

MARIA J. KRÓL, ANDRZEJ PERZYŃSKI, ANNA LEŚNIAK

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

WYKORZYSTANIE SŁOMY JAKO ŹRÓDŁA WĘGLA
W WIĄZANIU WOLNEGO AZOTU
PRZEZ BAKTERIE Z RODZAJU *AZOSPIRILLUM*

Utilisation of straw in fixation of nitrogen by *Azospirillum* spp. strains of bacteria

ABSTRAKT: Badano zdolne do degradacji słomy (głodzone) szczepy bakterii z rodzaju *Azospirillum* wyizolowane z endoryzosfery kukurydzy (*Zea mays*) uprawianej na różnych glebach. Zdolność do wykorzystywania słomy w procesie wiązania wolnego azotu określono na podstawie redukcji acetyleny w pożywce bezazotowej ze słomą jako jedynym źródłem węgla i w madzie średniej pyłowej z dodatkiem słomy w czasie 168 godzin. Największą aktywność nitrogenazy *Azospirillum* spp. w pożywce mineralnej ze słomą stwierdzono po 24–72 h, wynosiła ona od 250,0 nM do 1000,0 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej. Największą aktywność nitrogenazy w kombinacjach z madą średnią pyłową stwierdzono po 168 godzinach – 68,2 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej.

słowa kluczowe – key words:

Azospirillum spp. – *Azospirillum* spp., słoma – straw, gleba – soil, redukcja acetyleny – acetylene reduction

WSTĘP

Mikrobiologiczny rozkład słomy w glebie może prowadzić do różnorodnych zmian właściwości fizykochemicznych gleb, wpływając na wzrost i plonowanie roślin (17, 20, 21). Zastosowanie szczepionek z drobnoustrojów celulolitycznych może być czynnikiem przyspieszającym ten proces, jednak w warunkach polowych nie obserwowano ich istotnego wpływu na degradację słomy (23).

Słoma składa się z celulozy i hemicelulozy (70%), ligniny (20%), krzemionki (5%) i z frakcji ekstrahującej się w 5% etanolo-benzenie (16). W glebie lignina, celuloza i hemiceluloza słomy rozkładane są wspólnie, prawie wyłącznie przez grzyby i bakterie. Do drobnoustrojów celulolitycznych, mających kompleks enzymów prowadzących celuloлизę właściwą, należą przedstawiciele różnych grup systematycznych i fizjologicznych, powszechnie występujący w glebie (24).

Badano wiązanie azotu przez bakterie wolno żyjące – *Pseudomonas diazotrophica*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella planticola*, *Clostridium butyricum*, *A. lipof-*

rum i *A. brasilense*, w doświadczeniach laboratoryjnych z glebą mieszaną: z celulozą (5), ze słomą pszenicy (8), słomą owsianą (3), z łodygami kukurydzy (1), ze słomą ryżową (13) i z odpadkami z trzciny cukrowej (19). Aktywność nitrogenazy była kilkakrotnie wyższa w glebach z dodatkiem celulozy.

Ryzobakterie z rodzaju *Azospirillum* mogą wykorzystywać słomę, celulozę i ksylan (główny składnik hemicelulozy) oraz wiązać azot (9). Właściwości takie mają prawdopodobnie dwa gatunki: *A. lipoferum*, *A. brasilense* (13, 27). Trzeci gatunek *A. irakense* hydrolizuje celobiozę – dwucukier zbudowany z dwóch cząsteczek D-glukozy połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym – która jest przejściowym produktem degradacji celulozy (7).

W naszych wcześniejszych badaniach ze szczepami *Azospirillum* spp. stwierdziliśmy, że bakterie te hydrolizowały zarówno celulozę, jak i ksylan (12). Enzymy celulolityczne i ksylolityczne były obecne u większości szczepów bakterii *Azospirillum* spp. pochodzących z endoryzosfery kukurydzy.

W literaturze światowej brakuje danych dotyczących informacji o wykorzystywaniu celulozy, ksylanu i słomy jako jedyne źródła węgla w wiązaniu wolnego azotu przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. Ze względu na znaczenie, jakie ma kompleks enzymatyczny* celulaz i ksylanaz w endoryzosferze roślin zbożowych, podjęto badania nad określeniem aktywności nitrogenazy celulolitycznych szczepów *Azospirillum* spp. przy wykorzystaniu słomy jako jedyne źródła węgla w wiązaniu wolnego azotu.

MATERIAŁ I METODY

Wybrano trzy szczepy bakterii celulolitycznych, ksylanolitycznych (12) i rozkładających WWA (11) z rodzaju *Azospirillum*: 4B, 77Bb1, 83B1, wyizolowane z endoryzosfery kukurydzy (*Zea mays*). Przebadano ich zdolność do wiązania wolnego azotu w pożywkach mineralnych, bezazotowych z dodatkiem słomy jako jedyne źródła węgla i energii (12).

