

Aktywność nitrogenazy endofitów bakteryjnych w glebie gliniasto-piaszczystej pod uprawą traw

J. STARZYK, D. SWĘDRZYŃSKA

*Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej, Uniwersytet Przyrodniczy
w Poznaniu*

Nitrogenase activity of bacterial endophytes in the sandy-loam soil under grass cultivation

Abstract: A dinitrogen fixation by bacteria living in symbiosis with leguminous plants is a widespread and well-known phenomenon. However, also some free-living bacteria, frequently entering into associations with various plants, reveal capabilities of fixing molecular nitrogen. Such endophytes include bacteria like *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropediceae*, discovered in countries of the tropical climate, where they lived in associations with plants characteristic for this climate as: sugar cane, sorgo and grasses. Until now, however, very little is known about the occurrence of these bacteria in the climate of the temperate zone. Therefore, the objective of this experiment was to find out the influence of the inoculation of Italian ryegrass, *Bromus willdenowii* and *Festulolium braunii* with *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropediceae* on N₂ fixation.

Key words: grass, dinitrogen fixation, *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropediceae*

1. Wstęp

Zapotrzebowanie gleby w azot, szczególnie na obszarach o rozwiniętym rolnictwie, uzupełniane jest przede wszystkim nawozami sztucznymi. Jednak ze względu na wysoką koszty- i energochłonność tego procesu należy zwrócić uwagę na możliwość pełniejszego wykorzystania przez człowieka zdolności wielu drobnoustrojów do wiązania azotu cząsteczkowego (KRUPKA, 1984).

Zdolność wiązania tego pierwiastka posiadają tylko te organizmy prokariotyczne, które potrafią syntetyzować nitrogenazę. Jest to enzym mający decydujące znaczenie w procesie biologicznego wiązania azotu atmosferycznego (SAWICKA, 1983; BARABASZ, 1991). Proces ten dostarcza około 60% występującego na Ziemi azotu w formie zredukowanej (MAZUR, 1991). Powszechnie znanym zjawiskiem jest wiązanie tego pierwiastka przez bakterie wchodzące w symbiozę z roślinami motylkowatymi. Jednakże, również bakterie swobodnie żyjące w glebie, wchodząc często w asocjacje z rośliną, wykazują zdolność wiązania azotu cząsteczkowego (BURNS i WSP., 1975).

Jako typowe endofity mogą zasiedlać tkanki roślin, nie wywołując ich objawów chorobowych. Do takich endofitów należą bakterie *Acetobacter diazotrophicus* i *Herbaspirillum seropediceae*, po raz pierwszy odkryte w krajach klimatu tropikalnego. Obecność tych bakterii stwierdzono pod uprawami roślin charakterystycznych dla tego regionu, m.in. pod uprawami trzciny cukrowej, sorgo, słodkich ziemniaków i traw (DÖBEREINER i WSP., 1992). Jednak dotychczas niewiele wiadomo na temat ich występowania w strefie klimatu umiarkowanego.

Celem niniejszych badań było zbadanie aktywności wiązania azotu atmosferycznego *Acetobacter diazotrophicus* i *Herbaspirillum seropediceae* w klimacie umiarkowanym w uprawie traw mających duże znaczenie gospodarcze w Polsce.

2. Materiał i metody

W doświadczeniu wykorzystano dwa szczepy bakterii: *Acetobacter diazotrophicus* (nr 5601) i *Herbaspirillum seropediceae* (nr 6445) pochodzące z Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów i Kultur Komórkowych w Braunschweigu.

Do doświadczeń wazonowych użyto trzy gatunki traw:

- stokłosa obiedkowata (*Bromus willdenowii* Humb. et Kunth), odmiana Broma
- festulolium (*Festulolium braunii* K. Richter, A. Camus), odmiana Felopa
- życica wielokwiatowa (*Lolium multiflorum* Lam.), forma tetraploidalna, odmiana Kroto.

Nasiona wszystkich gatunków traw pochodziły ze spółki Hodowla Roślin Szelejewo.

