

Biologiczne wiązanie N₂, bakterie symbiotyczne roślin bobowatych w glebach Polski i oszacowywanie ich liczebności

Stefan Martyniuk

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

Abstrakt: Plonowanie roślin motylkowatych, podobnie jak wszystkich innych roślin uprawnych, zależy od wielu czynników środowiskowych, agrotechnicznych i biologicznych. Omawiana grupa roślin wyróżnia się jednak tym, że ich rozwój i plonowanie zależy także w znacznym stopniu od obecności w glebie specyficznej grupy bakterii, tj. bakterii wykazujących zdolność do biologicznego wiązania, czyli przyswajania azotu cząsteczkowego (atmosferycznego) w symbiozie z korzeniami tych roślin. Badania wykazały, że bakterie symbiotyczne (ryzobia) koniczyny, grochu i bobiku występują dość powszechnie w glebach Polski, nawet w glebach, na których od wielu lat nie uprawiano wymienionych roślin. Bakterii tych nie stwierdzono tylko w około 5% gleb (na 80 badanych) i były to gleby lekkie, silnie zakwaszone ($\text{pH}_{(\text{KCl})} < 4,5$). Bakterii symbiotycznych łubinu i fasoli nie wykryto w około 25% badanych gleb. Symbionty łubinu są najliczniejsze w glebach średnio zwięzłych i w glebach lekkich o odczynie lekko kwaśnym lub kwaśnym, czyli w glebach najczęściej obsiewanych tą rośliną. W większości naszych gleb brak jest bakterii symbiotycznych lucerny i soi lub liczebność tych bakterii jest mała, z wyjątkiem gleb obsiewanych tymi roślinami.

W związku z brakiem selektywnych podłoży do oznaczania liczebności bakterii symbiotycznych w glebach oszacowywanie populacji tych bakterii przeprowadza się metodami pośrednimi, w oparciu o wyniki biotestów z siewkami roślin bobowatych zaszczerpionych wzrastającymi rozcieńczeniami badanej gleby. W pracy opisano dokładnie różne sposoby przeprowadzania biotestów oraz określania liczebności ryzobiiów.

słowa kluczowe: biologiczne wiązanie N₂, rośliny bobowate, ryzobia, liczebność, gleba, oszacowanie

WSTĘP

Rośliny bobowate (motylkowate) są ważnym źródłem białka dla ludzi i zwierząt hodowlanych, a ich uprawa wpływa korzystnie na właściwości i żyzność gleb oraz na plonowanie roślin następczych, zwłaszcza w warunkach rolnictwa integrowanego i ekologicznego (Vance, 1998; Graham i Vance, 2003; Księżak, 2008). Plonowanie roślin motylkowatych, podobnie jak wszystkich innych roślin uprawnych, zależy od wielu czynników środowiskowych (gleba, klimat), agrotechnicznych (nawożenie, płodozmian) i biologicznych (odmiany hodowlane, organizmy szkodliwe). Omawiana grupa roślin wyróżnia się jednak tym, że ich rozwój i plonowanie przy ograniczonym nawożeniu azotem zależy także w znacznym stopniu od obecności w glebie pewnej specyficznej grupy bakterii, tj. bakterii wykazujących zdolność do biologicznego wiązania azotu cząsteczkowego (atmosferycznego) w symbiozie z korzeniami tych roślin (Strzelec, 1988; Singleton i in., 1992; Stasiak i in., 2016). Bakterie symbiotyczne roślin bobowatych poprzez wnikięcie do ich korzeni indukują powstawanie charakterystycznych narośli, tj. brodawek symbiotycznych (fot. 1), w których odbywa się proces wiązania azotu atmosferycznego, czyli jego redukcji do formy amonowej, przyswajalnej dla roślin (Wielbo i Skorupska, 2003; Stasiak i in., 2016).

WIĄZANIE AZOTU ATMOSFERYCZNEGO

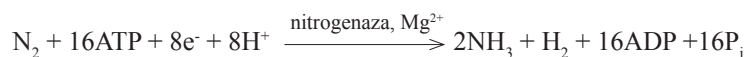
Z chemicznego punktu widzenia proces ten jest konwersją bardzo mało reaktywnego i w związku z tym nieprzyswajalnego dla roślin i zwierząt azotu cząsteczkowego (N₂) do zredukowanej formy tego pierwiastka, czyli amoniaku, który może być dalej metabolizowany w komórkach żywych organizmów. Wszystkie mikroorganizmy uzdolnione do redukcji azotu atmosferycznego przeprowadzają ten proces przy udziale złożonego układu enzymatycznego, w którym najważniejsza jest nitrogenaza – enzym

Autor do kontaktu:
Stefan Martyniuk
e-mail: sm@iung.pulawy.pl
tel.: +48 81 4786 962



Fotografia 1. Brodawki na korzeniach seradeli (*Ornithopus sativus* L., góra) i soi (*Glycine max* L., dół)
 Photography 1. Nodules on roots of serradella (*Ornithopus sativus* L., upper) and soybean (*Glycine max* L., bottom).

katalizujący bezpośrednio redukcję cząsteczki azotu (Philips, 1980; Kaminski i in., 1998; Martyniuk, 2002). Sumaryczne równanie biologicznego wiązania N₂ można przedstawić następująco:



Z równania tego wynika m.in., że biologiczna redukcja N₂ wymaga, oprócz nitrogenazy, także znacznych ilości energii w postaci ATP oraz siły redukcyjnej, czyli elektronów i protonów (H⁺). Nitrogenaza jest kompleksem dwóch komponentów białkowych zawierających metale w swoich aktywnych centrach; białko MoFe

(komponent I) oraz białko-Fe (komponent II). Białko-Fe jest homodimerem (2 podobne podjednostki o całkowitej masie cząsteczkowej ≈ 64 kDa) zawierającym dwa miejsca przyłączające Mg-ATP oraz jedno centrum [4Fe-4S] łączące podjednostki dimeru. Komponent I, czyli białko-MoFe, jest heterotetramerem (Mc ≈ 240 kDa) zawierającym po dwie kopie dwóch centrów aktywnych zwanych: kofaktorem-Fe-Mo oraz centrum-P. Kofaktor-FeMo składa się z 1Mo:7Fe:9S:1 homocystrynianu, natomiast centrum-P zawiera 8Fe:7S (Richards, 1997; Vance, 1998). Redukcja N₂ i innych substratów (acetylen, cyjanek) wymaga przejściowego połączenia białka-Fe z białkiem-MoFe. Elektrony z ferredoksyny lub flawodoksyny (silnie redukujące białka) przenoszone są do 4Fe-4S białka-Fe i po skompleksowaniu z Mg-ATP redukują białko-FeMo. W tym białku elektrony poprzez centrum-P przechodzą do kofaktora-FeMo, w którym następuje wiązanie i redukcja cząsteczki azotu i H⁺. Warto dodać, że u wszystkich mikroorganizmów wiążących N₂ nitrogenaza jest bardzo podobna, a nawet identyczna, zarówno pod względem strukturalnym, jak i funkcjonalnym. Różnice mogą dotyczyć jedynie występowania u niektórych bakterii nitrogenazy zawierającej w kofaktorze wanad (V) zamiast molibdenu (Mo) lub nawet nitrogenazy zawierającej tylko Fe (Kaminski i in., 1998). Inną ważną właściwością nitrogenazy jest to, że może być ona aktywna tylko w warunkach beztlenowych, a ściślej w środowisku zawierającym niewielką koncentrację O₂. Tlen w ilościach występujących np. w powietrzu trwale ją dezaktywuje. Z drugiej jednak strony asymilatory N₂, będące w znacznej większości drobnoustrojami tlenowymi, wymagają obecności tlenu cząsteczkowego, który jest im niezbędny w wielu procesach metabolicznych, m.in. jako akceptor elektronów i do wytwarzania ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej. Ten swoisty „paradoks tlenowy” u mikroorganizmów uzdolnionych do syntezy tego enzymu rozwiązywany jest w ciekawy i dość różnicowany sposób (Hennecke, 1997; Vance, 1998). Na przykład ochrona nitrogenazy przed toksycznymi stężeniami tlenu u wolno żyjących w środowisku wodnym i glebowym bakterii należących do rodzajów *Azotobacter*, *Nostoc* obejmuje takie mechanizmy jak: szybkie i intensywne wykorzystywanie tlenu do produkcji ATP w procesach oddechowych, duża aktywność enzymów hydrogenaza i katalaza oraz bariery fizyczne w postaci otoczek śluzowych, skupisk komórek lub heterocyst.

