W wyniku przeprowadzonej amplifikacji techniką PCR (podrozdział 3.2.2.5) wykazano obecność genu *mxoF* w genomach wszystkich badanych szczepów grupy I. Na podstawie sekwencji badanego genu szczepów grupy I oraz odpowiednich sekwencji szczepów referencyjnych pozyskanych z bazy GenBank (podrozdział 3.2.2.13), skonstruowano filogram dla genu *mxoF* (Fig. 17). Uzyskane sekwencje genu *mxoF* badanych szczepów zdeponowano w bazie danych GenBank (numery akcesyjne sekwencji umieszczono na filogramie, w nawiasach). Stopień podobieństwa sekwencji genu *mxoF* badanych szczepów między sobą mieścił się w granicach od 92 % do 100 %, natomiast w stosunku do sekwencji genu *mxoF* szczepów referencyjnych – w granicach 99,4-100 %.

Na drzewie filogenetycznym dla genu *mxoF*, badane szczepy zgrupowały się w dwa kłady (Fig. 17). W pierwszej grupie znalazły się szczepy *Methylorubrum* sp. MV6II, C44s, 1117, C2IIIIs oraz *Methylobacterium* sp. 124 wraz ze szczepami referencyjnymi reprezentującymi gatunki *M. pseudosasaе*, *M. extorquens* oraz *M. zatmanii*, przy współczynniku poparcia 82 %. Szczepy *Methylorubrum* sp. MV6II oraz C44s utworzyły wspólne grono z referencyjnym szczepem *Methylorubrum pseudosasaе* (współczynnik poparcia 80 %), natomiast *Methylorubrum* sp. C2IIIIs utworzył wspólne grono z referencyjnymi szczepami *Methylorubrum extorquens* oraz *Methylorubrum zatmanii*, przy współczynniku poparcia 89 %. Należące do drugiego kładu szczepy *Methylobacterium* sp. Red Cyt oraz *Methylobacterium*

sp. Red Mix I utworzyły wspólne grono z referencyjnym szczepem *Methylobacterium radiotolerans* oraz gatunkami *Methylobacterium mesophilicum* oraz *Methylobacterium organophilum* (współczynnik poparcia 97 %).

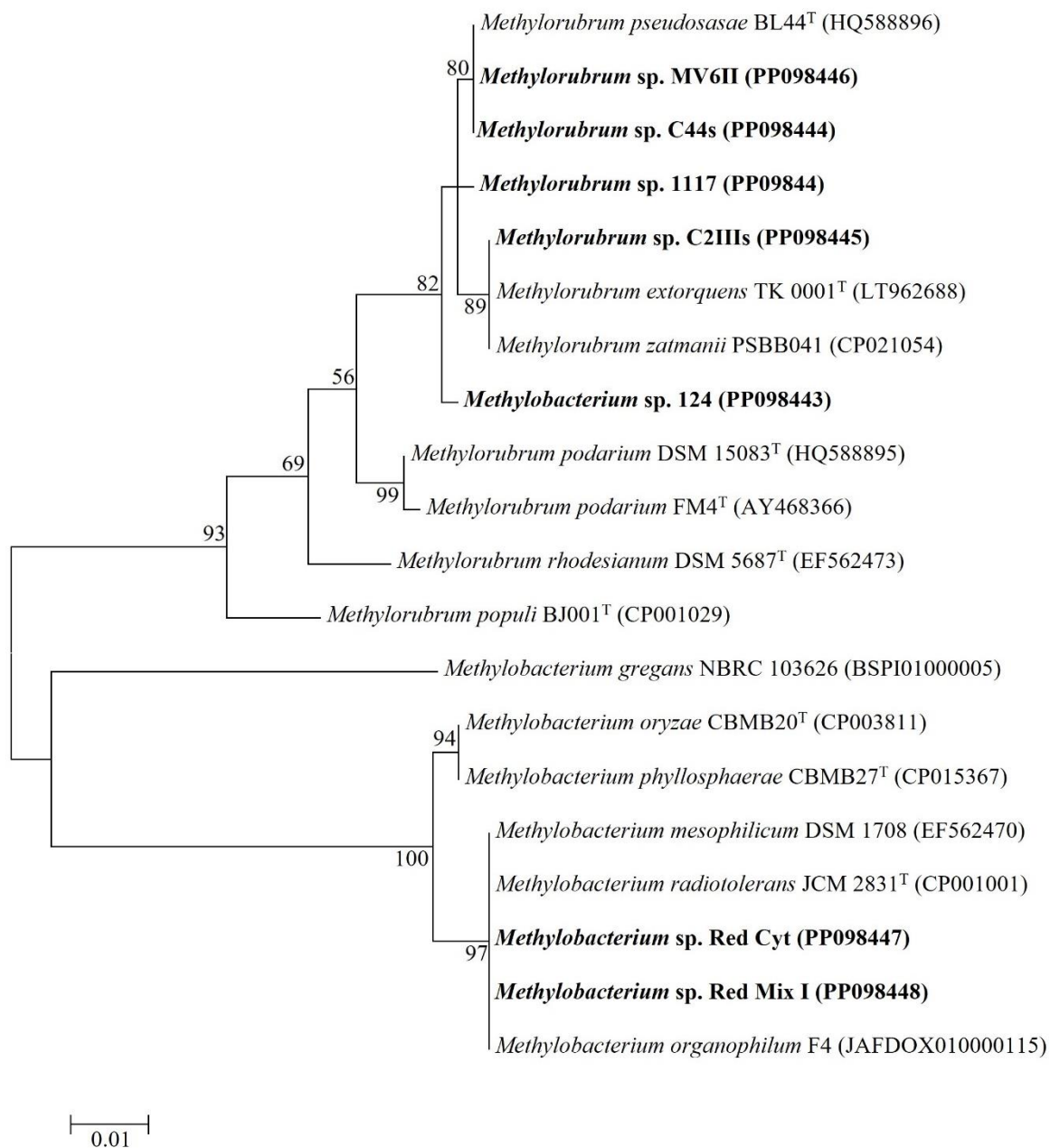


Fig. 17. Drzewo filogenetyczne przedstawiające wyniki analizy sekwencji genu *mxoF*, skonstruowane w oparciu o 514-nukleotydowe fragmenty sekwencji siedmiu badanych szczepów bakteryjnych oraz sekwencje szczepów referencyjnych z bazy danych GenBank. Filogram wykonany metodą największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), przy zastosowaniu trójparametrycznego modelu Tamury z uwzględnieniem rozkładu gamma. Do oceny wiarygodności poszczególnych węzłów zastosowano analizę „bootstrap” (1000 powtórzeń)

Sekwencje szczepów *Methylobacterium* sp. Red Cyt oraz *Methylobacterium* sp. Red Mix I charakteryzowały się najwyższym stopniem podobieństwa do sekwencji szczepu referencyjnego *Methylobacterium radiotolerans* oraz odpowiednich sekwencji gatunków *Methylobacterium mesophilicum* oraz *Methylobacterium organophilum* (100 %). Szczep *Methylobacterium* sp. C2III wykazał największe podobieństwo sekwencji genu *mxoF* (100 %) do odpowiedniej sekwencji gatunku *Methylobacterium extorquens*. Szczepy *Methylobacterium* sp. MV6II oraz *Methylobacterium* sp. C44s wykazały największe podobieństwo sekwencji w stosunku do odpowiednich sekwencji referencyjnego szczepu *Methylobacterium pseudosasaie* (100 %), natomiast szczepy *Methylobacterium* sp. 124 oraz *Methylobacterium* sp. 1117, charakteryzowały się odpowiednio 99,4 % i 99,6 % podobieństwem sekwencji badanego genu do sekwencji szczepu *Methylobacterium pseudosasaie*.

4.2.6. Detekcja i analiza genetyczna wybranych genów związanych ze zdolnością bakterii do realizowania mechanizmów promowania wzrostu roślin

Bazując na dostępnych źródłach literaturowych, populację badanych bakterii poddano analizie w kierunku występowania w genomach tych szczepów genów związanych ze zdolnością bakterii do realizowania mechanizmów promowania wzrostu roślin, charakterystycznych dla danych grup (rodzajów) bakterii (podrozdział 3.2.2.6). Pozyskane sekwencje genów zdeponowano w bazie danych GenBank (numery akcesyjne sekwencji umieszczono na drzewach filogenetycznych, w nawiasach).

Gen *nifH* – *Methylobacterium*/*Methylobacterium*

Gen *nifH* koduje tzw. białko *Fe*, stanowiące podjednostkę enzymu nitrogenazy. Jednocześnie, gen *nifH* jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych markerów genetycznych, umożliwiających identyfikację bakterii o potencjalnych zdolnościach do wiązania azotu atmosferycznego (Gaby i Buckley, 2012). W wyniku przeprowadzonej reakcji amplifikacji z użyciem starterów *nifH-F* oraz *nifH-R* (Tabela 6), uzyskano sekwencję o wielkości 239 pz jedynie dla jednego z analizowanych szczepów, tj. *Methylobacterium* sp. Red Cyt. Na podstawie pozyskanej sekwencji oraz odpowiednich sekwencji dostępnych w bazie danych GenBank skonstruowano drzewo filogenetyczne, wykorzystując metodę największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), przy zastosowaniu trójparametrycznego modelu Tamury (Fig. 18).

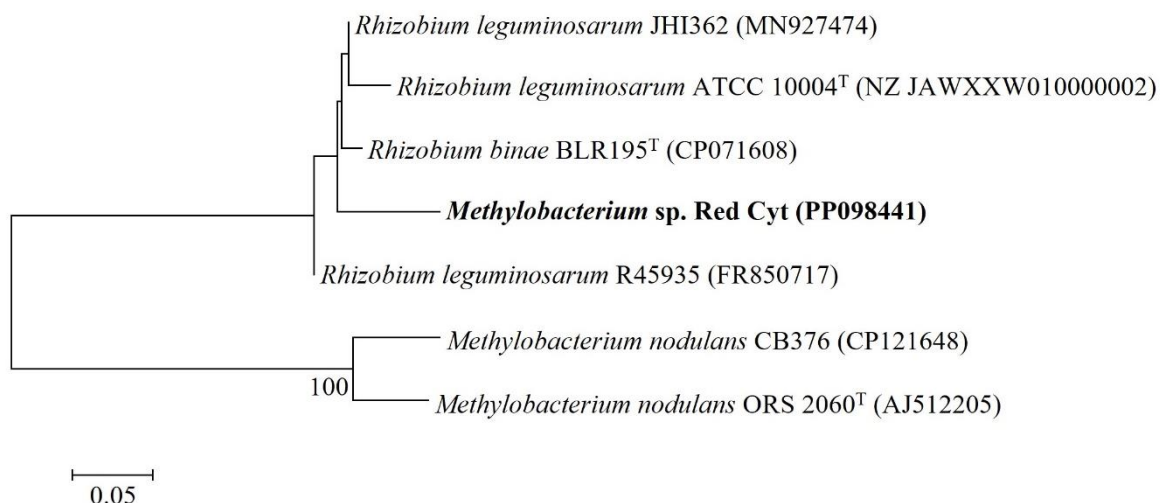


Fig. 18. Drzewo filogenetyczne przedstawiające wyniki analizy sekwencji genu *nifH*, skonstruowane w oparciu o 239-nukleotydowe fragmenty sekwencji szczepu *Methylobacterium* sp. Red Cyt oraz sekwencje sześciu szczepów referencyjnych z bazy danych GenBank, wykonane metodą największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), przy zastosowaniu trójparametrycznego modelu Tamury z uwzględnieniem rozkładu gamma. Do oceny wiarygodności poszczególnych węzłów zastosowano analizę „bootstrap” (1000 powtórzeń)

Analiza porównawcza sekwencji genu *nifH* wykazała podobieństwo badanego genu szczepu *Methylobacterium* sp. Red Cyt do odpowiednich genów szczepów gatunku *Rhizobium leguminosarum* (stopień podobieństwa 93,3-93,7 %) oraz *Rhizobium binae* (92,8 %). Wysoki stopień podobieństwa sekwencji genu *nifH* badanego izolatu do genów bakterii rodzaju *Rhizobium* może świadczyć o horyzontalnym transferze tego genu z bakterii rodzaju *Rhizobium* do *Methylobacterium* sp. Red Cyt. Ponieważ w obrębie rodzaju *Methylobacterium* występują gatunki o potwierdzonej zdolności do wiązania azotu atmosferycznego (m.in. *Methylobacterium nodulans*), dlatego do analizy włączono szczepy referencyjne należące do tego gatunku. Sekwencja genu *nifH* szczepu *Methylobacterium* sp. Red Cyt charakteryzowała się podobieństwem do sekwencji tego genu referencyjnych szczepów *M. nodulans* na poziomie 76,1 %.

W przypadku szczepu *Methylorubrum* sp. C2III_s, pomimo pozytywnego wyniku amplifikacji i wielu podjętych prób sekwencjonowania, odczytane sekwencje nukleotydowe genu *nifH* wykazały niską jakość, która uniemożliwiała włączenie ich do dalszych etapów analizy filogenetycznej.

Gen *acdS* – *Methylobacterium*/*Methylorubrum*

Obecność w genomie bakterii genu *acdS*, kodującego deaminazę ACC, wskazuje na potencjał danego szczepu do zwiększania tolerancji rośliny na działanie stresorów biotycznych i abiotycznych (Gontia-Mishra i in., 2014). W wyniku przeprowadzonych reakcji PCR z wykorzystaniem starterów ACCMet1f oraz ACCMet2r (Tabela 6), uzyskano produkty amplifikacji o oczekiwanej wielkości dla wszystkich izolatów reprezentujących grupę I. W przypadku 5 szczepów uzyskano satysfakcjonujące odczyty fragmentów sekwencji, o długości 140 pz.

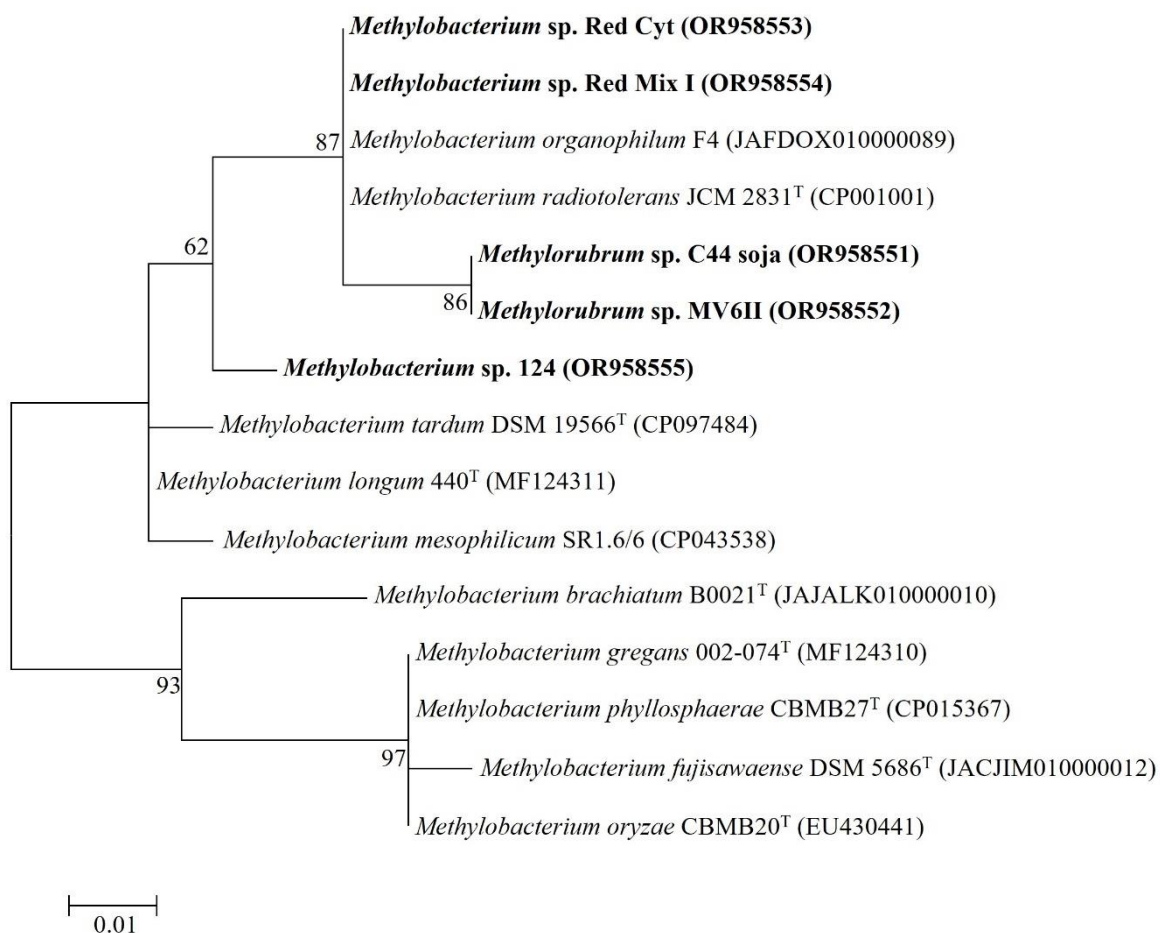


Fig. 19. Drzewo filogenetyczne przedstawiające wyniki analizy sekwencji genu *acdS*, skonstruowane w oparciu o 140-nukleotydowe fragmenty sekwencji pięciu badanych szczepów bakteryjnych oraz dziesięciu sekwencji nukleotydowych, pozyskanych z bazy GenBank. Filogram wykonany metodą największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), przy zastosowaniu trójparametrycznego modelu Tamury oraz analizy „bootstrap” (1000 powtórzeń)

Na podstawie podobieństwa sekwencji genu *acdS* badanych szczepów oraz pozyskanych z bazy GenBank sekwencji tego genu szczepów referencyjnych, skonstruowano filogram, wykonany metodą największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), przy zastosowaniu trójparametrycznego modelu Tamury (Fig. 19). Wykazano, że podobieństwo sekwencji genu *acdS* pomiędzy badanymi szczepami wynosiło od 96,4 % do 100 %, natomiast stopień podobieństwa tych sekwencji względem sekwencji szczepów referencyjnych wynosił od 98,5 % do 100 %. Wszystkie badane szczepy zgrupowały się w jednym kładzie, razem z referencyjnym szczepem *Methylobacterium radiotolerans* oraz gatunkiem *Methylobacterium organophilum*, przy współczynniku poparcia 62 %. Stopień podobieństwa sekwencji badanych szczepów do sekwencji *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831^T oraz *Methylobacterium organophilum* F4, zawierał się w przedziale od 98,5 % do 100 %.

Gen NRPS – *Micromonospora*

Gen *NRPS* (ang. *nonribosomal peptide synthetase*) koduje syntetazy peptydów nierybosomalnych, związanych z produkcją metabolitów wtórnych (Kouadri i in., 2014). W wyniku reakcji PCR z wykorzystaniem starterów A3 i A7R (Tabela 6), potwierdzono obecność badanego genu w genomach czterech szczepów grupy II: *Micromonospora* sp. 30, *Micromonospora* sp. 33, *Micromonospora* sp. 230 oraz *Micromonospora* sp. 152. Na podstawie podobieństwa uzyskanych odczytów sekwencji genu *NRPS* oraz sekwencji tego genu szczepów referencyjnych, skonstruowano drzewo filogenetyczne, wykonane metodą największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), przy zastosowaniu trójparametrycznego modelu Tamury (Fig. 20).

Sekwencje genu *NRPS* szczepów *Micromonospora* sp. 30, *Micromonospora* sp. 33, *Micromonospora* sp. 230 oraz *Micromonospora* sp. 152 charakteryzowały się podobieństwem na poziomie od 99,1 % do 100 %, natomiast w stosunku do umieszczonych na filogramie szczepów referencyjnych, podobieństwo sekwencji tego genu do sekwencji badanych szczepów referencyjnych wyniosło od 97,2 % do 98,4 %. Badane szczepy utworzyły na filogramie wspólną grupę, przy współczynniku poparcia 99 % (Fig. 20), wykazując najwyższy stopień podobieństwa sekwencji badanego genu do sekwencji genu szczepu referencyjnego *Micromonospora noduli* (97,9-98,4 %).

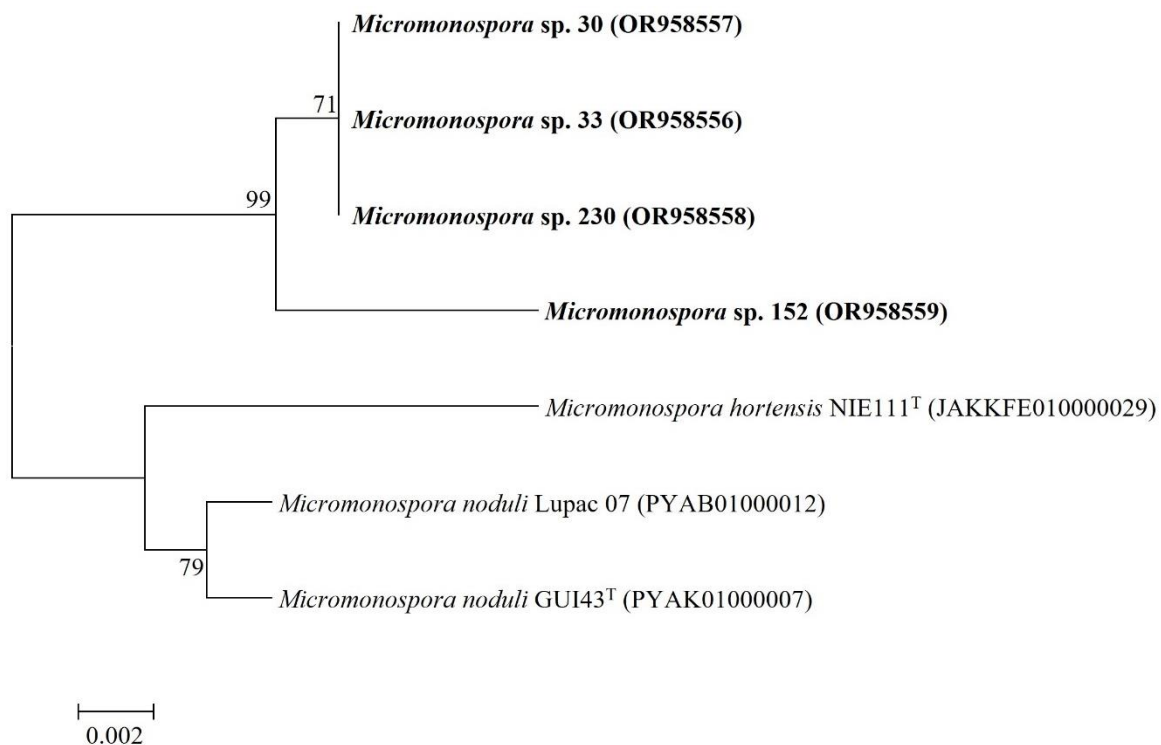


Fig. 20. Drzewo filogenetyczne przedstawiające wyniki analizy sekwencji genu *NRPS*, skonstruowane w oparciu o 596-nukleotydowe fragmenty sekwencji genu *NRPS* czterech badanych szczepów oraz sekwencje szczepów referencyjnych z bazy danych GenBank. Filogram wykonany metodą największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), przy zastosowaniu trójparametrycznego modelu Tamury oraz analizy „bootstrap” (1000 powtórzeń)

Gen *PKS I* – *Micromonospora*

Gen *PKS I* koduje syntazy poliketydowe typu I, związane m.in. z biosyntezą poliketydów niearomatycznych, stanowiących ważną grupę metabolitów wtórnych (Kouadri i in., 2014). Na podstawie przeprowadzonych reakcji PCR (z wykorzystaniem starterów K1 i M6R, Tabela 6) wykazano, że cztery spośród dziewiętnastu szczepów grupy II: *Micromonospora* sp. N5, *Micromonospora* sp. 5056, *Micromonospora* sp. N2 oraz *Micromonospora* sp. 5052, charakteryzują się obecnością genu *PKS* typu I w genomie, występującego w badanej populacji grupy II w dwóch różnych allelach. Na podstawie analizy podobieństwa sekwencji alleli genu *PKS I* badanych szczepów oraz pozyskanych z bazy GenBank sekwencji tego genu szczepów referencyjnych, wykonano drzewo filogenetyczne (Fig. 21) metodą największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), przy zastosowaniu trójparametrycznego modelu Tamury i z uwzględnieniem rozkładu gamma.

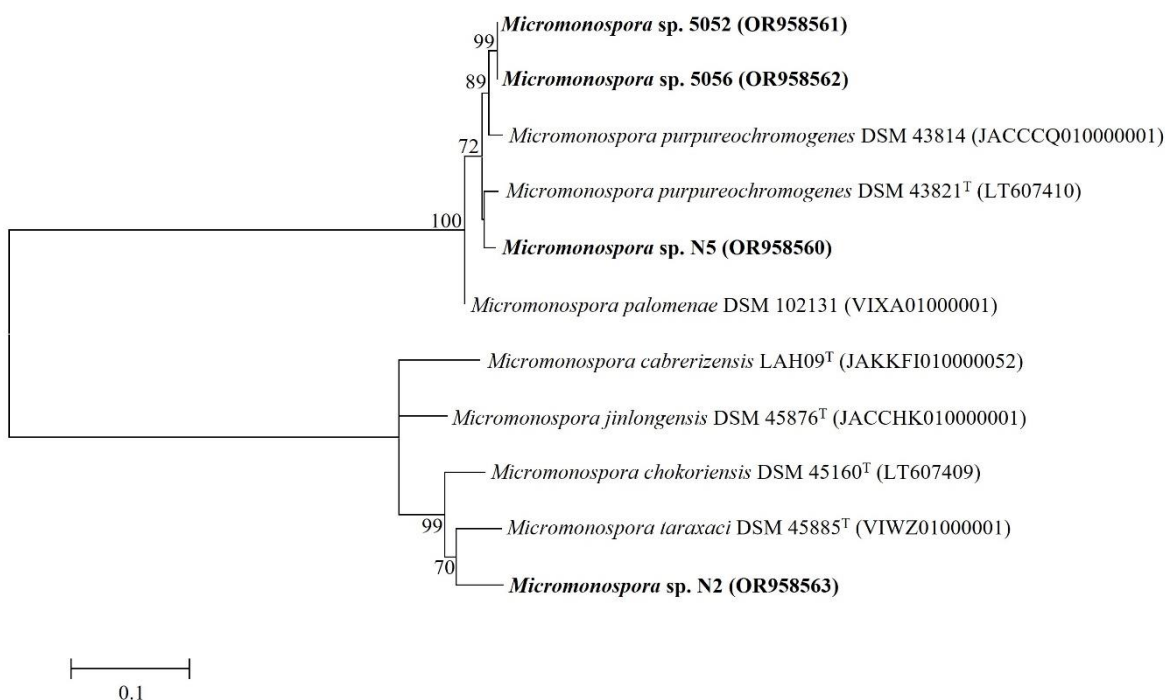


Fig. 21. Drzewo filogenetyczne przedstawiające wyniki analizy sekwencji genu *PKS I*, skonstruowane w oparciu o 474-nukleotydowe fragmenty sekwencji czterech badanych szczepów bakteryjnych oraz sekwencji szczepów referencyjnych z bazy danych GenBank. Filogram wykonano metodą największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), przy zastosowaniu trójparametrycznego modelu Tamury z uwzględnieniem rozkładu gamma. Do oceny wiarygodności poszczególnych węzłów zastosowano analizę „bootstrap” (1000 powtórzeń)

Szczepy *Micromonospora sp. N5*, *Micromonospora sp. 5056* oraz *Micromonospora sp. 5052*, charakteryzują się obecnością tego samego allelu genu *PKS I* typu I w genomie oraz stopniem podobieństwa sekwencji na poziomie 97,4 % do 100 %. Tworzące wspólne grono (Fig. 21) szczepy *Micromonospora sp. 5056* oraz *Micromonospora sp. 5052*, wykazały największy stopień podobieństwa sekwencji badanego genu do sekwencji tego genu gatunku *Micromonospora purpureochromogenes* DSM 43814 (97,6 %), z którym na filogramie utworzyły wspólną grupę (współczynnik poparcia 89 %). Z kolei szczep *Micromonospora sp. N5* wykazał najwyższy stopień podobieństwa genu *PKS I* do sekwencji szczepu referencyjnego *Micromonospora purpureochromogenes* DSM 43821^T (97,8 %), z którym stworzył wspólne grono. Szczep *Micromonospora sp. N2* posiada inny allel genu *PKS I* niż pozostałe badane izolaty i charakteryzował się najwyższym stopniem podobieństwa genu *PKS I* do referencyjnego szczepu *Micromonospora taraxaci* DSM 45885^T (92,7 %), z którym utwo-

rzył wspólne grono przy współczynniku poparcia równym 70 %. Stopień podobieństwa sekwencji genu *PKS I* szczepu *Micromonospora sp.* N2 a szczepami *Micromonospora sp.* 5052, *Micromonospora sp.* 5056 oraz *Micromonospora sp.* N5 mieścił się w zakresie od 61,3 % do 62 %.

PKS II – Micromonospora

Gen *PKS II* koduje syntazy poliketydowe typu II, związane głównie z biosyntezą poliketydów aromatycznych, w tym wielu substancji o charakterze związków antagonistycznych względem patogenów (Kouadri i in., 2014). W przypadku genu *PKS II*, sześć spośród dziewiętnastu szczepów grupy II charakteryzowało się występowaniem w genomie genu *PKS II*. Na podstawie uzyskanych sekwencji genu *PKS II* badanych szczepów oraz odpowiednich sekwencji nukleotydowych szczepów referencyjnych z bazy danych GenBank, skonstruowano filogram dla genu *PKS II* (Fig. 23). Drzewo filogenetyczne utworzono w oparciu o metodę „największej wiarygodności” (*Maximum Likelihood*), przy zastosowaniu modelu odwracalnego w czasie (GTR) z uwzględnieniem rozkładu gamma oraz parametru „I” opisującego udział miejsc niezmiennych. W analizie filogenetycznej genu *PKS II* uwzględniono trzydzieści dwie sekwencje szczepów referencyjnych pozyskanych z bazy GenBank. Reprezentują one rodzaje *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Catellatospora*, *Krasilnikovia*, *Nocardia* i *Streptomyces*.

Sekwencje genu *PKS II* badanych szczepów charakteryzowały się podobieństwem między sobą na poziomie od 79,2 % do 100 %, natomiast podobieństwo tych sekwencji do odpowiednich sekwencji szczepów referencyjnych charakteryzowało się stopniem podobieństwa na poziomie od 95,4 % do 99,6 %.

Badane szczepy utworzyły na filogramie trzy grupy (Fig. 22). W grupie pierwszej zlokalizowane zostały cztery badane szczepy, tj. *Micromonospora sp.* 29, 45, 55 oraz 249 wraz ze szczepami referencyjnymi, reprezentującymi różne gatunki rodzaju *Micromonospora*, przy współczynniku poparcia równym 100 %. Do grupy drugiej włączony został szczep *Micromonospora sp.* 5056 oraz gatunki *M. palomenae* i *M. purpureochromogenes* (współczynnik poparcia dla tej grupy wyniósł 100 %). Szczep *Micromonospora sp.* 5052 stworzył ostatnią grupę, wraz ze szczepami gatunku *M. lupni*, przy współczynniku poparcia równym 96 % (Fig. 22).

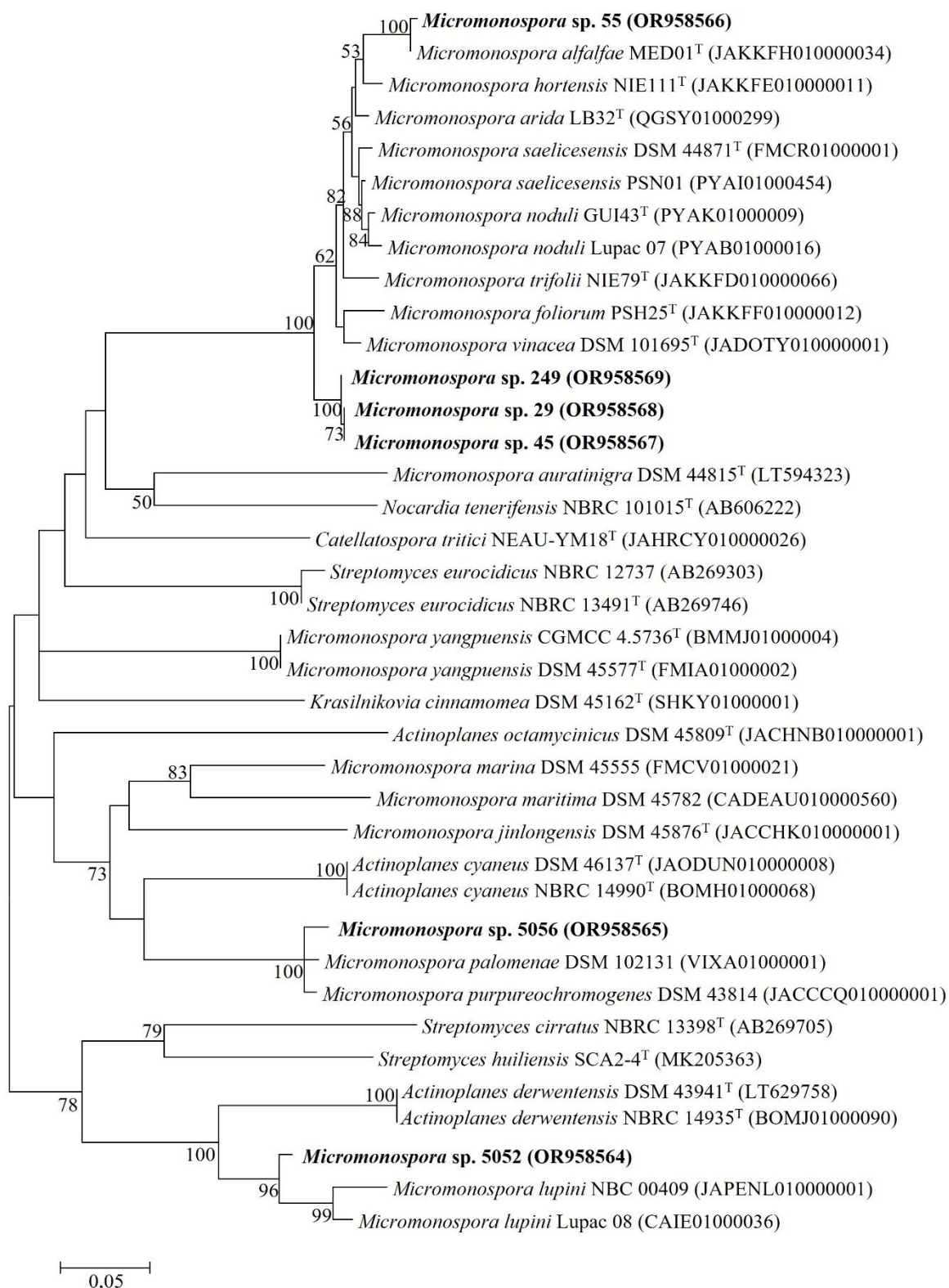


Fig. 22. Drzewo filogenetyczne przedstawiające wyniki analizy sekwencji genu *PKS II*, skonstruowane w oparciu o 553-nukleotydowe fragmenty sekwencji tego genu sześciu badanych szczepów oraz sekwencje szczepów referencyjnych z bazy danych GenBank, pozyskane z bazy GenBank. Filogram wykonany metodą największej wiarygodności (*Maximum Likelihood*), przy zastosowaniu

modelu odwracalnego w czasie (GTR) z uwzględnieniem rozkładu gamma oraz parametru „ Γ ” opisującego udział miejsc niezmiennych. Do oceny wiarygodności poszczególnych węzłów zastosowano analizę „bootstrap” (1000 powtórzeń)

Szczepy *Micromonospora* sp. 29, *Micromonospora* sp. 45 oraz *Micromonospora* sp. 249 wykazały najwyższy stopień podobieństwa sekwencji w stosunku do referencyjnych szczepów *Micromonospora saelicesensis* oraz *Micromonospora vinacea* (95,8-96 %). Szczep *Micromonospora* sp. 55 charakteryzował się najwyższym podobieństwem sekwencji badanego genu (99,6 %) do sekwencji referencyjnego szczepu *Micromonospora alfalfae*. W przypadku szczepu *Micromonospora* sp. 5052, najwyższy stopień podobieństwa sekwencji wykazano w stosunku do gatunku *Micromonospora lupini* (95,4 %), natomiast szczep *Micromonospora* sp. 5056 wykazał 98 % podobieństwo sekwencji genu *PKS II* do gatunków *Micromonospora palomenae* oraz *Micromonospora purpureochromogenes*.

4.2.7. Podsumowanie analiz związanych z obecnością w genomach badanych bakterii genów związanych z promowaniem wzrostu roślin

Na podstawie przeprowadzonych analiz genetycznych stwierdzono obecność genów związanych z promowaniem wzrostu roślin w genomach badanych bakterii. Wyniki tych analiz przedstawiono w tabeli podsumowującej (Tabela 8).

Tabela 8. Wyniki detekcji charakterystycznych genów związanych z promowaniem wzrostu roślin w genomach badanych bakterii endofitycznych

	<i>mxoF</i>	<i>nifH</i>	<i>acdS</i>	<i>NRPS</i>	<i>PKS I</i>	<i>PKS II</i>
<i>Methylobacterium</i> sp. 124	+	-	+	n.o.	n.o.	n.o.
<i>Methylobacterium</i> sp. Red Cyt	+	+	+	n.o.	n.o.	n.o.
<i>Methylobacterium</i> sp. Red Mix I	+	-	+	n.o.	n.o.	n.o.
<i>Methylorubrum</i> sp. 1117	+	-	s	n.o.	n.o.	n.o.
<i>Methylorubrum</i> sp. C2IIIIs	+	s	s	n.o.	n.o.	n.o.
<i>Methylorubrum</i> sp. C44s	+	-	+	n.o.	n.o.	n.o.
<i>Methylorubrum</i> sp. MV6II	+	-	+	n.o.	n.o.	n.o.
<i>Micromonospora</i> sp. 30	n.o.	n.o.	n.o.	+	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 33	n.o.	n.o.	n.o.	+	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 230	n.o.	n.o.	n.o.	+	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 152	n.o.	n.o.	n.o.	+	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. N2	n.o.	n.o.	n.o.	-	+	-

<i>Micromonospora</i> sp. 29	n.o.	n.o.	n.o.	-	-	+
<i>Micromonospora</i> sp. 43	n.o.	n.o.	n.o.	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 45	n.o.	n.o.	n.o.	-	-	+
<i>Micromonospora</i> sp. 66	n.o.	n.o.	n.o.	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 126	n.o.	n.o.	n.o.	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 249	n.o.	n.o.	n.o.	-	-	+
<i>Micromonospora</i> sp. 50	n.o.	n.o.	n.o.	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 53	n.o.	n.o.	n.o.	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 55	n.o.	n.o.	n.o.	-	-	+
<i>Micromonospora</i> sp. 5052	n.o.	n.o.	n.o.	-	+	+
<i>Micromonospora</i> sp. 48	n.o.	n.o.	n.o.	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. N4	n.o.	n.o.	n.o.	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. N5	n.o.	n.o.	n.o.	-	+	-
<i>Micromonospora</i> sp. 5056	n.o.	n.o.	n.o.	-	+	+

„+” – wykazano obecność badanego genu w genomie; „-” – nie wykazano obecności badanego genu w genomie; „s” – sekwencje słabej jakości (brak odczytów); „n.o.” – nie oznaczano

4.3. Analiza fenotypowa bakterii endofitycznych

4.3.1. Analiza cech fenotypowych bakterii z wykorzystaniem zestawu GEN III (system Biolog)

Wykazujące różnice w morfologii kolonii szczepy: *Methylobacterium* sp. 124, *Methylobacterium* sp. 1117, *Methylobacterium* sp. C2III, *Methylobacterium* sp. C44s, *Methylobacterium* sp. MV6II, *Micromonospora* sp. 43, *Micromonospora* sp. 48, *Micromonospora* sp. 55, *Micromonospora* sp. 66, *Micromonospora* sp. 5052 oraz *Micromonospora* sp. N2 poddano analizie cech fenotypowych z wykorzystaniem zestawu GEN III MicroPlate (system Biolog). Zestaw ten służy do oceny właściwości fenotypowych bakterii w oparciu o testy biochemiczne (94 testy), związane ze zdolnością bakterii do metabolizowania 71 substancji wykorzystywanych jako jedyne źródło węgla oraz wrażliwością na działanie różnych związków chemicznych (23 testy). Na podstawie wyniku kolorymetrycznych reakcji typu *redox*, możliwa jest ocena właściwości biochemicznych testowanych szczepów (podrozdział 3.2.4.1)

Badane szczepy charakteryzują się zdolnością do wykorzystywania różnych substancji chemicznych jako źródła węgla i energii (Fig. 23A oraz Fig. 23B). Wszystkie badane szczepy należące do rodzajów *Methylobacterium* oraz *Methylobacterium* charakteryzowały się

	<i>Methylobacterium</i> sp. 124	<i>Methylorubrum</i> sp. 1117	<i>Methylorubrum</i> sp. C2III _s	<i>Methylorubrum</i> sp. C44 _s	<i>Methylorubrum</i> sp. MV6II	<i>Micromonospora</i> sp. 43	<i>Micromonospora</i> sp. 48	<i>Micromonospora</i> sp. 53	<i>Micromonospora</i> sp. 66	<i>Micromonospora</i> sp. 5052	<i>Micromonospora</i> sp. N2
D-rafinoza											
α -D-glukoza											
D-sorbitol											
żelatyna											
pektyna											
kwas p-hydroksyfenylooctowy											
Tween 40											
dekstryna											
α -D-laktoza											
D-mannoza											
D-mannitol											
glicylo-L-prolina											
kwas D-galakturonowy											
pirogonian metylu											
kwas γ -aminomasłowy											
D-maltoza											
D-melibioza											
D-fruktoza											
D-arabitol											
L-alanina											
lakton kwasu L-galaktonowego											
ester metylowy kw. D-mlekowego											
kwas α -hydroksymasłowy											
D-trehaloza											
β -metylo-D-glukozyd											
D-galaktoza											
mio-inozytol											
L-arginina											
kwas glukonowy											
kwas L-mlekowy											
kwas β -hydroksy-D,L-masłowy											
D-celobioza											
D-salicyna											
3-metylo-glukoza											
glicerol											

wynik pozytywny
 wynik słaby dodatni
 wynik negatywny

Fig. 23A. Zdolność wybranych bakterii do metabolizowania różnych substancji chemicznych jako jedynego źródła węgla i energii, wykazanych w teści GEN III (system Biolog)

zdolnością do rozkładu glukuronamidu, kwasu α -keto-glutarowego i Tweenu 40. Wszystkie szczepy z rodzaju *Micromonospora* wykazały zdolność do wykorzystywania dekstryny, D-maltozy i gencjiobiozy jako źródeł węgla. Żaden z jedenastu badanych szczepów nie wykazał zdolności do rozkładu D-sorbitolu, α -D-laktozy, glicylo-L-proliny, mio-inozytolu, N-acetylo-D-mannozaminy, kwasu piroglutaminowego, kwasu chinowego oraz D-seryny.

	<i>Methylobacterium</i> sp. 124	<i>Methylorubrum</i> sp. 1117	<i>Methylorubrum</i> sp. C2III _s	<i>Methylorubrum</i> sp. C44 _s	<i>Methylorubrum</i> sp. MV6II	<i>Micromonospora</i> sp. 43	<i>Micromonospora</i> sp. 48	<i>Micromonospora</i> sp. 53	<i>Micromonospora</i> sp. 66	<i>Micromonospora</i> sp. 5052	<i>Micromonospora</i> sp. N2
kwasi L-asparaginowy	■				■	■	■		■		■
kwasi glukuronowy	■		■	■		■					
kwasi cytrynowy	■					■					
kwasi α-keto-masłowy	■					■					■
gencjiozo			■		■	■	■	■	■	■	■
N-acetylo-D-glukozamina			■						■		■
D-fukoza	■				■	■	■				■
D-glukoza-6-fosforan			■		■	■				■	
kwasi L-glutaminowy	■		■		■		■	■	■		■
glukuronamid		■	■	■	■	■				■	
kwasi α-keto-glutarowy	■	■	■	■	■	■					
kwasi acetylooctowy		■	■	■	■	■	■				■
sacharoza							■	■	■	■	
N-acetylo-D-mannoamina								■	■	■	
L-fukoza		■	■	■	■	■			■		■
D-fruktoza-6-fosforan		■	■	■	■				■	■	
L-histydyna								■	■		
kwasi śluzowy	■		■			■					■
kwasi D-jabłkowy	■				■						
kwasi propionowy				■	■	■			■	■	■
D-turanoza		■			■	■	■		■	■	■
N-acetylo-D-galaktoamina		■			■	■	■		■	■	■
L-ramnoza					■	■	■			■	■
kwasi D-asparaginowy		■				■					
kwasi piroglutaminowy											
kwasi chinowy											
kwasi L-jabłkowy	■	■		■	■			■		■	
kwasi octowy	■			■	■	■		■	■	■	■
stachioza					■						
kwasi N-acetylo-neuraminowy						■	■				
inozyna				■		■					■
D-seryna											
L-seryna	■		■		■						
kwasi D-glukarowy	■	■									
kwasi bromobursztynowy	■				■					■	
kwasi mrówkowy	■				■						

■ wynik pozytywny ■ wynik słaby dodatni □ wynik negatywny

Fig. 23B. Zdolność wybranych bakterii do metabolizowania różnych substancji chemicznych jako jedyne źródła węgla i energii, wykazanych w teście GEN III (system Biolog) (cd.)

Jak przedstawiono na wykresie (Fig. 24), szczep *Micromonospora* sp. 48 charakteryzował się największym potencjałem do wykorzystywania różnych substancji jako jedyne źródła węgla i energii, wykazując zdolność do rozkładu dwudziestu dziewięciu substancji; dodatkowo, w przypadku zdolności do utylizacji kolejnych związków: 3-metylo-glukozy oraz L-ramnozy, uzyskano wynik słaby dodatni.

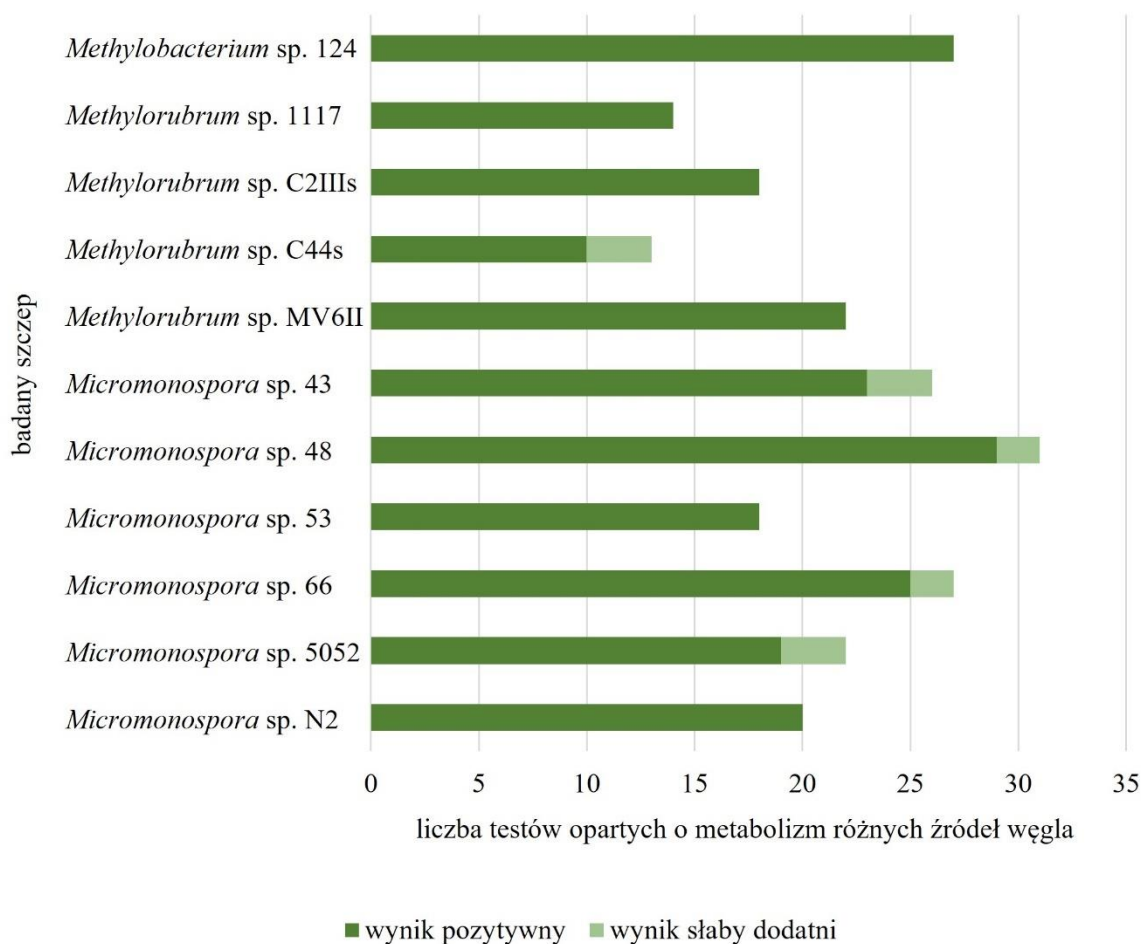


Fig. 24. Liczba substancji wykorzystywanych przez badane bakterie jako jedyne źródło węgla i energii, określona z wykorzystaniem systemu GEN III MicroPlate

Podobnie wysokim potencjałem do wykorzystywania różnych związków chemicznych jako jedyne źródła węgla i energii charakteryzował się szczep *Methylobacterium* sp. 124, wykazujący zdolność do wykorzystywania 27 różnych substancji. Najniższym potencjałem do wykorzystywania różnych źródeł węgla charakteryzował się natomiast szczep *Methylorubrum* sp. C44_s (zdolność do rozkładu dziesięciu różnych związków węgla oraz – w przypadku trzech kolejnych – wykazano wynik słaby dodatni).

W doświadczeniu oceniono również oporność badanych bakterii na poszczególne substancje chemiczne (Fig. 25).

	<i>Methylobacterium</i> sp. 124	<i>Methylorubrum</i> sp. 1117	<i>Methylorubrum</i> sp. C2IIIIs	<i>Methylorubrum</i> sp. C44s	<i>Methylorubrum</i> sp. MV6II	<i>Micromonospora</i> sp. 43	<i>Micromonospora</i> sp. 48	<i>Micromonospora</i> sp. 53	<i>Micromonospora</i> sp. 66	<i>Micromonospora</i> sp. 5052	<i>Micromonospora</i> sp. N2
1% NaCl	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1% mleczan sodu	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
troleandomycyna	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
linkomycyna	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
wankomycyna	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
kwas nalidyksowy	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
aztreonam	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
pH 6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4% NaCl	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
kwas fusydowy	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ryfamycyna SV	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
chlorowodorek guanidyny	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
fiolet tetrazoliowy	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
chlorek litu	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
maślan sodu	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
pH 5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
8% NaCl	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
D-seryna	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
minocyklina	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
siarczan sodowy tetradecylu	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
błękit tetrazoliowy	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
telluryn potasu	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
bromian sodu	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

wynik pozytywny
 wynik słaby dodatni
 wynik negatywny

Fig. 25. Oporność badanych bakterii na poszczególne substancje chemiczne, wykazane w teście GEN III (system Biolog)

Wykazano, że wszystkie badane szczepy wykazują oporność na chlorek sodu (stężenie 1%), kwas nalidyksowy oraz ryfamycynę SV. Wszystkie badane szczepy wykazały wrażliwość na chlorek sodu w stężeniu 4% i 8%, maślan sodu oraz siarczan sodowy tetradecylu. Szczep *Methylobacterium* sp. 124 wykazał oporność na działanie największej liczby różnych substancji (piętnaście substancji) spośród wszystkich jedenastu badanych szczepów. Szczep *Methylorubrum* sp. MV6II charakteryzował się opornością na czternaście różnych substancji. Szczep *Micromonospora* sp. 66 wykazał największy stopień wrażliwości na badane substancje, wykazując oporność jedynie w stosunku do pięciu różnych związków chemicznych (Fig. 26).

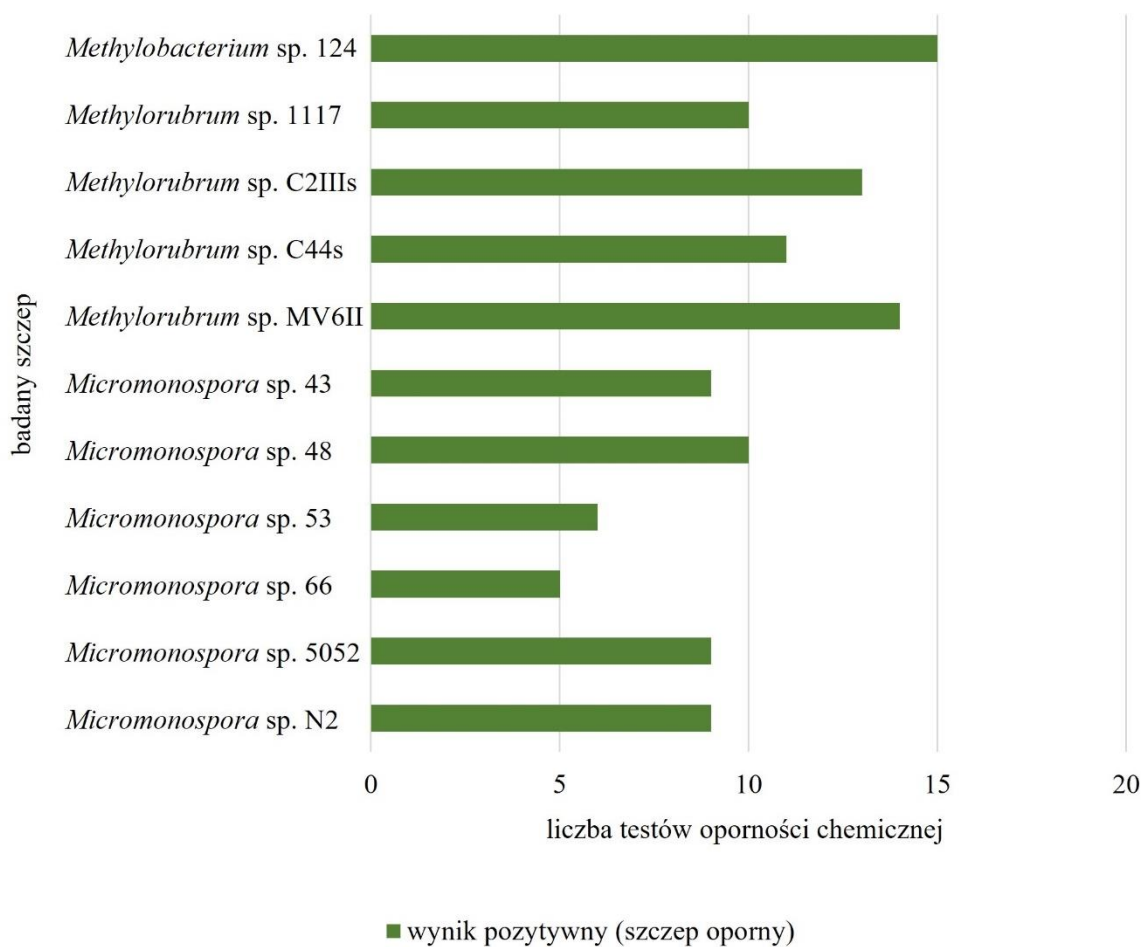


Fig. 26. Oporność badanych szczepów na poszczególne substancje chemiczne, wykazane w teście GEN III (system Biolog)

4.3.2. Charakterystyka biochemiczna izolatów bakterii Gram ujemnych z wykorzystaniem zestawu Microgen ID

Dodatkową charakterystykę biochemiczną Gram ujemnych szczepów należących do rodzaju *Methylobacterium* oraz *Methylobacterium* przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu komercyjnego Microgen ID. Zestaw Microgen ID panel A+B jest 24 substratowym systemem stosowanym do charakterystyki właściwości biochemicznych i identyfikacji mikroorganizmów, w oparciu o zmiany zabarwienia podłoży w studzienkach (podrozdział 3.2.4.2).

Badania wykazały, że wszystkie badane szczepy należące do rodzajów *Methylobacterium* oraz *Methylobacterium* charakteryzują się zdolnością do wytwarzania oksydazy cytochromowej. Analiza właściwości biochemicznych tych bakterii, przeprowadzona z użyciem zestawu Microgen ID wykazała, że sześć spośród siedmiu badanych szczepów charakteryzowało się zdolnością do fermentacji arabinozy oraz hydrolizy mocznika. Szczep *Methylobac-*

terium sp. Red Mix I wykazał ponadto zdolność do produkcji acetoiny (substratem była glukoza) oraz rozkładu cytrynianu. Szczep *Methylobacterium* sp. MV6II jako jedyny z badanych charakteryzował się zdolnością do fermentacji ramnozy. Szczep *Methylobacterium* sp. 124 wyróżniał się zdolnością do redukcji azotanów do azotynów (Fig. 27).

	<i>Methylobacterium</i> sp. 124	<i>Methylobacterium</i> sp. Red Cyt	<i>Methylobacterium</i> sp. Red mix I	<i>Methylobacterium</i> sp. 1117	<i>Methylobacterium</i> sp. C2III _s	<i>Methylobacterium</i> sp. C44 _s	<i>Methylobacterium</i> sp. MV6II
dekarboksylaza lizyny							
dekarboksylaza ornityny							
fermentacja adonitolu							
fermentacja arabinozy	■	■	■	■	■	■	
fermentacja glukozy							
fermentacja inozytolu							
fermentacja ksylozy							
fermentacja laktozy							
fermentacja mannitolu							
fermentacja rafinozy							
fermentacja ramnozy							■
fermentacja sacharozy							
fermentacja salicyny							
fermentacja sorbitolu							
hydroliza argininy							
hydroliza mocznika	■	■	■	■	■	■	
produkcja acetoiny			■				
produkcja indolu							
produkcja kwasu indolopirogronowego							
produkcja siarkowodoru							
produkcja β-galaktozydazy							
redaukacja azotanów do azotu		■	■	■	■	■	■
redukcja azotanów do azotynów	■						
upłynnianie żelatyny							
utyliczacja cytrynianu	■		■				
utyliczacja kwasu malonowego							

wynik dodatni
 wynik słaby dodatni
 wynik negatywny

Fig. 27. Aktywność biochemiczna badanych szczepów Gram ujemnych z wykazana w teście Microgen ID

4.3.3. Określenie zdolności bakterii do produkcji wybranych enzymów hydrolitycznych z wykorzystaniem zestawu API ZYM (bioMérieux)

Aktywność enzymatyczną wszystkich badanych szczepów oceniono z wykorzystaniem półilościowej mikrometody z wykorzystaniem komercyjnego testu API ZYM (bioMérieux). Ostateczny produkt reakcji enzymatycznej, świadczący o obecności danego enzymu, wykrywany jest dzięki zachodzącym w poszczególnych mikroprobówkach reakjom barwnym (podrozdział 3.2.4.3). Wykazano, że wszystkie badane szczepy wykazują zdolność do produkcji enzymów hydrolitycznych (Fig. 28).