W doświadczeniach wazonowych zastosowano gleby pochodzące z dwóch różnych zakładów doświadczalnych: gleba z terenu Zakładu Doświadczalno-Dydaktycznego w Żłotnikach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, nazywana dalej glebą żłotnicką oraz gleba pobrana z terenu zakładu Hodowli Roślin Szelejewo, nazywana dalej glebą szelejewską. Pola doświadczalne, z których pochodziły obie gleby były terenami nieuprawianymi rolniczo, położone na wysoczyźnie morenowej zbudowanej z utworów zwałowych. Gleby określono jako piaski gliniaste mocne, zaliczono do typu gleb pływowych, w klasyfikacji rolniczej należące do kompleksu żytniego bardzo dobrego i dobrego.

Szczegółowe analizy chemiczne gleb przedstawiają się następująco:

Gleba żłotnicka:	pH 1M KCl	6,39
P ₂ O ₅	25,2 mg 100g ⁻¹ gleby,	I kl. zasobności
K ₂ O	30,6 mg 100g ⁻¹ gleby,	I kl. zasobności
Mg	14,9 mg 100g ⁻¹ gleby,	I kl. zasobności
C	0,46%	
N	0,052%	
próchnica	0,79%	
grupa granulometryczna – gleby średnie		
Gleba szelejewska:	pH 1M KCl	7,1
P ₂ O ₅	108 mg 100g ⁻¹ gleby,	I kl. zasobności
K ₂ O	39,5 mg 100g ⁻¹ gleby,	I kl. zasobności

Mg	14,2 mg 100g ⁻¹ gleby,	I kl. zasobności
C	0,42%	
N	0,049%	
próchnica	0,83%	

grupa granulometryczna – gleby średnie.

Badania prowadzono w hali wegetacyjnej. Doświadczenie założono w skrzyniach zawierających po 25 kg gleby.

Nasiona traw inokulowano bezpośrednio przed siewem zawiesinami bakterii *Acetobacter diazotrophicus* i *Herbaspirillum seropedicae*, w czterech kombinacjach doświadczalnych: rośliny nieszczepione (kontrola), szczepione *Acetobacter diazotrophicus*, szczepione *Herbaspirillum seropedicae*, szczepione *Acetobacter diazotrophicus* + *Herbaspirillum seropedicae*.

Zagęszczenie komórek w zastosowanych inokulatach wynosiło od 10⁷ do 10⁸ w 1 ml.

Nasiona traw wysiewano w skrzyniach w sposób rzutowy. Terminy oraz normy wysiewu przeprowadzone były zgodnie zasadami przyjętymi w warunkach produkcyjnych.

Pomiaru wiązania azotu atmosferycznego pod trawami dokonano metodą redukcji acetyleny do etylenu (SAWICKA, 1978) po 3, 7, 9 i 12 tygodniach od wysiewu.

Wyniki podano w nanomolach etylenu wykorzystując do przeliczeń teoretyczny współczynnik zamiany 3 (N₂ : C₂H₄ = 1 : 3). Etylen oznaczano na chromatografii gazowym CHROM 5.

3. Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują, że szczepienie traw *Acetobacter diazotrophicus* i *Herbaspirillum seropedicae* powodowało wzrost aktywności wiązania azotu atmosferycznego wraz z ich rozwojem. Aktywność nitrogenazy w obu glebach pod uprawą życicy wielokwiatowej wzrastała do 9-tego tygodnia rozwoju średnio od 0,8 nM etylenu w glebie nieszczepionej po 3 tygodniach od wysiewu do średnio 17 nM etylenu w dziewiątym tygodniu doświadczenia w przypadku szczepienia *Acetobacter diazotrophicus*. Jednak w ostatnim terminie zanotowano obniżenie aktywności nitrogenazy średnio o 74% w porównaniu z 9 tygodniem doświadczenia (tab. 1).

W przypadku stokłosa obiedkowatej aktywność nitrogenazy w obu glebach wzrastała stopniowo do 12-tego tygodnia rozwoju średnio od 0,6 nM etylenu w pierwszym terminie do średnio 9,13 nM etylenu w 12-stym tygodniu doświadczenia, co stanowi wzrost aktywności enzymatycznej aż o 94%. Najefektywniejszą kombinacją w przypadku stokłosa obiedkowatej okazało się zastosowanie obu szczepów bakterii łącznie, co dało 50% wzrost związanego gazu w porównaniu do kontroli w przypadku gleby żłotnickiej i 39% wzrost w przypadku gleby szelejewskiej (tab. 2).

