

Wpłynęło 26.10.2016 r.
Zrecenzowano 01.03.2017 r.
Zaakceptowano 09.03.2017 r.
A – koncepcja
B – zestawienie danych
C – analizy statystyczne
D – interpretacja wyników
E – przygotowanie maszynopisu
F – przegląd literatury

ZASTOSOWANIE DROBNOUSTROJÓW O DZIAŁANIU SYNERGISTYCZNYM W PROCESIE BIOLOGICZNEGO WIĄZANIA AZOTU

Zyta WARACZEWSKA^{ABEF}, Alicja NIEWIADOMSKA^{ABD},
Donata KOSICKA-DZIECHCIAREK^{EF}

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Katedra Mikrobiologii
Ogólnej i Środowiskowej

Streszczenie

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie optymalizacją i zwiększeniem biologicznego wiązania azotu przez układy symbiotyczne z równoczesną poprawą właściwości chemicznych, biologicznych i fizycznych gleby. Cele te mogą być realizowane w ramach zielonej biotechnologii, w tym przez wykorzystanie mikroorganizmów stymulujących wzrost roślin, tzw. PGPR (ang. Plant Growth Promoting Rhizobacteria), poprzez zastosowanie koinokulacji (jednoczesnego szczepienia) makrosymbiontów (roślin) odpowiednim szczepem z rodziny *Rhizobiaceae* oraz endofitem o działaniu synergistycznym.

Bakterie z grupy PGPR, stosowane do koinokulacji w uprawach roślin bobowatych mogą wpływać na rośliny bezpośrednio m.in. poprzez dostarczanie pokarmu roślinom, a także pośrednio przez indukują odporności roślin na patogeny i szkodniki. Ponadto endofity mają zdolność wydzielania regulatorów wzrostu, takich jak auksyny, gibereliny czy cytokininy, które mają wpływ na zwiększenie wydajności diazotrofii. Poprzez zastosowanie koinokulacji obserwuje się zwiększenie liczby brodawek, wzmocnienie kolonizacji korzenia przez bakterie z rodziny *Rhizobiaceae* oraz wzrost poziomu aktywności nitrogenazy.

Potencjał PGPR wykorzystywanych w układach symbiotycznych jest szeroko udokumentowany w licznych pracach naukowych, ale nie został dotychczas dostatecznie wykorzystany. Niniejszy przegląd literatury ma na celu przedstawienie i usystematyzowanie dotychczasowej wiedzy dotyczącej wpływu koinokulacji roślin na wydajność procesu biologicznego wiązania azotu.

Słowa kluczowe: diazotrofia, koinokulacja, mikroorganizmy stymulujące wzrost roślin, PGPR, *Rhizobium*

Do cytowania For citation: Waraczewska Z., Niewiadomska A., Kosicka-Dziechciarek D. 2017. Zastosowanie drobnoustrojów o działaniu synergistycznym w procesie biologicznego wiązania azotu. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie. T. 17. Z. 2 (58) s. 157–168.

WSTĘP

Jednym z głównych składników pokarmowych niezbędnych do produkcji żywności w większości krajów świata jest azot. Jest to pierwiastek, który warunkuje ilość i jakość produkowanej żywności dla ludzi i zwierząt. W krajach technologicznie zaawansowanych i bogatych zapotrzebowanie na ten pierwiastek może być zaspokojone przez stosowanie nawozów chemicznych. Jednak nawet i w tych regionach koszt nawozów jest wysoki.

Ze względu na duże zapotrzebowanie na ten pierwiastek można uznać go za czynnik krytyczny, który reguluje zarówno ilość, jak i jakość pożywienia oraz jest odpowiedzialny za niedożywienie ludzkości.

Niniejszy artykuł ma na celu przedstawienie i usystematyzowanie dotychczasowej wiedzy dotyczącej wpływu koinokulacji roślin na wydajność procesu biologicznego wiązania azotu.