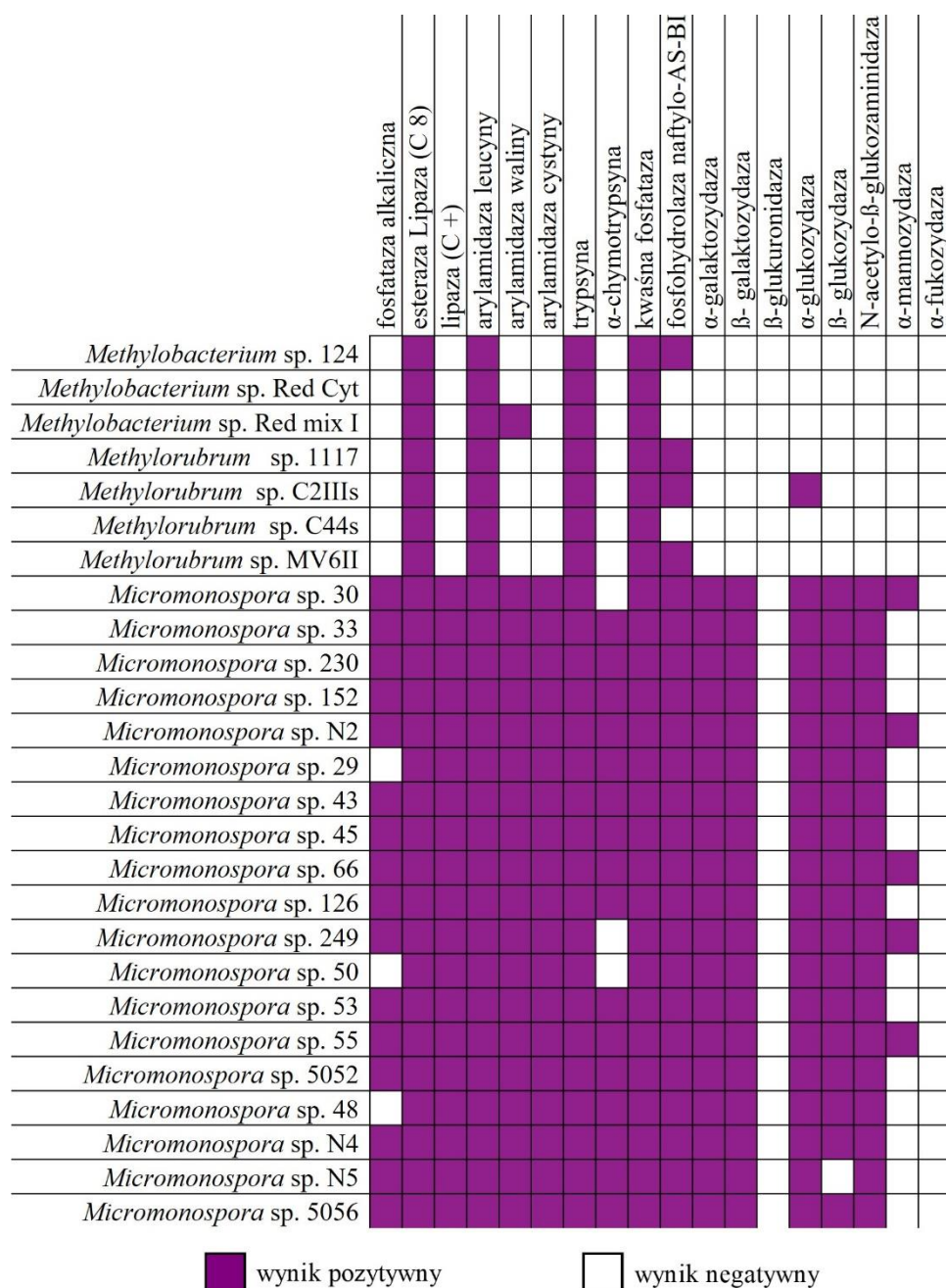


Fig. 28. Aktywność enzymatyczna badanych szczepów, określona przy pomocy zestawu API ZYM

Szczepy należące do rodzaju *Micromonospora* charakteryzowały się wyższym potencjałem enzymatycznym (od 13 do 16 produkowanych enzymów), niż szczepy należące do rodzajów *Methylobacterium*/*Methylorubrum*; te charakteryzowały się zdolnością do produkcji od 4 do 5 różnych enzymów spośród 19 badanych enzymów hydrolytycznych (Fig. 29).

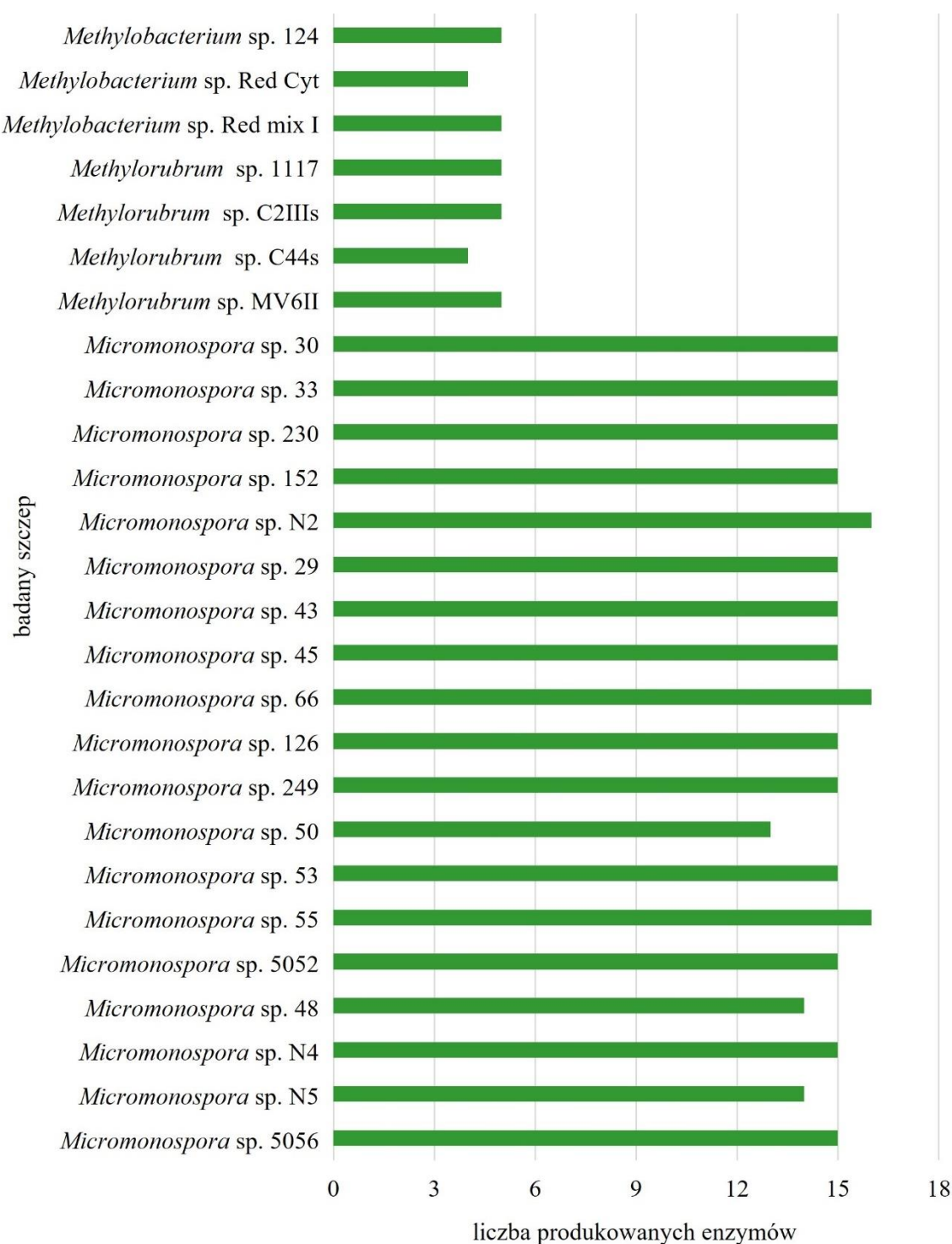


Fig. 29. Liczba enzymów hydrolytycznych produkowanych przez poszczególne szczepy bakteryjne, określona z wykorzystaniem zestawu API ZYM

Największą aktywnością enzymatyczną charakteryzowały się szczepy *Micromonospora* sp. N2, *Micromonospora* sp. 66 oraz *Micromonospora* sp. 55, zaś najmniejszą aktywność wykazały szczepy *Methylobacterium* sp. Red Cyt oraz *Methylorubrum* sp. C44s.

4.3.4. Określenie tolerancji bakterii wobec różnych stężeń NaCl w podłożu

W celu określenia tolerancji bakterii na zasolenie, szczepy wysiewano na podłoże stałe 79CA z metanolem (1 % v/v; rodzaje *Methylobacterium*/*Methylorubrum*) lub ISP2 (rodzaj *Micromonospora*) z dodatkiem NaCl w stężeniu 1-4 % (podrozdział 3.2.4.4); dodatkowo, bakterie wysiewano na wymienione podłoża o klasycznym składzie (próba kontrolna).

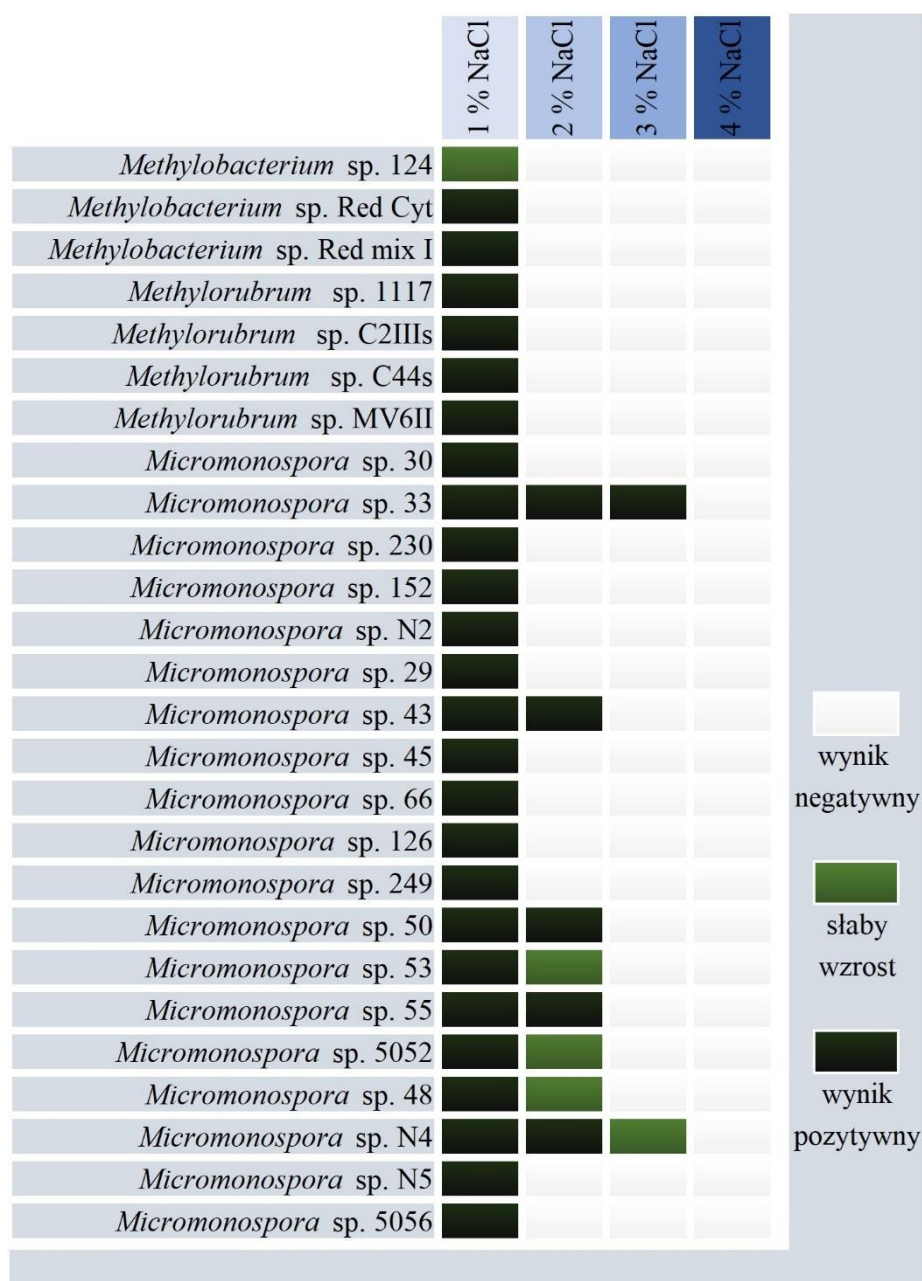


Fig. 30. Wpływ zasolenia (NaCl) w stężeniu od 1 % do 4 % na wzrost badanych bakterii

Jak przedstawiono na rycinie (Fig. 30) wszystkie badane szczepy charakteryzowały się zdolnością do wzrostu na podłożach zawierających chlorek sodu w stężeniu 1 % (w tym szczep *Methylobacterium* sp. 124, który charakteryzował się słabym wzrostem). Szczepy *Micromonospora* sp. 43, *Micromonospora* sp. 50, *Micromonospora* sp. 55 oraz *Micromonospora* sp. N4 wykazały zdolność do wzrostu na podłożach zawierających do 2 % NaCl, natomiast szczep *Micromonospora* sp. 33 charakteryzował się najwyższym stopniem tolerancji wobec NaCl w podłożu, wykazując zdolność do wzrostu na podłożach zawierających ten związek w stężeniu od 1 do 3 % (Fig. 31). Ponadto szczepy *Micromonospora* sp. 53, *Micromonospora* sp. 5052 oraz *Micromonospora* sp. 48 charakteryzowały się słabym wzrostem na podłożach zawierających NaCl w stężeniu 2 %, zaś szczep *Micromonospora* sp. N4 wykazał słaby wzrost na podłożu zawierającym NaCl w stężeniu 3 %.

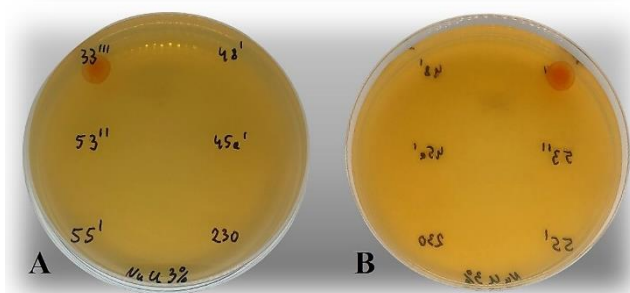


Fig. 31. Wzrost szczepu *Micromonospora* sp. 33 na podłożu ISP2 z dodatkiem NaCl w stężeniu 3 %; A – rewers, B – awers

4.3.5. Określenie zakresu pH wzrostu bakterii

W doświadczeniu oceniono zdolność wszystkich badanych bakterii do wzrostu na podłożu stałym 79CA (rodzaj *Micromonospora*) lub 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v) w przypadku szczepów należących do rodzaju *Methylobacterium*/*Methylorubrum*, o różnym odczynie (pH od 4,5-10, podrozdział 3.2.4.5).

Wykazano, że badane szczepy charakteryzują się zróżnicowaną wrażliwością na odczyn podłoża (Fig. 32). Szczepy *Micromonospora* sp. 30 oraz *Micromonospora* sp. N4 charakteryzowały się zdolnością wzrostu na podłożu 79CA o różnym zakresie pH (od 5,5 do 10). Szczepy *Methylobacterium* sp. 124 oraz *Micromonospora* sp. N5 wykazały najmniejszy zakres tolerancji na odczyn podłoża, wykazując zdolność do wzrostu na podłożu o wartości odczynu odpowiednio od 5,5 do 7 oraz od 6,5 do 8.

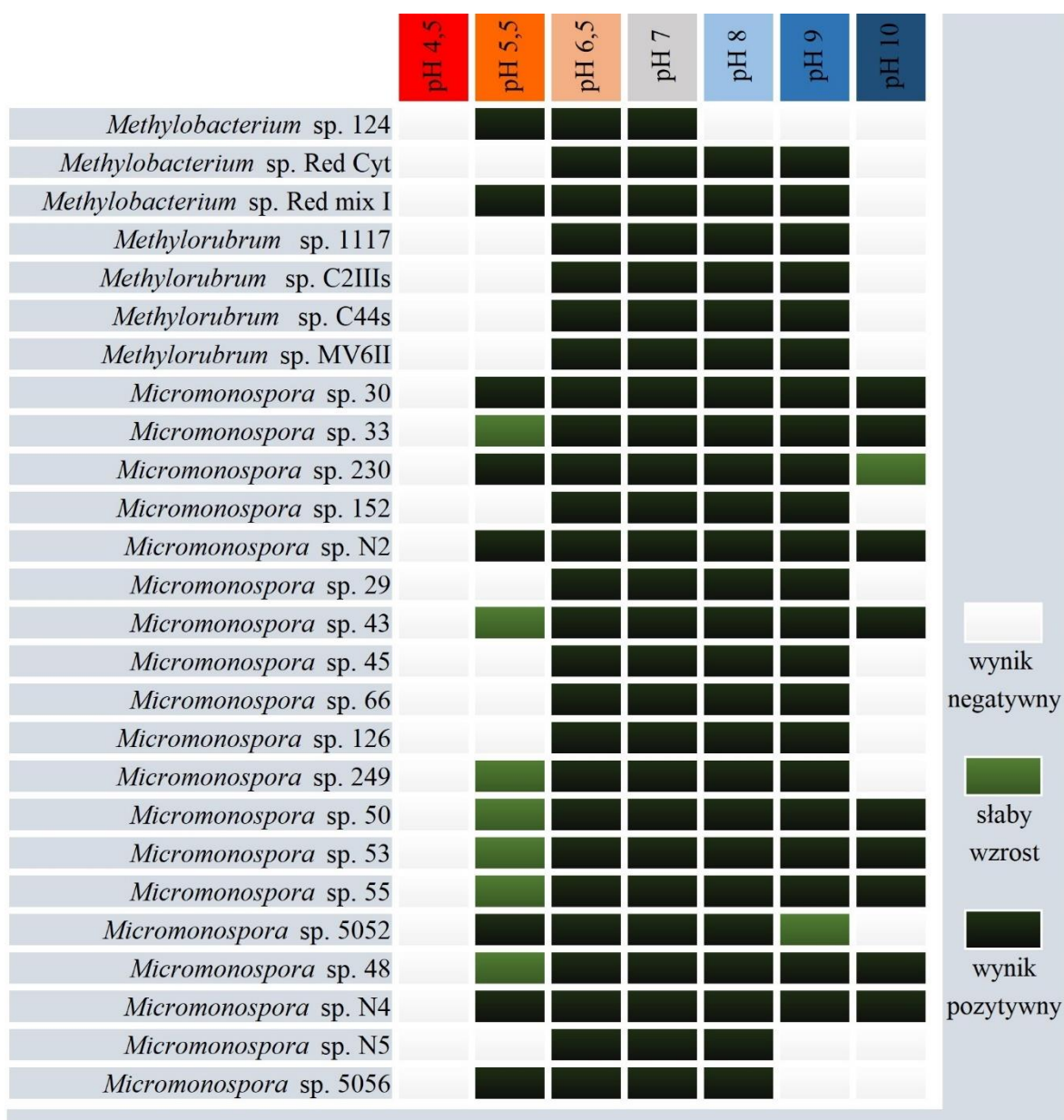


Fig. 32. Wzrostu bakterii endofitycznych na podłożach o pH w zakresie 4,5-10

Optymalne pH podłoża dla badanych szczepów mieściło się w zakresie od 5,5 do 7 (szczep *Methylobacterium* sp. 124); od 5,5 do 9 (szczepy *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Micromonospora* sp. 230), od 5,5 do 10 (szczepy *Micromonospora* sp. 30, *Micromonospora* sp. N2 i *Micromonospora* sp. N4) od 5,5 do 8 (szczepy *Micromonospora* sp. 5052 oraz *Micromonospora* sp. 5056), od 6,5 do 8 (szczep *Micromonospora* sp. N5), od 6,5 do 9 (szczepy *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylorubrum* sp. 1117, *Methylorubrum* sp. C2IIIs, *Methylorubrum* sp. C44s, *Methylorubrum* sp. MV6II, *Micromonospora* sp. 152, *Micromonospora* sp. 29, *Micromonospora* sp. 45, *Micromonospora* sp. 66, *Micromonospora* sp. 126, *Micromonospora* sp. 249), od 6,5 do 10 (szczepy *Micromonospora* sp. 33, *Micromonospora*

sp. 43, *Micromonospora* sp. 50, *Micromonospora* sp. 53, *Micromonospora* sp. 55, *Micromonospora* sp. 48). Wzrost reprezentatywnych szczepów, wykazujących wzrost na podłożach o odczynie równym 10 oraz 5,5 przedstawiono poniżej (Fig. 33).

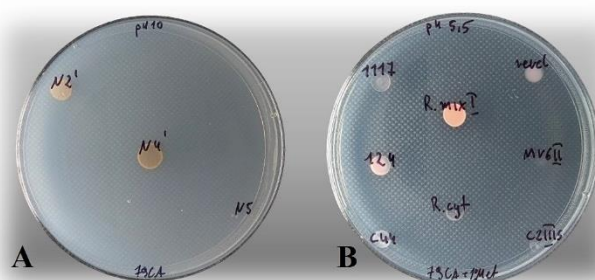


Fig. 33. A) Kolonie szczepów *Micromonospora* sp. N2 oraz *Micromonospora* sp. N4 na podłożu agarowym 79CA o pH 10; B) kolonie szczepów *Methylobacterium* sp. Red Mix I oraz *Methylobacterium* sp. 124 na podłożu agarowym 79CA z 1 % dodatkiem metanolu, o pH 5,5.

4.3.6. Określenie zdolności bakterii do wzrostu w różnych temperaturach

Charakteryzujące się różnicami w morfologii kolonii szczepy bakterii endofitycznych, tj. szczepy *Methylobacterium* sp. 124, *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Methylorubrum* sp. MV6II, *Micromonospora* sp. 33, *Micromonospora* sp. 43, *Micromonospora* sp. 66, *Micromonospora* sp. 5052, *Micromonospora* sp. 48, *Micromonospora* sp. N4, *Micromonospora* sp. N5 oraz *Micromonospora* sp. 5056 hodowano przez 14 dni w podłożu płynnym 79CA (rodzaj *Micromonospora*) lub 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v; *Methylobacterium*/*Methylorubrum*) w różnych temperaturach (podrozdział 3.2.4.6). Na podstawie wzrostu gęstości optycznej hodowli (OD_{600}), oceniono zakres temperatur, w których zachodzi wzrost badanych bakterii; wyniki przedstawiono poniżej (Fig. 34). Badane szczepy należące do rodzaju *Methylobacterium* oraz *Methylorubrum* charakteryzowały się zdolnością do wzrostu w temperaturach od 8 °C do 37 °C; w przypadku szczepów *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylobacterium* sp. Red Mix I oraz *Methylorubrum* sp. MV6II wykazano również zdolność tych bakterii do słabego wzrostu w temperaturze 42 °C. Wszystkie szczepy należące do rodzaju *Micromonospora* charakteryzowały się zdolnością do wzrostu w temperaturach 28 °C oraz 37 °C. Szczepy *Micromonospora* sp. 66, *Micromonospora* sp. 5052, *Micromonospora* sp. 48, *Micromonospora* sp. N4, *Micromonospora* sp. N5 oraz *Micromonospora* sp. 5056 wykazały zdolność do wzrostu w temperaturze 42 °C; ponadto szczepy *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Methylorubrum* sp. MV6II oraz *Micromonospora* sp. 43 charakteryzowały się słabym wzrostem w temperaturze 42 °C.

	8 °C	28 °C	37 °C	42 °C	45 °C	
<i>Methylobacterium</i> sp. 124	■	■	■	■	■	wynik negatywny
<i>Methylobacterium</i> sp. Red Cyt	■	■	■	■	■	
<i>Methylobacterium</i> sp. Red mix I	■	■	■	■	■	
<i>Methylorubrum</i> sp. MV6II	■	■	■	■	■	słaby wzrost
<i>Micromonospora</i> sp. 33	■	■	■	■	■	
<i>Micromonospora</i> sp. 43	■	■	■	■	■	wynik pozytywny
<i>Micromonospora</i> sp. 66	■	■	■	■	■	
<i>Micromonospora</i> sp. 5052	■	■	■	■	■	
<i>Micromonospora</i> sp. 48	■	■	■	■	■	
<i>Micromonospora</i> sp. N4	■	■	■	■	■	
<i>Micromonospora</i> sp. N5	■	■	■	■	■	
<i>Micromonospora</i> sp. 5056	■	■	■	■	■	
	■	■	■	■	■	

Fig. 34. Zdolność wybranych szczepów bakterii endofitycznych do wzrostu w różnych temperaturach w podłożu płynnym 79CA (*Micromonospora*) lub 79CA z dodatkiem metanolu (szczepy *Methylobacterium*/*Methylorubrum*)

4.3.7. Określenie zdolności bakterii do aktywnego ruchu

W celu określenia zdolności bakterii do aktywnego ruchu, wszystkie badane szczepy wysiewano w 0,35 % podłożu agarowe 79CA w przypadku szczepów z rodzaju *Micromonospora* lub 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v) w przypadku szczepów należących do rodzaju *Methylobacterium*/*Methylorubrum* poprzez punktowe wklucie masy bakteryjnej (podrozdział 3.2.4.7). Pojawienie się charakterystycznej, poszerzającej się strefy zmętnienia podłoża wokół miejsca szczepienia po siedmiu dniach od momentu wysiania bakterii, uznawano za wynik pozytywny; szczep należący do gatunku *Pseudomonas fluorescens* wykorzystano jako kontrolę pozytywną.

Wykazano, że szczepy *Methylobacterium* sp. 124, *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Methylorubrum* sp. 1117, *Methylorubrum* sp. C2IIIIs i *Methylorubrum* sp. C44s charakteryzowały się zdolnością do aktywnego ruchu (Fig. 35). Szczepy należące do rodzaju *Micromonospora* oraz szczep *Methylorubrum* sp. MV6II uznano za niezdolne do aktywnego ruchu w 0,35 % podłożu agarowym 79CA.

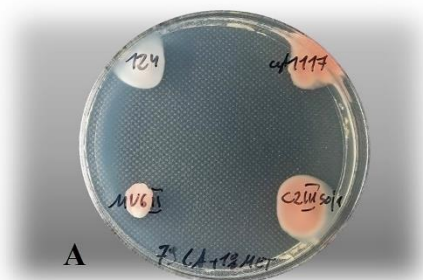


Fig. 35. Zdolność szczepów *Methylobacterium* sp. 124, *Methylorubrum* sp. 1117 oraz *Methylorubrum* sp. C2IIIs do aktywnego ruchu w podłożu 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v)

4.3.8. Określenie zdolności bakterii do oddziaływań typu *quorum sensing* (QS)

Szczepy bakterii z rodzajów *Methylobacterium*/*Methylorubrum* badano na podłożu stałym 79CA w obecności szczepu wskaźnikowego: *Chromobacterium violaceum* CV026 (podrozdział 3.2.4.8). Zdolność badanych bakterii Gram ujemnych do oddziaływań typu *quorum sensing*, świadczy o wytwarzaniu cząsteczek sygnałowych – autoinduktorów (w przypadku bakterii Gram ujemnych: N-acylohomoserynowe cząsteczki laktonowe, AHL). Pojawienie się fioletowego zabarwienia (wioletyna) w przypadku szczepu *Ch. violaceum* traktowano jako wynik pozytywny.

Spośród wszystkich badanych szczepów, jedynie szczep *Methylorubrum* sp. MV6II wykazał zdolność do produkcji bakteryjnych autoinduktorów AHL (Fig. 36).

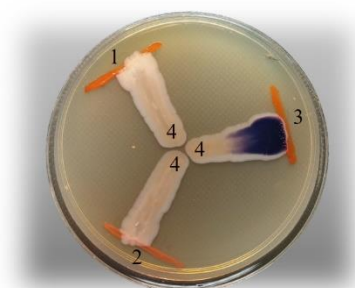


Fig. 36. Produkcja QS-zależnej wioletyny w obecności szczepu *Chromobacterium violaceum*. 1 – *Methylorubrum* sp. C2IIIs; 2 – *Methylorubrum* sp. C44s; 3 – *Methylorubrum* sp. MV6II (wynik pozytywny); 4 – *Chromobacterium violaceum* CV026

4.3.9. Określenie zdolności bakterii do tworzenia biofilmu metodą barwienia fioletem krystalicznym oraz przeżywalności w biofilmie przy użyciu zestawu LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability

Zdolność do tworzenia biofilmu przez szczepy należące do rodzajów *Methylobacterium* oraz *Methylostrubrum* (podrozdział 3.2.4.9) oceniono z wykorzystaniem testu z fioletem krystalicznym. Na podstawie spektrofotometrycznej oceny ilości pozostałości fioletu krystalicznego w studzienkach, świadczącego o zakumulowaniu tej substancji przez tworzące biofilm bakterie, oceniono zdolność badanych szczepów do wytwarzania tej struktury. Wykazano, że wszystkie testowane szczepy charakteryzują się zdolnością do tworzenia biofilmu bakteryjnego (Fig. 37).

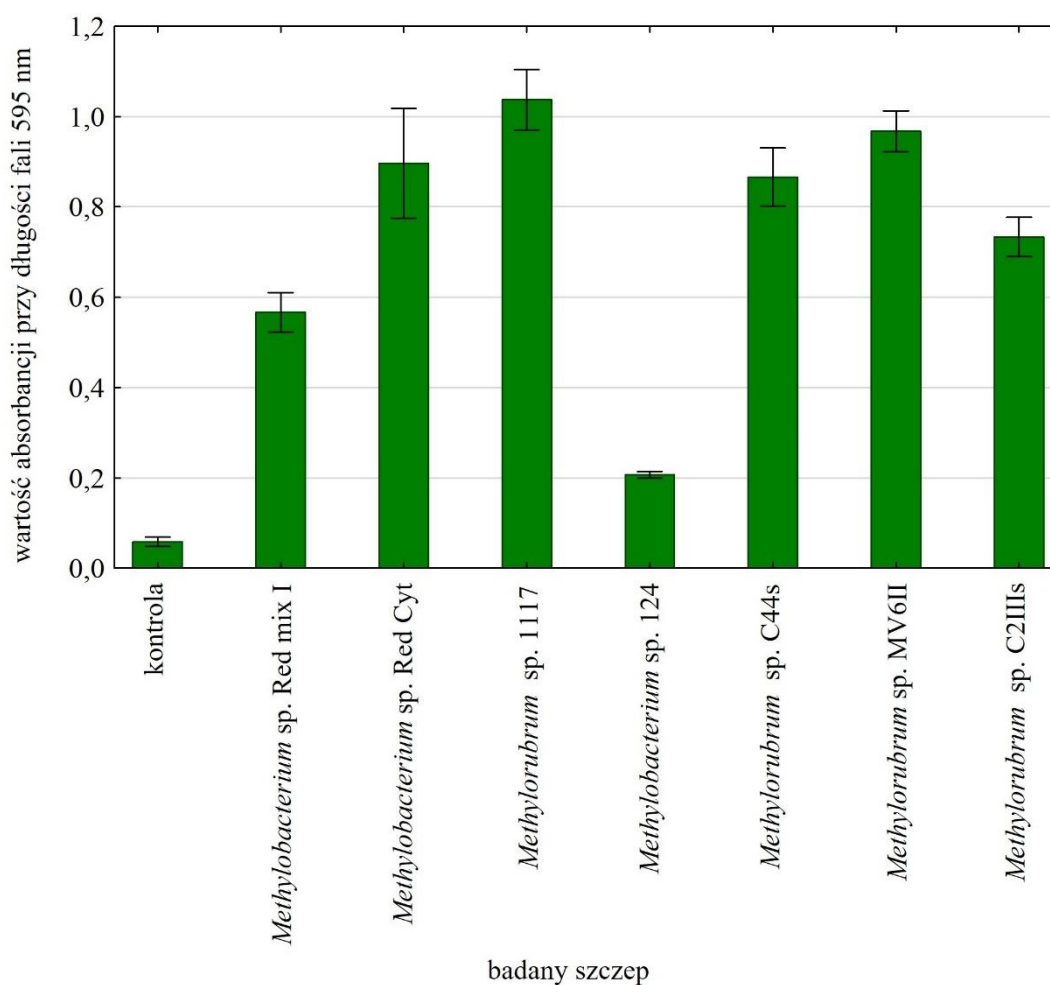


Fig. 37. Ocena potencjału bakterii z rodzajów *Methylobacterium* oraz *Methylostrubrum* do tworzenia biofilmu bakteryjnego, określona metodą barwienia z użyciem fioletu krystalicznego. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe (dla siedmiu powtórzeń)

Wartość absorbancji mierzona przy długości fali 595 nm wynosiła dla próby kontrolnej 0,054, natomiast wartość absorbancji dla badanych szczepów mieściła się w przedziale od 0,213 do 1,044. Szczep *Methylobacterium* sp. 1117 cechował się najwyższym potencjałem do tworzenia biofilmu bakteryjnego, charakteryzując się najwyższą wartością absorbancji względem kontroli (1,044), natomiast szczep *Methylobacterium* sp. 124 wykazał najniższy potencjał do tworzenia tej struktury (najniższa wartość absorbancji względem kontroli – 0,213).

Następnie szczepy *Methylobacterium* sp. 124, *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Methylobacterium* sp. 1117, *Methylobacterium* sp. C2IIIIs oraz *Methylobacterium* sp. MV6II poddano ocenie z wykorzystaniem zestawu LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, za pomocą którego oceniono żywotność komórek bakteryjnych w biofilmach (Fig. 38).

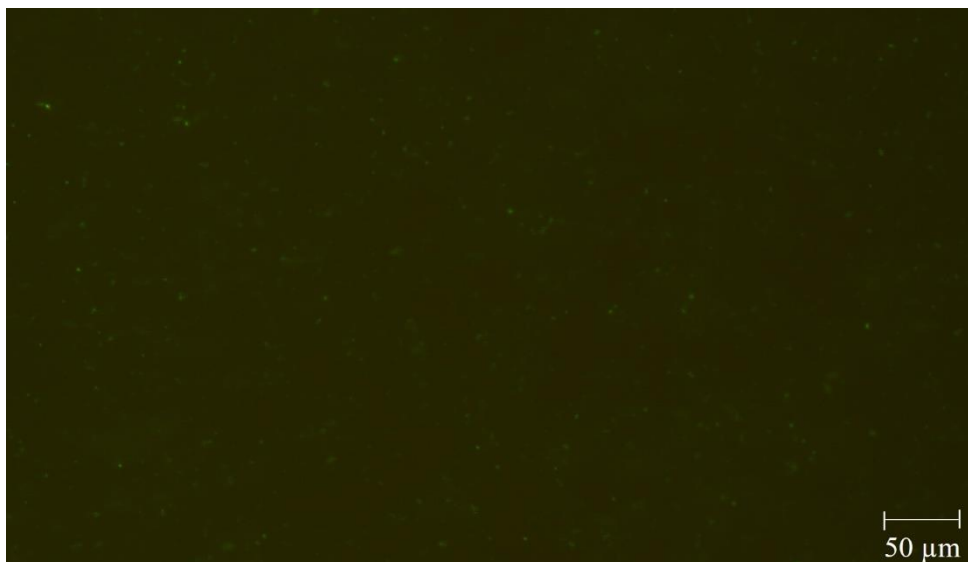


Fig. 38. Obraz biofilmu tworzego przez szczep *Methylobacterium* sp. 1117, komórki bakterii barwiono przy użyciu zestawu LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit. Kolor zielony oznacza komórki żywe. Zdjęcie mikroskopowe wykonano przy użyciu laserowego mikroskopu konfokalnego Zeiss Axiovert 200M przy powiększeniu 200×

Wykazano, że wszystkie badane szczepy należące do rodzajów *Methylobacterium* lub *Methylobacterium* charakteryzowały się ponad 95 % przeżywalnością komórek tworzących biofilm (Fig. 39); ocenę przeżywalności oceniano po upływie 48 godzin od momentu inokulacji. Szczep *Methylobacterium* sp. 1117 charakteryzował się największym udziałem komórek żywych (99 %).

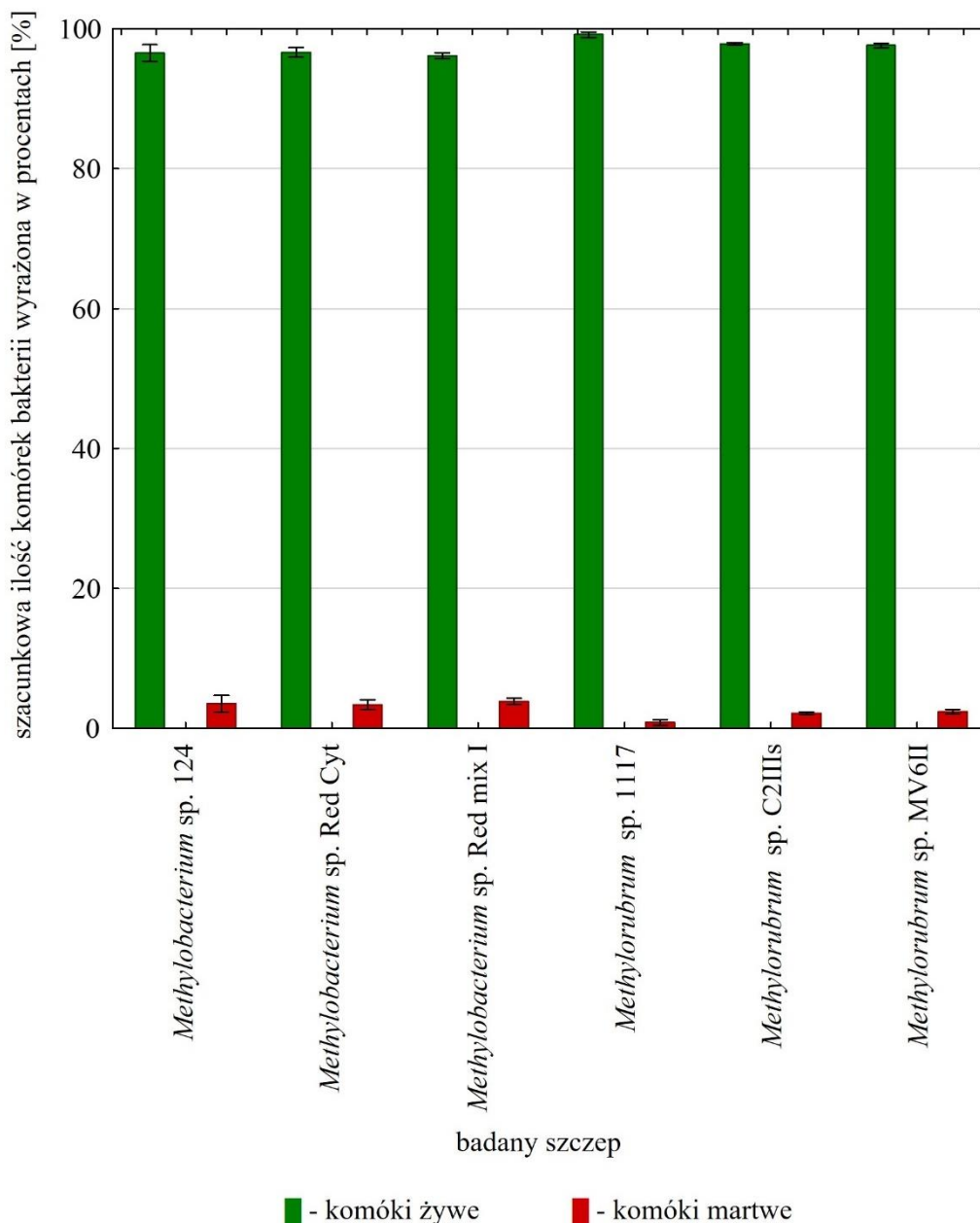


Fig. 39. Ocena przeżywalności komórek bakteryjnych tworzących biofilm, określona z wykorzystaniem zestawu LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, przy użyciu laserowego mikroskopu konfokalnego Zeiss Axiovert 200M. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe dla siedmiu powtórzeń

4.3.10. Określenie zdolności bakterii do wykorzystywania kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACC), jako jedyne źródła azotu

W celu ewaluacji zdolności badanych szczepów do rozkładu kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACC), oceniono możliwość wzrostu badanych szczepów na podłożach Dworkina i Fostera oraz podłożu minimalnym MM z dodatkiem ACC jako jedyne źródła azotu (podrozdział 3.2.4.10). Po upewnieniu się, że czerwień fenolowa nie wpływa

na wzrost badanych bakterii (dane nieprezentowane), barwnik ten zastosowano jako wskaźnik zmiany odczynu podłoża, dla monitorowania aktywności metabolicznej bakterii. Odbarwienie (zmiana pH) podłoża w próbie kontrolnej i próbie pozytywnej, przy jednoczesnym braku odbarwień podłoża w kontroli negatywnej, uznawano za wynik pozytywny.

Wykazano, że wszystkie szczepy należące do rodzajów *Methylobacterium* oraz *Methylorubrum* charakteryzują się pozytywnym wynikiem testu jakościowego na zdolność do rozkładu ACC (Fig. 40). Szczepy należące do rodzaju *Micromonospora* nie wykazały zdolności do rozkładu ACC poprzez wzrost na podłożu zawierającym ten związek jako jedyne źródło azotu.

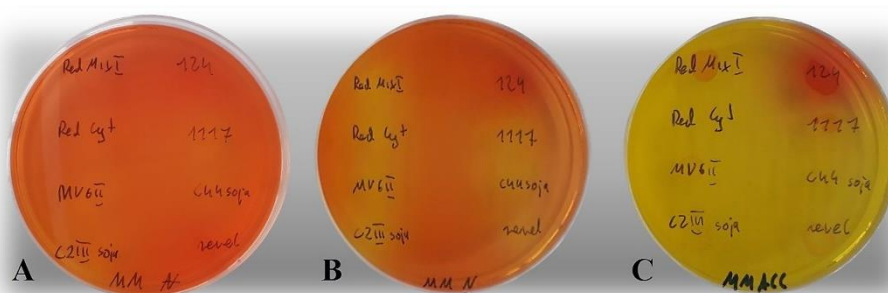


Fig. 40. Szczepy *Methylobacterium* oraz *Methylorubrum* na podłożu minimalnym MM: A) niezawierającym źródła azotu; B) zawierającym źródło azotu w postaci NH_4SO_4 ; C) zawierającym źródło azotu w postaci ACC. Odbarwienie podłoża wokół bakterii na podłożach zawierających źródło azotu (NH_4SO_4 lub ACC), przy jednoczesnym braku zmiany zabarwienia na podłożu kontrolnym bez źródła azotu, świadczy o zdolności do metabolizowania ACC jako jedyne źródła azotu

Dla szczepów dających pozytywny wynik na wykorzystywanie ACC jako jedyne źródła azotu, przeprowadzono ilościową ocenę zdolności rozkładu ACC, przy użyciu testu z ninhydriną. Na podstawie przeprowadzonej analizy wykazano (Fig. 41), że wszystkie badane szczepy należące do rodzajów *Methylobacterium* lub *Methylorubrum* charakteryzowała zdolność do wykorzystywania ACC jako jedyne źródła azotu. Poszczególne szczepy bakterii charakteryzowały się zróżnicowanym wykorzystaniem ACC, zawierającym się w zakresie od 0,83 do 1,08 mM (zawartość ACC w hodowlach płynnych badanych bakterii mierzono po upływie sześciodniowej inkubacji). Szczep *Methylorubrum* sp. C44s charakteryzował się największym potencjałem do wykorzystywania ACC jako jedyne źródła azotu (wykorzystanie 1,08 mM ACC w trakcie sześciodniowej inkubacji).

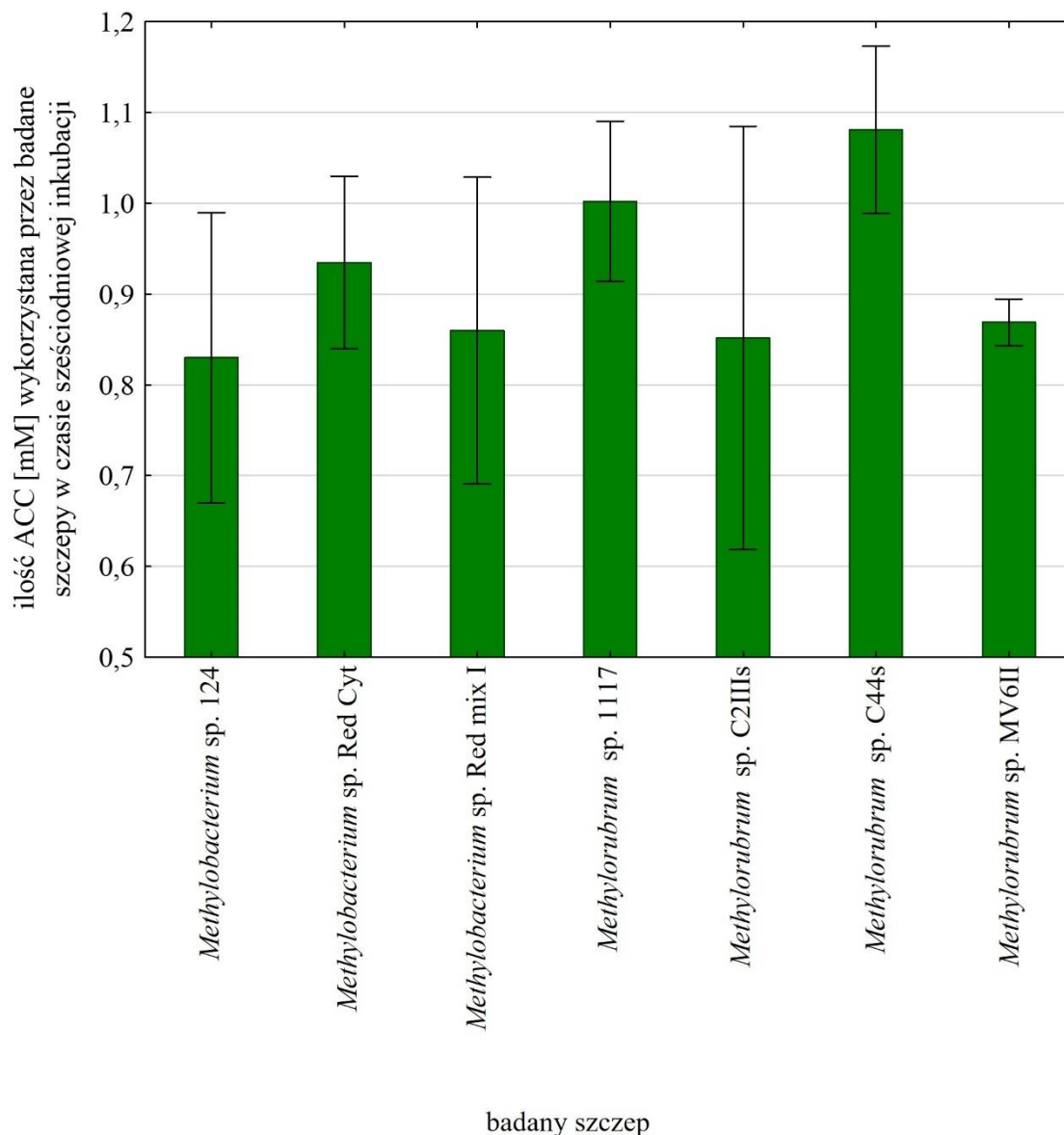


Fig. 41. Ilość ACC [mM] wykorzystana przez badane bakterie po sześciodniowej inkubacji w temperaturze 28 °C. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe

4.3.11. Określenie zdolności bakterii do wiązania azotu atmosferycznego

W celu oceny zdolności bakterii do wiązania azotu atmosferycznego, określono zdolność bakterii do wzrostu w zmodyfikowanym podłożu NFb, charakteryzującym się brakiem związków azotu (podrozdział 3.2.4.11). Bakterie wsiewano do próbek zawierających podłoże półpłynne, dzięki czemu ograniczano dostęp toksycznego dla większości rodzajów nitrogenaz tlenu do komórek bakterii. Pojawiającą się tuż pod powierzchnią podłoża charakterystyczną błonę bakteryjną, świadczącą o działaniu enzymu nitrogenazy i wzroście danego szczepu, pobierano za pomocą pipety i przenoszono do nowej porcji świeżej pożywki. Po-

jawienie się w drugim i trzecim pasażu charakterystycznej błony uznawano za wynik pozytywny; jako kontrolę pozytywną wykorzystano diazotroficzny szczep *Azospirillum lipoferum* D74 (Fig. 42A). Wykazano, że jedynie szczep *Methylobacterium* sp. Red Cyt (Fig. 42B) dał wynik pozytywny na wiązanie azotu atmosferycznego; wytwarzanie błony bakteryjnej odnotowano również w przypadku szczepu *Methylobacterium* sp. C2III, jednak błona bakteryjna pojawiała się jedynie w czasie pierwszego pasażu.

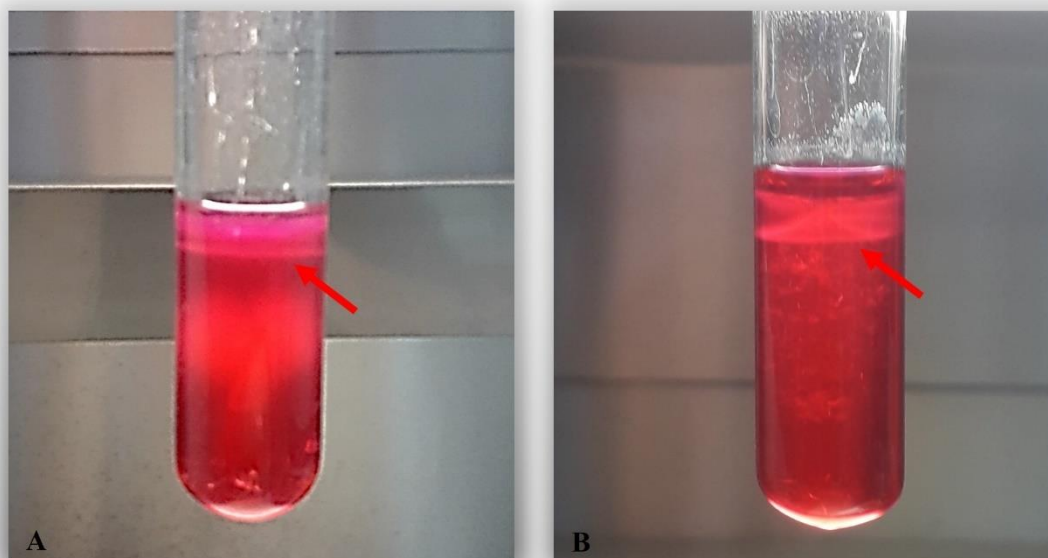


Fig. 42. Błona bakteryjna (zaznaczono czerwoną strzałką), świadcząca o potencjale bakterii do wiązania azotu atmosferycznego: A) szczep *Azospirillum lipoferum* (kontrola pozytywna); B) szczep *Methylobacterium* sp. Red Cyt

4.3.12. Określenie zdolności bakterii do produkcji kwasu indolilo-3-octowego (IAA) oraz indolu

W doświadczeniu oceniono zdolność badanych bakterii endofitycznych do produkcji IAA oraz indolu, substancji związanych z promowaniem wzrostu roślin (podrozdział 3.2.4.12). Bakterie hodowano w podłożach płynnych zawierających L-tryptofan, będący substratem w procesie biosyntezy IAA oraz indolu, w celu oceny zdolności badanych szczepów do produkcji tych metabolitów. Po dodaniu odczynnika Salkowskiego mierzono absorbancję próbki i odczytywano na spektrofotometrze przy długości fali 530 nm. Uzyskane wyniki odczytów porównano ze sporządzoną uprzednio krzywą wzorcową dla kwasu indolilo-3-octowego. W przypadku testu na indol, pojawienie się czerwono-fioletowego pierścienia na powierzchni hodowli bakteryjnych po dodaniu odczynnika Kovacs traktowano jako reakcję pozytywną.

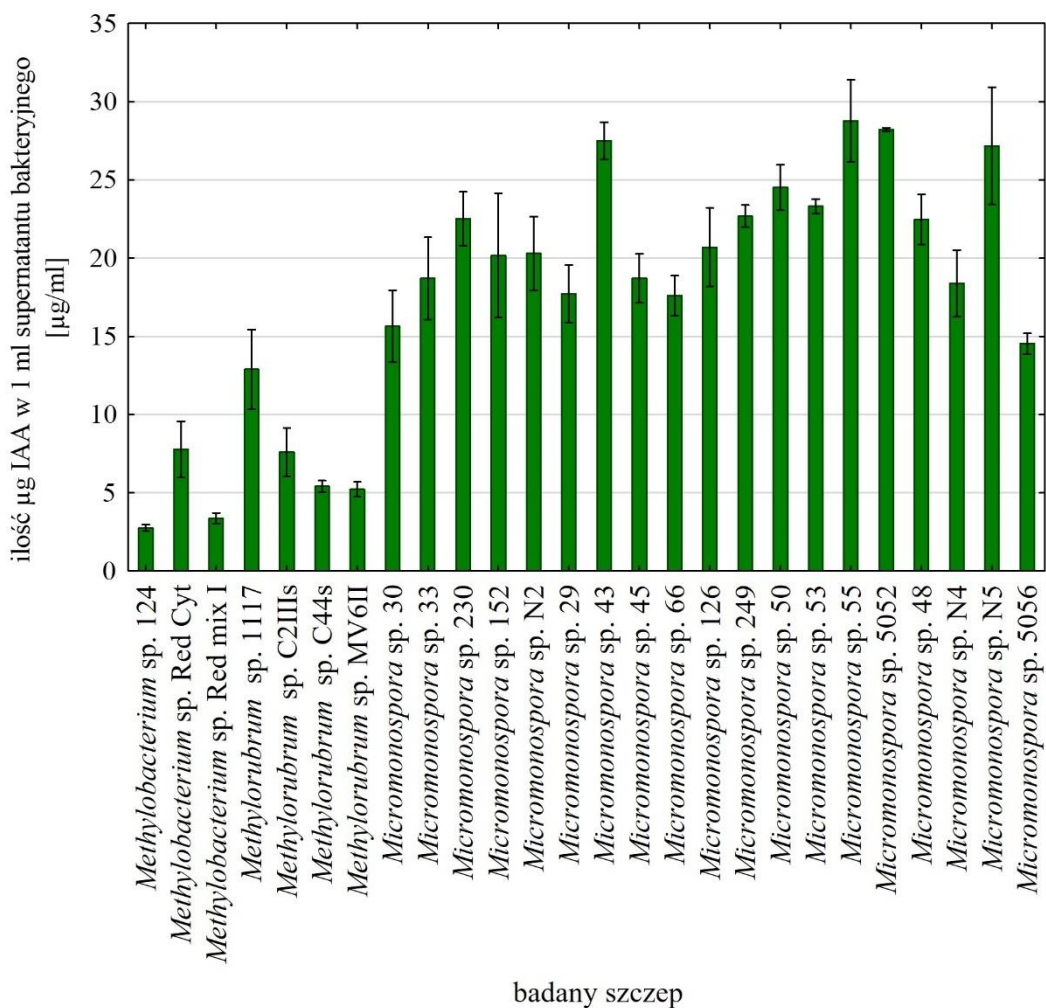


Fig. 43. Produkcja IAA ($\mu\text{g/ml}$) w 1 ml supernatantu bakteryjnego. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe

Wykazano, że wszystkie badane szczepy wykazują zdolność do produkcji IAA (Fig. 43). Szczepy *Micromonospora* sp. 43, *Micromonospora* sp. 55, *Micromonospora* sp. 5052 oraz *Micromonospora* sp. N5 charakteryzowały się największym potencjałem do produkcji związków o charakterze auksyn (ponad $26 \mu\text{g}$ w 1 ml supernatantu bakteryjnego). Szczepy *Methylobacterium* sp. 124 oraz *Methylobacterium* sp. Red Mix I wykazały najmniejszą zdolność do produkcji tych związków (poniżej $4 \mu\text{g}$ w 1 ml supernatantu).

Jednocześnie wykazano, że żaden z badanych szczepów bakterii endofitycznych nie produkował indolu (brak czerwonego pierścienia po dodaniu odczynnika Kovacsa).

4.3.13. Określenie tolerancji bakterii wobec różnych stężeń wybranych pierwiastków (arsenu, glinu, miedzi)

Badane szczepy bakterii endofitycznych oceniono pod kątem tolerancji różnych stężeń wybranych pierwiastków w podłożu, tj. jonów arsenu, glinu oraz miedzi. Szczepy wysiewano na podłoża stałe: ISP2 w przypadku szczepów *Micromonospora* lub 79CA z dodatkiem 1 % v/v metanolu w przypadku szczepów należących do rodzajów *Methylobacterium*/*Methylorubrum*, o określonej zawartości jonów wynoszącej od 1 do 18 mM (podrozdział 3.2.4.13). Wzrost bakterii na danym podłożu uznawano za wynik pozytywny.

Wykazano, że badane szczepy charakteryzowały się zróżnicowaną tolerancją na obecność jonów metali/półmetali w podłożu (Fig. 44). Pięć spośród dwudziestu sześciu badanych szczepów (*Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylorubrum* sp. 1117, *Methylorubrum* sp. C2III_s oraz *Micromonospora* sp. 5056) charakteryzowało się opornością na wszystkie badane pierwiastki, jednak w różnym zakresie: od 1 do 18 mM dla jonów arsenu, od 1 do 2 mM dla jonów glinu oraz od 1 do 6 mM dla jonów miedzi. Wszystkie szczepy należące do rodzajów *Methylobacterium* i *Methylorubrum* oraz osiem szczepów z rodzaju *Micromonospora* charakteryzowało się tolerancją na obecność arsenu w podłożu (1-18 mM); dwanaście badanych szczepów (*Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Methylorubrum* sp. 1117, *Methylorubrum* sp. C2III_s, *Methylorubrum* sp. C44_s, *Methylorubrum* sp. MV6II oraz *Micromonospora* sp. 33, *Micromonospora* sp. 43, *Micromonospora* sp. 5052, *Micromonospora* sp. 48, *Micromonospora* sp. N5 i *Micromonospora* sp. 5056) wykazało oporność na obecność jonów glinu w podłożu (1-2 mM); pięć szczepów (*Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylorubrum* sp. 1117, *Methylorubrum* sp. C2III_s oraz *Micromonospora* sp. 5056) charakteryzowało się tolerancją na obecność jonów miedzi (1-6 mM). Dziesięć szczepów, należących do rodzaju *Micromonospora*, wykazało wrażliwość na wszystkie badane pierwiastki i charakteryzowało się niezdolnością do wzrostu na podłożach z dodatkiem arsenu, miedzi i glinu. Największą opornością wobec jonów arsenu charakteryzowały się szczepy *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Methylorubrum* sp. 1117, *Methylorubrum* sp. C2III_s, *Methylorubrum* sp. C44_s, *Methylorubrum* sp. MV6II, *Micromonospora* sp. 33, *Micromonospora* sp. 5052 oraz *Micromonospora* sp. 48, cechujące się zdolnością do wzrostu na podłożach zawierających 18 mM jonów tego pierwiastka (Fig.45). Szczepy *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Methylorubrum* sp. 1117, *Methylorubrum* sp. C2III_s, *Methylorubrum* sp. C44_s i *Methylorubrum* sp. MV6II wykazały również

najwyższą opornością na zawartość jonów glinu w podłożu (2 mM). Szczep *Methylobacterium* sp. Red Mix I wyróżniał się na tle innych szczepów stosunkowo wysokim stopniem tolerancji na zawartość jonów miedzi, tj. w stężeniu 6 mM (Fig. 46).

