

II OGÓLNOPOLSKIE SYMPOZJUM  
MIKROBIOLOGICZNE  
„METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK”  
Lublin, 29 - 30 czerwca 2017 roku

MATERIAŁY KONFERENCYJNE





Zakład Badań  
Systemu Gleba-  
Roślina  
Instytut Agrofizyki  
im. B. Dobrzańskiego  
Polskiej Akademii  
Nauk  
ul. Doświadczalna 4  
20-290 Lublin



Katedra Biochemii i  
Chemii Środowiska  
Katolicki Uniwersytet  
Lubelski Jana Pawła II  
Konstantynów 1  
20-708 Lublin



Zakład Mikrobiologii  
Rolniczej  
Instytut Uprawy  
Nawożenia  
i Gleboznawstwa  
Państwowy Instytut  
Badawczy  
ul. Czartoryskich 8  
24-100 Puławy



SZKOŁA GŁÓWNA  
GOSPODARSTWA  
WIEJSKIEGO  
W WARSZAWIE

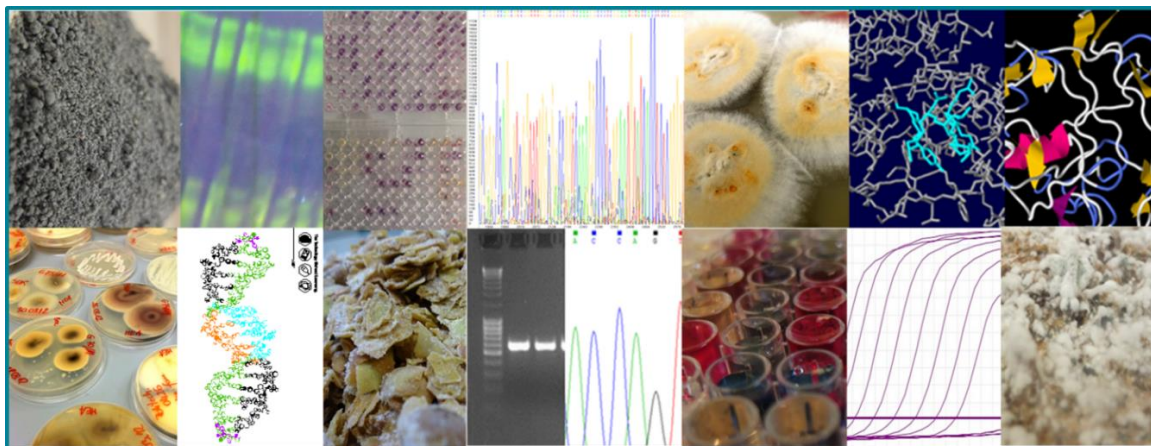
Samodzielny Zakład Biologii  
Mikroorganizmów  
Szkoła Główna Gospodarstwa  
Wiejskiego  
Zakład Biologii  
Mikroorganizmów  
ul. Nowoursynowska 159  
02-776 Warszawa

## II OGÓLNOPOLSKIE SYMPOZJUM MIKROBIOLOGICZNE

### „METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK”

Lublin, 29 - 30 czerwca 2017 roku

## MATERIAŁY KONFERENCYJNE



Ministerstwo Nauki  
i Szkolnictwa Wyższego

FUNDACJA  
PAN  
POLSKA AKADEMIA NAUK

Redaktor: Agata Gryta, Magdalena Frąc

Projekt okładki: freedesignfile, Agata Pacek-Bieniek

Skład: Agata Gryta

Copyright © 2017

Wydawnictwo: Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk



Open Access, Licencja Creative Commons CC BY-NC-ND

wersja opublikowana, czas opublikowania - razem z publikacją

Konferencja dofinansowana w ramach zadania: Organizacja II Ogólnopolskiego Sympozjum Mikrobiologicznego „Metagenomy Różnych Środowisk” - zadanie finansowane w ramach umowy 878/P-DUN/2017 (ID wniosku 350099) ze środków Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego przeznaczonych na działalność upowszechniającą naukę.

ISBN 978-83-89969-48-4

Liczba egzemplarzy: 180

Liczba arkuszy wydawniczych: 11,14

Liczba arkuszy drukarskich: 9,75

Druk: Perfekta info Renata Markisz, ul. Doświadczalna 48, 20-280 Lublin

## **Komitet Organizacyjny:**

*Przewodnicząca:*

**dr hab. Magdalena Frąc (IA PAN, Lublin)**

*Członkowie:*

**dr Anna Gałązka (IUNG-PIB, Puławy)**

**dr Agnieszka Wolińska (KUL, Lublin)**

**dr hab. Tomasz Stępkowski (SGGW, Warszawa)**

**dr Karolina Oszust (IA PAN, Lublin)**

*Sekretariat konferencji:*

**mgr Agata Gryta**

**mgr inż. Jacek Panek**

## **Komitet Naukowy:**

**prof. dr hab. Wiesław Barabasz**

**dr hab. inż. Sławomir Ciesielski**

**dr hab. Jolanta Jaroszuk-Ścisł**

**prof. dr hab. Adam Jaworski**

**dr Grzegorz Koczyk**

**prof. dr hab. Jan Kucharski**

**prof. dr hab. Wanda Małek**

**prof. dr hab. Stefan Martyniuk**

**dr Julia Pawłowska**

**dr Marcin Pierechod**

**prof. dr hab. Stanisław Pietr**

**prof. dr hab. Zofia Piotrowska-Seget**

**prof. dr hab. Maria Rudawska**

**prof. dr hab. Jadwiga Wyszowska**

**dr Katarzyna Zaremba-Niedzwiedzka**

**dr hab. Urszula Zielenkiewicz**

**dr hab. Aleksandra Ziemińska-Buczyńska**

## **Patronat honorowy:**

**prof. dr hab. Cezary Sławiński (IA PAN, Lublin)**

**prof. dr hab. Artur Zdunek (IA PAN, Lublin)**

**prof. dr hab. Wiesław Oleszek (IUNG-PIB, Puławy)**

**Ireneusz Samodulski (Fundacja PAN Oddział w Lublinie)**

**prof. dr hab. Zofia Stępniewska (KUL, Lublin)**

**dr hab. Mieczysław Błaszczak (SGGW, Warszawa)**

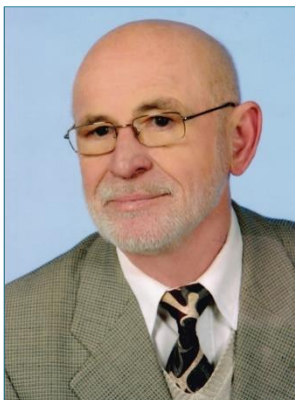
## **Patronat naukowy:**

**Polskie Towarzystwo Mikrobiologów**

**Polskie Towarzystwo Mykologiczne**



## Prelegenci



### **prof. dr hab. Adam Jaworski**

Z wykształcenia biochemik, z zawodu biolog, genetyk molekularny i naukowiec, ale przede wszystkim nauczyciel akademicki i wychowawca kadr naukowych (ponad 50 magistrów genetyki, 21 doktorów, spośród których 11 osób uzyskało stopnie dr habilitowanego i profesora nadzwyczajnego, a 1 osoba tytuł profesora nauk biologicznych). 53 lata pracy naukowej i dydaktycznej w Uniwersytecie Łódzkim, Polskiej Akademii Nauk oraz Uniwersytetach w USA i Japonii, a od 4 lat w największej w Polsce, najstarszej, niepublicznej Uczelni - Społecznej Akademii Nauk w Łodzi.

Dorobek naukowy: około 86 oryginalnych prac twórczych, w tym opublikowane w Science, Nature Genetics, Journal of Biological Chemistry, Gene, Journal of Molecular Biology, Nucleic Acids Research.



### **dr hab. inż. Sławomir Ciesielski, prof. UWM**

Pracownik Katedry Biotechnologii w Ochronie Środowiska Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. W latach 2012-2016 Prodzikan ds. Nauki na Wydziale Nauk o Środowisku UWM w Olsztynie. Zainteresowania naukowe to mikrobiologiczna produkcja biopolimerów, badanie procesów regulacji ekspresji genów z wykorzystaniem podejścia transkryptomycznego, mikrobiologiczne przemiany związków azotowych, zastosowanie metod metagenomicznych i bioinformatycznych w badaniach mikrobiomów środowisk naturalnych i antropogenicznych.

Dorobek naukowy: ponad 50 recenzowanych artykułów naukowych, kierownik lub główny wykonawca 13 projektów naukowych, promotor 2 doktorów, 21 magistrów oraz 16 inżynierów.



### **dr Julia Pawłowska**

Adiunkt w Zakładzie Filogenetyki Molekularnej i Ewolucji, Wydziału Biologii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych, Uniwersytetu Warszawskiego. Jedna z dwóch Kierowniczek Pracowni Mykologicznej w CNBCh UW. Sekretarz Polskiego Towarzystwa Mykologicznego. Jej pasją są grzyby. Choć główne zainteresowania dotyczą ewolucji i różnorodności biologicznej grzybów, zwłaszcza tych najbardziej pierwotnych grzybów lądowych, chętnie angażuje się w projekty dotyczące grzybów wielkoowocnikowych, badanie interakcji grzybów z innymi grupami organizmów oraz identyfikację molekularną grzybów. Ostatnio eksploruje też możliwości zastosowania technik NGS do badania różnorodności grzybów glebowych. Wspólnie ze swoim zespołem opisała 7 nowych dla nauki gatunków grzybów oraz jest współautorką ponad 30 publikacji o tematyce mykologicznej.



**dr Katarzyna Zaremba-Niedzwiedzka**

Pracownik naukowy w Program of Molecular Evolution, Department of Cell and Molecular Biology, Biomedical Centre, Uppsala University.

Absolwentka Wydziału Matematyki oraz Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego i Wydziału Biologii Uniwersytetu w Uppsali. Doktorat zatytułowany 'Microbial Metagenomics: A Tale of the Dead and the Living' obroniła w 2013 roku na Uniwersytecie w Uppsali. Obecnie pracuje jako postdoc w grupie Thijsa Ettemy zajmując się głęboką filogenezą, metagenomiką i bioinformatyką w zagadnieniach powstania eukariotów.



**dr Grzegorz Koczyk**

Bioinformatyk, specjalizujący się w bioinformatyce ewolucyjnej i ewolucji wtórnego metabolizmu u mikroorganizmów eukariotycznych. Współzałożyciel i kierownik Zespołu Ewolucji Funkcji Systemów Biologicznych (Zakład Biometrii i Bioinformatyki, Instytut Genetyki Roślin PAN). Razem z Zespołem zajmuje się m.in. problematyką rekonyliacji drzew filogenetycznych, charakteryzacją danych z sekwencjonowania nowej generacji w kontekście genów metabolizmu wtórnego oraz filogenezą i ewolucją mechanizmów biosyntezy i adaptacji do (toksycznych) metabolitów w komórkach roślin i grzybów. Laureat pierwszej edycji Programu LIDER (NCBiR) oraz SONATA i OPUS (NCN). Współautor prac wynikowych w m.in. Genome Biology and Evolution, Nucleic Acids Research, Theoretical and Applied Genetics.



**dr Marcin Pierechod**

Biochemik. Absolwent Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego oraz Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Staż podoktorski odbywał na Uniwersytecie w Tromsø, w Norweskim Narodowym Centrum Biologii Strukturalnej (NorStruct), gdzie kontynuuje pracę naukową. Poprzednie projekty, w których uczestniczył, dotyczyły charakteryzacji strukturalnej inhibitorów roślinnych kinaz stresowych SnRK oraz poszukiwania enzymów o potencjale komercyjnym w organizmach psychrofilnych i ich biochemicznej charakterystyce. Jego obecna praca koncentruje się na strukturalnej charakteryzacji białek wiążących jednoniciowe DNA oraz badaniach nad ich wykorzystaniem w m.in. nowych metodach sekwencjonowania wysokoprzepustowego.



**dr hab. Aleksandra Ziemińska-Buczyńska**

Mikrobiolog, zajmuje się badaniami zbiorowisk bakteryjnych układów technologicznych metodami biologii molekularnej oraz wykorzystaniem mikroorganizmów środowiskowych w procesach produkcji biotechnologicznej i bioremediacji. Adiunkt w Katedrze Biotechnologii Środowiskowej Wydziału Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej. Dyrektor Centrum Popularyzacji Nauki Politechniki Śląskiej. Laureatka konkursu FameLab 2015. Prowadząca program „Wynalazcy przyszłości” w stacji Canal+ Discovery.

**dr hab. Urszula Zielenkiewicz**

Adiunkt w Zakładzie Biochemii Drobnoustrojów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN. Absolwentka Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, w specjalności Mikrobiologia. Pracę magisterską pt. „Mutanty auksotroficzne szczepu *Thiobacillus A2*” wykonała pod opieką prof. W. Kunickiego-Goldfingera. Dwuletni staż naukowy odbyła w Universidad Autónoma de Barcelona w Hiszpanii. Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii uzyskała w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie na podstawie rozprawy pt. „Role of genes epsilon and zeta of pSM19035 plasmid in its stable maintenance in bacterial cells” pod kierunkiem dr. hab. Piotra Cegłowskiego. Stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk biologicznych, nadany przez Radę Naukową Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, uzyskała na podstawie osiągnięcia naukowego pt. „Kaseta genowa  $\epsilon$ - $\zeta$  plazmidu pSM19035 jako model systemów toksyna-antytoksyna bakterii Gram-dodatnich”. Obecnie kieruje własnym tematem badawczym w Zakładzie Biochemii Drobnoustrojów IBB PAN.





## Program

29.06.2017 (czwartek)	
<b>8:15-9:00</b>	Rejestracja uczestników konferencji (IA PAN, Budynek A)
	<b>Otwarcie Sympozjum</b> <b>Sala Konferencyjna IA PAN w Lublinie</b> (dr hab. Magdalena Frąc, dr Anna Gałązka, dr Agnieszka Wolińska, dr hab. Tomasz Stępkowski)
<b>9:00-9:30</b>	<b>prof. dr hab. Cezary Sławiński</b> (Dyrektor IA PAN w Lublinie) <b>prof. dr hab. Wiesław Oleszek</b> (Dyrektor IUNG-PIB w Puławach) <b>prof. dr hab. Zofia Stępniewska</b> (Kierownik Katedry Biochemii i Chemii Środowiska, KUL) <b>prof. dr hab. Mieczysław Błaszczuk</b> (Zakład Biologii Mikroorganizmów, SGGW)
	<b>Referaty plenarne</b> (prof. dr hab. Zofia Stępniewska, prof. dr hab. Mieczysław Błaszczuk)
<b>9:30-10:00</b>	<b>prof. dr hab. Adam Jaworski</b> (Społeczna Akademia Nauk w Łodzi) Geny oporności na antybiotyki stanowią część naturalnego metagenomu hodowlanych i niehodowlanych bakterii środowiskowych
<b>10:00-10:30</b>	<b>dr hab. inż. Sławomir Ciesielski</b> (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie) Metagenomika, metatranskryptomika i metaproteomika w badaniach środowiskowych
<b>10:30-11:00</b>	<b>dr Julia Pawłowska</b> (Uniwersytet Warszawski) Różnorodność grzybów glebowych wybranych obszarów zieleni miejskiej w świetle analiz metagenomicznych
<b>11:00-11:30</b>	<b>dr Katarzyna Zaremba-Niedzwiedzka</b> (Uniwersytet w Uppsali, Szwecja) Rozwój metagenomiki i nowe odkrycia jakich dostarcza w dziedzinie eukariogenezy
<b>11:30-11:40</b>	<b>Dyskusja</b>
<b>11:40-12:00</b>	<b>Przerwa kawowa (IA PAN, Budynek D)</b>
<b>12:00-13:40</b>	<b>Sesja I – narzędzia metagenomiczne</b> (prof. dr hab. Maria Rudawska, prof. dr hab. Adam Jaworski)
	<b>Referat plenarny</b>
<b>12:00-12:30</b>	<b>dr Grzegorz Koczyk</b> (Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Poznań) Metagenomowym palcem po (filogenomicznej) mapie - bezpośrednia charakteryzacja genów biosyntezy poliketydów w próbkach środowiskowych
	<b>Prezentacje</b>
<b>12:30-12:45</b>	<u>Adam Kuzdrański</u> , Hubert Szczerba, Anna Kot, Agnieszka Ostrowska, Marta Muszyńska, Michał Nowak (UP, Lublin) Testy molekularne umożliwiające identyfikację kluczowych patogenów pszenicy zwyczajnej ( <i>Triticum aestivum</i> L.)
<b>12:45-13:00</b>	<u>Sławomir Sułowicz</u> , Kinga Bondarczuk, Dariusz Ignatiuk, Zofia Piotrowska-Seget (UŚ, Katowice) Wykorzystanie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) regionów zmiennych genu 16S rDNA do oceny struktury zespołów mikroorganizmów z nalodzi na przedpolu lodowca Werenskiolda, Spitsbergen

13:00-13:15	<u>Joanna Banasiewicz</u> , Tomasz Stępkowski (SGGW, Warszawa) Badania populacyjne bakterii z rodzaju <i>Bradyrhizobium</i> z wykorzystaniem metod mikrobiologii klasycznej oraz podejść metagenomicznych
13:15-13:30	<u>Dominika Salamon</u> (Collegium Medicum UJ – OpenExome, Kraków – Warszawa) Zastosowanie metody NGS w ocenie mikrobioty jelita grubego u pacjentów z cukrzycą
13:30-13:40	<b>Dyskusja</b>
13:40-14:40	<b>Obiad (IA PAN, Budynek D)</b>
14:40-16:20	<b>Sesja II – metagenomika aplikacyjna</b> (prof. dr hab. Wanda Małek, prof. dr hab. Wiesław Barabasz)
	<b>Referat plenarny</b>
14:40-15:10	<u>dr Marcin Pierechod</u> (Uniwersytet w Tromsø, Norwegia) Projekt MarZymes: nowe aktywności enzymatyczne ukryte w metagenomach Morza Arktycznego
	<b>Prezentacje</b>
15:10-15:25	<u>Justyna Adamiak</u> , Justyna Szulc, Anna Otlewska, Tomasz Ruman, Katarzyna Kubiak, Beata Gutarowska (UŁ, Łódź) Metagenomika i metabolomika w diagnostyce foxingu
15:25-15:40	<u>Maria Rudawska</u> , Tomasz Leski, Leszek Karliński, Marcin Pietras (Instytut Dendrologii PAN, Poznań) Metagenomy grzybów glebowych w szkółkach leśnych i odnowieniu naturalnym
15:40-15:55	Justyna Liberska, Artur Trzebny, Sylwia Bialik, Jerzy Michalik, <u>Mirosława Dabert</u> (UAM, Poznań) Detekcja patogennych mikroorganizmów we krwi żywiciela przez sekwencjonowanie metagenomów rDNA
15:55-16:10	<u>Ewa Oleńska</u> , Wanda Małek (Uniwersytet w Białymstoku) Genomowe zróżnicowanie populacji endofitów koniczyny białej z około 100-letniej hałdy cynkowo-ołowiowej Bolesław
16:10-16:20	<b>Dyskusja</b>
16:30-18:30	<b>Spacer z przewodnikiem po Starym Mieście w Lublinie</b>
20:00-....	<b>Uroczysta kolacja (Hotel Victoria, ul. Prezydenta Gabriela Narutowicza 58/60, Lublin)</b> <b>Występ Formacji Tańca Towarzyskiego Politechniki Lubelskiej GAMZA</b>
<b>30.06.2017 (piątek)</b>	
9:00-9:30	<b>Sesja posterowa (IA PAN, Budynek A, Korytarz I piętro i II piętro)</b>
9:30-11:10	<b>Sesja III – metagenomika środowiskowa</b> (prof. dr hab. Zofia Piotrowska-Seget, prof. dr hab. Jan Kucharski)
	<b>Referat plenarny</b>
9:30 - 10:00	<u>dr hab. Aleksandra Ziemińska-Buczyńska</u> (Politechnika Śląska, Gliwice) Metagenomika zbiorowisk bakteryjnych środowisk technologicznych
	<b>Prezentacje</b>
10:00-10:15	<u>Agnieszka Wolińska</u> , Agnieszka Kuźniar, Urszula Zielenkiewicz, Dariusz Izak, Zofia Stępniewska, Mieczysław Błaszczak (KUL, Lublin) Metagenomiczna analiza Bacteroidetes w glebach Lubelszczyzny
10:15-10:30	<u>Leszek Karliński</u> , Maria Rudawska (Instytut Dendrologii PAN, Poznań) Zbiorowiska mikroorganizmów glebowych a genotyp drzew
10:30-10:45	<u>Krzysztof Pudełko</u> , Dorota Narożna, Joanna Króliczak, Cezary Mądrzak (UP, Poznań)

	Analiza molekularna potencjału symbiotycznego gleb na przykładzie mikrosymbiontów łubinu
<b>10:45-11:00</b>	<u>Anna Wąsowska</u> (Genomed, Warszawa) Wykorzystanie sekwencjonowania nowej generacji w badaniach metagenomów
<b>11:00-11:10</b>	<b>Dyskusja</b>
<b>11:10 – 11:30</b>	<b>Przerwa kawowa (IA PAN, Budynek D)</b>
<b>11:30-13:25</b>	<b>Sesja IV – czynniki wpływające na jakość środowiska</b> (prof. dr hab. Jadwiga Wyszowska, prof. dr hab. Stefan Martyniuk)
	<b>Referat plenarny</b>
<b>11:30-12:00</b>	<b>dr hab. Urszula Zielenkiewicz</b> (Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa) Mikrobiologia uranu
	<b>Prezentacje</b>
<b>12:00-12:15</b>	<u>Marta Wrzosek</u> , Alicja Okraśńska, Łukasz Istel, Julia Pawłowska (UW, Warszawa) Grzyby jako wskaźnik jakości środowiska
<b>12:15-12:30</b>	<u>Sonia Szymańska</u> , Luigimaria Borruso, Lorenzo Brusetti, Piotr Hulisz, Katarzyna Hryniewicz (UMK, Toruń) Bioróżnorodność taksonomiczna endofitów korzeniowych <i>Salicornia europaea</i> L. pochodzących z dwóch zasolonych stanowisk badawczych
<b>13:30-12:45</b>	<u>Tomasz Oszako</u> , Dmirty Voitka, Katarzyna Anna Kubiak, Miłosz Tkaczyk, Małgorzata Gorzkowska, Anna Tereba, Lassaâd Belbahri, Justyna Anna Nowakowska (Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin) Relacje pomiędzy strukturą genetyczną a zdrowotnością na przykładzie drzewostanów dębowych na Płycie Krotoszyńskiej
<b>12:45-12:55</b>	<u>Grzegorz Kaszyński</u> (LABNATEK, Warszawa) Zastosowania holotomografii w obrazowaniu komórek
<b>12:55-13:05</b>	<u>Łukasz Zarodkiewicz</u> (MSA System, Warszawa) A Closer Look At nanoTechnology
<b>13:05-13:20</b>	<b>Dyskusja</b>
<b>13:20-13:35</b>	<b>Podsumowanie i zakończenie konferencji, wręczenie nagród</b>
<b>13:35-14:35</b>	<b>Obiad (IA PAN, Budynek D)</b>
<b>14:40-15:50</b>	<b>Zwiedzanie Laboratoriów Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie</b> <b>Zwiedzanie odbędzie się w 5 grupach (A-E), każda z grup zobaczy każde laboratorium.</b>
14:40-14:50	Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej ( <u>Magdalena Frąc</u> )
14:55-15:05	Laboratorium Chromatografii Gazowej ( <u>Andrzej Bieganski</u> )
15:10-15:20	Laboratorium Mikroskopii ( <u>Artur Zdunek</u> )
15:25-15:35	Laboratorium Nowych Technologii Pozyskiwania Energii Odnawialnej oraz Biomasy ( <u>Izabela Krzemińska</u> )
15:40-15:50	Laboratorium Oceny Jakości Surowców Zbożowych i Oleistych ( <u>Agnieszka Nawrocka</u> )



## **Referaty plenarne**



## Referaty plenarne

1. Sławomir Ciesielski, Metagenomika, metatranskryptomika i metaproteomika w badaniach środowiskowych.....13
2. Adam Jaworski, Ireneusz Jurczak, Katarzyna Dudek, Geny oporności na antybiotyki stanowią część naturalnego metagenomu hodowlanych i niehodowlanych bakterii środowiskowych.....15
3. Grzegorz Koczyk, Adam Dawidziuk, Delfina Popiel, Katarzyna Wyrwa, Metagenomowym palcem po (filogenomicznej) mapie - bezpośrednia charakteryzacja genów biosyntezy poliketydów w próbkach środowiskowych.....17
4. Julia Pawłowska, Alicja Okraśńska, Łukasz Istel, Przemysław Decewicz, Łukasz Dziewit, Marta Wrzosek, Różnorodność grzybów glebowych wybranych obszarów zieleni miejskiej w świetle analiz metagenomicznych.....18
5. Marcin Pierechod, Projekt "MarZymes": nowe aktywności enzymatyczne ukryte w metagenomach Morza Arktycznego.....19
6. Katarzyna Zaremba-Niedzwiedzka, Eva F. Caceres, Anja Spang, Thijs J.G. Ettema, Rozwój metagenomiki i nowe odkrycia jakich dostarcza w dziedzinie eukariogenezy.....20
7. Aleksandra Ziemińska-Buczyńska, Anna Banach, Ciesielski Sławomir, Piotr Gutwiński, Metagenomika zbiorowisk bakteryjnych środowisk technologicznych....22
8. Urszula Zielenkiewicz, Mikrobiologia uranu.....23





## **Metagenomika, metatranskryptomika i metaproteomika w badaniach środowiskowych**

Metagenomics, metatranscriptomics and metaproteomics in environmental studies

Sławomir Ciesielski

Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Złożone zbiorowiska mikroorganizmów są podstawowym składnikiem wszystkich ekosystemów występujących na Ziemi. Ich struktura i funkcje są badane od dziesięcioleci, natomiast przełom w tej dziedzinie nastąpił w ciągu ostatniej dekady. Było to wynikiem rozwoju technologii masowego sekwencjonowania DNA. Tego rodzaju technologia wykorzystywana jest do badania zróżnicowania mikroorganizmów na poziomie szczepów i do analizy zmienności zbiorowisk mikroorganizmów w czasie poprzez podejście określane jako metagenomika oraz do definiowania aktywności funkcjonalnej tych zbiorowisk poprzez inne podejście, określane jako metatranskryptomika. Aktywność funkcjonalna zbiorowisk mikroorganizmów może być również definiowana na poziomie białek poprzez metaproteomikę. Integracja danych metagenomicznych z danymi metatranskryptomicznymi i metaproteomicznymi pozwala na lepsze zrozumienie reakcji zbiorowisk mikroorganizmów na nagłe zmiany środowiskowe. Ponieważ wzrasta tempo gromadzenia tego rodzaju danych, coraz bardziej niezbędny staje się dostęp do narzędzi bioinformatycznych oraz baz danych umożliwiających zarządzanie danymi biologicznymi. Dlatego też programy bioinformatyczne oraz bazy danych dostępne on-line są podstawowymi elementami projektów "meta-omicznych". Różne formaty danych, ich wielowymiarowość oraz potrzeba normalizacji stają się podstawowym wyzwaniem dzisiejszej bioinformatyki.

Wszystkie "meta-omiczne" technologie rewolucjonizują mikrobiologię środowiskową w zakresie ujawniania potencjału genetycznego i aktywności funkcjonalnej zbiorowisk mikroorganizmów. Poprzez badania metagenomiczne odkrywane są nowe biokatalizatory oraz szlaki biosyntezy w tempie niemożliwym do osiągnięcia z wykorzystaniem tradycyjnych narzędzi biologii molekularnej. Dlatego też "meta-omiczne" podejścia są coraz częściej stosowane nie tylko w badaniach środowiskowych, ale również w biotechnologii przemysłowej, bioremediacji gleb, oczyszczaniu ścieków, żywieniu i medycynie.

Complex microbial communities are a core component of every ecosystem on the earth. Their structure and functions are analyzed for decades but a real breakthrough on this field was achieved during last ten years. This was the result of high-throughput DNA sequencing technologies development. This type of analysis is used to identify strain-level microbial variation and community temporal dynamics by approach called metagenomics and to reveal community functional activity by other approach called metatranscriptomics. The functional activity of microbial communities could be also determined on the level of proteins through metaproteomics. Integrating metagenomic data of microorganisms with metatranscriptomic and metaproteomic information provides a better understanding of the microbial response to perturbations in the environment. As the speed of data accumulation is accelerating, bioinformatics tools and associated databases for handling those biodata have become more urgent and necessary. Therefore, bioinformatic softwares and online databases are essential parts of meta-omics projects. Different data formats, high data dimensionality and need for these data normalization, may be considered as one of the key challenges of present-day bioinformatics.

All of these new meta-omics technologies are revolutionizing the field of environmental microbiology in revealing the genetic potentials and functional activities of microbial

communities. Through metagenomic studies, novel biocatalysts and biosynthetic pathways are being discovered at a rate not possible previously using traditional molecular biology techniques. Therefore, meta-omics approaches are more and more often applied not only in microbiological studies but also in industrial biotechnology, soil bioremediation, wastewater treatment, nutrition and medicine.

## **Geny oporności na antybiotyki stanowią część naturalnego metagenomu hodowlanych i niehodowlanych bakterii środowiskowych**

Antibiotic resistance genes are part of the natural metagenome of culturable and unculturable environmental bacteria.

Adam Jaworski, Ireneusz Jurczak, Katarzyna Dudek

Instytut Nauk o Zdrowiu , Społeczna Akademia Nauk, Łódź, Gdańska 121

W czasie wykładu zostaną przedstawione dane literatury światowej na temat obecności genów lekooporności w środowiskowych populacjach bakterii. Uwaga zostanie skoncentrowana nie tylko na znanych szczepach i gatunkach bakterii hodowlanych, ale także na świecie bakterii dotąd niehodowlanych, identyfikowanych metodami genomicznymi. Gromadzone od lat 90-tych ubiegłego wieku dane w bazie ROAR (*ang. Reservoirs of Antibiotic Resistance*) dowodzą, że różne gatunki bakterii środowiskowych, w tym producenty antybiotyków stanowią ogromny, aczkolwiek wciąż mało poznany rezerwuariusz genów lekooporności. Rodzą się więc ważne pytania: jak wiele różnych determinant lekooporności krąży w świecie hodowlanych i niehodowlanych bakterii, jakie jest ich pochodzenie, jaką funkcję biologiczną spełniają w środowiskach naturalnych? Narasta wiedza na temat znanych i nowo odkrywanych genów lekooporności preegzystujących w komórkach producentów antybiotyków oraz w populacjach innych drobnoustrojów środowiskowych. Okazało się, że w przyrodzie istnieją ogromne rezerwuary genów lekooporności na antybiotyki, zwanych w języku angielskim (*ang. antibiotic resistomes*), które egzystują i krążą wśród bakterii zasiedlających gleby, wody, przewody pokarmowe ludzi i zwierząt. Geny te łącznie z genami i elementami odpowiedzialnymi za horyzontalny transfer informacji genetycznej stanowią funkcjonalny, efektywny system naturalnych środowisk, zwany *antibiotic extendend resistome*. Nowe światło na drobnoustroje glebowe jak ogromny rezerwuariusz genów oporności na antybiotyki rzuciły wyniki badań dowodzące, że bakterie glebowe zdolne do wykorzystania antybiotyków jako źródła węgla i energii są równocześnie ekstremalnie odporne na wszystkie obecnie stosowane klasy antybiotyków. Mamy obecnie niezaprzeczone dowody, że geny oporności na antybiotyki były obecne w genomach różnych gatunków bakterii prawdopodobnie od milionów lat. Wiele genów oporności na antybiotyki jest obecnych w bakteriach ziofilizowanych przed rokiem 1946, to jest przed erą antybiotyków. Dla przykładu w kolekcji Murraya, wśród 433 szczepów z rodzaju *Enterobacteriaceae* zgromadzonych w latach 1917-1952, liczne szczepy odporne na ampicylinę i tetracyklinę. „Narzędzia” genomiki i metagenomiki pozwalają na szczegółową analizę rezerwuarów genów oporności na antybiotyki w różnych naturalnych środowiskach, w tym także w środowiskach ekstremalnych. Publikowane wyniki takich badań, realizowanych z powodzeniem także w laboratoriach w Polsce, rozszerzają naszą wiedzę na temat źródeł genów oporności, ich różnicowania genetycznego, ewolucji, spełnianych funkcji biologicznych oraz dróg i mechanizmów horyzontalnej transmisji w określonych środowiskach naturalnych. W świetle gromadzonych wyników bardziej zrozumiałym staje się obecnie znaczenie środowiskowego procesu selekcji szczepów opornych na antybiotyki, który jest wzmagany działalnością człowieka poprzez nadmierne i nieuzasadnione względami medycznymi stosowanie antybiotyków nie tylko w ochronie zdrowia, ale także w hodowli zwierząt i w produkcji żywności.

During this lecture we will present data from the world literature concerning the presence of drug resistant genes in environmental bacterial populations. Our attention will be focused not only on well-known culturable bacterial strains and species but also on bacteria

which haven't been yet cultivated and have been identified thanks to genomic methods. Data which has been collected since the beginning of nineties and gathered in Reservoirs of Antibiotic Resistance proves that different environmental bacteria including antibiotics producers form a large yet little known reservoir of drug resistant genes. Important questions arise as to how many various determinants of drug resistance exist in culturable and unculturable bacteria, what is their origin and what biological function they play in the natural conditions. We are learning more and more about the well-known and the newly discovered drug resistance genes present in antibiotics' producers and other environmental microorganisms. It turns out that in nature exists an enormous reservoir of antibiotic resistomes, which circulate among soil bacteria, water bacteria as well as those which inhabit digestive tract of humans and animals. These genes together with the genes and elements responsible for horizontal transmission of genetic information constitute a functional and effective system known as antibiotic extended resistome. The new research results, which have shown that soil bacteria capable of using antibiotics as a source of carbon and energy are at the same time extremely resistant to all presently used antibiotics, have shed a new light on soil microorganisms as a potential huge reservoir of antibiotics resistomes. At present time we have unquestionable proves that antibiotics resistomes have existed in genomes of various bacterial species probably for million of years. Many determinants of antibiotic resistance can be found in bacteria lyophilized before the year 1946, which is before the era of antibiotics. As an example can serve Murray's collection. Among 433 strains of *Enterobacteriaceae* gathered between 1917 and 1952 many of them show resistance to ampicillin and tetracycline.

Tools of genomics and metagenomics allow an accurate analysis of reservoirs of antibiotics resistomes in diverse natural conditions including extreme ones. The publications which present results of research successfully conducted also in Poland, expand our knowledge on sources of drug resistant genes, their genetic diversity, evolution, biological functions, ways and methods of horizontal transmission in defined specific natural conditions.

In the light of all the gathered research results we have now more understanding of the importance of natural selection processes of antibiotics resistomes, which are being enforced by medically unjustified and excessive use of antibiotics both in humans treatment as well as in animals production.

## **Metagenomowym palcem po (filogenomicznej) mapie - bezpośrednia charakteryzacja genów biosyntezy poliketydów w próbkach środowiskowych**

Tracing metagenomic routes on a (phylogenomic) roadmap – direct characterisation of polyketide biosynthetic genes in environmental samples

Grzegorz Koczyk, Adam Dawidziuk, Delfina Popiel, Katarzyna Wyrwa

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Strzeszyńska 34, 60-479, Poznań

Modelowy eksperyment metagenomiczny zakłada charakteryzację różnorodności taksonomicznej mikroorganizmów (bakterii lub grzybów) poprzez klasyfikację zakonserwowanych sekwencji markerów (np. rDNA). Jednakże, analogiczne podejście koncepcyjne można zastosować dla charakteryzacji chemotypów (zdolności mikroorganizmów do produkcji różnych klas metabolitów wtórnych, dzięki niezwykle różnorodnym genom biosyntetycznym). Niezbędnym warunkiem wstępnym dalszej klasyfikacji i opisu nowych sekwencji jest, w tym przypadku, spójny opis ewolucyjnych źródeł obecnej zmienności genów zaangażowanych w proces biosyntezy.

W naszych poprzednich pracach (Koczyk i in. 2015) zaprezentowaliśmy prototypowy zasób „mapy drogowej” - dużej rekonstrukcji i rekonyliacji filogenetycznej, opisującej źródła zmienności genów głównych biosyntezy poliketydów aromatycznych (specjacja, duplikacja, transfer horyzontalny i/lub utrata genów) oraz ich związek z mechanizmami biosyntezy. Obecnie prezentujemy rezultaty, bazujących na zrekonstruowanej „mapie”, eksperymentów mających na celu specyficzne wzbogacanie próbek środowiskowych we fragmenty genów głównych (nieredukujących syntaz poliketydowych, NR-PKS), ich sekwencjonowanie i automatyczną analizę. W końcowym rezultacie – wodzenie metagenomowym „palcem” (w formie odczytów NGS lub przetworzonych amplikonów) po filogenomicznej „mapie drogowej” – umożliwia interpretację wyniku w kontekście typowych produktów, jak również możliwych gatunków-producentów.

Badania sfinansowane w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki SONATA/UMO-2011/03/D/NZ2/01435.

Exemplary applications of high-throughput sequencing in metagenomics focus on efficient characterisation of taxonomic diversity (bacterial or fungal) via proxy of classifying conserved barcode sequences (e.g. rDNA). However, an analogous conceptual approach can be used to sample underlying chemotypes (biosynthesis of different secondary metabolites due to activities of diverse core and accessory genes). For this purpose, the evolutionary relationships leading to the extant diversity need to be described, as a basis of further classification and annotation of novel, divergent sequences.

Previously (Koczyk et al. 2015) we have presented a proof-of-concept „roadmap” resource – a large scale phylogenetic reconstruction and reconciliation, explaining the origins of diversity (speciation, duplication, horizontal transfer, loss) and mechanistic innovations in aromatic polyketide biosynthesis. Now, we show the results of experiments aimed at enrichment and sequencing of non-reducing polyketide synthase (NR-PKS) gene fragments, followed by automated processing and phylogenetic placement of NR-PKS sequences from environmental samples. The end result – tracing the metagenomic „finger” (sequencing reads or assembled amplicons) through the above-mentioned „roadmap” – allows interpretation of likely end products and probable producer taxa.

Research funded under the National Science Centre research grant SONATA/UMO-2011/03/D/NZ2/01435.

## **Różnorodność grzybów glebowych wybranych obszarów zieleni miejskiej w świetle analiz metagenomicznych**

Fungal diversity of two different urban green spaces in the light of metagenomic analyses

Julia Pawłowska<sup>1</sup>, Alicja Okraśńska<sup>1</sup>, Łukasz Istel<sup>1</sup>, Przemysław Decewicz<sup>2</sup>, Łukasz Dziewit<sup>2</sup>,  
Marta Wrzosek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Filogenetyki Molekularnej i Ewolucji, Wydział Biologii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych,  
Uniwersytet Warszawski, ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa

<sup>2</sup>Zakład Genetyki Bakterii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się znaczeniu miejskich terenów zielonych. Doceniane są nie tylko ich walory rekreacyjne, ale również ich znaczenie w usuwaniu zanieczyszczeń (Escobedo i wsp., 2011; Kabisch, 2015). Choć różnorodność grzybów glebowych ma istotne znaczenie dla funkcjonowania ekosystemu, to wciąż jest słabo poznana (Hui i wsp., 2017). Działalność człowieka jest jednym z czynników mogących istotnie wpływać na różnorodność grzybów glebowych. Głównym celem projektu było zatem porównanie ich różnorodności w dwóch obszarach zieleni miejskiej, różniących się stopniem antropopresji. Przeprowadzone analizy metagenomowe pozwoliły stwierdzić dużą różnorodność grzybów w obydwu badanych obszarach. W analizie sumarycznie wyróżniono 1310 operacyjnych jednostek taksonomicznych (ang. OTU; przy 99% poziomie identyczności), których klasyfikacja taksonomiczna pozwoliła na identyfikację 7 różnych typów i 29 klas w obrębie królestwa Fungi. W 100-letnim parku miejskim wykryto więcej OTU (973) niż w rezerwacie przyrody Las Bielański (881). Przedstawiciele typów Ascomycota i Basidiomycota stanowili najliczniejszą grupę grzybów w obydwu lokalizacjach. W parku miejskim obserwowano większą liczbę przedstawicieli Chytrydiomycota i Glomeromycota, podczas gdy w Lesie Bielańskim częściej występowały przedstawiciele typów Rozellomycota i Zygomycota.

Recently, more and more attention is paid to importance of urban green spaces. They are appreciated not only due to their recreational values but also by their role in pollutants utilization (Escobedo et al., 2011; Kabisch, 2015). Although soil fungal community is crucial for ecosystem functioning, it still remains poorly described (Hui et al., 2017). Anthropogenic activity is supposed to be one of the factors influencing diversity of soil fungi. The main goal of our project was to compare fungal diversity of two urban green spaces differing in anthropogenic influence. Metabarcoding analyses revealed a rich soil fungal community with total of 1310 different OTUs (99% identity cut-off) that represented 7 phyla and 29 classes. More OTUs (973) were detected in 100 years old urban park than in Bielany Forest nature reserve (881) which is also located within the Warsaw borders. The Ascomycota and Basidiomycota were the most abundant phyla in both localities. Higher number of Chytrydiomycota and Glomeromycota representatives were observed in urban park, while Rozellomycota and Zygomycota abundances were higher in forest soil.

## **Projekt “MarZymes”: nowe aktywności enzymatyczne ukryte w metagenomach Morza Arktycznego**

The “MarZymes” project: novel enzyme activities hidden in the metagenomes of the Arctic Ocean

Marcin Pierechod

Department of Chemistry, The Arctic University of Norway (Tromsø, Norway)

Prezentacja przybliży projekt MarZymes realizowany w latach 2009-2015 jako część współpracy norwesko-szwedzkiej w ramach konsorcjum “Molecule for the future”. W projekcie realizowanym przez dwa norweskie uniwersytety: Arctic University of Norway (Tromsø) oraz Norwegian University of Science and Technology (Trondheim) skupiono się na poszukiwaniu nowych biokatalizatorów ze szczególnym naciskiem na ich wysoką aktywność w niskich temperaturach. Strona szwedzka, reprezentowana przez Umeå University (Umeå), realizowała wysokoprzepustowe badania przesiewowe ekstraktów bakteryjnych dostarczonych przez stronę norweską, w celu znalezienia nowych, drobno- cząsteczkowych związków zapobiegających infekcjom bakteryjnym i wirusowym.

W czasie trwania projektu udało nam się stworzyć kolekcję ok. 1400 izolatów bakteryjnych, zsekwencjonować genomy 60-ciu z nich oraz sklonować 3 biblioteki metagenomowe z DNA wyizolowanego z sedimentów dennych pobranych z głębokości ok. 800m. Zarówno izolaty bakteryjne jak i biblioteki genowe zostały sprawdzone w testach płytkowych pod kątem aktywności enzymów takich jak: proteazy, esterazy/lipazy, chitynazy, amylazy, ksylanazy, żelatynazy, celulazy, DNazy/RNazy. Z pozyskanych zasobów genetycznych wyselekcjonowano 75 genów kodujących enzymy o interesujących z punktu widzenia komercyjnego, aktywnościach. Enzymy te zostały sklonowane, eksprymowane oraz oczyszczone w celu ich pełnej charakteryzacji biochemicznej oraz w przypadku części z nich, charakteryzacji strukturalnej. Pierwsze enzymy projektu są już dostępne komercyjnie.

The presentation outlines the part of the Norway-Sweden bilateral project „Molecules for the future” where we targeted the Arctic marine metagenomes and bacterial isolates as the source of novel enzymes and molecules. The Norwegian part (MarZymes) with the Arctic University of Norway (UiT) and Norwegian University of Science and Technology (NTNU) involved, focused on new applicable biocatalysts active in low low temperatures, while the Swedish partners (Umeå University) screened for anti-infectious compounds. In the course of the project we have created a bacterial collection of approx. 1400 isolates, genome-sequenced and annotated 60 bacterial genomes. Both bacterial isolates and metagenomics libraries were functionally screened for the activities of enzymes such as: proteases, lipases/esterases, chitinases, amylases, xylanases, gelatinases, cellulase, DNase and RNases. From the vast genetic resources generated in the course of the project, 75 enzyme targets were selected for cloning, expression, purification and full biochemical characterization. The selected enzymes were characterised structurally. First enzymes originating from the project are already available, commercial products.



## **Rozwój metagenomiki i nowe odkrycia jakich dostarcza w dziedzinie eukariogenezy**

Development of metagenomics and new insights it gives into eukaryogenesis

Katarzyna Zaremba-Niedzwiedzka, Eva F. Caceres, Anja Spang, Thijs J.G. Ettema

Department of Cell and Molecular Biology, Science for Life Laboratory, Uppsala University, SE-75123  
Uppsala, Sweden

Metagenomika rozwinęła jako odpowiedź na ograniczenia laboratoryjnej hodowli w badaniach różnorodności mikrobiologicznej środowiska. W minionym dziesięcioleciu metodologia bardzo się rozwinęła dzięki postępom technologii sekwencjonowania i znacznym wysiłkom w opracowywaniu narzędzi bioinformatycznych służących do efektywnej analizy danych, jak na przykład binning. Obecnie pozwala na niemal rutynowe uzyskiwanie danych genomowych poszczególnych organizmów lub mieszaniny pokrewnych szczepów z próbek środowiskowych. Podczas gdy inne podejścia są wciąż nieocenione, metagenomika okazuje się być często pierwszym źródłem danych z organizmów, które były wcześniej nieznane lub nieosiągalne, prowadząc do nowych ekscytujących odkryć, tak jak w przypadku eukariogenezy. Pochodzenie złożonego życia jest jednym z najważniejszych pytań w ewolucji. Wszystkie podręczniki biologii pokazują prostą komórkę prokariotyczną oraz złożoną komórkę eukariotyczną, zadając pytanie w jaki sposób nastąpiło ewolucyjne przejście pomiędzy nimi. Archeony stanowią kluczowy element wyjaśnienia. Większość hipotez uznaje endosymbiozę bakterii przez archeonowego gospodarza jako początek powstania eukariotów. Wielu szczegółów ciągle jednak nie znamy. Metagenomika pozwoliła na uzyskanie nowych danych, które rzucają światło na eukariogenezę. W roku 2015 archeon o nazwie Loki został odkryty w osadach oceanicznych i okazał się być najbliższym krewnym eukariotów. Genom archeona Loki zawierał zaskakująco dużo typowych białek eukariotycznych. Kontynuacja tych badań wykazała występowanie krewnych Lokiego: Tora, Odyna i Heimdalla, które razem tworzą grupę archeonów Asgard, w próbkach z różnych środowisk w kilku miejscach na świecie. Badania filogenomiczne wykazują duże poparcie dla pozycji eukariotów wewnątrz archeonów, najbliższej spokrewnionych z archeonami Asgard. Archaeony Asgard zawierają też homologi licznych białek znanych wcześniej tylko z genomów eukariotycznych, jak białka cytoszkieletu, związane z powstawaniem i transportem pęcherzyków, transportem przez błony i inne, wskazując na to, że archeonowy gospodarz był dużo bardziej złożoną komórką niż poprzednio sądzono. Daleko nam do całkowitego wyjaśnienia zagadki powstania eukariotów, a metagenowe odkrycia stawiają wiele kolejnych pytań badawczych.

Metagenomics developed to overcome limitations of the culturing approaches to studying environmental microbial diversity. In the past decade the methodology has matured, thanks to both advances in sequencing technologies and substantial effort to develop bioinformatic tools to analyze the data efficiently, such as binning. It now allows almost routinely to obtain genomic data of individual organisms or mixture of related strains from environmental samples. While other approaches are still invaluable, metagenomics can often be the first data from organisms that were otherwise unknown or inaccessible and give exciting new insights, as is the case for eukaryogenesis. Origin of complex life is one of the most important questions in evolution. All biology textbooks contrast simple prokaryotic cell with the complexity of a eukaryotic one and pose the question of how did the transition happen. Archaea are a central piece of the explanation. It is generally accepted that an archaeal host took up a bacterium in an endosymbiotic event and such a fusion gave rise to eukaryotes. Many of the details however, are still missing. Metagenomics allowed obtaining novel archaeal data that shed light on eukaryogenesis. In 2015 an archaeon called Loki was discovered in oceanic sediments, and it

turned out to be the closest relative to eukaryotes. Loki contained a surprising number of typically eukaryotic proteins. Continuation of this study found Loki-relatives: Thor-, Odin- and Heimdallarchaea, constituting the Asgard superphylum, in samples from different environments from several places around the world. Phylogenomic analyses show high support for the placement of the eukaryotes within archaea and most closely related to the Asgard archaea. Asgard archaea contain homologs of numerous proteins previously only known in eukaryotes, from cytoskeleton, vesicle formation, membrane trafficking and others, indicating that the archaeal host was much more complex than previously expected. The picture however, is still far from being clear, and these metagenomics discoveries open numerous follow-up research questions.

## Metagenomika zbiorowisk bakteryjnych środowisk technologicznych

### Metagenomics of technological microbial communities

Aleksandra Ziemińska-Buczyńska<sup>1</sup>, Anna Banach<sup>1</sup>, Ciesielski Sławomir<sup>2</sup>, Piotr Gutwiński<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Politechnika Śląska, Katedra Biotechnologii Środowiskowej, ul. Akademicka 2, 44-100 Gliwice

<sup>2</sup>Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska, ul. Słoneczna 45G, 10-719, Olsztyn

Mikroorganizmy pełnią ważną rolę w biotechnologii i inżynierii środowiska. Ich plastyczny metabolizm i wyjątkowo wysoka odporność na niekorzystane warunki środowiska pozwalają wykorzystywać je szeroko, w zarówno w procesach produkcji użytecznych metabolitów, jak i utylizacji zanieczyszczeń. Biocenozy środowisk technologicznych, takie jak osad czynny, błona biologiczna, czy wypełnienie komór fermentacyjnych, pomimo ich technologicznego charakteru, są zbiorowiskami bakteryjnymi funkcjonującymi wg zasad charakteryzujących ekosystemy naturalne. Są one jednocześnie niezmiernie bogate genotypowo, jednak większość tych mikroorganizmów jest niehodowalna w warunkach laboratoryjnych. Ta cecha znacznie utrudnia poznanie składu takich zbiorowisk oraz badania ich przydatności biotechnologicznej i inżynierskiej. Narzędzia biologii molekularnej, w tym sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*), pozwalają identyfikować mikroorganizmy ekosystemów technologicznych, poznawać skład jakościowo-ilościowy tworzonych przez nie biocenoz, ich potencjał metaboliczny i zmienność gatunkową zależną od wielu czynników, w tym od parametrów technologicznych prowadzonego procesu. W prezentacji przedstawione zostaną biocenozy technologiczne, interesujące z punktu widzenia inżynierii środowiska: osad czynny, złożo biologiczne z biofilmem bakteryjnym oraz wypełnienie komór fermentacji metanowej.

