

Grażyna Dąbrowska, Ewelina Zdziechowska, Katarzyna Hrynkiewicz

Ocena potencjalnej przydatności bakterii ryzosferowych w procesie fitodesalinizacji gleb

Zasolenie gleby, określane jako stopień wysycenia roztworu glebowego składnikami mineralnymi, jest jedną z głównych przyczyn degradacji gleb. Szacuje się, że zasolenie dotyczy 7% powierzchni Ziemi i wciąż się zwiększa [1]. Nadmierna akumulacja jonów Na^+ i Cl^- w glebie, a także w roślinach, spowodowana jest przede wszystkim intensywnym stosowaniem nawozów mineralnych i środków ochrony roślin oraz używaniem soli do odśnieżania dróg [2]. Przyczyny zasolenia gleb można podzielić na naturalne (oddziaływanie wód słonych w pasie przymorskim, migracja jonów w wodach sąsiadujących z naturalnymi pokładami soli) oraz antropogeniczne (przemysł wydobywczy, emisje pyłów zawierających sól i potas, stosowanie nawozów sztucznych). Zasolenie gleby wpływa negatywnie na wzrost i rozwój roślin oraz wydajność fotosyntezy i jest przyczyną tak zwanej suszy fizjologicznej. Jest to także jeden z czynników abiotycznych obniżających wydajność rolnictwa. Ze względu na zwiększone zapotrzebowanie na żywność oraz wzrastające zasolenie upraw znacznie wzrosła liczba badań dotyczących odpowiedzi roślin na zasolenie gleby [3]. Bakterie stanowią podstawową masę mikroorganizmów glebowych. Środowiskiem szczególnie sprzyjającym rozwojowi bakterii są korzenie roślin i inne ich podziemne części. Liczebność bakterii w jednym gramie gleby waha się od kilku milionów do kilku miliardów komórek, przy czym najwięcej bakterii znajduje się w warstwie gleby uprawnej do głębokości około 30 cm [4].

Bakterie ryzosferowe stymulujące wzrost roślin (PGPR – plant-growth promoting rhizobacteria) charakteryzują się zdolnością do intensywnego tempa wzrostu, metabolizowania wielu związków oraz adaptacji do zróżnicowanych warunków panujących w środowisku [5], w tym do zanieczyszczenia wynikającego z zasolenia. Bakterie te stymulują wzrost roślin w sposób bezpośredni lub pośredni. Pierwszy z nich polega na produkcji fitohormonów stymulujących wzrost (auksyny, cytokiny i gibereliny), obniżaniu poziomu etylenu i intensyfikacji pobierania związków mineralnych poprzez zwiększenie powierzchni korzeni lub indukowanie systemów pobierania jonów. Pośrednia stymulacja wzrostu roślin opiera się na biologicznym zwalczaniu patogenów oraz indukowaniu odporności systemicznej.

Bakterie obecne w ryzosferze roślin (PGPR) pełnią ochronną rolę przed działaniem wielu czynników abiotycznych i biotycznych powodujących stres [6, 7]. Wybrane do badań szczepy tych bakterii stymulują wzrost roślin w warunkach naturalnych, a także w glebach zanieczyszczonych jonami pierwiastków śladowych oraz są zdolne do wzrostu na tworzywach polimerowych [8, 9].

Liofilizacja jest procesem składającym się z trzech etapów – zamrażania, sublimacji i desorpcji, przebiegającym w niskiej temperaturze, dzięki czemu właściwości chemiczne związków podlegają tylko niewielkim zmianom [10, 11]. Jest ona często wykorzystywana do konserwacji i przechowywania materiałów biologicznych [12], jednak wiąże się z niebezpieczeństwem denaturacji wrażliwych białek, co prowadzi do obniżenia przeżywalności lub aktywności komórek [13]. Uszkodzenia układów biologicznych wynikają ze zmian w fizycznym stanie lipidów błonowych oraz zmian w strukturze białek [14]. Proces ten znajduje zastosowanie przy wytwarzaniu antybiotyków, probiotyków i szczepionek, np. przeciwko grypie [15]. Liofilizacja bakterii mlekowych zapewnia wykorzystanie funkcjonalnych kultur bakteryjnych na skalę przemysłową [10]. Dotychczas, przede wszystkim w rolnictwie ekologicznym i integrowanym, wykorzystywane są biopreparaty zawierające bakterie symbiotyczne roślin motylkowatych i bakterie podnoszące plonowanie roślin [16–18]. Poznanie procesu liofilizacji bakterii ryzosferowych daje szansę na ich wykorzystanie na szeroką skalę w fitodesalinizacji środowiska.

Celem badań była ocena wzrostu bakterii w obecności chlorku sodu i selekcja szczepów bakterii ryzosferowych stymulujących wzrost i rozwój rzepaku w warunkach podwyższonego zasolenia. Ponadto, w celu potencjalnego wykorzystania bakterii w roli biopreparatów wspomagających wzrost roślin w glebach zasolonych, dokonano oceny, czy i w jakim stopniu proces liofilizacji oraz temperatura i czas przechowywania liofilizatów wpływają na przeżywalność komórek bakterii ryzosferowych.

