

JANUSZ CZABAN

**SAPROTROFICZNA MIKROFLORA
RYZOSFERY PSZENICY OZIMEJ**

**PRACA DOKTORSKA WYKONANA
W ZAKŁADZIE MIKROBIOLOGII ROLNICZEJ
INSTYTUTU UPRAWY, NAWOŻENIA
I GLEBOZNAWSTWA
W PUŁAWACH
POD KIERUNKIEM PROF. DR HAB. JÓZEFA KOBUSA**

PUŁAWY 2001

Składam serdeczne podziękowania
Panu Prof. dr hab. Józefowi Kobusowi
za inspirację, opiekę i cenne uwagi,
które pozwoliły na wykonanie
i napisanie tej pracy

a także
Panu Prof. dr hab. Stefanowi Martyniukowi,
Kierownikowi Zakładu Mikrobiologii Rolniczej
i wszystkim Koleżankom i Kolegom,
a zwłaszcza

Pani mgr Danucie Masiak,
Pani mgr Stefanii Ziębie,
Pani dr Annie Gajdzie,
Panu dr Wojciechowi Paszkowskiemu
Panu dr Andrzejowi Księżniakowi
I panu mgr Andrzejowi Perzyńskiemu
za okazaną pomoc w badaniach

SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE	9
2. PRZEGLĄD LITERATURY	10
2.1. Ryzosfera	10
2.2. Substancje organiczne przedostające się z korzeni do gleby podczas wzrostu roślin	10
2.3. Efekt ryzosferowy	13
2.4. Mikroorganizmy ryzosferowe	13
2.5. Oddziaływanie drobnoustrojów ryzosferowych na rośliny	17
2.5.1. Oddziaływanie za pośrednictwem regulatorów wzrostu roślin	19
2.5.2. Udostępnianie roślinom pierwiastków biogennych	20
2.5.3. Drobnoustroje ryzosferowe niekorzystnie oddziałujące na wzrost roślin (DRMO lub DRB)	22
2.5.4. Wpływ na inne mikroorganizmy - pożyteczne lub szkodliwe dla roślin	23
2.5.4.1. Stymulacja rozwoju mikroorganizmów symbiotycznych	23
2.5.4.2. Oddziaływanie PGPR na organizmy szkodliwe (patogeny i DRMO)	25
2.5.4.2.1. Oddziaływanie za pomocą antybiotyków	25
2.5.4.2.2. Biosynteza sideroforów	26
2.5.4.2.3. Synteza enzymów litycznych	27
2.5.4.2.4. Konkurencja o pokarm i przestrzeń	28
2.5.4.2.5. Indukcja odporności roślin	30
2.5.4.2.6. Mieszanki mikroorganizmów	31
2.6. Poprawa struktury gleby	31
2.7. Kolonizacja korzeni roślin przez mikroorganizmy i ich przeżywalność w środowisku glebowym	32
2.8. Wykorzystanie pożytecznej mikroflory ryzosferowej w praktyce (komercyjne produkty biologiczne)	35
2.9. Strategie zwiększania efektywności PGPR i spojrzenie na przyszłość	37
3. CELE PRACY	40
4. METODYKA BADAŃ	41
4.1. Gleba i materiał roślinny	41

4.2. Terminy pobierania próbek korzeni pszenicy ozimej	41
4.3. Przygotowanie korzeni roślin do analizy mikrobiologicznej	41
4.4. Analizy mikrobiologiczne zespołów drobnoustrojów ryzosferowych i izolacja szczepów	43
4.4.1. Identyfikacja wyizolowanych szczepów grzybów	44
4.4.2. Identyfikacja wyizolowanych szczepów bakterii	44
4.5. Badania (<i>in vitro</i>) zdolności wyizolowanych szczepów bakterii do hamowania wzrostu grzybowych patogenów pszenicy i do przemian niektórych związków C, P i S	46
4.5.1. Aktywność antagonistyczna bakterii	46
4.5.2. Zdolność do rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	46
4.5.3. Uwalnianie fosforu z kwasów nukleinowych i oznaczanie aktywności fosfataz	47
4.5.4. Mineralizacja (utlenianie do siarczanów) siarki organicznej	47
4.5.5. Aktywność chitynolityczna	47
4.5.6. Aktywność celulolityczna	47
4.5.7. Synteza związków kompleksujących Fe^{+3}	48
4.5.8. Synteza HCN	48
4.6. Metody zakładania i prowadzenia doświadczeń wegetacyjnych określających wpływ bakterii <i>Bacillus mycoides</i> na wzrost pszenicy ozimej	49
4.6.1. Doświadczenia laboratoryjne, fitotronowe i szklarniowe	49
4.6.1.1. Ogólny opis doświadczeń laboratoryjnych, fitotronowych i szklarniowych	49
4.6.1.1.1. Zakładanie i przebieg doświadczeń wazonowych	49
4.6.1.1.2. Przygotowanie zawiesiny bakterii	50
4.6.1.1.3. Przygotowanie nasion do doświadczeń	50
4.6.1.2. Szczegółowy opis doświadczeń laboratoryjnych, fitotronowych i szklarniowych	50
4.6.1.2.1. Doświadczenie 1a. Wpływ bakterii na wzrost siewek pszenicy ozimej	50
4.6.1.2.2. Doświadczenie 1b. Wpływ bakterii na wzrost pszenicy ozimej w 28-dniowym doświadczeniu doniczkowym na sterylnym piasku	50

4.6.1.2.3. Doświadczenie 2. Wpływ bakterii i <i>Fusarium culmorum</i> na wzrost pszenicy ozimej	51
4.6.1.2.4. Doświadczenie 3. Wpływ żywego i zabitego inokulum <i>Bacillus mycoides</i> szczep JC192 (wprowadzanego na różnych nośnikach) na wzrost pszenicy ozimej (odm. Gama) w 28 dniowym doniczkowym doświadczeniu fitotronowym	51
4.6.1.2.5. Doświadczenie 3a. Wpływ <i>Bacillus mycoides</i> szczep JC192 na wzrost pszenicy ozimej na torfie w 21 dniowym doniczkowym doświadczeniu laboratoryjnym na oświetlonym parapecie okiennym	52
4.6.1.2.6. Doświadczenie 4. Wpływ <i>Bacillus mycoides</i> szczep JC192 na wzrost pszenicy ozimej na różnych glebach w 28 dniowym doniczkowym doświadczeniu fitotronowym	52
4.6.1.2.7. Doświadczenie 5a. Wpływ inokulum <i>Bacillus mycoides</i> JC192 o różnym stężeniu na długość koleoptyli i korzonków różnych odmian pszenicy ozimej	52
4.6.1.2.8. Doświadczenie 5b. Wpływ <i>Bacillus mycoides</i> JC192 na wzrost różnych odmian pszenicy ozimej w 28 dniowym doniczkowym doświadczeniu fitotronowym	52
4.6.1.2.9. Doświadczenie 6. Wpływ bakterii <i>Bacillus mycoides</i> i grzyba <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> (Ggt) na wzrost pszenicy ozimej odmiany Kobra i stopień porażenia roślin przez Ggt w 28-dniowym doświadczeniu szklarniowym na czarnej ziemi deluwialnej	53
4.6.2. Doświadczenia mikro-i minipoletkowe	53
4.6.2.1. Doświadczenia mikropoletkowe	53
4.6.2.2. Doświadczenia minipoletkowe	53
4.7. Przeżywalność bakterii <i>Bacillus</i> i fluoryzujących <i>Pseudomonas</i> w glebie i kolonizacja przez nie ryzosfery pszenicy	54
4.8. Analiza statystyczna wyników	54
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja	56
5.1. Część I. Ogólne liczebności bakterii i grzybów w ryzosferze pszenicy ozimej oraz ich skład jakościowy	56

5.1.1. Liczebność saprotroficznych bakterii i grzybów w różnych strefach ryzosfery pszenicy	56
5.1.1.1. Liczebności bakterii	57
5.1.1.2. Liczebność grzybów	59
5.1.2. Rozmieszczenie bakterii i grzybów w różnych strefach ryzosfery pszenicy ozimej	61
5.1.3. Porównanie zasiedlenia korzeni pszenicy przez bakterie i grzyby	63
5.1.4. Skład jakościowy zespołów grzybowych	64
5.1.5. Skład jakościowy zespołów bakterii saprotroficznych	71
5.1.5.1. Zmiany jakościowe zachodzące w ryzosferze	72
5.1.5.2. Główne grupy bakterii ryzosfery pszenicy ozimej	78
5.1.5.2.1. Fluoryzujące <i>Pseudomonas</i>	78
5.1.5.2.1.1. Skład jakościowy fluoryzujących <i>Pseudomonas</i>	81
5.1.5.2.2. Bakterie z rodzaju <i>Bacillus</i>	81
5.1.5.2.3. Grupa <i>Flavobacterium-Cytophaga</i>	83
5.1.5.2.4. <i>Enterobacteriaceae</i>	83
5.1.6. Znaczenie ruchliwości bakterii do zasiedlenia przez nie powierzchni i wnętrza korzeni	85
5.2. Część II. Aktywność biochemiczna bakterii ryzosferowych	87
5.2.1. Aktywność antybiotyczna ryzobakterii w stosunku do <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> i <i>Fusarium culmorum</i> na pożywkach glukozowo-ziemniaczanej (PDA) i King B	88
5.2.1.1. Hamowanie wzrostu <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> (Ggt.) na pożywce PDA	88
5.2.1.2. Hamowanie wzrostu <i>Fusarium culmorum</i> (Fc.) na pożywce PDA	89
5.2.1.3. Hamowanie wzrostu Ggt. na pożywce King B	90
5.2.1.4. Hamowanie wzrostu Fc. na pożywce King B	90
5.2.2. Biosynteza związków chelatujących Fe ⁺³	95
5.2.3. Biosynteza HCN	97
5.2.4. Przemiany fosforu	99
5.2.4.1. Aktywność fosfataz i mineralizacja fosforanów z kwasów nukleinowych	99
5.2.4.2. Uwalnianie nieorganicznych fosforanów z kwasów nukleinowych	101

5.2.4.3. Rozpuszczanie fosforanu trójwapniowego	102
5.2.5. Mineralizacja siarki organicznej zawartej w cysteinie do nieorganicznych siarczanów	105
5.2.6. Aktywność celulaz	106
5.2.7. Hydroliza chityny	107
5.3. Część III. Wpływ bakterii <i>Bacillus mycoides</i> na wzrost pszenicy ozimej i jej ochronę przed grzybowymi patogenami korzeni	111
5.3.1. Doświadczenia fitotronowe i szklarniowe	111
5.3.1.1. Wpływ szczepów bakterii <i>B. mycoides</i> na wzrost pszenicy ozimej (odm. Gama)	111
5.3.1.1.1. Oddziaływanie bakterii na długość koleoptyli i korzonków siewek pszenicy na płytkach agarowych (Doświadczenie 1a)	111
5.3.1.1.2. Oddziaływanie bakterii <i>Bacillus mycoides</i> na wschody i masę roślin w 28 dniowym doświadczeniu doniczkowym na sterylizowanym piasku (Doświadczenie 1b)	112
5.3.1.1.3. Zależności pomiędzy zmianami (pod wpływem <i>Bacillus mycoides</i>) różnych parametrów wzrostu pszenicy ozimej odmiany Gama w doświadczeniach na płytkach agarowych i doniczkach z piaskiem kwarcowym (Doświadczenia 1a i 1b)	112
5.3.1.2. Wpływ <i>Fusarium culmorum</i> i <i>Bacillus mycoides</i> na wzrost pszenicy ozimej (odm. Gama) w 28-dniowym szklarniowym doświadczeniu wazonowym (Doświadczenie 2)	114
5.3.1.3. Wpływ żywego i zabitego inokulum <i>Bacillus mycoides</i> - szczep JC192 (wprowadzanego na różnych nośnikach) na wzrost pszenicy ozimej (odm. Gama) w doniczkowym doświadczeniu fitotronowym na czarnej ziemi deluwialnej (Doświadczenie 3)	115
5.3.1.3.1. Wpływ żywego inokulum <i>B. mycoides</i> JC192 (w porównaniu do zabitych bakterii) wprowadzonego do torfu na masę pszenicy ozimej (odm. Gama) uprawianej na tym torfie przez 21 dni (Doświadczenie 3a)	116
5.3.1.4. Wpływ <i>Bacillus mycoides</i> szczep JC192 na wzrost pszenicy ozimej (odm. Kobra) na różnych glebach w 28 dniowym doniczkowym doświadczeniu fitotronowym (Doświadczenie 4)	117

5.3.1.5. Wpływ <i>Bacillus mycoides</i> JC192 na wzrost różnych odmian pszenicy ozimej	120
5.3.1.5.1. Wpływ inokulum <i>Bacillus mycoides</i> JC192 o różnym stężeniu na długość koleoptyli i korzonków różnych odmian pszenicy ozimej (Doświadczenie 5a)	120
5.3.1.5.2. Wpływ <i>Bacillus mycoides</i> JC192 na wzrost różnych odmian pszenicy ozimej w 28 dniowym doniczkowym doświadczeniu fitotronowym (Doświadczenie 5b)	120
5.3.1.6. Wpływ bakterii <i>Bacillus mycoides</i> i grzyba <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> (<i>Ggt</i>) na wzrost pszenicy ozimej odmiany Kobra i stopień porażenia roślin przez <i>Ggt</i> w 28-dniowym doświadczeniu szklarniowym na czarnej ziemi deluwialnej (Doświadczenie 6)	122
5.3.2. Doświadczenia poletkowe	125
5.3.2.1. Doświadczenie mikropoletkowe (0,07 m ²) na glebie brunatnej, wytworzonej z piasku gliniastego mocnego, skażonej <i>Fusarium culmorum</i> (Doświadczenie 7)	125
5.3.2.2. Doświadczenie minipoletkowe (1 m ²) na glebie brunatnej, wytworzonej z piasku gliniastego mocnego, naturalnie skażonej <i>Ggt</i> (Doświadczenie 8)	126
5.3.2.3. Doświadczenia minipoletkowe (1,8 m ²) na madzie średniej (Doświadczenia 9)	127
5.4. Część IV. Przeżywalność bakterii w niesterylnej glebie i kolonizacja ryzosfery pszenicy ozimej przez bakterie wprowadzane na jej ziarno	128
5.4.1. Przeżywalność w niesterylnej glebie bakterii <i>Pseudomonas fluorescens</i> i <i>Bacillus mycoides</i>	128
5.4.2. Kolonizacja ryzosfery pszenicy ozimej (odm. Gama) przez bakterie <i>Pseudomonas fluorescens</i> i <i>Bacillus mycoides</i> wprowadzone na ziarno siewne	128
6. WAŻNIEJSZE WYNIKI I WNIOSKI	131
7. LITERATURA	134

1. WPROWADZENIE

Dążenie do ograniczenia kosztownych i szkodliwych dla środowiska i człowieka środków chemicznych w uprawie roślin (rolnictwo ekologiczne i zrównoważone), zwiększa zainteresowanie wykorzystaniem preparatów biologicznych (Glick, 1995; Kuś, 1998; Martyniuk, 1998; Pruszyński, 1998; Singh i Prithiviraj, 1997; Uoti, 1995). Idealnymi czynnikami biologicznymi są mikroorganizmy, które rozwijają się w ryzosferze, ponieważ stanowią one prawdziwą linię frontu w obronie korzeni przed atakami patogenów (Kurek i Jaroszuk, 1997; Weller, 1988) oraz mogą one udostępniać roślinom składniki pokarmowe i oddziaływać na nie poprzez substancje biologicznie aktywne (Bowen i Rovira, 1999; Glick, 1995; Kurek i Kobus, 1990; Pietr, 1990). Z tego powodu badanie populacji drobnoustrojów ryzosferowych ma zarówno znaczenie poznawcze jak i praktyczne. Istnieją bowiem możliwości wykorzystania drobnoustrojów zamieszkujących ryzosferę jako szczepionek. Do tego celu koniecznym jest poznanie ilości, jakości, wzajemnych relacji oraz biochemicznych uzdolnień mikroorganizmów strefy korzeniowej, powierzchni korzenia i jego wnętrza. Prezentowana praca doktorska dotyczy tego rodzaju badań nad ryzosferowymi, saprotroficznymi mikroorganizmami pszenicy ozimej. Pszenica, jako model badawczy, została wybrana z tego powodu, że jest najważniejszym, zarówno pod względem gospodarczym jak i technologicznym, gatunkiem zboża chlebowego i paszowego (Cacak-Pietrzak i in., 1999; Fabijańska i Siedlecki, 1999).

2. PRZEGLĄD LITERATURY

2.1. RYZOSFERA

Ryzosfera jest to miejsce szczególne pod względem możliwości wzajemnego oddziaływania drobnoustrojów i roślin. Termin ryzosfera (wprowadzony przez Hiltnera w 1904r.) pierwotnie określał warstwę gleby bezpośrednio przylegającą do korzeni, w której obserwuje się oddziaływanie roślin na drobnoustroje. Obecnie, szereg autorów dzieli ryzosferę na: (a) ektoryzosferę – tj. obszar gleby w najbliższej okolicy korzeni, do której wnikają wydzieliny korzeniowe (niektórzy autorzy w określeniu tej strefy, pozostają przy terminie ryzosfera), (b) ryzoplanę - powierzchnię korzenia i (c) endoryzosferę - czyli wnętrze korzenia, obejmującą głównie jego warstwę korową (De Leij i Lynch, 1997; Pietr, 1990). De Leij i Lynch (1997) epidermę korzenia zaliczają do ryzoplany, a Pietr (1990) do endoryzosfery, traktując ryzoplanę jako strefę wspólną dla ekto- i endoryzosfery. Niektórzy autorzy np. Kloepper i in. (1992) są przeciwni stosowania terminu endoryzosfera. W to miejsce proponują inne terminy, np. „endorhiza” (Hallmann i in., 1999). Część ryzosfery, w której obecne są grzyby mikoryzowe, określa się terminem „mikoryzosfera” (Kobus, 1999; Strzelczyk, 1999). Przytoczone powyżej terminy są przydatne do modelowania ryzosfery, ale wielu badaczy podkreśla, że w miarę starzenia się roślin, komórki epidermy i kory stają się niefunkcjonalne i ulegają lizie, co przyczynia się do powstania ciągłej warstwy gleby i komórek korzenia, o zatartych granicach pomiędzy nimi (Kloepper i in., 1992, De Leij i Lynch - 1997).

2.2. SUBSTANCJE ORGANICZNE PRZEDOSTAJĄCE SIĘ Z KORZENI DO GLEBY PODCZAS WZROSTU ROŚLIN

Aż 10-40% zasymilowanego węgla podczas fotosyntezy może być uwolnione przez korzenie do gleby w postaci różnych produktów metabolizmu roślin (Barber i Martin, 1976; Bowen i Rovira, 1999; Keith i in., 1986; Lynch i Whipps, 1990; Martens, 1990; Martin i Kemp, 1986, Merckx i in., 1986a). Według wyliczeń Keitha i in. (1986) oraz cytowanych przez nich autorów wynika, że korzenie roślin uprawnych wydzielały w ciągu sezonu wegetacyjnego 0,95-2,95 t C ha⁻¹. Z kolei Kluepfel (1993) oraz Pietr (1990) podają, że

wydzielane do ryzosfery substancje organiczne mogą stanowić aż 20% lub 30% całej biomasy, produkowanej przez rośliny w sezonie wegetacyjnym. Według Lyncha (1989), stosunek C:N w substancjach wydzielanych przez korzenie roślin w przybliżeniu wynosi 40:1. Dane te są zgodne z wyliczeniami Merbacha i in. (2000), z których wynika, że korzenie pszenicy wydzielają co najmniej $15 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ rok}^{-1}$.

Lynch (1989) i Lynch i Whipps (1990) stwierdzają, że substancje pochodzące z korzeni można podzielić na: „exudates”- rozpuszczalne w wodzie wydzieliny korzeniowe w skład których wchodzi m.in. cukry, aminokwasy, kwasy organiczne, hormony i witaminy, których wyciek z korzeni zachodzi bez zaangażowania energii metabolicznej; „secretions”- wydzielane w zależności od metabolicznych procesów wielocukry i enzymy; „lysates”- lizaty biernie uwalniane podczas autolizy komórek; „gases” - gazy jak etylen lub CO_2 oraz „mucilage” - śluz otaczające korzeń. Uwalnianie tych substancji odbywa się od wydzielania prostych cukrów podczas kiełkowania nasion, aż do zamierania całych starzejących się korzeni.

Także wielu innych autorów (Curl i Truelove, 1986; Jalali, 1976; Kluepfel, 1993; Plhák i Urbánková, 1969; Rovira, 1959; Rovira, 1969; Różycki i Strzelczyk, 1985; Schönwitz i Ziegler, 1989; Strzelczyk, 1999; Szmigielska i in., 1996; Vančura, 1964; Vransky i in., 1962) informuje, że w skład wydzielin korzeniowych wchodzi sacharydy, kwasy organiczne, aminokwasy, kwasy tłuszczowe, nukleotydy, witaminy, enzymy, fitohormony i cały szereg innych związków. Ponadto kiełkujące nasiona wydzielają szereg lotnych związków jak węglowodory, alkohole, aldehydy czy kwasy organiczne (Vančura i Stotzky, 1976).

Ilość i skład wydzielin korzeniowych zależy od gatunku (Balasubramanian i Rangaswami, 1969; Gransee i Wittenmayer, 2000; Rovira, 1959; Vančura, 1964 i 1967; Vančura i Hovadík, 1965), a nawet odmiany roślin (Kipe-Nolt i in. (1985) i fazy rozwojowej rośliny (Gransee i Wittenmayer, 2000; Hamlen i in. - 1972 – cyt. za Curl i Truelove, 1986; Keith i in., 1986; Sytnik i in., 1977), różnych czynników środowiska jak temperatura, intensywność światła czy poziom wilgotności (Bokhari i Singh, 1974 – cyt. za Hale i Moore, 1979; Curl i Truelove, 1986; Rovira, 1959; Vančura, 1967), czynników mechanicznych, drażniących lub uszkadzających korzenie (Barber i Gunn, 1974; Boulter i in., 1966 – cyt. za Curl i Truelove; Schönwitz i Ziegler, 1989), mineralnego żywienia roślin, np. poziomu azotu, fosforu, potasu czy wapnia (Bowen, 1969; Krafczyk i in., 1984; Petersen i Böttger, 1991; Rovira i Ridge - 1973 – cyt. za Curl i Truelove, 1986) i stosowania różnych środków chemicznych, w tym także dolistnych (Balasubramanian i Rangaswami, 1969; Hale i Moor, 1979; Jalali, 1976) .

Wydzielanie korzeniowe jest w istotny sposób zmieniane przez obecność drobnoustrojów w strefie korzeniowej (Kluepfel, 1993; Krafczyk i in., 1984; Martin i Kemp, 1986; Prikřyl i Vančura, 1980). Barber i Martin (1976) informują, że w glebie niesterylnej, w porównaniu do gleby sterylnej, zmniejszył się udział rozpuszczalnej frakcji wydzielin korzeniowych, a wzrosły udziały frakcji nierozpuszczalnej i frakcji gazowej. Autorzy ci wyliczyli, że korzenie pszenicy wydzieliły w sterylnej glebie tylko 7-9% ^{14}C pobranego przez rośliny, a w niesterylnej 18-21%. Podobnie, Beck i Gilmour (1983) stwierdzili, że pod wpływem szczepienia pszenicy mieszaniną bakterii z rodziny *Azotobacteriaceae* udział ^{14}C w wydzielinach korzeniowych wzrósł o 23%. Wykazano też szybkie wykorzystanie wydzielin korzeniowych przez bakterie. Także Martin (1977) stwierdził, że obecność mikroorganizmów istotnie podnosiła wydzielanie $^{14}\text{CO}_2$ z ryzosfery. Autor ten uważa, że straty C były głównie spowodowane autolizą tkanki korowej korzenia. Liza ta była spotęgowana przez drobnoustroje, bez penetracji roślinnych ścian komórkowych. Curl i Truelove (1986), Hale i Moore (1979) oraz Rovira (1969) podają, że mikroorganizmy glebowe mogą wpływać na przepuszczalność komórek korzeni przez: uszkodzenia tkanek korzeni, zmianę metabolizmu korzeni, preferencyjne wykorzystanie niektórych wydzielin korzeniowych (wytworzenie gradientu pomiędzy korzeniem i roztworem glebowym) i wydzielanie różnych metabolitów, w tym substancji typu hormonów wzrostu i toksyn.

Wydalane przez system korzeniowy produkty metabolizmu nagromadzają się w ryzosferze, co powoduje, że gleba w pobliżu korzeni różni się od gleby pozakorzeniowej pod względem fizykochemicznym (Bowen i Rovira, 1999). W stosunku do gleby pozakorzeniowej, w glebie ryzosferowej zmienione jest pH i E_h (Fischer i in., 1988; Kobus, 1999; Merckx i in., 1986b; Nye, 1981). Ponadto stwierdza się w niej wyższą zawartość C organicznego (Merckx i in., 1986b) i wyższe stężenie wielu składników pokarmowych dla roślin i drobnoustrojów, np. zawartość fosforu przewyższa kilkakrotnie jego poziom w glebie pozaryzosferowej, a zawartość rozpuszczalnych w wodzie substancji azotowych - kilkadziesiąt razy (Sytnik i in., 1977). Zwiększona jest też rozpuszczalność kationów przez ich kompleksację (Merckx i in., 1986b).

2.3. EFEKT RYZOSFEROWY

Stały dopływ substancji organicznej w strefie korzeniowej w okresie wegetacji roślin powoduje, że w pobliżu korzeni i na ich powierzchni gromadzi się znacznie więcej drobnoustrojów niż w glebie pozostającej poza zasięgiem oddziaływania korzeni. Według Sytnika i in. (1977) istnieje proporcjonalna zależność intensywności wydzielania korzeniowego i rozwoju mikroflory glebowej w strefie ryzosfery. Także Liljeroth i in. (1990) stwierdzili wyższą biomasę drobnoustrojów i wyższe liczebności drobnoustrojów w przypadku intensywniejszego wydzielania korzeniowego pszenicy. Ilość wydzielin, pochodząca z 1 g korzeni w ciągu 1 dnia, może dochodzić do 150 mg. Pozwala to na bytowanie w ryzosferze do 100 mg biomasy bakterii na 1 g korzeni (Pietr, 1990). Z kolei wg wyliczeń Schönwitz i Zieglera (1989) na 90 mg wydzielin korzeniowych z 1 g s.m. korzeni kukurydzy, zawierających 70% cukrów może wyżywić się 57×10^9 bakterii, co stanowi 40 mg biomasy. Stosunek liczby mikroorganizmów w glebie ryzosferowej do liczby mikroorganizmów w glebie pozaryzosferowej określone jest jako tzw. „efekt ryzosferowy”. Oznacza się go symbolem R:S (z ang. „Rhizosphere : Soil”) . Według różnych autorów (Bowen i Rovira, 1999; Curl i Truelove, 1986; Gantotti i Rangaswami, 1971; Kloepper i Bowen, 1991; Richards, 1976; Rouatt i in., 1960; Starkey - za Marszewska-Ziemięcka i in., 1974) R:S odpowiednio wynosi: dla bakterii, promieniowców, grzybów, pierwotniaków i glonów: 10-200; 4-8; 1,3-78; 1-3 i 1-2. Van Vuurde i de Lange (1978) stwierdzili, że efekt ryzosferowy dla liczebności bakterii zawsze był większy od 1, a dla promieniowców i grzybów był często mniejszy od 1. Wartość efektu ryzosferowego zależy od rośliny, gleby i warunków wzrostu (Bowen i Rovira, 1999). Bowen i Rovira (1999) oraz Curl i Truelove (1986) informują też o wyższej w ryzosferze liczebności mikrofauny (w tym nicieni), niż w glebie pozaryzosferowej.

2.4. MIKROORGANIZMY RYZOSFEROWE

Pomiędzy mikroorganizmami ryzosfery a mikroorganizmami gleby pozaryzosferowej występują nie tylko różnice ilościowe ale i jakościowe. W porównaniu do gleby pozaryzosferowej, ryzosferę w większym stopniu zasiedlają pałeczki gramujemne (Bowen i Rovira, 1999; Oka i in., 1997; Pietr, 1990) i są one morfologicznie i taksonomicznie bardziej różnorodne (Foster, 1986 – cyt. za Kobusem, 1999; Kloepper i in., 1992). Bakterie

ryzosferowe (w celu podkreślenia odrębności zespołów bakterii w ryzosferze, Suslow i in., 1979 określili je mianem ryzobakterii – cyt. za Pietrem, 1990) są szybko rosnące i metabolicznie bardziej aktywne niż bakterie glebowe. Porównując zespoły bakteryjne pochodzące z ryzosfery lub/i ryzoplany pszenicy czy jęczmienia do zespołów pochodzących z gleb poza-ryzosferowych stwierdzono, że te pierwsze wyróżniały się szybszym wzrostem na pożywkach agarowych (De Leij i in., 1993; De Leij i in., 1995; Rouatt i Katznelson, 1961; Vagnerova i in., 1960b), czy szybszym tempem wbudowywania tymidyny i leucyny (Söderberg i Baath, 1998). Ryzosferowe populacje różnią się od glebowych także pod względem ich zdolności do wykorzystania różnych związków i do dysymilacji N (Lemanceau i in., 1997). Bakterie ryzosferowe mają też inne wymagania pokarmowe niż bakterie glebowe, np. w większym stopniu wymagają obecności glukozy i aminokwasów (Curl i Truelove, 1986; Rouatt i Katznelson, 1961; Rouatt i in., 1963; Schönwith i Ziegler, 1989; Sundin i in., 1990; Święcicka i Hauschild, 1996; Vagnerova i in., 1960a; Vagnerova i in., 1960b). Dla ryzosfery charakterystyczna jest, w porównaniu do gleby pozaryzosferowej, znacznie wyższa liczebność denitryfikatorów i amonifikatorów (Rouatt i in., 1960). Skład i ilość wydzielin korzeniowych w dużym stopniu wpływają na mikroflorę ryzosferową, a więc jakość drobnoustrojów ryzosfery zależy od tych samych czynników, które wpływają na wydzielanie korzeniowe. Są to: przede wszystkim genotyp rośliny, jej faza rozwojowa, jakość gleby oraz różne czynniki fizykochemiczne, jak temperatura, nawożenie i opryski chemikaliami (Bowen i Rovira, 1999; Curl i Truelove, 1986; Glandorf i in., 1993; Jalali, 1976; Mishra i Das, 1975; Neal i in., 1973; Rouatt i in., 1963; Srivastava, 1971; Strzelczyk, 1988; Turner i in., 1985; Vransky i in., 1962). Ilość i jakość drobnoustrojów ryzosferowych zależy też od wieku korzeni, z których są one izolowane, np. Liljeroth i in. (1991) stwierdzili, że mikroorganizmy pochodzące z końca (młodszej części) korzeni pszenicy były zdolne do wytwarzania kwasów z różnych cukrów, reduktazy azotanowej, lipazy i oksydazy, natomiast te izolowane z podstawy (starszej części) korzeni zwykle nie miały wymienionych cech. Według Kluepfela (1993) 25-50% korzeni w starszej, górnej części może być martwa. W miarę starzenia się korzeni następuje wyraźna sukcesja mikroorganizmów. Zespoły drobnoustrojów związane z młodymi korzeniami wyróżniają się szybkim wzrostem, podczas gdy zespoły związane ze starymi korzeniami, charakteryzują się wzrostem wolnym (De Leij i in., 1993; Dujneveld i van Veen, 1999). Według pojęć ekologicznych (De Leij i in., 1993) taki typ bakterii, szybko rosnących i jako pierwsze kolonizujących nowe środowisko, to tzw. „r-stratedzy”, które w przeciwieństwie do „K-strategów”, czują się dobrze w bogatych w składniki pokarmowe i nie zatłoczonych „r-środowiskach”. Takim „r-środowiskiem” są młode korzenie roślin, w

przeciwieństwie do stabilnego i zatłoczonego „K-środowiska” lizowanych komórek epidermy i warstwy korowej starych korzeni (De Leij i in., 1993).

Drobnoustroje nie pokrywają korzeni równomiernie i przypadkowo. Newman i Bowen (1974) stwierdzili, że bakterie występują w skupiskach rozsianych na powierzchni korzeni, pomiędzy którymi bakterie są rzadkie lub nieobecne. Oprócz małych kolonii, widoczne są większe obszary o wysokiej i niskiej gęstości bakterii. W różnych strefach korzenia obserwuje się ich różne gęstości. Stożek wzrostu jest praktycznie wolny od drobnoustrojów, natomiast na starszych korzeniach np. w fazie kwitnienia stwierdza się znaczny rozwój mikroorganizmów zarówno na powierzchni, jak i zewnętrznych komórkach kory (Foster i Rovira, 1976; Schönwitz i Ziegler, 1989). Åström i in. (1993), Foster i Rovira (1976) oraz Lynch (1989) informują, że bakterie występują powszechnie pomiędzy komórkami epidermalnymi, co sugeruje, że wydzielanie organicznej substancji przez starsze korzenie odbywa się w miejscu połączeń komórek. Foster i Rovira (1976) także zauważyli, że kolonizacja komórek kory była poprzedzona przez lizę ich ścian komórkowych. Z kolei Åström i in. (1993) stwierdzili obecność bakterii w przestrzeniach międzykomórkowych kory, pomimo braku rozpuszczania blaszek środkowych przez bakterie. Sugerują oni, że bakterie mogły wnikać do przestrzeni międzykomórkowych przez różnego rodzaju pęknięcia, spowodowane przez deformacje korzeni np. pod wpływem metabolitów bakteryjnych. Podobnego zdania jest Kluepfel (1993), który twierdzi, że w wyniku różnych uszkodzeń korzeni, bakterie ryzosferowe mogą wnikać nawet do naczyń.

Według wyliczeń Schönwitz i Ziegler (1989) kolonie bakterii pokrywały tylko 4% powierzchni najmłodszej części korzeni kukurydzy (39×10^3 bakterii/mm²), 7% powierzchni ich strefy włóśników (63×10^3 bakterii/mm²) i 20% powierzchni (188×10^3 bakterii/mm²) ich najstarszej części (10 mm poniżej nasienia). Dane te są zgodne z wynikami Becka i Gilmoura (1983), którzy wyliczyli, że drobnoustroje zasiedlają 7,4% powierzchni korzeni pszenicy. Z kolei Lynch (1989) informuje, że bakterie przypuszczalnie mogą zasiedlać do 80% powierzchni korzeni.

Wśród badaczy można zaobserwować odmienne poglądy, które rodzaje bakterii są charakterystyczne dla ryzosfery. Kontrowersje te dotyczą głównie bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Kluepfel (1993), Kurek i Kobus (1990), Lynch i Whipps (1990) oraz Pietr (1990) uważają, że głównymi bakteriami Gram (-) związanymi z korzeniami są drobnoustroje z rodzaju *Pseudomonas*. Burns i in. (1989), Vagnerova i in. (1960a), Rouatt i in. (1963) oraz Rouatt i Katznelson (1961) informują, że udział *Pseudomonas* wyraźnie wzrastał przy przejściu od zespołów bakteryjnych, izolowanych z gleby poza-korzeniowej, poprzez zespoły

z gleby ryzosferowej do zespołów z powierzchni korzeni różnych roślin, w tym również pszenicy. Także Grayston i in. (1998) oraz Vančura (1980) stwierdzili bardzo duży wzrost liczebności fluoryzujących *Pseudomonas* w glebie ryzosferowej i (zwłaszcza) na powierzchni korzeni różnych roślin (w tym pszenicy) w stosunku do gleby poza-ryzosferowej, a Gams (1967) i Sato i Jiang (1997) informują, że *Pseudomonas* to główna grupa bakterii izolowanych z gleby ryzosferowej lub powierzchni korzeni pszenicy. Również wielu innych autorów donosi, że fluoryzujące *Pseudomonas* dominowały w ryzosferze bardzo różnych roślin (pomidora - De Brito Alvarez i in., 1995; kukurydzy - Lalande i in., 1989; owsa - Paszkowski i Kobus, 1995; ogórka - Pietr i Kempa, 1989; banana - Vlassak i in., 1992; brzoskwini - Yasuda i Katoh, 1989). Badania Parke i in. (1990) nad rozmieszczeniem wprowadzonego szczepu *P. fluorescens* do ryzosfery grochu, informują, że bakterie te ulokowały się w najwyższej liczebności w najbliższym sąsiedztwie korzeni.

Z drugiej strony, z rezultatów szeregu innych autorów wynika, że fluoryzujące *Pseudomonas* są grupą bakterii mało liczną w ryzosferze roślin, której znaczenie się przesadza. Turner i in. (1985) stwierdzili, że w ryzosferze życicy (i wg cytowanych przez nich innych badaczy, w ryzosferze koniczyny i lnu) grupami dominującymi były pałeczki coryneform lub typy pleomorficzne. Podobne wyniki otrzymały Kurek i in. (1994) dla ryzosfery żyta, Sperber i Rovira (1959 – cyt. za Bowenem i Rovirą, 1999) dla ryzosfery koniczyny i życicy oraz Kloepper i Bowen (1991) dla ryzosfery orzeszka ziemnego. Także Germida i in. (1997) stwierdzili, że bakterie *Pseudomonas* były nieliczne na powierzchni i nieobecne wewnątrz korzeni rzepaku jarego. Podobne dane odnośnie bakterii *Pseudomonas* otrzymali Hallmann i in. (1999) dla gleby ryzosferowej i wnętrza korzeni bawełny. Także Miller i in. (1990a, 1990b) informują, że liczebność fluoryzujących *Pseudomonas* była bardzo niska w ryzosferze pszenicy jarej. Stwierdzili oni (Miller i in., 1990b) niższy udział procentowy fluoryzujących *Pseudomonas* w zespołach bakterii z ryzoplany niż z gleby ryzosferowej pszenicy. Informują też oni, że fluoryzujące *Pseudomonas* były bardzo rzadko notowane w endoryzosferze. Miller (1990) wręcz stwierdza, że uwaga jaką się kieruje na fluoryzujące pseudomonasy jako główną grupę bakterii w ryzosferze roślin jest fałszywa, a z powodu ich szybkiego zanikania w czasie rozwoju roślin, prowadzenie intensywnych badań nad tą grupą jako czynnikiem biokontrolnym jest błędem.

Podobnie kontrowersyjne poglądy istnieją na temat rodzaju *Bacillus*. Szereg autorów (m.in. Burns i in., 1989; Kloepper i Bowen, 1991 oraz Rouatt i in., 1963) twierdzi, że ryzosfera a szczególnie ryzoplana roślin charakteryzuje się mniejszym udziałem bakterii z rodzaju *Bacillus* niż gleba poza-ryzosferowa. Z kolei inni (Fridlender i in., 1993; Gardner i

in., 1982; Germida i in., 1997; Kloepper i in., 1992; McInroy i in., 1997; Paszkowski i Kobus, 1995a) informują, że bakterie *Bacillus* są liczne w glebie ryzosferowej, na i w korzeniach wielu roślin, a niekiedy są zdecydowanie dominującą grupą endofitów (Germida i in., 1997; Lalande i in., 1989; McInroy i in., 1997). Należy dodać, że znaczenie bakterii *Bacillus* w ryzosferze może być duże, ponieważ niektóre gatunki ryzosferowych *Bacillus* wiążą azot atmosferyczny, którego ilość dostarczana roślinom może być dość znaczna (Kucey, 1988; Święcicka i Hauschild, 1996).

Wśród grzybów zasiedlających ryzosferę różnych roślin, zdecydowanie wyróżnia się rodzaj *Fusarium*. Chrzanowski (1976), Domsch i in. (1967) i Gams (1967) zaznaczyli, że grzyby z rodzaju *Fusarium* są dominującą grupą zasiedlającą system korzeniowy pszenicy. Również obfite występowanie *Fusarium* w ryzosferze różnych zbóż i traw stwierdzili Gadgil (1965), Hałabuda, (1958b), Kreutzer, (1972), Parkinson i Pearson (1967), Mikołajska i Majchrzak (1995); Paszkowski i Kobus (1995b); Rouatt i in. (1963) i van Vuurde (1978).

2.5. ODDZIAŁYWANIE DROBNOUSTROJÓW RYZOSFEROWYCH NA ROŚLINY

Pietr (1990) na początku swojej pracy przeglądowej przytacza słowa Lyncha „*Od momentu kiełkowania nasion aż do czasu osiągnięcia pełnej dojrzałości roślin, drobnoustroje rozwijają się wraz z nimi w ścisłej współzależności... Ten układ wzajemnych zależności określa się mianem ryzocenozy i z reguły to zjawisko jest ignorowane zarówno przez fizjologów jak i rolników.*”

Drobnoustroje ryzosferowe można podzielić na organizmy infekcyjne i nieinfekcyjne (Bowen i Rovira, 1999). Pożyteczne infekcyjne mikroorganizmy to przede wszystkim symbiotyczne bakterie, wiążące N_2 oraz grzyby mikoryzowe. Efektywne asocjacje symbiotyczne roślin motylkowatych z *Rhizobiaceae* i niektórych gatunków drzew z promieniowcem *Frankia* mogą zaspokajać zapotrzebowanie tych roślin w azot (Kurek i Kobus, 1990). Około 85% roślin lądowych tworzy asocjacje z grzybami mikoryzowymi, co pomaga im w pobieraniu składników pokarmowych, głównie fosforu (De Leij i Lynch, 1997; Kobus i Książniak, 1997). Mikroorganizmy infekcyjne szkodliwe to grzyby i bakterie wywołujące choroby roślin (Bowen i Rovira, 1999).

Najlicniejsza grupa mikroorganizmów ryzosferowych to wolno żyjące, nieinfekcyjne drobnoustroje saprotroficzne (większość autorów do tej pory używała nazwę „saprophytyczne”). Drobnoustroje te mogą wywierać korzystny lub szkodliwy wpływ na wzrost roślin (Alström, 1987a; Bowen i Rovira, 1999; De Leij i Lynch, 1997; Glick, 1995; Kurek i Kobus, 1990; Pietr, 1990). Niektórzy autorzy dodają, że mogą one także pozostawać dla roślin obojętne lub ich działanie może być zmienne (Alström, 1987a; Glick, 1995; Kurek i Kobus, 1990; Pietr, 1990). Pietr (1990) informuje, że mikroorganizmy stymulujące lub hamujące wzrost roślin stanowią od 2 do 20% całej populacji ryzosfery.

Według Alström (1987a) drobnoustroje mogą oddziaływać na rośliny w następujący sposób: (1) brak wpływu na szczepione rośliny; (2) wpływ na szybkość i liczbę wschodzących siewek; (3) okresowa lub trwała stymulacja wzrostu pędów, korzeni lub obu organów i (4) okresowa lub trwała inhibicja wzrostu i rozwoju korzeni, pędów lub obu organów. Wpływ szczepienia roślin może się zmieniać (od oddziaływania dodatniego do ujemnego) w zależności od użytego gatunku, czy nawet odmiany roślin (Alström, 1987a; Åström, 1991; Åström i Gerhardson, 1988; Åström i Gerhardson, 1989; Åström i in., 1993; Broadbent i in., 1977; Dubeikovsky i in., 1993; Elliott i Lynch, 1984; Germida i de Freitas, 1994; Holl i in., 1988; Howie i Echandi, 1983; Kennedy i in., 1991; Kurek i Kobus, 1990) i od różnych warunków środowiska (Alström, 1987a; Bowen i Rovira, 1999; Elliott i Lynch, 1985; Reddy i Rahe, 1989a). Dodatni wpływ uzyskiwano głównie we wczesnych fazach wzrostu roślin. Młode rośliny również reagowały silniej i szybciej na ryzobakterie hamujące ich wzrost niż rośliny starsze (Alström, 1987a). Także Sytnik i in. (1977) uważają, że mikroflora odgrywa wyjątkowo dużą rolę w pierwszym okresie wzrostu roślin, kiedy to obserwuje się niemal prostą zależność między ilością mikroorganizmów a wzrostem roślin.

Korzystnie oddziałujące na rośliny wolno żyjące bakterie ryzosferowe określa się terminem PGPR (z ang. „plant growth promoting rhizobacteria”) lub YIB (z ang. „yield increasing bacteria”), a drobnoustroje szkodliwe mianem DRMO (z ang. „deleterious rhizosphere microorganisms”) lub DRB (z ang. „deleterious rhizobacteria”) (Arshad i Frankenberger, 1998; Bowen i Rovira, 1999; Glick, 1995; Keel i in., 1990; Kloepper i in., 1988; Kurek i Kobus, 1990; Ogoshi i in., 1997; Ryder i in., 1994). Paszkowski (1993) informuje, że korzystne oddziaływanie drobnoustrojów ryzosferowych na rośliny może odbywać się poprzez: (1) udostępnianie roślinom składników pokarmowych, (2) wytwarzanie substancji typu regulatorów wzrostu roślin, (3) eliminowanie lub ograniczanie rozwoju mikroorganizmów szkodliwych dla roślin (DRMO) oraz fitopatogenów, (4) detoksykację związków fitotoksycznych oraz (5) poprawę struktury oraz stosunków wilgotnościowych

gleby. Bowen i Rovira (1999) oraz Kurek i Kobus (1990) dodają, że szczepy PGPR mogą podnosić odporność roślin na patogeny i sprzyjać rozwojowi organizmów symbiotycznych.

Drobnoustroje ryzosferowe mogą wpływać na wzrost roślin pośrednio lub bezpośrednio. Oddziaływanie bezpośrednie odbywa się przez syntezę w ryzosferze czynników wpływających na wzrost roślin oraz poprzez zmiany dostępności dla roślin substancji pokarmowych i detoksykację środowiska, natomiast pośrednie poprzez ograniczanie lub stymulację wzrostu organizmów chorobotwórczych, DRMO lub drobnoustrojów symbiotycznych, korzystnie wpływających na rośliny (Bowen i Rovira, 1999; Glick, 1995; Kurek i Kobus, 1990; Paszkowski, 1993; Strzelczyk, 1988).

2.5.1. Oddziaływanie za pośrednictwem regulatorów wzrostu roślin

Mikroorganizmy ryzosferowe mogą produkować tysiące metabolitów, z których większość może być wydzielana pozakomórkowo i wchodzić w interakcje z innymi organizmami, w tym z roślinami (De Leij i Lynch, 1997; Pietr, 1990). Niektóre z nich (np. auksyny, gibereliny, cytokininy, witaminy, etylen) w zależności od swego stężenia mogą oddziaływać dodatnio lub ujemnie na wzrost roślin (Alström, 1987a; Arshad i Frankenberger, 1991; Arshad i Frankenberger, 1998; Bowen i Rovira, 1999; Brown, 1974; De Leij i Lynch, 1997; Dobbelaere i in., 1999; Dubeikovskiy i in., 1993; Fallik i in., 1989; Loper i Schroth, 1986; Müller i in., 1989; Pietr, 1990; Selvadurai i in., 1991; Strzelczyk, 1999). Mikroflora zdolna do syntezy substancji regulujących wzrost roślin jest bardzo liczna w ryzosferze (Arshad i Frankenberger, 1998; Bowen i Rovira, 1999; Vančura, 1989). Badania Narayanaswami i Verraju (1969) oraz Rossi i in. (1984) wskazują, że w ryzosfera charakteryzuje się wyższą zawartością auksyn w porównaniu do gleby pozaryzosferowej, a wyniki Sarwara i Kremera (1995) informują, że bakterie ryzosferowe są znacznie bardziej wydajnymi producentami IAA niż szczepy pochodzące z gleby nieryzosferowej. Wyraźnym wskaźnikiem, że ryzobakterie wpływają na wzrost roślin za pośrednictwem hormonów są badania z różną ilością inokulum. Te same szczepy, które w dużym stężeniu są szkodliwe dla roślin, w małym mogą działać na rośliny w sposób korzystny (Kapulnik, 1985; Suslow, 1982 - cyt. za Alström, 1987a). Alström (1987a) informuje, że szczepy hamujące wzrost roślin wytwarzały z metioniny 15-20 razy więcej etylenu niż szczepy stymulujące. Loper i Schroth (1986), Dobbelaere i in. (1999) oraz Dubeikovskiy i in. (1993) znaleźli zależność pomiędzy ilością IAA, syntetyzowaną przez bakterie i skracaniem korzeni roślin. Dużą rolę w

oddziaływaniu na wzrost roślin mogą odgrywać szczepy bakterii syntetyzujące enzym dezaminazę 1-aminocyklopropano-1-karboksylanu, bezpośredniego prekursora etylenu. Enzym ten może zapobiegać syntezie etylenu w roślinach, stymulowanej przez bakteryjny IAA, wynikiem czego powinno następować zwiększenie wzrostu korzeni na długość, co z kolei zwiększa przeżywalność siewek, szczególnie podczas pierwszych dni po siewie roślin (Arshad i Frankenberger, 1998; Glick, 1995; Mayak i in., 1997; Shah i in., 1997). Przykładami oddziaływania innych związków biologicznie aktywnych są wyniki badań Deryło i Skorupskiej (1993), które stwierdziły, że syntetyzowane przez fluoryzujące pseudomonasy rozpuszczalne w wodzie witaminy grupy B stymulowały wzrost koniczyny z utworzonymi brodawkami, Tien i in. (1979 cyt. za Kurek i Kobus, 1990), którzy zaobserwowali, że giberelina, produkowana przez *Azospirillum brasilense* wzmacniała tworzenie korzeni bocznych i włośników oraz Young i in. (1990) którzy znaleźli zależność pomiędzy wzrostem korzeni na długość a produkcją cytokinin.

2.5.2. Udostępnianie roślinom pierwiastków biogennych

Pietr (1990) stwierdza, że do najczęściej rozpatrywanych możliwości dostarczania roślinom składników pokarmowych należą rozważania nad zaopatrzeniem roślin w azot i fosfor.

Wiele wolno żyjących ryzosferowych bakterii (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacteriaceae* i in.) jest zdolnych do wiązania azotu atmosferycznego. Chociaż określono, że $\frac{1}{4}$ azotu związanego przez te mikroorganizmy jest bezpośrednio dostępna dla roślin, a reszta może być uwolniona po śmierci bakterii (De Leij i Lynch, 1997), udział wiązania N_2 przez te mikroorganizmy w zaspokajaniu zapotrzebowania azotowego roślin jest niewielki, a bakterie te wpływają na wzrost i rozwój roślin głównie za pomocą innych mechanizmów (Glick, 1995; Kurek i Kobus, 1990; Pietr, 1990).