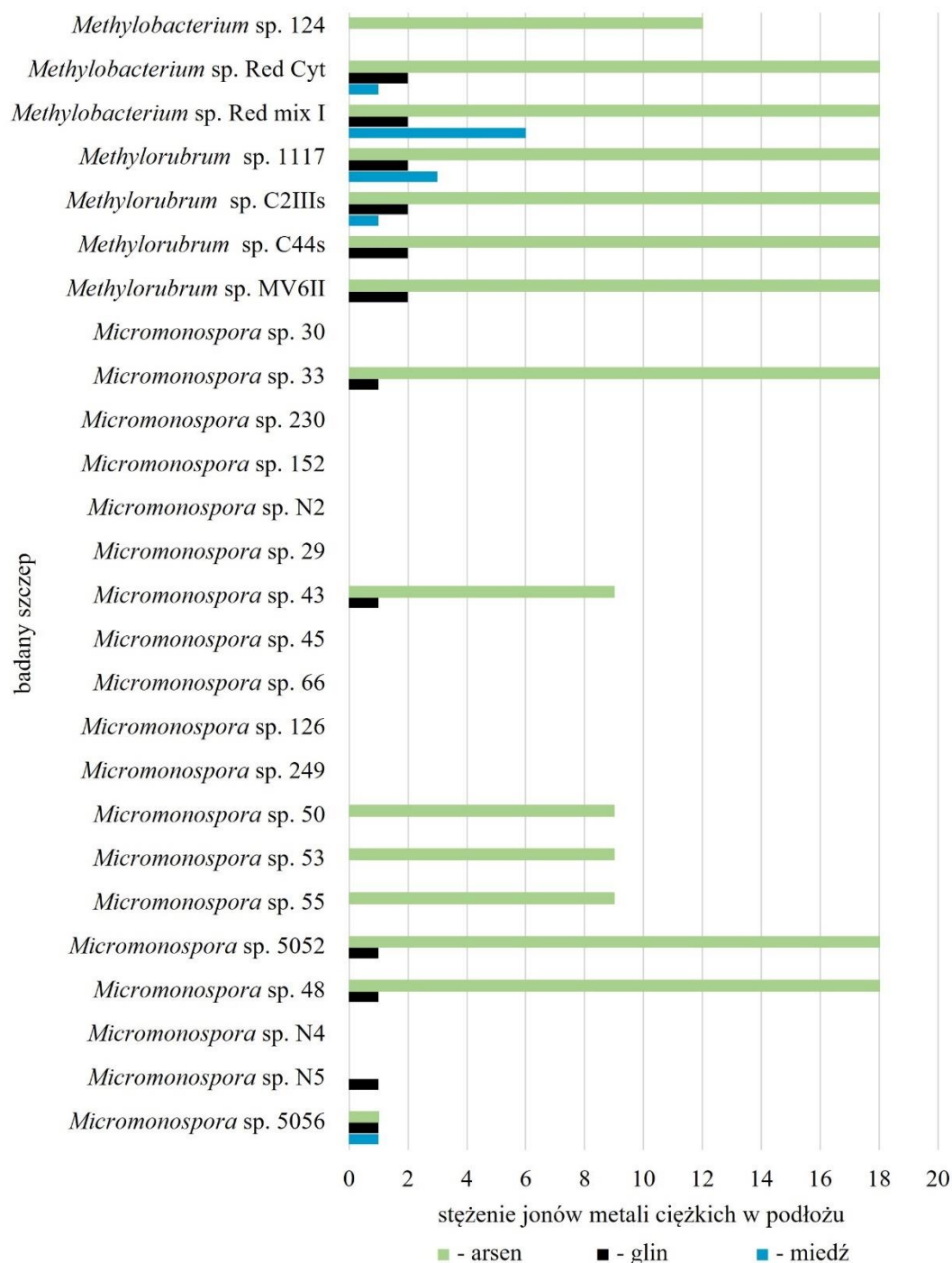


Fig. 44. Wzrost szczepów bakteryjnych na podłożach z jonami arsenu, glinu i miedzi, zawartych w podłożu 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v; *Methylobacterium*/*Methylobacterium* lub ISP2 (*Micromonospora*))

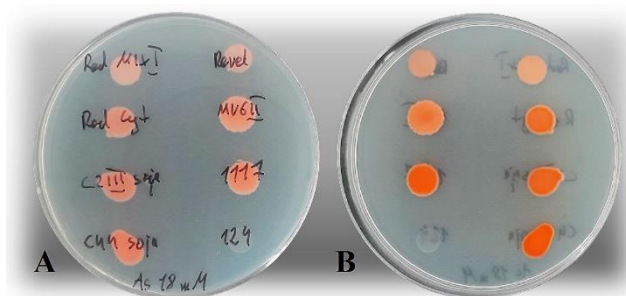


Fig. 45. Szczepy *Methylobacterium* oraz *Methylorubrum* na podłożu 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v) oraz jonów arsenu w stężeniu 18 mM; A – rewers, B – awers

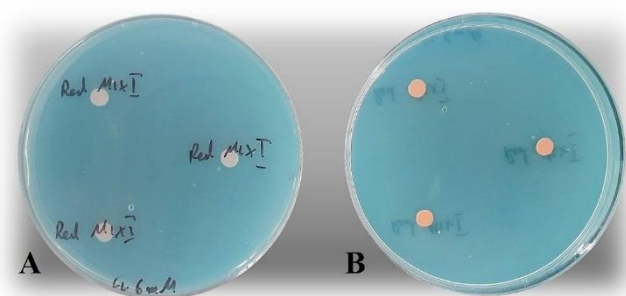


Fig. 46. Szczep *Methylobacterium* sp. Red Mix I na podłożu 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v) oraz jonów miedzi w stężeniu 6 mM; A – rewers, B – awers

4.3.14. Określenie zdolności bakterii do produkcji metaloforów

Badane izolaty poddano ocenie zdolności do produkcji związków chelatujących jony żelaza (siderofory) oraz jony miedzi, glinu i arsenu (metalofory) (podrozdział 3.2.4.14). Ponieważ należące do rodzaju *Micromonospora* szczepy nie wykazały zdolności do wzrostu na podłożu minimalnym CAS, standardowo wykorzystywanym w tego typu badaniach (Schwyn i Neilands, 1987), test przeprowadzono w oparciu o metodę korków agarowych, wycinanych z hodowli agarowych badanych bakterii (79CA z 1 % v/v dodatkiem metanolu dla *Methylobacterium/Methylorubrum* oraz ISP2 dla *Micromonospora*) i umieszczanych na powierzchni podłoża stałego CAS, zawierającego odpowiednie jony metali (Fig. 47). Pojawienie się czerwono-pomarańczowych przebarwień podłoża wokół korków agarowych interpretowano jako wynik pozytywny, świadczący o zdolności szczepu do wytwarzania metaloforów i pobierania jonów metali z podłoża.

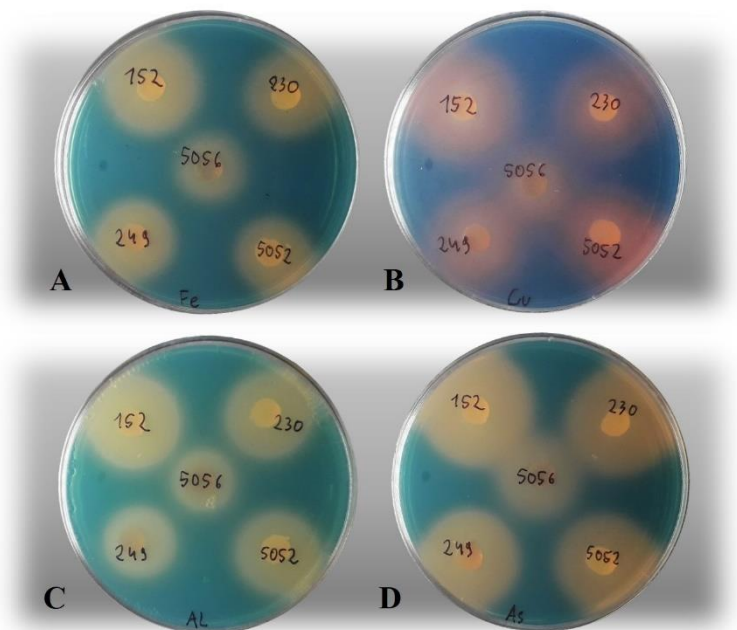


Fig. 47. Zdolność do produkcji metaloforów przez szczepy *Micromonospora* na podłożu CAS zawierającym jony: A) żelaza; B) miedzi; C) glinu; D) arsenu

Wykazano, że dwadzieścia spośród dwudziestu sześciu badanych szczepów charakteryzuje się zdolnością do produkcji metaloforów (Fig. 48). Strefy przebarwień charakteryzowały się barwą od czerwono pomarańczowej do pomarańczowej, zaś ich średnica mieściła się w zakresie od 13 do 40 mm. Spośród wszystkich siedmiu szczepów należących do rodzaju *Methylobacterium* oraz *Methylorubrum*, jedynie szczep *Methylobacterium* sp. Red Mix I charakteryzował się zdolnością do produkcji metaloforów (pozytywny wynik testu dla jonów miedzi, glinu i arsenu) przy średnicach przebarwień w zakresie od 10 do 20 mm. Z kolei wszystkie spośród dziewiętnastu badanych szczepów z rodzaju *Micromonospora* wykazały zdolność do produkcji metaloforów ułatwiających sekwestrację wszystkich czterech badanych metali/metaloidów z podłoża CAS. Największe strefy przebarwień odnotowano w przypadku szczepów *Micromonospora* sp. 152, *Micromonospora* sp. 45, *Micromonospora* sp. 66 oraz *Micromonospora* sp. 126.

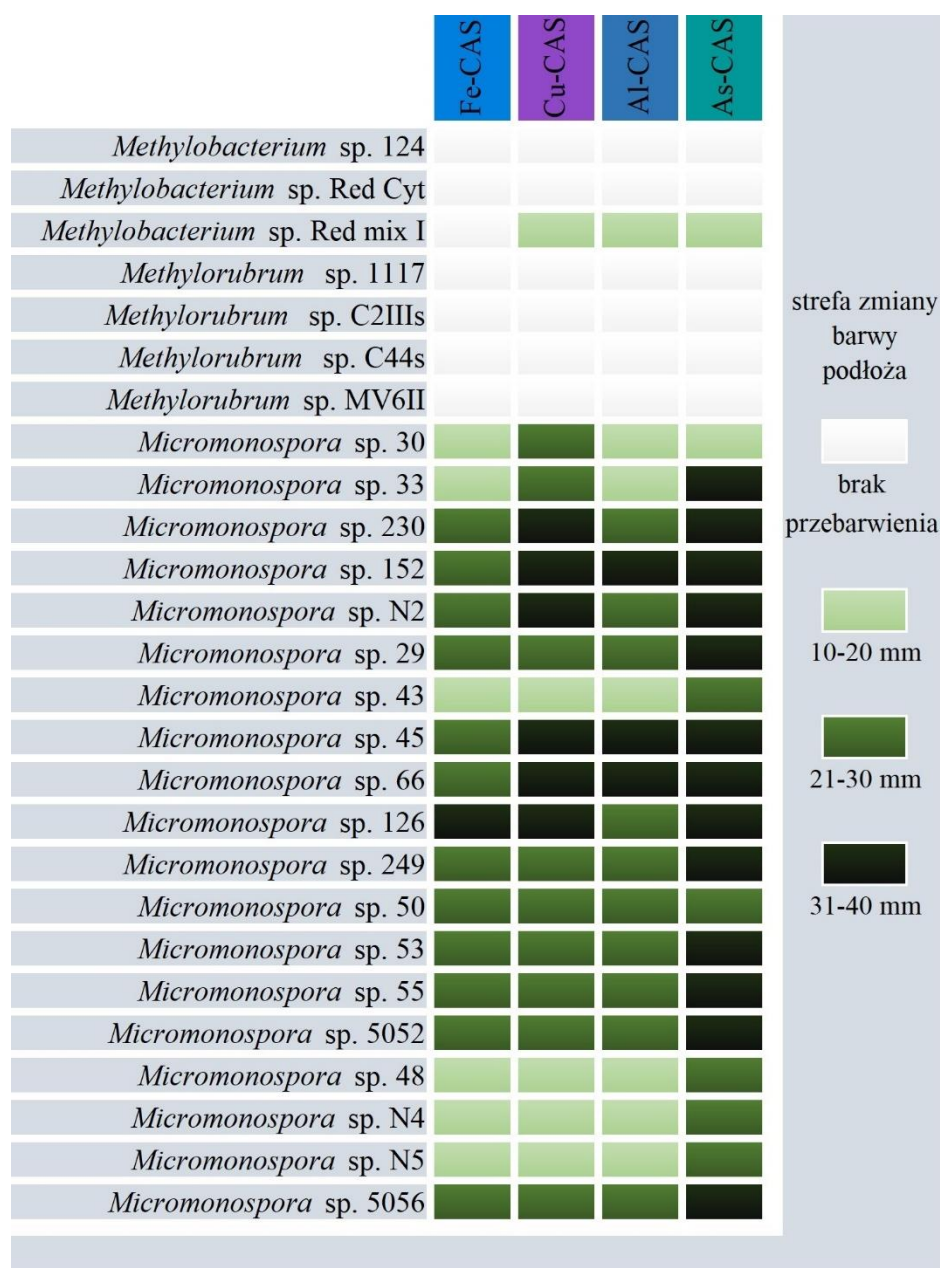


Fig. 48. Produkcja metaloforów na podłożu CAS z różnymi pierwiastkami (Fe, Cu, Al, As). Zakresy wielkości stref przebarwień zaznaczono w legendzie figury

Największe średnie strefy przebarwień odnotowano w przypadku podłoża zawierających jony arsenu – w przypadku trzynastu z dziewiętnastu badanych szczepów należących do rodzaju *Micromonospora* średnie stref przebarwień zawierały się w zakresie od 31 do 40 mm. Najmniejsze strefy przebarwień odnotowano w przypadku podłoża CAS zawierającego żelazo (jedynie w przypadku szczepu *Micromonospora* sp. 126 średnia strefa przebarwień zawierała się w przedziale od 31 do 40 mm).

4.3.15. Określenie zdolności bakterii do rozkładu trifosforanów (TCP)

W celu określenia zdolności badanych szczepów do uwalniania jonów fosforanowych z trudno rozpuszczalnej soli tego związku ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), bakterie hodowano na podłożu Pikowskaya (podrozdział 3.2.4.15). Pojawienie się przejaśnień wokół badanych szczepów świadczyło o uwalnianiu jonów fosforanowych, co uznawano za wynik pozytywny.

Wykazano, że trzy spośród dwudziestu sześciu badanych szczepów charakteryzowało się zdolnością do rozkładu zawartego w podłożu fosforanu (V) wapnia (Fig. 49): *Methylobacterium* sp. Red Mix I (Fig. 50), *Methylorubrum* sp. MV6II oraz *Micromonospora* sp. 230. W przypadku szczepu *Micromonospora* sp. 230 zaobserwowano największą strefę przejaśnienia wokół kolonii, wynoszącą średnio 11,5 mm.

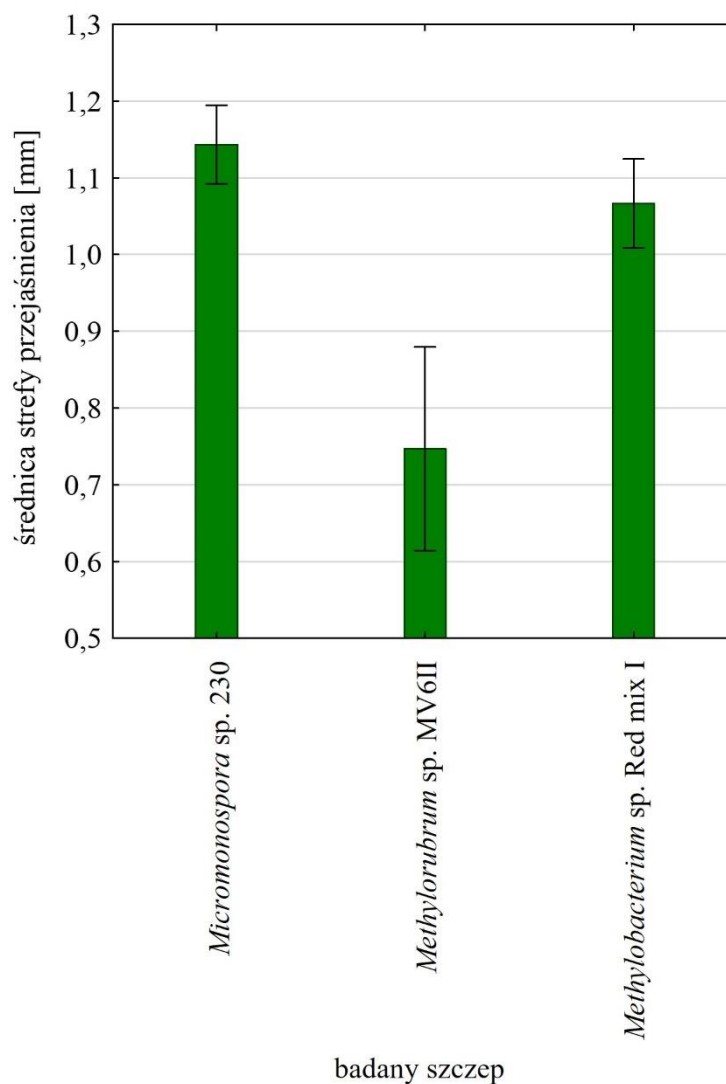


Fig. 49. Ocena zdolności badanych szczepów do rozkładu soli $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe

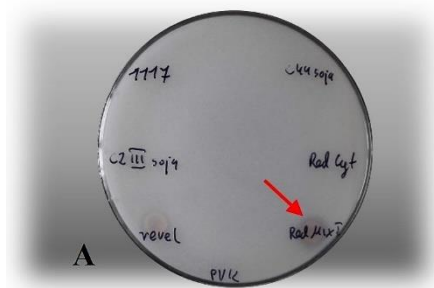


Fig. 50. Strefa przejśnienia (zaznaczono czerwoną strzałką) wokół kolonii szczepu *Methylobacterium* sp. Red Mix I na zmodyfikowanym podłożu Pikovskaya

4.3.16. Określenie zdolności bakterii do rozkładu celulozy

Ocenę zdolności bakterii do syntezy enzymów celulolitycznych przeprowadzono na podłożu z karboksymetylocelulozą (CMC, podrozdział 3.2.4.16). Czternastodniowe hodowle bakterii zalewano płynem Lugola i oceniano zdolność rozkładu celulozy przez badane szczepy. Nierozłożona karboksymetyloceluloza ulegała zabarwieniu, natomiast pojawienie się strefy przejśnienia wokół kolonii bakterii oznaczało rozkład celulozy, co stanowiło wynik pozytywny (Fig. 51).

Wykazano, że wszystkie z dwudziestu sześciu badanych szczepów charakteryzują się zdolnością do produkcji enzymów celulolitycznych (Fig. 52).

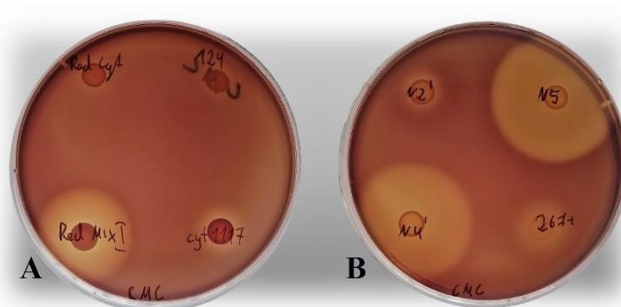


Fig. 51. Wzrost bakterii na podłożu z karboksymetylocelulozą. Strefa przejśnienia oznacza wynik pozytywny na rozkład CMC

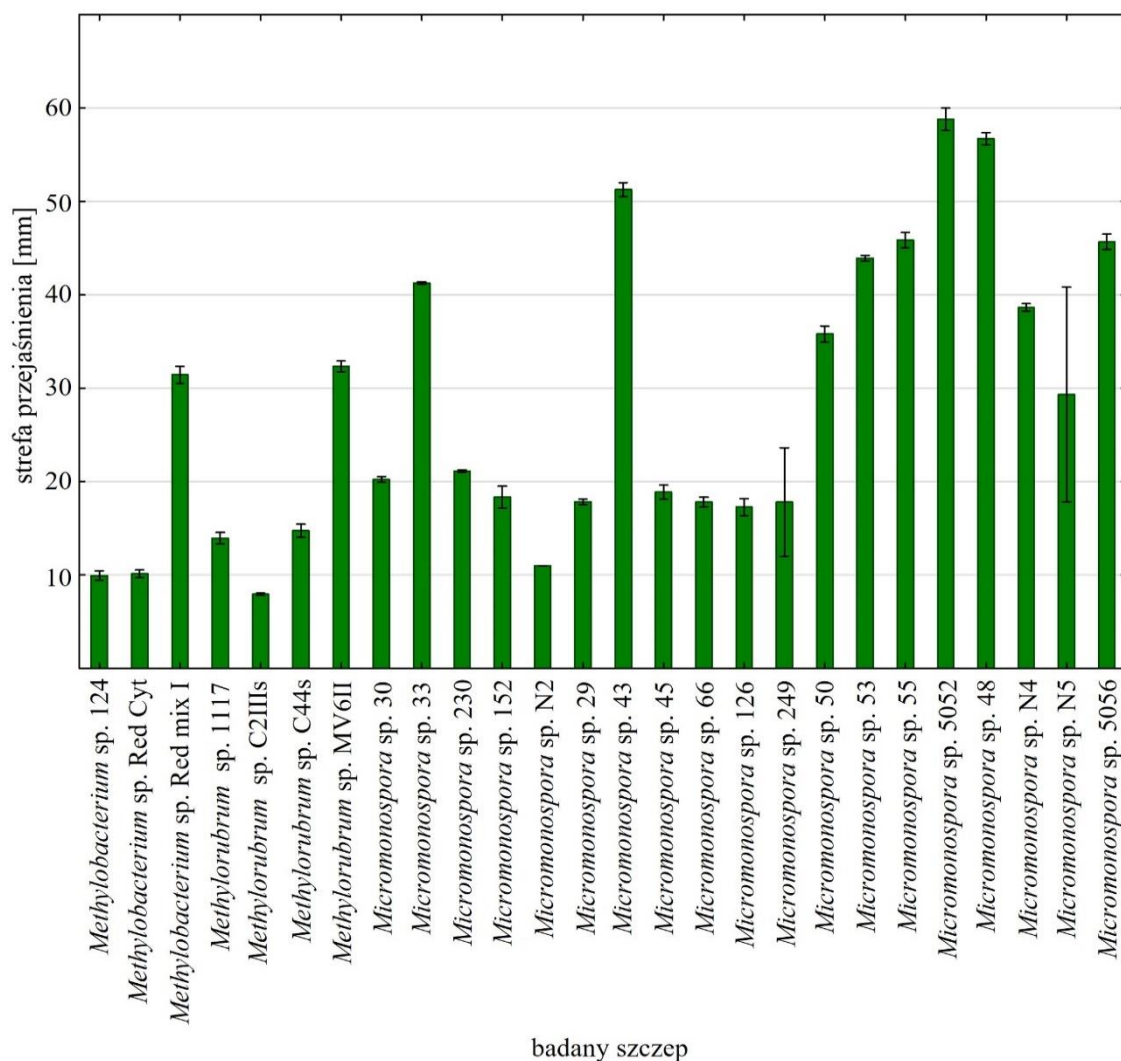


Fig. 52. Zdolność badanych szczepów do degradacji karboksymetylocelulozy. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe dla trzech powtórzeń

Szczepy *Micromonospora* sp. 43, *Micromonospora* sp. 5052 oraz *Micromonospora* sp. 48 charakteryzowały się największymi średnimi strefami przejśnienia (powyżej 50 mm). Szczep *Methylorubrum* sp. C2IIIa cechował się najmniejszą średnią strefą przejśnienia spośród wszystkich badanych szczepów, wynoszącą 8 mm.

4.3.17. Określenie zdolności bakterii do produkcji enzymów proteolitycznych

Zdolność badanych bakterii do wytwarzania enzymów proteolitycznych oceniono na podłożu z mlekiem w proszku (podrozdział 3.2.4.17). Pojawienie się strefy przejśnienia wokół kolonii bakteryjnej wskazywało na zdolność danego szczepu do produkcji enzymów proteolitycznych (wynik pozytywny).

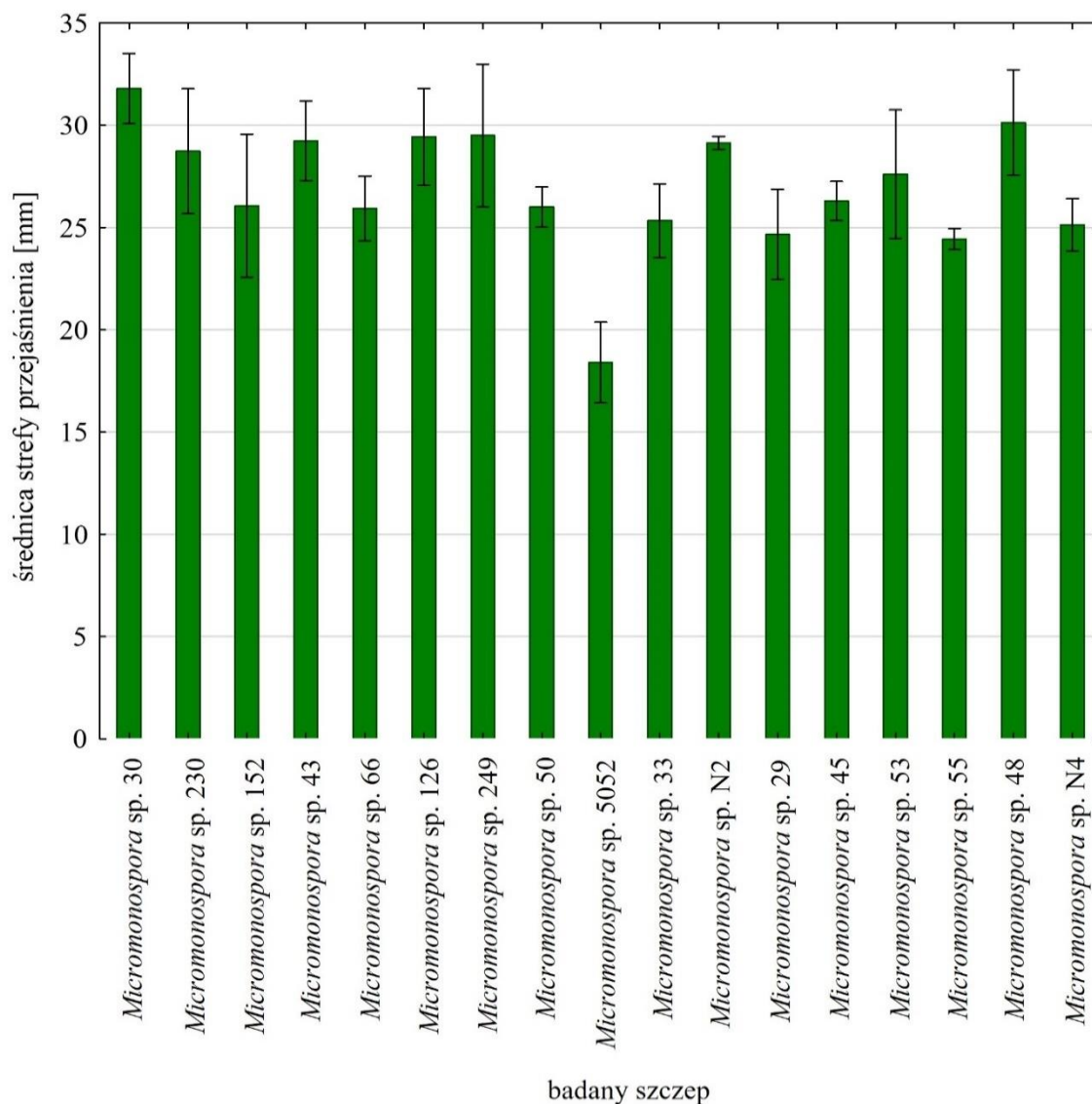


Fig. 53. Ocena zdolności badanych szczepów do produkcji enzymów proteolitycznych na podłożu z mlekiem w proszku. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe

Wykazano, że siedemnaście spośród dziewiętnastu szczepów z rodzaju *Micromonospora* charakteryzowało się zdolnością do wytwarzania enzymów proteolitycznych, uczestniczących w rozkładzie białek zawartych w mleku (Fig. 53). Strefa przejśnienia dla tych szczepów mieściła się w zakresie od 18 do 32 mm. Dla szczepów należących do rodzajów *Methylobacterium* i *Methylorubrum* oraz szczepów *Micromonospora* sp. 5056 i *Micromonospora* sp. N5 nie stwierdzono aktywności proteolitycznej w przeprowadzonym teście.

Największe średnie strefy przejśnienia powstały wokół kolonii szczepu *Micromonospora* sp. 30 oraz *Micromonospora* sp. 48 (powyżej 30 mm). Szczep *Micromonospora* sp. 5052 cechował się występowaniem najmniejszej średniej strefy przejśnienia (18 mm).

4.3.18. Określenie zdolności bakterii do rozkładu węglowodorów zawartych w oleju napędowym oraz przepracowanym oleju silnikowym

W celu określenia zdolności szczepów bakterii endofitycznych do wykorzystywania węglowodorów zawartych w oleju napędowym, bakterie hodowano w podłożu Bushnell Haas zawierającym jałowy olej napędowy jako jedyne źródło węgla (podrozdział 3.2.4.18). Szczepy wykazujące zdolność wzrostu w pożywce z jałowym olejem napędowym (przy kolejnych pasażach) oceniono jako wynik pozytywny.

Na podstawie wzrostu gęstości optycznej hodowli OD₆₀₀ wykazano, że szesnaście spośród dwudziestu sześciu badanych szczepów wykazało zdolność do wzrostu w podłożu zawierającym jałowy olej napędowy jako jedyne źródło węgla i energii. Pozytywnym wynikiem na wykorzystywanie węglowodorów zawartych w oleju napędowym charakteryzowały się wszystkie szczepy należące do rodzajów *Methylobacterium* oraz *Methylorubrum* oraz szczepy *Micromonospora* sp. 30, *Micromonospora* sp. 152, *Micromonospora* sp. N2, *Micromonospora* sp. 249, *Micromonospora* sp. 50, *Micromonospora* sp. 53, *Micromonospora* sp. 55, *Micromonospora* sp. N5 oraz *Micromonospora* sp. 5056.

Szczepy *Micromonospora* sp. N5 oraz *Micromonospora* sp. 5056 (Fig. 54), charakteryzowały się największą gęstością optyczną hodowli, świadczącą o największym potencjale do wykorzystywania różnych węglowodorów zawartych w oleju napędowym.

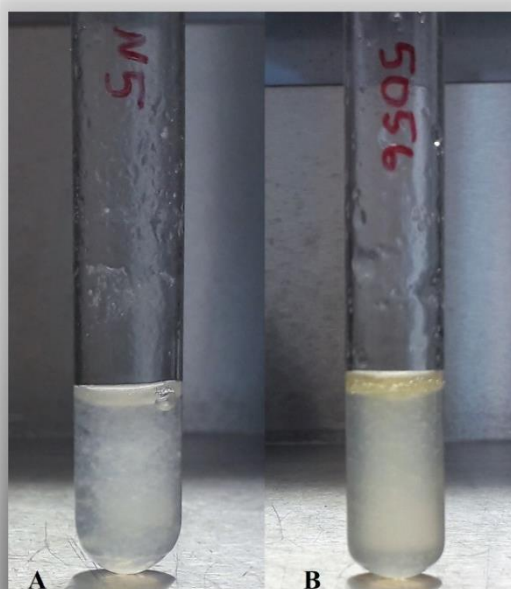


Fig. 54. Wzrost szczepów należących do rodzaju *Micromonospora* w podłożu zawierającym olej napędowy jako jedyne źródło węgla i energii (trzeci pasaż): A) *Micromonospora* sp. N5 oraz B) *Micromonospora* sp. 5056

Szczepy *Micromonospora* sp. N5 oraz *Micromonospora* sp. 5056 oceniono także pod kątem wzrostu w podłożu zawierającym jałowy, przepracowany olej silnikowy jako jedyne źródło węgla i energii. Wykazano, że obydwie szczepy charakteryzowały się zdolnością do wykorzystywania węglowodorów zawartych w przepracowanym oleju silnikowym jako źródła węgla i energii (Fig. 55).

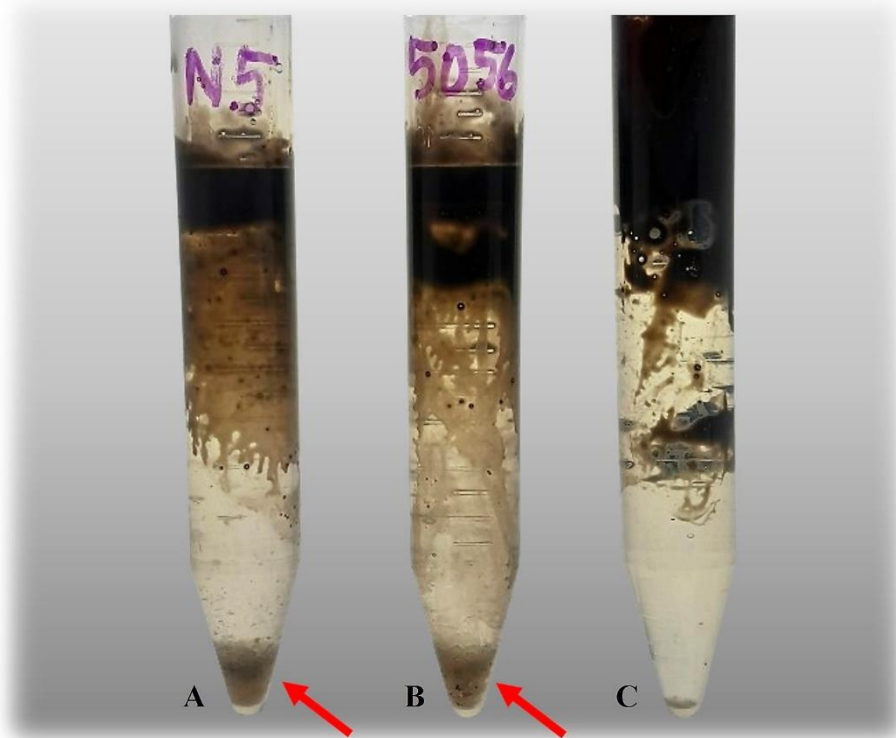


Fig. 55. Wzrost bakterii (czerwone strzałki) w podłożu Bushnell Haas zawierającym jałowy, przepracowany olej silnikowy jako jedyne źródło węgla (trzeci pasaż): A) *Micromonospora* sp. N5; B) *Micromonospora* sp. 5056; C) kontrola negatywna (bez bakterii)

4.3.19. Określenie zdolności bakterii do produkcji cyjanowodoru

Oceniono zdolność badanych bakterii do produkcji cyjanowodoru, gazowego związku nieorganicznego, wykazującego działanie toksyczne m.in. wobec fitopatogenów grzybowych. Wykonano test produkcji HCN z wykorzystaniem glicyny jako substratu, dodawanego do różnych podłoży dedykowanych badanym rodzajom bakterii endofitycznych oraz roztworu kwasu pikrynowego jako substancji umożliwiającej detekcję gazowego produktu (podrozdział 3.2.4.19). Pojawienie się różowego do ciemnoczerwonego zabarwienia na nasączonym fragmencie paska (z wykorzystaniem 2 % węglanu sodu w 0,5 % roztworze kwasu pikrynowego) oznaczało wynik pozytywny. Wykazano, że żaden z badanych szczepów z

rodzajów *Methylobacterium*, *Methylobacterium* i *Micromonospora* nie wykazał zdolności do produkcji cyjanowodoru z wykorzystaniem glicyny jako substratu.

4.4. Analiza właściwości antagonistycznych bakterii endofitycznych

4.4.1. Ocena zdolności bakterii do hamowania wzrostu fitopatogenów bakteryjnych

Badane bakterie badano pod kątem właściwości antagonistycznych wobec pięciu fitopatogenów bakteryjnych: *Erwinia amylovora* 659, *Agrobacterium tumefaciens* C58, *Xanthomonas vesicatoria* NCCB 92059, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 2905 oraz *Pectobacterium atrosepticum* NCCB 100429 (Tabela 3). Badane szczepy bakterii endofitycznych hodowano na podłożu SA1 przez 7 dni w temperaturze 20 °C (doświadczenie I) lub w temperaturze 28 °C (doświadczenie II) (podrozdział 3.2.5.1). Po tym czasie, zawiesiny szczepów fitopatogennych wysiewano w bezpośredniej bliskości kolonii badanych szczepów endofitycznych (0,5 cm, +/- 0,1 cm); następnie szalki inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 20 °C (doświadczenie I) lub 28 °C (doświadczenie II).

Wykazano, że w temperaturze 20 °C żaden z badanych szczepów nie wykazał zdolności do hamowania wzrostu fitopatogennych bakterii (nie stwierdzono charakterystycznych stref zahamowania wzrostu fitopatogennych bakterii). W przypadku doświadczenia II wykazano, że szczepy *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylobacterium* sp. 1117, *Methylobacterium* sp. MV6II oraz *Micromonospora* sp. 230 charakteryzują się zdolnością do hamowania wzrostu fitopatogenów bakteryjnych (Fig. 56).

	<i>E. amylovora</i> 659	<i>A. tumefaciens</i> C58	<i>X. vesicatoria</i> NCCB 92059	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 2905	<i>P. atrosepticum</i> NCCB 100429
<i>Methylobacterium</i> sp. 124					
<i>Methylobacterium</i> sp. Red Cyt		3,1-4 mm	2,1-3 mm	3,1-4 mm	3,1-4 mm
<i>Methylobacterium</i> sp. Red mix I					
<i>Methylorubrum</i> sp. 1117		1-2 mm			
<i>Methylorubrum</i> sp. C2IIIs					
<i>Methylorubrum</i> sp. C44s					
<i>Methylorubrum</i> sp. MV6II				2,1-3 mm	
<i>Micromonospora</i> sp. 30					
<i>Micromonospora</i> sp. 33					
<i>Micromonospora</i> sp. 230			1-2 mm		
<i>Micromonospora</i> sp. 152					
<i>Micromonospora</i> sp. N2					
<i>Micromonospora</i> sp. 29					
<i>Micromonospora</i> sp. 43					
<i>Micromonospora</i> sp. 45					
<i>Micromonospora</i> sp. 66					
<i>Micromonospora</i> sp. 126					
<i>Micromonospora</i> sp. 249					
<i>Micromonospora</i> sp. 50					
<i>Micromonospora</i> sp. 53					
<i>Micromonospora</i> sp. 55					
<i>Micromonospora</i> sp. 5052					
<i>Micromonospora</i> sp. 48					
<i>Micromonospora</i> sp. N4					
<i>Micromonospora</i> sp. N5					
<i>Micromonospora</i> sp. 5056					

brak
zahamowania
wzrostu

1-2 mm

2,1-3 mm

3,1-4 mm

Fig. 56. Zdolność badanych szczepów do hamowania wzrostu fitopatogenów bakteryjnych. Doświadczenie przeprowadzono w temperaturze 28 °C, pomiarów dokonywano po upływie 48 godzin od wysiewu szczepów patogennych

Szczep *Methylobacterium* sp. 1117 cechował się właściwościami antagonistycznymi wobec fitopatogenicznej bakterii *A. tumefaciens* C58 (Fig. 57AB). Szczep *Methylobacterium* sp. Red Cyt I charakteryzował się zdolnością do hamowania wzrostu czterech spośród pięciu badanych fitopatogenów: *A. tumefaciens* C58, *X. vesicatoria* NCCB 92059 (Fig. 57CD), *P. syringae* pv. *syringae* 2905 oraz *P. atrosepticum* NCCB 100429. Szczep *Methylobacterium* sp. MV6II wykazał zdolność do hamowania wzrostu *P. syringae* pv. *syringae* 2905, natomiast szczep *Micromonospora* sp. 230 hamował wzrost *X. vesicatoria* NCCB 92059. Żaden z badanych szczepów nie wykazał zdolności do hamowania wzrostu *E. amylovora* 659. Średnia średnica strefy zahamowania wzrostu fitopatogenów mieściła się w zakresie od 1 mm do 4 mm.

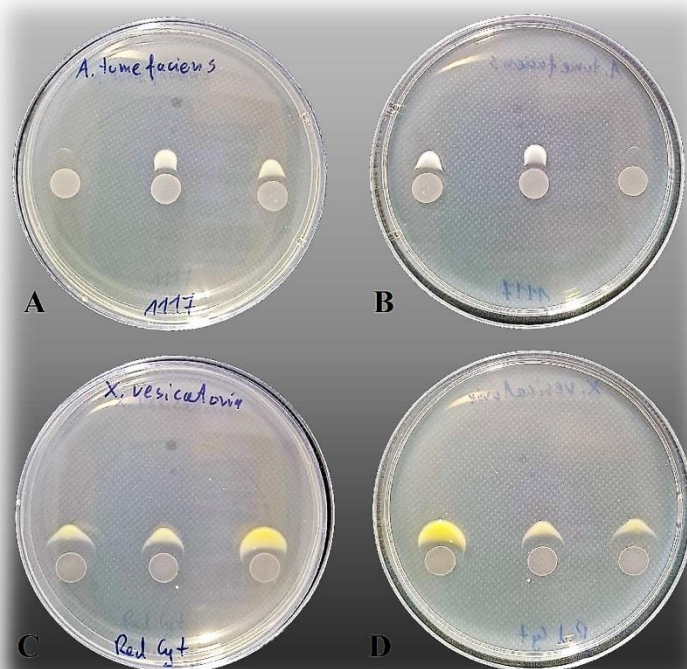


Fig. 57. Strefa zahamowania wzrostu fitopatogenicznych bakterii wokół badanych bakterii endofitycznych po upływie 48 godzin; A) szczep *Methylobacterium* sp. 1117 oraz *A. tumefaciens* C58 (rewers); B) szczep *Methylobacterium* sp. 1117 oraz *A. tumefaciens* C58 (awers); C) szczep *Methylobacterium* sp. Red Cyt oraz *X. vesicatoria* NCCB 92059 (rewers); D) szczep *Methylobacterium* sp. Red Cyt oraz *X. vesicatoria* NCCB 92059 (awers)

4.4.2. Ocena zdolności bakterii do hamowania wzrostu fitopatogenów grzybowych

Ocenę zdolności badanych szczepów bakteryjnych do hamowania wzrostu fitopatogennych grzybów: *Sclerotinia sclerotiorum* 10Ss01, *Botrytis cinerea* 10Bc01, *Fusarium oxysporum* 10Fo01, *Fusarium equiseti*, *Verticillium albo-atrum* CBS 745.83 (Tabela 4) przeprowadzono metodą podwójnych kultur na podłożu stałym. Doświadczenie wykonano w dwóch układach doświadczalnych: doświadczenie I – hodowla szczepów w temperaturze 20 °C, doświadczenie II – hodowla szczepów w 28 °C (podrozdział 3.2.5.2). Pojawienie się strefy zahamowania wzrostu grzyba wokół kolonii bakterii uznawano za wynik pozytywny.

Pomiary zahamowania wzrostu wykonywano po upływie 4 dni (*Sclerotinia sclerotiorum* 10Ss01, *Botrytis cinerea* 10Bc01), 6 dni (*Fusarium oxysporum* 10Fo01, *Fusarium equiseti*), lub 28 dni (*Verticillium albo-atrum* CBS 745.83). Wykazano, że żaden z dwudziestu sześciu testowanych szczepów bakteryjnych nie wykazał zdolności do hamowania wzrostu fitopatogennych grzybów w temperaturze 20 °C. W doświadczeniu II wykazano, że *Micromonospora* sp. 29, *Micromonospora* sp. 30, *Micromonospora* sp. 48, *Micromonospora* sp. 66 oraz *Micromonospora* sp. 152 wykazały zdolność do hamowania wzrostu fitopatogennych grzybów (Fig. 58). Powstałe wokół kolonii bakteryjnych strefy zahamowania wzrostu grzybów mieściły się w przedziale od 1 mm do 4 mm. Szczep *Micromonospora* sp. 66 charakteryzował się zdolnością do hamowania wzrostu fitopatogennych gatunków grzybów: *B. cinerea* 10Bc01, *F. oxysporum* 10Fo01 oraz *F. equiseti*. Szczep *Micromonospora* sp. 48 cechował się zdolnością do hamowania wzrostu szczepów *F. oxysporum* 10Fo01, *F. equiseti* oraz *V. albo-atrum* CBS 745.83. Szczep *Micromonospora* sp. 152 wykazał się antagonizmem względem patogenów należących do rodzaju *Fusarium*, zaś szczep *Micromonospora* sp. 29 wykazał zdolność do hamowania wzrostu szczepu *F. oxysporum* 10Fo01 (Fig. 59). Z kolei szczep *Micromonospora* sp. 30, wykazał się zdolnością do hamowania wzrostu fitopatogennego szczepu *V. albo-atrum* CBS 745.83.

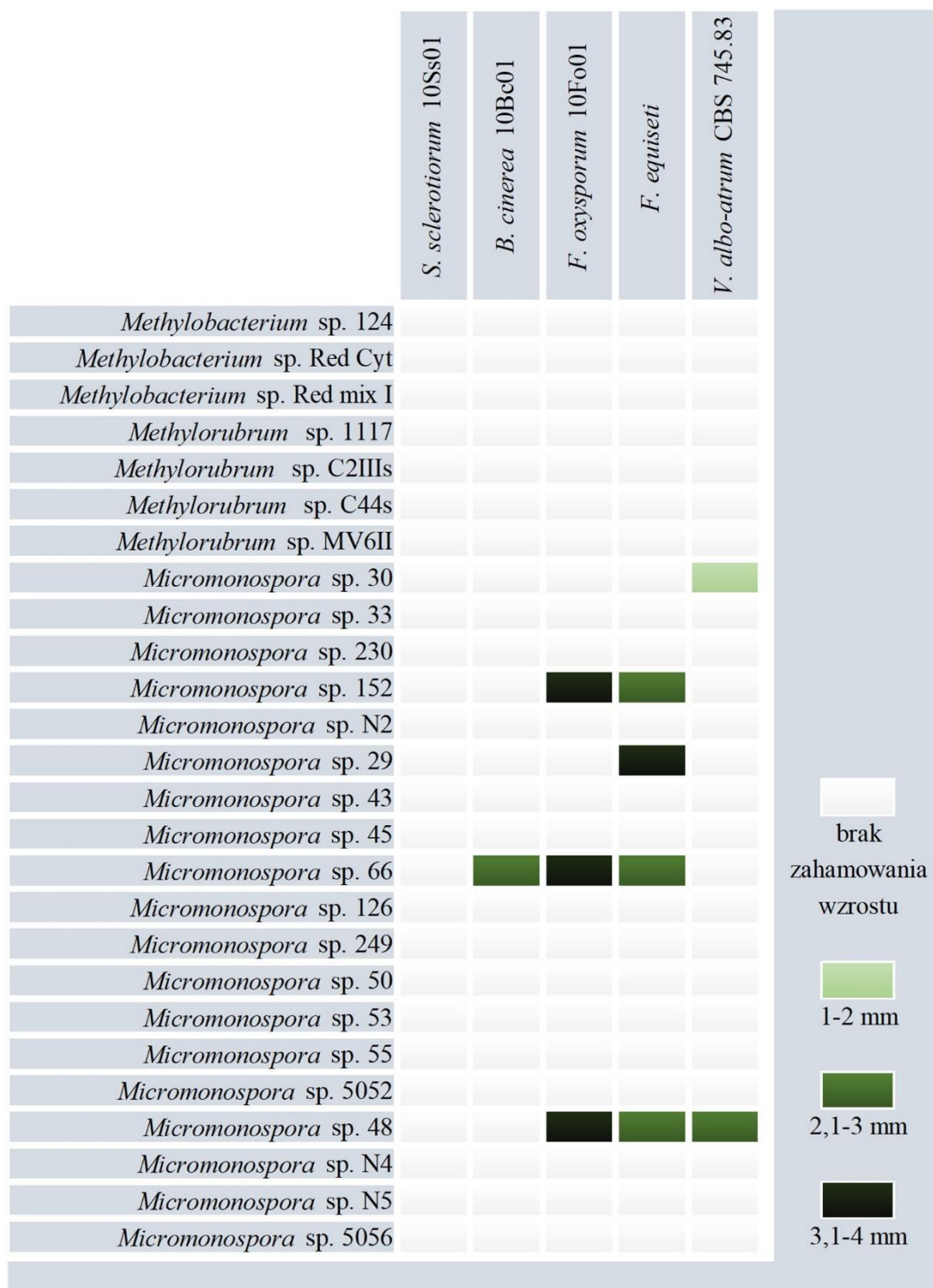


Fig. 58. Zdolność badanych szczepów do hamowania wzrostu fitopatogenów grzybowych. Doświadczenie przeprowadzono w temperaturze 28 °C

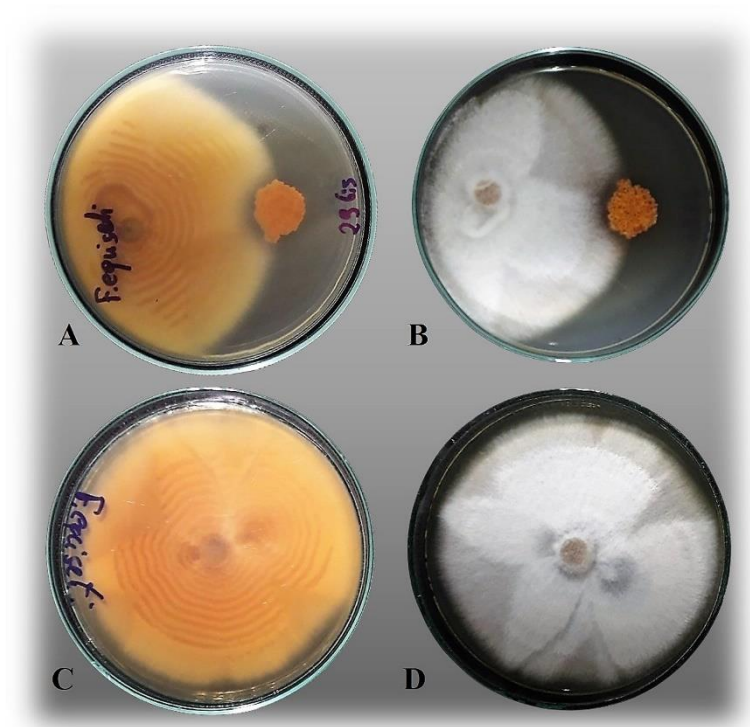


Fig. 59. Strefa zahamowania wzrostu fitopatogennych grzybów wokół szczepów bakterii endofitycznych; A) szczep *Micromonospora* sp. 29 oraz *F. equiseti* (rewers); B) szczep *Micromonospora* sp. 29 oraz *F. equiseti* (awers); C) fitopatogenny grzyb *Fusarium equiseti* - kontrola pozytywna (rewers); D) fitopatogenny grzyb *Fusarium equiseti* - kontrola pozytywna (awers)

4.5. Podsumowanie właściwości związanych ze zdolnością bakterii do kolonizacji wnętrza roślin oraz promowania ich wzrostu *in vitro*

Na podstawie przeprowadzonych testów biochemicznych oceniono zdolność badanych bakterii do realizowania wybranych mechanizmów związanych z kolonizacją wnętrza roślin oraz promowaniem wzrostu gospodarza roślinnego. Wyniki testów biochemicznych podsumowano w Tabeli 9, Tabeli 10 oraz Tabeli 11.

Tabela 9. Podsumowanie właściwości związanych ze zdolnością badanych bakterii do kolonizacji wnętrza roślin oraz promowania wzrostu gospodarza

	ruch	QS	biofilm	CMC	PROT	ON
<i>Methylobacterium</i> sp. 124	+	-	+	+	-	+
<i>Methylobacterium</i> sp. Red Cyt	+	-	+	+	-	+
<i>Methylobacterium</i> sp. Red Mix I	+	-	+	+	-	+
<i>Methylorubrum</i> sp. 1117	+	-	+	+	-	+
<i>Methylorubrum</i> sp. C2IIIIs	+	-	+	+	-	+
<i>Methylorubrum</i> sp. C44s	+	-	+	+	-	+
<i>Methylorubrum</i> sp. MV6II	-	+	+	+	-	+
<i>Micromonospora</i> sp. 30	-	n.b.	n.b.	+	+	+
<i>Micromonospora</i> sp. 33	-	n.b.	n.b.	+	+	-
<i>Micromonospora</i> sp. 230	-	n.b.	n.b.	+	+	-
<i>Micromonospora</i> sp. 152	-	n.b.	n.b.	+	+	+
<i>Micromonospora</i> sp. N2	-	n.b.	n.b.	+	+	+
<i>Micromonospora</i> sp. 29	-	n.b.	n.b.	+	+	-
<i>Micromonospora</i> sp. 43	-	n.b.	n.b.	+	+	-
<i>Micromonospora</i> sp. 45	-	n.b.	n.b.	+	+	-
<i>Micromonospora</i> sp. 66	-	n.b.	n.b.	+	+	-
<i>Micromonospora</i> sp. 126	-	n.b.	n.b.	+	+	-
<i>Micromonospora</i> sp. 249	-	n.b.	n.b.	+	+	+
<i>Micromonospora</i> sp. 50	-	n.b.	n.b.	+	+	+
<i>Micromonospora</i> sp. 53	-	n.b.	n.b.	+	+	+
<i>Micromonospora</i> sp. 55	-	n.b.	n.b.	+	+	+
<i>Micromonospora</i> sp. 5052	-	n.b.	n.b.	+	+	-
<i>Micromonospora</i> sp. 48	-	n.b.	n.b.	+	+	-
<i>Micromonospora</i> sp. N4	-	n.b.	n.b.	+	+	-
<i>Micromonospora</i> sp. N5	-	n.b.	n.b.	+	-	+
<i>Micromonospora</i> sp. 5056	-	n.b.	n.b.	+	-	+

ruch - zdolność do aktywnego ruchu; **QS** - zdolność do oddziaływań typu quorum sensing; **biofilm** - zdolność do tworzenia biofilmu; **CMC** - zdolność do rozkładu celulozy; **PROT** - zdolność produkcji enzymów proteolitycznych; **ON** – zdolność do rozkładu oleju napędowego; n.b. – nie badano

Tabela 10. Podsumowanie właściwości związanych ze zdolnością badanych bakterii do kolonizacji wnętrza roślin oraz promowania wzrostu gospodarza (cd.)

	N ₂	ACC	IAA	Ind	TCP	HCN	Bakt.	Grzyb.
<i>Methylobacterium</i> sp. 124	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Methylobacterium</i> sp. Red Cyt	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>Methylobacterium</i> sp. Red Mix I	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>Methylorubrum</i> sp. 1117	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>Methylorubrum</i> sp. C2IIIIs	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Methylorubrum</i> sp. C44s	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Methylorubrum</i> sp. MV6II	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>Micromonospora</i> sp. 30	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Micromonospora</i> sp. 33	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 230	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>Micromonospora</i> sp. 152	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Micromonospora</i> sp. N2	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 29	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Micromonospora</i> sp. 43	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 45	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 66	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Micromonospora</i> sp. 126	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 249	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 50	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 53	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 55	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 5052	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 48	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Micromonospora</i> sp. N4	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. N5	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i> sp. 5056	-	-	+	-	-	-	-	-

N₂ – zdolność do wiązania azotu atmosferycznego; **ACC** – zdolność do deaminacji ACC; **IAA** - zdolność do produkcji auksyn; **Ind** - zdolność do produkcji indolu; **TCP** - zdolność do rozpuszczania fosforanu wapnia; **HCN** - zdolność do produkcji cyjanowodoru; **Bakt.** - zdolność do hamowania wzrostu fitopatogenów bakteryjnych; **Grzyb.** - zdolność do hamowania wzrostu fitopatogenów grzybowych

Tabela 11. Podsumowanie właściwości związanych ze zdolnością badanych bakterii do kolonizacji wnętrza roślin oraz promowania wzrostu gospodarza (cd.)

	produkcja metaloforów				tolerancja na NaCl i sole metali/metaloidów			
	Fe	Cu	Al	As	NaCl [%]	Cu [mM]	Al [mM]	As [mM]
	<i>Methylobacterium</i> sp. 124	-	-	-	-	1	0	0
<i>Methylobacterium</i> sp. Red Cyt	-	-	-	-	1	1	2	18
<i>Methylobacterium</i> sp. Red Mix I	-	+	+	+	1	6	2	18
<i>Methylorubrum</i> sp. 1117	-	-	-	-	1	3	2	18
<i>Methylorubrum</i> sp. C2III _s	-	-	-	-	1	1	2	18
<i>Methylorubrum</i> sp. C44 _s	-	-	-	-	1	0	2	18
<i>Methylorubrum</i> sp. MV6II	-	-	-	-	1	0	2	18
<i>Micromonospora</i> sp. 30	+	+	+	+	1	0	0	0
<i>Micromonospora</i> sp. 33	+	+	+	+	3	0	1	18
<i>Micromonospora</i> sp. 230	+	+	+	+	1	0	0	0
<i>Micromonospora</i> sp. 152	+	+	+	+	1	0	0	0
<i>Micromonospora</i> sp. N2	+	+	+	+	1	0	0	0
<i>Micromonospora</i> sp. 29	+	+	+	+	1	0	0	0
<i>Micromonospora</i> sp. 43	+	+	+	+	2	0	1	9
<i>Micromonospora</i> sp. 45	+	+	+	+	1	0	0	0
<i>Micromonospora</i> sp. 66	+	+	+	+	1	0	0	0
<i>Micromonospora</i> sp. 126	+	+	+	+	1	0	0	0
<i>Micromonospora</i> sp. 249	+	+	+	+	1	0	0	0
<i>Micromonospora</i> sp. 50	+	+	+	+	2	0	0	9
<i>Micromonospora</i> sp. 53	+	+	+	+	2	0	0	9
<i>Micromonospora</i> sp. 55	+	+	+	+	2	0	0	9
<i>Micromonospora</i> sp. 5052	+	+	+	+	2	0	1	18
<i>Micromonospora</i> sp. 48	+	+	+	+	2	0	1	18
<i>Micromonospora</i> sp. N4	+	+	+	+	3	0	0	0
<i>Micromonospora</i> sp. N5	+	+	+	+	1	0	1	0
<i>Micromonospora</i> sp. 5056	+	+	+	+	1	1	1	1

produkcja metaloforów: **Fe** - zdolność do wychwytywania jonów żelaza na podłożu CAS; **Cu** - zdolność do wychwytywania jonów miedzi na podłożu CAS; **Al** - zdolność do wychwytywania jonów glinu na podłożu CAS; **As** - zdolność do wychwytywania jonów arsenu na podłożu

CAS; tolerancja na NaCl i sole metali/metaloidów: **NaCl** - zdolność do wzrostu na podłożu zawierającym NaCl [%]; **Cu** - zdolność do wzrostu na podłożu zawierającym jony miedzi [mM]; **Al** - zdolność do wzrostu na podłożu zawierającym jony glinu [mM]; **As** - zdolność do wzrostu na podłożu zawierającym jony arsenu [mM]

4.6. Doświadczenia roślinne

4.6.1. Wpływ inokulacji na energię i zdolność kiełkowania nasion

W doświadczeniu oceniono wpływ zabiegu inokulacji z wykorzystaniem badanych bakterii endofitycznych na energię i zdolność kiełkowania nasion koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) odm. Grasslands Huia oraz pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) odm. Foxx (podrozdział 3.2.6.3). Nasiona (po 30 nasion każdego gatunku) inokulowano zawiesiną szczepów ($OD_{600} = 0,2$) charakteryzujących się zdolnością do realizowania różnych mechanizmów związanych z kolonizacją roślin oraz promowaniem ich wzrostu przez bakterie i wykorzystanych w kolejnych doświadczeniach roślinnych: *Methylobacterium* sp. 124 (zdolność do rozkładu różnych źródeł węgla oraz oporność na różne substancje chemiczne), *Methylobacterium* sp. MV6II (zdolność do tworzenia biofilmu oraz oddziaływań typu *quorum sensing*), *Methylobacterium* sp. Red Cyt (zdolność do wiązania azotu oraz deaminacji ACC), *Methylobacterium* sp. Red Mix I (tolerancja na zawartość metali ciężkich/metaloidów w podłożu, zdolność do produkcji metaloforów), *Methylorubrum* sp. C2IIIs (tolerancja na zawartość metali ciężkich/metaloidów w podłożu), *Micromonospora* sp. 33 (tolerancja na zawartość metali ciężkich/metaloidów i produkcja IAA), *Micromonospora* sp. 48 (zdolność do rozkładu różnych źródeł węgla oraz CMC), *Micromonospora* sp. 55 (zdolność do produkcji enzymów hydrolitycznych oraz IAA), *Micromonospora* sp. 66 (zdolność do produkcji enzymów hydrolitycznych oraz metaloforów), *Micromonospora* sp. 152 (zdolność do produkcji metaloforów), *Micromonospora* sp. 230 (zdolność do rozkładu TCP), *Micromonospora* sp. 5056 (zdolność do produkcji IAA oraz rozkładu CMC i oleju napędowego) oraz *Micromonospora* sp. N5 (zdolność do produkcji IAA oraz rozkładu oleju napędowego). Próbę kontrolną stanowiły nasiona nieinokulowane, wytrząsane w jałowym podłożu płynnym Fahraeusa przed wyłożeniem na włókninę. Energię kiełkowania oceniono w czwartej dobie po inokulacji, natomiast zdolność kiełkowania w ósmej dobie; jako nasiona skiełkowane uznano nasiona o prawidłowo uformowanym korzonku zarodkowym.