Jak już wspomniano powyżej, bakterie symbiotyczne wiążą N_2 w brodawkach, które są wytworem komórek wewnętrznych warstw kory pierwotnej korzeni roślin motylkowatych. Wyróżnia się na ogół dwie grupy brodawek różniące się kształtem, obecnością lub brakiem stożka merystematycznego oraz formą N transportowanego do rośliny (Hadri i in., 1998). Pierwsza grupa to brodawki posiadające aktywność merystematyczną, czyli brodawki o wzroście ciągłym. Brodawki te mają zwykle kształt wydłużony, zbliżony do cylindrycznego i transportują związany N_2 w postaci związków amidowych, jak np. u lucerny, koniczyny czy grochu. Druga grupa to brodawki zwykle okrągłe, posiadające ograniczoną (czasową) aktywność merystematyczną i transportujące związany N_2 w formie ureidów, np. u soi czy fasoli. W centralnej części brodawek znajdują się komórki roślinne upakowane licznymi symbiosomami, które powstają po otoczeniu komórek ryzobiów przez tzw. membranę peribakteroidalną pochodzenia roślinnego. W symbiosomach komórki ryzobiów przekształcają się w bakteroidy, czyli formę endosymbiotyczną wiążącą azot cząsteczkowy (Stasiak i in., 2016). Transformacja normalnych komórek ryzobiów do bakteroidów przebiega w kilku etapach, w czasie których zachodzi wiele zmian zarówno w morfologii, jak i fizjologii bakterii. W rezultacie tych przemian bakteroidy tracą m.in. zdolność do podziałów, zyskują natomiast najważniejszą cechę, czyli zdolność do wiązania N_2 , której nie mają na ogół ryzobia żyjące w glebie. Aby proces ten mógł przebiegać w sposób efektywny, partner roślinny musi zapewnić bakteroidom odpowiednie warunki, tj. niskie stężenie tlenu (5–30 nM) optymalne dla aktywności nitrogenazy oraz stały dopływ asymilatów, czyli źródeł energii dla bakteroidów. Wykazano, że aktywność nitrogenazy w brodawkach ujawnia się dopiero po rozpoczęciu syntezy w komórkach roślinnych leghemoglobiny, białka o czerwonym zabarwieniu, którego zawartość w aktywnych brodawkach może stanowić do 30% wszystkich białek rozpuszczalnych. Rola leghemoglobiny jest dwójaka; wykazując silne powinowactwo do O_2 , chroni nitrogenazę przed nadmiarem tlenu z zewnątrz, ale jednocześnie ułatwia ona stałą i efektywną dyfuzję tlenu do bakteroidów, który jest im niezbędny do produkcji energii w procesach oddechowych (Khan i in., 1998; White i in., 2007; Stasiak i in., 2016). W peryferyjnych częściach brodawek znajdują się wiązki przewodzące łączące się z centralnym systemem przewodzącym korzenia rośliny-gospodarza. Tą drogą roślina dostarcza do brodawek węglowodany, które są nie tylko źródłem energii dla bakteroidów, ale także podjednostkami węglowymi niezbędnymi w procesach asymilacji związanego amoniaku w komórkach roślinnych. Warto dodać, że w odróżnieniu od wolno żyjących asymilatatorów N_2 , które wiążą ten pierwiastek tylko dla potrzeb ich metabolizmu w warunkach jego niedoboru, bakteroidy wiążą azot głównie dla rośliny rosnącej na glebie ubogiej w azot. Tak więc u ryzobiów musiał wykształcić się mechanizm uniezależnienia syntezy

nitrogenazy od stanu zaopatrzenia komórek w N. Ponadto, bakteroidy wiążące N_2 praktycznie nie pobierają związanego azotu, stając się w praktyce „małymi fabryczkami” amoniaku permanentnie wpompowującymi ten związek do cytoplazmy komórek rośliny-gospodarza. W komórce roślinnej jon amonowy jest szybko wbudowywany do aminokwasów – glutaminy lub glutaminianu, i w wyniku dalszych przemian transportowany jest on poza brodawki w postaci związków amidowych (np. asparagina, glutamina u grochu, lucerny, koniczyny) lub związków ureidowych (np. alantoina u soi) (Vance, 1998; White i in., 2007).

WYSTĘPOWANIE BAKTERII SYMBIOTYCZNYCH W GLEBACH POLSKI

Omawiając bakterie symbiotyczne roślin bobowatych, warto dodać, że ich popularna nazwa „ryzobia” wywodzi się od nazwy rodzajowej *Rhizobium*, która jeszcze do początku lat osiemdziesiątych obejmowała wszystkie gatunki tych bakterii. Nowy, filogenetyczny podział tej grupy bakterii, oparty m.in. na analizie sekwencyjnej genów 16S rRNA, jest bardziej różnicowany (Wielbo i Skorupska, 2003; Stępkowski i in., 2018). W tabeli 1 przedstawiono najważniejsze rodzaje i gatunki bakterii symbiotycznych oraz nazwy najważniejszych roślin bobowatych (roślina-gospodarz) uprawianych w Polsce, z którymi bakterie te tworzą układy symbiotyczne. Omawiana symbioza ryzobia-rośliny bobowate charakteryzuje się dość dużą specyficznością, czyli powinowactwem poszczególnych gatunków bakterii tylko do określonego rodzaju rośliny-gospodarza. Na przykład, bakterie symbiotyczne koniczyny (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*) nie tworzą symbiozy z fasolą, lucerną czy grochem, i na odwrót. Innymi słowy, nie stwierdzono dotychczas uniwersalnego gatunku bakterii symbiotycznych, który tworzyłby symbiozę ze wszystkimi roślinami bobowatymi (Martyniuk, 2008; Sujkowska, 2009).

Bakterie symbiotyczne roślin motylkowatych (ryzobia) w czasie kiedy nie tworzą symbiozy z korzeniami roślin motylkowatych, bytują w glebie jako saprofity, a liczebność ich populacji w tym środowisku zależy od właściwości fizyczno-chemicznych i biologicznych gleb, czynników klimatycznych oraz zabiegów agrotechnicznych (Strzelec, 1988; Thies i in., 1991; Sadowsky i Graham, 1998). Wśród czynników agrotechnicznych wpływających na występowanie i liczebność glebowych populacji bakterii brodawkowych są: nawożenie NPK i wapnowanie oraz częstotliwość uprawy roślin motylkowatych na danym polu. Wyniki naszych badań (Martyniuk i in., 1999) przeprowadzonych w oparciu o wieloletnie doświadczenia poletkowe i polowe wskazują także, że reakcja poszczególnych gatunków bakterii brodawkowych na nawożenie mineralne i na wieloletnią przerwę w uprawie rośliny-gospodarza może być różna. Na przykład w dwóch glebach nawożonych NPK i wapnowanych, na których od ponad 20 lat

Tabela 1. Najważniejsze rodzaje i gatunki bakterii brodawkowych oraz rośliny bobowate, z którymi tworzą symbiozę
Table 1. Most important genera and species of root nodule bacteria and their host-legumes.

Rodzaj/gatunek bakterii Genus/species of bacteria	Roślina-gospodarz Host-plant
Rhizobium	
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	groch (<i>Pisum</i>), wyka, bobik (<i>Vicia</i>), soczewica (<i>Lens</i>), groszek/łędźwian (<i>Lathyrus</i>)
bv. <i>trifolii</i>	koniczyna (<i>Trifolium</i>)
bv. <i>phaseoli</i>	fasola (<i>Phaseolus</i>)
Sinorhizobium (Ensifer)	
<i>S. meliloti</i>	lucerna (<i>Medicago</i>), nostrzyk (<i>Melilotus</i>), kozieradka (<i>Trigonella</i>)
Bradyrhizobium	
<i>B. japonicum</i>	soja (<i>Glycine</i>)
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	lubin (<i>Lupinus</i>), seradela (<i>Ornithopus</i>)

Źródło; Source: Martyniuk, 2008

nie uprawiano roślin bobowatych, liczebność symbiontów koniczyny (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*) była stosunkowo wysoka i wynosiła około 1700 (głina lekka) i 171 (piasek słabogliniasty) komórek w 1 g gleby. W tych samych glebach nawożonych NPK, ale bez wapnowania populacje tego gatunku bakterii były znacznie niższe (odpowiednio 58 i <6 komórek w 1 g gleby). Podobne zależności stwierdzono w przypadku bakterii symbiotycznych grochu (*R.l.* bv. *viciae*), natomiast w badanych glebach nie wykryto obecności symbiontów lucerny (*Sinorhizobium meliloti*), niezależnie od wariantów nawożeniowych, co świadczy, że bakterie *S. meliloti* są dużo bardziej wrażliwe na wieloletnią przerwę w uprawie rośliny-gospodarza (lucerny) niż dwa pozostałe gatunki ryzobiów.