Do badań w pierwszej partii użyto słomy jęczmiennej, owsianej, pszenicznej i żytniej (sproszkowanej w ilości 0,1% wagowo) oraz mineralnej półpłynnej pożywki Nfb (6) bez kwasu jabłkowego. W drugiej partii zamiast pożywki mineralnej użyto gleby – mady średniej pyłowej w ilości 4 g na buteleczkę.

W ciągu 168 godzin określano wykorzystywanie przez szczepy *Azospirillum* spp. słomy jako jedyne źródła węgla i energii podczas wzrostu i wiązania azotu

* Celulaza hydrolizuje wiązania β -1-4-glikozydowe; zidentyfikowano dwa różne typy celulazy: endoglukanazę i celobiohydrolazę (egzoglukanazy). Endoglukanazy hydrolizują wiązania wewnątrz celulozy, najbardziej podatne wiązania są w regionach niekryształicznych fibryli celulozy. Mikroorganizmy są zdolne używać produktów hydrolizy jako źródła energii, celobioza musi być rozkładana do dwóch cząsteczek glukozy przez β -glukozydazę. Drobnoustroje, aby efektywnie zużywać celulozę jako źródło energii, muszą wydzielać mieszaninę enzymów endoglukanazy, celobiohydrolazy i β -glukozydazy, by była stale w środowisku (4). Do kompletnej degradacji ksylanu wymagane jest współdziałanie ksylanaz i β -ksylozydazy z: α -arabinofuranozydazą, α -metyloglukuronidazą, esterazą acetyloksylanową i esterazą kwasu ferulowego (15).

w bezazotowej pożywce mineralnej (6) i w glebie. W pierwszej partii komórki bakterii (o gęstości około 10^6 jtk/na buteleczkę) po zmyciu solą fizjologiczną ze skosów z podłoża ziemniaczanego były głodzone przez 15 godzin inkubacji na pożywce bez źródła węgla w celu wykorzystania endogennych zapasów. Następnie przenoszono je do buteleczek z półpłynnym podłożem Nfb (bez kwasu jabłkowego) ze słomą i oznaczano aktywność nitrogenazy. W drugiej części badań bakterie po zmyciu solą fizjologiczną i głodzeniu były umieszczane w buteleczkach z małą średnią pyłową (w której nie stwierdzono występowania *Azospirillum* sp.). Hodowlę prowadzono w trzech powtórzeniach w temperaturze 30°C.

Aktywność nitrogenazy szczepów bakterii oznaczano metodą redukcji acetyleny z wykorzystaniem chromatografu gazowego PAY UNICAM - 204 (Detektor płomieniowo-jonizacyjny FID. Kolumna szklana długości 2,1 m, wypełnienie Poropak Q 80–120 mesh. Temperatury: dozownik 135°C, detektor 125°C, kolumna 60°C. Jako gaz nośny stosowano odtleniony azot, zawartość O_2 poniżej $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Bakterie hodowano w kalibrowanych buteleczkach zawierających około 6 cm^3 bezazotowego półpłynnego podłoża Nfb ze słomą i inkubowano od 2 do 168 godzin w atmosferze 10% acetyleny w temp. 30°C (pojemność fazy gazowej 7 cm^3). Pomiary redukcji acetyleny do etyleny wykonywano po 2, 24, 48, 72, 86, 120, 144 i 168 godzinach inkubacji. Jako kontrolę stosowano podłoża nie szczepione ze słomą i bez słomy.

W celu statystycznej weryfikacji otrzymanych wyników przeprowadzono analizę wariancji (ANOVA) i korelacji (w programie Statgraphic). Statystyczną istotność różnic średnich określono testem t-Studenta, przy poziomie istotności $p < 0,01$.