Szereg doniesień sugeruje, że PGPR stymulują wzrost roślin przez ułatwienie im pobierania związków mineralnych, w szczególności fosforanów (Germida i de Freitas, 1994; Glick, 1995; Kloepper i in., 1988; Kurek i Kobus, 1990; Pietr, 1990). Powstające na szlaku niefosforylacyjnej oksydacji kwasy: glukonowy, 2-ketoglukonowy i 2,5-dwuketoglukonowy mogą być istotnym czynnikiem w rozpuszczaniu różnych minerałów (Babu-Khan i in., 1995). Duff i in. (1963) stwierdzili, że bakterie produkujące kwas 2-ketoglukonowy mogły rozpuszczać szereg minerałów, co przyczyniało się do uwolnienia Ca, Mg, K, Na, Fe i Mn.

Moghimi i in. (1978) znaleźli w ryzosferze znaczne ilości (20% produktów ryzosfery) 2-ketoglukonianów. Badania Aleksandrowa i Zaka (1950 – cyt. za Barberem, 1968) dowodzą, że mikroorganizmy rozpuszczające minerały podnosiły plon kukurydzy i pszenicy oraz zwiększały pobieranie potasu. Podobnie Williamson i Wyn Jones (1973) stwierdzili zwiększone pobieranie K i jego przemieszczanie do pędów po szczepieniu zbóż zawieszoną glebową lub szczepem *Bacillus subtilis*. Domey i in. (1989) informują, że niektóre z drobnoustrojów rozpuszczających fosforany istotnie stymulowały wzrost i pobieranie P przez pszenicę w warunkach niedoboru fosforanów, a badania Germidy i de Freitas (1994) wskazują na zwiększone pobieranie P i N przez różne warzywa, po szczepieniu bakteriami bez stosowania nawożenia. Podobne przykłady stymulacji wzrostu różnych gatunków roślin i pobierania przez nie fosforanów, dzięki szczepieniu bakteriami *Pseudomonas* i *Bacillus*, zamieścili Kloepper i in. (1988), Kucey i in. (1989) oraz Paszkowski (1993). Badania z kilkoma gatunkami grzybów dały podobne efekty (Kucey, 1988; Whitelaw i in., 1997). Z kolei de Freitas i in. (1997) stwierdzili, że ryzobakterie rozpuszczające fosforany stymulowały wzrost i zwiększały plon rzepaku jarego, ale nie pobieranie fosforanów przez rośliny. Bowen i Rovira (1999) sądzą, że w wielu badaniach, w których stwierdzano rozpuszczanie fosforanów, działanie drobnoustrojów odbywało się poprzez stymulację wzrostu korzeni, co w konsekwencji dawało wzrost pobierania łatwo dostępnych form fosforanów. Podobnie, zdaniem Azcon-Aguilar i in. (1986 - cyt. za Paszkowskim, 1993) oraz Domey i in. (1989), uzyskiwane przyrosty plonów po zaszczepieniu drobnoustrojami rozpuszczającymi fosforany należy łączyć z równoczesną syntezą regulatorów wzrostu roślin przez te drobnoustroje. Badania Lin i in. (1983 cyt. za Kurek i Kobus, 1990) z *Azospirillum* wykazały, że bakterie te mogły wnikać do epidermy korzenia i rozluźniać kontakt pomiędzy komórkami tkanki korowej, czemu towarzyszył 30-50% wzrost pobierania N, P, i K przez kukurydzę i sorgo.

Kurek i Kobus (1990) sugerują także możliwość zwiększenia przyswajalności S dla roślin przez drobnoustroje ryzosfery. Zdolność mikroorganizmów ryzosferowych do utleniania do siarczanów S elementarnej i S zawartej w cysteinie stwierdzili Paszkowski i Kobus (2000) oraz Król i Kobus (1992).

2.5.3. Drobnoustroje ryzosferowe niekorzystnie oddziałujące na wzrost roślin (DRMO lub DRB)

Oprócz typowych patogenów w ryzosferze bytuje wiele mikroorganizmów, które obniżają wzrost roślin bez wywoływania objawów chorobowych. Drobnoustroje te obniżają wschody roślin, osłabiają ich wzrost, powodują więdnienie roślin, chlorozy, nekrozy liści, zniekształcenia korzeni, hamują wzrost korzeni na długość, zwiększają porażenie przez grzyby chorobotwórcze (Alström, 1990). Efektem tego jest duża obniżka plonów roślin. Można do nich zaliczyć szereg rodzajów bakterii należących do rodzin: Pseudomonadaceae (spośród DRB najczęściej wymieniane są szczepy z rodzaju *Pseudomonas*), Corynebacteriaceae, Enterobacteriaceae i Bacillaceae, oraz powszechne w ryzosferze grzyby *Fusarium*. Wytwarzają one wiele metabolitów wtórnych, zakłócających metabolizm roślin (Alström, 1990; Elliott i Lynch, 1985; Cherington i Elliott, 1987; Kurek i Kobus, 1990; Paszkowski, 1993; Pietr, 1990).

Wiele szczepów bakterii z rodzaju *Pseudomonas* wydziela HCN jako metabolit wtórny (Alström, 1987; Bakker i Schippers, 1987; Bowen i Rovira, 1999; Knowles, 1976; Leisinger i Margraff, 1997; Paszkowski i Masiak, 1998; Paszkowski i in., 1997; Schippers i in., 1990). Wyniki prezentowane przez Alström (1987a), Bakker i Schippersa (1987), Knowlesa (1976), Paszkowskiego (1996) i Schippersa i in. (1987) wskazują na to, że wysokie dawki HCN, związku toksycznego dla oddychania większości żywych komórek, były przyczyną zahamowania wzrostu różnych roślin. Także Czaban i in. (2000) stwierdzili, że zdolność bakterii do syntezy cyjanków *in vitro* była skorelowana z ich zdolnością do hamowania wzrostu korzeni pszenicy ozimej.

Szereg szczepów DRMO z rodzaju *Pseudomonas* wydziela różne toksyny o charakterze retardantów, np. fazeolotoksyna, syringomycyna, tegetytoksyna, tagtoksyna, tropolon i in. (Azegami i in., 1987 – za Paszkowskim, 1993; Bolton i Elliott, 1989; Bolton i in., 1989; Fredrickson i Elliott, 1985). Ujemne działanie bakterii *Pseudomonas* na wzrost roślin może być również związane z syntezą przez nie antybiotyków, np. 2,4-diacetylofloroglucynolu (Reddy i in., 1969 – cyt. za Alström, 1990).

Szczególnie silnymi producentami fitotoksyn (przez Paszkowskiego – 1993 nazwane fabrykami mykotoksyn) są grzyby z rodzaju *Fusarium*. Do najważniejszych toksyn wydzielanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium* należą: dezoksyniwalenol, zearalenon, ksycirpenol, moniliformina, nivalenon, kwas fuzariowy, sporofuzaryna i cały szereg innych

(Bandurska i in., 1994; Barabasz i in., 1998; Herrmann i in., 1996; Kim i Lee, 1994; Park i in., 1996; Gilbert, 1989 oraz Mirocha i in., 1989 – cyt. za Paszkowskim, 1993).

Pietr (1990), oprócz antybiotyków i toksyn (polimyksyn, trichotecyn, patuliny i in.) przytacza przykłady fitotoksycznego działania innych związków, produkowanych przez drobnoustroje ryzosferowe: powstających w wyniku wysokiego nawożenia azotowego nitrozoamin - dimetonitrozoamina, dietylonitrozoamina, metyloetylonitrozoamina, dipropylonitrozoamina (Barabasz i Voříšek, 2000; Barabasz i in., 1998) – powodujących wypadanie szeregu gatunków z zespołów roślinnych łąk; wielu alifatycznych (bursztynowy, masłowy, mlekowy, mrówkowy, octowy, propionowy) i aromatycznych (benzoesowy, syringowy, wanilinowy, salicyłowy) kwasów organicznych. Czynnikiem szkodliwym może być również synteza siarkowodoru w warunkach niskiej zawartości tlenu (Alström, 1990; Lynch i Whipps, 1990; Pietr, 1990).

Bakteryjne szczepy DRMO (DRB) działają szkodliwie na rośliny po wprowadzeniu ich na korzenie w dużej liczebności. Częściowo związane to jest z omawianą wcześniej syntezą przez te organizmy dużych ilości substancji typu hormonalnych regulatorów wzrostu, jak auksyny czy etylen (Alström, 1990). Kurek i Kobus (1990) zaznaczają, że podział na organizmy DRMO i PGPR nie jest czymś stałym, lecz zależy od warunków wegetacji i właściwości genetycznych rośliny. Jako przykład przytaczają pracę Alström i Gerhardsona (1987), którzy wykazali, że ten sam szczep *Pseudomonas fluorescens* działał dodatnio na sałatę a ujemnie na groch. Z kolei Åström i Gerhardson (1988 i 1989) oraz Åström (1991) wykazali bardzo odmienne reakcje (od wyraźnie dodatnich do wyraźnie ujemnych) różnych odmian pszenicy i grochu na działanie szczepów z rodzaju *Pseudomonas*. Wskazuje to na złożoność tego problemu.

2.5.4. Wpływ na inne mikroorganizmy - pożyteczne lub szkodliwe dla roślin

2.5.4.1. Stymulacja rozwoju mikroorganizmów symbiotycznych

Pośredni efekt mikroflory ryzosferowej na stymulację wzrostu roślin może być rezultatem pobudzania rozwoju drobnoustrojów symbiotycznych (Barea, 1997; Bowen i Rovira, 1999; Kloepper i in., 1988; Kurek i Kobus, 1990; Strzelczyk, 1999). Bowen i

Theodorou (1979) wykazali że bakterie z rodzaju *Bacillus* stymulowały kolonizację korzeni przez niektóre grzyby ektomikoryzowe aż o 72%. Innymi przykładami takiego oddziaływania jest działanie *Azospirillum brasilense*, który nie tylko stymulował wzrost korzeni i pobieranie azotu lecz zwiększał infekcję grzybem *Glomus mossae* (Barea i in. - cyt. za Kurek i Kobus, 1990). Azcón i in. (1976) znaleźli interakcję pomiędzy mikoryzą VAM a bakteriami (*Pseudomonas* i *Agrobacterium*), rozpuszczającymi fosforany w ryzosferze roślin, szczepionych tymi bakteriami, rosnących w glebie z niską zawartością P. Łączne szczepienie roślin bakteriami i grzybem mikoryzowym dawało istotnie wyższy plon niż szczepienie oddzielne. Rośliny pobierały więcej P przy jednoczesnym szczepieniu grzybem mikoryzowym i bakteriami, w porównaniu do szczepienia oddzielnego, w przypadku każdego stosowanego stężenia fosforu. Rośliny nie szczepione nie mogły korzystać z P, zawartego w fosforacie. Podobne wyniki uzyskali Toro i in. (1997), którzy stwierdzili, że łączne szczepienie grzybem VAM i bakteriami rozpuszczającymi fosforany (*Bacillus subtilis*) istotnie zwiększało biomasę roślin i akumulację N i P w tkankach roślinnych. Bakterie wspomagające mikoryzę nazywane są MHB (z ang. mycorrhization helper bacteria) (Strzelczyk, 1999)

Kurek i Kobus (1990) stwierdzają, że zwraca się coraz większą uwagę na stosowanie mieszanej szczepionki dla roślin motylkowatych, składającej się z *Rhizobium* i bakterii rozpuszczających fosforany. Alagawadi i Gaur (1988 - cyt. za Kurek i Kobusem, 1990) w wyniku stosowania mieszanej szczepionki *Rhizobium* i rozpuszczających fosforany *Pseudomonas* i *Bacillus*, uzyskali znacznie wyższe plony roślin niż przy szczepieniu samym *Rhizobium*. Badacze ci wnioskują, że bakterie *Pseudomonas* i *Bacillus* zaopatrywały rośliny w gibereliny i cytokininy. Podobnie Deryło i Skorupska (1993) stwierdziły, że syntetyzowane przez fluoryzujące pseudomonasy rozpuszczalne w wodzie witaminy grupy B stymulowały wzrost koniczyny z utworzonymi brodawkami. Autorki sugerują, że mieszanka PGPR i *Rhizobium* może działać korzystniej w porównaniu do samego *Rhizobium*. Także Liu i Huang (1997) oraz Halverson i Handelsman (1991) stwierdzili odpowiednio, że szczep *Erwinia herbicola* i dwa szczepy *Erwinia rhapontici* istotnie podnosiły suchą masę brodawek na korzeniach grochu, a szczep *Bacillus cereus* wyraźnie zwiększał brodawkowanie soi.

2.5.4.2. Oddziaływanie PGPR na organizmy szkodliwe (patogeny i DRMO)

Bezpośrednią konsekwencją stosowania syntetycznych środków ochrony roślin (często nieprzemyślanego) powoduje u drobnoustrojów chorobotwórczych dla roślin dobrze znane zjawisko 3 R: Resistance (z ang. oporność - powstanie szczepów opornych na chemikalia), Resurgence (z ang. powrót do życia - wzrost występowania odpornego patogenu na środek ochrony roślin po jego zastosowaniu) i Replacement (z ang. zastąpienie – przekształcenie mniej wirulentnych patogenów na bardziej wirulentne, jako wynik ich mutacji, spowodowanej przez syntetyczne środki ochrony roślin). Powstała w warunkach polowych oporność patogenów na środki ochrony roślin może też być wynikiem hamowania przez środek ochrony roślin antagonistów patogenu. Niektóre fungicydy i nematocydy lub ich metabolity mogą bezpośrednio oddziaływać na zdrowie człowieka i zwierząt, wnikając do ich szlaków pokarmowych. Na podstawie ostatniego raportu Narodowej Akademii Nauk USA, fungicydy (ze wszystkich pestycydów, znajdujących się w produktach spożywczych) są aż w 60% odpowiedzialne za ryzyko powstawania nowotworów. Z tego powodu stosowanie PGPR do zwalczania patogenów jest sprawą niezwykle istotną (Singh i Prithiviraj, 1997).

2.5.4.2.1. Oddziaływanie za pomocą antybiotyków

Synteza antybiotyków (substancji, które już przy małych koncentracjach są szkodliwe dla innych mikroorganizmów) odgrywa istotną rolę w antybiozie pomiędzy poszczególnymi grupami mikroorganizmów i jest jednym z najbardziej efektywnych mechanizmów, za pomocą których PGPR zapobiegają namnażaniu się fitopatogenów w ryzosferze (Bowen i Rovira, 1999; De Leij i Lynch, 1997; Fravel, 1988; Glick, 1995; Kobus, 1999; Kurek i Kobus, 1990; O’Sullivan i O’Gara, 1992; Pietr, 1992; Ryder i McClure, 1997; Sobiczewski, 1994; van Loon, 1998; Weller, 1988). Izolaty bakteryjnych rodzajów *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Burkholderia* i innych mają zdolność ochrony roślin przed bakteryjnymi i grzybowymi chorobami roślin (Ryder i McClure, 1997). Szczególną zdolność do produkcji różnych antybiotyków mają bakterie z rodzajów *Pseudomonas* i *Bacillus* (Katz i Demain, 1977; Leisinger i Margraff, 1979; O’Sullivan i O’Gara, 1992; Świącicka i Hauszild, 1996). Mariano i in. (1997), Singh i Prithiviraj (1997), Tsuchiya (1997), Wenhua i Hetong (1997) i Wong (1994) informują, że szczepy należące do tych dwóch rodzajów są też najczęściej stosowane w ochronie różnych gatunków roślin (pszenicy, ryżu, rzepaku, soi, bawełny, kapusty, ogórka, pomidora, papryki, orzeszków ziemnych, imbiru) przed

patogenami (*Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera tritici-repentis*, *Fusarium graminearum*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stagonospora nodorum*, *Erwinia* sp., *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *P. solanacearum*). Dużą rolę odgrywają w tym takie antybiotyki jak fenazyny, pioluteoryna, pirrolnityryna, 2,4-diacetylofloroglucynol, bacillomycyna, fengymycyna, ituryna A, kanosamina, polimyksyna B, subsporyna, zwittermycyna A i inne (Bowen i Rovira, 1999; Glick, 1995; Kobus, 1999; Kurek i Kobus, 1990; O'Sullivan i O'Gara, 1992; Pietr, 1992; Ryder i McClure, 1997; Sobiczewski, 1994; Weller, 1988). Cytowani autorzy informują też o możliwym oddziaływaniu na patogeny korzeni roślin substancji lotnych, szczególnie HCN. Właśnie synteza HCN odpowiada za tłumienie przez biokontrolny szczep *Pseudomonas fluorescens* CHA0 czarnej zgnilizny korzeni tytoniu, spowodowanej przez *Thielaviopsis basicola* i chorób pszenicy, powodowanych przez *Septoria tritici* i *Puccinia graminis* (Flaishman i in., 1996 oraz Voisard i in., 1989).

Oprócz omawianych rodzajów bakterii, ważną rolę w biokontroli rozwoju patogenów na drodze antybiozy spełniają bakterie należące do rodzaju *Streptomyces*, a wśród grzybów ryzosferowych rodzaje *Trichoderma* i *Gliocladium*, wytwarzające antybiotyki o szerokim spektrum aktywności (Howell i Stipanovic, 1995 – cyt. za Bowenem i Rovirą, 1997; Kurek i Kobus, 1990; Paszkowski, 1993; Pietr, 1997; Strzelczyk, 1988).

W tym rozdziale można też wspomnieć o toksycznych białkowych metabolitach *Bacillus thuringiensis*, powodujących uszkodzenia błon komórkowych układu pokarmowego owadów, szkodników roślin. Oprócz *B. thuringiensis* istotną rolę w biologicznej kontroli owadów pełnią *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. papilliae* i *B. sphaericus* (Kobus, 1999; Kozdrój, 1997; Świącicka i Hauszild, 1996).

2.5.4.2.2. Biosynteza sideroforów

Żelazo jest bardzo ważnym mikroelementem dla wzrostu drobnoustrojów, włączając w to patogeny roślin. Większość mikroorganizmów wymaga Fe w stężeniu 10^{-6} M. W napowietrzanej glebie Fe występuje w formie żelazowej, która jest rozpuszczalna w wodzie w ilości 10^{-18} M. Ilość ta jest za mała dla wzrostu drobnoustrojów, szczególnie przy pH powyżej 7. Dlatego niektóre mikroorganizmy wydzielają niskocząsteczkowe organiczne związki, zwane sideroforami (z greckiego – nośniki żelaza), zdolne do selektywnego chelatowania jonów Fe^{3+} i ich aktywnego transportu przez błony biologiczne (De Leij i

Lynch, 1997; Księżniak i Kobus, 1993; Kurek i Jaroszuk, 1993; Neilands, 1988; O'Sullivan i O'Gara, 1992; Pietr, 1992).

Siderofory zalicza się zasadniczo do dwu klas: pochodnych fenoli (katechole) i kwasów hydroksamowych (Kurek i Jaroszuk, 1993). Siderofory hydroksamowe, z których większość jest wytwarzana przez grzyby, mają niższe od sideroforów katecholowych stałe kompleksowania (Paszkowski, 1993). Przykładem mikroorganizmów wytwarzających siderofory o bardzo wysokim pokrewieństwie do Fe^{3+} , znacznie przewyższającym stałe trwałości kompleksów Fe^{3+} z sideroforami grzybowymi, są fluoryzujące bakterie z rodzaju *Pseudomonas* wytwarzające pseudobaktryny - rozpuszczalne w wodzie fluoryzujące oligopeptydowe siderofory z pochodną chinolinową. Siderofory te są wyjątkowo stabilne w glebie (Kurek i Jaroszuk, 1993; Pietr, 1992).

Jurkevitch i in. (1992) stwierdzili, że 12-20% bakterii ryzosferowych mogło wykorzystywać Fe z sideroforów hydroksamowych, natomiast niektóre pseudobaktryny mogły być źródłem Fe jedynie dla 2% lub nawet mniej niż 1% bakterii. Pseudobaktryny, dzięki temu, że Fe^{3+} związane z nimi nie może być wykorzystywane przez wiele patogenów roślin (szczególnie grzybów), mogą wywoływać dla tych drobnoustrojów ostry niedobór Fe w ryzosferze i z tego powodu są jednym z ważniejszych mechanizmów ograniczających wzrost drobnoustrojów szkodliwych dla roślin (Bowen i Rovira, 1999; Glick, 1995; Kloepper i in., 1988; Kurek i Kobus, 1990; O'Sullivan i O'Gara, 1992; Sobiczewski, 1994; van Loon, 1998; Weller, 1988). Wymienieni w poprzednim zdaniu autorzy cytują cały szereg przykładów biologicznej ochrony różnych roślin (buraka cukrowego, lnu, ogórka, pomidora, pszenicy, rzodkiewki, ziemniaka) przed *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp., *Thielaviopsis basicola*, *Erwinia carotovora* i *Pseudomonas syringae* przez szczepy z rodzaju *Pseudomonas* za pośrednictwem wytwarzanych przez nie sideroforów.

2.5.4.2.3. Synteza enzymów litycznych

Wiele enzymów, np. chitynazy, β -glukanazy, celulazy, proteazy i lipazy syntetyzowane przez bakteryjne i grzybowe czynniki biokontrolne, są aktywne w lizowaniu strzępek grzybów (Bowen i Rovira, 1999; Glick, 1995; Kurek i Kobus, 1990; Strzelczyk, 1988; Sundheim i in., 1995; van Loon, 1998). Szczególnie ważna jest zdolność tych mikroorganizmów w syntezie chitynaz, albowiem chityna jest strukturalnym składnikiem ścian komórkowych strzępek grzybów, osłonek jaj nicieni oraz szkieletów owadów i

skorupiaków (Gooday, 1990; Hallmann i in., 1999). Wyjątkowo wrażliwe na działanie chitynaz są rosnące zakończenia strzępek grzybów (Kozłowska, 1992; van Loon, 1998). Bowen i Rovira (1999), Glick (1995), Kurek i Kobus (1990), Strzelczyk (1988) i van Loon (1998) przytaczają szereg przykładów, w których mikroorganizmy z rodzajów *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* i *Trichoderma* chroniły różne rośliny (buraki cukrowe, fasolę, goździki, groch, orzeszki ziemne i pomidory) przed patogenami z rodzajów *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* czy *Sclerotium*. Badania szeregu autorów (Galper i in., 1991- cyt. przez Bowena i Rovirę, 1999; Oka i in., 1993; Sikora, 1990; Spiegel i in., 1991 oraz Stirling, 1984) wykazały także możliwość zwalczania nicieni pasożytniczych dla roślin przez szczepienie nasion chitynolitycznymi bakteriami *Pseudomonas chitinolytica*, *Bacillus cereus*, *Bacillus penetrans* i innymi, należącymi do rodzajów *Bacillus* i *Pseudomonas*, oraz grzybem *Cunninghamella elegans*. Bowen i Rovira (1999) przypuszczają, że drobnoustroje te działały poprzez chitynazy i inne enzymy (kolagenazy, elastazy i keratynazy).

Dowodem na to, że drobnoustroje chitynolityczne należy traktować jako ważny czynnik sanitarny są wyniki badań, w których wzbogacenie gleby w chitynę znacznie podwyższało liczebność i aktywność glebowych drobnoustrojów chitynolitycznych, które skutecznie mogły ograniczać rozwój nicieni pasożytniczych oraz grzybowych fitopatogenów odglebowych (Gooday, 1990; Sikora, 1992 – cyt. za Paszkowskim, 1997; Strzelczyk, 1988). Paszkowski (1997) informuje w dyskusji, że oprócz korzystnych funkcji drobnoustrojów chitynolitycznych, istnieje niebezpieczeństwo powstawania tzw. ujemnego efektu mikoryzosferowego, będącego wynikiem hamowania przez te drobnoustroje procesu tworzenia się mikoryzy. Dowodem tego są wyniki badań Meyera i Lindermana (1986 – cyt. za Paszkowskim, 1997), którzy stwierdzili, że chitynolityczne szczepy *Streptomyces* są odpowiedzialne za hamowanie mikoryzy typu VAM z grzybem *Glomus fasciculatum*.

2.5.4.2.4. Konkurencja o pokarm i przestrzeń

Bowen i Rovira (1999) uważają, że konkurencja o substancje pokarmowe i miejsce ich wydzielania na korzeniach odgrywa ważną rolę w składzie zespołów mikroorganizmów w ryzosferze. Wyrażeniem tego jest łatwość całkowitej kolonizacji korzeni w glebie sterylnej w porównaniu do słabszej kolonizacji w glebie niesterylnej. Oczywiście, organizmy zdolne do szybkiego wzrostu i dobrego rozmieszczenia w glebie w dużej liczebności będą miały znaczną przewagę. Sobiczewski (1994) i Weller (1988) podają, że współzawodnictwo między

pożytecznymi mikroorganizmami i szkodliwymi jest prawie zawsze w jakimś stopniu odpowiedzialne za biologiczny efekt ochrony. Van Loon (1998) i Weller (1988) uważają, że szczególną rolę mogą tu odgrywać fluoryzujące pseudomonasy, ponieważ są one zdolne do wykorzystywania ogromnej ilości związków z wydzielin korzeniowych i dzięki szybkiemu wzrostowi w ryzosferze powinny ograniczać patogenom pulę dostępnych im substancji pokarmowych. Strzelczyk (1988) podaje, że na zjawisko konkurencji pomiędzy bakteriami a grzybami chorobotwórczymi duży wpływ wywiera stosunek C:N. Przy wysokiej jego wartości (C:N = 90) działanie konkurencyjne bakterii było największe, przy wąskim zaś (C:N = 3) – najmniejsze. Jednakże z powodu, że powierzchnia korzeni, skolonizowana przez bakterie *Pseudomonas*, jest ograniczona zaledwie do kilku procent, van Loon (1998) uważa, że fizyczne niedopuszczenie patogenu do korzeni przez bakterie jest raczej mało prawdopodobne. Przykładem działania za pośrednictwem konkurencji o pokarm i przestrzeń jest szczep A506 *Pseudomonas fluorescens*, który zastosowany zapobiegawczo na kwiaty gruszy, dzięki szybszemu wykorzystaniu składników pokarmowych i wcześniejszej kolonizacji możliwych miejsc infekcji, skutecznie eliminował *Erwinia amylovora* (Sobiczewski, 1994).

Kurek i Kobus (1990) dużą uwagę zwracają na możliwość wyeliminowania drobnoustrojów szkodliwych dla roślin przez wprowadzenie do środowiska niepatogenicznego mutantu tego samego gatunku. Przykładem skuteczności takiego zabiegu jest eliminacja *Pseudomonas syringae*, syntetyzującego białko inicjujące krystalizację lodu w tkankach roślin, co powoduje w roślinie uszkodzenia lodowe. Wprowadzenie do środowiska mutantu tej bakterii, pozbawionego genu „ice nucleation” dało dobre rezultaty ochronne (Davison, 1988 cyt. za Kurek i Kobus, 1990; Lindow i in., 1989). Analogicznym przykładem jest eliminacja *Agrobacterium tumefaciens* (wywołującego guzowatość korzeni roślin dwuliściennych, chorobę powodującą duże straty w sadach owocowych) przez *A. radiobacter*, szczep K84. Oprócz produkcji agrocyny 84, substancji hamującej wzrost wrażliwych szczepów *A. tumefaciens*, bakterie tego szczepu, wskutek wcześniejszego zasiedlenia możliwych miejsc infekcji, nie dopuszczają do porażenia roślin przez *A. tumefaciens* (Kurek i Kobus, 1990; Sobiczewski, 1994). W podobny sposób za pomocą PGPR z rodzaju *Pseudomonas* wyeliminowano z ryzosfery ziemniaka cyjanogenne szczepy DRMO, likwidując tym zjawisko wyziemniaczenia (Bakker i Schippers, 1987a; Bakker i Schippers, 1987b). Wong (1994) i Wong i in. (1996) obniżyli natężenie zgorzeli podstawy źdźbła pszenicy i uzyskali znaczny wzrost plonów w doświadczeniach polowych na różnych typach gleb, przez wprowadzenie niewirulentnego, odpornego na zimno szczepu *Gaeumannomyces*

graminis var. *tritici* (Ggt). W ochronnym działaniu niewirulentnych szczepów przed szczepami wirulentnymi, oprócz zjawiska współzawodnictwa o pokarm i przestrzeń istotne może być zjawisko indukowania odporności u roślin (Olivain i in., 1995).

Ciekawym zjawiskiem są gleby, w których wykształcił się naturalny czynnik biologiczny tłumiący rozwój chorób infekcyjnych, tzw. „disease-suppressive soils”. Czynnikiem tym może być odpowiedni skład jakościowy zespołów drobnoustrojów, m.in. duży udział antagonistycznych fluoryzujących bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (Alabouvette, 1995; Cook i Rovira, 1976; Schroth i Hancock, 1982; van Loon, 1998).

2.5.4.2.5. Indukcja odporności roślin

Jednym z przejawów korzystnego oddziaływania drobnoustrojów ryzosferowych na rośliny jest wyzwalanie w roślinach ich naturalnych mechanizmów obronnych przed patogenami i DRMO. Na szczególną uwagę zasługuje indukowanie w nich systemicznej odporności (ISR) na fitopatogeny - grzyby, wirusy, bakterie, nicienie czy owady (Bowen i Rovira, 1999; De Leij i Lynch, 1997; Kozłowska, 1992; Martinez-Ochoa i in., 1997; van Loon i in., 1997; van Loon, 1998; Sobiczewski, 1994). Pojęcie indukowanej systemicznej odporności (ISR) zaproponował Kloepper i in. (1992). Zjawisko to jest zbliżone do indukcji czynnej odporności, wywoływanej przez organizmy patogeniczne (van Loon, 1998). Bowen i Rovira (1999) oraz van Loon i in. (1997) podają, że szczepienie nasion bakteriami PGPR chroni nadziemne części roślin przed chorobami liści i łodyg, a bakteryzacja korzeni była tak samo efektywna jak szczepienie dolnych liści. ISR objawia się zwiększoną akumulacją fungistatycznych fitoaleksyn (Bowen i Rovira, 1999) czy wzrostem aktywności peroksydazy i dysmutazy nadtlenkowej oraz lignifikacją (Jetiyanon i in., 1997). Pod wpływem szczepienia nasion bakteriami PGPR może zmieniać się też skład białek roślin (Bowen i Rovira, 1999; van Loon i in., 1997).

Czynnikami indukującymi ISR mogą być powierzchniowe składniki ścian komórkowych bakterii (Press i Kloepper, 1997; van Loon i in., 1997), siderofory i kwas salicylowy (Press i in., 1997; Reimann i in., 1997; van Loon i in., 1997; van Loon, 1998) czy HCN (Defago i in., 1990 cyt. za Sobiczewskim, 1994).

Bowen i Rovira (1999) podają na podstawie badań zespołu Kloeppera (Liu i in., 1995; Raupach i in., 1996; Kloepper i in., 1996) że endofityczne bakterie były bardziej efektywne w indukcji ISR niż bakterie pochodzące z gleby ryzosferowej. Działanie mikroorganizmów

stymulujących ISR było różne w przypadku różnych odmian (Liu i in., 1994) czy różnych ekotypów (van Loon i in., 1997). Stwierdzono istotną nieliniową, asymptotyczną zależność pomiędzy początkową dawką inokulum bakteryjnego na korzeniach, a stopniem ISR. Dawka niższa niż 10^5 jtk (jednostek tworzących kolonie) g^{-1} korzeni, była nieefektywna (van Loon i in., 1997).

2.5.4.2.6. Mieszanki mikroorganizmów

Mieszanki mikroorganizmów mogą zwiększać skuteczność biokontroli. Duffy i in. (1996) stwierdzili, że mieszanka grzyba *Trichoderma koningii*, pochodzącego z gleby supresywnej, wytwarzającego toksynę przeciwko *Ggt*, z fluoryzującymi pseudomonasami, zwiększała skuteczność biologicznej kontroli zgorzeli podstawy źdźbła pszenicy. Także Duif i in. (1997), Lemanceau i in. (1992) oraz Park i in. (1988) wykazali, że dodatek produkującego pseudobaktynę szczepu *P. putida* do niepatogennego szczepu *Fusarium oxysporum*, lepiej chronił goździki, len i ogórki przed fuzariozą. Sung i Chung (1997) stwierdzili znacznie większą zdolność do ochrony ryżu przed *Rhizoctonia solani* mieszanki czterech szczepów bakterii - dwóch (*Streptomyces* sp. i *Bacillus cereus*), produkujących chitynazy i dwóch (*Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas cepacia*), syntetyzujących antybiotyki, niż stosowanych w innych kombinacjach. Dodatek chitosanu podnosił efekt biokontrolny. Podobnie Pierson i Weller (1994) wykazali, że mieszanki fluoryzujących pseudomonasów były bardziej aktywne w tłumieniu zgorzeli podstawy źdźbła pszenicy niż szczepy pojedyncze.

2.6. POPRAWA STRUKTURY GLEBY

Kobus (1999) stwierdza, że drobnoustroje są częściowo odpowiedzialne za tworzenie niektórych właściwości fizyko-chemicznych gleby. Szereg drobnoustrojów glebowych i ryzosferowych (*Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus* i *Pseudomonas*) wydzielają śluz, które poprawiają strukturę gleby, inicjując i promując procesy agregacji mineralnych cząstek glebowych (Hebbar i in., 1992; Martens i Frankenberger, 1991; Paul i Clark, 2000). Uważa się, że egzopolisacharydy drobnoustrojowe zapoczątkowują proces agregacji, a glikoproteiny i hydrofobowe frakcje kwasów tłuszczowych mogą pełnić znaczącą rolę w tworzeniu agregatów wodo-opornych (Martens i Frankenberger, 1991, 1992). Hydrofilne

egzopolisacharydy spełniają ważną rolę w zatrzymywaniu znacznych ilości wody, chroniąc glebę przed przesuszeniem (Martens i Frankenberger, 1992; Robertson i Firestone, 1992). Guggenberger i in. (1999) informują, że także grzyby mogą odgrywać ważną rolę w tworzeniu i stabilizacji makroagregatów glebowych. Miller i Jastrow (1990) i Tisdall (1994) wykazali, że stabilność makroagregatów jest zależna od długości strzępek grzybowych w glebie.

2.7. KOLONIZACJA KORZENI ROŚLIN PRZEZ MIKROORGANIZMY I ICH PRZEŻYWALNOŚĆ W ŚRODOWISKU GLEBOWYM

Wymagany warunkiem wstępnym do powodzenia działania szczepu o pożytecznych cechach, np. jako czynnika biokontrolnego, eliminującego szkodliwe drobnoustroje ryzosferowe, jest efektywna kolonizacja powierzchni korzeni przez dany szczep i jego przeżywanie na korzeniach w czasie rozwoju rośliny (Kozdrój, 1996a; Kurek i Kobus, 1990; O'Sullivan i O'Gara, 1992; Paszkowski, 1993; Pietr, 1992; Rattray i in., 1993). O'Sullivan i O'Gara (1992) oraz Mawdsley i Burns (1994) informują, że drobnoustroje wprowadzone do gleby poddane są silnej presji szeregu abiotycznych i biotycznych czynników glebowych, takich jak zawartość wody, temperatura, pH, typ gleby, skład wydzielin korzeniowych, zawartość składników mineralnych, oddziaływania innych mikroorganizmów i in. Z danych, jakie podają Bowen i Rovira (1999), Hozore i Aleksander, 1991; Kobus, 1999; Kurek i Kobus (1990), O'Sullivan i O'Gara (1992), Paszkowski (1993), Pietr (1992), Vande Broek i Vanderleyden (1995) oraz Van Peer i in. (1990) wynika, że czynnikami wpływającymi na efektywność kolonizacji korzeni przez mikroorganizmy są: ruchliwość komórek, zdolność do chemotaksji w kierunku wydzielin korzeniowych, zdolność do trwałej adhezji na powierzchni korzenia (zdolność do wytwarzania fimbrii i do aglutynacji hydrofobowych powierzchniowych białek komórek korzeni), zdolność do penetracji wnętrza korzenia i kolonizacji przestrzeni międzykomórkowych (m.in. aktywność pektynolityczna i celulolityczna), szybsze tempo wzrostu, zdolność do wykorzystania szerokiego spektrum substancji w wydzielinach korzeniowych, zdolność do wytwarzania substancji hamujących wzrost i rozwój potencjalnych konkurentów, zdolność do przeżywania w warunkach dla siebie niekorzystnych, tolerancja osmotyczna i in. Lynch (1989) informuje, że aby szczep bakterii, wprowadzany do ryzosfery jako szczepionka odniósł sukces, powinien rosnąć

kopiotroficznie na substracie dostarczonym do gleby przez korzenie, ale też powinien być oligotrofem, gdy skończy się obfite źródło pokarmu i przeżyć do czasu nowego dopływu substratów.

Korzenie wielu roślin wydzielają substancje swoiste, które są czynnikiem rozpoznawczym dla mikroorganizmów, np. bakterie z rodzajów *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* reagują na lektyny, wydzielane przez rośliny motylkowate, patogeniczne szczepy *Agrobacterium tumefaciens* wykazują chemotaksję w kierunku opin, wydzielanych przez komórki przyranne uszkodzonych korzeni, *Azospirillum* charakteryzuje się wysoką mobilnością do niskich stężeń kwasów organicznych, występujących w wydzielinach korzeniowych a fluoryzujące *Pseudomonas* wykazują chemotaksję dodatnią w kierunku asparaginy, treoniny i waliny w stężeniach występujących w wydzielinach korzeniowych (Kurek i Kobus, 1990; Paszkowski, 1993). Ciekawe badania wykonali Gitte i in. (1978). Rozdzielili oni wydzieliny siewek ciecierzycy pospolitej na 3 frakcje: (a) anionową - zawierającą kwasy galakturonowy i glukonowy; (b) kationową - zawierającą alaninę, argininę, kwas asparaginowy, cystynę, glicynę, histydynę, izoleucynę, leucynę, lizynę i serynę; (c) obojętną - zawierającą arabinozę, glaktozę, glukozę, rybozę i ksylozę. Reakcja chemotaksji *Rhizobium* była najsłabsza wobec frakcji anionowej, a najsilniejsza wobec frakcji kationowej. Maksymalną chemotaksję otrzymano jednak wobec mieszaniny wszystkich frakcji. Badając wpływ pojedynczych związków stwierdzono, że bakterie wykazywały najwyższą chemotaksję do histydyny wśród aminokwasów i glukozy wśród cukrów i kwasów cukrowych, a ujemną reakcję stwierdzono w przypadku alaniny i kwasu glukonowego

Szereg właściwości fizykochemicznych gleb (struktura gleby, wilgotność, temperatura, pH, dostępność tlenu, dostępność substancji pokarmowych i obecność toksycznych związków) i czynników biologicznych (bakteriofagi, pierwotniaki, inne drobnoustroje i ich metabolity, korzenie roślin i ich wydzieliny) decyduje o przeżywalności mikroorganizmów wprowadzanych do gleby (Kozdrój, 1996a).

Wyższa zawartość frakcji ilastej w zasadniczy sposób wpływa na lepszą przeżywalność drobnoustrojów. Także dodawanie do gleby bentonitu czy kaolinitu poprawia przeżywalność wprowadzanych mikroorganizmów. Minerale ilaste tworzą siedliska, chroniące mikroorganizmy przed drapieżcami glebowymi i zapewniają dostępność wody i substancji odżywczych (England i in., 1993; Heijnen i van Veen, 1991; Heijnen i in., 1992; Heijnen i in., 1993; Kozdrój, 1996a; Palmer i in., 1997). Nie tylko zawartość w glebie ale i jakość minerałów ilastych jest istotna w przeżywalności bakterii. Stutz i in. (1989) stwierdzili, że szczep *Pseudomonas fluorescens*, przechowywany w czystym wermikulicie lub w ile z

gleby tłumiącej czarną zgniliznę tytoniu, zawierającym głównie wermikulit, mógł być reizolowany w czasie do 6 miesięcy i przeżywał w tych minerałach w 60°C przez 2 godziny. Natomiast w ile z gleby sprzyjającej chorobie, zawierającym głównie illit i smektyt oraz w czystym illicie lub na podłożu Kinga B, bakterie przeżywały krócej niż miesiąc i były zabijane przez działanie gorąca. Autorzy ci ułożyli czyste minerały ilaste pod względem wspomagania przeżywania bakterii i kolonizowania przez nie korzeni w następującym szeregu: wermikulit > montmorylonit > illit.

Wilgotność ok. 25%, co odpowiada ok. 50% maksymalnej pojemności wodnej, oraz niższe temperatury (ok. 4°C) w porównaniu do 15-27°C, najczęściej były optymalnymi dla przeżywalności bakterii (Kozdrój, 1996a; Mawdsley i Burns, 1994; Vandenhove i in., 1991), chociaż Davies i Whitbread (1989) oraz Rattray i in. (1993) informują, że tempo kolonizacji gleby przykorzeniowej i korzeni pszenicy lub rzodkiewki przez szczepy *Pseudomonas fluorescens* było najwyższe w najwyższej z badanych temperatur (22°C).

Przeważnie liczebność wprowadzonych bakterii spada wraz ze wzrostem stężenia H⁺ w roztworze glebowym, chociaż niektóre szczepy bakterii tolerują zwiększone zakwaszenie środowiska (Kozdrój, 1996a). Z powodu większej zasobności w substancje pokarmowe, wydzielane przez korzenie roślin i uwalnianych z gleby związków mineralnych, Angle i in. (1995), Mawdsley i Burns (1994), Molina i in. (2000) oraz szereg autorów cytowanych przez Kozdrója (1996a) wskazują na wyraźnie lepszą przeżywalność wprowadzanych bakterii genetycznie zmodyfikowanych w ryzosferze niż w glebie pozakorzeniowej.

Drastyczny spadek liczebności bakterii wprowadzanych do gleby, przypisuje się drapieżnej aktywności mikroorganizmów glebowych i obecności w glebie drobnoustrojów zajmujących tę samą niszę ekologiczną. Szczególnie intensywnej konkurencji ze strony rodzimej mikroflory ryzosferowej i działaniu ich metabolitów, podlegają drobnoustroje kolonizujące korzenie (Casida, 1992; Davies i Whitbread, 1989; Heijnen i in., 1993; Kozdrój, 1996a; Rattray i in., 1995).

2.8. WYKORZYSTANIE POŻYTECZNEJ MIKROFLORY RYZOSFEROWEJ W PRAKTYCE (KOMERCYJNE PRODUKTY BIOLOGICZNE)

Proces wprowadzania produktów handlowych zwiększających plony roślin jest stosunkowo powolny, chociaż ostatnio uległ pewnemu przyspieszeniu. W 1994 r. Harris rozważał, że pomimo czterech dekad badań nad biologiczną kontrolą odglebowych grzybów fitopatogenicznych, zaledwie kilka obiecujących bakteryjnych antagonistów zostało skomercjalizowanych, a Wong (1994) stwierdził, że minęło już ponad 15 lat od czasu pierwszych badań polowych nad biologiczną kontrolą *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* z zastosowaniem antagonistycznych glebowych bakterii i grzybów, a ciągle nie ma na rynku komercyjnego produktu, z powodu znacznej zmienności wyników otrzymanych w różnych miejscach i latach oraz tylko małej lub umiarkowanej efektywności, nieistotnej z ekonomicznego punktu widzenia. Również Pietr (1990) informował, że praktycznie nie było żadnego komercyjnego preparatu, zawierającego saprotroficzne mikroorganizmy stymulujące bezpośrednio wzrost roślin w warunkach polowych, poprzez własne metabolity, z powodu braku powtarzalności wyników. Podał on tylko jeden przykład powtarzalnych wyników doświadczeń polowych ze szczepem Sp7 *Azospirillum brasilense*. Podobne zdanie o przyczynie braku powtarzalności wyników w warunkach polowych na powolne wprowadzanie szczepionek w praktyce rolniczej, wyrazili Kurek i Kobus (1990). Na podstawie ich pracy, oraz publikacji Harrisa (1994) i Sobiczewskiego (1994) można wymienić zaledwie dziewięć komercyjnych preparatów biologicznych, których stymulujący wpływ na wzrost roślin jest związany z kontrolą patogenów (Kodiak, Quantum 4000 i Bactophyt, powstałe na bazie szczepów *Bacillus subtilis*; preparat zawierający *Phlebia gigantea*; Galtrol A i Polagrocyna z *Agrobacterium radiobacter* K84; wycofany już Dagger G, powstały na bazie *Pseudomonas fluorescens*; Mycostop, zawierający *Streptomyces griseoviridis* oraz Frostban B ze szczepem *Pseudomonas fluorescens* A506).

Kilka lat później, na międzynarodowej konferencji w Sapporo w 1997r. nt. „Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria: Present Status and Future Prospects”, Tsuchiya K. (1997) informował, że w Japonii zarejestrowane są tylko dwa preparaty (jeden oparty na *Agrobacterium radiobacter* K84, a drugi na niepatogennym *Fusarium oxysporum*, a Mariano i in. (1997) podali, że dotychczas nie ma w Brazylii produktu komercyjnie dostępnego, chociaż kroki z wprowadzeniem preparatu, opartego na *B. subtilis* są zaawansowane. Singh i

Prithiviraj (1997) informowali, że w Indiach w stadium prób przez farmerów są preparaty oparte na *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *Gliocladium virens* i szczególnie *Pseudomonas fluorescens* – który nie tylko jest czynnikiem biokontrolnym, ale także stymuluje wzrost roślin. Wenhua i Hetong (1997) stwierdzili, że w Chinach aktualnie zostały zarejestrowane jako produkty handlowe dwa szczepy *Trichoderma* spp., jeden szczep *B. subtilis* i jeden szczep *Pseudomonas cepacia*, a kilka innych (dwa szczepy *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *P. fluorescens* i *Paecilomyces lilacinus* wkrótce będą zarejestrowane. Autorzy ci zaznaczają, że chociaż w Chinach już w 1987 r. stosowano handlowe YIB na 3,35 mln ha, aż na 48 roślinach uprawnych, duża zmienność wyników jest poważnym problemem.

Dwa lata później, w swojej pracy przeglądowej, Bowen i Rovira (1999) poinformowali, że na liście USDA znajduje się 36 dostępnych na całym świecie produktów komercyjnych do biologicznej kontroli chorób roślin. Na początku 2001 roku, na podstawie danych (zamieszczonych 20 sierpnia 2000 r.) uzyskanych ze strony internetowej Beltsville Agricultural Research Service / Plant Science Institute / Biocontrol of Plant Diseases Laboratory (<http://www.barc.usda.gov/psi/>), można stwierdzić, że na liście USDA znajduje się już 50 preparatów komercyjnych do biologicznej kontroli chorób roślin. Są one wykonane na bazie siedmiu gatunków bakterii (*A. radiobacter* - Galltrol-A, Nogall, Diegall i Norbac 84C; *B. subtilis* - Subtilex, Companion, Kodiak, Rhizo Plus, Serenade, System 3 i HiStick N/T; *Burkholderia cepacia* - Intercept; *P. chlororaphis* - Cedomon; *P. fluorescens* - BlightBan A506 i Conquer; *P. syringae* - Bio-save 100 i Bio-save 110; *S. griseoviridis* - Mycostop) i dwunastu gatunków grzybów (*Ampelomyces quisqualis* - AQ10; *Candida oleophila* - Aspire; *Coniothyrium minitans* - Contans i KONI; *Fusarium oxysporum* - Biofox C i Fusaclean; *Gliocladium virens* - SoilGard; *Gliocladium catenulatum* - PreStop i Primastop; *Paecilomyces lilacinus* - Paecil; *Phlebia gigantea* - Rotstop i P.g. Suspension; *Pythium oligandrum* - Polyversum; *Talaromyces flavus* - Protus; *Trichoderma harzianum* - Bio Fungus, Binab T, Root Pro, RootShield, T-22G, T-22, Planter Box, Bio-Trek, Supresivit, Trichodex, Trichopel, Trichoject, Trichodowels, Trichoseal i Trichoderma 2000; *Trichoderma viride* - Trieco i EcoSOM. Dwa z nich: Polyversum i Binab T, służą m.in. do ochrony zbóż przed *Gaeumannomyces graminis*.

Bowen i Rovira (1999) uważają, że preparaty biologiczne, wykorzystywane komercyjnie powinny być łatwe do użycia w polu i być bezpieczne dla użytkownika, powinny zawierać wysoką liczebność komórek bakterii lub grzybów, mających zdolność do długiego przeżywania „na półce” oraz dużą zdolność do przemieszczania się w celu skolonizowania korzeni roślin.

Preparaty grzybowe stosowane są w postaci granulek, bryłek, proszków, a bakterie i promieniowce w formie liofilizatów, kultur płynnych lub agarowych, zawiesin w roztworach gum roślinnych, metylocelulozy lub skrobi. Jako nośniki kultur bakteryjnych stosowane są torf, minerały ilaste, węgiel bitumiczny, węglan wapnia, talk, zeolit a nawet tak dziwne substancje jak okrywy nasion kawy, kompostowane z obornikiem (Bowen i Rovira, 1999; Singh i Prithiviraj, 1997; Tsuchiya, 1997; Wenhua i Hetong, 1997).

Przeżywalność niektórych preparatów biologicznych jest wysoka. Wenhua i Hetong (1997) informują, że liczebność biokontrolnego szczepu bakterii *Pseudomonas fluorescens* po przechowywaniu „na półce” przez rok na nośniku z attapulgitu z gumą ksantanową wynosiła 10^9 jtk g⁻¹. Podobnie, preparaty oparte na niepatogennych szczepach *Fusarium* można przechowywać przez okres około 1 roku w 4 lub 5°C (Alabouvette i in., 1996; Tsuchiya, 1997).

2.9. STRATEGIE ZWIĘKSZANIA EFEKTYWNOŚCI PGPR I SPOJRZENIE NA PRZYSZŁOŚĆ

Glick (1995) stwierdza, że chociaż dzięki wykorzystaniu metod konwencjonalnej mutagenезy i selekcji, niewątpliwie powstaną efektywniejsze szczepy PGPR, to prawdziwie doskonale szczepy będzie można uzyskać za pomocą inżynierii genetycznej. Jedną ze strategii wg Glicka (1995) jest otrzymanie szczepów PGPR z wprowadzonym genem z *Bacillus thuringiensis*, odpowiedzialnym za powstawanie toksyny przeciwko owadom.