Materiały i metody

Materiał badawczy stanowiły szczepy bakterii *Bacillus* sp., *Bacteroidetes bacterium*, *Massilia* sp., *Pseudomonas fluorescens* oraz *Variovorax* sp. Wybrane do badań szczepy wyizolowano z terenów zdegradowanych antropogenicznie. Charakteryzują się one wysoką aktywnością enzymów hydrolitycznych, takich jak proteazy, lipazy, amylazy, celulazy [19]. Szczepy bakterii przechowywano na

Dr hab. G. Dąbrowska, mgr E. Zdziechowska: Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Zakład Genetyki, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
browsk@umk.pl

Dr hab. K. Hrynkiewicz: Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Zakład Mikrobiologii, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
hrynk@umk.pl

skosach agarowych w temperaturze 4°C. Bakterie hodowano na pożywce stałej R2A (18 g/dm³) w temperaturze 25°C przez 1÷2 doby od momentu zaszczepienia. Wykorzystując poszczególne szczepy przygotowano inokulum o zawartości bakterii 5·10⁷ jtk/cm³, które użyto w celu sprawdzenia wzrostu szczepów bakteryjnych w roztworze NaCl oraz do zaszczepienia nasion rzepaku. Wrażliwość szczepów bakteryjnych na zasolenie przeprowadzono w eksperymencie, w którym do sterylnych probówek dodawano po 10 µl inokulum bakteryjnego i 5 cm³ płynnej pożywki R2A (Difco) oraz roztwór NaCl do uzyskania stężenia końcowego wynoszącego odpowiednio 50 mM, 100 mM, 150 mM i 200 mM. Następnie próbki wymieszano w temperaturze 25°C i inkubowano przez 2 d. Kontrolę stanowiły próbki niezawierające NaCl w podłożu. Wszystkie analizowane warianty doświadczeń wykonano w trzech powtórzeniach. Gęstość hodowli sprawdzano spektrofotometrycznie (SmartSpec Plus, BioRad) mierząc gęstość optyczną suspensji bakterii przy długości fali 600 nm.

W kolejnym etapie zbadano wpływ bakterii na wzrost i rozwój rzepaku (*Brassica napus* L.). Sterylne nasiona (30 sztuk) wykładano na bibułę umieszczoną w szalkach Petriego. Przed wyłożeniem nasion bibułę nasączano zawiesiną bakteryjną lub wodą (kontrola) w ilości 6 cm³ z dodatkiem NaCl (100 mM i 200 mM). Tak przygotowany materiał roślinny inkubowano w temperaturze 25°C w ciemności przez 6 d, a następnie wykonano pomiary długości korzeni i hypokotyli siewek rzepaku. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach.

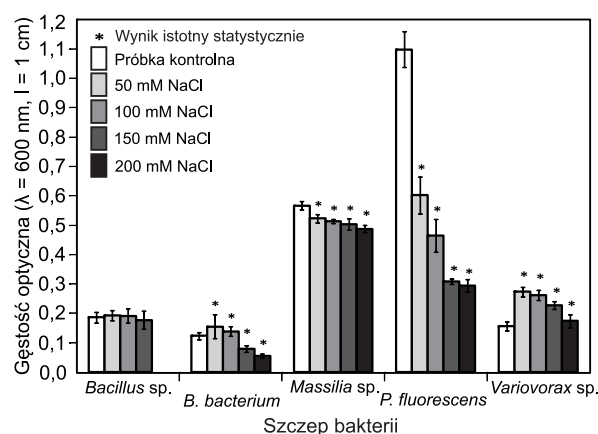
W celu przygotowania liofilizatów szczepy bakterii przechowywane na podłożu stałym R2A (Difco) w temperaturze 4°C użyto do założenia hodowli płynnych w pożywce R2A (0,05% wyciąg drożdżowy, 0,05% pepton, 0,05% hydrolizat kazeiny, 0,05% glukoza, 0,03% K₂HPO₄, 0,03% NaCl, 0,005% MgSO₄), które umieszczono w wytrząsarce i inkubowano przez 48 h w temperaturze 25°C. Zawiesiny bakteryjne doprowadzone do gęstości optycznej równej 0,5 przeniesiono po 2 cm³ do probówek i wirowano przez minutę z prędkością 12 tys. obr./min. Następnie ciecz nadosadową usunięto, a próbki z osadem bakteryjnym poddano liofilizacji w urządzeniu Speed Vac SC110 (Savant). Otrzymane liofilizaty, po 4 próbki z każdym szczepem, przechowywano w temperaturze wynoszącej 4°C, 24°C i 30°C. Kolejno, po jednym, dwóch, trzech oraz czterech miesiącach przechowywania liofilizatów, przygotowano szereg rozcieńczeń 10⁻¹÷10⁻⁷ i wykonano posiewy na płytkach z podłożem R2A (Difco). Kolonie bakterii policzono po sześciu dobach od posiewu na płytkach, a wyniki podano w jtk/cm³. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach.

Do analizy otrzymanych wyników wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i test t-Studenta (p≤0,05).