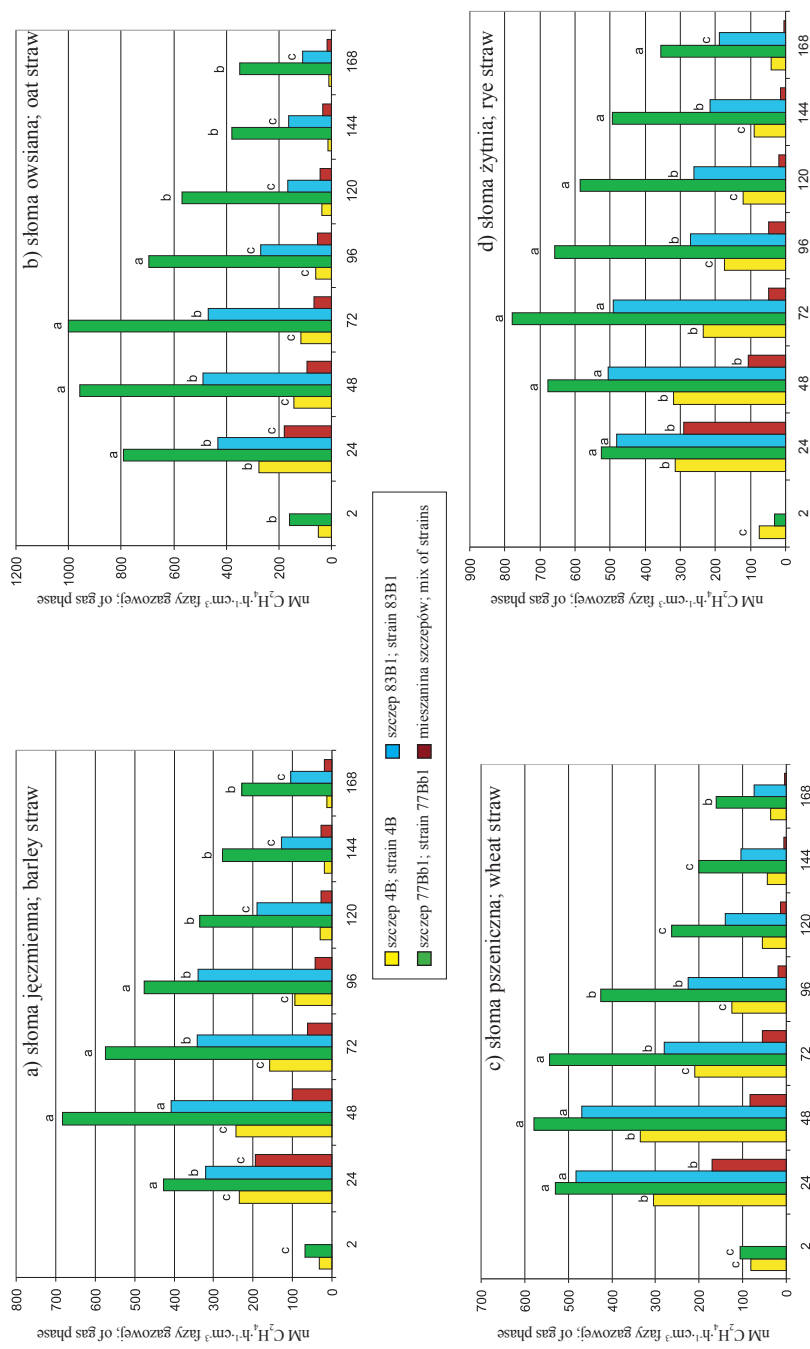
WYNIKI

Redukcja acetyleny przez szczepy *Azospirillum* spp. w bezazotowej pożywce mineralnej z dodatkiem słomy jako jedyne źródła węgla

Szczepy bakterii *Azospirillum* spp. wyizolowane z endoryzosfery kukurydzy (*Zea mays*) były bardzo aktywne w wykorzystywaniu słomy różnych gatunków zbóż w procesie wiązania wolnego azotu (rys. 1).

Najmniej aktywny pod tym względem okazał się szczep 4B (rys. 1a, b, c, d). Aktywność jego nitrogenazy przez pierwsze 48 godzin była bardzo wysoka i wynosiła ponad $300 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej. Jednak po 120 godzinach spadła poniżej 100 nM , a po 168 godzinach nawet poniżej 50 nM . Najwyższą aktywność szczepu 4B stwierdzono na pożywce z dodatkiem słomy żyta ($r = 0,985$) oraz pszenicy ($r = 0,995$).

Najaktywniejszy był szczep 77Bb1, dla którego redukcja acetyleny po 72 godzinach inkubacji w bezazotowej pożywce mineralnej z dodatkiem słomy owsianej była najwyższa i wynosiła $999,6 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej (rys. 1). W przypadku słomy pozostałych gatunków aktywność nitrogenazy tego szczepu była również bardzo wysoka – w obiektach z dodatkiem słomy żytniej redukcja acetyleny po trzech



wartości oznaczone różnymi literami (a, b i c) różnią się między sobą statystycznie istotnie ($\alpha < 0,01$); values with different letters (a, b and c) are statistically different ($\alpha < 0,01$)

Rys.1. Redukcja acetyleny przez szczepy *Azospirillum* spp. w pożywkach mineralnych, bezazotowych z dodatkiem słomy jako jedyne źródła węgla
Reduction of acetylene by *Azospirillum* spp. species, grow in N-free, mineral medium with straw as the sole carbon source

dniach wynosiła $780,1 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ cm}^{-3}$ fazy gazowej. Stwierdzono silne korelacje pomiędzy aktywnością nitrogenazy szczepu 77Bb1 a rodzajem zastosowanej słomy: owsianej ($r = 0,963$), pszenicznej ($r = 0,936$), żytniej ($r = 0,892$) i jęczmiennej ($r = 0,883$); (rys. 1a, b, c, d). Wysoka aktywność nitrogenazy tego szczepu *Azospirillum* sp. utrzymywała się nawet po siedmiu dniach inkubacji i dla słomy wszystkich badanych gatunków zbóż przekraczała 200 nM , co świadczy o bardzo dobrym źródle węgla dla tej bakterii.