System gospodarowania (uprawy roślin) ma również wpływ na występowanie i liczebność zarówno wolno żyjących w glebie (*Azotobacter*), jak i symbiotycznych (ryzobia) asymilatorów N₂ (tab. 2). W systemie ekologicznym, charakteryzującym się bardziej rozbudowanym płodozmianem, m.in. z udziałem mieszanek traw z roślinami bobowatymi i poplonami z tych roślin, gleba zasiedlona jest przez większe populacje omawianych bakterii (Martyniuk i in., 1999).

Wyniki powyższych doświadczeń wskazały także na potrzebę przeprowadzenia szerszych badań nad występowaniem bakterii symbiotycznych roślin bobowatych drobnonasiennych, tj. koniczyny i lucerny oraz strączkowych takich jak groch, fasola i lubin w glebach naszego kraju. Badania takie przeprowadzono na próbkach około 80 gleb pobranych w różnych rejonów Polski (rys. 1), a liczebność bakterii symbiotycznych oszacowywano metodą biotestu roślinnego (Martyniuk i in., 2000, 2005). Metoda biotestu polega na zaszczepianiu siewek roślin bobowatych, rosnących na sterylnym piasku w torebkach foliowych, wzrastającymi rozcieńczeniami analizowanej gleby. Po 4–5 tyg. wzrostu w fitotronie analizowano obecność (lub brak) brodawek na korzeniach siewek zaszczepionych poszczególnymi rozcieńczeniami gleby i na tej podstawie oszacowano liczebność bakterii w glebach, posługując się odpowiednimi tablicami matematycznymi (Vincent, 1970). Opis tej ważnej metody przedstawiony zostanie szczegółowo w kolejnym rozdziale niniejszego opracowania.

Wyniki ww. badań wskazują (tab. 3), że zarówno występowanie, jak i liczebność bakterii symbiotycznych w glebach Polski są bardzo zróżnicowane. Bakterii symbiotycznych koniczyny nie stwierdzono tylko w czterech

Tabela 2. Liczebności (w 1 g s.m. gleby) *Azotobacter* spp. i bakterii symbiotycznych roślin bobowatych w glebie pod pszenicą ozimą uprawianą w systemie ekologicznym i konwencjonalnym
Table 2. Number (in 1 g soil d.m.) of *Azotobacter* spp. and symbiotic bacteria of legumes in soil under winter wheat grown organic and conventional system.

System	pH (H ₂ O)	<i>Azotobacter</i> spp.	Bakterie symbiotyczne: Symbiotic bacteria of:		
			koniczyny red clover	lucerny alfalfa	grochu pea
Ekologiczny; Organic	6,6	120	1,7 × 10 ⁴	1,1 × 10 ²	1,7 × 10 ³
Konwencjonalny; Conventional	5,6	0	5,8 × 10 ²	0	1,7 × 10 ²

Źródło; Source: Martyniuk, 2008



Rysunek 1. Miejsca pobrania oraz liczba próbek glebowych
Figure 1. Locations and numbers of collected soil samples.

Tabela 3. Występowanie oraz liczebność bakterii symbiotycznych roślin bobowatych w próbkach 80 gleb Polski
Table 3. Occurrence and number of symbiotic bacteria of legumes in samples of 80 Polish soils.

Liczebność ryzobiów w 1 g gleby Number of rhizobia in 1 g soil	Liczba gleb z bakteriami symbiotycznymi: Number of soils with symbiotic bacteria of:				
	koniczyny red clover	lucerny alfalfa	fasoli bean	grochu pea	łubinu lupine
Wysoka; High ($> 10^3$)	43	3	25	59	24
Średnia; Medium ($> 10^2 - 10^3$)	12	3	15	11	10
Niska; Low ($> 10 - 10^2$)	17	7	18	5	17
Bardzo niska; Very low (do; up to 10)	4	11	3	2	10
Nie wykryto; Not detected	4	56	15	3	19

Źródło: Martyniuk i in., 2005; Source: Martyniuk et al., 2005

glebach spośród 80 badanych, w 33 glebach liczebność tych bakterii była bardzo niska, niska lub średnia i aż w 43 glebach populacje symbiontów koniczyny były duże, czyli liczące ponad 1000 komórek bakteryjnych w 1 gramie gleby. Nieliczne gleby, w których nie stwierdzono bakterii symbiotycznych koniczyny lub ich populacje były niewielkie, to najczęściej gleby lekkie i zakwaszone, na których

prawdopodobnie nigdy nie uprawiano koniczyny. Tylko w 3 przypadkach próbki badanych gleb pobrane były z pól, na których rosła koniczyna, i w tych glebach populacje bakterii symbiotycznych były stosunkowo największe, ale podobne liczebności tych bakterii stwierdzono także w glebach, na których od dawna nie uprawiano koniczyny, a pod względem właściwości fizyczno-chemicznych były

to gleby średnie lub ciężkie, o odczynie lekko kwaśnym lub obojętnym.

Zasiedlenie gleb w naszym kraju przez bakterie symbiotyczne lucerny kształtuje się zupełnie inaczej niż przez omówione powyżej symbionty koniczyny. W zdecydowanej największej liczbie gleb, czyli w 56 na 80 badanych, nie wykryto ryzobiów lucerny (tab. 3). W 18 glebach populacje tych bakterii były bardzo niskie lub niskie i tylko 6 gleb zasiedlonych było przez średnie lub wysokie populacje bakterii symbiotycznych lucerny. Podobnie jak w przypadku symbiontów koniczyny, największą liczebność ryzobiów lucerny stwierdzono w próbkach 3 gleb obsianych tą rośliną. Jednak od wielu lat zdecydowana większość rolników w naszym kraju nie uprawia koniczyny i lucerny, ale ten fakt, czyli brak rośliny-gospodarza, jest niekorzystny tylko dla bakterii symbiotycznych lucerny, o czym świadczy brak lub niewielkie populacje symbiontów tej rośliny w większości gleb w Polsce (tab. 3).

Obecność bakterii tworzących brodawki na korzeniach fasoli sprawdzano w próbkach 76 gleb, spośród których tylko 3 próbki pochodziły z pól, na których uprawiano ostatnio fasolę. W tych trzech glebach stwierdzono największą liczebność symbiontów fasoli. W innych glebach, na których od dawna nie uprawiano tej rośliny, populacje ryzobiów fasoli wahały się od małych do dużych, a w 15 glebach nie wykryto symbiontów fasoli (tab. 3). Trudno jest jednak jednoznacznie stwierdzić, jakie czynniki decydują o braku lub obecności tych bakterii w badanych glebach. Brak lub niskie populacje symbiontów fasoli stwierdzano bowiem zarówno w glebach lekkich zakwaszonych, jak i w glebach związlejszych o prawidłowym odczynie. Ważnym czynnikiem sprzyjającym zasiedlaniu gleb przez ryzobia jest, jak już podkreślano, częstotliwość uprawy danej rośliny motylkowatej. Fasola jest rzadko uprawiana przez rolników na większych arealach, a w niektórych rejonach kraju wysiewana jest prawdopodobnie tylko w ogródkach warzywnych.