ZNACZENIE BIOLOGICZNEGO WIĄZANIA AZOTU

Proces biologicznego wiązania azotu znany jest już od ponad stu lat. Wiadomo, że forma gazowa azotu (N_2) jest nieprzyswajalna bezpośrednio dla roślin. Jedynym sposobem na wprowadzenie do gleby zredukowanej formy tego pierwiastka jest proces biologicznego wiązania azotu atmosferycznego [KIDAJ 2004]. CHENG [2008] podaje, że corocznie trafia do globalnego obiegu azotu ok. $2,5 \cdot 10^{11}$ kg NH_3 dzięki procesowi diazotrofii, co stanowi ponad 60% azotu występującego na Ziemi w formie zredukowanej. Jedynymi organizmami, które mają zdolność wprowadzenia tego krytycznego pierwiastka do ekosystemów rolniczych są wolnożyjące bakterie glebowe (*Azotobacter*, *Clostridium*), sinice oraz bakterie należące do rodziny *Rhizobiaceae*, żyjące w symbiozie z roślinami bobowatymi, a także promieniowce *Frankia* wchodzące w symbiozę z korzeniami drzew. Zyski pochodzące z biologicznego wiązania azotu są bardzo zróżnicowane, zależne od ekosystemu i wielu czynników środowiskowych. W ekosystemie wydajność diazotrofii mikroorganizmów wolnożyjących mieści się w granicach $10\text{--}50$ kg $N \cdot ha^{-1} \cdot r^{-1}$ (tab. 1).

Znany i doceniany w praktyce rolniczej biologiczny system wiązania azotu, to symbiotyczny układ tworzony przez rośliny bobowate z bakteriami z rodzaju *Rhizobium*, dzięki któremu trafia do gleby ok. 90 mln t azotu rocznie w skali biosfery [KOZŁOWSKI i in. 2011]. Niestety, praktyczne wykorzystanie mikroorganizmów wiążących azot zostało na pewien czas zaniechane ze względu na szybki rozwój przemysłu nawozowego.

Rolnictwo europejskie jest obecnie w fazie przejściowej między rolnictwem konwencjonalnym, intensywnym – bezwzględnie eksploatującym środowisko przyrodnicze a rolnictwem bazującym na zrównoważonych technologiach produkcji, przyjaznych środowisku. Niepokojącym zjawiskiem są jednak obserwowane od

Tabela 1. Wiązanie azotu atmosferycznego w różnych ekosystemach**Table 1.** The nitrogen fixation in various ecosystems

Ekosystem Ecosystem	Ilość wiązanego azotu, kg N·ha ⁻¹ ·r ⁻¹ Quantity of biological nitrogen fixation, kg N·ha ⁻¹ ·year ⁻¹	
	wartości skrajne extreme values	wartości powszechne universal values
Mikroorganizmy wolnożyjące Free-living microorganisms		
Lasy Forests	0–38	0–10
Uprawy ryżu Rice cultivation	0–80	0–15
Mikroorganizmy asocjatywne Associative microorganisms		
Trawy tropikalne Tropical grasses	10–45	10–20
Uprawy Cultivation	0–239	0–50
Mikroorganizmy symbiotyczne Symbiotic microorganisms		
Azolla Azolla	10–150	10–50
Uprawy bobowatych paszowych Legumes cultivation on fodder	15–680	50–250
Uprawy bobowatych na ziarno Legumes cultivation on grain	10–450	30–150
Uprawy bobowatych na nawóz zielony Legumes cultivation on green fertilizer	20–460	20–150
Motylkowate drzewa/krzewy Legumes trees/shrubs	10–30	20–50

Źródło: NIEWIADOMSKA, SAWICKA [2005], zmodyfikowane.

Source: NIEWIADOMSKA, SAWICKA [2005], modified.

wielu lat skutki nieprawidłowej gospodarki nawozowej [WYSZCZÓLKOWSKI, DA-BEK-SZRENIAWSKA 2002]. Przez wiele lat polskie rolnictwo charakteryzowała tzw. „era tanich nawozów mineralnych” [NIEWIADOMSKA 2013]. Poza dużą kosztocłonnością i energochłonnością ich produkcji, ważnym skutkiem ich stosowania w dużych dawkach stał się deficyt związków próchnicznych w glebie. Nie bez znaczenia pozostają negatywne zmiany środowiska naturalnego, zwłaszcza glebowego, wywołane takim nawożeniem.

Brak we współczesnym rolnictwie nawozów, które mogłyby wyrównać deficyt związków próchnicznych, zapobiegać degradacji gleb i zwiększać plon roślin uprawnych, co zmusza do poszukiwań nowych, efektywnych sposobów poprawy właściwości gleb [BIELIŃSKA, ŻUKOWSKA 2002].