Prezentowane badania finansowane przez NCN: UMO-2013/09/D/NZ9/02438 i MNiSW: N N523 562138

Microorganisms are extremely useful in biotechnology and environmental engineering. Their flexible metabolism and high resistance towards unfavorable environmental conditions caused that they are used widely in both biotechnological production and pollutants removal. Technological systems biocenoses, such as activated sludge, bacterial biofilm in rotatory biological contractors or fermenting chambers biomass, despite their technological character, function according to the ecological rules as natural environment. Such communities are extremely rich and diverse but large part of these bacteria are uncultivable under laboratory condition. This feature causes difficulties in their biotechnological and engineering usefulness research. Molecular biology tools, including, next generation sequencing, enables to identify microorganisms living in such environments, to investigate community's qualitative and quantitative composition, metabolic potential and species changeability linked with technological factors variability. In this presentation microbial communities of technological systems: activated sludge, bacterial biofilm and fermentation chambers will be presented.

Research supported by NCN: UMO-2013/09/D/NZ9/02438 and MNiSW: N N523 562138

## Mikrobiologia uranu

### Insights into uranium microbiology

dr hab. Urszula Zielenkiewicz  
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
Institute of Biochemistry and Biophysics PAS

Mikroorganizmy autochtoniczne mogą być użyteczne w procesach bioługowania i bioremediacji uranu. Za pomocą podejść metagenomicznych jak i metod hodowlanych zbadano różnorodność oraz potencjał funkcjonalny mikroorganizmów w środowiskach o zróżnicowanej ilości mineralizacji uranowych powstałych w wyniku kopalnictwa uranu na Dolnym Śląsku. Przeprowadzono analizy metagenomiczne wybranych genów (amplikony *16S rRNA*, *cbbL*, *rus*) kilkudziesięciu prób ziem i wód zawierających związki uranowe. Wykazano iż środowiska te są bardzo różnorodne i zawierają liczne mikroorganizmy zdolne do przeprowadzania procesów autotroficznego utleniania minerałów. Z hałd zawierających najwyższe ilości uranu wyselekcjonowano na podłożach mineralnych (Beijerincka i Silvermana) konsorcja mikroorganizmów zdolnych do bioługowania rud uranu. Pogłębiona analiza meta-genomów tych konsorcjów pokazała dominację organizmów charakterystycznych dla tego typu środowisk:  $\alpha$ -*Proteobacteria* (*Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Leptospirillum*) lub  $\delta$ -*Proteobacteria* i *Actinobacteria* (*Halothiobacillus* i *Thiomonas*) oraz podobnie urozmaicony potencjał metaboliczny. Dokonano porównania metabolizmu autotroficznego wyizolowanych konsorcjów bioługujących z potencjałem mikroorganizmów bytujących w miejscach, z których konsorcja zostały wyprowadzone, poprzez analizę sekwencji genów *cbbL* karboksydysmutazy RuBisCo obecnych w meta-genomowym DNA.

Wśród hodowlalnych bakterii producentów sideroforów najliczniej reprezentowane były szczepy *Pseudomonas* i *Bacillus*.

Autochthonous microorganisms can be used in uranium bioleaching and bioremediation. Different culture-dependent and independent strategies were applied to analyze microbial diversity and functional potential of uranium contaminated environments – remnants of former uranium mines in Lower Silesia.

Metagenomic analyses of several dozen samples of uranium contaminated soil wastes and waters based on pyrosequencing of specific genes (amplicons of *16S rRNA*, *cbbL*, *rus*) have shown that these environments are greatly diversified and contain numerous microorganisms active in autotrophic oxidation of minerals.

Microbial consortia capable of metals leaching were isolated from the waste heaps containing significant amounts of uranium using Beijerinck and Silverman mineral media. In-depth analyses of meta-genome sequences revealed a relatively high diversity within studied consortia with the domination of organisms characteristic for such kind environments:  $\alpha$ -*Proteobacteria* (*Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Leptospirillum*) or  $\delta$ -*Proteobacteria* and *Actinobacteria* (*Halothiobacillus* and *Thiomonas*). The fair similarity of functional genes was noticed in both consortia types. Detailed comparative analysis of *cbbL* genes (large subunit of RuBisCo enzyme) present in consortia metagenomes and their starting soils was performed.

The group of cultivable bacteria producing the highest number of siderophores predominating in uranium mine wastes were *Pseudomonas* and *Bacillus*.

## Prezentacije ustne

## Prezentacje ustne

1. Justyna Adamiak, Justyna Szulc, Anna Otlewska, Tomasz Ruman, Katarzyna Kubiak, Beata Gutarowska, Metagenomika i metabolomika w diagnostyce foxingu.....27
2. Joanna Banasiewicz, Tomasz Stępkowski, Badania populacyjne bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* z wykorzystaniem metod mikrobiologii klasycznej oraz podejść metagenomicznych.....29
3. Kinga Bondarczuk, Zofia Piotrowska-Seget, Odprowadzanie oczyszczonych ścieków do jeziora, a rozprzestrzenianie oporności na antybiotyki w środowisku - analiza metagenomiczna.....30
4. Leszek Karliński, Maria Rudawska, Zbiorowiska mikroorganizmów glebowych a genotyp drzew.....31
5. Adam Kuzdrański, Hubert Szczerba, Anna Kot, Agnieszka Ostrowska, Marta Muszyńska, Michał Nowak, Testy molekularne umożliwiające identyfikację kluczowych patogenów pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.).....33
6. Justyna Liberska, Artur Trzebny, Sylwia Bialik, Jerzy Michalik, Mirosława Dabert, Detekcja patogennych mikroorganizmów we krwi żywiciela przez sekwencjonowanie metagenomów rDNA.....35
7. Ewa Oleńska, Wanda Małek, Genomowe zróżnicowanie populacji endofitów koniczyny białej z około 100-letniej hałdy cynkowo-ołowiowej Bolesław.....37
8. Tomasz Oszako, Dzmitry Voitka, Katarzyna Anna Kubiak, Miłosz Tkaczyk, Małgorzata Gorzkowska, Anna Tereba, Lassaâd Belbahri, Justyna Anna Nowakowska, Relacje pomiędzy strukturą genetyczną a zdrowotnością na przykładzie drzewostanów dębowych na Płycie Krotoszyńskiej.....39
9. Krzysztof Pudelko, Dorota Narożna, Joanna Króliczak, Cezary Mądrzak, Analiza molekularna potencjału symbiotycznego gleb na przykładzie mikrosymbiontów łubinu.....40
10. Maria Rudawska, Tomasz Leski, Leszek Karliński, Marcin Pietras, Metagenomy grzybów glebowych w szkółkach leśnych i odnowieniu naturalnym.....42
11. Dominika Salamon, Zastosowanie metody NGS w ocenie mikrobioty jelita grubego u pacjentów z cukrzycą.....44
12. Sławomir Sułowicz, Kinga Bondarczuk, Dariusz Ignatiuk, Zofia Piotrowska-Seget,

Wykorzystanie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) regionów zmiennych genu 16S rDNA do oceny struktury zespołów mikroorganizmów z nalodzi na przedpolu lodowca Werenskiolda, Spitsbergen.....	46
13. Sonia Szymańska, Luigimaria Borruso, Lorenzo Brusetti, Piotr Hulisz, Katarzyna Hrynkiewicz, Bioróżnorodność taksonomiczna endofitów korzeniowych <i>Salicornia europaea</i> L. pochodzących z dwóch zasolonych stanowisk badawczych.....	47
14. Agnieszka Wolińska, Agnieszka Kuźniar, Urszula Zielenkiewicz, Dariusz Izak, Zofia Stępniewska, Mieczysław Błaszczuk, Metagenomiczna analiza Bacteroidetes w glebach Lubelszczyzny.....	48
15. Marta Wrzosek, Alicja Okraśńska, Łukasz Istel, Julia Pawłowska, Grzyby jako wskaźnik jakości środowiska.....	49

## Metagenomika i metabolomika w diagnostyce foxingu

### Metagenomics and metabolomics in foxing diagnosis

Justyna Adamiak<sup>1</sup>, Justyna Szulc<sup>1</sup>, Anna Otlewska<sup>1</sup>, Tomasz Ruman<sup>2</sup>, Katarzyna Kubiak<sup>3</sup>,  
Beata Gutarowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka

<sup>2</sup> Pracownia Chemii Bioorganicznej, Politechnika Rzeszowska, Rzeszów

<sup>3</sup> Bionanopark sp. z o.o., Łódź

Foxing to rdzawobrazowe przebarwienia, występujące najczęściej na papierze z XIX i XX wieku, odpowiedzialne za obniżenie walorów estetycznych oraz osłabienie papieru. Jak dotąd mechanizm foxingu nie został w pełni poznany, ale jego przyczyny upatruje się w zjawiskach chemicznych lub mikrobiologicznych zachodzących w papierze.

Celem badań było wskazanie zależności pomiędzy występowaniem mikroorganizmów oraz związków chemicznych, a powstawaniem plam foxingowych na XIX-wiecznym papierze z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji na platformie Illumina oraz obrazowania AuNPET SALDI-ToF-MS (wysokiej rozdzielczości laserowa desorpcja/ionizacja ze spektrometrią mas oparta o nanocząstki złota).

W oparciu o wyniki sekwencjonowania nowej generacji stwierdzono, że wśród mikroorganizmów występujących na papierze z objawami foxingu dominowały bakterie należące do rodzajów *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, natomiast wśród grzybów zidentyfikowano *Cladonia*, *Pyrenochaeta* i *Phoma*. Wymienione mikroorganizmy były charakterystyczne wyłącznie dla próbek papieru z objawami foxingu, co może wskazywać na ich związek z powstawaniem rdzawobrazowych przebarwień. Wśród mas różnicujących widma wygenerowanych dla próbek papieru z foxingiem i bez stwierdzono występowanie  $m/z$  441, której według baz danych metabolomowych odpowiada związek o wzorze  $C_{30}H_{42}O$  (8'-apo-beta-carotenol) i/lub  $C_{27}H_{46}O_2$  (24-hydroxycholesterol). Na uwagę zasługuje fakt, iż oba te związki mogą mieć kolor żółto-pomarańczowy podobny do zabarwienia plam foxingowych.

The term foxing was applied to reddish-brown spots that were most commonly found on paper from the 19th and 20th centuries, responsible for reducing aesthetic qualities and strength of the paper. The mechanisms of foxing formation have not yet been fully understood, but it is believed to be the cause of chemical or microbiological phenomena occurring in the paper.

The aim of the research was to give an insight into the relationship between microorganisms, chemical compounds and foxing stains occurring on the 19<sup>th</sup> century paper. For this reason, two methods were combined, i.e. high-throughput sequencing on the Illumina platform and metabolome analysis using high-resolution laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry based on gold nanoparticle-enhanced target (AuNPET SALDI-ToF-MS) imaging.

DNA high-throughput sequencing data revealed the presence of bacterial genera belonging to *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus* and fungi represented mainly by *Cladonia*, *Pyrenochaeta* and *Phoma*. Above mentioned microorganisms occurred only on paper samples with the signs of foxing. It may indicate, therefore, their effect on the formation of foxing stains. What is interesting, the biggest positive, non-method related, difference in spectra A and C, that contains information about foxing, is  $m/z$  441. According to the database, the chemical formulas for 441 peak are  $C_{30}H_{42}O$  and/or  $C_{27}H_{46}O_2$ . Both formulas, in particular the first one, indicate that these compounds are unsaturated and/or aromatic based (8'-apo-beta-Carotenol, 24-Hydroxycholesterol). It may be assumed that they are meaningful in terms of



foxing formation, as their color varies between yellow and orange, similarly to the color of foxing stains.

## **Badania populacyjne bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* z wykorzystaniem metod mikrobiologii klasycznej oraz podejść metagenomicznych**

Classical microbiology and metagenomics in the population study of the genus  
*Bradyrhizobium*

Joanna Banasiewicz, Tomasz Stępkowski

Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa  
joanna\_banasiewicz@sggw.pl

Celem prezentowanych badań jest poznanie mechanizmów kształtujących strukturę społeczności bakterii należących do rodzaju *Bradyrhizobium* w glebie. Prowadzone do tej pory analizy wskazują na znaczny udział w tym procesie roślinnego gospodarza, który dokonując swoistej selekcji właściwych szczepów ryzobium, ma tym samym wpływ na skład gatunkowy ich społeczności. Struktura populacji bradyryzobiów kształtowana jest ponadto przez warunki glebowe i klimatyczne, a także czynniki geograficzne, przede wszystkim przez izolację geograficzną, która wpływa na rozprzestrzenianie się Fabaceae i co z tym się wiąże, również ich symbiontów bakteryjnych. Choć do niedawna postrzegano tę grupę mikroorganizmów głównie poprzez pryzmat ich symbiozy z bobowatymi, prowadzone w ostatnim czasie badania metagenomiczne wykazały, że ryzobia te są jednym z najczęściej występujących rodzajów bakterii glebowych, niezależnie od obecności w danym miejscu ich potencjalnych gospodarzy roślinnych. W niniejszym projekcie proponujemy poszerzenie zakresu analiz bazujących na metodach mikrobiologii klasycznej o podejścia metagenomiczne, oparte na amplifikacji zarówno genów metabolizmu podstawowego, jak również genów symbiotycznych na matrycy DNA izolowanego bezpośrednio z próbek gleby pochodzących z ryzosfery badanych roślin. W realizowanych projektach, podstawowy marker symbiotyczny stanowi gen *nifD* kodujący podjednostkę alfa nitrogenazy, który jest powszechnie wykorzystywany w badaniach filogenetycznych *Bradyrhizobium*.

The objective of this study is to elucidate the mechanisms shaping the structure of *Bradyrhizobium* communities in their soil environments. The current knowledge indicates that legume host may play a pivotal role in this process. This is because legumes select appropriate rhizobial strains, thus having an influence on the composition of bradyrhizobial communities. The structure of bradyrhizobial communities is further shaped by soil and climatic conditions, as well as by geographical factors, first of all, by geographic isolation that impedes the dispersal of the Fabaceae, and thus may have an impact on the dissemination of their bacterial symbionts. Although until recently this rhizobium group was perceived solely as symbiotic microorganisms, recent metagenomic studies have shown that they belong to most common groups of soil bacteria, regardless of the presence of potential plant hosts. In this project, we propose to broaden the scope of the analyses by incorporating a metagenomic approach based on the amplification of housekeeping and symbiotic genes on the DNA templates isolated directly from soil samples, collected from the rhizosphere of the selected legume plants. In this case, the symbiotic marker used is the *nifD* gene coding for the alpha subunit of nitrogenase, a phylogenetic marker which is commonly used in *Bradyrhizobium* studies.

## **Odprowadzanie oczyszczonych ścieków do jeziora, a rozprzestrzenianie oporności na antybiotyki w środowisku - analiza metagenomiczna**

Treated sewage release versus antibiotic resistance spread in the environment –  
a metagenomic approach

Kinga Bondarczuk, Zofia Piotrowska-Seget

Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Mikrobiologii,  
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

Wyniki badań ostatniej dekady wykazały istotny udział środowiskowych mikrobiomów w ewolucji i rozprzestrzenianiu oporności na antybiotyki wśród patogenów. Co więcej wskazano na oczyszczalnie ścieków jako na miejsca sprzyjające horyzontalnemu transferowi genów warunkujących antybiotykooporność. Ponad wszelką wątpliwość antybiotykooporne bakterie i geny warunkujące antybiotykooporność wraz z oczyszczonymi ściekami dostają się do środowiska. Dotychczasowe badania nie dostarczają jednak jednoznacznej odpowiedzi na temat utrzymywania się lub proliferacji tych bakterii i genów w odbiornikach oczyszczonych ścieków.

W ramach projektu badano wpływ uwalniania oczyszczonych ścieków na rozprzestrzenienie genów warunkujących antybiotykooporność w Jeziorze Żywieckim. W tym celu za pomocą platformy Illumina<sup>®</sup> HiSeq zsekwencjonowano trzy metagenomy z (1) uwalnianych do jeziora oczyszczonych ścieków, (2) wód jeziora, a także (3) wód rzeki Soły powyżej miejsca utworzenia jeziora (kontrola). Pomimo znacznego udziału oraz dużej różnorodności genów warunkujących antybiotykooporność w oczyszczonych ściekach, te parametry w wodach jeziora osiągały wartości niższe niż w rzece. To świadczy o ochronnej roli oczyszczalni ścieków w Żywcu dla badanego ekosystemu.

The studies of last decade has revealed an important role of the environmental microbiome in the evolution and dissemination of antibiotic resistance trait among pathogenic bacteria. Moreover wastewater treatment plants (WWTPs) has been recognised as specific compartments potentially enabling the horizontal spread of antibiotic resistance genes. The presence of the genes and antibiotic-resistant bacteria in final effluents of WWTPs is no longer a matter of doubt. However, due to confusing results, studying the fate of the genes and the bacteria in final effluent receiving water ecosystems remains too complicated for simple assessments.

The aim of the project was to evaluate the fate of antibiotic resistance genes in final effluent receiving Żywieckie Lake (Poland). For this purpose shotgun sequencing approach (Illumina<sup>®</sup> HiSeq) of three metagenomes was performed. We sequenced metagenomes of: the lake, the final effluent from the nearby WWTP in Żywiec and The Soła River upstream the lake (control site). Even though considerable amounts of antibiotic resistance genes were released together with the final effluent to the lake, the lake exhibited the lowest proportion and diversity of the genes when compared to control site. Therefore results suggested rather protective role of the WWTP in the studied ecosystem.

Badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu Preludium numer 2014/13/N/NZ9/03915.  
The research was supported by National Science Centre grant 2014/13/N/NZ9/03915.

## Zbiorowiska mikroorganizmów glebowych a genotyp drzew

Soil microbial communities and genotype of trees

Leszek Karliński, Maria Rudawska

Instytut Dendrologii Polskiej Akademii Nauk, ul. Parkowa 5, 62-035 Kórnik, Polska

Zbiorowiska mikroorganizmów glebowych odgrywają niezwykle istotną rolę w regulacji zdrowotności i odporności drzewostanów na czynniki biotyczne i abiotyczne. Skład i biomasa mikroorganizmów stanowią czuły wskaźnik zmian jakościowych gleby, jej skażenia, zmian klimatycznych, a także odzwierciedlają wpływ składu gatunkowego roślin na danym terenie. Celem badań było przeanalizowanie wpływu genotypu drzew na zbiorowiska mikroorganizmów glebowych towarzyszących korzeniom topoli w środowisku skażonym metalami ciężkimi (stanowisko koło huty miedzi Głogów) oraz na terenach wolnych od bezpośrednich zanieczyszczeń (2 stanowiska w okolicach Kórnika). Obiekt badawczy stanowiły próbki gleby (warstwa 0-30 cm) pobierane spod czterech klonów topoli, wysadzonych w połowie lat 90-tych. Wykorzystując specyficzne biowskaźniki (kwasy tłuszczowe, ergosterol) oraz metody chromatograficzne (GC, HPLC) określono biomasę i udział w zbiorowiskach bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, promieniowców, pierwotniaków, grzybów arbuskularnych oraz pozostałych grzybów, a także określono biomasę grzywni ekstraparykwalnej grzybów ektomykoryzowych metodą pułapek grzywniowych. Wyniki naszych badań wykazały, że na biomasę mikroorganizmów glebowych oraz ich udział w zbiorowisku istotnie rzutują dwa czynniki – środowisko glebowe oraz genotyp drzew, chociaż każda z wyszczególnionych grup mikroorganizmów w różnym stopniu warunkowana była przez te czynniki. Dominujący wpływ na mikrobiom topoli (poza promieniowcami) miało środowisko glebowe, podczas gdy genotyp drzew odgrywał drugorzędną rolę. W warunkach skażenia gleby metalami ciężkimi (Cu, Zn, Pb) wpływ genotypu topoli na zbiorowiska mikroorganizmów glebowych był wyższy, niż na terenach wolnych od zanieczyszczeń. Wraz ze wzrastającą głębokością gleby, spadała biomasa mikroorganizmów w glebie. Udział różnych grup organizmów w profilu glebowym był modyfikowany zarówno przez warunki glebowe danego stanowiska oraz genotyp gospodarza (topoli).

Microbial communities settled in the vicinity of poplar roots influence physical and chemical aspects of the soil and responds to different biotic and abiotic factors. The aim of our studies was to analyze the impact of tree genotype on biomass and community composition of microbiome of four poplar clones. Of the three study sites established in mid-90-thies, one was located in the vicinity of a copper smelter, where soil was contaminated with copper, zinc and lead and two other sites considered as a control was situated in the region free of acute environmental pollution. The biomass and the contribution in the whole community of Gram-positive and Gram-negative bacteria, arbuscular fungi, the rest of soil fungi, actinomycetes, protozoa was assessed. Additionally biomass of extramatrical mycelium (mesh bags method) of ectomycorrhizal fungi were estimated by analyzing specific biomarkers (fatty acids and ergosterol - GC and HPLC methods). Our results showed that biomass of soil microorganisms and their contribution in the community of organisms settled in soil close to poplar roots was the resultant of two main factors - the soil environment and the tree host genotype. However, each of distinguished groups of soil microorganisms was influenced by these factors in a different degree. In overall view, site effect played the main role in shaping the microbial community (excluding actinomycetes), whereas the influence of tree genotype had minor effect. At polluted soil the impact of tree genotype on microbiome of poplars was more evident than at unpolluted sites. With increasing of soil depth, decrease of biomass of all groups of

microorganisms was observed, however contribution of different representatives of microbial community across the soil profile, was modified by site and poplar genotype factor.

## Testy molekularne umożliwiające identyfikację kluczowych patogenów pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)

Molecular tests to identify key common wheat (*Triticum aestivum* L.) pathogens

Adam Kuzdraliński<sup>1</sup>, Hubert Szczerba<sup>1</sup>, Anna Kot<sup>1</sup>, Agnieszka Ostrowska<sup>1</sup>, Marta Muszyńska<sup>1</sup>, Michał Nowak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, ul. Skromna 8, 20-704, Lublin

<sup>2</sup>Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobiotechnologii, Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, ul. Akademicka 13, 20-950, Lublin

Patogeny grzybowe stanowią duży problem w uprawach pszenicy zwyczajnej. Każdego roku straty powodowane przez te mikroorganizmy istotnie wpływają na wielkość plonów, ich jakość oraz zanieczyszczenie mikotoksynami. Stosowane dotychczas metody molekularne do identyfikacji wybranych patogenów zbóż wykazują zmienną specyficzność oraz czułość. Istnieją przesłanki w kierunku uznania części z metod dostępnych w literaturze jako mało specyficzne. Przykładem takiej metody jest opracowana w latach 90-tych technika identyfikacji grzyba *Mycosphaerella graminicola*, która niespecyficznie identyfikowała izolaty należące do innych gatunków (Guo et al. 2006).

Celem badań jest zaprojektowanie oraz walidacja nowych testów PCR w kierunku identyfikacji kluczowych patogenów pszenicy występujących w Polsce.

Zaprojektowane zostaną metody molekularne do identyfikacji minimum 9 gatunków spośród wymienionych patogenów: *Blumeria graminis* (mączniak prawdziwy), *Stagonospora nodorum* (czynnik sprawczy septoriozy plew), *Mycosphaerella graminicola* (czynnik sprawczy septoriozy paskowanej liści), *Pyrenophora tritici-repentis* (czynnik sprawczy brunatnej plamistości liści), *Puccinia* spp., w tym m.in. *P. recondita*, *P. striiformis* (czynnik sprawczy rdzy zbóż), *Fusarium* spp., w tym *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae* oraz *Fusarium sporotrichioides* (czynnik sprawczy fuzariozy zbóż, w tym FHB, CR, FR), *Rhizoctonia cerealis* (czynnik sprawczy ostrej plamistości oczkowej), *Pseudocercospora herpotrichoides* (czynnik sprawczy łamliwości podstawy źdźbła).

Fungal pathogens are a serious problem in the cultivation of common wheat. The losses caused by these microorganisms every year, significantly affect crop yields quality and mycotoxin contamination. The molecular methods used hitherto to identify specific pathogens of cereals have shown a variable sensitivity and specificity. There are prerequisites to consider some of the methods available in the literature as methods of low specificity. An example of such a method is a technique developed in the 90s identifying the fungus *Mycosphaerella graminicola* that non-specifically identified isolates belonging to other species (Guo et al. 2006).

The objective of this research was to design and evaluate a novel PCR assay for the identification of key fungal pathogens of common wheat occurring in Poland.

Molecular methods are currently being designed to identify a minimum of 9 species of the following pathogens: *Blumeria graminis* (powdery mildew), *Stagonospora nodorum* (the causative agent of septoria glume blotch), *Mycosphaerella graminicola* (the causative agent of septoria tritici blotch), *Pyrenophora tritici-repentis* (the causative agent of tan spot), *Puccinia* spp., including *P. recondita*, *P. striiformis* (the causative agent of cereal rust), *Fusarium* spp., including *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* (the causative agent of cereal fusariosis, including FHB, CR and

FR), *Rhizoctonia cerealis* (the causative agent of sharp eyespot), *Pseudocercospora herpotrichoides* (the causative agent of eyespot).

Guo J.R., Schneider F., Verreet J.A., 2006. Presymptomatic and quantitative detection of *Mycosphaerella graminicola* development in wheat using a real-time PCR assay. *FEMS Microbiology Letters* 262(2): 223–229.

This study was financially supported by the National Center for Research and Development, V LIDER Program (LIDER/014/263/L-5/13/NCBR/2014), Poland.

## Detekcja patogennych mikroorganizmów we krwi żywiciela przez sekwencjonowanie metagenomów rDNA

Detection of pathogenic microorganisms in the host blood by rDNA metagenome sequencing

Justyna Liberska<sup>1</sup>, Artur Trzebny<sup>1</sup>, Sylwia Bialik<sup>2</sup>, Jerzy Michalik<sup>2</sup>, Mirosława Dabert<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Wydziałowa Pracownia Techniki Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

<sup>2</sup>Zakład Morfologii Zwierząt, Instytut Biologii Środowiska, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Klasyczne metody detekcji mikroorganizmów patogennych opierają się o swoistą amplifikację fragmentów określonych genów i ich sekwencjonowanie metodą Sanger'a i/lub metody oparte o qPCR z wykorzystaniem swoistych sond. Obie metody są bardzo czułe, ale mogą prowadzić do fałszywie negatywnych prób w przypadku pojawienia się nowych genotypów, które zawierałyby mutacje w rejonach hybrydyzacji starterów lub sond, oraz do pomijania gatunków, jeśli ich występowanie jest wykluczane a priori. Celem pracy było zastosowanie sekwencjonowania metagenomów regionów V4 16S i D1 28S rDNA do równoległej detekcji patogenów bakteryjnych i eukariotycznych w izolatach DNA z krwi. Jako model wykorzystano izolaty DNA pochodzące od 100 jeży, które wcześniej zostały przebadane metodami konwencjonalnymi na obecność *Anaplasma* (Bacteria, Rickettsiales) i *Babesia* (Eukaryota, Apicomplexa). Rejony V4 i D1 były amplifikowane w osobnych reakcjach z wykorzystaniem indeksowanych starterów fuzyjnych. Amplikony były sekwencjonowane z wykorzystaniem systemu IonTorrent PGM. Analizę sekwencji przeprowadzono za pomocą narzędzi w programach Geneious R10 i QIIME i baz danych GenBank i Greengenes. Ogółem w wyniku sekwencjonowania uzyskano ok. 2,64 mln odczytów w zakresie od ok. 100 do 114 tys. na próbę; mediana = 14 684. W izolatach zidentyfikowano DNA bakterii należących do *Anaplasma*, *Bartonella* i *Borrelia*, które wcześniej były notowane u jeży, ale również nienotowane dotąd *Coxiella*, *Franciscella*, *Rickettsia* i *Rickettsiella*. *Anaplasma* i *Babesia* zostały wykryte w większej liczbie prób niż w przypadku zastosowania metod konwencjonalnych.

Most conventional methods for the detection of pathogenic microorganisms rely on target-specific PCR involving specific PCR primers or probes (qPCR). Although these methods have proven to be sensitive, they could result in false negatives when new genotypes appear that have mutation in the priming/probe site or when the occurrence of a given pathogen is a priori excluded. To resolve this problem, we propose the NGS sequencing of hypervariable V4 16S and D1 28S rDNA regions for parallel detection of pathogenic bacteria and protists, respectively. One hundred hedgehogs' blood samples, that have been screened for *Anaplasma* (Bacteria, Rickettsiales) and *Babesia* (Eukaryota, Apicomplexa) using conventional methods, were subjected for two separate PCR reactions each using indexed universal primers allowing rDNA amplification in bacteria and eukaryotes. The amplicons were sequenced with Ion Torrent PGM System. Sequences were analyzed using tools implemented in Geneious R10 and QIIME and OTU were compared to GenBank and Greengenes databases. In total, 2,639,878 reads were analyzed, ranging from ca. 100 to 114,000 for each sample (median=14,684). Using this approach, we have identified positive samples for *Anaplasma*, *Bartonella* and *Borrelia* – pathogenic bacteria that have been already noted in hedgehogs. Moreover, additional pathogenic taxa that have not been reported in hedgehogs so far, i.e. *Coxiella*, *Franciscella*, *Rickettsia* and *Rickettsiella*, also were detected. The new approach appears to be more sensitive



than conventional methods because we found more positive samples for *Anaplasma* and *Babesia* than were detected by PCR and qPCR, respectively.

## Genomowe zróżnicowanie populacji endofitów koniczyny białej z około 100-letniej hałdy cynkowo-ołowiowej Bolesław

Genomic diversity of white clover endophytes population from 100-yrs old zinc-lead Bolesław waste heap

Ewa Oleńska<sup>1</sup>, Wanda Małek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

<sup>2</sup>Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Zwałowiska (hałdy) cynkowo-ołowiowe stanowią skrajnie niekorzystne siedlisko dla organizmów z powodu deficytu wody, niedoboru składników mineralnych oraz wysokiego stężenia jonów metali ciężkich, głównie cynku i ołowiu. Hałdy jako siedliska antropogeniczne, są zróżnicowane pod względem właściwości fizyko-chemicznych oraz czasu powstania. Stara, 70-100-letnia hałda Zn-Pb Bolesław jest naturalnym stanowiskiem koniczyny białej (*Trifolium repens*) i jej endofitów, a metale ciężkie obecne w industrioziemiu hałdy mogą być czynnikiem selekcji organizmów, ograniczającym ich zmienność genetyczną. Celem pracy było określenie poziomu polimorfizmu populacji *R. leguminosarum* bv. *trifolii* pochodzącej z brodawek korzeniowych *T. repens*, rosnącej na hałdzie Bolesław w odniesieniu do populacji kontrolnej (łąka w Bolestraszczykach) na podstawie profili DNA uzyskanych metodami ERIC- i REP-PCR. W oparciu o polimorfizm genomowy badanych bakterii metodą ERIC-PCR stwierdzono niższą zmienność ryzobiów z hałdy Bolesław ( $h=0,889$ ) w porównaniu z kontrolną populacją bakterii ( $h=0,992$ ), i statystycznie istotne zróżnicowanie pomiędzy badanymi populacjami ( $F_{ST}=0,162$ ;  $p=0,008$ ). Wśród 73 szczepów (39 pochodzących ze stanowiska kontrolnego i 34 z hałdowego) wyodrębniono 47 genomotypów. 34 genomotypy były reprezentowane przez szczepy kontrolne, natomiast 13 przez szczepy pochodzące ze stanowiska hałdowego. Na podstawie analizy polimorfizmu genomowego endofitów koniczyny białej metodą REP-PCR poziom zmienności genomowej populacji hałdowej był niższy ( $h=0,89$ ) w porównaniu z populacją kontrolną ( $h=0,99$ ), i obie populacje były istotnie statystycznie zróżnicowane ( $F_{ST}=0,180$ ;  $p=0,000$ ). W obu populacjach w oparciu o marker REP wyodrębniono 46 genomotypów; 26 w populacji kontrolnej, zaś 20 w populacji hałdowej. Nie stwierdzono genomotypów wspólnych dla obu badanych populacji przy użyciu obu markerów genomowych.

Southern Poland calamine waste-heaps are highly disadvantageous areas because of water and nutrient deficits and high heavy metal content, mainly zinc and lead. Waste-heaps as anthropogenic transformed areas are highly heterogeneous according to physico-chemical conditions and the time of their origin. 70-100-yrs old Zn-Pb Bolesław waste-heap is inhabited by a natural origin white clover (*T. repens*) and its microsymbionts, and present there heavy metals may act as a selection factor, diminishing the genomic diversity of organisms. The aim of this study was to determine the level of the genomic diversity of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* population derived from root nodules of *T. repens* growing in Bolesław waste-heap in comparison to control population derived from Bolestraszyce grassland using the ERIC- and REP-PCR techniques. The ERIC-PCR DNA fingerprinting method indicated the lower genomic diversity of bacterial waste-heap population ( $h=0.889$ ) in comparison to control population ( $h=0.992$ ) as well as a genomic dissimilarity of both analyzed populations ( $F_{ST}=0.162$ ;  $p=0.008$ ). Among 73 analyzed rhizobium strains (39 derived from control area and 34 from polluted one) 47 various genotypes were determined; 34 of them were represented by strains from control area, and 13 ones by strains derived from waste-heap. REP-PCR fingerprinting method showed a lower genomic polymorphism within Bolesław rhizobium

population ( $h=0.89$ ) in relation to control one ( $h=0.99$ ) as well as a significant genomic differences between the studied populations ( $F_{ST}=0,180$ ;  $p=0,000$ ). Forty six genotypes were founded in both rhizobium populations, 20 in Bolesław and 26 in Bolestraszyce one. By two DNA fingerprinting techniques, i.e. ERIC- and REP-PCR no common genotypes for both studied populations were detected.

## Relacje pomiędzy strukturą genetyczną a zdrowotnością na przykładzie drzewostanów dębowych na Płycie Krotoszyńskiej

Relationships between genetic structure and healthiness – case study of oak stands in Krotoszyn Plateau

Tomasz Oszako<sup>1</sup>, Dzmitry Voitka<sup>2</sup>, Katarzyna Anna Kubiak<sup>1</sup>, Miłosz Tkaczyk<sup>1</sup>, Małgorzata Gorzkowska<sup>3</sup>, Anna Tereba<sup>3</sup>, Lassaâd Belbahri<sup>4</sup>, Justyna Anna Nowakowska<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Forest Protection, Forest Research Institute, Braci Leśnej 3, Sękocin Stary 05-090, Poland

<sup>2</sup>Institute of Plant Protection, 2 Mira Street, Priluki BY-223011, Minsk District, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Laboratory of Molecular Biology, Forest Research Institute, Braci Leśnej 3, Sękocin Stary 05-090, Poland

<sup>4</sup>University of Neuchâtel, Rue Emile Argand 11, 2009 Neuchâtel, Switzerland

T.Oszako@ibles.waw.pl

Monitorowanie zdrowotności dębów przeprowadzono w latach 2013-2016 w 3 nadleśnictwach: Krotoszyn, Piaski i Karczma Borowa (RDLP Poznań). Wykazano korelacje pomiędzy syntetycznym wskaźnikiem uszkodzenia (SYN), odzwierciedlającym defoliację i żywotność, a liczbą alleli (całkowitą i obserwowaną). W latach 2013-2016, zaobserwowano spadek liczby gatunków *Phytophthora* w ryzosferze gleby (na podstawie metody NGS). Po 8 zabiegach lotniczych (opryski koron fosforynami) wykazano poprawę 7 z 8 badanych parametrów drobnych korzeni. Struktura genetyczna badanych drzewostanów dębowych, oszacowana za pomocą markerów chloroplastowych DNA wykazała, że zdrowotność drzewostanów poprawia się wraz ze wzrostem ich różnorodności genetycznej. Zaleca się stosowanie fosforynów w drzewostanach dębowych zagrożonych patogenicznymi gatunkami *Phytophthora*.

The monitoring of oak healthiness was conducted in central-western Poland from the ground in years 2013 - 2016. Generally, the statistically positive significant correlations was found between synthetic index of damage (SYN), reflecting defoliation and vitality, and the number of alleles (total and observed ones). The number of *Phytophthora* species in soil rhizosphere (evaluated with NGS method) showed a constant decrease within the years 2013 - 2016. Trials with phosphites showed that 7 of 8 fine root parameters were improved after aerial treatments. The genetic structure of 3 investigated oak stands assessed with chloroplast DNA markers revealed that healthiness of oaks is growing with the increase of genetic diversity. The use of phosphites in oak stands endangered by *Phytophthora* genus is recommended.

## **Analiza molekularna potencjału symbiotycznego gleb na przykładzie mikrosymbiontów łubinu**

Molecular analysis of soil symbiotic potential on the example of lupine microsymbionts.

Krzysztof Pudełko, Dorota Narożna, Joanna Króliczak, Cezary Mądrzak

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Biochemii i Biotechnologii, ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań

Łubiny wytwarzają efektywne brodawki korzeniowe w symbiozie z bakteriami rodzaju *Bradyrhizobium*, mogą być także brodawkowane przez słabo dotąd scharakteryzowane szybko rosnące rizobia. Powstanie efektywnych układów symbiotycznych roślin bobowatych z rizobiami uwarunkowane jest występowaniem w glebie rdzennych szczepów bakterii zdolnych do brodawkowania rośliny gospodarza oraz odpowiedniej liczebności populacji tych bakterii. Informacje o występowaniu i strukturze populacji bakterii w glebach uprawnych są ważne z praktycznego punktu widzenia, ponieważ mogą być podstawą do racjonalnego stosowania preparatów szczepionkowych zawierających mikrosymbionty uprawianych roślin. Obecnie najpowszechniej stosowanym sposobem określania obecności i liczebności populacji mikrosymbiontów bobowatych w glebie jest metoda biotestów. Podejście to, jakkolwiek dające wiarygodne i powtarzalne rezultaty, jest bardzo prac- i czasochłonne (wymaga ok. 4 tygodniowej uprawy roślin w warunkach szklarniowych).

Rozwój metod biologii molekularnej i zwiększająca się dostępność informacji o sekwencjach DNA pozwala na opracowanie szybkich i stosunkowo tanich metod badania liczebności i składu populacji mikroorganizmów glebowych w oparciu o analizy DNA izolowanych bezpośrednio z roztworów glebowych. W prezentowanej pracy podjęto próbę opracowania metody szybkiej identyfikacji mikrosymbiontów łubinu w glebie z wykorzystaniem sekwencji nukleotydowych genów symbiotycznych (*nodA*, *nodC*, *nodD* i *nodZ*) ponad czterdziestu własnych izolatów bradyrizobiów uzyskanych z brodawek łubinów, a także ponad 2000 innych sekwencji zdeponowanych w bazach danych. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość przeprowadzenia pełnej analizy (od pobrania próbek gleby do oceny liczebności obecnych w nich populacji bradyrizobiów zdolnych do brodawkowania łubinów) w czasie 1-2 dni. Zastosowanie opracowanej metody pozwala także na równoległą analizę nawet kilkudziesięciu próbek gleby.

Lupines can produce effective root nodules in symbiosis with bacteria of the genus *Bradyrhizobium* and can also be nodulated by poorly characterized fast growing rhizobia. The emergence of effective symbiotic systems of legume plants is conditioned by the presence of indigenous bacterial species in the soil capable of nodulating the host plant and the appropriate population size of these bacteria. Information on the occurrence and structure of bacterial populations in cultivated soils is important from a practical point of view as it may be the basis for the rational use of microbial inoculants containing microsymbions of cultivated plants. At present, the most commonly used method of determining the presence and abundance of microsymbiont populations in soil are the biotests based on bacterial most probable number (MPN) determination. This method, although giving reliable and reproducible results, is very laborious and time consuming (requires about 4 weeks of greenhouse cultivation).

The development of molecular biology methods and the increasing availability of DNA sequence information allow for the development of fast and relatively inexpensive methods for studying the abundance and composition of soil microbial populations based on DNA analysis directly isolated from soil solutions. In the presented work, an attempt was made to develop a method for the rapid identification of lupine microsymbionts in soil using the nucleotide sequences of symbiotic genes (*nodA*, *nodC*, *nodD*, and *nodZ*) of more than forty own

*Bradyrhizobium* isolates obtained from lupine nodules and more than 2000 other sequences deposited in databases. The results show the possibility of the full analysis (from soil sampling to assessment the abundance of *Bradyrhizobium* populations capable of lupins nodulation present in the field) within 1-2 days. The use of the developed method allows also simultaneous analysis of up to several dozen soil samples.

Praca została w części sfinansowana ze środków NCBiR, projekt nr PBS3/A8/28/2015  
o akronimie SEGENMAS.

## **Metagenomy grzybów glebowych towarzyszących siewkom sosny (*Pinus sylvestris* L.) w szkółkach leśnych i odnowieniu naturalnym**

Metagenomic analysis of fungal communities associated with roots of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings from bare-root forest nurseries and natural regeneration stands

Maria Rudawska, Tomasz Leski, Leszek Karliński, Marcin Pietras

Instytut Dendrologii Polskiej Akademii Nauk, Pracownia Badania Związków Symbiotycznych, ul. Parkowa 5, 62-035 Kórnik, Polska

Materiał sadzeniowy przeznaczony do odnowień i zalesień pochodzi w Polsce przede wszystkim z gruntowych szkółek leśnych, produkujących sadzonki drzew i krzewów z odkrytym systemem korzeniowym. Dobrze rozwinięta symbioza mykoryzowa na etapie szkółki leśnej jest ważnym warunkiem wysokiej udatności przyszłych odnowień i zalesień. Mykoryzy zwiększają bowiem w znacznym stopniu zaopatrzenie sadzonek w wodę i składniki odżywcze, jak również stanowią naturalną barierę ochronną przed patogenami systemu korzeniowego.

Panuje przekonanie, że wieloletnie użytkowanie szkółki leśnej może negatywnie oddziaływać na zbiorowisko grzybów mykoryzowych i sprzyjać rozwojowi organizmów patogenicznych. Aby zweryfikować tę tezę wykonane zostały badania zbiorowisk grzybów glebowych występujących na kwaterach sosnowych w szkółkach leśnych użytkowanych od 20, 40 i 60 lat. Dzięki wykorzystaniu masowego sekwencjonowania metodą 454 (pirosekwencjonowanie) możliwe było określenie nie tylko zbiorowisk grzybów mykoryzowych, ale również saprobiontycznych oraz patogenicznych. Materiał badawczy stanowiło DNA wyizolowane z prób korzeniowych jednorocznych siewek sosny oraz z prób glebowych. Punktem odniesienia były siewki i gleba z naturalnego odnowienia sosny. Łącznie w szkółkach leśnych i odnowieniu naturalnym stwierdzono obecność 917 grzybowych operacyjnych jednostek taksonomicznych (tzw. OTUs). Ogólna liczba OTUs grzybowych w szkółkach o różnym wieku była zbliżona i wynosiła odpowiednio: 294 w szkółce 20-letniej, 293 w szkółce 40-letniej i 317 w szkółce 60-letniej. Czas użytkowania szkółki nie wpływał również na liczbę OTUs grzybów ektomykoryzowych oraz saprobiontycznych w nich występujących. Łącznie we wszystkich szkółkach odnotowano obecność 91 OTUs grzybów mykoryzowych oraz 184 OTUs grzybów saprobiontycznych (odpowiednio: 47 i 101 w szkółce 20-letniej, 52 i 98 w szkółce 40-letniej oraz 47 i 99 w szkółce 60 letniej). Tylko bogactwo gatunkowe grzybów patogenicznych było związane z czasem użytkowania szkółki. Najwyższą liczbę OTUs grzybów patogenicznych (34) stwierdzono w szkółce najstarszej a najniższą w szkółce użytkowanej najkrócej (24). W trakcie badań wykazano także, że niezależnie od wieku szkółki próby glebowe zawsze odznaczały się wyższym bogactwem gatunkowym grzybów niż próby korzeniowe. Porównanie szkółek leśnych i odnowienia naturalnego wykazało, że liczba OTUs grzybowych występujących w tych dwóch środowiskach była podobna (580 vs 585), ale tylko 248 z nich było wspólnych dla obu środowisk.

Przeprowadzone badania pozwoliły na negatywne zweryfikowanie powszechnie panującego poglądu, że długotrwałe użytkownie szkółki leśnej może w sposób zasadniczy prowadzić do zubożenia zbiorowisk grzybów mykoryzowych, niezwykle istotnego elementu produkcji szkółkarskiej.

Scots pine seedlings used in standard reforestation and afforestation programs are in Poland predominantly produced in bare-root forest nurseries. Nursery managers have long recognized the importance of well-developed mycorrhizas for healthy seedling growth in the nursery and desired performance after outplanting.

However, it is still unclear if intensive and long lasting nursery practices (fertilization, irrigation, mechanical and chemical weed, and pest control) influence the diversity of root associated fungal communities. The objective, therefore was to evaluate the composition of fungal communities inhabiting Scots pine seedling roots and surrounding bulk soil in bare-root forest nurseries in Poland being under cultivation for 20, 40 and 60 years. Naturally regenerated pine seedlings originating from clear-cuts of nearby forests has been used as a reference. We used next-generation sequencing (454 pyrosequencing) to determine whether the composition of fungal communities (saprotrophic, pathogenic, mycorrhizal) differed among three forest bare-root nurseries. A special emphasis in our studies has been done to ectomycorrhizal (ECM) fungi. In total 917 operational taxonomic units (OTUs) of fungi has been obtained from all roots and soil samples. The number of OTUs from nursery samples (580) was very similar to that from the clear cuts (585). Among those, 46 and 52 OTUs of ECM fungi were found exclusively from nursery or clear cut samples, respectively, and 45 were common to both sample types. Unexpectedly the number of overall fungal (293-317) and ECM OTUs (47-52) appeared very comparable between nurseries of different age. The most abundant OTUs detected in forest nurseries belonged to *russula-lactarius*, *amanita*, *inocybe*, *tomentella-thelephora*, *meliniomyces*, *wilcoxina* and *terfezia-peziza* lineages. *Suillus-rhizopogon* OTUs were found exclusively in nurseries and *elaphomyces* OTUs in clear-cuts. In conclusion, this study highlights for the first time, through 454 pyrosequencing, the richness and diversity of the fungal communities in forest nurseries and demonstrate that even long lasting silvicultural practices in the nursery does not lead to the impoverishment of ECM community.



## Zastosowanie metody NGS w ocenie mikrobioty jelita grubego u pacjentów z cukrzycą

Use of the NGS method in evaluation of the colon microbiota in patients with diabetes

Dominika Salamon, Agnieszka Sroka – Oleksiak, Małgorzata Bulanda, Tomasz Gosiewski.

Katedra Mikrobiologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Dzięki analizie sekwencji 16S rRNA zidentyfikowano już kilkaset gatunków bakterii ekosystemu jelitowego, z których większość nie daje się hodować. Celem badania były: 1) ocena składu jakościowego i ilościowego mikrobiota jelita grubego pacjentów z cukrzycą typu 1 (T1DM, n = 22) i typu 2 (T2DM, n = 23) hospitalizowanych w Klinice Chorób Metabolicznych UJ CM w Krakowie oraz osób z grupy kontrolnej (K, n= 22) z wykorzystaniem jednej z metod NGS - SBS (sequencing by sythesis), 2) próba ustalenia związku danych uzyskanych z badania mikrobiologicznego z danymi klinicznymi osób chorych. Materiał: Badaniu poddano DNA izolowane z próbek kału. NGS przeprowadzono na platformie MiSeq (Illumina) w Ośrodku Genomiki MedycznejOMICRON UJCM. Wyniki: Na poziomie phylum we wszystkich grupach dominują bakterie należące do Firmicutes (> 77%). Tylko odsetek bakterii należących do Bacteroidetes różnił się statystycznie istotnie w grupie T2DM w stosunku do grupy K oraz do T1DM ( p = 0,006), a na poziomie genus - bakterii m.in. należących do Roseburia (p=0,006). Różnica istotnie statystyczna między T2DM a K oraz T1DM a T2DM dotyczyła m.in. bakterii należących do rodzaju Bacteroides (p=0,01). Stwierdzono związek bakterii należących do rodzaju: *Faecalibacterium*, *Collinsella*, *Parvimonas*, *Bulleidia* z odsetkiem hemoglobiny glikowanej u osób z grupy T2DM (korelacja ujemna,  $0,5 \leq R < 0,7$ ), a także związek bakterii należących do rodzaju *Bifidobacterium* ze stężeniem cholesterolu HDL zarówno w grupie T1DM jak i T2DM (korelacja dodatnia,  $0,3 \leq R < 0,5$ ). Wnioski: 1) statystycznie istotne różnice w odsetku bakterii stwierdzono głównie między grupami T2DM i K oraz na niższych poziomach taksonomicznych, 2) metoda NGS z wykorzystaniem regionu V3 i V4 genu kodującego 16S rRNA pozwoliła na identyfikację 125 rodzajów bakterii należących do mikrobiota jelita grubego, z czego większość nie poddaje się hodowli, 3) powyższe wyniki stanowią przesłankę do poszerzenia badań w tym zakresie, celem opracowania w przyszłości zindywidualizowanej terapii dla chorych z cukrzycą, opartej na modyfikacji składu mikrobiota jelitowej, jako nowego sposobu kontrolowania glikemii.

Badanie finansowane ze środków NCN w ramach grantu naukowego SONATA, nr DEC-2011/03/D/NZ5/0055.

More and more scientific data indicate that the gastrointestinal flora plays a vital role in the course of numerous diseases, including metabolic disorders. Through analysis of 16S rRNA sequence, several hundred species of intestinal ecosystem bacteria have already been identified, the majority of which cannot be cultured. The objective of the study is: 1) to evaluate the qualitative and quantitative composition of the colon microbiota in patients with type 1 (T1DM, n = 22) and type 2 (T2DM, n = 23) diabetes, hospitalized at the Department of Metabolic Diseases, Jagiellonian University Medical College, Kraków and people from the control group (C, n = 22) using one of the NGS methods - sequencing by synthesis, 2) an attempt to establish a link between data obtained from microbiological testing of the clinical data of patients. The material examined was DNA isolated from fecal samples NGS was performed on the MiSeq platform (Illumina) at the Centre for Medical GenomicsOMICRON JU MC. Results: On the phylum level, in all groups, bacteria belonging to Firmicutes (>77%) definitely prevail. Whereas only the percentage of bacteria belonging to Bacteroidetes statistically significantly differed in T2DM as compared to C and to T1DM (p=0.006). On the genus level: bacteria belonging to, among others, Roseburia (p=0.006). The statistically significant difference

between T2DM and C as well as T1DM and T2DM concerned, among others, bacteria belonging to the genus *Bacteroides* ( $p=0.01$ ). A relationship was found between bacteria belonging to the genera *Faecalibacterium*, *Collinsella*, *Parvimonas*, and *Bulleidia* and the proportion of glycated hemoglobin in people with T2DM (negative correlation,  $0.5 \leq R < 0.7$ ), as well as a relationship between bacteria belonging to the genus *Bifidobacterium* with the concentration of HDL cholesterol in both T1DM and T2DM groups (positive correlation,  $0.3 \leq R < 0.5$ ). Conclusions: 1) Statistically significant differences in the percentage of bacteria were found mainly between the T2DM and C groups and on the lower taxonomic levels, 2) NGS using regions V3 and V4 of the gene encoding 16S rRNA allowed to identify 125 bacterial types making up the colon microbiota, the majority of which is not subjected to culture, 3) The above results are a good reason to expand research in this field in order to develop future individualized therapy for patients with diabetes based on modifying the intestinal microbiota composition, as a new method for controlling the blood glucose level.