Według Kurek i Kobusa (1990) poważnym problemem limitującym powodzenie stosowania szczepionek PGPR są nie poznane do końca czynniki kontrolujące efektywną kolonizację korzeni przez drobnoustroje, ponieważ PGPR aby działać skutecznie, muszą efektywnie kolonizować korzenie i intensywnie rozwijać się w ryzosferze. Podobny pogląd przedstawiają Bowen i Rovira (1999) oraz O’Sullivan i O’Gara (1992). Glick (1995) podaje kilka kierunków do uzyskania szczepów za pomocą inżynierii genetycznej, co spowoduje, że szczepy te będą miały wyższą zdolność do przeżywania na korzeniach roślin. Jednym ze sposobów jest utworzenie szczepu (o korzystnych dla roślin cechach) o dużych zdolnościach do syntezy enzymów (np. dysmutazy nadtlenkowej, katalazy i peroksydazy) obniżających poziom aktywnego tlenu, wydzielanego przez korzenie roślin przeciwko organizmom zasiedlającym korzenie. Inną drogą jest wprowadzenie genu, odpowiedzialnego za syntezę białka, wydzielanego do podłoża i chroniącego mikroorganizm przed powstawaniem

kryształów lodu, co pozwoliłoby na lepsze jego przeżywanie w niskich temperaturach. Jeszcze innym podejściem jest dążenie do otrzymania szczepu PGPR, mającego zdolność do wykorzystanie wielu sideroforów, syntetyzowanych przez inne mikroorganizmy.

Bowen i Rovira (1999) oraz Pietr (1992) wyrażają pogląd, że możliwość wykorzystywania specyficznych związków organicznych jako źródeł węgla i energii może odgrywać kluczową rolę w manipulowaniu drobnoustrojami w ryzosferze. Colbert i in. (1993) oraz Fukui i in. (1994) stwierdzili, że dodatek salicylanu sodu do gleby zwiększył populacje genetycznie zmienionego szczepu *Pseudomonas putida*, wykorzystujący salicylan jako źródło węgla i energii. Podobne wyniki uzyskali Devliegher i in. (1995), którzy znacznie zwiększyli, po dodatku do gleby różnych detergentów, przeżywalność w glebie i kolonizację ryzosfery kukurydzy przez szczepy *P. aeruginosa* i *P. fluorescens*, zaadaptowane do ich wykorzystywania jako źródło C. Wyhodowanie roślin, zdolnych do wydzielania przez korzenie wysoce specyficznych substratów i wprowadzenie jako szczepionki genetycznie zmodyfikowanych szczepów mikroorganizmów o korzystnych dla roślin cechach to według Bowena i Roviry (1999) idealny model. Przykładem takiego podejścia są badania Farranda i in. (1994). Autorzy ci stwierdzili, że szczep *Pseudomonas syringae*, mający zdolność wykorzystywania opin produkowanych przez tytoń, osiągnął w ryzosferze tej rośliny kilkakrotnie wyższą liczebność niż szczep bakterii nie wykorzystujący opin. Spryskiwanie części nadziemnych roślin specyficznymi substancjami (np. organofosforowym insektycydem „Diazonin” - Gunner i in., 1966) może także selektywnie zmieniać zespoły mikroorganizmów ryzosferowych. Podobny pogląd wyraził Glick (1995), który informuje, że zdolność niektórych PGPR do hydrolizy 1-aminocyklopropano-1-karboksylanu i wykorzystania tego związku jako źródła azotu, może prowadzić do zwiększenia potencjału konkurencyjności tych szczepów w ryzosferze.

Pożyteczne bakterie wg Sobiczewskiego (1994) nie będą w najbliższym czasie uniwersalnym panaceum w walce z chorobami roślin i przeciwwagą metody chemicznej. Pewne jest jednak, że w niektórych uprawach i przeciwko niektórym patogenom będą wielką szansą, szczególnie w uprawach szklarniowych, kontenerowych i w przechowalniach, czyli tam, gdzie istnieją możliwości kontrolowania i regulacji warunków otoczenia. Uważa on, że pomimo dużego zaawansowania prac o charakterze praktycznym, wciąż jesteśmy na początku drogi do szerszej „współpracy” z bakteriami. Do osiągnięcia tego celu potrzebne będą wnikliwe badania ekologiczne, jak też wykorzystanie metod inżynierii genetycznej. Ich owocem jest np. uzyskanie i wprowadzenie do praktyki genetycznie zmodyfikowanego szczepu K1026 *A. radiobacter*. Sobiczewski (1994) uważa także, że zastosowanie metody

biologicznej do ochrony roślin, będących środkami żywności, stwarza konieczność przeprowadzenia wielokierunkowych badań zarówno o charakterze epidemiologicznym, jak i toksykologicznym.

Z drobnoustrojami genetycznie zmodyfikowanymi (DGZ) wprowadzanymi do środowiska glebowego związane jest ryzyko, wobec możliwości transferu informacji genetycznej w postaci plazmidów i transpozonów do populacji rodzimych drobnoustrojów glebowych i wodnych (Kozdrój, 1996b; Kozdrój, 1997). W celu zminimalizowania tego ryzyka niezbędna jest gruntowna wiedza o przeżywalności mikroorganizmów wprowadzonych do gleby, zwłaszcza w warunkach polowych (Angle i in., 1995; Kozdrój, 1996a; Natsch i in., 1996; O'Sullivan i O'Gara, 1992). Kozdrój (1996a) stwierdza, że badania nad wprowadzeniem rekombinantów do gleby ukazały jak ograniczona jest wiedza o ekologii drobnoustrojów glebowych. Wg O'Sullivana i O'Gary (1992) wiedza ta jest potrzebna przed wprowadzeniem DGZ do gleby. Należy ją poznać wcześniej, na podstawie badań z użyciem szczepów dzikich. Inną drogą do zabezpieczenia się przed nieznanymi skutkami, jest wprowadzanie DGZ, które posiadając geny samodestrukcji, uśmiercają się po określonym czasie (Kozdrój, 1997; Lindow i in., 1989). Wielką potrzebę badań ekologicznych (i genetycznych) nad kolonizacją korzeni roślin przez drobnoustroje i ich przeżywaniem w środowisku zgłaszają również Kluepfel (1993), Kurek i Kobus (1990) i Rattray i in. (1993).

3. CELE PRACY

- (a) określenie ilościowych i jakościowych zmian w zespołach bakteryjnych i grzybowych, zasiedlających różne strefy ryzosfery pszenicy ozimej w różnych fazach rozwojowych rośliny;
- (b) poznanie niektórych właściwości wyizolowanych szczepów bakterii, na podstawie których można sądzić o ich zdolnościach do: udostępniania roślinom niektórych składników pokarmowych, korzystnego oddziaływania na wzrost i rozwój roślin poprzez wytwarzane metabolity oraz ochrony roślin przed patogenami grzybowymi;
- (c) zbadanie przeżywalności szczepów (należących do grupy bakterii, wybranej na podstawie pozytywnych cech) w glebie oraz ich zdolności do kolonizowania ryzosfery pszenicy;
- (d) określenie wpływu tych wybranych szczepów bakterii na wzrost i plon pszenicy ozimej oraz jej zdolności do ochrony pszenicy przed patogenami grzybowymi w doświadczeniach laboratoryjnych i poletkowych.

4. METODYKA BADAŃ

4.1. GLEBA I MATERIAŁ ROŚLINNY

Pszenicę ozimą *Triticum aestivum* L. cv. Gama uprawiano na polu produkcyjnym Zakładu Doświadczalnego w Antopolu (należącego do Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach), miejscowości położonej w województwie lubelskim, ok. 30 km na południowy wschód od Puław. Gleba brunatna wytworzona z lessu, znajdująca się w tym miejscu, zawierała ok. 0,8% C i 0,08% N, a jej pH(H₂O) wynosiło 7,2.

4.2. TERMINY POBIERANIA PRÓBEK KORZENI PSZENICY OZIMEJ

Profil gleby wraz z rosnącymi roślinami (nasiona wysiano 10 września) pobierano do badań w następujących stadiach rozwojowych pszenicy ozimej: 10 października - w fazie drugiego liścia; 27 kwietnia - w fazie 4 liścia; 5 czerwca - w stadium kwitnienia i 20 lipca - w stadium pełnej dojrzałości.

4.3. PRZYGOTOWANIE KORZENI ROŚLIN DO ANALIZY MIKROBIOLOGICZNEJ

Natychmiast po przywiezieniu do laboratorium, rośliny pszenicy ozimej ostrożnie oddzielano od gleby. Następnie, za pomocą otrząsania pozbywano się nadmiaru gleby, pozostawiając na korzeniach jedynie warstewkę gleby bezpośrednio (i ściśle) do nich przylegającą. Korzenie odcinano od części nadziemnych. Odważone 10 g próbki korzeni z przylegającą do nich glebą przenoszono do butelek zawierających 90 ml sterylnej wody i wytrząsano na wytrząsarce mechanicznej przez 20 minut. Otrzymana zawiesina, zawierająca glebę przykorzeniową oraz fragmenty drobnych korzeni, stanowiła pierwszą strefę ryzosfery. Zawierała ona drobnoustroje znajdujące się w glebie ściśle przylegającej do korzeni. Mogła

też zawierać pewną, nieznaną ilość drobnoustrojów z powierzchni korzeni. Tę strefę nazwano **ektoryzosferą**, według De Leij i Lyncha (1997).

Z innej partii korzeni większość gleby usuwano poprzez odmywanie strumieniem wody wodociągowej. Następnie, za pomocą energicznego, ręcznego wytrząsania w kolbie, usuwano z korzeni resztki gleby poprzez 10-krotnie ich przemywanie sterylną wodą. Tak przygotowane korzenie - oczyszczone od gleby - przenoszono do butelek, zawierających 100 ml sterylnej wody i 30 g sterylnej, ostrego, gruboziarnistego piasku. Korzenie wytrząsano z piaskiem przez 20 minut na wytrząsarce mechanicznej. Uzyskana zawiesina - zdarta przez piasek zewnętrzna warstwa korzeni - stanowiła drugą strefę ryzosfery. Zawierała ona mikroorganizmy znajdujące się na powierzchni korzeni lub w ich powierzchniowej warstwie - epidermie. Tę strefę nazwano **ryzoplana** (za De Leij i Lynch, 1997).

Korzenie, pozostałe po wydzieleniu drugiej strefy, kilkakrotnie przemywano sterylną wodą destylowaną, a następnie dzielono na dwie części. Pierwszą z nich homogenizowano ręcznie ze sterylną wodą w szklanym homogenizatorze Pottera. Homogenat korzeni stanowił trzecią strefę ryzosfery. Zawierała ona drobnoustroje znajdujące się we wnętrzu korzeni, najprawdopodobniej głównie w warstwie korowej (De Leij i Lynch, 1997; Kloepper i in., 1992). Mogła też zawierać pewną, nieznaną pozostałość strefy drugiej, czyli powierzchniowej części korzeni. Uznano, że jest to frakcja przejściowa pomiędzy powierzchnią i „głębszym” wnętrzem korzeni. Dlatego strefę tę nazwano **ryzoplana/endoryzosfera** (pod wpływem De Leij i Lynch, 1997).

Drugą część opłukanych korzeni, pozostałych po wydzieleniu strefy drugiej poddano powierzchniowemu odkażaniu poprzez zanurzenie ich w 70% etanolu przez 15 minut i następnie przez zanurzenie w 3% H_2O_2 przez kolejne 15 minut. Po kilkakrotnym opłukaniu sterylną wodą, korzenie homogenizowano w identyczny sposób jak korzenie nieodkażane. Homogenat korzeni odkażanych powierzchniowo stanowił strefę czwartą, która najprawdopodobniej była głębszą częścią strefy trzeciej. Zawierała ona drobnoustroje znajdujące się we wnętrzu korzeni. Strefę tę nazwano **endoryzosfera** (za De Leij i Lynch, 1997).

4.4. ANALIZY MIKROBIOLOGICZNE ZESPOŁÓW

DROBNOUSTROJÓW RYZOSFEROWYCH I IZOLACJA SZCZEPÓW

W uzyskanych frakcjach, będących różnymi strefami ryzosfery (korzeni pszenicy ozimej z przylegającą do nich glebą), stosując technikę rozcieńczeń, oznaczano:

- **ogólną liczebność grzybów**, po 3 dniach inkubacji w temperaturze 27°C, na podłożu Martina, o składzie: 10 g glukozy, 5 g peptonu, 1 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g agaru i 1000 ml wody destylowanej - pH pożywki wynosiło 6,5. Przed rozlaniem na płytki dodawano do pożywki 50 mg streptomycyny i 4 ml 1% roztworu różu bengalskiego;
- **ogólną liczebność bakterii**, po 5 dniach inkubacji w temperaturze 27°C, na podłożu Kinga B, zawierającym: 20 g peptonu, 1,5 g K_2HPO_4 , 1,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 ml glicerolu, 14 g agaru i 1000 ml wody destylowanej - pH pożywki wynosiło 7,2.

Bakterie i grzyby, po obliczeniu ich ogólnej liczebności, izolowano z płytek na takie same podłoża hodowlane, a po ich wyrośnięciu, poddano oczyszczaniu aż do uzyskania czystych kultur. Drobnoustroje izolowano z wszystkich kolonii z wybranego rozcieńczenia. Ponadto, grzyby i bakterie izolowano z kolonii, wyrosłych wokół położonych na powierzchni wyżej wymienionych podłoży mikrobiologicznych, półcentymetrowych odcinków tych samych korzeni (odkaszanych powierzchniowo i nieodkaszanych), z których sporządzano homogenaty (odpowiadające strefom - ryzoplana/endoryzosfera i endoryzosfera).

Z homogenatów korzeni izolowano drobnoustroje (mające zdolność do wzrostu na pożywkach sztucznych) najliczniejsze w warstwie powierzchniowej i we wnętrzu korzeni. Dodatkowo, postanowiono izolować drobnoustroje z odcinków tych samych korzeni, układanych na pożywki agarowe. Założono, że ta technika pozwoli na wyodrębnienie szczepów, które m.in. dzięki swemu szybkiemu wzrostowi, wcześniej od innych zasiedlają nowe środowisko, w tym przypadku powierzchnię pożywki agarowej wokół wyłożonych odcinków korzeni, a w praktyce być może także powierzchnię korzenia. Wydawało się, że tego rodzaju szybko rosnące szczepy mikroorganizmów mogą być szczególnie przydatne jako materiał do ewentualnej przyszłej szczepionki, poprawiającej wzrost i zdrowotność roślin. Według pojęć ekologicznych (De Leij i in., 1993) taki typ bakterii, szybko rosnących i jako pierwsze kolonizujących nowe środowisko, to tzw. „r-stratedzy”, które w przeciwieństwie do

„K-strategów”, czują się dobrze w bogatych w składniki pokarmowe i nie zatłoczonych środowiskach.

4.4.1. Identyfikacja wyizolowanych szczepów grzybów

Identyfikację wyodrębnionych grzybów przeprowadzono na podstawie ich cech morfologicznych według różnych kluczy, używanych do klasyfikacji grzybów, głównie klucza Domscha i in. (1980).

4.4.2. Identyfikacja wyizolowanych szczepów bakterii

Identyfikację bakterii przeprowadzono na podstawie ich cech morfologicznych i biochemicznych opisanych przez Harrigan i McCance (1966) i sklasyfikowano według klucza Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984-1989).

(1) Przy klasyfikacji oparto się na następujących **cechach morfologicznych** bakterii:

- morfologia (kształt i zabarwienie) kolonii na agarze odżywczym;
- wymiary i kształty komórek w preparatach mikroskopowych barwionych metodą Grama, otrzymanych z 24 godzinnych hodowli badanych szczepów na agarze odżywczym;
- ruchliwość bakterii w kropli wiszącej z 24 godzinnej hodowli w bulionie odżywczym;
- obecność endospor po zabarwieniu komórek zielenią malachitową;
- kwasooporność metodą Ziehl-Neelsena.

(2) **Cechy biochemiczne** wyodrębnionych szczepów bakterii określano na podstawie następujących testów:

- zdolność do wykorzystania węglowodanów i alkoholi (glukozy, arabinozy, laktozy, glicerolu);
- zdolność do wykorzystania cytrynianów - na podłożu agarowym Simmons'a z błękitem bromotymolowym;
- wytwarzanie oksydazy cytochromowej - na bibule filtracyjnej, nasyconej 1% roztworem N,N-dimetylo-p-fenyldiaminy;
- biosyntezę katalazy - przy użyciu 3% H₂O₂;
- aktywność ureazy - na agarowym podłożu Christensena;

- produkcję kwasów z glukozy - na podłożu Hugh-Leifsona z błękitem bromotymolowym;
- próbę Voges-Proskauera na produkcję acetylometylokarbinolu z glukozy - według zmodyfikowanej metody Barritta, przy użyciu 6% etanolowego roztworu α -naflotu i 16% KOH;
- wytwarzanie indolu z tryptofanu - w podłożu płynnym (pepton 10 g, NaCl 5 g, H₂O 1000 ml) o pH 7,2. Obecność indolu wykrywano odczynnikiem Kovacs'a;
- redukcję azotanów - w pożywce płynnej (0,1% KNO₃ w wodzie peptonowej). Obecność azotynów oznaczano odczynnikiem Griessa i Ilosvaya z dodatkiem lub bez pyłu cynkowego;
- hydrolizę żelatyny - na zmodyfikowanym podłożu Fraziera z roztworem HgCl₂ jako odczynnik wywołujący;
- wytwarzanie barwników fluoryzujących na podłożu B King'a.

(3) Identyfikację *Erwinia* przeprowadzono według klucza Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984), wykorzystując ich następujące cechy biochemiczne (oznaczane według Harrigan i McCance, 1966):

- wytwarzanie żółtego barwnika na agarze odżywczym;
- wytwarzanie gazu z D-glukozy;
- wytwarzanie kwasów z L-arabinozy, laktozy i glicerolu;
- wytwarzanie indolu (opis w punkcie 2);
- wytwarzanie acetylometylokarbinolu z glukozy (opis w punkcie 2);
- synteza ureazy (opis w punkcie 2);
- hydroliza żelatyny (opis w punkcie 2);
- rozkład pektyn - test, wykazujący rozkład tkanek krążków ziemniaka;
- wykorzystanie cytrynianu (opis w punkcie 2);
- redukcja azotanów (opis w punkcie 2).

(4) Identyfikację fluoryzujących bakterii z rodzaju *Pseudomonas* przeprowadzono według klucza Begey's Manual of Systematic Bacteriology (1984-1990), wykorzystując ich następujące cechy biochemiczne (opisane przez Harrigan i McCance, 1966):

- wytwarzanie oksydazy cytochromowej (opis w punkcie 2);

- hydrolizę argininy w warunkach beztlenowych na podłożu Thornley'a;
- hydrolizę żelatyny (opis w punkcie 2);
- wytwarzanie lewanu na podłożu z sacharozą;
- denitryfikację z wykorzystaniem odczynnika Griess'a-Ilosvay'a, proszku cynkowego i rurek Durhama;
- wzrost bakterii na pożywkach zawierających trehalozę, adonitol lub sorbitol jako jedyne źródło C.

4.5. BADANIA (IN VITRO) ZDOLNOŚCI WYIZOLOWANYCH SZCZEPÓW BAKTERII DO HAMOWANIA WZROSTU GRZYBOWYCH PATOGENÓW PSZENICY I DO PRZEMIAN NIEKTÓRYCH ZWIĄZKÓW C, P i S

4.5.1. Aktywność antagonistyczna bakterii przeciwko dwu groźnym patogenom korzeni podstawy źdźbła pszenicy - *Gaeumannomyces graminis*. var. *tritici* (Ggt) (Kuś i Mróz, 1996; Martyniuk, 1986) i *Fusarium culmorum* (Fc) (Bandurska i in., 1994; Cook, 1992; Kurek i Jaroszuk, 1994a) prowadzono w testach płytkowych na agarowych pożywkach: (a) glukozowo-ziemniaczanej (Difco) i (b) Kinga B. Agar przecinano począwszy od zewnętrznych krawędzi płytek Petriego (średnica 9 mm) na długości 2/3 promienia płytek, dzieląc pożywkę na 4 sektory. Takie postępowanie uniemożliwiało dyfuzję metabolitów bakterii do sąsiednich sektorów. Bakterie szczepiono w odległości 3,5 cm od środka płytki, a w samym centrum umieszczano krążek grzyba o średnicy 4 mm. Aktywność antagonistyczną (szerokość strefy zahamowania wzrostu grzybów w mm) mierzono po 7 dniach inkubacji w 28°C.

4.5.2. Zdolność do rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ badano dwiema metodami: (a) na płynnym podłożu Pikowskiej, zawierającym: 5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 10g glukozy, 3 g ekstraktu drożdżowego, 12,5 cm³ ekstraktu glebowego 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g NaCl, 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, śladowe ilości $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ i $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Po 14 dniach inkubacji w temperaturze 28°C, bakteryjne hodowle odwirowywano (10000 rpm przez 10 min), a w

supernatancie oznaczano zawartość jonów fosforanowych kolorymetryczną metodą, wykorzystującą tworzenie błękitu fosforomolibdenowego (Lityński i in., 1976); (b) na agarowym podłożu Pikowskiej (skład jak powyżej plus 10 g agaru). Zestaloną w probówkach pożywkę szczepiono badanymi drobnoustrojami, a po inkubacji (jak wyżej) mierzono głębokość strefy rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (przejaśnienie pożywki) w mm.

4.5.3. Uwalnianie fosforu z kwasów nukleinowych i oznaczanie aktywności fosfataz

- zdolność bakterii do uwalniania reszty fosforanowej z kwasów nukleinowych badano na płynnym podłożu zawierającym w 1000 ml wodnego roztworu: 3,5 g kwasów nukleinowych z drożdży, 4 g glukozy, 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, i 0,1 g NaCl. Po 14 dniach inkubacji w temperaturze 28°C , w supernatantach (po wirowaniu przy 10000 rpm przez 10 min) oznaczano według Lityńskiego i in. (1976) ilość uwolnionych fosforanów.
- W tych samych roztworach oznaczano metodą Tabatabai i Bremnera (1969) aktywności fosfatazy kwaśnej (w pH 6,1) i fosfatazy zasadowej (w pH 9,5). Substratem był p-nitrofenylo-o-fosforan, pod wpływem enzymów przekształcany do żółtego p-nitrofenolu, którego stężenie oznaczano metodą kolorymetryczną, przy długości fali 415 nm.

4.5.4. Mineralizacja (utlenianie do siarczanów) siarki organicznej określano na podłożu płynnym o składzie: 1,5 g cysteiny, 5 g glukozy, 0,5 g NH_4NO_3 , 0,5 g K_2HPO_4 , 0,25 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1000 cm^3 H_2O . Po 14 dniach inkubacji w temperaturze 28°C , kultury bakteryjne odwirowywano (10000 rpm przez 10 min) i w supernatancie oznaczano zawartość siarczanów metodą Massoumi i Cornfielda (1963).

4.5.5. Aktywność chitynolityczną bakterii oznaczano w probówkach na podłożu agarowym (wg Strzelczyka i in., 1990), zawierającym: 5 g koloidalnej chityny, 1 g NH_4Cl , 1 g K_2HPO_4 , śladowe ilości $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i ZnSO_4 , 15 g agaru i 1000 ml H_2O . Po 14 dniach inkubacji w 28°C mierzono (w mm) głębokość przezroczystej strefy, wskazującej na hydrolizę chityny.

4.5.6. Aktywność celulolityczną oznaczano w probówkach na podłożu agarowym (wg Strzelczyka i Szpotańskiego, 1989) o składzie: 5 g koloidalnej celulozy, 1 g ekstraktu

drożdżowego, 1 g NaNO_3 , 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g KCl , 0,5 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 12 g agaru i 1000 cm^3 wody destylowanej (pH pożywki 7,0). Podobnie jak w przypadku aktywności chitynolitycznej, głębokość strefy przezroczystej w teście probówkowym (po 14 dniach inkubacji w temperaturze 28°C) informowała o aktywności celulolitycznej badanego mikroorganizmu.

4.5.7. Zdolność bakterii do syntezy związków kompleksujących Fe^{+3} badano w pożywce o składzie: 25 cm^3 glicerolu, 5 g NH_4Cl , 2 g K_2SO_4 , 3 g K_2HPO_4 , 1 g NaCl , 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 80 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, śladowe ilości CuSO_4 i $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1000 cm^3 wody destylowanej. Po sterylizacji w autoklawie i ochłodzeniu, do pożywki dodawano 2 mg chlorowodoru tiaminy. Po inkubacji przez 21 dni w temperaturze 28°C do 1 cm^3 płynu pochowianego dodawano 0,3 cm^3 6% roztworu $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ w 0,1 N HCl . Po 1 godz. oznaczano kolorymetrycznie (przy długości fali 520 nm) zawartość związków chelatujących Fe^{+3} . Stężenie tych związków odczytywano z krzywej wzorcowej, wykonanej dla metanosulfonianu desferrioksaminy B (Desferal).

4.5.8. Zdolność bakterii do syntezy HCN badano po 4 dniach inkubacji w 28°C w szczelnie zamkniętych probówkach, zawierających 5 ml podłoża King B, wzbogaconego w 4,4 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ glicyny i 20 μM FeCl_3 . Obecność HCN wykrywano za pomocą zmiany zabarwienia umieszczonych w probówkach papierków wskaźnikowych, nasączonych 0,5% kwasem pikrynowym i 2% węglanem sodu (Bakker i Schippers, 1987; Paszkowski i in., 1996).

***Uwagi:** W Tabelach 19 - 32 zamieszczono dane (udział aktywnych szczepów oraz średnie arytmetyczne i wartości najwyższe poszczególnych aktywności) dotyczące wszystkich wyizolowanych szczepów, łącznie ze szczepami wyizolowanymi z odcinków korzeni.

4.6. METODY ZAKŁADANIA I PROWADZENIA DOŚWIADCZEŃ WEGETACYJNYCH OKREŚLAJĄCYCH WPŁYW BAKTERII *Bacillus mycoides* NA WZROST PSZENICY OZIMEJ

4.6.1. Doświadczenia laboratoryjne, fitotronowe i szklarniowe.

4.6.1.1. Ogólny opis doświadczeń laboratoryjnych, fitotronowych i szklarniowych

4.6.1.1.1 Zakładanie i przebieg doświadczeń wazonowych. Doniczki napełniano (w zależności od rodzaju doświadczenia) 1 kg niesterylnego lub sterylnego piasku (trzykrotna sterylizacja w autoklawie), wzbogaconego lub nie pożywką Hoaglanda (zawierającą w 1000 ml: 0,95 g $\text{Ca}(\text{N})_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,61 g KNO_3 ; 0,49 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,12 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 84 mg FeEDTA; zestaw mikroelementów) lub 0,6 - 0,7 kg niesterylnej gleby, nieskażonej lub skażonej grzybowym patogenem pszenicy (*Fusarium culmorum* lub *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*). Fizykochemiczne właściwości stosowanych gleb są zamieszczone w Tabeli 1. W czasie trwania doświadczeń utrzymywano wilgotność gleb (dodając wodę destylowaną lub do piasku pożywkę Hoaglanda) na poziomie 60% całkowitej pojemności wodnej podłoża. Dynamikę wschodów, przedstawianą jedną wartością liczbową, określano poprzez zsumowanie liczby rosnących roślin w kolejnych badanych terminach (np. po 5, 6 i 7 dniach od siewu). Po określeniu dynamiki wschodów (po 7-19 dniach w zależności od doświadczenia), rośliny przerywano, pozostawiając (w zależności od doświadczenia) 5 - 8 siewek na doniczkę.

W większości doświadczeń rośliny hodowano w komorze wzrostowej przy 16 godzinowym dniu w temperaturze 20°C, przy natężeniu światła 240 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i przy 8 godzinnej nocy w temperaturze 15°C;

Niektóre doświadczenia (w tym oba doświadczenia z patogenami pszenicy), przeprowadzono w miesiącach jesiennych i zimowych w ocieplanej i doświetlanej szklarni. Temperatura w tych doświadczeniach wahała się od kilkunastu do dwudziestu kilku stopni Celsjusza, w zależności od zewnętrznej temperatury i nasłonecznienia.

Po 28 dniach od wysiania nasion, rośliny odmywano od gleby i po wysuszeniu określano masę ich pędów i korzeni, a przez zsumowanie lub podzielenie uzyskanych wartości - masę całych roślin oraz stosunek masy pędów do masy korzeni. Doświadczenia prowadzono w 3 - 5 powtórzeniach (w zależności od doświadczenia). Kontrolę każdego z doświadczeń wegetacyjnych stanowiła seria roślin szczepionych roztworem 1% CM-celulozy po zmywie z powierzchni pożywki sterylnej, nie szczepionej bakteriami.

4.6.1.1.2. Przygotowanie zawiesiny bakterii. Bakterie hodowano przez 48 godzin w temperaturze 27°C na stałej pożywce „Pseudomonas agar F” firmy Difco. Po tym czasie bakterie zmywano z powierzchni pożywki 1% roztworem CM-celulozy (15 ml z powierzchni jednej płytki Petriego o średnicy 9 mm). Liczebność bakterii w 1 ml takiej zawiesiny wahała się w granicach 10^8 - 10^9 jednostek propagacyjnych. Jako kontrolę stosowano zmyw z pożywki nie zaszczipionej bakteriami.

4.6.1.1.3. Przygotowanie nasion do doświadczeń. Wybrane (nieuszkodzone i bez oznak porażenia przez patogeny) nasiona pszenicy ozimej odmian (w zależności od doświadczenia) Gama, Kobra, Elena i Maltanka, o zbliżonej masie i wielkości, moczono w zawieszynie bakterii (lub w zmywie kontrolnym) przez 1 godzinę. Po tym zabiegu wysiewano je w doniczkach wypełnionych odpowiednią glebą. W niektórych doświadczeniach nasiona pszenicy **sterylizowano powierzchniowo** 0,1% sublimatem przez 3 min, a następnie płukano sterylnym 0,1 N HCl i 5-krotnie sterylną wodą destylowaną.

4.6.1.2. Szczegółowy opis doświadczeń laboratoryjnych, fitotronowych i szklarniowych

4.6.1.2.1. Doświadczenie 1a. Wpływ bakterii na wzrost siewek pszenicy ozimej. 20 nasion pszenicy ozimej odmiany Gama (sterylizowanych powierzchniowo 0,1% sublimatem) zanurzano w zawiesinach 12 szczepów bakterii *Bacillus mycoides* (lub w zmywie kontrolnym) na 1 godz., po czym wykładano je na płytki Petriego z 0,7% agarem wzbogaconym pożywką Hoaglanda. Po 8 dniach wzrostu mierzono długości koleoptyli i korzonków. Otrzymane wyniki porównywano do kontroli nie szczepionej bakteriami.

4.6.1.2.2. Doświadczenie 1b. Wpływ bakterii na wzrost pszenicy ozimej w 28-dniowym doświadczeniu doniczkowym na sterylnym piasku. Nasiona pszenicy ozimej odmiany Gama sterylizowano powierzchniowo 0,1% sublimatem, a następnie zanurzano w

zawiesinach 12 szczepów bakterii *Bacillus mycoides* lub w zmywie kontrolnym na 1 godz. Tak przygotowane nasiona wysiewano w sterylnym piasku (13 nasion na 1kg doniczkę), wzbogaconym pożywką Hoaglanda (100 ml na doniczkę na początku doświadczenia a potem 10 razy po 20 ml razem z nawadnianiem). Po 14 dniach od siewu określano liczbę rosnących roślin, a następnie przerywano je, pozostawiając po 5 siewek na doniczkę. Po 28 dniach od siewu określano suchą masę pędów, korzeni i całych roślin. Doświadczenie prowadzono w 5 powtórzeniach.

4.6.1.2.3. Doświadczenie 2. Wpływ bakterii i *Fusarium culmorum* na wzrost pszenicy ozimej prowadzono w doniczkowym doświadczeniu szklarniowym na glebie ogrodowej. Glebę, z wyjątkiem kontroli, skażono chorobotwórczym dla pszenicy grzybem *Fusarium culmorum*. Grzyb wprowadzano na ziarnie owsa w ilości 0,5% (w/w). Ziarno pszenicy ozimej (odm. Gama) szczepiono czterema (z dwunastu) szczepami bakterii *B. mycoides*, które w poprzednim doświadczeniu (na sterylnym piasku) najbardziej zwiększały masę roślin. Do doniczek wysiano po 20 nasion pszenicy (odm. Gama). Dynamikę wschodów określono na podstawie liczby rosnących roślin po 5, 6, 7 i 19 dniach od siewu. Po 19 dniach rośliny przerwano, pozostawiając po 8 siewek na doniczkę. Zbiór roślin przeprowadzono po 28 dniach od siewu. Określono liczbę pędów, suchą masę pędów, korzeni i całych roślin oraz obliczano stosunek masy pędów do masy korzeni. Doświadczenie prowadzono w 3 powtórzeniach.

4.6.1.2.4. Doświadczenie 3. Wpływ żywego i zabitego inokulum *Bacillus mycoides* szczep JC192 (wprowadzanego na różnych nośnikach) na wzrost pszenicy ozimej (odm. Gama) w 28 dniowym doniczkowym doświadczeniu fitotronowym. Do tego doświadczenia wybrano bardzo żyzną czarną ziemię. Żywe lub zabite bakterie wprowadzano na nasiona w postaci (a) zawiesiny wodnej (zmyw z 48-godz hodowli na pożywce King B - 15 ml z płytki Petriego o średnicy 9 cm); (b) na rozdrobnionym torfie o wielkości ziarn <1 mm (10 ml wodnej zawiesiny bakterii na 10 g torfu); (c) w postaci namoczonego na 24 godz. liofilizatu (na podłożu bulionowym z dodatkiem chudego mleka w stosunku 1:1 v/v) bakterii oraz (d) w zawieszynie bakterii w wodnym roztworze melasy (melasa : woda = 1:1). Doświadczenie prowadzono w 4 powtórzeniach.

4.6.1.2.5. Doświadczenie 3a. Wpływ *Bacillus mycoides* szczep JC192 na wzrost pszenicy ozimej na torfie w 21 dniowym doniczkowym doświadczeniu laboratoryjnym (oświetlony parapet okienny). Do torfu wprowadzano żywe lub zabite inokulum bakterii w ilości 10 ml na 100 g torfu. Siewki (15 roślin na krystalizator o średnicy 19 cm) dwukrotnie dokarmiono pożywką Hoaglanda w ilości 25 ml na 100 g torfu po 0 i 14 dniach inkubacji. Doświadczenie prowadzono bez powtórzeń.

4.6.1.2.6. Doświadczenie 4. Wpływ *Bacillus mycoides* szczep JC192 na wzrost pszenicy ozimej na różnych glebach w 28 dniowym doniczkowym doświadczeniu fitotronowym. Do tego doświadczenia użyto glebę ogrodową, wytworzoną z piasku słabogliniastego, glebę brunatną, wytworzoną z lessu i czarną ziemię (charakterystyka gleb w Tabeli 1) a także piasek kwarcowy. Zastosowane gleby różniły się wyraźnie zdolnościami plonotwórczymi. Najżyźniejszą okazała się czarna ziemia, natomiast piasek reprezentował środowisko najuboższe. Ziarno pszenicy ozimej (odm. Kobra) szczepiono zawiesiną bakterii *B. mycoides* JC192 i wysiewano do doniczek w ilości 21 nasion na doniczkę. Dynamikę wschodów określono poprzez zsumowanie liczby rosnących roślin po 5, 6 i 7 dniach. Po 10 dniach od siewu rośliny przerywano do 7 siewek na doniczkę. Po 28 dniach określano suchą masę pędów, korzeni i całych roślin oraz stosunek masy pędów do masy korzeni. Doświadczenie prowadzono w 4 powtórzeniach.

4.6.1.2.7. Doświadczenie 5a. Wpływ inokulum *Bacillus mycoides* JC192 o różnym stężeniu na długość koleoptyli i korzonków różnych odmian pszenicy ozimej.

Nasiona (20 sztuk) trzech odmian pszenicy ozimej (Kobra, Elena i Maltanka) zanurzano w stężonej zawieszynie bakterii (zmyw 15 ml 1% CM-celulozą z płytki Petriego z 48 godz. kulturą bakterii), i rozcieńczonej (1% CM-celulozą) dwukrotnie i dziesięciokrotnie. Po 5 dniach inkubacji w ciemności w temp. 20°C mierzono długości koleoptyli i korzonków.

4.6.1.2.8. Doświadczenie 5b. Wpływ *Bacillus mycoides* JC192 na wzrost różnych odmian pszenicy ozimej w 28 dniowym doniczkowym doświadczeniu fitotronowym.

Nasiona zaszczepione bakteriami lub moczone w zmywie kontrolnym (patrz „Ogólny opis doświadczeń”) wysiewano do doniczek z czarną ziemią (charakterystyka gleb w Tabeli 1). Rośliny przerywano do 5 siewek na doniczkę. Po 28 dniach inkubacji określano suchą masę pędów, korzeni i całych roślin oraz wyliczano stosunek masy pędów do masy korzeni.

4.6.1.2.9. Doświadczenie 6. Wpływ bakterii *Bacillus mycoides* i grzyba *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) na wzrost pszenicy ozimej odmiany Kobra i stopień porażenia roślin przez Ggt w 28-dniowym doświadczeniu szklarniowym na czarnej ziemi deluwialnej.

Glebę z wyjątkiem kontroli skażono chorobotwórczym dla pszenicy grzybem Ggt. Do jednej serii doświadczalnej wprowadzono też zabite inokulum Ggt. Grzyb wprowadzano na wilgotnym ziarnie owsa w ilości 1% (w/w). Ziarno pszenicy ozimej (odm. Kobra) szczepiono trzema szczepami bakterii *B. mycoides* (JC177, JC192 i K184). Do doniczek wysiano po 13 nasion pszenicy. Dynamikę wschodów określono codziennie od 7 do 14 dnia od siewu na podstawie liczby rosnących roślin. Zbiór roślin przeprowadzono po 29 dniach od siewu. Określono suchą masę pędów, korzeni i całych roślin oraz obliczano stosunek masy pędów do masy korzeni. Ponadto po zbiorach określano odsetek korzeni porażonych przez patogena, a po 21, 25 i 28 dniach odsetek roślin z objawami żółknięcie i zasychanie części nadziemnych. Doświadczenie prowadzono w 3 powtórzeniach.

4.6.2. Doświadczenia mikro-i minipoletkowe

4.6.2.1. Doświadczenia mikropoletkowe (nr 7) prowadzono w kręgach o średnicy 30 cm (powierzchnia 0,07 m²) zakopanych w glebie brunatnej, wytworzonej z piasku gliniastego mocnego (charakterystyka gleby w Tabeli 1). Do gleby połowy mikropoletek wprowadzono inokulum grzyba *Fusarium culmorum*, namnożonym na ziarnie owsa (40 g na mikropoletko). Bakterie wprowadzano na ziarno pszenicy w zawieszynie CM-ce;lulozy (sposób opisany dla doświadczeń fitotronowych lub szklarniowych). Na mikropoletku wysiewano po 30 ziaren pszenicy ozimej (odmiany Almari). Doświadczenie prowadzono w 4 powtórzeniach.

4.6.2.2. Doświadczenia minipoletkowe

Doświadczenie 8 prowadzono na glebie brunatnej, wytworzonej z piasku gliniastego mocnego na obetonowanych poletkach o powierzchni 1m². W glebie tej naturalnie rozwinął się grzyb *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Bakterie wprowadzano na ziarno pszenicy w zawieszynie CM-celulozy (jak w przypadku doświadczeń fitotronowych lub szklarniowych). Na minipoletku wysiewano po 341 nasion pszenicy ozimej (odm. Almari). Doświadczenie prowadzono w 3 powtórzeniach.

Doświadczenie 9 prowadzono na madzie średniej (ZD Kępa - Puławy) z ozimą odmianą pszenicy (Almari) i odmianami jarymi (Igną i Sigmą) na poletkach o powierzchni $1,8 \text{ m}^2$, oddzielonych ścieżkami o szerokości 0,8 m. Badania prowadzono w 5 powtórzeniach metodą bloków kompletnie zrandomizowanych. Poletka nawożono 80 kg N ha^{-1} i 30 kg P ha^{-1} . Bakterie wprowadzano na ziarno pszenicy w zawieszynie CM-celulozy w sposób opisany dla doświadczeń fitotronowych lub szklarniowych. Nasiona wysiewano do gleby w ilości 120 kg ha^{-1} .

Zarówno w doświadczeniach mikro- jak i minipoletkowych po doprowadzeniu roślin do pełnej dojrzałości oznaczano liczbę kłosów oraz plon suchej masy słomy i ziarna.

4.7. PRZEŻYWALNOŚĆ BAKTERII *BACILLUS* I FLUORYZUJĄCYCH *PSEUDOMONAS* W GLEBIE I KOLONIZACJA PRZEZ NIE RYZOSFERY PSZENICY

Do badań nad przeżywalnością w glebie i zasiedlaniem ryzosfery pszenicy przez bakterie zastosowano spontaniczne rifampicyno- (R^+) i streptomycyno- (S^+) -oporne mutanty wybranych szczepów *Bacillus* (JC192 i K184) i fluoryzujących *Pseudomonas* (III107 β_4 i II21y $_4$). Badania nad przeżywalnością mutantów JC192 R^+S^+ , K184 R^+S^+ , III107 $\beta_4R^+S^+$ i II21y $_4R^+S^+$ prowadzono w świeżej glebie brunatnej, wytworzonej z lessu po 0, 2 i 4 tygodniach, a badania nad kolonizacją pszenicy w tej samej glebie po 2 i 4 tygodniach.

4.8. ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW

Uzyskane wyniki poddano różnym testom statystycznym. Do określania istotności różnic pomiędzy średnimi arytmetycznymi wykorzystano analizę wariancji i test t Studenta. Ponadto określano zależności pomiędzy różnymi wartościami, wyliczając współczynniki korelacji prostej Pearsona.

Tabela 1.

Właściwości fizyczne i chemiczne gleb użytych w biotestach

Gleba	Procentowa zawartość frakcji mechanicznych o średnicy (w mm)				pH _{KCl}	C-organ. %	Wymienny Ca (meq 100g ⁻¹)	Przyswajalne (mg 100g ⁻¹)		
	1,0 - 0,1	0,1 - 0,02	< 0,02	< 0,002				P ₂ O ₅	K ₂ O	Mg
Doświadczenia fitotronowe i szklarniowe										
Oгородowa wytworzona z piasku słabogliniastego	72	19	9	1	6,9	1,18	14,7	100,0	20,3	3,6
Brunatna wytworzona z lessu	19	49	32	9	6,8	0,89	15,8	40,0	15,2	2,8
Czarna ziemia deluwialna	82	7	11	6	6,8	0,96	0,1% CaCO ₃	12,0	7,2	2,5
Doświadczenia mikro- i minipoletkowe										
Brunatna z piasku gliniastego mocnego	50	33	17	6	6,0	1,13	-	54,0	9,2	5,3
Doświadczenia poletkowe										
Mada średnia	7	46	47	14	6,2	1,64	-	13,4	11,5	20,6

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

5.1. CZĘŚĆ I

OGÓLNE LICZEBNOŚCI BAKTERII I GRZYBÓW W RYZOSFERZE PSZENICY OZIMEJ ORAZ ICH SKŁAD JAKOŚCIOWY

Podczas wegetacji pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L. cv. Gama) w warunkach polowych, czterokrotnie badano zasiedlanie korzeni (wraz z przylegającą do nich glebą) przez różne grupy drobnoustrojów - od bardzo wczesnego stadium rozwojowego (faza 2. liścia) do fazy pełnej dojrzałości.

5.1.1. Liczebność saprotroficznych bakterii i grzybów w różnych strefach ryzosfery pszenicy

Tabela 2

Liczebność bakterii (na pożywce King B) w różnych strefach ryzosfery pszenicy ozimej
i w różnych fazach jej rozwoju
[x 10⁶ g⁻¹ suchej masy gleby (a) lub suchej masy korzeni (b)]

Strefa ryzosfery	Faza 2. liścia	Faza 4. liścia	Faza kwitnienia	Faza pełnej dojrzałości	Wzrost liczebności bakterii ♣
1.Ektoryzosfera ^a	2529,9 m	2187,4 m	2662,9 m	3103,6 m	1,3-krotny
2.Ryzoplana ^b	806,9 m	1345,5 n ^{**}	1336,5 n ^{**}	1269,8 n [*]	1,1-krotny
3.Ryzop./Endor. ^b	969,0 m	919,4 m	1088,0 m	2016,7 n [*]	2,0-krotny
4.Endoryzosfera ^b	3,05 m	2,93 m	2,36 m	262,1 n ^{***}	94-krotny
Strefy korzeniowe łącznie (2+3)	1775,9 m	2264,9 m	2424,5 m	3286,5 n ^{**}	1,5-krotny

♣ - stosunek liczebności bakterii w fazie dojrzałości do średniej liczebności z 3 pozostałych faz.
m, n - średnie (w obrębie poszczególnych stref ryzosfery) oznaczone różnymi literami
różnią się istotnie przy * P=90%, ** P=95% lub *** P=99%).

Z powodu bardzo kontrowersyjnych poglądów na temat wyboru rodzaju podłoża mikrobiologicznego do badań liczebności i składu jakościowego ryzosferowych zespołów bakteryjnych, należy przedstawić powody zastosowania w naszych badaniach pożywki King B, sporządzonej przez Kinga i in. (1954 - cyt. za Harrigan i McCance, 1966) do detekcji fluoryzujących barwników, syntetyzowanych przez bakterie *Pseudomonas*. Jednakże, pożywka ta według Alström (1987) jest nieselektywna, a według Pietra i Kempy (1989) i cytowanego przez nich Goulda (1985) mało selektywna w kierunku wzrostu fluoryzujących *Pseudomonas*.

Pożywkę tę wybrano z dwóch powodów: (1) pepton jest jej głównym składnikiem, a większość bakterii izolowanych z ryzosfer różnych roślin wymaga aminokwasów (Louw i Webley, 1959; Rouatt i in, 1960 i 1963; Rouatt i Katznelson, 1961, Turner i in., 1985; Vagnerova i in, 1960a i 1960b) i (2) jej powszechnego stosowania na całym świecie.

Pomimo tego, że m.in. Bowen i Rovira (1976) wskazują, że ryzosfera jest środowiskiem znacznie mniej optymalnym niż pożywki laboratoryjne i jest ono dobre do wzrostu oligotrofów, pożywkę King B używano w stężeniu oryginalnym, a nie rozcieńczonym, co spowodowało, że liczono i izolowano głównie bakterie kopiotroficzne, a nie oligotroficzne (Bowen i Rovira, 1999; Lynch, 1989; Weyman-Kaczmarkowa, 1996). Uważano, że kopiotrofy są drobnoustrojami charakterystycznymi dla ryzosfery, a oligotrofy dla gleby poza-ryzosferowej. Dowodzą tego m. in. wyniki badań Weyman-Kaczmarkowej (1996) która po wprowadzeniu do gleby sztucznych wydzielin korzeniowych, opartych na składzie wydzielin korzeniowych pszenicy, czy wysuszonych i utartych korzeni pszenicy, obserwowała o wiele wyższy wzrost liczebności bakterii kopiotroficznych, niż liczebności oligotrofów. Należy dodać, że Kloepper i in. (1991) stwierdzili, że liczebności bakterii w ryzosferze i endoryzosferze czterech roślin motylkowatych i żyta, określane na 5% TSA (tryptic soy agar) i na TSA o normalnym stężeniu, praktycznie się nie różniły, a liczebności bakterii na korzeniach orzeszka ziemnego (po 6 i 9 tygodniach od siewu) liczone na podłożu *Pseudomonas* agar F (identyczne z pożywką Kinga B) były wyższe o 80 i 30% od liczebności na 5% TSA. Dopiero po 12 tygodniach (faza wybarwiania łusek nasiennych) liczebność bakterii na *Pseudomonas* agar F była niższa o 91% od liczebności na 5% TSA (Kloepper i Bowen, 1991).

5.1.1.1. Liczebności bakterii w przeliczeniu na 1 g suchej masy gleby przykorzeniowej (ektoryzosfera) lub 1 g suchej masy korzeni (wszystkie strefy „korzeniowe”) wahały się w podobnych granicach ($2,2-3,1 \times 10^9$ - gleba i $1,8-3,3 \times 10^9$ - korzenie) (Tabela

2). Analizując poszczególne strefy ryzosfery, nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy liczebnościami bakterii w trzech pierwszych badanych fazach rozwojowych rośliny (Tabela 2). Zaznaczył się jedynie niewielki trend stopniowego wzrostu liczebności bakterii na powierzchni i we wnętrzu korzeni (strefy korzeniowe łącznie). W tych fazach zwraca uwagę stosunkowo mała liczebność bakterii w endoryzosferze (ok. $2-3 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ suchej masy korzenia). Dopiero w fazie dojrzałości obserwowano jej wyraźny (ok. 100-krotny) wzrost (Tabela 2).

Z powodu stosowania różnych technik frakcjonowania ryzosfery, różnych pożywek oraz z powodu różnego sposobu przedstawiania danych (w przeliczeniu na wilgotną lub suchą masę gleby lub korzeni), trudno jest porównywać wartości liczebności drobnoustrojów uzyskane przez różnych autorów. Literaturowe dane dla ryzosferowej gleby pszenicy wahają się od 60 mln (Vágnerová i in., 1960a) do ponad 1300 mln (Lochhead i Rouatt, 1955) w 1 g suchej masy gleby, a dla innych roślin od 0,35 mln w 1 g suchej masy w ryzosferze ryżu (Vlassak i in., 1992) do 9270 mln w 1 g suchej masy w ryzosferze owsa (Paszkowski, 1995a). Liczebności bakterii w glebie przykorzeniowej pszenicy, stwierdzone w naszych badaniach, kształtowały się na zbliżonym poziomie do wartości uzyskanych przez Duinevelde i Van Veen (1994) dla ryzosfery chryzantemy, Kurek i in. (1994) dla ryzosfery żyta, Lochheada i Rouatta (1955) dla ryzosfery wielu roślin - w tym pszenicy, Paszkowskiego i Kobusa (1995a) dla ryzosfery owsa i Rouatta i in. (1960) dla ryzosfery pszenicy.

Dane literaturowe, dotyczące liczebności bakterii (w przeliczeniu na 1 g świeżej masy korzeni) na powierzchni korzenia pszenicy wahają się od 25 mln (Sands i Rovira, 1971) do 2630 mln (Vagnerova i in., 1960a), a na powierzchni innych roślin od 1,9 mln na powierzchni ryżu (Sands i Rovira, 1971) do 501 mln na powierzchni chryzantemy (Duineveld i Van Veen, 1994). Z kolei Schönwitz i Ziegler (1989) podają, że na powierzchni korzeni kukurydzy (w przeliczeniu na 1 g suchej masy korzeni) było 1200 mln bakterii. Jak duże mogą być rozbieżności pomiędzy wartościami przedstawianymi na suchą lub świeżą masę korzeni informują dane Rouatta i Katznelsona (1961), którzy wyliczyli, że na powierzchni korzeni pszenicy jest 340 lub 4120 mln bakterii, w zależności od tego, czy wyniki były przedstawiane na świeżą lub suchą masę korzeni. Dane informujące o liczebności na powierzchni korzeni pszenicy ozimej, uzyskane w naszych badaniach, są zbliżone do podanych powyżej wartości literaturowych.