Szczep 83B1 był również bardzo aktywny w wykorzystywaniu słomy różnych gatunków w wiązaniu wolnego azotu. Aktywność jego nitrogenazy była wysoka i utrzymywała się powyżej 100 nM nawet po 7 dniach inkubacji bakterii w bezazotowych pożywkach mineralnych z dodatkiem słomy badanych gatunków z wyjątkiem pszenicy (rys. 1c). Największą redukcję acetyleny u szczepu 83B1 stwierdzono między 24. a 72. godziną badań. Szczególnie wysoka była w pożywce ze słomą żyta ($r = 0,913$) i owsa ($r = 0,939$), mniejsza w obiektach ze słomą pszenicy ($r = 0,885$) oraz jęczmienia ($r = 0,765$). Po 168 godzinach inkubacji redukcja acetyleny utrzymywała się jeszcze powyżej $100 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej (rys. 1 a, b, d), z wyjątkiem obiektów ze słomą pszeniczną (rys. 1c).

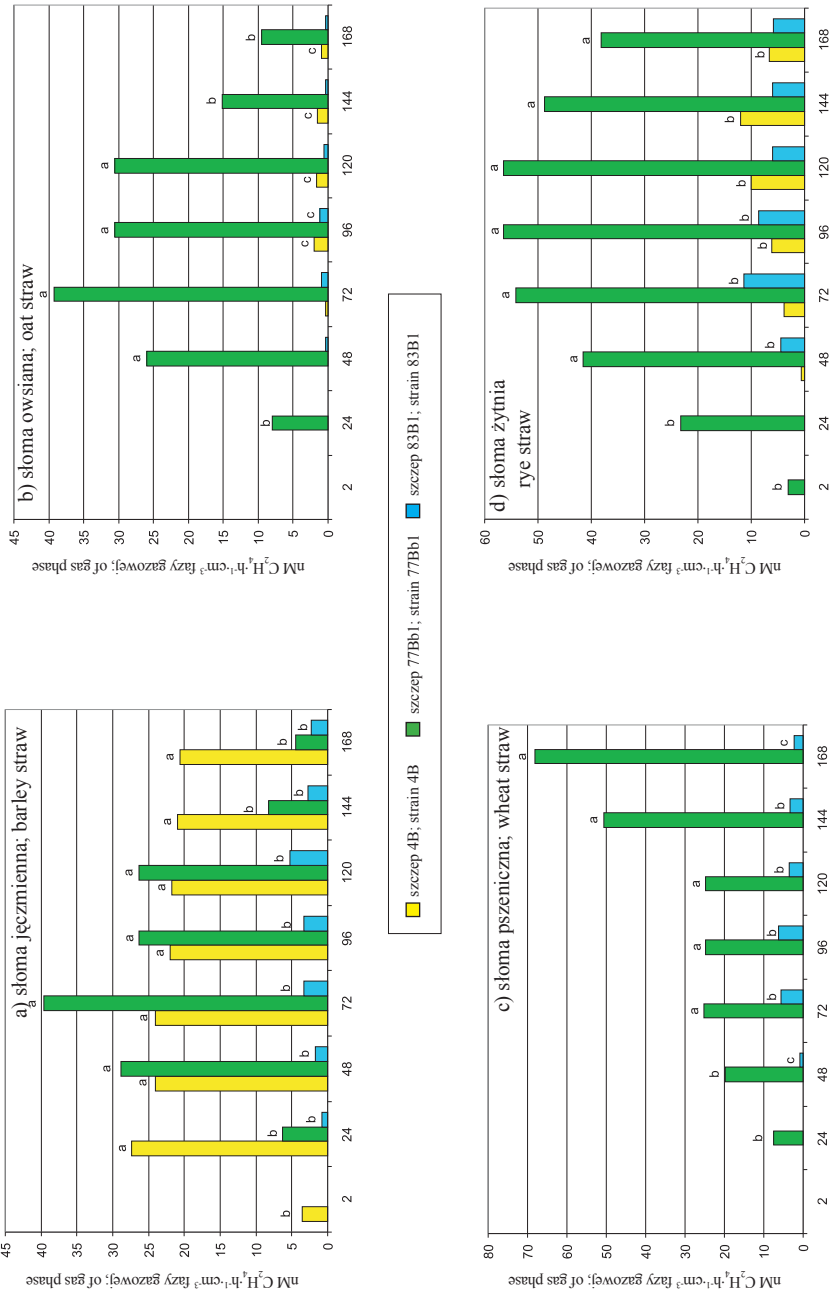
Dużą redukcję acetyleny przez zmieszane szczepy *Azospirillum* spp. stwierdzono jedynie po 24 godzinach inkubacji w pożywce ze słomą żyta (rys. 1d), co potwierdzono statystycznie ($r = 0,985$). Natomiast po 72 godzinach następował spadek aktywności nitrogenazy poniżej $100 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej, a po siedmiu dniach – do kilku nanomoli.