Wyniki badań

Wzrost bakterii w obecności NaCl

Szczep *Bacillus* sp. wykazał podobny poziom wzrostu, niezależnie od zawartości NaCl w pożywce (rys. 1). Zarówno w warunkach kontrolnych (bez NaCl), jak i przy różnych stężeniach soli, wartości gęstości optycznej powodujące wzrost bakterii tego szczepu były bardzo zbliżone. W przypadku *B. bacterium*, zawartości NaCl wynoszące 50 mM i 100 mM spowodowały statystycznie istotną



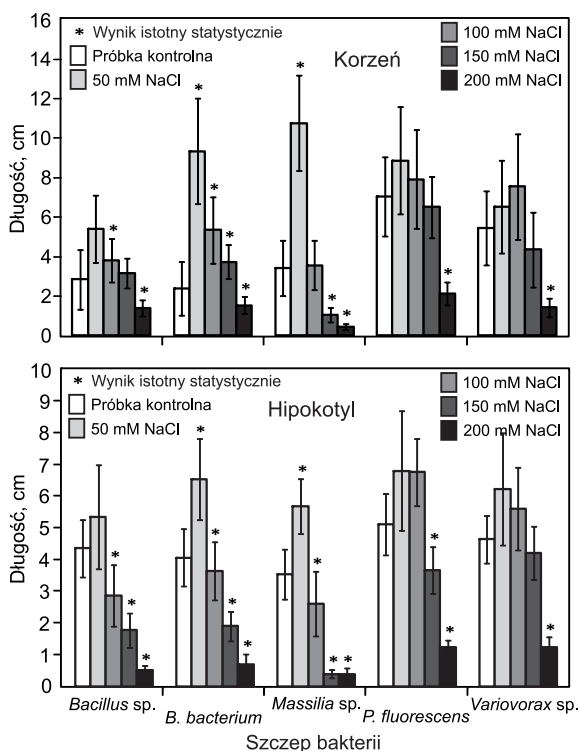
Rys. 1. Wzrost (gęstość optyczna: $\lambda=600$ nm, $l=1$ cm) bakterii *Bacillus* sp., *B. bacterium*, *Massilia* sp., *P. fluorescens* i *Variovorax* sp. w obecności chlorku sodu (50÷200 mM)
Fig. 1. Growth (OD: $\lambda=600$ nm, $l=1$ cm) of *Bacillus* sp., *B. bacterium*, *Massilia* sp., *P. fluorescens* and *Variovorax* sp. in the presence of sodium chloride (50–200 mM)

stymulację wzrostu bakterii, lecz większa zawartość NaCl znacząco hamowała wzrost tego szczepu. W podłożu zawierającym 150 mM NaCl zanotowano 1,5-krotnie, a w przypadku 200 mM NaCl prawie 2-krotnie słabszy wzrost tego szczepu niż w hodowli kontrolnej. Wzrost *Massilia* sp. w obecności NaCl był hamowany niezależnie od stężenia tego związku w podłożu. Dużą wrażliwością na obecność soli charakteryzował się również *P. fluorescens*. Nawet najmniejsze stężenie NaCl ograniczało wzrost bakterii niemal 2-krotnie, w obecności 50 mM NaCl był on prawie 2-krotnie mniejszy, przy 100 mM – 2,3-krotnie, przy 150 mM – 3,5-krotnie, a przy 200 mM prawie 4-krotnie mniejszy. *Variovorax* sp. był jedynym szczepem bakteryjnym, w przypadku którego obserwowano stymulację wzrostu w obecności soli (przy wszystkich analizowanych stężeniach). W porównaniu do próbki kontrolnej, w obecności 50 mM NaCl zaobserwowano niemal 2-krotnie, natomiast przy 100 mM i 150 mM około 1,5-krotnie intensywniejszy wzrost bakterii.

Wpływ stężenia NaCl i szczepienia bakteriami ryzosferowymi na wzrost siewek rzepaku

Szczepy *P. fluorescens* i *Variovorax* sp. w największym stopniu stymulowały wzrost korzeni rzepaku w środowisku kontrolnym (bez NaCl). W przypadku wszystkich badanych bakterii ryzosferowych w obecności 50 mM i 100 mM NaCl (z wyjątkiem *Massilia* sp. i *P. fluorescens*) zaobserwowano statystycznie istotny wzrost długości korzeni w porównaniu z próbką kontrolną. W obecności 150 mM NaCl stymulujący wpływ bakterii na wzrost roślin zanotowano jedynie w przypadku *B. bacterium*. Obecność chlorku sodu w stężeniu 200 mM hamowała wzrost korzeni (w przypadku *Bacillus* sp. 2-krotnie, *P. fluorescens* – 3-krotnie, *Variovorax* sp. – 4-krotnie i *Massilia* sp. – 7-krotnie w porównaniu z próbką kontrolną) (rys. 2).