W naszych badaniach liczebność bakterii wewnątrz korzenia (frakcja czwarta - endoryzosfera), była 270-560 razy mniejsza od liczebności bakterii na powierzchni korzenia (frakcja druga - ryzoplana). Podobne proporcje można wyliczyć na podstawie wyników

Ruppela (1989) - liczebność bakterii oligonitrofilnych w endoryzosferze pszenicy ozimej była 280-krotnie niższa od liczebności bakterii oligonitrofilnych w jej ryzoplane oraz Vlassaka i in. (1992) - endoryzosfera ryżu zawierała 80-680 razy mniej bakterii niż jego ryzoplana. Podobne wyniki otrzymali Kloepper i in. (1991). Stwierdzili oni, że wewnątrz korzeni czterech roślin motylkowatych i żyta było od 40 razy mniej (w przypadku żyta) do 2000 razy mniej bakterii (w przypadku soi) od ich liczebności w odpowiednich glebach przykorzeniowych. Autorzy ci (Kloepper i in., 1991) znaleźli wewnątrz korzeni bardzo zbliżone liczebności bakterii do stwierdzonych w naszych badaniach.

Tabela 3

Liczebność grzybów (na pożywcę Martina) w różnych strefach ryzosfery pszenicy ozimej i w różnych fazach jej rozwoju
[x 10³ g⁻¹ suchej masy gleby (a) lub suchej masy korzeni (b)]

Strefa ryzosfery	Faza 2. liścia	Faza 4. liścia	Faza kwitnienia	Faza pełnej dojrzałości	Wzrost liczebności grzybów♣
1.Ektoryzosfera ^a	1269,1 m	5808,4 mn	1509,5 m	6777,2 n	2,4-krotny
2.Ryzoplana ^b	61,5 mn	44,0 m	77,7 n	2260,8 o	37-krotny
3.Ryzop./Endor. ^b	114,1 o	11,3 m	46,8 n	433,0 p	7,5-krotny
4.Endoryzosfera ^b	<0,01 m	<0,01 m	0,45 n	11,1 o	74-krotny
Strefy korzeniowe łącznie (2+3)	175,6 o	55,3 m	124,5 n	2693,8 p	23-krotny

♣ -stosunek liczebności grzybów w fazie dojrzałości do średniej liczebności z 3 pozostałych faz.
m, n, o, p - średnie (w obrębie poszczególnych stref ryzosfery) oznaczone różnymi literami
różnią się istotnie przy P=90%.

5.1.1.2. Liczebność grzybów (w przeliczeniu na 1 g suchej masy) w trzech pierwszych fazach rozwojowych pszenicy była, w przeciwieństwie do bakterii, znacznie wyższa w ektoryzosferze ($1,3-5,8 \times 10^6$) niż na powierzchni i wewnątrz korzenia ($0,06-0,18 \times 10^6$). Różnice te zmniejszyły się wyraźnie dopiero w fazie pełnej dojrzałości ($6,8 \times 10^6$ – gleba przykorzeniowa i $2,7 \times 10^6$ - korzeń) (Tabela 3). Także w przeciwieństwie do bakterii, wzrost liczebności grzybów w fazie dojrzałości (w porównaniu do średniej wartości z innych faz) był znaczny nie tylko w endoryzosferze (74x), ale i w ryzoplane (37x). Przypuszczalnie w tym stadium zanikł antygrzybowy system obronny korzeni pszenicy. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w endoryzosferze nie notowano obecności grzybów saprotroficznych przez

pierwsze dwie fazy wzrostu roślin. W fazie kwitnienia pojawiły się drożdże, a pierwsze grzyby strzępkowe dopiero w fazie dojrzałości.

Na podstawie danych literaturowych liczebność grzybów w 1 g gleby przykorzeniowej różnych roślin wahała się w zakresie od kilkudziesięciu tysięcy w ryzosferze pszenicy (Catská i in., 1960; Gomolyako, 1957) do ponad 50 milionów w ryzosferze owsa (Paszkowski i Kobus, 1995b) i ryzosferze jęczmienia (Król, 1997). Zbliżone wartości liczebności grzybów w glebie przykorzeniowej do uzyskanych w naszych badaniach, podają Rouatt i in. (1960) w ryzosferze jarej pszenicy oraz Kurek i in. (1994) w ryzosferze żyta. Z kolei Catská i in. (1960) i Gomolyako (1957) znaleźli zbliżone do uzyskanych w naszych badaniach liczebności grzybów na powierzchni korzeni pszenicy.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono obecność wyraźnych sił obronnych korzeni pszenicy ozimej przed intensywną kolonizacją ich wnętrza przez saprotroficzne drobnoustroje, głównie przez grzyby - nie notowane w endoryzosferze w fazach 2. i 4. liścia (Tabele 2 i 3). W fazie kwitnienia, we wszystkich badanych strefach korzeni, widoczny był istotny statystycznie wzrost liczebności grzybów w stosunku do fazy wcześniejszej, a w fazie pełnej dojrzałości można już było zaobserwować bardzo znaczny wzrost liczebności mikroorganizmów (bakterii we wnętrzu korzeni, a grzybów we wszystkich badanych strefach korzeni). W czasie dojrzwania roślin, znaczny wzrost liczebności bakterii i promieniowców w ryzosferze jęczmienia, owsa, lnu, gryki, ziemniaka, łubinu i grochu również zaobserwował Myśków (1960), a Vagnerova i in. (1960b) oraz De Leij i in. (1993) stwierdzili wzrost liczebności bakterii na powierzchni korzeni pszenicy (po zbiorach lub w fazie dojrzałości). Z kolei Catská i in. (1960) oraz Kurek i in. (1994) zanotowali w fazie dojrzałości wyraźny wzrost liczebności grzybów w ryzosferze i (zwłaszcza) na korzeniach, odpowiednio, pszenicy i żyta. Podobne wyniki uzyskali Kloepper i in. (1991), badając liczebności bakterii i grzybów w ryzosferze czterech roślin motylkowatych i żyta. Paul i Clark (2000) informują, że w starzejącym się korzeniu, po śmierci komórek korzeniowych tworzą się luki lub przestrzenie powietrzne, sprzyjające ich zasiedleniu przez grzybnie. Odmienne wyniki uzyskali Paszkowski i Kobus (1995a), którzy wraz ze starzeniem się owsa obserwowali stopniowy spadek liczebności bakterii, promieniowców i grzybów.

5.1.2. Rozmieszczenie bakterii i grzybów w różnych strefach ryzosfery pszenicy ozimej

Ze względu na łatwość metodyczną, liczebność bakterii i grzybów (Tabele 2 i 3) przeliczano na jednostki suchej masy gleby przykorzeniowej lub suchej masy korzeni, a więc substancji o zdecydowanie różnej proporcji suchej masy do swych naturalnych objętości. Aby otrzymać chociażby przybliżony obraz przestrzennego rozmieszczenia drobnoustrojów w całej, szeroko pojętej ryzosferze (korzeń + ściśle otaczająca go gleba), postanowiono dodatkowo określić procentowe rozmieszczenie drobnoustrojów w różnych jej strefach, traktując korzeń wraz z przylegającą doń glebą jako całość (100%).

Tabela 4

Liczebność bakterii w 1 g wilgotnej masy korzeni z przylegającą do nich glebą (całość ryzosfery) oraz ich rozmieszczenie w poszczególnych strefach ryzosfery pszenicy ozimej (w %).

Strefa ryzosfery	Faza 2. liścia	Faza 4. liścia	Faza kwitnienia	Faza pełnej dojrzałości
1.Ektoryzosfera	95,9%	94,8%	86,6%	81,0%
2.Ryzoplana	1,9%	3,1%	7,4%	7,3%
3.Ryzop./Endor.	2,2%	2,1%	6,0%	11,7%
4.Endoryzosfera	0,007%	0,007%	0,013%	1,5%
Strefy korzeniowe łącznie (2+3)	4,1%	5,2%	13,4%	19,0%
Liczebność bakterii w 1 g wilg. masy korzeni z glebą	$1,725 \times 10^9$	$1,562 \times 10^9$	$1,624 \times 10^9$	$2,106 \times 10^9$

Takie procentowe rozmieszczenie bakterii i grzybów w różnych strefach ryzosfery przedstawiono w Tabelach 4 i 5. Jak z nich wynika, w trzech pierwszych fazach rozwoju pszenicy ozimej, zdecydowana większość zarówno bakterii (87-96%) jak i (szczególnie) grzybów (99-99,95%) znajdowała się we frakcji pierwszej - ektoryzosferze (która na pewno zawierała w sobie elementy ryzoplany), a frakcja czwarta - endoryzosfera zawierała niewielką ich część (0.007-0.013% bakterii i 0-0.005% grzybów). Dopiero w fazie dojrzałości obserwowano znaczne zwiększenie udziału frakcji korzeniowych łącznie (19% bakterii i 8% grzybów) i endoryzosfery (1,5% bakterii i 0,03% grzybów) w rozmieszczeniu drobnoustrojów

ryzosferowych. Obserwowany stopniowy wzrost udziału frakcji korzeniowych łącznie w rozmieszczeniu drobnoustrojów (szczególnie bakterii) może w dużym stopniu być spowodowany wzrostem udziału masy korzeni w masie kompleksu korzenie + otaczająca je gleba (Tabela 6). Wyliczono istotny przy $P = 95\%$ współczynnik korelacji pomiędzy procentowym udziałem masy korzeni w masie kompleksu korzenie + otaczająca je gleba, a procentowym udziałem frakcji korzeniowych łącznie w rozmieszczeniu bakterii ryzosferowych ($r = 0,989$).

Tabela 5

Liczebność grzybów w 1 g wilgotnej masy korzeni z przylegającą do nich glebą (całość ryzosfery) oraz ich rozmieszczenie w poszczególnych strefach ryzosfery pszenicy ozimej (w %).

Strefa ryzosfery	Faza 2. liścia	Faza 4. liścia	Faza kwitnienia	Faza pełnej dojrzałości
1.Ektoryzosfera	99,25%	99,95%	98,6%	91,9%
2.Ryzoplana	0,25%	0,04%	0,9%	6,8%
3.Ryzop./Endor.	0,5%	0,01%	0,5%	1,3%
4.Endoryzosfera	<0,00005%	<0,00005%	0,005%	0,03%
Strefy korzeniowe łącznie (2+3)	0,75%	0,05%	1,4%	8,1%
Liczebność grzybów w 1 g wilg. masy korzeni z glebą	$0,837 \times 10^6$	$3,932 \times 10^6$	$0,808 \times 10^6$	$3,993 \times 10^6$

Tabela 6

Udział suchej masy gleby i suchej masy korzeni w ryzosferze pszenicy ozimej w jej różnych fazach rozwojowych (w %)

Strefa	Faza 2. liścia	Faza 4. liścia	Faza kwitnienia	Faza pełnej dojrzałości
Gleba	94,3	94,9	85,4	81,85
Korzenie	5,7	5,1	14,6	18,15

5.1.3. Porównanie zasiedlenia korzeni pszenicy przez bakterie i grzyby

Generalnie, niezależnie od fazy rozwojowej rośliny, wartość stosunku liczebności bakterii do liczebności grzybów (B/G) stopniowo wzrastała wraz z przejściem od ektoryzosfery, poprzez ryzoplanę i ryzoplanę/endoryzosferę, do endoryzosfery (Tabela 7). Różnice pomiędzy wartościami B/G w ektoryzosferze a wartościami B/G stref korzeniowych uległy obniżeniu w fazie dojrzałości, co spowodowane było wyższym stopniem kolonizacji przez grzyby korzeni w okresie ich zamierania.

Tabela 7

Stosunek liczebności bakterii do liczebności grzybów w ryzosferze pszenicy ozimej

Strefa ryzosfery	Faza 2. liścia	Faza 4. liścia	Faza kwitnienia	Faza pełnej dojrzałości	Wszystkie fazy
Ektoryzosfera	2000	380	1800	450	1150
Ryzoplana	13100	30600	17200	560	15400
Ryzop./Endor.	8500	81400	23200	4700	29400
Endoryzosfera	>300000	>300000	5200	23600	>150000
Strefy korzeniowe łącznie	10100	41000	19500	1200	17900

Na podstawie stosunku liczebności bakterii do liczebności grzybów (Tabela 7) można sądzić, że saprotroficzne bakterie okazały się znacznie lepszymi kolonizatorami powierzchni i (zwłaszcza) wnętrza korzeni od saprotroficznych grzybów. Potwierdzają to m.in. wyniki badań Gantottiego i Rangaswami (1971), Richardsa (1976) oraz van Vuurde i de Lange (1978), którzy uzyskali znacznie wyższe wartości efektu ryzosferowego w przypadku bakterii niż grzybów. Do określania liczebności drobnoustrojów stosowali oni, tak jak my, metody płytkowe. Metody płytkowe mogą być jednak mylące w przypadku określania liczebności grzybów. Praca Lumsdena i in. (1990), stwierdzająca odwrotną zależność pomiędzy biomasą a liczbą jednostek tworzących kolonie grzyba *Trichoderma* sugeruje, że grzyby w warunkach stresu (np. przy ograniczonym dostępie pokarmu lub przesuszeniu) tworzą dużą liczbę zarodników, co po wysianiu na płytki agarowe daje dużą liczbę kolonii, natomiast w warunkach korzystnych, gdy dostępna jest duża ilość pokarmu, energia grzyba jest

skierowana do produkcji wegetatywnej grzybni, co w efekcie może dać małą liczbę kolonii, a dużą biomasę grzyba. Podobne wnioski można wysnuć z pracy Agnihotrudu (1955). Jednakże, wykorzystanie technik mikroskopowych do określenia stopnia pokrycia powierzchni korzeni przez drobnoustroje (Gochnauer i in., 1989; Newman i in., 1981; Schönwitz i Ziegler, 1989; Turner i in., 1985) oraz oznaczenia oddychania czy mineralizacji glukozy w glebie ryzosferowej i pozaryzosferowej po wprowadzeniu cykloheksimidu i streptomycyny (Vancura i Kunc, 1977; Nakas i Klein, 1980) wskazują na to, że jednak bakterie dominują w glebie ryzosferowej i na korzeniach roślin, a grzyby w glebie pozaryzosferowej. Powyższe wnioski mogą też być potwierdzone przez wyniki pracy Joergensena (2000), który stwierdził, że procentowa zawartość ergosterolu w stosunku do ilości C-biomasy drobnoustrojów (określonej metodą fumigacji-inkubacji) na korzeniach traw była 3-krotnie niższa niż w glebie ryzosferowej i poza-ryzosferowej. Należy zaznaczyć, że w powyższych rozważaniach nie były brane pod uwagę grzyby mikoryzowe, których znaczna biomasa jest związana z korzeniami, a których liczebność nie może być określana metodami płytkowymi (De Leij i Lynch, 1997).

5.1.4. Skład jakościowy zespołów grzybowych

Wyizolowane na pożywce Martina grzyby należały do następujących rodzajów: *Acremonium*, *Alternaria*, *Arthrinium*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Coniothyrium*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Helminthosporium*, *Humicola*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium* (łącznie z *Paecilomyces*, ze względu na trudności identyfikacyjne), *Phoma*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Verticillium* (prawie wyłącznie *V. nigriscens*), *Zygodesmus* jak również różnokolorowe drożdże i grzyby niezarodnikujące (Tabele 8-11). Wyniki badań wielu autorów (Chrzanowski, 1976; Catská i in., 1960; Gams, 1967; Hałabuda, 1958a i 1958b; Peterson, 1958; Płaskowska, 1997; Rouatt i in., 1963; van Vuurde, 1978) potwierdzają powszechność występowania w ryzosferze i na korzeniach pszenicy tych rodzajów grzybów, jakie zostały znalezione w naszych badaniach.

Tabela 8

Jakościowy skład grzybów w różnych strefach ryzosfery w fazie 2. liścia pszenicy ozimej (w %)

Grupa grzybów	Ektoryzosfera (gleba przykorzeniowa)	Ryzoplana (powierzchniowa warstwa korzeni)	Ryzoplana/ endoryzosfera (homogenat korzeni nieodkaszanych)	Endoryzosfera (homogenat korzeni odkaszanych)	Ryzoplana/ endoryzosfera (odcinki korzeni nieodkaszanych)	Endoryzosfera (odcinki korzeni odkaszanych)
<i>Acremonium</i>	12,0	0	5,0	0	0	0
<i>Alternaria</i>	0	15,0	70,0	0	5,5	0
<i>Beauveria</i>	0	0	5,0	0	0	0
<i>Fusarium</i>	8,0	45,0	20,0	0	66,5	0
<i>Helminthosporium</i>	0	0	0	0	4,0	0
<i>Mortierella</i>	8,0	0	0	0	5,5	0
<i>Penicillium</i> (łącznie z <i>Paecilomyces</i>)	20,0	0	0	0	5,5	0
<i>Phoma</i>	4,0	0	0	0	0	0
<i>Scopulariopsis</i>	4,0	0	0	0	0	0
<i>Stachybotrys</i>	4,0	0	0	0	0	0
<i>Trichoderma</i>	12,0	10,0	0	0	0	0
<i>Verticillium</i>	20,0	5,0	0	0	0	0
Nie zarodnikujące żółte	0	15,0	0	0	9,0	0
Nieoznaczone	8,0	10,0	0	0	0	0
Liczba szczepów	25 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	0	18 (100%)	0

Tabela 9

Jakościowy skład grzybów w różnych strefach ryzosfery w fazie 4. liścia pszenicy ozimej (w %)

Grupa grzybów	Ektoryzosfera (gleba przykorzeniowa)	Ryzoplana (powierzchniowa warstwa korzeni)	Ryzoplana/ endoryzosfera (homogenat korzeni nieodkaszanych)	Endoryzosfera (homogenat korzeni odkaszanych)	Ryzoplana/ endoryzosfera (odcinki korzeni nieodkaszanych)	Endoryzosfera (odcinki korzeni odkaszanych)
<i>Acremonium</i>	0	10,0	0	0	-	-
<i>Alternaria</i>	0	2,5	0	0	-	-
<i>Arthrinium</i>	0	30,0	0	0	-	-
<i>Coniothyrium</i>	8,5	0	0	0	-	-
<i>Fusarium</i>	6,4	12,5	22,0	0	-	-
<i>Mucor</i>	4,25	5,0	0	0	-	-
<i>Penicillium</i> + <i>Paecilomyces</i>	38,3	15,0	32,0	0	-	-
<i>Phoma</i>	4,25	2,5	6,0	0	-	-
<i>Scopulariopsis</i>	4,25	0	4,0	0	-	-
<i>Trichoderma</i>	21,3	0	4,0	0	-	-
<i>Verticillium</i>	6,4	20,0	26,0	0	-	-
Nie zarodnikujące żółte	0	0	4,0	0	-	-
Nieoznaczone	21,3	2,5	2,0	0	-	-
Liczba szczepów	6,4	40 (100%)	50 (100%)	0	-	-

Tabela 10

Jakościowy skład grzybów w różnych strefach ryzosfery w fazie kwitnienia pszenicy ozimej (w %)

Grupa grzybów	Ektoryzosfera (gleba przykorzeniowa)	Ryzoplana (powierzchniowa warstwa korzeni)	Ryzoplana/ endoryzosfera (homogenat korzeni nieodkaszanych)	Endoryzosfera (homogenat korzeni odkaszanych)	Ryzoplana/ endoryzosfera (odcinki korzeni nieodkaszanych)	Endoryzosfera (odcinki korzeni odkaszanych)
<i>Acremonium</i>	12,9	13,0	7,6	0	0	0
<i>Cladosporium</i>	6,45	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i>	0	0	12,0	0	50,0	0
<i>Gliocladium</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Humicola</i>	0	0	1,1	0	0	0
<i>Mucor</i>	0	0	1,1	0	33,3	0
<i>Penicillium</i> + <i>Paecilomyces</i>	25,8	30,45	10,9	0	0	0
<i>Phoma</i>	9,7	4,35	0	0	0	0
<i>Sclerotinia</i>	3,2	0	0	0	0	0
<i>Trichoderma</i>	16,1	30,45	22,8	0	8,3	0
<i>Verticillium</i>	6,45	0	31,5	0	0	0
<i>Zygodesmus</i>	0	4,35	0	0	0	0
Drożdże	0	17,4	13,0	100	0	100
Nieoznaczone	19,4	0	0	0	8,3	0
Liczba szczepów	31 (100%)	23 (100%)	92 (100%)	6 (100%)	12 (100%)	6 (100%)

Tabela 11

Jakościowy skład grzybów w różnych strefach ryzosfery w fazie pełnej dojrzałości pszenicy ozimej (w %)

Grupa grzybów	Ektoryzosfera (gleba przykorzeniowa)	Ryzoplana (powierzchniowa warstwa korzeni)	Ryzoplana/ endoryzosfera (homogenat korzeni nieodkaszanych)	Endoryzosfera (homogenat korzeni odkaszanych)	Ryzoplana/ endoryzosfera (odcinki korzeni nieodkaszanych)	Endoryzosfera (odcinki korzeni odkaszanych)
<i>Aspergillus</i>	0	0	5,25	0	0	0
<i>Fusarium</i>	22,2	0	63,2	0	35	0
<i>Gliocladium</i>	27,8	50	15,8	100	15	100
<i>Mucor</i>	27,8	20	0	0	20	0
<i>Penicillium</i> + <i>Paecilomyces</i>	16,7	15	10,5	0	20	0
<i>Rhizoctonia</i>	0	0	5,25	0	0	0
<i>Trichoderma</i>	5,5	0	0	0	0	0
<i>Verticillium</i>	0	10	0	0	0	0
Liczba szczepów	18 (100%)	20 (100%)	19 (100%)	7 (100%)	20 (100%)	5 (100%)

Na podstawie przedstawionych wyników (Tabele 8-11) można stwierdzić, że w miarę starzenia się roślin następowały jakościowe zmiany w izolowanych zespołach grzybowych. Od fazy 2. liścia do fazy kwitnienia były one stosunkowo niewielkie w zespołach grzybowych, pochodzących z ektoryzosfery. Przeważały tu zdecydowanie *Penicillium* i *Trichoderma*, oraz w mniejszym stopniu *Verticillium* i *Acremonium*. W fazie 2. liścia z frakcji korzeniowych (z wyjątkiem korzeni odkażanych powierzchniowo, gdzie nie stwierdzano obecności grzybów) izolowano prawie wyłącznie *Alternaria* i *Fusarium*. W fazach późniejszych, *Fusarium* były nadal liczne w homogenacie korzeni nieodkażanych, a już szczególnie ten rodzaj dominował w zespołach grzybów wyizolowanych z odcinków korzeni nieodkażanych.

Tabela 12.

Procentowy udział rodzajów grzybów w zespołach grzybowych,
pochodzących z różnych stref ryzosfery.

Rodzaj lub grupa grzybów	Ektoryzosfera	Ryzoplana	Ryzoplana/Endoryzosfera
<i>Acremonium</i>	6,2	5,8	3,2
<i>Alternaria</i>	0	4,4	17,5
<i>Arthrinium</i>	0	7,5	0
<i>Aspergillus</i>	0	0	1,3
<i>Beauveria</i>	0	0	1,3
<i>Cladosporium</i>	1,6	0	0
<i>Coniothyrium</i>	2,1	0	0
<i>Fusarium</i>	9,2	15,6	29,3
<i>Gliocladium</i>	7,0	12,5	4,0
<i>Humicola</i>	0	0	0,3
<i>Mortierella</i>	2,0	0	0
<i>Mucor</i>	8,0	6,3	0,3
<i>Penicillium</i> + <i>Paecilomyces</i>	25,2	15,1	13,4
<i>Phoma</i>	4,5	1,7	1,5
<i>Rhizoctonia</i>	0	0	1,3
<i>Sclerotinia</i>	0,8	0	0
<i>Scopulariopsis</i>	2,1	0	1,0
<i>Stachybotrys</i>	1,0	0	0
<i>Trichoderma</i>	13,7	10,1	6,7
<i>Verticillium</i>	8,2	8,8	14,4
<i>Zygodesmus</i>	0	1,1	0
Drożdże	0	4,4	3,3
Nie zarodnikujące żółte	0	3,8	1,0
Nieoznaczone	8,5	3,1	0,5

W zespołach grzybowych, pochodzących z ryzoplany i ryzoplany/endoryzosfery starzejących się korzeni (już począwszy od fazy 4. liścia - Tabela 9), a więc w czasie, gdy zaciera się granica pomiędzy powierzchnią korzenia i glebą (De Leij i Lynch, 1997), nastąpił wyraźny wzrost udziału rodzajów bardziej typowych dla gleby (przeważających już od fazy 2. liścia w glebie przykorzeniowej - Tabela 8), a mianowicie *Penicillium*, *Trichoderma*, *Verticillium* i *Acremonium*. W czasie zamierania korzeni - w fazie dojrzałości (Tabela 11), z trzech pierwszych stref ryzosfery izolowano głównie przedstawicieli *Gliocladium*, *Fusarium* i *Penicillium*, a z dwu pierwszych stref ryzosfery także *Mucor*.

W Tabeli 12 przedstawiony jest średni (dla wszystkich faz rozwoju pszenicy ozimej) udział różnych rodzajów w zespołach grzybów z trzech pierwszych stref ryzosfery (ektoryzosfery, ryzoplany i ryzoplany/endoryzosfery). Na podstawie tych danych wynika, że (nie uwzględniając bardzo nielicznych przedstawicieli *Aspergillus*, *Beauveria*, *Humicola* i *Rhizoctonia*) udział jedynie trzech rodzajów: *Fusarium*, *Alternaria* i *Verticillium* (występującego głównie w postaci *V. nigrescens*) stopniowo wzrastał przy przejściu od ektoryzosfery do ryzoplany/endoryzosfery. Udział pozostałych rodzajów grzybów stopniowo malał (Tabela 12).

Należy zaznaczyć, że rodzaj *Fusarium* zdecydowanie przeważał w zespołach grzybów wyizolowanych z odcinków korzeni nieodkazywanych. Świadczy to o dużych zdolnościach *Fusarium* do kolonizowania nowego środowiska, jakim jest pożywka agarowa. Ciekawym jest fakt również wyraźnego wzrostu udziału *Mucor* w zespołach grzybowych z odcinków korzeni nieodkazywanych w fazach kwitnienia i pełnej dojrzałości. Należy tu nadmienić, że wszystkie szczepy *Mucor* z odcinków korzeni należały do gatunku *M. hiemalis*.

Catská i in. (1960), podobnie do wyników prezentowanych w Tabeli 12, zaobserwowali w doświadczeniu polowym stopniowy, bardzo silny wzrost udziału *Fusarium* (były to najliczniejsze grzyby w ryzosferze i na powierzchni korzeni) i *Alternaria*, oraz stopniowy spadek udziału *Penicillium* i *Trichoderma*, wraz z przejściem od gleby pozaryzosferowej, poprzez glebę ryzosferową do powierzchni korzeni pszenicy (natomiast zaobserwowane przez nich zmiany udziału *Mucor* i *Verticillium* w badanych strefach były odwrotne niż w Tabeli 12). Podobne wyniki uzyskały Kurek i in. (1994), a mianowicie wyższy udział *Fusarium* i *Alternaria*, a niższy udział *Penicillium* i *Trichoderma* w ryzosferze żyta niż w glebie wolnej od korzeni. Również Peterson (1958) stwierdził częstsze występowanie *Fusarium* a rzadsze *Penicillium* na powierzchni korzeni pszenicy niż w glebie ryzosferowej czy glebie poza-ryzosferowej. Z kolei, Płaskowska (1997) wyizolowała znacznie więcej szczepów *Fusarium*, *Mortierella* i *Mucor* z korzeni pszenicy niż z gleby

ryzosferowej. Być może duża zdolność grzybów z rodzaju *Fusarium* do kolonizowania powierzchni korzeni jest między innymi związana z ich zdolnością do wzrostu w warunkach o bardzo ograniczonym dostępie tlenu (Carlile i Watkinson, 1995).

To, że ryzosfera jest dla grzybów *Fusarium* dogodnym miejscem do życia, szczególnie świadczą wyniki badań Agnihothrudu (1955), który informuje, że grzyby *Fusarium* występowały w ryzosferze różnych roślin w postaci grzybni, a nie zarodników. Ten fakt może tłumaczyć, dlaczego w naszych badaniach grzyby z rodzaju *Fusarium* dominowały na pożywce agarowej wokół odcinków korzeni.

Endoryzosfera była miejscem niedostępnym dla grzybów saprotroficznych w fazach 2. i 4. liścia (nie badano występowania grzybów endomikoryzowych), dopiero w fazie kwitnienia stwierdzono obecność różnokolorowych drożdży. Podobnie Parkinson i Pearson (1967) stwierdzili, że kolonizacja powierzchni korzeni jęczmienia przez grzyby rozpoczęła się od *Candida* sp.. W naszych badaniach stwierdziliśmy, że pierwsze grzyby strzępkowe wniknęły do endoryzosfery dopiero w fazie dojrzałości, gdy zamarły siły życiowe korzenia. Okazały się nimi *Gliocladium*, powszechnie znane ze zdolności celulolitycznych (Domsch i in, 1980). Ciekawym jest fakt, że w odróżnieniu od zespołów grzybowych z odcinków korzeni nieodkazywanych, obraz zespołów grzybowych, pochodzących z odcinków korzeni odkazywanych powierzchniowo był dokładnie taki sam jak w przypadku homogenatów tych korzeni (Tabele 8 - 11).

5.1.5. Skład jakościowy zespołów bakterii saprotroficznych.

Z ryzosfery pszenicy ozimej wyodrębniono 1245 szczepów bakterii. Na podstawie cech morfologicznych i biochemicznych zakwalifikowano je do następujących rodzajów lub grup: *Acinetobacter*, *Actinomycetes*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Janthinobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*. Ze względu na trudności identyfikacyjne, pałeczki Gram (+) połączono w jedną grupę, nazwaną „Coryneform”. Niesklasyfikowane pałeczki Gram (-) rozdzielono do dwu grup „Nieoznaczone 1” i „Nieoznaczone 2”, za względu na niektóre wspólne cechy szczepów w obrębie każdej grupy. Na podstawie dodatkowej identyfikacji szczepy *Erwinia* i fluoryzujących *Pseudomonas* oznaczono do gatunku. Ponadto wśród szczepów *Bacillus* wydzielono szybko rosnące szczepy *B. mycoides*.

5.1.5.1. Zmiany jakościowe zachodzące w ryzosferze.

Stopniowo w miarę starzenia się roślin, w zespołach bakteryjnych następował wzrost udziału bakterii Gram (+). Wartości średnie udziału bakterii Gram (+) ze wszystkich stref ryzosfery łącznie odpowiednio wynosiły: w fazie 2. liścia - 19 %; w fazie 4. liścia - 21%; w fazie kwitnienia - 25% i w fazie dojrzałości - 51%. Zmiany jakościowe zespołów bakteryjnych zachodziły we wszystkich badanych strefach ryzosfery według podobnego schematu: (a) w fazie 2. liścia dominowały *Erwinia* i fluoryzujące *Pseudomonas*; (b) w fazie 4. liścia zdecydowanie przeważały fluoryzujące *Pseudomonas*, a *Flavobacterium-Cytophaga* i Coryneform wyraźnie zwiększyły swoje udziały; (c) faza kwitnienia to okres dominacji *Flavobacterium-Cytophaga* i w mniejszym stopniu Coryneform (z wyjątkiem endoryzosfery, w której prawie wyłącznie notowano fluoryzujące *Pseudomonas*), a (d) faza dojrzałości to okres wyraźnego wzrostu udziału Coryneform i *Alcaligenes* (Tabele 13-16). Zmiany jakościowego składu zespołów bakteryjnych od *Erwinia* i fluoryzujących *Pseudomonas* do Coryneform najszybciej przebiegały w ektoryzosferze, a najwolniej w endoryzosferze. Pomimo, że w przeciwieństwie do De Leija i Lyncha (1993) nie rozdzielaliśmy korzeni w danej fazie wzrostu roślin na młodsze (znajdujące się w głębszych warstwach gleby) i starsze (znajdujące się w górnych warstwach gleby), można stwierdzić, że zaobserwowany obraz zmian jakościowych zespołów bakteryjnych w ciągu okresu wegetacyjnego pszenicy doskonale odzwierciedla zmiany przejścia od bakteryjnych zespołów „r-strategów” (w naszym przypadku - bakterii z rodzaju *Erwinia* i fluoryzujących *Pseudomonas*), zasiedlających młode korzenie, do zespołów „K-strategów” (w naszym przypadku - *Flavobacterium-Cytophaga*, Coryneform i być może *Alcaligenes*), żyjących w środowisku starych korzeni (De Leij i in., 1993; De Leij i Lynch, 1997). Badane przez De Leij i in. (1993) zespoły bakterii, pochodzące z coraz młodszych korzeni pszenicy, rosnących w stopniowo głębszych warstwach gleby, w fazie krzewienia charakteryzowały się stopniowo zwiększającym się średnim wzrostem na pożywkach agarowych. Różnice w tempie wzrostu zespołów bakteryjnych, pochodzących z korzeni, położonych na różnej głębokości, zmniejszyły się w fazie kwitnienia i zanikły w fazie dojrzałości, a zespoły bakterii z różnych głębokości gleby pozakorzeniowej nie wykazywały żadnych różnic w tempie wzrostu na pożywkach agarowych (De Leij i in., 1993).

Obserwowaliśmy szczególną zdolność *Erwinia* i fluoryzujących *Pseudomonas* do kolonizowania pożywki agarowej wokół odcinków korzeni pszenicy położonych na pożywkę

agarową. Nawet w okresie ich niskiej liczebności na i w korzeniach (nie notowane lub prawie nie notowane w homogenatach korzeni: (a) fluoryzujące *Pseudomonas* w fazie dojrzałości i kwitnienia w homogenacie korzeni nieodkazywanych <Tabele 15 i 16> oraz (b) *Erwinia* w fazach 4. liścia i kwitnienia <Tabele 14 i 15>) potrafiły wygrać konkurencję w zasiedleniu pożywki agarowej wokół odcinków korzeni ze znacznie liczniejszymi grupami bakterii. Z drugiej strony, *Flavobacterium-Cytophaga* liczne w fazie 4. liścia i kwitnienia, a Coryneform i *Alcaligenes*, liczne w fazie kwitnienia i szczególnie w fazie pełnej dojrzałości, były prawie nie notowane na pożywce wokół odcinków korzeni. Wyniki otrzymane przez Nijhuis i in. (1993) potwierdzają nasze dane, omówione powyżej. Badali oni m. in. zdolność różnych grup bakterii, izolowanych z ryzosfery traw, do kolonizacji korzeni na płytkach agarowych. Indeks kolonizacyjny wyliczony przez mnie [(procentowy udział poszczególnych grup bakterii w klasie trzeciej <cały korzeń zasiedlony przez daną grupę bakterii> x 2 + procentowy udział poszczególnych grup bakterii w klasie drugiej <zasiedlona tylko górna, starsza część korzenia> x 1 + procentowy udział poszczególnych grup bakterii w klasie pierwszej <nie stwierdzono kolonizacji korzeni przez daną grupę bakterii> x 0)/100%] na podstawie wyników tej pracy wynosił: bakterie Gram (-) 1,80; bakterie Gram (+) 1,29; *Pseudomonas* 2,00; *Flavobacterium* 1,65; Coryneform 1,32 (najwyższy dla *Cellulomonas/Corynebacterium* 1,59 i *Arthrobacter/Rhodococcus* 1,44); *Streptomyces* 0. Badanie kolonizacji ryzosfery i ryzoplany przez wyizolowane szczepy wskazują, że szczep *Pseudomonas* w jednakowy sposób kolonizował zarówno młode jak i stare korzenie, natomiast *Flavobacterium* głównie stare (Nijhuis i in., 1993).

Tabela 18 pokazuje wyraźną przewagę fluoryzujących *Pseudomonas* oraz *Erwinia* do kolonizacji endoryzosfery. Udział tych grup ryzobakterii wyraźnie wzrastał w kolejnych strefach ryzosfery (przy przejściu od ektoryzosfery do endoryzosfery). Dane te sugerują, że bakterie, należące do tych rodzajów są szczególnie uzdolnione do kolonizowania wnętrza korzeni. Z wyjątkiem *Bacillus* udział pozostałych badanych grup lub rodzajów bakterii bardziej lub mniej wyraźnie stopniowo się obniżał (Tabela 17). Wyższy udział *Bacillus* w zespole z endoryzosfery może być spowodowany niedostateczną sterylizacją zarodników tych bakterii (Kunicki-Goldfinger, 1994).

Tabela 13

Jakościowy skład bakterii w różnych strefach ryzosfery w fazie 2. liścia (w %)

Grupa bakterii	Ektoryzosfera (gleba przykorzeniowa)	Ryzoplana (powierzchniowa warstwa korzeni)	Ryzoplana/ endoryzosfera (homogenat korz. nieodkąż.)	Endoryzosfera (homogenat korzeni odkąż.)	Ryzoplana/ endoryzosfera (odcinki korzeni nieodkąż.)	Endoryzosfera (odcinki korzeni odkążanych)
<i>Acinetobacter</i>	8,6	1,5	0	0	0	0
<i>Actinomycetes</i>	8,6	0	0	0	0	0
<i>Alcaligenes</i>	1,7	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i>	0	3,0	0	5,6	10,7	18,9
(<i>B. mycoides</i>)*		(0)*		(0)*	(100)*	(71)*
Coryneform	6,9	4,5	6,3	5,6	0	2,7
<i>Erwinia</i>	19,0	13,6	23,5	63,8	57,1	45,9
(<i>E. carotovora</i>)*	(73)*	(89)*	(40)*	(70)*	(100)*	(100)*
(<i>E. herbicola</i>)*	(27)*	(11)*	(60)*	(30)*		
<i>Flavobacterium-Cytophaga</i>	6,9	3,0	6,3	0	0	0
<i>Janthinobacterium</i>	0	0	1,6	0	0	0
<i>Klebsiella</i>	5,2	1,5	4,7	2,8	7,1	0
<i>Micrococcus</i>	5,2	27,3	1,6	2,8	0	0
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	24,1	27,3	37,5	13,9	14,3	27,0
(<i>P. fluorescens</i>)*	(79)*	(92)*	(96)*	(100)*	(50)*	(90)*
(<i>P. putida</i>)*	(7)*					(10)*
(<i>P. syringae</i>)*		(8)*	(4)*		(50)*	
(<i>P. cichorii</i>)*	(14)*					
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	5,2	4,5	0	0	0	0
<i>Xanthomonas</i>	1,7	1,5	4,7	0	0	0
Nieoznaczone 1	3,45	3,0	9,4	5,6	3,6	2,7
Nieoznaczone 2	3,45	9,1	4,7	0	7,1	2,7
Liczba szczepów	58 (100%)	66 (100%)	64 (100%)	36 (100%)	28 (100%)	37 (100%)

* - Wartości w nawiasach informują o procentowym udziale różnych gatunków w zespołach *Erwinia* i fluoryzujących *Pseudomonas* oraz o udziale *B. mycoides* w zespole *Bacillus* (rzędy zacięnione).

Tabela 14

Jakościowy skład bakterii w różnych strefach ryzosfery w fazie 4. liścia (w %)

Grupa bakterii	Ektoryzosfera (gleba przykorzeniowa)	Ryzoplana (powierzchniowa warstwa korzeni)	Ryzoplana/ endoryzosfera (homogenat korz. nieodkaz.)	Endoryzosfera (homogenat korzeni odkaż.)	Ryzoplana/ endoryzosfera (odcinki korzeni nieodkaz.)	Endoryzosfera (odcinki korzeni odkażanych)
<i>Acinetobacter</i>	4,3	7,4	0	0	0	0
<i>Alcaligenes</i>	2,2	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i>	2,2	5,6	0	22,9	35,5	50,0
(<i>B. mycoides</i>)*	(0)*	(0)*		(0)*	(18)*	(23)*
Coryneform	13,0	11,1	14,3	6,3	3,2	2,3
<i>Erwinia</i>	0	0	0	0	3,2	0
(<i>E. carotovora</i>)**					(100)*	
<i>Flavobacterium-Cytophaga</i>	23,9	11,1	25,4	10,4	0	0
<i>Micrococcus</i>	0	7,4	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> fluoryzuj¹cy	28,3	48,1	44,4	52,1	48,4	43,2
(<i>P. fluorescens</i>)*	(61)*	(47)*	(67)*	(38)*	(100)*	(100)*
(<i>P. putida</i>)*	(8)*					
(<i>P. syringae</i>)*	(31)*	(53)*	(33)*	(62)*		
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzuj¹cy	10,9	5,6	9,5	2,1	6,5	0
<i>Xanthomonas</i>	0	1,9	3,2	0	0	0
Nieoznaczone 1	15,2	1,9	3,2	6,3	0	0
Nieoznaczone 2	0	0	0	0	3,2	4,5
Liczba szczepów	46 (100%)	54 (100%)	63 (100%)	48 (100%)	31 (100%)	44 (100%)

* - Wartości w nawiasach informują o procentowym udziale różnych gatunków w zespołach *Erwinia* i fluoryzujących *Pseudomonas* oraz o udziale *B. mycoides* w zespole *Bacillus* (rzędy zacięnione).

Tabela 15

Jakościowy skład bakterii w różnych strefach ryzosfery w fazie kwitnienia (w %)

Grupa bakterii	Ektoryzosfera (gleba przykorzeniowa)	Ryzoplana (powierzchniowa warstwa korzeni)	Ryzoplana/ endoryzosfera (homogenat korz. nieodk.ż.)	Endoryzosfera (homogenat korzeni odk.ż.)	Ryzoplana/ endoryzosfera (odcinki korzeni nieodk.ż.)	Endoryzosfera (odcinki korzeni odk.ż.)
<i>Acinetobacter</i>	0	9,2	2,4	0	0	0
<i>Actinomycetes</i>	10,0	0	0	0	0	0
<i>Alcaligenes</i>	3,3	3,4	8,9	0	0	4,2
<i>Bacillus</i>	6,7	2,3	10,6	8,3	21,4	16,7
(<i>B. mycoides</i>)*			(0)*	(2,1)*	(0)*	(25)*
Coryneform	33,3	12,6	16,3	0	3,6	25,0
<i>Erwinia</i>	0	0	0	0	3,6	8,3
(<i>E. carotovora</i>)*					(100)*	(100)*
<i>Flavobacterium-Cytophaga</i>	33,3	25,3	33,3	0	7,1	0
<i>Micrococcus</i>	0	1,1	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> fluoryzuj ¹ cy	3,3	9,2	0	84,4	39,3	37,5
(<i>P. fluorescens</i>)*		(67)*		(75)*	(67)*	(83)*
(<i>P. putida</i>)*	(100)*	(17)*		(22)*		(17)*
(<i>P. syringae</i>)*		(17)*			(33)*	
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzuj ¹ cy	3,3	12,6	6,5	0	21,4	0
<i>Xanthomonas</i>	6,7	8,0	6,5	6,3	0	0
Nieoznaczone 1	0	9,2	10,6	0	3,6	0
Nieoznaczone 2	0	6,9	4,9	1,0	0	8,3
Liczba szczepów	30 (100%)	87 (100%)	87 (100%)	96 (100%)	28 (100%)	24 (100%)

* - Wartości w nawiasach informują o procentowym udziale różnych gatunków w zespołach *Erwinia* i fluoryzujących *Pseudomonas* oraz o udziale *B. mycoides* w zespole *Bacillus* (rzędy zacięzione).

Tabela 16

Jakościowy skład bakterii w różnych strefach ryzosfery w fazie pełnej dojrzałości (w %)

Grupa bakterii	Ektoryzosfera (gleba przykorzeniowa)	Ryzoplana (powierzchniowa warstwa korzeni)	Ryzoplana/ endoryzosfera (homogenat korz. nieodkąż.)	Endoryzosfera (homogenat korzeni odkąż.)	Ryzoplana/ endoryzosfera (odcinki korzeni nieodkąż.)	Endoryzosfera (odcinki korzeni odkążanych)
<i>Acinetobacter</i>	1,5	0	5,0	1,8	0	0
<i>Alcaligenes</i>	15,2	3,6	22,5	12,7	0	0
<i>Bacillus</i>	6,1	18,1	0	7,3	33,3	47,1
(<i>B. mycoides</i>)*		(0)*		(0)*	(0)*	(0)*
Coryneform	37,9	28,9	37,5	43,6	3,7	0
<i>Erwinia</i>	13,6	2,4	0	3,6	7,4	0
(<i>E. carotovora</i>)*	(100)*	(100)*		(100)*	(100)*	
<i>Flavobacterium-Cytophaga</i>	6,1	2,4	0	0	0	5,9
<i>Klebsiella</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus</i>	7,6	12,0	2,5	1,8	0	0
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	0	4,8	10,0	3,6	22,2	35,3
(<i>P. fluorescens</i>)*		(25)*	(100)*	(50)*	(57)*	(100)*
(<i>P. putida</i>)*		(50)*			(29)*	
(<i>P. syringae</i>)*		(25)*		(50)*		
(<i>P. cichorii</i>)*					(14)*	
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	4,5	4,8	2,5	3,6	11,1	0
<i>Xanthomonas</i>	3,0	8,4	2,5	7,3	11,1	0
Nieoznaczone 1	4,5	10,8	7,5	10,9	7,4	11,7
Nieoznaczone 2	0	3,6	10,0	3,6	3,7	0
Liczba szczepów	66 (100%)	83 (100%)	83 (100%)	55 (100%)	27 (100%)	17 (100%)

* - Wartości w nawiasach informują o procentowym udziale różnych gatunków w zespołach *Erwinia* i fluoryzujących *Pseudomonas* oraz o udziale *B. mycoides* w zespole *Bacillus* (rzędy zacienione).

Tabela 17

Procentowy udział różnych grup bakterii w strefach ryzosfery
(średnia z 3 pierwszych badanych faz rozwoju pszenicy - **bez fazy dojrzałości**)

Rodzaj lub grupa bakterii	Ektoryzosfera	Ryzoplana	Ryzoplana/ Endoryzosfera	Endoryzosfera
<i>Acinetobacter</i>	4,3	6,0	0,8	0
<i>Actinomycetes</i>	6,2	0	0	0
<i>Alcaligenes</i>	2,4	1,1	3,0	0
<i>Bacillus</i>	2,9	3,6	3,5	12,3
Coryneform	17,8	9,4	12,3	3,9
<i>Erwinia</i>	6,3	4,5	7,8	21,3
(<i>E. carotovora</i>)*	(73)*	(89)*	(40)*	(70)*
(<i>E. herbicola</i>)*	(27)*	(11)*	(60)*	(30)*
<i>Flavobacterium -Cytophaga</i>	21,4	13,1	21,7	3,5
<i>Klebsiella</i>	1,7	0,5	1,6	0,9
<i>Micrococcus</i>	1,7	11,9	0,5	0,9
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	18,6	28,2	27,8	50,1
(<i>P. fluorescens</i>)*	(47)*	(68,5)*	(81,5)*	(71)*
(<i>P. putida</i>)*	(38)*	(5,5)*		(7)*
(<i>P. syringae</i>)*	(10)*	(26)*	(18,5)*	(21)*
(<i>P. cichorii</i>)*	(5)*			
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	6,5	7,6	5,3	0,7
<i>Xanthomonas</i>	2,8	3,8	4,8	2,1
Nieoznaczone 1	6,2	4,7	7,7	3,9
Nieoznaczone 2	1,1	5,3	3,2	0,3
Bakterie Gram (+)	28,6	24,9	16,3	17,1

* - Wartości w nawiasach informują o procentowym udziale różnych gatunków w zespołach *Erwinia* i fluoryzujących *Pseudomonas*.

5.1.5.2. Główne grupy bakterii ryzosfery pszenicy ozimej

5.1.5.2.1. Fluoryzujące *Pseudomonas* w naszych badaniach okazały się najliczniejszą grupą drobnoustrojów w ryzosferze pszenicy ozimej. Wyróżniały się one wyjątkową zdolnością do kolonizacji powierzchni i (zwłaszcza) wnętrza korzeni, podobnie do danych przedstawionych przez Burnsa i in. (1989), Gamsa (1967), Grayston i in. (1998), Lyncha i Whippsa (1990), Rouatta i Katznelsona (1961), Rouatta i in. (1963), Sato i Jianga (1997), Vagnerová i in. (1960a) oraz Vančurę (1980).

Rozbieżności pomiędzy różnymi badaczami w ocenie znaczenia bakterii *Pseudomonas* w ryzosferze roślin (przedstawione w Przeglądzie Literatury) mogą być spowodowane

stosowaniem przez nich różnych podłoży mikrobiologicznych, skutkiem czego wyniki nie mogą być do końca porównywalne. Nijhuis i in. (1993) badali skład zespołów bakterii gleby ryzosferowej i ryzoplany traw na (a) 10% agarze z tryptonem i wyciągiem z soi (TSA) oraz (b) agarze z wyciągiem glebowym (SEA). Na TSA izolowano mniej więcej równe ilości bakterii Gram (-) i Gram (+), natomiast na SEA głównie bakterie Gram (+). Średni udział bakterii z różnych rodzajów i grup w zespole bakterii z TSA i SEA odpowiednio wynosił: *Pseudomonas* 21% i 4%; *Flavobacterium* 12% i 10%; *Bacillus* 1% i 3%; coryneform 46% i 75%; *Streptomyces* 1% i 2%. Również Turner i in. (1985) stwierdzili, że pleomorficzne bakterie były bardziej liczne niż pałeczki w ryzosferze życicy, gdy do izolacji użyto pożywkę ubogą w składniki pokarmowe, a Liljeroth i in. (1991) informują, że gdy izolację prowadzono na pożywkach ubogich, bakterie coryneform, zarówno Gram dodatnie jak i Gram ujemne były bardzo liczne, a pseudomonasy stanowiły mniej niż 1% izolatów.