Największą redukcję acetyleny przy wiązaniu wolnego azotu prawie u wszystkich badanych szczepów *Azospirillum* spp. wyizolowanych z endoryzosfery kukurydzy stwierdzono w pożywkach ze słomą żyta ($r = 0,998$) i owsa ($r = 0,957$); (rys. 1b, d).

Redukcja acetyleny przez szczepy *Azospirillum* spp. w madzie średniej pyłowej z dodatkiem słomy

Zbadano również aktywność nitrogenazy tych samych szczepów *Azospirillum* spp. (4B, 77Bb1, 83B1) w madzie średniej pyłowej zmieszanej ze słomą. Do badań użyto tej samej słomy jęczmiennej, owsianej, pszenicznej i żytniej. Redukcję acetyleny przez bakterie w tych kombinacjach przedstawiono na rysunku 2.

W glebie szczepy *Azospirillum* spp. były mało aktywne – redukcja acetyleny była dużo słabsza niż w bezazotowych pożywkach mineralnych z dodatkiem słomy. Piki najwyższej aktywności nitrogenazy bakterii w glebie były przesunięte i przypadały między 48. a 120. godziną badań. Wyjątkiem była jedna kombinacja ze słomą jęczmienną i szczepem 4B ($r = 0,850$), dla której największa redukcja acetyleny wystąpiła w 24. godzinie inkubacji komórek (rys. 2a). Trzeba nadmienić, że aktywność nitrogenazy tego szczepu utrzymywała się prawie na tym samym poziomie do 168 godziny.



Rys. 2. Redukcja acetyleny przez szczepy *Azospirillum* spp. w miedze średniej pyłowej ze słomą
Reduction of acetylene by *Azospirillum* spp. species in alluvial medium soil with straw

wartości oznaczone różnymi literami (a, b i c) różnią się między sobą statystycznie istotnie ($\alpha < 0,01$); values with different letters (a, b and c) are statistically different ($\alpha < 0,01$)

Podobnie jak w pożywkach mineralnych z dodatkiem słomy również w madzie średniej pyłowej najwyższa redukcja acetyleny charakteryzowała szczep 77Bb1 (rys. 2), z tą różnicą, że maksimum aktywności przypadało nie między 24 a 72 godziną badań, a dopiero po 120 i 168 godzinach inkubacji gleby (rys. 2d). Stwierdzono istotną statystycznie korelację pomiędzy aktywnością nitrogenazy szczepu 77Bb1 a rodzajem zastosowanej słomy: słomą żytnią ($r = 0,974$; $p < 0,01$), słomą owsianą ($r = 0,860$; $p < 0,01$) i słomą jęczmienną ($r = 0,954$; $p < 0,01$).

Aktywność nitrogenazy szczepów 4B1 i 83B1 była słabsza niż u szczepu 77Bb1. Najwyższą redukcję acetyleny u szczepu 83B1 w glebie stwierdzono również w obiektach z dodatkiem słomy żytniej, ale dopiero po 72 godzinach inkubacji ($r = 0,747$); (rys. 2 d). Redukcja acetyleny przez szczep 83B1 była około czterdziestokrotnie słabsza w madzie średniej pyłowej ze słomą niż w bezazotowych pożywkach mineralnych z dodatkiem słomy (rys. 2). Szczególnie niską aktywność stwierdzono w glebie z dodatkiem słomy owsianej ($r = 0,467$); (rys. 2b).

Ponieważ w glebie szczepy *Azospirillum* spp. były mało aktywne i redukcja acetyleny była bardzo słaba w porównaniu z wynikami w bezazotowych pożywkach mineralnych z dodatkiem słomy, szczególnie u szczepów 83B1 i 4B, nie sprawdzano aktywności nitrogenazy w mieszance tych szczepów.

DYSKUSJA

Węgiel występujący obficie w słomie (C:N=100:1) nie może być w pełni wykorzystany przez mikroorganizmy, ponieważ brak w niej dostatecznych ilości azotu i fosforu, niezbędnych do syntezy białka, kwasów nukleinowych i związków wysokoenergetycznych. Niedobór tych dwóch istotnych pierwiastków biogennych nie pozwala na szybkie zużywanie węgla jako źródła energii i jego przekształcanie w masę bakteryjną. Dlatego przy przyorwaniu słomy wskazane jest uzupełnianie środowiska przede wszystkim azotem. Na degradację słomy w glebie wpływa również wilgotność, skład granulometryczny – zawartość frakcji mechanicznych, a przede wszystkim koloidów glebowych oraz odczyn gleby i temperatura (17).