W omawianych badaniach 23 próbki gleb pochodziły z pól, na których w ostatnich latach uprawiano groch lub bobik. I w tych glebach stwierdzaliśmy największą liczebność bakterii symbiotycznych, wspólnych (tab. 1) dla tych roślin. Także w innych glebach, na których od dawna nie uprawiano ani grochu ani bobiku, populacje symbiontów były wysokie. Tylko w próbkach 3 gleb (tab. 3) nie stwierdziliśmy występowania bakterii brodawkowych grochu i bobiku, a były to gleby lekkie o bardzo kwaśnym odczynie, na których prawdopodobnie nigdy nie uprawiano tych roślin strączkowych. W oparciu o powyższe wyniki można więc stwierdzić, że bakterie symbiotyczne grochu i bobiku występują powszechnie w glebach Polski, podobnie jak bakterie brodawkowe koniczyny. Bakterii tych może być jednak brak w glebach lekkich, silnie zakwaszonych. Na takich glebach nie uprawia się jednak omawianych roślin.

Bakterie symbiotyczne łubinu analizowano w próbkach 80 gleb, z których tylko 4 pobrane były z pól obsianych tą rośliną i w tych glebach populacje ryzobiów

łubinu były oczywiście wysokie. Ale również w 20 innych glebach, na których w ostatnich latach nie uprawiano tej rośliny, stwierdzaliśmy dużo symbiontów łubinu (tab. 3). Najwięcej (37) gleb charakteryzowało się małymi lub średnimi populacjami symbiontów łubinu, a w 19 glebach nie stwierdzono obecności tych bakterii. Większość gleb, w których nie wykryto ryzobiów łubinu, to żyzne gleby, średnio związłe lub ciężkie o odczynie powyżej 6,5. Prawdopodobnie były to gleby, na których nigdy nie uprawiano łubinu. Gleby lekkie lub średnio związłe o odczynie kwaśnym lub lekko kwaśnym, czyli takie, które najlepiej nadają się do uprawy różnych gatunków łubinu, zawierają wystarczająco wysokie populacje bakterii symbiotycznych łubinu; nawet te gleby, na których od dawna nie uprawiano tej rośliny.

W przytoczonych powyżej badaniach analizowano zarówno zasiedlenie gleb przez bakterie symbiotyczne, jak i oszacowywano ich liczebność. Badanie zasiedlenia, czyli obecności (lub braku) bakterii symbiotycznych w glebie na jakimś polu, jest ważne z praktycznego punktu widzenia, zwłaszcza dla rolnika planującego uprawę wybranej rośliny bobowatej na tym polu. Bowiem od obecności w glebie aktywnych symbiotycznie bakterii brodawkowych tej rośliny zależeć będzie w znacznym stopniu intensywność brodawkowania i wiązania azotu, czyli w efekcie końcowym wysokość plonu. Badanie obecności bakterii symbiotycznych w glebie jest stosunkowo proste i możliwe do wykonania przez samego rolnika. Wystarczy na polu, na którym planowana jest uprawa wybranej rośliny bobowatej, wytyczyć na wiosnę poletko doświadczalne i wysiać na nim nasiona tej rośliny. Po około 4–6 tygodniach wzrostu należy wykopać część roślin wraz z korzeniami, zwracając uwagę, aby jak najmniej je uszkodzić. Po ostrożnym umyciu korzeni można przeprowadzić ocenę brodawkowania. Obecność na korzeniach licznych, czerwonych w środku brodawek (fot. 1) świadczy o obecności w badanej glebie aktywnych symbiotycznie bakterii brodawkowych badanej rośliny. Brak brodawek na korzeniach rośliny testowej nie jest jednak przeciwwskazaniem do jej uprawy na tym polu, bowiem dostępne są w handlu preparaty szczepionkowe zawierające bakterie symbiotyczne, którymi należy zaszczerpić przedsięwzięcie nasiona. Preparaty takie zapewniają prawidłowy rozwój symbiozy i uzyskanie satysfakcjonujących plonów, oczywiście pod warunkiem spełnienia innych wymagań uprawowych rośliny i kryteriów jakościowych preparatu szczepionkowego.

Wykrywanie obecności różnych mikroorganizmów w glebie, wodzie i innych materiałach, przeprowadzane jest najpowszechniej metodami konwencjonalnymi z wykorzystaniem podłoża (pożywek) selektywnych lub semi-selektywnych, czyli takich, które zawierają jakiś czynnik hamujący lub ograniczający rozwój innych (niż badany) mikroorganizmów. Niestety w przypadku bakterii symbiotycznych (ryzobiów) brak jest takich podłoży. Oczywiście dostępne są inne metody, np. immunologiczne czy molekularne, umożliwiające skuteczne wykrywanie obecności

i identyfikowanie różnych drobnoustrojów, w tym ryzobiów, ale ich przydatność do badań ilościowych jest ograniczona. Podłoża selektywne są często wykorzystywane także do oszacowywania liczebności mikroorganizmów w różnych środowiskach. Jak już wspomniano, takie podłoża nie są dostępne na potrzeby oznaczania liczebności ryzobiów w glebach. W związku z tym liczebność glebowych populacji bakterii symbiotycznych roślin bobowatych oszacowywana jest metodami pośrednimi (ZB i NPL, opisy poniżej), w oparciu o wyniki biotestów z siewkami roślin zaszczipionych wzrastającymi rozcieńczeniami badanej gleby.

OSZACOWYWANIE LICZEBNOŚCI BAKTERII BRODAWKOWYCH W OPARCIU O BIOTESTY ROŚLINNE

W biotestach tych siewki roślin bobowatych muszą rosnąć w warunkach aseptycznych, to znaczy na podłożu jałowym, a nasiona przed ich wysadzeniem należy dezynfekować w celu pozbycia się bakterii brodawkowych, którymi nasiona są zwykle zanieczyszczone.

Dezynfekcja nasion

Nieuszkodzone i o dobrej sile kiełkowania nasiona opłukać przez około 30 sekund w 95–96% etanolu. Następnie nasiona zanurzyć na 10 min. w jednym z następujących dezynfektantów: 3–5% woda utleniona (H_2O_2), 5% roztwór podchlorynu sodu ($NaClO$) lub stężony kwas siarkowy (H_2SO_4), zachowując odpowiednie środki ostrożności. Ten ostatni środek jest polecany tylko przy wyjaławianiu nasion o szorstkich i twardych okrywkach nasiennych, np. seradeli, gdyż jednocześnie skaryfikuje on takie nasiona. W celu usunięcia ww. dezynfektantów nasiona należy co najmniej 5-krotnie wypłukać w jałowej wodzie wodociągowej. Osuszone na jałowej bibule nasiona można bezpośrednio wysiewać do próbek testowych (lub innych pojemników) lub przed wysadzeniem podkiełkować je na zwilżonej i jałowej bibule lub na jałowym agarze wodnym w płytkach Petriego. Warunki podkiełkowania (czas, temperatura) dobrać tak, by korzonki miały długość 1–2 cm. Użycie siewek ze zbyt długimi korzonkami utrudnia ich wysadzenie i zwiększa możliwość uszkodzenia stożków wzrostu.

Biotest w próbkach

Biotesty z roślinami bobowatymi drobnonasiennymi, takimi jak lucerna, koniczyna czy seradela, przeprowadzane są najczęściej z wykorzystaniem laboratoryjnych próbek szklanych o średnicy 15–20 mm i wysokości 150–200 mm. Do próbek dodaje się 10–12 ml agarowej pożywki dla roślin zawierającej wszystkie mineralne składniki odżywcze z wyjątkiem azotu (N), zamyka się je korkiem wykonanym z waty i wyjaławia w temp. 121°C przez 20 min. w autoklawie. Przykładowy skład pożywki dla roślin wg Jensena (Vincent, 1970) jest następujący: $CaHPO_4$ – 1 g, K_2HPO_4 – 0,2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2 g,

$NaCl$ – 0,2 g, $FeCl_3$ – 0,1 g, woda – 1000 cm^3 , agar – 8 g (na słupek), 15 g (skosy). Po wyjęciu z autoklawu odstawić próbki do zastygnięcia agaru w pozycji pionowej („na słupek”) lub rozłożyć do uzyskania skosów. W przypadku wyboru pozycji pionowej (fot. 2) do próbek należy wlewać mniej, czyli 8–10 ml, pożywki agarowej zawierającej także mniej agaru ($8\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Przygotowywanie agaru „na słupek” jest wskazane zwłaszcza wtedy, gdy do próbek wkładane będą nasiona niepodkiełkowane, natomiast skosy agarowe są znacznie wygodniejsze przy wysadzeniu nasion z korzonkami (podkiełkowanych). Przed zaszczipianiem takich próbek należy odczekać 1–2 dni dla lepszego przywarcia korzonków do powierzchni podłoża na skosie. Przygotowywanie pożywki agarowej w formie skosów zalecane jest także wtedy, gdy siewki zaszczipiane będą 1 ml zawiesiny gleby. Inokulacja siewek „na słupku” taką objętością zawiesiny może niekorzystnie wpływać na ich wzrost, m.in. na skutek długiego zalegania płynu i rozwoju grzybów na powierzchni agaru, zwłaszcza w początkowych rozcieńczeniach (10^1 – 10^2) gleby (czarna powierzchnia na fot. 2).