Zdecydowanie najniższą aktywność nitrogenazy uzyskano pod festulolium, choć również w tym przypadku obserwowano tendencję wzrostu aktywności enzymatycznej w czasie, notując największe wartości w 12-tym tygodniu trwania doświadczenia. Najskuteczniejszym sposobem szczepienia festulolium również okazało się zastosowanie

Tabela 1 Aktywność nitrogenazy pod życią wielokwiatową szczepioną *Acetobacter diazotrophicus* i *Herbaspirillum seropediceae*
 Table 1. Nitrogenase activity under Italian ryegrass inoculated with *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropediceae*

Kombinacja wzrostowa Experimental treatment	Aktywności nitrogenazy (nm C ₂ H ₄ h ⁻¹ roślina ⁻¹) Nitrogenase activity (nm C ₂ H ₅ h ⁻¹ plant ⁻¹)							
	3 tydzień 3 week		7 tydzień 7 week		9 tydzień 9 week		12 tydzień 12 week	
	średnia mean	SD	średnia mean	SD	średnia mean	SD	średnia mean	SD
Gleba złotnicka – złotnicka soil								
kontrola	0,68	0,24	7,18	0,20	9,70	1,22	3,40	0,20
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	1,50***	0,28	11,49***	0,27	18,42***	0,63	7,10***	0,30
<i>Herbaspirillum seropediceae</i>	1,31***	0,20	7,40**	0,27	10,37*	0,70	4,36***	0,25
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> + <i>Herbaspirillum seropediceae</i>	1,74***	0,17	9,53***	0,30	14,63***	0,30	5,54***	0,33
Gleba szelejewska – szelejewska soil								
kontrola	0,95	0,27	7,79	0,36	10,06	0,30	3,98	0,24
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	2,05***	0,21	11,92***	0,33	15,06***	0,24	3,99	0,40
<i>Herbaspirillum seropediceae</i>	1,59***	0,30	7,88	0,28	10,53***	0,25	4,83***	0,25
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> + <i>Herbaspirillum seropediceae</i>	1,90***	0,25	9,95***	0,30	18,92***	0,33	5,90***	0,37

chylenie standardowe – standard deviation

ównanie kombinacji do kontroli przy poziomie istotności < 0,05 – comparison of treatments to control by significant level < 0.05.

ównanie kombinacji do kontroli przy poziomie istotności < 0,01 – comparison of treatments to control by significant level < 0.01.

ównanie kombinacji do kontroli przy poziomie istotności < 0,001 – comparison of treatments to control by significant level < 0.001.

2 Aktywność nitrogenazy pod *Bromus willdenowii* obiedkowaną szczepioną *Acetobacter diazotrophicus* i *Herbaspirillum seropedic*
 ble 2. Nitrogenase activity under *Bromus willdenowii* inoculated with *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedic*

Kombinacja badawcza Experimental treatment	Aktywności nitrogenazy (nm C ₂ H ₄ h ⁻¹ roślina ⁻¹) Nitrogenase activity (nm C ₂ H ₅ h ⁻¹ plant ⁻¹)							
	3 tydzień 3 week		7 tydzień 7 week		9 tydzień 9 week		12 tydzień 12 week	
	średnia mean	SD	średnia mean	SD	średnia mean	SD	średnia mean	SD
Gleba złotnicka – złotnicka soil								
kontrola	0,27	0,13	3,29	0,25	6,32	0,24	6,12	0,48
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	0,35*	0,11	3,55**	0,18	6,08*	0,33	6,54**	0,48
<i>Herbaspirillum seropedic</i>	0,21	0,11	4,16***	0,26	6,77***	0,43	8,32***	0,39
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> + <i>Herbaspirillum seropedic</i>	0,75***	0,25	9,05***	0,27	10,99***	0,48	10,93***	0,48
Gleba szelejewska – szelejewska soil								
kontrola	0,36	0,17	3,62	0,25	7,14	0,25	11,92	0,48
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	0,57***	0,19	4,09***	0,30	8,14***	0,28	8,51***	0,39
<i>Herbaspirillum seropedic</i>	0,34	0,15	4,54***	0,29	8,70***	0,28	8,07***	0,48
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> + <i>Herbaspirillum seropedic</i>	1,68***	0,16	10,72***	0,39	12,73***	0,29	12,65***	0,39

σ – odchylenie standardowe – standard deviation

* – porównanie kombinacji do kontroli przy poziomie istotności < 0,05 – comparison of treatments to control by significant level < 0.05.