Nasiona koniczyny białej charakteryzowały się wysokimi wartościami energii oraz zdolności kiełkowania; wartości te mieściły się w zakresie od 63,3 % do 96,7 %. Jak przedstawiono na wykresie (Fig. 60), energia i zdolność kiełkowania w przypadku próby kontrolnej (nasiona nieinokulowane) wynosiły po 86,7 %. Nasiona inokulowane zawiesinami szczepów: *Methylobacterium* sp. 124, *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Micromonospora* sp. 66, *Micromonospora* sp. 48 i *Micromonospora* sp. 5056 charakteryzowały się wyższą energią i zdolnością kiełkowania niż nasiona nieinokulowane; w przypadku obydwu parametrów wartości te mieściły się w zakresie od 90 % do 97 %. Nasiona inokulowane zawiesiną szczepu *Micromonospora* sp. 55 charakteryzowały się natomiast większą zdolnością kiełkowania (90 %) niż nasiona stanowiące próbę kontrolną; równocześnie inokulacja z wykorzystaniem tego szczepu nie wpłynęła na energię kiełkowania tych nasion.

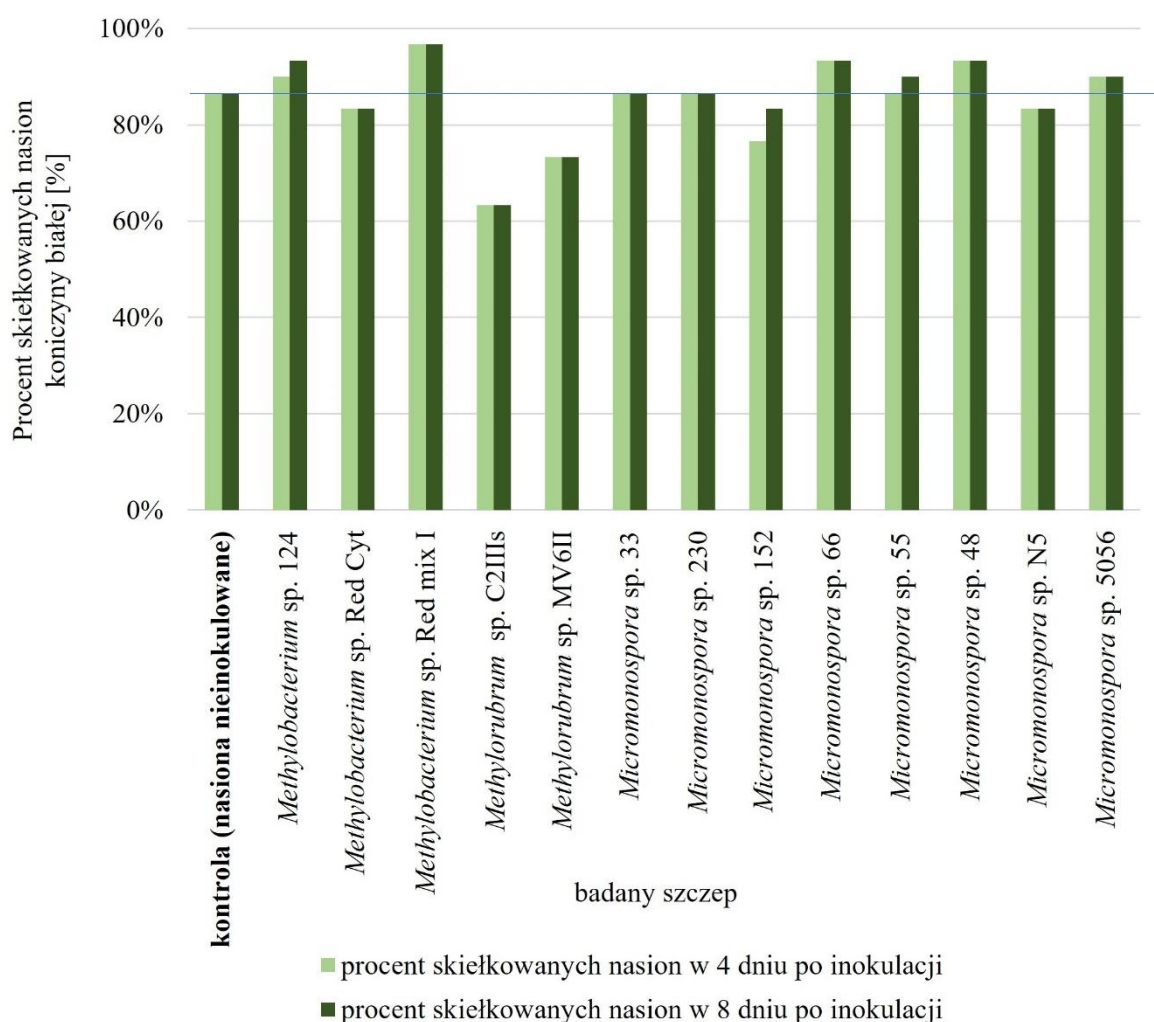


Fig. 60. Wpływ inokulacji zawiesinami bakterii endofitycznych na energię i zdolność kiełkowania nasion koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) odm. Grasslands Huia

W przypadku nasion koniczyny inokulowanych zawiesinami szczepów *Micromonospora* sp. 33 oraz *Micromonospora* sp. 230 nie stwierdzono żadnego wpływu inokulacji na energię i zdolność kiełkowania nasion koniczyny białej, natomiast w przypadku szczepów *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylorubrum* sp. C2III_s, *Methylorubrum* sp. MV6II, *Micromonospora* sp. 152 i *Micromonospora* sp. N5 stwierdzono efekt hamujący – wartości badanych parametrów mieściły się w przedziale od 63,3 % do 83,3 %. Nasiona inokulowane szczepem *Methylorubrum* sp. C2III_s charakteryzowały się natomiast najniższą siłą i zdolnością kiełkowania (po 63,3 %) spośród wszystkich badanych prób.

Wartość procentowa parametrów energii i zdolności kiełkowania nasion pszenicy zwyczajnej wahała się odpowiednio między 3,3 % a 33,3 % oraz 20 % a 53,3 % (Fig. 61); wartości te w przypadku próby kontrolnej wynosiły odpowiednio 16,7 % oraz 40 %.

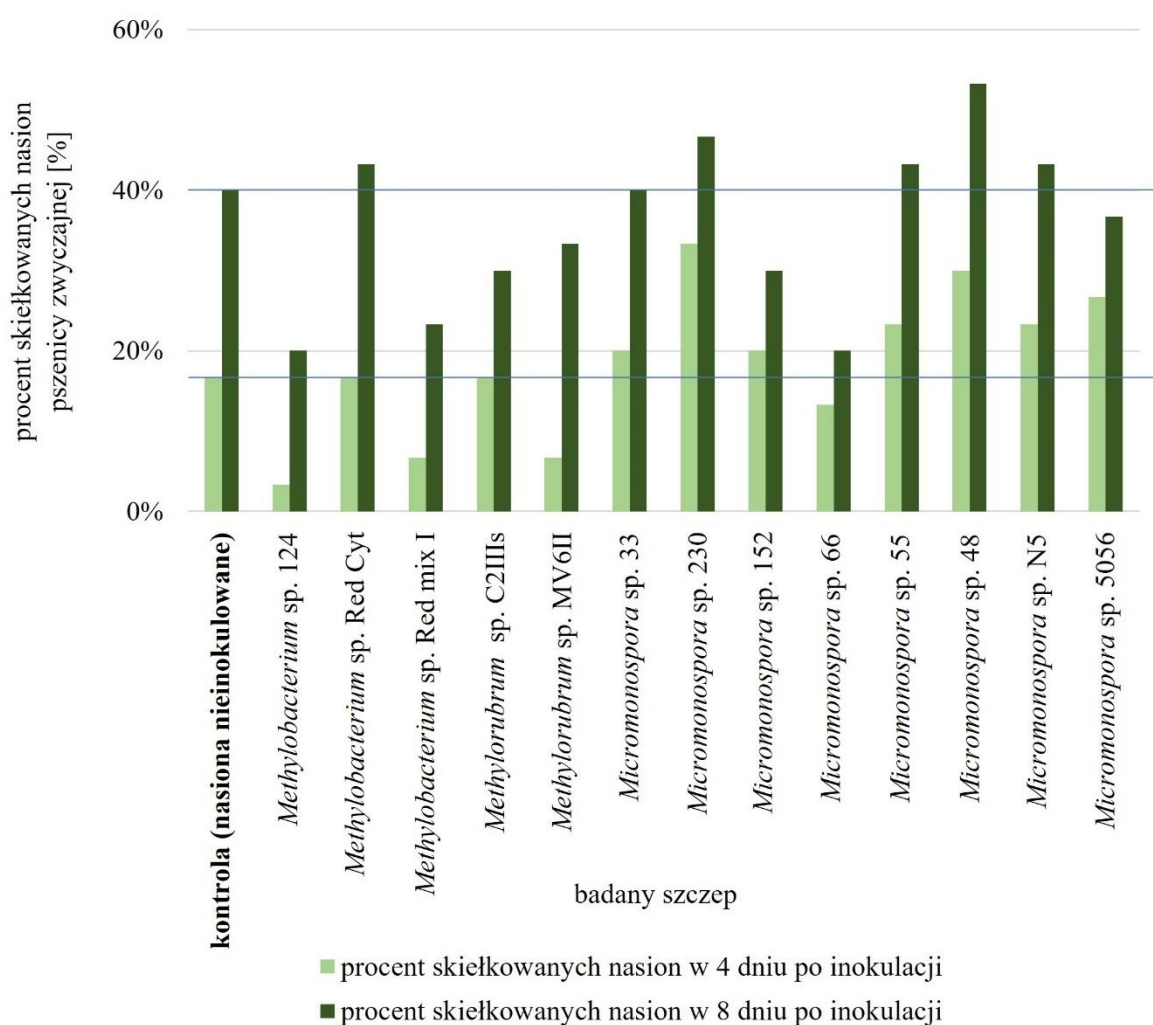


Fig. 61. Wpływ inokulacji zawiesinami bakterii endofitycznych na energię i zdolność kiełkowania nasion pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) odm. Foxx

Nasiona inokulowane zawiesiną szczepów *Micromonospora* sp. 230, *Micromonospora* sp. 55, *Micromonospora* sp. 48 oraz *Micromonospora* sp. N5 charakteryzowały się większą energią i zdolnością kiełkowania niż próba kontrolna i przyjmowały wartości w przedziale od 23,3 % do 33,3 % (energia kiełkowania) oraz od 43,3 % do 53,3 % (zdolność kiełkowania). Nasiona poddane bakteryzacji zawiesiną szczepu *Micromonospora* sp. 152 oraz *Micromonospora* sp. 5056 wykazały wyższą energię kiełkowania niż próba kontrolna (odpowiednio 20 % i 26,7 %), jednak w przypadku zdolności kiełkowania tych nasion wykazano efekt hamujący (odpowiednio 30 % i 36,7 %). Inokulacja z wykorzystaniem szczepu *Micromonospora* sp. 33 pozwoliła na zwiększenie wartości energii kiełkowania nasion (20 %), nie wpływając na zdolność kiełkowania. Nasiona inokulowane zawiesiną szczepu *Methylobacterium* sp. Red Cyt charakteryzowały się natomiast większą od nasion nieinokulowanych zdolnością kiełkowania (43,3 %), zaś energia kiełkowania nasion była taka sama jak w przypadku nasion stanowiących kontrolę. Inokulacja nasion szczepami *Methylobacterium* sp. 124, *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Methylobacterium* sp. C2III, *Methylobacterium* sp. MV6II i *Micromonospora* sp. 66 nie wpływała na energię i zdolność kiełkowania nasion pszenicy zwyczajnej; wartości tych parametrów były zbliżone do kontroli lub niższe (energia kiełkowania: od 3,3 % do 16,7 %; zdolność kiełkowania: od 20 % do 36,7 %).

4.6.2. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin, uprawianych w substracie torfowym

W doświadczeniu oceniono wpływ inokulacji siewek na długość i masę części nadziemnych koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) odm. Grasslands Huia oraz pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) odm. Foxx (podrozdział 3.2.6.4). Rośliny inokulowano zawiesinami szczepów charakteryzujących się zdolnością do realizowania różnych mechanizmów związanych z promowaniem wzrostu roślin: *Methylobacterium* sp. 124, *Methylobacterium* sp. MV6II, *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Micromonospora* sp. 48, *Micromonospora* sp. 55, *Micromonospora* sp. 66, *Micromonospora* sp. 152, *Micromonospora* sp. 230, *Micromonospora* sp. 5056 oraz *Micromonospora* sp. N5. Rośliny niepoddane inokulacji stanowiły próbę kontrolną. Uprawę prowadzono w substracie torfowym (podrozdział 3.2.6.1) przez 30 dni (pszenica zwyczajna) lub 63 dni (koniczyna biała). Po tym czasie mierzono długość pędów oraz ważono rośliny w celu oceny świeżej masy. Po wykonaniu pomiarów pobierano fragmenty roślin celem oceny zdolności szczepów do ich kolonizacji (podrozdział 3.2.6.6).

Rośliny koniczyny białej cechowały się dużymi różnicami długości pędów, zawierającymi się w przedziale od 5,9 do 27 cm; waga pędów wahała się od 0,1 do 2,1 g (Fig. 62).

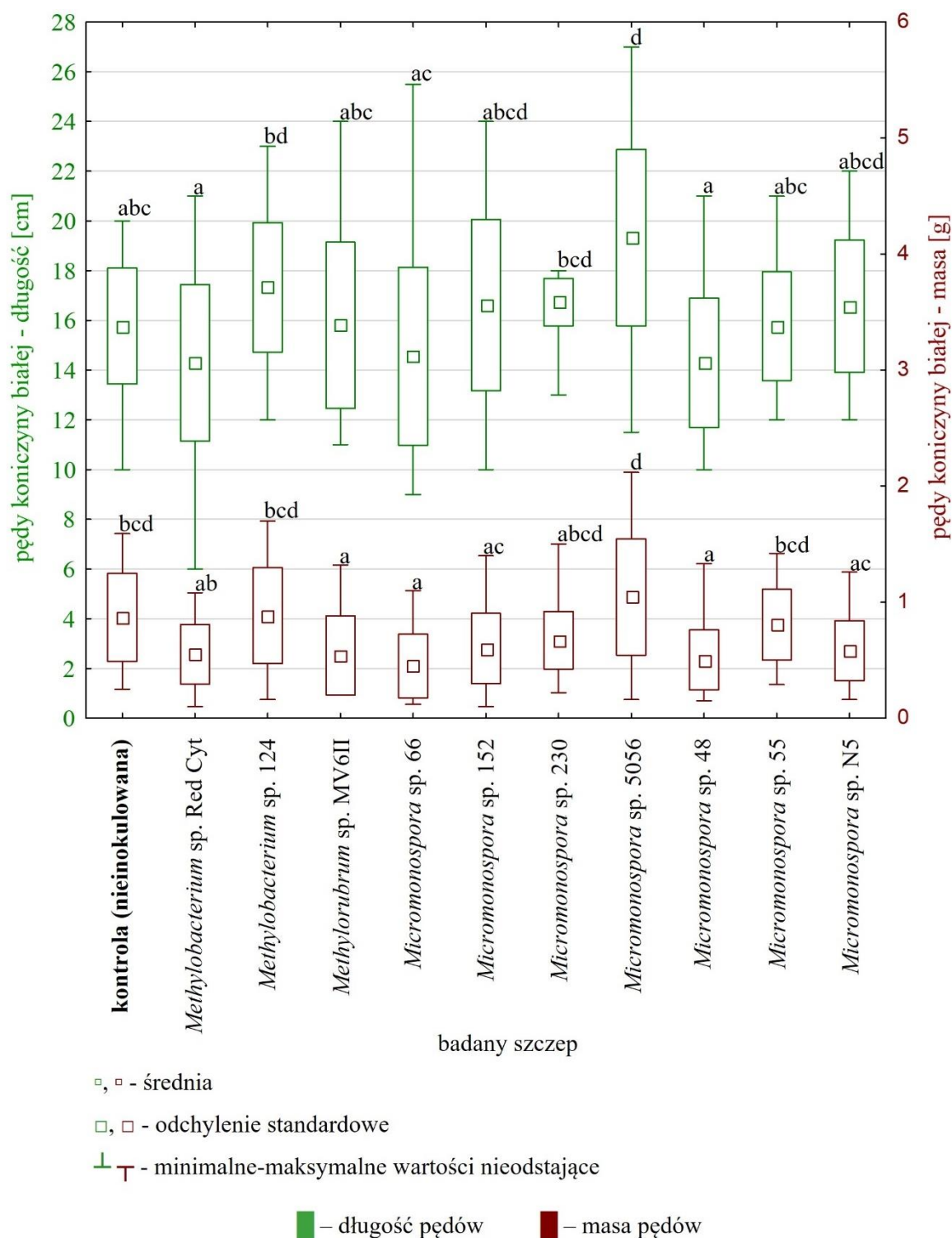


Fig. 62. Wpływ inokulacji siewek koniczyny białej zawiesinami wybranych bakterii endofitycznych na długość i masę pędów nadziemnych. Te same litery oznaczają brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbami

W przypadku roślin stanowiących kontrolę, długość pędów mieściła się w zakresie od 10 do 20 cm, natomiast masa – od 0,25 do 1,59 g. Na podstawie wykonanych analiz statystycznych (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA) stwierdzono, że zarówno w przypadku średnich długości jak i średnich mas pędów nadziemnych, pomiędzy badanymi próbkami występują istotne statystycznie różnice (wartości testu odpowiednio: $F_{(10, 319)} = 8,065$; $p < 0,05$ oraz $F_{(10, 319)} = 9,927$; $p < 0,05$). Na podstawie testu HSD Tukeya wykazano, że tylko w przypadku roślin inokulowanych bakteriami *Micromonospora* sp. 5056, średnia długość części nadziemnej charakteryzowała się istotną statystycznie różnicą w stosunku do kontroli ($p < 0,05$) i wykazywała wyższą wartość niż próba kontrolna (wzrost średniej długości pędów o 22,9 % w stosunku do kontroli). W przypadku roślin zakażanych pozostałymi szczepami nie wykazano istotnych statystycznie różnic w średniej długości części nadziemnej w stosunku do roślin kontrolnych ($p > 0,05$). W wyniku analizy statystycznej średnich mas części nadziemnej wykazano natomiast, że pomiędzy roślinami zakażanymi zawiesinami szczepów *Micromonospora* sp. 55, *Micromonospora* sp. N5, *Micromonospora* sp. 152, *Micromonospora* sp. 230, *Micromonospora* sp. 5056 oraz *Methylobacterium* sp. 124 nie ma istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$) w stosunku do roślin nieinokulowanych, zaś w przypadku prób inokulowanych szczepami *Methylobacterium* sp. MV6II, *Micromonospora* sp. 66 oraz *Micromonospora* sp. 48 odnotowano istotne statystycznie różnice w stosunku do kontroli ($p < 0,05$), jednak średnie w tych próbach badawczych były niższe od wartości średniej masy pędów roślin kontrolnych (spadek od 56 do 46 %).

Długość pędów pszenicy zwyczajnej mieściła się w zakresie od 34 do 57,8 cm, natomiast ich masa wahała się od 0,6 do 2,7 g; długość pędów roślin kontrolnych wahała się od 41 do 53 cm, natomiast ich masa – od 1,38 do 2,67 g (Fig. 63). Na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) stwierdzono, że pomiędzy badanymi grupami występują istotne różnice w średniej długości pędów nadziemnych ($F_{(10, 319)} = 7,1335$, $p < 0,05$), podobnie jak w średniej masie tych pędów ($F_{(10, 319)} = 8,7219$, $p < 0,05$). Przeprowadzone testy *post hoc* HSD Tukeya wykazały, że w przypadku średniej długości pędów, jedynie szczep *Micromonospora* sp. 48 charakteryzował się istotną statystycznie różnicą w stosunku do kontroli ($p < 0,05$); średnie długości pędów były wyższe niż w przypadku kontroli o 5,6 %. Próby, w których rośliny poddano inokulacji szczepami *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylobacterium* sp. 124, *Micromonospora* sp. 48 oraz *Micromonospora* sp. 230 charakteryzowały się istotnymi statystycznie różnicami w średniej masie części nadziemnych w stosunku do kontroli ($p < 0,05$), jednak były niższe niż średnie masy pędów roślin kontrolnych

(od 15 do 25 %). Pozostałe badane próby nie wykazały istotnych statystycznie różnic pomiędzy średnią masą pędów nadziemnych w stosunku do próby kontrolnej ($p > 0,05$).

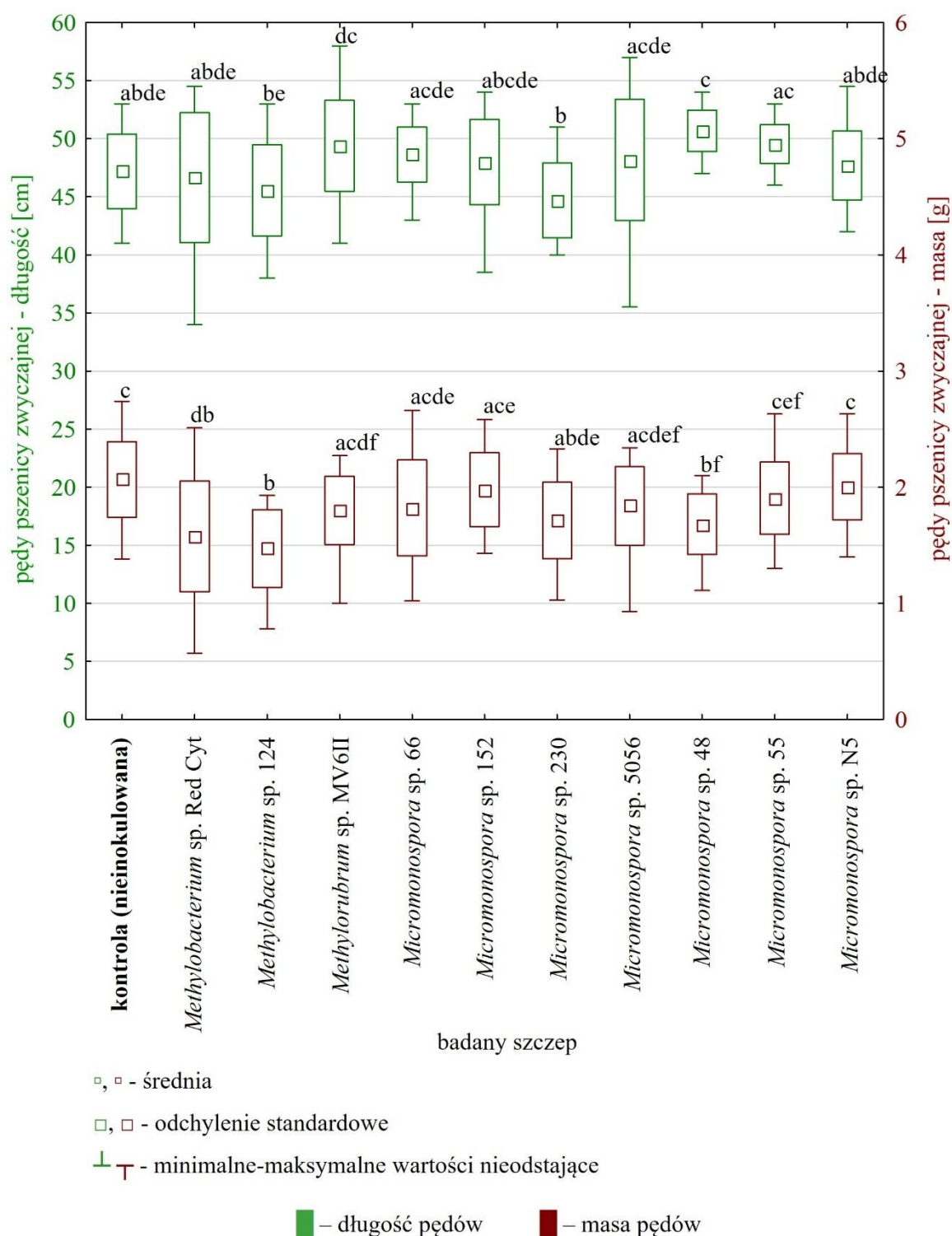


Fig. 63. Wpływ inokulacji siewek pszenicy zwyczajnej zawiesinami wybranych bakterii endofitycznych na długość i masę pędów nadziemnych. Te same litery oznaczają brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbami

4.6.3. Wpływ koinokulacji siewek koniczyny białej zawiesinami bakterii endofitycznych i ryzobiowych na wybrane cechy biometryczne roślin, uprawianych w substracie torfowym

W doświadczeniu poddano ocenie wpływ koinokulacji siewek koniczyny białej zawiesinami wybranych szczepów endofitycznych oraz zawiesiną szczepu ryzobiowego *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 (właściwego dla koniczyny białej) na wybrane cechy biometryczne badanych roślin (podrozdział 3.2.6.5). Te inokulowano z wykorzystaniem endofitycznych szczepów badanych bakterii: *Methylobacterium* sp. 124, *Methylobacterium* sp. MV6II, *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Micromonospora* sp. 48, *Micromonospora* sp. 55, *Micromonospora* sp. 66, *Micromonospora* sp. 152, *Micromonospora* sp. 230, *Micromonospora* sp. 5056 oraz *Micromonospora* sp. N5. Rośliny poddane inokulacji jedynie bakteriami ryzobiowymi stanowiły próbę kontrolną. Uprawę prowadzono w przygotowanym substracie torfowym (podrozdział 3.2.6.1) przez 63 dni. Następnie mierzono długość pędów nadziemnych oraz ważono je w celu oceny świeżej masy. W czasie wykonywanych analiz pobierano fragmenty roślin celem późniejszej oceny zdolności badanych szczepów bakterii endofitycznych do kolonizacji organów wewnętrznych badanych roślin (podrozdział 3.2.6.6).

Rośliny koniczyny białej charakteryzowały się zróżnicowaną długością pędów nadziemnych, wahającą się od 6 do 29 cm, natomiast ich masa mieściła się w zakresie od 0,05 do 2,9 g (dla roślin stanowiących kontrolę, wartości te przyjmowały wartości odpowiednio 12 do 24 cm oraz 0,19 do 1,8 g (Fig. 64). W wyniku przeprowadzonej analizy statystycznej z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) wykazano obecność istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami, zarówno w długości pędów, jak i ich masie (wartość testu dla długości pędów wynosiła: $F_{(10, 319)} = 5,6153$, $p < 0,05$; wartość testu dla masy pędów wynosiła: $F_{(10, 319)} = 5,2432$, $p < 0,05$). Na podstawie testu HSD Tukeya odnotowano, że rośliny zakażane szczepem ryzobiowym oraz szczepami *Micromonospora* sp. 55, *Micromonospora* sp. 66 oraz *Micromonospora* sp. 230 charakteryzowały się istotnymi różnicami w średnich długościach pędów w stosunku do kontroli ($p < 0,05$), jednak średnie te były niższe (spadek o 17,6-27,5 %) niż średnia długość pędów w próbie kontrolnej. Pozostałe badane próby nie wykazały istotnych różnic w średniej długości pędów w stosunku do kontroli inokulowanej jedynie szczepem ryzobiowym ($p > 0,05$). W przypadku średniej masy pędów, jedynie w próbie roślin inokulowanych zawiesiną szczepu endofitycz-

nego *Micromonospora* sp. 66 oraz szczepu ryzobiowego odnotowano istotne różnice w stosunku do kontroli ($p < 0,05$), jednak średnia masa pędów w tej próbie była niższa o 60 % w stosunku do średniej masy pędów roślin kontrolnych.

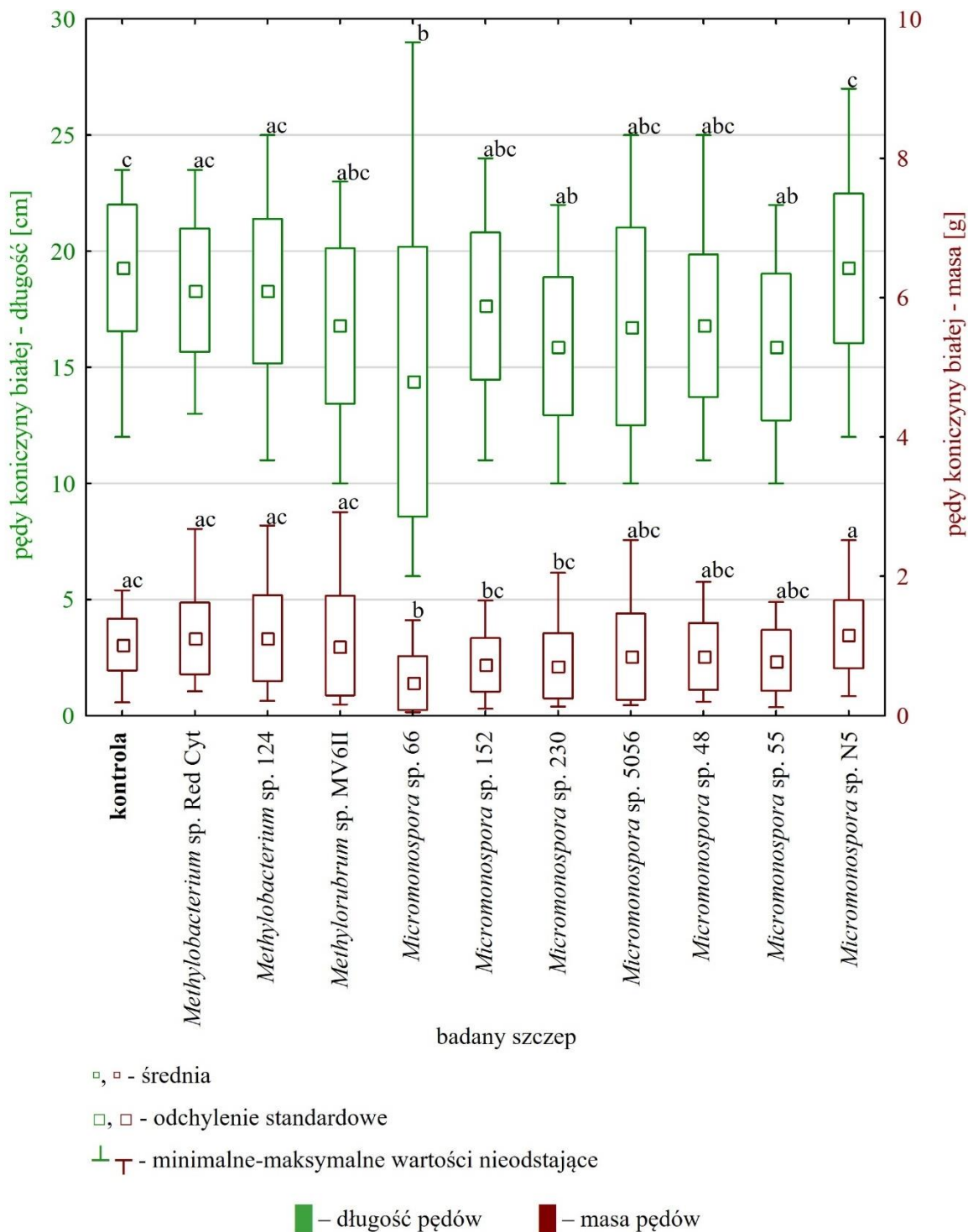


Fig. 64. Wpływ koinokulacji siewek koniczyny białej zawiesinami wybranych bakterii endofitycznych oraz bakterii ryzobiowych na długość i masę pędów nadziemnych. Te same litery oznaczają brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbami

4.6.4. Ocena zdolności bakterii do kolonizacji różnych organów roślin

W wyniku selektywnej izolacji bakterii endofitycznych z tkanek roślin zakażanych badanymi szczepami, wykorzystanymi w doświadczeniach opisanych w podrozdziałach 4.6.2 oraz 4.6.3, uzyskano wzrost pojedynczych kolonii różnych mikroorganizmów endofitycznych na podłożach selektywnych (podrozdział 3.2.6.6). Obserwację doświadczenia prowadzono przez osiem tygodni, w celu detekcji bakterii o charakterystycznych cechach morfologii kolonii dla rodzajów *Methylobacterium*, *Methylorubrum* oraz *Micromonospora*. Izolaty o lekko wypukłych, śluzowatych koloniach, o zabarwieniu od różowego do bordowego pasażowano na podłoże 79CA z dodatkiem metanolu (1 % v/v) natomiast izolaty o niewielkich, suchych koloniach, jasnopomarańczowym zabarwieniu pasażowano na podłoże ISP2 w celu porównania morfologii kolonii ze szczepami wyjściowymi, pasażowanymi równocześnie na tych samych podłożach.

W przypadku izolacji bakterii z korzeni wszystkich badanych roślin, stwierdzono wzrost bakterii charakteryzujących się podobieństwem morfologii kolonii do szczepów wyjściowych, wykorzystanych do uprzedniej inokulacji tych roślin. Ponadto, w przypadku niektórych roślin, bakterie charakteryzujące się wyglądem typowym dla wyjściowych szczepów wyizolowano również z wnętrza pędów nadziemnych lub brodawek korzeniowych.

4.6.5. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin koniczyny białej, uprawianych w zmodyfikowanym podłożu Hoaglanda

Ocenę zdolności szczepów *Methylobacterium* sp. Red Cyt oraz *Methylorubrum* sp. C2III_s do wiązania azotu atmosferycznego i udostępniania go roślinom przeprowadzono również w doświadczeniu probówkowym (podrozdział 3.2.6.8). W tym celu siewki koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) odm. Grasslands Huia uprawiano na skosach agarowych, z zastosowaniem zmodyfikowanego podłoża Hoaglanda ($100 \mu\text{M KNO}_3 \times \text{l}^{-1}$) dla roślin stanowiących badane próby, inokulowanych szczepami bakterii endofitycznych. Rośliny pozostawione bez bakteryzacji, uprawiane na skosach agarowych ze zmodyfikowanym podłożem Hoaglanda stanowiły próbę kontrolną. Po 40 dniach uprawy rośliny usuwano, następnie mierzono długość pędów nadziemnych i długość korzenia; ponadto określano ich świeżą masę.

Rośliny koniczyny białej charakteryzowały się długością pędu w zakresie 0,9 cm do 5 cm, natomiast ich masa mieściła się w przedziale od 0,06 do 0,023 g (Fig. 65). Długość pędów roślin kontrolnych mieściła się w zakresie 2,4-5 cm, zaś ich masa wahała się od 0,011

do 0,023 g. Na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) dla długości oraz masy pędów nadziemnych (wartości testu odpowiednio: $F_{(2, 57)} = 22,4312$ oraz $F_{(2, 57)} = 7,4562$) ustalono, że pomiędzy badanymi grupami występowały istotne statystycznie różnice zarówno w średniej długości, jak i w średniej masie pędów ($p < 0,05$).

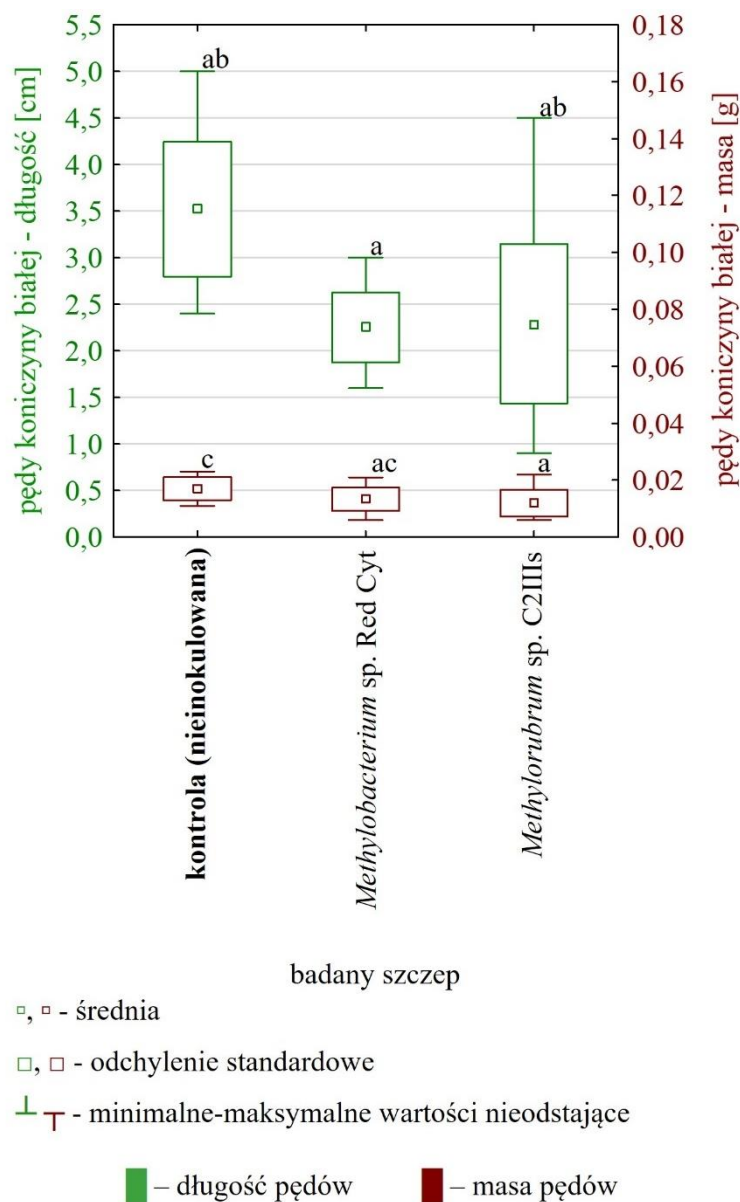


Fig. 65. Wpływ inokulacji siewek koniczyny białej zawiesinami wybranych bakterii endofitycznych na długość i masę pędów nadziemnych. Te same litery oznaczają brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbkami

W wyniku przeprowadzonego testu HSD Tukeya dowiedziono, że w przypadku średniej długości pędów nadziemnych, jedynie rośliny inokulowane zawiesiną szczepu *Methylobac-*

terium sp. Red Cyt charakteryzowały się istotną statystycznie różnicą wobec roślin kontrolnych ($p < 0,05$), jednak średnia długość pędów roślin stanowiących tę grupę badawczą była niższa niż średnia długość pędów roślin kontrolnych o 37 %. W przypadku średniej masy pędów, istotne statystycznie różnice odnotowano jedynie pomiędzy próbą kontrolną a roślinami inokulowanymi zawiesiną szczepu *Methylobacterium* sp. C2IIIIs ($p < 0,05$); średnia masa pędów tych roślin była jednak niższa od średniej masy pędów roślin należących do próby kontrolnej o 29,4 %.

Długość systemu korzeniowego roślin koniczyny białej mieściła się w zakresie od 1,5 do 12,3 cm, natomiast masa wahała się od 0,003 do 0,3 g (dla roślin kontrolnych odpowiednio 2,4-9,5 cm oraz 0,04 do 0,025 g; Fig. 66). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (wartość testu dla długości korzenia: $F_{(2, 57)} = 4,7031$; wartość testu dla masy systemu korzeniowego: $F_{(2, 57)} = 4,6585$). Na podstawie analizy wykazano, że pomiędzy badanymi grupami roślin występują istotne statystycznie różnice zarówno w długości korzenia jak i jego masie ($p < 0,05$). Średnie długości korzenia w próbie roślin inokulowanych szczepami *Methylobacterium* sp. Red Cyt oraz próbie roślin zakażanych bakteriami *Methylobacterium* sp. C2IIIIs różniły się statystycznie od długości korzenia w próbie kontrolnej ($p < 0,05$) i charakteryzowały się wyższymi wartościami w stosunku do roślin kontrolnych (wzrost o odpowiednio o 60 i 62,5 %). Podobnie w przypadku średniej masy korzeni, rośliny stanowiące badane próby w sposób istotny statystycznie różniły się od roślin kontrolnych ($p < 0,05$) i charakteryzowały się wyższymi wartościami w stosunku do próby kontrolnej (wzrost o 70 % dla roślin inokulowanych bakteriami *Methylobacterium* sp. Red Cyt oraz 40 % dla roślin inokulowanych bakteriami *Methylobacterium* sp. C2IIIIs).

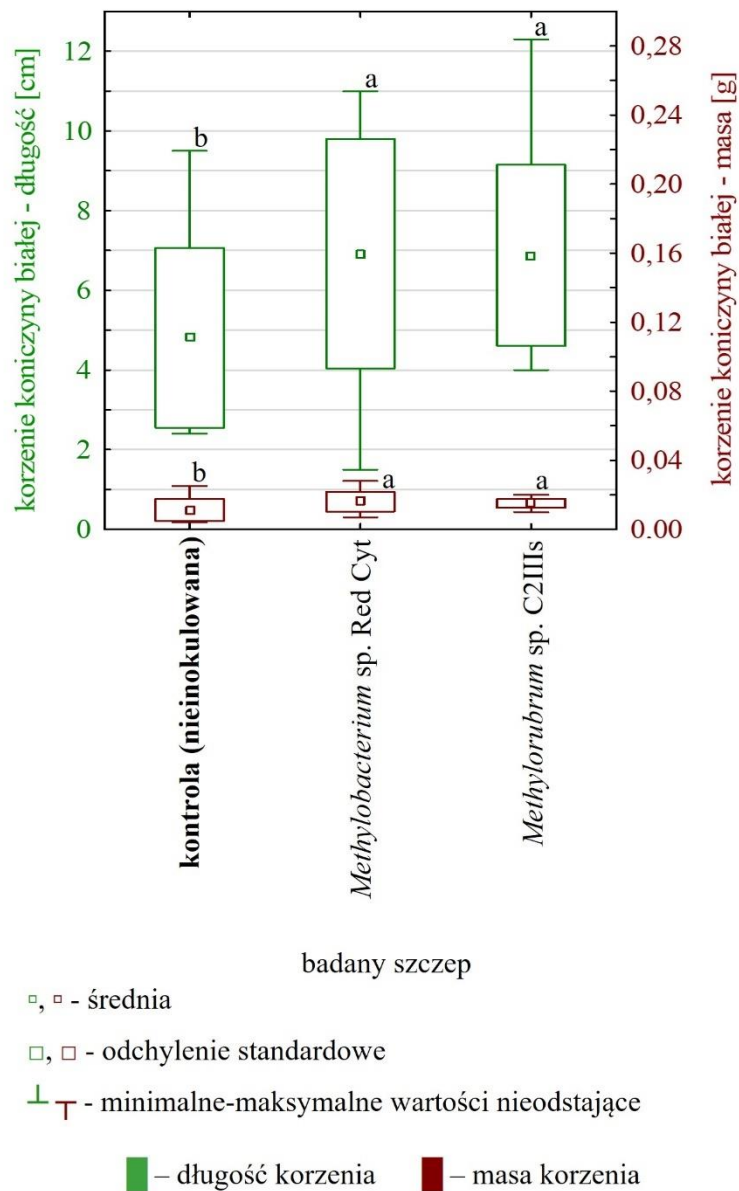


Fig. 66. Wpływ inokulacji siewek koniczyny białej zawiesinami wybranych bakterii endofitycznych na długość korzenia i masę systemu korzeniowego. Te same litery oznaczają brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbami

4.6.6. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin, uprawianych w substracie torfowym zanieczyszczonym metalami ciężkimi

W celu oceny zdolności wybranych szczepów bakteryjnych do promowania wzrostu roślin w warunkach zanieczyszczenia podłoża metalami/półmetalami ciężkimi (podrozdział 3.2.6.9), rośliny koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) odm. Grasslands Huia oraz rzepaku

(*Brassica napus* L.) (gatunek akumulatorowy) odm. Goliat, uprawiano w podłożu zanieczyszczonym jonami: miedzi ($1 \text{ g jonów} \times \text{kg}^{-1} \text{ podłoża}$) oraz arsenu ($24 \text{ mg jonów} \times \text{kg}^{-1} \text{ podłoża}$). Rośliny uprawiane w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi poddawano następnie inokulacji zawiesinami szczepów *Methylobacterium* sp. Red Mix I oraz *Micromonospora* sp. 5056; rośliny uprawiane w podłożu zanieczyszczonym jonami arsenu inokulowano zawiesinami szczepów *Methylobacterium* sp. Red Mix I oraz *Micromonospora* sp. 33. Jako próby kontrolne wykorzystano rośliny niezakażane, uprawiane w glebie bez zanieczyszczeń oraz rośliny niezakażane, uprawiane w glebie zanieczyszczonej odpowiednio jonami miedzi i arsenu. Zdolność do promowania wzrostu przez bakterie oceniono na podstawie oceny długości i masy pędów nadziemnych roślin inokulowanych oraz porównanie wyników z wartościami uzyskanymi w warunkach kontrolnych. Uprawę prowadzono przez 45 dni (koniczyna biała) lub 40 dni (rzepak).

Uprawiane w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi (oraz w podłożu niezanieczyszczonym w przypadku jednej z prób kontrolnych) rośliny koniczyny białej, charakteryzowały się wartościami długości pędów nadziemnych mieszczącymi się w zakresie od 11 do 27 cm oraz masą pędów nadziemnych, wahającą się od 0,24 do 5 g (Fig. 67).

Na podstawie jednoczynnikowej analizy ANOVA przeprowadzonej dla wartości długości pędów ($F_{(3, 56)} = 13,420$) wykazano, że pomiędzy badanymi próbami występują istotne różnice w średniej długości pędów ($p < 0,05$). W wyniku przeprowadzonego testu *post hoc* HSD Tukeya wykazano natomiast, że rośliny inokulowane szczepem *Methylobacterium* sp. Red Mix I oraz rośliny inokulowane szczepem *Micromonospora* sp. 5056 charakteryzowały się brakiem istotnych statystycznie różnic w średniej długości pędów między tymi grupami; wartości te różniły się natomiast w sposób istotny statystycznie od roślin stanowiących grupy kontrolne.

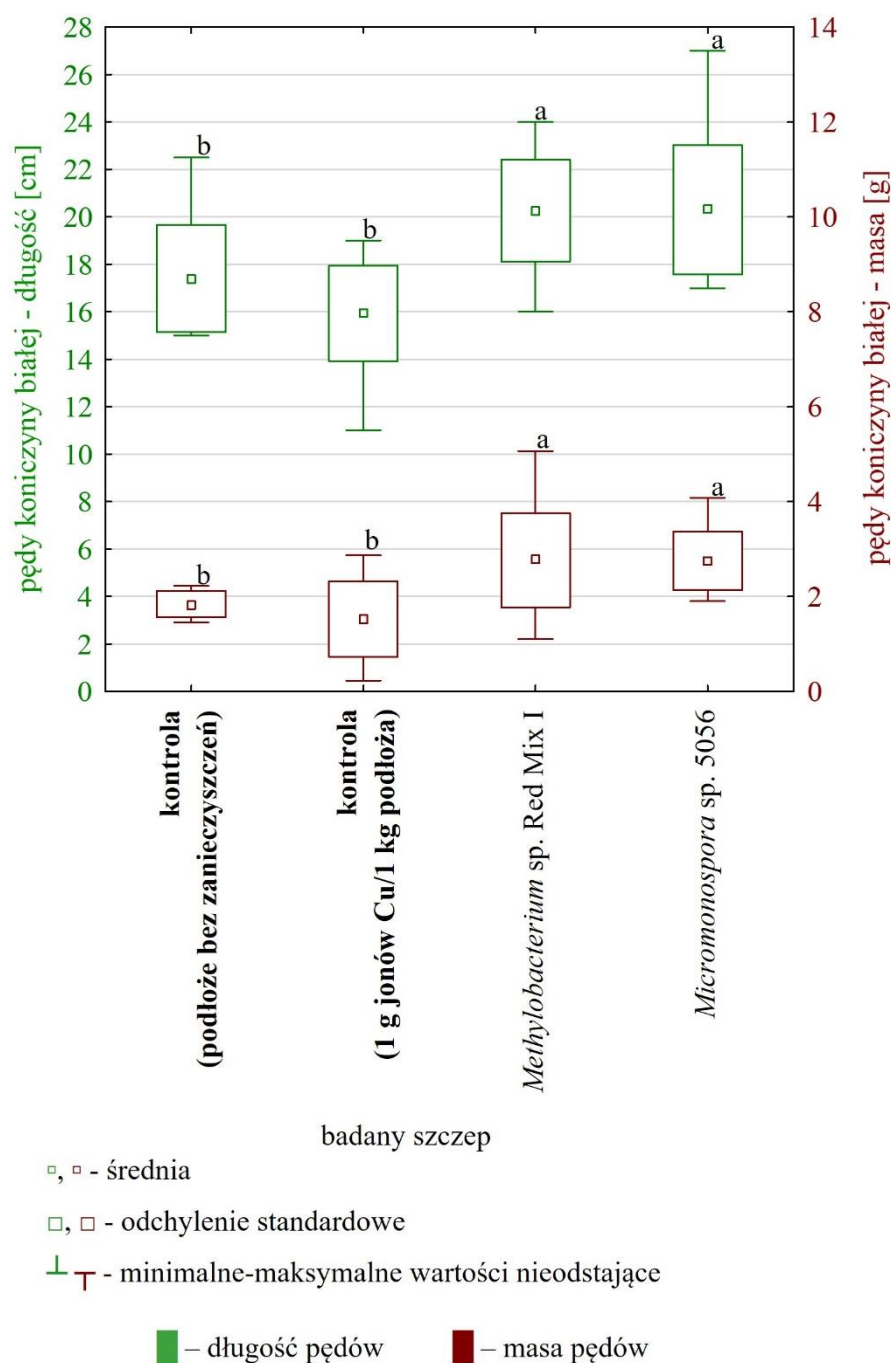


Fig. 67. Wpływ inokulacji roślin koniczyny białej zawiesinami wybranych bakterii endofitycznych na długość i masę pędów nadziemnych roślin uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi. Te same litery oznaczają brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbami

Średnie długości pędów nadziemnych roślin grup badawczych były większe zarówno od średniej długości pędów roślin nieinokulowanych, uprawianych w podłożu niezanieczyszczonym (wzrost o 16,7 %) jak i roślin nieinokulowanych, uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi (wzrost o 27,7 %; Fig. 68 oraz Fig. 69). W przypadku masy

pędów również wykazano obecność grup różniących się w sposób istotny statystycznie (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, $F_{(3, 56)} = 11,6409$, $p < 0,05$). Na podstawie testu HSD Tukeya wykazano, że rośliny stanowiące badane próby, tj. rośliny inokulowane szczepem *Methylobacterium* sp. Red Mix I oraz rośliny inokulowane szczepem *Micromonospora* sp. 5056 cechowały się brakiem istotnych różnic pomiędzy tymi grupami ($p > 0,05$) oraz występowaniem istotnych statystycznie różnic w stosunku do prób kontrolnych ($p < 0,05$). Średnie masy pędów nadziemnych prób badawczych były wyższe w stosunku do grup kontrolnych: w przypadku roślin inokulowanych szczepem *Methylobacterium* sp. Red Mix I odnotowano wzrost o 50 % w stosunku do roślin kontrolnych uprawianych w podłożu niezanieczyszczonym oraz wzrost o 77,6 % w stosunku do roślin kontrolnych uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi; dla roślin inokulowanych bakteriami *Micromonospora* sp. 5056 odnotowano wzrost odpowiednio o 52,8 % oraz 80,1 %. Pomiedzy próbami kontrolnymi nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w średniej długości oraz średniej masie pędów nadziemnych.



Fig. 68. Porównanie roślin koniczyny białej uprawianej w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi ($1 \text{ g jonów} \times \text{kg}^{-1}$ podłoża). A) rośliny inokulowane zawiesiną szczepu *Micromonospora* sp. 5056; B) rośliny nieinokulowane (kontrola)



Fig. 69. Porównanie roślin koniczyny białej uprawianej w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi ($1 \text{ g jonów} \times \text{kg}^{-1} \text{ podłoża}$). A) rośliny inokulowane zawiesiną szczepu *Methylobacterium* sp. Red Mix I; B) rośliny nieinokulowane (kontrola)

Rośliny koniczyny białej uprawianej w podłożu zanieczyszczonym jonami arsenu, cechowały się długością pędów nadziemnych mieszczącą się w zakresie od 11,5 do 23,5 cm, natomiast ich masa zawierała się w przedziale od 0,19 do 2,8 g (Fig. 70). W wyniku przeprowadzonej analizy statystycznej średnich wartości długości pędów nadziemnych (jednoczynnikowa ANOVA $F_{(3, 56)} = 0,14064$) wykazano brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami roślin ($p > 0,05$). W przypadku masy pędów nadziemnych odnotowano istotne statystycznie różnice pomiędzy badanymi grupami (jednoczynnikowa ANOVA $F_{(3, 56)} = 4,3926$, $p < 0,05$). Rośliny stanowiące badane próby, czyli inokulowane szczepem *Methylobacterium* sp. Red Mix I lub inokulowane szczepem *Micromonospora* sp. 33, charakteryzowały się brakiem istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$) w średniej masie pędów w stosunku do roślin kontrolnych, uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami arsenu ($24 \text{ mg jonów} \times \text{kg}^{-1} \text{ podłoża}$). Rośliny poddane bakteryzacji z wykorzystaniem bakterii *Micromonospora* sp. 33 cechowały się natomiast występowaniem istotnej różnicy w średniej masie pędów nadziemnych w stosunku do średniej masy pędów uprawianych w podłożu bez zanieczyszczeń ($p < 0,05$), jednak średnia masa pędów tej próby była niższa od średniej masy pędów próby kontrolnej o 27,8 %. Odnotowano również istotne statystycznie różnice w średniej masie pędów nadziemnych pomiędzy próbami kontrolnymi ($p < 0,05$); wartość średniej masy roślin uprawianych w podłożu niezanieczyszczonym była wyższa niż w przypadku roślin uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami arsenu o 30,7 %.

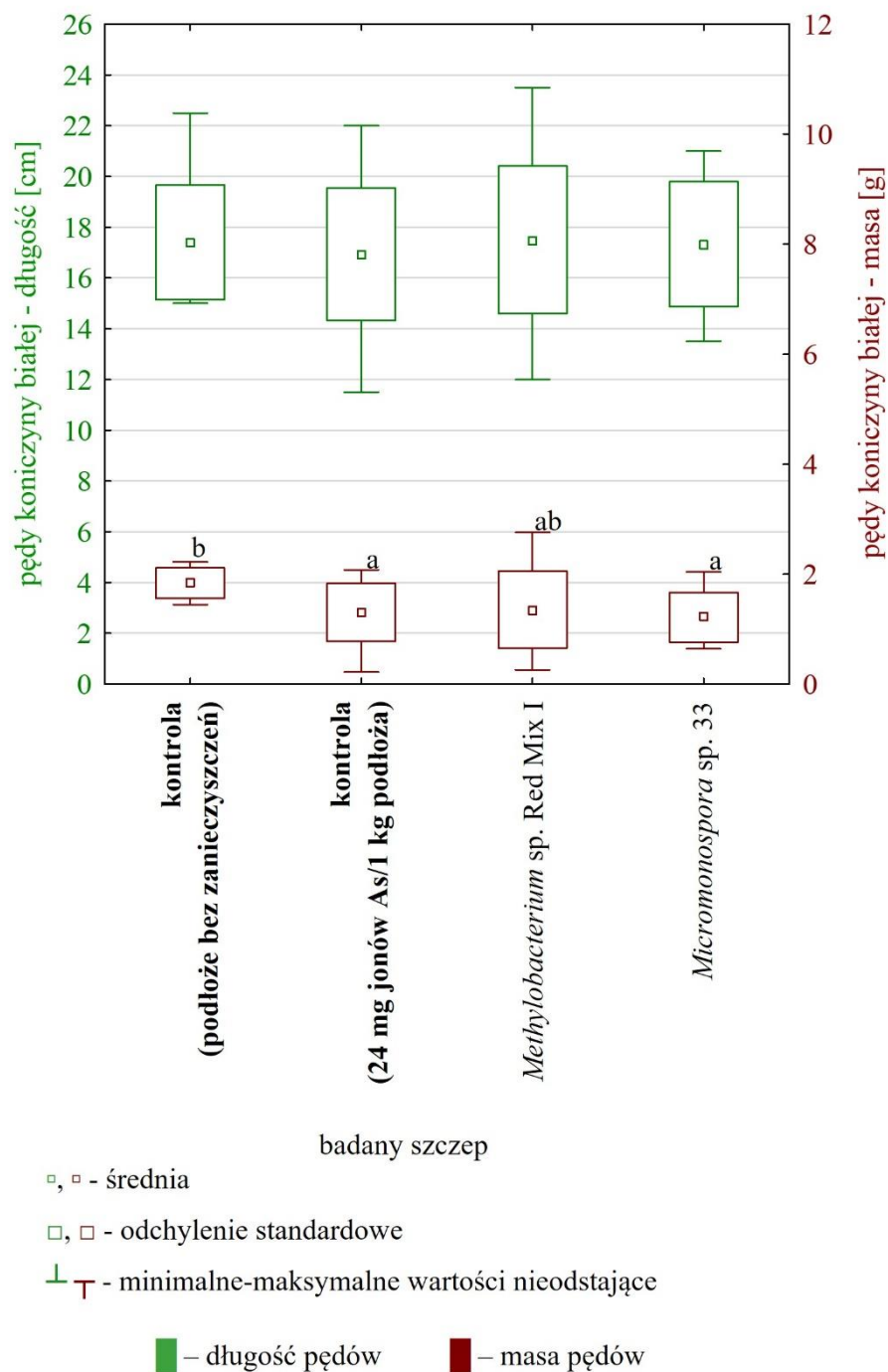


Fig. 70. Wpływ inokulacji roślin koniczyny białej zawiesinami wybranych bakterii endofitycznych na długość i masę pędów nadziemnych roślin uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami arsenu. Te same litery oznaczają brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbami

Rośliny rzepaku uprawiane w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi oraz w podłożu niezanieczyszczonym (próba kontrolna) charakteryzowały się długością pędów nadziemnych w przedziale od 20 do 36 cm; masa tych pędów mieściła się w zakresie od 2,8 do 16,3 g (Fig. 71).