The study was supported by National Science Centre in Poland in the framework of research grant, no. DEC-2011/03/D/NZ5/00551.

## **Wykorzystanie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) regionów zmiennych genu 16S rDNA do oceny struktury zespołów mikroorganizmów z nalodzi na przedpolu lodowca Werenskiolda, Spitsbergen**

Application of next-generation sequencing of 16S rDNA gene for evaluation of microbial community structure from water of glacier naled ice form on Werenskioldbreen, Svalbard

Sławomir Sułowicz<sup>1</sup>, Kinga Bondarczuk<sup>1</sup>, Dariusz Ignatiuk<sup>2</sup>, Zofia Piotrowska-Seget<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Mikrobiologii, ul Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

<sup>2</sup>Uniwersytet Śląski, Wydział Nauk o Ziemi, Katedra Geomorfologii, ul. Będzińska 60, 41-200 Sosnowiec

Nalodzia to struktury lodowe w kształcie kopuły czy stożka formowane przed czołem lodowca powstające w trakcie sezonu akumulacyjnego w wyniku szybkiego zamarzania wody wypływającej spod lodowca. Niektóre z lodowców, jak lodowiec Werenskiolda na Spitsbergenie, posiadają wewnątrz rozwinięty system kanałów, które odprowadzają wodę powstałą z topnienia lodowca. Kanały te mogą funkcjonować jako niezależne elementy systemu, co stwarza możliwość badań zespołów mikroorganizmów zasiedlających wody podlodowcowe w zależności od lokalizacji kanału czy właściwości fizykochemicznych wody przez nie transportowane.

Do badań wykorzystano wodę pobraną z nalodzi zlokalizowanych w trzech różnych zlewniach na przedpolu lodowca Werenskiolda. Część prowadzonych badań obejmowała ocenę struktury zespołów mikroorganizmów z wody podlodowcowej przy użyciu techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS) regionów zmiennych genu 16S rDNA. Uzyskane wyniki wskazują, że zespoły mikroorganizmów różniły się w zależności od miejsca poboru próbek, a wysoka czułość przeprowadzonych analiz pozwoliła wskazać, które z badanych kanałów funkcjonują jako niezależne elementy systemu odprowadzania wody spod lodowca. Badania były prowadzone w ramach polskiej wyprawy naukowej organizowanej przez Uniwersytet Śląski i Centrum Studiów Polarnych oraz wspieranej przez Polską Stację Polarną Hornsund na Spitsbergenie.

Glacier naled ice are dome- or cone-shaped ice bodies formed in front of glaciers during the accumulation season. They form as a consequence of the rapid refreezing of subglacial meltwater seepage. Some glaciers, like Werenskioldbreen in Svalbard, have well-developed subglacial drainage systems. Moreover, their channels may not be connected to each other and transport subglacial water independently with various content of minerals. It provides an unique opportunity to study the microbial community of subglacial water dependent on their physicochemical properties and/or channel origin.

Studied water samples were collected from three different catchments located in Werenskioldbreen forefield. A part of our study involved determination of the structure of microbial communities from water of glacier naled ice using next-generation sequencing of 16S rDNA gene. Obtained data revealed that microbial community differed dependent on channels and indicated which channels function as an independent part of the glacier drainage system. This activity was a part of polish scientific expedition organized by The University of Silesia and Center for Polar Studies with support from Polish Polar Station in Hornsund, Svalbard.

**Bioróżnorodność taksonomiczna endofitów korzeniowych *Salicornia europaea* L. pochodzących z dwóch zasolonych stanowisk badawczych**

Taxonomic diversity of *Salicornia europaea* L. root endophytes isolated from two saline test sites

Sonia Szymańska<sup>1</sup>, Luigimaria Borruso<sup>2</sup>, Lorenzo Brusetti<sup>2</sup>, Piotr Hulisz<sup>3</sup>,  
Katarzyna Hrynkiewicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika,  
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń, email: [hrynk@umk.pl](mailto:hrynk@umk.pl)

<sup>2</sup>Faculty of Science and Technology, Free University of Bozen/Bolzano, Piazza Università 5,  
39100 Bolzano, Italy

<sup>3</sup>Katedra Gleboznawstwa i Kształtowania Krajobrazu, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń

Bioróżnorodność bakterii endofitycznych kształtowana jest przez liczne czynniki np. genotyp rośliny, stadium jej rozwoju lub warunki środowiska. Zasolenie gleb uznawane jest za istotny czynnik negatywnie wpływający na liczebność i bioróżnorodność bakterii występujących w środowisku.

W przeprowadzonym doświadczeniu założono, że halotolerancyjne i halofilne endofity kolonizujące tkanki *Salicornia europaea* wykształciły mechanizmy adaptacyjne, które umożliwiają im bytowanie w tak wymagającym środowisku.

Celem przeprowadzonych badań było oznaczenie różnorodności taksonomicznej endofitów korzeniowych *S. europaea* na dwóch stanowiskach badawczych różniących się poziomem zasolenia z wykorzystaniem analizy metagenomowej wykonanej w oparciu o region V3-V4 16S rDNA.

Wykazano, że endofity dominujące na obu stanowiskach należały do typów: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Actinobacteria, Chloroflexi, Acidobacteria, Verrucomicrobia, OD1, Chlamydiae, TM7 i Fibrobacteres. Różnorodność taksonomiczną endofitów *S. europaea* w największym stopniu determinował genotyp rośliny, zaś parametry fizyko-chemiczne gleby ryzosferowej (przede wszystkim zasolenie) wpływały na frekwencję identyfikowanych rodzajów bakterii.

Biodiversity of endophytic bacteria is determined by numerous factors such as plant genotype, development stage of plant or environmental conditions. Soil salinity is considered as an important factor which negatively affects the abundance and biodiversity of bacteria occurring in the environment.

In the experiment were assumed that halotolerant and halophilic endophytes colonizing *Salicornia europaea* tissues developed adaptive mechanisms that allow them to live in such demanding environment.

The aim of the study was to determine the taxonomic diversity of *S. europaea* root endophytes isolated from the two research sites with different salinity level based on metagenomic analysis of the V3-V4 16S rDNA gene region.

The dominant endophytes at both sites belonged to the following phylum: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Actinobacteria, Chloroflexi Acidobacteria, Verrucomicrobia, OD1, Chlamydiae, TM7 and Fibrobacteres. The taxonomic diversity of *S. europaea* endophytes was mainly determined by genotype of plant, while physicochemical parameters of the rhizosphere soil (primarily salinity) influenced the frequency of identified bacterial phylum.

## Metagenomiczna analiza *Bacteroidetes* w glebach Lubelszczyzny

Metagenomic analysis of *Bacteroidetes* in soils from Lubelskie Province

Agnieszka Wolińska<sup>1</sup>, Agnieszka Kuźniar<sup>1</sup>, Urszula Zielenkiewicz<sup>2</sup>, Dariusz Izak<sup>2</sup>  
Zofia Stępniewska<sup>1</sup>, Mieczysław Błaszczak<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biochemii i Chemii Środowiska,  
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Instytut Biotechnologii  
ul. Konstantynów 1 I, 20-708 Lublin, e-mail: awolin@kul.pl

<sup>2</sup>Zakład Biochemii Drobnoustrojów,  
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-206 Warszawa

<sup>3</sup>Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Celem pracy była analiza metagenomiczna bakterii należących do *Bacteroidetes* zasiedlających gleby rolnicze na tle nieużytków rolnych (gleby kontrolne), dzięki której wyznaczono wrażliwość tej grupy bakterii na rolnicze użytkowanie gleb. Przeanalizowano dwanaście gleb rolniczych (A) i taką samą liczbę gleb nieużytkowanych rolniczo, stanowiących kontrole (C). Biorąc pod uwagę genezę powstawania gleb przypisano je do trzech grup: (1) autogenicznych – ukształtowanych na podłożu lessowym (FAO: *Albic Luvisols*, *Haplic Luvisols*, *Brunic Arenosols*), (2) hydrogenicznych – wykształconych pod wpływem stagnującej wody (*Haplic Chernozem*, *Mollic Gleysol*, *Gleyic Umbrisol*) oraz litogenicznych – powstałych na podłożu wapiennym (*Calcaric Cambisols*).

Skład bakterii należących do typu *Bacteroidetes* analizowano z zastosowaniem techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS) IonTorrent™ (Ion PGM™, Life Technologies). Sekwencje grupowano w operacyjne jednostki taksonomiczne (OTU) na podstawie 99% podobieństwa. Otrzymano średnio 2516 OTU należących do *Bacteroidetes* w glebach kontrolnych i 1568 OTUs w glebach rolniczo użytkowanych. Wykazano, że zarówno na stanowiskach rolniczych jak i kontrolnych dominują bakterie z rodzaju *Flavobacterium*, zaś subdominantami się przedstawiciele rodzajów: *Pedobacter* i *Mucilaginibacter*. Przeprowadzone badania wykazały, że poza praktykami rolniczymi, także geneza gleby stanowi istotny czynnik warunkujący liczebność *Bacteroidetes*.

The aim of the study was to determine the *Bacteroidetes* community structure in arable soils versus wastelands in order to assess their sensitivity to agricultural soil usage. Twelve arable soils (A) and the same number of wastelands, serving as controls (C), were grouped on the basis of the soil origin as: (1) autogenic (AG) – formed from loess material (FAO: *Albic Luvisols*, *Haplic Luvisols*, *Brunic Arenosols*), (2) hydrogenic (HG) – formed under the influence of stagnant water (*Haplic Chernozem*, *Mollic Gleysol*, *Gleyic Umbrisol*) and (3) lithogenic (LG) – formed from limestone (*Calcaric Cambisols*).

The composition of *Bacteroidetes* was analysed with the next generation sequencing Ion Torrent™ technology. The sequences were clustered into OTUs based on a 99% similarity threshold. An average of 2516 OTUs belonging to *Bacteroidetes* per C soil and 1568 OTUs per A soils were evidenced. It was found that *Flavobacterium* was the dominant genus in both C and A soils; however, its numbers significantly decreased in A soils, which proves its sensitivity to agricultural practices. *Pedobacter* and *Mucilaginibacter* were subdominants. Our results emphasised that, besides agricultural practices, soil genesis is an essential factor for the abundance of *Bacteroidetes*.

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2013/09/D/NZ9/02482.

## Grzyby jako wskaźnik jakości środowiska

### Fungi as bioindicators of environmental quality

Marta Wrzosek, Alicja Okraśńska, Łukasz Istel, Julia Pawłowska

Zakład Filogenetyki Molekularnej i Ewolucji, Wydział Biologii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych,  
Uniwersytet Warszawski, ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa

Zdanie, że miasto jest generalnie uboższym siedliskiem niż tereny wiejskie należy do znanych stereotypów. Porównania przyrodnicze terenów wiejskich oraz miejskich terenów zielonych nie pozwalają na tak jednoznaczne stwierdzenia. Wiadomo, że pszczoły na terenach miejskich radzą sobie z reguły lepiej niż w wielu obszarach użytkowanych rolniczo, ze względu na brak oprysków pestycydami (Werner 2016). Tereny miejskie są często środowiskowo znacznie bardziej urozmaicone, co przekłada się na ilość nisz ekologicznych dostępnych dla bezkręgowców i grzybów. Monitoring zanieczyszczeń powietrza przez skalę porostową jest wykorzystywany od ponad 25 lat, więc grzyby mają już swój wkład w wyznaczanie standardów czystości powietrza. Wydawać by się mogło, że tereny miejskie powinny na niekorzyść odstawać w tej kategorii od środowisk wiejskich, jednak przeczy temu praca poświęcona porostom miejskiego rezerwatu jakim jest Las Bielański w Warszawie (Kubiak i wsp. 2010). Warto wyraźnie podkreślić, że to nie liczba taksonów w danym siedlisku jest cechą świadczącą o jego jakości, ale dobór taksonów czy też ich względna rzadkość. Jak twierdzi Gams (2007), przynajmniej 400 grzybów glebowych można uznać za kosmopolityczne, a ich brak w środowisku uznaje wyłącznie za pochodną szczególnych ekologicznych preferencji, które jeszcze nie zostały przez naukowców wyjaśnione. Marfenina (1999) postuluje by uznać obecność *Umbelopsis rammaniana* za wskaźnik obszarów o znikomej antropopresji. Teza niniejszej prezentacji jest następująca – za wskaźniki wartości przyrodniczej obszarów należy uznać te grzyby, które są powiązane ekologicznymi związkami z rzadkimi, często trudnymi do obserwacji, organizmami oraz te grzyby, których obecność wskazuje na specyficzne cechy mikrosiedliska.

The stereotype that city environment is generally poorer in comparison to rural area is well known. The biological comparison of green spaces located in countryside and in urban area do not justify these theories. It is known that bees are often more successful in cities than in countryside due to the lack of pesticides (Werner 2016). There are more ecological niches for invertebrates and fungi as the environment in the city may be more complex. Further, the lichens are used as bioindicators for more than 25 years. The observations of fruticulose species are used as standard indicating unpolluted air. The work by Kubiak et al. (2010) shows that even in a big European capital, the green space could be extremely rich in lichen species and that air pollution is not the main factor influencing quality of environment. It is worth to underline, that it is not the abundance of species, but their rarity and mycocenosis composition that could be a good measure of high quality environment. Gams (2007) stated that more than 400 species of soil microfungi are cosmopolitan, and their distribution is driven by some obscure factors. Marfenina (1999) indicated *Umbelopsis rammaniana* as a species typically present in undisturbed areas. Concluding, bioindicators of environment quality should be either fungi which are associated with rare species or fungi that are indicators of unusual ecological niche.

# POSTERY





## Postery

1. Anna Banach, Sławomir Ciesielski, Aleksandra Ziemińska-Buczyńska, Charakterystyka metagenomu bakteryjnego komory fermentacyjnej w zmiennych warunkach termicznych.....57
2. Anna Banach, Mariusz Tomaszewski, Grzegorz Cema, Aleksandra Ziemińska-Buczyńska, Analiza metagenomiczna zbiorowiska bakteryjnego prowadzącego proces anammox w sekwencyjnym reaktorze biologicznym .....58
3. Joanna Banasiewicz, Tomasz Stępkowski, Analiza populacyjna bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* występujących w glebach na obszarze południowo-wschodniej Brazylii.....59
4. Wiesław Barabasz, Anna Pikulicka, Właściwości promieniowców izolowanych z gleb Bieszczadzkiego Parku Narodowego.....60
5. Grzegorz Bazylak, Magdalena Twarużek, Robert Kosicki, Iwona Ałtyn, Jan Grajewski, Anna Gryn-Rynko, Anna Przybylska, Marcin Siepak, Monitoring of patulin, trace elements and micronutrients in dried fruits and inflorescences of hawthorn (*Crataegus spp.*) harvested in various areas of Poland.....62
6. Nina Bilińska-Wielgus, Magdalena Frąc, Karolina Oszust, Agata Gryta, Charakterystyka profilu metabolicznego grzybów ciepło-opornych z rodzaju *Neosartorya*.....63
7. Agata Borowik, Karolina Oszust, Jadwiga Wyszowska, Różnorodność funkcjonalna zbiorowisk grzybów w glebie zanieczyszczonej olejem napędowym.....64
8. Barbara Breza-Boruta, Magdalena Kroplewska, Agata Bartkowiak, Skład mikrobiomu aerozolu biologicznego w powietrzu wokół obiektów gospodarki komunalnej.....65
9. Aleksandra Bukalska, Anita Swatek, Magdalena Staszczak, Aktywność proteasomów 26S *Trametes versicolor* w warunkach działania związków tiolowych i stresu oksydacyjnego .....66
10. Maria J. Chmiel, Dobrosława Zachara, Ocena wpływu wybranych herbicydów w badaniach in vitro na promieniowce z rodzaju *Streptomyces* izolowane ze środowiska glebowego.....68
11. Matteo Conti, Julien Crovadore, Bastien Cochard, Romain Chablais, Mauro Jermini, Tomasz Oszako, François Lefort, *Pseudomonas putida* i *Trichoderma harzianum* w ochronie biologicznej kasztana przed rakiem wywołanym przez *Gnomoniopsis smithogilvyi* .....69
12. Matteo Conti, Julien Crovadore, Bastien Cochard, Romain Chablais, Mauro Jermini, Tomasz Oszako, Justyna Anna Nowakowska, François Lefort, Molekularna analiza *Gnomoniopsis smithogilvyi*, patogenicznego endofita podkładek i zrzędów sześciu odmian kasztanów (*Castanea sativa* L.) .....70
13. Matteo Conti, Julien Crovadore, Bastien Cochard, Romain Chablais, Joana Beatrice Meyer, Mauro Jermini, Justyna Anna Nowakowska, François Lefort, Molekularna identyfikacja *Gnomoniopsis smithogilvyi* i *Cryphonectria parasitica* w tkankach *Castanea sativa*.....71
14. Magdalena Frąc, Karolina Oszust, Jerzy Lipiec, Bogusław Usowicz, Ocena struktury zbiorowisk grzybów w glebach uprawnych o różnym uwilgotnieniu z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji.....72
15. Krzysztof Frączek, Dariusz Ropek, Karol Bulski, Jacek Grzyb, Aerozole bakteryjne i grzybowe w środowisku parków Krakowa.....73

16. Bliss Furtado, Marcin Gołębiowski, Monika Skorupa, Jarosław Tyburski, Katarzyna Hryniewicz, Wpływ czynników środowiskowych i przestrzennych na endofity grzybowe *Salicornia europaea*.....74
17. Karolina Furtak, Anna M. Gajda, Różnorodność funkcjonalna mikroorganizmów glebowych pod uprawą pszenicy ozimej w różnych systemach uprawy roli.....75
18. Anna M. Gajda, Karolina Furtak, Określenie zmian w środowisku glebowym w zależności od stosowanego systemu uprawy roli przy zastosowaniu metod standardowych oraz technik molekularnych.....76
19. Agnieszka Galus-Barchan, Iwona Paśmionka, Bioróżnorodność populacji glebowej – badania i metody analizy molekularnej.....77
20. Anna Gałązka, Karolina Gawryjołek, Jarosław Grządziel, Magdalena Frąc, Jerzy Książak, Ocena bioróżnorodności strukturalnej i funkcjonalnej mikroorganizmów w glebie spod uprawy kukurydzy w długoletniej monokulturze.....78
21. Anna Gałązka, Karolina Gawryjołek, Jarosław Grządziel, Profil metaboliczny i bioróżnorodność strukturalna jako wskaźnik jakości gleb użytkowanych rolniczo.....79
22. Natalia Gierasimiuk, Marcin Stocki, Tomasz Oszako, Działanie lotnych związków organicznych (VOCs) produkowanych przez bakterie z rodzaju *Bacillus* na grzyby z rodzaju *Fusarium* .....80
23. Weronika Goraj, Anna Pytlak, Anna Szafranek-Nakonieczna, Zofia Stępniewska, Wstępna analiza metagenomiczna społeczności mikroorganizmów zasiedlających podziemną biosferę Wieliczki.....81
24. Ewa Beata Górka, Wojciech Stępień, Anna Walkiewicz, Anna Wąsowska, Jakub Dobrzyński, Dariusz Gozdowski, Bioróżnorodność Procaryota w glebie pod uprawą roślin w monokulturze i przy różnym zmianowaniu.....82
25. Agata Gryta, Karolina Oszust, Jacek Panek, Anna Siczek, Giorgia Pertile, Magdalena Frąc, Aktywność enzymów zaangażowanych w szlak degradacji celulozy oraz stopień jej wykorzystania przez grzyby *Petriella setifera*.....83
26. Jarosław Grządziel, Anna Gałązka, Zastosowanie metody sekwencjonowania NGS do określenia mikrobiomu rdzeniowego różnych typów gleb.....85
27. Jacek Grzyb, Krzysztof Frączek, M. Olbryt, Jakość mikrobiologiczna biomasy używanej jako paliwo.....86
28. Agnieszka Hanaka, Jolanta Jaroszuk-Ścisiel, Ewa Ozimek, Małgorzata Majewska, Anna Słomka, Andrzej Plak, Piotr Zagórski, Małgorzata Wójcik, Sławomir Dresler, Grupy fizjologiczne mikroorganizmów gleb ryzosferowych Spitsbergenu.....87
29. Monika Elżbieta Jach, Ewa Sajnaga, Skład i funkcja mikrobiomu jelitowego na podstawie badań metagenomowych.....89
30. Agnieszka Jamiołkowska, Beata Hetman, Marek Kopacki, Barbara Skwaryło-Bednarz, Różnorodność populacji *Colletotrichum coccodes* w świetle badań morfologicznych i genetycznych.....90
31. Jolanta Jaroszuk-Ścisiel, Grzegorz Janusz, Artur Nowak, Renata Tyśkiewicz, Ewa Ozimek, Małgorzata Majewska, Anna Słomka, Metabolizm endofitycznych szczepów *Fusarium culmorum* a typ interakcji z rośliną.....91
32. Jolanta Joniec, Joanna Bednarz, Rafał Cierpiąta, Wpływ systemu uprawy na aktywność drobnoustrojów czynnych w przemianach C i N w glebie pod uprawą jęczmienia.....93
33. Michał Kalita, Wanda Małek, Sylwia Wdowiak-Wróbel, Monika Marek-Kozaczuk, Magdalena Wójcik, Filogenetyczny dowód transferu genów symbiotycznych między bakteriami glebowymi rodzaju *Bradyrhizobium* i *Rhizobium*.....94

34. Izabela Lidia Kałucka, Zalesione zwałowiska pogórnice jako refugia rzadkich gatunków grzybów makroskopowych.....95
35. Teresa Kornilłowicz-Kowalska, Kamila Rybczyńska-Tkaczyk, Ocena aktywności ligninolitycznej mutantów szczepu *Bjerkandera adusta* CCBAS 930.....96
36. Donata Kosicka-Dziechciarek, Agnieszka Wolna-Maruwka, Jacek Dach, Magdalena Szczech, Ocena przydatności odpadów organicznych do namnażania antagonistycznych szczepów *Trichoderma* sp.....97
37. Karolina Kotowicz, Justyna Boniecka, Anna Goc, Grażyna Barbara Dąbrowska, Ekspresja genów RSH zaangażowanych w proces odpowiedzi ścisłej u rzepaku (*Brassica napus* L.) pod wpływem czynników stresowych.....99
38. Monika Koziół, Stefan Martyniuk, Ocena przydatności metod ITS-PCR i sekwencjonowania genu 16S rRNA w genotypowaniu *Azotobacter chroococcum*.....100
39. Magdalena Larska, Julia Kęsik-Maliszewska, Aleksandra Antos, Analiza zmienności genetycznej wirusa Schmallenberg (SBV) u przeżuwaczy i w muchówkach z rodzaju *Culicoides* spp. w Polsce .....101
40. Tomasz Lech, Identyfikacja zagrożenia mikrobiologicznego wybranych obiektów kolekcji etnograficznej, zgromadzonej przez Benedykta Dybowskiego w latach 1879 – 1883, z wykorzystaniem metod biologii molekularnej.....102
41. Anna Lisek, Lidia Sas Paszt, Paweł Trzciński, Selekcja oraz identyfikacja szczepów bakterii glebowych o potencjalnym zastosowaniu w bioremediacji gleb.....104
42. Anna Litwin, Cezary Tkaczyk, Sylwia Różalska, Wpływ insektycydu Decis na aktywność metaboliczną grzybów entomopatogennych.....105
43. Małgorzata Łyszcz, Anna Gałązka, Metagenomowa analiza bakterii zasiedlających liście różnych odmian szybkorosnących drzew *Paulownia* sp.....107
44. Małgorzata Majewska, Jolanta Jaroszuk-Ściseł, Artur Nowak, Ewa Ozimek, Anna Słomka, Renata Tyśkiewicz, Ekstrakcja Cd i związków kompleksujących Fe(III) z powierzchni korzeni żyta (*Secale cereale*) i kostrzewy owczej (*Festuca ovina*).....108
45. Stefan Martyniuk, Monika Koziół, Występowanie i liczebności bakterii wiążących N<sub>2</sub> w glebach Polski.....110
46. Artur Nowak, Jolanta Jaroszuk-Ściseł, Iwona Komaniecka, Adrian Wiater, Grzegorz Janusz, Renata Tyśkiewicz, Ewa Ozimek, Małgorzata Majewska, Anna Słomka, Zróżnicowanie składu monomerów cukrowych egzopolimerów syntetyzowanych przez glebowe i ryzosferowe szczepy *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. i *Penicillium* spp.....111
47. Alicja Okraśńska, Julia Pawłowska, Przemysław Decewicz, Łukasz Dziewit, Łukasz Istel, Marta Wrzosek Grzyby: identyfikacja morfologiczna czy metabarkoding – która z metod sprawdza się lepiej?.....113
48. Mirosław Onyszko, Martyna Śnioszek, Maciej Płatkowski, Arkadiusz Telesiński, Michał Stręk, Ocena oddziaływania napropamidu na aktywność enzymatyczną gleby w doświadczeniu polowym z nagietkiem lekarskim (*Calendula officinalis* L.).....114
49. Michał Oskiera, Urszula Smolińska, Grzegorz Bartoszewski, Zastosowanie NGS w analizach metapopulacji mykobiomu gleby po aplikacji biopreparatów w uprawie sałaty.....115
50. Tomasz Oszako, Dzmitry Voitka, Miłosz Tkaczyk, Sławomir Lipiński, Małgorzata Gorzkowska, Anna Tereba, Lassaâd Belbahri, Justyna Anna Nowakowska, Defoliacja jako stymulator infekcji *Phytophthora plurivora* na pędach brzozy.....116

51. Karolina Oszust, Jacek Panek, Giorgia Pertile, Anna Siczek, Marta Oleszek, Magdalena Frąć, Różnorodność kataboliczna i genetyczna izolatów *Petriella setifera* hodowanych na odpadach organicznych.....117
52. Ewa Ozimek, Jolanta Jaroszuk-Ścisieł, Piotr Sobiczewski, Lidia Sas-Paszt, Małgorzata Majewska, Anna Słomka, Synteza fitohormonu IAA przez rozpuszczający fosforany (PSM) glebowy szczep *Pseudomonas luteola* .....118
53. Jacek Panek, Karolina Oszust, Magdalena Frąć, Analiza metagenomiczna odpadów jabłkowych z uprawy ekologicznej.....119
54. Iwona Paśmionka, Agnieszka Galus-Barchan, Ocena bioróżnorodności i dynamiki populacji drobnoustrojów w osadzie czynnym z wykorzystaniem metod molekularnych.....120
55. Elżbieta Patkowska, Marcela Krawiec, Zbiorowiska mikroorganizmów w glebie spod uprawy grochu (*Pisum sativum* L.) po zastosowaniu Trianum P i ekstraktu z *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel.....121
56. Anna Pawlik, Grzegorz Janusz, Magdalena Frąć, Marta Ruminowicz-Stefaniuk, Andrzej Mazur, Jerzy Wielbo, Wpływ podłoża trocinowego na profil metaboliczny *Cerrena unicolor*.....122
57. Giorgia Pertile, Magdalena Frąć, Karolina Oszust, Jerzy Lipiec, Bogusław Usowicz, Metagenomy grzybowe gleb wzbogaconych odpadową materią organiczną.....123
58. Stanisław Jerzy Pietr, Teresa Lewicka, Małgorzata Patrycja Oksińska, Elżbieta Grażyna Magnucka, Wpływ pszenżyta w monokulturze a bioróżnorodność drobnoustrojów w glebach.....124
59. Maciej Płatkowski, Arkadiusz Telesiński, Martyna Śnioszek, Porównanie oddziaływania wybranych substancji ropopochodnych na aktywność pirofosfatazy nieorganicznej w glebie ciężkiej.....125
60. Małgorzata Poniewozik, Konrad Wołowski, Kritsana Duangjan, Czynniki inicjujące zakwity wód z zbiornikach wodnych.....126
61. Anna Pytlak, Anna Szafranek-Nakonieczna, Agnieszka Wolińska, Natalia Łopacka, Adam Kubaczyński, Zofia Stępniewska, Magdalena Frąć, Karolina Oszust, Analiza metaboliczna konsorcjum metanotroficznego.....127
62. Dariusz Roman Ropek, Krzysztof Frączek, Krzysztof Pawlak, Wpływ pola elektromagnetycznego na grzyby owadobójcze.....128
63. Joanna Sajewicz-Krukowska, Katarzyna Domańska-Blicharz, Technologia NGS jako skuteczne narzędzie w identyfikacji i charakterystyce patogenów drobiu.....129
64. Anna Siczek, Jerzy Wielbo, Dominika Kidaj, Zróżnicowanie genetyczne rizobiów zasiedlających brodawki bobiku-wpływ lipochitooligosacharydów.....131
65. Marta Siebyła, Dorota Hilszczańska, Katarzyna Sikora, Aleksandra Rosa-Gruszecka, Hanna Szmidla, Zbiorowiska bakterii glebowych związanych z truflą letnią (*Tuber aestivum* Vittad.).....132
66. Agnieszka Sroka-Oleksiak, Dominika Salamon, Małgorzata Bulanda, Tomasz Gosiewski, Kompleksowa detekcja oraz identyfikacja bakteryjnego DNA we krwi pacjentów z sepsą i u zdrowych osób metodą sekwencjonowania nowej generacji.....133
67. Justyna Sulej, Aleksandra Drab, Grzegorz Janusz, Jerzy Rogalski, Badania przesiewowe oraz identyfikacja molekularna grzybów *Ascomycota* zdolnych do produkcji dehydrogenazy celobiozowej.....135
68. Anna Szafranek-Nakonieczna, Anna Pytlak, Weronika Goraj, Agnieszka Wolińska, Magdalena Frąć, Karolina Oszust, Katarzyna Larwa, Zofia Stępniewska, Analiza

- metaboliczna i metagenomiczna konsorcjów metanotroficznych pochodzących z gleb o różnej genezie.....136
69. Michał Szelań, Joanna Banasiewicz, Małgorzata Peszka, Tomasz Stępkowski, Zastosowanie metod metagenomicznych w procesie identyfikacji bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* zakażających rośliny należące do plemion Genisteae i Loteae.....137
70. Agata Święciło, Zastosowanie testu opartego na parametrach wzrostu mutantu sod1 drożdży *S. cerevisiae* w środowisku hipertonicznym do badania właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów roślinnych.....138
71. Małgorzata Tartanus, Eligio Malusá, Barbara Helena Łabanowska, Artur Mischczak, Fabiana Russo, Andrea Ceci, Oriana Maggi, Anna Maria Persiani, Mikrobiologiczna biodegradacja i fitoakumulacja jako możliwa strategia zmniejszenia zanieczyszczenia DDT w glebach ekologicznych gospodarstw.....139
72. Małgorzata Tartanus, Eligio Malusa, Barbara Helena Łabanowska, Cezary Tkaczuk, Loredana Canfora, Flavia Pinzari, Skuteczność i wpływ na środowisko grzybów entomopatogenicznych stosowanych w ochronie roślin sadowniczych.....140
73. Arkadiusz Telesiński, Łukasz Węgrzynowski, Michał Stręć, Analiza oddziaływania nadtlenu wapnia na aktywność wybranych enzymów oksydoredukcyjnych w glebie lekkiej skażonej przepieczonym olejem silnikowym.....141
74. Arkadiusz Telesiński, Kornel Curyło, Robert Biczak, Barbara Pawłowska, Porównanie oddziaływania 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych cieczy jonowych z anionem tetrafluoroboranowym na aktywność oksydazy o-difenolowej w glebie.....142
75. Dominika Thiem, Marcin Gołębiowski, Katarzyna Hryniewicz, Trójczynnikiowa interakcja symbiotyczna olszy czarnej (*Alnus glutinosa* L. Gaertn.) w warunkach stresu solnego..143
76. Anna Tomkowiak, Jerzy Szukała, Justyna Starzyk, Wpływ systemów uprawy roli na aktywność fosfataz w glebie pod uprawą łubinu wąskolistnego .....144
77. Renata Tyśkiewicz, Jolanta Jaroszuk-Ścisła, Elżbieta Patkowska, Grzegorz Janusz, Artur Nowak, Małgorzata Majewska, Anna Słomka, Cechy ryzosferowych szczepów *Trichoderma* spp. warunkujące mykopasożytnicze oddziaływanie w stosunku do patogenicznych szczepów *Fusarium* spp.....145
78. Anna Węgrzyn, Viviane Radl, Andrés Sauvêtre, Korneliusz Miksch, Peter Schröder, Wpływ diklofenaku oraz sulfametoksazolu na różnorodność bakterii endofitycznych izolowanych z miskanta.....147
79. Magdalena Wypij, Patrycja Golińska, Taksonomiczna różnorodność promieniowców acidofilnych kierunkiem w poszukiwaniu nowych metabolitów.....148
80. Małgorzata Zielińska, Joanna Banasiewicz, Hanna Rekosz-Burlaga, Tomasz Stępkowski, Identyfikacja metodami metagenomicznymi, izolacja z gleby i wstępna charakterystyka molekularna przedstawicieli *Myxococcales*.....149

## Charakterystyka metagenomu bakteryjnego komory fermentacyjnej w zmiennych warunkach termicznych

Characteristic of bacterial metagenome in fermentation chamber during temperature shift

Anna Banach<sup>1</sup>, Sławomir Ciesielski<sup>2</sup>, Aleksandra Ziemińska-Buczyńska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Politechnika Śląska, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Katedra Biotechnologii Środowiskowej Akademicka 2, 44-100 Gliwice

<sup>2</sup>Uniwersytet Warmińsko – Mazurski w Olsztynie, Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska, Słoneczna 45G, 10-719 Olsztyn

Fermentacja metanowa jest procesem stosowanym na szeroką skalę podczas stabilizacji odpadów oraz osadów ściekowych. Proces ten wymaga koegzystencji i współpracy grup różnych gatunków mikroorganizmów beztlenowych, które biorą udział w szeregu przemian biochemicznych, których końcowym produktem jest biogaz. Wiedza na temat związku pomiędzy parametrami fizykochemicznymi procesu oraz składem jego biomasy jest niezbędna dla optymalizacji pracy reaktora oraz lepszego poznania samego procesu. Celem badań była charakterystyka metagenomiczna zbiorowiska bakteryjnego podczas zmiany warunków termicznych z mezofilowych (38 °C) na termofilowe (55 °C) w komorze fermentacji metanowej. Analiza składu biocenozy bakteryjnej była możliwa dzięki zastosowaniu sekwencjonowania metagenomowego opartego o gen kodujący 16S rRNA. Pomimo tego, że temperatura jest jednym z kluczowych parametrów wpływających na proces fermentacji metanowej, wyniki wskazują na brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy składem biocenozy bakteryjnej procesu mezofilowego a termofilowego. Dominującymi gromadami w przypadku każdej z badanych temperatur były *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* oraz *Bacteroidetes*. Temperatura miała najsilniejszy wpływ na proces fermentacji zaraz po rozpoczęciu okresu termofilowego. Dodatkowo, proces termofilowy charakteryzował się większą produkcją biogazu, jak i większą średnią zawartością metanu w produkowanym biogazie.

Methane fermentation is a method that is widely used for excessive sludge stabilisation and organic waste disposal during wastewater treatment. The process is carried out by a variety of anaerobic microorganisms. More information about the connection between anaerobic digestion parameters and composition of the microbial community involved in the anaerobic digestion process is required to gain a better understanding bioreactor functions. The aim of this study was to analyse the composition of microbial community during the shift from mesophilic (38 °C) to thermophilic (55 °C) conditions during biogas production. The total microbial composition was examined via the metagenomic approach based on 16S rRNA gene sequencing. Even though temperature is one of the crucial parameters affecting microorganisms involved in the anaerobic digestion process, the results revealed that there were no statistically significant differences in microbial community composition between the mesophilic and thermophilic phases of the process. The most abundant phyla were found to be *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes*. The temperature had the strongest impact on the methanogens in the fermentation chamber directly after implementing the temperature shift. A relatively higher biogas yield and average content of CH<sub>4</sub> in the produced biogas were observed under thermophilic conditions.

## **Analiza metagenomiczna zbiorowiska bakteryjnego prowadzącego proces anammox w sekwencyjnym reaktorze biologicznym**

Metagenomics of microbial community performed anammox process in the sequencing batch reactor

Anna Banach, Mariusz Tomaszewski, Grzegorz Cema, Aleksandra Ziemińska-Buczyńska

Politechnika Śląska, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Katedra Biotechnologii Środowiskowej  
Akademicka 2, 44-100 Gliwice

Proces anammox (ang. anaerobic ammonium oxidation) jest procesem konwersji azotu amonowego oraz azotynowego do azotu cząsteczkowego, przeprowadzanym przez bakterie anammox należące do typu *Planctomycetes*. Obecnie stosowany jest on w wielu oczyszczalniach ścieków na świecie, z uwagi na efektywność deamonifikacji ścieków oraz niższe koszty prowadzenia procesu w porównaniu do tradycyjnych technik biologicznego usuwania związków azotu. Celem przedstawionych badań była analiza struktury metagenomowej zbiorowiska bakteryjnego prowadzącego proces anammox w sekwencyjnym reaktorze biologicznym. Zastosowanie sekwencjonowania metagenomowego opartego o gen kodujący 16S rRNA pozwoliło na określenie dokładnego składu badanej biocenozy w próbkach pobranych z czterech różnych okresów badawczych: początku pracy reaktora, okresu wpracowania procesu w reaktorze, okresu stabilnej pracy reaktora oraz okresu po zaburzeniach odczynu w reaktorze. Wiedza na temat składu oraz bioróżnorodności biocenozy mikroorganizmów uczestniczących w procesie anammox jest niezbędna dla lepszego zrozumienia samego procesu, a także pomocna w optymalizacji prowadzenia procesu w systemach oczyszczania ścieków w bardziej opłacalnych warunkach.

Prezentowane badania finansowane przez NCN, grant nr: UMO-2013/09/D/NZ9/02438.

Biological anaerobic ammonium oxidation (anammox) is a process of ammonium and nitrite conversion into dinitrogen gas. Process is performed by anammox bacteria belonging to the phylum *Planctomycetes*. Anammox process has been widely applied in the many wastewater treatment plants as a cost-effective and sustainable process of ammonium removal. The aim of this study was to analyse the composition of the microbial community performing anammox process carried out in the sequencing batch reactor. Metagenomic approach application with 16S rRNA coding gene allowed to examine microbial composition in the samples taken at four different experimental phases: beginning of the reactor start-up, end of the reactor start – up, stable reactor operation and the phase after pH drop in the reactor. The characteristics of the microorganisms involved in anammox process and knowledge about their composition and biodiversity are required for better understanding of bioreactor functioning. Moreover, may be helpful in optimizing the process in wastewater treatment systems in more cost effective conditions.

Studies were founded by NCN, grant no.: UMO-2013/09/D/NZ9/02438.

## **Analiza populacyjna bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* występujących w glebach na obszarze południowo-wschodniej Brazylii**

Population analysis of bacteria of the *Bradyrhizobium* genus inhabiting the soils of south-eastern Brazil

Joanna Banasiewicz, Tomasz Stępkowski

Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa  
iapedus1989@gmail.com

Badania prowadzone w ostatnim czasie wykazały znaczenie izolacji geograficznej w skali całego kontynentu jako czynnika grupującego izolaty *Bradyrhizobium* w obrębie drzew filogenetycznych genów symbiotycznych. Biorąc pod uwagę trwającą przez ponad 120 milionów izolację geograficzną Ameryki Południowej oraz fakt, iż kraina neotropikalna jest miejscem występowania najbardziej zróżnicowanej na świecie flory Fabaceae, to właśnie bariery geograficzne wpływające na rozprzestrzenianie się Fabaceae oraz radiacja adaptacyjna w obrębie tej rodziny, zdają się mieć decydujący wpływ na ewolucję rodzaju *Bradyrhizobium* na tym obszarze. Oba te czynniki przyczyniły się do powstania wysoce zróżnicowanych społeczności *Bradyrhizobium*, o strukturze których wiemy nadal stosunkowo niewiele. Biorąc pod uwagę ograniczenia metod klasycznej mikrobiologii, które w przypadku badań nad ryzobiami oparte są wyłącznie na charakterystyce molekularnej i filogenetycznej szczepów pochodzących z brodawek korzeniowych, zdecydowaliśmy się na zastosowanie metod metagenomicznych polegających na amplifikacji genu *nifD* na matrycy DNA izolowanego bezpośrednio z próbek gleby pobranych w południowo-wschodniej Brazylii. W tym przypadku, badania metagenomiczne stanowią uzupełnienie metod klasycznych opartych o technikę MLSA (z ang. *multilocus sequence analysis*).

Recent studies revealed the importance of geographic isolation on a continental scale as a factor defining the grouping pattern in *Bradyrhizobium* symbiotic gene phylogenetic trees. Given that South America has remained in an almost complete geographical isolation for over 120 million years and the fact that the Neotropics is inhabited by the most diverse Fabaceae flora, these two factors – the geographical isolation and the diversity of Fabaceae flora may have played the pivotal role in the evolution of *Bradyrhizobium* genus in this area. Taking into account the limitations that are inherent to classical microbiology methods, which are restricted to the molecular and phylogenetic characterization of pure cultures of the root-nodule isolates, we have decided to use a metagenomic approach centred on amplification of *nifD* symbiotic gene on DNA templates isolated directly from soil samples that had been brought from south-eastern Brazil. In this case, metagenomic studies should be regarded as complementary to the classical methods based on MLSA (*multilocus sequence analysis*).



## Właściwości promieniowców wyizolowanych z gleb Bieszczadzkiego Parku Narodowego

Properties of actinomycetes isolated from the soils of the Bieszczady National Park

Wiesław Barabasz<sup>1</sup>, Anna Pikulicka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

<sup>2</sup>Państwowa Wyższa Szkoła Wschodnioeuropejska w Przemyślu

Promieniowce to jedna z najważniejszych grup drobnoustrojów glebowych uczestniczących w większości procesów przebiegających w tym skomplikowanym środowisku. Z wybranych gleb dominujących ekosystemów trawiastych Bieszczadzkiego Parku Narodowego wyizolowano 725 szczepów promieniowców i oznaczono ich przynależność systematyczną oraz oceniono właściwości fizjologiczne, biochemiczne i powiązania genetyczne. Badania taksonomiczne pozwoliły zaszeregować je do 6 rodzajów i 36 gatunków. Najliczniej reprezentowanymi gatunkami promieniowców glebowych (aż 70%) były gatunki należące do rodzaju *Streptomyces* i inne należące do rodzajów *Nocardia*, *Micromonospora*, *Actinomycetes*, *Actinoplanes* i *Streptosporangium*. Wyizolowane gatunki promieniowców posiadały szerokie uzdolnienia biochemiczne i fizjologiczne do wykorzystywania, jako źródło węgla i azotu różne związki organiczne i nieorganiczne. Czynniki fizyko-chemiczne wpływały w różny sposób na badane gatunki promieniowców. Temperatura, odczyn i promieniowanie UV miały największy wpływ na ich wzrost i rozwój. Reakcja promieniowców na pestycydy, metale ciężkie, mykotoksyny, antybiotyki i substancje oleiste była różna, w zależności od gatunku. Badane promieniowce posiadały uzdolnienia do wytwarzania enzymów, których aktywność była duża i zależała od rodzaju substratu. Ocena uzdolnień fizjologicznych i biochemicznych wykazała, że wyizolowane gatunki promieniowców, charakteryzują się wieloma cennymi właściwościami, które mogą być wykorzystane do różnych celów. Na uwagę zasługują ich zdolności do produkcji substancji antybiotycznych i możliwości wytwarzania licznych enzymów, a także uzdolnienia do degradacji pestycydów i życia w środowisku zawierającym duże stężenia metali ciężkich, soli, mykotoksyn, antybiotyków i olei. Różnorodność właściwości fizjologicznych i biochemicznych oraz produkcja substancji biologicznie czynnych stwarza możliwość ich wykorzystania w lecznictwie, rolnictwie, przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i biotechnologii.

Actinomycetes is one of the most important groups of soil microorganisms that participate in most processes in this complex environment. Of the selected soils of the dominant grass ecosystems of the Bieszczady National Park, 725 strains of actinomycetes were isolated and their systemic status was determined and their physiological, biochemical and genetic relationships were assessed. Taxonomic research allowed them to classify them into 6 genera and 36 species. The most representative species of actinomycetes (up to 70%) were species belonging to the genus *Streptomyces* and others belonging to the genus *Nocardia*, *Micromonospora*, *Actinomyces*, *Actinoplanes* and *Streptosporangium*. Isolated species of actinomycetes have broad biochemical and physiological capacities to use as a source of carbon and nitrogen various organic and inorganic compounds. Physico-chemical factors influenced the investigated species of actinomycetes in different ways. Temperature, reaction and UV radiation have had the greatest impact on their growth and development. The response of actinomycetes to pesticides, heavy metals, mycotoxins, antibiotics and oily substances was different, depending on the species. The investigated actinomycetes were capable of producing enzymes whose activity was high and depended on the type of substrate. Evaluation of physiological and biochemical abilities has shown that isolated species of actinomycetes are

characterized by many valuable properties that can be used for different purposes. Their ability to produce antibiotic substances and the ability to produce numerous enzymes, as well as the ability to degrade pesticides and living in high concentrations of heavy metals, salts, mycotoxins, antibiotics and oils, deserve attention. The diverse physiological and biochemical properties and the production of biologically active substances make it possible to use them in medicine, agriculture, pharmaceuticals, food and biotechnology

## Monitoring of patulin, trace elements and micronutrients in dried fruits and inflorescences of hawthorn (*Crataegus spp.*) harvested in various areas of Poland

Grzegorz Bazylak<sup>1</sup>, Magdalena Twarużek<sup>2</sup>, Robert Kosicki<sup>2</sup>, Iwona Altyń<sup>2</sup>,  
Jan Grajewski<sup>2</sup>, Anna Gryn-Rynko<sup>1</sup>, Anna Przybylska<sup>1</sup>, Marcin Siepak<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum, Faculty of Pharmacy, Department of Bromatology & Molecular Nutrition, Jagiellonska 13, PL – 85-067 Bydgoszcz, Poland; gbazylak@cm.umk.pl

<sup>2</sup>Kazimierz Wielki University, Faculty of Natural Sciences, Institute of Experimental Biology, Department of Physiology & Toxicology, Chodkiewicza 30, PL – 85-064 Bydgoszcz, Poland

<sup>3</sup>Adam Mickiewicz University, Faculty of Geographical & Geological Sciences, Department of Hydrogeology & Water Protection, Maków Polnych 16, PL – 61-066 Poznań, Poland

**BACKGROUND AND AIM:** Hawthorns commonly growing on the whole area of Poland are characterized by high species polymorphism causing that this shrubby plant is not easy to recognize and difficult in systematics [1]. Similarly, data on the microbial contamination and mycotoxins content in dried hawthorn inflorescences (HI) and fruits/berries (HF) harvested in Poland are still limited [2]. **MATERIALS AND METHODS:** Thus, representative samples of the HI and HF obtained from western, central and north-eastern regions of Poland were examined for numbers of aerobic mesophilic bacteria (APC), total moulds (NTM) and yeast (NTY), count of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* bacteria along with determination of 20 macro- and trace-elements, 5 inorganic anions, 5 organic acids, total polyphenols (TPC), total flavonoids (TFC), total antioxidant capacity (TAC) and patulin (PAT) content with SPE-UPLC-MS method. **RESULTS:** PAT was confirmed in the 100 % of analysed HF samples with mean content of  $10.45 \pm 6.32 \mu\text{g/kg}$  (range  $6.62 \div 25.9 \mu\text{g/kg}$ ). The highest mean PAT content ( $13.02 \mu\text{g/kg}$ ) was determined in the HF originated from western regions of Poland. Significantly lower mean amount of PAT as  $7.38$  and  $8.37 \mu\text{g/kg}$  was observed in these products supplied, respectively, from central and north-eastern regions of Poland. No statistically significant ( $p > 0.05$ ) correlations were observed between PAT content in the studied set of HF samples and their microbiological quality parameters APC (max  $6.3 \times 10^6$  cfu/g), NTM (max  $1.9 \times 10^4$  cfu/g), NTY (max  $3.4 \times 10^3$  cfu/g) as well as polyphenols TPC (range  $6.92 \div 1301.81$  mg CAE/100g), flavonoids TFC ( $9.56 \div 548.41$  mg CAE/100g), antioxidant capacity TAC (IC50 range  $0.526 \div 4.838$  mg Trolox/mg HF-DS), malic acid ( $113.53 \div 400.85$  mg/100g), chloride anions ( $1.85 \div 2.91$  mg/kg), sulphate anions ( $12.3 \div 19.7$  mg/kg), and microelements as Al ( $16.0 \div 38.6$  mg/kg), V ( $0.066 \div 0.248$  mg/kg), Co ( $0.135 \div 0.245$  mg/kg), Fe ( $20.1 \div 47.9$  mg/kg), Ni ( $0.677 \div 1.353$  mg/kg), Cu ( $11.2 \div 25.7$  mg/kg), Cd ( $0.002 \div 0.015$  mg/kg), Ba ( $8.1 \div 42.4$  mg/kg), As ( $0.027 \div 0.052$  mg/kg) and Sr ( $10.4 \div 25.2$  mg/kg). **CONCLUSIONS:** The highest concentration of PAT revealed for some analyzed here HF samples ( $25.9 \text{ mg/kg}$ ) exceed near 2.5-fold the maximum level of  $10 \mu\text{g/kg}$  acceptable for this mycotoxin in fruits and fruit-based foodstuffs which could be used for children, infants and convalescent people in UE countries. The 90% contamination prevalence of PAT in the HF samples in Poland reached alarming level as compared to the range of 7.7 to 32.0% reported earlier for similar fruits in China [3-5]. Thus, the further surveillance study should be recommended as the occurrence of PAT in HF samples could be dependent on many still not fully recognized physical factors and chemical characteristics intrinsic for variety of hawthorn species. **REFERENCES:** [1] Soltys-Lelek A., Gruszka W., *Biodiv. Res. Conserv.*, 2016, 43, 27-40; [2] Przybylska A., Bazylak G., *Post. Mikrobiol.*, 2013, 52 (Supl.1), 116; [3] Zhou Y. et al., *J. Sep. Sci.*, 2012, 35, 641-649; [4] Xiang L. et al., *World Mycotoxin J.*, 2012, 5, 31-36; [5] Li F. et al., *J. AOAC Int.*, 2007, 90, 167-172.