Próbki zawierające 2–3 niepodkiełkowane nasiona wstawić do fitotronu lub innego pomieszczenia z kontrolowaną temperaturą i regulowanym oświetleniem. Umieszczenie próbek w statywach owiniętych folią aluminiową zabezpieczy korzenie siewek przed nadmiarem światła. Po kilku dniach siewki są gotowe do przeprowadzenia właściwego badania, czyli zaszczipiania ich zawiesiną badanego materiału, np. rozcieńczeniami gleby.

W omawianej metodzie przyjmuje się, że nawet pojedyncza komórka ryzobium wprowadzona od strefy korzeniowej rośliny-gospodarza (roślina bobowata) jest zdolna do indukowania brodawek na korzeniach rośliny testowej. Wyniki badań porównawczych, w których oznaczano liczebność czystych kultur ryzobiów za pomocą biotestów oraz metodą posiewu różnych rozcieńczeń zawiesiny bakteryjnej na pożywkę agarową, wykazały, że takie założenie jest prawdziwe. Po zaszczipieniu zestawu takich sterylnych siewek wzrastającymi rozcieńczeniami badanego materiału (gleby, szczepionki) i policzeniu roślin z brodawkami na korzeniach (po 4–5 tyg. wzrostu) można oszacować liczebność ryzobiów w wyjściowej próbce badanego materiału, wykorzystując do tego celu odpowiednie tabele matematyczne.

Wykonanie badania. Liczba potrzebnych próbek z siewkami zależy od wyboru metody oszacowywania liczebności bakterii brodawkowych w glebie i innych materiałach, np. w preparatach szczepionkowych z ryzobiami. Vincent (1970) podaje dwie metody badania liczebności: w pierwszej z nich oszacowywane jest **zagęszczenie bakterii – ZB** (density estimates) w oparciu o tabele Fishera i Yatesa, a druga bazuje na teorii „**najbardziej prawdopodobnej liczebności – NPL**” (most probable number – MPN) i tabelach opracowanych przez Brockwella.



Fotografia 2. Biotest próbek z siewkami koniczyny czerwonej (*Trifolium pratense* L.) rosnących na agarze „słupkowym”

Photography 2. Biotest with red clover (*Trifolium pratense* L.) seedlings growing on agar “deeps”.

Metoda „ZB” (tab. 4). Na potrzeby tej metody Vincent (1970) opracował tabele dla różnych rozcieńczeń gleby, np. 2-krotne, 4-krotne lub 10-krotne, z dwoma lub czterema powtórzeniami (n), czyli próbkami z siewkami w każdym rozcieńczeniu, oraz dla różnych serii rozcieńczeń (s), np. od 10¹ do 10⁴ (s = 4), czy od 10¹ do 10⁸ (s = 8). W badaniach glebowych populacji ryzobiów stosuje się najczęściej 10-krotne rozcieńczenia gleby, dlatego w tabeli 4 podano prawdopodobne liczebności bakterii dla 3 serii (s), 10-krotnych rozcieńczeń badanego materiału, z n = 2 i n = 4, czyli z 2 lub 4 próbkami z siewkami w każdym rozcieńczeniu.

Przykładowe badanie tą metodą liczebności bakterii symbiotycznych koniczyny w glebie. Przystępując do takich badań powinniśmy mieć gotowe do inokulacji kilkudniowe siewki koniczyny w próbkach. Liczba potrzebnych próbek z siewkami zależy od celu i zakresu badań. Je-

żeli potrzebne jest dokładne oszacowanie liczebności symbiontów koniczyny tylko w jednej glebie, można wybrać do tego celu biotest z serią 6 rozcieńczeń (s = 6) 10-krotnych tej gleby, z 4 próbkami z siewkami koniczyny w każdym rozcieńczeniu (n = 4), czyli do przeprowadzenia tego testu potrzebne są: 6 × 4 = 24 próbki z siewkami + 4 próbki kontrolne (bez inokulacji) = 28 próbek. Jeżeli badamy kilka czy nawet kilkanaście gleb, liczba potrzebnych próbek z siewkami i innych niezbędnych materiałów oraz pracochłonność znacząco wzrastają, dlatego w takiej sytuacji można wybrać podobną serię rozcieńczeń (s = 6), ale z 2 próbkami (siewkami) koniczyny dla każdego rozcieńczenia (tab. 4). Jeżeli są to siewki na słupkach agarowych, powinniśmy pamiętać, że należy je zaszczepiać 0,2 ml zawiesiny glebowej (rozcieńczenia), natomiast w przypadku siewek na skosach można używać 1 ml zawiesiny. Należy też pamiętać, że powinniśmy przygotować taką serię rozcieńczeń badanej gleby, aby uzyskać zawiesiny z ryzobiami i bez tych bakterii, czyli w efekcie siewki z brodawkami i bez brodawek korzeniowych. Do przygotowania rozcieńczeń badanej gleby potrzebny jest pojemnik (butelka) z 90 ml jałowej wody wodociągowej, jałowe próbki z 9 ml wody oraz sterylne pipety (1 ml) z wacikiem. Do butelki naważyć 10 g świeżej gleby i wytrząsać przez 5–10 min. Jest to pierwsze, czyli 10-krotne (10¹) rozcieńczenie gleby. W rozcieńczeniu tym 10 ml zawiesiny zawiera 1 g gleby. Kolejne rozcieńczenia, czyli 10², 10³, 10⁴, 10⁵ i 10⁶ wykonać w próbkach z 9 ml wody, przenosząc do nich za pomocą nowej pipety po 1 ml zawiesiny z poprzedniego rozcieńczenia. Mieszanie zawiesin na każdym etapie wykonujemy poprzez ostrożne wdmuchiwanie powietrza przez pipetę (bąbelkowanie) i poprzez kilkakrotne napełnienie i wydmuchanie płynu z pipety. Po wykonaniu ostatniego rozcieńczenia, w tym przykładzie 10⁶, zachowujemy pipetę i przystępujemy do zaszczepiania (inokulacji) nią siewek w próbkach. Inokulację rozpoczynamy od ostatniego, czyli największego rozcieńczenia (10⁶), pobierając 4 razy po 1 ml (lub 0,2 ml) zawiesiny gleby i zaszczepiając nią siewki w 4 próbkach. Podobnie postępujemy z kolejnymi rozcieńczeniami gleby. Po zakończeniu inokulacji próbki z siewkami przenosimy do komory wzrostowej (fitotronu) i po 4 tyg. wzrostu odczytujemy wynik, czyli liczymy próbki z brodawkującymi siewkami w każdym rozcieńczeniu. Na fotografii 2 widać, że siewki z brodawkami symbiotycznymi (rozcieńczenia 10¹ – 10⁴) są bardziej zielone i znacznie lepiej rozwinięte, niż siewki bez symbiozy, czyli zaszczepione najwyższymi rozcieńczeniami gleby (10⁵ i 10⁶), w których nie było już ryzobiów koniczyny. Poniżej przedstawiony jest wynik biotestu:

Rozcieńczenia gleby:	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	
Liczba próbek z brodawkującymi siewkami (+):	4	4	4	3	1	0	= 16

W metodzie **ZB** sumowane są wszystkie pozytywne wyniki, czyli +; w naszym przykładzie suma ta wynosi **16**. Następnie w tabeli 4 wybieramy odpowiednie rubryki, czyli: zastosowaliśmy 6 dziesięciokrotnych rozcieńczeń gleby, a więc $s = 6$, i 4 próbki w każdym rozcieńczeniu, czyli $n = 4$. Liczbie **16** w rubryce $n = 4$ odpowiada liczba **1700** ($1,7 \times 10^3$) w rubryce $s = 6$ i jest to prawdopodobna liczebność komórek ryzobiów koniczyny w 1 ml pierwszego rozcieńczenia gleby. Liczebność (x) w przeliczeniu na jednostkę masy gleby lub innego materiału wylicza się ze wzoru:

$$x = \frac{m \cdot d}{v \cdot g}$$

gdzie: m = prawdopodobna liczebność (z tabeli); d = pierwsze rozcieńczenie; v = objętość użyta do inokulacji siewek;

g = masa (objętość) badanej próbki (gleby). A zatem w naszym przykładzie w 1 gramie badanej gleby znajdowało się $\frac{1700 \cdot 10}{1 \cdot 1} = 1,7 \times 10^4$ komórek ryzobiów koniczyny.