Obecnie zwiększa się zainteresowanie poszukiwaniem czynników umożliwiających optymalizację pobierania składników pokarmowych przez rośliny z gleby z równoczesną poprawą właściwości chemicznych, biologicznych i fizycznych gleby [NIEWIADOMSKA 2013]. Cele te mogą być realizowane w ramach zielonej biotechnologii, w tym przez wykorzystanie mikroorganizmów w zwiększaniu plonu roślin. Ze względów rolniczych duże znaczenie dla upraw polowych mają bak-

terie z rodziny *Rhizobiaceae* wiążące azot cząsteczkowy w symbiozie z roślinami bobowatymi, a także cała grupa drobnoustrojów zaliczanych do mikroorganizmów stymulujących wzrost roślin (PGPR) (ang. Promoting Growth Plant Rhizobacteria) [OWEN i in. 2015; SANTOYO i in. 2012]. Poszukiwanie nowych środków wspomagających rozwój oraz plonowanie roślin bobowatych, wyróżniających się dużą zawartością białka, a także silnym oddziaływaniem następczym w całym płodozmianie – to konieczność współczesnego rolnictwa.

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie potencjonalnymi możliwościami szerszego zastosowania i zwiększenia efektywności biologicznego wiązania azotu. Coraz częściej w badaniach o zasięgu międzynarodowym pojawiają się prace na temat koinokulacji, a więc jednoczesnego szczepienia roślin bobowatych szczepem charakterystycznym dla makrosymbionta (rośliny) oraz endofitem należącym do bakterii o działaniu synergistycznym, grupy PGPR. Bakterie stymulujące wzrost roślin należą do różnych grup filogenetycznych. Najliczniejszą grupę PGPR stanowią bakterie z rodzajów: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* i *Erwinia* [KALITKIEWICZ, KĘPCZYŃSKA 2008].

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA PROCES BIOLOGICZNEGO WIĄZANIA AZOTU

Związek bakterii zdolnych do redukcji azotu cząsteczkowego z eukariontami zależy w dużej mierze od warunków środowiska. Proces brodawkowania i wiązania azotu w warunkach polowych jest zależny od czynników środowiskowych, takich jak: rodzaj gleby, jej odczyn, obecność jonów glinu, magnezu i azotu, jak również wapnia i związków fosforu. W wielu doniesieniach literaturowych podaje się, że te czynniki mogą istotnie wpływać zarówno na populacje bakterii z rodziny *Rhizobiaceae*, jak i na proces symbiozy, na każdym jego etapie od infekcji do wytworzenia brodawek [NIEWIADOMSKA, SAWICKA 2005].

Opublikowane doniesienia wskazują, że zbyt duże stężenie mineralnych form azotu w glebie hamuje powstawanie brodawek i aktywność nitrogenazy, ponadto zmniejsza liczbę bakterii zdolnych do adhezji na powierzchni korzenia. Natomiast niedobór azotu może wpływać korzystnie na układ symbiotyczny, ponieważ wyzwala chemiczną sygnalizację między rośliną a mikroorganizmami, poprzedzającą troficzne zależności pomiędzy symbiontami [GULDEN, VESSEY 1997; WEISANY i in. 2013].

W funkcjonowaniu układu symbiotycznego bardzo ważna jest też rola fosforu. Bierze on udział w różnych procesach molekularnych i biochemicznych, jest też nośnikiem energii wykorzystywanej w komórkach. Obecność fosforu w glebie wpływa na zdolność brodawkowania i wiązania azotu. W celu poprawy dostępności tego pierwiastka w zrównoważonym rolnictwie stosuje się infekcję korzeni grzybami mykoryzowymi [BONILLA, BOLAÑOS 2009; BUCHER 2007].

Innym czynnikiem wpływającym na proces diazotrofii jest wapń, który ma istotny wpływ na pH środowiska glebowego. Wraz ze zmniejszeniem się jego zawartości w glebie zmniejsza się zdolność kolonizacji włośników przez rhizobia, a w konsekwencji ilość wiązanego azotu w brodawkach. Odnotowano również, że wapń bierze udział w stabilizacji otoczki bakteryjnych heterocyst, która zapewnia aktywność nitrogenazy głównie w warunkach stresu tlenowego [FERNANDEZ-PINAS i in. 1995; WAIS i in. 2002]

Mniej istotny wpływ na układy symbiotyczne niż wyżej wymienione pierwiastki ma potas. Niemniej w glebach zasolonych jony potasu są bardzo pożądane, gdyż pełnią funkcję osmolitu. Biorąc pod uwagę, że blisko połowa gleb nawadnianych na świecie jest uznawana za zasolone, potas podtrzymuje układ bakteria-roślina [BONILLA, BOLAÑOS 2009; ZAHRAN 1999].