## Charakterystyka profilu metabolicznego grzybów ciepło-opornych z rodzaju *Neosartorya* The metabolic characterization of heat-resistant *Neosartorya* fungi

Nina Bilińska-Wielgus, Magdalena Frąc, Karolina Oszust, Agata Gryta

Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin  
m.frac@ipan.lublin.pl, n.bilinska@ipan.lublin.pl

Grzyby *Neosartorya* zaliczane są do grzybów termoopornych, które mogą stanowić zagrożenie dla produktów przetwarzanych termicznie w przetwórstwie rolno-spożywczym. Zastosowanie specjalistycznych płytek Biolog FF w celu charakterystyki profilu metabolicznego może przyczynić się do opracowania metod zapobiegających rozwojowi tych mikroorganizmów.

Celem podjętych badań była ocena profilu katabolicznego 42 szczepów *Neosartorya* wyizolowanych z gleby oraz z truskawek pochodzących z plantacji zlokalizowanych w województwach lubelskim i mazowieckim (kolekcja Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej, IA PAN) oraz dwóch szczepów wzorcowych zakupionych z kolekcji NBRC (Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation). Badania miały na celu porównanie wykorzystywania poszczególnych źródeł węgla przez badane szczepy oraz znalezienie zależności pomiędzy nimi. Opracowanie statystyczne obejmowało przeprowadzenie analizy skupień opierającej się na ocenie podobieństw i różnic w katabolizmie poszczególnych substratów węglowych przez badane szczepy grzybów.

Wyniki analizy skupień w zakresie uzdolnień do zużywania poszczególnych substratów pozwoliły określić najbardziej i najmniej intensywnie wykorzystywane związki przez poszczególne szczepy grzybów. Najaktywniej zużywanymi źródłami węgla były: D-trehaloza, sacharoza, D-mannoza, D-fruktoza, gentiobioza,  $\alpha$ -D-glukoza, D-melezytoza,  $\beta$ -metylo-D-glukozyd oraz turanoza. Natomiast najslabiej wykorzystywane były: L-fruktoza,  $\alpha$ -cyklodestyna, kwas fumarowy, kwas acetamidooctowy, alaninamid oraz kwas  $\beta$ -hydroksymasłowy. Najbardziej aktywnymi szczepami były szczepy wzorcowe oraz dziewięć szczepów z kolekcji LMMiŚ. Najchętniej zużywanym substratem była D-trehaloza, która jest magazynowana w zarodnikach workowych powstających na drodze rozmnażania płciowego (askosporach). Trehaloza jest magazynowana zarówno u grzybów, jak i roślin w celu ochrony przed wysoką temperaturą oraz innymi niesprzyjającymi czynnikami środowiska.

*Neosartorya* fungi are classified as thermo-resistance fungi, which can pose a threat to products processed thermally. Biolog System was used to investigate ways to prevent the development of these microorganisms.

The aim of the study was to evaluate the catabolic profile of 42 *Neosartorya* strains isolated from soil and strawberries from plantations located in Lublin and Mazowieckie voivodships and two reference strains purchased from NBRC.

The most active carbon sources were D-Trehalose, Sucrose, D-Mannose, D-Fructose, Gentobiose,  $\alpha$ -D-Glucose, D-Melezitose,  $\beta$ -Methyl-D-Glucoside and Turanose. L-Fructose,  $\alpha$ -Cyclodextrin, Fumaric Acid, Acetamidacetic Acid, Alaninamide and  $\beta$ -Hydroxybutyrate were the least used. The most active strains were two reference strains and nine strains from the LMEM collection. The most commonly consumed substance was D-Trehalose, which is stored in the spores produced by sexual states (ascospores). Trehalose is stored as well as protected against high temperatures and other environmental factors.

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki (Polska), projekt: DEC-2012/07/D/NZ9/03357

## Różnorodność funkcjonalna zbiorowisk grzybów w glebie zanieczyszczonej olejem napędowym

Functional diversity of fungi communities in soil contaminated with diesel oil

Agata Borowik<sup>1</sup>, Karolina Oszust<sup>2</sup>, Jadwiga Wyszkowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

<sup>2</sup>Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie

agata.borowik@uwm.edu.pl

Zanieczyszczenie gleby produktami ropopochodnymi, w tym olejem napędowym, może zmieniać właściwości mikrobiologiczne gleby. W celu przeanalizowania wpływu oleju napędowego na różnorodność funkcjonalną grzybów wykonano badania modelowe trwające 260 dni. Wyizolowano z gleby i zidentyfikowano grzyby oraz oznaczono różnorodność funkcjonalną ich zbiorowisk. Grzyby identyfikowano metodą MALDI-TOF, a różnorodność funkcjonalną określono wykorzystując płytki FF PLATE<sup>®</sup> firmy Biolog z 95 źródłami węgla. Ponadto oznaczono dynamikę degradacji oleju napędowego.

Stwierdzono, że olej napędowy zmienia mikrobiom gleby. W glebie zanieczyszczonej dominowały grzyby z rodzaju *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Talaromyces*, *Microsporum*, *Fusarium*, *Aureobasidium*, *Candida* i *Trichosporon*. Nastąpiło przyspieszenie namnażania grzybów i zmniejszenie ich różnorodności. Największa różnorodność grzybów, na podstawie wskaźników bioróżnorodności: Average Well Color Development (AWCD) oraz Richness (R) wystąpiła w 60. dniu trwania badań, – a najmniejsza w 270. dniu. Spośród wszystkich źródeł węgla zbiorowiska grzybów najlepiej wykorzystywały: Tween 80, dekstrynę, glikogen,  $\alpha$ -cyklodestrynę,  $\beta$ -cyklodestrynę, a najslabiej: glukuronamid, kwas acetamidooctowy, alaninamid, 2-amino etanol oraz putrescynę. Olej napędowy ulegał sukcesywnej degradacji, ale jego pozostałości wykrywano jeszcze w 270 dniu od momentu zanieczyszczenia gleby.

Soil contamination with petroleum products, including diesel oil, can change the microbiological properties of soil. To analyse the effect of diesel oil on functional diversity of fungi, a 260-day study was carried out. Fungi was isolated from the soil and identified, and the functional diversity of their communities was determined. Fungi were identified by the MALDI-TOF method and the functional diversity was established using FF PLATE<sup>®</sup> microplates manufactured by Biolog with 95 carbon sources. Additionally, the dynamics of diesel oil degradation was determined.

It was found that diesel oil changes the soil microbiome. In the contaminated soil, fungi of the *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Talaromyces*, *Microsporum*, *Fusarium*, *Aureobasidium*, *Candida* and *Trichosporon* genera were prevalent. The fungi proliferation rate was increased and their diversity was lowered. The highest fungal diversity, measured by Average Well Color Development (AWCD) and Richness (R) biodiversity indices, was recorded on day 60 of the study and the lowest was on day 270. Out of all carbon sources, fungal communities used to the highest degree the following sources: Tween 80, Dextrin, Glycogen,  $\alpha$ -Cyclodextrin and  $\beta$ -Cyclodextrin, and to the lowest degree: Glucuronamide, Succinamic Acid, Alaninamide, 2-Amino Ethanol and Putrescine. Diesel oil was subject to gradual degradation, but its residues were detected even on day 270 after soil contamination.

## Skład mikrobiomu aerozolu biologicznego w powietrzu wokół obiektów gospodarki komunalnej

Microbiome composition of biological aerosol in the air around municipal facilities

Barbara Breza-Boruta<sup>1</sup>, Magdalena Kroplewska<sup>1</sup>, Agata Bartkowiak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Mikrobiologii i Technologii Żywności, <sup>2</sup>Katedra Gleboznawstwa i Ochrony Gleb, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy

Celem pracy było określenie poziomu stężenia i składu mikrobiologicznego bioaerozolu wokół wybranych kompostowni w woj. mazowieckim i kujawsko-pomorskim. Próbkę powietrza do analiz mikrobiologicznych pobierano przy użyciu impaktora typu MAS – 100 Eco<sup>TM</sup>. Diagnostykę bakterii dokonano za pomocą systemu VITEK<sup>®</sup> 2 oraz metodami molekularnymi przy użyciu real-time PCR, natomiast grzybów z wykorzystaniem kluczy mykologicznych. Z badań wynika, że w badanym bioaerozolu występowały potencjalnie patogeniczne bakterie *Staphylococcus aureus*, *S. auricularis*, *S. epidermidis*, *S. quorum*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Gardnerella vaginalis*, *Kocuria rosea* i inne. Wśród aerozolu bakteryjnego największy procentowy udział stanowiły ziarniaki gram dodatnie, a następnie pałeczki G+ i G-. Analizy mykologiczne wykazały obecność grzybów o właściwościach alergizujących i mykotoksynotwórczych takich jak: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium chrysogenum*, *P. expansum* and *P. notatum*. Mimo, że poziom stężenia mikroorganizmów w powietrzu wokół monitorowanych obiektów nie był wysoki to oznaczone gatunki stanowią zagrożenie dla środowiska oraz zdrowia okolicznych mieszkańców.

The aim of this study was to estimate the concentration level and microbiological composition of bioaerosol around some chosen composting plants in the Mazovian and Kuyavian-Pomeranian voivodeships. Air samples for microbiological analyses were collected with the compaction method using the Merck MAS – 100 Eco<sup>TM</sup> type impactor. Diagnostics of bacteria was made with the BioMerieux VITEK<sup>®</sup> 2 system and with the use of real-time PCR technique, whereas fungi were identified using mycological keys. The study indicates that the bioaerosol contained potentially pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*, *S. auricularis*, *S. epidermidis*, *S. quorum*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Gardnerella vaginalis*, *Kocuria rosea* and others. The highest percentage of bacterial aerosol comprised Gram-positive cocci, and then G+ and G- bacilli. Mycological analyses confirmed the presence in the studied air of fungi with potentially allergic and mycotoxinogenic properties, such as: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium chrysogenum*, *P. expansum* and *P. notatum*. Although the level of microorganism concentration in the air around the monitored facilities was not high, determined species may pose a threat to the environment and health of the local residents.

## **Aktywność proteasomów 26S *Trametes versicolor* w warunkach działania związków tiolowych i stresu oksydacyjnego**

Activity of the 26S proteasomes from *Trametes versicolor* exposed to thiol compounds and oxidative stress

Aleksandra Bukalska, Anita Swatek, Magdalena Staszczak

Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

*Trametes versicolor* należy do grzybów białej zgnilizny drewna (*Basidiomycetes*), produkujących enzymy ligninolityczne o istotnym potencjale biotechnologicznym. Wcześniejsze badania wskazywały na znaczącą rolę szlaku proteasomalnej degradacji białek wewnątrzkomórkowych w regulacji aktywności enzymów ligninolitycznych *T. versicolor*. Celem pracy było zbadanie wpływu wybranych związków tiolowych (zredukowanej formy glutationu, cysteiny i ditiotreitolu) oraz stresu oksydacyjnego (nadtlenu wodoru) na aktywności kompleksów proteasomowych 26S, izolowanych z *T. versicolor*. Multikatalityczne kompleksy proteolityczne - proteasomy 26S izolowano stosując metodę wielokrotnej ultrafiltracji, z użyciem membrany polieterosulfonowej BioMax PBVK (NMWL 500 kDa). Aktywności proteasomów badano stosując: analizę spektrofluorymetryczną, umożliwiającą ocenę stopnia rozkładu fluorogennych substratów peptydowych - odpowiednich dla każdej aktywności peptydazowej proteasomów 26S (Suc-LLVY-AMC dla aktywności chymotrypsynopodobnej, Z-GGR-AMC dla aktywności trypsynopodobnej i Z-LLE-AMC dla aktywności kaspazopodobnej) oraz analizę elektroforetyczną (SDS-PAGE), pozwalającą na obserwację procesu degradacji przez proteasomy 26S modelowego białka substratowego ( $\beta$ -kazeiny). Analiza spektrofluorymetryczna wykazała zahamowanie peptydazowych aktywności kompleksów proteasomowych 26S pod wpływem badanych związków tiolowych. Najsilniejszy efekt inhibicji obserwowano w przypadku ditiotreitolu. Aktywności chymotrypsynopodobna i trypsynopodobna były bardziej wrażliwe na działanie tych związków niż aktywność kaspazopodobna. Nie stwierdzono istotnego wpływu  $H_2O_2$  na aktywności peptydazowe proteasomów 26S, w przeciwieństwie do efektu działania związków tiolowych. Wyniki analiz elektroforetycznych tempa degradacji modelowego substratu białkowego były spójne z danymi uzyskanymi w odniesieniu do aktywności peptydazowych, oznaczanych przy wykorzystaniu analizy spektrofluorymetrycznej.

*Trametes versicolor* belongs to white rot fungi (*Basidiomycetes*) and is an efficient lignin degrader. This group of fungi has been studied mainly because of potential biotechnological applications of ligninolytic enzymes. Proteasome-mediated pathway responsible for degradation of intracellular proteins has been previously found to be involved in the regulation of ligninolytic activities of *T. versicolor*. The study presents the effect of thiol compounds (reduced glutathione, cysteine and dithiothreitol) and oxidative stress (hydrogen peroxide) on activity of 26S proteasome complexes isolated from *T. versicolor*. Multicatalytic 26S proteasome complexes were isolated using BioMax PBVK polyethersulfone ultrafiltration membranes (NMWL 500 kDa). Proteasome activities were analyzed both as the ability to hydrolyze fluorogenic peptide substrates (Suc-LLVY-AMC, Z-GGR-AMC and Z-LLE-AMC, for all three peptidase activities of proteasomes: chymotrypsin-like, trypsin-like, and caspase-like activity, respectively) and by SDS-PAGE. Electrophoretic analyses were performed with  $\beta$ -casein as a model protein substrate. Spectrofluorometric analyses revealed inhibitory effects of tested thiol compounds on peptidase activities of the 26S proteasomes, with the strongest inhibition by dithiothreitol. The chymotrypsin-like and trypsin-like activities were much more

affected by all of these compounds than the caspase-like activity. In contrast to the thiol compounds, hydrogen peroxide had not a significant influence on the peptidase activities. Electrophoretic analyses of effect of thiol compounds and oxidative stress on full-length protein ( $\beta$ -casein) degradation by the 26S proteasomes isolated from *T. versicolor* confirmed results obtained for peptidase activities.



## Ocena wpływu wybranych herbicydów w badaniach *in vitro* na promieniowce z rodzaju *Streptomyces* izolowane ze środowiska glebowego

Evaluation of the influence of selected herbicides in *in vitro* studies on actinomycetes belonging to genus *Streptomyces* isolated from the soil environment

Maria J. Chmiel, Dobrosława Zachara

Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu herbicydów Stomp 330EC, Orkan 350SL oraz Roundup ultra 170SL na wzrost promieniowców z rodzaju *Streptomyces* w warunkach *in vitro*.

Analizy mikrobiologiczne gleb uprawnych, łąkowych, leśnych i zdegradowanych wykonano metodą seryjnych rozcieńczeń oznaczając w nich średnią liczebność promieniowców. Testy wrażliwości wybranych losowo promieniowców na herbicydy wykonano metodą dyfuzyjno-studzienkową stosując preparaty w dawkach odpowiadających stężeniom roboczym oraz połowie stężenia zalecanego przez producenta. Analizy wykonano w trzech powtórzeniach.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wszystkie promieniowce były wrażliwe na Stomp i Orkan w dawce roboczej a w dawce 50% odpowiednio 94,4 i 97,2% szczepów. Wrażliwość na Roundup stwierdzono u 22,2 oraz 13,9% promieniowców przy czym średnia strefa zahamowania wzrostu była kilkakrotnie mniejsza w porównaniu do pozostałych herbicydów. Izolaty pochodzące z gleb uprawnych i łąkowych statystycznie istotnie były wrażliwsze na działanie preparatów Stomp i Orkan od szczepów izolowanych z gleb leśnych i zdegradowanych. Najmniej wrażliwe na działanie badanych pestycydów były *Streptomyces* sp. wyizolowane z gleb zdegradowanych, co może sugerować selekcję szczepów odpornych na herbicydy w środowisku glebowym.

The aim of the study was to evaluate the effect of herbicides Stomp 330EC, Orkan 350SL and Roundup Ultra 170SL on the growth of actinomycetes of the genus *Streptomyces* in *in vitro* conditions.

Microbiological analyzes of cultivated, meadow, forest and degraded soils were made by serial dilutions method, indicating the average number of actinomycetes. Sensitivity tests of randomly chosen actinomycetes for herbicides were performed by diffusion-well method using dosage forms corresponding to the working concentrations and half of the concentration recommended by the manufacturer. The analyzes were done in triplicate.

Based on the results, it was found that all actinomycetes were sensitive to Stomp and Orkan in working dose and 50% one respectively 94.4 and 97.2% of tested strains. Sensitivity to Roundup was observed in 22.2 and 13.9% of the actinomycetes, with the mean growth inhibitory zone being several times lower comparing to the other herbicides. Isolates derived from cultivated and meadow soils were statistically significant more sensitive to the effects of Stomp and Orkan preparations than strains isolated from the forest and degraded soils. The least sensitive to the tested pesticides were *Streptomyces* sp. isolated from degraded soils, suggesting the selection of herbicide resistant strains in the soil environment.

## ***Pseudomonas putida* i *Trichoderma harzianum* w ochronie biologicznej kasztana przed rakiem wywołanym przez *Gnomoniopsis smithogilvyi***

*Pseudomonas putida* and *Trichoderma harzianum* may efficiently control the agent of chestnut brown rot and chestnut canker *Gnomoniopsis smithogilvyi*

Matteo Conti<sup>1</sup>, Julien Crovadore<sup>1</sup>, Bastien Cochard<sup>1</sup>, Romain Chablais<sup>1</sup>, Mauro Jermini<sup>2</sup>, Tomasz Oszako<sup>3</sup>, François Lefort<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Plants and pathogens Group, Institute Land Nature Environment, hepia, University of Applied Sciences and Arts Western Switzerland (HES-SO), 150 route de Presinge, 1254 Jussy, Switzerland

<sup>2</sup>Agroscope, Cadenazzo Research Centre, A Ramél 18, 6593 Cadenazzo, Switzerland

<sup>3</sup>Technological University in Białystok, Forest Faculty, Piłsudskiego 8, 17-200 Hajnówka, Poland  
francois.lefort@hesge.ch

Wykonano testy antagonizmu na pożywce PGA pomiędzy *G. smithogilvyi* (genotypy GE1 i TI1) i 9 izolatami grzybów: *Trichoderma asperellum*, *T. atroviride*, *T. aureoviride*, *T. hamatum*, *T. harzianum F1*, *T. harzianum B05*, *Aureobasidium pullulans*, *A. pullulans éch.5* i *Beauveria bassiana*. Analogiczne testy wykonano na pożywce LBPGA wykorzystując szczepy bakterii: *Pseudomonas putida*, *P. viridiflava*, *P. graminis*, *P. xanthomarina*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bacillus amyloliquefaciens Ba2* i *B. amyloliquefaciens Ba4*. Testy umożliwiły wyborów 5 gatunków grzybów i 3 szczepów bakterii, które hamowały wzrost *G. smithogilvyi* in vitro. Testy in planta na zrazach, wykonane z tymi samymi mikroorganizmami, wykazały skuteczność jedynie 5 gatunków grzybów (*T. harzianum B05*, *T. harzianum F1*, *T. hamatum*, *T. aureoviride* i *T. asperellum*), oraz 3 szczepów bakterii (*P. putida*, *B. amyloliquefaciens Ba4* i *B. amyloliquefaciens Ba2*). Do ochrony biologicznej przez rakiem kasztana rekomenduje się *P. putida* (UASWS0946) i *T. hamatum* (UASWS1405), które całkowicie hamowały wzrost *G. smithogilvyi* i *C. parasitica*.

In vitro challenge tests were carried out on Potato glucose agar (PGA) cultures between *Gnomoniopsis smithogilvyi* and 9 strains of antagonistic fungi: *Trichoderma asperellum*, *T. atroviride*, *T. aureoviride*, *T. hamatum*, *T. harzianum F1*, *T. harzianum B05*, *Aureobasidium pullulans*, *A. pullulans éch.5* and *Beauveria bassiana*. Similar tests on LBPGA medium were carried out with 7 strains of antagonist bacteria belonging to the following species: *Pseudomonas putida*, *P. viridiflava*, *P. graminis*, *P. xanthomarina*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bacillus amyloliquefaciens Ba2* and *B. amyloliquefaciens Ba4*. Two different genotypes of *G. smithogilvyi* from Geneva (GE1) and Ticino (TI1) and were used during these tests. These in vitro challenge tests allowed to select 5 fungal and 3 bacterial strains, which demonstrated a strong inhibitory activity on *G. smithogilvyi*'s growth. The organisms retained for biological control experiments on chestnut scions were: *T. harzianum B05*, *T. harzianum F1*, *T. hamatum*, *T. aureoviride* and *T. asperellum* for fungi; *P. putida*, *B. amyloliquefaciens Ba4* and *B. amyloliquefaciens Ba2* for bacteria. If most retained organisms did not maintain their efficiency in vivo, the bacterial strain *P. putida* UASWS0946 and the fungal strain *T. hamatum* UASWS1405 totally inhibited the growth of *G. smithogilvyi* and *C. parasitica*.

## Molekularna analiza *Gnomoniopsis smithogilvyi*, patogenicznego endofita podkładek i zrzewów sześciu odmian kasztanów (*Castanea sativa* L.)

Molecular assessment of the latent endophytic pathogen *Gnomoniopsis smithogilvyi* in chestnuts, rootstocks and grafts of six varieties of chestnut trees

Matteo Conti<sup>1</sup>, Julien Crovadore<sup>1</sup>, Bastien Cochard<sup>1</sup>, Romain Chablais<sup>1</sup>, Mauro Jermini<sup>2</sup>, Tomasz Oszako<sup>3</sup>, Justyna Anna Nowakowska<sup>4</sup>, François Lefort<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Plants and pathogens Group, Institute Land Nature Environment, hepia, University of Applied Sciences and Arts Western Switzerland (HES-SO), 150 route de Presinge, 1254 Jussy, Switzerland

<sup>2</sup>Agroscope, Cadenazzo Research Centre, A Ramél 18, 6593 Cadenazzo, Switzerland

<sup>3</sup>Technological University in Białystok, Forest Faculty, Piłsudskiego 8, 17-200 Hajnówka, Poland

<sup>4</sup>Laboratory of Molecular Biology, Forest Research Institute, Braci Leśnej 3, Sękocin Stary 05-090, Poland  
francois.lefort@hesge.ch

Poszukiwano obecności grzybów *Gnomoniopsis smithogilvyi* i *Cryphonectria parasitica* w materiale rozmnożeniowym 6 odmian kasztanów. Po ekstrakcji genomowego DNA, zastosowano specyficzne startery w celu detekcji ww. patogenów w próbkach pobranych z: 60 korzeni, 41 kielkujących siewek i 17 podkładek kasztanów, a także 112 próbek z 56 podkładek / zrzewów, aby stwierdzić czy patogen może być przeniesiony z podkładkami i zrzewami. Analizy DNA potwierdziły obecność *G. smithogilvyi* jako endofita, natomiast nie wykryto obecności *C. parasitica* w roślinach. Sześć z 60 analizowanych siewek miało korzenie zainfekowane *G. smithogilvyi*, a także dwa spośród 41 pędów i dwie z 17 analizowanych podkładek. W 12% badanych podkładkach i 60% zrzewów stwierdzono obecność *G. smithogilvyi*. Wyniki potwierdzają wysokie ryzyko przenoszenia endofita *G. smithogilvyi* w materiale rozmnożeniowym (w zrzewach), oraz niskie ryzyko przenoszenia w podkładkach, niezależnie od badanej odmiany kasztanów.

The presence of *Gnomoniopsis smithogilvyi* and the chestnut canker agent *Cryphonectria parasitica* was searched for in the propagation material of 6 chestnut tree varieties. DNA extraction was followed by specific amplification primers for *G. smithogilvyi* and *C. parasitica* in: Sixty root samples, 41 shoot samples from germinated chestnuts and 17 chestnut rootstock samples were analysed, along with 112 samples from 56 rootstock/graft pairs, in order to determine whether the pathogen was transmitted by the rootstock or the graft. It was possible to detect the presence of *G. smithogilvyi* as an endophyte, but *C. parasitica* was never detected. Six of the 60 roots analysed from seed chestnuts were contaminated with *G. smithogilvyi*, as well as 2 out of the 41 shoots from seed chestnuts, and 2 out of 17 rootstocks. Regarding the 112 samples from 56 rootstock/graft pairs, *G. smithogilvyi* was found in 12% of the analysed rootstocks and 60% of the grafts. These results showed a weak presence of *G. smithogilvyi* in rootstock propagation material and an important contamination of grafting material in all varieties, confirming the endophytic behavior *G. smithogilvyi*.

## Molekularna identyfikacja *Gnomoniopsis smithogilvyi* i *Cryphonectria parasitica* w tkankach *Castanea sativa*

Molecular diagnostics of the chestnut canker agents *Gnomoniopsis smithogilvyi* and *Cryphonectria parasitica* in different tissues of *Castanea sativa*

Matteo Conti<sup>1</sup>, Julien Crovadore<sup>1</sup>, Bastien Cochard<sup>1</sup>, Romain Chablais<sup>1</sup>, Joana Beatrice Meyer<sup>2</sup>, Mauro Jermini<sup>3</sup>, Justyna Anna Nowakowska<sup>4</sup>, François Lefort<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Plants and Pathogens Group, Institute Land Nature Environment, hepia, University of Applied Sciences and Arts Western Switzerland (HES-SO), 150 route de Presinge, 1254 Jussy, Switzerland

<sup>2</sup>Unit Biodiversity and Conservation Biology, Swiss Federal Research Institute WSL, Zürcherstrasse 111, 8903 Birmensdorf, Switzerland

<sup>3</sup>Agroscope, Cadenazzo Research Centre, A Ramél 18, 6593 Cadenazzo, Switzerland

<sup>4</sup>Laboratory of Molecular Biology, Forest Research Institute, Braci Leśnej 3, Sękocin Stary 05-090, Poland francois.lefort@hesge.ch

Dwa patogeniczne szczepy grzybów: sprawcy raka kasztanów *Cryphonectria parasitica* i endofitycznego *Gnomoniopsis smithogilvyi*, zostały niedawno zidentyfikowane na szkółkach w Europie i w Szwajcarii. Na podstawie danych dostępnych w banku genów GenBank, spośród 164 analizowanych sekwencji ITS, 90 sekwencji EF1a i 45 sekwencji beta-tubuliny, tylko dla tego ostatniego genu udało się zaprojektować specyficzne startery, różnicujące oba badane gatunki patogenów w reakcji PCR. Testy *in silico*, wykonane dla sekwencji DNA izolatów *C. parasitica* i *G. smithogilvyi* wyizolowanych z tkanek korzeni, łodyg i liści kasztanów pochodzących z Ticino, Wallis i Genewy, potwierdziły skuteczność opracowanych starterów, które mogą być stosowane jako praktyczne narzędzie detekcji *G. smithogilvyi* w materiale rozmnożeniowym *Castanea sativa* na szkółkach.

Two fungi cause chestnut tree diseases (on *Castanea sativa* species) in Switzerland: *C. parasitica*, the endemic chestnut canker agent, and *G. smithogilvyi*, an endophytic fungus, recently identified in Europe and Switzerland as the main agent of chestnut fruit brown rot, also causing chestnut canker in nurseries and orchards. In order to evaluate the presence of these fungi in the plant material, specific molecular diagnostic tests were developed for both species. All sequences available in the GenBank for the internal transcript spacer (ITS) of the ribosomal DNA, the elongation factor 1-alpha (EF1a) gene and the beta-tubulin gene (TUBB), were collected for these two fungi. Significant differences between *G. smithogilvyi* and *Gnomoniopsis spp.*, were sought, as well as between *G. smithogilvyi* and *C. parasitica*. After analysing 164 ITS, 90 EF1a and 45 beta-tubulin sequences, only the TUBB gene sequences showed any significant differences between both species. *In silico*, two primer pairs were tested with DNA extracted from *G. smithogilvyi* and *C. parasitica* isolates from Ticino, Wallis and Geneva, from roots and stems of germinated chestnuts or leaves of chestnut trees. These tests showed a great robustness and represent an interesting tool to describe the phytosanitary status of propagation material, especially for endophytic fungus *G. smithogilvyi*.

## Ocena struktury zbiorowisk grzybów w glebach uprawnych o różnym uwilgotnieniu z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji

Assessment of fungal community structure in arable soils with different moisture using next generation sequencing

Magdalena Frąc, Karolina Oszust, Jerzy Lipiec, Bogusław Usowicz

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk  
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin  
m.frac@ipan.lublin.pl

Badania zostały przeprowadzone w celu określenia wpływu wilgotności gleby na zbiorowiska grzybów w glebie pod uprawą pszenicy. Badania przeprowadzono na glebie płowej o różnej wilgotności (8,0% i 13,4%) w Trzebieszowie na Podlasiu. Próbki gleby pobrano jesienią 2015 roku. Zbiorowiska grzybów były badane na podstawie analizy metagenomicznej z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji (technologia Illumina).

Dominującą gromadą grzybów w glebie bardziej wilgotnej były przedstawiciele Ascomycota, Basidiomycota i Zygomycota. W glebie o mniejszej wilgotności dominowały przedstawiciele Ascomycota i Basidiomycota. W glebie o większym uwilgotnieniu stwierdzono większą różnorodność grzybów, a wśród dominujących występowały: *Solicoccozyma terricola*, *Sordariomycetes* sp., *Sordariales* sp.. W glebie o mniejszej wilgotności dominowały: *Trechisporales* sp., *Penicillium simplicissimum*, *Tremellales* sp., *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium oxysporum* oraz grzyby, które nie zostały zidentyfikowane. Wskaźnik różnorodności biologicznej Shannona kształtował się na poziomie 6,102 i 7,259, a Simpsona 0,916 i 0,976, odpowiednio dla gleby o mniejszej i większej wilgotności.

Przeprowadzone badania wskazują, że wilgotność gleby jest ważnym czynnikiem wpływającym na strukturę zbiorowisk grzybów. Uzyskane wyniki badań mogą być użyteczną podstawą do przewidywania składu mikrobioty grzybów w glebach o różnej wilgotności.

This study investigated the effects of soil moisture on the fungal communities under wheat cultivation. The study were carried out on podzols soil with different moisture (8.0% and 13.4%) located in the region Podlasie, in commune Trzebieszów. Soil samples were collected in Autumn 2015. Fungal communities were analysed by next generation sequencing in Illumina technology.

The dominant fungal phyla in more moist soil were Ascomycota, Basidiomycota and Zygomycota, whereas Ascomycota and Basidiomycota in less humid soil. Higher fungal biodiversity was found in more humid soil. The dominant fungi in this soil were: *Solicoccozyma terricola*, *Sordariomycetes* sp., *Sordariales* sp.. The dominant fungi in less moist soil were: *Trechisporales* sp., *Penicillium simplicissimum*, *Tremellales* sp., *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium oxysporum* and other unidentified fungi. The biodiversity Shannon index were 6.102 and 7.259, whereas Simpson 0.916 and 0.976, respectively for less and more moist soil.

The soil moisture was important determinant of the fungal community structure in soils with different moisture content. These results may provide a useful baseline for predicting the variation in fungal communities in soils with different moisture level.

Projekt współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach programu ramowego w zakresie badań naukowych i innowacji Horyzont 2020. iSQAPER – umowa o dofinansowanie: 635750

## **Aerozole bakteryjne i grzybowe w środowisku parków Krakowa**

Bacterial and fungal aerosols at the environment of parks of Cracow

Krzysztof Frączek, Dariusz Ropek, Karol Bulski, Jacek Grzyb

Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

W ostatnich latach coraz częściej składnikiem środowiska przyrodniczego, zaliczanym do grupy zasobów przyrody o podstawowym znaczeniu dla człowieka, zwierząt i roślin jest powietrze atmosferyczne. Celem badań była ocena jakości mikrobiologicznej powietrza w parkach Krakowa. Pomiary bioaerozolu wykonano przy użyciu 6-stopniowego impaktora Andersena (model 10-710, Graseby-Andersen, Inc., Atlanta, GA, USA) zimą, na obszarze sześciu wytypowanych parku krakowskich oraz w centrum miasta. Stężenia aerozolu bakteryjnego w badanych parkach wahały się od 28 do 455 jtk·m<sup>-3</sup>, natomiast stężenia aerozolu grzybowego zawsze były niższe niż 67 jtk·m<sup>-3</sup>. Analiza współczynnika korelacji Spearman'a potwierdziła, że zapylenie powietrza znacząco wpływało na obserwowane stężenia aerozoli bakteryjnych i grzybowych. W związku z tym, powinna być zalecona kontrola tego parametru przy analizach mikrobiologicznych powietrza atmosferycznego.

In recent years, atmospheric air has become increasingly a component of the natural environment, classified as a one of resources at natural resources group with fundamental importance for humans, animals and plants. The aim of the study was to evaluate the microbiological quality of air at the parks of Cracow. Measurements of bioaerosol were performed using a 6-stage Andersen air sampler (model 10-710, Graseby-Andersen, Inc., Atlanta, GA, USA) in winter season, at the six selected parks in Cracow and at the city center. Bacterial aerosol concentrations at the studied parks ranged from 28 to 455 cfu·m<sup>-3</sup>, while fungal aerosol concentrations were always lower than 67 cfu·m<sup>-3</sup>. Spearman's correlation coefficient analysis confirmed that particulate matter significantly influenced the observed concentrations of bacterial and fungal aerosols. Accordingly, it should be recommended to control this parameter for microbiological analyzes of atmospheric air.

# Wpływ czynników środowiskowych i przestrzennych na endofity grzybowe *Salicornia europaea*

## Impact of environmental and spatial factors on fungal endophytes of *Salicornia europaea*

Bliss Furtado<sup>1,3</sup>, Marcin Gołębiowski<sup>2,3</sup>, Monika Skorupa<sup>3</sup>, Jarosław Tyburski<sup>2,3</sup>, Katarzyna Hryniewicz<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Lwowska 1, PL-89-100 Toruń, Polska, \*hrynk@umk.pl

<sup>2</sup>Katedra Fizjologii i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Lwowska 1, PL-89-100 Toruń, Polska

<sup>3</sup>Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wileńska 4, 87-100 Toruń, Polska

Endofity grzybowe zasiedlają tkanki większości znanych roślin i mogą wywierać pozytywny wpływ na ich wzrost i rozwój, zwłaszcza w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Rozmieszczenie i różnorodność endofitów grzybowych oraz ich funkcjonowanie w odniesieniu do gospodarza roślinnego może być ważnym czynnikiem przewidującym ich rolę w trudnych warunkach środowiskowych. *Salicornia europaea* jest halofitem dobrze przystosowanym do wysokiego poziomu zasolenia w środowisku. Tkanki tych roślin mogą być kolonizowane przez halotolerancyjne i/lub halofilne mikroorganizmy, które są ważne w procesie wzrostu i rozwoju gospodarza roślinnego. Głównym celem badań było oznaczenie różnorodności endofitów grzybowych zasocjowanych z *S. europaea* i określenie roli czynników środowiskowych i przestrzennych w tworzeniu ich społeczności w tkankach *S. europaea*. W naszych badaniach wykorzystaliśmy metody hodowlane (izolacja i identyfikacja szczepów grzybów) i niehodowlane (analiza metagenomowa). Ponadto, określono parametry fizyko-chemiczne gleb aby ocenić potencjalne czynniki środowiskowe determinujące strukturę endofitów grzybowych *S. europaea*.

Fungal endophytes inhabit tissues of most terrestrial plants and can affect plant growth in unfavourable environmental conditions. Distribution and diversity of fungal endophytes as well as their functioning in relation with host-plant can be a key factor predicting their role in such a harsh environment. *Salicornia europaea* is a halophyte well adapted to hypersaline conditions. Tissues of this plant can be colonized by halotolerant and/or halophilic microorganisms that might be relevant for the growth and development of the host-plant.

Main aim of our study was to reveal diversity of fungal endophytes associated with *S. europaea* and to examine the relative importance of environmental and spatial factors in structuring their communities in *S. europaea*. In our experiment we used culture-dependent (isolation and identification of fungal strains) and culture-independent (metagenomics) approaches. The physicochemical soil parameters were also analyzed to evaluate possible environmental factors determining the structure of fungal communities.

Keywords: endophytes, fungi, halophyte, salinity

### Acknowledgment

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 676480

Słowa kluczowe: endofity, grzyby, halofit, zasolenie

### Podziękowania

Badania zostały wykonane w ramach projektu EU Horizon 2020 Research and Innovation Programme Marie Skłodowska-Curie, No 676480

## **Różnorodność funkcjonalna mikroorganizmów glebowych pod uprawą pszenicy ozimej w różnych systemach uprawy roli**

Functional diversity of microorganisms in soil under winter wheat grown in different farming systems

Karolina Furtak, Anna M. Gajda

Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy;  
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy; tel. (0-81) 4786961  
kfurtak@iung.pulawy.pl

W badaniach nad różnorodnością funkcjonalną społeczności mikroorganizmów pod wpływem różnych czynników ocena profilu metabolicznego (*community level physiological profiles* – CLPP) może być prowadzona z zastosowaniem systemu Biolog EcoPlate. Analiza w systemie Biolog opiera się na zmianie barwy wskaźnika (fioletu tetrazoliowego) podczas utleniania substratu węglowego w studzience. Płytki EcoPlate zawiera 31 różnych źródeł węgla umieszczonych w trzech powtórzeniach oraz wodę, jako próbę kontrolną. Na podstawie uzyskanych profili metabolicznych możemy otrzymać informację o dostępności do substratów przez badane zespoły drobnoustrojów oraz ocenić istotność danego procesu katabolizmu w glebie.

Materiał badawczy stanowiły próbki glebowe pochodzące z wieloletniego doświadczenia polowego w RZD IUNG-PIB w Osinach (woj. lubelskie). Doświadczenie to, obejmuje cztery systemy gospodarowania różniące się zmianowaniem oraz całokształtem agrotechniki.

Dla każdej próby wyliczono wskaźnik różnorodności (R) oraz wskaźnik jednorodności Shannon-Weaver (H). Najwyższa aktywność metabolizmu tyczna została zaobserwowana po 120 h inkubacji płytek. Wyniki analiz przedstawiono w postaci graficznej (heatmaps).

Badania sfinansowano częściowo z Programu Badawczego Wieloletniego IUNG-PIB Zadanie 1.3 i 1.4 oraz Statutowego Programu Badawczego 2.26.

In the study on functional diversity of microbial communities influenced with various factors an evaluation of the metabolic profile (*community level physiological profiles* - CLPP) can be conducted using Biolog system EcoPlate. This system is based on the color change of the indicator (tetrazolium violet) during the oxidation of the carbon substrate in the well. The EcoPlate contains 31 different carbon sources in triplicate and water as a control. Based on the obtained metabolic profiles we can receive any information on the utilization rate of C substrates by the soil microbial assemblies and to assess the relevance of the catabolism process in the soil.

The soil samples taken from long-term field experiment at ES of IUNG-PIB in Osiny (Lublin voivodeship) were the basal research material. This experiment includes four different farming systems differ in crop management and applied agrotechnics.

For each sample, the diversity index (R) and Shannon-Weaver homogeneity index (H) were calculated. The highest metabolic activity was observed after 120 hours incubation. The results of the analysis are graphically presented (heatmaps).

The research was supported partly by IUNG-PIB Research Programmes 1.3 and 1.4 and Research Statute Program 2.26.



## **Określenie zmian w środowisku glebowym w zależności od stosowanego systemu uprawy roli przy zastosowaniu metod standardowych oraz technik molekularnych**

Assessment of changes in soil environment in relation to tillage system applied using standard methods and molecular techniques

Anna M. Gajda, Karolina Furtak

Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy;  
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy; tel. (0-81) 4786961  
ag@iung.pulawy.pl

Głównym celem przeprowadzonych badań było określenie zmian w środowisku glebowym związanych z oddziaływaniem bezorkowej uprawy roli na zmiany w różnorodności drobnoustrojów i aktywności enzymatycznej w glebie pod pszenicą ozimą w stosunku do systemu opartego na orce pługiem.

Badania przeprowadzono w latach 2013-2016 w oparciu o pola doświadczalne zlokalizowane w RZD IUNG-PIB w Grabowie (woj. mazowieckie), na których od roku 2002 stosowane są różne systemy uprawy roli. Analizy gleby zostały wykonane przy zastosowaniu metod standardowych oraz dostępnych technik molekularnych. Analizy statystyczne wykonano w programie ANOVA. Istotność różnic przyjęto na poziomie  $P \leq 0,05$ . Uzyskane wyniki wykazały, że w glebie w uprawie bezorkowej zachodziły korzystne zmiany w jakości środowiska glebowego, co znalazło potwierdzenie w zróżnicowanych ilościach wyizolowanego z gleby DNA, wyższej aktywności metabolicznej drobnoustrojów określonej przy pomocy techniki BIOLOG® Ecoplates™ oraz wyższej aktywności enzymatycznej gleby, w porównaniu do systemu płuznego.

Badania sfinansowano częściowo z Programu Badawczego Wieloletniego IUNG-PIB Zadanie 1.3 i 1.4 oraz Statutowego Programu Badawczego 2.26.

The studies focused on changes in soil environment related to the influence of no-tillage system on diversity and activity of soil microbial communities in comparison to the tillage system based on ploughing.

Research was conducted in the years 2013-2016 on experimental fields at the ES of IUNG-PIB in Grabów (Mazovian voivodeship) under different tillage practices started in 2002. Soil analysis were performed using both standard and molecular-base methods. Statistical analysis were made using the ANOVA method. The differences were considered as significant at  $P \leq 0.05$ . The no-till system enhanced beneficial changes in soil environment what was reflected in varied quantities of isolated form soil DNA, higher metabolic activity measured with BIOLOG® Ecoplates™, and higher activity of soil enzymes as compared to the tillage with mouldboard plough.

The research was supported partly by IUNG-PIB Research Programmes 1.3 and 1.4 and Research Statute Program 2.26.

## **Bioróżnorodność populacji glebowej – badania i metody analizy molekularnej**

Biodiversity of the soil – survey and methods of molecular analysis

Agnieszka Galus-Barchan, Iwona Paśmionka

Katedra Mikrobiologii Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Al. Mickiewicza 24/28

Ekosystem glebowy jest silnie zróżnicowanym układem, gdzie bardzo licznie występują organizmy prokariotyczne cechujące się dużą bioróżnorodnością. Tradycyjnie stosowane mikrobiologiczne techniki laboratoryjne nie dają pełnego obrazu różnorodności mikroorganizmów występujących w glebie, pozwalają określić tylko 1% populacji. Zastosowanie nowoczesnych metod molekularnych daje możliwość badania i identyfikacji niehodowanych drobnoustrojów glebowych. W związku z tym, że 1 gramie gleby może być około 1000 różnych szczepów i gatunków bakterii klonowanie i analizowanie metagenomów złożonych populacji glebowych jest bardzo skomplikowane. Zmusza to do wykorzystania różnych sposobów frakcjonowania DNA, aby w zależności od celu badań, do klonowania bibliotek metagenomowych używać określonych, wyselekcjonowanych frakcji DNA. Badania te mają na celu poznanie filogenetycznej i taksonomicznej różnorodności mikroorganizmów, które stanowią nieznane i niehodowane do tej pory rodzaje i gatunki bakterii.

The soil ecosystem is a strongly diverse system where prokaryotic organisms characterized by high biodiversity are abundant. Traditionally used microbiological laboratory techniques do not give a complete picture of the diversity of microorganism present in the soil, allowing only 1% of the population to be identified. The use of modern molecular methods give the opportunity study and identify non-cultivated soil microorganisms. Since 1 gram of soil can be about 1000 different strains and bacterial species cloning and analyzing metagenomes of complex soil populations is very complicated. This forces us the use different ways of DNA fractionation so that, depending on the purpose of the study, the use of specific, selected DNA fractions for the cloning of metagenomic libraries. These studies aim to understand the phylogenetic and taxonomic diversity of microorganism, which are unknown and not yet cultivated types and species of bacteria.

## Ocena bioróżnorodności strukturalnej i funkcjonalnej mikroorganizmów w glebie spod uprawy kukurydzy w długoletniej monokulturze

Determination of structural biodiversity and functional and metabolic profiles in soil under long-term maize monoculture

Anna Gałązka<sup>1</sup>, Karolina Gawryjołek<sup>1</sup>, Jarosław Grządziel<sup>1</sup>, Magdalena Frąc<sup>2</sup>, Jerzy Książak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Mikrobiologii Rolniczej, ul. Krańcowa 8, 24-100 Puławy, tel. (0-81) 4786 958, [agalazka@iung.pulawy.pl](mailto:agalazka@iung.pulawy.pl)

<sup>2</sup>Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Różnorodność mikrobiologiczna może być ograniczona w warunkach naturalnych poprzez nieodpowiednie czynniki środowiskowe, do których należą m.in. ograniczone zasoby pokarmowe, ekologiczne i fizyczne czynniki przewyższające tolerancję organizmu oraz system uprawy i interakcje międzygatunkowe uniemożliwiające występowanie lub utrzymanie gatunku w danym środowisku. Celem pracy była ocena bioróżnorodności strukturalnej i funkcjonalnej mikroorganizmów w glebie po długoletniej uprawie kukurydzy w zmianowaniu. Oznaczenia obejmowały kombinacje glebowe: KN – glebę spod monokultury kukurydzy nie oraną (siew bezpośredni), KO - glebę spod monokultury kukurydzy oraną (pełna uprawa płuzna), KZ - glebę spod kukurydzy oraną w zmianowaniu (jęczmień jary, pszenica ozima, kukurydza) oraz Ku – glebę spod monokultury kukurydzy (uprawa uproszczona, gruber). Próbkę glebową pobierano w trzech fazach wzrostu roślin: faza 6 liści, 12 liści, faza kwitnienia kukurydzy oraz przed siewem i po zbiorze roślin. W badaniach określono skład populacji mikroorganizmów poprzez sekwencjonowanie fragmentów zmiennych w genomach glebowych oraz ocenę różnorodności funkcjonalnej zbiorowisk mikroorganizmów glebowych przy użyciu systemu Biolog (EcoPlate). Zastosowane metody badawcze przyczyniły się do lepszego zrozumienia różnorodności genetycznej oraz składu populacyjnego mikroorganizmów w środowisku glebowym pod wpływem zmian jakie nastąpiły w glebie w wyniku uprawy kukurydzy w długoletniej monokulturze.

Badania wykonano w ramach realizacji **zadanie 1.4. Ocena i kształtowanie bioróżnorodności środowiska glebowego oraz aktywności mikrobiologicznej gleb z uwzględnieniem różnych warunków siedliskowych i systemów gospodarowania.** Program Wieloletni IUNG-PIB na lata (2016-2020).

Microbial diversity in soil may be limited under natural conditions by inappropriate environmental factors such as: limited food resources, environmental and physical factors, tillage system and interspecies interactions prevent the occurrence or maintenance of the species in the environment. The aim of this work was to determinate structural biodiversity and functional microorganisms in in soil under long-term maize monoculture. The reaction of maize cultivated in perennial monoculture for the direct sowing was investigated and compared to full tillage monoculture and crop rotation full tillage cultivation in the following phases: six leaves, twelve leaves, flowering phase, before harvest and after harvest. Three objects were included into this research: maize cropped continuously monoculture - zero tillage, maize monoculture cropped continuously – full tillage, crop rotation (spring barley, winter wheat, maize) – full tillage. The evaluation of the structural biodiversity of the soil was based on the next-generation sequencing (NGS). The functional and metabolic profiles in soil were determined by Biolog EcoPlate System. The research methods used in this subject have contributed to a better understanding of genetic diversity and composition of the population of microorganisms in the soil environment under the influence of the changes that have taken in soil under long-term maize monoculture.

## **Profil metaboliczny i bioróżnorodność strukturalna jako wskaźnik jakości gleb użytkowanych rolniczo**

Metabolic profile and structural biodiversity as an indicator of the quality of agricultural soils

Anna Gałązka, Karolina Gawryjołek, Jarosław Grządziel

Zakład Mikrobiologii Rolniczej  
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy,  
ul. Krańcowa 8, 24-100 Puławy, tel. (0-81) 4786 958  
agalazka@iung.pulawy.pl

Celem pracy było zastosowanie metodyki oznaczania profilu metabolicznego mikroorganizmów zasiedlających wybrane typy gleb jako wskaźnika oceny jakości w monitoringu gleb uprawnych w Polsce. Materiał glebowy stanowiły próbki glebowe pochodzące z krajowego monitoringu chemizmu gleb pobrane w roku 2015. Program ten obejmuje 216 lokalizacji reprezentujących użytki rolnicze, głównie grunty orne z całego kraju. Próbkę glebową są pobierane z stałych punktów pomiarowo-kontrolnych, zlokalizowanych na gruntach ornym charakterystycznych dla pokrywy glebowej kraju. Reprezentują one użytki rolnicze o różnym stopniu intensyfikacji produkcji rolnej znajdujące się w obszarach oddziaływania rolniczej i pozarolniczej działalności człowieka. Baza danych charakteryzujących gleby w miejscu pobrania próbek obejmuje szereg właściwości, takich jak odczyn, zasolenie, poziom zanieczyszczenia metalami i zanieczyszczeniami organicznymi, zawartość węgla i składników nawozowych, skład granulometryczny i in. W wybranych próbkach reprezentujących główne typy gleb oznaczono zarówno profil metaboliczny mikroorganizmów jak i ich zróżnicowanie genetyczne.

Badania wykonano w ramach realizacji **zadanie 1.4. Ocena i kształtowanie bioróżnorodności środowiska glebowego oraz aktywności mikrobiologicznej gleb z uwzględnieniem różnych warunków siedliskowych i systemów gospodarowania.** Program Wieloletni IUNG-PIB na lata (2016-2020).

The aim of the study was to use the methodology of determination of metabolic profile of soil microorganisms as an indicator for evaluation of quality in arable soil monitoring programme in Poland.