Metoda NPL (tab. 5 i 6). Od strony technicznej przygotowanie siewek roślin testowych i rozcieńczeń badanej gleby oraz inokulacja siewek są takie same jak w metodzie ZB. Inny jest tylko sposób zapisywania wyników biotestu i odczytywania liczebności bakterii z tabeli. W tabeli 5 podano (Vincent, 1970) prawdopodobne liczebności bakterii symbiotycznych w oparciu o biotesty z siewkami w 3 powtórzeniach (dla każdego rozcieńczenia) zaszczerpianych szeregiem sześciu 10-krotnych rozcieńczeń badanej gleby.

Przykładowy wynik biotestu z 3 próbkami z siewkami zaszczerpienymi 1 ml każdego z sześciu 10-krotnego

Tabela 4. Liczebność ryzobiów oszacowana[#] w oparciu o biotest z siewkami roślin bobowatych zaszczerpienych wzrastającymi rozcieńczeniami (10-krotnymi) gleby w zależności od liczby rozcieńczeń (s) i liczby powtórzeń (n) w każdym rozcieńczeniu
Table 4. Number of rhizobia estimated[#] by a biotest with legume seedlings inoculated with 10-fold soil dilutions as dependent on dilution series (s) and number of replications (n) in each dilution.

Liczba próbek (roślin) z brodawkami (+) Number of tubes (plants) with nodules (+)		Zakres rozcieńczeń (liczba rozcieńczeń = s) Dilution steps (s)		
$n = 4$	$n = 2$	($s = 8$) $10 - 10^8$	($s = 6$) $10 - 10^6$	($s = 4$) $10 - 10^4$
32	16	$>7 \times 10^6$		
31		$>7 \times 10^6$		
30	15	$6,9 \times 10^6$		
29		$3,4 \times 10^6$		
28	14	$1,8 \times 10^6$		
27		$1,0 \times 10^6$		
26	13	$5,9 \times 10^5$		
25		$3,1 \times 10^5$		
24	12	$1,7 \times 10^5$	$>7 \times 10^4$	
23		$1,0 \times 10^5$	$>7 \times 10^4$	
22	11	$5,8 \times 10^4$	$6,9 \times 10^4$	
21		$3,1 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4$	
20	10	$1,7 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	
19		$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	
18	9	$5,8 \times 10^3$	$5,9 \times 10^4$	
17		$3,1 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$	
16	8	$1,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	>700
15		$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	>700
14	7	580	580	690
13		310	310	340
12	6	170	170	180
11		100	100	100
10	5	58	58	59
9		31	31	31
8	4	17	17	17
7		10	10	10
6	3	5,8	5,8	5,8
5		3,1	3,1	3,1
4	2	1,7	1,7	1,7
3		1,0	1,0	1,0
2	1	0,6	0,6	0,6
1		$<0,6$	$<0,6$	$<0,6$
0	0			

[#] Współczynniki 95% przedziału ufności; Factors for 95% fiducial limits (\cdot , \times): = 6,6 ($n = 2$), = 3,8 ($n = 4$)

Źródło: Vincent (1970), zmodyfikowane; Source: Vincent (1970), modified.

rozcieńczenia gleby (pierwsze rozcieńczenie zawiera 1 g gleby w 10 ml zawiesiny):

Rozcieńczenia gleby:	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
Liczba probówek z brodawkującymi siewkami (+):	3	3	2	1	0	0

W metodzie tej nie sumujemy pozytywnych wyników, czyli probówek z brodawkującymi siewkami, lecz taki właśnie wzór jak powyżej, czyli **332100**, odnajdujemy w tabeli 5 i odczytujemy prawdopodobną liczebność bakterii. Powyższemu wzorowi odpowiada **1470** komórek bakterii brodawkowych w 1 ml pierwszego rozcieńczenia, czyli aby obliczyć liczebność ryzobiów w 1 gramie badanej gleby należy 1470 pomnożyć przez 10, czyli $1470 \times 10 = 14700$ lub $14,7 \times 10^3$ komórek g⁻¹ gleby.

Jeżeli potrzebowalibyśmy dokładniejszego oszacowania liczebności bakterii symbiotycznych w glebie lub w innym materiale, np. w preparacie szczepionkowym do zaprawiania nasion, można przeprowadzić podobny biotest NPL, ale z szeregiem 5-krotnych rozcieńczeń gleby. W przypadku gdy spodziewamy się, że badany materiał może zawierać dużo bakterii brodawkowych, należy go wstępnie rozcieńczyć, np. 100-krotnie (10²) i od tego rozcieńczenia należy wykonać sześć dalszych 5-krotnych rozcieńczeń (Vincent, 1970). Biotest ten można przygotować w ten sposób, że ze 100-krotnego rozcieńczenia pobieramy 1 ml i dodajemy do 4 ml jałowej wody, dokładnie mieszamy i zawieszamy ją zaszczepiamy po 1 ml 4 probówki z siewkami. Zmieniamy pipetę i do pozostałego 1 ml zawiesiny dodajemy 4 ml jałowej wody, mieszamy i inokulujemy kolejne 4 probówki. Tak samo postępujemy aż do ostatniego rozcieńczenia (1:15625).

Przykładowy wynik biotestu z 4 probówkami z siewkami zaszczepionymi 1 ml każdego rozcieńczenia gleby, która była już na początku badania rozcieńczona 100×:

Rozcieńczenia gleby:	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:15625
Liczba probówek z brodawkującymi siewkami (+):	4	4	2	1	0	0

W tabeli 6 powyższy wzór, czyli **442100**, odpowiada **108** komórkom ryzobiów w 1 ml pierwszego, 100-krotnego rozcieńczenia gleby. Wartość ta pomnożona przez 100 (pierwsze rozcieńczenie) daje $10,8 \times 10^3$ g⁻¹ komórek bakterii brodawkowych w badanej glebie.

Biotesty z wykorzystaniem innych pojemników niż probówki

Jak już wspomniano, biotesty z siewkami roślin bobowatych, w oparciu o które oszacowywana jest liczebność bakterii symbiotycznych tych roślin w glebie (i innych materiałach), należy przeprowadzać w warunkach aseptycznych i w przypadku roślin drobnonasiennych, takich jak koniczyna, lucerna czy seradela, biotesty probówkowe są najlepszym rozwiązaniem. Jednak wykonanie biotestów probówkowych z roślinami strączkowymi grubonasiennymi, czyli charakteryzującymi się dużymi nasionami i odpowiednio dużymi siewkami, jest znacznie trudniejsze, głównie ze względu na fakt, że siewki tych roślin źle rozwijają się w probówkach, nawet o odpowiednio dużych rozmiarach. Z tego względu na potrzeby takich biotestów poszukiwano innych sposobów utrzymywania korzeni siewek roślin bobowatych w jałowych podłożach i w wa-

Tabela 5. Wzory biotestu (liczba probówek z brodawkującymi siewkami w kolejnych rozcieńczeniach) i odpowiadająca im prawdopodobna liczebność (NPL)[#] ryzobiów w 1 ml 10-krotnego rozcieńczenia gleby, dla testu z 6 wzrastającymi 10-krotnymi rozcieńczeniami gleby i 3 siewkami/probówkami w każdym z rozcieńczeń

Table 5. Biotest patterns (number of tubes with nodulating seedlings in successive dilutions) and respective most probable number (MPN)[#] of rhizobia in 1 ml of the first 10-fold soil dilution, for biotest with seedlings inoculated with 1 ml of successive 10-fold dilutions of the examined soil with 3 seedlings/tubes in each of six dilutions.