Słoma jest ważnym źródłem składników energetycznych dla całego zespołu organizmów glebowych, w tym wiążących wolny azot, dlatego wolne tempo degradacji słomy może być czynnikiem ograniczającym intensywność tego procesu. Rozkład słomy może prowadzić do nagromadzenia się w glebie lotnych kwasów tłuszczowych w stężeniach fitotoksycznych i zwiększenia podatności roślin na infekcje wywoływane przez grzyby z rodzaju *Fusarium* (10, 22). Powstawanie związków fitotoksycznych może być ograniczone przez nawożenie mineralne N i Ca, które przyspiesza również procesy rozkładu celulozy i hemicelulozy (18), a wapń powoduje dodatkowo neutralizację kwasów organicznych. Czynniki te mogą także stymulować wiązanie wolnego azotu, co było obserwowane w niektórych badaniach (20).

Halsall i in. (9) oraz Ladha i in. (13) donieśli o rozkładzie słomy pszenicy i słomy ryżowej oraz ksylanu przez czyste kultury *A. lipoferum* i *A. brasilense*.

Wong i in. (27) badając redukcję acetyleny w kulturach mieszanych z *A. lipoferum* i *A. brasilense* w pożywkach z czystą celulozą, stwierdzili po sześciu dniach najwyższe wiązanie azotu, które wynosiło około 310 nM/inokulum $\text{h}^{-1} \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej. Redukcja acetyleny przez te same szczepy bakterii w pożywkach ze słomą pszenicy i kukurydzy była o połowę mniejsza.

Szczepy *Azospirillum* spp. wyizolowane z endoryzosfery kukurydzy (*Zea mays*) były bardzo aktywne w wykorzystywaniu słomy różnych gatunków w wiązaniu wolnego azotu, szczególnie w bezazotowych pożywkach mineralnych. Wysoka aktywność nitrogenazy w tych warunkach utrzymywała się nawet po siedmiu dniach inkubacji. Dla szczepu 77Bb1 wynosiła powyżej 200 nM $\text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej, co świadczy o bardzo dobrym źródle węgla dla tej bakterii. Najwyższą redukcję acetyleny przy wiązaniu wolnego azotu stwierdzono prawie u wszystkich szczepów w pożywce ze słomą żyta. Wiadomo, że słoma żyta (i w mniejszej ilości innych zbóż) zawiera fitotoksyczne substancje, takie jak różnego typu związki fenolowe (z aromatycznymi pierścieniami benzenowymi) np: kwas ferulowy, waniliowy, fenylooctowy, 4-fenylooctowy, *p*-kumarowy, *o*-kumarowy, *p*-hydroksybenzoesowy, salicylowy i aldehyd salicylowy (25). Trzeba nadmienić, że w kukurydzy, skąd badane bakterie były izolowane, występują również pochodne kwasów hydroksamowych. Ponadto u szczepów celulolitycznych *Azospirillum* spp. stwierdzono obecność genów metabolicznego szlaku rozkładu węglowodorów aromatycznych: dioksygenazę 2,3-katecholową (C2,3-DO) i dioksygenazę naftalenową (NDO, 11). Prawdopodobnie niektóre z kwasów hydroksamowych, zawarte w słomie żytniej, mogły być pomocne i wykorzystywane dodatkowo przez te szczepy przy wiązaniu wolnego azotu. Szczepy bardzo aktywne w wykorzystywaniu słomy w wiązaniu wolnego azotu w pożywkach mineralnych po dodaniu do gleby traciły swoją aktywność. Wiadomo jednak, że są to bakterie przystosowane do wiązania wolnego azotu w strefie endoryzosferowej rośliny, a nie w glebie. Wiązanie azotu cząsteczkowego u *Azospirillum* sp. jest skomplikowane i zależy głównie od ilości azotu w podłożu oraz od zmian stężenia tlenu. Stwierdzono, że *Azospirillum* spp. i inne bakterie diazotroficzne izolowane ze strefy korzeniowej traw były bardzo tolerancyjne na mniejsze stężenie tlenu, gdy pochodziły z wnętrza korzenia (26).