** – porównanie kombinacji do kontroli przy poziomie istotności < 0,01 – comparison of treatments to control by significant level < 0.01.

*** – porównanie kombinacji do kontroli przy poziomie istotności < 0,001 – comparison of treatments to control by significant level < 0.001.

kombinacji obu testowanych endofitów, co dało około 43% wzrost aktywności nitroge-
nazy w obu glebach w porównaniu do roślin nieszczepionych (tab. 3).

Porównując aktywność enzymatyczną analizowanych gleb zarysowała się tendencja
podwyższenia aktywności nitroge-
nazy w glebie szelejewskiej zarówno w poszczegól-
nych terminach, jak i kombinacjach doświadczalnych. Różnice w aktywności enzyma-
tycznej obu zastosowanych w doświadczeniu gleb przedstawiono w tabeli 4.

Niskie wartości związanego przez trawy azotu po trzech tygodniach od wysiewu
nasion (średnio 1,5 nM etylenu w przypadku życicy wielokwiatowej, 0,56 nM etylenu
w przypadku stokłosa uniolowatej i 0,16 nM etylenu w przypadku festulium) mogą
świadczyc o tym, iż wprowadzone do gleby bakterie nie zdążyły się jeszcze namnożyć
w takiej ilości, która pozwoliłaby na odnotowanie znaczących efektów ich aktywności
enzymatycznej. W tym czasie wprowadzone do gleby drobnoustroje przechodziły praw-
dopodobnie okres adaptacji do nowych warunków środowiska.

Powszechnie wiadomo, że intensywność prowadzonego przez rośliny procesu foto-
syntezy jest wprost proporcjonalna do ich aktywności wiązania azotu atmosferycznego.
Powstające w procesie fotosyntezy związki organiczne stanowią źródło węgla i energii
dla bakterii. Stwierdzono, że czynniki, które mają wpływ na przebieg fotosyntezy (wyż-
sze stężenie CO₂), decydują o aktywności wiązania azotu przez mikroorganizmy.

Liczne badania procesu fotosyntezy u roślin potwierdziły zależność, iż im większy
wskaźnik powierzchni liścia rośliny, tym większe natężenie fotosyntezy. Około 80%
padającego na roślinę światła ulega absorpcji przez chlorofil chloroplastów (FOGG, 1972).

Wzrost aktywności nitroge-
nazy w 9. i 12. tygodniu rozwoju traw sugeruje nasilenie
procesu fotosyntezy związane z rozwojem roślin, a tym samym zwiększeniem
powierzchni liści i ilości zawartego w nich chlorofilu.

Przeprowadzono liczne doświadczenia polowe, zarówno w strefie klimatu tropikal-
nego jak i umiarkowanego, w których stwierdzano wiązanie azotu atmosferycznego (DE
CONINCK i WSP., 1988; SAWICKA, 1996, 1997). Choć na sumę związanego azotu składa
się aktywność licznych drobnoustrojów diazotoficznych, to niektóre z nich, jak *Azospiril-
lum*, potrafią związać 30–40 kg azotu rocznie w asocjacji z trawami i do 200 kg w asocja-
cji z trzciną cukrową (CHALK, 1991). DÖBEREINER i WSP., [1972] stwierdziła, że w ryzos-
ferze tropikalnej trawy *Paspalum notatum* bardzo licznie występuje bakteria *Azotobacter
paspali*, która potrafi w obecności tej rośliny związać aż 90 kg N ha⁻¹ rocznie.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki aktywności wiązania azotu przez szczepy
Acetobacter diazotrophicus i *Herbaspirillum seropediceae* w klimacie umiarkowanym
pod testowanymi gatunkami traw są znacznie niższe niż wyniki podobnych badań
prowadzonych w krajach tropikalnych, potwierdzające zdolność tych szczepów bakterii do
zaopatrywania upraw w azot w ilościach nawet ponad 100 kg/ha rocznie (BODDEY
i WSP., 1991; KLAMA, 2004a; KLAMA, 2004b).