Soil samples from Monitoring of arable soils in Poland were taken for analysis. The monitoring includes 216 points of sampling on arable land across Poland. They represent areas of quite high degree of intensive tillage located in areas of other than agriculture influence of human activity. Database that characterizes location of soil sampling includes: pH, salinity, content of metals, and organic compounds, carbon content, macronutrients content, texture and others. Selected samples representing the main types of soils have both the metabolic profile of microorganisms and their genetic diversity.

The research was conducted within the frames of Task 1.4. Evaluation and formation of biodiversity of soil and microbial activity of soil with regard to habitat conditions and management system. Multi – Annual Programme IUNG – PIB 2016 – 2020.

## Działanie lotnych związków organicznych (VOCs) produkowanych przez bakterie z rodzaju *Bacillus* na grzyby z rodzaju *Fusarium*

The activity of Volatile Organic Compounds (VOCs) produced by *Bacillus* bacteria on fungi of the genus *Fusarium*

Natalia Gierasimiuk<sup>1,2</sup>, Marcin Stocki<sup>1</sup>, Tomasz Oszako<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Politechnika Białostocka, Zamiejscowy Wydział Leśny w Hajnówce  
ul. Piłsudskiego 1A, 17-200 Hajnówka

<sup>2</sup>Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska  
ul. Wiejska 45E, 15-351 Białystok

Grzyby z rodzaju *Fusarium* powszechnie występują w glebie. Porażają rośliny we wszystkich stadiach rozwojowych. W walce z tymi patogenami stosowanych jest wiele syntetycznych pestycydów. Jednakże ze względu na postępującą degradację środowiska naturalnego i Dyrektywę Komisji Europejskiej o Integrowanej Ochronie Roślin (IPM) poszukuje się metod biologicznych ochrony roślin. Takie możliwości stwarza wykorzystanie bakterii z rodzaju *Bacillus*, które posiadają zdolność do hamowania wzrostu patogennych grzybów. Wytwarzane przez nie lotne metabolity (VOCs-Volatile Organic Compounds) są związkami organicznymi stanowiącymi aktywny czynnik ochrony biologicznej. Celem niniejszych badań było określenie stopnia zahamowania wzrostu *F. oxysporum* w obecności związków produkowanych przez bakterie z rodzaju *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. thuringiensis* i *B. amyloliquefaciens*. Przeprowadzone testy antagonizmu potwierdziły inhibujące działanie wszystkich 3 gatunków bakterii. Jednak, najwyższym stopniem inhibicji odznaczał się gatunek *B. amyloliquefacines*. Lotne związki organiczne wydzielane przez bakterie *Bacillus* były badane za pomocą mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME, ang. *Solid Phase Microextraction*). Analizy składu chemicznego ekstraktów SPME przeprowadzono z użyciem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas (GC-MS, ang. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). Identyfikacji poszczególnych związków chemicznych dokonano w oparciu o widma mas, jak również indeksy retencji. Wyniki przeprowadzonych analiz potwierdziły możliwości wykorzystania badanych bakterii z rodzaju *Bacillus* w ochronie biologicznej roślin przed patogenem *F. oxysporum*.

*Fusarium* fungi are common soil borne organisms. They infect plants in all stages of development. Many synthetic pesticides have been used against *Fusarium*, so far. However, due to progressive degradation of the environment and European Commission Directive on Integrated Plant management (IPM) biological methods are sought to control fungal growth of these pathogens. An application of bacteria *Bacillus* genus are in line with IPM strategy. Aforementioned bacteria are capable to inhibit pathogenic fungi thanks to their secondary metabolites being active volatile organic compounds (VOC's) used as biological protection agents. The aim of the study was to determine the degree of inhibition of *Fusarium* fungi as a result of VOC's produced by *Bacillus* species: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, and *B. thuringiensis*. The conducted antagonism tests have confirmed the inhibition of all 3 species of bacteria. However, the highest degree of inhibition revealed *B. amyloliquefaciens*. VOC's produced by *Bacillus* bacteria were analysed thanks to solid phase microextraction technique (SPME). Analysis of chemical composition of SPME extracts was carried out using Gas Mass Spectrometry (GC-MS). The identification of individual chemical compound was based on mass spectra as well as retention indices. Our findings confirmed the potential of the tested bacteria *Bacillus* genus as plant biological protection agents against the pathogen *F. oxysporum*.

## **Wstępna analiza metagenomiczna społeczności mikroorganizmów zasiedlających podziemną biosferę Wieliczki**

Preliminary metagenomic analysis of microorganisms community inhabiting Wieliczka subsurface biosphere

Weronika Goraj, Anna Pytlak, Anna Szafranek-Nakonieczna, Zofia Stępniewska

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku

Przeniesienie badań mikrobiologicznych pod powierzchnię Ziemi celem zbadania bioróżnorodności podziemnej biosfery jest ważne i pozwala wyjść poza dotychczasowe ramy nauki. Życie mikroorganizmów determinowane jest przez różne czynniki zarówno fizyczne, geochemiczne jak i biologiczne min.: dostępność wody i składników odżywczych, temperatura, pH, zasolenie i ciśnienie. Ostatnie dane literaturowe udowadniają obecność i aktywność mikroorganizmów w głębokiej biosferze.

Prezentowane zagadnienia są szczególnie istotne, ponieważ mają na celu poznanie bioróżnorodności mikroorganizmów zasiedlających zasoloną podziemną biosferę. Według naszej wiedzy, w literaturze brak jest informacji na temat bioróżnorodności mikroorganizmów zasiedlających Kopalnię Soli „Wieliczka”.

Materiałem badawczym były skały towarzysząca pokładom soli w Wieliczce (mułowiec z żyłami soli włóknistej i żyłami anhydrytu). Po powierzchniowej sterylizacji skał, pobrano rozdrobiony materiał, z którego wyizolowano DNA. Analizę metagenomiczną wykonano na podstawie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) techniką MiSeq (Illumina) (GENOMED S.A.). Uzyskane wyniki pozwoliły potwierdzić obecność mikroorganizmów występujących bezpośrednio w skałach towarzyszących pokładom soli.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr DEC-2014/15/N/NZ8/00315 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Transfer microbiological studies under the surface of the Earth to exploration of biodiversity of subsurface biosphere is important and allows exceeding the current framework of science. Microbial life is determined by physical, geochemical, and biological factors such as the availability of liquid water, nutrients, trace elements, temperature, pH, salinity, and pressure. Recent studies have shown the presence and activity of cells in the deep biosphere.

Presented problems are particularly important because they are aimed at learning the biodiversity of microorganisms that inhabit the saline subsurface biosphere. To our knowledge this kind of studies about microorganisms inhabiting the “Wieliczka” Salt Mine were not performed.

The research material was the rocks surrounding salt deposits in Wieliczka (siltstones with veins of fibrous salt and lenses of anhydrite). After surface sterilization, powder of rock to DNA isolation was obtained. Metagenomic analysis was performed on the basis of NGS by MiSeq (Illumina) technology (GENOMED S. A.). The results confirmed the presence of microorganisms directly in environmental sample of rocks surrounding salt deposits in Wieliczka.

This project was financed by the National Science Centre (Poland), granted on the basis of decision DEC-2014/15/N/NZ8/00315

## Bioróżnorodność Procaryota w glebie pod uprawą roślin w monokulturze i przy różnym zmianowaniu

Biodiversity of Procaryota in soil under monoculture and in different crop rotation

Ewa Beata Górską<sup>1</sup>, Wojciech Stępień<sup>2</sup>, Anna Walkiewicz<sup>3</sup>, Anna Wąsowska<sup>4</sup>, Jakub Dobrzyński<sup>1</sup>, Dariusz Gozdowski<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

<sup>2</sup>Katedra Nauk o Środowisku Glebowym SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

<sup>3</sup>Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego, Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

<sup>4</sup> Genomed S.A. ul. Ponczowa 12, 02-971 Warszawa

<sup>5</sup>Katedra Doświadczalnictwa i Bioinformatyki SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa  
e.b.gorska@wp.pl

Badania przeprowadzone we wrześniu 2016 roku w Skierniewickiej Stacji Doświadczalnej SGGW w Warszawie wykazały, że nie tylko właściwości chemiczne gleby, ale i różnorodność taksonomiczna mikroorganizmów prokariotycznych zależą od sposobu jej uprawy w porównaniu z glebą odłogowaną.

Największą zawartość C org. oraz N ogólnego stwierdzono w glebie spod uprawy roślin w zmianowaniu pięciopolowym, natomiast najniższą w glebie spod wieloletniego odłogu (kontrola). Gleby spod uprawy roślin w monokulturze i zmianowaniu pięciopolowym wykazywały najwyższą wartość pH porównując z kontrolą i zmianowaniem tzw. dowolnym.

Analiza różnorodności taksonomicznej Procaryota oznaczona na podstawie składu sekwencji hiperzmiennego regionu V3-V4 genu kodującego jednostkę 16SrRNA, wykazała że w badanych glebach dominują następujące taksony w randze typu: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes* i *Verrucomicrobia*. Uprawa roślin zwiększyła udział procentowy *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae* i *Proteobacteria* oraz zmniejszyła udział między innymi *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* w glebie w porównaniu z odłogiem.

The studies carried out in September 2016 at Skierniewice Experimental Station SGGW in Warsaw showed that not only the soil chemical properties but also the taxonomic diversity of procaryotic microorganisms depend on the management of soil compared to the fallow soil. The biggest content of C org. and N total were found in the soil under the cultivation of plants in 5-field course, while the lowest in the laying fallow for a long time (control). Soils from planted crops in monoculture and five-field course showed the highest pH value compared to control and random rotation systems.

Procaryota taxonomic diversity analysis based on the composition of the sequences of the V3-V4 hypervariable region which codes 16SrRNA gene revealed that the following taxa are dominant in the studied soil: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes* and *Verrucomicrobia*. Plant cultivation has increased the percentage of *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae* and *Proteobacteria*, but has reduced the percentage of *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* in soil as compared to fallow soil.

## **Aktywność enzymów zaangażowanych w szlaki degradacji celulozy oraz stopień jej wykorzystania przez grzyby *Petriella setifera***

Activity of enzymes involved in cellulose degradation pathways and level of cellulose utilization by *Petriella setifera*

Agata Gryta, Karolina Oszust, Jacek Panek, Giorgia Pertile, Anna Siczek, Marta Oleszek, Magdalena Frąc

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk  
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, tel.: (81) 744 50 61  
a.gryta@ipan.lublin.pl, m.frac@ipan.lublin.pl

Podstawowym składnikiem bardzo wielu rodzajów odpadów pochodzących z przemysłu rolno-spożywczego jest biomasa lignocelulozowa. W skład tej struktury polimerowej wchodzi celuloza, hemiceluloza i lignina. Ze względu na charakter wiązań chemicznych jest to struktura trudno podlegająca biodegradacji, jednakże jest bogatym źródłem energetycznym, wykorzystywanym w procesach produkcji np. biogazu.

W glebach wzbogacanych obornikiem lub kompostami występuje gatunek grzyba *Petriella setifera*, który ze względu na swoje właściwości biochemiczne jest interesujący dla badań nad degradacją odpadów celulozowych.

Właściwości biochemiczne grzyba *Petriella setifera* zostały ocenione pod względem zdolności do rozkładu celulozy. Pomiaru aktywności celulaz dokonano na podstawie analiz biochemicznych opierających się na oznaczeniu ilości nagromadzonych po hydrolizie celulozy cukrów redukujących. Substratami wykorzystanymi w badaniach były: bibuła filtracyjna (FPA) i karboksymetyloceluloza (CMC), w celu oznaczenie niespecyficznego aktywności celulolitycznej oraz karboksymetylocelulaz. Ponadto, oceniono stopień wykorzystania celulozy przez izolaty *Petriella setifera* poprzez hodowlę na płytkach Biolog MT2 z dodatkiem odpowiednich substratów. Zastosowanie tego rodzaju płytek, umożliwiło prowadzenie hodowli z wybranymi do eksperymentu substratami oraz ocenę wzrostu badanych mikroorganizmów poprzez pomiar gęstości hodowli.

Wykonane analizy wskazują na zdolności grzyba *Petriella setifera* do rozkładu celulozy. Odnotowano aktywność enzymów zaangażowanych w szlaki degradacji celulozy oraz wykazano zdolność do wzrostu na podłożu indukcyjnym z celulozą.

The main ingredient of waste from the agri-food industry is ligninocellulosic biomass. This polymer, cellular structure is composed of cellulose, hemicellulose and lignin. In view of the nature of chemical bonds it is a hardly biodegradable structure. However, the ligninocellulose biomass is a rich source of energy and is used in biogas process production.

In the soils fertilized with manure or compost the specific of fungus *Petriella setifera* was found. Because of their biochemical properties it is interesting organism for research of cellulolytic waste degradation.

The study of *Petriella setifera* biochemical activity included ability to cellulose degradation. Measurement of cellulases activity was based on biochemical analysis by assessment the amount of accumulated reducing sugars after cellulose hydrolysis. The filter paper (FPA) and carboxymethylcellulose (CMC) were used as a substrate, to determine unspecific cellulolytic activity and carboxymethylcelulases. Moreover, the level of utilization the cellulose by *Petriella setifera* have been measured through the use of Biolog MT2 plates with addition of appropriate substrates. The use of this type of plates enabled to culture tested microorganisms on the selected substrates and measuring the density of culture.



The analysis revealed the ability of the *Petriella setifera* to cellulose degradation. The activity of enzymes involved in cellulose degradation pathways was observed, tested species had the ability to growth on the medium with cellulose addition.

## **Zastosowanie metody sekwencjonowania NGS do określenia mikrobiomu rdzeniowego różnych typów gleb**

Application of NGS sequencing method to determine the core microbiome of different types of soils

Jarosław Grządziel, Anna Gałązka

Zakład Mikrobiologii Rolniczej  
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy,  
ul. Krańcowa 8, 24-100 Puławy, tel. (0-81) 4786 958  
jgrzadziel@iung.pulawy.pl

Różnorodność funkcjonalna i taksonomiczna została określona w ośmiu różnych typach gleby przy zastosowaniu metody sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Dodatkowo przeprowadzono analizę rozkładu różnych substratów przy zastosowaniu metody Biolog EcoPlate. Obie analizy pozwoliły na klasyfikację oraz skorelowanie gatunków lub rodzajów bakterii z właściwościami gleby. Analizy statystyczne pozwoliły na określenie mikroorganizmów charakterystycznych i związanych z różnymi typami gleb. Mikrobiom rdzeniowy został obliczony dla grupy pięciu gleb, zaliczanych do dobrych jakościowo, urodzajnych oraz dla grupy trzech gleb kwaśnych o niskiej jakości. Badanie to dało podstawy do poszukiwania glebowych markerów bakteryjnych oraz odpowiedzi na pytanie, jaki jest związek pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi gleby a zamieszkującymi ją mikroorganizmami. Kolejnym etapem badań będzie analiza składu grzybów, a także mikroorganizmów związanych z ryzosferą oraz endoryzosferą.

The microbial taxonomic and functional diversity in eight different types of soils were determined by the next generation sequencing (NGS) method. Additionally the utilization level of 31 substrates measured by Biolog EcoPlate approach was conducted. Both methods enabled to classify and correlate the bacteria species or genera to the soil properties. The statistical methods enabled to determine microorganisms characteristic and related to different soil types. The soil core microbiomes were calculated, for five soils considered as good quality and three considered as acidic, poor quality. The research provided the basis for the search of soil marker bacteria and a better understanding of the relationships between soil physiochemical properties and the microorganisms inhabiting them. The next stage of the research will be the fungal, as well as rhizosphere and endorhizosphere microorganisms diversity analysis.

## **Jakość mikrobiologiczna biomasy używanej jako paliwo**

Microbiological quality of biomass used as fuel

Jacek Grzyb, Krzysztof Frączek, M. Olbryt

Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie, Katedra Mikrobiologii

Perspektywa wyeksploatowania paliw kopalnych oraz wciąż rosnące zanieczyszczenie środowiska naturalnego przyczynia się do większego zainteresowania odnawialnymi źródłami energii. W Polsce dominującym źródłem energii odnawialnej jest biomasa, którą można wykorzystać między innymi jako paliwo. Oprócz korzyści ekologicznych wynikających ze stosowania biomasy jako paliwa w zastępstwie lub wraz z paliwami kopalnymi pojawiają się zagrożenia mikrobiologiczne. Są one związane z obróbką biomasy i powstawaniem bioaerozoli oraz pyłów, które mogą mieć działanie chorobotwórcze, toksyczne drażniące lub alergizujące.

Mając powyższe na uwadze przebadano 12 próbek biomasy. 2/3 próbek stanowiła biomasa świeża: zrębki kukurydzy, zrębki drzewne, zrębki wierzby, a 1/3 biomasa podlegająca naturalnej biodeterioracji podczas składowania na placu. W próbkach badano obecność bakterii, grzybów, promieniowców oraz bakterii kałowych.

Wykazano, że próbki biomasy były w różnym stopniu zanieczyszczone mikrobiologicznie. Największe ilości bakterii i grzybów odnotowano w składowanej biomacie, z kolei większe ilości promieniowców i bakterii kałowych w biomacie świeżej.

The prospect of fossil fuel exploitation and the ever increasing pollution of the environment contribute to increased concern in renewable energy sources. In Poland, the dominant source of renewable energy is biomass, which can be used as fuel. In addition to the ecological benefits of using biomass as a fuel substitute or with fossil fuels occur microbiological hazards. They are related to the treatment of biomass and the formation of bioaerosols and dusts that may be pathogenic, toxic, irritant or allergic.

With this in mind, 12 biomass samples were examined. Two thirds of samples were fresh biomass: corn chips, wood chips, willow chips, and 1/3 biomass subjected to natural biodeterioration during long storage in the biomass square. The samples were examined for bacteria, fungi, actinomycetes, and fecal bacteria.

It has been shown that biomass samples were to a varying degree microbiologically contaminated. The highest amounts of bacteria and fungi were recorded in the stored biomass, while the higher numbers of actinomycetes and fecal bacteria - in fresh biomass.

## Grupy fizjologiczne mikroorganizmów gleb ryzosferowych Spitsbergenu

Physiological groups of microorganisms from rhizosphere soils of Spitsbergen

Agnieszka Hanaka<sup>1</sup>, Jolanta Jaroszuk-Ściśeł<sup>2</sup>, Ewa Ozimek<sup>2</sup>, Małgorzata Majewska<sup>2</sup>, Anna Słomka<sup>2</sup>, Andrzej Plak<sup>3</sup>, Piotr Zagórski<sup>4</sup>, Małgorzata Wójcik<sup>1</sup>, Sławomir Dresler<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Fizjologii Roślin, Wydział Biologii i Biotechnologii

<sup>2</sup>Zakład Mikrobiologii Środowiskowej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

<sup>3</sup>Zakład Gleboznawstwa i Ochrony Gleb, Wydział Nauk o Ziemi i Gospodarki Przestrzennej

<sup>4</sup>Zakład Geomorfologii, Wydział Nauk o Ziemi i Gospodarki Przestrzennej, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Al. Kraśnicka 2cd, 20-718 Lublin

agnieszka.hanaka@umcs.pl

Spitsbergen, ze względu na warunki klimatyczne panujące na wyspie, jest zasobny w mikroorganizmy psychrofilne, które mogą być wykorzystane w biopreparatach w rolnictwie w umiarkowanym klimacie Polski. Próbkę gleb pobrano w NW części Ziemi Wedela Jarsberga z obszarów: Calypsostranda (CAL), Chamberlindalen (CH), Renardbreen (REN), Reimholmen (REIN) i Reinodden (LN). Oznaczono liczebności mikroorganizmów: rozkładających mocznik (ureolitycznych), rozpuszczających fosforany - PSM (ang. Phosphate Solubilizing Microorganisms), syntetyzujących związki kompleksujące żelazo  $Fe^{3+}$ , na tle zawartości wybranych pierwiastków N, P i Fe w glebie.

Najwyższą liczebność bakterii ureolitycznych stwierdzono w lokalizacji CH6 (8,67  $\log_{10}$ ), a najmniejszą w REN1 (6,22  $\log_{10}$ ). Natomiast najniższą zawartość N oznaczono w glebach REN1, 2 (odpowiednio 0,011 i 0,025% N) oraz CAL2 (0,02% N), a najwyższą w REIN2 i 3 (odpowiednio 1,23 i 1,76% N). Najwyższą liczebność PSM oznaczono w glebie CH6 (9,32  $\log_{10}$ ), a najniższą w glebie CAL1 (4,98  $\log_{10}$ ). Wysokiej zawartości P przyswajalnego oznaczonego w glebie (REIN, CH4) towarzyszyła stosunkowo niska liczebność PSM. Najwyższą liczebność bakterii kompleksujących  $Fe^{3+}$  oznaczono w REIN 3 (7,41  $\log_{10}$ ), natomiast najniższą w CAL3 (5,01  $\log_{10}$ ). Najwyższą zawartość Fe przyswajalnego stwierdzono w glebach pobranych w lokalizacjach CAL8, REIN2 i REN1 (odpowiednio 0,74; 0,7 i 0,7 g/kg s.m. gleby). W glebach z lokalizacji CH, gdzie oznaczono niskie stężenie Fe przyswajalnego, stwierdzono podwyższoną liczebność mikroorganizmów kompleksujących żelazo.

Due to the climatic conditions prevailing on the island, Spitsbergen is rich in psychrophilic microorganisms that can be used in biopreparations in agriculture in the moderate climate of Poland. Soil samples were collected in the NW part of the Wedel Jarsberg Land from Calypsostranda (CAL), Chamberlindalen (CH), Renardbreen (REN), Reimholmen (REIN), and Reinodden (LN). The abundance of microorganisms: ureolytic urea, Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM), and synthesizing  $Fe^{3+}$  complexes, was determined against the content of selected N, P, and Fe elements in the soil.

The highest abundance of ureolytic bacteria was found in CH6 (8.67  $\log_{10}$ ) and the lowest in REN1 (6.22  $\log_{10}$ ). The lowest N content was found in REN1, 2 (0.011 and 0.025% N, respectively) and CAL2 (0.02% N) and the highest in REIN2 and 3 (1.23 and 1.76% N, respectively). The highest abundance of PSM was determined in the CH6 soil (9.32  $\log_{10}$ ) and the lowest in the CAL1 soil (4.98  $\log_{10}$ ). The high available P content in soil (REIN, CH4) was accompanied by a relatively low PSM abundance. The highest abundance of  $Fe^{3+}$  complexing bacteria was found in REIN 3 (7.41  $\log_{10}$ ), while the lowest in CAL3 (5.01  $\log_{10}$ ). The highest content of available Fe was found in the soils collected in sites CAL8, REIN2, and REN1 (0.74,

0.7 and 0.7 g/kg soil, respectively). In soils from the CH location, where a low concentration of available Fe was detected, increased numbers of iron complexing microorganisms were found.

## **Skład i funkcja mikrobiomu jelitowego na podstawie badań metagenomowych**

Composition and function of the intestinal microbiome based on metagenomic studies

Monika Elżbieta Jach<sup>1</sup>, Ewa Sajnaga<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katolicki Uniwersytet Lubelski  
Jana Pawła II, ul. Konstantynów II, 20-708 Lublin

<sup>2</sup>Interdyscyplinarne Centrum Badań Naukowych, Laboratorium Biokontroli, Produkcji i Aplikacji EPN,  
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, ul. Konstantynów 1J, 20-708 Lublin

W ramach rozpoczętego w 2007 r. projektu Human Microbiome Project (HMP) prowadzone są badania nad składem ludzkiego mikrobiomu oraz jego wpływem na stan zdrowia człowieka. W tym celu zsekwencjonowano genomy mikrobiomów pochodzących od 250 osób z całego świata. Metagenomowe analizy wykazały, że mikrobiom jelit składa się z 3,3 miliona unikatowych genów, z których większość nie występuje w genomie człowieka. Jest to ilość genów ok. 150 razy większa niż ta zawarta w genomie ludzkim. Na podstawie metagenomowej analizy oszacowano, że w jelicie ludzkim może znajdować się ponad 1000 gatunków bakterii. Analiza sekwencji genów kodujących 16S rRNA ujawniła, że nawet 80% fylotypów (odpowiednik gatunku określony na podstawie analizy 16S rRNA) odpowiada gatunkom bakterii niehodowlanych *in vitro*. Jednym z głównych celów HMP było ustalenie czy ludzkość posiada wspólną, rdzeniową mikroflorę jelitową. Zaskakującym jest fakt, że nie wykryto jednego gatunku bakterii (z założenia >0,5% zespołu mikroorganizmów) występującego w jelicie wszystkich badanych osób. Jednakże dalsze metagenomowe analizy wykazały, że istnieje stały zestaw genów obecny we wszystkich próbkach. Może to wskazywać na istnienie wspólnego dla wszystkich ludzi mikrobiomu na poziomie materiału genetycznego, niezależnie od różnorodności gatunkowej. Ten wspólny dla wszystkich ludzi zestaw genów mikroorganizmów nadaje człowiekowi właściwości metaboliczne, których sam nie rozwinął.

The Human Microbiome Project (HMP) was launched in 2007 to study the characterization of the human microbe genome (microbiome) and its impact on human health. Complete genomes of the microbiome from 250 people from all over the world have been sequenced. Metagenomic analyses have shown that the intestinal microbiome consists of 3.3 million unique genes, of which a significant amount does not occur in the human genome. The amount is 150 times bigger than the number of the genes of the human genome. Based on the metagenomic analysis, it is estimated that over 1000 species of bacteria may be present in the human gut. Analysis of the sequence of the 16S rRNA genes has revealed that up to 80% of the phylotypes (species equivalent based on 16S rRNA analysis) correspond to *in vitro* non-cultured species. One of the main goals of the HMP was to determine the existence of the human intestinal microbiota core. Surprisingly, no one bacterial species (> 0.5% of the microbial population) was found to be present in all tested people. However, further metagenomic analyses have shown that there is a set of genes present in all samples. This may indicate the importance of the existence of a common microbiome for all people at the level of genetic material, regardless of species diversity. This set of microorganism genes common for all humans gives humans metabolic properties that they have not developed themselves.

## **Różnorodność populacji *Colletotrichum coccodes* w świetle badań morfologicznych i genetycznych**

Agnieszka Jamiołkowska, Beata Hetman, Marek Kopacki, Barbara Skwaryło-Bednarz

Katedra Ochrony i Kwarantanny Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,  
ul. Leszczyńskiego 7, 20-509 Lublin, aguto@wp.pl

*Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes uznawany jest za jednego ze sprawców antraknozy korzeni papryki w południowo-wschodniej części Polski. W okresie 2007-2012 gatunek ten był wielokrotnie izolowany z korzeni papryki słodkiej (*Capsicum annuum* L.) uprawianej w polu. Celem pracy była morfologiczna i genetyczna charakterystyka populacji *C. coccodes* występujących na roślinach papryki. Wśród losowo wybranych do badania izolatów sześć pochodziło z kolekcji własnej zaś cztery otrzymano z Banku Patogenów IOR-PIB w Poznaniu. Podczas badania oceniano charakter morfologiczny kultur: tempo wzrostu i kolorystykę grzybni, oraz tworzenie struktur morfologicznych (acerwulusy, konidia, sclerocja). Obserwacje morfologiczne przeprowadzono przy użyciu mikroskopu optycznego i skaningowego. Analizę molekularną izolatów przeprowadzono techniką RAPD-PCR, z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody CTAB. Badania molekularne zróżnicowania genetycznego populacji *C. coccodes* były jednymi z pierwszych tego typu badań przeprowadzonych w Polsce. W obrębie badanej populacji wyróżniono dwie główne grupy skupień, które wykazały na odrębną klasteryzację izolatów pochodzących odpowiednio z liści i korzeni oraz brak zróżnicowania genetycznego pomiędzy izolatami w zależności od miejsca ich pochodzenia.

## Metabolizm endofitycznych szczepów *Fusarium culmorum* a typ interakcji z rośliną

The metabolism of endophytic *Fusarium culmorum* strains and type of interaction with a plant

Jolanta Jaroszuk-Ściseł<sup>1</sup>, Grzegorz Janusz<sup>2</sup>, Artur Nowak<sup>1</sup>, Renata Tyśkiewicz<sup>1</sup>,  
Ewa Ozimek<sup>1</sup>, Małgorzata Majewska<sup>1</sup>, Anna Słomka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Środowiskowej, <sup>2</sup>Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii,  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Trzy blisko genetycznie spokrewnione szczepy *F. culmorum*, posiadające genetyczne determinanty dla syntezy toksyny deoksynivalenolu, różnią się intensywnością kolonizacji korzeni, typem interakcji z komórkami granicznymi korzenia, zdolnością tworzenia struktur mufko podobnych (tylko przez patogena) oraz efektem oddziaływania na rośliny zbożowe (promujący-PGPF, szkodliwy-DRMO i patogenny). Celem badania było określenie czynników wpływających na różnice oddziaływania szczepów na rośliny. Wykazano, że mają one podobną zawartość frakcji ściany komórkowej, ale różnią się znacznie zdolnością do syntezy z egzopolimerów (EPS) i składem tych polimerów. Szczep PGPF produkował EPS tylko w kulturach młodych (2-3 dniowych) i to w najniższych stężeniach. EPS szczepu PGPF zawierał 10 razy więcej białka niż EPS syntetyzowane przez pozostałe szczepy. Frakcje polisacharydowe EPS zawierały monomery glukozy, mannozy i galaktozy, ale w EPS szczepu PGPF przeważała galaktoza, a w EPS szczepów DRMO i patogena, mannoza. Niepatogeniczne szczepy różniły się znacząco od szczepu patogennego pod względem zdolności wykorzystania różnorodnych substratów zarówno w długotrwałych hodowlach autolitycznych jak i w teście Biolog FF MicroPlate™ w młodych hodowlach. Szczepy niepatogeniczne wykorzystywały substraty kilkakrotnie intensywniej i nawet o 96 godzin wcześniej niż szczep patogenny, przy czym silna przewaga szczepu DRMO zaznaczyła się bardziej w niskiej temperaturze (12°C) niż w 20°C. Hodowle szczepu PGPF posiadały wyższą aktywność chitynazy, glukanazy i mannanazy a niższą aktywność ksylanazy, celulazy i pektynazy niż hodowle szczepu DRMO i patogena. Szczep PGPF syntetyzował w najwyższym stężeniu kwas indoliloctowy i giberelinowy a patogen etylen.

Three genetically related *F. culmorum* strains, possess genetic determinants for synthesis of deoxynivalenol toxin, differ in: intensity of root colonisation, type in interaction with root border cells and mantle-like structures formation (only by the pathogen) and effect on cereal plants growth (promoting-PGPF, deleterious-DRMO and pathogenic). The aim of the study was to determine factors contributing to differences in the effect of strains on the plant. It has been shown that they have similar contents of cell wall fractions but vary significantly in the ability to synthesize of exopolymers (EPS) and differ in terms of the composition of these polymers. The PGPF strain produced EPS only in young (2-3 day old) cultures and at the lowest concentrations. The EPS of PGPF strain contain up to 10 times more protein than EPS synthesized by other strains. Polysaccharide fractions of EPS include monomers of glucose, mannose and galactose, but EPS of PGPF was dominated by galactose and in the EPS of DRMO and pathogen strains by mannose. The non-pathogenic strains differed significantly from the pathogenic strain in terms of the use of a wide variety of substrates both in the long-term autolytic culture and in FF Biolog MicroPlate™ test in young cultures. The non-pathogenic strains were able to use several times more substrates and up to 96 hours earlier than the pathogenic strain, with the strong advantage for the DRMO strain, especially at the low temperature (12°C) in relation to the 20°C. The PGPF strain cultures were characterized by higher activity of the chitinase, mannanase and xylanase activity and lower activity of



glucanase, celulase and pectinase than the cultures of the DRMO and pathogenic strain. The PGPF strain synthesized highest concentrations of phytohormones - indoliloacetic and gibberellic acids, but the pathogen cultures exhibited highest concentration of ethylene.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę – projekt nr BS-P-11-010-17-2-07

## Wpływ systemu uprawy na aktywność drobnoustrojów czynnych w przemianach C i N w glebie pod uprawą jęczmienia

Jolanta Joniec<sup>1</sup>, Joanna Bednarz<sup>1</sup>, Rafał Cierpiała<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,  
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin, tel. 81 5248 wew. 161, +48 81 52 48 106, jolanta.joniec@up.lublin.pl

<sup>2</sup>Katedra Herbologii i Technik Uprawy Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,  
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Badania podjęto w celu poznania oddziaływania różnych systemów uprawy, tj. konwencjonalnego i ekologicznego na aktywność enzymatyczną i przebieg procesów biochemicznych w glebie pod uprawą jęczmienia.

Badaniami objęto glebę pochodzącą z trzyletniego doświadczenia polowego, założonego przez Katedrę Herbologii i Technik Uprawy Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Doświadczenie założono w Czesławicach (Polska, woj. lubelskie), na glebie płowej wytworzonej z lessu, zaliczanej do II klasy bonitacyjnej. W doświadczeniu zastosowane były 2 systemy rolnicze: ekologiczny i konwencjonalny. W obu badanych systemach rośliny uprawiane były w pięciopolowym płodozmianie: burak cukrowy, jęczmień jary, koniczyna czerwona, pszenica ozima, owies. W każdym roku pod przedplon jęczmienia jarego stosowano jesienią obornik w dawkach: 30 t•ha<sup>-1</sup> w systemie konwencjonalnym i 40 t•ha<sup>-1</sup> w systemie ekologicznym, a następnie przyorywano go orką zięblą na głębokość 30 cm. W części ekologicznej nie stosowano chemicznej pielęgnacji zasiewów oraz nawożenia mineralnego. Rośliny wysiewane w warunkach rolnictwa konwencjonalnego nawożono nawozami mineralnymi w dawkach ustalonych dla każdego gatunku indywidualnie. Stosowano też środki ochrony roślin zgodne z programem zwalczania agrofagów w poszczególnych uprawach rolniczych. Regulacja zachwaszczenia ładu roślin objętych systemem ekologicznym opierała się wyłącznie na zabiegach mechanicznych.

W czasie trzech lat trwania doświadczenia próbki gleby do analiz pobierano czterokrotnie w ciągu każdego roku tj. przed siewem (I), w fazie krzewienia (II), w fazie wyrzucania wiech (III) oraz w fazie dojrzałości pełnej (IV). W materiale glebowym oznaczano: aktywność dehydrogenaz, ureazy, proteazy oraz nasilenie procesów amonifikacji i nityfikacji.

Przeprowadzone badania wykazały, że zarówno uprawa konwencjonalna jak i ekologiczna wpływały stymulująco na aktywność proteazy i dehydrogenaz w glebie. Efekt ten w przypadku aktywności proteolitycznej wystąpił we wszystkich latach badań, a aktywności dehydrogenazowej tylko w drugim roku. Aktywność ureazy była istotnie wyższa tylko w obiekcie z uprawą ekologiczną i jedynie w trzecim roku trwania doświadczenia.

Aktywność proteazy w glebie objętej zarówno uprawą konwencjonalną jak i ekologiczną kształtowała się na zbliżonym poziomie w poszczególnych terminach. Natomiast aktywność ureazy i dehydrogenaz była najwyższa w IV terminie tj. w fazie dojrzałości pełnej rośliny.

Wyniki dotyczące procesu amonifikacji i nityfikacji wykazały, że jedynie proces nityfikacji podlegał nasileniu. Efekt ten uwidocznił się w glebie spod uprawy ekologicznej w pierwszym i drugim roku badań. Nasilenie procesu nityfikacji było największe w I i II terminie tj. przed siewem i w fazie krzewienia jęczmienia.

## **Filogenetyczny dowód transferu genów symbiotycznych między bakteriami glebowymi rodzaju *Bradyrhizobium* i *Rhizobium***

Phylogenetic evidence of the symbiotic genes transfer between soil bacteria of the genus *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*

Michał Kalita, Wanda Małek, Sylwia Wdowiak-Wróbel, Monika Marek-Kozaczuk,  
Magdalena Wójcik

Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej,  
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Pozycja rodzajowa 10 szczepów bakteryjnych wyizolowanych z brodawek korzeniowych janowca ciernistego (*Genista germanica*) została określona na podstawie analizy porównawczej sekwencji genu 16S rRNA. Sześć izolatów zaklasyfikowano do rodzaju *Bradyrhizobium*. Pozostałe cztery szczepy zgrupowały się na drzewie filogenetycznym, skonstruowanym w oparciu o sekwencje genu 16S rRNA, z bakteriami rodzaju *Rhizobium*. Analiza filogenetyczna sekwencji genów symbiotycznych *nodC* oraz *nodZ* badanych bakterii wykazała złożony profil pokrewieństwa ze szczepami referencyjnymi. Wszystkie izolaty *G. germanica* zaklasyfikowane do rodzaju *Bradyrhizobium* wykazywały najwyższy stopień podobieństwa sekwencji genów *nodC* i *nodZ* do referencyjnych szczepów tego rodzaju, z którymi utworzyły wspólne grona na drzewach filogenetycznych analizowanych genów symbiotycznych. Wszystkie mikrosymbionty *G. germanica* należące do rodzaju *Rhizobium* utworzyły z bakteriami rodzaju *Bradyrhizobium* wspólną grupę na drzewie filogenetycznym genu *nodZ*, natomiast na filogramie genu *nodC* bakterie te rozdzieliły się na dwie grupy: jedną o bliższym pokrewieństwie z rodzajem *Bradyrhizobium* i drugą bliżej spokrewnioną z rodzajem *Rhizobium*. Zaprezentowane wyniki wskazują na horyzontalny transfer genów symbiotycznych pomiędzy szczepami należącymi do różnych rodzajów bakterii brodawkowych.

The genus affiliation of 10 bacterial strains isolated from root nodules of German greenweed (*Genista germanica*) was determined by comparative analysis of the 16S rRNA gene sequences. Six isolates were classified into the genus *Bradyrhizobium*. The other four strains formed, on phylogenetic tree reconstructed from 16S rRNA gene sequences, a common group with reference species of the genus *Rhizobium*. Phylogenetic analysis of the symbiotic gene sequences (*nodC*, *nodZ*) of the studied bacteria exhibited a complex pattern of relationship with reference strains. The *nodC* and *nodZ* gene sequences of all *G. germanica* isolates belonging to the genus *Bradyrhizobium* were most similar to the sequences of reference strains of this genus, with which our isoates formed common clusters on the phylograms reconstructed from the analyzed symbiotic genes sequences. All *G. germanica* microsymbionts belonging to the genus *Rhizobium* grouped within the genus *Bradyrhizobium* on the *nodZ* gene phylogenetic tree, whereas on the *nodC* phylogram they were divided into two groups: one which was close related with the genus *Bradyrhizobium* strains and the other which was clustered with the genus *Rhizobium* species. The results presented in this study indicate horizontal transfer of symbiotic genes between strains belonging to different genera of nodule bacteria.

## **Zalesione zwałowiska pogórnice jako refugia rzadkich gatunków grzybów makroskopowych**

Afforested mine spoils as refugia for rare species of macrofungi

Izabela Lidia Kałucka

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Nieuniknionym skutkiem górnictwa odkrywkowego są zwałowiska nadkładu – rozluźnionych i wymieszanych mas skalnych znad eksploatowanego złoża, charakteryzujących się zwykle niekorzystnymi właściwościami fizycznymi i chemicznymi. Zwałowiska obowiązkowo podlegają rekultywacji technicznej i biologicznej w celu przywrócenia funkcji użytkowych i przyrodniczych, a większość z nich zagospodarowuje się w kierunku leśnym. Zalesienia rekultywacyjne na zwałowiskach, które ze względu na swój silnie antropogeniczny charakter rzadko bywają obiektem badań bioróżnorodności, okazały się być siedliskiem niezwykle bogatym w grzyby makroskopowe, zwłaszcza ektomykoryzowe – tworzące symbiozę z drzewami. Specyficzne, często ekstremalne warunki glebowe i mikroklimatyczne stanowią tu bardzo silny filtr środowiskowy, który powoduje, że obok gatunków kosmopolitycznych czy wykazujących szeroką tolerancję w stosunku do warunków siedliskowych, pojawiają się taksony rzadkie, o wąskich preferencjach ekologicznych. Są wśród nich liczne gatunki uznawane za zagrożone, a także gatunki znane z pojedynczych stanowisk w Polsce, a nawet na świecie. Przy znacznym ograniczeniu konkurencji ze strony innych gatunków, dla grzybów tych zwałowiska i drzewostany rekultywacyjne mogą stanowić ostoję umożliwiającą egzystencję rzadkich, izolowanych populacji.

One of unavoidable effects of open-cast mining are spoil heaps – masses of loosened, mixed and aerated overburden, usually showing poor physical and chemical features. Obligatory technical and biological recultivation of such places aim in reinstatement of utility and natural functions, frequently via forest reclamation. For their strong anthropogenic character, such forests are rarely the object of thorough biodiversity studies, however, they appear to host exceptional diversity of macrofungi, especially of those forming ectomycorrhizal symbiosis with trees. Specific, frequently extreme soil and microclimatic features characterizing heterogeneous overburden heaps do form a strong environmental filter. As a result of limited competition and habitat differentiation, besides cosmopolitan or highly tolerant species many rare taxa showing specific niche preferences were found. Among them are many species considered threatened, some are known from few localities in Poland or even in the world. For these species, mine spoil afforestation may provide valuable refuge enabling existence and survival of rare, isolated populations.

## Ocena aktywności ligninolitycznej mutantów szczepu *Bjerkandera adusta* CCBAS 930

Evaluation of ligninolytic activity of mutants of *Bjerkandera adusta* CCBAS 930

Teresa Kornilłowicz-Kowalska, Kamila Rybczyńska-Tkaczyk

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Katedra Mikrobiologii Środowiskowej,  
Pracownia Mikologiczna, ul. Ileszczyńskiego 7, 20-069 Lublin  
kamila.rybczynska-tkaczyk@up.lublin.pl

Anamorficzny szczep grzyba *B. adusta* CCBAS 930 o uzdolnieniach ligninolitycznych został wyizolowany z czarnej ziemi (Phaeazems wg FAO). Szczep *B. adusta* CCBAS 930 cechuje się właściwościami do biotransformacji ligniny po-przemysłowej, kwasów huminowych oraz pochodnych antrachinonu: daunomycyny i barwników przemysłowych.

Celem pracy było zwiększenia efektywności ligninolitycznej szczepu *Bjerkandera adusta* CCBAS 930.

Szczep macierzysty poddano mutagenezie z wykorzystaniem czynnika chemicznego *N*-metylo-*N*-nitro-*N*-nitrozoguanidyny (MNNG). W płynnych hodowlach stacjonarnych (14 dni, 28°C) z 0,2% dodatkiem ligniny po-przemysłowej, okresowo oznaczano: stopień dekoloryzacji, zawartość związków fenolowych, zawartość białka oraz aktywność zewnątrzkomórkowych peroksydaz: podobnej do chrzanowej (HRP-like), ligninowej (LiP) oraz uniwersalnej (VP). W celu stwierdzenia różnicowania genetycznego szczepu macierzystego *B. adusta* CCBAS 930 i fenotypowego mutantu (M5), który wykazywał najsilniejsze właściwości ligninolityczne, wykonano analizę RAPD.

Uzyskane na drodze mutagenezy MNNG mutanty (M1, M2, M5, M8, M9, M10), charakteryzowały się różnicowanymi właściwościami ligninolitycznymi w porównaniu do szczepu macierzystego *B. adusta* CCBAS 930. Pod koniec 2-tygodnia badań wykazywały aktywność dekoloryzacyjną w zakresie 86-92%. W przypadku mutantu M5, odbarwienie ligniny po-przemysłowej było silnie skorelowane z aktywnością peroksydazy podobnej do chrzanowej (HRP-like) i uniwersalnej (VP). Analiza stopnia polimorfizmu materiału genetycznego szczepu macierzystego *B. adusta* CCBAS 930 i jego mutantu M5 wykonana techniką RAPD pozwoliła stwierdzić różnice w genotypie tych szczepów.

## Ocena przydatności odpadów organicznych do namnażania antagonistycznych szczepów *Trichoderma* sp.

An assessment of the suitability of organic waste for the proliferation antagonistic *Trichoderma* sp. strains

Donata Kosicka-Dziechciarek<sup>1</sup>, Agnieszka Wolna-Maruwka<sup>1</sup>, Jacek Dach<sup>2</sup>, Magdalena Szczech<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej

<sup>2</sup>Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Instytut Inżynierii Biosystemów

<sup>3</sup>Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

Doświadczenie polegało na monitorowaniu liczebności grzybów pleśniowych oraz trzech izolatów *Trichoderma* sp. (T1- *T.atroviride*, T2-*T.harzianum*, T3-*T.harzianum*) w przekompostowanych odpadach warzywniczych (cebulowe i pomidorowe) oraz oborniku. Ponadto określono rodzaj interakcji między autochtonicznymi grzybami wyizolowanymi z kompostów i obornika a szczepami *Trichoderma* sp. Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że największą liczebność grzybów w kompostowanych odpadach cebulowych i oborniku odnotowano w obiekcie z dodatkiem izolatu *Trichoderma* T3. Z kolei w kompostowanych odpadach pomidorowych w kombinacji z dodatkiem szczepu T1. Kompost wytworzony z odpadów cebulowych i pomidorowych okazał się najlepszym nośnikiem dla szczepu T3, kompost sporządzony na bazie obornika dla izolatu T1. Wykazano, że w kompostowanych odpadach cebulowych dominowały szczepy *Penicillium* sp.. Z kolei w odpadach pomidorowych dominującym rodzajem okazał się *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*, natomiast w oborniku *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Clonostachys*. Przeprowadzony test na antagonizm wykazał inhibicyjny wpływ izolatów *Trichoderma* sp. w stosunku do większości wyizolowanych grzybów pleśniowych. Badania dowodzą, że przekompostowane odpady cebulowe i pomidorowe przeznaczone pod uprawę roślin warzywnych są dobrym nośnikiem dla antagonistycznych szczepów *Trichoderma* sp. Słowa kluczowe: grzyby pleśniowe, antagonizm, odpady warzywnicze, obornik

Praca została zrealizowana w ramach projektu pt. „Polskie szczepy *Trichoderma* w ochronie roślin i zagospodarowaniu odpadów organicznych”, nr UDA-POIG.01.03.01-00-129/09-09, współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, Działanie 1.3 Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka

The experiment was conducted in which we applied the plate method of monitor the number of moulds and three *Trichoderma* sp. isolates (T1- *T.atroviride*, T2- *T.harzianum*, T3- *T.harzianum*) in vegetable wastes composted (onion and tomato) and manure. Moreover, we specified the type of interaction between autochthonous fungi isolated from the composts and manure and *Trichoderma* sp. strains applied in the experiment. The research revealed that the greatest number of moulds in the composted onion waste and manure was in the combination with *Trichoderma* T3. The greatest number of moulds in composted tomato waste was found in the combination with strain T1. The onion and tomato waste compost was the best carrier for strain T3, whereas manure was the best carrier for isolate T1. *Penicillium* sp. strain was predominant in the onion waste compost. On the other hand *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. *Fusarium* sp. and *Rhizopus* sp. were predominant in the tomato waste compost, and in manure *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. and *Clonostachys* sp. The antagonism test revealed the inhibitory effect of *Trichoderma* isolates on a most the mould strains isolated.

The research proved that composted onion and tomato waste, which could be used for vegetable growing, was a good carrier for antagonistic strains of *Trichoderma* sp.

The research was conducted as part of the project of the National Centre for Research and Development, No. UDA-POIG.01.03.01-00-129/09-09 'Polish Strains of *Trichoderma* in Plant Protection and Organic Waste Handling'

## **Ekspresja genów *RSH* zaangażowanych w proces odpowiedzi ścisłej u rzepaku (*Brassica napus* L.) pod wpływem czynników stresowych**

Expression of *RSH* genes involved in the stringent response in rape (*Brassica napus* L.) in response to stress conditions

Karolina Kotowicz, Justyna Boniecka, Anna Goc, Grażyna Barbara Dąbrowska

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Zakład Genetyki  
browsk@umk.pl

Geny *RSH* (ang. *RelA/SpoT Homologs*) są to roślinne homologi bakteryjnych genów kodujących białka zaangażowane w proces odpowiedzi ścisłej. Produktami aktywności tych białek są (p)ppGpp – nietypowe nukleotydy nazywane alarmonami. Akumulacja alarmonów odpowiada za przeprogramowanie procesów komórkowych, aby umożliwić przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiska (Dąbrowska i in 2006).

Analiza promotorów genów *RSH* pozwoliła zidentyfikować elementy regulatorowe odpowiedzialne m.in. za odpowiedź na światło, suszę, niską temperaturę, fitohormony czy elicytory grzybowe. W celu określenia poziomu transkryptu czterech typów genów *BnRSH* w czasie kiełkowania nasion w obecności czynników biotycznych i abiotycznych, przeprowadzono reakcję *sqRT-PCR*.

Wykazano obecność genów *RSH* u rzepaku oraz zaobserwowano różnice w poziomie mRNA poszczególnych typów tych genów w nasionach. Dowiedziono również, że ekspresja *RSH* ulega zmianie pod wpływem wybranych czynników powodujących stres. Największe zmiany ekspresji zaobserwowano dla genu *RSH1* i *CRSH*. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że geny *RSH* rzepaku są zaangażowane w reakcje roślin na działanie czynników środowiskowych.

*RSH* (*RelA/SpoT Homologs*) genes are plant homologs of bacterial genes encoding proteins involved in the stringent response. Products of those proteins activity are (p)ppGpp - atypical nucleotides called alarmons. The accumulation of alarmons is responsible for reprogramming of cellular processes that help to survive under unfavorable environmental conditions (Dąbrowska i in. 2006).

*RSH* gene promoter analysis allowed to identify regulatory elements responsible for response to light, drought, low temperature, phytohormones or fungi elicitors. In order to determine the transcript level of four *BnRSH* gene types during seed germination in response to biotic and abiotic factors *sqRT-PCR* was performed.

The presence of *RSH* genes in rapeseed has been demonstrated and differences in mRNA levels of the individual genes in seeds have been observed. It has also been shown that *RSH* expression changes under the influence of selected factors. The largest changes in gene expression were observed for *RSH1* and *CRSH* genes. The results show that rape *RSH* genes are involved in plant responses to environmental factors.

### Literatura/Literature:

Dąbrowska G., Prusińska J., Goc A. (2006) *Roślinny mechanizm adaptacyjnej odpowiedzi na warunki stresowe homologiczny do odpowiedzi ścisłej bakterii*. Postępy Biochemii 52(1): 94-100

Badania sfinansowane z funduszu statutowego UMK



## Ocena przydatności metod ITS-PCR i sekwencjonowania genu 16S rRNA w genotypowaniu *Azotobacter chroococcum*

Evaluation of ITS-PCR and sequencing 16S rRNA genes techniques for *Azotobacter chroococcum* genetic differentiation

Monika Kozieł, Stefan Martyniuk

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
Zakład Mikrobiologii Rolniczej

W ciągu ostatnich lat metody oparte na biologii molekularnej stały się bardzo cennym narzędziem w badaniu różnorodności mikroorganizmów wielu środowisk. Dostępność metod biologii molekularnej jest obecnie dość szeroka, a dobór odpowiedniej techniki często uzależniony jest od wiedzy i dostępu do odpowiedniego sprzętu.