Mikroelementy, które istotnie wpływają na rozwój rośliny, a także proces wiązania azotu, to: molibden, bor, żelazo i kobalt. Na szczególną uwagę zasługują molibden i żelazo. Pierwiastki te są składnikami enzymu bakteryjnego – nitrogenazy, wiążącego azot cząsteczkowy. Jest to białko złożone z dwóch podjednostek – większej zawierającej kofaktor FeMo i mniejszej zawierającej tylko żelazo [SYMANOWICZ i in. 2005]. Ograniczenie dostępności molibdenu występuje naturalnie w kwaśnych, wilgotnych, słabo zbuforowanych glebach. Istnieją doniesienia, że dolistne dodanie molibdenu do roślin strączkowych w warunkach terenowych zwiększa efektywność wiązania azotu, masę brodawek, a także plon nasion [VIEIRA i in. 1998; WEISANY i in. 2013].

Bor jest mikroelementem, który występuje w niewielkiej ilości w roślinach, ale odgrywa ważną rolę w szeregu procesów fizjologicznych. Wchodzi również w interakcję z wapniem, a oba te pierwiastki mają wpływ na rozwój tkanek roślinnych i są niezbędne do optymalnego wzrostu rośliny. W środowisku, gdzie występuje niedobór boru, obserwuje się ograniczenie brodawkowania, zmniejszenie liczby komórek *Rhizobium* i nici infekcyjnych [BROWN i in. 2002; WEISANY i in. 2013].

Innym ważnym pierwiastkiem nie tylko dla rozwoju roślin, ale także dla prawidłowego funkcjonowania brodawek, jest kobalt. Pierwiastek ten jest istotny szczególnie dla symbiozy roślin z cyjanobakteriami. Wchodzi w skład kobalaminy, która działa jako koenzym w utrwalaniu i wzroście brodawek zaangażowanych w wiązanie azotu [PASSAM i in. 2007].

Poza czynnikami abiotycznymi duży wpływ na efektywność symbiozy mają także czynniki biotyczne. Występowanie mikroorganizmów symbiotycznych jest uwarunkowane także obecnością w glebie związków allelopatycznych wydzielanych przez korzenie roślin, jak również wzajemnymi interakcjami różnych grup drobnoustrojów [BADURA 2006].

Coraz większego znaczenia nabiera zagadnienie dotyczące wpływu różnych populacji mikroorganizmów glebowych na wzrost i rozwój roślin, w tym także na systemy symbiotyczne. Oddziaływania między roślinami i mikroorganizmami mogą mieć różny charakter. Oprócz mikroorganizmów wpływających niekorzystnie

na roślinę, lub takich, których wpływ pozostaje niezauważalny, nie bez znaczenia dla zwiększenia wydajności diazotrofii jest udział drobnoustrojów zaliczanych do grupy PGPR.

SYNERGISTYCZNE ODDZIAŁYWANIE RÓŻNYCH GRUP BAKTERII NA PROCES BIOLOGICZNEGO WIĄZANIA AZOTU

Jak już wspomniano, bakterie z grupy PGPR, stosowane do koinokulacji w uprawach roślin bobowatych mogą wpływać na rośliny bezpośrednio i pośrednio. Pośredni wpływ stymulacyjny polega na indukowaniu odporności roślin na szkodniki, patogeny czy inne czynniki stresogenne [GLICK 2012], a także na zwiększeniu efektywności wykorzystania nawozów [VAN LOON 2007]. Z kolei bezpośrednio wspieranie wzrostu roślin wiąże się na ogół z dostarczaniem pokarmu ze środowiska, w tym związanego azotu, żelaza i fosforu, z syntezą fitohormonów stymulujących rozwój roślin, a także z obniżaniem poziomu etylenu, który niekorzystnie wpływa na ukorzenianie się roślin [GLICK 2014; JANKIEWICZ 2010].