Niektóre szczepy *Azospirillum* sp. wymagają do wzrostu obecności w podłożu witamin, biotyny i pirydoksyny oraz pierwiastków śladowych (14). Wszystkie gatunki bakterii z rodzaju *Azospirillum* dobrze rosną i wiążą wolny azot w obecności kwasów organicznych i ich soli, wykorzystują również różne cukry i alkohole. W glebie ich ilość może być niewystarczająca do wiązania wolnego azotu, natomiast w korzeniach roślin zapotrzebowanie bakterii na te związki jest zaspokojone. Bakterie ryzosferowe *Azospirillum* spp. podlegają w glebie różnym stresom i dlatego gromadzą wewnątrzkomórkowo zapasowe substancje energetyczne, aby w warunkach niesprzyjających móc z nich korzystać, jednak nie są to ilości wystarczające w środowisku glebowym poza ryzosferą. W glebie o dużym stężeniu soli komórki bakterii podlegają wysokiemu potencjałowi osmotycznemu, w suchej glebie niski

potencjał ogranicza ich aktywność i żywotność. Dlatego podłoża piaskowe lub gleba o małej zawartości substancji organicznej nie sprzyjają dobrej kolonizacji korzeni przez bakterie ryzosferowe z rodzaju *Azospirillum*, ponieważ adhezja tych bakterii do czystego piasku, w którym brakuje koloidów lub substancji organicznej, jest słaba. Jak donoszą Bashan i Levanony (2), bakterie wytwarzają w tym środowisku siatkę mostków białkowych pomiędzy swoimi komórkami a cząsteczkami kwarcu. Aby pokonać te bariery i skolonizować korzenie roślin, bakterie muszą użyć dużo energii na poruszanie się poprzez cząstki piasku czy gleby. Część energii, która mogłaby być zużytkowana na wiązanie azotu, tracona jest na przemieszczanie się w kierunku sprzyjających warunków.

WNIOSKI

1. Szczepy bakterii *Azospirillum* spp. wyizolowane z endoryzosfery kukurydzy charakteryzowały się wysoką aktywnością nitrogenazy podczas wzrostu i wiązania wolnego azotu w podłożu zawierającym słomę jako jedyne źródło węgla i energii.
2. Najefektywniejszym szczepem w mineralizacji słomy okazał się szczep 77Bb1 zarówno w pożywce zawierającej słomę jako jedyne źródło węgla i energii, jak i w glebie.
3. Wszystkie szczepy *Azospirillum* spp. najaktywniej rozkładały *in vitro* słomę owsianą i żytnią, a *in vivo* w glebie słomę żytnią.
4. Zdolność wiązania azotu cząsteczkowego przez *Azospirillum* spp. *in vitro* i *in vivo* przy wykorzystywaniu słomy jako jedyne źródła węgla i energii sugeruje, że szczepy te mogą uczestniczyć w procesach jej mineralizacji w glebach ubogich w azot.
5. Bakterie z rodzaju *Azospirillum* zasiedlające strefę korzeniową i wewnątrz korzeni zbóż rozkładają resztki poźniwne i zwiększają przyswajalność związków odżywczych zawartych w podłożu, co sprzyja wzrostowi i rozwojowi roślin.

LITERATURA

1. Abd-elMalek Y., Monib M., Gohar M.R., Rizk S.G., Antoun G.G.: Decomposition of organic matter under different conditions with special reference to changes in plant nutrients. Soil Organic Matter Studies Symp. IAEA-SM-211/27, IAEA, Vienna, 1976.
2. Bashan Y., Levanony H.: Interaction between *Azospirillum brasilense* CD and wheat root cells during early stages of root colonization. W: *Azospirillum*. IV. Ed. W. Klingmüller Springer Verlag, Berlin, 1988.
3. Brouzes R., Lasik J., Knowles R.: The effect of organic amendment, water content, and oxygen on the incorporation of $^{15}\text{N}_2$ by some agricultural and forest soils. Can. J. Microbiol., 1969, **15**: 899-905.
4. Chapin III F.S., Matson P.A., Mooney H.A.: Principles of terrestrial ecosystem ecology. Springer-Verlag, New York, N. Y, 10013, USA, 2002.