W przypadku inokulacji nasion *B. napus* zaobserwowano stymulację wzrostu hypokotyli w obecności 50 mM NaCl. Szczepy *Bacillus* sp., *P. fluorescens* i *Variovorax* sp. pełniły ochronną rolę w warunkach wzrostu hypokotyli w podłożu zawierającym 100 mM NaCl. Po dodaniu 150 mM NaCl, a także 200 mM NaCl, obserwowano znaczne zahamowanie wzrostu hypokotyli, co sugeruje, że bakterie nie były zdolne do przełamania stresu spowodowanego większą zawartością soli w podłożu (rys. 2).



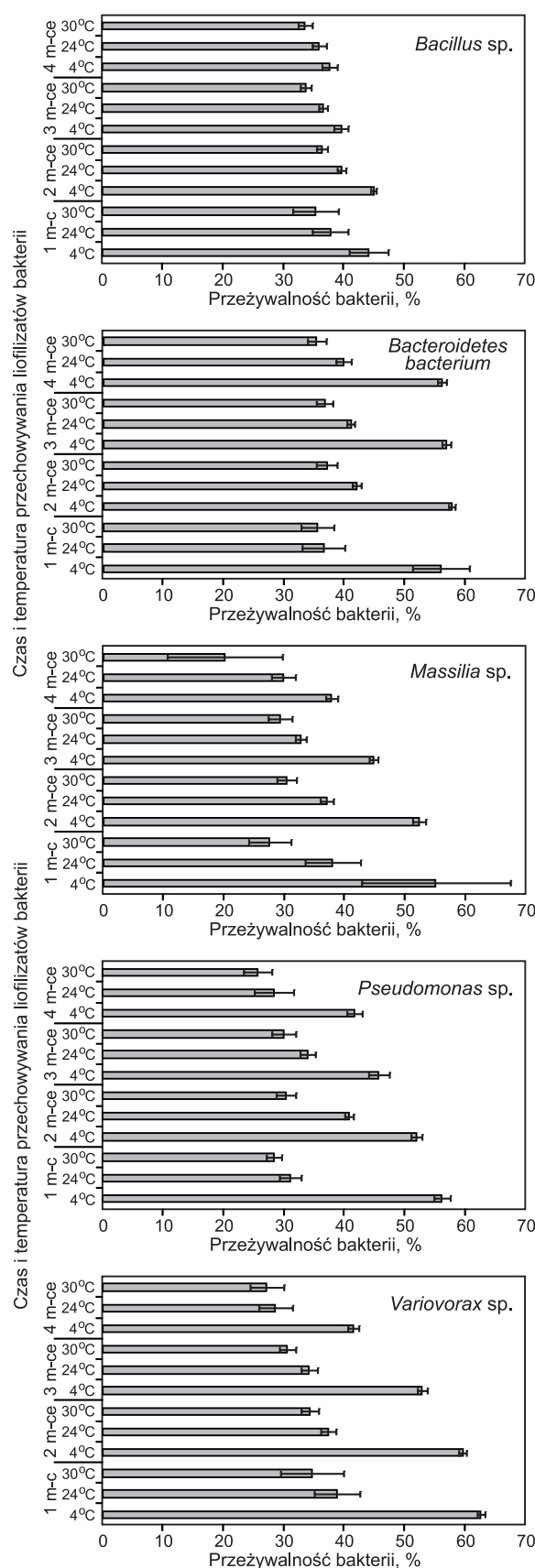
Rys. 2. Długość korzenia i hipokotyła 6-dniowych siewek rzepaku inokulowanych szczepami *Bacillus* sp., *B. bacterium*, *Massilia* sp., *P. fluorescens* i *Variovorax* sp.

Fig. 2. Length of roots and hypocotyls of six-day rape seedlings inoculated with *Bacillus* sp., *B. bacterium*, *Massilia* sp., *P. fluorescens* and *Variovorax* sp.

Przeżywalność bakterii ryzosferowych w liofilizatach

Proces liofilizacji obniżał przeżywalność wszystkich szczepów bakteryjnych użytych w badaniach. Zdolność do podejmowania wzrostu na podłożu stałym R2A przez bakterie ryzosferowe była różna i zależała od szczepu. Wzrost zliofilizowanych komórek bakteryjnych obserwowano po pierwszej i drugiej dobie od wysiania – szczep *B. bacterium*, po trzeciej i czwartej dobie wzrostu – szczep *Bacillus* sp., a kolonie szczepów *Massilia* sp., *P. fluorescens* i *Variovorax* sp. podejmowały wzrost po piątej i szóstej dobie od wysiania. Tempo wzrostu bakterii na podłożu po liofilizacji można uszeregować w kolejności: *B. bacterium* > *Bacillus* sp. > *Massilia* sp. = *P. fluorescens* = *Variovorax* sp.

Po pierwszym miesiącu przechowywania liofilizatów w temperaturze 4°C największą przeżywalność komórek bakterii stwierdzono w przypadku *Variovorax* sp. (63%), a najmniejszą – *Bacillus* sp. (38%). Szczepy *B. bacterium*, *Massilia* sp. i *P. fluorescens* wykazywały porównywalną przeżywalność (55–56%). W drugim i trzecim miesiącu zanotowano nieznaczny spadek przeżywalności większości badanych szczepów. Czas i temperatura przechowywania liofilizatów wpływały na ograniczenie przeżywalności bakterii, z wyjątkiem szczepu *Bacillus* sp. który wykazywał małą wrażliwość na te czynniki. Największą przeżywalność szczepów bakteryjnych zaobserwowano podczas przechowywania liofilizatów w temperaturze 4°C, a znacznie mniejszą w temperaturze około 20°C. Najniższą przeżywalność bakterii glebowych stwierdzono po cztero-miesięcznym przechowywaniu zliofilizowanych bakterii w temperaturze 30°C (rys. 3).