Również badania nad wiązaniem azotu przez *Azospirillum* prowadzone w Polsce nie dały
pozytywnych wyników. SWĘDRZYŃSKA (1998) prowadząc badania nad *Azospirillum brasi-
lense* nie stwierdziła wiązania przez nie azotu w uprawach zbóż klimatu umiarkowanego.

Bakterie *Acetobacter diazotrophicus* i *Herbaspirillum seropediceae*, a także *Azospiri-
llum* należą do bakterii swobodnie żyjących w glebie, a jednocześnie do bakterii sym-
biotroficznych, żyjących nie tylko w ryzosferze roślin, ale także na ich powierzchni oraz

Tabela 3. Aktywność nitrogenazy pod *Festulolium braunii* szczepioną *Acetobacter diazotrophicus* i *Herbaspirillum seropedicaceum*.
 Table 3. Nitrogenase activity under *Festulolium braunii* inoculated with *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicaceum*.

Kombinacja dozwolona combinational treatment	Aktywności nitrogenazy (nm C ₂ H ₄ h ⁻¹ roślina ⁻¹) Nitrogenase activity (nm C ₂ H ₅ h ⁻¹ plant ⁻¹)							
	3 tydzień 3 week		7 tydzień 7 week		9 tydzień 9 week		12 tydzień 12 week	
	Średnia mean	SD	Średnia mean	SD	Średnia mean	SD	Średnia mean	SD
Gleba złotnicka – złotnicka soil								
Kontrola control	0,12	0,02	2,04	0,16	2,39	0,27	2,39	0,16
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	0,15***	0,01	2,16*	0,19	2,39	0,28	2,50	0,22
<i>Herbaspirillum seropedicaceum</i>	0,11*	0,02	2,97***	0,22	4,33 ***	0,23	3,31***	0,16
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> + <i>Herbaspirillum seropedicaceum</i>	0,23***	0,02	4,05***	0,23	3,19***	0,27	4,48***	0,22
Gleba szelejewska – szelejewska soil								
Kontrola control	0,14	0,02	2,15	0,20	2,69	0,16	2,56	0,16
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	0,16	0,02	2,45***	0,18	3,00***	0,23	3,08***	0,30
<i>Herbaspirillum seropedicaceum</i>	0,12***	0,02	3,27***	0,24	3,56***	0,21	3,53***	0,22
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> + <i>Herbaspirillum seropedicaceum</i>	0,26***	0,02	4,14***	0,26	4,61***	0,21	4,63***	0,16

Odchylenie standardowe – standard deviation

Porównanie kombinacji do kontroli przy poziomie istotności < 0,05 – comparison of treatments to control by significant level < 0.05.

Porównanie kombinacji do kontroli przy poziomie istotności < 0,01 – comparison of treatments to control by significant level < 0.01.

Porównanie kombinacji do kontroli przy poziomie istotności < 0,001 – comparison of treatments to control by significant level < 0.001.

4. Porównanie aktywności nitrogenazy w glebie złotnickiej i szelejewskiej w obrębie tych samych kombinacji doświadczalnych poszczególnych traw

4. Comparison of nitrogenase activity in złotnicka and szelejewska soils within the same experimental treatments for particular

Kombinacja doświadczalna Experimental treatment	Różnica procentowa aktywności nitrogenazy w glebach Percentage difference nitrogenase activity in soils							
	3 tydzień 3 week		7 tydzień 7 week		9 tydzień 9 week		12 tydzień 12 week	
	różnica difference %	<i>p</i>	różnica difference %	<i>p</i>	różnica difference %	<i>p</i>	różnica difference %	<i>p</i>
<i>Bromus willdenowii</i>								
la	31%	NS	10%	<i>p</i> < 0,001	13%	<i>p</i> < 0,001	95%	<i>p</i> < 0,
acter ophicus	63%	<i>p</i> < 0,001	15%	<i>p</i> < 0,001	34%	<i>p</i> < 0,001	30%	<i>p</i> < 0,
pirillum dicae	64%	<i>p</i> = 0,003	9%	<i>p</i> < 0,001	29%	<i>p</i> < 0,001	-3%	NS
acter + pirillum	125%	<i>p</i> < 0,001	18%	<i>p</i> < 0,001	16%	<i>p</i> < 0,001	16%	<i>p</i> < 0,
<i>Lolium multiflorum</i>								
la	40%	<i>p</i> < 0,001	9%	<i>p</i> = 0,002	4%	NS	17%	<i>p</i> < 0,
acter ophicus	18%	<i>p</i> < 0,001	4%	<i>p</i> < 0,001	3%	<i>p</i> = 0,002	-44%	<i>p</i> < 0,
pirillum dicae	22%	<i>p</i> = 0,001	6%	<i>p</i> < 0,001	2%	NS	11%	<i>p</i> < 0,
acter + pirillum	27%	<i>p</i> < 0,001	4%	<i>p</i> < 0,001	3%	<i>p</i> < 0,001	7%	<i>p</i> = 0,