5. Darmwal N.S., Gaur A.C.: Associative effect of cellulolytic fungi and *Azospirillum lipoferum* on yield and nitrogen uptake by wheat. *Plant Soil.*, 1988, **107**: 211-218.
6. Döbereiner J., Marriell J.E., Nery M.: Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.*, 1976, **22**: 1464-1473.
7. Faure D., Bouillant M.L., Bally R.: Isolation of *Azospirillum lipoferum* 4T Tn5 mutants affected in melanization and laccase activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**: 3413-4315.
8. Halsall D.M., Gibson A.H.: Nitrogenase activity by diazotrophs grown on a range of agricultural plant residues. *Soil Biol. Biochem.*, 1989, **21**: 1037-1043.
9. Halsall D.M., Turner G.L., Gibson A.H.: Straw and xylan utilization by pure cultures of nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, **49**: 423-428.
10. Kaszubiak H., Kaczmarek W., Pędziwilk Z., Sawicka M., Muszyńska M., Durska G.: Zespoły drobnoustrojów pod uprawami roślin w monokulturze i w zmianowaniu. W: *Ekologiczne procesy w monokulturowych uprawach zbóż*. Wyd. Nauk. UAM, Poznań, 1990, 77-90.
11. Król M.J.: Wykorzystywanie przez wolno żyjące, ryzosferowe asymilatory azotu, węglowodórów aromatycznych jako substrat pierwotny podczas wiązania N_2 . Projekt badawczy Nr 3 PO6S 037 24, 2003.
12. Król M.J., Perzyński A.: Cellulose and xylan utilization by pure cultures of nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. 4th European Nitrogen Fixation Conference, September 16-20, Sevilla – Spain, 2000, 143.
13. Ladha J.K., Padre A.T., Nayak D.N., Garcia M., Watanabe I.: Nitrogen fixation by single and mixed heterotrophic bacteria in flooded paddy soils amended with hydrogen peroxide treated straw (hemicellulose). W: *Proceedings of the IV International Symposium on Microbial Ecology*, Ljubljana, Yugoslavia, 1986, 603.
14. Lopez-de Victoria G., Lovell C.R.: Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**: 2951-2955.
15. MacKenzie C.R., Bilous D.: Ferulic acid esterase from *Schizophyllum commune*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, **54**: 1170-1173.
16. Mckean W.T., Jacobs R.S.: Wheat straw as a paper fiber source: Seattle, Washington, The Clean Washington Center, accessed August 11, 2003, at <http://cwc.org/paper/pa971rpt.pdf>.
17. Molope M.B., Page E.R.: The contributions of fungi, bacteria and physical processes in the development of aggregate stability of a cultivated soil, in the roles of microorganisms in a sustainable agriculture. Edited by J.M. Lopez and R.D. Hodges, A B Academic Publishers, 1986.
18. Myśków W., Jaszczewska B., Stachyra A., Naglik E.: Substancje organiczne gleby – ich rolnicze i ekologiczne znaczenie. *Rocz. Glebozn.*, 1986, **37**: 15-35.
19. Patriquin D.G.: Nitrogen fixation in sugar cane litter. *Biol. Agric. Hort.*, 1982, **1**: 39-64.
20. Pietr S.J., Stankiewicz M., Lewicka T., Lubczyńska J., Węgrzyn T.: Wpływ przyorywania słomy na aktywność enzymatyczną gleb w warunkach polowych. *Zesz. Nauk. AR Wrocław, Rolnictwo*, LXXVIII, 2001, **409**: 75-95.
21. Pietr S.J., Lubczyńska J., Jarosz B.: Występowanie kwasów organicznych w glebach nawożonych słomą pszenicy ozimej i rzepaku ozimego w warunkach polowych. *Zesz. Nauk. AR Wrocław, Rolnictwo*, LXXVIII, 2001, **409**: 97-103.
22. Smagacz J.: Występowanie zgorzeli podstawy żdźbła i plonowanie pszenicy ozimej uprawianej po sobie w zależności od zaprawy nasiennej oraz częstotliwości nawożenia słomą. *Progr. Plant Protect./Post. Ochr. Rośl.*, 2005, **45(1)**: 441-447.
23. Smith J.L., Papendick R.I., Bezdicsek D.F., Lynch J.M.: Soil organic matter dynamics and crop residue management. W: *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*, F. Blaaime Meeting, Jr. (red) Marcel Deller, Inc., New York-Basel-Hong Kong, 1992, 65-94.
24. Strzelczyk E., Szpotański T.: Cellulolytic and pectolytic activity of streptomycetes isolated from root-free soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.). *Biol. Fertil. Soils*, 1989, **7**: 365-369.
25. Oleszek W.: Kwasy hydroksamowe żyta (*Secale cereale* L.) i ich aktywność allelopatyczna. *Fragm. Agron.*, 1995, **3(47)**: 9-19.

26. Sly L.I., Stackebrandt E.: Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. Int. J. Syst. Bacteriol., 1999, **49**: 541-544.
27. Wong P.P., Stenberg N.E., Edgar L.: Characterization of a bacterium of the genus *Azospirillum* from cellulolytic nitrogen-fixing mixed cultures. Can. J. Microbiol., 1980, **26**: 291-296.

UTILISATION OF STRAW IN FIXATION OF NITROGEN BY *AZOSPIRILLUM* SPP. STRAINS OF BACTERIA

Summary

Azospirillum spp. strains of bacteria were isolated from the endorhizosphere of maize (*Zea mays*), cultivated on different soils. These strains were able to degrade the straw. Nitrogen fixation of *Azospirillum* spp. strains (starved) determined, as reduction of C_2H_2 , was demonstrated in N-free medium with straw as the sole carbon source and in alluvial soil medium with straw over a time of 168 hours. The highest nitrogenase activity of *Azospirillum* spp. in N-free medium with straw as the sole carbon source was found after 24 h for 72 h. These ranged from 250 nM to 1000 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ of gas phase. The highest acetylene reduction of *Azospirillum* spp. in alluvial soil medium with straw was found after 168 hours: 68.2 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ of gas phase.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 VI 2007 r.