Należy podkreślić, że rosnący korzeń wnika do gleby, która nie jest sterylna. Znajdują się w niej liczne, dla niej typowe oligotrofy („drobnoustroje autochtoniczne” wg dawnej teorii Winogradskiego), rosnące na ubogich pożywkach, zawierających wyciąg glebowy. Są to głównie bakterie Gram (+). Dzięki wydzielinom korzeniowym następuje stymulacja wzrostu kopiotrofów (zymogenów) - głównie bakterii Gram (-), które początkowo mogą być mało liczne. Wyrastają one na pożywkach bogatych w składniki pokarmowe (Lynch, 1989; Marszewska-Ziemińska i in., 1974). Należy tu przytoczyć wyniki pracy Tesarovej i Šimka (1989), które informują, że wraz z przejściem od gleby pozaryzosferowej, poprzez glebę ryzosferową do ryzoplany traw, bardzo wyraźnie (z 3, poprzez 14 do 26%) stopniowo wzrastał (w stosunku do bakterii liczonych bezpośrednią metodą mikroskopową) udział bakterii aktywnych metabolicznie, liczonych na bogatych pożywkach agarowych. Podobne wnioski można wyciągnąć na podstawie dawnych badań Louw i Webley (1959), informujących, że stosunki liczebności bakterii określane metodą bezpośredniego liczenia do liczebności określanych metodą płytkową były kilkakrotnie mniejsze w przypadku gleby ryzosferowej owsa i jego powierzchni, niż w przypadku gleby pozaryzosferowej. Wyliczony przez Pietra i Stankiewicz (1990) współczynnik λ z równania Hattoriego (wyrażający prawdopodobieństwo proliferacji komórek w jednostce czasu) dla zespołów ryzoplany bobiku, pszenicy ozimej i rzepaku, informuje, że bakterie z rodzaju *Pseudomonas* znajdują się w ryzopłanie, przeciwieństwie do ogólnej liczebności bakterii, w stanie fizjologicznie aktywnym. Dowodzi to (wg tych autorów), iż właśnie bakterie *Pseudomonas* znajdują w ryzopłanie roślin (niezależnie od siedliska glebowego) dobre warunki dla swego rozwoju.

Bardzo liczne w glebie bakterie autochtoniczne (oligotrofy), których rozwój w mniejszym stopniu niż rozwój zymogenów (kopirotrofów) ulega stymulacji przez wydzieliny korzeniowe i które w ryzosferze są najprawdopodobniej dużo mniej aktywne, nadal są żywe i liczne i po wysianiu zawiesiny gleby lub korzeni, mogą wyrosnąć na odpowiednich, selektywnych pożywkach. To nie musi znaczyć, że one w ryzosferze pełnią pierwszorzędną rolę. Z kolei bakterie zymogeniczne (np. fluoryzujące *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacterium*) zwiększające swoją liczebność w ryzosferze roślin pod wpływem wydzielin korzeniowych, nawet po namnożeniu mogą być w stosunku do autochtonów mniej liczebne, co nie znaczy, że ich rola w ryzosferze jest mało lub nieistotna. O prawdziwości takiego rozumowania może świadczyć praca Raaijmakersa i in. (1997), którzy stwierdzili, że fluoryzujące *Pseudomonas* syntetyzujące 2,4-diacetylofloroglucynol, które pomimo, że występowały w liczebności 1 mln lub mniej w przeliczeniu na 1 g korzeni, co z całą pewnością stanowiło niewielki ułamek w stosunku do całkowitej liczebności bakterii, one to najprawdopodobniej były odpowiedzialne za powstanie „odporności gleb” na zgorzel podstawy źdźbła. Należy jeszcze przytoczyć pogląd Lyncha (1989), który informuje, że aby szczep bakterii, wprowadzany do ryzosfery jako szczepionka odniósł sukces, powinien rosnąć kopirotroficznie na substracie dostarczonym do gleby przez korzenie.

Omawiane powyżej różnice w wynikach różnych badaczy i ocenie znaczenia fluoryzujących *Pseudomonas* w strefie korzeniowej, mogą być zależne od gatunku badanych roślin. Martin (1975) stwierdził, że na tej samej glebie, w przypadku pszenicy, efekt ryzosferowy dla liczebności fluoryzujących pseudomonasów był 21-krotnie wyższy od odpowiedniego efektu ryzosferowego dla liczebności wszystkich bakterii, a w przypadku koniczyzny ten efekt był wyższy tylko 2,1-krotnie. Różnice te mogą też być spowodowane różnymi czynnikami środowiskowymi np. różną temperaturą czy nawożeniem.. McInroy i in. (1997) izolowali endofityczne bakterie z łodyg roślin tych samych odmian bawełny, wysianych w Chinach i USA. Z amerykańskich roślin izolowano głównie bakterie *Pseudomonas* (60-80% izolatów), a z chińskich głównie *Bacillus* (80-90%). Podobnie Vlassak i in. (1992) informują, że z korzeni roślin klimatu umiarkowanego częściej izoluje się fluoryzujące *Pseudomonas* niż z roślin klimatu tropikalnego. Rouatt i in. (1963) stwierdzili, że zmiana temperatury z 13-15⁰C do 30-32⁰C spowodowała w zespole bakterii, izolowanych z ryzoplany pszenicy, znaczne obniżenie udziału bakterii Gram (-), szczególnie należących do rodzaju *Pseudomonas*, natomiast zmiany w zespole bakterii, izolowanych z ryzoplany soi były dokładnie odwrotne. Na podstawie danych Millera i in. (1990b) istotnie obniżał się

udział fluoryzujących *Pseudomonas* w zespołach z ryzosfery pszenicy po nawożeniu wysokimi dawkami azotu.

Przytoczone dane informują, że odpowiedź na pytanie o znaczeniu fluoryzujących *Pseudomonas* w ryzosferze roślin nie jest ani łatwa ani jednoznaczna.

5.1.5.2.1.1. Skład jakościowy fluoryzujących *Pseudomonas*.

Większość wyizolowanych szczepów fluoryzujących *Pseudomonas* została zaliczona do *P. fluorescens* (Tabele 13-16). Zaznaczyła się też tendencja wzrastającego udziału *P. fluorescens* przy przejściu od ektoryzosfery do endoryzosfery (Tabela 17). Ponadto izolowano *P. putida*, *P. syringae* i kilka szczepów *P. cichorii*. Podobnie, Clays-Josserand i in. (1999) stwierdzili, że *P. putida* był głównym gatunkiem w zespołach fluoryzujących *Pseudomonas* w glebie nieuprawianej, w której udział *P. fluorescens* był niewielki, natomiast w zespołach bakterii izolowanych z korzeni lnu i pomidora zdecydowanie (niekiedy do 100%) zwiększył się udział *P. fluorescens*, a zmalał udział *P. putida*. Również *P. fluorescens* był głównym gatunkiem fluoryzujących *Pseudomonas* (nie stwierdzono obecności *P. putida*) izolowanym z ryzosfery pszenicy, traw i koniczyny przez Grayston i in. (1998), a także w strefach mikoryzosfery i mikoryzy daglezi (Frey i in., 1997), gdzie obserwowano stopniowy wzrost udziału *P. fluorescens* przy przejściu od gleby do strefy mikoryzy. Podobnie, Emnova i in. (1995) - z ryzoplany kukurydzy, słonecznika i lucerny, van Peer i in. (1990) - z ryzoplany i endoryzosfery pomidora oraz Vancura (1980) - z ryzosfery pszenicy, kukurydzy i ogórka, izolowali głównie *P. fluorescens* i w mniejszym stopniu *P. putida*. Niekiedy, np. w ryzosferze jęczmienia Vancura (1980) i w ryzosferach roślin tropikalnych (ryż, banan, cassawa) (Hernandez i in., 1986 - cyt. za Sathivel i Gnanamanickam, 1989; Vlassak i in., 1992) *P. putida* był dominującym gatunkiem fluoryzujących *Pseudomonas*.

5.1.5.2.2. Bakterie z rodzaju *Bacillus*, stosunkowo nieliczne w zespołach bakterii z ektoryzosfery, ryzoplany oraz homogenatach korzeni (nieco wyższy udział w homogenatach korzeni odkażanych powierzchniowo), bakterie *Bacillus* były grupą dominującą w zespołach z odcinków korzeni (Tabele 13-16). Ich wyższy udział w zespole bakterii z odcinków korzeni odkażanych powierzchniowo (podobnie jak w zespołach bakterii z homogenatów tych korzeni) mógł być spowodowany niedostateczną sterylizacją ich zarodników przez stosowane środki - 70% etanol i 3% H₂O₂ (Kunicki-Goldfinger, 1994). Należy jednak podkreślić, że udział *Bacillus* był równie duży w zespołach z odcinków korzeni nieodkażanych powierzchniowo, co raczej świadczy o ich dużych zdolnościach konkurencyjnych w

zasiedlaniu pożywki agarowej. Również Stanghellini i Rasmussen (1989) zaobserwowali, że kolonie bakterii z rodzaju *Bacillus* dominowały na pożywkach agarowych, po odcisnięciu na ich powierzchni korzeni różnych roślin. Być może bakterie *Bacillus* wygrywały konkurencję o przestrzeń dzięki wydzielaniu metabolitów o zdolnościach antybiotycznych, co jest zjawiskiem często notowanym u różnych gatunków *Bacillus* (Katz i Demain, 1977; Ryder i McClure, 1997; Świącicka i Hauschild, 1996). Niektórym szczepom mogła pomóc ich zdolność do bardzo szybkiego wzrostu. Obserwowaliśmy przede wszystkim wyraźny wzrost udziału (w porównaniu do zespołów z homogenatów korzeni) bardzo szybko rosnących *B. mycoides*. Należy zaznaczyć, że stosunkowo niski udział bakterii z rodzaju *Bacillus* w zespołach bakterii izolowanych z zawiesin gleby przykorzeniowej lub zhomogenizowanych korzeni (mniejsza liczba jednostek tworzących kolonie) mógł być spowodowany zaobserwowaną zdolnością tych bakterii do tworzenia agregatów komórek, stosunkowo trwałych na rozerwanie, podczas gdy kolonie innych bakterii łatwo rozpadały się na pojedyncze komórki.

Do próby wyjaśnienia kontrowersji w poglądach różnych badaczy, dotyczących występowania bakterii *Bacillus* w ryzosferze roślin (przedstawionych w Przeglądzie Literatury), należy przytoczyć wyniki badań Vagnerovej i in. (1960a), którzy stwierdzili, że przy przejściu od zespołów bakteryjnych z gleby ugoru poprzez zespół bakterii z gleby ryzosferowej pszenicy do zespołu bakterii, pochodzącego z powierzchni jej korzeni, chociaż udział wszystkich *Bacillus* stopniowo malał, stopniowo wzrastał udział tych bakterii wymagających aminokwasy. Świącicka i Hauschild (1996), na podstawie danych Priesta (1993) także informują o istnieniu dwu grup *Bacillus*, jednej glebowej, o małych wymaganiach pokarmowych i drugiej, charakterystycznej dla ryzosfery, o dużych wymaganiach pokarmowych, potrzebujących do rozwoju różnorodnych aminokwasów i witamin. Na podstawie badań Mavingui i in. (1992) wynika, że nawet populacje bakterii należące do tego samego gatunku (*B. polymyxa*), pochodzące z trzech odrębnych nisz ekologicznych (gleby pozaryzosferowej, gleby ryzosferowej i ryzoplany pszenicy), różniły się fenotypowo i genotypowo. Gochner i in. (1989) stwierdzają na podstawie danych własnych i cytowanych autorów, że obok fluoryzujących pseudomonasów, bakterie z rodzaju *Bacillus* były bardziej liczne (określane metodami płytkowymi) na młodych korzeniach kukurydzy i traw niż starych. Autorzy ci także podają, że tylko na powierzchni młodych korzeni kukurydzy, a nie starych, były widoczne pod mikroskopem łańcuchy zarodników. Zapewne (na podstawie przytoczonych powyżej informacji literaturowych i danych własnych, informujących o dużych zdolnościach bakterii *Bacillus* do kolonizacji pożywki agarowej

wokół odcinków korzeni pszenicy) ryzosferowe *Bacillus* należy również zaliczyć do tzw. „r-strategów”. Także mogą w pewnym stopniu o tym świadczyć wysokie dla bakterii *Bacillus* ryzoplany roślin (wyższe nawet niż dla bakterii *Pseudomonas*) wartości parametru λ z równania Hattoriego, wyliczone przez Pietra i Stankiewicz (1990).

5.1.5.2.3. Grupa *Flavobacterium-Cytophaga* została utworzona ze względu na trudności identyfikacyjne (w podobny sposób postępowali inni badacze - Bergey's Manual, 1984, 1989). Ta niejednorodna taksonomicznie grupa bakterii, była jedną z liczniejszych w różnych strefach ryzosfery pszenicy w fazach 4. liścia i kwitnienia (Tabele 14 i 15). Również Sato i Jiang (1997) stwierdzili, że *Flavobacterium-Cytophaga*, a Gams (1967) i Paszkowski i Kobus (1995a) informują, że *Flavobacterium* - to obok *Pseudomonas* główna grupa bakterii izolowanych (odpowiednio) z powierzchni korzeni pszenicy, ryzosfery pszenicy i ryzosfery owsa. Kremer i in. (1990) izolowali *Flavobacterium* z ryzosfery chwastów, a Burns i in. (1989), Vagnerova i in. (1960a), Rouatt i in. (1963) oraz Rouatt i Katznelson (1961) stwierdzili, że udział *Flavobacterium* w zespołach bakteryjnych stopniowo wzrastał przy przejściu od gleby poza-korzeniowej, poprzez glebę ryzosferową do powierzchni korzeni różnych roślin, w tym pszenicy. Podobnie Germida i in. (1997) informują, że *Flavobacterium* to najliczniejsza grupa bakterii Gram (-) w ryzopłanie i wnętrzu korzeni rzepaku jarego.

5.1.5.2.4. *Enterobacteriaceae* była grupą bakterii licznie występującą w fazie 2. liścia (Tabela 13). Wyizolowane szczepy zaliczone zostały głównie do *Erwinia carotovora* (prawdopodobnie subsp. *carotovora*) oraz w mniejszym stopniu do *Erwinia herbicola* i *Klebsiella* sp.. Obecnie, gatunek *Erwinia herbicola* (nazywany także *Enterobacter agglomerans*) został zmieniony na nowy gatunek *Pantoea agglomerans*, ale z powodu, iż do identyfikacji bakterii korzystano z „Bergey's Manual z r. 1984, w którym ta nazwa jeszcze nie występuje, oraz z powodu, że nazwy *E. herbicola* i *P. agglomerans* uznano za równoważne synonimy (Schollenberger, 1997), pozostano przy nazwie *E. herbicola*. Wyizolowane szczepy *Enterobacteriaceae* z wyjątkiem *Klebsiella* należą do gatunków potencjalnie chorobotwórczych dla roślin. Należy jednak podkreślić, że izolowano je ze zdrowych korzeni. Część z wyizolowanych szczepów *Erwinia* miała zdolność do rozkładu pektyn (test na krążkach bulw ziemniaka) inne nie. Być może szczepy te były niepatogenne lub mało patogenne dla pszenicy, a może nie wystąpiły sprzyjające warunki (np. odpowiednia temperatura) do wystąpienia choroby. Niepatogenne *Erwinia carotovora* izolowali z bulw

ziemniaka Pishchik i in. (1998). Nie wykazywały one aktywności liazy pektynianowej. Z kolei Łojkowska i in. (1997) informują, że *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* wywołuje infekcje roślin w temperaturach wyższych od 25°C. Należy też zaznaczyć, że rodzaj *Erwinia* jest bardzo zbliżony do rodzaju *Enterobacter* i być może ktoś inny zaklasyfikowałby wyizolowane szczepy do *Enterobacter* sp.

Bakterie te, szczególnie *E. carotovora* wykazały duże zdolności do zasiedlania powierzchni i wnętrza korzeni, oraz do kolonizacji pożywki agarowej wokół odcinków korzeni (izolowano wyłącznie *E. carotovora*) (Tabele 13-17). Podobnie Rattray i in. (1995) stwierdzili dużą zdolność *Enterobacter cloacae* do kolonizacji korzeni pszenicy., a Lalande i in. (1989) informują, że *Serratia*, *Enterobacter* i *Klebsiella* są po bakteriach *Pseudomonas* i *Bacillus* najliczniejszą grupą bakterii ryzosfery kukurydzy, a Kloepper i in. (1992) przytaczają szereg przykładów, w których *Erwinia* lub *Enterobacter* były jednymi z głównych grup endofitów. Dużą aktywność metaboliczną *Enterobacteriaceae* potwierdzają badania Heuer i in. (1995) - cyt. przez Grayston i in. (1998), którzy stwierdzili, że szybko rosnące bakterie *Enterobacter* były odpowiedzialne za zmianę barwy podłoża systemu Biolog, szczepionych zawiesziną gleby, tzn. że głównie one rozwijały się na testowych podłożach.

Niektóre szczepy *Enterobacteriaceae* (wyizolowane na pożywkach bezazotowych) testowano na zdolność do redukcji acetyleny (dane nie prezentowane). Z testów tych wynika, że *Klebsiella* i (w znacznie mniejszym stopniu) *Erwinia* wykazywały zdolność do redukcji acetyleny, co sugeruje, że mogą one wiązać wolny azot. Również Lynch i Whipps (1990) stwierdzają za cytowanymi przez siebie autorami, że bakterie *Enterobacter* spp. są szczególnie ważne jako kolonizatorzy endoryzosfery ponieważ wiele szczepów ma zdolność do wiązania N₂. Podobnie Lutfu Cakmakci i in. (1981) wyizolowali z korzeni pszenicy wiążącą wolny azot *Klebsiella oxytoca*, Werner i in. (1989) piszą o izolowanych z ryzosfer różnych roślin *Erwinia herbicola*, a Jones i Bangs (1985) i Rennie (1980) podają, że *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* i *Enterobacter agglomerans* (*Erwinia herbicola*) to jedne z ważniejszych organizmów wiążących N₂ w glebach. *Enterobacteriaceae* to także ważne mikroorganizmy chitynolityczne: *Erwinia* (Paszkowski, 1997 i badania własne); *Enterobacter* (Chernin i in., 1997; Hallmann i in., 1999); *Klebsiella* (Kurek i Jaroszuk, 1997); *Serratia* (Ordentlich i in., 1988). Również wyniki badań Kurek i in. (1994) informujące, że w ryzosferze żyta *Klebsiella* były najliczniejszymi bakteriami Gram-ujemnymi oraz dane prezentowane przez Paszkowskiego i Kobusa (1995a), mówiące o dużym udziale *Erwinia* w zespołach bakterii, izolowanych z ryzosfery owsa, dowodzą dużego znaczenia bakterii *Enterobacteriaceae* w ryzosferze roślin.

5.1.6. Znaczenie ruchliwości bakterii do zasiedlenia przez nie powierzchni i wnętrza korzeni

Tabela 18

Udział bakterii ruchliwych w zespołach ryzobakterii pszenicy ozimej (w %)

Strefa ryzosfery	Faza 2. liścia	Faza 4. liścia	Faza kwitnienia	Faza pełnej dojrzałości	Wszystkie fazy*
Ektoryzosfera	60,0	37,0	20,0	56,1	43,3
Ryzoplana	75,8	53,7	42,5	48,2	55,1
Ryzop./Endor.	84,4	50,8	37,4	65,0	59,4
Endoryzosfera	86,1	64,6	86,5	69,1	76,6

* - średnia arytmetyczna wartości z wszystkich faz rozwoju roślin

Znaczenie ruchliwości bakterii w kolonizacji przez nie powierzchni i wnętrza korzeni jest problemem, na który różni badacze mają odmienne zapatrywania (Bowen i Rovira, 1999; Broek i Vanderleyden, 1995). Howie i in. (1987) - w doświadczeniach z pszenicą, oraz Bowers i Parke (1993) - w doświadczeniach z grochem, kwestionują znaczenie ruchliwości bakterii w kolonizacji korzeni, ponieważ ruchliwe szczepy *Pseudomonas fluorescens* i ich nieruchliwe mutanty kolonizowały korzenie roślin w takim samym stopniu. Także Scher i in. (1988) nie znaleźli różnic w kolonizacji korzeni soi przez ruchliwy szczep *P. putida* i jego nieruchliwy mutant. Podobne wyniki uzyskali Boelens i in. (1994), badając zasiedlanie korzeni kukurydzy przez *P. fluorescens*. To, że zdolność ruchu nie jest ważna w zasiedlaniu korzeni przez bakterie mogą świadczyć też wyniki Germidy i in. (1997), którzy stwierdzili, że bakterie nieruchliwe (głównie *Micrococcus* i *Flavobacterium*) stanowiły dużą część izolatów z wnętrza korzeni rzepaku jarego.

Z drugiej strony - Bashan i Holguin (1994) twierdzą, że ruchliwość *Azospirillum brasilense* była niezbędna w kolonizacji korzeni pszenicy i soi przez te bakterie oraz w przemieszczaniu bakterii z jednych korzeni do innych, Toyota i Ikeda (1997) sugerują na podstawie badań kolonizacji korzeni pomidora i melona przez ruchliwy szczep *P. fluorescens* i jego nieruchliwy mutant, że ruchliwość bakterii była istotna w przemieszczaniu bakterii

zarówno w kierunku od gleby do korzeni jak i wzdłuż korzeni, Catlow i in. (1990) informują, że zdolność do ruchu bardzo istotnie wpływała na rozmieszczenie *Rhizobium trifolii* na korzeniach koniczyny a Maplestone i Campbell (1989) stwierdzają, że ruchliwy szczep *Bacillus* w większym stopniu kolonizował system korzeniowy pszenicy od szczepu nieruchliwego. Także Korber i in. (1994) uważają, że zdolność ruchu znacznie ułatwia bakteriom kolonizację różnych powierzchni.

W naszych badaniach zdecydowaliśmy się ocenić znaczenie ruchliwości w zasiedlaniu korzeni przez bakterie w pośredni sposób. Dzięki izolacji dużej liczby szczepów (ponad 1000) spróbowaliśmy ocenić jaki udział w zespołach bakterii, izolowanych z różnych stref ryzosfery mają bakterie ruchliwe. Na podstawie wyników zamieszczonych w Tabeli 18 widać, że we wszystkich fazach rozwoju pszenicy ozimej, wraz z przejściem od ektoryzosfery, poprzez ryzoplanę i ryzoplanę/endoryzosferę do endoryzosfery, stopniowo wzrastał udział bakterii ruchliwych, co wyraźnie wskazuje, że zdolność ruchu jest ważna w zasiedlaniu powierzchni i (zwłaszcza) wnętrza korzeni, szczególnie młodych. Na podstawie tych samych danych można też sądzić, że ruchliwość bakterii nie jest jednak cechą bezwzględnie konieczną do zasiedlenia korzeni, ponieważ bakterie nieruchliwe stanowiły dużą część, a w fazie kwitnienia stanowiły nawet większość izolatów z powierzchni korzeni. Główną grupę bakterii nieruchliwych stanowiły *Flavobacterium-Cytophaga*. Pomimo braku urzęsienia, niektóre z nich rozprzestrzeniały się na powierzchni wilgotnych pożywek agarowych. Być może w podobny sposób zasiedlały powierzchnię korzeni. Ruch (aktywny i pasywny) w błonkach wodnych, pokrywających powierzchnię korzenia, to według Bowena i Roviry (1976) jeden z głównych mechanizmów przemieszczania się bakterii wzdłuż korzeni. Mawdsley i Burns (1994) stwierdzili przemieszczanie się nieruchliwego szczepu *Flavobacterium* wzdłuż rosnących korzeni pszenicy bez udziału strumienia wody. Oczywiście, najsilniejszym czynnikiem przemieszczającym w glebie zarówno bakterie ruchliwe jak i nieruchliwe, jest najprawdopodobniej strumień płynącej wody (Bowen i Rovira, 1999; Parke i in., 1986).

5.2. CZĘŚĆ II

AKTYWNOŚĆ BIOCHEMICZNA BAKTERII RYZOSFEROWYCH

W związku z tym, iż na podstawie uzyskanych wyników i danych literaturowych uznano, że to saprotroficzne bakterie a nie grzyby dominują w ryzosferze (w rozważaniach nie brano pod uwagę grzybów mikoryzowych), a zwłaszcza na powierzchni i wewnątrz korzeni, wydaje się, że w poszukiwaniu pożytecznych szczepów, które można zastosować w formie szczepionki, poprawiającej wzrost i zdrowotność roślin, należy skupić uwagę głównie na bakteriach ryzosferowych. Z tego powodu, dalsze badania nad aktywnością biochemiczną wyizolowanych szczepów, przeprowadzono wyłącznie na szczepach bakterii ryzosferowych.

Aktywność, wyizolowanych z ryzosfery pszenicy ozimej różnych grup bakterii w badanych procesach przedstawiono w Tabelach 19 - 32. Przedstawiane w tabelach wartości dotyczą wszystkich wyizolowanych szczepów bakterii, należących do różnych rodzajów lub grup (ze wszystkich faz rozwoju pszenicy i wszystkich stref ryzosfery łącznie). W związku z tym, że obecnie *Erwinia herbicola* została przeniesiona do nowego rodzaju jako *Pantoea agglomerans*, aktywności biochemiczne *E. carotovora* i *E. herbicola* są przedstawione oddzielnie. Z powodu wyraźnej odmienności w zasiedlaniu różnych stref ryzosfery, także oddzielnie przedstawione zostały aktywności biochemiczne fluoryzujących i niefluoryzujących *Pseudomonas*.

Ponadto przedstawiona jest aktywność (średnie arytmetyczne i udział aktywnych szczepów) zespołów bakterii, pochodzących z różnych stref ryzosfery - dla wszystkich faz rozwoju roślin łącznie (Tabela 33) lub z różnych faz rozwoju roślin - dla wszystkich stref ryzosfery łącznie (Tabela 34). Oprócz tego w tekście wprowadzono dane, nie przedstawiane w formie tabel ani wykresów, o innych zaobserwowanych zależnościach czy trendach.

5.2.1. Aktywność antybiotyczna ryzobakterii w stosunku do *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* i *Fusarium culmorum* na pożywkach glukozowo-ziemniaczanej (PDA) i King B

Jednym z najważniejszych mechanizmów działania pożytecznych bakterii w aspekcie biologicznej ochrony roślin przed drobnoustrojami chorobotwórczymi jest antybioza (Fravel, 1988; Ryder i McClure, 1997; Sobiczewski, 1994). Pomimo niektórych doniesień o braku korelacji pomiędzy antybiozą *in vitro* na pożywkach agarowych, a ochroną roślin *in vivo* (Alström, 1987; Fravel, 1988; Sobiczewski i in., 1996), jako pierwszy krok w ocenie antybiotycznych zdolności wyizolowanych szczepów bakterii bardzo często przeprowadza się testy na pożywkach agarowych. W naszych badaniach do tego celu zastosowano pożywki PDA i King B, które są powszechnie używane (Alström, 1987; Król, 1997; Kurek i Jaroszuk, 1997; Lievens i in., 1989; Oedijono i in., 1993; Paszkowski, 1993; Pierson i Weller, 1994; Pietr i Kempa, 1989; Ryder i Rovira, 1993; Savithiry i Gnanamanickam, 1987; Sobiczewski i in., 1996).

5.2.1.1. Z danych przedstawionych w tabeli 19 widać, że ok. 50% szczepów bakterii, wyizolowanych z ryzosfery pszenicy hamowało **wzrost *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt.) na pożywce PDA**. Podobne wyniki w hamowaniu wzrostu *Ggt* przez bakterie wyizolowane również z ryzosfery pszenicy uzyskali Ryder i Rovira (1993). Najwięcej aktywnych szczepów i najwyższe średnie wartości strefy zahamowania wzrostu grzyba otrzymaliśmy w przypadku *Xanthomonas*, fluoryzujących *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Erwinia herbicola* i promieniowców. Nieaktywnymi okazały się *Janthinobacterium* i Nieoznaczone 2.

Zauważono, że aktywność (w hamowaniu wzrostu *Ggt* na PDA) bakteryjnych zespołów pochodzących z różnych stref ryzosfery stopniowo wzrastała przy przejściu od ektoryzosfery do endoryzosfery (Tabela 33). Wzrastał również udział aktywnych szczepów (Tabela 33). Stwierdzono także, że aktywność (w hamowaniu wzrostu *Ggt* na PDA) zespołu fluoryzujących *Pseudomonas*, wyizolowanych z ektoryzosfery (4,8 mm), była istotnie niższa (przy $P \geq 95\%$) od aktywności zespołów fluoryzujących pseudomonasów, pochodzących z innych stref (7,5 - 8,8 mm) (Czaban i in., 1997).

Tabela 19

Hamowanie wzrostu *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) na pożywce glukozowo-ziemniaczanej (PDA) przez bakterie z ryzosfery pszenicy ozimej

Grupa lub rodzaj bakterii	Liczba szczepów	% szczepów aktywnych	Strefa zahamowania (w mm)	
			Wartości średnie	Wartości najwyższe
Wszystkie szczepy	1245	49	5,3	31
<i>Acinetobacter</i>	27	18,5	1,2	9
<i>Actinomycetes</i>	8	75	2,9	6
<i>Alcaligenes</i>	49	8,2	1,1	21
<i>Bacillus</i>	137	22,6	1,0	17
Coryneform	177	35	5,7	31
<i>Erwinia carotovora</i>	90	38,9	3,2	24
<i>Erwinia herbicola</i>	20	75,0	13,8	24
<i>Flavobacterium</i> - <i>Cytophaga</i>	130	51,5	7,8	29
<i>Janthinobacterium</i>	1	0	0	0
<i>Klebsiella</i>	10	40	1,2	3
<i>Micrococcus</i>	45	46,7	5,8	24
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	333	90,1	8,2	26
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	54	16,7	1,4	19
<i>Xanthomonas</i>	48	93,8	11,9	23
Nieoznaczone 1	74	20,3	1,8	18
Nieoznaczone 2	42	0	0	0

5.2.1.2. Prawie 40% szczepów hamowało na pożywce PDA wzrost *Fusarium culmorum* (Fc), który okazał się grzybem bardziej odpornym na działanie bakterii od Ggt (Tabela 20). Podobne wyniki w hamowaniu wzrostu Fc przez bakterie z ryzosfery żyta uzyskały Kurek i Jaroszuk (1997) oraz Alström (1987) przez bakterie wyizolowane z korzeni różnych roślin oraz różnych gleb.

Nie licząc pojedynczego szczepu *Janthinobacterium*, bardzo aktywnymi okazały się oba gatunki *Erwinia*, Coryneform oraz Nieoznaczone 1 i 2, oraz w mniejszym stopniu *Klebsiella*, fluoryzujące *Pseudomonas* i *Cytophaga-Flavobacterium*.

Gdy poddano analizie zespoły bakterii z poszczególnych stref ryzosfery, stwierdzono, że w porównaniu do bakteryjnych zespołów z innych stref ryzosfery aktywność i udział aktywnych szczepów (w hamowaniu wzrostu Fc na PDA) zespołu pochodzącego z endoryzosfery były wyraźnie niższe (Tabela 33). Podobne zależności znaleziono w przypadku fluoryzujących *Pseudomonas*. Aktywność zespołu z endoryzosfery (1,7 mm) była niższa od aktywności odpowiednich zespołów bakterii z pozostałych stref ryzosfery (3,7 - 4,9 mm).

5.2.1.3. Jak wynika z Tabeli 21 prawie 90% szczepów bakterii oddziaływało hamująco na wzrost *Ggt* na pożywce **Kinga B**. Najwyższe wartości średnie strefy zahamowania wzrostu grzyba otrzymano w przypadku *Xanthomonas*, *Cytophaga-Flavobacterium*, Nieoznaczonych 2 i *Alcaligenes*, chociaż silnie aktywne szczepy znajdowano w obrębie wielu grup, a w szczególności wśród Coryneform i *Cytophaga-Flavobacterium*.

W przeciwieństwie do hamowania wzrostu *Ggt* na PDA, gdy obserwowano w miarę starzenia się roślin stopniowy spadek aktywności (Tabela 34), w przypadku hamowania wzrostu *Ggt* na pożywce King B, stwierdzono wyższą aktywność zespołów bakteryjnych z fazy kwitnienia i dojrzałości, w porównaniu do aktywności zespołów z faz wcześniejszych (Tabela 34). Wyliczono jednak niewielką, ale istotną przy $P > 99\%$ korelację ($r = 0,329$; $n = 1245$) pomiędzy wielkością stref zahamowania wzrostu *Ggt* przez wyizolowane szczepy bakterii na obu pożywkach.

5.2.1.4. Na pożywce **Kinga**, grzyb *Fusarium culmorum* (*Fc*) okazał się zdecydowanie bardziej odporny na wpływ bakterii niż *Ggt*. Tylko 26% wyizolowanych szczepów hamowało jego wzrost, a niektóre rodzaje bakterii były zupełnie nieaktywne (*Acinetobacter*, *Klebsiella* i *Micrococcus*). Najsilniej oddziaływały nieaktywne na pożywce PDA rodzaj *Alcaligenes* oraz *Xanthomonas*, *Bacillus* i Coryneform. Najliczniejsza grupa bakterii ryzosferowych, fluoryzujące *Pseudomonas* była średnio aktywna (Tabela 22).

Tabela 20

Hamowanie wzrostu *Fusarium culmorum* (*Fc*) na pożywce glukozowo-ziemniaczanej (PDA) przez bakterie z ryzosfery pszenicy ozimej

Grupa lub rodzaj bakterii	Liczba szczepów	% szczepów aktywnych	Strefa zahamowania (w mm)	
			Wartości średnie	Wartości najwyższe
Wszystkie szczepy	1245	39,4	3,5	29
<i>Acinetobacter</i>	27	25,9	0,7	4
<i>Actinomyces</i>	8	37,5	2,3	7
<i>Alcaligenes</i>	49	0	0	0
<i>Bacillus</i>	137	23,4	1,2	14
Coryneform	177	44,6	6,3	29
<i>Erwinia carotovora</i>	90	70	6,3	20
<i>Erwinia herbicola</i>	20	75	8,0	20
<i>Flavobacterium - Cytophaga</i>	130	35,4	2,7	16
<i>Janthinobacterium</i>	1	100	7,0	7
<i>Klebsiella</i>	10	50	3,2	8
<i>Micrococcus</i>	45	26,7	1,5	9
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	333	42,0	3,3	18
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	54	7,4	0,4	7
<i>Xanthomonas</i>	48	12,5	0,9	12
Nieoznaczone 1	74	68,9	5,8	17
Nieoznaczone 2	42	64,3	5,0	14

Podobnie do zmian aktywności zespołów bakteryjnych w hamowaniu wzrostu *Ggt* na pożywce King B, aktywności zespołów bakteryjnych w hamowaniu wzrostu *Fc* na tej pożywce jeszcze wyraźniej stopniowo rosły w miarę starzenia się roślin (Tabela 34). Podobnie rósł udział szczepów aktywnych (Tabela 34). Gdy analizowano szczepy wyizolowane z różnych stref ryzosfery (z wszystkich faz rozwoju roślin łącznie), obserwowano nieznaczny stopniowy spadek aktywności zespołów bakterii w hamowaniu wzrostu *Fc* na pożywce King B, przy przejściu od ektoryzosfery do endoryzosfery (Tabela 33). Podobny stopniowy spadek aktywności był widoczny zarówno w przypadku fluoryzujących pseudomonasów (1,7; 1,5; 1,4; 1,0 mm), jak i pozostałych ryzobakterii (2,1; 1,8; 1,7; 1,2 mm).

Tabela 21

Hamowanie wzrostu *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) na pożywce Kinga B przez bakterie z ryzosfery pszenicy ozimej

Grupa lub rodzaj bakterii	Liczba szczepów	% szczepów aktywnych	Strefa zahamowania (w mm)	
			Wartości średnie	Wartości najwyższe
Wszystkie szczepy	1245	87,1	9,0	31
<i>Acinetobacter</i>	27	74,1	5,1	16
<i>Actinomycetes</i>	8	100	9,0	16
<i>Alcaligenes</i>	49	100	13,4	19
<i>Bacillus</i>	137	61,3	6,5	25
Coryneform	177	65	7,0	31
<i>Erwinia carotovora</i>	90	100	7,9	17
<i>Erwinia herbicola</i>	20	95	6,9	15
<i>Flavobacterium</i> - <i>Cytophaga</i>	130	91,5	15,0	28
<i>Janthinobacterium</i>	1	100	11,0	11
<i>Klebsiella</i>	10	90	3,0	7
<i>Micrococcus</i>	45	93,3	7,6	20
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	333	96,7	8,1	19
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	54	85,2	6,2	17
<i>Xanthomonas</i>	48	93,8	15,7	28
Nieoznaczone 1	74	100	9,4	20
Nieoznaczone 2	42	100	13,7	20

Zdolność bakterii z ryzosfery pszenicy do hamowania wzrostu *Ggt* na pożywce King B była bardziej powszechna i silniejsza niż na pożywce PDA, natomiast w przypadku *F.c.* obserwowano dokładnie odwrotny trend. Podobne zjawisko zaobserwowała Alström (1987) w doświadczeniu szklarniowym, w którym badano antagonizm przeciwko *Ggt* w ryzosferze pszenicy. Gdy bakterie wprowadzono razem z pożywkami, pożywka Kinga B istotnie obniżała stopień infekcji przez patogen, a bulion glukozowo-ziemniaczany istotnie ją podwyższał. Całkowicie odmienne wyniki uzyskał Paszkowski (1993). Stwierdził on co najmniej dwukrotnie silniejsze zahamowanie wzrostu *Ggt* i *Fc* na pożywce PDA niż King B. Uważa on, podobnie jak Alström (1987), Savithiry i Gnanamanickam (1987) i Pietr i Kempa (1989), że bakterie (głównie fluoryzujące *Pseudomonas*) hamowały chorobotwórcze dla roślin grzyby na pożywce Kinga głównie przez biosyntezę sideroforów. We wszystkich cytowanych badaniach, po dodatku Fe^{3+} do pożywki, efekt zahamowania wzrostu grzyba był w dużym stopniu znoszony. W naszych badaniach nie stwierdzono zależności pomiędzy wielkością strefy zahamowania wzrostu patogenów a zdolnością bakterii do syntetyzowania związków chelatujących Fe^{3+} , gdy analizowano wszystkie wyizolowane szczepy. Stwierdzono jedynie słabe (r^2 od 1 do 18%), ale istotne przy $P > 99\%$ korelacje w przypadku

analizowanych osobno zespołów fluoryzujących *Pseudomonas* i *Bacillus*. Ponadto, aktywności zespołów pochodzących z endoryzosfery w zahamowaniu wzrostu obu patogenów na pożywce King B, były najniższe, a ich zdolności do syntezy związków chelatujących Fe^{3+} , najwyższe (Tabela 33). Również, trendy zmian aktywności zespołów bakteryjnych w hamowaniu patogenów na pożywce King B były rosnące w miarę starzenia się roślin, a odpowiednie zmiany zdolności do syntezy związków chelatujących Fe^{3+} raczej malejące (Tabela 34). Sugeruje to, że raczej inne czynniki niż związki chelatujące Fe^{3+} głównie wpływały na zahamowanie wzrostu patogenów na tej pożywce.

W przypadku wszystkich wyizolowanych szczepów stwierdzono nieznaczące (r^2 od 1 do 5%), ale istotne przy $P > 99\%$, korelacje: (a) dodatnie pomiędzy wielkością strefy zahamowania wzrostu obu patogenów przez wyizolowane bakterie na pożywce PDA a ich zdolnością do rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3$ przez powstające z glukozy kwasy organiczne oraz (b) ujemne pomiędzy wielkością strefy zahamowania wzrostu obu patogenów przez wyizolowane bakterie na pożywce King B, a ich zdolnością do rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3$. Być może świadczy to, że w działaniu bakterii na płytkach agarowych na wzrost patogenów pewną rolę odgrywała zmiana wartości pH - zakwaszenie na PDA z powodu przekształcania glukozy do kwasów organicznych i alkalizacja na King B z powodu amonifikacji peptonu. Alström (1987) doniosła o wpływie zmian pH na wzrost grzybów patogennych dla roślin, właśnie z podanych wyżej powodów. Informuje też ona, podobnie jak Fravel (1988), o toksycznym działaniu amoniaku na grzyby. Ponadto, Alström (1987) donosi, że z peptonu, szczególnie w środowisku alkalicznym bakterie mogą syntetyzować HCN. Paszkowski (1996) stwierdził, że HCN, syntetyzowany (na pożywce King B z dodatkiem glicyny i żelaza) przez bakterie ryzosferowe, był bardzo toksyczny dla *Ggt*, natomiast *F.c.* był odporny na jego działanie. Analizując nasze wyniki, stwierdziłem bardzo słabe (r^2 od 1 do 7%), ale istotne przy $P \geq 95\%$ zależności pomiędzy wielkością strefy zahamowania wzrostu grzybów na obu badanych pożywkach, a cyjanogennymi zdolnościami fluoryzujących *Pseudomonas*. Na obu pożywkach, zależności te były dwukrotnie silniejsze w przypadku zahamowania wzrostu *Ggt* niż w przypadku zahamowania wzrostu *Fc*. Może to sugerować o pewnej roli HCN w hamowaniu wzrostu patogenów, ale należy zaznaczyć, że testy antybiotyczne nie prowadzono w szczelnym układzie, zapobiegającym uciekaniu substancji lotnych.

Tabela 22

Hamowanie wzrostu *Fusarium culmorum* (Fc) na pożywce Kinga B przez bakterie z ryzosfery pszenicy ozimej

Grupa lub rodzaj bakterii	Liczba szczepów	% szczepów aktywnych	Strefa zahamowania (w mm)	
			Wartości średnie	Wartości najwyższe
Wszystkie szczepy	1245	26,3	1,6	26
<i>Acinetobacter</i>	27	0	0	0
<i>Actinomyces</i>	8	25	0,6	3
<i>Alcaligenes</i>	49	83,7	7,8	18
<i>Bacillus</i>	137	31,4	2,3	18
Coryneform	177	13,7	1,6	26
<i>Erwinia carotovora</i>	90	20,0	0,9	8
<i>Erwinia herbicola</i>	20	0	0	0
<i>Flavobacterium - Cytophaga</i>	130	12,3	0,6	10
<i>Janthinobacterium</i>	1	0	0	0
<i>Klebsiella</i>	10	0	0	0
<i>Micrococcus</i>	45	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	333	35,1	1,3	12
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	54	14,8	0,4	5
<i>Xanthomonas</i>	48	45,8	4,4	17
Nieoznaczone 1	74	20,3	0,9	9
Nieoznaczone 2	42	45,2	1,9	8

Szereg danych literaturowych informuje o dużych zdolnościach antybiotycznych tych samych rodzajów, czy grup bakterii, jakie wyróżniły się w naszych badaniach, np.: Lievens i in. (1989) wymieniają *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Alcaligenes*; Paszkowski (1993) - *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Streptomyces*, *Micromonospora*; Król - *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, coryneform, *Bacillus*, *Actinomyces*, *Micromonospora*; Oedijono i in., 1993 - *Pseudomonas* i *Bacillus* a Broadbent i in. (1971) - *Pseudomonas*, *Streptomyces* i *Bacillus*.

5.2.2. Biosynteza związków chelatujących Fe⁺³

Tabela 23
Biosynteza związków chelatujących Fe⁺³ przez bakterie z ryzosfery pszenicy

Grupa lub rodzaj bakterii	Liczba szczepów	% szczepów aktywnych	μM Desferalu l ⁻¹	
			Wartości średnie	Wartości najwyższe
Wszystkie szczepy	1245	86,7	36,6	306
<i>Acinetobacter</i>	27	100	5,1	28,5
<i>Actinomycetes</i>	8	100	91,9	200,2
<i>Alcaligenes</i>	49	53,1	7,0	119
<i>Bacillus</i>	137	100	26,3	159,8
Coryneform	177	24,9	3,6	76,5
<i>Erwinia carotovora</i>	90	100	32,9	223,9
<i>Erwinia herbicola</i>	20	100	8,5	46,8
<i>Flavobacterium - Cytophaga</i>	130	95,4	6,2	39,1
<i>Janthinobacterium</i>	1	100	5,5	5,5
<i>Klebsiella</i>	10	100	15,3	29,7
<i>Micrococcus</i>	45	97,8	8,8	19,1
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	333	100	98,5	280,5
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	54	100	7,1	30
<i>Xanthomonas</i>	48	100	19,4	306
Nieoznaczone 1	74	95,9	15,6	93
Nieoznaczone 2	42	100	7,6	40,3

Dane zawarte w Tabeli 23 informują o uzdolnieniach wyizolowanych bakterii do biosyntezy związków chelatujących Fe⁺³. Zdecydowana większość szczepów bakterii, wyizolowanych z ryzosfery pszenicy ozimej miała zdolność do syntezy związków kompleksujących Fe³⁺. Fluoryzujące pseudomonasy i promieniowce to drobnoustroje zdecydowanie wyróżniające się dużymi aktywnościami w tym procesie. Średnimi aktywnościami charakteryzowały się *Erwinia carotovora*, *Bacillus* i *Xanthomonas*. Podobne wyniki uzyskali: Paszkowski (1993) - który badał szczepy bakterii, wyizolowane z ryzosfery owsa - oraz. Książniak i Kobus (1993) - badający szczepy bakterii z ryzosfer różnych zbóż. Stwierdzili oni, że *Pseudomonas*, *Erwinia* i promieniowce, szczególnie *Nocardia*, to najaktywniejsze grupy bakterii w biosyntezie sideroforów. Także Haansuu i in. (1998) informują, że większość szczepów (*Pseudomonas*, *Bacillus* i *Streptomyces*) wyizolowanych z ryzosfery brzozy brodawkowatej i kostrzewy czerwonej syntetyzowała siderofory. Należy podkreślić, że zdolność fluoryzujących *Pseudomonas* do syntezy związków kompleksujących Fe³⁺ była skorelowana ze zdolnością do hamowania Ggt na pożywce PDA (Czaban i in., 1997). Podobne wyniki uzyskali Barnett i in. (1999), którzy stwierdzili, że zdolność szczepów

Pseudomonas (pochodzących z korzeni pszenicy zasiedlonych przez *Ggt*) do fluorescencji była silnie związana z ich zdolnością do hamowania wzrostu *Ggt*.

Obserwowano stopniowy wzrost aktywności w syntezie związków kompleksujących Fe^{3+} przy przejściu od zespołu bakterii, wyizolowanych z ektoryzosfery, poprzez zespoły z ryzoplany i ryzoplany/endoryzosfery do bakteryjnego zespołu, pochodzącego z endoryzosfery (Tabela 33). Także zespół najliczniejszej grupy wyizolowanych ryzobakterii - fluoryzujących pseudomonasów, pochodzący z ektoryzosfery, miał istotnie (przy $P > 99\%$) niższą aktywność syntezy związków chelatujących Fe^{3+} ($62,2 \mu\text{M l}^{-1}$) od zespołów z innych stref ryzosfery ($92,8 - 108,1 \mu\text{M l}^{-1}$) (Czaban i in., 1997). Sugeruje to, że zdolność do syntezy tych związków może mieć duże znaczenie w zasiedlaniu korzeni przez bakterie. Szczepy bakterii z fazy pełnej dojrzałości wyróżniały się niższą aktywnością syntezy związków chelatujących Fe^{3+} oraz wyraźnie niższym udziałem aktywnych szczepów od zespołów bakterii z innych faz rozwoju pszenicy ozimej (Tabela 34).

5.2.3. Biosynteza HCN

Tabela 24

Biosynteza HCN przez bakterie z ryzosfery pszenicy

Grupa lub rodzaj bakterii	Liczba szczepów	% szczepów aktywnych	Skala 0 - 3	
			Wartości średnie	Wartości najwyższe
Wszystkie szczepy	1245	8,8	0,18	3
<i>Acinetobacter</i>	27	0	0	0
<i>Actinomycetes</i>	8	0	0	0
<i>Alcaligenes</i>	49	0	0	0
<i>Bacillus</i>	137	4,4	0,004	0,1
Coryneform	177	0	0	0
<i>Erwinia carotovora</i>	90	0	0	0
<i>Erwinia herbicola</i>	20	0	0	0
<i>Flavobacterium - Cytophaga</i>	130	3,8	0,004	0,1
<i>Janthinobacterium</i>	1	0	0	0
<i>Klebsiella</i>	10	0	0	0
<i>Micrococcus</i>	45	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	333	29,7	0,68	3
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	54	0	0	0
<i>Xanthomonas</i>	48	0	0	0
Nieoznaczone 1	74	0	0	0
Nieoznaczone 2	42	0	0	0

Jednym z istotnych czynników oddziaływania bakterii na rośliny jest synteza HCN, który może spełniać zarówno korzystną rolę (jest narzędziem walki biologicznej z patogenami roślin) jak i niekorzystną (hamowanie oksydazy cytochromowej roślin i innych enzymów zawierających Fe i Cu, np. peroksydaz) (Schippers i in., 1990). Dane zawarte w Tabeli 24 informują, że fluoryzujące *Pseudomonas* wyróżniały się szczególną zdolnością do syntezy HCN. W porównaniu do pozostałych grup wyizolowanych szczepów ryzobakterii, gdzie jedynie kilka szczepów *Bacillus* i *Cytophaga-Flavobacterium* wykazywały jakąś śladową, nietypową aktywność, aż 30% szczepów fluoryzujących *Pseudomonas* (9% wszystkich wyizolowanych szczepów) miało zdolność do syntezy HCN z glicyny (Tabela 24).

Bardzo podobne wyniki do naszych danych (Tabela 24) uzyskali Bakker i Schippers (1987), Kloepper i in. (1991), Paszkowski i Masiak (1998) i Paszkowski i Wróblewska (2000) w przypadku ryzosfery różnych zbóż. Znacznie niższe wartości udziału cyjanogennych szczepów, nie przekraczające 2% wyizolowanych bakterii z ryzosfery pomidora, otrzymali de Brito Alvarez i in. (1995).

Gdy analizowano aktywność zespołów bakterii z różnych stref ryzosfery (pochodzących z wszystkich faz wzrostu roślin łącznie), wraz z przejściem od ektoryzosfery do endoryzosfery obserwowano wyraźny stopniowy wzrost ich aktywności i wzrost procentowego udziału aktywnych szczepów (Tabela 33). Podobne zależności wraz z przejściem od ektoryzosfery do endoryzosfery stwierdzono w przypadku zespołów fluoryzujących *Pseudomonas* (0,3 i 21%; 0,5 i 21%; 0,6 i 26%; 1,0 i 43%) (Czaban i in., 1997). Sugeruje to, że zdolność do syntezy HCN ułatwia fluoryzującym *Pseudomonas* kolonizację powierzchni i wnętrza korzeni. Podobnie, Burns i in. (1989) uważają, że wydzielanie HCN przez bakterie może ułatwiać im przeżywanie w ryzosferze.

5.2.4. Przemiany fosforu

Fosfor - podstawowy makroelement dla wzrostu roślin występuje w glebie głównie w formie trudno dla nich dostępnej. Znaczna część P glebowego jest związana w postaci estrów fosforanowych w organicznym kompleksie gleby. P organiczny musi być hydrolizowany do nieorganicznych fosforanów aby mógł być wykorzystany przez rośliny. Dlatego ważną jest rola drobnoustrojów w uwalnianiu fosforanów z trudno rozpuszczalnych związków mineralnych lub związków organicznych (Paszkowski i Kobus, 1999; Tarafdar i Marschner (1994).