Festulolium braunii

la l	15%	$p = 0,002$	6%	NS	12%	$p < 0,001$	7%	$p = 0,$
acter ophticus	6%	NS	13%	$p < 0,001$	26%	$p < 0,001$	23%	$p < 0,$
pirillum dicae	9%	NS	10%	$p < 0,001$	12%	$p < 0,001$	6%	$p = 0,$
acter + pirillum	15%	$p < 0,001$	2%	NS	6%	$p = 0,001$	3%	$p = 0,$

liczany był z różnicy między średnią aktywnością nitrogenazy w glebie złotnickiej a szelejewskiej dzielone przez aktywność w glebie złotnickiej – difference between average nitrogenase activity in the złotnicka and szelejewska soils divided by activity in złotnicka soil.

om istotności – level of significance.

istotne ($p > 0,05$) – no significant ($p > 0.05$).

w przestworach międzykomórkowych tkanek korzeni, a czasem liści i łodyg roślin (PAULA i WSP., 1991; OLIVARES, 1996). Są to mikroorganizmy o specyficznych wymaganiach w stosunku do tlenu, produkowanych przez roślinę asymilatów, a tym samym dużą wybiórczością względem rośliny – gospodarza (PRERIA, 1995, KLAMA, 2006). Fakt ten może stanowić uzasadnienie niższych wartości związanego azotu przez bakterie w obecności testowanych roślin klimatu umiarkowanego.

4. Wnioski

- Szczepy *Acetobacter diazotrophicus* i *Herbaspirillum seropediceae* różnią się między sobą aktywnością nitrogenazy w glebie pod testowanymi trawami.
- Najlepszy efekt dało szczepienie życicy wielokwiatowej *Acetobacter diazotrophicus*, a stokłosa obiedkowatej i festulolium połączeniem obu szczepów bakterii, dając znacznie wyższe wartości aktywności wiązania azotu w porównaniu z pozostałymi kombinacjami doświadczalnymi.
- Niezależnie od rodzaju bakterii najwyższą wartość związanego azotu zanotowano w 9-tym tygodniu od wysiewu nasion pod życią wielokwiatową, oraz 12-tym tygodniu pod pozostałymi trawami, co wiąże się zarówno z rozwojem bakterii, jak i wzrostem kondycji rośliny.
- Niezbyt duże wartości związanego azotu przez *Acetobacter* i *Herbaspirillum* pod testowanymi gatunkami traw nie wykluczają zasadności poszukiwań innych układów roślinna – diazotrofy, dających jeszcze lepsze rezultaty.

Literatura

- BARABASZ W., 1991. Mikrobiologiczne przemiany azotu glebowego. Biogeochemia azotu glebowego. Postępy Mikrobiologii, 30, (4), 395–410.
- BODDEY R.M., URQUIAGA S., REIS V., DÖBEREINER J., 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. Plant and Soil, 137, 111–117.
- BURNS R.C., HARDY R.W.F., 1975. Nitrogen fixation in Bacteria and Higher Plants. Springer – Berlin, Heidelberg, New York, 124.
- CHALK P.M., 1991. The contribution of associative and symbiotic nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of non-legumes. Plant and Soil, 132, 29–39.
- DE CONINCK K., HOREMANS S., RANDOMBAGE S., VLASSAK K., 1988. Occurrence and survival of *Azospirillum* spp. in temperate regions. Plant and Soil, 110, 213–218.
- DÖBEREINER J., DAY J.M., DART P.J., 1972. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum* – *Azotobacter paspali* association. Journal of General Microbiology, 71, 103–106.
- DÖBEREINER J., REIS V.M., PAULA M.A., OLIVARES F., 1992. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereales and tuber plants. New horizons in nitrogen fixation. Proceedings of the 9th Int. Congress on Nitrogen Fixation, Cancun, Mexico, 671–676.
- FOGG G.E., 1972. Fotosynteza. PWN. Warszawa, 69–73.