Rys. 3. Wpływ temperatury (4°C, 24°C i 30°C) i czasu przechowywania liofilizatów (1–4 miesiące) bakterii *Bacillus* sp., *B. bacterium*, *Massilia* sp., *P. fluorescens* i *Variovorax* sp. na ich przeżywalność (%)

Fig. 3. Effect of temperature (4°C, 24°C and 30°C) and storage time (1–4 months) on the survival (%) of freeze-dried bacteria *Bacillus* sp., *B. bacterium*, *Massilia* sp., *P. fluorescens* and *Variovorax* sp.

Dyskusja wyników

Obecność bakterii ryzosferowych w glebie może oddziaływać korzystnie lub niekorzystnie na rośliny – jest to uzależnione od gatunku czy odmiany rośliny [21]. Jednak zdecydowanie więcej doniesień naukowych dotyczy pozytywnego wpływu tej grupy drobnoustrojów na rośliny. W literaturze znajdujemy liczne prace badawcze, których przedmiotem była tolerancja roślin i bakterii na zasolenie. Podobnie jak rzepak, należący do glikofitów, a także wiele gatunków roślin, zwłaszcza uprawnych, wykazuje niewielką odporność na zasolenie gleby [1]. Bakterie ryzosferowe odgrywają istotną rolę w podnoszeniu wydajności plonowania roślin rosnących w niekorzystnych warunkach wzrostu i rozwoju.

Najwięcej bakterii promujących wzrost roślin można znaleźć wśród gatunków *Pseudomonas* i *Bacillus* [22]. Autorzy pracy [23] wykazali, że szczepy *Acinetobacter calcoaceticus*, *Burkholderia cepacia* i *Promicromonospora* sp. wpływały na poprawę wzrostu roślin ogórka w warunkach stresowych w obecności chlorku sodu i glikolu polietylenowego indukujących zasolenie i stres suszy. Podobny efekt podwyższonej tolerancji na stres i wzrost pobierania mikroelementów zaobserwowano w badaniach prowadzonych na bazylii *Ocimum basilicum* L., inokulowanej szczepami *Bacillus* sp., *Cronobacter dublinensis* i *Pseudomonas monteilii* [24]. W omawianych badaniach własnych szczepy *P. fluorescens* i *Variovorax* sp. najlepiej stymulowały wzrost organów siewek rzepaku w obecności 50 mM i 100 mM NaCl, natomiast *Bacillus* sp. i *B. bacterium* pełniły ochronną rolę w podłożu zawierającym 150 mM NaCl. Podobnie jak w omawianych badaniach własnych, również autorzy pracy [25] wykazali, że bakterie *Pseudomonas* wpływają na promowanie wzrostu roślin i pełnią ochronną rolę przed patogenami. Z kolei w pracy [26] wykazano, że takie gatunki PGPR, jak *Azospirillum* sp. i *Pseudomonas* sp. wpływały na wzrost biomasy roślin rzepaku poprzez regulowanie poziomu enzymów stresu oksydacyjnego i składników odżywczych w warunkach stresu solnego. Obecność bakterii *B. cepacia*, *Promicromonospora* sp. i *A. calcoaceticus* wpływała na stymulację wzrostu pędów, które były dłuższe odpowiednio o 28,5%, 26,1% i 26,9% w porównaniu do roślin kontrolnych. W warunkach stresu solnego wzrost pędów był natomiast większy odpowiednio o 21,3%, 20,3% i 18,7% w porównaniu do próbki kontrolnej. W innych badaniach wykazano, że inokulacja korzeni rzepaku bakteriami *P. fluorescens* zwiększa tolerancję na stres solny poprzez zmianę poziomu białek związanych z metabolizmem energetycznym i podziałami komórkowymi [27].

Liofilizacja jest powszechnie wykorzystywaną metodą przechowywania mikroorganizmów. Dużą przeżywalność po przeprowadzeniu tego procesu oraz długoterminowym przechowywaniu liofilizatów zaobserwowano u wielu rodzajów bakterii, drożdży i grzybów. Żywotność takich szczepów może utrzymać się nawet ponad dwadzieścia lat, jednak – aby było to możliwe – niezbędne jest uzyskanie odpowiedniej liczebności bakterii przed liofilizacją, która powinna wynosić 10^6 – 10^{10} komórek w 1 cm^3 [28]. Do warunków krytycznych należą ponadto temperatura, czas przechowywania liofilizatów, wilgotność otoczenia, ekspozycja liofilizatów na działanie światła oraz rozmiar komórek bakteryjnych. Im temperatura jest wyższa, a czas przetrzymywania dłuższy, tym stabilność liofilizowanego materiału jest mniejsza [29]. Przykładowo, niewielkich rozmiarów enterokoki są bardziej odporne na zamrażanie i liofilizację niż laseczki *Lactobacillus*. Zatem im większa jest