5.2.4.1. Aktywność fosfataz i mineralizacja fosforanów z kwasów nukleinowych

Tabela 25

Synteza fosfatazy kwaśnej przez bakterii z ryzosfery pszenicy ozimej

Grupa lub rodzaj bakterii	Liczba szczepów	% szczepów aktywnych	$\mu\text{g p-nitrofenolu ml}^{-1}$	
			Wartości średnie	Wartości najwyższe
Wszystkie szczepy	1245	96,9	11,3	109,6
<i>Acinetobacter</i>	27	100	5,5	14,9
<i>Actinomycetes</i>	8	100	4,8	9,6
<i>Alcaligenes</i>	49	89,8	11,8	96,2
<i>Bacillus</i>	137	97,1	7,7	86,6
Coryneform	177	91,5	6,9	99,1
<i>Erwinia carotovora</i>	90	100	52,2	108,8
<i>Erwinia herbicola</i>	20	100	27,2	95,9
<i>Flavobacterium - Cytophaga</i>	130	93,1	4,8	96,1
<i>Janthinobacterium</i>	1	100	38,5	38,5
<i>Klebsiella</i>	10	100	81,2	104,1
<i>Micrococcus</i>	45	100	2,7	23,4
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	333	99,7	6,2	101
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	54	100	11,3	74,8
<i>Xanthomonas</i>	48	97,9	4,4	22,7
Nieoznaczone 1	74	94,6	10,9	109,6
Nieoznaczone 2	42	100	12,5	106,9

Z naszych badań wynika, że prawie wszystkie wyizolowane szczepy bakterii miały zdolność do syntezy fosfataz (Tabele 25 i 26). Dane te są zbliżone do wyników Paszkowskiego i Kobusa (1999), badających bakterie z ryzosfery owsa oraz do wyników Król (1997), badającej bakterie z ryzosfery jęczmienia. Najwyższą aktywnością fosfataz

wyróżniały się *Klebsiella* i *Erwinia carotovora*. Także Paszkowski i Kobus (1999) podają, że *Erwinia* z ryzosfery owsa miały znacznie wyższą aktywność obu fosfataz niż inne rodzaje bakterii. Stwierdzono, że pomiędzy aktywnością fosfatazy kwaśnej i aktywnością fosfatazy alkalicznej wyizolowanych przez nas ryzobakterii, występowała istotna statystycznie (przy $P > 99\%$) dodatnia korelacja ($r = 0,513$; $n = 1245$).

Tabela 26

Synteza fosfatazy alkalicznej przez bakterii z ryzosfery pszenicy ozimej

Grupa lub rodzaj bakterii	Liczba szczepów	% szczepów aktywnych	$\mu\text{g p-nitrofenolu ml}^{-1}$	
			Wartości średnie	Wartości najwyższe
Wszystkie szczepy	1245	94	8,3	106,2
<i>Acinetobacter</i>	27	100	6,3	28,5
<i>Actinomyces</i>	8	100	5,1	7,9
<i>Alcaligenes</i>	49	83,7	5,5	33,3
<i>Bacillus</i>	137	86,9	4,8	68,5
Coryneform	177	98,3	4,6	106,2
<i>Erwinia carotovora</i>	90	100	25,2	96,8
<i>Erwinia herbicola</i>	20	100	16,8	58,9
<i>Flavobacterium - Cytophaga</i>	130	96,2	10,5	96,6
<i>Janthinobacterium</i>	1	100	36,0	36
<i>Klebsiella</i>	10	100	50,4	82,6
<i>Micrococcus</i>	45	86,7	2,3	21,6
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	333	90,1	2,8	27,1
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	54	100	8,0	35,7
<i>Xanthomonas</i>	48	95,8	15,5	103,2
Nieoznaczone 1	74	100	10,0	61,9
Nieoznaczone 2	42	100	20,8	74,4

Większość grup bakterii charakteryzowała się wyższą aktywnością fosfatazy kwaśnej niż fosfatazy alkalicznej (fluoryzujące *Pseudomonas* 2,21-krotnie, *Alcaligenes* 2,15-krotnie, *Erwinia carotovora* 2,07-krotnie, *Erwinia herbicola* 1,62-krotnie, *Klebsiella* 1,61-krotnie, *Bacillus* 1,60-krotnie, Coryneform 1,50-krotnie, niefluoryzujące *Pseudomonas* 1,41-krotnie, *Micrococcus* 1,17-krotnie, Nieoznaczone 1 1,09-krotnie i *Janthinobacterium* 1,07-krotnie).

Biorąc pod uwagę wszystkie wyizolowane szczepy, aktywność fosfatazy kwaśnej, podobnie jak w przypadku Paszkowskiego i Kobusa (1999), była wyższa o ok. 40% w porównaniu do aktywności fosfatazy alkalicznej. Wyniki te są zgodne z danymi podanymi przez Burnsa i in. (1989), którzy stwierdzili, że w ryzosferze jęczmienia i kukurydzy przeważa aktywność fosfatazy kwaśnej. Jedynie *Xanthomonas* (3,52-krotnie), *Flavobacterium-Cytophaga* (2,19-krotnie), Nieoznaczone 2 (1,66-krotnie), *Acinetobacter* (1,15-krotnie) i promieniowce (1,06-krotnie) wyróżniały się wśród badanych grup bakterii

wyższą aktywnością fosfatazy alkalicznej od aktywności fosfatazy kwaśnej. Również, wyższą aktywnością fosfatazy alkalicznej od aktywności fosfatazy kwaśnej charakteryzowały się: *Xanthomonas*, *Flavobacterium* i *Nocardia* w zespole bakterii z ryzosfery owsa (Paszkowski i Kobus, 1999) i *Flavobacterium* i *Streptomyces* w zespole bakterii z ryzosfery jęczmienia (Król, 1997).

Tabela 27

Uwalnianie jonów PO_4^{3-} z kwasów nukleinowych przez bakterie z ryzosfery pszenicy ozimej

Grupa lub rodzaj bakterii	Liczba szczepów	% szczepów aktywnych	$\mu\text{g P-PO}_4^{-3} \text{ ml}^{-1}$	
			Wartości średnie	Wartości najwyższe
Wszystkie szczepy	1245	69,2	21,9	886,8
<i>Acinetobacter</i>	27	59,3	13,1	109,2
<i>Actinomycetes</i>	8	100	124,5	165,6
<i>Alcaligenes</i>	49	87,8	44,8	235,2
<i>Bacillus</i>	137	40,1	-9,9	199,2
Coryneform	177	69,5	21,9	177,6
<i>Erwinia carotovora</i>	90	90,0	62,0	886,8
<i>Erwinia herbicola</i>	20	90,0	70,1	148,8
<i>Flavobacterium</i> - <i>Cytophaga</i>	130	70,8	13,9	252
<i>Janthinobacterium</i>	1	100	136,8	136,8
<i>Klebsiella</i>	10	100	160,5	366
<i>Micrococcus</i>	45	64,4	14,6	96
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	333	62,2	7,6	217,2
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	54	66,7	16,1	128,4
<i>Xanthomonas</i>	48	87,5	42,4	139,2
Nieoznaczone 1	74	81,1	30,0	208,8
Nieoznaczone 2	42	97,6	56,7	160,8

Szczepy z ektoryzosfery (po połączeniu zespołów bakteryjnych ze wszystkich faz rozwoju pszenicy) miały wyższą aktywność fosfatazy kwaśnej od zespołów bakterii z innych stref ryzosfery (Tabela 33).

5.2.4.2. Dane dotyczące zdolności wyizolowanych szczepów bakteryjnych z ryzosfery pszenicy ozimej do **uwalniania nieorganicznych fosforanów z kwasów nukleinowych** zamieszczono w Tabeli 27. Zdolność ta nie była tak powszechna (70% aktywnych szczepów) jak do biosyntezy fosfataz, hydrolizujących p-nitrofenyleno-o-fosforan. Ten odsetek szczepów aktywnych w uwalnianiu fosforanów z kwasów nukleinowych jest wyraźnie wyższy od danych (18-55%) prezentowanych przez Myśkova (1960) oraz Paszkowskiego i Kobusa (1999) badających odpowiednio zespoły bakterii, wyizolowane z ryzosfery jęczmienia i owsa. Stwierdziliśmy, że najwyższą aktywnością charakteryzował się (podobnie

jak w przypadku fosfataz) rodzaj *Klebsiella*. Do silnie aktywnych grup mikroorganizmów (wysokie średnie arytmetyczne i udział aktywnych szczepów) należały także promieniowce, jedyny szczep *Janthinobacterium* i *Erwinia* (Tabela 27). Bardzo aktywne szczepy znajdowano także w obrębie wielu grup bakterii. Podobnie do wyników naszych badań, zarówno Myśków (1960) jak i Paszkowski i Kobus (1999) stwierdzili, że promieniowce są bardzo silnymi mineralizatorami P z kwasów nukleinowych.

Z naszych badań wynika, że tak jak w przypadku fosfatazy kwaśnej, najaktywniejsze w uwalnianiu P z kwasów nukleinowych szczepy pochodziły z ektoryzosfery (Tabela 33). Również Paszkowski i Kobus (1999) z ektoryzosfery wyizolowali najwięcej aktywnych szczepów w mineralizacji P z kwasów nukleinowych.

Znaleźliśmy jedynie niewielkie korelacje (istotne przy $P > 99\%$) pomiędzy zdolnością wyizolowanych szczepów bakterii do uwalniania nieorganicznych fosforanów z kwasów nukleinowych a ich aktywnością obu fosfataz (z fosforanem p-nitrofenolu jako substratem), kwaśnej $r = 0,352$ i zasadowej $r = 0,359$, gdy analizowaliśmy dane dla 1245 wyizolowanych szczepów. W przypadku, gdy porównano aktywności (średnie arytmetyczne) całych zespołów bakteryjnych z różnych stref ryzosfery i różnych faz rozwoju pszenicy ($n = 16$), współczynniki korelacji prostej (istotne przy $P > 99\%$) pomiędzy zdolnością bakterii do mineralizacji P z kwasów nukleinowych, a aktywnością ich fosfataz były wyraźnie wyższe. Wynosiły one: dla fosfatazy kwaśnej $r = 0,726$, a dla fosfatazy alkalicznej $r = 0,698$.

5.2.4.3. Rozpuszczanie fosforanu trójwapniowego

Rozpuszczanie fosforanu trójwapniowego badano dwiema metodami: (1) w pożywce płynnej, oznaczając stężenie jonu PO_4^{3-} i (2) w agarowej pożywce stałej, mierząc strefę przejaśnienia, powstałą po rozpuszczeniu $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Pomiedzy wynikami otrzymanymi tymi dwiema metodami stwierdzono jedynie niewielką, istotną przy $P > 99\%$ korelację ($r = 0,172$),.

Okolo 80% wyizolowanych szczepów miało zdolność do rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, określaną zarówno jedną, jak i drugą metodą (Tabele 28 i 29). Jest to wartość wyższa od danych (6-50%) prezentowanych przez innych autorów (De Brito Alvarez i in., 1995; Louw, 1970 - za Curl i Truelove, 1986; Paszkowski i Kobus, 1999b; Pietr i Stankiewicz, 1990; Sperber, 1958), dotyczących bakteryjnych zespołów z ryzosfer różnych roślin, w tym pszenicy, jęczmienia i owsa.

Tabela 28

Rozpuszczanie $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ przez bakterie z ryzosfery pszenicy ozimej w pożywce płynnej

Grupa lub rodzaj bakterii	Liczba szczepów	% szczepów aktywnych	$\mu\text{g P-PO}_4^{-3} \text{ ml}^{-1}$	
			Wartości średnie	Wartości najwyższe
Wszystkie szczepy	1245	78,2	30,1	295,2
<i>Acinetobacter</i>	27	40,7	5,3	42,2
<i>Actinomycetes</i>	8	87,5	12,8	34,1
<i>Alcaligenes</i>	49	49	3,3	49,9
<i>Bacillus</i>	137	73	22,3	259,7
Coryneform	177	78,5	21,8	148,8
<i>Erwinia carotovora</i>	90	98,9	84,5	251,0
<i>Erwinia herbicola</i>	20	100	126,9	234,2
<i>Flavobacterium - Cytophaga</i>	130	81,5	16,3	114
<i>Janthinobacterium</i>	1	0	0	0
<i>Klebsiella</i>	10	100	87,1	108,9
<i>Micrococcus</i>	45	64,4	11,5	69,6
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	333	88,6	33,9	214,1
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	54	70,4	16,2	106,1
<i>Xanthomonas</i>	48	81,3	13,4	108,5
Nieoznaczone 1	74	77	52,8	295,2
Nieoznaczone 2	42	21,4	2,5	80,1

Na pożywce płynnej, z wyjątkiem *Janthinobacterium*, zdolność tę miały wszystkie grupy, jednak zdecydowaną przewagą w prowadzeniu tego procesu charakteryzowały się szczepy z rodziny *Enterobacteriaceae*: *Erwinia* i *Klebsiella*. Wyróżniały się również Nieoznaczone 1, fluoryzujące *Pseudomonas*, *Bacillus* i Coryneform (Tabela 28). Na stałej pożywce agarowej również dużą zdolność miały *Erwinia* (szczególnie *E. herbicola*) i Nieoznaczone 1, jednakże najwyższą aktywnością charakteryzowały się fluoryzujące *Pseudomonas*, *Cytophaga-Flavobacterium* i *Bacillus* (Tabela 29). Podobnie jak w przypadku naszych badań, inni autorzy wymieniają te same rodzaje lub grupy bakterii, wyróżniające się wysoką zdolnością rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: Król (1997) - *Arthrobacter* i inne coryneform, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* oraz promieniowce (*Streptomyces*, *Nocardia* i *Actinomyces*); Paszkowski i Kobus (1999b) - *Pseudomonas*, *Nocardia* i *Streptomyces*; Paul i Sundara Rao (1971) - *Bacillus*; Schilling i in. (1998) i Kim i in. (1998) - *Pseudomonas* i *Pantoea* (*Enterobacter-Erwinia*); Vassilev i in. (1997) - *Enterobacter*; Sperber (1958) - *Arthrobacter* i *Flavobacterium*;

Tabela 29

Rozpuszczanie $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ przez bakterie z ryzosfery pszenicy ozimej
w stałej pożywce agarowej

Grupa lub rodzaj bakterii	Liczba szczepów	% szczepów aktywnych	Strefa przejaśnienia (w mm)	
			Wartości średnie	Wartości najwyższe
Wszystkie szczepy	1245	78,4	2,16	25
<i>Acinetobacter</i>	27	55,6	0,93	3
<i>Actinomyces</i>	8	87,5	3,63	6
<i>Alcaligenes</i>	49	28,6	0,64	7
<i>Bacillus</i>	137	90,5	2,75	9
Coryneform	177	76,3	1,45	7
<i>Erwinia carotovora</i>	90	66,7	1,13	10
<i>Erwinia herbicola</i>	20	100	2,91	8
<i>Flavobacterium - Cytophaga</i>	130	90,8	2,42	25
<i>Janthinobacterium</i>	1	100	0,10	0,1
<i>Klebsiella</i>	10	100	1,72	3
<i>Micrococcus</i>	45	13,3	0,27	4
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	333	96,4	3,59	13
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	54	59,3	1,07	5
<i>Xanthomonas</i>	48	81,3	1,35	6
Nieoznaczone 1	74	71,6	1,87	10
Nieoznaczone 2	42	50	0,25	3

Wraz z przejściem od ektoryzosfery do endoryzosfery obserwowano stopniowy wzrost aktywności (wzrastały zarówno średnie arytmetyczne jak i udział aktywnych szczepów) zespołów wyizolowanych szczepów bakterii (Tabela 33). Podobnie Sperber (1958) stwierdziła wyraźnie wyższy udział bakterii rozpuszczających $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ w ryzosferze pszenicy i życicy niż w glebie ugoru, a Louw (1970 - za Curl i Truelove, 1986), Louw i Webley (1959a), Rouatt i Katznelson (1961), Vagnerova i in. (1960) oraz Webley i Duff (1965) informują, że wraz z przejściem od gleby pozaryzosferowej, poprzez glebę ryzosferową do powierzchni korzeni owsa lub pszenicy, stopniowo wzrastał udział bakterii rozpuszczających węglan wapnia lub udział bakterii, tworzących kwas z glukozy. Ponadto stwierdziliśmy, że zdolność bakterii do rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3$ w pożywce płynnej stopniowo spadała w miarę starzenia się roślin (Tabela 34).

5.2.5. Mineralizacja siarki organicznej zawartej w cysteinie do nieorganicznych siarczanów

Tabela 30
Przekształcanie S-cysteiny przez bakterie z ryzosfery pszenicy ozimej do S-SO_4^{2-}

Grupa lub rodzaj bakterii	Liczba szczepów	% szczepów aktywnych	$\mu\text{g S-SO}_4^{2-} \text{ ml}^{-1}$	
			Wartości średnie	Wartości najwyższe
Wszystkie szczepy	1245	83,5	4,1	98
<i>Acinetobacter</i>	27	100	10,6	70
<i>Actinomycetes</i>	8	100	8,6	25,5
<i>Alcaligenes</i>	49	100	18,8	86
<i>Bacillus</i>	137	70,8	1,6	29
<i>Coryneform</i>	177	63,8	2,6	85
<i>Erwinia carotovora</i>	90	100	6,1	38
<i>Erwinia herbicola</i>	20	100	3,5	9
<i>Flavobacterium - Cytophaga</i>	130	76,9	1,3	23,5
<i>Janthinobacterium</i>	1	100	2,5	2,5
<i>Klebsiella</i>	10	100	27,9	84
<i>Micrococcus</i>	45	75,6	1,9	20,7
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	333	88,9	2,2	75
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	54	63	2,6	43
<i>Xanthomonas</i>	48	100	7,0	39
Nieoznaczone 1	74	97,3	4,6	98
Nieoznaczone 2	42	97,6	11,2	26,5

Zdecydowana większość S w glebach występuje w postaci organicznej (głównie w formie związków, w których S jest bezpośrednio związana z C), która aby stać się łatwo dostępną dla roślin musi być przekształcona przez mikroorganizmy glebowe do nieorganicznych siarczanów (Eriksen i in., 1998; Kobus, 1980).

Podobnie jak w przypadku badań Paszkowskiego i Kobusa (2000) i Król i Kobusa (1992), większość wyizolowanych z ryzosfery pszenicy szczepów bakterii miała zdolność do przekształcania S-cysteiny do siarczanów (Tabela 30). Jednak na ogół aktywność ta była niewielka i tylko mała liczba szczepów uwalniała siarczany w większym stopniu. W przeciwieństwie do wyników badań cytowanych przez Paszkowskiego i Kobusa (2000) oraz Król i Kobusa (1992), promieniowce nie były najaktywniejszą grupą bakterii. Wyższą aktywność miały *Klebsiella*, *Alcaligenes* - wymieniany także przez Paszkowskiego i Kobusa (2000), jako jeden z bardziej aktywnych rodzajów bakterii w ryzosferze owsa, oraz *Acinetobacter*.

5.2.6. Aktywność celulaz

Tabela 31

Celulolityczna aktywność bakterii z ryzosfery pszenicy ozimej

Grupa lub rodzaj bakterii	Liczba szczepów	% szczepów aktywnych	Strefa przejaśnienia (w mm)	
			Wartości średnie	Wartości najwyższe
Wszystkie szczepy	1245	2,1	0,11	13
<i>Acinetobacter</i>	27	3,7	0,004	0,1
<i>Actinomycetes</i>	8	87,5	3,375	5
<i>Alcaligenes</i>	49	2	0,041	2
<i>Bacillus</i>	137	8,8	0,593	13
Coryneform	177	1,1	0,068	7
<i>Erwinia carotovora</i>	90	0	0	0
<i>Erwinia herbicola</i>	20	0	0	0
<i>Flavobacterium</i> - <i>Cytophaga</i>	130	0	0	0
<i>Janthinobacterium</i>	1	0	0	0
<i>Klebsiella</i>	10	0	0	0
<i>Micrococcus</i>	45	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	333	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	54	0	0	0
<i>Xanthomonas</i>	48	0	0	0
Nieoznaczone 1	74	0	0	0
Nieoznaczone 2	42	0	0	0

Zaledwie 2% szczepów bakterii wyizolowanych z ryzosfery pszenicy ozimej charakteryzowała się aktywnością celulolityczną (Tabela 31). Jeszcze niższe wartości (poniżej 0,1%) uzyskali Neal i in. (1973) oraz Rouatt i in. (1960) dla zespołów bakterii z ryzosfery pszenicy, a Paszkowski i Kobus (1999a) i Turner i in. (1985) stwierdzili brak zdolności celulolitycznych u bakterii wyizolowanych odpowiednio z ryzosfery owsa i ryzoplany życicy. Także Król (1997) aktywność celulolityczną wśród bakterii wyizolowanych z ryzosfery jęczmienia, notowała tylko u promieniowców.

Zdecydowanie najbardziej aktywną grupą okazały się promieniowce, których większość rozkładała celulozę oraz rodzaj *Bacillus* (9% szczepów), w obrębie którego znaleziono najaktywniejsze szczepy. Mniejszą aktywnością charakteryzowały się Coryneform (Tabela 31).

Obserwowano stopniowo zmniejszającą się celulolityczną aktywność zespołów bakteryjnych wraz z przejściem od ektoryzosfery do endoryzosfery. Stopniowo malał też udział aktywnych szczepów (Tabela 33).

5.2.7. Hydroliza chityny

Tabela 32

Chitynolityczna aktywność bakterii z ryzosfery pszenicy ozimej

Grupa lub rodzaj bakterii	Liczba szczepów	% szczepów aktywnych	Strefa przejaśnienia (w mm)	
			Wartości średnie	Wartości najwyższe
Wszystkie szczepy	1245	21,8	2,7	25
<i>Acinetobacter</i>	27	18,5	3,1	25
<i>Actinomycetes</i>	8	87,5	11,8	20
<i>Alcaligenes</i>	49	10,2	2,4	25
<i>Bacillus</i>	137	27,7	3,0	25
Coryneform	177	10,7	1,5	25
<i>Erwinia carotovora</i>	90	71,1	5,7	25
<i>Erwinia herbicola</i>	20	0	0	0
<i>Flavobacterium</i> - <i>Cytophaga</i>	130	30	2,0	20
<i>Janthinobacterium</i>	1	100	14,0	14
<i>Klebsiella</i>	10	0	0	0
<i>Micrococcus</i>	45	2,2	0,3	15
<i>Pseudomonas</i> fluoryzujący	333	2,4	0,3	20
<i>Pseudomonas</i> niefluoryzujący	54	11,1	2,6	25
<i>Xanthomonas</i>	48	66,7	11,0	25
Nieoznaczone 1	74	5,4	0,6	15
Nieoznaczone 2	42	100	17,7	20

Chityna - naturalny biopolimer amino-cukrowy jest składnikiem ścian komórkowych wielu organizmów szkodliwych dla roślin uprawnych, głównie owadów, nicieni i grzybów (Gooday, 1990; Hanzlíková i in., 1989). Dodatek chityny do gleby podnosi populację chitynolitycznych mikroorganizmów. Ten wzrost jest związany z redukcją uszkodzeń roślin (Gooday, 1990; Hanzlíková i in., 1989). Informuje to, że aktywność chitynolityczna drobnoustrojów ryzosferowych może odgrywać istotną rolę w ochronie roślin przed patogenami.

Jedynie $\frac{1}{5}$ wyizolowanych z ryzosfery pszenicy szczepów bakterii charakteryzowała się zdolnością do hydrolizy chityny (Tabela 32). Podobne wartości, dotyczące zespołów bakterii z ryzosfer różnych roślin (w tym owsa i życicy) przedstawiają Gooday (1990 - za Mihalym, 1960), Paszkowski (1997) i Turner (1985). Nieco niższe wartości udziału bakterii chitynolitycznych (nie przekraczające 10%) w zespołach bakteryjnych z ryzosfery różnych roślin (w tym żyta) uzyskali Kloepper i in. (1991) oraz Kurek i Jaroszuk (1997).

Najwyższy procent aktywnych szczepów znaleziono wśród Nieoznaczonych 2, promieniowców, *Erwinia* i *Xanthomonas*, jednakże silnie aktywne szczepy znajdowano także

w obrębie wielu innych grup, szczególnie wśród *Bacillus*, *Coryneform* i niefluoryzujących *Pseudomonas* (Tabela 32). Na podstawie badań Król (1997) i Paszkowskiego (1997), najbardziej aktywne rodzaje bakterii w rozkładzie chityny, występujące w ryzosferze jęczmienia i owsa to: *Erwinia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micromonospora* i *Nocardia*.

Turner i in. (1985) stwierdzili, że ryzoplana żyłycy charakteryzowała się mniejszym udziałem drobnoustrojów chitynolitycznych niż gleba pozaryzosferowa. Również Paszkowski (1997) oraz Kurek i Jaroszuk (1997) informują, że najwięcej bakterii chitynolitycznych występowało w ektoryzosferze owsa i jęczmienia. Dane te są zgodne z uzyskanymi w naszych badaniach. Obserwowaliśmy stopniowy spadek udziału bakterii chitynolitycznych przy przejściu od ektoryzosfery do endoryzosfery (Tabela 33). Być może jest to związane z jednoczesnym wzrostem stosunku liczebności bakterii do liczebności grzybów (Tabela 7).

Paszkowski (1997) wyizolował największą ilość chitynolitycznych ryzobakterii w fazie kwitnienia. My również zaobserwowaliśmy, że zespół szczepów bakterii wyizolowanych w fazie kwitnienia charakteryzował się najwyższą aktywnością chitynolityczną (Tabela 34).

Tabela 33

Aktywność (średnie arytmetyczne) oraz udział aktywnych szczepów
w zespołach bakterii, wyizolowanych z różnych stref ryzosfery pszenicy ozimej
(ze wszystkich faz rozwoju roślin łącznie)

Badana cecha	Średnie arytmetyczne dla całego zespołu bakterii				Udział aktywnych szczepów (w %)			
	Ektoryzosfera	Ryzoplana	Ryzoplana/ Endoryzosfera	Endoryzosfera	Ektoryzosfera	Ryzoplana	Ryzoplana/ Endoryzosfera	Endoryzosfera
<i>Ggt</i> na PDA (w mm)	5,00	5,06	5,56	5,87	37,1	46,2	43,6	61,7
<i>Fc</i> na PDA (w mm)	4,10	3,28	3,98	2,40	44,1	39,0	40,4	29,4
<i>Ggt</i> na King B (w mm)	9,29	9,54	9,93	9,14	91,1	88,6	85,1	93,2
<i>Fc</i> na King B (w mm)	2,07	1,71	1,70	1,13	26,2	26,2	24,1	22,6
Zw. chelat. Fe^{3+} (w $\mu\text{M l}^{-1}$)	23,8	29,2	31,2	50,2	77,7	87,2	82,6	88,1
HCN (skala 1-3)	0,05	0,10	0,13	0,48	4,0	4,8	6,0	20,4
Fosf. kw. (w $\mu\text{g ml}^{-1}$)	14,0	8,9	9,7	8,9	97,5	97,6	94,3	97,9
Fosf. alk. (w $\mu\text{g ml}^{-1}$)	8,6	7,3	8,4	8,2	95,5	95,5	90,4	93,6
Mineral. P organ. (w $\mu\text{g ml}^{-1}$)	27,5	16,8	23,6	21,3	72,3	69,0	65,6	73,2
Rozp. fosf. Ca roztw. (w $\mu\text{g ml}^{-1}$)	22,1	23,3	28,3	32,5	71,8	70,0	77,7	85,5
Rozp. fosf Ca agar (w mm)	1,59	1,95	2,14	2,35	71,8	71,0	79,8	85,1
Mineral. S org (w $\mu\text{g ml}^{-1}$)	4,9	3,7	5,3	3,0	84,7	80,3	85,5	88,9
Chitynaza (w mm)	2,87	2,66	2,80	1,88	27,2	19,7	19,5	14,9
Celulaza (w mm)	0,13	0,08	0,02	0,01	4,0	1,4	0,7	0,4

Tabela 34

Aktywność (średnie arytmetyczne) oraz udział aktywnych szczepów
w zespołach bakterii, wyizolowanych z różnych faz rozwoju pszenicy ozimej
(ze wszystkich stref ryzosfery łącznie)

Badana cecha	Średnie arytmetyczne dla całego zespołu bakterii				Udział aktywnych szczepów (w %)			
	Faza 2. liścia	Faza 4. liścia	Faza kwitnienia	Faza dojrzałości	Faza 2. liścia	Faza 4. liścia	Faza kwitnienia	Faza dojrzałości
<i>Ggt</i> na PDA (w mm)	6,78	5,00	5,58	4,12	58,0	51,2	50,6	29,5
<i>Fc</i> na PDA (w mm)	5,52	1,12	2,49	4,78	60,6	16,6	33,8	41,8
<i>Ggt</i> na King B (w mm)	8,14	7,87	10,94	10,26	93,4	88,6	86,9	88,9
<i>Fc</i> na King B (w mm)	0,42	1,23	1,55	3,25	11,1	25,6	26,5	34,4
Zw. chelat. Fe^{3+} (w $\mu\text{M l}^{-1}$)	33,8	46,4	34,0	21,7	94,7	88,6	86,3	68,0
HCN (skala 1-3)	0,33	0,01	0,34	0	14,2	1,4	15,9	0
Fosf. kw. (w $\mu\text{g ml}^{-1}$)	19,7	4,4	6,1	11,7	97,8	97,2	95,4	97,1
Fosf. alk. (w $\mu\text{g ml}^{-1}$)	12,4	4,6	7,0	8,5	94,7	93,8	92,4	94,3
Mineral. P organ. (w $\mu\text{g ml}^{-1}$)	32,8	16,1	13,9	27,6	71,7	73,0	62,5	74,6
Rozp. fosf. Ca roztw. (w $\mu\text{g ml}^{-1}$)	41,7	25,5	22,3	19,4	82,3	82,0	78,4	62,3
Rozp. fosf Ca agar (w mm)	1,96	2,25	2,23	1,61	73,9	81,5	83,2	67,2
Mineral. S org (w $\mu\text{g ml}^{-1}$)	5,19	1,75	7,93	4,56	94,2	83,4	84,5	77,0
Chitynaza (w mm)	2,90	0,82	3,73	2,18	23,5	12,3	21,3	21,7
Celulaza (w mm)	0,14	0,06	0,03 a	0,02	3,1	1,4	0,9	0,8

5.3. CZĘŚĆ III. WPŁYW BAKTERII *Bacillus mycoides* NA WZROST PSZENICY OZIMEJ I JEJ OCHRONĘ PRZED GRZYBOWYMI PATOGENAMI KORZENI

Jak przedstawiono w „Przeglądzie Literatury” jedną z najważniejszych cech bakterii, warunkujących powodzenie zastosowania ich jako szczepionki, jest ich zdolność do przeżycia w niekorzystnych dla nich warunkach oraz zdolność do kolonizacji ryzosfery. Do badań nad wpływem bakterii na rośliny postanowiono więc wybrać bakterie z rodzaju *Bacillus*, wytwarzające przetrwalniki, umożliwiające im lepszą przeżywalność w glebie. Uwagę naszą zwrócił fakt, że w porównaniu do zespołów bakterii, pochodzących z odpowiednich homogenatów korzeni pszenicy ozimej, w zespołach bakteryjnych kolonizujących pożywkę agarową wokół położonych na niej odcinków tych korzeni obserwowano szczególnie znaczny wzrost udziału szybko rosnących bakterii *B. mycoides*. Założyliśmy, iż pomimo, że bakterie te nie mają zdolności ruchu, obserwowany na pożywkach agarowych ich szybki wzrost może ułatwić im szybką kolonizację powierzchni korzeni. Z tego też względu postanowiliśmy sprawdzić jaki wpływ mają wyizolowane szczepy *B. mycoides* na wzrost pszenicy ozimej i określić ich zdolności biokontrolne przeciwko grzybowym patogenom roślin. Należy tu dodać, że *B. mycoides* został wyizolowany jako szczep biokontrolny z gleby tłumiącej rozwój zgorzeli podstawy źdźbła (Maplestone i Campbell, 1989).

5.3.1. Doświadczenia fitotronowe i szklarniowe

5.3.1.1. Wpływ szczepów bakterii *B. mycoides* na wzrost pszenicy ozimej (odm. Gama)

5.3.1.1.1. Oddziaływanie bakterii na długość koleoptyli i korzonków siewek pszenicy na płytkach agarowych (Doświadczenie 1a) po 8 dniach inkubacji przedstawiono w Tabeli 35. Wpływ bakterii (w porównaniu do kontroli nieszczepionej) na długość koleoptyli wahał się w granicach od 0% do +38,2% (śr. +17,9%). Zakres działania bakterii na długość korzonków był znacznie szerszy. Wahał się on w granicach od -28,5% do +108,4% (śr. +38,1%). Zmiany stosunku długości koleoptyli do długości korzonków (K/K) pod wpływem działania bakterii również podlegały znacznym wahaniom od -44,8% do +42,0%

(śr. -6,9%). Szczep JC192 w największym stopniu podnosił ten stosunek, natomiast szczep K171 go obniżał (Tabela 35).

5.3.1.1.2. Oddziaływanie bakterii *Bacillus mycoides* na wschody i masę roślin w 28 dniowym doświadczeniu doniczkowym na sterylizowanym piasku (Doświadczenie 1b) przedstawiono również w tabeli 35. Bakterie nieznacznie stymulowały wschody roślin (od 0 do +18,6%, śr. +7,8%). Na przeciwległych biegunach znalazły się szczepy JC192 (stymulujący wschody) i K171 (nie mający wpływu), bakterie skrajnie odmiennie zmieniające stosunek długości koleoptyli do długości korzonków (K/K). Badane szczepy bakterii dodatnio wpływały na masę całych roślin od +6,2 do +44,2% (śr. +20,6%) i masę pędów od +12,3 do +43,3% (śr. +23,3%). W obu przypadkach szczep K184 wpływał najsilniej. Masa korzeni zmieniała się pod wpływem bakterii od -3,5 do +45,7% (śr. +16,2%). I w tym przypadku najsilniej dodatnio oddziaływał szczep K184. Szczep K167 działał najmniej korzystnie zarówno na masę pędów jak i korzeni. Szczepy *B. mycoides* zmieniały stosunek masy pędów do masy korzeni (P/K) od -5,8 do +20% (śr. +6,9%). Podobnie jak w przypadku zmian K/K oraz wschodów roślin, na przeciwległych biegunach znalazły się szczepy K171 (największy wzrost P/K) i JC192 (największa obniżka P/K) (Tabela 35).

5.3.1.1.3. Zależności pomiędzy zmianami (pod wpływem *Bacillus mycoides*) różnych parametrów wzrostu pszenicy ozimej odmiany Gama w doświadczeniach na płytkach agarowych i doniczkach z piaskiem kwarcowym (Doświadczenia 1a i 1b) przedstawiono w postaci współczynników korelacji prostej w Tabeli 36. Na podstawie tych danych widać, że zmiany długości korzonków pod wpływem bakterii w doświadczeniu na płytkach agarowych są ujemnie skorelowane ($r = -0,520$ przy $P = 90\%$) ze zmianami masy korzeni w doświadczeniu doniczkowym. Szczególnie duża ujemna korelacja jest widoczna pomiędzy zmianami K/K a zmianami P/K ($r = -0,896$ przy $P > 99\%$). Również zmiany (pod wpływem bakterii) wschodów roślin są skorelowane ze zmianami K/K ($r = 0,438$ przy $P = 90\%$) i zmianami P/K ($r = -0,466$ przy $P = 90\%$) (Tabela 36).

Zaobserwowane zależności sugerują, że w oddziaływaniach bakterii *B. mycoides* na wzrost pszenicy ozimej biorą udział metabolity typu hormonów wzrostu, które w zależności od stężenia hamują wzrost roślin lub go stymulują. Szereg doniesień informuje, że bakterie należące do rodzaju *Bacillus* mają zdolność do syntezy auksyn, giberelin i cytokinin (Brown cyt. przez Broadbent i in., 1977; Holl i in., 1988; Kampert i Strzelczyk, 1984; Selvadurai i in., 1991).

Tabela 35.

Wpływ *Bacillus mycoides* na wzrost pszenicy ozimej odmiany Gama w 8-dniowym doświadczeniu na sterylnych płytkach agarowych (kolumny zacienione) i w 28 dniowym fitotronowym doświadczeniu wazonowym na sterylnym piasku kwarcowym -
- wzbogaconych pożywką Hoaglanda
(wartości przedstawiono w % kontroli nieszczepionej).

Symbol szczepu	Długość koleoptyli	Długość korzonków	Stosunek kol./korz.	Wschody (po 14 dniach)	Masa całych roślin	Masa pędów	Masa korzeni	Stosunek pędy/korzenie
Kontrola	4,8 cm 100%	8,9 cm 100%	0,54 100%	8,6 100%	1050,3 mg 100%	646,0 mg 100%	404,3 mg 100%	1,60 100%
JC 58	102,8%	149,4%	68,8%	109,3%	111,2%*	117,3%**	101,5%	115,6%
JC 177	125,7%	176,1%**	71,4%	111,6%	130,7%**	132,9%*	127,2%**	104,5%
JC 180	128,4%	140,4%	91,4%	109,3%	122,8%*	123,2%*	122,0%	101,0%
JC 189	116,7%	107,4%	108,6%	100,0%	119,8%***	120,2%**	119,3%	100,7%
JC 192	123,1%	86,7%	142,0%	118,6%	126,2%*	123,3%*	130,8%**	94,2%
JC 194a	100,0%	71,5%	139,8%	114,0%	118,5%	116,9%	121,1%	96,5%
JC 197b	124,4%	168,8%	73,7%	107,0%	133,4%**	140,6%**	122,0%*	115,2%
JC 199	138,2%	195,2%***	70,8%	111,6%	107,6%	113,3%	98,4%	115,2%
K 167	100,9%	135,1%	74,7%	102,3%	106,2%	112,3%*	96,5%	116,5%
K 171	115,1%	208,4%	55,2%	100,0%	113,4%	121,2%*	101,0%	120,0%
K 184	113,3%	100,2%	113,0%	107,0%	144,2%***	143,3%***	145,7%**	98,4%
K 186	126,3%	117,7%	107,3%	102,3%	112,7%	114,8%*	109,4%	104,9%

*, **, *** - wartości różnią się od kontroli przy P = 90, 95 lub 99%.

Tabela 36.

Współczynniki korelacji pomiędzy zmianami (pod wpływem *Bacillus mycoides*) różnych parametrów wzrostu pszenicy ozimej odmiany Gama w doświadczeniach na płytkach agarowych i doniczkach z piaskiem kwarcowym.

Długość koleoptyli	Długość korzonków	Stosunek kol./korz.	Wschody	Masa pędów	Masa korzeni	Masa całych roślin	Stosunek pędy/ /korzenie
1	0,406	-0,144	0,161	0,162	0,108	0,145	-0,034
	1	-0,928***	-0,273	0,016	-0,520*	-0,254	0,815***
		1	0,438*	0,011	0,589**	0,305	-0,896***
			1	0,101	0,373	0,245	-0,466*
				1	0,773***	0,947***	-0,208
					1	0,936***	-0,778***
						1	-0,510*
							1

***, **, * - wartości współczynników korelacji są istotne przy P = 99, 95 lub 90%.

5.3.1.2. Wpływ *Fusarium culmorum* i *Bacillus mycoides* na wzrost pszenicy ozimej (odm. Gama) w 28-dniowym szklarniowym doświadczeniu wazonowym (Doświadczenie 2) przedstawiono w Tabeli 37. W porównaniu do kontroli nie szczepionej żadnymi drobnoustrojami, *Fusarium culmorum* istotnie opóźniał wschody roślin i obniżał ich masę. Z wyjątkiem szczepu JC197b, który w porównaniu do serii szczepionej samym *F. culmorum* oddziaływał istotnie dodatnio jedynie na masę korzeni, badane szczepy działały pozytywnie na wschody roślin i ich masę (masę pędów, korzeni i całych roślin). Najsilniej oddziałującym szczepem okazał się JC192, który w poprzednich doświadczeniach najsilniej zmieniał K/K i P/K oraz najsilniej stymulował wschody roślin. Ten szczep bakterii, jako jedyny, istotnie (przy $P \geq 95\%$) zwiększał (w porównaniu do kontroli nieszczepionej) masę pędów, korzeni i całych roślin (Tabela 37).

Do dalszych badań wybrano szczep JC192. Z przeprowadzonych dotychczas doświadczeń wynikało, że był on najbardziej aktywny w oddziaływaniu na rośliny. Szczep ten najsilniej zwiększał stosunek długości koleoptyli do długości korzonków w doświadczeniu 1a, najsilniej zmniejszał stosunek masy pędów do masy korzeni w

doświadczeniu 1b oraz był on najbardziej skuteczny w ochronie pszenicy przed *Fusarium culmorum* w doświadczeniu 2.

Tabela 37.

Wpływ *Fusarium culmorum* i *Bacillus mycoides* na wzrost pszenicy ozimej (odm. Gama) w 28-dniowym szklarniowym doświadczeniu wazonowym (wartości przedstawiono w % kontroli nieszczepionej)

Seria doświadczalna	Dynamika wschodów (5,6,7 i 19 dnia)	Liczba pędów	Masa pędów	Masa korzeni	Masa całych roślin	Stosunek pędy/ /korzenie
Kontrola nieszczepiona	35,7 100% e	8,0 100% a	939 mg 100% b	873 mg 100% b	1812 mg 100% b	1,08 100% a
Fusarium	22,4 a	104,2 ab	56,3 a	50,2 a	53,4 a	111,8 ab
JC197B + Fus.	26,2 abc	108,3 ab	84,2 abc	76,6 bc	80,6 abc	109,0 ab
K184 + Fus.	54,2 bcd	108,3 ab	115,1 c	102,6 bc	109,0 bd	112,1 ab
JC177 + Fus.	47,7 bc	116,7 ab	118,8 bcd	103,1 bc	111,2 bcd	116,0 ab
JC192 + Fus.	76,6 de	133,3 b	141,7 d	114,9 c	128,8 c	123,2 b

a, b, c, d, e - wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy P = 95%.

5.3.1.3. Wpływ żywego i zabitego inokulum *Bacillus mycoides* - szczep JC192 (wprowadzanego na różnych nośnikach) na wzrost pszenicy ozimej (odm. Gama) w doniczkowym doświadczeniu fitotronowym na czarnej ziemi deluwialnej (Doświadczenie 3) przedstawiono w Tabeli 38. Wprowadzenie inokulum zabitych bakterii nie było obojętne dla roślin. Z wyjątkiem serii z torfem, zabite inokulum bakterii działało ujemnie na masę pędów usuniętych po 7 dniach (od -15 do -88%) i na masę korzeni po 28 dniach (od -13 do -28%), a w przypadku serii z melasą także na masę pędów po 28 dniach (-15%) i na dynamikę wschodów (-40%). Być może zabite inokulum razem z nośnikami stanowiło źródło pokarmu dla mikroorganizmów, szkodliwie oddziałujących na wzrost roślin. W porównaniu do serii z zabitymi bakteriami (100%), szczepienie nasion bakteriami żywymi przeważnie oddziaływało pozytywnie na badane parametry wzrostu roślin (Tabela 38). Pod wpływem żywych bakterii dynamika wschodów wzrosła w zakresie od +5 do +46%, masa usuniętych pędów wzrosła w zakresie od +15 do +375%, masa całych roślin zmieniła się w zakresie od 0 do +19%, masa pędów wzrosła w zakresie od +3 do +11% a masa korzeni uległa zmianie w zakresie od -4

do +30%. W porównaniu do kontroli nie szczepionej (100%) żywe inokulum działało pozytywnie (z wyjątkiem serii z melasą) na dynamikę wschodów w zakresie od +5 do +23%, masę wyrwanych pędów w zakresie od +4 do +15% i masę pędów w zakresie od +3 do +13% oraz działało ujemnie na masę korzeni w zakresie od -7 do -12% (Tabela 38). Zmiany te z wyjątkiem jednej (wpływ na masę korzeni w serii z liofilizatem) nie zostały udowodnione statystycznie. Istotny statycznie (przy $P = 95$ lub 99%), z wyjątkiem dwóch przypadków, okazał się wpływ zarówno żywego (do +21%) jak i zabitego (do +22%) inokulum bakterii na stosunek masy pędów do masy korzeni (P/K).

Tabela 38.

Wpływ żywego i zabitego inokulum *Bacillus mycoides* - szczep JC192 (wprowadzanego na różnych nośnikach) na wzrost pszenicy ozimej (odm. Gama) w doniczkowym doświadczeniu fitotronowym na czarnej ziemi deluwialnej (7 roślin/doniczkę).
(Wartości serii szczepionych żywym lub zabitym szczepem JC192 przedstawiono w % kontroli nieszczepionej)

Nośnik	Inokulum	Wschody po 7 dn.	Masa pędów usuniętych po 7 dn.	Masa roślin po 28 dn.	Masa pędów po 28 dn.	Masa korzeni po 28 dn.	Pędy/ /korzenie po 28 dn.
Kontrola		11 100%	90 mg 100%	1281 mg 100 %	675 mg 100%	606 mg 100 %	1,11 100 %
Woda	Zabite	104,5	79,8	94,5	101,4	86,8	117,3***
	Żywe	122,7	103,9	103,5	112,9	93,0	121,4**
Torf	Zabite	100,0	99,8	100,6	105,7	95,0	110,8
	Żywe	104,5	114,5	100,6	109,1	91,0	120,5**
Liofilizat	Zabite	104,5	85,1	90,6**	98,9	81,5***	121,7**
	Żywe	115,9	114,1	95,9	102,7	88,2**	116,4**
Melasa	Zabite	59,1	11,7	78,6*	84,6	72,0**	118,7**
	Żywe	86,4	55,6	93,5	93,6	93,4	100,3
Wszystkie	Zabite	92,0	69,1	91,1	97,7	83,8	117,1
	Żywe	107,4	97,0	98,4	104,6	91,4	114,7

***, **, * - wpływ inokulum *B. mycoides* JC192 jest istotny przy $P = 99$, 95 lub 90% .

5.3.1.3.1. W Tabeli 39 przedstawiono dane informujące o **wpływie żywego inokulum *B. mycoides* JC192 (w porównaniu do zabitych bakterii) wprowadzonego do torfu na masę pszenicy ozimej (odm. Gama) uprawianej na tym torfie przez 21 dni** (Doświadczenie 3a). Podobnie jak w poprzednim doświadczeniu na glebie deluwialnej, żywe inokulum wpływało

(w porównaniu do zabitego inokulum) dodatnio na masę roślin. Ze względu na to, że doświadczenie to wykonano w jednym powtórzeniu, uzyskane różnice nie mogą być udowodnione statystycznie. Należy zaznaczyć, że wokół korzeni pszenicy z serii z inokulum zabitym położonych na powierzchnię pożywek agarowych dla bakterii i grzybów wyrosły różnorodne drobnoustroje, wśród których grzyby z rodzaju *Fusarium* wyróżniały się dużym udziałem, natomiast w serii z żywym JC192 stwierdzono wzrost wyłącznie *B. mycoides*, zarówno na pożywkach dla bakterii jak i grzybów (dane nie prezentowane). Obserwacje korzeni roślin pod binokulem sugerują, że w serii z żywym inokulum, głównie *B. mycoides* pokrywał powierzchnię korzeni i pozostałości macierzystego ziarna siewnego.

Tabela 39.

Wpływ żywego i zabitego inokulum *Bacillus mycoides* - szczep JC192 (wprowadzanego do torfu) na wzrost pszenicy ozimej (odm. Gama) w 21-dniowym doniczkowym doświadczeniu na torfie.

Seria doświadczalna	Masa całych roślin	Masa pędów	Masa korzeni	Masa pędów / / masa korzeni
Inokulum zabite	620,1 mg (100 %)	444,5 mg (100 %)	175,6 mg (100 %)	2,53 (100 %)
Inokulum żywe	720,4 mg (116,2 %)	539,0 mg (121,3 %)	181,4 mg (103,3 %)	2,97 (117,4 %)

5.3.1.4. Wpływ *Bacillus mycoides* szczep JC192 na wzrost pszenicy ozimej (odm. Kobra) na różnych glebach w 28 dniowym doniczkowym doświadczeniu fitotronowym (Doświadczenie 4) przedstawiono w Tabeli 40.

Piasek kwarcowy i trzy gleby (glebę ogrodową, glebę brunatną wytworzoną z lessu i czarną ziemię deluwialną) dobrano pod względem ich stopniowo wzrastających zdolności plonotwórczych. Masa całych roślin wahała się od 735,1 mg do 2179,2 mg, masa pędów wahała się od 387,4 mg do 1502,3 mg, masa korzeni wahała się od 347,7 mg do 676,9 mg. Wraz ze wzrostem zdolności plonotwórczych wzrastał stosunek masy pędów do masy korzeni (P/K) od 1,11 w przypadku piasku do 2,22 w przypadku gleby deluwialnej. Gleby o wyższych zdolnościach plonotwórczych charakteryzowały się niższą dynamiką wschodów (Tabela 40).

Szczepienie nasion bakteriami *B. mycoides* JC192 spowodowało wyraźniejsze zmiany dynamiki wschodów, masy roślin i stosunku P/K w glebach o wyższych zdolnościach plonotwórczych (Tabela 40). Zmiany masy roślin w seriach z *B. mycoides* były istotnie

skorelowane przy $P \geq 95\%$ z masą roślin (szczególnie z masą korzeni) w seriach kontrolnych, nie szczepionych bakteriami (dane nie prezentowane). Wpływ szczepienia ziarna siewnego bakteriami *B. mycoides* JS192 był istotny statystycznie jedynie w przypadku gleby deluwialnej, w której rośliny w glebie kontrolnej uzyskały najwyższą biomasę w ciągu 28 dni (Tabela 40). Dynamika wschodów wzrosła o 32% (istotność przy $P \geq 99\%$), masa pędów wzrosła o 14% (istotność przy $P = 90\%$), masa całych roślin wzrosła o 22% (istotność przy $P \geq 99\%$), masa korzeni wzrosła o 38% (istotność przy $P \geq 99\%$) a wartość P/K zmalała o 17% (istotność przy $P \geq 95\%$).

Tabela 40.

Wpływ *Bacillus mycoides* szczep JC192 na wzrost pszenicy ozimej (odm. Kobra) na różnych glebach w 28 dniowym doniczkowym doświadczeniu fitotronowym.