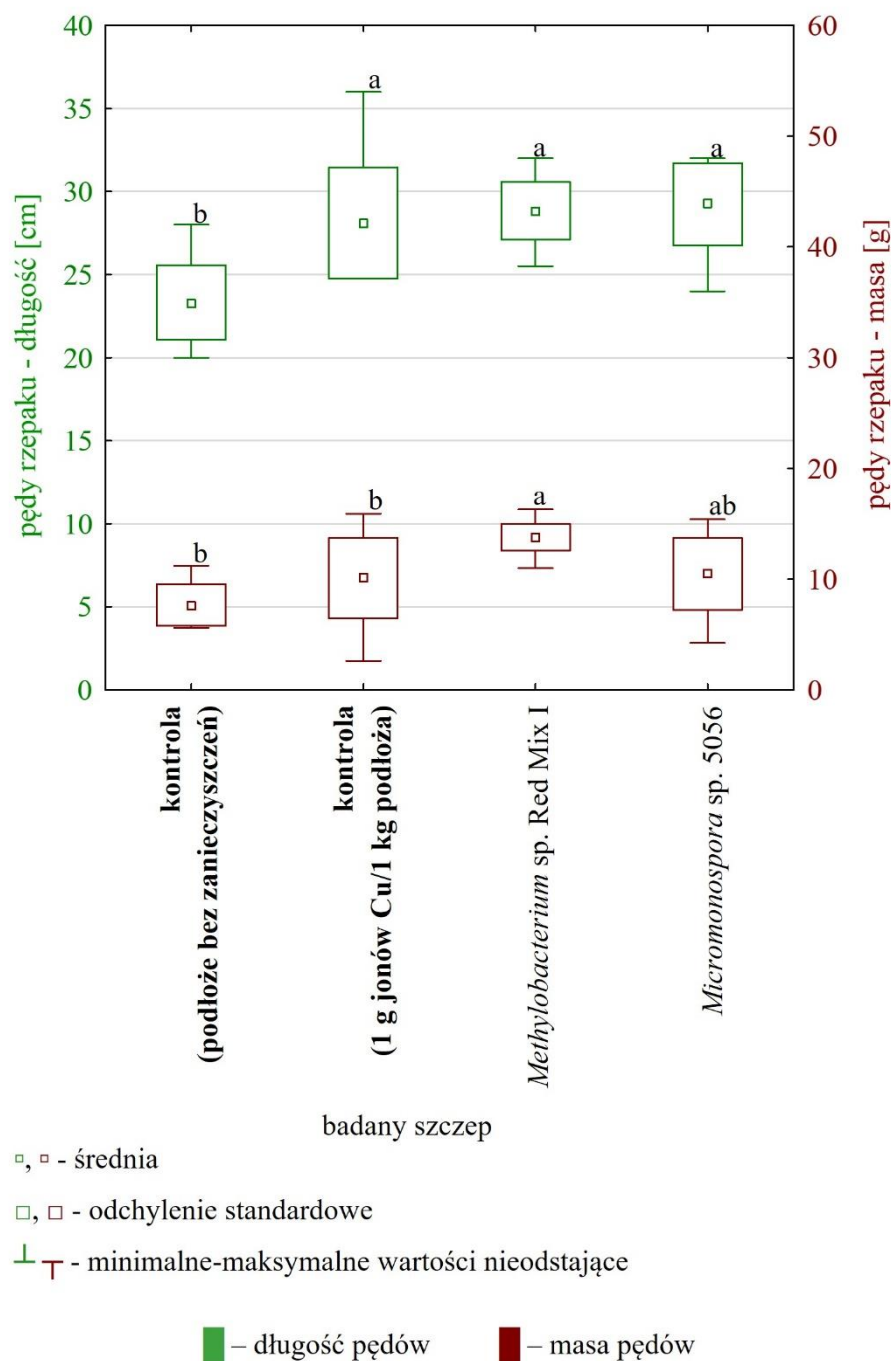


Fig. 71. Wpływ inokulacji roślin rzepaku zawiesinami wybranych bakterii endofitycznych na długość i masę pędów nadziemnych roślin uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi.

Te same litery oznaczają brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbami

Na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) stwierdzono, że zarówno w przypadku średniej długości pędów nadziemnych, jak i ich średnich mas, pomiędzy badanymi próbkami występują istotne statystycznie różnice (wyniki testu odpowiednio: $F_{(3, 44)} = 14,132$, $p < 0,05$ oraz $F_{(3, 44)} = 10,5213$, $p < 0,05$). Przeprowadzona analiza *post hoc* (test HSD Tukeya) wykazała, że w przypadku średniej długości pędów, rośliny stanowiące obydwie grupy badane charakteryzowały się występowaniem istotnych statystycznie różnic ($p < 0,05$) w stosunku do roślin stanowiących kontrolę, uprawianych w podłożu bez zanieczyszczeń; średnie długości pędów nadziemnych roślin inokulowanych szczepami endofitycznymi były wyższe o 22,1 % (inokulacja szczepem *Methylobacterium* sp. Red Mix I) oraz o 27,7 % (inokulacja szczepem *Micromonospora* sp. 5056), w stosunku do średniej długości pędów roślin kontrolnych (rośliny uprawiane w podłożu niezanieczyszczonym). W przypadku analizowanych prób badawczych oraz roślin kontrolnych, uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi, nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w średniej długości pędów ($p > 0,05$), natomiast pomiędzy próbkami kontrolnymi odnotowano istotne statystycznie różnice w średniej długości pędów nadziemnych ($p < 0,05$); średnia długość pędów roślin uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi była wyższa od średniej długości pędów roślin kontrolnych uprawianych w glebie czystej o 14 %. W przypadku średniej masy pędów, pomiędzy próbkami kontrolnymi nie odnotowano istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$). Spośród prób badawczych, jedynie w przypadku roślin inokulowanych szczepem *Methylobacterium* sp. Red Mix I odnotowano istotne statystycznie różnice w średniej masie pędów nadziemnych ($p < 0,05$) w stosunku do obydwu próbek kontrolnych; średnia masy dla roślin stanowiących próbkę badawczą (rośliny inokulowane szczepem *Methylobacterium* sp. Red Mix I) była wyższa od średniej masy pędów roślin kontrolnych uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi o 37 %, oraz o 95 % w stosunku do roślin kontrolnych uprawianych w podłożu niezanieczyszczonym.

Rośliny rzepaku uprawiane w podłożu zanieczyszczonym jonami arsenu oraz stanowiące kontrolę (rośliny w podłożu niezanieczyszczonym) charakteryzowały się długością pędów nadziemnych w granicach od 18 do 36 cm oraz masą pędów nadziemnych przyjmującą wartości od 2,3 do 20 g (Fig. 72). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA dla wartości długości pędów: $F_{(3, 44)} = 17,6653$ oraz dla wartości masy pędów: $F_{(3, 44)} = 8,0589$) wykazały obecność istotnych statystycznie różnic ($p < 0,05$) zarówno w średniej długości jak i średniej masie pędów badanych roślin.

Na podstawie testu HSD Tukeya wykazano, że w przypadku prób kontrolnych istotne statystycznie różnice występują zarówno w przypadku długości, jak i masy pędów nadziemnych ($p < 0,05$).

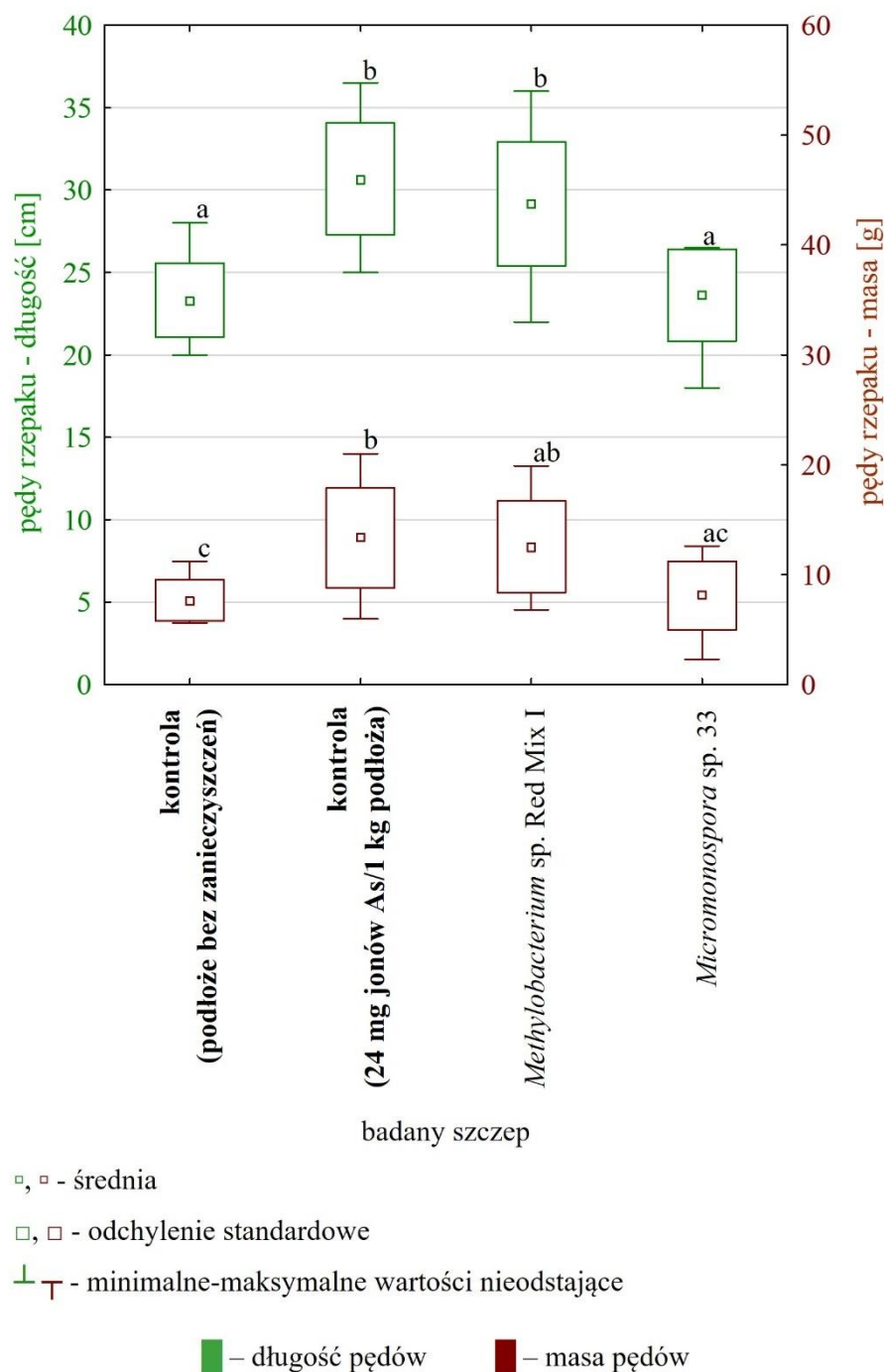


Fig. 72. Wpływ inokulacji roślin rzepaku zawiesinami wybranych bakterii endofitycznych na długość i masę pędów nadziemnych roślin uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami arsenu.

Te same litery oznaczają brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbami

Średnia długości pędów roślin nieinokulowanych, uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami arsenu była wyższa o 36 % od średniej długości pędów roślin kontrolnych uprawianych w podłożu niezanieczyszczonym; podobnie w przypadku masy pędów nadziemnych; średnia roślin nieinokulowanych, uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami arsenu była wyższa niż o 81,4 % w stosunku do roślin uprawianych w podłożu niezanieczyszczonym. Nie odnotowano natomiast istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$) w średnich wartościach długości oraz masy pędów nadziemnych pomiędzy roślinami inokulowanymi bakteriami *Micromonospora* sp. 33 a roślinami uprawianymi w podłożu niezanieczyszczonym; podobnie nie wykazano istotnych statystycznie różnic ($p > 0,05$) w średnich długości i masie pędów nadziemnych pomiędzy roślinami poddanymi bakteryzacji z wykorzystaniem szczepu *Methylobacterium* sp. Red Mix I a roślinami kontrolnymi, uprawianymi w podłożu zanieczyszczonym jonami arsenu. Rośliny zaszczerpione bakteriami *Micromonospora* sp. 33 charakteryzowały się istotnymi statystycznie różnicami ($p < 0,05$) w średniej długości i średniej masie pędów w stosunku do roślin kontrolnych uprawianych w podłożu zanieczyszczonym arsenem, jednak wartości te były niższe (odpowiednio o 24,3 % oraz 34,4 %) niż średnie długości i średnie masy pędów roślin kontrolnych.

4.6.7. Wpływ inokulacji siewek zawiesinami bakterii endofitycznych na wybrane cechy biometryczne roślin uprawianych w substracie torfowym zanieczyszczonym olejem napędowym

W doświadczeniu badano zdolność szczepów *Micromonospora* sp. 5056 oraz *Micromonospora* sp. N5 do promowania wzrostu roślin uprawianych w podłożu zanieczyszczonym olejem napędowym (podrozdział 3.2.6.9). W tym celu siewki koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) odm. Grasslands Huia oraz rzepaku (*Brassica napus* L.) odm. Goliat inokulowano zawiesinami wskazanych szczepów bakterii endofitycznych oraz uprawiano w zanieczyszczonym olejem napędowym podłożu. Kontrolę stanowiły rośliny nieinokulowane, uprawiane w podłożu niezanieczyszczonym, oraz rośliny uprawiane w podłożu zanieczyszczonym olejem napędowym i niepoddane zabiegowi inokulacji. Po zakończeniu uprawy roślin (koniczyna biała 45 dni, rzepak 40 dni) mierzono długość pędów nadziemnych oraz określano ich masę; uzyskane dane dotyczące roślin inokulowanych szczepami bakterii endofitycznych porównywano z wartościami otrzymanymi w wyniku dokonanych pomiarów długości i masy pędów roślin kontrolnych.

Rośliny koniczyny białej charakteryzowały się długością pędów mieszczącą się w granicach od 12 do 22,5 cm, masa pędów mieściła się w zakresie od 0,6 do 2,2 g (Fig. 73).

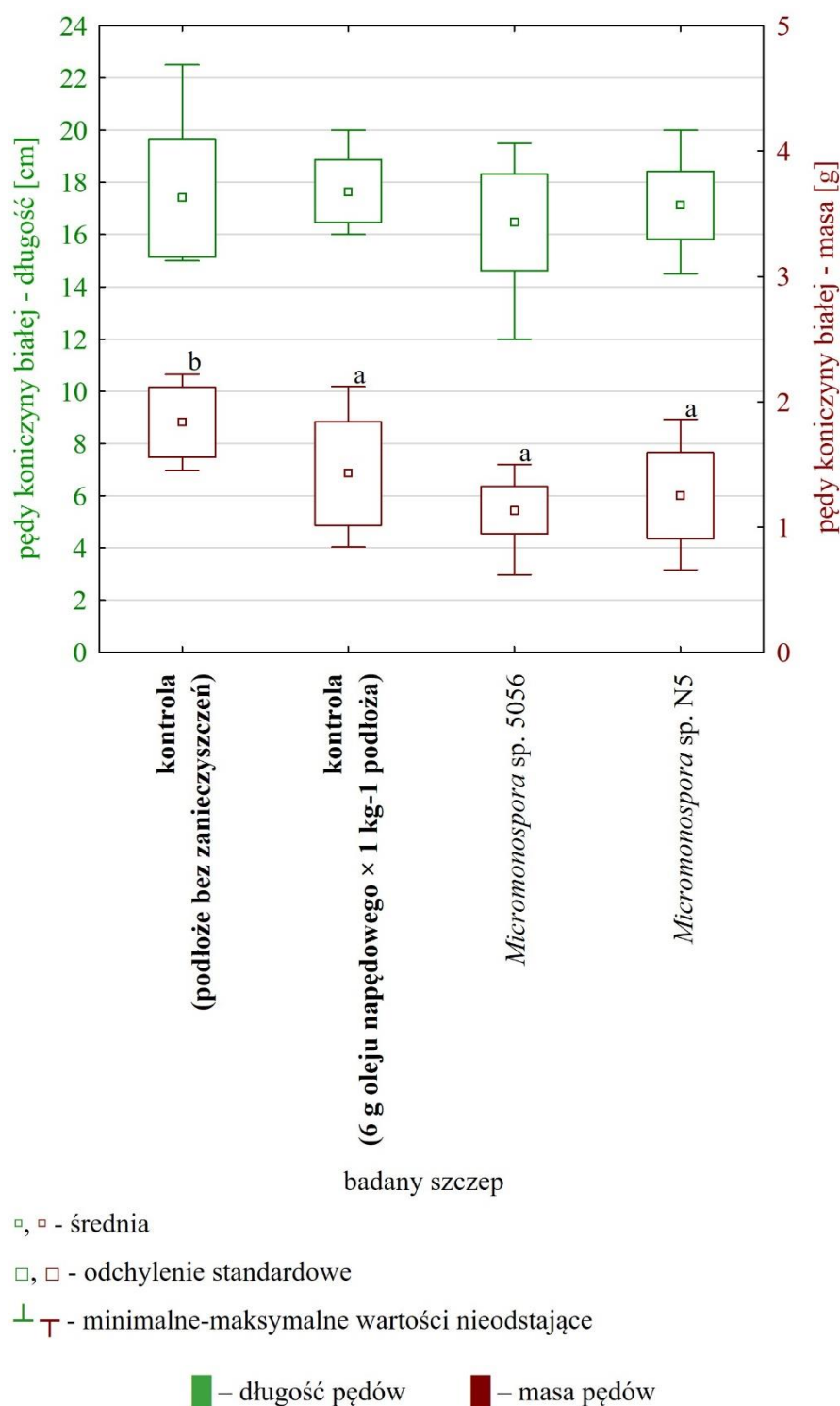


Fig. 73. Wpływ inokulacji roślin koniczyny białej zawiesinami wybranych bakterii endofitycznych na długość i masę pędów nadziemnych roślin uprawianych w podłożu zanieczyszczonym olejem napędowym. Te same litery oznaczają brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbami

Przeprowadzona analiza statystyczna (jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA)) wykazała brak istotnych statystycznie różnic w średniej długości pędów nadziemnych pomiędzy badanymi grupami roślin (wartość testu: $F_{(3, 56)} = 1,4026$, $p > 0,05$). W przypadku średniej

masy pędów nadziemnych odnotowano istotne statystycznie różnice (wartość testu: $F_{(3, 56)} = 14,4399$, $p < 0,05$), które na podstawie testu HSD Tukeya zidentyfikowano pomiędzy próbami badawczymi a próbą kontrolną (rośliny uprawiane w podłożu bez zanieczyszczeń). Średnie masy pędów nadziemnych roślin inokulowanych szczepami *Micromonospora* sp. N5 oraz *Micromonospora* sp. 5056 były niższe (odpowiednio o 36,8 % oraz 42,1 %) niż średnie roślin kontrolnych uprawianych w podłożu niezanieczyszczonym. Istotne statystycznie różnice w masie pędów ($p < 0,05$) wykazano również pomiędzy próbami kontrolnymi – wartość średniej masy pędów roślin uprawianych w podłożu zanieczyszczonym olejem napędowym była niższa o 26,3 % od wartości średniej masy pędów nadziemnych roślin uprawianych w podłożu niezanieczyszczonym.

Rośliny rzepaku charakteryzowały się długością pędów nadziemnych mieszczącą się w granicach od 25 cm do 38 cm; masa pędów wahała się od 5,6 do 19,2 g (Fig. 74). Na podstawie poddanych analizie statystycznej danych odnotowano, że zarówno w przypadku średnich wartości długości pędów oraz masy, pomiędzy badanymi grupami roślin występują istotne statystycznie różnice (jednoczynnikowa ANOVA dla wartości długości pędów: $F_{(3, 44)} = 28,661$, $p < 0,05$; jednoczynnikowa ANOVA dla wartości masy pędów: $F_{(3, 44)} = 10,800$, $p < 0,05$). Przeprowadzono test *post hoc* (HSD Tukeya), na podstawie którego wykazano, że pomiędzy próbami badawczymi nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w średniej długości i średniej masie pędów nadziemnych rzepaku ($p > 0,05$); próby kontrolne charakteryzowały się brakiem istotnych różnic między tymi grupami w przypadku masy pędów ($p > 0,05$), natomiast w przypadku długości pędów, różnice pomiędzy tymi grupami były istotne ($p < 0,05$). Badane próby charakteryzowały się jednak istotnymi statystycznie różnicami w średniej długości i średniej masie pędów w stosunku do prób kontrolnych ($p < 0,05$). Średnie wartości długości pędów roślin inokulowanych szczepem *Micromonospora* sp. N5 oraz *Micromonospora* sp. 5056 były wyższe niż średnie wartości odnotowane w przypadku roślin kontrolnych, uprawianych w podłożu zanieczyszczonym olejem napędowym (odpowiednio o 14,8 % oraz 18,1%) oraz w podłożu niezanieczyszczonym (odpowiednio o 34,2 % oraz 38 %; Fig. 75). Podobnie, średnie wartości masy pędów roślin inokulowanych szczepem *Micromonospora* sp. N5 oraz *Micromonospora* sp. 5056 były wyższe niż średnie wartości odnotowane w przypadku roślin kontrolnych uprawianych w podłożu zanieczyszczonym olejem napędowym (odpowiednio 34 % oraz 33,3 %) oraz w podłożu niezanieczyszczonym (odpowiednio 78,7% oraz 77,3 %).

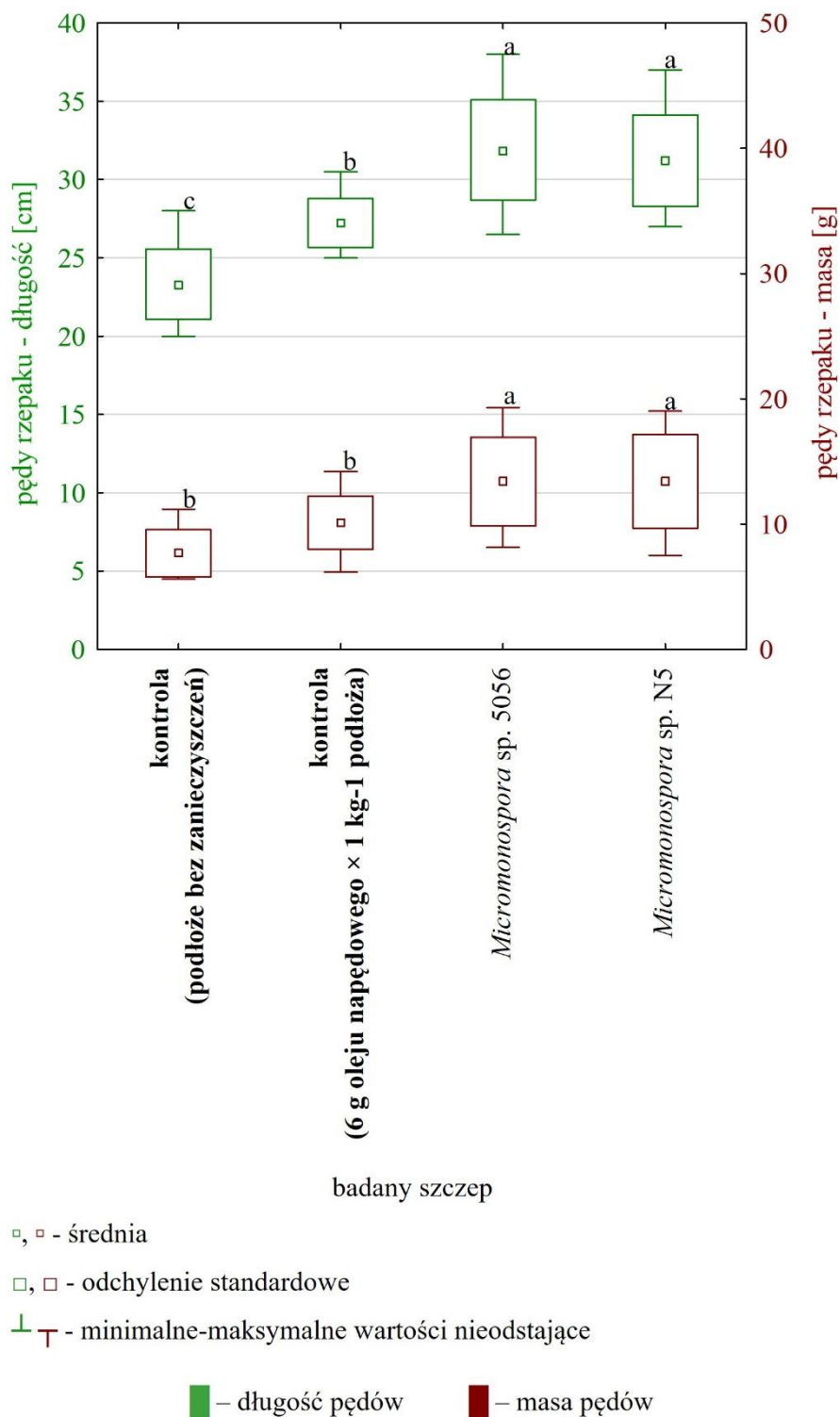


Fig. 74. Wpływ inokulacji roślin rzepaku zawieszinami wybranych bakterii endofitycznych na długość i masę pędów nadziemnych roślin uprawianych w podłożu zanieczyszczonym olejem napędowym. Te same litery oznaczają brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbami

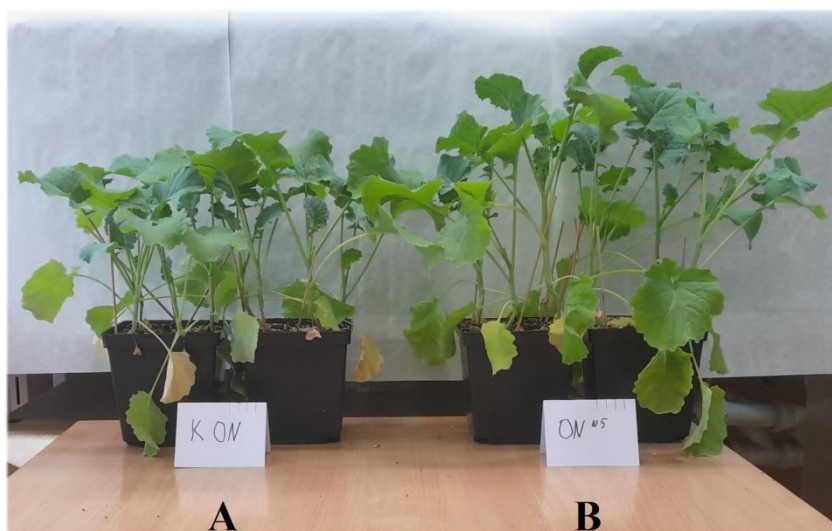


Fig. 75. Porównanie roślin rzepaku uprawianych w podłożu zanieczyszczonym olejem napędowym ($6 \text{ g} \times \text{kg}^{-1}$ podłoża). A) rośliny nieinokulowane, uprawiane w podłożu zanieczyszczonym olejem napędowym (kontrola); B) rośliny inokulowane zawiesiną szczepu *Micromonospora* sp. N5

5. DYSKUSJA

5.1. Pozyskanie izolatów bakterii endofitycznych z brodawek korzeniowych roślin należących do rodziny bobowate (*Fabaceae*)

Izolaty badanych bakterii endofitycznych pozyskano z brodawek korzeniowych roślin należących do rodziny bobowate (*Fabaceae*). Struktury te charakteryzują się wysoką zawartością substancji odżywczych, i jako takie stanowią atrakcyjne siedlisko w obrębie tkanek roślinnych dla różnych bakterii, w tym bakterii endofitycznych. Szacuje się, że endofityczne, nieryzobiowe szczepy bakteryjne mogą stanowić od 0,1 do niemal 40 % wszystkich bakterii wewnątrz danej brodawki. Brodawki korzeniowe uznawane są za źródło użytecznych biotechnologicznie mikroorganizmów, często charakteryzujących się zdolnością do promowania wzrostu roślin czy wspomagania procesu brodawkowania i kolonizacji korzeni przez bakterie ryzobiowe. Należy jednak podkreślić, że rola bakterii endofitycznych w układzie roślina – mikroorganizmy nie została jeszcze w pełni wyjaśniona (Peix i in., 2014; Trujillo i in., 2015; Etesami, 2022).

Zastosowana w niniejszych badaniach technika pozyskiwania bakterii z zewnątrznie odkażonych części roślin (z wykorzystaniem roztworów etanolu oraz soli metali ciężkich, takich jak HgCl_2) jest skuteczną i szeroko stosowaną metodą izolacji hodowlanej frakcji bakterii endofitycznych (Barac i in., 2004; Anjum i Chandra, 2015; Etesami, 2022). W wyniku przeprowadzonej izolacji bakterii endofitycznych, pozyskano łącznie pięćdziesiąt izolatów bakteryjnych, charakteryzujących się wyraźnymi różnicami w morfologii kolonii od typowych bakterii ryzobiowych (podrozdział 4.1). Izolaty podzielono na dwie grupy, cechujące się wyraźnymi różnicami w morfologii kolonii między sobą; spośród pozyskanych pięćdziesięciu izolatów, dziesięć charakteryzowało się wzrostem w postaci śluzowatych, lekko wypukłych kolonii o zabarwieniu od blad różowego do ciemnoczerwonego, natomiast pozostałe czterdzieści izolatów tworzyło niewielkie, suche i wrastające w podłoże kolonie o barwie od jasnopomarańczowej do ciemnopomarańczowej, o charakterystycznej dla promieniowców (*Actinobacteria*) morfologii kolonii.

W celu określenia zróżnicowania genetycznego pozyskanej populacji bakterii oraz wykonania analiz genetycznych, przeprowadzono procedurę izolacji materiału genetycznego bakterii. Izolacja genomowego DNA wykonana została w oparciu o metodę Pitchera i wsp. (1989), przystosowaną do izolacji DNA z komórek bakterii Gram ujemnych oraz Gram dodatnich, wykorzystywaną w badaniach dotyczących bakterii endofitycznych, tak jak w pracach da Silvy i wsp. (2013) czy Khana i wsp. (2015). Technika ta okazała się skuteczna

w przypadku bakterii z tzw. grupy I (podrozdział 4.1), natomiast w przypadku czterdziestu izolatów stanowiących tzw. grupę II izolacja DNA z wykorzystaniem tej techniki nie powiodła się (co dodatkowo sugerowało odmienny charakter bakterii z obydwu omawianych grup). Metodę izolacji DNA zmodyfikowano na etapie lizy ściany komórkowej bakterii, wykorzystując w tym celu lizozym jaja kurzego oraz mutanolizynę, substancje o działaniu synergistycznym w procesie lizy ściany komórkowej bakterii Gram dodatnich (Herbert i in., 2007). Wprowadzona modyfikacja okazała się skuteczna w przypadku izolatów bakteryjnych, dzięki czemu uzyskano materiał genetyczny o wysokim stopniu czystości. Wyizolowane DNA poddano następnie analizie techniką BOX-PCR w celu oceny zróżnicowania genetycznego badanej populacji (podrozdział 4.2.2). Metoda ta jest jedną z wielu technik genotypowania bakterii, wykorzystywanych także w badaniach bakterii endofitycznych (Wu i in., 2009; Carro i Nouiou, 2017; Passari i in., 2018; Manjunatha i in., 2022). Technika BOX-PCR umożliwia ocenę zróżnicowania genetycznego bakterii poprzez uzyskanie dla każdego z izolatów tzw. genomowego odcisku palca (ang. *fingerprinting*), powstającego w wyniku obrazowania produktów reakcji PCR po elektroforezie w żelu agarozowym. Liczba i umiejscowienie prążków na żelu są charakterystyczne dla każdego izolatu; w przypadku klonów bakteryjnych liczba i umiejscowienie prążków powinny być identyczne (Versalovic i in., 1994). Na podstawie przeprowadzonej analizy BOX-PCR ujawniono zróżnicowanie genetyczne pomiędzy badanymi izolatami; w obrębie grupy I stwierdzono obecność siedmiu niepowtarzalnych profili genetycznych, natomiast w grupie II – trzydziestu trzech profili genetycznych. Na podstawie analizy numerycznej obrazu profili genetycznych skonstruowano dendrogramy z wykorzystaniem metody UPGMA (przy 3 % współczynnika podobieństwa), obrazujące stopień zróżnicowania badanych izolatów w obrębie obydwu badanych grup bakterii. Na podstawie cech morfologicznych kolonii bakteryjnych oraz stopnia zróżnicowania genomowego izolatów wyselekcjonowano dwadzieścia sześć izolatów, które wykorzystano w dalszych analizach. Spośród dziesięciu szczepów grupy I wybrano siedem szczepów, cechujących się różnymi i niepowtarzalnymi profilami genetycznymi. W przypadku grupy II, spośród czterdziestu izolatów bakteryjnych wybrano siedemnaście izolatów charakteryzujących się niepowtarzalnymi profilami genetycznymi oraz różniących się intensywnością zabarwienia oraz cechami morfologicznymi kolonii (przeprowadzono częściową ocenę wg pracy Shirlinga i Gottlieba, 1966, dane nieprezentowane). Ponadto, do dalszych badań wybrano dwa izolaty (izolat 53 oraz izolat 55) charakteryzujące się identycznymi profilami genetycznymi, różniące się zdolnością do wytwarzania na podłożu 79CA pigmentów wnikających w głąb podłoża.

5.2. Bakterie z grupy *Methylobacterium sensu lato* oraz rodzaju *Micromonospora* jako endofity roślin z rodziny bobowate (*Fabaceae*)

Klasyfikacja systematyczna jest integralnym elementem badań dotyczących bakterii endofitycznych (Woźniak i in., 2018; Fadji i Babalola, 2020; Gamalero i in., 2022). Obecnie, dzięki szeroko rozpowszechnionym, nowoczesnym technikom sekwencjonowania, taksonomia bakterii coraz częściej opiera się na porównywaniu *in silico* danych pozyskiwanych w wyniku sekwencjonowania pełnych genomów, szczególnie w przypadku opisywania nowych gatunków bakterii. Metoda ta postulowana jest przez wielu badaczy jako nowy „złoty standard” w taksonomii prokariotów, w miejsce eksperymentalnej techniki hybrydyzacji DNA-DNA (Chun i Rainey, 2014; Franco-Duarte i in., 2019; Lalucat i in., 2020; Ferraz Helene i in., 2022). Należy jednak podkreślić, iż możliwość pozyskiwania pełnych sekwencji genomów bakteryjnych wciąż nie jest jeszcze wykorzystywana powszechnie, szczególnie w przypadku identyfikacji szczepów reprezentujących opisane wcześniej gatunki. Jednocześnie kluczowym i wciąż wykorzystywanym w taksonomii bakterii narzędziem jest analiza porównawcza sekwencji genu kodującego mniejszą podjednostkę rybosomu 16S rRNA. Składająca się z blisko 1500 pz sekwencja tego genu charakteryzuje się występowaniem odcinków o wysokim stopniu konserwatywności, jak i regionów (łącznie dziewięciu) o wysokiej zmienności, co przekłada się na użyteczność tego genu jako markera molekularnego w procesie przyporządkowania izolatów bakterii na poziomie rodzaju (Yarza i in., 2014; Franco-Duarte i in., 2019; Abellan-Schneyder i in., 2021; Hugenholtz i in., 2021). Uzupełnieniem i uszczegółowieniem analizy podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA jest wielolokusowa analiza sekwencji (MLSA), polegająca na analizie połączonych sekwencji kilku genów metabolizmu podstawowego, kodujących niezbędne do przeżycia organizmu białka. Wielolokusowa analiza sekwencji połączonych jest skuteczna szczególnie w dyferencjacji gatunków należących do tego samego rodzaju, umożliwiając w ten sposób ominięcie ograniczeń związanych z analizą genu 16S rRNA. Ograniczenia te związane są m.in. ze zbyt niskim polimorfizmem tego pojedynczego genu, uniemożliwiającym prawidłową identyfikację niektórych, blisko spokrewnionych rodzajów (Janda i Abbott, 2007; Chun i Rainey, 2014; Glaeser i Kämpfer, 2015; Ferraz Helene i in., 2022).

W celu określenia przynależności rodzajowej oraz oceny pokrewieństwa filogenetycznego badanych bakterii przeprowadzono analizę porównawczą genu 16S rRNA (podrozdział 4.2.3) oraz wielolokusową analizę połączonych sekwencji genów *recA*, *gyrB*, *rpoB* oraz

atpD (podrozdział 4.2.4). W wyniku przeprowadzonej procedury amplifikacji oraz sekwencjonowania genu 16S rRNA otrzymano sekwencje o długości 1330 nukleotydów dla izolatów grupy I; te porównano ze szczepami referencyjnymi z bazy danych GenBank. Pokrewieństwo filogenetyczne badanych izolatów przedstawiono na drzewie filogenetycznym, które skonstruowano w oparciu o metodę największej wiarygodności, przy zastosowaniu trójparametrycznego modelu Tamury i uwzględnieniu rozkładu gamma oraz parametru „*I*”.

Na podstawie stopnia podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA izolatów grupy I wykazano, że dla izolatów Red Mix I oraz 124, najbliższym filogenetycznie rodzajem był rodzaj *Methylobacterium* (stopień podobieństwa sekwencji 99,8 %), natomiast dla pozostałych pięciu izolatów tej grupy – rodzaj *Methylobacterium* (stopień podobieństwa 99,8-100 %), co wskazywałoby na przynależność badanych szczepów do tych właśnie rodzajów (Yarza i in., 2014; Chun i in., 2018). Następnie przeprowadzono analizę MLSA w oparciu o 2396-nukleotydową sekwencję połączonych genów *recA*, *gyrB*, *rpoB* i *atpD*. Filogram obrazujący relacje filogenetyczne szczepów referencyjnych wykazujących najwyższy stopień podobieństwa sekwencji połączonych do badanych izolatów, skonstruowano metodą największej wiarygodności, przy zastosowaniu modelu odwracalnego w czasie z uwzględnieniem rozkładu gamma oraz parametru „*I*”. Wyniki analizy porównawczej sekwencji genu 16S rRNA zostały częściowo potwierdzone poprzez analizę MLSA; na podstawie podobieństwa sekwencji połączonych potwierdzono przynależność izolatów Red Mix I oraz 124 do rodzaju *Methylobacterium* oraz izolatów 1117, C2III_s, C44_s i MV6II do rodzaju *Methylobacterium*. W przypadku izolatu Red Cyt, wyniki analizy MLSA wskazały na przynależność tego szczepu do rodzaju *Methylobacterium* (98,7 % podobieństwa do połączonych sekwencji szczepu referencyjnego *Methylobacterium radiotolerans*), co stoi w sprzeczności z przedstawionymi wynikami analizy sekwencji genu 16S rRNA. Należy w tym miejscu zaznaczyć, iż analiza MLSA charakteryzuje się większym stopniem precyzji w określaniu przynależności taksonomicznej bakterii niż analiza porównawcza sekwencji 16S rDNA, nie tylko na poziomie rodzaju, ale i na poziomie gatunku. Zastosowanie analizy opartej o sekwencje trzech lub więcej genów metabolizmu podstawowego pozwala uniknąć błędów związanych z ograniczeniami analizy pojedynczej sekwencji kodującej 16S rRNA. W przypadku blisko spokrewnionych rodzajów *Methylobacterium* oraz *Methylobacterium*, dodatkowym utrudnieniem w jednoznacznym ustaleniu pozycji taksonomicznej szczepów należących do omawianych rodzajów jest wciąż niepewna pozycja taksonomiczna niektórych gatunków należących do rodzaju *Methylobacterium* (Alessa, 2022). Rodzaj ten, wyłączony został z rodzaju *Methylobacterium* w 2018 roku m.in. na podstawie wyraźnego zróżnicowania w obrębie sekwencji genu

16S rRNA, co potwierdzono również w tej pracy (stopień podobieństwa sekwencji genu kodującego 16S rRNA izolatów grupy I mieścił się w zakresie 94,6-100 %, co wskazuje na dużą heterogeniczność sekwencji). Według Hörtda i wsp. (2020), rozdzielenie rodzajów *Methylobacterium* oraz *Methylobacterium*, skądinąd słuszne, obecnie nie wydaje się być prawidłowe m.in. ze względu na niedostateczną dostępność zdeponowanych sekwencji bakterii należących do rodziny *Methylobacteriaceae*, co implikuje konieczność reorganizacji tych taksonów w przyszłości, nie wykluczając ponownego włączenia niektórych gatunków, zaklasyfikowanych do rodzaju *Methylobacterium*, do rodzaju *Methylobacterium*. Poprawnym wydaje się więc obecnie określanie bakterii należących do rodzaju *Methylobacterium*/*Methylobacterium* jako grupa *Methylobacterium sensu lato*, podobnie jak we wspomnianej pracy Hörtda i wsp. (2020). W tym znaczeniu, niniejsze badania przyczyniają się w sposób pośredni do rozgraniczenia obydwu rodzajów poprzez udostępnienie w ogólnodostępnej bazie danych sekwencji genu 16S rRNA badanych szczepów, należących do rodzajów *Methylobacterium*/*Methylobacterium*.

W przypadku pozostałych izolatów zaklasyfikowanych na podstawie analizy sekwencji genu 16S rRNA do rodzaju *Methylobacterium*, tj. izolatów Red Mix I oraz 124, na podstawie analizy MLSA potwierdzono ich określoną wcześniej przynależność rodzajową. Wykazano, że szczep *Methylobacterium* sp. Red Mix I charakteryzował się 99,4 % podobieństwem połączonych sekwencji do odpowiednich sekwencji szczepu referencyjnego *Methylobacterium radiotolerans*, natomiast szczep *Methylobacterium* sp. 124 wykazał 95,5 % podobieństwo do szczepu referencyjnego *Methylobacterium tardum*. Zaklasyfikowane do rodzaju *Methylobacterium* izolaty 1117, C2III_s, C44_s i MV6II cechowały się natomiast największym podobieństwem połączonych sekwencji genów rdzeniowych do szczepu referencyjnego *Methylobacterium extorquens*, wykazując podobieństwo połączonych sekwencji na poziomie od 98,3 do 99,9 %.

Dla izolatów reprezentujących grupę I przeprowadzono analizę genu *mxoF*, kodującego większą podjednostkę dehydrogenazy metanolowej, enzymu uczestniczącego w procesie degradacji metanolu i wykorzystywania tego związku jako źródła węgla i energii (cecha charakterystyczna dla bakterii z rodziny *Methylobacteriaceae*; podrozdział 4.2.5). Sekwencja genu *mxoF* może być wykorzystywana jako marker molekularny, użyteczny w dyferencjacji gatunków należących do tej rodziny mikroorganizmów (Kist i Tate, 2013). Na podstawie podobieństwa 514-nukleotydowych fragmentów sekwencji genu *mxoF* badanych izolatów oraz sekwencji pozyskanych z bazy danych GenBank skonstruowano drzewo filogene-

tyczne. W wyniku przeprowadzonej analizy wykazano, że podobieństwo sekwencji badanego genu pomiędzy izolatami grupy I mieściło się w zakresie od 92 do 100 %. Zaklasyfikowane uprzednio do rodzaju *Methylobacterium* szczepy charakteryzowały się 99,6-100 % podobieństwem sekwencji do sekwencji genu *mxoF* szczepów referencyjnych różnych gatunków należących do rodzaju *Methylobacterium*, co potwierdza ich przynależność gatunkową do tego właśnie rodzaju. Nieco inaczej prezentują się wyniki analizy genu *mxoF* dla izolatów przyporządkowanych do rodzaju *Methylobacterium*; w przypadku izolatów Red Cyt oraz Red Mix I, podobieństwo sekwencji badanego genu wobec referencyjnych szczepów należących do rodzaju *Methylobacterium* wynosiło 100 %, co również potwierdza przynależność tych izolatów do wskazanego rodzaju. Izolat 124, zaklasyfikowany na podstawie analizy sekwencji genu 16S rRNA oraz analizy MLSA do rodzaju *Methylobacterium*, charakteryzował się natomiast najwyższym stopniem podobieństwa sekwencji (99,4 %) genu *mxoF* do referencyjnego szczepu *Methylobacterium pseudosasaie*, co może wskazywać na horyzontalny, międzyrodzajowy transfer tego genu.

Analizą porównawczą genu 16S rRNA oraz wielolokusowa analizą sekwencji połączonych genów *recA*, *gyrB*, *rpoB* i *atpD* objęto również izolaty grupy II. Stopień podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA badanych izolatów mieścił się w zakresie 97,1-100 %, co odzwierciedla stosunkowo wysoki stopień heterogeniczności tego genu w obrębie rodzaju *Micromonospora*, zauważony wcześniej przez Kocha i wsp. (1996) i potwierdzony przez Kroppenstedta i wsp. (2005). Na tej podstawie wykazano, że wszystkie izolaty grupy II wykazały najwyższy stopień podobieństwa sekwencji badanego genu do rodzaju *Micromonospora*; relacje filogenetyczne badanych szczepów z różnymi gatunkami należącymi do tego rodzaju przedstawiono na filogramie, skonstruowanym w oparciu o 1298-nukleotydowe sekwencje genu 16S rRNA metodą największej wiarygodności, przy zastosowaniu trójparametrycznego modelu Tamury z uwzględnieniem rozkładu gamma oraz parametru „*I*”. Podobieństwo sekwencji genu 16S rRNA badanych bakterii oraz sekwencji tego genu zdeponowanych w bazie GenBank mieścił się w zakresie od 99,6 do 100 %; badane izolaty przyporządkowano do rodzaju *Micromonospora*.

Przeprowadzoną analizę MLSA wykonano w oparciu o 2620-nukleotydową sekwencję połączonych genów *recA*, *gyrB*, *rpoB* i *atpD* dziewiętnastu szczepów grupy II oraz szczepów referencyjnych, dostępnych w bazie GenBank. Drzewo filogenetyczne, obrazujące relację filogenetyczną badanych bakterii oraz szczepów należących do różnych gatunków grupy II wykonano metodą największej wiarygodności, przy zastosowaniu modelu odwracalnego w czasie z uwzględnieniem rozkładu gamma oraz parametru „*I*”. Na podstawie

otrzymanych wyników potwierdzono przynależność wszystkich izolatów grupy II do rodzaju *Micromonospora*. Szczepy *Micromonospora*: 43, 29, 45, 66, 126 oraz 249 wykazały najwyższy stopień podobieństwa do szczepu referencyjnego *Micromonospora violae* (97-97,4 %). Szczepy *Micromonospora*: 30, 33, 152, 230 oraz N2 cechowały się najwyższym stopniem podobieństwa połączonych sekwencji do sekwencji szczepu referencyjnego *Micromonospora inaquosa* (97,3-97,8 %). Szczepy *Micromonospora*: 50, 53 oraz 55 charakteryzowały się natomiast najwyższym stopniem podobieństwa sekwencji połączonych w stosunku do sekwencji referencyjnego szczepu *Micromonospora alfalfae* (99,1 %). Z kolei szczepy *Micromonospora* sp. 5056 oraz *Micromonospora* sp. N5 cechowały się największym podobieństwem sekwencji do sekwencji referencyjnego szczepu *Micromonospora purpureochromogenes* (97,6-98,8 %); szczepy *Micromonospora* sp. 48 i *Micromonospora* sp. N4 wykazały najwyższe podobieństwo sekwencji połączonych do odpowiednich sekwencji szczepu referencyjnego *Micromonospora tulbaghiaie* (99,1-99,5 %). Szczep *Micromonospora* sp. 5052 charakteryzował się największym stopniem podobieństwa do szczepu referencyjnego *Micromonospora lupini* (98,5 %).

Uzyskane wyniki w sposób klarowny wskazują, że pozyskane z brodawek korzeniowych, nieryzobiowe izolaty bakteryjne należą do grupy *Methylobacterium sensu lato* (tj. do rodzajów *Methylobacterium* oraz *Methylorubrum*) oraz do rodzaju *Micromonospora*. Należące do wskazanych rodzajów bakterie już wcześniej izolowano z brodawek korzeniowych różnych gatunków roślin należących do rodzaju bobowate, co wskazuje na powszechną zdolność tych bakterii do kolonizacji roślin jako endofity (Yates i in., 2007; Palaniappan i in., 2010; Carro i in., 2012; Martínez-Hidalgo i in., 2020). Ponadto, warto zauważyć, że reprezentowane przez rodzaje *Methylobacterium*, *Methylorubrum* oraz *Micromonospora* typy *Proteobacteria* i *Actinobacteria* to najliczniej opisywane dotychczas zbiorowości bakterii endofitycznych (Hardoim i in., 2015; Khan i in., 2020).

5.3. Analiza zdolności badanych bakterii do realizowania mechanizmów promowania wzrostu roślin *in vitro*

W ujęciu klasycznym, ocenę zdolności bakterii endofitycznych do promowania wzrostu gospodarza roślinnego (badania *in planta*) poprzedza laboratoryjna ewaluacja potencjału tych bakterii do realizacji różnych mechanizmów promowania wzrostu roślin *in vitro* (Liu i in., 2017; De Silva i in., 2019; Khan i in., 2020). Wybranych dwadzieścia sześć szczepów

bakterii endofitycznych przeanalizowano pod kątem ich właściwości biochemicznych *in vitro* w celu określenia zdolności tych mikroorganizmów do realizacji różnych mechanizmów związanych z kolonizacją roślin oraz promowaniem ich wzrostu. Na podstawie otrzymanych wyników dokonano selekcji szczepów o największym potencjale do wspomagania wzrostu roślin. Szczepy te poddano następnie ewaluacji *in planta*.

W przeprowadzonych badaniach oceniono zdolność wybranych, reprezentatywnych dla poszczególnych rodzajów szczepów do wykorzystywania różnych substancji chemicznych jako jedynego źródła węgla i energii, z wykorzystaniem komercyjnego testu GEN III MicroPlate (system Biolog; podrozdział 4.3.1). Zdolność bakterii do wykorzystywania różnych źródeł węgla wiąże się bezpośrednio ze zdolnością do kolonizacji wewnętrznych tkanek roślin. Rośliny, poprzez modulację składu chemicznego wydzielin korzeniowych, ułatwiają namnażanie się w ryzoplacie tych bakterii, które wykazują zdolność do metabolizowania substancji organicznych zawartych w wydzielinach korzeni (Pfeiffer i in., 2017; Sasse i in., 2018; Pinski i in., 2019). Badane szczepy charakteryzowały się zróżnicowaną zdolnością w wykorzystywaniu różnych substancji jako źródeł węgla i energii; liczba wykorzystywanych związków wahała się od 13 do 27. Wśród wielu substancji wykorzystywanych przez poszczególne szczepy warto wymienić chociażby takie substancje jak α -D-glukoza, D-mannoza, D-fruktoza, mio-inozytol, glicerol, kwas cytrynowy czy kwas α -keto-glutarowy. Co ważne, związki te występują w składzie wydzielin korzeniowych różnych roślin, co zostało opisane w literaturze (Sasse i in., 2018; More i in., 2019).

W przypadku badanych szczepów Gram ujemnych, przeprowadzono ocenę wybranych cech biochemicznych z wykorzystaniem zestawu Microgen ID (podrozdział 4.3.2). Na podstawie wyników tego testu wykazano, że szczepy należące do grupy *Methylobacterium sensu lato* charakteryzują się dużym podobieństwem fenotypowym w obrębie badanych właściwości biochemicznych. Sześć z siedmiu badanych szczepów charakteryzowało się zdolnością do hydrolizy mocznika, natomiast wszystkie szczepy wykazywały zdolność do redukcji azotanów do azotynów lub azotu. Właściwości te wiążą się bezpośrednio z przemianami azotu, i gdy zachodzą w glebie, mogą przyczyniać się do zubożenia puli tego pierwiastka występującego w formach dostępnych dla roślin, co jest niewątpliwie cechą niekorzystną w przypadku bakterii endofitycznych (Zhang i in., 2015; Coskun i in., 2017). Sześć spośród siedmiu badanych szczepów charakteryzowało się zdolnością do fermentacji L-arabinozy, pięciowęglowego cukru będącego ważnym monomerem zawartym w hemicelulozie oraz składnikiem wydzielin korzeniowych, co wskazuje na potencjał tych bakterii do degradacji ścian komórkowych roślin oraz namnażania na powierzchni korzeni, co może znacząco

ułatwiać proces kolonizacji rośliny-gospodarza (Sasse i in., 2018; Ye i in., 2018; More i in., 2019). Kolonizację wewnętrznych tkanek roślinnych przez bakterie ułatwiają również produkowane przez mikroorganizmy enzymy, szczególnie te umożliwiające degradację polimerów tworzących ścianę komórkową roślin (Bulgarelli i in., 2013; Afzal i in., 2019).

Przeprowadzona analiza aktywności hydrolitycznej dwudziestu sześciu badanych szczepów bakterii endofitycznych (z wykorzystaniem testu API ZYM, bioMérieux) wskazuje na potencjał tych bakterii do produkcji różnych enzymów hydrolitycznych (podrozdział 4.3.3). Najwyższym potencjałem hydrolitycznym cechują się szczepy z rodzaju *Micromonospora* (mogą produkować, w zależności od szczepu, od 13 do 16 spośród 19 badanych enzymów), co jednoznacznie potwierdza dotychczasowe badania dotyczące właściwości enzymatycznych bakterii należących do tego rodzaju (Valdés i in., 2005; Özdemir-Koçak i in., 2017; Benito i in., 2022). Zdolność badanych szczepów do produkcji różnych enzymów hydrolitycznych, umożliwiających degradację związków nieorganicznych oraz naturalnych, organicznych polimerów, może odgrywać istotną rolę nie tylko w procesach kolonizacji tkanek roślinnych, ale także w procesie udostępniania roślinom składników mineralnych oraz substancji odżywczych, szczególnie pozostających dotąd w formie związków niedostępnych dla roślin. Wykazano, że wszystkie badane izolaty charakteryzowały się zdolnością do produkcji kwaśnej fosfatazy, enzymu biorącego udział w rozpuszczaniu estrów fosforanowych, co może przekładać się na zdolność udostępniania jonów fosforanowych roślinom w warunkach polowych. Ponadto, szesnaście oraz dwadzieścia trzy szczepy (z puli badanych dwudziestu sześciu bakterii) wykazały odpowiednio zdolność do produkcji fosfatazy zasadowej oraz fosfohydrolazy naftolowej AS-BI, enzymów uczestniczących w defosforylacji organicznych związków fosforu (Khan i in., 2016; Matos i in., 2017; Jeong i in., 2018; Adhikari i Pandey, 2020). Zdolność bakterii do produkcji enzymów hydrolizujących wiązania w białkach (trypsyna, α -chymotrypsyna, arylamidaza leucyny, arylamidaza waliny, arylamidaza cystyny) może natomiast świadczyć o możliwości badanych szczepów do rozkładu peptydów. Dzięki syntezie tych enzymów, bakterie mogą ułatwiać roślinom pozyskiwanie aminokwasów; co więcej, zdolność do produkcji enzymów proteolitycznych może wskazywać na potencjalne właściwości związane z ograniczaniem rozwoju patogenów czy szkodników roślin, m.in. poprzez degradację elementów ściany komórkowej patogenów grzybowych czy uszkodzanie jaj szkodliwych nicieni (Silva i in., 2016; Tashi-Oshnoei i in., 2017; Hu i in., 2019; Hazarika i in., 2021).

Stopień wrażliwości bakterii endofitycznych na niekorzystne warunki środowiskowe ma istotne znaczenie w kontekście oceny możliwości wykorzystania danych szczepów w

uprawie i ochronie roślin. Wyselekcjonowane na podstawie zdolności bakterii do promowania wzrostu roślin szczepy, powinny się bowiem charakteryzować zdolnością do adaptacji w środowisku oraz odpornością na zmieniające się warunki fizykochemiczne (Woźniak i in., 2019; Pirttilä i in., 2021; Denton-Thompson i Sayer, 2022; Khan i in., 2023).

Analiza fenotypowa z wykorzystaniem testu GEN III MicroPlate umożliwia ocenę oporności bakterii na różne substancje chemiczne oraz odczyn środowiska (podrozdział 4.3.1). Na podstawie przeprowadzonych testów wrażliwości oceniono, że badane szczepy wykazują zróżnicowaną wrażliwość na badane substancje chemiczne (bakterie wykazały oporność w pięciu do piętnastu z dwudziestu trzech różnych testów). Na szczególną uwagę zasługuje charakterystyka wrażliwości bakterii na zasolenie podłoża oraz jego odczyn. Wykazano, że wszystkie badane w tym doświadczeniu izolaty cechowały się opornością na obecność chlorku sodu w stężeniu 1 %. W przypadku odczynu podłoża, osiem spośród jedenastu badanych szczepów należących do rodzajów *Methylobacterium*, *Methylorubrum* oraz *Micromonospora* wykazało oporność na pH równe 6, natomiast jeden z badanych szczepów – *Methylobacterium* sp. 124 – na pH równe 5. Ocenę wrażliwości badanych bakterii na obecność NaCl w podłożu oraz na jego odczyn kontynuowano w postaci testów wzrostu bakterii na odpowiednich podłożach mikrobiologicznych, rozszerzając tę analizę na wszystkie dwadzieścia sześć szczepów bakterii. Wykazano, że wszystkie badane szczepy charakteryzują się opornością na chlorek sodu w stężeniu 1 % (podrozdział 4.3.4), co potwierdza zaprezentowane wyniki analizy wybranych szczepów z wykorzystaniem zestawu GEN III MicroPlate. Szczepy należące do rodzajów *Methylobacterium* oraz *Methylorubrum* charakteryzowały się brakiem zdolności do wzrostu na podłożach zawierających wyższe stężenia NaCl w podłożu, tj. 2 %, 3 % czy 4 %, podobnie jak chociażby w badaniach Lee i wsp. (2009), którzy opisując gatunek *Methylobacterium dankookense* wykazali zdolność tego szczepu do wzrostu na podłożu zawierającym 1,5 % stężenie NaCl, natomiast 2 % stężenie tej soli w podłożu hamowało wzrost tego szczepu. Trotsenko i wsp. (2007) wskazują nawet, iż w przypadku bakterii należących do rodzaju *Methylobacterium* już 1 % stężenie NaCl w podłożu hamuje ich wzrost (wyłączając szczepy halofilne).

Osiem z dziewiętnastu badanych szczepów należących do rodzaju *Micromonospora* cechowało się natomiast zdolnością do wzrostu na podłożu zawierającym NaCl w stężeniu 2 %; spośród nich dwa (*Micromonospora* sp. 33 oraz *Micromonospora* sp. N4) wykazały wzrost na podłożu z 3 % dodatkiem chlorku sodu. Oporność szczepów z rodzaju *Micromonospora* na chlorek sodu, (w stężeniu ≤ 2 %) jest cechą charakterystyczną wielu gatunków w obrębie tego rodzaju. Należy jednak wspomnieć, iż w obrębie rodzaju *Micromonospora*

scharakteryzowano również szczepy halofilne, których oporność na NaCl w podłożu sięga nawet 5 % czy 7 % (Carro i in., 2013; Gurovic i in., 2013; Songsumanus i in., 2013).

Zakres pH podłoża, w którym zachodził wzrost badanych bakterii charakteryzował się dużą zmiennością pomiędzy szczepami (podrozdział 4.3.5). Wszystkie dwadzieścia sześć szczepów cechowało się zdolnością do wzrostu na podłożu o pH równym 6,5 oraz 7; nadto dwadzieścia pięć szczepów wykazało oporność na pH podłoża równe 8, natomiast dwadzieścia trzy szczepy wykazały wzrost na podłożu o pH 9. Dwa szczepy należące do rodzaju *Methylobacterium* oraz trzynaście szczepów należących do rodzaju *Micromonospora* wykazało natomiast zdolność do wzrostu na podłożu o pH 5,5. Dziesięć szczepów z rodzaju *Micromonospora* było zdolnych do wzrostu na podłożu o pH 10, co potwierdza wcześniejsze doniesienia o szczepach należących do omawianych rodzajów (Gurovic i in., 2013; Genilloud, 2015; Green, 2015; Kittiwongwattana i in., 2015).

W ramach podjętych badań przeprowadzono także ocenę zdolności wybranych szczepów do wzrostu w różnych temperaturach (8 °C, 28 °C, 37 °C, 42 °C, 45 °C) analizując wybrane, reprezentatywne dla każdego z badanych rodzajów szczepy (cztery z grupy *Methylobacterium sensu lato* oraz osiem z rodzaju *Micromonospora*; podrozdział 4.3.6). Wykazano, że wszystkie z dwunastu badanych bakterii cechowały się zdolnością do wzrostu w temperaturze 28 °C oraz 37 °C. Ponadto szczepy należące do grupy *Methylobacterium sensu lato* charakteryzowały się zdolnością do wzrostu w temperaturze 8 °C oraz – w przypadku trzech z czterech badanych szczepów – również w temperaturze 42 °C (słaby wzrost). Niniejsze wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia dotyczące zakresu temperatur wzrostu bakterii należących do tej grupy, chociaż zdolność do wzrostu w temperaturze 8 °C oraz 37 °C i wyższej nie jest powszechną cechą dla tej grupy mikroorganizmów (Knief i in., 2012; Green., 2015; Lee i Jeon, 2018). W przypadku szczepów należących do rodzaju *Micromonospora*, siedem z ośmiu badanych szczepów było zdolnych do wzrostu w 42 °C (słaby wzrost), co znajduje potwierdzenie w literaturze dotyczącej badań nad bakteriami należącymi do tego rodzaju (Genilloud, 2015; Thanaboripat i in., 2015; Thawai i in., 2019).