Celem pracy była ocena przydatności metod ITS-PCR oraz sekwencjonowania genu 16S rRNA w genotypowaniu *Azotobacter chroococcum*.

Materiał do badań stanowiły szczepy bakterii z rodzaju *Azotobacter* wyizolowane z gleb z obszarów całej Polski. W celu genotypowania zgromadzonych izolatów zastosowano dwie metody: ITS-PCR i sekwencjonowanie genu 16S rRNA.

Metoda ITS-PCR/RFLP potwierdziła przynależność badanych szczepów do tego samego gatunku – *Azotobacter chroococcum*, gdyż dla wszystkich badanych izolatów uzyskano ten sam profil elektroforetyczny (jeden produkt PCR o długości około 1000pz). Analiza uzyskanych sekwencji 16rDNA potwierdziła, że wyizolowane szczepy należą do gatunku *Azotobacter chroococcum*, a stopień identyczności wynosi od 98-100%.

In recent years, methods based on molecular biology have become a very valuable tool in the study of microbial diversity of many environments. The availability of molecular biology methods is currently quite wide, and the selection of the appropriate technique often depends on the knowledge and access to appropriate equipment.

The aim of this study was to evaluate the usefulness of ITS-PCR and sequencing 16S rRNA genes methods for genotyping of *Azotobacter chroococcum*.

The material for the study was strains of bacteria of the genus *Azotobacter* isolated from soils from all over Poland. For genotyping of collected isolates two methods were applied: ITS-PCR and sequencing 16S rRNA genes.

ITS-PCR / RFLP method assay confirmed that the all strains belong to the same species - *Azotobacter chroococcum*, as the same isolate profile was obtained for all tested isolates (one PCR product of approximately 1000pz). Analysis of 16rDNA sequences confirmed that isolated strains belong to the species of *Azotobacter chroococcum*, and the degree of identity is 98-100%.

## **Analiza zmienności genetycznej wirusa Schmallerberg (SBV) u przeżuwaczy i w muchówkach z rodzaju *Culicoides* spp. w Polsce**

The analysis of genetic variability of Schmallerberg virus (SBV) in ruminants and *Culicoides* spp. biting midges in Poland

Magdalena Larska, Julia Kęsik-Maliszewska, Aleksandra Antos

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

Wirus Schmallerberg jest stosunkowo nowo odkrytym w Europie ortobunywirusem zakażającym głównie przeżuwacze (bydło, owce, kozy) i którego wektorem są owady z rodzaju *Culicoides* spp. (potocznie kuczmany). Szczyt epizootii w Polsce nastąpił w latach 2012 i 2013 i doprowadził do zakażenia do 100% badanych populacji zwierząt. W roku 2012 r. aż u 10% odłowionych kuczmanów na terenie całego kraju stwierdzono obecność materiału genetycznego wirusa. Genom SBV składa się z jednoniciowego RNA o ujemnej polarności zawierającego trzy segmenty: L kodujący polimerazę RNA; M - białko niestrukturalne NSm i glikoproteiny Gn i Gc; oraz S – białko nukleokapsydu i niestrukturalne białko NSs. Przeprowadzone badania mają charakter pionierski. Za pomocą NGS lub sekwencjonowania Sangera uzyskano sekwencje genomowe pełne 10 Polskich szczepów SBV pochodzące z surowicy zakażonego bydła, mózgu martwo-urodzonych jagniąt i kuczmanów z gatunku *C. obsoletus*, które porównano między sobą oraz z dostępnymi szczepami referencyjnymi. Analiza wykazała małą zmienność SBV w Europie. Największą zmienności charakteryzował się fragment segmentu M. Co ciekawe większą zmienność w tym fragmencie wykazywały sekwencje od ssaków, podczas gdy niewiele mutacji niesynonimicznych stwierdzono w sekwencjach od owadów i grupowały się one w innych miejscach sekwencji aminokwasowej, co może mieć istotny wpływ dla patogenezy wirusa.

Schmallerberg virus, an orthobunyvirus that infects mainly ruminants (cattle, sheep and goats), which vectors are blood-suckling midges of the genus *Culicoides* spp. has emerged into Europe quite recently. SBV epizooty peaked in Poland between 2012 and 2013 and led to infection up to 100% of tested animal populations. Moreover, as many as 10% of the midges trapped in the whole country in 2012 were found to carry the genetic material of the virus. The SBV genome consists of a single-stranded negative sense RNA comprising three segments: L encoding RNA polymerase; M - nonstructural protein NSm and glycoproteins Gn and Gc; and S - nucleocapsid protein and NSs protein. The study is pioneering. Using NGS or Sanger sequencing, complete genomic sequences of SBV strains obtained from the serum of infected cattle, the brain of dead lambs and *C. obsoletus* midges were compared to each other and to the available reference strains. The analysis showed a low variability of SBV in Europe. Interestingly, greater variation in this fragment has been shown for mammalian sequences, while only few nonsynonymous mutations have been found in insect sequences and have been grouped elsewhere in the amino acid sequence, which may have a significant impact on the pathogenesis of the virus.

**Identyfikacja zagrożenia mikrobiologicznego wybranych obiektów kolekcji etnograficznej, zgromadzonej przez Benedykta Dybowskiego w latach 1879 – 1883, z wykorzystaniem metod biologii molekularnej**

Identification of the microbiological hazard of selected objects of the ethnographic collection, collected by Benedyctek Dybowski in the years 1879 - 1883, using the methods of molecular biology

Tomasz Lech

Katedra Mikrobiologii  
Wydział Towaroznawstwa, Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie  
ul. Rakowicka 27, 31-510 Kraków, tel. 12 2935803  
tomasz.lech@uek.krakow.pl

Obiekty dziedzictwa kulturowego stanowią szczególny rodzaj towarów, który przed laty zostały wytworzone przez człowieka często jako przedmioty użytkowe, dekoracyjne, czy też mające charakter sakralny. Obecnie dzięki badaniom historycznych zbiorów możliwe jest poznanie rozwoju kultury, dyplomacji, czy też wierzeń minionych społeczeństw. Niestety nieustannie obiekty te ulegają nieodwracalnej deterioracji wywołanej różnymi czynnikami środowiskowymi. Jednym z większych zagrożeń dla obiektów historycznych są mikroorganizmy. Bakterie, promieniowce i grzyby, posiadające potencjał biodeteriacyjny, mogą zasiedlać obiekty historyczne, a także środowiska ich gromadzenia. W przypadku ich aktywnego wzrostu prowadzić mogą nawet do całkowitego ich zniszczenia. Celem niniejszych badań była identyfikację zagrożenia mikrobiologicznego szczególnego obiektu, ze zbiorów Muzeum Etnograficznego w Krakowie jakim jest aleucka parka - futro ze skórek ptasich z piórami. Ten wyjątkowy obiekt trafił do muzeum etnograficznego z kolekcją zgromadzoną przez Benedykta Dybowskiego w latach 1879 – 1883. Ze względu na unikatowość aleuckiej parki w badaniach obok metod klasycznych zastosowano zaawansowane metody biologii molekularnej, pozwalające na uzyskanie dokładniejszych informacji na temat stanu mikrobiologicznego badanego obiektu. Zapewnienie odpowiednich warunków przechowywania wszystkich zbiorów dziedzictwa kulturowego stanowi kluczowy aspekt w ich zabezpieczeniu oraz utrzymaniu w dobrej kondycji fizycznej, tak aby mogły dawać świadectwo minionych kultur przyszłym pokoleniom.

Cultural heritage objects are a special group of goods that were created by humans many years ago, often as utility, decorative or sacral objects. Nowadays, due to historical collections research, it is possible to get known about the development of past societies culture, diplomacy or beliefs. Unfortunately those objects constantly undergo irreversible deterioration caused by various environmental factors. One of the historical objects major risk are microorganisms. Bacteria and fungi capable of biodeterioration can colonize historical objects as well as their storage environments. If they grow actively, they can cause various changes on the surface and in the structure of the material until complete destruction occurs.

The aim of this study was the identification of microbiological hazard of an object from the collection of the Ethnographic Museum in Cracow, which is bird fur with feathers (aleucka parka). This exceptional object was donated to Ethnographic Museum as a part of Benedykt Dybowski collection gathered between 1879 - 1883. Due to aleucka parka uniqueness, both classical and advanced molecular methods were applied, what allow to achieve more accurate information of studied object microbiological status.

Moreover appropriate storage conditions for all cultural heritage collections are curtail to protect them and keep in good physical condition, that they can be a past cultures testimony for future generations.

## Selekcja oraz identyfikacja szczepów bakterii glebowych o potencjalnym zastosowaniu w bioremediacji gleb

Selection and identification of strains of soil bacteria with potential use in soil bioremediation

Anna Lisek, Lidia Sas Paszt, Paweł Trzcíński

Instytut Ogrodnictwa  
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, tel. 46 834 52 21,  
fax 46 833 32 28;  
anna.lisek@inhort.pl

Rozwój przemysłu powoduje wzrost zanieczyszczeń gleb węglowodorami aromatycznymi, wysoko toksycznymi dla ludzi, ponieważ wykazują one działanie kancerogenne i mutagenne. Z tego powodu poszukiwane są metody degradacji i usuwania tych związków z gleby. Do tego celu mogą znaleźć zastosowanie pożyteczne bakterie, które wytwarzają biosurfaktanty w celu zdegradowania węglowodorów i użycia ich jako źródło węgla. Celem badań była ocena przydatności szczepów bakterii do bioremediacji gleb na podstawie zdolności do wytwarzania lipopeptydów oraz identyfikacja szczepów bakterii wykazujących takie właściwości. Testy przeprowadzono dla osiemdziesięciu ośmiu Gram dodatnich szczepów bakterii pozyskanych z gleb z okolic korzeni roślin sadowniczych. Ocenę właściwości wytwarzania lipopeptydów przez szczepy bakterii przeprowadzono przy użyciu techniki analizy DNA z użyciem czterech par starterów specyficznych dla grup lipopeptydów takich jak surfaktyny, mycosubtiliny, fengycyny oraz plipastatyny. Identyfikację szczepów bakterii przeprowadzono na podstawie analizy genu 16S rRNA. Zdolność do wytwarzania lipopeptydów wykazały 33 szczepy bakterii. Największa liczba szczepów bakterii (22) wykazywała zdolność do syntezy surfaktyn, natomiast zdolność do wytwarzania mycosubtilin i plipastatyn wykazywały odpowiednio 8 i 3 szczepy bakterii. Stwierdzono, że szczepy bakterii wytwarzające lipopeptydy należały do rodzajów *Bacillus* oraz *Paenibacillus*.

Industrial development increases the contamination of soils with aromatic hydrocarbons, which are highly toxic to humans as they exhibit carcinogenic and mutagenic activities. For this reason, methods of degrading and removing these compounds from the soil are being sought. For this purpose, use can be made of beneficial bacteria that produce biosurfactants in order to degrade hydrocarbons and use them as a source of carbon. The aim of the study was to assess the usefulness of bacterial strains for soil bioremediation on the basis of their capacity to produce lipopeptides, and to identify those strains that exhibit such properties. The tests were performed for eighty-eight Gram-positive bacterial strains obtained from soils from around the roots of fruit plants. The assessment of the production of lipopeptides by the strains was performed using a DNA analysis technique involving the use of four primer pairs for the three lipopeptide families, taking into account the differences between each synthetase gene. Identification of the bacterial strains was based on the analysis of the 16S rRNA gene. The capability to produce lipopeptides was shown by 33 strains. The largest number of the strains (22) had the capacity for synthesizing surfactin, whereas the ability to produce mycosubtilin and plipastatin was exhibited by, respectively, 8 and 3 bacterial strains. It was found that the strains of the bacteria capable of producing lipopeptides belonged to the genera *Bacillus* and *Paenibacillus*.

## Wpływ insektycydu Decis na aktywność metaboliczną grzybów entomopatogennych.

Influence of Decis insecticide on the metabolic activity of entomopathogenic fungi.

Anna Litwin<sup>1</sup>, Cezary Tkaczuk<sup>2</sup>, Sylwia Różalska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

<sup>2</sup>Zakład Ochrony i Hodowli Roślin, Wydział Przyrodniczy, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach

Insektycydy to substancje z grupy pestycydów powszechnie stosowane w ochronie roślin. Do najczęściej wykorzystywanych zaliczamy związki syntetyczne, do których należą pyretroidy, neonicotynoidy, karbaminy oraz związki chloro- i fosforoorganiczne. Masowe stosowanie insektycydów może wywierać niekorzystny wpływ na organizmy żywe zamieszkujące gleby, w tym grzyby entomopatogenne, które w naturalny sposób kontrolują populacje stawonogów w środowisku.

Celem pracy było określenie wpływu insektycydu Decis (deltametryny zaliczanej do pyretroidów), na zdolność do kiełkowania i aktywność metaboliczną grzybów entomopatogennych.

Badania przeprowadzono na płytkach mikrotitracyjnych, do których dodawano deltametrynę (w stężeniach od 0,001 do 1 g/l) oraz  $2 \times 10^5$  zarodników/ml grzybów entomopatogennych należących do rodzajów *Paecilomyces*, *Beauveria*, *Isaria* i *Metarhizium*. Ponadto, po 48-godzinnej inkubacji, przeprowadzono testy żywotności z diocetanem fluoresceiny (FDA).

Spośród 13 przebadanych szczepów grzybów entomopatogennych najbardziej oporny na obecność Decis w podłożu wzrostowym okazał się szczep *Beauveria brongniartii*, dla którego zanotowano 31% i 82% żywotność, odpowiednio przy stężeniach 62,5 i 7,8 mg/l. Z pozostałych przebadanych szczepów około 50% aktywność metaboliczną (przy stężeniu deltametryny 7,8 mg/l) wykazały szczepy *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* i *Metarhizium robertsii*.

Stwierdzono, że *Beauveria brongniartii* charakteryzuje się najmniejszą wrażliwością na obecność badanego insektycydu w podłożu wzrostowym.

Insecticides are a group of pesticides frequently used in plant protection. Synthetic insecticides such as pyrethroids, neonicotinoids, carbamates and organophosphates, organochlorides are the most common. The widespread use of insecticides can adversely affect soil organisms, including entomopathogenic fungi, which naturally control arthropod populations in the environment.

The aim of the study was to determine the effect of insecticide Decis (pyrethroid deltamethrin) on germination ability and metabolic activity of entomopathogenic fungi.

The experiments were performed on microtiter plates with deltamethrin (in concentrations from 0.001 to 1 g/l) and  $2 \times 10^5$  spores/ml of entomopathogenic fungi belonging to the genera of *Paecilomyces*, *Beauveria*, *Isaria*, and *Metarhizium*. Moreover, at 48 hour of incubation, the viability tests with fluorescein diacetate (FDA) were conducted.

Among 13 tested strains of entomopathogenic fungi, the *Beauveria brongniartii* strain was the most resistant to Decis and its viability was 31% and 82% at 62.5 and 7.8 mg/l concentration of the insecticide, respectively. In case of the other tested strains, about 50% of the metabolic activity (at concentration of deltamethrin 7.8 mg/l) was detected for *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride* i *Metarhizium robertsii*.

It was found that *Beauveria brongniartii* is the least sensitive to the presence of Decis in growth medium.

## Metagenomowa analiza bakterii zasiedlających liście różnych odmian szybko rosnących drzew *Paulownia* sp.

Metagenomic analysis of bacteria inhabiting leaves of various cultivar fast growing tree of *Paulownia* sp.

Małgorzata Łyszcz, Anna Gałązka

Zakład Mikrobiologii Rolniczej,  
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy,  
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, tel. (0-81) 4786950,  
mlyszcz@iung.pulawy.pl

*Paulownia* sp. jest szybko rosnącą odmianą drzewa liściastego, należącego do rodziny *Paulowniaceae*, również zaliczanego do rodziny *Scrophulariaceae* (wcześniejsza nazwa). Najbardziej znaczącymi gatunkami tego rodzaju są *P. albiphloea*, *P. australis*, *P. catalpifolia*, *P. elongata*, *P. fargesii*, *P. fortunei*, *P. kawakamii* i *P. tomentosa*. Drzewo to pochodzi z Chin, gdzie uprawiane jest już od ponad 2000 lat. Gatunki tego rodzaju są bardzo dobrze przystosowane do szerokich zmian czynników glebowych i klimatycznych, rosną na glebie określanych jako marginalne. Liście *Paulownia* sp. mają wysoką zawartość białka (około 20%), tłuszczów oraz cukrów.

Fyllosfera – to nadziemna część roślin, która jest ważnym i wszechobecnym siedliskiem dla bakterii. Natomiast bakterie są ważne dla gospodarzy roślinnych. Mikroorganizmy z komórkami gospodarza zapewniają kompleksowy ekosystem określający liczne i różnorodne procesy biologiczne. Szczegółowe cele tego badania to określenie różnorodności drobnoustrojów zamieszkujących liście *Paulownia* sp. Analiza różnorodności strukturalnej, która jest jakościową i ilościową analizą zawartości populacji bakterii, była wykonana przy użyciu nowoczesnej techniki, którą jest sekwencjonowanie następnej generacji hiperzmiennych fragmentów genu 16S rDNA. Analiza fragmentów V3-V4 wykazała, że *Calothrix parietina* występuje w każdej próbce liści bez względu na odmianę drzew. Prawdopodobnie ten gatunek jest charakterystyczny dla odmian drzew *Paulownia* sp.

*Paulownia* sp. is a fast growing variety of deciduous tree, which belongs to *Paulowniaceae* family but also is included in *Scrophulariaceae* family (earlier name). The most significant varieties of this kind are *P. albiphloea*, *P. australis*, *P. catalpifolia*, *P. elongata*, *P. fargesii*, *P. fortunei*, *P. kawakamii* and *P. tomentosa*. This tree comes from China, where it is cultivated already for more than 2000 years. The species from this type are extremely well-adjusted to wide changes of soil and climate factors, they grow on soil referred to as marginal. *Paulownia* leaves have a high protein content (about 20%), fats and sugars.

The phyllosphere - the aerial surfaces of plants is an important and ubiquitous habitat for bacteria. On the other hand bacteria are important to their plant hosts. The microorganisms with the host cell systems provide a comprehensive ecosystem determining a number of diverse biological processes. Detailed aims of the study is definition of the diversity of microorganisms inhabiting leaves of *Paulownia* sp. The analysis of structure diversity which is the qualitative and quantitative species content analysis of bacteria population was performed by modern technique, which is next-generation sequencing of hypervariable fragments of 16S rDNA gene. Analysis of variable V3-V4 fragments revealed that *Calothrix parietina* is present in every leaf sample irrespective of tree species. Probably this species is characteristic of *Paulownia* sp.



## Ekstrakcja Cd i związków kompleksujących Fe(III) z powierzchni korzeni żyta (*Secale cereale*) i kostrzewy owczej (*Festuca ovina*)

Extraction of Cd and Fe(III)-chelators from root surface of rye (*Secale cereale*) and sheep fescue (*Festuca ovina*)

Małgorzata Majewska, Jolanta Jaroszuk-Ściśeł, Artur Nowak, Ewa Ozimek, Anna Słomka, Renata Tyśkiewicz

Zakład Mikrobiologii Środowiskowej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Celem przeprowadzonych badań było porównanie akumulacji Cd w biomasie żyta (*Secale cereale* „Dańkowskie Złote”) oraz kostrzewy owczej (*Festuca ovina*) – roślin o istotnym potencjale fitoremediacyjnym. Wykorzystując metodę ekstrakcji 0,1M NaNO<sub>3</sub> określono potencjalną mobilność zimmobilizowanego Cd oraz związków kompleksujących Fe(III) zgromadzonych na powierzchni korzeni tych roślin. Akumulacja Cd przez rośliny (3-tygodniowa hodowla hydroponiczna) zależała od stężenia tego metalu w podłożu wzrostu (roztwór Hoagland’a) oraz gatunku rośliny. Zarówno przy stężeniu 1 jak i 10 µg Cd ml<sup>-1</sup> podłoża, w korzeniach *F. ovina* było akumulowane 2 razy więcej Cd niż w korzeniach *S. cereale*, a translokacja Cd do części nadziemnych kostrzewy była 3 razy wydajniejsza w porównaniu do tej stwierdzonej u żyta. Kadm unieruchomiony przez korzenie *S. cereale* był trudniej ekstrahowany 0,1M NaNO<sub>3</sub> niż metal zimmobilizowany przez korzenie *F. ovina*. Wydajność uruchamiania Cd z korzeni kostrzewy wynosiła 14% a z korzeni żyta 6%, gdy rośliny rosły w podłożu zawierającym 1 µg Cd ml<sup>-1</sup> lub odpowiednio, 34% i 28%, gdy rosły w podłożu zawierającym 10 µg Cd ml<sup>-1</sup>. Z korzeni *F. ovina* ekstrahowano istotnie więcej związków kompleksujących Fe(III), w tym sideroforów hydroksamowych i katecholowych, niż z korzeni *S. cereale*. Niezależnie od gatunku rośliny, zwiększenie stężenia Cd w podłożu powodowało wzrost ilości chelatorów Fe(III) deponowanych na powierzchni korzeni. Na podstawie uzyskanych wyników, można wnioskować, że związki kompleksujące obecne w wydzielinach korzeniowych zwiększały mobilizację Cd unieruchomionego przez korzenie.

The aim of the study was to compare the accumulation of Cd by roots of rye (*Secale cereale* „Dańkowskie Złote”) and sheep fescue (*Festuca ovina*) – plants exhibiting significant potential for phytoremediation. By using the extraction procedure with 0.1M NaNO<sub>3</sub>, the potential mobility of Cd and total Fe(III)-chelators immobilized on the roots surface of these plants was determined. Accumulation of Cd by plants (3-week hydroponic cultivation period) depended on the concentrations of Cd in the growth medium (Hoagland solution) and the plant species. At both concentration levels of Cd (1 or 10 µg Cd ml<sup>-1</sup>), twice as much metal was accumulated in the roots of *F. ovina* than in the roots of *S. cereale*, and translocation of Cd to the shoots was three times higher in fescue than in rye. Cadmium immobilized by the roots of *S. cereale* was harder to extract with 0.1M NaNO<sub>3</sub> than the metal bound by *F. ovina* roots. The effectiveness of metal mobilization was 14% from fescue roots and 6% from the rye roots, when plants growth at 1 µg Cd ml<sup>-1</sup>, and 34% and 28% respectively, when plants grew at 10 µg Cd ml<sup>-1</sup>. During Cd extraction with 0.1M NaNO<sub>3</sub>, not only the metal but also organic ligands were released from the root surface. Significantly more Fe(III)-chelators, including hydroxamate and catechol siderophores, were extracted from *F. ovina* roots than *S. cereale* roots. Regardless of the plants species, the increase of amount of Fe(III)-chelators deposited on the root surface was positively correlated with the quantity of added Cd. These observations allow us to conclude that organic ligands present in the root exudates increased Cd mobilization from roots.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę – projekt nr BS-P-11-010-17-2-07

## Występowanie i liczebności bakterii wiążących N<sub>2</sub> w glebach polski

### Occurrence of N<sub>2</sub> fixing bacteria in Polish soils

Stefan Martyniuk, Monika Kozieł

Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, Sm@iung.pulawy.pl

W pracy przedstawiono wyniki badań nad występowaniem w glebach uprawnych Polski następujących grup bakterii uzdolnionych do asymilacji azotu atmosferycznego: - wolno żyjących w środowisku glebowym asymilatorów N<sub>2</sub> z rodzaju *Azotobacter*, oraz – bakterii symbiotycznych (*Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*) roślin bobowatych. Występowanie oraz liczebności bakterii z rodzaju *Azotobacter* oznaczano metodą rozcieńczeń na płytkach z bezazotową pożywką agarową, natomiast bakterii brodawkowych metodą biotestu z siewkami roślin bobowatych rosnącymi na sterylnym piasku zaszczipianym wzrastającymi rozcieńczeniami badanych gleb (10<sup>-1</sup> - 10<sup>-6</sup>).

Przeprowadzone badania wykazały, że bakterie należące do rodzaju *Azotobacter* występują w około 50% gleb Polski, na ogół o pH powyżej 6,0. Bakterie symbiotyczne koniczyny, grochu i bobiku występują powszechnie w glebach Polski, nawet w glebach, na których od wielu lat nie uprawiano wymienionych roślin. Bakterii tych nie stwierdzono tylko w około 5% gleb (na 80 badanych) i były to gleby lekkie, silnie zakwaszone (pH<sub>(KCl)</sub> < 4,5). Bakterii symbiotycznych łubinu i fasoli nie wykryto w około 25% badanych gleb. Symbionty łubinu są najliczniejsze w glebach średnio zwięzłych i w glebach lekkich o odczynie lekko kwaśnym lub kwaśnym, czyli w glebach najczęściej obsiewanych tą rośliną. W większości naszych gleb brak jest bakterii symbiotycznych lucerny i soi lub liczebności tych bakterii są bardzo niskie.

Results of studies on the occurrence and numbers of free living N<sub>2</sub>-fixing bacteria of the genus *Azotobacter* and symbiotic bacteria (*Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*) of legumes in Polish soils are presented in this work. Numbers of *Azotobacter* spp. were assessed by a plate-dilution method on N-free agar medium and those of root-nodule bacteria using a sand pouch–plant infection method (bio-tests) with seedlings of leguminous plants inoculated with soil dilutions (10<sup>-1</sup> - 10<sup>-6</sup>).

It was found that bacteria belonging to the genus *Azotobacter* colonize about 50% of Polish soils having the pH above 6.0. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (symbionts of pea, faba bean, vetch) and *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (symbionts of clover) were detected in 77 and 76 soils, respectively, of 80 soils examined. Most of these soils contained moderate and high numbers of these species of the rhizobia. Symbionts of beans, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, were assessed in 76 soils; of this number 15 soils had no detectable populations of bean rhizobia and in 40 soils high or moderate numbers of these bacteria were found. *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), root nodule bacteria of lupine and serradella, were absent in 19 soils, out of 80 tested, and 34 soils were colonised by high or moderate populations of bradyrhizobia. *Sinorhizobium meliloti*, symbionts of alfalfa, were sparse in the examined soils; with 56 soil containing no detectable numbers of *S. meliloti* and only 6 soils harbouring high or moderate populations of this species. The estimated numbers of the rhizobia in the studied soils were also related to some physical and chemical properties of these soils.

## Zróźnicowanie składu monomerów cukrowych egzopolimerów syntetyzowanych przez glebowe i ryzosferowe szczepy *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. i *Penicillium* spp.

Differentiation of sugar monomer compositions of exopolymers synthesized by soil and rhizospheric *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. and *Penicillium* spp.

Artur Nowak<sup>1</sup>, Jolanta Jaroszuk-Ściśeł<sup>1</sup>, Iwona Komaniecka<sup>2</sup>, Adrian Wiater<sup>3</sup>, Grzegorz Janusz<sup>4</sup>, Renata Tyśkiewicz<sup>1</sup>, Ewa Ozimek<sup>1</sup>, Małgorzata Majewska<sup>1</sup>, Anna Słomka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Środowiskowej

<sup>2</sup>Zakład Genetyki i Mikrobiologii

<sup>3</sup>Zakład Mikrobiologii Przemysłowej

<sup>4</sup>Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, UMCS, Akademicka 19. 20-033 Lublin

Mikrobiologiczne egzopolimery (EPS) są wielkocząsteczkowymi związkami zawierającymi głównie polisacharydy i aminocukry ale także białka i związki o charakterze fenolowym. Polisacharydy wchodzące w skład EPS zbudowane są z powtarzających się cukrowych monomerów połączonych ze sobą wiązaniami  $\alpha$  lub  $\beta$ . W zależności od tego czy monomery są jednego typu czy zróżnicowane wyróżnia się, odpowiednio, homo- oraz heteropolimery. Budowa i skład EPS może mieć kluczowe znaczenie w kształtowaniu ich właściwości antyoksydacyjnych, antymikrobiologicznych czy zdolności do indukcji odporności roślin. Egzopolimery grzybów *Ascomycota* wpływają na interakcje zachodzące w ryzosferze i tkankach roślin z innymi mikroorganizmami oraz roślinami. Zbadano zdolność do wytwarzania oraz skład EPS 9 szczepów *Ascomycota* reprezentujących trzy rodzaje: *Fusarium* (*F. avenacum* Fa4, *F. oxysporum* Fo14, *F. graminearum* Fg36), *Trichoderma* (*T. harzianum* Th32Ag3, *T. koningii* Tk3Ag0, *T. reesei* TrF560) oraz *Penicillium* (*P. janthinellum* Pj4Ag0, *P. lanosum* Pl7, *P. chrysogenum* Pch46). Hodowle prowadzono w 20°C na podłożu zawierającym sacharozę i pepton. EPS uzyskany poprzez precypitację alkoholową, liofilizowano, hydrolizowano i poddawano analizie metodą chromatografii gazowej. We wszystkich badanych EPS glukoza, galaktoza i mannoza stanowiła ponad 99% a arabinoza oraz gluko- i galaktoaminy występowały w śladowych ilościach. Wykazano, że EPS szczepów Fa4 i Fg36 były niemalże czystymi glukanami (96% i 98% glukozy). EPS szczepów *Penicillium* spp. i *F. oxysporum* okazały się mannogalakto-glukanami, natomiast EPS szczepów *Trichoderma* spp. glukogalakto-mannanami zawierającymi 40-50% glukozy, 30% galaktozy i 16-30% mannozy.

Microbial exopolymers (EPS) are high molecular compounds containing mainly polysaccharides and aminosugars, but also proteins and phenolic compounds. Polysaccharides that are part of the EPS are built of repeating sugar monomers linked together by  $\alpha$  or  $\beta$  bonds. EPS are divided on homo- and heteropolymers depending on the monomers type. Structure and composition of the EPS may be crucial in shaping their antioxidant, antimicrobial or plant resistance inducing properties. Exopolymers of *Ascomycota* fungi affect interactions in rhizosphere and plant tissues with other microorganisms and plants. The ability to synthesize and the composition of the EPS of 9 strains of *Ascomycota*, representing the three genera: *Fusarium* (*F. avenacum* Fa4, *F. oxysporum* Fo14, *F. graminearum* Fg36), *Trichoderma* (*T. harzianum* Th32Ag3, *T. koningii* Tk3Ag0, *T. reesei* TrF560) and *Penicillium* (*P. janthinellum* Pj4Ag0, *P. lanosum* Pl7, *P. chrysogenum* Pch46) has been studied. Cultures were carried out at 20°C on a medium containing sucrose and peptone. The EPS obtained by alcohol precipitation has been lyophilized, hydrolysed and analyzed by gas chromatography. In all EPS, glucose, galactose and mannose represented more than 99% but arabinose and glucu- and galactoamins were in the traces. It has been shown that the EPS of Fa4 and Fg36 strains were almost pure glucans (96% and 98% glucose). EPS of *Penicillium* spp. and *F. oxysporum*

were mannogalactoglucans, while EPS of *Trichoderma* spp. were glucogalactomannans containing 40-50% glucose, 30% galactose and 16-30% mannose.

Praca finansowana ze środków na naukę w ramach projektu badawczego BS-M-11-010-16-2-09

## Grzyby: identyfikacja morfologiczna czy metabarkoding – która z metod sprawdza się lepiej?

Fungi: morphological identification or metabarcoding – which method performs better?

Alicja Okraśńska<sup>1</sup>, Julia Pawłowska<sup>1</sup>, Przemysław Decewicz<sup>2</sup>, Łukasz Dziewit<sup>2</sup>,  
Łukasz Istel<sup>1</sup>, Marta Wrzosek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Filogenetyki Molekularnej i Ewolucji, Wydział Biologii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych,  
Uniwersytet Warszawski, ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa

<sup>2</sup>Zakład Genetyki Bakterii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Dotychczasowe ekologiczne badania grzybów przeprowadzano głównie przy użyciu metod morfologicznych. Identyfikacja morfologiczna jest jednak obarczona wieloma wadami, tj. wymaga specjalistycznej wiedzy z zakresu morfologii (a także fizjologii grzybów), a co za tym idzie jest nie tylko czaso- i pracochłonna, ale i uzależniona od umiejętności i doświadczenia badacza. Ponadto, wybiórczy wzrost grzybów na podłożach hodowlanych stanowi dodatkową przeszkodę w poznaniu pełnej różnorodności grzybów mikroskopowych w danej próbie środowiskowej. Przeprowadzone przez nas badanie ma na celu sprawdzenie, czy metody oparte na sekwencjonowaniu nowej generacji i narzędziach bioinformatycznych są w stanie dać pełniejszy obraz składu gatunkowego micromycetes niż tradycyjne metody oparte na analizach morfologii. Trzeba podkreślić jednak, że metody oparte o analizy NGS nie są pozbawione wad. Ich wynikiem jest zbiór markerowych sekwencji nukleotydów, które same w sobie nie niosą żadnej informacji. Dopiero w oparciu o porównanie uzyskanych sekwencji DNA z bazami sekwencji referencyjnych możliwe jest uzyskanie informacji, czyli identyfikację danego organizmu. W związku z niedoskonałością baz danym tj. GenBank czy UNITE, wśród uzyskanych przez nas wyników tylko 20% nie zostało zidentyfikowanych do poziomu gatunku. Z drugiej strony, przy użyciu metod opartych na NGS otrzymaliśmy prawie pięć razy więcej gatunków niż w przypadku metod morfologicznych. Ponadto udało się zidentyfikować kilka gatunków dotychczas nienotowanych w Polsce – np. *Mortierella alliacea* czy *M. amoeboides*.

Traditional methods used in ecological studies to identify fungal taxa are mainly based on morphological features of given organisms. However, these methods are not perfect. Effectiveness of given methods depend on overall knowledge of fungal morphology, physiology and taxonomy. Therefore traditional methods are not only time-consuming and labor-intensive but also very researcher's skills-dependent. Selective growth on agar media is another obstacle decreasing identification of full mycodyversity of a given environmental sample. Our study aimed to check whether NGS methods can give more complex and full insight into micromycetes' diversity than traditional methods. However, NGS-based methods also have disadvantages. The result of such analysis is a pool of nucleotide barcode sequences which are not an information *per se*. Only comparing obtained sequences with reference databases can result in identification of organisms. Only 20% of sequences obtained in our study could not be identified on species level what is probably due to imperfection of databases like GenBank and UNITE. On the other hand, using NGS and bioinformatic tools we obtained almost five times more species than we did while using morphology-based methods. Moreover, our results revealed some species, which has not been identified in Poland before, e.g. *Mortierella alliacea* or *M. amoeboides*.

## Ocena oddziaływania napropamidu na aktywność enzymatyczną gleby w doświadczeniu polowym z nagietkiem lekarskim (*Calendula officinalis* L.)

Assessment of napropamide effect on soil enzymatic activity in field experiment with marigold (*Calendula officinalis* L.)

Mirosław Onyszko, Martyna Śnioszek, Maciej Płatkowski,  
Arkadiusz Telesiński, Michał Stręk

Katedra Fizjologii Roślin i Biochemii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Celem przeprowadzonych badań była ocena oddziaływania napropamidu, zastosowanego w uprawie nagietka lekarskiego, na aktywność dehydrogenaz, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy zasadowej i ureazy w glebie.

Trzyletnie doświadczenie polowe, przeprowadzono w układzie bloków losowanych, z nagietkiem lekarskim (*Calendula officinalis* L.) odmiany Pacific Persimmon Beauty, jako rośliną testową. W doświadczeniu zastosowano następujące dawki napropamidu: 0 (gleba kontrolna), połowa dawki polowej, dawka polowa oraz dwukrotnie większa. Napropamid został wprowadzony do gleby jako substancja aktywna preparatu Devrinol 450 SC. Bezpośrednio po wprowadzeniu napropamidu (1. dzień doświadczenia) oraz w poszczególnych fazach rozwojowych rośliny testowej (faza dwóch par liści, faza zawiązywania pąków oraz faza kwitnienia) oznaczono aktywność enzymów glebowych.

Oddziaływanie napropamidu na aktywność biologiczną gleby zależało od dawki herbicydu, terminu pomiaru, jak i rodzaju enzymu. Wielokrotnie nie występowała wyraźna zależność pomiędzy aktywnością enzymatyczną a wielkością zastosowanej dawki herbicydu. Aplikacja napropamidu, w dawce zalecanej przez producenta oraz o połowę mniejszej, okazała się mało toksyczna w stosunku do oznaczanych enzymów. Natomiast wprowadzenie dawki podwyższonych napropamidu w większości przypadków spowodowało obniżenie oznaczanych parametrów biologicznych gleby. Spośród oznaczanych enzymów największą wrażliwością na obecność w glebie napropamidu charakteryzowały się dehydrogenazy.

The aim of study was to assess of effect of napropamide on dehydrogenases, acid phosphatase, alkaline phosphatase and urease activities in soil during the marigold cultivation. A three-year field experiment was carried out in a randomized blocks, with marigold (*Calendula officinalis* L.) cv. Pacific Beauty Persimmon as a test plant. In experiment, the following dosages of napropamide were used: 0 (control soil), half of the field rate, the field rate and two times of field rate. Napropamide was applied into the soil in both experiments as active substance of Devrinol 450 SC. Immediately after the application of napropamide (first day of the experiment) and in individual development stages of the test plant (two pairs of leaves, formation of buds and flowering), activity of dehydrogenases, urease, acid phosphatase, alkaline phosphatase were determined.

The effect of napropamide on soil enzymatic activity depended on the herbicide dosage, and on the term of measurement and type of enzyme. The use of napropamide at the dosage recommended by the manufacturer or smaller was proved to be less toxic to the soil enzymes. As a contrast, the application of higher napropamide dosage, in most cases, resulted in decrease in soil biological parameters. Among assayed enzymes dehydrogenases were the most vulnerable to the presence of napropamide.

## Zastosowanie NGS w analizach metapopulacji mykobioty gleby po aplikacji biopreparatów w uprawie sałaty

Metapopulation analysis of the soil mycobiome after application of biopreparations in lettuce cultivation

Michał Oskiera<sup>1</sup>, Urszula Smolińska<sup>1</sup>, Grzegorz Bartoszewski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Mikrobiologii, Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

<sup>2</sup>Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Rozwój technologii NGS (Next Generation Sequencing) w połączeniu ze wzrostem ilości i jakości uzyskiwanych danych niesie ze sobą wiele nowych możliwości badania środowiska naturalnego. Sekwencjonowanie wysokoprzepustowe umożliwia jednocześnie rozpoznanie setek taksonów i określenie ich wzajemnych proporcji w badanej próbce. Dodatkowo, identyfikacja mikroorganizmów bez konieczności ich namnażania na podłożach mikrobiologicznych, nie jest ograniczona selektywnym wzrostem poszczególnych grup mikroorganizmów. Dostępność informacji o tym, jakie mikroorganizmy są w danym środowisku i w jakich proporcjach, oraz możliwość jednoczesnej analizy wielu prób umożliwia śledzenie zmian jakie następują w środowisku, pod wpływem różnorodnych czynników. W Instytucie Ogrodnictwa we współpracy z SGGW badano populację mikroorganizmów w glebie po aplikacji biopreparatów w uprawie polowej sałaty. Do gleby wprowadzono mieszaniny grzybów *T. atroviride* i *T. harzianum* sensu stricto namnożonych na nośnikach organicznych, a następnie wysadzono sałatę. Reprezentatywne próby gleby pobrano z poletek doświadczalnych przed aplikacją preparatów z *Trichoderma*, podczas uprawy sałaty oraz po zbiorze roślin. Z prób wyizolowano DNA i amplifikowano region ITS1 grzybów. Do sekwencjonowania wykorzystano platformę Illumina Miseq, a następnie uzyskane sekwencje analizowano bioinformatycznie. Otrzymane wyniki dostarczyły niezwykle dużo informacji o mikroorganizmach bytujących w badanym środowisku glebowym. Przeprowadzone badania zostały sfinansowane przez UE jako część projektu Nr UDA-POIG.01.03.01-00-129/09-08.

Development of Next Generation Sequencing (NGS) technology, increasing the quantity and quality of obtained data, offers many new opportunities for environmental research. High-throughput sequencing, allowing simultaneous recognition of hundreds of taxa and determining their proportions in the sample. In addition, the identification of microorganisms without the necessity of their cultivation on microbial media is not limited by the selective growth of particular microbial groups. Availability of the taxonomic information about microorganisms in the environment, their proportions, and the ability to simultaneously analyze multiple samples, allows monitoring of the changes that occur in the environment under the influence of various factors. In the Research Institute of Horticulture in cooperation with WULS, soil microorganisms were studied after biopreparations application in the field cultivation of lettuce. Mixtures of the *T. atroviride* and *T. harzianum* sensu stricto overgrown on organic carrier was added to the soil and planted with lettuce. Representative soil samples were taken from experimental plots prior to application of *Trichoderma* biopreparations, during lettuce cultivation and after harvest. DNA was isolated from the samples and the fungal ITS1 was amplified. Illumina Miseq platform was used for sequencing, and sequences were analyzed bioinformatically. The results provided a lot of information about the microorganisms present in the analyzed soil environment.

This study was financed by The European Union as a part of the project No UDA-POIG.01.03.01-00-129/09-08



## Defoliacja jako stymulator infekcji *Phytophthora plurivora* na pędach brzozy

Defoliation stimulating infections by *Phytophthora plurivora* on birch shoots

Tomasz Oszako<sup>1</sup>, Dzmitry Voitka<sup>2</sup>, Miłosz Tkaczyk<sup>1</sup>, Sławomir Lipiński<sup>1</sup>, Małgorzata Gorzkowska<sup>3</sup>, Anna Tereba<sup>3</sup>, Lassaâd Belbahri<sup>4</sup>, Justyna Anna Nowakowska<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Forest Protection, Forest Research Institute, Braci Leśnej 3, Sękocin Stary 05-090, Poland

<sup>2</sup>Institute of Plant Protection, 2 Mira Street, Priluki BY-223011, Minsk District, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Laboratory of Molecular Biology, Forest Research Institute, Braci Leśnej 3, Sękocin Stary 05-090, Poland

<sup>4</sup>University of Neuchâtel, Rue Emile Argand 11, 2009 Neuchâtel, Switzerland

T.Oszako@ibles.waw.pl

Ocena wpływu stresu defoliacji (utruty wszystkich (100%) lub części liści (50%) jako symulacja uszkodzenia od owadów i zakażenia pędów jednoletnich siewek brzozy (*Betula pendula* L.). Do inokulacji wykorzystano gatunek lęgniowca *P. plurivora* wyhodowany na pożywce PDA przez 7 dni w temperaturze 25 ° C. Po usunięciu wszystkich lub obcięciu połowy każdego liścia, pędy brzozy (u podstawy: 5-7 cm nad ziemią) zaszczepiono izolatem *P. plurivora* w 10 powtórzeniach, poprzez nacięcie tkanki kory. Uszkodzenia oceniono po 70 dniach na podstawie pomiarów nekroz (długości i szerokości) oraz przeanalizowano różnice między wariantami za pomocą testu Kruskala-Wallisa. W badaniach potwierdzono, że gatunek *B. pendula* jest potencjalnym żywicielem patogena *P. plurivora*. Wyniki naszych badań wykazały statystycznie istotną różnicę zmian szerokości uszkodzeń pędów brzozy po zaszczepieniu. Poziom defoliacji (50%) stymulował reakcje odpornościowe u siewek brzozowych (mniejsze nekrozy na szerokość), natomiast całkowita utrata ulistnienia stymulowała radialny rozwój patogena w zakażonych tkankach powodując większe zagrożenie śmiertelności.

To evaluate the effect of stress and infection of *Betula pendula* (1-year-old seedlings) artificial removal of all or partial foliage (100% and 50%) simulated insect damage to plants. *P. plurivora* infection inoculum was produced by growing the oomycete on PDA for 7 days in Petri dishes at 25°C. One day after defoliation, 10 plants were inoculated with *P. plurivora* in each treatment variant. Artificial inoculation at the base of each stem of birch with the pathogen was carried by cutting the bark tissue 5-7 cm above the soil. The level of stem damage was assessed after 70 days by measuring the dimensions of lesions, and the differences among variants evaluated with Kruskal-Wallis Test. Our findings proved that *B. pendula* is the host of *P. plurivora*. The results of our investigation have shown the statistically significant difference of the lesions width on birch trunks after inoculation. The level of 50% defoliation stimulated resistance of plants while the total defoliation stimulated growth of pathogen.

## Różnorodność kataboliczna i genetyczna izolatów *Petriella setifera* hodowanych na odpadach organicznych

Genetic and catabolic diversity of *Petriella setifera* cultured on organic waste

Karolina Oszust, Jacek Panek, Giorgia Pertile, Anna Siczek, Marta Oleszek, Magdalena Frąć

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin  
m.frac@ipan.lublin.pl, koszust@ipan.lublin.pl

*Petriella setifera* – gatunek należący do Ascomycota, Microascaceae, występuje głównie w glebie wzbogaconej obornikiem lub kompostami. *P. setifera* jest także patogenem dębu i sosny. Gatunek ten jest interesujący także w kontekście degradacji odpadów. Jego właściwości są jednak słabo opisane w literaturze naukowej.

Założono, że szczepy *P. setifera*, wyizolowane z kompostu, hodowane na trzech różnych odpadach wykażą różne właściwości kataboliczne i genetyczne. Zróznicowanie potencjału katabolicznego zostało ocenione na podstawie zdolności izolatów *Petriella* do wykorzystania trocin dębowych (SD), wysłodków buraczanych (BP) i otrąb pszennych (WB) w eksperymencie opartym o płytki MT2 oraz do wykorzystania substratów węglowych umieszczonych na płytce Biolog FF. Różnorodność genetyczną oceniono natomiast stosując analizę polimorfizmu długości amplifikowanych fragmentów DNA (AFLP) i cDNA (cAFLP). W celu przeprowadzenia analiz MT2, FF, AFLP i cAFLP, każdy szczep namnożono na pożywce agarowej z wyciągiem ziemniaczanym (PDA) i 3% dodatkiem: trocin dębowych (SDM), wysłodków buraczanych (BPM) lub otrąb pszennych (WBM), hodując przez 25 dni w temperaturze 27°C. Kontrolę stanowiło podłoże PDA. *Petriella* wstępnie hodowana na SDM wykorzystywała w większym stopniu WB i SD, a na WBM, BP. Na podstawie analiz FF wykazano większe zróznicowanie kataboliczne szczepów *Petriella* hodowanych na odpadach, niż na podłożu kontrolnym. Odnotowano także, że szczepy hodowane na SDM wykazywały odmienny profil genetyczny.

*Petriella setifera* belonging to Ascomycota, the family Microascaceae, found especially in the soil enriched with manure or composts, is interesting as far as both contexts, pathogenesis and waste degradation, however, is rather poorly described as far as its properties. *P. setifera* was reported to be the pathogen of oak and pine.

It was hypothesized that *P. setifera* isolates, compost isolates, precultured on three different wastes (oak sawdust, beet pulp and wheat bran) will reveal different catabolic properties and shifts in genetic fingerprinting. Differences in catabolic potential were evaluated by the ability of *Petriella* to use oak sawdust (SD), beet pulp (BP) and wheat bran (WB) following the MT2 and the abilities for utilization of carbon sources located on FF plates. Genetic diversity was evaluated using Amplified Fragment Length Polymorphism analysis performed on DNA (AFLP) and cDNA (cAFLP). To provide MT2, FF analysis, AFLP and cAFLP fingerprinting, each isolate were obtained by cultivation on potato dextrose agar medium (PDA) with 3% addition of the following additives: oak sawdust (SDM), beet pulp (BPM), wheat bran (WBM), and control medium (CLM) on PDA, without any additives, in the dark at 27°C through 25 days. *Petriella* strains precultured on SDM were more able to utilize WB and SD but not BP, which utilization was slightly enhanced, when WBM provided. *Petriella* precultured on all proposed waste revealed also better diversity in carbon sources utilization located on FF plates, compering to the control. The SDM cultured strains also grouped separately, when genetic fingerprinting taken under consideration.

## Synteza fitohormonu IAA przez rozpuszczający fosforany (PSM) glebowy szczep *Pseudomonas luteola*

<sup>1</sup>Ewa Ozimek, <sup>1</sup>Jolanta Jaroszuk-Ściśeł, <sup>2</sup>Piotr Sobiczewski, <sup>3</sup>Lidia Sas-Paszt,  
<sup>1</sup>Małgorzata Majewska, <sup>1</sup>Anna Słomka

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Środowiskowej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biologii  
i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

<sup>2</sup>Zakład Fitopatologii, Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

<sup>3</sup>Zakład Mikrobiologii, Pracownia Rizosfery, Instytut Ogrodnictwa Oddział Sadownictwa,  
ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice

Kwas indolilo-3-octowy (IAA) jest fitohormonem zaliczanym do auksyn, syntetyzowanym przez rośliny jak również przez wiele mikroorganizmów ryzosferowych i endofitycznych. Auksyna ta zwykle stymuluje wzrost elongacyjny roślin, kiełkowanie nasion oraz wzrost siewek, ale jej oddziaływanie jest silnie uzależnione od stężenia. W niskich stężeniach IAA stymuluje wydłużanie korzeni, a w wysokich stymuluje powstawanie korzeni bocznych i przybyszowych, ale także może wywołać nadmierny przyrost tkanek (guzowatość). Zdolność mikroorganizmów do wytwarzania IAA uważana jest jednak za czynnik sprzyjający promowaniu wzrostu roślin. Prekursorem syntezy kwasu indolilo-3-octowego jest aminokwas tryptofan (Trp).

Celem badań było określenie zdolności szczepu *P. luteola* BN0834, rozpuszczającego nieorganiczne fosforany, do syntezy fitohormonu IAA. Hodowle *P. luteola* BN0834 na zmodyfikowanym podłożu płynnym Czapek-Dox, z dodatkiem 1% glukozy: (1) bez tryptofanu (Trp)-CDM; (2) z 250µg Trp/ml -CDM<sub>250</sub> oraz (3) z 500µg Trp/ml -CDM<sub>500</sub> inokulowano  $1 \cdot 10^5$  jtk/mL i inkubowano w 20°C przez 16, 24, 48 i 72 godziny. Stężenie IAA w płynach pochodzących uzyskanych na podłożu CDM (bez dodatku Trp) było niskie i po 72 godzinach hodowli wynosiło około 2,25µg IAA/ml, natomiast na podłożu CDM<sub>250</sub> już po 24 godzinach zanotowano dwukrotnie wyższe stężenie IAA. Stwierdzono, że stężenie IAA było skorelowane z początkowym stężeniem Trp, gdyż w hodowli *P. luteola* na podłożu CDM<sub>500</sub> uzyskano najwyższe stężenie IAA - 6,5µg/ml.