Wzór biotestu Biotest pattern	Prawdopodobna liczebność Probable number	Wzór biotestu Biotest pattern	Prawdopodobna liczebność Probable number
100000	4	332100	1470
200000	9	333100	4240
300000	23	333200	9190
		333300	23000
210000	15		
310000	42	333210	14700
320000	92	333310	42700
330000	230	333320	93300
		333330	240000
321000	147		
331000	424	333321	149000
332000	918	333331	462000
333000	2300	333332	1099000

[#] Współczynnik 95% przedziału ufności; Factor for 95% fiducial limits (:, ×) = 3,5

Źródło: Vincent (1970), zmodyfikowane; Source: Vincent (1970), modified.

Tabela 6. Wzory biotestu (liczba probówek z brodawkującymi siewkami w kolejnych rozcieńczeniach) i odpowiadająca im prawdopodobna liczebność (NPL)[#] bakterii w 1 ml pierwszego rozcieńczenia gleby^{##}, dla testu z sześcioma 5-krotnymi rozcieńczeniami gleby i 4 siewkami/probówkami w każdym z rozcieńczeń

Table 6. Biotest patterns (number of tubes with nodulating seedlings in successive dilutions) and respective most probable number (MPN)[#] of bacteria in 1 ml of the first soil dilution^{##}, for biotest with successive 5-fold dilutions of soil and with 4 seedlings/tubes in each dilution.

Wzór biotestu Biotest pattern	Prawdopodobna liczebność Probable number	Wzór biotestu Biotest pattern	Prawdopodobna liczebność Probable number	Wzór biotestu Biotest pattern	Prawdopodobna liczebność Probable number
100000	1,1	403000	18,1	444020	350
200000	2,6	413000	25,2	444120	490
300000	4,6	423000	36,4	444220	710
400000	8,0	433000	56,5	444320	1090
010000	1,0	441000	57	444030	450
110000	2,3	442000	81	444130	630
210000	4,0	443000	121	444230	910
310000	6,5	444000	202	444330	1410
020000	2,1	440100	54	444410	1430
120000	3,5	441100	75	444420	2030
220000	5,5	442100	108	444430	3020
320000	8,7	443100	164	444440	5050
030000	3,0	440200	71	444401	1350
130000	4,9	441200	98	444411	1880
230000	7,2	442200	141	444421	2690
330000	11,3	443200	218	444431	4100
410000	11,4	440300	91	444402	1770
420000	16,2	441300	126	444412	2450
430000	24,2	442300	182	444422	3530
440000	40,4	443300	282	444432	5440
401000	10,8	444100	290	444403	2260
411000	15,1	444200	410	444413	3140
421000	21,5	444300	600	444423	4550
431000	32,8	444400	1010	444433	7060
402000	14,1	444010	270	444441	7100
412000	19,6	444110	380	444442	10100
422000	28,3	444210	540	444443	15100
432000	43,6	444310	820	444444	25200

[#] Współczynnik 95% przedziału ufności; Factor for 95% fiducial limits (:, ×) = 2,6

^{##} lub w 1 ml rozcieńczenia, od którego rozpoczęto wykonywanie 5-krotnych rozcieńczeń; or in 1 ml of the dilution from which 5-fold dilutions were made.

Źródło: Vincent (1970), zmodyfikowane; Source: Vincent (1970), modified

runkach ograniczających do minimum możliwość wzajemnego zakażenia się siewek. W niektórych krajach, np. w USA, dostępne są w handlu specjalne torebki (growth pouches, Mega International) wykorzystywane głównie do obserwacji kiełkowania nasion i wzrostu korzeni siewek. Torebki te mają zwykle wymiary 16 × 20 cm i są wykonane z przezroczystej folii poliestrowej wytrzymałej autoklawowaniu w 121°C przez 15 min. Wewnątrz zawierają one sztywną bibułę, która w górnej części uformowana jest kształcie kołnierza z otworkami, przez które przechodzą korzonki kiełkujących nasion. Na dno wlewana jest odpowiednia ilość wody lub pożywki dla roślin, a bibuła działa jak knot, zapewniając odpowiednią wilgot-

ność dla korzeni. Badania wykazały, że omawiane torebki mogą być z powodzeniem wykorzystywane w biotestach z siewkami roślin bobowatych służących do oznaczania liczebności bakterii symbiotycznych, a zwłaszcza strączkowych grubonasiennych, takich jak soja czy groch (Somasegaran i Hoben, 1994). Torebki te nie są zanieczyszczone bakteriami brodawkowymi, a więc można ich używać bez dodatkowego wyjaławiania. Na dno torebek wlewa się po około 30 ml jałowej pożywki bezazotowej, a do kołnierza bibuły wyklada sterylne nasiona lub kilkunastu siewki. Po zaszczepieniu siewek zawieszoną badanej gleby zestawy torebek umieszcza się w specjalnych stelażach i przenosi do fitotronu lub innej komory wzrostowej dla roślin. Pomi-

mo że w tej metodzie siewki nie rosną w warunkach pełnej jałowości, badania wykazały, że uzyskiwane wyniki są w pełni wiarygodne (Woomer i in., 1990).

Podobną technikę zastosowali Martyniuk i in. (2000, 2005) w badaniach nad występowaniem i liczebnością bakterii symbiotycznych w glebach Polski. Na potrzeby tych badań opracowano biotesty, w których siewki roślin bobowatych rosły w torebkach wykonanych z przezroczystej folii polipropylenowej (Martyniuk i in., 2000). Dostępne w handlu torebki z tej folii dzielono przy użyciu zgrzewarki na mniejsze cele, których wielkość uzależniona była od rośliny testowej. W przypadku roślin, których siewki są małe (koniczyna, lucerna, seradela), stosowano torebki o szerokości 2,5 cm i wysokości 15 cm, a w przypadku roślin strączkowych grubonasiennych siewki tych roślin rosły w torebkach o wymiarach 5 × 20 cm. Mniejsze torebki napełniano około 30 g, a większe 180 g suchego piasku i ścianki torebek perforowano za pomocą igły preparacyjnej. Z względu na to, że w badaniach tych stosowano 4 powtórzenia dla każdego rozcieńczenia gleby, przygotowano zestawy po 4 torebki (fot. 3). Zestawy te wkładano po 4 do zlewek szklanych i wyjaławiano je w autoklawie przez 30 min. w temperaturze 121°C (1 atm) i po ostygnięciu piasek w torebkach uwilgniano jałową,

bezażotową pożywką (skład podany w punkcie „biotest w próbkach”) dla roślin (około 5 ml do małych i 30 ml do dużych torebek). Do tak przygotowanych torebek można wysadzać wyjałowione nasiona lub siewki, najlepiej po 2, przestrzegając zasad jałowości, i zaszczepić je 1 ml zawiesiny badanej gleby. Na potrzeby niniejszych badań wykonano z rur PCV zestawy specjalnych wazoników (fot. 4), do których przenoszono torebki z siewkami po ich zaszczepieniu rozcieńczeniami gleb. Wazoniki te chroniły korzenie siewek przed światłem i ułatwiały podlewanie jałową pożywką wprowadzaną na dno wazoników. Wazoników takich można używać wielokrotnie po ich wysterylizowaniu w 75% alkoholu etylowym lub innym środkiem dezynfekującym.

Większość korzeni siewek rośnie wzdłuż ścianek torebek i brodawki korzeniowe są wyraźnie widoczne, ale w przypadkach wątpliwych można łatwo przeciąć torebkę wzdłuż, otrząsnąć piasek i przeprowadzić obserwację, czyli stwierdzić obecność lub brak brodawek na korzeniach siewek testowych. Pozostałe zasady postępowania, w tym obliczanie wyników, są takie same jak w przypadku biotestów próbkowych.

Podobnie jak w przypadku biotestów z wykorzystaniem „growth pouches”, także w torebkach z piaskiem siewki



fot. S. Martyniuk

Fotografia 3. Torebki z piaskiem i siewkami lucerny (*Medicago sativa* L.) zaszczepionymi wzrastającymi rozcieńczeniami gleby (S1–S6)

Photography 3. Sand pouches with alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings inoculated with increasing soil dilutions (S1–S6).