powierzchnia komórek, tym większe są uszkodzenia błon spowodowane formowaniem się zewnątrzkomórkowych kryształów lodu podczas zamrażania. Ponadto w porównywalnych warunkach suszenia i przechowywania w formie liofilizatów różne szczepy tego samego gatunku bakterii mogą charakteryzować się zróżnicowaną przeżywalnością. Prawdopodobnie wynika to z różnic w budowie genetycznej lub w składzie ściany i błony komórkowej, które mogą prowadzić do otrzymania różnych fenotypów poszczególnych szczepów [30]. Podczas liofilizacji oraz przechowywania liofilizatów dochodzi do zmian w strukturze błony i ściany komórkowej. U *Lactobacillus bulgaricus* zaobserwowano, że wraz z upływem czasu przetrzymywania zliofilizowanych bakterii w temperaturze 20°C zmniejszała się zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych [10]. W przeprowadzonych badaniach liofilizacja drastycznie zmniejszyła przeżywalność wszystkich szczepów bakteryjnych. Ponadto żywotność bakterii malała wraz z upływem czasu oraz wzrostem temperatury przechowywania liofilizatów. W przeprowadzonym eksperymencie najsilniejsze zmniejszenie żywotności bakterii po miesiącu przechowywania w temperaturze 4°C zaobserwowano u *Bacillus* sp. i *P. fluorescens*.

Warunki przetrzymywania liofilizatów odgrywały istotną rolę w przypadku wszystkich badanych szczepów, natomiast szczególnie wrażliwe na temperaturę 30°C okazały się szczepy *P. fluorescens* i *Massilia* sp. W doświadczeniu opisanym w pracy [28] procesowi liofilizacji poddano bakterie Gram-dodatnie *Brevibacterium flavum*, *B. lactofermentum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *C. glutamicum* i *Streptococcus mutans* oraz Gram-ujemne *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas putida* i *Alcaligenes faecalis*. Bezpośrednio po przeprowadzeniu liofilizacji przeżywalność wszystkich bakterii Gram-dodatnich wyniosła około 80%, a później zależała od rodzaju bakterii i czasu ich przechowywania. Podobny poziom przeżywalności utrzymał się po dziesięciu latach przetrzymywania w temperaturze 5°C liofilizatów należących do *Brevibacterium* oraz *Corynebacterium*. Żywotność *S. mutans* malała natomiast wraz z upływem czasu przetrzymywania. Żywotność bakterii Gram-ujemnych po liofilizacji wynosiła około 50%. Początkowy poziom przeżywalności *E. coli* wynosił około 47%, a po dziesięciu latach – 11%. Przeżywalność *S. marcescens* zmniejszyła się odpowiednio z około 57% do około 5%, zaś *P. putida* z około 35% do 2%. W przypadku *A. faecalis* przeżywalność wynosiła 45%, po sześciu latach około 7%, zaś po dziesięciu – 4%. Przeżywalność bakterii Gram-dodatnich bezpośrednio po liofilizacji była znacznie większa niż bakterii Gram-ujemnych. Sugeruje się, że są one bardziej odporne na proces liofilizacji niż bakterie Gram-ujemne, co może być wynikiem różnic w budowie powierzchni komórek [28]. W badaniach własnych nie zaobserwowano takiej zależności. Gram-dodatnia bakteria *Bacillus* sp. po liofilizacji miała mniejszą żywotność niż bakteria Gram-ujemna *B. bacterium*, co mogło wynikać z braku obecności substancji chroniących komórki bakteryjne, takich jak mleko odtuszczone czy glutaminian sodu, które stabilizują błony komórkowe. Mniejszą przeżywalność mikroorganizmów po liofilizacji oraz na skutek długoterminowego przechowywania zaobserwowali również autorzy pracy [30]. Przeżywalność bakterii *Pseudomonas chlororaphis* przetrzymywanych po liofilizacji w temperaturze 8°C wyniosła 24%, po pięćdziesięciu dobach przechowywania w tej samej temperaturze zmalała do 6%, zaś po dwustu dobach wynosiła już jedynie 2%.