The indolilo-3-acetic acid (IAA) is the phytohormone belonging to auxins, synthesized by plants as well as for many rhizosphere and endophytic microorganisms. This auxin usually stimulates the elongation plants growth, germination and seedlings development but effect of IAA depends on its concentration. In low concentrations IAA stimulates extend roots, and its high level stimulates the formation of lateral roots and adventitious roots but it can also cause excessive tissue growth (tuberosity). The ability of microorganisms to produce IAA is considered to be a very important factor promoting plant growth. Amino acid tryptophan (Trp) is considered to be the primary precursor for synthesis of indolilo-3-acetic acid.

The aim of the study was determined the ability of the *P. luteola* BN0834, strain dissolving inorganic phosphates, to synthesize phytohormone IAA. The *P. luteola* BN0834 was grown on Chapek-Dox modified liquid media, with the addition of 1% glucose: (1) without tryptophan (Trp)-CDM; (2) 250µgTrp/ml -CDM<sub>250</sub>, and (3) with 500µg Trp/ml -CDM<sub>500</sub> inoculated with  $1 \cdot 10^5$  jtk/mL and incubated at 20°C for 16, 24, 48 and 72 hours. The IAA concentration in liquid cultures carried out on CDM (without the Trp) was low (about 2,25µg IAA/ml) in 72 hour culture, while after 24 hours on CDM<sub>250</sub> medium, the more than two-fold increase in IAA concentration has been noted. It was found that the concentration of IAA was correlated with the initial concentration of Trp, as in *P. luteola* culture on the CDM<sub>500</sub> medium the highest concentration of IAA (6.5 µg/ml) has been obtained.

## Analiza metagenomiczna odpadów jabłkowych z uprawy ekologicznej

Metagenomic analysis of apple waste from organic cultivation

Jacek Panek, Karolina Oszust, Magdalena Frąć

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk  
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin  
j.panek@ipan.lublin.pl, m.frac@ipan.lublin.pl

Odpady organiczne pozostające po procesach przetwórstwa żywności stanowią znaczny problem ekonomiczny oraz logistyczny dla przetwórców żywności. Rozwiązaniem tego problemu mogą być rolnicze metody zagospodarowania tych odpadów. Odpady w przetwórstwie żywności zawierają bogaty i różnorodny mikrobiom. Aby zadbać o bezpieczeństwo gospodarowania odpadami i zminimalizować ryzyko wprowadzenia do upraw, wraz odpadami, mikroorganizmów potencjalnie szkodliwych, takich jak patogenne czy pasożytnicze, pomocna jest analiza składu mikroorganizmów metodami metagenomicznymi.

Celem badań była analiza metagenomiczna odpadów jabłkowych pochodzących z uprawy ekologicznej z wykorzystaniem technik sekwencjonowania nowej generacji (NGS, Illumina). Badania zbiorowisk grzybów przeprowadzono na podstawie sekwencjonowania ITS1.

Badaniom poddano odpady jabłkowe pochodzące z jabłek uprawianych ekologicznie. Spośród wykrytych i zidentyfikowanych grzybów, największy udział (18%) miały endofityczne grzyby *Aureobasidium pullulans* oraz grzyby należące do rodzaju *Cryptococcus* (13%). Ponadto zaobserwowano liczną grupę fitopatogenów należących do gatunku *Mycosphaella tassiana* (8,77%).

Food-processing wastes are significant economic and logistic trouble in food industry. Methods for agricultural utilization of these wastes are one of the answers for this issue. Such wastes contain rich and diverse microbiota. To minimize risk of pathogens introduction and assure safety of waste utilization, metagenomics analysis of waste microbiota is helpful.

The goal of this study was metagenomics analysis of waste acquired from apples from organic cultivation. The next-generation sequencing (NGS, Illumina) techniques were used. The study included fungal community based on ITS1.

Among the detected and identified fungi, the biggest share (18%) was of endophytic *Aureobasidium pullulans* and *Cryptococcus* (13%). Moreover, numerous group of phytopathogenes *Mycosphaella tassiana* (8.77%) was observed.

## Ocena bioróżnorodności i dynamiki populacji drobnoustrojów w osadzie czynnym z wykorzystaniem metod molekularnych

Assessment of biodiversity and dynamics of microbial populations in activated sludge using molecular methods

Iwona Paśmionka, Agnieszka Galus – Barchan

Katedra Mikrobiologii  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie  
Al. Mickiewicza 24/28

Wymagania w stosunku do jakości ścieków oczyszczonych stale wzrastają, co powoduje konieczność prowadzenia ciągłych badań mających na celu określenie możliwości obniżenia stężenia substancji organicznych i biogennych w oczyszczonych ściekach. Dlatego koniecznym staje się zrozumienie czynników wpływających na różnorodność oraz dynamikę populacji mikroorganizmów zasiedlających osad czynny. W osadzie czynnym bada się archebakterie i bakterie właściwe. Populacja archebakterii jest różnorodna, dominują w niej bakterie metanowe. Najliczniej obserwowanymi klasami bakterii właściwych są *Alphaproteobacteria* i *Betaproteobacteria*, które izoluje się w różnych stosunkach ilościowych. Różnorodność składu populacji drobnoustrojów osadu czynnego jest zmienna. Zależy od warunków panujących w układzie biologicznego oczyszczania (rodzaj układu, sezonowe zmiany temperatury, skład dopływających ścieków, stosowane parametry technologiczne). Zmiany składu populacji drobnoustrojów nie są przypadkowe. Wpływają na nie wiek osadu, temperatura oraz naprzemienne warunki tlenowe i beztlenowe.

The requirements for purified effluent quality are steadily increasing, leading to the need for ongoing research to determine the potential for reducing the concentration of organic and biogenic substances in treated wastewater. It is therefore necessary to understand the factors affecting the diversity and dynamics of the microbial population in activated sludge. In activated sludge, archaea and eubacteria are tested. The archaea population is diverse, with methane in it. The most commonly observed classes of eubacteria are *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria* which are isolated in different quantitative ratios. The diversity of the composition of the activated sludge population is variable. Depends on the conditions of the biological cleansing system (type of system, seasonal changes of temperature, composition of incoming sewage, technological parameters). Changes in the composition of the microbial population are not accidental. They are influenced by age of activated sludge, temperature and alternating aerobic and anaerobic conditions.

**Zbiorowiska mikroorganizmów w glebie spod uprawy grochu (*Pisum sativum* L.)  
po zastosowaniu Trianum P i ekstraktu  
z *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel**

Microorganisms communities in the soil under pea (*Pisum sativum* L.) cultivation  
after applying of Trianum P and *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel extract

Elżbieta Patkowska<sup>1</sup>, Marcela Krawiec<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Fitopatologii i Mykologii, <sup>2</sup>Katedra Nasiennictwa i Szkółkarstwa Ogrodniczego,  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
elzbieta.patkowska@up.lublin.pl, marcela.krawiec@up.lublin.pl

W prezentowanych badaniach określono wpływ Trianum P i Timorex Gold 24 EC na zdrowotność *Pisum sativum* L. i występowanie populacji mikroorganizmów w ryzosferze tej rośliny. Przed siewem nasiona grochu odm. 'Sześciotygodniowy TOR' zaprawiano preparatami biologicznymi Trianum P (*Trichoderma harzianum* T-22), Timorex Gold 24 EC (ekstrakt z krzewu herbacianego - *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel) oraz preparatem chemicznym Miedzian 50 WP (50% tlenochlorek miedzi). Kontrolę stanowiły nasiona nie zaprawiane. Analizę mikrobiologiczną gleby ryzosferowej przeprowadzono w laboratorium. Uzyskane izolaty bakterii *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. oraz grzybów *Clonostachys* spp., *Myrothecium* spp., *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. wykorzystano do określenia ich antagonistycznego oddziaływania względem grzybów patogenicznych dla grochu: *Alternaria alternata*, *Peyronellaea pinodes*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *Thanatephorus cucumeris* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Testowane preparaty stymulowały rozwój antagonistycznych *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Clonostachys* spp., *Myrothecium* spp., *Trichoderma* spp. i *Penicillium* spp. oraz ograniczały występowanie grzybów chorobotwórczych przeżywających w glebie. Populacja ryzosferowych bakterii w kombinacjach z Trianum P i Timorex Gold 24 EC była znacząco większa aniżeli w kontroli. Odwrotna zależność wystąpiła w przypadku grzybów. Antagonistyczne mikroorganizmy dominowały w ryzosferze roślin wyrosłych z nasion zaprawianych Trianum P.

The present studies determined the effect of Trianum P and Timorex Gold 24 EC on the healthiness of *Pisum sativum* L. and on the microorganism population in the rhizosphere of this plant. Before the sowing, the seeds of 'Sześciotygodniowy TOR' cv. pea were dressed with biological preparations Trianum P (*Trichoderma harzianum* T-22), Timorex Gold 24 EC (the tea tree extract - *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel) and the chemical preparation Miedzian 50 WP (50% oxochloride of copper). The seeds that were not dressed constituted the control. A microbiological analysis of the rhizosphere soil of pea was conducted in the laboratory. The obtained isolates of bacteria *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. and fungi *Clonostachys* spp., *Myrothecium* spp., *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. were used to determine their antagonistic effect towards the following fungi pathogenic towards pea: *Alternaria alternata*, *Peyronellaea pinodes*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *Thanatephorus cucumeris* and *Sclerotinia sclerotiorum*. The tested preparations stimulate the development of antagonistic *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Clonostachys* spp., *Myrothecium* spp., *Trichoderma* spp. and *Penicillium* spp., at the same time limiting the occurrence of pathogenic soil-borne fungi. The population of rhizosphere bacteria in the combinations with Trianum P and Timorex Gold 24 EC was significantly higher than in the control. A reverse relationship occurred for the fungi population. Antagonistic microorganisms dominated in the rhizosphere of plants grown from the seeds dressed with Trianum P.

## Wpływ podłoża trocinowego na profil metaboliczny *Cerrena unicolor*

The effect of sawdust substrate on *Cerrena unicolor* metabolic profile

Anna Pawlik<sup>1</sup>, Grzegorz Janusz<sup>1</sup>, Magdalena Frąc<sup>2</sup>, Marta Ruminowicz-Stefaniuk<sup>1</sup>, Andrzej Mazur<sup>3</sup>, Jerzy Wielbo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

<sup>2</sup>Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk

<sup>3</sup>Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

*Cerrena unicolor* (gmatkówka szarawa) jest grzybem białej zgnilizny drewna, w warunkach naturalnych rosnącym na żywym i martwym drewnie wielu drzew liściastych tj. jesion, brzoza, klon, kasztanowiec. Ponadto w literaturze *C. unicolor* jest znanym źródłem enzymów i innych związków bioaktywnych o znaczeniu biotechnologicznym. Pomimo tego wiedza dotycząca charakterystyki fenotypowej tego grzyba oraz wpływu warunków środowiska na metabolizm *C. unicolor* jest dość niewielka. Celem niniejszej pracy było określenie i porównanie profilu metabolicznego *C. unicolor* FCL139 w warunkach hodowli stacjonarnej na zróżnicowanym podłożu trocinowym. Badania obejmowały ocenę aktywności metabolicznej *C. unicolor* pod kątem uzdolnień do degradacji 95 różnych źródeł węgla w oparciu o wykorzystanie systemu Biolog oraz mikroplątek (MP) FF. Przeprowadzona analiza wykazała duże zróżnicowanie uzyskanych profili metabolicznych. Natomiast wykazano niewielkie różnice w uzyskanych wartościach wskaźnika różnorodności R. Najwyższe aktywności kataboliczne wykazano w przypadku użycia trocin jesionu oraz brzozy jako podłoża hodowlanego, które ujawniły się w zdolności *C. unicolor* do rozkładu 38 substratów. Analiza proporcji pomiędzy poszczególnymi grupami związków rozkładanych przez *C. unicolor* wykazuje zdolność tego grzyba do metabolizowania poszczególnych grup w miarę równych proporcjach niezależnie od warunków hodowlanych. Jednakże polimery okazały się być grupą związków najchętniej rozkładanych przez *C. unicolor* w warunkach kontrolnych.

*Cerrena unicolor*, commonly known as a mossy maze polypore, is a wood-degrading basidiomycete in the *Polyporaceae* family. This saprobic fungus commonly lives on hardwoods such as *Aesculus*, *Acer*, *Fagus* or *Quercus* and is an aggressive decay organism which also attacks living trees causing extensive white rot. Strains of *C. unicolor* are also well described as producers of enzymes and other bioactive compounds of biotechnological interest. Although genomic and transcriptomic analysis has provided new insights into *C. unicolor* ligninocellulose degradation, the knowledge related to its phenotypic characterization and the effect of environmental conditions on fungal metabolism has not been studied. Here we report a comparison of the metabolic profiles of *C. unicolor* FCL139 cultivated under SSF (solid-state fermentation) conditions on a different sawdust substrates. Biolog FF MPs were applied to obtain data on utilization of 95 carbon sources and mitochondrial activity of *C. unicolor* cultivated on a different sawdust substrates. The analysis revealed a broad variability of substrate utilization profiles. Moderate differences have been shown in substrate richness (R) values. The highest catabolic activities were exhibited when ash and birch sawdust were used with capabilities to decompose up to 38 carbon sources. There is no clear correlation in metabolic preferences of the analysed strains to a particular group of substrates. However, polymers constitute a group of the most easily metabolized carbon sources when *C. unicolor* was cultivated in a control medium (LH). The project was funded by the National Science Centre (Poland) based on the decision number DEC-2014/15/B/NZ9/01990.

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2014/15/B/NZ9/01990

## Metagenomy grzybowe gleb wzbogaconych odpadową materią organiczną

Fungal metagenomes of soil amended with wasted organic matter

Giorgia Pertile, Magdalena Frąc, Karolina Oszust, Jerzy Lipiec, Bogusław Usowicz

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin  
m.frac@ipan.lublin.pl, g.pertile@ipan.lublin.pl

Glebową materią organiczną stanowią wszystkie substancje organiczne, pochodzące od organizmów żywych, w tym odpady organiczne, które trafiając do środowiska glebowego podlegają procesom dekompozycji. Zasoby materii organicznej w glebie są ważne, ze względu na jej funkcję produkcyjną, istotny wpływ na kształtowanie właściwości chemicznych, fizycznych i biologicznych gleby oraz rolę w sekwestracji dwutlenku węgla z atmosfery. Procesy rozkładu glebowej materii organicznej przebiegają z udziałem mikroorganizmów, w tym grzybów, które stanowią ważne ogniwo w degradacji odpadów wprowadzonych do środowiska glebowego.

Celem przeprowadzonych badań było porównanie struktury zbiorowisk grzybów występujących w glebie nawożonej od ponad 20. lat odpadową materią organiczną: podłożem po produkcji pieczarek oraz pomiotem kurzym.

Analiza metagenomiczna zbiorowisk grzybów została przeprowadzona na podstawie regionu ITS1 z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania następnej generacji w technologii Illumina. Określono również zawartość próchnicy w badanych glebach.

Analiza metagenomowa zbiorowisk grzybów wykazała dominację przedstawicieli *Sordariomycetes* we wszystkich badanych glebach. Przedstawiciele *Pezizomycetes* i *Tremellomycetes* dominowały w glebie nawożonej podłożem po produkcji pieczarek, natomiast obecność *Dothideomycetes* i *Mortierellomycotina* stwierdzono w glebie nawożonej pomiotem kurzym. Przeprowadzone badania wykazały, około 3-krotny wzrost zawartości próchnicy w glebach wzbogaconych odpadową materią organiczną, kształtujący się na poziomie 4,71% dla podłoża po produkcji pieczarek i 3,50% dla pomiotu kurzego, w stosunku do gleb nienawożonych odpadami (0,86% i 1,34%).

Soil organic matter is composed of organic substances from living organisms, including organic waste, which are introduced into the soil environment and then are decomposed. The organic matter resources in the soil are important, because of production function, a significant influence on chemical, physical and biological properties of the soil and the role in carbon sequestration. Soil organic matter decomposition involve microorganisms, including fungi, which are important in the degradation of waste in the soil environment.

The goal of the study was to compare the structure of fungal communities in soil amended with organic matter for more than 20 years: the spent mushroom substrate (MS) and the chicken manure (CM). Metagenomic analysis of fungal communities was done by sequencing of ITS1 region using next-generation sequencing in Illumina technology. The content of humus in the studied soils was also determined.

Metagenomic analysis of the fungal communities showed dominance of *Sordariomycetes* in all tested soils. The representatives of *Pezizomycetes* and *Tremellomycetes* were dominant in soil fertilized with spent mushroom substrate, whereas *Dothideomycetes* and *Mortierellomycotina* were found in soil fertilized with chicken manure. The study showed increase the humus content in soils amended with wasted organic matter (4.71% MS, 3.50% CM, 0.86% and 1.34% Controls).

Projekt współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach programu ramowego w zakresie badań naukowych i innowacji Horyzont 2020. Umowa o dofinansowanie: 677407 (SOILCARE)



## Wpływ pszenżyta w monokulturze a bioróżnorodność drobnoustrojów w glebach

Effect of monoculture of triticale on biodiversity of microorganisms in soil

Stanisław Jerzy Pietr, Teresa Lewicka, Małgorzata Patrycja Oksińska, Elżbieta Grażyna Magnucka

Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Katedra Ochrony Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Narastającym problem w rolnictwie jest znaczny udział zbóż w zmianowaniu oraz coraz powszechniejsza ich uprawa w monokulturze. Praktyce takiej towarzyszą liczne negatywne zjawiska, w tym spadek plonów, spowodowany m.in. zmianami jakościowymi i ilościowymi. Celem pracy było określenie bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych w oparciu o profile lotnych kwasów tłuszczowych (FAME) w glebach w trzech kolejnych sezonach wegetacyjnych po wschodach pszenżyta jesienią. Analizowano gleby pod uprawą pszenżyta uprawianego w zmianowaniu (ziemniaki – owies – pszenżyto), w 1, 2 i 3 oraz w 12, 13 i 14 roku monokultury, na których słomę po zbiorze zbierano lub przyorywano. Ponadto analizowano wpływ gorczycy białej, jako międzyplon ścierniskowego w wieloletniej monokulturze. Analiza podobieństwa profili FAME, pozwoliła na stwierdzenie wyraźnie odmiennych klastrów, które to odpowiadają poszczególnym sezonom wegetacyjnym. Najmniej zróżnicowane profile FAME stwierdzono w glebach z 12, 13 i 14 letnią monokulturą, co wskazuje na mniejszej bioróżnorodności edafonu glebowego. Ponadto, gleby powyższe charakteryzowały się większą niż na pozostałych poletkach z pszenżytem zawartość kwasu C 16:1  $\omega$ 5c, co świadczy o większej biomasy grzybów. Równocześnie w stwierdzono zmniejszanie sumy C 16:1  $\omega$ 5c, C 18:1  $\omega$ 9c, C 18:2  $\omega$ 6c i 18:0 *Anteiso* odzwierciedlających poziom biomasy grzybów w tych glebach pomiędzy 12 a 14 rokiem monokultury. Gleby z poletek z uprawą pszenżyta w płodozmianie cechował znaczny udział kwasu C 9:0 dwukarboksyłowy, wskaźnika biomasy bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Uprawa gorczycy białej w międzyplonie spowodowała wzrost biomasy bakterii Gram ujemnych na co wskazuje wzrost zawartości kwasów C 12:0 i C 16:1  $\omega$ 7c.

The growing problem in agriculture is the high proportion of cereals in the cropping system and widespread their cultivation in monoculture. Such practice is accompanied by numerous negative phenomena, including yield decrease, caused among other by changes in the qualitative and quantitative composition of soil microorganisms resulting from the homogeneity of crop residues. The biodiversity of soil microbes was tested based on comparison of the volatile fatty acids (FAME) profiles in soils in three successive vegetation seasons in the autumn. Soil samples were tested from plots with triticale cultivated in rotation (potatoes - oats - triticale), in 1, 2 and 3 as well as in 12, 13 and 14 year of monocultures on which straw after harvest was collected or plowed. Analysis of the similarity of the FAME profiles allowed us to identify distinct clusters that corresponded to particular growing seasons. Generally, the lowest diversity of FAME profiles was observed in soils with 12, 13 and 14 years old monocultures, what suggest lower level of biodiversity. Moreover, the content of C 16:1  $\omega$ 5c acid was noticeable higher in soils from mentioned above plots than from other triticale plots, what suggest a comparatively greater biomass of fungi. However, relative decrease of content of C 16:1  $\omega$ 5c, C 18:1  $\omega$ 9c, C 18:2  $\omega$ 6c and 18:0 *Anteiso* acids reflecting the level of biomass of fungi was observed in soil between 12 and 14 year of monoculture. A noticeable higher amount of C 9:0 dicarboxylic acid, a biomass indicator of bacteria from the genus *Pseudomonas*, was observed in soils from plots with triticale cultivated in crop rotation system. Cultivation of white mustard as intercrop resulted with increase of the content of C 12:0 i C 16:1  $\omega$ 7c, which indicated propagation of Gram negative bacteria.

## **Porównanie oddziaływania wybranych substancji ropopochodnych na aktywność pirofosfatazy nieorganicznej w glebie ciężkiej**

Comparison of effect of some petroleum derivatives on inorganic pyrophosphatase in clay soil

Maciej Płatkowski, Arkadiusz Telesiński, Martyna Śnioszek

Katedra Fizjologii Roślin i Biochemii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Celem podjętych badań było porównanie oddziaływania wybranych substancji ropopochodnych: benzyny, oleju napędowego i przepracowanego oleju silnikowego na aktywność pirofosfatazy nieorganicznej w glebie.

Doświadczenie przeprowadzono na glinie piaszczysto-pylastej o zawartości węgla organicznego  $33,8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Do próbek glebowych wprowadzono substancje ropopochodne w ilości  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Wilgotność próbek doprowadzono do 60% maksymalnej pojemności wodnej i inkubowano w temperaturze  $20^\circ\text{C}$ . W 1., 7., 14., 28. oraz 56. dniu doświadczenia oznaczono spektrofotometrycznie aktywność pirofosfatazy nieorganicznej.

Zanieczyszczenie gleby substancjami ropopochodnymi spowodowało istotne zmiany aktywności oznaczanego enzymu, który w największym stopniu uwidocznił się na początku doświadczenia. W 1. dniu doświadczenia odnotowano inhibicję aktywności pirofosfatazy nieorganicznej pod wpływem wszystkich substancji ropopochodnych, sięgającą w przypadku przepracowanego oleju silnikowego prawie 70% w porównaniu do gleby kontrolnej. W kolejnych dniach doświadczenia odnotowano zarówno stymulację, jak i inhibicję enzymu pod wpływem substancji ropopochodnych. Można jednak stwierdzić, że we wszystkich terminach pomiarów największy wpływ na aktywność pirofosfatazy nieorganicznej miał przepracowany olej silnikowy.

The aim of the study was to compare the effect of some petroleum derivatives: gasoline, diesel oil and spent engine oil on inorganic pyrophosphatase activity in soil.

The experiment was carried out on sandy clay loam with organic carbon content  $33.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Petroleum derivatives at the dosage of  $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  were added to soil samples. Samples were adjusted to 60% maximum water capacity and they were incubated in temperature  $20^\circ\text{C}$ . Inorganic pyrophosphatase activity was determined spectrophotometrically, on days 1, 7, 14, 28 and 56.

Soil contamination with petroleum derivatives caused significant changes of assayed enzyme activity, which were the highest on the experiment beginning. On day 1, in soil with every petroleum derivative, inhibition of inorganic pyrophosphatase activity was observed. It was reaching up to nearly 70% of engine oil compared to the control soil. In the following days, both stimulation and inhibiting of the enzyme under the influence of petroleum substances were noted. However, it can be stated that over all measurement periods, the most significant influence on inorganic pyrophosphatase activity was spent engine oil.

## Czynniki inicjujące zakwity wód z zbiornikach wodnych.

Which factors can initiate phytoplankton blooms in water bodies?

Małgorzata Poniewozik<sup>1</sup>, Konrad Wołowski<sup>1</sup>, Kritsana Duangjan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Department of Phycology, Lubicz 46, PL-31-512 Kraków, Poland

<sup>2</sup>Science and Technology Research Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand

Zjawisko zakwitów wód spowodowanych przez nadmierny rozwój fitoplanktonu jest poważnym problemem w ostatnich latach. Grupą organizmów szczególnie łatwo tworzącą zakwity, dzięki przystosowaniom morfologicznym i fizjologicznym, są prokariotyczne sinice. Jako organizmy, z których duża grupa produkuje toksyny, powodują one pogorszenie jakości wód zarówno w aspekcie przyrodniczym, jak i użytkowym. Kluczowymi dla rozwoju sinic są wysokie stężenia fosforu (w postaci ortofosforanów) oraz wysoka temperatura wody. Wysoka temperatura oraz wysokie stężenie azotu (w postaci jonów amonowych) oraz/lub węgla organicznego sprzyjają bujnemu rozwojowi eukariotycznych euglenin, które bardzo obficie rozwijają się w płytkich jeziorach i stawach. W badaniach przeprowadzonych w zbiornikach wodnych Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego (PŁW) oraz w stawach w północnej Tajlandii, w strefie klimatu tropikalnego, zakwity zarówno sinic, jak i euglenin były obserwowane bardzo często. W jeziorze Glinki (PŁW) obserwowano masowy pojaw sinic nitkowatych osiągających wartości biomasy rzędu 2.3 – 6.8 mg dm<sup>-3</sup> późnym latem i na początku jesieni. Gatunkami, które tworzyły zakwit były: *Aphanizomenon gracile*, *Cuspidothrix issatschenkoi* i *Planktolyngbya limnetica*. Wartości ortofosforanów były wysokie, co wraz z wzrastającą temperaturą spowodowało ich silny rozwój w jeziorze. W zbiornikach, w których obserwowany był rozwój euglenin, zwykle był on poprzedzony wysoką koncentracją jonów N-NH<sub>4</sub>: 1.13 – 3.11 mg dm<sup>-3</sup>, które procentowo stanowiły ponad połowę puli azotu rozpuszczonego w wodzie. W takich warunkach masowo rozwijał się rodzaj *Trachelomonas*, szczególnie taksony: *T. volvocina*, *T. volvocinopsis* i *T. rugulosa*. W stawach w Tajlandii, gdzie występowały długo utrzymujące się zakwity przedstawicieli rodzaju *Phacus* wartości azotu amonowego były bardzo wysokie (aż do 5.62 mg dm<sup>-3</sup>). Dodatkowo wszystkie zbiorniki były bogate w materię organiczną pochodzącą z rozkładającej się silnie rozwiniętej roślinności porastającej brzegi zbiorników.

Phenomenon of water blooms caused by development of phytoplankton in enormous amounts has been a serious problem in freshwaters for many years. Organisms, which most often cause water blooms are cyanoprokaryotes owing to their special morphological and physiological adaptations. Many species belonging to that group produce toxins worsening water conditions in water bodies from, both, environmental and usable aspects. High concentrations of orthophosphates and high water temperature seem to be key factors in cyanoprokaryotes massive development. In the case of euglenophytes – another group, which causes water blooms – apart from temperature, high concentration of ammonium salts is essential. In the studies conducted within eastern Poland and northern Thailand massive development of cyanoprokaryotes was observed and among them filamentous *Aphanizomenon gracile*, *Cuspidothrix issatschenkoi* and *Planktolyngbya limnetica* were the most abundant – their biomass ranged between 2.3 and 6.8 mg dm<sup>-3</sup>. In shallow ponds in both countries euglenophyte blooms were observed and species that created them were: *Trachelomonas volvocina*, *T. volvocinopsis*, *T. rugulosa* and also representatives of the genus *Phacus*. During the studies physical chemical features of water confirmed cyanophytes and euglenophytes environmental demands.

## **Analiza metaboliczna konsorcjum metanotroficznego**

### Metabolic analysis of the methanotrophic consortium

Anna Pytlak<sup>1</sup>, Anna Szafranek – Nakonieczna<sup>1</sup>, Agnieszka Wolińska<sup>1</sup>, Natalia Łopacka<sup>1</sup>,  
Adam Kubaczyński<sup>1</sup>, Zofia Stępniewska<sup>1</sup>, Magdalena Frąc<sup>2</sup>, Karolina Oszust<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, Instytut Biotechnologii, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana  
Pawła II, ul. Konstantynów 1i, 20-708 Lublin, e-mail: apytlak@kul.pl

<sup>2</sup>Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk  
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Bakterie metanotroficzne stanowią od kilku dekad obiekt intensywnych badań. Przyczyną tego zainteresowania jest fakt, iż w środowisku naturalnym pełnią one bardzo ważną rolę ograniczając emisję metanu do atmosfery przez co efektywnie kształtują klimat. Ponadto, metanotrofy wykazują zdolność do syntezy wielu związków chemicznych, które mają gospodarcze znaczenie (osmoprotektanty, witaminy, polihydroksyalkanolany) przez co postulowane jest ich biotechnologiczne/przemysłowe wykorzystanie. W ostatnim czasie wykazano, iż metanotrofy cechuje większa aktywność gdy występują w hodowlach mieszanych z innymi mikroorganizmami. Jednocześnie sugeruje się iż w wielu środowiskach, w których występuje abiogeniczny CH<sub>4</sub> pełnią funkcję swego rodzaju producentów pierwotnych a uwalniane przez nich produkty przemiany materii stwarzają warunki do życia dla innych mikroorganizmów stymulując tym samym bioróżnorodność. W bieżącej pracy przedstawiono identyfikację mikroorganizmów wchodzących w skład konsorcjum wyizolowanego z oligotroficznego środowiska skał przywęglowych i hodowanego z wykorzystaniem metanu jako jedyne źródła węgla (w oparciu o NGS) oraz jego zdolności metaboliczne (test Biolog, Ecoplates<sup>TM</sup>).

Since a few decades methanotrophic bacteria are a subject of intense investigations. They comprise an indispensable element of a global carbon cycle and play a crucial role in the shaping of the Earth's climate by restraining methane emission to the atmosphere. Furthermore, methanotrophs are characterized by their ability to synthesize many valuable substances (osmoprotectants, vitamins, polyhydroxyalkanoates) which makes them potentially useful for biotechnological/industrial purposes. In recent years, it was found that methanotrophs reveal higher activity when grown in mixed rather than monocultures. It was also suggested that in the environments where abiogenic CH<sub>4</sub> is available they play a role of primary producers supplying growth substrates for other organisms and thus stimulating biodiversity. In the current work we present NGS-revealed identification and metabolic capabilities (Biolog, Ecoplates<sup>TM</sup>) of microorganisms found in a consortium isolated from an oligotrophic coalbed environment and grown on methane as the sole carbon source.

## Wpływ pola elektromagnetycznego na grzyby owadobójcze

The effect of electromagnetic field on entomopathogenic fungi

Dariusz Roman Ropek, Krzysztof Frączek, Krzysztof Pawlak

Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

Celem doświadczenia było poznanie wpływu pola elektromagnetycznego na rozwój grzybni wybranych gatunków i szczepów grzybów owadobójczych. Badania przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych z wykorzystaniem standardowego podłoża PDA (Biocorp). Materiał badawczy stanowiły trzy gatunki grzybów owadobójczych *Isaria fumosorosea* (szczep I1), *Beauveria bassiana* (szczep B1) i *Metarhizium anisopliae* (szczep M4). Testowane szczepy grzybów owadobójczych pochodzą z kolekcji Katedry Ochrony Środowiska Rolniczego Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Grzyby zaszczepiano na pożywkę PDA z dodatkiem chloramphenicolu (zmniejsza ryzyko zanieczyszczenia hodowli bakteriami) w szalkach Petriego (średnica 90mm). W centralnej części płytki umieszczano krążek (5mm) z inokulum odpowiedniego grzyba. Doświadczenie przeprowadzono w 4 powtórzeniach. Źródłem pola elektromagnetycznego (PEM) był specjalnie zaprojektowany na potrzeby doświadczenia generator emitujący fale z zakresu częstotliwości radiowej 1800 MHz i gęstości mocy równej  $0,1 \text{ W/m}^2 \pm 0,02$ . W trakcie trwania eksperymentu antena generatora fal znajdowała się w stałej odległości 24 cm nad szalkami. Pole elektromagnetyczne emitowane było w sposób ciągły. W kontroli szalki umieszczano poza zasięgiem oddziaływania pola elektromagnetycznego w takich samych warunkach hodowlanych. Wpływ pola elektromagnetycznego na wzrost grzybni zależał od gatunku grzyba owadobójczego.

The aim of the experiment was to study the effect of electromagnetic field on the development of mycelia of selected species and strains of entomopathogenic fungi. The experiment was conducted under laboratory conditions using a standard PDA culture medium (Biocorp). Three species of entomopathogenic fungi were used in experiment: *Isaria fumosorosea* (strain I1), *Beauveria bassiana* (strain B1) and *Metarhizium anisopliae* (strain M4). Tested strains of entomopathogenic fungi come from the collection of Department of Agricultural Environment Protection, University of Agriculture in Cracow. Fungi were inoculated on PDA culture medium supplemented with chloramphenicol (reduces the risk of bacterial contamination) in Petri dishes (90mm diameter). In the central part of the plate a disc (5mm) with inoculum of the appropriate fungi was placed. The experiment was conducted in 4 replications. The source of electromagnetic field (PEM) was specially designed for the experiment generator, which is emitting radio waves of 1800 MHz and a power density of  $0.1 \text{ W/m}^2 \pm 0,02$ . During the experiment, the wave generator antenna was at a constant distance of 24 cm above the dishes. The electromagnetic field was emitted continuously. In control the dishes were placed out of the reach of the electromagnetic field under the same growing conditions. The influence of the electromagnetic field on the mycelium growth depended on the species of entomopathogenic fungi.

## Technologia NGS jako skuteczne narzędzie w identyfikacji i charakterystyce patogenów drobiu

NGS technology as an effective tool for the identification and characterization of poultry pathogens

Joanna Sajewicz-Krukowska, Katarzyna. Domańska-Blicharz

Zakład Chorób Drobiu, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Koronawirusy (CoV) drobiu powodują duże straty w przemyśle drobiarskim. Do najważniejszych z nich należą wirus zakaźnego zapalenia oskrzeli (IBV), koronawirusy indyjskie (TCoV) oraz przepiórcze (GfCoV). Badania ostatnich kilku lat wykazały olbrzymią różnorodność gamma- i deltaCoV u dzikich ptaków. Uważa się, że stanowią one rezerwuar puli genowej CoV dla drobiu i dodatkowo odgrywają rolę w ich rozprzestrzenianiu. Nieocenionym narzędziem w charakterystyce molekularnej CoV jest technologia NGS.

W latach 2015-2016 zidentyfikowano RNA CoVs u 5-tygodniowych indyków oraz 7-dniowych przepiórek z objawami enteropatii. Z wykorzystaniem platformy MiSeq (Illumina) uzyskano ich pełne sekwencje o długości odpowiednio 27618 i 25921 nt. Oba genomy posiadają strukturę typową dla swojego rodzaju. Analiza filogenetyczna pełnej sekwencji nt indyjskiego gammaCoV/Tk/PL/G160/2016 wykazała najwyższą homologię (89,6%) z francuskim szczepem GfCoV/FR/2011 (LN610099). Podobieństwo z innymi dostępnymi sekwencjami TCoV było na poziomie 87,7%-88,7%. Interesujące, że sekwencja nt genu S wykazywała niską homologię z innymi dostępnymi w bazie GenBank sekwencjami TCoV (56%-78,3%). Największe podobieństwo genu S wykazano z GfCoV/FR/2011 (82,5%). Z kolei przepiórczy deltaCoV/Q/PL/G32/2015 ulokował się na wspólnej gałęzi z deltaCoV od wróbla (JQ065045), kota bengalskiego (EF584906) oraz amerykańskimi deltaCoV świń. DeltaCoVs pozostałych dzikich ptaków wykazywały zdecydowanie niższą homologię (50,6-76,6%) z polskim szczepem. Mimo, że topografia drzewa filogenetycznego skonstruowanego na podstawie genu S wyglądała podobnie, homologia ich sekwencji była znacznie niższa.

Otrzymane wyniki wyraźnie wskazują na atypowy charakter zidentyfikowanego w Polsce TCoV. Ponadto, wykryty przez nasze laboratorium deltaCoV u przepiórek to pierwszy taki przypadek w Europie. Nasze wyniki potwierdzają, że gamma- i deltaCoV mogą zakażać szerszą niż dotąd przypuszczano gamę gospodarzy i są one bardzo zróżnicowane. NGS umożliwiło uzyskanie pełnych sekwencji genomów CoV i ich wstępną analizę relacji filogenetycznych. Niezbędne są jednak dalsze badania pozwalające określić ich dokładne pochodzenie. Konieczne jest również opracowanie skutecznej metody izolacji koronawirusów co umożliwi badania nad ich patogenezą.

Poultry coronaviruses (CoVs) cause significant economic losses to the poultry industry. The most important of these include infectious bronchitis virus (IBV), turkey (TCoV) and quail (GfCoV) coronaviruses. Research in the past few years has shown a great variety of gamma and deltaCoVs in wild birds. It is believed that they play a role as a reservoir of the CoVs gene pool for poultry and additionally play a role in their spreading. An invaluable tool in the molecular characteristics of CoVs is NGS technology.

RNA of CoVs was isolated between 2015-2016 from 5-week-old turkeys and 7-day-old quails with symptoms of enteric diseases. Using the MiSeq platform (Illumina), their full sequences were obtained, 27618 and 25921 nt length, respectively. Both genomes have typical structure of their genus. The phylogenetic analysis of the complete sequence of gammaCoV/Tk/PL/G160/2016 showed its highest homology (89,6%) with the French strain

GfCoV/FR/2011 (LN610099). The similarity with other available TCoV sequences was 87,7% -88,7%. It is interesting that the S gene nt sequence showed low homology with other TCoV sequences available in GenBank (56% -78,3%). The highest similarity of the S gene was demonstrated with GfCoV/FR/2011 (82.5%). In turn, quail deltaCoV/Q/PL/G32/2015 was located on the common branch with deltaCoVs from sparrow (JQ065045), Asian leopard cat (EF584906) and American pigs. DeltaCoVs of other wild birds showed significantly lower homology (50,6-76,6%) with the Polish strain. Although the topography of the S gene tree was similar, the homology of their sequences was significantly lower.

The obtained results clearly indicate the atypical character of the TCoV identified in Poland. In addition, detected in our laboratory deltaCoV from quails is the first such case in Europe. Our results confirm that gamma- and deltaCoVs can infect a broader host range than previously thought, and are very diverse. NGS has enabled gaining full sequences of CoV genomes and their phylogenetic relationships initial analysis. However, further studies are needed to determine their exact origin. It is also necessary to develop an effective method of CoVs isolation, which will allow to study their pathogenesis.

## Zróżnicowanie genetyczne rizobiów zasiedlających brodawki bobiku-wpływ czynników Nod

Genetic diversity of rhizobia in faba bean nodules-the effect of Nod Factors

Anna Siczek<sup>1</sup>, Jerzy Wielbo<sup>2</sup>, Dominika Kidaj<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk

<sup>2</sup>Uniwersytet Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie, Zakład Genetyki i Mikrobiologii

Celem badań była ocena wpływu czynników Nod (NF, lipochitooligosacharydów) na zróżnicowanie genetyczne populacji rizobiów w brodawkach bobiku (*Vicia faba*). NF otrzymano z *R. leguminosarum* i zastosowano przed siewem na nasiona bobiku (N), w obiekcie kontrolnym (K) nasiona moczo w wodzie. Z DNA szczepów rizobiów amplifikowano fragment 16-23S rDNA oraz gen *nodD*. Poziom zróżnicowania genetycznego określono na podstawie liczby różnych profili PCR-RFLP. Przeprowadzono również sekwencjonowanie regionu 16-23S rDNA i genu *nodD*, które pozwoliło na skonstruowanie drzew filogenetycznych.

Z brodawek roślin kontrolnych wyizolowano 42 szczepy i zidentyfikowano 12 genotypów, z roślin z obiektu N odpowiednio 45 szczepy i 17 genotypów rizobiów. Genotypy obecne w obu populacjach (K i N) wystąpiły z większą częstością niż genotypy specyficzne. Populacja rizobiów w grupie N była bardziej zróżnicowana niż w grupie K (odpowiednio 12 i 7 specyficznych genotypów). Stwierdzono wyższe zróżnicowanie sekwencji genu *nodD* niż sekwencji regionu 16-23S rDNA (maksymalnie odpowiednio > 4 i > 2 substytucji / 100 pz). Większość sekwencji regionu 16-23S rDNA grupowała się w obrębie kladu o wewnętrznym zróżnicowaniu mniejszym niż 1 substytucja / 100 pz. Sekwencje genu *nodD* zgrupowane zostały w dwa klady, charakteryzujące się niewielkim wewnętrznym zróżnicowaniem; w jednym przeważały sekwencje pochodzące ze szczepów grupy N, w drugim – z grupy K.

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji nr DEC-2012/07/B/NZ9/02430

The aim of the study was to evaluate the effect of Nod factors (NF, lipochitooligosaccharides) on genetic diversity of rhizobia populations in faba bean (*Vicia faba*) nodules. NF was isolated from *R. leguminosarum* and was applied before sowing on seeds (N). In control treatment the seeds were soaked in water (K). 16-23S rDNA and *nodD* genes were amplified. The level of genetic diversity was determined based on the number of different PCR-RFLP profiles. Sequencing of the 16-23S rDNA and *nodD* genes was also done, which allowed for the construction of phylogenetic trees.

42 strains were isolated and 12 genotypes were identified from control group, 45 strains and 17 genotypes from N group, respectively. Genotypes present in both populations occurred more frequently than specific genotypes. The N population was more heterogeneous than the K (12 and 7 specific genotypes, respectively). There was a higher variation of the *nodD* gene sequence than the 16-23S rDNA sequence (maximum >4 and > 2 substitutions / 100 bp, respectively). Most of the 16-23S rDNA region sequences were grouped within a cluster with an internal difference less than 1 substitution / 100 bp. The sequences of the *nodD* gene are grouped into two clusters characterized by slight internal variation; within one cluster predominated sequences from strains of group N, and within the other from K.

This work was funded by the National Science Centre in Poland on the basis of decision no. DEC-2012/07/B/NZ9/02430



## Zbiorowiska bakterii glebowych związanych z truflą letnią (*Tuber aestivum* Vittad.)

Soil bacterial communities associated with summer truffle (*Tuber aestivum* Vittad.)

Marta Siebyła<sup>1</sup>, Dorota Hilszczańska<sup>2</sup>, Katarzyna Sikora<sup>1</sup>, Aleksandra Rosa-Gruszecka<sup>1</sup>,  
Hanna Szmidla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Ochrony Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa ul. Braci Leśnej 3, Sękocin Stary,  
05-090 Raszyn, Polska

<sup>2</sup>Zakład Ekologii Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa ul. Braci Leśnej 3, Sękocin Stary,  
05-090 Raszyn, Polska

Trufle należą do grzybów charakteryzujących się podziemnym, hypogeicznym trybem życia, rosnących w symbiozie z wieloma gatunkami drzew i krzewów. Ich cykl życiowy oraz warunki stymulujące powstawanie owocników (askospor) wciąż pozostają tajemnicą. Trufła letnia (*Tuber aestivum*) jest jednym z najważniejszych gatunków trufli, cenionych z uwagi na walory smakowe i zapachowe, występujących w Polsce. Owocniki trufli letniej są pozyskiwane w drzewostanach naturalnych jak i w ogrodach truflowych.

W procesie rozwoju owocników trufli biorą udział niektóre gatunki bakterii, które kolonizują trufle. Owocniki trufli są też zasiedlane przez drożdże, grzyby strzępkowe i wirusy, które prawdopodobnie zaangażowane są w rozwój i dojrzewanie, jak również dyspersję zarodników trufli. Jak dotąd, bogactwo gatunkowe i rola bakterii związanych z truflą letnią nie zostały jeszcze w pełni odkryte. Badania przeprowadzone w ostatnim dziesięcioleciu wykazały, że bakterie należące do *α-Proteobacteria* odgrywają prawdopodobnie główną rolę w tworzeniu owocników trufli.

Identyfikacja bakterii i określenie ich roli w rozwoju owocników trufli ma szczególne znaczenie w uprawie i ochronie tych grzybów.

Truffles (*Tuber* spp.) hypogeous ascomycetes, which may grow in ectomycorrhizal symbioses with specified shrub and tree species. Their life cycle and the conditions which stimulate ascocarps' formation still remain a mystery. Summer truffle (*Tuber aestivum*) is the most common European truffle species with great commercial value. In Poland, this species is harvested in natural forests and truffle orchards as well.

In process of truffle fruiting bodies development some bacteria are engaged. The bacteria grow within truffle fruiting bodies accompanied by yeasts and filamentous fungi, that are presumably involved in ascocarp nutrition, development and maturation, as well as spore dispersal. Yet the richness and role of bacteria associated with summer truffle have not been fully discovered so far. Studies from the last decade showed that bacteria belonging to *α-Proteobacteria* play supposedly the main role in formation of truffle fruiting bodies. However, the stage of truffles' development involves more groups of bacteria interactions.

Identification the bacteria that promote formation of truffle fruiting bodies is of particular importance in successful truffles' cultivation and protection. Knowledge about the role of bacteria in the process of truffle development may help growing the ultimate fungi and enhance possibilities of protection as well.

## **Kompleksowa detekcja oraz identyfikacja bakteryjnego DNA we krwi pacjentów z sepsą i u zdrowych wolontariuszy metodą sekwencjonowania nowej generacji**

Comprehensive detection and identification of bacterial DNA in the blood of patients with sepsis and healthy volunteers using next-generation sequencing method.

Agnieszka Sroka-Oleksiak, Dominika Salamon, Małgorzata Bulanda, Tomasz Gosiewski

Katedra Mikrobiologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

**Wstęp:** Zakażenia spowodowane przez bakterie i grzyby od dawna stanowią poważny problem medyczny. Najgroźniejsze są infekcje systemowe, np. sepsa. Metoda sekwencjonowania nowej generacji pozwala na uzyskanie pełnego profilu bakteryjnego, dlatego zastosowaliśmy ją do badania próbek krwi od pacjentów z klinicznymi objawami sepsy oraz od zdrowych ochotników.

**Materiały i metody:** Próbkę krwi pobrano od pacjentów septycznych (n=62), hospitalizowanych na oddziale intensywnej terapii oraz od zdrowych wolontariuszy (n=23) i po odpowiednim przygotowaniu, sekwencjonowano przy użyciu platformy MiSeq. Hodowle krwi przeprowadzono w tym samym czasie.

**Wyniki:** Metodą hodowlaną uzyskano tylko 30,6% (n= 19) pozytywnych wyników dla próbek pochodzących od pacjentów septycznych. Metoda NGS pozwoliła na wykrycie obecności bakteryjnego DNA we wszystkich próbkach (od pacjentów z sepsą i co było najbardziej zaskakujące - od zdrowych wolontariuszy).

**Wnioski:** Uzyskane rezultaty pokazują, że bakterie w sposób ciągły przedostają się do krwi (DNAemia), ale u zdrowych ludzi ich skład jakościowy jest zupełnie inny niż u pacjentów z sepsą. Pacjenci hospitalizowani na oddziale intensywnej terapii byli narażeni na zakażenie bakteriami szpitalnymi, głównie Gram negatywnymi bakteriami należącymi do typu Proteobacteria, co prawdopodobnie było rezultatem wyższej ilości tych bakterii w grupie pacjentów septycznych. Z kolei u osób zdrowych obecne było DNA typowe dla fizjologicznej flory bakteryjnej.

**Introduction:** Infections caused by bacteria and fungi have been a serious medical problem since olden times. The most threatening are systemic infections, i.e. sepsis. The Next-generation sequencing method (NGS) allows to obtain a full bacteriological profile, so we would like to use this method to examine blood samples from patients with clinical signs of sepsis and healthy volunteers.

**Materials and methods:** blood samples were taken from patients hospitalized in the ICU (Intensive Care Unit) with septic symptoms (n = 62) and in healthy volunteers (n = 23) and after proper preparation, sequenced using NGS method – MiSeq apparatus. Blood cultures were performed at the same time.

**Results:** In our studies we demonstrated that the percentage of positive blood culture was 30.6% (n=19) for samples from septic patients. NGS method revealed the presence of bacterial DNA in all samples (from patients with sepsis and healthy volunteers, what was the most surprising fact).

**Conclusions:** The obtained results show that bacteria constantly passed into the blood (DNAemia), but in healthy people their quantitative composition was different than in patients with sepsis. Patients hospitalized in the ICU ward were exposed to nosocomial bacteria, mainly Gram negative bacteria belonging to Proteobacteria phylum - probably it was a reason why a

higher percentage of Proteobacteria was demonstrated in patients with sepsis. In the blood of healthy volunteers was present DNA typical for physiological bacterial flora.

## Badania przesiewowe oraz identyfikacja molekularna grzybów *Ascomycota* zdolnych do produkcji dehydrogenazy celobiozowej

Screening and molecular identification of *Ascomycota* fungi capable of producing cellobiose dehydrogenase

Justyna Sulej, Aleksandra Drab, Grzegorz Janusz, Jerzy Rogalski

Zakład Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin,  
justyna.sulej@poczta.umcs.lublin.pl

Dehydrogenaza celobiozowa (CDH, EC 1.1.99.18, CAZy AA 3.1) jest zewnątrzkomórkową oksydoreduktazą produkowana przez wiele grzybów rozkładających drewno. CDH zbudowana jest z dużej, katalitycznej domeny flawinowej połączonej niekowalencyjnie z FAD oraz domeny cytochromowej zawierającej hem typu b, połączonych ze sobą poprzez elastyczny region zawiasowy. CDH w zależności od organizmu z jakiego pochodzi wykazuje różną specyficzność substratową najczęściej jednak utlenia wiązania  $\beta$ -1,4 glikozydowe di- a także oligosacharydów takich jak celobioza, celodextryny i laktoza. W oparciu o analizy filogenetyczne sekwencji CDH pochodzących z różnych grzybów, dehydrogenazy celobiozowe zostały podzielone na trzy odrębne klasy: klasę I (*Basidiomycota*), klasę II (*Ascomycota*) oraz klasę III (CDH niescharakteryzowane). CDHs pochodzące z grzybów należących do *Ascomycota* ze względu na swoją naturę są bardzo ważne w procesach biotechnologicznych. Odkrycie nowych enzymów o różnej specyficzności substratowej oraz zwiększonej stabilności białka jest niezbędne do zastosowań komercyjnych. W prezentowanej pracy wykonano badania przesiewowe grzybów należących do *Ascomycota* pod względem zdolności do produkcji CDH oraz ich identyfikację przy użyciu technik molekularnych opartych o sekwencje ITS.