Wśród istotnych czynników umożliwiających kolonizację tkanek roślinnych przez bakterie endofityczne wymienia się zdolność do aktywnego ruchu, oddziaływań typu *quorum sensing* i tworzenia biofilmu bakteryjnego. Właściwości te ułatwiają bakteriom proces adhezji do komórek skórki korzenia, stanowiący jeden z etapów kolonizacji i poprzedzający wnikanie bakterii do wnętrza tkanek rośliny-gospodarza (Liu i in., 2011; Bogino i in., 2013; Pinski i in., 2019). Ocenę zdolności wszystkich badanych dwudziestu sześciu szczepów do

aktywnego ruchu zbadano na 0,35 % podłożu agarowym 79CA (podrozdział 4.3.7). Wykazano, że sześć spośród siedmiu badanych szczepów z grupy *Methylobacterium sensu lato* charakteryzowało się zdolnością do aktywnego ruchu. Zdolność do aktywnego ruchu tych bakterii wydaje się charakterystyczną cechą tej grupy (Green, 2015; Tsagkari i Sloan, 2018). Co ciekawe, tylko jeden szczep z grupy *Methylobacterium sensu lato*, szczep *Methylorubrum* sp. MV6II, nie wykazał zdolności przemieszczania się w 0,35 % podłożu agarowym, co mogłoby wskazywać na niezdolność tego szczepu do aktywnego ruchu. Należy jednak podkreślić, iż świetle dostępnej literatury wyróżnia się szereg czynników fizykochemicznych, uniemożliwiających zdolnym do ruchu bakteriom aktywne przemieszczanie się, m.in. gęstość środowiska w którym zachodzi ich wzrost (w tym przypadku, stężenie agaru w podłożu), co należałoby uwzględnić w przyszłych analizach (Mattick, 2002). Ponadto, jak donoszą Doerges i Kutschera (2014), należące do grupy *Methylobacterium sensu lato* szczepy mogą – w zależności od aktualnej fazy wzrostu i zagęszczenia komórek – wykazywać niezdolność do ruchu spowodowaną czasową utratą flagelli. Natomiast wykazana niezdolność do aktywnego ruchu wszystkich badanych szczepów z rodzaju *Micromonospora* potwierdza dotychczasową wiedzę na temat tego rodzaju bakterii (Tanasupawat i in., 2010; Genilloud, 2015; Thanaboripat i in., 2015).

Oceniono również zdolność wszystkich szczepów należących do rodzajów *Methylobacterium/Methylorubrum* do produkcji N-acylohomoserynowych cząsteczek laktonowych, będących autoinduktorami w procesie *quorum sensing* bakterii Gram ujemnych (podrozdział 4.3.8). Wykazano, że tylko szczep *Methylorubrum* sp. MV6II charakteryzował się wytwarzaniem AHL w obecności wskaźnikowego szczepu *Chromobacterium violaceum* CV026. Fakt ten przeczy wcześniejszym doniesieniom, w których zdolność do oddziaływań typu *quorum sensing* uznaje się za cechę powszechną wśród bakterii należących do grupy *Methylobacterium sensu lato*, co zauważają Poonguzhall i wsp. (2007). Jednocześnie wskazują oni, że nie wszystkie cząsteczki sygnałowe w procesie *quorum sensing*, produkowane przez szczepy należące do rodzaju *Methylobacterium*, stymulują proces produkcji wiolacyny przez szczep *Ch. violaceum* CV026 (Poonguzhall i in., 2007). Co więcej, Wallace i wsp. (2023) wykazali, że w przypadku szczepu *Methylobacterium fujisawaense* DSM5686 autoinduktory zaangażowane w oddziaływania *quorum sensing* w sposób negatywny wpływały na zdolność tej bakterii do ruchu, co znajduje odzwierciedlenie również w niniejszych badaniach (zdolny do produkcji autoinduktorów szczep *Methylorubrum* sp. MV6II jako jedyny charakteryzował się brakiem zdolności do aktywnego ruchu). Wskazuje to na konieczność pogłębionych badań w celu wyjaśnienia mechanizmów związanych ze zdolnością badanych

szczepów do oddziaływań typu *quorum sensing*, w tym do eksperymentalnego określenia chemicznego charakteru ewentualnie produkowanych autoinduktorów.

Oddziaływania typu QS, stanowiące formę „komunikacji” pomiędzy komórkami bakterii, odgrywają niebagatelną rolę w procesie formowania biofilmu bakteryjnego (Li i Zhao, 2020). Należy więc podkreślić, że pośrednim argumentem, wskazującym na zdolność do oddziaływań typu *quorum sensing* jest także – wykazana w przypadku wszystkich szczepów z grupy *Methylobacterium sensu lato* – zdolność do tworzenia biofilmu. Na podstawie zróżnicowania potencjału bakterii do tworzenia tej struktury oraz analizy przeżywalności bakterii w biofilmie wykazano, że wszystkie szczepy z rodzajów *Methylobacterium* lub *Methylorubrum* cechowały się zróżnicowanym potencjałem do tworzenia biofilmu oraz przeżywalności w tej strukturze (podrozdział 4.3.9). Właściwości te wydają się powszechne w przypadku szczepów tej grupy bakterii (Yano i in., 2013; Kovaleva i in., 2014; Tsagkari i in., 2017).

Użyteczność aplikacyjna bakterii endofitycznych o korzystnych właściwościach wobec gospodarza roślinnego stoi u podstaw wykorzystywania w rolnictwie wyselekcjonowanych szczepów, charakteryzujących się zdolnością do bezpośredniego lub pośredniego promowania wzrostu roślin (Afzal i in., 2019; Glick i in., 2020a). Wśród dobroczynnych właściwości bakterii endofitycznych, ważne miejsce zajmuje zdolność do deaminacji kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego, co w sposób bezpośredni zwiększa odporność roślin na stresory biotyczne i abiotyczne oraz umożliwia roślinie dostęp do przyswajalnych form azotu (Glick, 2014; Khan i in., 2016; Orozco-Mosqueda i in., 2020). Przeprowadzono analizę genetyczną z wykorzystaniem techniki PCR w celu oceny obecności w genomach bakterii z rodzajów *Methylobacterium* oraz *Methylorubrum* genu *acdS* kodującego deaminazę ACC (podrozdział 4.2.6). Przeprowadzona wizualizacja produktów PCR w 1 % żelu agarozowym ujawniła, że wszystkie badane szczepy charakteryzują się występowaniem w genomach fragmentów odpowiadających wielkością sekwencji genu *acdS*. Ze względu na trudności w procesie sekwencjonowania, jedynie w przypadku pięciu szczepów, tj. *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Methylobacterium* sp. 124, *Methylorubrum* sp. C44s i *Methylorubrum* sp. MV6II, uzyskano odczyty sekwencji, których analiza filogenetyczna wykazała, iż są to docelowo poszukiwane fragmenty genu *acdS*. W kolejnym etapie przeprowadzono ocenę zdolności do wykorzystywania ACC jako jedyne źródła azotu (podrozdział 4.3.10). Badaniami objęto wszystkie dwadzieścia sześć szczepów. Stwierdzono, że wszystkie szczepy grupy *Methylobacterium sensu lato* charakteryzują się

zdolnością do deaminacji ACC, co potwierdza wyniki przeprowadzonej analizy genetycznej. W przypadku rodzaju *Micromonospora*, żaden z badanych dziewiętnastu szczepów nie wykazał zdolności do wykorzystywania ACC jako źródła azotu, chociaż jak pokazują badania, bakterie należące do rodzaju *Micromonospora* mogą wykazywać zdolność do deaminacji ACC, tak jak chociażby endofityczny szczep *Micromonospora chalcea* UAE1 (Tarabily i in., 2019) czy pozyskane z gleby w rejonie Jiangsu (Chiny) izolaty *Micromonospora* sp. (Gong i in., 2018).

Wykazujące zdolność do rozkładu ACC szczepy z grupy *Methylobacterium sensu lato* poddano ilościowej ocenie zdolności do wykorzystywania ACC jako jedynego źródła azotu. Wykazano, że wszystkie badane szczepy cechują się zbliżonymi wartościami charakteryzującymi zdolność do dekompozycji ACC, wykorzystując od 0,83 do 1,08 mM ACC w czasie sześciodniowej inkubacji (podrozdział 4.3.10). Właściwość tą potwierdzono również u innych bakterii należących do rodziny *Methylobacteriaceae* (Madhaiyan i in., 2006a; Madhaiyan i in., 2007a; Yim i in., 2013).

Niemniej istotną i wysoce pożądaną cechą endofitycznych bakterii promujących wzrost roślin jest zdolność do wiązania azotu cząsteczkowego i udostępnianie go w formie przyswajalnej dla roślin (Nag i in., 2020; Rana i in., 2023). Szczepy należące do rodzajów *Methylobacterium* oraz *Methylorubrum* poddano analizie genetycznej z wykorzystaniem techniki PCR (podrozdział 4.2.6). Jedynie w przypadku szczepów *Methylobacterium* sp. Red Cyt oraz *Methylorubrum* sp. C2III_s wykazano obecność genu *nifH* kodującego białko *Fe*, wchodzące w skład enzymu wiążącego azot. W przypadku szczepu *Methylorubrum* sp. C2III_s ponownie natrafiono na problemy z sekwencjonowaniem produktów PCR, mimo wielokrotnych prób amplifikacji docelowej sekwencji. Problem próbowano rozwiązać wykorzystując różne komercyjne mieszaniny reakcyjne, zawierające różne odmiany enzymu polimerazy; ponadto do mieszaniny reakcyjnej dodawano związki chemiczne ułatwiające amplifikację tzw. trudnych matryc (DMSO, betaina; Jensen i in., 2010) oraz modyfikowano warunki reakcji sekwencjonowania. Ponadto, amplifikację i sekwencjonowanie problematycznych sekwencji zlecano firmie zewnętrznej (Genomed S.A, Warszawa), również bez powodzenia. W tej sytuacji wydaje się, że skutecznym narzędziem, umożliwiającym pozyskanie sekwencji nukleotydowych byłoby przeprowadzenie sekwencjonowania pełnych genomów.

Ewaluację zdolności wszystkich dwudziestu sześciu szczepów do wiązania azotu atmosferycznego przeprowadzono wg metody Baldaniego i wsp. (2014), oceniając zdolność

bakterii do wzrostu w półpłynnych podłożach bez dodatku azotu (podrozdział 4.3.11). Uzyskane wyniki wskazują, że jedynie szczep *Methylobacterium* sp. Red Cyt charakteryzował się dodatnim wynikiem testu. W przypadku szczepu *Methylorubrum* sp. C2III_s zaobserwowano zdolność do wzrostu po pierwszym pasażu. Ze względu na brak wzrostu po drugim oraz trzecim pasażu, test uznano za negatywny, jednak w świetle analizy produktów PCR uznano, że otrzymany w przypadku tego szczepu wynik nie powinien być interpretowany jako jednoznacznie negatywny; dlatego badany szczep wykorzystano w badaniach *in planta*.

Zdolność do wiązania azotu atmosferycznego przez bakterie z grupy *Methylobacterium sensu lato* została opisana w literaturze (Jourand i in., 2004; Raja i in., 2006; Madhaiyan i in., 2015). W przypadku bakterii należących do rodzaju *Micromonospora* uznaje się, że bakterie te mogą wykazywać zdolność do wiązania azotu atmosferycznego (Valdés i in., 2005; Trujillo i in., 2010). Ponadto, jak donoszą Kaewkla i wsp. (2021), wyizolowany z korzeni sosny szczep *Micromonospora veneta* charakteryzuje się występowaniem w genomie genów odpowiedzialnych za redukcję azotu atmosferycznego, co wskazuje na potencjał tego szczepu do wiązania azotu atmosferycznego *in vivo*. Tę cechę autorzy potwierdzili *in vitro* w podłożu NFb, stosując test wzrostowy Baldaniego i wsp. (2014). Tę metodę wykorzystano również w niniejszej rozprawie stosując zmodyfikowane podłoże NFb z mannitolem jako źródłem węgla i energii oraz z czerwienią fenolową zamiast błękitu bromotymolowego, (błękit bromotymolowy hamował wzrost badanych bakterii; dane nieprezentowane). Z drugiej strony Martínez-Hidalgo i wsp. (2014), badając endofityczne izolaty należące do rodzaju *Micromonospora* ocenili, że badane przez nich bakterie nie wiążą azotu atmosferycznego oraz nie wykazują zdolności do wzrostu w podłożu półpłynnym, pozbawionym azotu, co potwierdziło się dla wszystkich dziewiętnastu przebadanych szczepów reprezentujących rodzaj *Micromonospora*.

Kolejnym mechanizmem, zaangażowanym w promowanie wzrostu gospodarza roślinnego przez bakterie endofityczne jest zdolność do produkcji kwasu indolilo-3-octowego (IAA), będącego ważnym hormonem roślinnym, odpowiadającym w głównej mierze za wzrost wydłużeniowy roślin (Etesami i in., 2015; Afzal i in., 2019; Orozco-Mosqueda i in., 2023). Analiza zdolności badanych bakterii do produkcji IAA wykazała, że wszystkie szczepy cechuje zdolność do produkcji IAA z wykorzystaniem tryptofanu jako substratu (podrozdział 4.3.12). Cecha ta jest stosunkowo powszechnym mechanizmem, charakterystycznym dla bakterii promujących wzrost, w tym bakterii należących do omawianych w tej rozprawie rodzajów (Lee i in., 2004; Shutsrirung i in., 2013; Martínez-Hidalgo i in., 2014; Pattnaik i in., 2017). Jednocześnie wykazano, że żaden z badanych szczepów nie wykazał

zdolności do produkcji indolu, aktywnego biologicznie związku o właściwościach związanych z promowaniem wzrostu roślin oraz ich ochroną przed patogenami (Sun i in., 2023). Brak zdolności badanych szczepów z rodzajów *Methylobacterium*, *Methylorubrum* oraz *Micromonospora* do produkcji indolu znajduje odzwierciedlenie w literaturze (Nimaichand i in., 2013; Green, 2015; Green i Ardley, 2018; Kim i in., 2020b).

Kolejnym mechanizmem związanym z pośrednim promowaniem wzrostu roślin, szczególnie istotnym z punktu widzenia fitoremediacji wspomagananej mikroorganizmami, jest tolerancja na zawarte w podłożu metale ciężkie oraz zdolność do produkcji metaloforów ułatwiających sekwestrację tych pierwiastków (Gałązka i in., 2015; Glick, B.R., 2020b; Ortúzar i in., 2020). Oceniono stopień tolerancji dwudziestu sześciu badanych szczepów na zawartość jonów arsenu, glinu i miedzi w podłożu (podrozdział 4.3.13). Wykazano, że siedem szczepów z grupy *Methylobacterium sensu lato* oraz dziewięć szczepów z rodzaju *Micromonospora* charakteryzowało się zdolnością do wzrostu na podłożach zawierających jony badanych metali/półmetali w różnych stężeniach molowych. Bakterie charakteryzowały się najwyższą tolerancją na zawartość jonów arsenu w podłożu – w przypadku sześciu szczepów należących do grupy *Methylobacterium sensu lato* oraz trzech szczepów należących do rodzaju *Micromonospora* wykazano zdolność bakterii do wzrostu na podłożu zawierającym 18 mM jonów arsenu. W przypadku jonów miedzi oraz glinu, badane szczepy wykazały tolerancję na stężenia tych metali w podłożu w zakresie 1-2 mM, co świadczy o stosunkowo niewielkiej tolerancji na te pierwiastki. Wyjątkiem był szczep *Methylobacterium* sp. Red Mix I, którego tolerancja na zawartość jonów miedzi w podłożu sięgała 6 mM.

Przedstawione doniesienia znajdują odzwierciedlenie w literaturze; jak wskazali Dorado i wsp. (2012), bakterie należące do rodzaju *Methylobacterium* mogą charakteryzować się tolerancją na wysokie stężenie jonów arsenu, kadmu i ołowiu. Podobne wnioski wysnuli de Marco i wsp. (2004), którzy udowodnili tolerancję różnych szczepów należących do rodzaju *Methylobacterium* na obecność jonów ołowiu oraz arsenu. Szczepy należące do grupy *Methylobacterium sensu lato* mogą również charakteryzować się tolerancją na zawartość jonów miedzi, o czym donoszą Koo i Cho (2007) oraz Dávalos i García-de Los Santos (2023). Z kolei o potencjale bakterii należących do rodzaju *Micromonospora* do wzrostu w środowisku zawierającym metale ciężkie świadczą przedstawione przez Ortúzar i wsp. (2020) wyniki badań *in silico*, które ujawniły obecność w genomach większości badanych przez badaczy szczepów z rodzaju *Micromonospora*, od kilku do kilkudziesięciu genów związanych z opornością na obecność metali ciężkich. Ponadto, właściwości te zostały również potwierdzone w testach *in vitro* oraz *in planta*. Co ważne, owe korzystne właściwości

związane z tolerancją na obecność metali ciężkich wydają się być cechą charakterystyczną dla wybranych gatunków, czy nawet szczepów, co potwierdzają również niniejsze wyniki badań, w których wykazano, że obok szczepów charakteryzujących się wysokim stopniem tolerancji na różne metale występują również szczepy charakteryzujące się całkowitą wrażliwością na obecność szkodliwych pierwiastków w podłożu. Warto zauważyć, że ze względu na wysoki stopień tolerancji na obecność wybranych metali ciężkich, w przypadku sześciu szczepów należących do grupy *Methylobacterium sensu lato* oraz trzech należących do rodzaju *Micromonospora*, słusznym wydaje się przeprowadzenie szerszej analizy badawczej w celu określenia mechanizmów zaangażowanych w zwiększanie tolerancji na zawartość jonów arsenu i miedzi w podłożu. Kierunek ten wydaje się szczególnie ważny ze względu na powszechnie wykorzystywane w uprawach ogrodniczych pestycydy zawierające w swoim składzie związki miedzi jako substancje czynne, których pozostałości mogą zalegać w ekosystemach rolniczych. Warto wspomnieć, iż jeszcze do niedawna w rolnictwie stosowano pestycydy (w tym zaprawy nasienne) zawierające arsen (Kaczmarek-Cichosz in., 2011; Tomassi-Morawiec i in., 2016).

Oceniono zdolność siedmiu szczepów należących do grupy *Methylobacterium sensu lato* oraz dziewiętnastu szczepów należących do rodzaju *Micromonospora* do produkcji sideroforów, związków ułatwiających przyswajanie jonów żelaza w warunkach niedoboru tego pierwiastka. Ponadto określono zdolność tych bakterii do produkcji metaloforów umożliwiających chelatowanie jonów miedzi, glinu lub arsenu. Zdolność do syntezy metaloforów przekłada się na zwiększanie tolerancji roślin na te pierwiastki, zaliczane do tzw. metali ciężkich. W tym celu posłużono się zmodyfikowaną metodą wykorzystującą podłoże minimalne CAS zawierające jony Fe, Cu, Al lub As (podrozdział 4.3.14). Wykazano, że spośród siedmiu szczepów należących do grupy *Methylobacterium sensu lato* jedynie szczep *Methylobacterium* sp. Red Mix I cechował się zdolnością do wytwarzania metaloforów umożliwiających chelatowanie jonów miedzi, glinu i arsenu. Dodatkowo, badania dotyczące wrażliwości na różne stężenia metali ciężkich w podłożu wykazały, że szczep ten charakteryzował się również zdolnością do wzrostu na podłożach zawierających jony miedzi, glinu oraz arsenu odpowiednio w stężeniu 6 mM, 2 mM i 18 mM. Juma i współpracownicy (2022) na podstawie przeprowadzonych *in silico* analiz, stwierdzili, że w genomach bakterii z rodzaju *Methylobacterium* występują różne klastry genów związanych z produkcją sideroforów, co może świadczyć o zdolności tych szczepów do chelatowania różnych metali. Ci sami autorzy wykazali również, iż w obrębie rodzajów *Methylobacterium* oraz *Methylorubrum* występują

szcypy, które nie posiadają genów związanych z produkcją metaloformów (dziewięć z sześćdziesięciu przebadanych), co potwierdzają wyniki przedstawione w niniejszej pracy. Również według badań przeprowadzonych przez Taniego i wsp. (2012), mniej niż 40 % przebadanych przez nich szczepów należących do rodzaju *Methylobacterium* charakteryzowało się zdolnością do wytwarzania sideroformów.

Wszystkie przebadane szczepy należące do rodzaju *Micromonospora* (dziewiętnaście szczepów) charakteryzowało się zdolnością do produkcji metaloformów umożliwiających chelatowanie jonów żelaza, miedzi, glinu i arsenu (podrozdział 4.3.14). Największe średnie strefy przebarwień odnotowano w przypadku podłoża CAS zawierającego jony arsenu, co świadczy o największym powinowactwie wytwarzanych przez te szczepy metaloformów do tego właśnie pierwiastka. W przypadku szczepów *Micromonospora* sp. 33, *Micromonospora* sp. 43, *Micromonospora* sp. 48, *Micromonospora* sp. 50, *Micromonospora* sp. 53, *Micromonospora* sp. 55 oraz *Micromonospora* sp. 5052 zdolność do produkcji metaloformów wiążących arsen idzie w parze ze zdolnością do wzrostu na podłożach zawierających arsen w podłożu (9-18 mM; podrozdział 4.3.13), co wydaje się szczególnie użyteczne w przypadku wykorzystania tych bakterii w procesach bioremediacji czy fitoremediacji wspomaganiej mikroorganizmami. Zdolność szczepów z rodzaju *Micromonospora* do wytwarzania różnych metaloformów, chelatujących m.in. jony arsenu, miedzi, kobaltu, rtęci, molibdenu, niklu, wanadu czy cynku, potwierdzono również w badaniach przeprowadzonych przez Ortúzar i wsp. (2020), Riesco i wsp. (2022) czy Wu i wsp. (2022).

Bakterie endofityczne mogą w sposób bezpośredni promować wzrost roślin poprzez udostępnianie roślinom składników mineralnych, często znajdujących się w obrębie ryzosfery w formie niedostępnej lub trudno dostępnej dla roślin. Bakterie te, dzięki właściwym sobie cechom biochemicznym, uczestniczą m.in. w upłynnianiu trudno rozpuszczalnych związków chemicznych czy dekompozycji organicznych polimerów, takich jak celuloza (Puri i in., 2020; Tang i in., 2020; Eid i in., 2021). Oceniono, że trzy spośród dwudziestu sześciu badanych szczepów, mianowicie: *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Methylorubrum* sp. MV6II oraz *Micromonospora* sp. 230 cechują się zdolnością do rozpuszczania nieorganicznej formy fosforu w postaci $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ zawartego w podłożu (podrozdział 4.3.15). Co więcej, wykazujące zdolność do rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ szczepy charakteryzują się także zdolnością do produkcji enzymów uczestniczących w uwalnianiu jonów fosforanowych ze związków organicznych, co udowodniono w teście API ZYM (podrozdział 4.3.3): kwaśna fosfataza – szczepy *Methylobacterium* sp. Red Mix I, *Methylorubrum* sp. MV6II oraz *Micromonospora* sp. 230; fosfohydrolaza naftylo-AS-BI – szczepy *Methylorubrum* sp. MV6II

oraz *Micromonospora* sp. 230; fosfataza alkaliczna – szczep *Micromonospora* sp. 230 (podrozdział 4.3.3). Stosunkowo niewielka liczba szczepów wykazująca zdolność do rozpuszczania nieorganicznego związku $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ sugeruje, iż cecha ta nie jest powszechnie występującą właściwością wśród bakterii należących do omawianych rodzajów. Wniosek ten znajduje odzwierciedlenie w literaturze: Poorniammal i wsp. (2009) wykazali, że żaden z czterech badanych przez tych autorów szczepów z rodzaju *Methylobacterium* nie wykazał zdolności do rozpuszczania nieorganicznych fosforanów zawartych w podłożu Pikovskaya. Podobnie Palaniappan i wsp. (2010) wykazali brak zdolności endofitycznego, pozyskanego z brodawek korzeniowych roślin z rodzaju *Lespedeza*, szczepu *Methylobacterium fujisawense* do rozpuszczania nieorganicznych fosforanów. Z kolei Ishak i wsp. (2021), oceniając zdolność trzech szczepów z rodzaju *Methylobacterium* do rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ wykazali, że dwa badane szczepy charakteryzowały się wynikiem pozytywnym w teście na rozkład fosforanów na podłożu Pikovskaya, natomiast trzeci szczep, chociaż cechował się brakiem zdolności do rozpuszczania nieorganicznych fosforanów na podłożu Pikovskaya, cechował się wynikiem pozytywnym tego testu na podłożu NBRIP, zawierającym glukozę jako główne źródło węgla i energii oraz nierozpuszczalne fosforany. Taki wynik może sugerować, iż zdolność szczepów z rodzaju *Methylobacterium/Methylorubrum* do rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ *in vitro* jest uzależniona od składu chemicznego podłoża, co sugeruje konieczność pogłębionej analizy związanej ze zdolnością badanych szczepów należących do grupy *Methylobacterium sensu lato* do rozpuszczania trudno rozpuszczalnego związku $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Spośród dziewiętnastu badanych szczepów z rodzaju *Micromonospora*, jedynie szczep *Micromonospora* sp. 230 charakteryzował się zdolnością do rozpuszczania fosforanu (V) wapnia na podłożu Pikovskaya (podrozdział 4.3.15). Uzyskane wyniki pokrywają się z danymi literaturowymi, między innymi w badaniach Insuk i wsp. (2020) wykazano, że spośród sześciu badanych szczepów należących do rodzaju *Micromonospora*, żaden nie wykazał zdolności do rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ na tym podłożu. Podobne rezultaty prezentują Himan i wsp. (2016), wykazując, brak zdolności u wszystkich ośmiu badanych izolatów *Micromonospora* do rozpuszczania nieorganicznych fosforanów. Należy jednak zaznaczyć, że istnieją doniesienia o szczepach rodzaju *Micromonospora*, które cechują się zdolnością do rozpuszczania trifosforanów (Hamdali i in., 2008; Sinma i in., 2015).

Endofityczne szczepy będące przedmiotem tej rozprawy oceniono pod kątem zdolności do produkcji enzymów celulolitycznych oraz proteolitycznych (podrozdziały 4.3.16 oraz 4.3.17). Wykazano, że wszystkie badane szczepy, tj. siedem szczepów należących do grupy

Methylobacterium sensu lato oraz dziewiętnaście szczepów należących do rodzaju *Micromonospora* cechowało się zdolnością do rozkładu karboksymetylocelulozy (CMC) zawartej w podłożu. O zdolności bakterii należących do omawianych rodzajów do degradacji CMC świadczą liczne doniesienia literaturowe (Jayashree i in., 2011; Hu i in., 2014; Chen i in., 2020; Zhang i in., 2020). Produkcja enzymów celulolitycznych przez bakterie endofityczne świadczy o potencjale tych szczepów do kolonizacji roślin, co niejednokrotnie związane jest z koniecznością miejscowej degradacji tkanek okrywających rośliny, zbudowanych w głównej mierze z celulozy (Spadaro i Droby, 2016).

Zdolność bakterii do rozkładu białka wykazano natomiast w przypadku siedemnastu szczepów należących do rodzaju *Micromonospora* (podrozdział 4.3.17). Wszystkie przebadane szczepy należące do grupy *Methylobacterium sensu lato* oraz szczepy *Micromonospora* sp. 5056 i *Micromonospora* sp. N5 nie wykazywały zdolności do rozkładu białka zawartego w podłożu. Dane literaturowe wskazują, że brak zdolności do rozkładu białka jest cechą powszechnie występującą u bakterii rodzaju *Methylobacterium* oraz *Methylorubrum* (Jiang i in., 2020; Kim i in., 2020a; Kim i in., 2020b) co pozostaje w zgodzie z wynikami przedstawionymi w tej pracy. W przypadku szczepów *Micromonospora* sp. 5056 oraz *Micromonospora* sp. N5, brak zdolności do rozkładu mleka zdaje się przeczyć wynikom uzyskanym z wykorzystaniem komercyjnych testów API ZYM (bioMérieux) (podrozdział 4.3.3). Test API ZYM wykazał bowiem, że obydwie szczepy wykazują zdolność do produkcji różnych enzymów uczestniczących w hydrolizie wiązań w białkach. Ta niezgodność między wynikami doświadczeń, tj. testu na podłożu z mlekiem oraz API ZYM może być związana ze składem chemicznym wykorzystanego w niniejszych badaniach podłoża mikrobiologicznego. Jak wykazali eksperymentalnie Chen i wsp. (2004), obecność w podłożu aminokwasów wytwarzanych w wyniku kwaśnej hydrolizy kazeiny może ograniczać produkcję enzymów proteolitycznych (związki te wchodziły w skład wykorzystanego podłoża; podrozdział 3.1.5). Ponadto jak wykazali Kaewkla i wsp. (2021), nie wszystkie szczepy należące do rodzaju *Micromonospora* charakteryzują się zdolnością do rozkładu białek na podłożu z odtłuszczonym mlekiem w proszku.

Oceniono również zdolność badanych szczepów do wzrostu w podłożu zawierającym olej napędowy jako jedyne źródło węgla (podrozdział 4.3.18). Wykazano, że wszystkie szczepy należące do grupy *Methylobacterium sensu lato* oraz dziewięć z dziewiętnastu badanych szczepów należących do rodzaju *Micromonospora* charakteryzowało się zdolnością do wykorzystywania węglowodorów wchodzących w skład oleju napędowego jako jedyne źródła węgla i energii. Wyniki te znajdują potwierdzenie w dostępnej literaturze, gdzie

już wcześniej opisywano zdolność bakterii z omawianych rodzajów do rozkładu ropopochodnych węglowodorów (Salam i in., 2015; Tirandaz i in., 2019; Harumain i in., 2023). Ponadto, szczepy *Micromonospora* sp. 5056 oraz *Micromonospora* sp. N5, charakteryzujące się największą efektywnością wzrostu w podłożu zawierającym olej napędowy jako jedyne źródło węgla, oceniono pod kątem zdolności do wykorzystywania węglowodorów obecnych w przerepracowanym oleju silnikowym (podrozdział 4.3.18). W przypadku obydwu szczepów zaobserwowano wzrost w podłożu zawierającym przerepracowany olej silnikowy, co wskazuje na potencjał szczepów *Micromonospora* sp. 5056 oraz *Micromonospora* sp. N5 do degradacji związków wchodzących w skład oleju silnikowego. Cecha ta, istotna z punktu widzenia remediacji terenów skażonych, została już wcześniej potwierdzona w literaturze m.in. dla promieniowców z rodzaju *Micromonospora* (Idemudia i in., 2014; Tirandaz i in., 2019). Słusznym wydaje się przeprowadzenie dalszych badań, mających na celu kompleksowe wyjaśnienie mechanizmów zaangażowanych w proces wykorzystywania węglowodorów zawartych w przerepracowanym oleju silnikowym przez szczepy *Micromonospora* sp. 5056 i *Micromonospora* sp. N5, a także analiza metabolitów będących produktami przemian związanych z wykorzystywaniem węglowodorów przez te bakterie.

Istotną cechą bakterii endofitycznych jest zdolność do hamowania wzrostu mikroorganizmów fitopatogennych. Cechę tą zalicza się do tzw. pośrednich mechanizmów promowania wzrostu roślin, zaś endofityczne szczepy wykazujące antagonizm wobec fitopatogennych bakterii czy grzybów mogą zostać wykorzystane w ochronie roślin jako tzw. biopestycydy (Aravind i in., 2009; Narayanan i Glick, 2022). Jednym z mechanizmów świadczących o potencjale bakterii do hamowania wzrostu fitopatogenów jest produkcja cyjanowodoru (Ramette i in., 2006; Sehrawat i in., 2022). Stwierdzono, że żaden z badanych szczepów należących do rodzajów *Methylobacterium*, *Methylorubrum* oraz *Micromonospora* nie wytwarzał cyjanowodoru z wykorzystaniem glicyny jako substratu (podrozdział 4.3.19). Podobne rezultaty, wskazujące na brak zdolności do wytwarzania cyjanowodoru przez różne szczepy należące do omawianych rodzajów zostały opisane w literaturze (Poorniammal i in., 2009; Ghodhbane-Gtari i in., 2010; Radha i in., 2017; Joel i in., 2023).

Przeprowadzono ocenę zdolności badanych szczepów do hamowania wzrostu wybranych fitopatogenów bakteryjnych i grzybowych, z wykorzystaniem tzw. metody podwójnych kultur na podłożu agarowym (podrozdział 4.4). Analiza wykazała, że żaden z badanych szczepów bakterii endofitycznych nie wykazał zdolności do hamowania wzrostu fitopatogenów w temperaturze 20 °C. W temperaturze 28 °C, trzy szczepy należące do grupy *Methy-*

lobacterium sensu lato oraz sześć szczepów należących do rodzaju *Micromonospora* wykazało potencjał do hamowania wzrostu badanych fitopatogenów. Szczep *Methylobacterium* sp. Red Cyt hamował wzrost czterech z pięciu badanych fitopatogennych bakterii (*A. tumefaciens* C58, *X. vesicatoria* NCCB 92059, *P. syringae* pv. *syringae* 2905 oraz *P. atrosepticum* NCCB 100429). Szczepy *Methylorubrum* sp. 1117 oraz *Methylorubrum* sp. MV6II hamowały wzrost odpowiednio *A. tumefaciens* C58 oraz *P. syringae* pv. *syringae* 2905. Doniesienia o właściwościach antagonistycznych wobec fitopatogenów, cechujących szczepy należących do rodzaju *Methylobacterium* znajdują odniesienie w literaturze (Poorniammal, i in., 2009; Grossi i in., 2020; Photolo i in., 2020) i dotyczą zarówno antagonizmu wobec mikroorganizmów fitopatogennych (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum* czy *Sclerotium rolfsii*) jak i mikroorganizmów chorobotwórczych dla ludzi (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* czy *Candida albicans*).

W przypadku bakterii należących do rodzaju *Micromonospora* eksperymentalnie wykazano, że bakterie należące do tego rodzaju mogą charakteryzować się zdolnością do supresji mikroorganizmów fitopatogennych (Zhao i in., 2011; Talukdar i in., 2012; Gangwar i in., 2014; Radha i in., 2017). Przeprowadzone testy *in vitro* poprzedzono analizą obecności w genomach tych bakterii genów *NRPS*, *PKS I* oraz *PKS II*, kodujących enzymy uczestniczące w syntezie poliketydów czy niekodowanych genomowo białek (podrozdział 4.2.6). Związki te, uczestniczące w hamowaniu wzrostu i rozwoju innych mikroorganizmów, stanowią główną grupę metabolitów wtórnych produkowanych przez typ *Actinobacteria* (Vargas-Bautista i in., 2014; Komaki i in., 2021). Na podstawie przeprowadzonej analizy genetycznej wykazano, że cztery spośród dziewiętnastu szczepów charakteryzowało się obecnością w genomach sekwencji genu *NRPS*, zaś kolejne cztery szczepy posiadały w genomach sekwencje genu *PKS I*. W przypadku analizy sekwencji genu *PKS II*, sześć z dziewiętnastu badanych szczepów cechowało się obecnością tego genu w genomach. Dwa z nich, tj. *Micromonospora* sp. 5052 i *Micromonospora* sp. 5056, wykazały również obecność sekwencji genu *PKS I*. Wyniki przeprowadzonej analizy genetycznej częściowo pokrywają się z przeprowadzoną *in vitro* oceną zdolności szczepów z rodzaju *Micromonospora* do hamowania wzrostu fitopatogenów bakteryjnych i grzybowych (podrozdział 4.4). Wykazano, że szczepy *Micromonospora* sp. 29, *Micromonospora* sp. 30, *Micromonospora* sp. 48, *Micromonospora* sp. 66, *Micromonospora* sp. 152 oraz *Micromonospora* sp. 230 wykazały reakcję pozytywną (hamowały wzrost) przynajmniej jednego z przebadanych fitopatogenów. Spośród nich, szczepy *Micromonospora* sp. 29, *Micromonospora* sp. 30, *Micromonospora* sp. 152

oraz *Micromonospora* sp. 230 charakteryzowały się obecnością w genomie sekwencji genów *NPRS* lub *PKS I*, co może świadczyć o potencjalnym udziale metabolitów wtórnych produkowanych przez te bakterie w zjawisku supresji wzrostu fitopatogenów. Należy jednak zaznaczyć, iż obecność klastrów genów *NPRS*, *PKS I*, czy *PKS II* nie zawsze wiąże się ze zdolnością do oddziaływań typu antagonistycznego (Abidin i in., 2018; Tistechok i in., 2021; Ye i in., 2023).

Przeprowadzona *in vitro* ocena zdolności badanych szczepów do hamowania wzrostu fitopatogenów bakteryjnych i grzybowych wykazała zdolność wybranych szczepów należących do rodzajów *Methylobacterium*, *Methylorubrum* oraz *Micromonospora* do ograniczania wzrostu mikroorganizmów fitopatogennych, charakterystycznych dla upraw rolniczych i ogrodniczych na terenie Polski. Znamienym jest, iż cecha ta była zależna od temperatury, w jakiej prowadzono hodowlę badanych mikroorganizmów a także składu chemicznego podłoża (dane nieprezentowane), co w przypadku antagonistycznych właściwości bakterii zostało wcześniej opisane w literaturze (Leifert i in., 1993; Aguilar i Klotz, 2010; Jiménez-Delgadillo i in., 2018). Wykorzystanie tych bakterii lub ich metabolitów w ochronie roślin, tj. ewentualna komercjalizacja w postaci tzw. biopestycydów, zakładałaby konieczność przeprowadzenia kompleksowej charakterystyki właściwości antagonistycznych szczepów *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylorubrum* sp. 1117, *Methylorubrum* sp. MV6II, *Micromonospora* sp. 29, *Micromonospora* sp. 30, *Micromonospora* sp. 48, *Micromonospora* sp. 66, *Micromonospora* sp. 152 oraz *Micromonospora* sp. 230, nie wyłączając testów *in planta*.

5.4. Analiza zdolności badanych bakterii do realizowania mechanizmów promowania wzrostu roślin *in planta*

Ewaluacja zdolności badanych bakterii do realizowania *in vitro* mechanizmów związanych z promowaniem wzrostu roślin umożliwiła wyselekcjonowanie szczepów charakteryzujących się potencjałem do promowania wzrostu roślin *in planta*. W tym celu przeprowadzono doświadczenia roślinne, mające na celu określić zdolność wybranych szczepów do realizowania wspomnianych mechanizmów promowania wzrostu gospodarza roślinnego *in vivo* (Ryan i in., 2008; ALKahtani i in., 2020; Gamalero i in., 2022; Khan i in., 2023). W testach roślinnych uwzględniono łącznie trzynaście szczepów bakterii endofitycznych, należących do grupy *Methylobacterium sensu lato* (pięć szczepów) oraz do rodzaju *Micromo-*

nospora (osiem szczepów) (podrozdział 4.6.1). Szczepy te cechowały się zdolnością do realizacji różnych mechanizmów charakterystycznych dla PGPB, co uwzględniono na etapie planowania badań *in planta*. W doświadczeniach wykorzystano gatunki i odmiany roślin uprawnych, charakterystycznych dla upraw rolniczych na terenie Polski: koniczynę białą (*Trifolium repens* L.) odm. Grasslands Huia, pszenicę zwyczajną (*Triticum aestivum* L.) odm. Foxx (odmiana ozima) oraz rzepak (*Brassica napus* L.) odm. Goliat (odmiana jara).

Oceniono wpływ inokulacji nasion koniczyny białej oraz pszenicy zwyczajnej z wykorzystaniem wszystkich trzynastu szczepów na energię i zdolność kiełkowania nasion pszenicy zwyczajnej oraz pszenicy ozimej (podrozdział 4.6.1). Wykazano, że dwa szczepy należące do rodzaju *Methylobacterium*, tj. *Methylobacterium* sp. 124 oraz *Methylobacterium* sp. Red Mix I oraz trzy szczepy należące do rodzaju *Micromonospora* (*Micromonospora* sp. 66, *Micromonospora* sp. 48 i *Micromonospora* sp. 5056) charakteryzowały się zdolnością do indukowania procesu kiełkowania nasion koniczyny białej. W przypadku nasion pszenicy ozimej, cztery z ośmiu badanych szczepów należących do rodzaju *Micromonospora* (*Micromonospora* sp. 230, *Micromonospora* sp. 55, *Micromonospora* sp. 48, *Micromonospora* sp. N5) cechowało się zdolnością do zwiększania energii i zdolności kiełkowania ziarniaków pszenicy. Szczep *Micromonospora* sp. 48 charakteryzował się natomiast zdolnością do indukowania procesu kiełkowania zarówno nasion koniczyny białej, jak i pszenicy zwyczajnej. Zdolność do indukcji kiełkowania nasion traktowanych zawiesinami szczepów bakterii należących do grupy *Methylobacterium sensu lato* oraz rodzaju *Micromonospora* wykazano również w literaturze (Madhaiyan i in., 2005; Madhaiyan i in., 2006b; Meena i in., 2012; Velázquez-Medina i in., 2022), co dowodzi o potencjale tych bakterii do zwiększania energii czy zdolności kiełkowania różnych roślin, m.in. pszenicy zwyczajnej, trzciny cukrowej czy orzachy podziemnej.

Należące do omawianych rodzajów bakterie, wykazujące zdolność do realizacji mechanizmów promowania wzrostu roślin *in vitro*, mogą charakteryzować się zdolnością do promowania wzrostu roślin *in planta*. Pozytywne efekty działania bakterii endofitycznych są szeroko opisywane w literaturze. Grossi i wsp. (2020) wykazali potencjał endofitycznego szczepu *Methylobacterium* sp. 2A do promowania wzrostu roślin rzodkiewnika pospolitego *Arabidopsis thaliana* poddanych warunkom stresu solnego oraz do hamowania *in planta* wzrostu fitopatogennego lęgnowca *Phytophthora infestans*. Abdul Rahim i Ishak (2022) wykazali natomiast, iż szczepy bakterii zaklasyfikowane do rodzaju *Methylorubrum* wykazały zdolność do indukcji procesu kiełkowania nasion fasoli (*Vigna radiata*). Torres Vera i wsp. (2023) opisali korzystne właściwości szczepu *Methylobacterium symbioticum* SB23,

wykazując zdolność tej bakterii do promowania wzrostu kukurydzy (*Zea mays* L.) oraz poziomki (*Fragaria vesca* L.) poprzez wiązanie azotu atmosferycznego i udostępnianie go roślinom. El-Tarabily i wsp. (2008) wykazali, że badany przez nich szczep należący do gatunku *Micromonospora endolithica* charakteryzował się zdolnością do promocji wzrostu fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) uprawianej w warunkach dużej koncentracji jonów wapniowych w glebie. Martínez-Hidalgo i wsp. (2015) udowodnili zdolność endofitycznego szczepu *Micromonospora* sp. ALFpr18c do indukcji systemicznej odporności (ISR) w roślinach pomidora (*Solanum lycopersicum* L.), co przekładało się na wyraźne ograniczenie objawów zarazy ziemniaczanej na roślinach inokulowanych z wykorzystaniem zawiesiny badanego szczepu. El-Tarabily i wsp. (2019) wykazali z kolei, że endofityczny szczep *Micromonospora chalcea* UAE1, charakteryzujący się zdolnością do produkcji deaminazy ACC, cechował się zdolnością do promowania wzrostu swojego gospodarza, halofilnej rośliny – solanki karłowatej (*Salicornia bigelovii*).

W niniejszej rozprawie, dziesięć szczepów bakterii endofitycznych, trzy należące do grupy *Methylobacterium sensu lato* oraz siedem należących do rodzaju *Micromonospora*, poddano ocenie promowania wzrostu roślin koniczyny białej oraz pszenicy ozimej, uprawianych w podłożu skomponowanym na bazie substratu torfowego (podrozdział 4.6.2), oceniając wpływ inokulacji roślin zawiesinami badanych szczepów na długość oraz świeżą masę części nadziemnych. Wykazano, że w przypadku roślin koniczyny białej, inokulowanych zawiesiną szczepu *Micromonospora* sp. 5056, odnotowano istotny statystycznie wzrost średniej długości pędów (o 22,9 % w stosunku do roślin kontrolnych), natomiast w przypadku roślin pszenicy zwyczajnej, inokulacja zawiesiną szczepu *Micromonospora* sp. 48 pozwoliła na uzyskanie statystycznie istotnego wzrostu średniej długości pędów względem kontroli (o 5,6 %).

W kolejnym doświadczeniu, rośliny koniczyny białej poddano zabiegowi koinokulacji z wykorzystaniem szczepów badanych w podrozdziale 4.6.2 oraz ryzobiowego szczepu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 (podrozdział 4.6.3). Badane rośliny uprawiano w podłożu skomponowanym na bazie substratu torfowego. Przeprowadzona analiza średniej długości i świeżej masy pędów wykazała, że żaden z badanych szczepów endofitycznych w połączeniu ze szczepem ryzobiowym, indukującym brodawkowanie u badanych roślin, nie powodował istotnego statystycznie wzrostu średniej długości czy świeżej masy badanych roślin.

Przeprowadzono również ocenę zdolności badanych bakterii do kolonizacji tkanek wewnętrznych badanych roślin koniczyny białej oraz pszenicy zwyczajnej (podrozdział

4.6.4). Wykazano, że izolacja mikroorganizmów endofitycznych z korzeni badanych roślin wykazała obecność bakterii charakteryzujących się podobieństwem morfologii kolonii do szczepów wykorzystanych uprzednio do inokulacji roślin przy braku bakterii w próbie kontrolnej. W przypadku niektórych roślin, bakterie o typowej dla wyjściowych szczepów morfologii kolonii wyizolowano również z pędów nadziemnych lub brodawek korzeniowych, co sugeruje zdolność badanych bakterii do kolonizacji wnętrza roślin.

Ocenę zdolności szczepów *Methylobacterium* sp. Red Cyt oraz szczepu *Methylobacterium* sp. C2III_s do wiązania azotu atmosferycznego i udostępniania go roślinom koniczyny białej przeprowadzono w formie doświadczenia probówkowego, w którym siewki koniczyny białej uprawiano w zmodyfikowanym podłożu Hoaglanda, z ograniczoną ilością azotu (podrozdział 4.6.6). Stwierdzono, że w przypadku siewek inokulowanych zawiesinami badanych szczepów, nie zaobserwowano istotnego statystycznie wzrostu średniej długości czy średniej masy pędów koniczyny. Odnotowano natomiast, że w przypadku roślin inokulowanych zawiesinami badanych szczepów, średnia długość i świeża masa korzeni różniły się istotnie od średniej długości oraz świeżej masy korzeni roślin kontrolnych. W przypadku średniej długości korzeni, wzrost długości względem kontroli wynosił 60 % oraz 62,5 %, odpowiednio dla szczepów *Methylobacterium* sp. Red Cyt oraz *Methylobacterium* sp. C2III_s. Wzrost średniej masy korzeni względem średniej masy korzeni roślin kontrolnych wynosił natomiast 70 % dla szczepu *Methylobacterium* sp. Red Cyt oraz 40 % dla szczepu *Methylobacterium* sp. C2III_s. W doświadczeniu wykazano, że badane szczepy promują wzrost korzeni badanych roślin, co przy braku efektu pozytywnego na przyrost zielonej masy roślin, nie świadczy o wiązaniu azotu atmosferycznego i udostępnianiu go roślinom.

Bakterie należące do rodzajów *Methylobacterium* oraz *Micromonospora* mogą charakteryzować się zdolnością do promowania wzrostu roślin w warunkach uprawy w glebie zanieczyszczonej jonami metali ciężkich czy związkami ropopochodnymi. Madhaiyan i wsp. (2007b) wykazali, że koinokulacja uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami kadmu i niklu roślin pomidora (*Lycopersicon esculentum* L.) z wykorzystaniem szczepu *Methylobacterium oryzae* CBMB20 oraz szczepu *Burkholderia* sp. przyczyniła się do zmniejszenia efektu fitotoksyczności na badanych roślinach. Podobnie Vannucchi i wsp. (2021) wykazali, że szczep *Methylobacterium* sp. CP3, wykorzystany do inokulacji roślin topoli (*Populus deltoides* x *P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*) odm. 'Marke' uprawianej w glebie zanieczyszczonej jonami cynku, przyczynił się do zwiększenia tolerancji badanych roślin na obecność tych jonów w glebie. O potencjale bakterii z rodzaju *Methylobacterium* związanym z tolerancją oraz skuteczną bioremediacją jonów miedzi ze środowiska donoszą

natomiast Poorniammal i wsp., (2009) oraz Celebi i wsp., (2016). Ponadto jak wskazali Alcántara-Martínez i in., (2017), inokulacja roślin szczepami bakterii należących do rodzaju *Methylobacterium* zwiększa poziom tolerancji akacji Farnesa (*Acacia farnesiana* L.) na obecność arsenu w glebie. Potencjał bakterii należących do rodzaju *Micromonospora* do remediacji terenów skażonych oraz promowania wzrostu roślin uprawianych na glebach zanieczyszczonych również znajduje odzwierciedlenie w literaturze, m.in., w pracach Rodríguez-Higareda i wsp. (2019), którzy wykazali *in vivo* korzystny wpływ szczepu należącego do gatunku *Micromonospora echinospora* na procesy bioremediacji oraz fitoremediacji gleb zanieczyszczonych m.in. związkami ropopochodnymi. Wspomniana wcześniej praca Ortúzar i wsp. (2020), wskazuje natomiast na wysoki potencjał *in planta* badanych szczepów z rodzaju *Micromonospora* do zwiększania tolerancji rzodkiewnika pospolitego *Arabidopsis thaliana* L. na stres wywołany obecnością metali ciężkich w podłożu.

W niniejszych badaniach oceniono zdolność szczepów *Methylobacterium* sp. Red Mix I oraz *Micromonospora* sp. 5056 do promowania wzrostu roślin koniczyny białej oraz rzepaku, uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi, a dla szczepów *Methylobacterium* sp. Red Mix I oraz *Micromonospora* sp. 33, w podłożu z jonami arsenu (podrozdział 4.6.7). Wykazano, że w przypadku roślin koniczyny białej, inokulacja zawiesinami *Methylobacterium* sp. Red Mix I oraz *Micromonospora* sp. 5056 charakteryzowały się istotnym statystycznie wzrostem średniej długości pędów oraz świeżej masy pędów względem roślin kontrolnych, zarówno uprawianych w podłożu niezanieczyszczonym, jak i w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi. Odnotowany wzrost długości oraz świeżej masy pędów koniczyny białej względem kontrolnych roślin uprawianych w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi wynosiły odpowiednio 27,7 % dla *Methylobacterium* sp. Red Mix I oraz od 77,6 % do 80,1 % dla *Micromonospora* sp. 5056, co wskazuje na zdolność badanych szczepów do promowania wzrostu roślin koniczyny białej uprawianej w podłożu zanieczyszczonym związkami miedzi. Podobnie rośliny rzepaku, inokulowane zawiesiną szczepu *Methylobacterium* sp. Red Mix I i uprawiane w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi cechowały się wyższymi, istotnymi statystycznie wartościami średniej masy pędów niż rośliny kontrolne uprawiane w podłożu niezanieczyszczonym (o 95 %) oraz w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi (o 37 %), co dodatkowo świadczy o korzystnych właściwościach szczepu *Methylobacterium* sp. Red Mix I w procesach remediacji gleb skażonych.

Oceniono zdolność szczepów *Micromonospora* sp. 5056 oraz *Micromonospora* sp. N5 do promowania wzrostu roślin koniczyny białej oraz rzepaku uprawianych w podłożu zanie-

czyszczonym olejem napędowym (podrozdział 4.6.8). Istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami badawczymi a grupą kontrolną, uprawianą w podłożu zanieczyszczonym olejem napędowym wykazano w średniej długości oraz średniej masie roślin rzepaku, inokulowanych zawiesinami obydwu badanych szczepów, tj. *Micromonospora* sp. 5056 oraz *Micromonospora* sp. N5. W przypadku średniej długości pędów, odnotowano wzrost o odpowiednio 14,8 % oraz 18,1 % względem grupy kontrolnej uprawianej w podłożu zanieczyszczonej olejem napędowym. W przypadku średniej świeżej masy roślin, odnotowano wzrost o odpowiednio 34 % oraz 33,3 % względem roślin kontrolnych (uprawa w podłożu zanieczyszczonym olejem napędowym).

Na uwagę zasługują nietypowe wyniki doświadczeń z wykorzystaniem roślin rzepaku, w których oceniono wpływ zanieczyszczeń podłoża związkami miedzi oraz arsenu (podrozdział 4.6.6) oraz wpływ zanieczyszczenia podłoża olejem napędowym (podrozdział 4.6.7). Jak wykazano, biomasa roślin kontrolnych, uprawianych w podłożu zanieczyszczonym odpowiednio jonami miedzi, jonami arsenu oraz olejem napędowym charakteryzowała się wyższymi wartościami średnich długości oraz średnich mas pędów nadziemnych w stosunku do roślin uprawianych w podłożu niezanieczyszczonym, co może budzić zastrzeżenia dotyczące uzyskanych wyników. Taka niezgodność, wynikająca być może z cech genotypowych rzepaku (*Brassica napus*) została już wcześniej opisana w literaturze (Lacalle i in., 2018) gdzie wykazano, że rośliny rzepaku uprawiane w glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi oraz olejem napędowym, charakteryzowały się większą biomasa niż rośliny kontrolne, uprawiane w glebie niezanieczyszczonej, podobnie jak w ma to miejsce w niniejszej pracy. Jednocześnie przedstawione wyniki wskazują na potrzebę przeprowadzenia pogłębionej analizy dotyczącej wykorzystania rzepaku jako rośliny akumulatorowej.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Przeprowadzone badania dotyczyły oceny zdolności do promowania wzrostu roślin przez nieryzobiowe izolaty bakteryjne, pozyskane z brodawek korzeniowych roślin należących do rodziny *Fabaceae* (bobowate). Badane izolaty poddano analizom genetycznym, na podstawie których bakterie zostały zaklasyfikowane do rodzajów *Methylobacterium*, *Methylobacterium* oraz *Micromonospora*. W ogólnodostępnej bazie danych GenBank zdeponowano fragmenty sekwencji genu 16S rRNA oraz genów rdzeniowych: *recA*, *gyrB*, *rpoB* oraz *atpD* trzech szczepów z rodzaju *Methylobacterium*, pięciu szczepów z rodzaju *Methylobacterium* oraz dziewiętnastu szczepów z rodzaju *Micromonospora*. Udostępnienie sekwencji badanych szczepów może w przyszłości okazać się przydatne w badaniach taksonomicznych prowadzonych przez innych badaczy, szczególnie w przypadku rodzajów *Methylobacterium* oraz *Methylobacterium* które – jak zaznaczono wcześniej – wymagają wypracowania nowych kryteriów, umożliwiających prawidłowe przyporządkowanie gatunków charakteryzujących się statusem *incertae sedis*. Ponadto dokonano detekcji w genomach badanych szczepów obecności sekwencji genów *mxoF*, *acdS*, *nifH*, *NRPS*, *PKS I*, *PKS II*; w przypadku szczepów charakteryzujących się obecnością genu/genów dokonano ich amplifikacji oraz sekwencjonowania, a uzyskane sekwencje zdeponowano w bazie GenBank.

W badaniach uwzględniono zarówno ocenę mechanizmów promowania wzrostu roślin *in vitro*, jak i badania *in planta*, z wykorzystaniem roślin charakterystycznych dla upraw rolniczych prowadzonych na terenie Polski. Przeprowadzono ocenę wybranych właściwości biochemicznych bakterii, w tym, obejmujących m.in. ocenę zdolności bakterii do wykorzystywania różnych źródeł węgla, oporności na różne substancje chemiczne, zdolności do wzrostu w różnych temperaturach, na podłożach o różnym pH czy na podłożach zawierających różne stężenia NaCl. Przeprowadzono także ocenę do wzrostu szczepów na podłożach zawierających różne stężenia jonów Cu, Al czy As, wykazując zdolność wybranych szczepów do tolerancji stosunkowo wysokich stężeń miedzi i arsenu. Przeprowadzona ocena zdolności tych szczepów do produkcji różnych metaloforów (chelatujących Fe, Cu, Al i As) wykazała, że badane szczepy w przeważającej ilości charakteryzują się zdolnością do produkcji metaloforów; to z kolei wskazuje na możliwość wykorzystania wybranych szczepów w procesach fitoremediacji, co w przypadku szczepów *Methylobacterium* sp. Red Mix I oraz *Micromonospora* sp. 5056 zostało potwierdzone również w testach *in planta*. Oceniono również zdolność bakterii do produkcji wybranych enzymów hydrolitycznych, aktywnego ru-

chu, oddziaływań *quorum sensing*, tworzenia biofilmu bakteryjnego, rozkładu ACC, wiązania azotu atmosferycznego, produkcji IAA oraz indolu, upłynniania fosforanów, rozkładu celulozy oraz białek. Przeprowadzono także ocenę zdolności badanych szczepów do wzrostu w podłożu zawierającym jałowy olej napędowy jako jedyne źródło węgla. Na podstawie testów wzrostowych wyselekcjonowano dwa szczepy, *Micromonospora* sp. 5056 oraz *Micromonospora* N5 charakteryzujące się największym spośród badanych bakterii potencjałem do wykorzystywania węglowodorów zawartych w oleju napędowym. Ponadto, szczepy te cechowały się zdolnością do wzrostu w podłożu zawierającym jałowy, przepracowany olej silnikowy, co wskazuje na potencjał tych bakterii do wykorzystywania w procesach remediacji terenów skażonych substancjami ropopochodnymi, co potwierdzono również w przeprowadzonych w ramach tej rozprawy testach roślinnych. Wśród puli dwudziestu sześciu badanych szczepów wyodrębniono szczepy charakteryzujące się zdolnością do hamowania wzrostu wybranych fitopatogenów bakteryjnych i grzybowych *in vitro*, co należałoby w przyszłości potwierdzić w badaniach *in vivo*; badania te wpisują się w ogólnoświatowy trend poszukiwania mikroorganizmów użytecznych w biologicznej ochronie roślin. Ponadto wykazano, że wybrane szczepy charakteryzują się zdolnością do indukcji kiełkowania nasion koniczyzny białej oraz pszenicy zwyczajnej, co wskazuje na konieczność kontynuacji zapoczątkowanych badań w kierunku wykorzystania bakterii w produkcji zapraw nasiennych zawierających żywe mikroorganizmy.

Na podstawie przeprowadzonych badań, wysunięto następujące wnioski:

1. Bakterie pozyskane z brodawek korzeniowych roślin z rodziny bobowate (*Fabaceae*) należą do rodzajów: *Methylobacterium*, *Methylorubrum* oraz *Micromonospora*;
2. Wszystkie badane szczepy bakteryjne charakteryzują się zdolnością do realizowania różnych mechanizmów promowania wzrostu roślin *in vitro*;
3. Szczepy: *Methylobacterium* sp. Red Cyt, *Methylorubrum* sp. 1117, *Methylorubrum* sp. MV6II, *Micromonospora* sp. 29, *Micromonospora* sp. 30, *Micromonospora* sp. 48, *Micromonospora* sp. 66, *Micromonospora* sp. 152 oraz *Micromonospora* sp. 230 charakteryzują się potencjałem *in vitro* do hamowania wzrostu fitopatogenów (*Agrobac-*

terium tumefaciens C58, *Xanthomonas vesicatoria* NCCB 92059, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 2905, *Pectobacterium atrosepticum* NCCB 100429, *Botrytis cinerea* 10Bc01, *Fusarium oxysporum* 10Fo01, *Fusarium equiseti*, *Verticillium albo-atrum* CBS 745.83) co należy potwierdzić w badaniach *in planta*;

4. Szczep *Micromonospora* sp. 48 charakteryzował się zdolnością do indukcji procesu kiełkowania nasion koniczyny białej oraz pszenicy zwyczajnej, co wskazuje na możliwy potencjał tego szczepu do indukcji kiełkowania nasion różnych roślin;
5. Szczepy *Micromonospora* sp. 5056 i *Micromonospora* sp. 48 charakteryzują się zdolnością do promowania wzrostu roślin, odpowiednio koniczyny białej oraz pszenicy zwyczajnej, i jako takie mogą być wykorzystane do produkcji biopreparatów wspomagających wzrost roślin;
6. Szczepy *Methylobacterium* sp. Red Mix I i *Micromonospora* sp. 5056 charakteryzują się zdolnością do promowania wzrostu koniczyny białej uprawianej w podłożu zanieczyszczonym jonami miedzi, co wskazuje na użyteczność tych bakterii jako mikroorganizmów wspomagających fitoremediację terenów skażonych związkami miedzi;
7. Szczepy *Micromonospora* sp. 5056 i *Micromonospora* sp. N5, charakteryzują się zdolnością do wykorzystywania przepracowanego oleju silnikowego jako jedyne źródła węgla i energii; słusznym wydaje się kontynuacja badań pod kątem produktów będących wynikiem metabolizmu węglowodorów zawartych w przepracowanym oleju silnikowym;
8. Szczepy *Micromonospora* sp. 5056 i *Micromonospora* sp. N5 charakteryzują się zdolnością do promowania wzrostu rzepaku, uprawianego w podłożu zanieczyszczonym olejem napędowym; ponadto cechują się zdolnością do wykorzystywania przepracowanego oleju silnikowego jako jedyne źródła węgla i energii, co wskazuje na użyteczność tych bakterii jako mikroorganizmów wspomagających fitoremediację terenów skażonych związkami ropopochodnymi.