Fotografia 4. Biotest z siewkami koniczyny (*Trifolium pratense* L.). W pierwszym szeregu siewki zaszczerpione rozcieńczeniami gleby bez symbiontów tej rośliny, a w kolejnych szeregach glebami z małą, średnią i dużą liczebnością ryzobliów koniczyny
 Photography 4. Biotest with seedlings of red clover (*Trifolium pratense* L.). In the first row seedling inoculated with dilutions of soil without symbionts of this plant and in upper rows inoculated with soils containing low, medium and numbers of clover rhizobia.

roślin testowych nie rosną w warunkach pełnej sterylności, jednak opisane powyżej zasady w zadawalającym stopniu te warunki zapewniają. Wyraźnie widoczna na zdjęciach różnica w wyglądzie siewek zaszczerpionych zawiesinami gleb zawierających ryzobia i zawiesinami bez tych bakterii wskazuje, że nie następuje wzajemne zakażenie się siewek, a uzyskiwane wyniki są wiarygodne (fot. 3 i 4).

PIŚMIENNICTWO

- Graham P.H., Vance C.P., 2003.** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131: 872-877, doi: org/10.1104/pp.017004.
- Hadri A-E., Spaink H.P., Bisseling T., Brewin N.J., 1998.** Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. W: *The Rhizobiaceae*; eds: H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas, Kluwer Acad. Pub., ss. 347-360.
- Hennecke H., 1997.** Rhizobial respiration to support symbiotic nitrogen fixation. W: *Biological nitrogen fixation for the 21st century*; eds: C. Elmerich, A. Kondorosi, W.E. Newton., Kluwer Acad. Pub., ss. 429-434.
- Kaminski P.A., Batut J., Boistard P., 1998.** A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia. W: *The Rhizobiaceae*; eds: H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas, Kluwer Acad. Pub., ss. 431-460.
- Khan M.L., McDermott T.R., Udvardi M.K., 1998.** Carbon and nitrogen metabolism in rhizobia. W: *The Rhizobiaceae*; eds: H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas, Kluwer Acad. Pub., ss. 461-485.
- Książek J., 2008.** Regionalne zróżnicowanie produkcji pasz objętościowych w Polsce. *Pamiętnik Puławski*, 147: 151-164.
- Martyniuk S., Woźniakowska A., Martyniuk M., 1999.** Effect of agricultural practices on populations of *Rhizobium* in some field experiments. *Botanica Lithuanica*, Suppl., 3: 99-102.
- Martyniuk S., Woźniakowska A., Martyniuk M., Oroń J., 2000.** A new sand pouch-plant infection technique for enumeration of rhizobia in soil. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 69: 257-261, doi: 10.5586/asbp.2000.033.
- Martyniuk S., 2002.** Systemy biologicznego wiązania azotu. *Nawozy i Nawożenie*, 1: 264-277.
- Martyniuk S., Oroń J., Martyniuk M., 2005.** Diversity and numbers of root-nodule bacteria (rhizobia) in Polish soils. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 74: 83-86, doi: 10.5586/asbp.2005.012.

- Martyniuk S., 2008.** Znaczenie procesu biologicznego wiązania azotu w rolnictwie ekologicznym. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 2008, 53(4): 9-14.
- Phillips D.A., 1980.** Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Annual Review of Plant Physiology*, 31: 29-49, doi: 10.1146/annurev.pp.31.060180.000333.
- Richards R.L., 1997.** Chemical models for the function of nitrogenase. W: *Biological nitrogen fixation for the 21st century*; eds: C. Elmerich, A. Kondorosi, W.E. Newton., Kluwer Acad. Pub., ss. 17-22.
- Sadowsky M.J., Graham P.H., 1998.** Soil biology of the *Rhizobiaceae*. W: *The Rhizobiaceae*; Spaink H.P, Kondorosi A., Hooykaas P.J.J. (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, ss. 155-172.
- Singleton P.W., Bohlool B.B., Nakao P.L., 1992.** Legume response to rhizobial inoculation in the tropics: myth and realities. W: *Myths and Science of Soils of the Tropics*; eds Lai R., Sanchez P., Madison, WI, SSSA Spec. Publ. No. 29, ss. 135-155, doi: 10.2136/sssaspecpub29.c8.
- Stasiak G., Mazur A., Koper P., Żebracki K., Skorupska A., 2016.** Symbioza ryzobionów z roślinami bobowatymi (*Fabaceae*). *Postępy Mikrobiologii*, 55(3): 289-299.
- Stępkowski T., Banasiewicz J., Granada C.E., Andrews M., Passaglia L.M.P., 2018.** Phylogeny and phylogeography of rhizobial symbionts nodulating legumes of the tribe Genistae. *Genes*, 9: 163-188, doi: 10.3390/genes9030163.
- Strzelec A., 1988.** Symbiotyczne wiązanie azotu. I. Znaczenie bakterii symbiotycznych, ich występowanie w glebach i szczepionki *Rhizobium* dla roślin motylkowatych. *Postępy Nauk Rolniczych*, 4(88): 17-30.
- Somasegaran P., Hoben H.J., 1994.** Handbook of Rhizobia. *Methods in Legume-Rhizobium Technology*. Springer-Verlag, New York, NY, 450 ss.
- Sujkowska M., 2009.** Przebieg procesu infekcji w układzie symbiotycznym rośliny motylkowate – *Rhizobium*. *Wiadomości Botaniczne*, 53(1/2): 35-53.
- Thies J.E., Singleton P.W., Bohlool B.B., 1991.** Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 19-28, doi: 10.1128/aem.57.1.19-28.1991.
- Vance C.P., 1998.** Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. W: *The Rhizobiaceae*; eds: H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas, Kluwer Acad. Pub., ss. 509-530.
- Vincent J.M., 1970.** A manual for practical study of root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 164 ss.
- White J., Prell J., James E.K., Poole P., 2007.** Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiology*, 144: 604-614, doi: 10.1104/pp.107.097741.
- Wielbo J., Skorupska A., 2003.** Ewolucja układu symbiotycznego *Rhizobium* – rośliny motylkowate. *Postępy Mikrobiologii*, 42(3): 263-283.
- Woomer P., Bennett J., Yost R., 1990.** Overcoming the inflexibility of most-probable number procedures. *Agronomy Journal*, 82: 349-353, doi: 10.2134/agronj1990.0002196200820020035x.

Stefan Martyniuk

BIOLOGICAL FIXATION OF N₂, SYMBIOTIC BACTERIA OF LEGUMES IN POLISH SOILS AND ESTIMATION OF THEIR NUMBERS

Summary

Yields of legumionous plants, as well as other arable crops, depend on numerous environmental, agro-technical and biological factors. In the case of legumes colonization of soils with a specific group of symbiotic bacteria which fix atmospheric nitrogen is also an important factor influencing the development and yields of these crops. Results of our survey have shown that symbiotic bacteria (rhizobia) of clover, faba bean and pea commonly occur in soils of Poland, even in soil not planted to these crops for a long time. These bacteria have not been detected only in about 5% of soils (out of 80 examined) and these were light and strongly acidic (pH_{KCl} < 4.5) soils. Symbiotic bacteria of lupine and field bean were not found in about 25% of the studied Polish soils. Symbionts of lupine were most numerous in light- and medium-textured soils with slightly acidic pH. In the majority of Polish soils symbiotic bacteria of alfalfa and soybean were not detected or their numbers were low, except those soil on which these plants were cropped recently.

Due to the lack of selective media to count root nodule bacteria in soils and other materials (inoculants) populations of these bacteria are usually assessed by indirect methods based on biotests with legume seedling inoculated with increasing dilutions of a studied soil. In this article different biotests and methods of estimation of rhizobial numbers are described.

Keywords: biological N₂ fixation, legumes, rhizobia, number, soil, estimation

Autor

ORCID

Stefan Martyniuk

0000-0002-0579-2495

data zarejestrowania pracy w redakcji Polish Journal of Agronomy: 10 lipca 2019 r.

data uzyskania recenzji: 24 września 2019 r.

data akceptacji: 26 września 2019 r.