Cellobiose dehydrogenase (CDH, EC 1.1.99.18, CAZy AA 3.1) is an extracellular oxidoreductase produced by a number of wood-degrading fungi. CDH is composed of a large catalytic flavin domain containing non-covalently bound FAD and a b-type heme-containing cytochrome domain connected by a flexible linker region. According to the origin, CDHs show varying substrate specificities, but in general, they all oxidize  $\beta$ -1,4-linked di- and oligosaccharides such as cellobiose, cellodextrins, and lactose. Based on phylogenetic analysis of CDH sequences from various fungal sources cellobiose dehydrogenases were divided into three distinct classes: class I (*Basidiomycota*), class II (*Ascomycota*) and class III (uncharacterized CDHs). CDHs from *Ascomycota* fungi in view of its nature are biotechnologically important enzymes. Discovery of novel CDHs with different substrate specificities and improved stabilities is essential for commercial applications. Here we present screening of several strains of *Ascomycota* for their ability to produce CDHs. Moreover, molecular identification of these strains based on ITS sequences was performed.

The research project funded by the National Science Centre in Poland (grant no. 2015/17/D/NZ9/02066)  
Projekt badawczy finansowany z funduszy Narodowego Centrum Nauki w Polsce (grant nr  
2015/17/D/NZ9/02066)

## **Analiza metaboliczna i metagenomiczna konsorcjów metanotroficznych pochodzących z gleb o różnej genezie**

Metabolic and metagenomic analysis of methanotrophic consortia from soils of different genesis

Anna Szafranek-Nakonieczna<sup>1</sup>, Anna Pytlak<sup>1</sup>, Weronika Goraj<sup>1</sup>, Agnieszka Wolińska<sup>1</sup>,  
Magdalena Frąc<sup>2</sup>, Karolina Oszust<sup>2</sup>, Katarzyna Larwa<sup>1</sup>, Zofia Stępniewska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, ul. Konstantynów 11, 20-708 Lublin, tel. (0-81) 4545460, [anna.szafranek@kul.pl](mailto:anna.szafranek@kul.pl)

<sup>2</sup>Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Bakterie metanotroficzne wykorzystują metan (CH<sub>4</sub>), jako źródło węgla i energii. Zasadniają środowiska, w których wytwarzany jest CH<sub>4</sub> (np. torfowiska) lub takie które mają kontakt z metanem atmosferycznym (np. gleby mineralne). Metanotrofy zdolne są do wytwarzania m.in. białek, biopolimerów, kwasów organicznych, osmoprotektantów oraz lipidów. Wszystko to decyduje o ich potencjale biotechnologicznym oraz wskazuje, że ich funkcja w środowisku i wpływ na inne mikroorganizmy, z którymi tworzą konsorcja, może być znacząca.

Celem pracy było zbadanie profilu metabolicznego hodowlanych konsorcjów metanotroficznych pochodzących z gleby organicznej – torfu (torfowisko wysokie, Poleski Park Narodowy) i mineralnej – bielicy (okolice Kurowa) oraz ich identyfikacja.

Z badanych gleb zaszczipiano mikroorganizmy na podłoże mineralne (NMS, stałe a następnie płynne). Zbadano profil metaboliczny konsorcjów hodowanych na podłożu płynnym (System BIOLOG<sup>®</sup>, EcoPlate<sup>®</sup>). Identyfikację mikroorganizmów wchodzących w skład konsorcjów przeprowadzono w oparciu o sekwencjonowanie nowej generacji (MiSeq, Illumina).

Badane konsorcja z gleby torfowej i bielicy wykazywały aktywność metanotroficzną wynoszącą odpowiednio 50,7 i 21,1 mg CH<sub>4</sub> l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Analiza metaboliczna i metagenomiczna wykazała ich zróżnicowanie oraz potwierdziła obecność w ich składzie bakterii metanotroficznych.

Methanotrophic bacteria use methane (CH<sub>4</sub>) as a source of carbon and energy. They occupy environments where CH<sub>4</sub> is produced (e.g. peat bogs) or which are in contact with atmospheric methane (e.g. mineral soil). Methanotrophs are capable of producing, among others, proteins, biopolymers, organic acids, osmoprotectants and lipids. This determines their biotechnological potential but also indicates that their role in the environment and impact on other microorganisms with which they form consortia can be significant.

The aim of the study was to investigate the metabolic profile of culture methanotrophic consortia from organic – peat bog (Poleski National Park) and mineral soil- *Albic Luvisols* (Kurów region) and their identification.

From investigated soils the microorganisms were inoculated on mineral medium (NMS, solid and next liquid). The metabolic profile of the investigated consortia on the liquid media (BIOLOG<sup>®</sup> System, EcoPlate<sup>®</sup>) was determined. Microorganisms were identified using next generation sequencing (MiSeq, Illumina).

The investigated consortia from peat and *Albic Luvisols* characterized by methanotrophic activity of 50.7 and 21.1 mg CH<sub>4</sub> l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> respectively. Metabolic and metagenomic analysis indicated differences between consortia and that they build on the methanotrophs metabolism.

## **Zastosowanie metod metagenomicznych w procesie identyfikacji bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* zakażających rośliny należące do plemion Genisteeae i Loteae**

The application of metagenomic methods in the identification of *Bradyrhizobium* bacteria infecting Genisteeae and Loteae plants

Michał Szela, Joanna Banasiewicz, Małgorzata Peszka, Tomasz Stępkowski

Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa  
iapetus1989@gmail.com

Szczepy *Bradyrhizobium* zakażające przedstawicieli plemion Genisteeae i Loteae na obszarze Europy tworzą grupę filogenetyczną w obrębie sekwencji genów symbiotycznych znaną jako kład II. Kład II wykazuje szerokie rozprzestrzenienie, również poza Europą, ale zawsze na obszarach, na których występują przedstawiciele obu lub jednego z wyżej wymienionych plemion. Biorąc pod uwagę wysoką specyficzną symbiozy, która cechuje szczepy kladu II, postanowiono zidentyfikować w obrębie wysp symbiotycznej gen lub grupę genów wyróżniającą ten kład od innych szczepów *Bradyrhizobium*. Spośród kilku zidentyfikowanych genów wybrano gen kodujący fosfodiesterazę guanylową, który w obrębie kladu II występuje w postaci kopii „symbiotycznej”, jak też „niesymbiotycznej”. Równocześnie podjęto próbę amplifikacji genu *nifD* w oparciu o startery specyficzne dla tego kladu *Bradyrhizobium*.

Uzyskano pozytywne wyniki amplifikacji (potwierdzone przez sekwencjonowanie produktów PCR) na matrycach DNA izolowanych z próbek gleby pobranych z różnych gatunków Genisteeae na obszarze Polski, a także z ryzosfery roślin kolcolistu (*Ulex europaeus*) rosnących na obszarze południowo-wschodniej Brazylii, gdzie gatunek ten jest rośliną inwazyjną. Obecność kladu II w południowo-wschodniej Brazylii wskazuje na ko-introdukcję *Bradyrhizobium* kladu II z Europy, razem ze swoim gospodarzem roślinnym.

*Bradyrhizobium* strains infecting legume plants belonging to the Genisteeae and Loteae tribes in Europe form a phylogenetic group known as Clade II within symbiotic gene phylogenetic trees. Clade II strains are widespread (also outside Europe), however, they are always present in areas inhabited by legume species representing either both or at least one of the mentioned above tribes. Taking into account the high specificity of the symbiosis formed by Clade II strains, it was decided to identify within the symbiotic islands a gene (or group of genes) which distinguishes this clade from other *Bradyrhizobium* groups. Out of the several possible candidates, a gene encoding a guanyl phosphodiesterase was selected, which in the genomes of Clade II strains is present as “symbiotic” and nonsymbiotic copies. Simultaneously, an attempt was made to amplify the *nifD* gene using newly designed primers specific to this *Bradyrhizobium* clade.

Positive results of the amplification (confirmed by PCR product sequencing) were obtained on DNA templates isolated from soil samples collected in Poland from different species of Genisteeae as well as from the rhizosphere of gorse (*Ulex europaeus*) collected in south-eastern Brazil, where this plant is regarded as the invasive species. The presence of Clade II strains in the south-eastern Brazil most likely is due to the co-introduction of *Bradyrhizobium* Clade II strains, which have been brought from Europe together with their host plant.

## **Zastosowanie testu opartego na parametrach wzrostu mutantu *sod1* drożdży *S. cerevisiae* w środowisku hipertonicznym do badania właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów roślinnych**

The use of a test based on growth parameters of the *sod1* mutant of *S. cerevisiae* yeast in a hypertonic medium to evaluate the antioxidant properties of plant extracts

Agata Święciło

Katedra Mikrobiologii Środowiskowej  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
Ul. S. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin, tel. (600834135),  
agata.swiecilo@up.lublin.pl

Do oznaczania właściwości antyoksydacyjnych próbek żywności lub surowców do produkcji żywności wykorzystuje się różne metody zarówno biochemiczne jak i biologiczne. Właściwości antyoksydacyjne uzyskane w testach biologicznych nie zawsze są skorelowane z wynikami testów biochemicznych *in vitro*, co wynika z ich przemian metabolicznych podczas trawienia oraz różnej bioprzystępności składników tych próbek. W praktyce laboratoryjnej do badania właściwości antyoksydacyjnych *in vivo* wykorzystuje się różne organizmy modelowe w tym drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Celem prezentowanych badań była ocena przydatności testu biologicznego wykorzystującego wzrost mutantu *sod1* drożdży *S. cerevisiae* (pozbawionego aktywności cytoplazmatycznej dysmutazy ponadtlenkowej) na podłożu hipertonicznym do oznaczania właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów wodnych z owoców jagodowych. Markerem właściwości antyoksydacyjnych w tym przypadku była zdolność do przywracania wzrostu tym komórkom. Ekstrakty wykonano z owoców trzech odmian uprawnych maliny (*Rubus idaeus* L. cv. *Cascade Delight*, *Glen Fyne*, *Octavia*), jednej odmiany uprawnej jeżyny (*Rubus fruticosus* L. cv. *Navaho*) oraz dzikiej jeżyny (*Rubus fruticosus* L.) a także mieszańca malino-jeżyny (*Rubus idaeus* L. × *Rubus fruticosus* L.). Testy wzrostowe komórek *sod1* drożdży na podłożu hipertonicznym potwierdziły właściwości antyoksydacyjne wszystkich badanych ekstraktów, z tym że test polegający na oznaczaniu parametrów wzrostu za pomocą liczby kolonii okazał się bardziej czuły niż wysiew uzyskany za pomocą replikatora.

Various biochemical and biological methods are used to determine the antioxidant properties of food samples or raw material for food production. The antioxidant properties of samples in biological tests are not always in agreement with the results of *in vitro* biochemical tests, due to metabolic transformations taking place during digestion and to differences in the bioavailability of their components. In laboratory practice, antioxidant properties are tested *in vivo* using various model organisms including *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. The aim of the present study was to evaluate the suitability of a biological test based on the growth of the *S. cerevisiae sod1* mutant (devoid of cytosolic superoxide dismutase activity) on a hypertonic medium to determine the antioxidant properties of aqueous extracts of berry fruits. The ability to restore the growth of *sod1* mutant cells was in this case the marker of antioxidant properties. The extracts were prepared from the fruit of three cultivars of raspberry (*Rubus idaeus* L. cv. *Cascade Delight*, *Glen Fyne* and *Octavia*), one cultivar of blackberry (*Rubus fruticosus* L. cv. *Navaho*), and wild blackberry (*Rubus fruticosus* L.), as well as a raspberry-blackberry hybrid (*Rubus idaeus* L. × *Rubus fruticosus* L.). The tests of the growth of the *sod1* yeast cells on a hypertonic medium confirmed the antioxidant properties of all extracts tested. The technique involving determination of growth parameters based on the number of colonies proved more sensitive than the use of a microplate replicator.

## Mikrobiologiczna biodegradacja i fitoakumulacja jako możliwa strategia zmniejszania zanieczyszczenia DDT w glebach ekologicznych gospodarstw

Microbial biodegradation and phytoaccumulation as a possible strategy to reduce DDT pollution in soils of organic farms

Małgorzata Tartanus<sup>1</sup>, Eligio Malusá<sup>1</sup>, Barbara Helena Łabanowska<sup>1</sup>, Artur Miszczak<sup>1</sup>, Fabiana Russo<sup>2</sup>, Andrea Ceci<sup>2</sup>, Oriana Maggi<sup>2</sup>, Anna Maria Persiani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

<sup>2</sup>Dept. Environmental Biology, Sapienza Univ. Roma, P.le Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy

W Instytucie Ogrodnictwa podjęto próbę połączenia: biodegradacji przez mikroorganizmy wspomagające rośliny wykazujące właściwości akumulujące w celu redukcji skażenia gleb przez pestycydy w uprawach ekologicznych. Stosowano wytypowane gatunki roślin i konsorcja mikroorganizmów (bakterie i grzyby mykoryzowe), korzystne dla rozwoju roślin, w celu zbadania możliwości pobierania DDT i jego metabolitów przez te rośliny. Ponadto z gleby zanieczyszczonej DDT izolowano rozwijające się w niej grzyby i bakterie, w celu identyfikacji szczepów zdolnych do metabolizowania tych związków. Badania takie są konieczne, gdyż z 53 prób gleby pobranych w ośmiu województwach w Polsce, aż 80% zawierało pozostałości tych substancji. Niektóre gatunki roślin (np. *Cucurbita pepo*) wykazały pewną zdolność pobierania i transportu związków DDT do części nadziemnych, ale nie do owoców. Zastosowane konsorcja mikroorganizmów dość efektywnie wspomagały, pobieranie w/w toksycznych substancji przez rośliny. Z gleb zanieczyszczonych związkami DDT wyizolowano i zidentyfikowano 179 szczepów należących do 59 gatunków grzybów saprotroficznymi. Przeprowadzono testy tolerancji / oporu (Rt: Rc, T.I.) w obecności wysokiego stężenia DDT by ocenić i wytypować najlepsze szczepy wykazujące zdolności biodegradacji DDT.

The study has been undertaken at the Research Institute of Horticulture to investigate microorganism biodegradation and phytoaccumulation of organic pesticides present in soils managed under organic farming methods. Consortia of microorganisms, such as plant beneficial bacteria and fungi (PGPR and mycorrhizal), were used in association to specific plant species to explore the possibility of breakdown DDT and its metabolites into harmless compounds or to foster their uptake by the plants. Furthermore, soil polluted with DDT were used to isolate fungi and bacteria that were able to thrive in them aiming at identifying strains able to metabolize these compounds. Such studies were prompted by the outcome of a survey of 53 soil samples gathered from eight Voivodships in Poland showing that 80% contained residues of this substances. Some plant species (e.g. *Cucurbita pepo*) showed some translocation capacity into above-soil organs, but not to physiological sinks such as fruits. The used microbial consortia fostered the uptake of DDT and its metabolites into the root system. 179 strains belonging to 59 saprotrophic soil fungal species were isolated and identified from polluted soils. Tolerance/resistance tests (Rt:Rc; T.I.) in presence of high DDT concentration were performed in order to select the best candidates for DDT biodegradation which hold promise for bioremediation purposes.

Badania prowadzono w ramach projektu: Sadownictwo metodami ekologicznymi - badania w zakresie określenia źródeł oraz przyczyn niezamierzonego występowania w produktach ekologicznych środków niedopuszczonych do stosowania w rolnictwie ekologicznym. Określenie dobrych praktyk, standardów postępowania, opracowanie przewodnika oraz wytycznych w zakresie przeciwdziałania takim przypadkom.

Finansowany przez MRiRW w 2016 roku



## Skuteczność i wpływ na środowisko grzybów entomopatogenicznych stosowanych w ochronie roślin sadowniczych

Efficacy and environmental impact of entomopathogenic fungi used for the protection of fruit plants

Małgorzata Tartanus<sup>1</sup>, Eligio Malusa<sup>1</sup>, Barbara Helena Łabanowska<sup>1</sup>, Cezary Tkaczuk<sup>2</sup>, Loredana Canfora<sup>3</sup>, Flavia Pinzari<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

<sup>2</sup>Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach, Zakład Ochrony i Hodowli Roślin, Prusa 14, 08-110 Siedlce

<sup>3</sup>Council for Agricultural Research and Economics - Research Centre for the Soil-Plant System, Via della Navicella, 2-4, 00184 Rome, Italy

<sup>4</sup>Life Science Department, Natural History Museum, Cromwell Road, London, SW7 5BD, UK

Rejestracja wprowadzanych do środowiska produktów opartych na mikroorganizmach wymaga oceny skuteczności, ekotoksykologii i zachowania w glebie, ponieważ biopestycydy są na ogół narażone na działanie czynników środowiskowych, ale same też na nie oddziałują. Dlatego też w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach, w latach 2014-2016 prowadzono doświadczenia z zastosowaniem grzybów entomopatogenicznych: *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii* do zwalczania pędraków chrabąszcza majowego (*Melolontha melolontha*) na plantacjach truskawki uprawianej wg systemu ekologicznego. Opracowano również nową metodę, opartą na qPCR dostosowując podejście genotypowe w oparciu o marker SSR (Simple Sequence Repeat), którą stosowano do oceny przeżywalności i wykrywania ilości obu rodzajów grzybów entomopatogenicznych, po wprowadzeniu ich do gleby. Wpływ inokulum grzybów entomopatogenicznych na strukturę i zróżnicowanie populacji mikrobiologicznej (bakterie i grzyby) gleb oszacowano stosując technikę T-RFLP i qPCR. W prowadzonych doświadczeniach uzyskiwano ograniczenie liczby pędraków chrabąszcza majowego i uszkodzonych przez nie roślin, zależnie od ich zagęszczenia wyjściowego i zastosowanego inokulum grzybów entomopatogenicznych, na poziomie od kilku do ponad 50%. Wprowadzanie inokulum grzybów owadobójczych do gleby nie wpływało na ogólną populację mikroorganizmów glebowych (bakterii i grzybów).

The registration and release in the environment of microbial-based products require the evaluation of efficacy, ecotoxicology and fate and behaviour, since biopesticides are generally affected by environmental factors but also affect them. During 2014-2016 in the Institute of Horticulture were conducted experiments to test the efficacy to control white grubs of may beetles (*Melolontha melolontha*) on organic strawberry plantations and the environmental impact of the following entomopathogen fungi: *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*. A new method based on qPCR, adapting a genotyping approach based on SSR (Simple Sequence Repeat) marker, was developed for the simultaneous detection and quantification of the two entomopathogenic fungi in soil, and showing a different capacity of fungi persistence. The inoculum effect on soil microbial community structure and diversity was evaluated using the T-RFLP and qPCR approaches. In the conducted experiments, the number of beetles and damaged plants was reduced, depending on their initial density and of the applied inoculum of the entomopathogenic species, up to more than 50%. The inoculation did not affect the overall microbial population.

Badania prowadzono w ramach projektu: Określenie innowacyjnych rozwiązań oraz dobrych praktyk ochrony przed szkodnikami i chorobami ze szczególnym uwzględnieniem upraw roślin jagodowych, w tym truskawki, maliny i aronii. Finansowany przez MRiRW w latach 2014-2016

## **Analiza oddziaływania nadtlenu wapnia na aktywność wybranych enzymów oksydoredukcyjnych w glebie lekkiej skażonej przepracowanym olejem silnikowym**

Assessment of calcium peroxide effect on some enzyme activities in sandy soil contaminated with spent engine oil

Arkadiusz Telesiński, Łukasz Węgrzynowski, Michał Stręk

Katedra Fizjologii Roślin i Biochemii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Celem podjętych badań było określenie oddziaływania nadtlenu wapnia na aktywność wybranych enzymów oksydoredukcyjnych: dehydrogenaz oraz oksydazy *o*-difenolowej w glebie zanieczyszczonej przepracowanym olejem silnikowym. Doświadczenie laboratoryjne przeprowadzono na próbkach gleb pobranych z poziomu ornopróchniczego (0-30 cm) ziem rdzawych typowych (piasek gliniasty, Corg 8,7 g·kg<sup>-1</sup>). Do części ziemistych pobranego materiału glebowego wprowadzono w różnych kombinacjach przepracowany olej silnikowy (w ilościach 0, 10 i 50 g·kg<sup>-1</sup>) oraz nadtlenek wapnia (w ilościach 0, 200 i 400 mg·kg<sup>-1</sup>). Próbkę doprowadzono do 60% maksymalnej pojemności wodnej i przechowywano w szczelnie zamkniętych szklanych pojemnikach w temperaturze 20°C. We wszystkich kombinacjach oznaczono w 1., 7., 14. i 28. dniu doświadczenia aktywność dehydrogenaz oraz oksydazy *o*-difenolowej.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że zanieczyszczenie gleby przepracowanym olejem silnikowym spowodowało istotne zmiany aktywności dehydrogenaz i oksydazy *o*-difenolowej. Aktywność dehydrogenaz w glebie zanieczyszczonej przepracowanym olejem silnikowym uległa podwyższeniu w stosunku do gleby kontrolnej, podczas gdy aktywność oksydazy *o*-difenolowej była hamowana. Aplikacja nadtlenu wapnia do gleby niezawierającej przepracowanego oleju silnikowego w niewielki sposób oddziaływała na aktywność oznaczanych oksydoreduktaz. Największe różnice pomiędzy oddziaływaniem zastosowanych dawek nadtlenu wapnia w glebie skażonej przepracowanym olejem silnikowym wystąpiły w przypadku dehydrogenaz.

The aim of study was to assess calcium peroxide influence on some oxidoreductases: dehydrogenases and *o*-diphenol oxidase activities in soil contaminated with spent engine oil. The laboratory experiment was carried out on loamy sand samples with organic carbon content of 8.7 g·kg<sup>-1</sup>. Different combination of spent engine oil (0, 10 and 50 g·kg<sup>-1</sup>) and calcium peroxide (0, 200 and 400 mg·kg<sup>-1</sup>) were added to soil samples. The soil samples were adjusted to 60% maximum water holding capacity, and they were incubated in tightly closed glass containers at a temperature of 20°C. Activity of dehydrogenases and *o*-diphenol oxidase was determined on day 1, 7, 14 and 28.

Obtained results showed that contamination with spent engine oil caused significant changes of dehydrogenases and *o*-diphenol oxidase activities. Activity of dehydrogenases was increased and activity of *o*-diphenol oxidase was decreased comparing to control. Application of calcium peroxide to non-contaminated soil in a small way affected on assayed oxidoreductases. It is difficult to assess the direction of dehydrogenases and *o*-diphenol oxidase activities in soil contaminated with spent engine oil after addition of calcium peroxide. The highest differences between the effects of the applied dosage of calcium peroxide in soil contaminated with spent engine oil occurred in the case of dehydrogenases.

## Porównanie oddziaływania 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych cieczy jonowych z anionem tetrafluoroboranowym na aktywność oksydazy *o*-difenolowej w glebie

Comparison of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids with tetrafluoroborate anion on *o*-diphenol oxidase activity in soil

Arkadiusz Telesiński<sup>1</sup>, Kornel Curyło<sup>1</sup>, Robert Biczak<sup>2</sup>, Barbara Pawłowska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Fizjologii Roślin i Biochemii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

<sup>2</sup>Zakład Biochemii i Ekotoksykologii, Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie

Celem podjętych badań było określenie oddziaływania trzech cieczy jonowych: tetrafluoroboranu 1-butylo-3-metyloimidazoliowego [BMIM][BF<sub>4</sub>], tetrafluoroboranu 1-hekso-3-metyloimidazoliowego [HMIM][BF<sub>4</sub>] oraz tetrafluoroboranu 1-oktylo-3-metyloimidazoliowego [OMIM][BF<sub>4</sub>] na aktywność oksydazy *o*-difenolowej w glebach o różnym składzie granulometrycznym. Doświadczenie laboratoryjne przeprowadzono na próbkach gleb pobranych z poziomu ornopróchnicznego (0-30 cm): piasku gliniastym (Corg 8,7 g·kg<sup>-1</sup>, pH<sub>KCl</sub> 6,36), glinie lekkiej (Corg 10,9 g·kg<sup>-1</sup>, pH<sub>KCl</sub> 6,81) oraz glinie piaszczysto-ilestej (Corg 33,8 g·kg<sup>-1</sup>, pH<sub>KCl</sub> 7,13). Do części ziemistych pobranego materiału glebowego wprowadzono cieczy jonowe w ilościach: 0 (gleba kontrolna), 0,05, 0,50 i 5,00 mmol·kg<sup>-1</sup>. Próbkę doprowadzono do 60% maksymalnej pojemności wodnej i przechowywano w szczelnie zamkniętych szklanych pojemnikach w temperaturze 20°C. Aktywność oksydazy *o*-difenolowej oznaczono w 1., 7., 14., 28., 56 i 112. dniu doświadczenia.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że aplikacja 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych cieczy jonowych z anionem tetrafluoroboranowym spowodowała w większości przypadków istotne zmiany aktywności oksydazy *o*-difenolowej. Największy efekt zaobserwowano w piasku gliniastym, w którym w trakcie trwania całego doświadczenia występowała stymulacja enzymu w porównaniu do gleby kontrolnej. Natomiast w glinie piaszczysto-ilestej wykazano głównie inhibicję aktywności oksydazy *o*-difenolowej. Ponadto oddziaływanie cieczy jonowych zwiększało się wraz z wydłużaniem podstawnika alkilowego w kationie.

The aim of study was to assess effect of three ionic liquids: 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate [BMIM][BF<sub>4</sub>], 1-hexyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate [HMIM][BF<sub>4</sub>], and 1-octyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate [OMIM][BF<sub>4</sub>] on soil *o*-diphenol activity. The laboratory experiment was carried out on soil samples, with different texture: loamy sand (Corg 8,7 g·kg<sup>-1</sup>, pH<sub>KCl</sub> 6,36), sandy loam (Corg 10,9 g·kg<sup>-1</sup>, pH<sub>KCl</sub> 6,81) and sandy clay loam (Corg 33,8 g·kg<sup>-1</sup>, pH<sub>KCl</sub> 7,13). Ionic liquids at the dosages of: 0 (control soil), 0,05, 0,50 i 5,00 mmol·kg<sup>-1</sup> were added to soil samples. The soil samples were adjusted to 60% maximum water holding capacity, and they were incubated in tightly closed glass containers at a temperature of 20°C. Activity of *o*-diphenol oxidase was determined on day 1, 7, 14, 28, 56 and 112.

Obtained results showed that application of ionic liquids with tetrafluoroborate anion caused primarily significant changes in *o*-diphenol oxidase activity. The highest effect was observed in loamy sand, where the increase was reported during all experiment. However in sandy clay loam the decrease in *o*-diphenol oxidase was mainly noted. Moreover the impact of ionic liquids increased with the extension of the alkyl chain

## Trójczynnikowa interakcja symbiotyczna olszy czarnej (*Alnus glutinosa* L. Gaertn.) w warunkach stresu solnego

Tripartite mutualism of black alder (*Alnus glutinosa* L. Gaertn.) at saline area

Thiem Dominika<sup>1,3</sup>, Marcin Gołębiewski<sup>2,3</sup>, Hrynkiewicz Katarzyna<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii· Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Lwowska 1, PL-89-100 Torun, Polska, hrynk@umk.pl

<sup>2</sup>Katedra Fizjologii i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Lwowska 1, PL-89-100 Torun, Polska

<sup>3</sup>Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii, Nicolaus Copernicus University, Wilenska 4, 87-100 Toruń, Polska

Olsza czarna (*Alnus glutinosa* L. Gaertn.) jest gatunkiem pionierskim charakteryzującym się podwyższoną tolerancją na zasolenie gleb, w związku z czym może być rozpatrywana w rekultywacji terenów zasolonych. Wysoka tolerancja niekorzystnych warunków glebowych przez olszę czarną może być efektem unikalnej, trójczynnikowej interakcji symbiotycznej z grzybami ektomykoryzowymi (EM), arbuskularnymi (AM) oraz z bakteriami brodawkowymi z rodzaju *Frankia* sp., która może tworzyć się na korzeniach olszy czarnej. Udział grzybów EM i AM w tworzeniu modelu różnorodności obu typów asocjacji mykoryzowych oraz występowanie i rola bakterii nitryfikacyjnych drzew został jak dotychczas słabo poznany. Wykazano, że występowanie i różnorodność symbiontów grzybowych i bakteryjnych w istotnym stopniu zależy od czynników abiotycznych środowiska. Tymczasem, wpływ zasolenia gleb, jako czynnika abiotycznego różnicującego strukturę symbiotycznych mikroorganizmów, analizowany był głównie w przypadku roślin zielnych i tworzących z nimi symbiozę grzybów arbuskularnych.

Podczas konferencji zaprezentowane zostaną wyniki sekwencjonowania amplikonów bakteryjnych genów 16S rRNA i grzybowych ITS opisujących zbiorowiska endofitów olszy czarnej z dwóch stanowisk (zasolonego i kontrolnego) oraz analiza wpływu czynników środowiskowych (w szczególności zasolenia) na te zbiorowiska.

*Alnus glutinosa* (black alder) is a pioneer tree species with the tolerance to high concentrations of salts in the soils, and can be considered as an important tree for regeneration of forests at saline areas. High tolerance of *A. glutinosa* to unfavorable conditions can be a feedback effect of unusual tripartite symbiotic association of plant roots with nitrogen-fixing bacteria (*Frankia* sp.) and representatives of two mycorrhizal types: ectomycorrhizal (EM) and arbuscular (AM) fungi. Participation of EM and AM fungi in forming biodiversity model of both mycorrhizal symbionts as well the association of roots with nitrogen-fixing bacteria is poorly understood, specially at natural unfavourable saline conditions. It was demonstrated that the distribution and diversity of fungal and bacterial symbionts highly dependent on the abiotic factors. Meanwhile, the effect of salinity, as an important abiotic factor which differentiate structure of symbiotic microorganisms, was analysed only in case of herbaceous plants associated with arbuscular fungi.

During the conference the results of sequencing of 16S rRNA and ITS amplicons describing endophytic communities of black alder roots at two test sites (saline and control) and the effect of environmental factors (especially salinity) which affect this community will be presented.

## **Wpływ systemów uprawy roli na aktywność fosfataz w glebie pod uprawą łubinu wąskolistnego**

Effect of tillage systems on phosphatase activity in soils under lowland lupine

Anna Tomkowiak<sup>1</sup>, Jerzy Szukała<sup>2</sup>, Justyna Starzyk<sup>1</sup>

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii,

<sup>1</sup>Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej

<sup>2</sup>Katedra Agronomii

Opiekun naukowy: dr hab. Justyna Starzyk

Nowym zadaniem rolnictwa jest zrównoważona intensyfikacja, która ma na uwadze nie tylko produkcję, ale również poprawę środowiska naturalnego. W następstwie tego odchodzi się od uprawy tradycyjnej na rzecz uprawy uproszczonej i siewu bezpośredniego. Z uwagi na istotny udział mikroorganizmów glebowych podczas rozwoju roślin wykorzystuje się metodę uprawy roli, która pozwoli na niezaburzony ich rozwój.

Badania przeprowadzone w latach 2012-2014 miały na celu określenie wpływu trwałego (wieloletniego) oddziaływania uproszczeń w uprawie roli na aktywność fosfataz kwaśnych i zasadowych w glebie pod uprawą łubinu wąskolistnego (Bojar). Doświadczenie polowe miało charakter trzyczynnikowy. Próbki materiału badawczego były pobierane na terenie Zakładu Doświadczalno-Dydaktycznego w Złotnikach (koło Poznania) z 0-10 cm i 10-20 cm głębokości. Wykorzystano wariant wodny z blokami deszczowanymi i niedeszczowanymi. Zastosowano trzy systemy uprawy roli: tradycyjny, uproszczony oraz siew bezpośredni. Analizy enzymatyczne wykonywano trzykrotnie w czasie sezonu wegetacyjnego łubinu. Aktywność fosfataz kwaśnych i zasadowych oznaczano metodą spektrofotometryczną. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują na korzystne oddziaływanie uproszczeń w uprawie roli na aktywność enzymatyczną gleby. Nie stwierdzono jednoznacznie istotnego wpływu deszczowania na aktywność oznaczanych enzymów.

The new task of agriculture is a balanced intensification, which not only produces but also improves the environment. As a consequence, traditional cultivation for simplified cropping and direct sowing is left. Due to the important contribution of soil microorganisms during the development of the crop, a method of tillage is used, which will allow for their undisturbed development.

The research carried out in 2012-2014 aimed at determining the influence of permanent (multi-annual) influence of soil simplification on the activity of acid and alkaline phosphatases in soils under lime (Bojar). Field experience was a three-factorial character. Samples of research material were collected at the Experimental and Didactic Department in Złotniki (near Poznań) with 0-10 cm and 10-20 cm depth. A variant of water was used with sprinklers and sprinklers. Three farming systems were used: traditional, simplified and direct sowing. Enzyme analyzes were performed three times during the lupine vegetation season. The activity of acid and alkaline phosphatases was determined by spectrophotometric method.

The results of the analyzes indicate the beneficial effect of soil cultivation simplifications on the enzymatic activity of the soil. No significant effect of sprinkling on the activity of enzymes was found

## Cechy ryzosferowych szczepów *Trichoderma* spp. warunkujące mykopasożytnicze oddziaływanie w stosunku do patogenicznych szczepów *Fusarium* spp.

Characteristics of rhizosphere strains of *Trichoderma* spp. contributing to mycoparasitic effects on pathogenic *Fusarium* spp. Strains

Renata Tyśkiewicz<sup>1</sup>, Jolanta Jaroszuk-Ścisel<sup>1</sup>, Elżbieta Patkowska<sup>2</sup>, Grzegorz Janusz<sup>3</sup>, Artur Nowak<sup>1</sup>, Małgorzata Majewska<sup>1</sup>, Anna Słomka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Środowiskowej

<sup>3</sup>Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

<sup>2</sup>Katedra Fitopatologii i Mykologii, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Uniwersytet Przyrodniczy, ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin

Celem przeprowadzonych badań było wykazanie cech ryzosferowych szczepów *Trichoderma* spp. warunkujących mykopasożytnicze oddziaływanie w stosunku do patogenicznych szczepów *Fusarium*, należących do gatunków *F. culmorum*, *F. oxysporum* i *F. graminearum*. Badane szczepy poddano testom biotycznym na podłożu Martina i PDA oraz określono zdolność do konkurencji o ważne dla interakcji w środowisku glebowym pierwiastki (węgiel i żelazo). Wszystkie badane szczepy *Trichoderma* spp. hamowały wzrost *Fusarium* spp. zarówno na podłożu Martina (konkurencja o niszę i składniki pokarmowe) jak i podłożu PDA (antybioza), z czego szczepy należące do gatunków *T. koningiopsis*, *T. viride*, *T. aureoviride* i *T. velutinum* redukowały wielkość kolonii szczepów patogenicznych najsilniej, bo aż od 66% do 100%. U większości szczepów *Trichoderma* zaobserwowano w obrazie mikroskopowym tworzenie zmian morfologicznych typowych dla mykopasożytnictwa, takich jak okręcanie wokół strzępek grzybowego gospodarza i lizę ścian komórkowych patogenów. Obecność związków kompleksujących żelazo, zarówno specyficznych (siderofory hydroksamowe) jak i niespecyficznych u szczepów *Trichoderma*, wskazuje na możliwość wspomagania mykopasożytnictwa na drodze silnej konkurencji między mikroorganizmami glebowymi o niezbędne składniki pokarmowe, głównie żelazo.

Mykopasożytnicze oddziaływanie szczepów *Trichoderma* jest złożonym procesem, na który składają się: antagonizm oparty na lizie enzymatycznej, antybioza oraz konkurencja o niszę i składniki pokarmowe. Zjawisko to ma ogromne znaczenie, gdy ofiarą jest patogen roślinny, stając się obiecującą strategią biologicznego zwalczania szkodników roślin.

The aim of the study was to demonstrate the characteristics of *Trichoderma* spp. rhizosphere strains that contribute to mycoparasitic effect on pathogenic strains of *Fusarium* belonging to species *F. culmorum*, *F. oxysporum*, and *F. graminearum*. The tested strains were subjected to biotic tests on Martin and PDA medium. Additionally, the ability of competition for important soil elements (carbon and iron) was determined. All tested *Trichoderma* spp. strains inhibited the growth of *Fusarium* spp. both on Martin (competition for niche and nutrients) and PDA (antibiosis) media, whereas strains belonging to *T. koningiopsis*, *T. viride*, *T. aureoviride* and *T. velutinum* induced the strongest reduction of the colony of pathogenic strains, i.e. from 66% to 100%. In most *Trichoderma* strains, morphological changes, typical for mycoparasites, were observed in the microscopic image, such as curling around the host hyphae and lysis of cell walls of pathogens. The presence of iron complexing compounds, both specific (hydroxamic siderophores) and non-specific, in *Trichoderma* strains cultures, indicates the possibility of supporting mycoparasitism by the strong competition between microorganisms for essential nutrients. Mycoparasitism is a complex process that includes such features as antagonism based mostly on enzymatic lysis, antibiosis and competition between

fungi for the niche and nutrients. This phenomenon is of a great importance when the victim is a plant pathogen, which provides a strategy for biological pest control.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę – projekt nr BS-P-11-010-17-2-07

## Wpływ diklofenaku oraz sulfametoksazolu na różnorodność bakterii endofitycznych izolowanych z miskanta

Effect of diclofenac and sulfamethoxazole on the diversity of endophytic bacteria isolated from *Miscanthus*

Anna Węgrzyn<sup>1</sup>, Viviane Radl<sup>2</sup>, Andrés Sauvêtre<sup>2</sup>, Korneliusz Miksch<sup>1,3</sup>, Peter Schröder<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Politechnika Śląska, Gliwice, Polska

<sup>2</sup>Research Unit Comparative Microbiome Analysis, Helmholtz Zentrum München German Research Center for Environmental Health, Munich, Germany

<sup>3</sup>Centrum Biotechnologii, Politechnika Śląska, Gliwice, Polska

Postęp medycyny i wzrastająca konsumpcja leków spowodowała znaczące zanieczyszczenie środowiska farmaceutykami. Wśród tych substancji diklofenak (DCF) oraz sulfametoksazol (SMX) są powszechnie wykorzystywane. Oczyszczalnie hydrofitowe stanowią skuteczne rozwiązanie problemu redukcji zanieczyszczeń, w tym farmaceutyków. Bakterie endofityczne naturalnie występujące w tkankach roślin pełnią istotną rolę w biodegradacji lub biotransformacji zanieczyszczeń organicznych.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu DCF oraz SMX na różnorodność endofitów bakteryjnych izolowanych z tkanki korzeniowej miskanta. Izolaty bakteryjne identyfikowano na podstawie sekwencjonowania fragmentu genu kodującego 16S rRNA oraz zbadano ich zdolności do transformacji DCF oraz do promowania wzrostu roślin. Analiza filogenetyczna uzyskanych sekwencji wykazała różnice w różnorodności endofitów bakteryjnych uzyskanych z roślin nienarażonych (kontrolnych) oraz eksponowanych na działanie DCF i SMX. W próbkach kontrolnych najwyższa liczba izolatów była reprezentowana przez klasę Alphaproteobacteria. W próbkach eksponowanych obserwowano wzrost liczebności szczepów zaklasyfikowanych jako Actinobacteria, a rodzaj *Streptomyces* reprezentowany był przez największą liczbę izolatów. Najwyższą zdolnością do transformacji DCF charakteryzowały się *Streptomyces curacoii* (99,9%), *Microbacterium saccharophilum* (59%) oraz *M. flavescens* (64%).

The progress of medicine and increasing consumption of drugs have resulted in a significant contamination of environment with pharmaceuticals. Belonging to this group, diclofenac (DCF) and sulfamethoxazole (SMX) are in common use. Constructed wetlands represent an effective solution for the reduction of contaminants, including pharmaceuticals. Endophytic bacteria occurring naturally inside plant tissue are known to play a crucial role in the biodegradation or biotransformation of organic pollutants.

Our researches were focused on the effect of DCF and SMX on the diversity of endophytic bacteria isolated from *Miscanthus*. Bacterial isolates were identified by 16S rRNA gene sequencing and their abilities to DCF transformation as well as to plant growth promotion were examined.

Phylogenetic analysis of the sequences revealed differences in endobacterial diversity in samples obtained from plants non-exposed and exposed to DCF and SMX. In non-exposed roots, the class of Alphaproteobacteria was represented by the higher number of isolates. In root samples exposed to DCF and SMX, the increase in the abundance of strains classified as Actinobacteria was observed, and the genus *Streptomyces* was represented by the highest number of isolates. The highest transformation rate of DCF was observed for *Streptomyces curacoii* (99.9%), *Microbacterium saccharophilum* (59%) and *M. flavescens* (64%).



## Taksonomiczna różnorodność promieniowców acidofilnych kierunkiem w poszukiwaniu nowych metabolitów

Taxonomic diversity of acidophilic actinobacteria as a roadmap to drug discovery

Magdalena Wypij, Patrycja Golinska

Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Promieniowce są źródłem blisko połowy znanych substancji pochodzenia naturalnego, a sekwencje genomowe tych mikroorganizmów zawierają ponad 20 klastrów genowych, kodujących biosyntezę znanych lub dotąd niepoznanych (nowych) metabolitów wtórnych. Chociaż są dobrze poznanym źródłem związków bioaktywnych, to poszukiwanie zupełnie nowych substancji u powszechnie znanych szczepów promieniowców, jest trudne i prowadzi często do ponownego i kosztownego odkrywania poznanych już połączeń. Zatem niezbędne jest poszukiwanie nowych strategii izolacji, identyfikacji i rozpoznawania nowych szczepów w odnajdywaniu nieznanymi metabolitów.

Takie taksonomiczne podejście w celu odkrywania potencjalnie nowych substancji antybiotycznych zostało wykorzystane do selektywnej izolacji i wyodrębnienia nowych acidofilnych promieniowców z organicznych i mineralnych poziomów glebowych lasów szpilkowych. Wśród dotychczas zbadanych szczepów odkryto pięć nowych gatunków z rodzajów *Actinospica*, *Nocardia* i *Streptacidiphilus*, a niektóre z nich wytwarzają nieznane dotąd naturalne produkty, dostarczając tym samym dowodów na to, że promieniowce ze środowisk ekstremalnych są potencjalnie bogatym źródłem bioaktywnych substancji ważnych w ochronie zdrowia.

Filamentous actinobacteria are the source of almost half of all known natural products and typically have whole-genome sequences which contain > 20 biosynthetic gene clusters that code for known or predicted secondary metabolites. Although clearly an underdeveloped resource, it is difficult to discovery new chemical entities from known actinobacteria as screening them leads to the costly rediscovery of known compounds. Consequently, new strategies are needed to isolate, dereplicate and recognise new taxa for screening purposes. This taxonomic approach to drug discovery was used to selectively isolate and highlight novel acidophilic actinobacteria from litter and mineral horizon of a spruce forest soil. Five novel acidophilic species of *Actinospica*, *Nocardia* and *Streptacidiphilus* were discovered, some of which produced new natural products thereby providing further evidence that filamentous actinobacteria from extreme habitats are a potentially rich source of new bioactive compounds for healthcare.

## **Identyfikacja metodami metagenomicznymi, izolacja z gleby i wstępna charakterystyka molekularna przedstawicieli *Myxococcales***

Identification by metagenomic methods, isolation from soil and preliminary molecular characteristics of representatives of the order *Myxococcales*

Małgorzata Zielińska, Joanna Banasiewicz, Hanna Rekosz-Burlaga, Tomasz Stępkowski

Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa  
iapedus1989@gmail.com

Przedmiotem prezentowanych badań są bakterie należące do rzędu *Myxococcales*. Przedstawiciele tego rzędu bakterii występują głównie w glebie, zasiedlają ponadto osady denne zbiorników wód słodkich i słonych. Mikroorganizmy te odznaczają się złożonym cyklem życiowym - w warunkach ograniczonej dostępności substancji odżywczych zaczynają agregować, tworząc strukturę zwaną ciałem owocowym, która wypełniona jest formami przetrwalnymi. Bakterie te mają właściwości bakteriologiczne oraz proteolityczne, wytwarzają ponadto szereg metabolitów wtórnych, w tym substancje hamujące rozwój grzybów i komórek nowotworowych

Prowadzone wcześniej badania metodami metagenomicznymi z wykorzystaniem genu *recA*, jako markera filogenetycznego, ujawniły obecność szeregu nieznanymi nauce grup w obrębie myksobakterii. Celem obecnego etapu badań było otrzymanie czystych kultur tych bakterii metodami „klasycznej mikrobiologii”, a następnie ich wstępna charakterystyka w oparciu o sekwencjonowanie genów *recA* oraz 16S rRNA. Materiał do izolacji czystych kultur stanowił obornik, którym inokulowano podłoża sporządzone zgodnie z dostępnymi danymi literaturowymi. Hodowle oczyszczano poprzez pasażowanie kolonii myksobakterii na podłożach mineralnych wzbogaconych wybranymi antybiotykami. Pozwoliło to na uzyskanie czystych kultur, a następnie izolację z nich DNA genomowego i amplifikację genów *recA* i 16S rRNA. Analiza filogenetyczna otrzymanych sekwencji umożliwiła określenie przynależności taksonomicznej badanych szczepów w obrębie rzędu *Myxococcales*.

This study has been focused on bacteria belonging to the order *Myxococcales*, the order comprising predominantly soil microorganisms, although myxobacteria are also known to inhabit fresh water and marine sediments. The distinctive feature of myxobacteria is their complex life cycles - under nutrient-deficient conditions they begin to aggregate, forming the fruiting bodies filled with spores. Apart from widespread bacteriolytic and proteolytic capabilities, they also produce a number of secondary metabolites, including the substances that inhibit the growth of fungi and cancerous cells.

Previous studies in which *recA* gene was used as the phylogenetic marker revealed the presence of unknown to science groups within the *Myxococcales*. The purpose of the current study was to obtain pure cultures of these bacteria by "classical microbiology" methods and then, to carry out their characterization by sequencing of *recA* and 16S rRNA genes. The source for the isolation of pure cultures was manure of herbivorous animals, which was used for inoculation of mineral media prepared according to earlier published protocols. The cultures were then purified by passages on mineral medium enriched with antibiotics. Partial and nearly complete sequences of *recA* and 16S rRNA genes, respectively, were generated, following the amplification of these two genes on DNA extracted from isolated pure cultures. Phylogenetic analysis of obtained sequences allowed to determine the taxonomic affinity of the studied strains within the order *Myxococcales*.

## **Informacje o sponsorach**



EURx Sp. z o.o. jest prywatną, polską firmą biotechnologiczną o profilu produkcyjno-badawczym, z siedzibą w Gdańsku. Od ponad 19 lat uczestniczymy w rozwoju polskiego sektora biotechnologicznego. Dostarczamy wysokiej jakości odczynniki do biologii molekularnej dla społeczności naukowej i diagnostycznej. Nasza grupa badawczo-rozwojowa wywodzi się z kręgów akademickich, większość ma za sobą długoletnie doświadczenie w branży biotechnologicznej. EURx rygorystycznie przestrzega kontroli jakości i standardów produkcji aby zapewnić wysoką jakość i powtarzalność produktów. Równocześnie stale udoskonalamy i rozwijamy naszą ofertę, wychodząc naprzeciw oczekiwaniom naszych klientów. Mamy bogate doświadczenie w fermentacji, klonowaniu i inżynierii białkowej, oczyszczaniu białek i DNA, a także w amplifikacji DNA.

EURx produkuje szeroką gamę zestawów do izolacji i oczyszczania kwasów nukleinowych i białek, a także polimerazy termostabilne, unikalne polimerazy ludzkie, odwrotne transkryptazy, wzorce wielkości DNA i białek oraz różnego typu nukleazy, białka modyfikujące DNA, enzymy restrykcyjne i wiele innych odczynników niezbędnych w biologii molekularnej, jak bufory i odczynniki do elektroforezy i hodowli komórkowych.

Spółka NEXBIO powstała z inicjatywy lubelskich naukowców w roku 2015 w ramach projektu Innova-Invest realizowanego przez Lubelski Park Naukowo-Technologiczny w działaniu 3.1. Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka.

NEXBIO jest firmą biotechnologiczną specjalizującą się w dedykowanych rozwiązaniach w zakresie analiz molekularnych służących wczesnemu wykrywaniu chorób zagrażających uprawom. Firma oferuje unikalne w skali globalnej usługi w zakresie wczesnego wykrywania patogenów zbóż dzięki własnym testom molekularnym.

W efekcie możliwe jest wcześniejsze zapobieganie rozwojowi chorób na uprawach poprzez celowy dobór środków ochrony roślin. Takie rozwiązanie jest tańsze, bardziej skuteczne i bardziej ekologiczne, gdyż powoduje mniejsze zużycie pestycydów, do tego wyłącznie takich, które zwalczają faktycznie istniejące zagrożenie.

Pracujemy także nad rozwiązaniem w postaci przenośnego modułu analiz DNA, w formule lab-on-chip, który umożliwiłby przeprowadzenie takich badań w warunkach polowych, bez udziału laboratorium.

Inne obszary działania Spółki obejmują:

- sekwencjonowania DNA,
- projektowanie metod molekularnych oraz wykonywanie analiz dedykowanych
- badania zafałszowań żywności przy użyciu metod molekularnych
- usługi w zakresie medycyny spersonalizowanej zwierząt.

Pomimo krótkiej historii NEXBIO jest już laureatem wielu nagród:

- zwycięzca w konkursie Startup Contest w ramach InfoShare 2016,
- zwycięzca polskiej edycji konkursu Chivas the Venture
- laureat nagrody Aulera 2017
- Laureat nagrody Impuls do Biznesu
- Finalista Top 50 Innovators Challenge w dziedzinie Science.

NEXBIO sp. z o.o.

Lubelski Park Naukowo-Technologiczny

ul. Dobrzańskiego 3, 20-262 Lublin

tel. + 48 81 820 05 43

e-mail: [biuro@nexbio.pl](mailto:biuro@nexbio.pl)

[www.nexbio.pl](http://www.nexbio.pl)

Patroni naukowi



POLSKIE TOWARZYSTWO  
MYKOLOGICZNE

Patroni medialni



Laboratorium  
(PRZEGŁĄD DOŚWIADZEŃ)

FORUM  
AKADEMICKIE

Sponsorzy



EURx<sup>®</sup>  
MOLECULAR  
BIOLOGY  
PRODUCTS



**BioMaxima**



nexbio  
next generation bioscience



SULMED  
Wynalazczynie i Inżynierowie



ISBN 978-83-89969-48-4

egzemplarz bezpłatny