7. BIBLIOGRAFIA

1. **Abdul Rahim**, A., Ishak, F.N., 2022. Plant growth promoting activities of endophytic and epiphytic *Methylobacterium* sp. isolated from palm oil (*Elaeis guineensis*) leaves, w: Perumal, M., Hung, P.K.J., Daud, A., Rajoo, K.S., Mohamed, N.T.S., (red.), e-Proceeding International Conference on Food and Industrial Crops, Universitas Putra, 108–111. eISBN 978-967-26369-1-5;
2. **Abellan-Schneyder**, I., Machado, M.S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., i in., 2021. Primer, pipelines, parameters: issues in 16S rRNA gene sequencing. *mSphere*, 6, 1, e01202-20. DOI:10.1128/msphere.01202-20;
3. **Abidin**, Z.A.Z., Chowdhury, A.J.K., Malek, N.A., Zainuddin, Z., 2018. Diversity, antimicrobial capabilities, and biosynthetic potential of mangrove actinomycetes from coastal waters in Pahang, Malaysia. *Journal of Coastal Research* 82, 174–179. DOI:10.2112/SI82-025.1;
4. **Achari**, G.A., Ramesh, R., 2019. Colonization of eggplant by endophytic bacteria antagonistic to *Ralstonia solanacearum*, the bacterial wilt pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 89, 585–593. DOI:10.1007/s40011-018-0972-2;
5. **Adeleke**, B.S., Ayangbenro, A.S., Babalola, O.O., 2022. *In vitro* screening of sunflower associated endophytic bacteria with plant growth-promoting traits. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 6, 903114. DOI:10.3389/fsufs.2022.903114;
6. **Adhikari**, P., Pandey, A., 2020. Bioprospecting plant growth promoting endophytic bacteria isolated from Himalayan yew (*Taxus wallichiana* Zucc.). *Microbiological Research* 239, 126536. DOI:10.1016/j.micres.2020.126536;
7. **Afzal**, I., Shinwari, Z.K., Sikandar, S., Shahzad, S., 2019. Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research* 221, 36–49. DOI:10.1016/j.micres.2019.02.001;
8. **Aguilar**, C., Klotz, B., 2010. Effect of the temperature on the antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety* 30, 4, 996–1015. DOI:10.1111/j.1745-4565.2010.00257.x;
9. **Alemneh**, A.A., Zhou, Y., Ryder, M.H., Denton, M.D., 2021. Is phosphate solubilizing ability in plant growth-promoting rhizobacteria isolated from chickpea linked to their ability

to produce ACC deaminase? *Journal of Applied Microbiology* 131, 5, 2416–2432. DOI:10.1111/jam.15108;

10. Ali, M., Ali, Q., Sohail, M.A., Ashraf, M.F., Saleem, M.H., i in., 2021. Diversity and taxonomic distribution of endophytic bacterial community in the rice plant and its prospective. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 18, 10165. DOI:10.3390/ijms221810165;

11. ALKahtani, M.D., Fouda, A., Attia, K.A., Al-Otaibi, F., Eid, A.M., i in., 2020. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from desert plants and their application as bioinoculants for sustainable agriculture. *Agronomy* 10, 9, 1325. DOI:10.3390/agronomy10091325;

12. Alcántara-Martínez, N., Figueroa-Martínez, F., Rivera-Cabrera, F., Gutiérrez-Sánchez, G., Volke-Sepúlveda, T., 2018. An endophytic strain of *Methylobacterium* sp. increases arsenate tolerance in *Acacia farnesiana* (L.) Willd: a proteomic approach. *Science of the Total Environment* 625, 762–774. DOI:10.1016/j.scitotenv.2017.12.314;

13. Alessa, O., 2022. The taxonomic and phenotypic diversity of *Methylobacterium* species. Rozprawa doktorska, Uniwersytet Okayama. dostępny: https://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/files/public/6/63661/2022061611450796223/K0006654_fulltext.pdf (dostęp 12.12.2023);

14. Alquéres, S., Meneses, C., Rouws, L., Rothballer, M., Baldani, I., i in., 2013. The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26, 8, 937–945. DOI:10.1094/MPMI-12-12-0286-R;

15. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 3, 403–410. DOI:10.1016/S0022-2836(05)80360-2;

16. Andria, V., Reichenauer, T.G., Sessitsch, A. 2009. Expression of alkane monooxygenase (*alkB*) genes by plant-associated bacteria in the rhizosphere and endosphere of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) grown in diesel contaminated soil. *Environmental Pollution* 157, 12, 3347–3350. DOI:10.1016/j.envpol.2009.08.023;

17. Anjum, N., Chandra, R., 2015. Endophytic bacteria: optimization of isolation procedure from various medicinal plants and their preliminary characterization. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 8, 4, 233–238;

- 18. Anwar, S., Ali, B., Sajid, I., 2016.** Screening of rhizospheric actinomycetes for various *in-vitro* and *in-vivo* Plant Growth Promoting (PGP) traits and for agroactive compounds. *Frontiers in Microbiology* 7, 1334. DOI:10.3389/fmicb.2016.01334;
- 19. Aravind, R., Kumar, A., Eapen, S.J., Ramana, K.V., 2009.** Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. *Letters in Applied Microbiology* 48, 1, 58–64. DOI:10.1111/j.1472-765X.2008.02486.x;
- 20. Arora, N.K., 2019.** Impact of climate change on agriculture production and its sustainable solutions. *Environmental Sustainability* 2, 2, 95–96. DOI:10.1007/s42398-019-00078-w;
- 21. Asaf, S., Khan, M.A., Khan, A.L., Waqas, M., Shahzad, R., i in., 2017.** Bacterial endophytes from arid land plants regulate endogenous hormone content and promote growth in crop plants: an example of *Sphingomonas* sp. and *Serratia marcescens*. *Journal of Plant Interactions* 12, 1, 31–38. DOI:10.1080/17429145.2016.1274060;
- 22. Asseng, S., Ewert, F., Martre, P., Rötter, R.P., Lobell, D.B., i in., 2015.** Rising temperatures reduce global wheat production. *Nature Climate Change* 5, 2, 143–147. DOI:10.1038/nclimate2470;
- 23. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., i in., (red.) 2003.** Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons, Inc., ISBN: 047150338X;
- 24. Ayuso-Sacido, A., Genilloud, O., 2005.** New PCR primers for the screening of *NRPS* and *PKS-I* systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology* 49, 1, 10–24. DOI:10.1007/s00248-004-0249-6;
- 25. Azevedo, J. L., Maccheroni J., W., Pereira, J.O., De Araújo, W.L., 2000.** Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 3, 1, 15–16. DOI:10.2225/vol3-issue1-fulltext-4;
- 26. Bakker, P.A., Pieterse, C.M., Van Loon, L.C., 2007.** Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97, 2, 239–243. DOI:10.1094/PHYTO-97-2-0239;

- 27. Baldani, I.,** Reis, V., Videira, S., Boddey, L., Baldani, V., 2014. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil* 384, 413–431. DOI:10.1007/s11104-014-2186-6;
- 28. Barac, T.,** Taghavi, S., Borremans, B., Provoost, A., Oeyen, L., i in., 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology* 22, 5, 583–588. DOI:10.1038/nbt960;
- 29. Benito, P.,** Carro, L., Bacigalupe, R., Ortúzar, M., Trujillo, M.E., 2022. From roots to leaves: the capacity of *Micromonospora* to colonize different legume tissues. *Phytobiomes Journal* 6, 1, 35–44. DOI:10.1094/PBIOMES-02-21-0015-R;
- 30. Berlec, A.,** 2012. Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: search for plant probiotics. *Plant Science* 193–194, 96–102. DOI:10.1016/j.plantsci.2012.05.010;
- 31. Bhutani, N.,** Maheshwari, R., Negi, M., Suneja, P., 2018. Optimization of IAA production by endophytic *Bacillus* spp. from *Vigna radiata* for their potential use as plant growth promoters. *Israel Journal of Plant Sciences* 65, 1–2, 83–96. DOI:10.1163/22238980-00001025;
- 32. Bodenhausen, N.,** Horton, M. W., Bergelson, J., 2013. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLOS One* 8, 2, e56329. DOI:10.1371/journal.pone.0056329;
- 33. Bogino, P.C.,** de las Mercedes Oliva, M., Sorroche, F.G., Giordano, W., 2013. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 8, 15838–15859. DOI:10.3390/ijms140815838;
- 34. Bolivar-Anillo, H.J.,** González-Rodríguez, V.E., Cantoral, J.M., García-Sánchez, D., Collado, I.G., i in., 2021. Endophytic bacteria *Bacillus subtilis*, isolated from *Zea mays*, as potential biocontrol agent against *Botrytis cinerea*. *Biology* 10, 6, 492. DOI:10.3390/biology10060492;
- 35. Breitkreuz, C.,** Reitz, T., Schulz, E., Tarkka, M.T., 2021. Drought and plant community composition affect the metabolic and genotypic diversity of *Pseudomonas* strains in grassland soils. *Microorganisms* 9, 8, 1677. DOI:10.3390/microorganisms9081677;

- 36. Bruto, M., Prigent-Combaret, C., Muller, D., Moënne-Loccoz, Y., 2014.** Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-promoting rhizobacteria and related *Proteobacteria*. *Scientific Reports* 4, 1, 6261. DOI:10.1038/srep06261;
- 37. Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E.V.L., Schulze-Lefert P., 2013.** Structure and functions of the bacterial microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology* 64, 1, 807–838. DOI:10.1146/annurev-arplant-050312-120106;
- 38. Canbolat, M.Y., Bilen, S., Çakmakçı, R., Şahin, F., Aydın, A., 2006.** Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biology and Fertility of Soils* 42, 350–357. DOI:10.1007/s00374-005-0034-9;
- 39. Cao, M., Narayanan, M., Shi, X., Chen, X., Li, Z., i in., 2023.** Optimistic contributions of plant growth-promoting bacteria for sustainable agriculture and climate stress alleviation. *Environmental Research* 217, 114924. DOI:10.1016/j.envres.2022.114924;
- 40. Card, S., Johnson, L., Teasdale, S., Caradus, J., 2016.** Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents. *FEMS Microbiology Ecology* 92, 8, fiw114. DOI:10.1093/femsec/fiw114;
- 41. Carro, L., 2011.** Avances en la sistemática del género *Micromonospora*: estudio de cepas aisladas de la rizosfera y nódulos de *Pisum sativum*. *Rozprawa doktorska, Uniwersytet w Salamance*. dostępny: <https://gredos.usal.es/handle/10366/76406> (dostęp 2.05.2023);
- 42. Carro, L., Spröer, C., Alonso, P., Trujillo, M.E., 2012.** Diversity of *Micromonospora* strains isolated from nitrogen fixing nodules and rhizosphere of *Pisum sativum* analyzed by multilocus sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 35, 2, 73–80. DOI:10.1016/j.syapm.2011.11.003;
- 43. Carro, L., Pukall, R., Spröer, C., Kroppenstedt, R.M., Trujillo, M.E., 2013.** *Micromonospora halotolerans* sp. nov., isolated from the rhizosphere of a *Pisum sativum* plant. *Antonie van Leeuwenhoek* 103, 1245–1254. DOI:10.1007/s10482-013-9903-7;
- 44. Carro, L., Nouioui, I., 2017.** Taxonomy and systematics of plant probiotic bacteria in the genomic era. *AIMS Microbiology* 3, 3, 383. DOI:10.3934/microbiol.2017.3.383;
- 45. Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., i in., 2000.** Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12, 9, 1647–1666. DOI:10.1105/tpc.12.9.1647;

- 46. Celebi, N., Nadaroglu, H., Kalkan, E., Kotan, R., 2016.** Removal of copper from copper-contaminated river water and aqueous solutions using *Methylobacterium extorquens* modified Erzurum clayey soil. *Archives of Environmental Protection* 42, 4, 58–69. DOI:10.1515/aep-2016-0035;
- 47. Chatterjee, P., Kanagendran, A., Samaddar, S., Pazouki, L., Sa, T.M., i in., 2019.** *Methylobacterium oryzae* CBMB20 influences photosynthetic traits, volatile emission and ethylene metabolism in *Oryza sativa* genotypes grown in salt stress conditions. *Planta* 249, 1903–1919. DOI:10.1007/s00425-019-03139-w;
- 48. Chaudhary, T., Dixit, M., Gera, R., Shukla, A.K., Prakash, A., i in., 2020.** Techniques for improving formulations of bioinoculants. *3 Biotech* 10, 1–9. DOI:10.1007/s13205-020-02182-9;
- 49. Chen, X.G., Stabnikova, O., Tay, J.H., Wang, J.Y., Tay, S.T.L., 2004.** Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus*, sp. nov., from sewage sludge. *Extremophiles* 8, 489–498. DOI:10.1007/s00792-004-0412-5;
- 50. Chen, L., Luo, S., Li, X., Wan, Y., Chen, J., i in., 2014.** Interaction of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and functional endophyte *Pseudomonas* sp. Lk9 on soil heavy metals uptake. *Soil Biology and Biochemistry* 68, 300–308. DOI:10.1016/j.soilbio.2013.10.021;
- 51. Chen, S.J., Lam, M.Q., Thevarajoo, S., Abd Manan, F., Yahya, A., i in., 2020.** Genome analysis of cellulose and hemicellulose degrading *Micromonospora* sp. CP22. *3 Biotech* 10, 4, 160. DOI:10.1007/s13205-020-2148-z;
- 52. Chialva, M., Lanfranco, L., Bonfante, P., 2022.** The plant microbiota: composition, functions, and engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 73, 135–142. DOI:10.1016/j.copbio.2021.07.003;
- 53. Choppala, G., Saifullah, Bolan, N., Bibi, S., Iqbal, M., i in., 2014.** Cellular mechanisms in higher plants governing tolerance to cadmium toxicity. *Critical Reviews in Plant Sciences* 33, 5, 374–391. DOI:10.1080/07352689.2014.903747;
- 54. Choudhury, A.R., Choi, J., Walitang, D.I., Trivedi, P., Lee, Y., i in., 2021.** ACC deaminase and indole acetic acid producing endophytic bacterial co-inoculation improves physiological traits of red pepper (*Capsicum annum* L.) under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 267, 153544. DOI:10.1016/j.jplph.2021.153544;

- 55. Chun, J.,** Rainey, F.A., 2014. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the *Bacteria* and *Archaea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, Pt_2, 316–324. DOI:10.1099/ij-s.0.054171-0;
- 56. Chun, J.,** Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D.R., i in., 2018. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68, 1, 461–466. DOI:10.1099/ij-sem.0.002516;
- 57. Cohen, A.C.,** Travaglia, C.N., Bottini, R., Piccoli, P.N., 2009. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botany* 87, 5, 455–462. DOI:10.1139/B09-023;
- 58. Cocking, E.C.,** Stone, P.J., Davey, M.R., 2005. Symbiosome-like intracellular colonization of cereals and other crop plants by nitrogen-fixing bacteria for reduced inputs of synthetic nitrogen fertilizers. *Science China Life Sciences* 48, 888–896. DOI:10.1007/BF03187127;
- 59. Compant, S.,** Clément, C., Sessitsch, A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 5, 669–678. DOI:10.1016/j.soil-bio.2009.11.024;
- 60. Coskun, D.,** Britto, D.T., Shi, W., Kronzucker, H.J., 2017. Nitrogen transformations in modern agriculture and the role of biological nitrification inhibition. *Nature Plants* 3, 6, 1–10. DOI:10.1038/nplants.2017.74;
- 61. Cuaxinque-Flores, G.,** Aguirre-Noyola, J.L., Hernández-Flores, G., Martínez-Romero, E., Romero-Ramírez, Y., i in., 2020. Bioimmobilization of toxic metals by precipitation of carbonates using *Sporosarcina luteola*: An *in vitro* study and application to sulfide-bearing tailings. *Science of the Total Environment*, 724, 138124. DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.138124;
- 62. Dávalos, A.,** García-de Los Santos, A., 2023. Five copper homeostasis gene clusters encode the Cu-efflux resistome of the highly copper-tolerant *Methylobacterium extorquens* AM1. *PeerJ* 11, e14925. DOI:10.7717/peerj.14925;

- 63. Deicke, M.,** Mohr, J.F., Roy, S., Herzsprung, P., Bellenger, J.P., i in., 2019. Metallophore profiling of nitrogen-fixing *Frankia* spp. to understand metal management in the rhizosphere of actinorhizal plants. *Metallomics* 11, 4, 810–821. DOI:10.1039/c8mt00344k;
- 64. Demtröder, L.,** Narberhaus, F., Masepohl, B., 2019. Coordinated regulation of nitrogen fixation and molybdate transport by molybdenum. *Molecular Microbiology* 111, 1, 17–30. DOI:10.1111/mmi.14152;
- 65. Deng, Y.,** Chen, H., Li, C., Xu, J., Qi, Q., i in., 2019. Endophyte *Bacillus subtilis* evade plant defense by producing lantibiotic subtilomycin to mask self-produced flagellin. *Communications Biology* 2, 1, 368. DOI:10.1038/s42003-019-0614-0;
- 66. Denton-Thompson, S.M.,** Sayer, E.J., 2022. Micronutrients in food production: what can we learn from natural ecosystems? *Soil Systems* 6, 1, 8. DOI:10.3390/soilsystems6010008;
- 67. Diale, M.O.,** Ubomba-Jaswa, E., Serepa-Dlamini, M.H., 2018. The antibacterial activity of bacterial endophytes isolated from *Combretum molle*. *African Journal of Biotechnology* 17, 8, 255–262. DOI:10.5897/AJB2017.16349;
- 68. Divjot, K.O.U.R.,** Rana, K.L., Tanvir, K.A.U.R., Yadav, N., Yadav, A.N., i in., 2021. Biodiversity, current developments and potential biotechnological applications of phosphorus-solubilizing and-mobilizing microbes: a review. *Pedosphere* 31, 1, 43–75. DOI:10.1016/S1002-0160(20)60057-1;
- 69. Doerges, L.,** Kutschera, U., 2014. Assembly and loss of the polar flagellum in plant-associated methylobacteria. *Naturwissenschaften* 101, 339–346. DOI:10.1007/s00114-014-1162-6;
- 70. Dourado, M.N.,** Ferreira, A., Araujo, W.L., Azevedo, J.L., Lacava, P.T., 2012. The diversity of endophytic methylotrophic bacteria in an oil-contaminated and an oil-free mangrove ecosystem and their tolerance to heavy metals. *Biotechnology Research International* 2012, 759865. DOI:10.1155/2012/759865;
- 71. Dourado, M.,** Pomini, A., Bogas, A., Andreote F.D., Quecine M.C., i in., 2013. *Methylobacterium*-plant interaction genes regulated by plant exudate and *quorum sensing* molecules. *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 4, 1331–1339. DOI:10.1590/S1517-83822013000400044;

- 72. Dourado**, M.N., Neves, A.A., Santos, D.S., Araújo, W.L., 2015. Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylotrophic *Methylobacterium* spp. BioMed Research International 909016. DOI:10.1155/2015/909016;
- 73. Dubey**, A., Malla, M.A., Kumar, A., Dayanandan, S., Khan, M.L., 2020. Plants endophytes: unveiling hidden agenda for bioprospecting toward sustainable agriculture. Critical Reviews in Biotechnology 40, 8, 1210–1231. DOI:10.1080/07388551.2020.1808584;
- 74. Dudeja**, S.S., Giri, R., 2014. Beneficial properties, colonization, establishment and molecular diversity of endophytic bacteria in legumes and non legumes. African Journal of Microbiology Research 8, 1562–1572. DOI:10.5897/AJMR2013.6541;
- 75. Durlik**, K., Żarnowiec, P., Piwowarczyk, R., Kaca, W., 2021. Culturable endophytic bacteria from *Phelipanche ramosa* (Orobanchaceae) seeds. Seed Science Research 31, 1, 69–75. DOI:10.1017/S0960258520000343;
- 76. Edwards**, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N.K., i in., 2015. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. Proceedings of the National Academy of Sciences 112, 8, 911–920. DOI:10.1073/pnas.1414592112;
- 77. Eid**, A.M., Fouda, A., Abdel-Rahman, M.A., Salem, S.S., Elsaied, A., i in. 2021. Harnessing bacterial endophytes for promotion of plant growth and biotechnological applications: an overview. Plants 10, 5, 935. DOI:10.3390/plants10050935;
- 78. El-Tarabily**, K.A., Nassar, A.H., Sivasithamparam, K., 2008. Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. Applied Soil Ecology 39, 2, 161–171. DOI:10.1016/j.apsoil.2007.12.005;
- 79. El-Tarabily**, K.A., AlKhajeh, A.S., Ayyash, M.M., Alnuaimi, L.H., Sham, A., i in., 2019. Growth promotion of *Salicornia bigelovii* by *Micromonospora chalcea* UAE1, an endophytic 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing actinobacterial isolate. Frontiers in Microbiology 10, 1694. DOI:10.3389/fmicb.2019.01694;
- 80. Etesami**, H., Mirsyed Hosseini, H., Alikhani, H.A., 2014. *In planta* selection of plant growth promoting endophytic bacteria for rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Soil Science and Plant Nutrition 14, 2, 491–503. DOI:10.4067/S0718-95162014005000039;

- 81. Etesami, H., Alikhani, H.A., Hosseini, H.M., 2015.** Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX* 2, 72–78. DOI:10.1016/j.mex.2015.02.008;
- 82. Etesami, H., Emami, S., Alikhani, H.A., 2017.** Potassium solubilizing bacteria (KSB): mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects. A review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 17, 4, 897–911. DOI:10.4067/S0718-95162017000400005;
- 83. Etesami, H., 2022.** Root nodules of legumes: a suitable ecological niche for isolating non-rhizobial bacteria with biotechnological potential in agriculture. *Current Research in Biotechnology* 4, 78–86. DOI:10.1016/j.crbiot.2022.01.003;
- 84. Fadji, A.E., Babalola, O.O., 2020.** Exploring the potentialities of beneficial endophytes for improved plant growth. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27, 12, 3622–3633. DOI:10.1016/j.sjbs.2020.08.002;
- 85. Fang, L-R., Yang, X-C., Wu, C-Y., Sun, K., Megharaj, M., i in., 2023.** Endophytic *Bacillus* sp. R1 and its roles in assisting phytoremediation and alleviating the toxicity of aluminum combined phenanthrene contaminations in *Brassica napus*. *Current Microbiology* 80, 397. DOI:10.1007/s00284-023-03493-9;
- 86. Feng, F., Ge, J., Li, Y., Cheng, J., Zhong, J., i in., 2017a.** Isolation, colonization, and chlorpyrifos degradation mediation of the endophytic bacterium *Sphingomonas* strain HJY in Chinese Chives (*Allium tuberosum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 6, 1131–1138. DOI:10.1021/acs.jafc.6b05283;
- 87. Feng, N.X., Yu, J., Zhao, H.M., Cheng, Y.T., Mo, C.H., i in., 2017b.** Efficient phytoremediation of organic contaminants in soils using plant–endophyte partnerships. *Science of the Total Environment* 583, 352–368. DOI:10.1016/j.scitotenv.2017.01.075;
- 88. Ferraz Helene, L.C., Klepa, M.S., Hungria, M., 2022.** New insights into the taxonomy of bacteria in the genomic era and a case study with rhizobia. *International Journal of Microbiology* 2022, 4623713. DOI:10.1155/2022/4623713;
- 89. Fesel, P.H., Zuccaro, A., 2016.** Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Microbiology* 32, 103–112. DOI:10.1016/j.mib.2016.05.008;
- 90. Fikri, A.S.I., Rahman, I.A., Nor, N.S.M., Hamzah, A., 2018.** Isolation and identification of local bacteria endophyte and screening of its antimicrobial property against pathogenic

bacteria and fungi. AIP Conference Proceedings 1940, 1, AIP Publishing. DOI:10.1063/1.5027987;

91. Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K.S, Salehi, B., i in., 2019. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. *Microorganisms* 7, 5, 130. DOI:10.3390/microorganisms7050130;

92. Frank, A., Saldierna Guzmán, J., Shay, J., 2017. Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms* 5, 70. DOI:10.3390/microorganisms5040070;

93. Fukami, J., Nogueira, M.A., Araujo, R.S., Hungria, M., 2016. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. *AMB Express* 6, 1–13. DOI:10.1186/s13568-015-0171-y;

94. Gaby, J.C., Buckley, D.H., 2012. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *PLOS One* 9, 3, e93883. DOI:10.1371/journal.pone.0093883;

95. Gałazka, A., Bigos, J., Siebielec, S., 2015. Promowanie wzrostu roślin przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* oraz ich zastosowanie w rolnictwie. *Polish Journal of Agronomy* 23, 48–62;

96. Gamalero, E., Glick, B.R., 2020. The use of plant growth-promoting bacteria to prevent nematode damage to plants. *Biology* 9,11, 381. DOI:10.3390/biology9110381;

97. Gamalero, E., Bona, E., Glick, B.R., 2022. Current techniques to study beneficial plant-microbe interactions. *Microorganisms* 10, 7, 1380. DOI:10.3390/microorganisms10071380;

98. Gamit, H.A., Naik, H., Chandarana, K.A., Chandwani, S., Amaresan, N., 2023. Secondary metabolites from methylotrophic bacteria: their role in improving plant growth under a stressed environment. *Environmental Science and Pollution Research* 30, 11, 28563–28574. DOI:10.3390/microorganisms10071380;

99. Gangwar, M., Dogra, S., Gupta, U.P., Kharwar, R.N., 2014. Diversity and biopotential of endophytic actinomycetes from three medicinal plants in India. *African Journal of Microbiology Research* 8, 2, 184–191. DOI:10.5897/AJMR2012.2452;

100. Gavrilesco, M., 2022. Enhancing phytoremediation of soils polluted with heavy metals. *Current Opinion in Biotechnology* 74, 21–31. DOI:10.1016/j.copbio.2021.10.024;

- 101. Genilloud, O.**, 2015. *Micromonospora*, w: Trujillo, M.E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., i in., (red.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, John Wiley & Sons. DOI:10.1002/9781118960608.gbm00148;
- 102. Germida, J.J.**, Siciliano, S.D., Renato de Freitas, J., Seib, A.M., 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology* 26, 1, 43–50. DOI:10.1016/S0168-6496(98)00020-8;
- 103. Ghodhbane-Gtari, F.**, Essoussi, I., Chattaoui, M., Chouaia, B., Jaouani, A., i in., 2010. Isolation and characterization of non-*Frankia* actinobacteria from root nodules of *Alnus glutinosa*, *Casuarina glauca* and *Elaeagnus angustifolia*. *Symbiosis* 50, 51–57. DOI:10.1007/s13199-009-0029-7;
- 104. Glaeser, S.P.**, Kämpfer, P., 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology* 38, 4, 237–245. DOI:10.1016/j.syapm.2015.03.007;
- 105. Glick, B.R.**, 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012, 963401. DOI:10.6064/2012/963401;
- 106. Glick, B.R.**, 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* 169, 1, 30–39. DOI:10.1016/j.micres.2013.09.009;
- 107. Glick, B.R.**, 2020a. Introduction to plant growth-promoting bacteria, w: Glick, B.R., (red.), *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*, Springer, Cham, 1–37. DOI:10.1007/978-3-030-44368-9_1;
- 108. Glick, B.R.**, 2020b. Resource acquisition, w: Glick, B.R., (red.), *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*, Springer, Cham, 91–138. DOI:10.1007/978-3-030-44368-9_4;
- 109. Glick, B.R.**, 2020c. Biocontrol of bacteria and fungi, w: Glick, B.R., (red.), *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*, Springer, Cham, 181–230. DOI:10.1007/978-3-030-44368-9_6;
- 110. Gong, Y.**, Bai, J.L., Yang, H.T., Zhang, W.D., Xiong, Y.W., i in., 2018. Phylogenetic diversity and investigation of plant growth-promoting traits of actinobacteria in coastal salt marsh plant rhizospheres from Jiangsu, China. *Systematic and Applied Microbiology* 41, 5, 516–527. DOI:10.1016/j.syapm.2018.06.003;

- 111. Gontia-Mishra, I., Sasidharan, S., Tiwari, S., 2014.** Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress. *Biotechnology Letters* 36, 889–898. DOI:10.1007/s10529-014-1458-9;
- 112. Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.C., 2015.** Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from L-tryptophan (Trp) using HPTLC. *Journal of Microbiological Methods* 110, 7–14. DOI:10.1016/j.mimet.2015.01.001;
- 113. Green, P.N., 2015.** *Methylobacterium*, w: Trujillo, M.E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., i in., (red.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, John Wiley & Sons. DOI:10.1002/9781118960608.gbm00830;
- 114. Green, P.N., Ardley, J.K., 2018.** Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms: a proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68, 9, 2727–2748. DOI:10.1099/ijsem.0.002856;
- 115. Griffith, G.W., Easton, G.L., Detheridge, A., Roderick, K., Edwards, A., i in., 2007.** Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *FEMS Microbiology Letters* 276, 2, 165–171. DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.00923.x;
- 116. Grossi, C.E.M., Fantino, E., Serral, F., Zawoznik, M.S., Fernandez Do Porto, D.A., i in., 2020.** *Methylobacterium* sp. 2A is a plant growth-promoting rhizobacteria that has the potential to improve potato crop yield under adverse conditions. *Frontiers in Plant Science* 11, 71. DOI:10.3389/fpls.2020.00071;
- 117. Guo, D. J., Singh, R.K., Singh, P., Li, D.P., Sharma, A., i in., 2020.** Complete genome sequence of *Enterobacter roggenkampii* ED5, a nitrogen fixing plant growth promoting endophytic bacterium with biocontrol and stress tolerance properties, isolated from sugarcane root. *Frontiers in Microbiology* 11, 580081. DOI:10.3389/fmicb.2020.580081;
- 118. Gurovic, M.S.V., Müller, S., Domin, N., Seccareccia, I., Nietzsche, S., i in., 2013.** *Micromonospora schwarzwaldensis* sp. nov., a producer of telomycin, isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, Pt_10, 3812–3817. DOI:10.1099/ijs.0.051623-0;

- 119. Guzzo, J., Duong, F., Wandersman, C., Murgier, M., Lazdunski, A., 1991.** The secretion genes of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease are functionally related to those of *Erwinia chrysanthemi* proteases and *Escherichia coli* α -haemolysin. *Molecular Microbiology* 5, 447–453. DOI:10.1111/j.1365-2958.1991.tb02128.x;
- 120. Hall, T.A., 1999.** BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98;
- 121. Hamdali, H., Bouizgarne, B., Hafidi, M., Lebrihi, A., Virolle, M.J., i in., 2008.** Screening for rock phosphate solubilizing *Actinomyces* from Moroccan phosphate mines. *Applied Soil Ecology* 38, 12–19. DOI:10.1016/j.apsoil.2007.08.007;
- 122. Hamid, B., Zaman, M., Farooq, S., Fatima, S., Sayyed, R.Z., i in., 2021.** Bacterial plant biostimulants: a sustainable way towards improving growth, productivity, and health of crops. *Sustainability* 13, 5, 2856. DOI:10.3390/su13052856;
- 123. Hamzah, A., Zubir, I., Ross, E.E.R., Aqma, W.S., 2017.** Antagonistic effect and plant growth hormone produced by endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* LKM-UL isolated from cocoa plant. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* 7, 3, 169–176. DOI:10.17706/ijbbb.2017.7.3.169-176;
- 124. Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Elsas, J.D.V., 2008.** Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16, 463–471. DOI:10.1016/j.tim.2008.07.008;
- 125. Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S., i in., 2015.** The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79, 3, 293–320. DOI:10.1128/mmbr.00050-14;
- 126. Harumain, Z.A.S., Mohamad, M.A.N., Nordin, N.F.H., Abd Shukor, M.Y., 2023.** Biodegradation of petroleum sludge by *Methylobacterium* sp. strain ZASH. *Tropical Life Sciences Research* 34, 2, 197–222. DOI:10.21315/tlsr2023.34.2.10;
- 127. Hayakawa, M., Sadakata, T., Kajiura, T., Nonomura, H., 1991.** New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 72, 5, 320–326. DOI:10.1016/0922-338X(91)90080-Z;

- 128. Hazarika, S.N., Saikia, K., Borah, A., Thakur, D., 2021.** Prospecting endophytic bacteria endowed with plant growth promoting potential isolated from *Camellia sinensis*. *Frontiers in Microbiology* 12, 738058. DOI:10.3389/fmicb.2021.738058;
- 129. He, W., Megharaj, M., Wu, C.Y., Subashchandrabose, S.R., Dai, C.C., 2020.** Endophyte-assisted phytoremediation: mechanisms and current application strategies for soil mixed pollutants. *Critical Reviews in Biotechnology* 40, 1, 31–45. DOI:10.1080/07388551.2019.1675582;
- 130. Hedden, P., 2020.** The current status of research on gibberellin biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* 61, 11, 1832–1849. DOI:10.1093/pcp/pcaa092;
- 131. Herbert, S., Bera, A., Nerz, C., Kraus, D., Peschel, A., i in., 2007.** Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in staphylococci. *PLoS Pathogens* 3, 7, e102. DOI:10.1371/journal.ppat.0030102;
- 132. Himaman, W., Thamchaipenet, A., Pathom-Aree, W., Duangmal, K., 2016.** Actinomycetes from *Eucalyptus* and their biological activities for controlling *Eucalyptus* leaf and shoot blight. *Microbiological Research* 188, 42–52. DOI:10.1016/j.micres.2016.04.011;
- 133. Hirsch, A.M., Valdés, M., 2010.** *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 4, 536–542. DOI:10.1016/j.soilbio.2009.11.023;
- 134. Hopwood, D.A., 1967.** Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriological Reviews* 31, 4, 373–403;
- 135. Hördt, A., López, M.G., Meier-Kolthoff, J.P., Schleuning, M., Weinhold, L.M., i in., 2020.** Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of 59 *Alphaproteobacteria*. *Frontiers in Microbiology* 11, 468. DOI:10.3389/fmicb.2020.00468;
- 136. Hossain, M.T., Chung, Y.R., 2019.** Endophytic *Bacillus* species induce systemic resistance to plant diseases, w: Islam, M., Rahman, M., Pandey, P., Boehme, M., Haesaert, G., (red.), *Bacilli and agrobiotechnology: phytostimulation and biocontrol. Bacilli in climate resilient agriculture and bioprospecting.* Springer, Cham, 151–160. DOI:10.1007/978-3-030-15175-1_9;

- 137. Hu, X., Yu, J., Wang, C., Chen, H., 2014.** Cellulolytic bacteria associated with the gut of *Dendroctonus armandi* larvae (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Forests* 5, 3, 455–465. DOI:10.3390/f5030455;
- 138. Hu, H., Gao, Y., Li, X., Chen, S., Yan, S., i in., 2020.** Identification and nematicidal characterization of proteases secreted by endophytic bacteria *Bacillus cereus* BCM2. *Phytopathology* 110, 2, 336–344. DOI:10.1094/PHYTO-05-19-0164-R;
- 139. Hugenholtz, P., Chuvochina, M., Oren, A., Parks, D.H., Soo, R.M., 2021.** Prokaryotic taxonomy and nomenclature in the age of big sequence data. *the ISME Journal*, 15, 7, 1879–1892. DOI:10.1038/s41396-021-00941-x;
- 140. Husen, E., Wahyudi, A.T., Suwanto, A., Saraswati, R., 2009.** Soybean seedling root growth promotion by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing pseudomonads. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 10, 1, 19–25;
- 141. Ibáñez, A., Garrido-Chamorro, S., Vasco-Cárdenas, M.F., Barreiro, C., 2023.** From lab to field: biofertilizers in the 21st century. *Horticulturae* 9, 12, 1306. DOI:10.3390/horticulturae9121306;
- 142. Idemudia, M.I., Nosagie, O.A., Omorede, O., 2014.** Comparative assessment of degradation potentials of bacteria and actinomycetes in soil contaminated with motorcycle spent oil. *Asian Journal of Science and Technology* 5, 8, 482–487;
- 143. Insuk, C., Kuncharoen, N., Cheeptham, N., Tanasupawat, S., Pathom-Aree, W., 2020.** Bryophytes harbor cultivable actinobacteria with plant growth promoting potential. *Frontiers in Microbiology* 11, 2267. DOI:10.3389/fmicb.2020.563047;
- 144. Ishak, F.N., Rahim, A.A., Mean, L.J., Ayub, N.A.M., Fazilah, N.N., 2021.** Preliminary analysis of endophytic plant growth promoting (PGP) *Methylobacterium* sp. isolated from palm oil (*Elaeis guineensis*) leaves, w: *Earth and environmental science* 765, IOP Publishing, 012071. DOI:10.1088/1755-1315/765/1/012071;
- 145. ISTA, 2006.** Międzynarodowe Przepisy Oceny Nasion. Wydanie 2006. Międzynarodowy Związek Oceny Nasion (ISTA), Bassersdorf, Szwajcaria;
- 146. Ijaz, A., Imran, A., Anwar ul Haq, M., Khan, Q.M., Afzal, M., 2015.** Phytoremediation: recent advances in plant-endophytic synergistic interactions. *Plant and Soil* 405, 1-2, 179–195. DOI:10.1007/s11104-015-2606-2;

- 147. Jacob, J.,** Krishnan, G.V., Thankappan, D., Amma, B.N.S.D.K., 2020. Endophytic bacterial strains induced systemic resistance in agriculturally important crop plants, w: Kumar, A., Radhakrishnan, E.K., (red.), *Microbial Endophytes*, Woodhead Publishing, 75–105. DOI:10.1016/b978-0-12-819654-0.00004-1;
- 148. Jacob, S.M.,** Paranthaman, S., 2023. Biofertilizers: an advent for eco-friendly and sustainable agriculture development. *Vegetos* 36, 4, 1141–1153. DOI:10.1007/s42535-022-00550-9;
- 149. Janda, J.M.,** Abbott, S.L., 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology* 45, 9, 2761–2764. DOI:10.1128/jcm.01228-07;
- 150. Jasim, B.,** Sreelakshmi, K.S., Mathew, J., Radhakrishnan, E.K., 2016. Surfactin, iturin, and fengycin biosynthesis by endophytic *Bacillus* sp. from *Bacopa monnieri*. *Microbial Ecology* 72, 106–119. DOI:10.1007/s00248-016-0753-5;
- 151. Jayashree, S.,** Lalitha, R., Vadivukkarasi, P., Kato, Y., Seshadri, S., 2011. Cellulase production by pink pigmented facultative methylotrophic strains (PPFMs). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164, 5, 666–680. DOI:10.1007/s12010-011-9166-6;
- 152. Jensen, M.A.,** Fukushima, M., Davis, R.W., 2010. DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in *de novo* synthesis. *PLOS One* 5, 6, e11024. DOI:10.1371/journal.pone.0011024;
- 153. Jeong, J.J.,** Sang, M.K., Lee, D.W., Choi, I.G., Kim, K.D., 2019. *Chryseobacterium phosphatilyticum* sp. nov., a phosphate-solubilizing endophyte isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) root. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69, 3, 610–615. DOI:10.1099/ijsem.0.003091;
- 154. Jiang, Z.K.,** Tuo, L., Huang, D.L., Osterman, I.A., Tyurin, A.P., i in., 2018. Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China. *Frontiers in Microbiology* 9, 868. DOI:10.3389/fmicb.2018.00868;
- 155. Jiang, L.,** An, D., Wang, X., Zhang, K., Li, G., i in., 2020. *Methylobacterium planium* sp. nov., isolated from a lichen sample. *Archives of Microbiology* 202, 1709–1715. DOI:10.1007/s00203-020-01881-4;

- 156. Jiménez-Delgadillo, R., Valdés-Rodríguez, S.E., Olalde-Portugal, V., Abraham-Juárez, R., García-Hernández, J.L., 2018.** Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36, 2, 256–275. DOI:10.18781/r.mex.fit.1711-3;
- 157. Joel, G.V.V., Latha, P.C., Gopal, A.V., Sreedevi, B., 2023.** Isolation and characterization of pink pigmented facultative methylotrophic bacteria: an *in-vitro* evaluation of the isolates for plant growth promotion on rice. *Biological Forum – an International Journal* 15, 2, 1167–1179;
- 158. Jorge, G.L., Kisiala, A., Morrison, E., Aoki, M., Nogueira, A.P.O., i in., 2019.** Endosymbiotic *Methylobacterium oryzae* mitigates the impact of limited water availability in lentil (*Lens culinaris* Medik.) by increasing plant cytokinin levels. *Environmental and Experimental Botany* 162, 525–540. DOI:10.1016/j.envexpbot.2019.03.028;
- 159. Jourand, P., Giraud, E., Bena, G., Sy, A., Willems, A., i in., 2004.** *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 6, 2269–2273. DOI:10.1099/ij.s.0.02902-0;
- 160. Juma, P.O., Fujitani, Y., Alessa, O., Oyama, T., Yurimoto, H., i in., 2022.** Siderophore for lanthanide and iron uptake for methylotrophy and plant growth promotion in *Methylobacterium aquaticum* strain 22A. *Frontiers in Microbiology* 13, 921635. DOI:10.3389/fmicb.2022.921635;
- 161. Kaczmarek-Cichosz, R., Chojnacki, J., Deszcz, E., 2011.** Ocena skuteczności zastosowania biochikolu 020 pc do pól suchego zaprawiania ziarna pszenicy jarej. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 56, 3, 184–188;
- 162. Kaewkla, O., Suriyachadkun, C., Franco, C.M.M., 2021.** *Micromonospora veneta* sp. nov., an endophytic actinobacterium with potential for nitrogen fixation and for bioremediation. *Archives of Microbiology* 203, 2853–2861. DOI:10.1007/s00203-021-02260-3;
- 163. Kafle, A., Timilsina, A., Gautam, A., Adhikari, K., Bhattarai, i in., 2022.** Phytoremediation: mechanisms, plant selection and enhancement by natural and synthetic agents. *Environmental Advances* 8, 100203. DOI:10.1016/j.envadv.2022.100203;

- 164. Kashyap, N., Singh, S.K., Yadav, N., Singh, V.K., Kumari, M., i in., 2023.** Biocontrol screening of endophytes: applications and limitations. *Plants* 12, 13, 2480. DOI:10.3390/plants12132480;
- 165. Kędzia, W., 1990.** Diagnostyka mikrobiologiczna w medycynie. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, wyd. 3;
- 166. Khan, A.R., Ullah, I., Khan, A.L., Park, G.S., Waqas, M., i in., 2015.** Improvement in phytoremediation potential of *Solanum nigrum* under cadmium contamination through endophytic-assisted *Serratia* sp. RSC-14 inoculation. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 14032–14042. DOI:10.1007/s11356-015-4647-8;
- 167. Khan, A.L., Halo, B.A., Elyassi, A., Ali, S., Al-Hosni, K., i in., 2016.** Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology* 21, 58–64. DOI:10.1016/j.ejbt.2016.02.001;
- 168. Khan, M.A., Asaf, S., Khan, A.L., Ullah, I., Ali, S., i in., 2019.** Alleviation of salt stress response in soybean plants with the endophytic bacterial isolate *Curtobacterium* sp. SAK1. *Annals of Microbiology* 69, 797–808. DOI:10.1007/s13213-019-01470-x;
- 169. Khan, S.S., Verma, V., Rasool, S., 2020.** Diversity and the role of endophytic bacteria: a review. *Botanica Serbica* 44, 2, 103–120. DOI:10.2298/BOTSERB2002103K;
- 170. Khan, A., Singh, A.V., Gautam, S.S., Agarwal, A., Punetha, A., i in., 2023.** Microbial bioformulation: a microbial assisted biostimulating fertilization technique for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science* 14, 1270039. DOI:10.3389/fpls.2023.1270039;
- 171. Khatri, B.R., Tipre, D.R., Dave, S.R., 2018.** Isolation and identification of HCN producing *Pseudomonas* spp. and their application in metal extraction from waste cell phone PCBs. *International Journal of Research and Analytical Reviews* 5, 237–241;
- 172. Kim, J., Chhetri, G., Kim, I., Kim, M.K., Seo, T., 2020a.** *Methylobacterium durans* sp. nov., a radiation-resistant bacterium isolated from gamma ray-irradiated soil. *Antonie van Leeuwenhoek* 113, 211–220. DOI:10.1007/s10482-019-01331-2;
- 173. Kim, J., Chhetri, G., Kim, I., Lee, B., Jang, W., i in., 2020b.** *Methylobacterium terricola* sp. nov., a gamma radiation-resistant bacterium isolated from gamma ray-irradiated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70, 4, 2449–2456. DOI:10.1099/ijsem.0.004054;

- 174. Kist, J., Tate, R.L., 2013.** Phylogeny of bacterial methylotrophy genes reveals robustness in *Methylobacterium mxaF* sequences and *mxo* operon construction. *Soil Biology and Biochemistry* 59, 49–57. DOI:10.1016/j.soilbio.2012.12.010;
- 175. Kittiwongwattana, C., Thanaboripat, D., Laosinwattana, C., Koohakan, P., Parintha-wong, N., i in., 2015.** *Micromonospora oryzae* sp. nov., isolated from roots of upland rice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, Pt_11, 3818–3823. DOI:10.1099/ijsem.0.000500;
- 176. Knief, C., Dengler, V., Bodelier, P.L., Vorholt, J.A., 2012.** Characterization of *Methylobacterium* strains isolated from the phyllosphere and description of *Methylobacterium longum* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 101, 169–183. DOI:10.1007/s10482-011-9650-6;
- 177. Koch, C., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., 1996.** Intrageneric relationships of the actinomycete genus *Micromonospora*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 46, 2, 383–387. DOI:10.1099/00207713-46-2-383;
- 178. Komaki, H., Ichikawa, N., Hosoyama, A., Hamada, M., Igarashi, Y., 2021.** *In silico* analysis of *PKS* and *NRPS* gene clusters in arisostatin-and kosinostatin-producers and description of *Micromonospora okii* sp. nov. *Antibiotics* 10, 12, 1447. DOI:10.3390/antibiotics10121447;
- 179. Kopittke, P.M., Menzies, N.W., Wang, P., McKenna, B.A., Lombi, E., 2019.** Soil and the intensification of agriculture for global food security. *Environment International* 132, 105078. DOI:10.1016/j.envint.2019.105078;
- 180. Koskimäki, J.J., Pohjanen, J., Kvist, J., Fester, T., Härtig, C., i in., 2022.** The meristem-associated endosymbiont *Methylorubrum extorquens* DSM13060 reprograms development and stress responses of pine seedlings. *Tree Physiology* 42, 2, 391–410. DOI:10.1093/treephys/tpab102;
- 181. Kouadri, F., Al-Aboudi, A., Khyami-Horani, H., 2014.** Antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. isolated from the gulf of Aqaba-Jordan and screening for *NRPS*, *PKS-I*, and *PKS-II* genes. *African Journal of Biotechnology* 13, 34. DOI:10.5897/AJB2014.13869;
- 182. Kovaleva, J., Degener, J.E., van der Mei, H.C., 2014.** *Methylobacterium* and its role in health care-associated infection. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 5, 1317–1321. DOI:10.1128/jcm.03561-13;

- 183. Kraemer, S.M.,** Duckworth, O.W., Harrington, J.M., Schenkeveld, W.D.C., 2014. Metallophores and trace metal biogeochemistry. *Aquatic Geochemistry* 21, 2-4, 159–195. DOI:10.1007/s10498-014-9246-7;
- 184. Kroppenstedt, R.M.,** Mayilraj, S., Wink, J.M., Kallow, W., Schumann, P., i in., 2005. Eight new species of the genus *Micromonospora*, *Micromonospora citrea* sp. nov., *Micromonospora echinaurantiaca* sp. nov., *Micromonospora echinofusca* sp. nov. *Micromonospora fulviviridis* sp. nov., *Micromonospora inyonensis* sp. nov., *Micromonospora peucetia* sp. nov., *Micromonospora sagamiensis* sp. nov., and *Micromonospora viridifaciens* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 4, 328–339. DOI:10.1016/j.syapm.2004.12.011;
- 185. Kumar, S.,** Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 7, 1870–1874. DOI:10.1093/molbev/msw054;
- 186. Kumar, A.,** Droby, S., Singh, V.K., Singh, S.K., White, J.F., 2020. Entry, colonization, and distribution of endophytic microorganisms in plants. *Microbial Endophytes* 2020, 1–33. DOI:10.1016/b978-0-12-819654-0.00001-6;
- 187. Lacalle, R.G.,** Gómez-Sagasti, M.T., Artetxe, U., Garbisu, C., Becerril, J.M., 2018. *Brassica napus* has a key role in the recovery of the health of soils contaminated with metals and diesel by rhizoremediation. *Science of The Total Environment* 618, 347–356. DOI:10.1016/j.scitotenv.2017.10.334;
- 188. Lalucat, J.,** Mulet, M., Gomila, M., García-Valdés, E., 2020. Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus *Pseudomonas*. *Genes* 11, 2, 139. DOI:10.3390/genes11020139;
- 189. Lau, E.,** Fisher, M.C., Steudler, P.A., Cavanaugh, C.M., 2013. The methanol dehydrogenase gene, *mxoF*, as a functional and phylogenetic marker for proteobacterial methanotrophs in natural environments. *PLoS One* 8, 2, e56993. DOI:10.1371/journal.pone.0056993;
- 190. Lecomte, C.,** Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Robert, F., Steinberg, C., 2016. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: a review. *Biological Control* 101, 17–30. DOI:10.1016/j.biocontrol.2016.06.004;

- 191. Lee, K.H., Munusamy, M., Kim, C.W., Lee, H.S., Selvaraj, P., i in., 2004.** Isolation and characterization of the IAA producing methylotrophic bacteria from phyllosphere of rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer* 37, 4, 235–244;
- 192. Lee, S.W., Oh, H.W., Lee, K.H., Ahn, T.Y., 2009.** *Methylobacterium dankookense* sp. nov., isolated from drinking water. *The Journal of Microbiology* 47, 716–720. DOI:10.1007/s12275-009-0126-6;
- 193. Lee, Y., Jeon, C.O., 2018.** *Methylobacterium frigidaeris* sp. nov., isolated from an air conditioning system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68, 1, 299–304. DOI:10.1099/ijsem.0.002500;
- 194. Leifert, C., Sigeo, D.C., Stanley, R., Knight, C., Epton, H.A.S., 1993.** Biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Alternaria brassicicola* on Dutch white cabbage by bacterial antagonists at cold-store temperatures. *Plant Pathology* 42, 2, 270–279. DOI:10.1111/j.1365-3059.1993.tb01500.x;
- 195. Li, X., He, J., Li, S., 2007.** Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. strain Dsp-2, and cloning of the *mpd* gene. *Research in Microbiology* 158, 143e149. DOI:10.1016/j.resmic.2006.11.007;
- 196. Li, Z., Chang, S., Lin, L., Li, Y., An, Q., 2011.** A colorimetric assay of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) based on ninhydrin reaction for rapid screening of bacteria containing ACC deaminase. *Letters in Applied Microbiology* 53, 2, 178–185. DOI:10.1111/j.1472-765X.2011.03088.x;
- 197. Li, Y., Li, Y., Zhang, H., Wang, M., Chen, S., 2019.** Diazotrophic *Paenibacillus beijingsis* BJ-18 provides nitrogen for plant and promotes plant growth, nitrogen uptake and metabolism. *Frontiers in Microbiology* 10, 1119. DOI:10.3389/fmicb.2019.01119;
- 198. Li, J., Zhao, X., 2020.** Effects of quorum sensing on the biofilm formation and viable but non-culturable state. *Food Research International* 137, 109742. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109742;
- 199. Li, Y., Wei, S., Chen, X., Dong, Y., Zeng, M., i in., 2023.** Isolation of cadmium-resistance and siderophore-producing endophytic bacteria and their potential use for soil cadmium remediation. *Heliyon*, e17661. DOI:10.1016/j.heliyon.2023.e17661;

- 200. Liu, X., Jia, J., Papat, R., Ortori, C.A., Li, J., i in., 2011.** Characterisation of two quorum sensing systems in the endophytic *Serratia plymuthica* strain G3: differential control of motility and biofilm formation according to life-style. *BMC Microbiology* 11, 1–12. DOI:10.1186/1471-2180-11-26;
- 201. Liu, W., Li, L., Khan, M.A., Zhu, F., 2012.** Popular molecular markers in bacteria. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology* 27, 103–107. DOI:10.3103/S0891416812030056;
- 202. Liu, H., Carvalhais, L.C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P.G., i in., 2017.** Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Frontiers in Microbiology* 8, 2552. DOI:10.3389/fmicb.2017.02552;
- 203. Liu, H., Brettell, L.E., Qiu, Z., Singh, B.K., 2020.** Microbiome-mediated stress resistance in plants. *Trends in Plant Science* 25, 8, 733–743. DOI:10.1016/j.tplants.2020.03.014;
- 204. Lòpez-Fernàndez, S., Sonogo, P., Moretto, M., Pancher, M., Engelen, K., i in., 2015.** Whole-genome comparative analysis of virulence genes unveils similarities and differences between endophytes and other symbiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology* 6, 419. DOI:10.3389/fmicb.2015.00419;
- 205. Lu, Q., Weng, Y., You, Y., Xu, Q., Li, H., i in., 2020.** Inoculation with abscisic acid (ABA)-catabolizing bacteria can improve phytoextraction of heavy metal in contaminated soil. *Environmental Pollution* 257, 113497. DOI:0.1016/j.envpol.2019.113497;
- 206. Lucero, C.T., Lorda, G.S., Anzuay, M.S., Ludueña, L.M., Taurian, T., 2021.** Peanut endophytic phosphate solubilizing bacteria increase growth and P content of soybean and maize plants. *Current Microbiology* 78, 1961–1972. DOI:10.1007/s00284-021-02469-x;
- 207. Ma, L., Cao, Y.H., Cheng, M.H., Huang, Y., Mo, M.H., i in., 2013.** Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex. *Antonie van Leeuwenhoek* 103, 299–312. DOI:10.1007/s10482-012-9810-3;
- 208. Ma, L., Huang, L., Liu, Q., Xu, S., Wen, Z., i in., 2022.** Positive effects of applying endophytic bacteria in eggplant-sedum intercropping system on Cd phytoremediation and vegetable production in cadmium polluted greenhouse. *Journal of Environmental Sciences* 115, 383–391. DOI:10.1016/j.jes.2021.08.005;

- 209. Madhaiyan, M.,** Poonguzhali, S., Lee, H.S., Hari, K., Sundaram, S.P., i in., 2005. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). *Biology and Fertility of Soils* 41, 350–358. DOI:10.1007/s00374-005-0838-7;
- 210. Madhaiyan, M.,** Poonguzhali, S., Ryu, J., Sa, T., 2006a. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. *Planta* 224, 268–278. DOI:10.1007/s00425-005-0211-y;
- 211. Madhaiyan, M.,** Suresh Reddy, B.V., Anandham, R., Senthilkumar, M., Poonguzhali, S., i in., 2006b. Plant growth–promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. *Current Microbiology* 53, 270–276. DOI:10.1007/s00284-005-0452-9;
- 212. Madhaiyan, M.,** Poonguzhali, S., Sa, T., 2007a. Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase containing *Methylobacterium oryzae* and interactions with auxins and ACC regulation of ethylene in canola (*Brassica campestris*). *Planta* 226, 867–876. DOI:10.1007/s00425-007-0532-0;
- 213. Madhaiyan, M.,** Poonguzhali, S., Sa, T., 2007b. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere* 69, 2, 220–228. DOI:10.1016/j.chemosphere.2007.04.017;
- 214. Madhaiyan, M.,** Alex, T.H.H., Ngoh, S.T., Prithiviraj, B., Ji, L., 2015. Leaf-residing *Methylobacterium* species fix nitrogen and promote biomass and seed production in *Jatropha curcas*. *Biotechnology for Biofuels* 8, 1–14. DOI:10.1186/s13068-015-0404-y;
- 215. Maela, P.M.,** Serepa-Dlamini, M.H., 2019. Current understanding of bacterial endophytes, their diversity, colonization and their roles in promoting plant growth. *Applied Microbiology* 5, 157. DOI:10.35248/2471-9315.19.5.157;
- 216. Maheshwari, R.,** Bhutani, N., Suneja, P., 2020. Isolation and characterization of ACC deaminase producing endophytic *Bacillus mojavensis* PRN2 from *Pisum sativum*. *Iranian Journal of Biotechnology* 18, 2, e2308. DOI:10.30498/IJB.2020.137279.2308;

- 217. Mahgoub**, H.A., Fouda, A., Eid, A.M., Ewais, E.E.D., Hassan, S.E.D., 2021. Biotechnological application of plant growth-promoting endophytic bacteria isolated from halophytic plants to ameliorate salinity tolerance of *Vicia faba* L. *Plant Biotechnology Reports* 15, 819–843. DOI:10.1007/s11816-021-00716-y;
- 218. Majchrowska-Safaryan**, A., Tkaczuk, C., 2023. Wpływ bionawozów zawierających substancje humusowe na wzrost grzybów z rodzaju *Beauveria* i *Metarhizium* w warunkach *in vitro*. *Progress in Plant Protection* 63, 2, 73–79. DOI:10.14199/ppp-2023-008;
- 219. Malfanova**, N., Lugtenberg, B.J., Berg, G., 2013. Bacterial endophytes: who and where, and what are they doing there?, w: de Bruijn, F.J., (red.), *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* 1, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 391–403. DOI:10.1002/9781118297674.ch36;
- 220. Mamangkey**, J., Mendes, L. W., Harahap, A., Briggs, D., Kayacilar, C., 2022. Endophytic bacteria and fungi from Indonesian medicinal plants with antibacterial, pathogenic antifungal and extracellular enzymes activities: a review. *International Journal of Science, Technology & Management* 3, 1, 245–255;
- 221. Manassila**, M., Nuntagij, A., Kotepong, S., Boonkerd, N., Teaumroong, N., 2007. Characterization and monitoring of selected rhizobial strains isolated from tree legumes in Thailand. *Systematic and Applied Microbiology* 6, 12, 1393–1402;
- 222. Manjunatha**, L., Narasareddy, G., Ravikumar, B.M., Uppala, L.S., Kumar, R., i in., 2022. Detection of endophytes by molecular fingerprinting techniques, w: Sankaranarayanan, A., Amaresan, N., Dwivedi, M.K., (red.), *Endophytic microbes: isolation, identification, and bioactive potentials*. Springer Protocols Handbooks, New York, 109–133. DOI:10.1007/978-1-0716-2827-0_13;
- 223. de Marco**, P., Pacheco, C.C., Figueiredo, A.R., Moradas-Ferreira, P., 2004. Novel pollutant-resistant methylotrophic bacteria for use in bioremediation. *FEMS Microbiology letters* 234, 1, 75–80. DOI:10.1111/j.1574-6968.2004.tb09515.x;
- 224. Martínez-Hidalgo**, P., Galindo-Villardón, P., Trujillo, M.E., Igual, J.M., Martínez-Molina, E., 2014a. *Micromonospora* from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). A new promising plant probiotic bacteria. *Scientific Reports* 4, 1, 6389. DOI:10.1038/srep06389;