Podsumowanie

Zasolenie gleb jest nieuniknioną konsekwencją nadmiernego stosowania nawozów mineralnych w uprawach roślin użytkowych. Problemem jest też zagospodarowanie terenów naturalnie nadmiernie zasolonych. Analizowane szczepy bakteryjne, zwłaszcza *Bacillus* sp. i *Variovorax* sp. wykazywały zdolność do wzrostu w podłożu zawierającym znaczne stężenia chlorku sodu. Dodatkowo bakterie te promowały wzrost i rozwój siewek rzepaku w warunkach stresu solnego. Wydaje się, że wykorzystanie szczepów bakterii zdolnych do wzrostu w glebach zasolonych, a jednocześnie stymulujących wzrost roślin w takich warunkach, stwarza możliwości ich zastosowania do skutecznej ochrony roślin przed nadmiernym zasoleniem w glebach uprawnych oraz w inżynierii środowiska. Liofilizacja, jako metoda utrwalania materiałów biologicznych, wymaga optymalizacji na poszczególnych jej etapach. Skuteczność tego procesu zależy między innymi od gatunku i szczepu mikroorganizmów, rozmiaru liofilizowanych komórek, temperatury inkubacji, składu podłoża wzrostu, stosowania substancji ochronnych, szybkości zamrażania oraz czasu i temperatury przechowywania. Liczne badania wskazują na zmniejszenie przeżywalności zliofilizowanych bakterii i spadek żywotności mikroorganizmów wraz z upływem czasu oraz wzrostem temperatury przechowywania, co potwierdziły również niniejsze badania. Przeprowadzony eksperyment umożliwił porównanie przeżywalności wybranych szczepów bakteryjnych, które potencjalnie mogą stanowić składniki biopreparatów stosowanych do usuwania z gleb zanieczyszczeń spowodowanych nadmiernym zasoleniem.

Kolejnym krokiem w badaniach będzie zastosowanie substancji o charakterze osmoprotektantów, w celu zwiększenia wydajności przeżywalności komórek bakteryjnych i ich stabilności podczas długiego czasu przechowywania, a także zastosowanie liofilizatów – jako inokulum – w eksperymentach polowych.

Praca została sfinansowana ze środków na działalność statutową Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz zrealizowana w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki (DEC-2012/07/B/NZ9/01801).

LITERATURA

1. R. MUNNS: Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 2002, Vol. 25, pp. 239–250.
2. A. KALANDYK, F. DUBERT, M. MACIEJEWSKI, A. PŁAŻEK: Wpływ suszy glebowej i zasolenia na procesy zachodzące w trakcie fazy generatywnej grochu i łubinu. *Episteme* 2012, vol. 15, ss. 121–129.
3. Z. DAJIC: Salt stress. In: K.V. MADHAVA RAO, A.S. RAGHA VENDRA, K. JANARDHAN REDDY [Eds]: *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer, Dordrecht 2006, pp. 41–99.
4. B. KOLWZAN: Możliwości wykorzystania biosurfaktantów w technologiach oczyszczania środowiska gruntowo-wodnego (Possible biosurfactant applications in water and soil remediation processes). *Ochrona Środowiska* 2014, vol. 36, nr 3, ss. 3–18.
5. G. DĄBROWSKA, K. HRYNKIEWICZ, K. JANCZAK, M. ŻURAŃSKA: Zastosowanie zmodyfikowanych bakterii glebowych do poprawy skuteczności fitoremediacji środowiska zanieczyszczonego jonami metali śladowych (Modified soil bacteria and their potential application to improving fitoremediation of trace metal-contaminated environment). *Ochrona Środowiska* 2014, vol. 36, nr 1, ss. 21–26.
6. P.N. BHATTACHARYYA, D.K. JHA: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2012, Vol. 28, No. 4, pp. 1327–1350.
7. G. DĄBROWSKA, E. ZDZIECHOWSKA: Rola bakterii ryzosferowych w stymulacji procesów wzrostu i rozwoju oraz ochronie roślin przed czynnikami środowiska. *Progress in Plant Protection* 2015, vol. 55, nr 4, ss. 498–506.
8. K. JANCZAK, G. DĄBROWSKA, Z. ZNAJWSKA, K. HRYNKIEWICZ: Wpływ szczepienia bakteryjnego na wzrost miska i liczebność bakterii i grzybów w glebie zawierającej polimery. Cz. I. Polimery biodegradowalne. *Przemysł Chemiczny* 2014, vol. 93, nr 12, ss. 2218–2221.
9. K. JANCZAK, G. DĄBROWSKA, Z. ZNAJWSKA, K. HRYNKIEWICZ: Wpływ szczepienia bakteryjnego na wzrost miska i liczebność bakterii i grzybów w glebie zawierającej polimery. Cz. II. Polimery niebiodegradowalne. *Przemysł Chemiczny* 2014a, vol. 93, nr 12, ss. 2218–2221.
10. H.P. CASTRO, P.M. TEIXEIRA, R. KIRBY: Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnology Letters* 1996, Vol. 18, No. 1, pp. 99–104.
11. X. TANG, M.J. PIKAL: Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice. *Pharmaceutical Research* 2004, Vol. 21, No. 2, pp. 191–200.
12. A.S. CARVALHO, J. SILVA, P. HO, P. TEIXEIRA, F.X. MALCATA, P. GIBBS: Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Lait* 2003, Vol. 83, No. 3, pp. 203–210.
13. D. BERNER, H. VIERNSTEIN: Effect of protective agents on the viability of *Lactococcus lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying. *Scientia Pharmaceutica* 2006, Vol. 74, No. 3, pp. 137–149.
14. S.B. LESLIE, E. ISRAELI, B. LIGHTHART, J.H. CROWE, L.M. CROWE: Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology* 1995, Vol. 61, No. 10, pp. 3592–3597.
15. M. JACH, R. ŁOŚ, M. MAJ, A. MALM: Probiotyki – aspekty funkcjonalne i technologiczne. *Postępy Mikrobiologii* 2013, vol. 52, nr 2, ss. 161–170.
16. J.H.G. STEPHENS, H.M. RASK: Inoculant production and formulation. *Field Crops Research* 2000, Vol. 65, No. 2–3, pp. 249–258.
17. J.K. VESSEY: Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 2003, Vol. 255, No. 2, pp. 571–586.
18. S. MARTYNIUK: Skuteczne i nieskuteczne preparaty mikrobiologiczne stosowane w ochronie i uprawie roślin oraz rzetelne i nierzetelne metody ich oceny. *Postępy Mikrobiologii* 2011, vol. 50, nr 4, ss. 321–328.
19. K. HRYNKIEWICZ, C. BAUM, P. LEINWEBER: Density, metabolic activity, and identity of cultivable rhizosphere bacteria on *Salix viminalis* in disturbed arable and landfill soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 2010, Vol. 173, No. 5, pp. 747–756.
20. Ø. HAMMER, D.A.T. HARPER, P.D. RYAN: PAST: Paleontological Statistic software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 2001, Vol. 4, pp. 1–9.
21. G. DĄBROWSKA, K. HRYNKIEWICZ, A. MIEREK-ADAMSKA, A. GOC: Wrażliwość odmian jarych i ozimych rzepaku na metale ciężkie i bakterie glebowe. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops* 2012, vol. 33, nr 2, ss. 201–220.
22. R. ORTÍZ-CASTRO, H.A. CONTRERAS-CORNEJO, L. MACÍAS-RODRÍGUEZ, J. LÓPEZ-BUCIO: The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling and Behaviour* 2009, Vol. 4, No. 8, pp. 701–712.
23. S.-M. KANG, A.L. KHAN, M. WAQAS, Y.-H. YOU, J.-H. KIM, J.-G. KIM, M. HAMAYUN, I.-J. LEE: Plant growth promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis dativus*. *Journal of Plant Interactions* 2014, Vol. 9, No. 1, pp. 673–682.