- KLAMA J., 2004a. Współzycie endofitów bakteryjnych z roślinami. *Acta Scientiarum Polonorum, Agricultura*, 3, (1), 19–28.
- KLAMA J., 2004b. *Herbaspirillum seropedicae* – efektywny diazotrof klimatu umiarkowanego? *Kosmos*, 53, (2), 225–229.
- KLAMA J., NIEWIADOMSKA A., WOLNA-MARUWKA A., 2006. Wpływ bakterii endofitycznych na zmiany liczebności drobnoustrojów glebowych. *Acta Agraria et Silvestria, Seria Agraria*, 49, 245–255.
- KRUPKA H.M., 1984. Wybrane problemy biologicznego wiązania azotu atmosferycznego. *Wiadomości Ekologiczne*, 30, (3), 249–270.
- MAZUR T., CZUBA R., GORLACH E., KALEMBASA S., ŁOGINOW W., 1991. Azot w glebach uprawnych. PWN, Warszawa, 226.
- OLIVARES F.J., BALDANI V.L.D., REIS V.M., BALDANI J.I., DÖBEREINER J., 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, 21, 197–200.
- PAULA M.A., REIS V.M., DÖBEREINER J., 1991. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biol. Fertil. Soils*, 11, 111–115.
- PEREIRA J.O., 1995. Microorganismos endofíticos em espécies tropicais. *Reuniao Annual de Genetica de Microorganismos*, 3, 20.
- SAWICKA A., 1978. Aktywność wiązania azotu w glebie oznaczona metodą redukcji acetyleny. *Roczniki AR w Poznaniu*, 102, 103–110.
- SAWICKA A., 1983. Ekologiczne aspekty wiązania azotu atmosferycznego. *Roczniki AR w Poznaniu. Rozprawy naukowe*, 134.
- SAWICKA A., 1996. Nitrogen fixation in soils of the Turew agricultural landscape. W: *Dynamics of an Agricultural Landscape*. Eds. Ryszkowski L., Frenč N.R., Kędziora A. PWRiL, Poznań, 204–212.
- SAWICKA A., 1997. Czynniki ograniczające wiązanie azotu atmosferycznego u roślin motylkowych i u traw. *Biuletyn Oceny Odmian*, 29, 59–63.
- SWĘDRZYŃSKA D., 1998. Ocena możliwości wykorzystania bakterii z rodzaju *Azospirillum* w uprawach wybranych zbóż. *Maszynopis rozprawy doktorskiej, Katedra Mikrobiologii Rolnej, AR Poznań*, ss. 107.

Nitrogenase activity of bacterial endophytes in the sandy – loam soil under grass cultivation

J. STARZYK, D. SWĘDRZYŃSKA

Department of General and Environmental Microbiology, Poznań University of Life Sciences

Summary

Pot experiment was established on a sandy loam soil under cultivation of three grass species: Italian ryegrass, *Bromus willdenowii* and *Festulolium braunii*. The seeds of grasses were inoculated with *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and mixture of both bacteria

species. The nitrogenase activity in the soil under cultivated grass was measured after 3, 7, 9, and 12 weeks from the time of sowing. It was noted differences between enzymatic activity under tested plants. The highest activity was noted under Italian ryegrass and the lowest level of the nitrogenase activity under *Festulolium* cultivation. The enzymatic activity in all cases increased along with grass development. The highest nitrogenase activity was noted after 9 and 12 weeks under inoculated grass. The best effect was recorded in Italian ryegrass inoculated with *Acetobacter diazotrophicus* and in application a mixture of both bacterial species in other grasses. In this treatments the dinitrogen fixation activity reached up to 48% under Italian ryegrass, 44.5% under *Bromus willdenowii* and 43% under *Festulolium braunii* in comparison with control combinations.

Adres do korespondencji – Address for correspondence:

Dr inż. Justyna Starzyk
Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Szydlowska 50, 60-656 Poznań
tel. 61 846 67 20, fax. 61 848 71 90
e-mail: jstarzyk@up.poznan.pl