- 225. Martínez-Hidalgo, P., Olivares, J., Delgado, A., Bedmar, E., Martínez-Molina, E.,** 2014b. Endophytic *Micromonospora* from *Medicago sativa* are apparently not able to fix atmospheric nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry* 74, 201–203. DOI:10.1016/j.soilbio.2014.03.011;
- 226. Martínez-Hidalgo, P., García, J.M., Pozo, M.J.,** 2015. Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Micromonospora* strains isolated from root nodules. *Frontiers in Microbiology* 6, 922. DOI:10.3389/fmicb.2015.00922;
- 227. Martínez-Hidalgo, P., Flores-Félix, J.D., Velázquez, E., Brau, L., Trujillo, M.E.,** i in., 2020. High taxonomic diversity of *Micromonospora* strains isolated from *Medicago sativa* nodules in Western Spain and Australia. *Systematic and Applied Microbiology* 43, 1, 126043. DOI:10.1016/j.syapm.2019.126043;
- 228. Matos, A.D., Gomes, I.C., Nietsche, S., Xavier, A.A., Gomes, W.S.,** i in., 2017. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89, 2945–2954. DOI:10.1590/0001-3765201720160111;
- 229. Mattick, J.S.,** 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annual Reviews in Microbiology* 56, 1, 289–314. DOI:10.1146/annurev.micro.56.012302.160938;
- 230. Mazurek, K.,** 2023. Wzrasta liczba biopreparatów. Potrzebne uregulowania prawne. Farmer.pl, (on-line). dostępny: <https://www.farmer.pl/produkcja-roslinna/ochrona-roslin/wzrasta-liczba-biopreparatow-potrzebne-uregulowania-prawne,133206.html> (dostęp 18.09.2023);
- 231. McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R.,** i in., 1997. Quorum Sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143, 12, 3703–3711. DOI:10.1099/00221287-143-12-3703;
- 232. Meena, K.K., Kumar, M., Kalyuzhnaya, M.G., Yandigeri, M.S., Singh, D.P.,** i in., 2012. Epiphytic pink-pigmented methylotrophic bacteria enhance germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*) by producing phytohormone. *Antonie van Leeuwenhoek* 101, 4, 777–786;
- 233. Mehnert, M., Retamal-Morales, G., Schwabe, R., Vater, S., Heine, T.,** i in., 2017. Revisiting the chrome azurol S assay for various metal ions. *Solid State Phenomena* 262, 509–512. DOI:10.4028/www.scientific.net/SSP.262.509;

- 234. Mello, I.S., Targanski, S., Pietro-Souza, W., Stachack, F.F.F., Terezo, A.J., i in., 2020.** Endophytic bacteria stimulate mercury phytoremediation by modulating its bioaccumulation and volatilization. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 202, 110818. DOI:10.1016/j.ecoenv.2020.110818;
- 235. Miliute, I., Buzaitė, O., Baniulis, D., Stanys, V., 2015.** Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. *Zemdirbyste-Agriculture* 102, 4, 465–478. DOI:10.13080/z-a.2015.102.060;
- 236. Mishra, S., Bhattacharjee, A., Sharma, S., 2021.** An ecological insight into the multifaceted world of plant-endophyte association. *Critical Reviews in Plant Sciences* 40, 2, 127–146. DOI:10.1080/07352689.2021.1901044;
- 237. Mitter, E.K., Kataoka, R., de Freitas, J.R., Germida, J.J., 2019.** Potential use of endophytic root bacteria and host plants to degrade hydrocarbons. *International Journal of Phytoremediation* 21, 9, 928–938. DOI:10.1080/15226514.2019.1583637;
- 238. Mohan, C., 2006.** Buffers. A guide for the preparation and use of buffers in biological systems. EMD Bioscience, wyd. 3;
- 239. Morales-Cedeño, L.R., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Loeza-Lara, P.D., Parra-Cota, F.I., de Los Santos-Villalobos, S., i in., 2021.** Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre-and post-harvest diseases: fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiological Research* 242, 126612. DOI:10.1016/j.micres.2020.126612;
- 240. More, S.S., Shinde, S.E., Kasture, M.C., 2019.** Root exudates a key factor for soil and plant: An overview. *The Pharma Innovation Journal* 8, 6, 449–459;
- 241. Nag, P., Shriti, S., Das, S., 2020.** Microbiological strategies for enhancing biological nitrogen fixation in nonlegumes. *Journal of Applied Microbiology* 129, 2, 186–198. DOI:10.1111/jam.14557;
- 242. Narayanan, Z., Glick, B.R., 2022.** Secondary metabolites produced by plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microorganisms* 10, 10, 2008. DOI:doi.org/10.3390/microorganisms10102008;
- 243. Naylor, D., Degraaf, S., Purdom, E., Coleman-Derr, D., 2017.** Drought and host selection influence bacterial community dynamics in the grass root microbiome. *International Society for Microbial Ecology J11*, 2691–2704. DOI:10.1038/ismej.2017.118;

- 244. Nei, M., Kumar, S., 2000.** Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York
- 245. Nimaichand, S., Zhang, Y.G., Cheng, J., Li, L., Zhang, D.F., i in., 2013.** *Micromonospora kangleipakensis* sp. nov., isolated from a sample of limestone quarry. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63, Pt_12, 4546–4551. DOI:10.1099/ijms.0.052746-0;
- 246. Noel, S., Mikulcak, F., Etter, H., Stewart, N., 2015.** Economics of land degradation initiative: report for policy and decision makers: reaping economic and environmental benefits from sustainable land management. ELD Initiative, Bonn;
- 247. Noman, M., Ahmed, T., Ijaz, U., Shahid, M., i in., 2021.** Plant–Microbiome crosstalk: Dawning from composition and assembly of microbial community to improvement of disease resilience in plants. International Journal of Molecular Sciences 22, 13, 6852. DOI:10.3390/ijms22136852;
- 248. Olanrewaju, O.S., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2017.** Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology 33, 197. DOI:10.1007/s11274-017-2364-9;
- 249. Oukala, N., Aissat, K., Pastor, V., 2021.** Bacterial endophytes: the hidden actor in plant immune responses against biotic stress. Plants 10, 5, 1012. DOI:10.3390/plants10051012;
- 250. Orozco-Mosqueda, M., Glick, B.R., Santoyo, G., 2020.** ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): an efficient mechanism to counter salt stress in crops. Microbiological Research 235, 126439. DOI:10.1016/j.micres.2020.126439;
- 251. Orozco-Mosqueda, M., Santoyo, G., 2021.** Plant-microbial endophytes interactions: scrutinizing their beneficial mechanisms from genomic explorations. Current Plant Biology 25, 100189, DOI:10.1016/j.cpb.2020.100189;
- 252. Orozco-Mosqueda, M.D.C., Santoyo, G., Glick, B.R., 2023.** Recent advances in the bacterial phytohormone modulation of plant growth. Plants 12, 3, 606. DOI:10.3390/plants12030606;
- 253. Ortúzar, M., Trujillo, M.E., Román-Ponce, B., Carro, L., 2020.** *Micromonospora* metallophores: a plant growth promotion trait useful for bacterial-assisted phytoremediation? Science of the Total Environment 739, 139850. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.139850;

- 254. Oteino, N., Lally, R.D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., i in., 2015.** Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology* 6, 745. DOI:10.3389/fmicb.2015.00745;
- 255. Özdemir-Koçak, F., Gençbay, T., Topkara, A.R., Çil, E., Işık, K., 2017.** API-ZYM and numerical analysis of 16S rRNA gene identified *Micromonospora* isolates from the Black Sea region. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma* 10, 2, 81–92;
- 256. Palaniappan, P., Chauhan, P.S., Saravanan, V.S., Anandham, R., Sa, T., 2010.** Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biology and Fertility of Soils* 46, 807–816. DOI:10.1007/s00374-010-0485-5;
- 257. Papik, J., Folkmanova, M., Polivkova, M., Suman, J., Uhlik, O., 2020.** The invisible life inside plants: deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity. *Biotechnology Advances* 44, 107614. DOI:10.1016/j.biotechadv.2020.107614;
- 258. Partida-Martínez, L.P., Heil, M., 2011.** The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers in Plant Science* 2, 100. DOI:10.3389/fpls.2011.00100;
- 259. Parker, M.A., 1999.** Relationships of bradyrhizobia from the legumes *Apios americana* and *Desmodium glutinosum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 11, 4914–4920. DOI:10.1128/AEM.65.11.4914-4920.1999;
- 260. Passari, A.K., Mishra, V.K., Singh, B.P., 2018.** Molecular markers used for identification and genomic profiling of plant associated endophytic actinobacteria, w: Singh, B.P., Gupta, V.K., Passari, A.K., (red.), *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: actinobacteria: diversity and biotechnological applications.* Elsevier, 43–65. DOI:10.1016/B978-0-444-63994-3.00003-5;
- 261. Pathak, P., Rai, V.K., Can, H., Singh, S.K., Kumar, D., i in., 2022.** Plant-endophyte interaction during biotic stress management. *Plants* 11, 17, 2203. DOI:10.3390/plants11172203;
- 262. Pattnaik, S., Rajkumari, J., Paramanandham, P., Busi, S., 2017.** Indole acetic acid production and growth-promoting activity of *Methylobacterium extorquens* MP1 and *Methylobacterium zatmanii* MS4 in tomato. *International Journal of Vegetable Science* 23, 4, 321–330. DOI:10.1080/19315260.2017.1283381;

- 263. Paungfoo-Lonhienne, C., Rentsch, D., Robatzek, S., Webb, R.I., Sagulenko, E., i in.,** 2010. Turning the table: plants consume microbes as a source of nutrients. *PLOS One* 5, 7, e11915. DOI:10.1371/journal.pone.0011915;
- 264. Pawlik, M.,** 2018. Rola bakterii endofitycznych w fitoremediacji gleb skażonych związkami ropopochodnymi. Rozprawa doktorska, Uniwersytet Śląski w Katowicach. dostępny: https://rebus.us.edu.pl/bitstream/20.500.12128/6340/1/Pawlik_Rola_bakterii_endofitycznych_w_fitoremediacji_gleb_skazonych_zwiazkami_ropopochodnymi.pdf (dostęp 12.12.2023);
- 265. Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Velázquez, E., Bedmar, E.J.,** 2015. Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34, 1-3, 17–42. DOI:10.1080/07352689.2014.897899;
- 266. Penrose, D.M., Glick, B.R.,** 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum* 118, 1, 10–15. DOI:10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x;
- 267. Pfeiffer, S., Mitter, B., Oswald, A., Schloter-Hai, B., Schloter, M., i in.,** 2017. Rhizosphere microbiomes of potato cultivated in the High Andes show stable and dynamic core microbiomes with different responses to plant development. *FEMS Microbiology Ecology* 93, 2, fiw242. DOI:10.1093/femsec/fiw242;
- 268. Photolo, M.M., Mavumengwana, V., Sitole, L., Tlou, M.G.,** 2020. Antimicrobial and antioxidant properties of a bacterial endophyte, *Methylobacterium radiotolerans* MAMP 4754, isolated from *Combretum erythrophyllum* seeds. *International Journal of Microbiology* 2020, 1–11. DOI:10.1155/2020/9483670;
- 269. Pieterse, C.M., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C., i in.,** 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52, 347–375. DOI:10.1146/annurev-phyto-082712-102340;
- 270. Pirttilä, A.M., Mohammad Parast Tabas, H., Baruah, N., Koskimäki, J.J.,** 2021. Biofertilizers and biocontrol agents for agriculture: how to identify and develop new potent microbial strains and traits. *Microorganisms* 9, 4, 817. DOI:10.3390/microorganisms9040817;
- 271. Pitcher, D.G., Saunders, N.A., Owen, R.J.,** 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate, *Letters in Applied Microbiology* 8, 4, 151–156. DOI:10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x;

- 272. Pinski, A.,** Betekhtin, A., Hupert-Kocurek, K., Mur, L. A., Hasterok, R., 2019. Defining the genetic basis of plant–endophytic bacteria interactions. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 8, 1947. DOI:10.3390/ijms20081947;
- 273. Poonguzhall, S.,** Madhaiyan, M., Sa, T., 2007. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals is wide-spread in Gram-negative *Methylobacterium*. *The Korean Society for Microbiology and Biotechnology* 17, 2, 226–233;
- 274. Poorniammal, R.,** Sundaram, S.P., Kumutha, K., 2009. *In vitro* biocontrol activity of *Methylobacterium extorquens* against fungal pathogens. *International Journal of Plant Protection* 2, 1, 59–62;
- 275. Pouresmaieli, M.,** Ataei, M., Forouzandeh, P., Azizollahi, P., Mahmoudifard, M., 2022. Recent progress on sustainable phytoremediation of heavy metals from soil. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 108482. DOI:10.1016/j.jece.2022.108482;
- 276. Prasad, M.,** Srinivasan, R., Chaudhary, M., Mahawer, S.K., Jat, L.K., 2020. Endophytic bacteria: role in sustainable agriculture, w: Kumar, A., Singh, V.K., (red.), *Microbial endophytes. Prospects for sustainable agriculture*, Woodhead Publishing, 37–60. DOI:10.1016/B978-0-12-818734-0.00003-6;
- 277. Prieto, P.,** Schilirò, E., Maldonado-González, M.M., Valderrama, R., Barroso-Albaracín, J.B., i in., 2011. Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. *Microbial Ecology* 62, 435–445. DOI:10.1007/s00248-011-9827-6;
- 278. Prodhan, M.Y.,** Rahman, M.B., Rahman, A., Akbor, M.A., Ghosh, S., i in., 2023. Characterization of growth-promoting activities of consortia of chlorpyrifos mineralizing endophytic bacteria naturally harboring in rice plants—a potential bio-stimulant to develop a safe and sustainable agriculture. *Microorganisms* 11, 7, 1821. DOI:10.3390/microorganisms11071821;
- 279. Puri, A.,** Padda, K.P., Chanway, C.P., 2020. *In vitro* and *in vivo* analyses of plant-growth-promoting potential of bacteria naturally associated with spruce trees growing on nutrient-poor soils. *Applied Soil Ecology* 149, 103538. DOI:10.1016/j.apsoil.2020.103538;
- 280. Rademaker, J.L.,** Louws, F.J., Versalovic, J., De Bruijn, F.J., 2004. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting, w:

- Kowalchuk, G., de Bruijn, F., Head, I., Akkermans, A., van Elsas, J., (red.), Molecular microbial ecology manual, Springer, Dordrecht, 611–643. DOI:10.1007/978-1-4020-2177-0;
- 281. Radha**, T.K., Rao, D.L.N., Sreeramulu, K.R., 2017. Actinobacteria of arid and semi-arid soils: antagonism to fungal pathogens and plant growth promoting potential. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 11, 1045–1052. DOI:10.22207/JPAM.11.2.47;
- 282. Rahim**, A.A., Ibrahim, N.A., Ishak, F.N., Mean, L.J., Ayub, N.A.M., i in., 2021. Investigation of newly isolated *Methylobacterium* sp. as potential biofertilizer, w: *Earth and Environmental Science* 765, IOP Publishing, 012063. DOI:10.1088/1755-1315/765/1/012063;
- 283. Ramette**, A., Moëgne-Loccoz, Y., Défago, G., 2006. Genetic diversity and biocontrol potential of fluorescent pseudomonads producing phloroglucinols and hydrogen cyanide from Swiss soils naturally suppressive or conducive to *Thielaviopsis basicola*-mediated black root rot of tobacco. *FEMS Microbiology Ecology* 55, 3, 369–381. DOI:10.1111/j.1574-6941.2005.00052.x;
- 284. Raja**, P., Uma, S., Sundaram, S., 2006. Non-nodulating pink-pigmented facultative *Methylobacterium* sp. with a functional *nifH* gene. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22, 1381–1384. DOI:10.1007/s11274-006-9199-0;
- 285. Rana**, K.L., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A., i in., 2021. Bioprospecting of endophytic bacteria from the Indian Himalayas and their role in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Applied Biology and Biotechnology* 9, 34–50. DOI:10.7324/JABB.2021.9306;
- 286. Rana**, K.L., Kour, D., Kaur, T., Negi, R., Devi, R., i in., 2023. Endophytic nitrogen-fixing bacteria: untapped treasurer for agricultural sustainability. *Journal of Applied Biology and Biotechnology* 11, 2, 75–93. DOI:10.7324/JABB.2023.110207;
- 287. Rashid**, S., Charles, T.C., Glick, B.R., 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology* 61, 217–224. DOI:10.1016/j.apsoil.2011.09.011;
- 288. Riesco**, R., Ortúzar, M., Fernández-Ábalos, J.M., Trujillo, M.E., 2022. Deciphering genomes: genetic signatures of plant-associated *Micromonospora*. *Frontiers in Plant Science* 13, 872356. DOI:10.3389/fpls.2022.872356;

- 289. Rodríguez-Higareda, A., Saucedo-Martínez, B.C., Márquez-Benavides, L., Maya-Cortes, C., Rico-Cerda, J., i in., 2019.** Biostimulation of soil impacted by waste residual oil and phytoremediation by phytoremediation by *Phaseolus vulgaris* with *Micromonospora echinospora* and *Streptomyces griseus*. *Journal of the Selva Andina Research Society* 10, 1, 37–44;
- 290. Rumyantsev, S.D., Alekseev, V.Y., Sorokan, A.V., Burkhanova, G.F., Cherepanova, E.A., i in., 2023.** Additive effect of the composition of endophytic bacteria *Bacillus subtilis* on systemic resistance of wheat against greenbug aphid *Schizaphis graminum* due to lipopeptides. *Life* 13, 1, 214. DOI:10.3390/life13010214;
- 291. Rungin, S., Indananda, C., Suttiviriya, P., Kruasuwan, W., Jaemsaeng, R., i in., 2012.** Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (*Oryza sativa* L. Cv. KDML105). *Antonie van Leeuwenhoek* 102, 3, 463–472. DOI:10.1007/s10482-012-9778-z;
- 292. Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J., Dowling, D.N., 2008.** Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* 278, 1, 1–9. DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x;
- 293. Safara, S., Harighi, B., Bahramnejad, B., Ahmadi, S., 2022.** Antibacterial activity of endophytic bacteria against sugar beet root rot agent by volatile organic compound production and induction of systemic resistance. *Frontiers in Microbiology* 13, 921762. DOI:10.3389/fmicb.2022.921762;
- 294. Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B.K., Bhattacharjee, S., i in., 2016.** Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 3984–3999. DOI:10.1007/s11356-015-4294-0;
- 295. Salam, L.B., Obayori, O.S., Raji, S.A., 2015.** Biodegradation of used engine oil by a methylotrophic bacterium, *Methylobacterium mesophilicum* isolated from tropical hydrocarbon-contaminated soil. *Petroleum Science and Technology* 33, 2, 186–195. DOI:10.1080/10916466.2014.961610;
- 296. Santos, M.S., Nogueira, M.A. Hungria, M., 2019.** Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express* 9, 205. DOI:10.1186/s13568-019-0932-0;

- 297. Santoyo, G.,** Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda Mdel, C., Glick, B.R., 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research* 183, 92–99. DOI:10.1016/j.micres.2015.11.008;
- 298. Sasse, J.,** Martinoia, E., Northen, T., 2018. Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends in Plant Science* 23, 1, 25–41. DOI:10.1016/j.tplants.2017.09.003;
- 299. Schwyn, B.,** Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160, 1, 47–56. DOI:10.1016/0003-2697(87)90612-9;
- 300. Sehrawat, A.,** Sindhu, S.S., Glick, B.R., 2022. Hydrogen cyanide production by soil bacteria: biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. *Pedosphere* 32, 1, 15–38. DOI:10.1016/S1002-0160(21)60058-9;
- 301. Sezonov, G.,** Joseleau-Petit, D., d'Ari, R., 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology* 189, 23, 8746–8749. DOI:10.1128/jb.01368-07;
- 302. Shahzad, R.,** Waqas, M., Khan, A.L., Asaf, S., Khan, M.A., i in., 2016. Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry* 106, 236–243. DOI:10.1016/j.plaphy.2016.05.006;
- 303. Sharma, S.B.,** Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, T.A., 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2, 1–14. DOI:10.1186/2193-1801-2-587;
- 304. Sharma, M.,** Saleh, D., Charron, J. B., Jabaji, S., 2020. A crosstalk between *Brachypodium* root exudates, organic acids, and *Bacillus velezensis* B26, a growth promoting bacterium. *Frontiers in Microbiology* 11, 575578. DOI:10.3389/fmicb.2020.575578;
- 305. Sharon, J.,** Hathwaik, L., Glenn, G.M., Imam, S., Lee, C.C., 2016. Isolation of efficient phosphate solubilizing bacteria capable of enhancing tomato plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 16, 2, 525–536. DOI:10.4067/S0718-95162016005000043;
- 306. Sheibani-Tezerji, R.,** Naveed, M., Jehl, M.A., Sessitsch, A., Rattei, T., i in., 2015. The genomes of closely related *Pantoea ananatis* maize seed endophytes having different effects on the host plant differ in secretion system genes and mobile genetic elements. *Frontiers in Microbiology* 6, 440. DOI:10.3389/fmicb.2015.00440;

- 307. Shirling, E.B.,** Gottlieb, D., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 16, 3, 313–340. DOI:10.1099/00207713-16-3-313;
- 308. Shutsrirung, A.,** Chromkaew, Y., Pathom-Aree, W., Choonluchanon, S., Boonkerd, N. 2013. Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity. *Soil Science and Plant Nutrition* 59, 3, 322–330. DOI:10.1080/00380768.2013.776935;
- 309. Siciliano, S.D.,** Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, G., Labelle, S., i in., 2001. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 6, 2469–2475. DOI:10.1128/AEM.67.6.2469-2475.2001;
- 310. da Silva, T.F.,** Vollú, R.E., Jurelevicius, D., Alviano, D.S., Alviano, C.S., i in., 2013. Does the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. (pepper-rosmarin) affect its endophytic microbial community? *BMC Microbiology* 13, 1, 1–14. DOI:10.1186/1471-2180-13-29;
- 311. Silva, M.C.S.,** Polonio, J.C., Quecine, M.C., de Almeida, T.T., Bogas, A.C., i in., 2016. Endophytic cultivable bacterial community obtained from the *Paullinia cupana* seed in Amazonas and Bahia regions and its antagonistic effects against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbial Pathogenesis* 98, 16–22. DOI:10.1016/j.micpath.2016.06.023;
- 312. de Silva, N.I.,** Brooks, S., Lumyong, S., Hyde, K.D., 2019. Use of endophytes as bio-control agents. *Fungal Biology Reviews* 33, 2, 133–148. DOI:10.1016/j.fbr.2018.10.001;
- 313. da Silveira, A.P.,** Iório, R.D.P.F., Marcos, F.C.C., Fernandes, A.O., de Souza, S.A.C.D., i in., 2019. Exploitation of new endophytic bacteria and their ability to promote sugarcane growth and nitrogen nutrition. *Antonie van Leeuwenhoek* 112, 283–295. DOI:10.1007/s10482-018-1157-y;
- 314. Singh, R.K.,** Singh, P., Guo, D.J., Sharma, A., Li, D.P., i in., 2021. Root-derived endophytic diazotrophic bacteria *Pantoea cyripedii* AF1 and *Kosakonia arachidis* EF1 promote nitrogen assimilation and growth in sugarcane. *Frontiers in Microbiology* 12, 774707. DOI:10.3389/fmicb.2021.774707;
- 315. Singh, R.P.,** Ma, Y., Shadan, A., 2022. Perspective of ACC-deaminase producing bacteria in stress agriculture. *Journal of Biotechnology* 352, 36–46. DOI:10.1016/j.jbiotec.2022.05.002;

- 316. Singh, R., Kaur, S., Bhullar, S.S., Singh, H., Sharma, L.K., 2024.** Bacterial biostimulants for climate smart agriculture practices: mode of action, effect on plant growth and roadmap for commercial products. *Journal of Sustainable Agriculture and Environment* 3, 1, e12085. DOI:10.1002/sae2.12085;
- 317. Sinma, K., Nurak, T., Khucharoenphaisan, K., 2015.** Potentiality of endophytic actinomycetes isolated from sugar cane. *KMITL Science and Technology Journal* 15, 2, 88–97;
- 318. Solans, M., 2007.** *Discaria trinervis*–*Frankia* symbiosis promotion by saprophytic actinomycetes. *Journal of Basic Microbiology* 47, 3, 243–250. DOI:10.1002/jobm.200610244;
- 319. Songsumanus, A., Tanasupawat, S., Igarashi, Y., Kudo, T., 2013.** *Micromonospora maritima* sp. nov., isolated from mangrove soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, Pt_2, 554–559. DOI:10.1099/ijs.0.039180-0;
- 320. Spadaro, D., Droby, S., 2016.** Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology* 47, 39–49. DOI:10.1016/j.tifs.2015.11.003;
- 321. Srebot, M.S., Ripa, M.B., Gallozo, J.A., Bettucci, G.R., Ferretti, M.D., i in., 2023.** *Gluconacetobacter diazotrophicus* triggers ISR involving SA and JA/Et defense-related pathways to respond against *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis* and optimizes the cellular redox state maintaining reduced FITNESS levels. manuskrypt w wersji „preprint”. DOI:10.21203/rs.3.rs-3225540/v1;
- 322. Sriwati, R., Maulidia, V., Intan, N., Oktarina, H., Khairan, i in., 2023.** Endophytic bacteria as biological agents to control fusarium wilt disease and promote tomato plant growth. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 125, 101994. DOI:10.1016/j.pmpp.2023.101994;
- 323. Stanis, A., 2006.** Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny. Statystyki podstawowe. StatSoft, Kraków;
- 324. Stępniewska, Z., Kuźniar, A., 2013.** Endophytic microorganisms—promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 9589–9596. DOI:10.1007/s00253-013-5235-9;
- 325. Sun, W., Peng, C., Zhao, Y., Li, Z., 2012.** Functional gene-guided discovery of type II polyketides from culturable actinomycetes associated with soft coral *Scleronephthya* sp. *PLOS One* 7, 8, e42847. DOI:10.1371/journal.pone.0042847;

- 326. Sun, P.,** Huang, Y., Chen, S., Ma, X., Yang, Z., i in., 2023. Indole derivatives as agrochemicals: an overview. *Chinese Chemical Letters*, 109005. DOI:10.1016/j.ccllet.2023.109005;
- 327. Syed Ab Rahman, S.,** Singh, E., Pietersen, C., Schenck, P., 2018. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science* 267, 102–111. DOI:10.1016/j.plantsci.2017.11.012;
- 328. Talukdar, M.,** Duarah, A., Talukdar, S., Gohain, M.B., Debnath, R., i in., 2012. Bio-prospecting *Micromonospora* from Kaziranga National Park of India and their anti-infective potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 2703–2712. DOI:10.1007/s11274-012-1080-8;
- 329. Tamura, K.,** 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9, 678–687. DOI:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752;
- 330. Tanasupawat, S.,** Jongrungruangchok, S., Kudo, T., 2010. *Micromonospora marina* sp. nov., isolated from sea sand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 3, 648–652. DOI:10.1099/ijs.0.014068-0;
- 331. Tang, A.,** Haruna, A.O., Majid, N.M.A., Jalloh, M.B., 2020. Potential PGPR properties of cellulolytic, nitrogen-fixing, phosphate-solubilizing bacteria in rehabilitated tropical forest soil. *Microorganisms* 8, 3, 442. DOI:10.3390/microorganisms8030442;
- 332. Tani, A.,** Sahin, N., Matsuyama, Y., Enomoto, T., Nishimura, N., i in., 2012. High-throughput identification and screening of novel *Methylobacterium* species using whole-cell MALDI-TOF/MS analysis. *PLOS One* 7, 7, e40784. DOI:10.1371/journal.pone.0040784;
- 333. Tashi-Oshnoei, F.,** Harighi, B., Abdollahzadeh, J., 2017. Isolation and identification of endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol potential from oak trees. *Forest Pathology* 47, 5, e12360. DOI:10.1111/efp.12360;
- 334. Taulé, C.,** Vaz-Jauri, P., Battistoni, F., 2021. Insights into the early stages of plant–endophytic bacteria interaction. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37, 13. DOI:10.1007/s11274-020-02966-4;
- 335. Terakado-Tonooka, J.,** Ohwaki, Y., Yamakawa, H., Tanaka, F., Yoneyama, T., i in., 2008. Expressed *nifH* genes of endophytic bacteria detected in field-grown sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.). *Microbes and Environments* 23, 1, 89–93. DOI:10.1264/jsme2.23.89;

- 336. Thakur, N., Kaur, S., Tomar, P., Thakur, S., Yadav, A.N., 2020.** Microbial biopesticides: current status and advancement for sustainable agriculture and environment, w: Rastegari, A.A., Yadav, N., Yadav, A.N., (red.), *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*, Elsevier, 243–282. DOI:10.1016/B978-0-12-820526-6.00016-6;
- 337. Thanaboripat, D., Thawai, C., Kittiwongwattana, C., Laosinwattana, C., Koohakan, P., i in., 2015.** *Micromonospora endophytica* sp. nov., an endophytic actinobacteria of Thai upland rice (*Oryza sativa*). *The Journal of Antibiotics* 68, 11, 680–684. DOI:10.1038/ja.2015.57;
- 338. Thawai, C., Tanasupawat, S., Kudo, T., 2019.** *Micromonospora caldifontis* sp. nov., isolated from hot spring soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69, 5, 1336–1342. DOI:10.1099/ijsem.0.003321;
- 339. Tian, L., Lin, X., Tian, J., Ji, L., Chen, Y., i in., 2020.** Research advances of beneficial microbiota associated with crop plants. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 5, 1792. DOI:10.3390/ijms21051792;
- 340. Tian, Q., Gong, Y., Liu, S., Ji, M., Tang, R., i in., 2023.** Endophytic bacterial communities in wild rice (*Oryza officinalis*) and their plant growth-promoting effects on perennial rice. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1184489. DOI:10.3389/fpls.2023.1184489;
- 341. Tirandaz, H., Shaeyan, M., Ghanbarpour, S., Seyedipour, N., Ziaedini, A., i in., 2019.** The succession of dominant culturable hydrocarbon-utilizing bacteria during bioremediation of oil-based drilling waste. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 38, 5, 267–277;
- 342. Tistechok, S., Skvortsova, M., Mytsyk, Y., Fedorenko, V., Parnikoza, I., i in., 2021.** The diversity and antibacterial activity of culturable actinobacteria isolated from the rhizosphere soil of *Deschampsia antarctica* (Galindez Island, Maritime Antarctic). *Polar Biology* 44, 9, 1859–1868. DOI:10.1007/s00300-021-02924-2;
- 343. Tiwari, P., Kang, S., Bae, H., 2023.** Plant-endophyte associations: rich yet under-explored sources of novel bioactive molecules and applications. *Microbiological Research* 266, 127241. DOI:10.1016/j.micres.2022.127241;
- 344. Tomassi-Morawiec, H., Pasieczna, A., Markowski, W., 2016.** Metale w glebach dzielnicy Włochy m. st. Warszawy. *Przegląd geologiczny* 64, 3;

- 345. Torres Vera, R.,** Bernabé García, A.J., Carmona Álvarez, F.J., Martínez Ruiz, J., Fernández Martín, F., 2023. Application and effectiveness of *Methylobacterium symbioticum* as a biological inoculant in maize and strawberry crops. *Folia Microbiologica* 69, 121–131. DOI:10.1007/s12223-023-01078-4;
- 346. Trotsenko, Y.A.,** Doronina, N.V., Li, T.D., Reshetnikov, A.S., 2007. Moderately haloalkaliphilic aerobic methylobacteria. *Microbiology* 76, 253–265. DOI:10.1134/S0026261707030010;
- 347. Trujillo, M.E.,** Fernández-Molinero, C., Velázquez, E., Kroppenstedt, R.M., Schumann, P., i in., 2005. *Micromonospora mirobrigensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 877–880. DOI:10.1099/ijs.0.63361-0;
- 348. Trujillo, M.E.,** Alonso-Vega, P., Rodríguez, R., Carro, L., Cerda, E., i in., 2010. The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *The ISME Journal* 4, 10, 1265–1281. DOI:10.1038/ismej.2010.55;
- 349. Trujillo, M.E.,** Riesco, R., Benito, P., Carro, L., 2015. Endophytic actinobacteria and the interaction of *Micromonospora* and nitrogen fixing plants. *Frontiers in Microbiology* 6, 1341. DOI:10.3389/fmicb.2015.01341;
- 350. Tsagakari, E.,** Keating, C., Couto, J.M., Sloan, W.T., 2017. A keystone *Methylobacterium* strain in biofilm formation in drinking water. *Water* 9, 10, 778. DOI:10.3390/w9100778;
- 351. Tsagakari, E.,** Sloan, W.T., 2018. The role of the motility of *Methylobacterium* in bacterial interactions in drinking water. *Water* 10, 10, 1386. DOI:10.3390/w10101386;
- 352. Ullah, A.,** Nisar, M., Ali, H., Hazrat, A., Hayat, K., i in., 2019. Drought tolerance improvement in plants: an endophytic bacterial approach. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 7385–7397. DOI:10.1007/s00253-019-10045-4;
- 353. Usmanova, A.D.,** Ignatova, L.V., Omirbekova, A.A., Brazhnikova, Y.V., Egamberdieva, D.R., i in., 2021. Diversity of endophytic microorganisms of plants of Kazakhstan and their biological features. *Eurasian Journal of Ecology* 69, 4, 73–80. DOI:10.26577/EJE.2021.v69.i4.08;

- 354. Valdés, M., Pérez, N-O., Estrada-de los Santos, P., Caballero-Mellado, J., PeñaCabria-les, J.J., i in., 2005.** Non-*Frankia* actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Applied & Environmental Microbiology* 71, 460e466. DOI:10.1128/AEM.71.1.460-466.2005;
- 355. Van Aken, B., Tehrani, R., Schnoor, J.L., 2011.** Endophyte-assisted phytoremediation of explosives in poplar trees by *Methylobacterium populi* BJ001 T, w: Pirttilä, A., Frank, A. (red.), Endophytes of forest trees. *Forestry Sciences* 80, Springer, Dordrecht, 217–234. DOI:10.1007/978-94-007-1599-8_14;
- 356. Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., Dufresne, A., 2015.** The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist* 206, 1196–1206. DOI:10.1111/nph.13312;
- 357. Vanderstraeten, L., Depaepe, T., Bertrand, S., Van Der Straeten, D., 2019.** The ethylene precursor ACC affects early vegetative development independently of ethylene signaling. *Frontiers in Plant Science* 10, 1591. DOI:10.3389/fpls.2019.01591;
- 358. Vannucchi, F., Imperato, V., Saran, A., Staykov, S., D’Haen, J., i in., 2021.** Inoculated seed endophytes modify the poplar responses to trace elements in polluted soil. *Agronomy* 11, 10, 1987. DOI:10.3390/agronomy11101987;
- 359. Vargas-Bautista, C., Rahlwes, K., Straight, P., 2014.** Bacterial competition reveals differential regulation of the *pks* genes by *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 196, 4, 717–728. DOI:10.1128/jb.01022-13;
- 360. Verma, S.K., Kingsley, K., Irizarry, I., Bergen, M., Kharwar, R.N., i in., 2017.** Seed-vectored endophytic bacteria modulate development of rice seedlings. *Journal of Applied Microbiology* 122, 6, 1680–1691. DOI:10.1111/jam.13463;
- 361. Verma, S.K., Sahu, P.K., Kumar, K., Pal, G., Gond, S.K., i in., 2021.** Endophyte roles in nutrient acquisition, root system architecture development and oxidative stress tolerance. *Journal of Applied Microbiology* 131, 2161–2177. DOI:10.1111/jam.15111;
- 362. Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., Lupski, J.R., 1994.** Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 25–40;

- 363. Větrovský, T., Steffen, K.T., Baldrian, P., 2014.** Potential of cometabolic transformation of polysaccharides and lignin in lignocellulose by soil *Actinobacteria*. *PLOS One* 9, 2, e89108. DOI:10.1371/journal.pone.0089108;
- 364. Vincent, J.M., 1970.** A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biological Programme, Blackwell Scientific Publications, Oxford;
- 365. Waghmode, T.R., Kurade, M.B., Kabra, A.N., Govindwar, S.P., 2012.** Degradation of remazol red dye by *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 leading to increased iron uptake in *Sorghum vulgare* and *Phaseolus mungo* from soil. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17, 117–126. DOI:10.1007/s12257-011-0307-0;
- 366. Wallace, M., Cummings, J.D.A., Roberts, A.G., Puri, A.W., 2024.** A widespread methylotroph acyl-homoserine lactone synthase produces a new quorum sensing signal that regulates swarming in *Methylobacterium fujisawaense*. *Mbio* 15, 1, e01999-23. DOI:10.1128/mbio.01999-23;
- 367. Wani, Z.A., Ashraf, N., Mohiuddin, T., Riyaz-Ul-Hassan S., 2015.** Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 2955–2965. DOI:10.1007/s00253-015-6487-3;
- 368. Weyens, N., Truyens, S., Dupae, J., Newman, L., Taghavi, S., i in., 2010.** Potential of the TCE-degrading endophyte *Pseudomonas putida* W619-TCE to improve plant growth and reduce TCE phytotoxicity and evapotranspiration in poplar cuttings. *Environmental Pollution* 158, 9, 2915–2919. DOI:10.1016/j.envpol.2010.06.004;
- 369. White, J.F., Kingsley, K.L., Verma, S.K., Kowalski, K.P., 2018.** Rhizophagy cycle: an oxidative process in plants for nutrient extraction from symbiotic microbes. *Microorganisms* 6, 3, 95. DOI:10.3390/microorganisms6030095;
- 370. Whittenbury, R., Davies, S.L., Wilkinson, J.F., 1970.** Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *Journal of General Microbiology* 61, 205–218;
- 371. Woźniak, M., Gałazka, A., Grządziel, J., Głodowska, M., 2018.** The identification and genetic diversity of endophytic bacteria isolated from selected crops. *The Journal of Agricultural Science* 156, 4, 547–556. DOI:10.1017/S0021859618000618;

- 372. Woźniak, M.,** Gałazka, A., Tyśkiewicz, R., Jaroszuk-Ściseł, J., 2019. Endophytic bacteria potentially promote plant growth by synthesizing different metabolites and their phenotypic/physiological profiles in the Biolog GEN III MicroPlate™ Test. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 21, 5283. DOI:10.3390/ijms20215283;
- 373. Wu, C.H.,** Bernard, S.M., Andersen, G.L., Chen, W., 2009. Developing microbe–plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. *Microbial Biotechnology* 2, 4, 428–440. DOI:10.1111/j.1751-7915.2009.00109.x;
- 374. Wu, Q.,** Bell, B.A., Yan, J.X., Chevrette, M.G., Brittin, N.J., i in., 2022. Metabolomics and genomics enable the discovery of a new class of nonribosomal peptidic metallophores from a marine *Micromonospora*. *Journal of the American Chemical Society* 145, 1, 58–69. DOI:10.1021/jacs.2c06410;
- 375. Velázquez-Medina, A.,** De la Cruz, J.L.I., Sánchez-Yáñez, J.M., 2022. *Bacillus thuringiensis* and *Micromonospora echinospora* ongrowth of *Phaseolus vulgaris*. *Horticulture International Journal* 6, 2, 89–93. DOI:10.15406/hij.2022.06.00247;
- 376. Xu, F.F.,** Morohoshi, T., Wang, W.Z., Yamaguchi, Y., Liang, Y., i in., 2014. Evaluation of intraspecies interactions in biofilm formation by *Methylobacterium* species isolated from pink-pigmented household biofilms. *Microbes and Environments* 29, 4, 388–392. DOI:10.1264/jsme2.ME14038;
- 377. Yadav, R.,** 2022. Biopesticides: Current status and future prospects. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences* 12, 3, 211;
- 378. Yano, T.,** Kubota, H., Hanai, J., Hitomi, J., Tokuda, H., 2013. Stress tolerance of *Methylobacterium* biofilms in bathrooms. *Microbes and Environments* 28, 1, 87–95. DOI:10.1264/jsme2.ME12146;
- 379. Yarza, P.,** Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., i in., 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* 12, 9, 635–645. DOI 10.1038/nrmicro3330;
- 380. Yates, R.J.,** Howieson, J.G., Reeve, W.G., Nandasena, K.G., Law, I.J., i in., 2007. *Lotononis angolensis* forms nitrogen fixing, lupinoid nodules with phylogenetically unique, fast-growing, pink-pigmented bacteria, which do not nodulate *L. bainesii* or *L. listii*. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 7, 1680–1688. DOI:10.1016/j.soilbio.2007.01.025;

- 381. Ye, S., Kim, J.W., Kim, S.R., 2019.** Metabolic engineering for improved fermentation of L-arabinose. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 29, 3, 339–346. DOI:10.4014/jmb.1812.12015;
- 382. Ye, J.J., Zou, R.J., Zhou, D.D., Deng, X.L., Wu, N.L., i in., 2023.** Insights into the phylogenetic diversity, biological activities, and biosynthetic potential of mangrove rhizosphere *Actinobacteria* from Hainan Island. *Frontiers in Microbiology* 14, 1157601. DOI:10.3389/fmicb.2023.1157601;
- 383. Yim, W., Seshadri, S., Kim, K., Lee, G., Sa, T., 2013.** Ethylene emission and PR protein synthesis in ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. inoculated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) challenged with *Ralstonia solanacearum* under greenhouse conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 67, 95–104. DOI:10.1016/j.plaphy.2013.03.002;
- 384. Yu, Q., Powles, S., 2014.** Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production. *Plant Physiology* 166, 3, 1106–1118. DOI:10.1104/pp.114.242750;
- 385. Zhang, X., Davidson, E.A., Mauzerall, D.L., Searchinger, T.D., Dumas, P., Shen, Y., 2015.** Managing nitrogen for sustainable development. *Nature* 528, 7580, 51–59. DOI:10.1038/nature15743;
- 386. Zhang, H., Li, Q., Zhao, Y., Zhang, M., Xu, D., i in., 2020.** Endoglucanase activity of cellulolytic bacteria from lake sediments and its application in hydrophyte degradation. *FEMS Microbiology Letters* 367, 24, fnaa200. DOI:10.1093/femsle/fnaa200;
- 387. Zhao, K., Pentinen, P., Guan, T., Xiao, J., Chen, Q., i in., 2011.** The diversity and antimicrobial activity of endophytic isolated from medicinal plants in Panxi Plateau, China. *Current Microbiology* 62, 182–190;
- 388. Zhour, H., Bray, F., Dandache, I., Marti, G., Flament, S., i in., 2022.** Wild wheat rhizosphere-associated plant growth-promoting bacteria exudates: effect on root development in modern wheat and composition. *International Journal of Molecular Sciences* 3, 23, 15248. DOI:10.3390/ijms232315248;
- 389. Zúñiga, A., Poupin, M.J., Donoso, R., Ledger, T., Guiliani, N., i in., 2013.** *Quorum sensing* and indole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth

promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26, 5, 546–553. DOI:10.1094/MPMI-10-12-0241-R;

Umieszczone w niniejszej rozprawie fotografie i ryciny pochodzą z archiwum autora

8. ANEKS

EDUKACJA

- 2019-2024** **Nauka w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych**
Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie
Katedra Genetyki i Mikrobiologii
Dziedzina: nauk ścisłych i przyrodniczych
Dyscyplina: nauki biologiczne
Tytuł przygotowywanej rozprawy doktorskiej:
„Ocena zdolności endofitów bakteryjnych z rodzajów *Methylobacterium*
i *Micromonospora* do realizacji mechanizmów promujących wzrost roślin
in vitro oraz *in planta*”
- 2019** **Uzyskanie tytułu magistra w zakresie ochrony roślin**
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Katedra Ochrony Roślin
Kierunek studiów: Ochrona Roślin i Kontrola Fitosanitarna (stacjonarne)
Tytuł pracy magisterskiej:
„Wpływ plazmy niskotemperaturowej na zdrowotność i ukorzenianie
się sadzonek półzdrewniałych rozmarynu lekarskiego
(*Rosmarinus officinalis* L.)”
- 2018** **Uzyskanie tytułu inżyniera w zakresie ogrodnictwa**
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Katedra Ochrony Roślin
Kierunek studiów: Ogródnictwo (stacjonarne)
Tytuł pracy inżynierskiej:
„Projekt ochrony derenia (*Cornus* sp.) w terenie zurbanizowanym”
- 2012** **Ukończenie nauki w II LO im. Stanisława Staszica w Starachowicach**
Profil biologiczno-chemiczno-fizyczny

ZAINTERESOWANIA NAUKOWE

- biologiczne metody ochrony roślin;
- wykorzystanie mikroorganizmów w szeroko pojętej ochronie roślin;
- bioremediacja terenów zanieczyszczonych oraz fitoremediacja wspomagana mikroorganizmami;
- wykorzystywanie właściwości biochemicznych bakterii w przemyśle;
- zastosowanie biopestycydów, biopreparatów i bionawozów.

PUBLIKACJE

1. Karaś, M.A., Wdowiak-Wróbel, S., Sokołowski, W., 2021. **Selection of endophytic strains for enhanced bacteria-assisted phytoremediation of organic pollutants posing a public health Hazard.** International Journal of Molecular Sciences 22, 9557. DOI:10.3390/ijms22179557.

IF2021 = 6,208; punkty MNiSW2021 = 140;

2. Kopacki, M., Skwaryło-Bednarz, B., Jamiołkowska, A., Matsiakh, I., Sokołowski, W., 2021. **Przegląd gatunków derenia ze szczególnym uwzględnieniem jego agrofagów i ochrony w miejskich terenach zieleni.** Aura 2021, 1, s. 14-19. DOI:10.15199/2.2021.1.2. IF2021 = brak danych; punkty MNiSW2021 = 5;

3. Kowalczyk, B., Sokołowski, W., Włodarczyk, K., Palusińska-Szys, M., 2021. **Lipidy jako cenne markery chemotaksonomiczne fitopatogennych grzybów z rodzaju *Puccinia*.** W: M. Babicz, B. Nowakowicz-Dębek (red.), **Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa**, Lublin, Wydawnictwo UP Lublin, s. 71-76. DOI:10.24326/mon.2021.10.

IF2021 = brak danych; punkty MNiSW2021 = 20;

4. Sokołowski, W., Kowalczyk, B., Włodarczyk, K., Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., 2021. **Możliwości wykorzystania bakterii z rodzaju *Methylobacterium* w zrównoważonej uprawie roślin.** W: M. Babicz, B. Nowakowicz-Dębek (red.), **Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa**, Lublin, Wydawnictwo UP Lublin, s. 116-121. DOI:10.24326/mon.2021.10.

IF2021 = brak danych; punkty MNiSW2021 = 20;

5. Włodarczyk, K., Sokołowski, W., Kowalczyk, B., 2021. **Rizobiowe czynniki Nod i ich interakcje z roślinnymi mechanizmami obronnymi**. W: M. Babicz, B. Nowakowicz-Dębek (red.), **Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa**, Lublin, Wydawnictwo UP Lublin, s. 122-128. DOI:10.24326/mon.2021.10.

IF2021 = brak danych; punkty MNiSW2021 = 20;

6. Karaś, M.A., Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., Sokołowski, W., Melianchuk, K., Komaniecka, I., 2023. **Assessment of phenanthrene degradation potential by plant growth-promoting endophytic strain *Pseudomonas chlororaphis* 23aP isolated from *Chamaecytisus albus* (Hack.) Rothm.** *Molecules* 28, 22, 7581. DOI:10.3390/molecules28227581.

IF2022 = 4,6; punkty MNiSW2023 = 140;

7. Wdowiak-Wróbel, S., Kalita, M., Palusińska-Szyszk, M., Marek-Kozaczuk, M., Sokołowski, W., Coutinho, T.A., 2023. ***Pantoea trifolii* sp. nov., a novel bacterium isolated from a *Trifolium rubens* root nodule**. *Scientific reports* 14, 1, 2698. DOI:10.1038/s41598-024-53200-2.

IF2022 = 4,6; punkty MNiSW2023 = 140.

UCZESTNICTWO W KONFERENCJACH NAUKOWYCH

Krajowe:

1. I Interdyscyplinarna Konferencja Doktorantów Nauk Biologicznych „BIO-IDEA”.
Referat: Sokołowski, W., 2020. **Czy warto badać endofity roślinne? Czyli o wykorzystaniu naturalnego potencjału bakterii endofitycznych w promowaniu wzrostu i ochronie roślin.**
2. II Interdyscyplinarna Konferencja Doktorantów Nauk Biologicznych „BIO-IDEA”.
Referat: Sokołowski W., 2021. **Ocena zdolności endofitów bakteryjnych soi warzywnej (*Glycine max* L.) do promowania wzrostu i rozwoju roślin *in vivo*.**
3. XIII Konferencja Naukowa TYGIEL „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”.
Plakat naukowy: Sokołowski, W., Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., Włodarczyk, K., 2021. **Polimorfizm genomowy endofitów bakteryjnych wyizolowanych z brodawek korzeniowych koniczyny białej (*Trifolium repens* L.), określony metodą BOX-PCR.**

4. XIII Konferencja Naukowa TYGIEL „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”.
Referat: Włodarczyk, K., Wielbo, J., Marek-Kozaczuk, M., Wdowiak-Wróbel, S., Sokołowski, W., 2021. **Fenotypowa charakterystyka endosymbiontów szczodrzeńca zmiennego *Chamaecytisus albus*.**
5. Ogólnopolska Konferencja Doktorantów „Środowisko-Roślina-Zwierzę-Produkt”.
Referat: Sokołowski, W., Kowalczyk, B., Włodarczyk, K., Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., 2021. **Endofity bakteryjne koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) – ocena wybranych właściwości promujących wzrost i rozwój roślin.**
6. Ogólnopolska Konferencja Doktorantów „Środowisko-Roślina-Zwierzę-Produkt”.
Referat: Kowalczyk, B., Sokołowski, W., Włodarczyk, K., Palusińska-Szys, M., 2021. **Znaczenie składników lipidowych teliospor *Puccinia glechomatis* i *P. malvacearum* w inwazji roślinnego gospodarza.**
7. Ogólnopolska Konferencja Doktorantów „Środowisko-Roślina-Zwierzę-Produkt”.
Referat: Włodarczyk, K., Wielbo, J., Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., Sokołowski, W., Kowalczyk, B., 2021. **Charakterystyka metaboliczna endosymbiontów szczodrzeńca zmiennego (*Chamaecytisus albus*).**
8. Konferencja „Metagenomy różnych środowisk”.
Plakat naukowy: Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., Kalita, M., Karaś, M., Sokołowski, W., Śrutwa, P., 2021. **Pozycja taksonomiczna bakterii endofitycznych pochodzących z soi (*Glycine max*).**
9. Konferencja „Metagenomy różnych środowisk”.
Plakat naukowy: Wdowiak-Wróbel, S., Karaś, M., Marek-Kozaczuk, M., Kalita, M., Wielgus, A., Sokołowski W., 2021. **Porównanie potencjału biodegradacyjnego endofitycznych izolatów z rodzaju *Pseudomonas* pozyskanych z terenów Polski i RPA.**
10. Konferencja Mikrobiologiczna „Mikroorganizmy Różnych Środowisk”.
Plakat naukowy: Kalita, M., Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., Sokołowski, W., 2021. **Identyfikacja hodowlanej frakcji mikrobiomu brodawek korzeniowych *Trifolium rubens*.**

11. Konferencja Mikrobiologiczna „Mikroorganizmy Różnych Środowisk”.

Plakat naukowy: Pastuszka, A., Komaniecka, I., Sokołowski, W., Wdowiak-Wróbel, S., Choma, A., 2021. **Wstępne badania lipopolisacharydów bakterii metylotroficznych izolowanych z różnych gatunków roślin.**

12. Konferencja „Metagenomy Różnych Środowisk”.

Plakat naukowy: Kalita, M., Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., Sokołowski, W., Di Iorio, E., De Castro, O., Manzo, E., 2022. **Analiza filogenetyczna endofitycznych promieniowców z rodzaju *Micromonospora* wyizolowanych z brodawek korzeniowych jawnowca barwierskiego (*Genista tinctoria*) rosnącego w południowych Włoszech.**

13. Konferencja „Metagenomy Różnych Środowisk”.

Plakat naukowy: Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., Karaś, M., Kalita, M., Sokołowski, W., 2022. **Analiza filogenetyczna endofitycznych szczepów rodzaju *Pseudomonas*, wyizolowanych z brodawek korzeniowych *Chamaecytisus albus*.**

14. XXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

Plakat naukowy: Horbowicz, A., Marczak, M., Marek-Kozaczuk, M., Wdowiak-Wróbel, S., Koper, P., Kalita, M., Sokołowski, W., Stańczuk, D., 2022. **Identyfikacja i charakterystyka rizo biofagowej depolimerazy egzopolisacharydu.**

15. XXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

Plakat naukowy: Marczak, M., Marek-Kozaczuk, M., Koper, P., Sokołowski, W., Wdowiak-Wróbel, S., Horbowicz, A., Kalita, M., Stańczuk, D., 2022. **Identyfikacja i charakterystyka fagów specyficznych dla *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.**

16. Warsztaty naukowe „Preparaty mikrobiologiczne w rolnictwie i ochronie środowiska”.

Udział bierny.

Międzynarodowe:

1. XVI International Scientific Conference „YOUTH AND PROGRESS OF BIOLOGY”.

Plakat naukowy: Sokołowski, W., Włodarczyk, K., Kowalczyk, B., 2020. **Biodiversity appraisal of *Methylobacterium* strains isolated from root nodules of *Fabaceae* plants with the REP-PCR method.**

2. XVI International Scientific Conference „YOUTH AND PROGRESS OF BIOLOGY”.
Plakat naukowy: Włodarczyk, K., Sokołowski, W., 2020. **Studying the genomic diversity of *Chamaecytisus albus* endophytes using BOX-PCR technique.**
3. XVII International Scientific Conference „YOUTH AND PROGRESS OF BIOLOGY”.
Referat: Sokołowski, W., Włodarczyk, K., Kowalczyk, B., Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., 2021. **Biochemical characterisation of endophytic *Methylobacterium* strains isolate from root nodules of leguminous plants.**
4. XVII International Scientific Conference „YOUTH AND PROGRESS OF BIOLOGY”.
Referat: Włodarczyk, K., Sokołowski, W., Kowalczyk B., 2021. **Studying the genetic diversity of *Chamaecytisus albus* endophytes.**
5. International Conference „Bioprotection-Global Plant Health and Product Safety”.
Plakat naukowy: Sokołowski, W., Karaś, M., Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., Kalita, M., Włodarczyk, W., 2021. **Suppression of phytopathogenic fungi by *Pseudomonas* spp. strains.**
6. VII International Plant Science Conference.
Plakat naukowy: Di Iorio, E., De Castro, O., Manzo, E., Marek-Kozaczuk, M., Sokołowski, W., Wdowiak-Wróbel, S., Kalita, M., 2021. **Microbiological characterization of the root nodules of *Genista tinctoria* of the Mefite of the Ansanto Valley (southern Italy).**
7. International Phd Student's Conference „Environment-Plant-Animal-Product”.
Referat: Sokołowski, W., Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., Kalita, M., Kowalczyk, B., 2022. **Potential role of endophytic *Methylobacterium* strains in heavy metal phytoremediation.**

INNE AKTYWNOŚCI NAUKOWE

- Członkostwo w lubelskim oddziale Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego, ogólnopolskiej organizacji zrzeszającej osoby pracujące na polu ochrony roślin;
- Uczestnictwo w wewnętrznym projekcie badawczym pt.: „**Charakterystyka bakteriofagów ryzobiowych drogą do poszukiwania nowych, biotechnologicznie użytecznych białek**”. Numer wewnętrzny projektu ZB/2021/1;

- Współwnioskodawca w złożonym projekcie badawczym w konkursie OPUS: „**Badania skryningowe i eksploracja genomów endofitycznych izolatów z rodzaju *Micromonospora* - poszukiwanie biologicznych czynników aktywnych**” Nr rej. wniosku 2021/41/B/NZ9/00763, (nie otrzymano dofinansowania);
- Wnioskodawca o dofinansowanie w konkursie na projekty badawcze dla młodych naukowców Instytutu Nauk Biologicznych UMCS w Lublinie: tytuł projektu: „**Endofity bakteryjne z rodzaju *Pseudomonas* – analiza potencjalnych mechanizmów promocji wzrostu i rozwoju roślin oraz wstępna ocena możliwości ich wykorzystania w praktyce rolnictwa zrównoważonego**”, (nie otrzymano dofinansowania).

DZIAŁALNOŚĆ POPULARNONAUKOWA

- Współautorstwo w projektach realizowanych w ramach Lubelskiego Festiwalu Nauki 2021 i 2022: „**Sprzymierzeńcy czy wrogowie? – rzecz o skomplikowanych relacjach człowieka z grzybami i bakteriami**” oraz „**Allies or enemies? – complicated relationships of man with fungi and bacteria**”;
- Autorstwo projektu realizowanego w ramach Lubelskiego Festiwalu Nauki 2022: „**Jak chorują drzewa**”;
- Autorstwo artykułów popularnonaukowych:
 1. Sokołowski, W., 2021. **Co „gryzie” truskawki?** Działkowiec, 5 (849), s. 56-57.
 2. Sokołowski, W., 2021. **Czego nie lubią ślimaki?** Działkowiec, 7 (851), s. 57.
 3. Sokołowski, W., 2021. **Grzyby z ogródka.** Działkowiec, 7 (851), s. 48-49.
 4. Sokołowski, W., 2021. **Mikoryza.** Działkowiec, 9 (853), s. 65-66.
 5. Sokołowski, W., 2021. **Wykwity i pleśnie.** Działkowiec, 12 (856), s. 67-68.
 6. Sokołowski, W., 2021. **Harmonia współlistnienia.** Działkowiec, 12 (856), s. 68-69.
 7. Sokołowski, W., 2022. **Wczesnowiosenna ochrona owocowych.** Działkowiec, 1 (857), s. 56-57.
 8. Sokołowski, W., 2022. **Rany na drzewach.** Działkowiec, 2 (858), s. 53.
 9. Sokołowski, W., 2022. **Ochrona jakości wód.** Działkowiec, 5 (861), s. 69-70.
 10. Sokołowski, W., 2022. **Deformacje liści.** Działkowiec, 7 (863), s. 68-69.
 11. Sokołowski, W., 2022. **Porosty w ogródku.** Mój Ogródek, 7 (100), s. 60.
 12. Sokołowski, W., 2023. **Wybieramy podłoża.** Działkowiec, 2 (870), s. 69-70.
 13. Sokołowski, W., 2023. **Zaprawy nasienne.** Działkowiec, 3 (871), s. 55.

14. Sokołowski, W., 2023. **Ważne zmianowanie**. Działkowiec, 4 (872), s. 67-68.
15. Sokołowski, W., 2023. **Przyczyny więdnienia roślin**. Działkowiec, 8 (876), s. 65-66.
16. Sokołowski, W., 2023. **Rośliny na mulcz**. Działkowiec, 9 (877), s. 70.

NAGRODY I WYRÓŻNIENIA

- Nagroda za wyróżniającą się pracę inżynierską „Projekt ochrony derenia (*Cornus* sp.) w terenie zurbanizowanym” (2018);
- Nagroda Rektora dla wyróżniającego się absolwenta studiów inżynierskich, otrzymana „za wybitne osiągnięcia w nauce” (2018);
- Nagroda za wyróżniającą się pracę magisterską: „Wpływ plazmy niskotemperaturowej na zdrowotność i ukorzenianie się sadzonek półzdrewniałych rozmarynu lekarskiego (*Rosmarinus officinalis* L.)” (2019);
- Nagroda Rektora dla wyróżniającego się absolwenta studiów magisterskich, otrzymana „za wybitne osiągnięcia w nauce (2019)”.

UMIEJĘTNOŚCI SPECJALISTYCZNE

- **Praca w laboratorium mikrobiologicznym:**
 - pozyskiwanie czystych kultur bakterii z różnych środowisk;
 - analiza zdolności bakterii do realizacji mechanizmów promowania wzrostu i rozwoju roślin, hamowania wzrostu patogenów czy bioremediacji;
 - wykonywanie podstawowych testów fizjologicznych dla bakterii, zarówno tradycyjnymi metodami, jak i nowoczesnymi (Microgen ID/system Biolog);
- **Analiza genetyczna bakterii:**
 - amplifikacja materiału genetycznego metodą PCR;
 - wykorzystanie narzędzi bioinformatycznych w celu ustalenia przynależności taksonomicznej bakterii;
- **Projektowanie i prowadzenie doświadczeń roślinnych oraz analiza statystyczna uzyskanych wyników;**
- **Upowszechnianie uzyskanych wyników badań w formie naukowej oraz popularno-naukowej w języku polskim oraz w języku angielskim;**

- **Posługiwanie się językiem angielskim w stopniu umożliwiającym uczestnictwo w międzynarodowym środowisku naukowym (wg subiektywnej oceny autora poziom B2+).**