24. S. RAKSHAPAL, K. S. SUMIT, P. P. RAJENDRA, K. ALOK: Technology for improving essential oil yield of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by application of bioinoculant colonized seeds under organic field conditions. *Indian of Crop Production* 2013, Vol. 45, pp. 335–342.
25. D. HAAS, G. DÉFAGO: Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. *Nature Reviews Microbiology* 2005, Vol. 3, No. 4, pp. 307–19.
26. B. NOORIEH, M. H. ARZANESH, G. MAHLEGHA, S. MARYAM: The effect of plant growth promoting rhizobacteria on growth parameters, antioxidant enzymes and microelements of canola under salt stress. *Journal of Applied Environmental and Biological Science* 2013, Vol. 3, pp. 17–27.
27. F. BANAEI-ASL, A. BANDEHAGH, E. D. ULIAEI, D. FARAJZADEH, K. SAKATA, G. MUSTAFA, S. KOMATSU: Proteomic analysis of canola root inoculated with bacteria under salt stress. *Journal of Proteomics* 2015, Vol. 124, No. 21, pp. 88–111.
28. Y. MIYAMOTO-SHINOHARA, T. IMAIZUMI, J. SUKENOBE, Y. MURAKAMI, S. KAWAMURA, Y. KOMATSU: Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology* 2000, Vol. 41, No. 3, pp. 251–255.
29. A. S. CARVALHO, J. SILVA, P. HO, P. TEIXEIRA, F. X. MALCATA, P. GIBBS: Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 2004, Vol. 14, No. 10, pp. 835–847.
30. J. PALMFELDT, P. RÅDSTRÖM, B. HAHN-HÄGERDAL: Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology* 2003, Vol. 47, No. 1, pp. 21–29.

Dabrowska, G., Zdziechowska, E., Hryniewicz, K. Evaluation of Potential Suitability of Rhizobacteria for Phytodesalination of Soils. *Ochrona Srodowiska* 2016, Vol. 38, No. 3, pp. 9–14.

Abstract: The role and significance of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in soil degradation due to salinization was discussed. Soil pollution, leading to the so-called salt stress, may be caused by excessive use of mineral fertilizers and plant protection products. The study demonstrated the potential of *Bacillus* sp. and *Variovorax* sp. to enhance the rape-seed growth in the saline environment. Impact of lyophilization process, its time and the temperature of bacterial lyophilization storage on survival of the six strains: *Bacillus* sp., *Bacteroidetes*

bacterium, *Massilia* sp., *Pseudomonas fluorescens* and *Variovorax* sp. was examined. It was demonstrated that both lyophilization and an increase in temperature as well as lyophilization storage time significantly reduced viability of rhizospheric microorganisms. Further, the survival rate of plant growth stimulating bacteria in lyophilisates depended on the bacterial strain. All the lyophilized microorganisms exhibited the best survival rate following storage at 4 °C. The freeze-dried soil bacteria can potentially be used as components of bioproducts in order to assist plant growth in excessively saline soils.

Keywords: Soil pollution, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), lyophilization, bioproduct, bacterial survival, salinity.