Gleba	Dynamika wschodów		Masa roślin		Masa pędów		Masa korzeni		Pędy / korzenie	
	Kontrola suma roślin 5, 6 i 7 dnia	Wpływ Bacillus w % kontroli	Kontrola masa w mg	Wpływ Bacillus w % kontroli	Kontrola masa w mg	Wpływ Bacillus w % kontroli	Kontrola masa w mg	Wpływ Bacillus w % kontroli	Kontrola	Wpływ Bacillus w % kontroli
Piasek kwarcowy	45,3 a	104,4	735,1 a	99,2	387,4 a	97,6	347,7 a	101,0	1,11	96,1
Gleba ogrodowa	38,0 ab	123,0	1076,2 b	106,3	637,8 b	104,5	438,4 b	109,0	1,45	95,3
Brunatna z lessu	26,0 b	104,8	1338,0 c	105,7	882,2 c	105,3	455,8 b	106,6	1,94	98,2
Czarna ziemia	27,0 b	132,4**	2179,2 d	121,7****	1502,3 d	114,3*	676,9 c	138,1****	2,22	82,6**

a, b, c, d - wartości (w obrębie kolumn) oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy P = 95%.

****, **, * - wpływ *B. mycoides* JC192 jest istotny przy P = 99, 95 lub 90%.

5.3.1.5. Wpływ *Bacillus mycoides* JC192 na wzrost różnych odmian pszenicy ozimej.

5.3.1.5.1. Wpływ inokulum *Bacillus mycoides* JC192 o różnym stężeniu na długość koleoptyli i korzonków różnych odmian pszenicy ozimej (Doświadczenie 5a). Dane dotyczące tego doświadczenia zamieszczone są w tabeli 41.

Dziesięciokrotne rozcieńczenie zmywu kontrolnego z powierzchni nieszczepionej pożywki agarowej spowodowało podobną reakcję wszystkich trzech odmian pszenicy ozimej, a mianowicie wzrost długości koleoptyli i skrócenie korzonków. Przyczyniło się to do wzrostu stosunku K/K u wszystkich odmian pszenicy (Tabela 41).

Różne odmiany pszenicy ozimej (Kobra, Elena i Maltanka) zareagowały jednak w sposób odmienny na rozcieńczenia (2- i 10-krotne) zawiesiny bakterii, zmytej z powierzchni pożywki agarowej 1% roztworem CM-celulozy. Kobra była odmianą reagującą najslabiej na zmiany stężenia inokulum *Bacillus mycoides* JC192. W porównaniu do stężenia podstawowego, inokulum JC192 po rozcieńczeniu obniżyło długość koleoptyli i długość korzonków. Reakcje Eleny i Maltanki były krańcowo odmienne od reakcji Kobry. Rozcieńczenie inokulum bakterii spowodowało u tych odmian pszenicy ozimej wzrost długości koleoptyli i (zwłaszcza) długości korzonków (Tabela 41).

Zmiana wartości K/K Kobry pod wpływem rozcieńczenia zawiesiny JC192 była także odmienna od zmian wartości K/K pozostałych odmian. Rozcieńczenie zawiesiny bakterii spowodowało wzrost wartości K/K Kobry, a spadek wartości K/K u Eleny i Maltanki. W porównaniu do kontroli wszystkie odmiany zareagowały spadkiem K/K (Tabela 41).

5.3.1.5.2. Wpływ *Bacillus mycoides* JC192 na wzrost różnych odmian pszenicy ozimej w 28 dniowym doniczkowym doświadczeniu fitotronowym (Doświadczenie 5b) przedstawiono w Tabeli 42. Tym razem odmianą szczególnie odmiennie reagującą (od pozostałych dwu odmian) na szczepienie nasion bakteriami *B. mycoides* JC192 była Maltanka. Zareagowała ona spadkiem masy pędów o 15%, masy korzeni o 24% i masy całych roślin o 17%. Wszystkie te obniżki były istotne statystycznie przy $P \geq 95\%$. Pozostałe dwie odmiany zareagowały nieznacznie dodatnio, jednakże te różnice od wartości kontrolnych nie zostały udowodnione statystycznie przy $P = 95\%$. Jedynie 9% wzrost masy całych roślin w przypadku Kobry był istotny przy $P = 90\%$ (Tabela 42).

Tabela 41.

Wpływ inokulum *Bacillus mycoides* JC192
(zmyw 1% roztworem CM-celulozy z pożywki agarowej) o różnym stężeniu
na długość koleoptyli i korzonków różnych odmian pszenicy ozimej.
Kontrolę stanowi zmyw ze sterylnej pożywki.

Odmiana pszenicy	Rozcieńczenie zmywu z pożywki agarowej	Długość koleoptyli (w mm i % kontroli)		Długość korzonków (w mm i % kontroli)		Koleoptyle/korzonki (w jedn.bzwgl. i % kontroli)	
		Wartość kontrolna	Wpływ <i>Bacillus</i>	Wartość kontrolna	Wpływ <i>Bacillus</i>	Wartość kontrolna	Wpływ <i>Bacillus</i>
Kobra	1-krotne	17,2 100%	19,9 115,7%	22,3 100%	19,1 85,6%	0,77 100%	1,04 135,1%
	2-krotne	17,7 100%	18,0 101,7%	18,2 100%	15,0 82,3%	0,97 100%	1,20 123,7%
	10-krotne	18,2 100%	17,1 93,9%	16,8 100%	13,6 80,9%	1,09 100%	1,26 115,6%
Elena	1-krotne	13,5 100%	6,4 47,5%*	32,7 100%	7,5 23,0%***	0,41 100%	0,85 207,3%
	2-krotne	12,0 100%	14,9 124,6%	20,3 100%	18,4 90,4%	0,59 100%	0,81 137,3%
	10-krotne	14,5 100%	14,1 97,8%	19,5 100%	23,9 122,9%	0,74 100%	0,59 79,7%
Maltanka	1-krotne	17,2 100%	13,8 80,2%	23,6 100%	13,8 58,4%	0,73 100%	1,00 137,0%
	2-krotne	18,1 100%	14,8 81,5%	24,3 100%	14,8 60,8%**	0,75 100%	1,00 133,3%
	10-krotne	19,2 100%	18,9 98,7%	22,6 100%	24,5 108,4%	0,85 100%	0,77 90,6%

Odmienne reakcje (niekiedy od znacznie dodatnich do znacznie ujemnych) różnych odmian różnych roślin (w tym pszenicy) na szczepienie bakteriami stwierdzili także Åström (1991), Åström i in. (1993), Elliott i Lynch (1984), Kennedy i in. (1991) oraz Vraný i in. (1989). Niektórzy cytowani autorzy uważają, że różna wrażliwość różnych odmian roślin na metabolity bakteryjne jest jednym z głównych czynników warunkujących reakcję roślin na działanie bakterii. W badaniach Åströma i Gerhardsona (1988) nad wpływem dwóch szczepów bakterii *Pseudomonas fluorescens* na wzrost 14 genotypów pszenicy i 17

genotypów grochu, uszeregowanie w rangi reakcji roślin od najmniejszej wrażliwości do największej prawie powtórzyło się w drugim doświadczeniu. Współczynnik korelacji rangowej Spearmana wyniósł 0,611 i 0,810. Dowodzi to, że reakcja roślin na izolaty bakterii jest regulowana genetycznie.

Tabela 42.

Wpływ *Bacillus mycoides* JC192 na wzrost różnych odmian pszenicy ozimej w 28 dniowym doniczkowym doświadczeniu fitotronowym.

Odmiana pszenicy ozimej	Masa całych roślin (w mg i % kontroli)		Masa pędów (w mg i % kontroli)		Masa korzeni (w mg i % kontroli)		Pędy/korzenie (w jedn. bezwzgl. i % kontroli)	
	Wartość kontrolna	Wpływ <i>Bacillus</i>	Wartość kontrolna	Wpływ <i>Bacillus</i>	Wartość kontrolna	Wpływ <i>Bacillus</i>	Wartość kontrolna	Wpływ <i>Bacillus</i>
Kobra	2024,6 100 %	2210,7 109,2 %	1526,3 100 %	1669,7 109,4 %	498,4 100 %	541,0 108,6 %	3,06 100 %	3,19 100,8 %
Elena	1325,9 100 %	1360,9 102,6 %	1004,6 100 %	999,6 99,5 %	321,4 100 %	361,3 112,4 %	3,13 100 %	2,89 88,5 %
Maltanka	1640,5 100 %	1395,9 85,1 %	1271,0 100 %	1123,2 88,4 %	369,6 100 %	272,8 73,8 %	3,44 100 %	4,14 119,7 %

5.3.1.6. Wpływ bakterii *Bacillus mycoides* i grzyba *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*) na wzrost pszenicy ozimej odmiany Kobra i stopień porażenia roślin przez *Ggt* w 28-dniowym doświadczeniu szklarniowym na czarnej ziemi deluwialnej (Doświadczenie 6) przedstawiono w Tabelach 43 i 44.

Jak pokazuje Tabela 43 wprowadzenie zabitego inokulum *Ggt* do gleby obniżało istotnie (przy $P \geq 95\%$) dynamikę wschodów roślin (o 25%) i masę ich pędów (o 15%) i korzeni (o 28%). Wprowadzenie żywego inokulum tego grzyba pogłębiło ten niekorzystny wpływ (Tabela 43). Dynamika wschodów roślin obniżyła się (w porównaniu do kontroli bez dodatku żywego lub martwego *Ggt*) o 29%, a masy pędów i korzeni spadły odpowiednio o 38% i 44%. Inną konsekwencją wprowadzenia martwego lub żywego *Ggt* był również wzrost wartości P/K (o 8-10%).

Szczepienie bakteriami nasion pszenicy ozimej wysiewanych do gleby skażonej żywym inokulum *Ggt* nie spowodowało istotnych statystycznie zmian wartości dynamiki

wschodów roślin (70-112%) ani masy ich pędów (88-111%) czy korzeni (81-114%) w porównaniu do serii z samym żywym *Ggt* (100%) (Tabela 43).

Tabela 43.

Wpływ bakterii *Bacillus mycoides* i grzyba *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*
na wzrost pszenicy ozimej odmiany Kobra
w 28-dniowym doświadczeniu szklarniowym na czarnej ziemi deluwialnej

Seria doświadczalna	Dynamika wschodów (7-14 dni) (w jedn. bezwzgl. i % kontroli)	Masa całych roślin (w mg i % kontroli)	Masa pędów (w mg i % kontroli)	Masa korzeni (w mg i % kontroli)	Pędy/korzenie (w jedn. bezwzgl. i % kontroli)
Kontrola	58,8 100% a	436,0 mg 100% a	349,6 mg 100% a	86,4 mg 100% a	4,05 100%
Zabity <i>Ggt</i>	75,2% b	82,4% b	85,0% b	72,0% b	118,0%
<i>Ggt</i>	71,1% b	60,5% c	61,6% c	55,8% b	110,5%
JC192 + <i>Ggt</i>	63,4% b	67,5% c	68,6% c	63,4% b	108,1%
K184 + <i>Ggt</i>	59,5% b	55,6% c	54,4% c	60,3% b	90,3%
JC177 + <i>Ggt</i>	51,0% b	57,6% c	60,7% c	45,1% b	134,4%

a, b, c - wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy $P \geq 95\%$.

Jak pokazuje Tabela 44 w serii kontrolnej nie stwierdzono porażenia korzeni pszenicy, ani żadnych objawów chorobowych (żółknięcie, brązowienie czy zasychanie liści) na częściach nadziemnych. Nie stwierdzono też objawów chorobowych na liściach w serii z zabitym *Ggt*, jedynie niewielkie 5% porażenie korzeni, niekoniecznie spowodowane przez *Ggt* (Tabela 44). Żywy *Ggt*, przyczynił się do 70% porażenia korzeni roślin i do powstania objawów chorobowych u 11-35% (w zależności od terminu obserwacji) roślin (Tabela 44). Szczepienie nasion pszenicy ozimej bakteriami *B. mycoides* obniżyło zarówno porażenie korzeni do 29-52% (w zależności od szczepu bakterii) jak i powstawanie objawów chorobowych na częściach nadziemnych do 3-32% (Tabela 44). Różnice te (pomiędzy serią zakażoną żywym *Ggt*, ale nie szczepioną bakteriami *B. mycoides* a seriami doświadczalnymi z żywym *Ggt* i bakteriami, wprowadzanymi na ziarnie pszenicy) były istotne statystycznie przy $P \geq 95\%$ z wyjątkiem objawów na częściach nadziemnych w serii z K184 (Tabela 44).

Ujemne oddziaływanie zabitego inokulum *Ggt* mogło być spowodowane zarówno oddziaływaniem substancji typu toksyn lub hormonów wzrostu roślin, produkowanych przez *Ggt* na nasionach owsa, lub/oraz stymulacją rozwoju (jako źródło pokarmu) szkodliwie oddziałujących mikroorganizmów – obserwowano niewielkie porażenie korzeni. Podobne zjawisko hamowania wzrostu roślin przez zabite inokulum *B. mycoides* JC192 obserwowano w Doświadczeniu 3 – Tabela 38).

Tabela 44.

Wpływ bakterii *Bacillus mycoides* na porażenie pszenicy ozimej przez *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

Seria doświadczalna	% korzeni porażonych po 28 dniach	% roślin z objawami chorobowymi na częściach nadziemnych		
		po 21 dniach	po 25 dniach	po 28 dniach
Kontrola	0 a	0 a	0 a	0 a
Zabity <i>Ggt</i>	5,1 a	0 a	0 a	0 a
<i>Ggt</i>	70,3 d	11,3 c	21,1 c	35,1 c
JC192 + <i>Ggt</i>	51,9 c	3,3 ab	7,5 ab	18,2 b
K184 + <i>Ggt</i>	39,1 bc	8,1 bc	16,2 bc	32,1 c
JC177 + <i>Ggt</i>	28,6 b	8,3 bc	8,3 b	15,0 b

a, b, c, d - wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy $P \geq 95\%$.

5.3.2. Doświadczenia poletkowe

Tabela 45.

Wpływ szczepienia nasion pszenicy ozimej (odm. Almari) bakteriami *B. mycoides* szczep JC192 na jej plon w doświadczeniach mikro- (0,07 m²) i minipoletkowych (1 m²) na glebie brunatnej, wytworzonej z piasku gliniastego mocnego, skażonej *Fusarium culmorum* lub *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

Seria doświadczalna	Liczba kłosów	Masa kłosów	Masa jedn. kłosa	Masa słomy	Masa części nadziemnych	Masa ziarna
Doświadczenie 1 - gleba skażona <i>Fusarium culmorum</i> (6 miesięcy przed siewem)						
Kontrola	32,5 100%	58,3 g 100%	1,79 g 100%	31,7 g 100%	90,0 g 100%	47,8 g 100%
JC192	29,3 90,0%	57,5 g 98,7%	1,97 g 110,2%*	32,3 g 101,6%	89,8 g 99,7%	47,6 g 99,6%
K184	34,8 106,9%	55,5 g 95,3%	1,63 g 90,9%	29,3 g 92,1%	84,8 g 94,2%	46,0 g 96,3%
<i>Fusarium culmorum</i>	34,25 105,4%	58,0 g 99,6%	1,69 g 94,3%	30,5 g 96,1%	88,5 g 98,3%	47,7 g 99,8%
<i>F. culmorum</i> + JC192	21,5 66,2%**	63,0 g 108,2%	2,96 g 165,1%***	42,3 g 133,1%*	105,3 g 116,9%*	50,4 g 105,4%
<i>F. culmorum</i> + K184	33,8 103,8%	56,8 g 97,4%	1,69 g 94,5%	37,8 g 118,9%*	94,5 g 105,0%	46,5 g 97,3%
Doświadczenie 2 - gleba naturalnie skażona <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>						
Kontrola	339,0 100%	622,75 g 100%	1,84 g 100%	336,0 g 100%	958,8 g 100%	549,75 g 100%
JC192	322,7 95,4%	576,3 g 92,5%	1,79 g 97,3%	321,7 g 95,7%	898,0 g 93,7%	572,2 g 95,9%

5.3.2.1. Doświadczenie mikropoletkowe (0,07 m²) na glebie brunatnej, wytworzonej z piasku gliniastego mocnego, skażonej *Fusarium culmorum* (Doświadczenie 7). Dane przedstawione są w Tabeli 45. Skażenie gleby *F. culmorum* bez szczepienia nasion bakteriami *B. mycoides*, podobnie jak szczepienie nasion bakteriami w glebie nieskażonej *F. culmorum* nie spowodowało żadnych wyraźnych zmian w masie pszenicy ozimej (odm. Almari). Jedynie szczep JC192 nieznacznie obniżył liczbę kłosów, co uwidoczniło się niewielkim, 10% wzrostem masy jednego kłosa (zmiana istotna statystycznie przy $P = 90\%$). Dopiero połączenie *F. culmorum* i *B. mycoides* JC192 przyczyniło się do wyraźniejszych zmian (spadek liczby kłosów o 34%, istotny statystycznie przy $P \geq 95\%$; wzrost masy jednego kłosa o 65%, istotny przy $P \geq 99\%$ i wzrost masy słomy o 33% i masy części nadziemnych o 17%, istotnych przy $P = 90\%$). Łączne działanie *F. culmorum* i *B. mycoides* K184 spowodowało

wzrost masy słomy roślin o 19%, istotny przy $P = 90\%$. Być może spowodowane to było synergistycznym działaniem substancji typu hormonów wzrostu roślin, produkowanych przez bakterie i grzyba. Podobny wzrost biomasy roślin, przewyższający wartości serii kontrolnej, niczym nie szczepionej, obserwowano w przypadku szczepu JC192 w doświadczeniu doniczkowym nr 2 (Tabela 35). W żadnej serii doświadczalnej nie stwierdzono istotnych różnic (w porównaniu do kontroli bez *F. culmorum* i *B. mycooides*) w masie ziarna (Tabela 45).

Tabela 46.

Wpływ szczepienia nasion pszenicy bakteriami *B. mycooides* szczep JC192 na jej plon w doświadczeniach minipoletkowych ($1,8 \text{ m}^2$) na madzie średniej

Seria doświadczalna	Liczba kłosów	Masa części nadziemnych	Masa słomy	Masa ziarna
Odmiana ozima Almari				
Kontrola	483,0 (100%)	2100,0 g (100%)	1354,2 g (100%)	745,8g (100%)
<i>B. mycooides</i> JC192	623,2 (129,0%)	2620,0 g (124,8%)	1698,2 g (125,4%)	921,8g (123,6%)*
Odmiana jara Igna				
Kontrola	541,2 (100%)	1000,6 g (100%)	424,1 g (100%)	411,6 g (100%)
<i>B. mycooides</i> JC192	516,6 (95,5%)	988,8 g (98,8%)	422,1 g (99,5%)	405,6 g (98,5%)
Odmiana jara Sigma				
Kontrola	488,6 (100%)	985,6 g (100%)	490,2 g (100%)	319,3 g (100%)
<i>B. mycooides</i> JC192	497,4 (101,8 %)	990,6 g (100,5 %)	491,2g (100,2 %)	310,1 g (97,1 %)

5.3.2.2. Doświadczenie minipoletkowe (1 m^2) na glebie brunatnej, wytworzonej na piasku gliniastym mocnym, naturalnie skażonej *Ggt* (Doświadczenie 8). Jak przedstawia Tabela 45, szczepienie nasion szczepem *B. mycooides* JC192 przyczyniło się do niewielkich, kilku procentowych spadków wszystkich badanych parametrów wzrostu i plonowania pszenicy ozimej (odm. Almari). Zmiany te nie zostały udowodnione statystycznie.

5.3.2.3. Doświadczenia minipoletkowe (1,8 m²) na madzie średniej (Doświadczenia 9).

Dane zamieszczono w Tabeli 46. Szczepienie nasion szczepem *B. mycoides* JC192 przyczyniło się do dwudziestu kilku procentowych wzrostów liczby kłosów i masy części nadziemnych i ziarna pszenicy ozimej (odm. Almari). Jedynie wzrost masy ziarna był istotny statystycznie przy $P = 90\%$. W przypadku obu odmian jarych (Igny i Sigmy) nie stwierdzono zmian badanych parametrów (Tabela 46).

Duża zmienność wyników przeprowadzonych doświadczeń poletkowych potwierdza opisywany w „Przeglądzie Literatury” problem braku powtarzalności wyników w warunkach polowych (Kurek i Kobus, 1990; Pietr, 1990; Wenhua i Hetong, 1997; Wong, 1994).

5.4. CZĘŚĆ IV. PRZEŻYWALNOŚĆ BAKTERII W NIESTERYLNEJ GLEBIE I KOLONIZACJA RYZOSFERY PSZENICY OZIMEJ PRZEZ BAKTERIE WPROWADZANE NA JEJ ZIARNO

5.4.1. Przeżywalność w niesterylnej glebie bakterii *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus mycoides*.

Dane przedstawiono w Tabeli 47. W ciągu 4 tygodni inkubacji, liczebność w glebie bakterii *Pseudomonas fluorescens*, w zależności od szczepu, zmalała 25 000- lub 112 000-krotnie, natomiast liczebność *Bacillus mycoides* JC192 utrzymywała się na poziomie wyjściowym, a liczebność K184 zmalała zaledwie 6-krotnie.

Również badania Heijnera i in. (1993), Devlieghera i in. (1995) oraz Paszkowskiego (1993) pokazują znaczne spadki liczebności *P. fluorescens* w glebach niesterylnych. Z kolei badania Westa i in. (1985) potwierdzają nasze dane, że bakterie z rodzaju *Bacillus* doskonale przeżywają w glebie.

5.4.2. Kolonizacja ryzosfery pszenicy ozimej (odm. Gama) przez bakterie *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus mycoides* wprowadzone na ziarno siewne.

Pomimo mniejszej wyjściowej liczebności jednostek propagacyjnych bakterii *B. mycoides*, szczepy *P. fluorescens* i *B. mycoides* kolonizowały zarówno glebę przykorzeniową jak i korzeń pszenicy ozimej w zbliżonym do siebie stopniu (10^2 - 10^4 jtk (jednostek tworzących kolonie) na 1 g suchej masy gleby czy korzenia), a po 4 tygodniach zaznaczyła się niewielka przewaga *B. mycoides* w kolonizacji korzenia (Tabela 47).

Także Juhnke i in. (1987) wykazali, że po 30-40 dniach od siewu, bakterie *B. subtilis* i *B. pumilus* kolonizowały korzenie pszenicy w podobnym stopniu (10^3 - 10^5 jtk g⁻¹) jak bakterie Gram (-), m.in. *Pseudomonas fluorescens*. Bardzo zbliżone do naszych dane uzyskali także Maplestone i Campbell (1989), którzy badali kolonizację ryzosfery pszenicy przez szczep *B. mycoides*, wyizolowany z gleby tłumiącej zgorzel podstawy źdźbła. W badaniach swych unikali pionowego przepływu wody. Pomimo, że bakterie *B. mycoides* nie mają zdolności ruchu, Maplestone i Campbell (1989) stwierdzili, że w czasie 20-48 dni od siewu bakterie te występowały na 1 g s.m. korzeni z przylegającą do nich glebą w liczebności od 10^6 jtk w przypadku korzeni położonych w odległości 0-8 cm od nasienia (na którym te bakterie były wprowadzone) do 10^2 - 10^4 jtk na korzeniach w odległości 32-40 cm od nasienia. Również Paszkowski (1993) uzyskał podobne do naszych wyniki w kolonizacji korzeni owsa (10^2 - 10^4

jtk g⁻¹ s.m. korzeni) przez szczep *P. fluorescens* po 28 dniach wzrostu roślin. Z kolei Kurek i Jaroszuk (1994b) stwierdziły na 1 g korzeni żyta (po miesiącu) znacznie wyższe (10⁷-10⁸ jtk) liczebności fluoryzujących *Pseudomonas*, a De Leij i in. (1995) informują, że genetycznie zmieniony *P. fluorescens* na korzeniach pszenicy występował w liczebności ok. 10⁶ jtk g⁻¹ korzeni przez cały okres wegetacyjny.

Tabela 47.
Przeżywalność bakterii *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus mycoides* w niesterylnej glebie i kolonizacja ryzosfery pszenicy ozimej przez bakterie wprowadzane na jej ziarno.

Symbol szczepu	Czas inkubacji w tygodniach		
	0	2	4
Przeżywalność w glebie bez roślin			
<i>P. fluoresc.</i> III107β4	1,9 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁵	1,7 x 10 ³
<i>P. fluorescens</i> II21y4	4,0 x 10 ⁸	1,9 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁴
<i>B. mycoides</i> JC192	3,8 x 10 ⁶	5,6 x 10 ⁶	3,8 x 10 ⁶
<i>B. mycoides</i> K184	3,8 x 10 ³	6,4 x 10 ³	6,5 x 10 ²
Kolonizacja gleby przykorzeniowej (na 1 g suchej masy gleby)			
<i>P. fluoresc.</i> III107β4	2,0 x 10 ⁹ *	8,4 x 10 ³	4,4 x 10 ²
<i>P. fluorescens</i> II21y4	1,0 x 10 ⁹ *	6,2 x 10 ⁴	4,3 x 10 ⁴
<i>B. mycoides</i> JC192	1,0 x 10 ⁷ *	2,5 x 10 ⁴	4,8 x 10 ⁴
<i>B. mycoides</i> K184	5,0 x 10 ⁴ *	2,1 x 10 ³	5,0 x 10 ²
Kolonizacja korzenia (na 1 g suchej masy korzenia)			
<i>P. fluoresc.</i> III107β4	2,0 x 10 ⁹ *	1,8 x 10 ³	3,1 x 10 ²
<i>P. fluorescens</i> II21y4	1,0 x 10 ⁹ *	2,8 x 10 ⁴	6,6 x 10 ²
<i>B. mycoides</i> JC192	1,0 x 10 ⁷ *	1,9 x 10 ⁴	2,3 x 10 ³
<i>B. mycoides</i> K184	5,0 x 10 ⁴ *	2,4 x 10 ³	2,8 x 10 ³

* - Liczebność bakterii wprowadzonych na 1 ziarno pszenicy ozimej.

Stosowanie bakterii z rodzaju *Bacillus* jako szczepionki, poprawiającej wzrost i zdrowotność roślin ma dużą szansę powodzenia, z powodu ich dużej zdolności do

przeżywania w niekorzystnych warunkach. Z badań Liu i Sinclaira (1992) wynika, że wprowadzony do ryzosfery soi szczep *B. megaterium* występował w glebie ryzosferowej w liczebności 10^4 - 10^6 jtk g^{-1} przez dwa kolejne sezony wegetacyjne, doskonale przeżywając okres zimowy. Dla porównania stwierdzono, że doskonale przeżywający w ryzosferze przez cały pierwszy okres wegetacyjny genetycznie zmieniony szczep *P. fluorescens*, w drugim roku (po okresie zimowym) występował na korzeniach pszenicy w liczebności 10-100 jtk g^{-1} (De Leij i in., 1995). Także Juhnke i in. (1987) wykazali, że chociaż po 30-40 dniach od siewu, bakterie *Bacillus* kolonizowały korzenie pszenicy w podobnym stopniu jak bakterie Gram (-), ale już po 80 dniach liczebność bakterii Gram (-) wyraźnie zmalała, natomiast liczebność bakterii *Bacillus* uległa tylko niewielkim zmianom. Warto również przytoczyć wyniki badań Halversona i in. (1993), którzy stwierdzili, że wprowadzone do ryzosfery bakterie *B. cereus* występowały na korzeniach soi w liczebności 10^2 - 10^6 jtk cm^{-1} korzeni przez cały okres wegetacyjny. Autorzy ci podkreślają, że chociaż udział tych bakterii w całej populacji heterotroficznych bakterii w ryzosferze był niewielki, oddziaływały one istotnie na wzrost liczby brodawek, chroniły przed patogenami i podnosiły plon roślin.

WAŻNIEJSZE WYNIKI I WNIOSKI

Na podstawie badań „Saprofityczna mikroflora ryzosfery pszenicy ozimej” można wysnuć następujące wnioski:

1. Ryzosfera pszenicy ozimej była zasiedlona zarówno przez bakterie jak i grzyby saprotroficzne. W porównaniu do grzybów, bakterie okazały się głównymi kolonizatorami korzeni roślin, szczególnie endoryzosfery.
2. W miarę starzenia się roślin obserwowano charakterystyczne zmiany w składzie zespołów bakteryjnych. W kolejnych, badanych fazach wzrostu roślin licznie przeważały następujące grupy bakterii: *Erwinia* + fluoryzujące *Pseudomonas* (faza 2. liścia) → fluoryzujące *Pseudomonas* (faza 4. liścia) → *Flavobacterium-Cytophaga* (faza kwitnienia) → Coryneform (faza pełnej dojrzałości). Te jakościowe zmiany składu zespołów bakteryjnych najszybciej przebiegały w ektoryzosferze, a najwolniej w endoryzosferze.
3. Wśród wyizolowanych bakterii, fluoryzujące *Pseudomonas* (szczególnie *P. fluorescens*) i *Erwinia carotovora* wykazały się największymi zdolnościami do kolonizacji powierzchni i (zwłaszcza) wnętrza korzeni pszenicy. Obie wymienione grupy bakterii wraz z bakteriami z rodzaju *Bacillus* (szczególnie szybko rosnących bakterii *B. mycoides*) wykazały się też największymi zdolnościami w zasiedlaniu bogatej w składniki pokarmowe pożywki mikrobiologicznej.
4. W zbiorowiskach grzybów saprotroficznych zasiedlających ektoryzosferę przeważały licznie *Penicillium* i *Trichoderma* oraz w mniejszym stopniu *Verticillium* i *Acremonium*, natomiast w ryzopłanie i ryzopłanie/endoryzosferze grzyby z rodzajów *Fusarium* i *Alternaria*. W miarę starzenia się roślin obserwowano w ryzopłanie i ryzopłanie/endoryzosferze wzrost udziału rodzajów typowych dla ektoryzosfery, a mianowicie *Penicillium*, *Trichoderma*, *Verticillium* i *Acremonium*. Duży udział grzybów *Fusarium* w zespołach grzybowych, pochodzących z ryzopłany/endoryzosfery, izolowanych zarówno z homogenatów jak i (zwłaszcza) z odcinków nieodkazywanych powierzchniowo korzeni pszenicy, świadczy o bardzo dużych zdolnościach tych grzybów do kolonizowania korzeni pszenicy.

5. Na tle wszystkich izolatów bakterii, najliczniejsze grupy bakterii charakteryzowały się następującymi badanymi cechami biochemicznymi:
 - Bakterie z rodzaju *Erwinia* wykazywały bardzo wysoką aktywność fosfataz, chitynaz i zdolność do rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ oraz dość wysokie zdolności do hamowania wzrostu *Fusarium culmorum* (*Fc*) na podłożu PDA oraz do hamowania wzrostu *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*) na obu stosowanych podłożach;
 - Fluoryzujące *Pseudomonas* wyróżniały się bardzo wysoką zdolnością do syntezy związków chelatujących Fe^{3+} , syntezy HCN i do rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ oraz stosunkowo dużą zdolnością do hamowania wzrostu patogenów (szczególnie *Ggt* na PDA);
 - Grupa *Flavobacterium-Cytophaga* charakteryzowała się stosunkowo wysoką aktywnością fosfatazy alkalicznej i chitynazy oraz dość wysokimi zdolnościami do hamowania wzrostu *Ggt* na obu stosowanych podłożach i do rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$;
 - Bakterie należące do rodzaju *Bacillus* charakteryzowały się: stosunkowo wysoką aktywnością chitynolityczną i celulolityczną oraz dość wysokimi zdolnościami do rozpuszczania $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, do hamowania wzrostu *Fc* na podłożu King B i syntezy związków kompleksujących Fe^{3+} ;
 - Grupa Coryneform charakteryzowała się dość wysokimi zdolnościami do hamowania wzrostu patogenów grzybowych na podłożu PDA oraz niewielkimi (na tle generalnie nieaktywnych szczepów) zdolnościami do rozkładu celulozy.
6. W przeciwieństwie do bakterii *Pseudomonas fluorescens*, szczepy *B. mycoides* (wyselekcjonowane na podstawie szybkiego wzrostu na podłożach agarowych) doskonale przeżywały w glebie niesterylnej przez okres 4 tygodni. Ponadto, bakterie *B. mycoides* kolonizowały glebę przykorzeniową i powierzchnię korzeni pszenicy ozimej w stopniu nie gorszym jak bakterie *P. fluorescens*.
7. Szczepienie nasion pszenicy ozimej bakteriami *B. mycoides* przyspieszało wschody roślin i zwiększało masę roślin w doświadczeniu doniczkowym na piasku sterylnym. Bakterie *B. mycoides* oddziaływały na wzrost pszenicy w sposób charakterystyczny dla związków o charakterze hormonów wzrostu. W tych oddziaływaniach wyróżniał się szczep JC192. W większości doświadczeń doniczkowych z glebami niesterylizowanymi, nie obserwowano tak wyraźnie dodatniego oddziaływania

szczepu *B. mycoides* JC192 na wzrost pszenicy ozimej jak w doświadczeniu na sterylnym piasku. Wpływ szczepienia zmieniał się w zależności od rodzaju gleby i odmiany pszenicy. W doświadczeniach poletkowych statystycznie udowodniony dodatni wpływ szczepu *B. mycoides* JC192 stwierdzono jedynie w jednym z trzech przeprowadzonych doświadczeń.

8. Szczepienie nasion pszenicy ozimej bakteriami *B. mycoides* chroniło jej siewki przed szkodliwym działaniem *Fusarium culmorum* (Fc) w szklarniowym doświadczeniu doniczkowym. Obserwowano przyspieszenie wschodów i wzrost zarówno masy pędów jak i korzeni. Najwyższymi zdolnościami ochronnymi wykazał się szczep JC192. W doświadczeniu poletkowym na glebie skażonej Fc, po wprowadzeniu szczepu JC192 na nasiona, obserwowano również zwiększenie masy słomy pszenicy. Masa ziarna pozostała jednak bez zmian.
9. Szczepienie nasion bakteriami *B. mycoides* zmniejszało liczbę porażonych korzeni i liczbę roślin pszenicy ozimej z objawami chorobowymi na częściach nadziemnych charakterystycznych dla *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt), w szklarniowym doświadczeniu doniczkowym na glebie skażonej tym patogenem, ale nie obniżało szkodliwego wpływu Ggt na dynamikę wschodów roślin i ich masę. W doświadczeniu poletkowym, na glebie naturalnie skażonej Ggt także nie obserwowano dodatniego ochronnego wpływu szczepu *B. mycoides* JC192 na plon słomy i ziarna pszenicy ozimej.
10. Na podstawie naszych badań - z których wynika, że szczep *Bacillus mycoides* JC 192 stosowany na nasiona pszenicy ozimej jako szczepionka, może przyspieszać wzrost siewek pszenicy, zwiększać masę roślin i chronić je przed *Fusarium culmorum* - można sądzić, że kierunek badań nad wpływem mikroorganizmów na wzrost i zdrowotność roślin powinien być kontynuowany z większą liczbą szczepów bakterii i z różnymi gatunkami i odmianami roślin.

LITERATURA

1. **Agnihotrudu V. (1955)** State in which fungi occur in the rhizosphere. *Naturwiss.* **H.18 (Jg. 42):** 515-516.
2. **Alabouvette C. (1995)** Biological control of fusarium wilts. (w) Environmental biotic factors in integrated plant disease control. M. Mańka (ed) European Foundation for plant Pathology, Poznań, 61-68.
3. **Alström S. (1987)** Influence of root-zone inhabiting bacteria on growth of plants and soil-borne fungal pathogens. Plant protection reports Dissertations. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. Szwecja.
4. **Alström S. (1990)** Deleterious rhizosphere bacteria in relation to plants and other microorganisms. (w) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria - Progress and Prospects.” : Proc. 2nd Int. Workshop on PGPR, Keel C., Koller B., Défago G. (eds.) Interlaken, Szwajcaria, 275-285.
5. **Angle J.S., Levin M.A., Gagliardi J.V., McIntosh M.S. (1995)** Validation of microcosms for examining the survival of *Pseudomonas aureofaciens* (*lacZY*) in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **61:** 2835-2839.
6. **Arshad M., Frankenberger W.T.Jr. (1991)** Microbial production of plant hormones. *Plant Soil* **133:** 1-8.
7. **Arshad M., Frankenberger W.T.Jr. (1998)** Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Adv. Agron.* **62:** 45-151.
8. **Azcón R., Barea J.M., Hayman D.S. (1976)** Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **8:** 135-138.
9. **Åström B. (1991)** Intra- and interspecific variation in plant response to inoculation with deleterious rhizosphere pseudomonads. *J. Phytopathol.* **131:** 184-192.
10. **Åström B., Gerhardson B. (1988)** Differential reactions of wheat and pea genotypes to root inoculation with growth-affecting rhizosphere bacteria. *Plant Soil* **109:** 263-269.
11. **Åström B., Gerhardson B. (1989)** Wheat cultivar reactions to deleterious rhizosphere bacteria under gnotobiotic conditions. *Plant Soil* **117:** 157-165.
12. **Åström B., Gustafsson A., Gerhardson B. (1993)** Characteristics of a plant deleterious rhizosphere pseudomonad and its inhibitory metabolite(s). *J. Appl. Bacteriol.* **74:** 20-28.
13. **Babu-Khan S., Yeo T.V., Martin W.L., Duron M.R., Rogers R.D., Goldstein A.H. (1995)** Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61:** 972-978.
14. **Bakker A.W., Schippers B. (1987)** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.* **19:** 451-457.
15. **Balasubramanian A., Rangaswami G. (1969)** Studies on the influence of foliar nutrient sprays on the root exudation pattern in four crop plants. *Plant Soil* **XXX:** 210-220.
16. **Bandurska H., Chelkowski J., Wiśniewska H. (1994)** Free proline accumulation in wheat seedlings influenced by *Fusarium culmorum* infection and the pathogen metabolite deoxynivalenol. *Acta Physiol. Plant.* **16:** 111-116.

17. **Barabasz W., Smyk B., Chmiel M.J., Voříšek K. (1998)** Zmęczenie gleby a skład mikroflory glebowej. (w) *Ekologiczne aspekty mikrobiologii gleby* A.R. Poznań s. 43-56.
18. **Barabasz W., Voříšek K. (2000)** Wpływ mineralnego nawożenia N na aktywność mikrobiologiczną gleb górskich ekosystemów trawiastych. (w) *mat. 35. Symp. Mikrobiol. "Drobnoustroje środowiska glebowego – aspekty fizjologiczne, biochemiczne, genetyczne."* Toruń – Bachotek, str. 2.
19. **Barber D.A. (1968)** Microorganisms and the inorganic nutrition of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **19**: 71-88.
20. **Barber D.A., Gunn K.B. (1974)** The effect of mechanical forces on the exudation of organic substances by the roots of cereal plants grown under sterile conditions. *New Phytol.* **73**: 39-45.
21. **Barber D.A., Martin J.K. (1976)** The release of organic substances by cereal roots into soil. *New Phytol.* **76**: 69-80.
22. **Barclay G.A., Crosse J.E. (1974)** Population of aerobic bacteria associated with the roots of apple and cherry plants. *J. Appl. Bact.* **37**: 475-486.
23. **Barea J.M. (1997)** Mycorrhiza / bacteria interactions on plant growth promotion. (w) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 150-158.
24. **Barnett S.J., Singleton I., Ryder M. (1999)** Spatial variation in populations of *Pseudomonas corrugata* 2140 and pseudomonads on take-all diseased and healthy root systems of wheat. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 633-636.
25. **Bashan Y., Holguin G. (1994)** Root-to-root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2120-2131.
26. **Beck S.M., Gilmour W. (1983)** Role of wheat root exudates in associative nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* **15**: 33-38.
27. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984-89)** Vol. 1 (1984) N. R. Krieg (ed); Vol. 2 (1986) P.H.A. Sneath (ed); Vol. 3 (1989); Vol. 4 (1989) S.T. Williams (ed) Williams & Wilkins 2648 stron.
28. **Boelens J., Woestyne M.V., Verstrack W. (1994)** Ecological importance of motility for the plant growth-promoting rhizopseudomonad strain ANP15. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 269-277.
29. **Bolton H., Elliott L.F., Gurusiddaiah S., Fredrickson J.K. (1989)** Characterization of a toxin produced by a rhizobacterial *Pseudomonas* sp. that inhibits wheat growth. *Plant Soil* **114**: 279-287.
30. **Bolton H., Elliott L.F.: (1989)** Toxin production by a rhizobacterial *Pseudomonas* sp. that inhibits wheat root growth. *Plant Soil* **114**: 269-278.
31. **Bowen G.D. (1969)** Nutrient status effect on loss of amides and amino acids from pine roots. *Plant Soil* **XXX**: 139-142.
32. **Bowen G.D., Rovira A.D. (1976)** Microbial colonization of plant roots. *Ann. Rev. Phytopathol.* **14**: 121-144.
33. **Bowen G.D., Rovira A.D. (1999)** The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* **66**: 1-102.
34. **Bowen G.D., Theodorou C. (1979)** Interaction between bacteria and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* **11**: 119-126.

35. **Bowers J.H., Parke J.L. (1993)** Colonization of pea (*Pisum sativum* L.) taproots by *Pseudomonas fluorescens*: effect of soil temperature and bacterial motility. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 1693-1701.
36. **Broadbent P., Baker K.F., Franks N., Holland J. (1977)** Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedlings in steamed and in nontreated soil. *Phytopathol.* **67**: 1027-1034.
37. **Broadbent P., Baker K.F., Waterworth Y. (1971)** Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Aust. J. Biol. Sci.* **24**: 925-944.
38. **Broek A.V., Vanderleyden J. (1995)** The role of bacterial motility, chemotaxis, and attachment in bacteria-plant interactions. *Molecul. Plant-Microbe Interact.* **8**: 800-810.
39. **Brown M.E. (1974)** Seed and root bacterization. *Ann. Rev. Phytopathol.* **12**: 181-197.
40. **Burns R.G., Alström S., Burton C.C., Dartnall A.M. (1989)** Cyanogenic microbes and phosphatase enzymes in the rhizosphere: properties and prospects for manipulation. (w) „Interrelationships between microorganisms and plants in soil” - V. Vančura and F. Kunc (eds.) - Praha, 191-199.
41. **Cacak-Pietrzak G., Ceglińska A., Haber T. (1999)** Polskie i europejskie standardy jakościowe dla podstawowych zbóż chlebowych. *Wież jutra* : 10-12.
42. **Carlile M.J., Watkinson S.C. (1995)** „The fungi”. Academic Press, 482 stron.
43. **Casida L.E.Jr. (1992)** Competitive ability and survival in soil of *Pseudomonas* strain 679-2, a dominant, nonobligate bacterial predator of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 32-37.
44. **Catlow H.Y., Glenn A.R., Dilworth M.J. (1990)** Does rhizobial motility affects its ability to colonize along the legume root? *Soil Biol. Biochem.* **22**: 573-575.
45. **Chernin L.S., De La Fuente L., Sobolev V., Haran S., Vorgias C.E., Oppenheim A.B., Chet I. (1997)** Molecular cloning, structural analysis, and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 834-839.
46. **Cherrington C.A., Elliott L.F.: (1987)** Incidence of inhibitory pseudomonads in the Pacific Northwest. *Plant Soil* **101**: 159-165.
47. **Chrzanowski J. (1976)** Mikoflora ryzosfery pszenicy (z badań polowych i *in vitro* - 1970-1974). *Hod. rośl. aklimat. nasien.* **20**: 19-45.
48. **Clays-Josserand A., Ghilione J.F., Philippot L., Lemanceau P., Lensi R. (1999)** Effect of soil type and plant species on the fluorescent pseudomonads nitrate dissimilating community. *Plant Soil* **209**: 275-282.
49. **Colbert S.F., Schroth M.N., Weinhold A.R., Henderson M. (1993)** Enhancement of population densities of *Pseudomonas putida* Pp67 in agricultural ecosystems by selective feeding with the carbon source salicylate. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2064-2070.
50. **Cook R.J. (1992)** Wheat root health management and environmental concern. *Canadian Journal of plant Pathology* **14**: 76-85.
51. **Cook R.J., Rovira A.J. (1976)** The role of bacteria in the biological control of *Gaeumannomyces graminis* by suppressive soils. *Soil Biol. Biochem.* **8**: 269-273.
52. **Curl E.A., Truelove B. (1986)** The rhizosphere. Springer-Verlag, 288 stron.
53. **Czaban J., Kobus J., Paszkowski W.L., Masiak D. (1997)** The importance of fluorescent pseudomonads as biological control agents in winter wheat rhizosphere. (w) *Trichoderma*

- spp., other microorganisms and plant extracts in plant diseases control. Orlikowski L.B., Skrzypczak Cz. (eds), Skierniewice, 68-73.
54. **Czaban J., Paszkowski W.L., Kobus J. (2000)** Zdolność ryzosferowych bakterii *Pseudomonas* do syntezy HCN, a ich oddziaływanie na wzrost pszenicy ozimej. (w) „Biochemiczne interakcje w oddziaływaniach środowiskowych”. Oleszek W. (ed) IUNG Puławy, 45-46.
 55. **Czaban J., Paszkowski W.L., Masiak D., Kobus J. (1997)** Związki pomiędzy występowaniem niektórych cech u fluoryzujących *Pseudomonas*. (w) „Drobnoustroje w środowisku. Występowanie, aktywność i znaczenie.” Barabasz W. (ed.). AR Kraków. 71-88.
 56. **Czembor H. (1999)** Kierunki hodowli zbóż w Polsce. *Wiś jutra* **6(11)**: 20-21.
 57. **Čatská V., Macura J., Vágnerová K. (1960)** Rhizosphere microflora of wheat. III. Fungal flora of wheat rhizosphere. *Folia Microbiol.* **5**: 320-330.
 58. **Davies K.G., Whitbread R. (1989)** Factors affecting the colonization of a root system by fluorescent pseudomonads: The effect of water, temperature and soil microflora. *Plant Soil* **116**: 247-256.
 59. **De Brito Alvarez M.A., Gagne S., Antoun H. (1995)** Effect of compost on rhizosphere microflora of the tomato and on incidence on plant growth promoting rhizobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 194-199.
 60. **de Freitas J.R., Banerjee M.R., Germida J.J. (1997)** Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soils.* **24**: 358-364.
 61. **De Leij F.A.A.M., Lynch J.M. (1997)** Functional diversity of the rhizosphere. (w) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 38-43.
 62. **De Leij F.A.A.M., Sutton E.J., Whipps J.M., Fenlon J.S., Lynch J.M. (1995)** Field release of a genetically modified *Pseudomonas fluorescens* on wheat: Establishment, survival and dissemination. *Bio/Technology* **13**: 1488-1492.
 63. **De Leij F.A.A.M., Sutton E.J., Whipps J.M., Fenlon J.S., Lynch J.M. (1993)** Impact of field release of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* on indigenous microbial populations of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3443-3453.
 64. **De Leij F.A.A.M., Whipps J.M., Lynch J.M. (1993)** The use of colony development for the characterization of bacterial communities in soil and on roots. *Microb. Ecol.* **27**: 81-97.
 65. **Deryło M., Skorupska A. (1993)** Enhancement of symbiotic nitrogen fixation by vitamin-secreting fluorescent *Pseudomonas*. *Plant Soil* **154**: 211-217.
 66. **Devliegher W., Arif M.A.S., Verstraete W. (1995)** Survival and plant growth promotion of detwrgent-adapted *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3865-3871.
 67. **Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Broek A.V., Vanderleyden J. (1999)** Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* **212**: 155-164.
 68. **Domey S., Lippmann G. (1989)** Stimulation of plant growth by phosphate solubilizing bacteria. (w) „Interrelationships between microorganisms and plants in soil” - V. Vančura and F. Kunc (eds.) - Praha 1989, 457-461.

69. **Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. (1980)** *Compendium of soil fungi* - Academic Press, Vol. 1 - 859 stron, Vol. 2 - 405 stron.
70. **Domsch K.H., Gams W., Weber E. (1967)** Der Einfluss verschiedener Vorfrüchte auf das Bodenpilzspektrum in Weizenfeldern. *Z. Pflanzenerähr. Bodenk.* **119**: 134-149.
71. **Dubeikovskiy A. N., Mordukhova E. A., Kochetkov V. V., Polikarpova F. Y., Boronin A. M. (1993)** Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain *Pseudomonas fluorescens* BSP53a synthesizing an increased amount of indole-3-acetic acid. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 1277-1281.
72. **Duff, R.B., Webley D.M., Scott R.O. (1963)** Solubilization of minerals and related materials by 2-ketogluconic acid-producing bacteria. *Soil Sci.* **95**: 195-114.
73. **Duffy B.K., Simon A., Weller D.M. (1996)** Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. *Phytopathology* **86**: 188-194.
74. **Duiff B.J., Alabouvette C., Lemanceau P. (1997)** Involvement of pseudobactin 358 in the inhibition of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* in flax rhizosphere by the combination of *Pseudomonas putida* WCS358 and non pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. (w) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 379.
75. **Duineveld B.M., Van Veen J.A. (1999)** The number of bacteria in the rhizosphere during plant development: relating colony-forming units to different reference units. *Biol. Fertil. Soils* **28**: 285-291.
76. **Elliott L. F., Lynch J.M. (1984)** Pseudomonads as a factor in the growth of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Soil Biol. Biochem.* **16**: 69-71.
77. **Emnova E.E. i in. (Емнова Е.Е., Меренюк Г.В., Сланина В.А., Татару Ю.М., Руснак Т.М.) (1995)** Видовой состав сапротрофных флуоресцирующих псевдомонад в ризоплане различных видов сельскохозяйственных растений. *Микробиология* **64**: 820-826.
78. **England L.S., Lee H., Trevors J.T. (1993)** Bacterial survival in soil: effects of clays and protozoa. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 525-531.
79. **Eriksen J., Murphy M.D., Schnug E. (1998)** The soil sulphur cycle. (w) Sulphur in Agroecosystems, Ewald Schnug (ed.), Kluwer Academic Publishers, pp 39-73.
80. **Fabijańska M., Siedlecki J. (1999)** Wartość pokarmowa zbóż w żywieniu zwierząt. *Wies jutra* **6**: 17-19.
81. **Farrand S.K., Wilson M., Lindow S.E., Savka M.A. (1994)** (w) „Improving plant productivity with rhizosphere bacteria” M. H. Ryder, P.M. Stephens and G. D. Bowen (eds.) CSIRO Glen Osmond, S.A., Australia, 233-237.
82. **Fischer W. R., Flessa H., Schaller G. (1988)** pH values and redox potentials in microsites of the rhizosphere. *Z. Pflanzenerähr. Bodenk.* **152**: 191-195.
83. **Foster R. C. i Rovira A. D. (1976)** Ultrastructure of wheat rhizosphere. *New Phytol.* **76**: 343-352.
84. **Fravel D.R. (1988)** Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* **26**: 75-91.
85. **Fredrickson J.K., Elliott L.F. (1985)** Effects of winter wheat seedling growth by toxic-producing rhizobacteria. *Plant Soil* **83**: 399-409.

