

## Streszczenie rozprawy doktorskiej

Instytut Technologiczno-Przyrodniczy  
Państwowy Instytut Badawczy  
w Falentach

**Tytuł:** Występowanie względnie beztlenowych, przetrwalnikujących bakterii celulolitycznych w glebie różnie użytkowanej rolniczo

**Autor:** mgr Jakub Dobrzyński

**Promotor:** dr hab. inż. Ewa Beata Górka, prof. SGGW

**Promotor pomocniczy:** dr hab. inż. Barbara Wróbel, prof. ITP-PIB

Ekologia bakterii celulolitycznych w glebie rolniczej pozostaje wciąż stosunkowo nieznaną. Nadal istnieje zaledwie kilka prac dotyczących obfitości i różnorodności tej grupy bakterii w glebach użytkowanych rolniczo. Niniejsze badania miały na celu określenie wpływu różnych systemów uprawy roślin i nawożenia obornikiem na względną liczebność i różnorodność względnie beztlenowych przetrwalnikujących bakterii celulolitycznych oraz względnie beztlenowych przetrwalnikujących bakterii potencjalnie celulolitycznych (WBPBC).

Miejscem badań był prawie 100-letni eksperyment nawozowy, jeden z najstarszych nadal kontynuowanych eksperymentów polowych w Europie. Relatywna obfitość WBPBC i potencjalnych WBPBC oceniano za pomocą klasycznych metod mikrobiologicznych, najbardziej prawdopodobnych liczb (NPL) oraz sekwencjonowania 16S rRNA Illumina MiSeq. Najwyższe NPL badanej grupy bakterii odnotowano w glebie spod upraw ze zmianowaniem bez roślin bobowatych nawożonej obornikiem (ARP-FYM) (382 jednostek tworzących kolonie (jtk) g<sup>-1</sup>). W wyniku analizy bioinformatycznej najwyższe wartości indeksu Shannon-Wienera i największą liczbę operacyjnych jednostek taksonomicznych (OTUs) znaleziono w ARP-FYM, podczas gdy najniższe wartości tych parametrów odnotowano w glebie pochodzącej z ARP bez nawożenia obornikiem. We wszystkich próbkach dominujące na poziomie rzędu były: Brevibacillales (13,1–43,4%), Paenibacillales (5,3–36,9%), Bacillales (4,0–0,9%). Natomiast Brevibacillaceae (13,1–43,4%),

Paenibacillaceae (8,2–36,9%) i Clostridiaceae (5,4–11,9%) dominowały na poziomie rodziny we wszystkich badanych próbkach. Rodziny Aneurinibacillaceae i Hungateiclostridiaceae miały większą względną liczebność w glebie nawożonej obornikiem. Podsumowując, wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej pokazują, że wpływ systemu uprawy na WBPBC był znikomy, podczas gdy rzeczywistym czynnikiem kształtującym społeczność WBPBC było stosowanie w płodozmianie obornika.

Celem potwierdzenia występowania WBPBC w badanej glebie i oznaczenia aktywności ich enzymów celulolitycznych wyizolowano kilkadziesiąt szczepów bakterii przetrwalnikujących, spośród których jeden został wybrany do dalszych badań. Poprzez sekwencjonowanie genu 16S rRN wybrany szczep bakterii został zidentyfikowany jako należący do rodzaju *Bacillus* (szcep 8E1A). *Bacillus* sp. 8E1A wykazał produkcję karboksymetylocelulazy (CMCazy) z wizualizacją z użyciem czerwieni Kongo (25 mm - rozmiar strefy przejrzystej). Ponadto badano aktywności CMCazy, hydrolazy papieru filtracyjnego (FPazy) oraz hydrolazy Avicel mikrokrystalicznej celulozy (avicelazy). Do hodowli szczepu wykorzystano trzy różne źródła celulozy: karboksymetylocelulozę (CMC), papier filtracyjny (FP) i mikrokrystaliczną celulozę Avicel. Najwyższa aktywność CMCazy ( $0,617 \text{ U mL}^{-1}$ ), FPazy ( $0,903 \text{ U mL}^{-1}$ ) i Avicelazy ( $0,645 \text{ U mL}^{-1}$ ) przez *Bacillus* sp. 8E1A zaobserwowana została przy użyciu: CMC (po 216 h inkubacji), celulozy Avicel (po 144 h inkubacji) oraz CMC (po 144 h inkubacji). Następnie aktywność celulaz była mierzona w różnych temperaturach i przy różnych wartościach pH. Optymalna temperatura dla aktywności CMCazy ( $0,535 \text{ U mL}^{-1}$ ) i Avicelazy ( $0,666 \text{ U mL}^{-1}$ ) wynosiła  $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jednak najwyższą aktywność FPazy ( $0,868 \text{ U mL}^{-1}$ ) została zarejestrowana w  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Najwyższą aktywność CMCazy i Avicelazy odnotowano przy pH 7,0 (odpowiednio przy  $0,520$  i  $0,507 \text{ U mL}^{-1}$ ), a optymalną aktywność FPazy stwierdzono przy pH 6,0 ( $0,895 \text{ U mL}^{-1}$ ). Powyższe wyniki wskazują, że celulazy produkowane przez *Bacillus* sp. 8E1A potencjalnie mogą być wykorzystywane do degradacji odpadów lignocelulozowych w warunkach przemysłowych.

**Słowa kluczowe:** systemy upraw, Firmicutes, nawożenie, celulazy