86. **Frey P., Frey-Klett P., Garbaye J., Berge O., Heulin T. (1997)** Metabolic and genotypic fingerprint of fluorescent pseudomonads associated with the Douglas fir-*Laccaria bicolor* mycorrhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1852-1860.
87. **Fridlender M., Inbar J., Chet I. (1993)** Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 1211-1221.
88. **Fukui R., Schroth M.N., Hendson M. Hancock J.G. (1994)** Interaction between strains of pseudomonads in sugar beet spermospheres and their relationship to pericarp colonization by *Pythium ultimum* in soil. *Phytopathol.* **84**: 1322-1330.
89. **Gadgil P.D. (1965)** Distribution of fungi on living roots of certain *Graminae* and the effect of root decomposition on soil structure. *Plant Soil* **XXII**: 239-259.
90. **Gams W. (1967)** Mikroorganismen in der Wurzelregion von Weizen. Paul Parey (ed) Berlin, 77 stron.
91. **Gantotti B. V., Rangaswami G. (1971)** Improvement in the physical properties of soil under the influence of the rhizosphere microflora of four different plant species. *Plant Soil* **35**: 347-356.
92. **Gardner J.M., Feldman A.W., Zablotowicz R.M. (1982)** Identity and behaviour of xylem residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1335-1342.
93. **Germida J.J., Siciliano S.D., de Freitas J.R., Seib A.M. (1997)** Diversity of rhizosphere bacteria associated with field grown canola (*Brassica napus* L.). (in) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 177-179.
94. **Gitte R. R., Rai P. V., Patil R. B. (1978)** Chemotaxis of *Rhizobium* sp. towards root exudate of *Cicer arietinum* L. *Plant Soil* **50**: 553-566.
95. **Glandorf D. C. M., Peters L. G. L., van der Sluis I., Bakker P. A. H. M., Schippers B. (1993)** Crop specificity of rhizosphere pseudomonads and the involvement of root agglutinins. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 981-989.
96. **Glick B.R. (1995)** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**: 109-117.
97. **Gochnauer M.B., McCully M.E., Labbé H. (1989)** Different populations of bacteria associated with sheathed and bare regions of roots of field-grown maize. *Plant Soil* **114**: 107-120.
98. **Gomolyako M.I. (Гомоляко М.І.) (1957)** Вплив на ріст ярої пшениці грибів з її ризосфери. *Микробиологічний Журнал Академії Наук Української РСР* **XIX(4)**: 8-15.
99. **Gooday G.W. (1990)** The ecology of chitin degradation. *Adv. Microb. Ecol.* **11**: 387-430.
100. **Gransee A., Wittenmayer L. (2000)** Qualitative and quantitative analysis of water soluble root exudates in relation to plant species and development. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **163**: 381-385.
101. **Grayston S.J., Wang S., Campbell C.D., Edwards A.C. (1998)** Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 369-378.
102. **Guggenberger G., Elliott E.T., Frey S.D., Six J., Paustian K. (1999)** Microbial contributions to the aggregation of a cultivated grassland soil amended with starch. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 407-419.

103. **Gunner H.B., Zuckerman B.M., Walker R.W., Miller C.W., Deubert K.H., Lonley R.E. (1966)** The distribution and persistence of Diazonin applied to plant and soil and its influence on rhizosphere and soil microflora. *Plant Soil* **25**: 249-264.
104. **Haansuu P., Elo S., Maunuksela L., Sarmia N., Vuorela P., Haaktela K. (1998)** Antagonistic soil and rhizosphere bacteria as potential agents for biological control of plant diseases. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* **63**: 1679-1684.
105. **Halabuda T.W. (Халабуда Т.В.) (1958a)** Основні підсумки досліджень мікофлори ризосфери озимой пшениці на півдні УРСР. *Мікробіологічний Журнал Академії Наук Української РСР* **XX(2)**: 11-24.
106. **Halabuda T.W. (Халабуда Т.В.) (1958b)** Гриби найбільш поширені в мікофлорі ризосфери озимой пшениці на півдні УРСР. *Мікробіологічний Журнал Академії Наук Української РСР* **XX(3)**: 10-16.
107. **Hale M. G., Moore L. D. (1979)** Factors affecting root exudation II: 1970-1978. *Adv. Agron.* **31**: 93-124.
108. **Hallmann J., Rodríguez Kábana R., Kloepper J.W. (1999)** Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 551-560.
109. **Halverson L.J., Clayton M.K., Handelsman J. (1993)** Population biology of *Bacillus cereus* UW85 in the rhizosphere of field-grown soybeans. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 485-493.
110. **Halverson L.J., Handelsman J. (1991)** Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2767-2770.
111. **Harrigan W.F. i McCance M.E. (1966)** "Laboratory Methods in Microbiology" - Academic Press, London & New York. 362 strongy.
112. **Hebbar K.P., Gueniot B., Colin-Morel P. Heulin T., Balandreau J., Rinaudo M. (1992)** Characterization of exopolysaccharides produced by Rhizobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 248-253.
113. **Heijnen C.E., Van Veen J.A. (1991)** A determination of protective microhabitats for bacteria introduced into soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**: 73-80.
114. **Heijnen C.E., Hok-A-Hin C.H., Van Veen J.A. (1992)** Improvements to the use of bentonite clay as a protective agent, increasing survival levels of bacteria introduced into soil. *Soil Biol. Biochem.* **24**: 533-538.
115. **Heijnen C.E., Hok-A-Hin C.H., Van Elsas J.D. (1993)** Root colonization by *Pseudomonas fluorescens* introduced into soil amended with bentonite. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 239-246.
116. **Holl F.B., Chanway C.P., Turkington R., Radley R.A. (1988)** Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol Biochem.* **20**: 19-24.
117. **Howie W.J., Cook R.J., Weller D.M. (1987)** Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. *Phytopathology* **77**: 286-292.
118. **Howie W.J., Echandi E. (1983)** Rhizobacteria: influence of cultivar and soil type on plant growth and yield of potato. *Soil Biol. Biochem.* **15**: 127-132.

119. **Hozore E., Alexander M. (1991)** Bacterial characteristics important to rhizosphere competence. *Soil Biol. Biochem.* **23**: 717-723.
120. **Jalali B.L. (1976)** Biochemical nature of root exudates in relation to root rot of wheat - III. Carbohydrate shifts in response to foliar treatment. *Soil Biol. Biochem.* **8**: 127-129.
121. **Jetiyanon K., Tuzun S., Kloepper J.W. (1997)** Lignification, peroxidase and superoxidase dismutases as early plant defense reactions associated with PGPR- mediated induced systemic resistance. (in) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 265-268.
122. **Joergensen R.G. (2000)** Ergosterol and microbial biomass in the rhizosphere of grassland soils. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 647-652.
123. **Jones K., Bangs D. (1985)** Nitrogen fixation by free-living heterotrophic bacteria in an oak forest: the effect of liming. *Soil Biol. Biochem.* **17**: 705-709.
124. **Juhnke M.E., Mathre D.E., Sands D.C. (1987)** Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2793-2799.
125. **Jurkevitch E., Hadar Y., Chen Y. (1992)** Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rhizosphere bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 119-124.
126. **Kampert M., Strzelczyk E. (1984)** Effect of pH on production of cytokinin-like substances by bacteria isolated from soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.). *Acta Microbiol. Pol.* **33**: 77-85.
127. **Kapulnik Y., Okon Y., Henis Y. (1985)** Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* **31**: 881-887.
128. **Katz E., Demain A.L. (1977)** The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* **41**: 449-474.
129. **Keel C., Koller B., Défago G. (eds.) (1990)** „Plant Growth- Promoting Rhizobacteria - Progress and Prospects”: Proc. 2nd Int. Workshop on PGPR, IUBS, Interlaken, Szwajcaria. 418 stron.
130. **Keith H., Oades J.M., Martin J.K. (1986)** Input of carbon to soil from wheat plants. *Soil Biol. Biochem.* **18**: 445-449.
131. **Kennedy A. C., Elliott L. F., Young F. L., Douglas C. L. (1991)** Rhizobacteria suppressive to the weed downy brome. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **55**: 722-727.
132. **Kim K.Y., Jordan D., McDonald G.A. (1998)** *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: Effect of carbon sources. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 995-1003.
133. **Kipe-Nolt J.A., Avalakki U.K., Dart P.J. (1985)** Root exudation of sorghum and utilization of exudates by nitrogen-fixing bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **17**: 859-863.
134. **Kloepper J.W., Bowen K. (1991)** Quantification of the geocarposphere and rhizosphere effect of peanut (*Arachis hypogea* L.) *Plant Soil* **136**: 103-109.
135. **Kloepper J.W., Lifshitz R., Schroth M.N. (1988)** *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *ISI Atlas of Science: Animal and Plant Sciences* **1**: 60-64.
136. **Kloepper J.W., Rodríguez-Kábana R., McInroy J.A., Collins D.J. (1991)** Analysis of populations and physiological characterization of microorganisms in rhizospheres of plants with antagonistic properties to phytopathogenic nematodes. *Plant Soil* **136**: 95-102.

137. **Kloepper J.W., Schippers B., Bakker P.A.H.M. (1992)** Proposed elimination of the term *endorhizosphere*. *Phytopathology* **82**: 726-727.
138. **Kloepper J.W., Tuzun S., Kuć J. (1992)** Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol.* **2**: 349-351.
139. **Kluepfel D.A. (1993)** The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**: 441-472.
140. **Knowles C.J. (1976)** Microorganisms and cyanide. *Bacteriol. Rev.* **40**: 652-680.
141. **Kobus J. (1980)** Zawartość i przemiany siarki w glebie. (w) „Siarka w biosferze.” PWRiL, Warszawa, 47-81.
142. **Kobus J. (1999)** Interaction between soil, plant, and microorganisms. *Roczn. Glebozn. L.* **89**: 110.
143. **Kobus J., Książniak A. (1997)** Mikoryza wezikularno-arbuskularna roślin zielnych. *Post. Nauk Roln.* **5**: 73-90.
144. **Korber D.R., Lawrence J.R., Caldwell D.E. (1994)** Effect of motility on surface colonization and reproductive success of *Pseudomonas fluorescens* in dual-dilution continuous culture and batch culture systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1421-1429.
145. **Kozdrój J. (1996a)** Problemy związane z wprowadzeniem mikroorganizmów genetycznie zmodyfikowanych do gleby. *Post. Mikrobiol.* **XXXV**: 45-66.
146. **Kozdrój J. (1996b)** Przenoszenie bakteryjnych genów w środowisku. *Post. Mikrobiol.* **XXXV**: 157-175.
147. **Kozdrój J. (1997)** Ocena ryzyka ekologicznego związanego z wprowadzaniem mikroorganizmów genetycznie zmodyfikowanych do gleby. *Post. Mikrobiol.* **XXXVI**: 339-351.
148. **Kozłowska M. (1992)** Aktualne kierunki badań nad mechanizmami reakcji obronnych roślin względem patogenów. (w) „Nowe kierunki badań nad ochroną roślin przed chorobami powodowanymi przez wirusy i inne czynniki chorobotwórcze” Polskie Towarzystwo Fitopatologiczne. Poznań, 30-34.
149. **Krafczyk I., Trollenier G., Beringer H. (1984)** Soluble root exudates of maize: Influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **16**: 315-322.
150. **Kremer R.J., Begonia M.F.T., Stanley L., Lanham E.T. (1990)** Characterization of rhizobacteria associated with weed seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1649-1655.
151. **Kreutzer W.A. (1972)** *Fusarium* spp. as colonists and potential pathogens in root zones of grassland plants. *Phytopathology* **62**: 1066-1070.
152. **Król M., Kobus J. (1992)** Utlenianie siarki elementarnej i organicznej (z cysteiny) przez drobnoustroje ryzosfery jęczmienia. *Pam. Puł.* **101**: 109-122.
153. **Książniak A., Kobus J. (1993)** Udział drobnoustrojów ryzosfery pszenicy, jęczmienia i owsa w produkcji sideroforów. *Pam. Puł.* **102**: 77-89.
154. **Kucey R.M.N. (1988)** Alteration of size of wheat root systems and nitrogen fixation by associative nitrogen-fixing bacteria measured under field conditions. *Can. J. Microbiol.* **34**: 735-739.
155. **Kucey R.M.N. (1988)** Effect of *Penicillium bilaji* on solubility and uptake of P. and micronutrients from soil by wheat. *Can. J. Soil Sci.* **68**: 261-270.

156. **Kucey R.M.N., Janzen H.H., Leggett M.E. (1989)** Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv. Agron.* **42**: 199-228.
157. **Kunicki-Goldfinger W.J.H. (1994)** „Życie bakterii.” PWN, 587 stron.
158. **Kurek E., Jaroszuk J. (1993)** Siderofory i ich rola w środowisku glebowym. *Post. Mikrobiol.* **XXXII**: 71-81.
159. **Kurek E., Jaroszuk J. (1994a)** Occurrence of beneficial and deleterious for plant growth *Fusarium* strains in rye (*Secale cereale* L.) rhizosphere. *Acta Microbiol. Polon.* **43**: 181-187.
160. **Kurek E., Jaroszuk J. (1994b)** Treatment of rye (*Secale cereale* L.) seedlings with growth promoting *Pseudomonas* strains: Plant growth responses and survival of bacteria in the rhizosphere. *Acta Microbiol. Polon.* **43**: 189-198.
161. **Kurek E., Jaroszuk J. (1997)** The *in vitro* antagonism between rhizobacterial and *Fusarium* strains. *Acta Microbiol. Polon.* **46**: 65-73.
162. **Kurek E., Kobus J. (1990)** Korzystne i szkodliwe oddziaływanie mikroflory ryzosferowej na wzrost i rozwój roślin. *Post. Mikrobiol.* **XXIX**: 103-123.
163. **Kurek E., Machowicz Z., Kulpa D., Słomka A. (1994)** The microorganisms of rye (*Secale cereale* L.) rhizosphere. *Acta Microbiol. Polon.* **43**: 251-255.
164. **Kuś J. (1998)** Integrowane i ekologiczne systemy gospodarowania. (w) „Zagadnienia ochrony roślin w aspekcie rolnictwa integrowanego i ekologicznego” IUNG Puławy, 55-68.
165. **Kuś J., Mróz A. (1996)** Porażenie wybranych odmian pszenicy ozimej przez patogeny systemu korzeniowego i plonowanie w zależności od środowiska. (w) „Nowe kierunki w fitopatologii”, Kraków, 265-270.
166. **Lalande R., Bissonnette N., Coutlée D., Antoun H. (1989)** Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant Soil* **115**: 7-11.
167. **Leisinger T., Margraff R. (1979)** Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol. Rev.* **43**: 422-442.
168. **Lemanceau P., Bakker P.A.H.M., DeKogel W.J., Alabouvette C., Schippers B. (1992)** Effect of Pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of *Fusarium* wilt of carnations by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 74-82.
169. **Lemanceau P., Latour X., Clays-Jasserand A., Lensi R., Alabouvette C. (1997)** Bacterial traits related to the selection exerted by the plant toward fluorescent pseudomonads. (w) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 453
170. **Lievens K.H., Van Rijsbergen R., Leyns F.R., Lambert B.J., Tenning P., Swings J., Joos H.J.-P. (1989)** Dominant rhizosphere bacteria as a source for antifungal agents. *Pestic. Sci.* **27**: 141-154.
171. **Liljeroth E., Burgers S.L.G.E., Van Veen J. A., Miller H. J. (1991)** Changes in bacterial populations along roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Biol. Fertil. Soils* **10**: 276-280.
172. **Liljeroth E., Burgers S.L.G.E., van Veen J.A. (1991)** Changes in bacterial populations along roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Biol. Fertil. Soils* **10**: 276-280.

173. **Liljeroth E., Van Veen J. A., Miller H. J. (1990)** Assimilate translocation to the rhizosphere of two wheat lines and subsequent utilization by rhizosphere microorganisms at two soil nitrogen concentrations. *Soil Biol. Biochem.* **22**: 1015-1021.
174. **Lindow S.E., Panopoulos J., McFarland B.L. (1989)** Genetic engineering of bacteria from managed and natural habitats. *Science* **244**: 1300-1307.
175. **Lityński T., Jurkowska H., Gorlach E. (1976)** „Analiza chemiczno-rolnicza. Przewodnik metodyczny do analizy gleby i nawozów.” PWN Warszawa.
176. **Liu L., Huang H.C. (1997)** Effects of rhizobacteria on nodulization of dry peas by *Rhizobium*. in „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 396-398.
177. **Liu L., Kloepper J.W., Tuzun S. (1994)** PGPR-mediated induced systemic resistance in cucumber: effect of host heritable genetic resistance. (in) „Improving plant productivity with rhizosphere bacteria” M. H. Ryder, P.M. Stephens and G. D. Bowen (eds.) CSIRO Glen Osmond, S.A., Australia, 44-46.
178. **Liu Z.L., Sinclair J.B. (1992)** Population dynamics of *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 in the rhizosphere of soybean. *Phytopathol.* **82**: 1297-1301.
179. **Lochhead A. G., Rouatt J.W. (1955)** The „rhizosphere effect” on the nutritional groups of soil bacteria. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* **19**: 48-49.
180. **Łojkowska E., Jafra S., Śledź W. (1997)** Badania nad rolą enzymów pektynolitycznych bakterii z rodzaju *Erwinia* w patogenie mokrej zgnilizny. „Materiały z I Konferencji Grupy Roboczej Bakteryjnych Chorób Roślin Komitetu Ochrony Roślin Polskiej Akademii Nauk” Skierniewice, 29-35.
181. **Louw H.A., Webley D.M. (1959)** The bacteriology of the root region of the oat plant grown under controlled pot culture conditions. *J. Appl. Bact.* **22**: 216-226.
182. **Lumsden R.D., Carter J.P., Whipps J.M., Lynch J.M. (1990)** Comparison of biomass and viable propagule measurements in the antagonism of *Trichoderma harzianum* against *Pythium ultimum*. *Soil Biol. Biochem.* **22**: 187-194.
183. **Lutfu Cakmakci M., Evans H.J., Seidler R.J. (1981)** Characteristics of nitrogen-fixing *Klebsiella oxytoca* isolated from wheat roots. *Plant Soil* **61**: 53-63.
184. **Lynch J.M. (1989)** Development and interaction between microbial communities on the root surface. in „Interrelationships between microorganisms and plants in soil” - V. Vančura and F. Kunc (eds.) - Praha 1989, 5-12.
185. **Lynch J.M., Whipps J.M. (1990)** Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* **129**: 1-10.
186. **Maplestone P.A., Campbell R. (1989)** Colonization of roots of wheat seedlings by bacilli proposed as biocontrol agent against take-all. *Soil Biol. Biochem.* **21**: 543-550.
187. **Mariano R.L.R., Michereff S.J., Silveira E.B., Assis S.M.P., Reis A. (1997)** Plant growth-promoting rhizobacteria in Brazil. in „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 22-29.
188. **Marszewska-Zięmiecka J., Maliszewska W., Myśków W., Strzelczyk E. (1974)** Mikrobiologia gleby i nawozów organicznych. PWRiL, Warszawa, 450 stron.

189. **Martens D.A., Frankenberger W.T.Jr. (1991)** Saccharide composition of extracellular polymers produced by soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **23**: 731-736.
190. **Martens D.A., Frankenberger W.T.Jr. (1992)** Decomposition of bacterial polymers in soil and their influence on soil structure. *Biol. Fertil. Soils* **13**: 65-73.
191. **Martens R. (1990)** Contribution of rhizodeposits to the maintenance and growth of soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.* **22**:141-147.
192. **Martin J.K. (1971)** Influence of plant species and plant age on the rhizosphere microflora. *Aust. J. Biol. Sci.* **24**: 1143-1150.
193. **Martin J.K. (1975)** ¹⁴C-labelled material leached from the rhizosphere of plants supplied continuously with ¹⁴CO₂. *Soil Biol. Biochem.* **9**: 395-399.
194. **Martin J.K. (1977)** Factors influencing the loss of organic carbon from wheat roots. *Soil Biol. Biochem.* **9**: 1-7.
195. **Martin J.K., Kemp J.R. (1986)** The measurement of C transfers within the rhizosphere of wheat grown in field plots. *Soil Biol. Biochem.* **18**: 103-107.
196. **Martyniuk S. (1986)** „Ekologia i właściwości fitopatogena korzeni zbóż *Gaeumannomyces graminis* /Sacc./ Arx i Olivier i grzybów pokrewnych z rodzaju *Phialophora*.” IUNG, Puławy, 85 stron.
197. **Martyniuk S. (1998)** Dobre praktyki rolnicze a saprofityczna i fitopatogeniczna mikroflora gleby. (w) „Dobre praktyki w produkcji rolniczej” IUNG Puławy, 351-360.
198. **Massoumi A., Cornfield A.H. (1963)** A rapid method for determining sulphate in water extracts of soils. *Analyst.* **88**: 321-322.
199. **Matrinez-Ochoa N., Kloepper J.W., Rodríguez-Kábana, Ji P. (1997)** Induced resistance and phenotypic characteristics of several PGPR compared to biocontrol activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. (in) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 296-300.
200. **Mavingui P., Laguerre G., Berge O., Heulin T. (1992)** Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. *App. Environ. Microbiol.* **58**: 1894-1903.
201. **Mawdsley J.L., Burns R.G. (1994)** Factors affecting the survival of a *Flavobacterium* species in non-planted and rhizosphere soil. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 849-859.
202. **Mawdsley J.L., Burns R.G. (1994)** Root colonization by a *Flavobacterium* species and the influence of percolating water. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 861-870.
203. **Mayak S., Tirosch T., Glick B.R. (1997)** The influence of plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 on the rooting of mung bean cuttings. (in) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 313-315.
204. **McInroy J.A., Qi W., Mahaffee W.F., Lu S., Mei R., Kloepper J.W. (1997)** Comparative evaluation of endophytic bacteria from Chinese and U.S. cotton cultivars. (in) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 228-231.

205. **Merbach W., Schulze J., Richert M., Rocco E., Mengel K. (2000)** A comparison of different ^{15}N application techniques to study the N net rhizodeposition in the plant-soil system. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **163**: 375-379.
206. **Merckx R., van Ginkel J.H., Sinnaeve J., Cremers A. (1986a)** Plant-induced changes in the rhizosphere of maize and wheat. I. Production and turnover of root-derived material in the rhizosphere of maize and wheat. *Plant Soil* **96**: 85-93.
207. **Merckx R., van Ginkel J.H., Sinnaeve J., Cremers A. (1986b)** Plant-induced changes in the rhizosphere of maize and wheat. II. Complexation of cobalt, zinc and manganese in the rhizosphere of maize and wheat. *Plant Soil* **96**: 95-107.
208. **Mikolajska J., Majchrzak B. (1995)** Soil mycoflora and root and stem rot of spring barley. (w) Environmental biotic factors in integrated plant disease control. M. Mańka (ed) European Foundation for plant Pathology, Poznań, 411-417.
209. **Miller H.J. (1990)** Notes on the behavior of fluorescent pseudomonads in rhizosphere studies. *Symbiosis (Rehovot)* **9**: 377-381.
210. **Miller H.J., Liljeroth E., Henken G., van Veen J.A. (1990a)** Fluctuations on the fluorescent pseudomonad and actinomycete populations on rhizosphere and rhizoplane during the growth of spring wheat. *Can. J. Microbiol.* **36**: 254-258.
211. **Miller H.J., Liljeroth E., Willemsen-de Klein M.J.E.I.M., van Veen J.A. (1990b)** The dynamics of actinomycetes and fluorescent pseudomonads in wheat rhizoplane and rhizosphere. *Symbiosis (Rehovot)* **9**: 389-391.
212. **Miller R.M., Jastrow J.D. (1990)** Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. *Soil Biol. Biochem.* **22**: 570-584.
213. **Mishra R. P., Das S. N. (1975)** Attendant changes in the bacterial flora of rice rhizosphere as influenced by fertilizer treatment. *Plant Soil* **42**: 359-365.
214. **Moghimi A., Tate M.E., Oades J.M. (1978)** Characterization of rhizosphere products especially 2-ketogluconic acid. *Soil Biol. Biochem.* **10**: 283-287.
215. **Molina L., Ramos C., Duque E., Ronchel M.C., García M., Wyke L., Ramos J.L. (2000)** Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 315-321.
216. **Müller M., Deiglele C., Ziegler H. (1989)** Hormonal interactions in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) and their effects on plant development. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **152**: 247-254.
217. **Myśków W. (1960)** Badania nad drobnoustrojami rozpuszczającymi fosforany wapnia. *Roczn. Nauk Roln.* **88-D**: 156 stron.
218. **Nakas J. P., Klein D. A. (1980)** Mineralization capacity of bacteria and fungi from the rhizosphere-rhizoplane of a semi-arid grassland. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 113-117.
219. **Natsch A., Keel C., Troxler J., Zala M., Von Albertini N., Défago G. (1996)** Importance of preferential flow and soil management in vertical transport of a biocontrol strain of *Pseudomonas fluorescens* in structured field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 33-40.
220. **Neal J. L. Jr., Larson R. I. i Atkinson T. G. (1973)** Changes in rhizosphere populations of selected physiological groups of bacteria related to substitution of specific pairs of chromosomes in spring wheat. *Plant Soil* **39**: 209-212.
221. **Neilands J.B. (1988)** Siderophores. *ISI Atlas of Science: Biochemistry* **1**: 53-56.

222. **Newman E. I., Bowen H. J. (1974)** Patterns of distribution of bacteria on root surfaces. *Soil Biol. Biochem.* **6**: 205-209.
223. **Nijhuis E. H., Maat M. J., Zeegers I., W., E., Waalwijk C., van Veen J.A. (1993)** Selection of bacteria suitable for introduction into the rhizosphere of grass. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 885-895.
224. **Nye P. H. (1981)** Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. *Plant Soil* **61**: 7-26.
225. **O'Sullivan D., O'Gara F. (1992)** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **56**: 662-676.
226. **Oedjijono, Line M.A., Dragar C. (1993)** Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 247-250.
227. **Ogoshi A., Kobayashi K., Homma Y., Kodama F., Kondo N., Akino S. (eds.) (1997)** „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”: Proc. 4th Int. Workshop on PGPR, pp Faculty of Agriculture, Sapporo, Japonia, 483 stron.
228. **Oka N., Hartel P. G., Fuhrmann J. J. (1997)** Effect of plant genotype on rhizobacterial composition of *Arabidopsis thaliana*. (in) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 437-440.
229. **Oka Y., Chet I., Spiegel Y. (1993)** Control of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus*. *Biocontr. Sci. Technol.* **3**: 115-126.
230. **Olivain C., Steinberg C., Alabouvette C. (1995)** Evidence of induced resistance in tomato inoculated by nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. (w) Environmental biotic factors in integrated plant disease control. M. Mańka (ed) European Foundation for plant Pathology, Poznań, 427-430.
231. **Ordentlich A., Elad Y., Chet I. (1988)** The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* **78**: 84-88.
232. **Palmer S., Scanferlato V.S., Orvos D.R., Lacy G.H., Cains J. Jr. (1997)** Survival and ecological effects of genetically engineered *Erwinia carotovora* in soil and aquatic microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**: 650-657.
233. **Park C.-S., Paulitz T.C., Baker R. (1988)** Biocontrol of fusarium wilt of cucumber resulting from interactions between *pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **78**: 190-194.
234. **Parke J.L., Moen R., Rovira A.D., Bowen G.D. (1986)** Soil water flow affects the rhizosphere distribution of a seed-borne biological control agent, *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol. Biochem.* **18**: 583-588.
235. **Parkinson D., Pearson R. (1967)** Studies on fungi in the root region. VI. The occurrence of sterile dark fungi on root surfaces. *Plant Soil* **XXVII**: 113-119.
236. **Paszkowski W.L. (1993)** „Mikroflora ryzosfery owsa i jej wpływ na rozwój i zdrowotność roślin.” Praca doktorska. IUNG Puławy, 184 strony.
237. **Paszkowski W.L. (1996)** Wpływ HCN wydzielanego przez *Pseudomonas fluorescens* na wzrost grzybów fitopatogenicznych. *Zesz. Nauk. Akad. Roln. we Wrocławiu. Konf. XVIII* **332**: 85-92.

238. **Paszkowski W.L., Kobus J. (1995a)** Quantitative and qualitative examination of oat rhizosphere microorganisms. I. Bacteria. (w) Environmental biotic factors in integrated plant disease control. M. Mańka (ed) European Foundation for plant Pathology, Poznań, 443-446.
239. **Paszkowski W.L., Kobus J. (1995b)** Quantitative and qualitative examination of oat rhizosphere microorganisms. II. Fungi. (w) Environmental biotic factors in integrated plant disease control. M. Mańka (ed) European Foundation for plant Pathology, Poznań, 447-450.
240. **Paszkowski W.L., Kobus J. (1999a)** Drobnoustroje celulolityczne ryzosfery owsa *Pam. Pul.* **117**: 5-12.
241. **Paszkowski W.L., Kobus J. (1999b)** Zdolność drobnoustrojów ryzosfery owsa do uwalniania fosforu z fosforanu trójwapniowego i kwasów nukleinowych. *Pam. Pul.* **117**: 13-23.
242. **Paszkowski W.L., Kobus J. (2000)** Drobnoustroje ryzosfery owsa utleniające w warunkach *in vitro* siarkę elementarną i organiczną. (Praca złożona do druku w *Pamiętniku Puławskim*).
243. **Paszkowski W.L., Kobus J., Czaban J., Masiak D. (1997)** Occurrence of cyanogenic *Pseudomonas* strains in the rhizosphere of wheat and their antagonism to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Fusarium culmorum*. (in) "Trichoderma spp., other microorganisms and plant extracts in plant diseases control." Orlikowski L.B. i Skrzypczak Cz. (Eds.) Skierniewice., 64-67.
244. **Paszkowski W.L., Masiak D. (1998)** Występowanie cyjanogennych bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w ryzosferze jęczmienia jarego. (w) Ekologiczne aspekty mikrobiologii gleby A.R. Poznań s. 259-263.
245. **Paszkowski W.L., Masiak D., Kobus J. (1996)** Biosynteza HCN przez bakterie ryzosfery pszenicy. (w) „Teoretyczne i praktyczne aspekty allelopatii.” IUNG **K (10)**: 79-85.
246. **Paszkowski W.L., Wróblewska (2000)** Występowanie cyjanogennych bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w ryzosferze zbóż. Materiały Sympozjum Mikrobiologicznego: „Drobnoustroje środowiska glebowego - aspekty fizjologiczne, biochemiczne, genetyczne Toruń-Bachotek 6-8 września, 47.
247. **Paul E.A., Clark F.E. (2000)** „Mikrobiologia i biochemia gleb”. Wydawnictwo UMCS, 400 stron.
248. **Paul N.B., Sundara Rao W.V.B. (1971)** Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes. *Plant Soil* **35**: 127-132.
249. **Peterson E.A. (1958)** Observations on fungi associated with plant roots. *Can. J. Microbiol.* **4**: 257-265.
250. **Pierson E.A., Weller D.M. (1994)** Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathol.* **84**: 940-947.
251. **Pietr S. (1990)** Wpływ saprofitycznej mikroflory ryzosfery na wzrost roślin. *Post. Nauk Roln.* **3**: 19-38.
252. **Pietr S. (1997)** The mode of action of *Trichoderma*: Short summary. (in) "Trichoderma spp., other microorganisms and plant extracts in plant diseases control." Orlikowski L.B. i Skrzypczak Cz. (Eds.) Skierniewice, 7-14.
253. **Pietr S.J., Kempa R. (1989)** Cucumber rhizosphere pseudomonads as antagonists of *Fusarium*. in „Interrelationships between microorganisms and plants in soil” - V. Vančura and F. Kunc (eds.) - Praha, 411-417.

254. **Pietr S.J., Stankiewicz M. (1990)** Charakterystyka bakterii ryzoplany wybranych roślin uprawianych w różnych środowiskach glebowych przy zastosowania równania Hattoriego oraz na podstawie występowania różnych grup fizjologicznych. *Zesz. Nauk. Akad. Roln. we Wrocławiu. Rolnictwo LIII* **196**: 63-74.
255. **Piotrowska-Seget Z. (1995)** The effect of cyanogenic strains of *Pseudomonas fluorescens* on plant growth. *Acta Microbiol. Polon.* **44**: 161-170.
256. **Piscchik V.N., Mokrousov I.V., Lazarev A.M., Vorobyev N.I., Narvskaya O.V., Chernyaeva I.I., Kozhemyakov A.P., Koval G.N. (1998)** Biological properties of some nitrogen-fixing associative enterobacteria. *Plant Soil* **202**: 49-59.
257. **Pląskowska E. (1997)** The fungi communities of the soil environment of *Triticum aestivum* and its forecrops: *Hordeum vulgare*, *Vicia faba* ssp. *minor* and *Trifolium pratense*. *Acta Mycol.* **32**: 265-274.
258. **Plhák F., Urbánková V. (1969)** Study of the effect of volatile substances from cereal roots. *Biol. Plant.* **11**: 226-235.
259. **Press C.M., Kisaalita W., Wilson M., Tuzun S., Kloepper J.W. (1997)** Effects of iron and siderophores on induced systemic disease resistance of cucumber mediated by *Serratia marcescens* 90-166. (in) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 256-259.
260. **Press C.M., Kloepper J.W. (1997)** Role of bacterial cell constituents in PGPR-mediated induced systemic resistance of cucumber. (in) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 260-264.
261. **Prikřyl Z., Vančura V. (1980)** Root exudates of plants. VI. Wheat root exudation as dependent of growth, concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. *Plant Soil* **57**: 69-83.
262. **Pruszyński S. (1998)** Tendencje i niechemiczne metody w ochronie roślin. (w) „Zagadnienia ochrony roślin w aspekcie rolnictwa integrowanego i ekologicznego” IUNG Puławy, 7-15.
263. **Raaijmakers J.M., Weller D.M., Thomashow L.S. (1997)** Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 881-887.
264. **Rattray E.A.S., Prosser J.I., Glover L.A., Killham K. (1995)** Characterization of rhizosphere colonization by luminescent *Enterobacter cloacae* at the population and single-cell levels. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2950-2957.
265. **Rattray E.A.S., Tyrrell J.A., Prosser J.I., Glover L.A., Killham K. (1993)** Effect of soil bulk density and temperature on wheat rhizosphere colonization by lux-marked *Pseudomonas fluorescens*. *Eur. J. Soil Biol.* **29**: 73-82.
266. **Reimann C., Maurhofer M., Schmidli P., Gaille C., Haas D., Défago G. (1997)** Role of salicylate produced by *Pseudomonas fluorescens* in the suppression of tobacco diseases. (in) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 248-250.
267. **Rennie R.J. (1980)** Dinitrogen-fixing bacteria: computer-assisted identification of soil isolates. *Can. J. Microbiol.* **26**: 1275-1283.

268. **Richards B. N.** (1976) Introduction to the Soil Ecosystem. Longman, Londyn, 266.
269. **Robertson E.B., Firestone M.K.** (1991) Relation between desiccation and exopolisaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1284-1291.
270. **Rossi W., Grapelli A., Pietrosanti W.** (1984) Phytohormones in soil after atrazine application. *Folia Microbiol.* **29**: 325-329.
271. **Rouatt J.W., Katznelson H.** (1961) A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere soil of crop plants. *J. Appl. Bacteriol.* **24**: 164-171.
272. **Rouatt J.W., Katznelson H. i Payne T.M.B.** (1960) Statistical evaluation of the rhizosphere effect. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* **24**: 271-273.
273. **Rouatt J.W., Peterson E.A., Katznelson H. i Henderson H.** (1963) Microorganisms in the root zone in relation to temperature. *Can. J. Microbiol.* **9**: 227-236.
274. **Rovira A. D.** (1959) Root excretions in relation to the rhizosphere effect, IV. Influence of plant species, age of plant, light, temperature, and calcium nutrition on exudation. *Plant Soil* **XI**: 53-64.
275. **Rovira A. D.** (1969) Plant root exudates *Bot. Rev.* **35**: 35-57.
276. **Różycki H., Strzelczyk E.** (1985) Połączenia organiczne wydzielane przez drobnoustroje glebowe i korzenie roślin. *Post. Mikrob.* **XXIV**: 285-303.
277. **Ruppel S.** (1989) Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of *Triticum aestivum* and *Ammophila arenaria*. in „Interrelationships between microorganisms and plants in soil” - V. Vancura and F. Kunc (eds.) – Praha, 253-262.
278. **Ryder M.H., McClure N.C.** (1997) Antibiosis in relation to other mechanisms in biocontrol by rhizobacteria. (in) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 65-72.
279. **Ryder M.H., Rovira A.D.** (1993) Biological control of take-all of glasshouse-grown wheat using strains of *Pseudomonas corrugata* isolated from wheat field soil. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 311-320.
280. **Ryder M.H., Stephens P.M., Bowen G.D.** (Eds.) (1994) Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria”: Proc 3rd Int. Workshop on PGPR, CSIRO Adelaide, Australia. 288 stron.
281. **Sakthivel N., Gnanamanickam S.S.** (1989) Incidence of different biovars of *Pseudomonas fluorescens* in flooded rice rhizospheres in India. *Agricult. Ecosyst. Environ.* **25**: 287-298.
282. **Sands D.C., Rovira A.D.** (1971) *Pseudomonas fluorescens* biotyp G, the dominant fluorescent pseudomonad in South Australian soils and wheat rhizospheres. *J. Appl. Bact.* **34**: 261-275.
283. **Sato K., Jiang J.Y.** (1997) Gram-negative bacterial flora on the root surface of wheat (*Triticum aestivum*) grown under different soil conditions. *Biol. Fert. Soils* **23**: 237-281.
284. **Savithiry S., Gnanamanickam S. S.** (1987) Bacterization of peanut with *Pseudomonas fluorescens* for biological control of *Rhizoctonia solani* and for enhanced yield. *Plant Soil* **102**: 11-15.
285. **Scher F.M., Kloepper J.W., Singleton C., Zaleska I., Laliberte M.** (1988) Colonization of soybean roots by *Pseudomonas* and *Serratia* species: relationship to bacterial motility, chemotaxis, and generation time. *Phytopathol.* **78**: 1055-1059.

286. **Schilling G., Gransee A., Deubel A., Ležovic G., Ruppel S. (1998)** Phosphorus availability, root exudates, and microbial activity in the rhizosphere. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **161**: 465-478.
287. **Schippers B., Bakker A.W., Bakker P.A.H.M., Van Peer R. (1990)** Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. *Plant Soil* **129**: 75-83.
288. **Schippers B., Bakker A.W., Bakker P.A.H.M., van Peer R. (1990)** Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions *Plant Soil* **129**: 75-83.
289. **Schollenberger M. (1997)** Taksonomia bakterii patogenicznych dla roślin. „Materiały z I Konferencji Grupy Roboczej Bakteryjnych Chorób Roślin Komitetu Ochrony Roślin Polskiej Akademii Nauk” Skierniewice, 7-13.
290. **Schönwitz R., Ziegler H. (1989)** Interaction of maize roots and rhizosphere microorganisms. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **152**: 217-222.
291. **Schroth M.N., Hancock J.G. (1982)** Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* **216**: 1376-1381.
292. **Selvadurai E.L., Brown A.E., Hamilton J.T.G. (1991)** Production of indole-3-acetic acid analogues by strain of *Bacillus cereus* in relation to their influence on seedling development. *Soil Biol. Biochem.* **23**: 401-403.
293. **Shah S., Li J., Moffat B.A., Glick B.R. (1997)** ACC deaminase genes from plant growth promoting rhizobacteria. (w) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 320-324.
294. **Sikora R.A. (1990)** The concept of using plant health promoting rhizobacteria from the biological control of plant parasitic nematodes. (w) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria - Progress and Prospects.” : Proc. 2nd Int. Workshop on PGPR, Keel C., Koller B., Défago G. (eds.) Interlaken, Szwajcaria, 3-10.
295. **Singh U.P., Prithiviraj B. (1997)** Biological control of plant diseases in India. (w) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 17-21.
296. **Sobiczewski P. (1994)** Bakterie jako czynniki biologicznej ochrony roślin przed chorobami. *Post. Nauk Roln.* **6**: 19-33.
297. **Sobiczewski P., Bryk H., Berczyński S. (1996)** Evaluation of epiphytic bacteria isolated from apple leaves in the control of postharvest apple diseases. *J. Fruit Ornament. Plant Res.* **IV**: 35-45.
298. **Söderberg K.H., Baath E. (1998)** Bacterial activity along a young barley root measured by the thymidine and leucine incorporation techniques. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 1259-1268.
299. **Sperber J. (1958)** The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Aust. . Agric. Res.* **9**: 778-781.
300. **Spiegel Y., Cohn E., Calpea S., Sharon E., Chet I. (1991)** Evaluation of a newly isolated *Pseudomonas chitinolytica* sp. nov. for controlling root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. *Biocontr. Sci. Technol.* **1**: 115-125.

301. **Stanghellini M.E., Rasmussen S.L. (1989)** Root prints: A technique for the determination of the in situ spatial distribution of bacteria on the rhizoplane of field-grown plants. *Phytopathol.* **79**: 1131-1134.
302. **Stirling G.R. (1984)** Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathol.* **74**: 55-60.
303. **Srivastava V.B. (1971)** Investigations into rhizosphere microflora. VIII. Light and dark treatment in relation to root-region microflora. *Plant Soil* **35**: 463-470.
304. **Strzelczyk E. (1988)** Biologiczne zwalczanie roślinnych patogenów glebowych. *Post. Mikrobiol.* **XXVII**: 255-272.
305. **Strzelczyk E. (1999)** Wytwarzanie regulatorów wzrostu roślin (fitohormonów) i witamin z grupy B przez drobnoustroje gleb leśnych i grzyby ektomikoryzowe. *Post. Mikrobiol.* **38**: 119-139.
306. **Strzelczyk E., Gorlach K., Różycki H. (1990)** Chitynolytic and proteolytic activity of streptomycetes isolated from root free soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.) *Biol. Fertil. Soils* **9**: 268-272.
307. **Strzelczyk E., Szpotański T. (1989)** Cellulolytic and pectolytic activity of streptomycetes isolated from root-free soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.) *Biol. Fertil. Soils* **7**: 365-369.
308. **Stutz E., Kahr G., Defago G. (1989)** Clays involved in suppression of tobacco black root rot by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol. Biochem.* **21**: 361-366.
309. **Sundheim L., Klemsdal, Lorito., Harman G.A., Tronsmo A. (1995)** Chitinolytic enzymes in biological control of plant pathogens. (w) Environmental biotic factors in integrated plant disease control. M. Mańka (ed) European Foundation for plant Pathology, Poznań, 137-145.
310. **Sundin P., Valeur., Olsson S. i Odham G. (1990)** Interactions between bacteria-feeding nematodes and bacteria in the rape rhizosphere: effects on root exudation and distribution of bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**: 65-74.
311. **Sung K.C., Chung Y.R. (1997)** Enhanced suppression of rice sheath blight using combination of bacteria which produce chitinases or antibiotics. (w) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Proc. Sapporo, Japonia, 370-372.
312. **Sytnik K. M., Kniga N. M., Musatienko L. I. (1977)** „Fizjologia korzenia” PWRiL Warszawa 1977, 381 stron.
313. **Szmigielska A.M., Van Rees K.C.J., Cieśliński G., Huang P.M. (1996)** Low molecular weight dicarboxylic acids in rhizosphere soil of durum wheat. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 1036-1040.
314. **Święcicka I., Hauschild T. (1996)** Rodzaj *Bacillus* - występowanie i znaczenie w środowiskach naturalnych. *Post. Mikrob.* **XXXV**: 27-43.
315. **Tabatabai M.A., Bremner J.M. (1969)** Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* **1**: 301-307.
316. **Tarafdar J. C., Marschner H. (1994)** Phosphatase activity in the rhizosphere and hyposphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 387-395.

317. **Tesařová M., Šimek M. (1989)** Rhizosphere microflora of managed grasslands. (w) „Interrelationships between microorganisms and plants in soil” - V. Vancura and F. Kunc (eds.) - Praha, 307-313.
318. **Tinker P.B. (1984)** The role of microorganisms in mediating and facilitating the uptake of plant nutrients from soil. *Plant Soil* **76**: 77-91.
319. **Tisdall J.M. (1994)** Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant Soil* **159**: 117-121.
320. **Toro M., Azcón R., Barea J.-M. (1997)** Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate- solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (^{32}P) and nutrient cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4408-4412.
321. **Toyota K., Ikeda K. (1997)** Relative importance of motility and antibiosis in the rhizoplane competence of a biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Me1RC2Rif. *Biol. Fert. Soils* **25**: 416-420.
322. **Tsuchiya K. (1997)** Current status and future prospects in research and practice of biological control of plant diseases in Japan. (w) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Proc. Sapporo, Japonia, 30-35.
323. **Turner S.M., Newman E.I. i Campbell R. (1985)** Microbial population of ryegrass root surfaces: Influence of nitrogen and phosphorus supply. *Soil Biol. Biochem.* **17**: 711-715.
324. **Uoti J. (1995)** Commercial biofungicides: facts or fantasies. (w) Environmental biotic factors in integrated plant disease control. M. Mańka (ed) European Foundation for plant Pathology, Poznań, 113-120.
325. **Vágnerová K., Macura J., Čatská V. (1960a)** Rhizosphere microflora of wheat. I. Composition and properties of bacterial flora during the first stages of wheat growth. *Folia Microbiol.* **5**: 298-310.
326. **Vágnerová K., Macura J., Čatská V. (1960b)** Rhizosphere microflora of wheat. II. Composition and properties of bacterial flora during the vegetation period of wheat. *Folia Microbiol.* **5**: 311-319.
327. **Vandenhove H., Merckx R., Wilmots H., Vlassak K. (1991)** Survival of *Pseudomonas fluorescens* inocula of different physiological strains in soil. *Soil Biol. Biochem.* **12**: 1133-.
328. **van Loon L.C. (1998)** Biotechnology as a means to improve biological control of plant diseases. *Med. Fac, Landbouww. Univ. Gent* **63/4b**: 1657-1666.
329. **van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J. (1997)** Mechanisms of PGPR-induced resistance against pathogens. (w) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, 50-57.
330. **van Peer R., Punte H.L.M., de Weger L.A., Schippers B. (1990)** Characterization of root surface and endorhizosphere pseudomonads in relation to their colonization of roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2462-2470.
331. **van Vuurde J.W.L., (1978)** The rhizosphere microflora of wheat grown under controlled conditions. I. The effect of soil fertility and urea leaf treatment on the rhizoplane microflora. *Plant Soil* **50**: 447-460.

332. **van Vuurde J.W.L., de Lange A. (1978)** The rhizosphere microflora of wheat grown under controlled conditions. II. Influence of the stage of growth of the plant, soil fertility and leaf treatment with urea on the rhizosphere soil microflora. *Plant Soil* **50**: 461-472.
333. **Vančura V. (1964)** Root exudates of plants. I. Analysis of root exudates of barley and wheat in their initial phases of growth. *Plant Soil* **XXI**: 231:248.
334. **Vančura V. (1967)** Root exudates of plants. III. Effects of temperature and „cold shock” on the exudation of various compounds from seeds and seedlings of maize and cucumber. *Plant Soil* **XXVII**: 319:328.
335. **Vančura V. (1980)** Fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of plants and their relation to root exudates. *Folia Microbiol.* **25**: 168-173.
336. **Vančura V., Hovadík A. (1965)** Root exudates of plants. II. Composition of root exudates of some vegetables. *Plant Soil* **XXII**: 21-32.
337. **Vančura V., Stotzky G. (1980)** Gaseous and volatile exudates from germinating seeds and seedlings. *Can. J. Bot.* **54**: 518-532.
338. **Vassilev N., Toro M., Vassileva M., Azcon R., Barea J.M. (1997)** Rock phosphate solubilization by immobilized cells of *Enterobacter* sp. in fermentation and soil conditions. *Bios. Technol.* **61**: 29-32.
339. **Voisard C., Keel C., Haas D., Défago G. (1989)** Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.* **8**: 351-358.
340. **Vraný J., Vančura V., Macura J. (1962)** The effect of foliar application of some readily metabolized substances, growth regulators and antibiotics on rhizosphere microflora. *Folia Microbiol.* **7**: 61-70.
341. **Webley D.M., Duff R.B. (1965)** The incidence, in soils and other habitats, of micro-organisms producing 2-ketogluconic acid. *Plant Soil* **XXII**: 307-313.
342. **Weller D.M. (1988)** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* **26**: 379-407.
343. **Wenhua T., Hetong Y. (1997)** Research and application of biocontrol of plant diseases and PGPR in China. in „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Present Status and Future Prospects.”- A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino (eds.) Sapporo, Japonia, s. 2-9.
344. **Werner D., Berggold R., Jaeger D., Krotzky A., Papen H., Schenk S., Thierfelder H. (1989)** Plant, microbial and soil factors, determining nitrogen fixation in the rhizosphere. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* **152**: 231-236.
345. **West A.W., Burges H.D., Dixon T.J., Wyborn C.H. (1985)** Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: Effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **17**: 657-665.
346. **Weyman-Kaczmarkowa W. (1996)** Interdependencies between oligotrophic and copiotrophic bacteria in soils of different mechanical structure. *Polish Journal of Soil Science* **XXIX**: 65-72.
347. **Whitelaw M.A., Harden T.J., Bender G.L. (1997)** Plant growth promotion of wheat inoculated with *Penicillium radicum* sp. nov. *Aust. J. Soil. Res.* **35**: 291-300.

348. **Williamson F.A., Wyn Jones R.G.** (1973) The influence of soil microorganisms on growth of cereal seedlings and on potassium uptake. *Soil Biol. Biochem.* **5**: 569-575.
349. **Wong P. T. W.** (1994) Biocontrol of wheat take-all in the field using soil bacteria and fungi. (in) „*Improving plant productivity with rhizosphere bacteria*” M. H. Ryder, P. M. Stephens and G. D. Bowen (eds.) CSIRO Glen Osmond, S.A., Australia s. 24-28.
350. **Wong P.T.W., Mead J.A., Holley M.P.** (1996) Enhanced field control of wheat take-all using cold tolerant isolates of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Phialophora* sp. (lobed hyphopodia). *Plant Pathol.* **45**: 285-293.
351. **Yasuda M., Katoh K.** (1989) Characteristics of bacteria isolated from soil and roots of fruit trees. *Soil Sci. Plant Nutr.* **35**: 501-508.
352. **Young S., Pharis R.P., Reid D., Reddy M.S., Lifshitz R., Brown G.** (1990) PGPR: is there a relationship between plant growth regulators and the stimulation of plant growth or biological activity. (in) „Plant Growth-Promoting Rhizobacteria - Progress and Prospects.” : Proc. 2nd Int. Workshop on PGPR, Keel C., Koller B., Défago G. (eds.) Interlaken, Szwajcaria p. 182-186.