Szczególną rolę przypisuje się wydzielanym przez endofity regulatorom wzrostu, takim jak gibereliny, auksyny i cytokininy przez endofity, które mają udział w zwiększaniu wydajności biologicznego wiązania azotu [HONTEZEAS i in. 2006]. Gibereliny wytwarzają m.in. takie bakterie endofityczne, jak: *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropediace* [BASTIÁN i in. 1998], *Bacillus* sp. oraz *Azospirillum* [BOTTINI i in. 2004]. Uważa się, że mają one korzystny wpływ na rozwój i wzrost korzenia oraz wytwarzanie włóśników korzeniowych [KING, EVANS 2003], przez co roślina staje się bardziej podatna na infekcje i rozwój bakterii brodawkowych *Rhizobium* [KRÓL 2003]. W badaniach przeprowadzonych w warunkach laboratoryjnych przez NIEWIADOMSKĄ i SWĘDRZYŃSKĄ [2011] nad efektem jednoczesnej inokulacji lucerny szczepami bakterii brodawkowych *Sinorhizobium meliloti* i bakterii endofitycznych *Herbaspirillum frisingense* stwierdzono korzystne oddziaływanie takiego szczepienia na proces symbiozy i plonowanie lucerny siewnej. Także w innych badaniach zarówno polowych, jak i laboratoryjnych, NIEWIADOMSKA [2013] wykazała korzystny wpływ jednoczesnego szczepienia koniczyny i lucerny odpowiednio szczepami z rodzaju *Rhizobium*, *Sinorhizobium* oraz *Azospirillum* na proces biologicznego wiązania azotu, wydajność fotosyntezy oraz plon roślin koniczyny i lucerny. Wzmocniona podatność rośliny na infekcje bakteriami brodawkowymi, a tym samym zwiększenie szansy nodulacji, w obecności *Azospirillum*, tłumaczona jest przez KRÓL [2003] stymulacją wzrostu i powstawania większej liczby komórek epidermalnych pod wpływem wytwarzanych przez te bakterie fitohormonów. Stymulujące działanie bakterii z rodzaju *Azospirillum* na proces diazotrofii oraz inne parametry z nim związane (plon, brodawkowanie itp.) wykazali też w swoich badaniach HUNGRIA i in. [2013], którzy wprowadzali „konsorcjum bakteryjne” złożone z bakterii rodzaju *Rhizobium* oraz *Azospirillum brasili-*

lense na nasiona soi lub fasoli. Zanotowano także stymulujące działanie zastosowania takiego samego „konsorcjum bakteryjnego” w uprawie roślin zbożowych (kukurydzy) [KLAMA i in. 2010]. Wykazano, że obecność bakterii *Rhizobium* wpływała stymulująco na zasiedlanie korzeni kukurydzy przez *Azospirillum* i udowodniono, że zastosowana koinokulacja wpłynęła na lepszą kondycję roślin, o czym świadczyło zwiększenie wartości indeksu zieloności liścia.

Przeprowadzone przez MASCARELLEGO i in. [2014] badania, w których jednocześnie zaszczerpiono nasiona soi szczepem *Bacillus amyloliquefaciens* oraz symbiontem *Bradyrhizobium japonicum*, wykazały korzystny wpływ jednoczesnej koinokulacji na wzrost roślin oraz na liczebność brodawek. W synergistycznym oddziaływaniu bakterie z rodzaju *Bacillus* wzmacniały zdolność kolonizacji korzenia i zwiększały liczbę brodawek tworzonych przez *Bradyrhizobium*. Podobne efekty zanotowano w przypadku zastosowania jako koinokulanta *Bacillus megaterium* [SUBRAMANIAN i in. 2015; YU i in. 2012]. W wyniku jednoczesnego zaszczerpienia roślin nastąpił wzrost brodawek korzeniowych i poziom aktywności nitrogenazy, a tym samym zawartość białka ogólnego w badanych roślinach. Autorzy tych badań tłumaczą ten efekt wysokim poziomem wydzielania auksyny – kwasu indylilo-3-octowego (IAA) przez *Bacillus megaterium*.

Rola IAA polega na umożliwieniu kontaktu bakterii z rośliną, a skutek działania zależy od stężenia auksyn [PERSELLO-CARTIEAUX i in. 2003]. PATTEN i GLICK [2002] wykazali, że bakteryjny IAA wpływa bezpośrednio na rozwój głównego systemu korzeniowego, natomiast LI i in. [2000] stwierdzili, że pośrednio wpływa on na regulację poziomu etylenu w roślinach, którego nadmiar hamuje wzrostu korzenia.

Duże znaczenie dla plonowania roślin bobowatych i zwiększenia wydajności procesu biologicznego wiązania azotu mają także bakterie z rodzaju *Pseudomonas* [EGAMBERDIEVA i in. 2010; SÁNCHEZ i in. 2014]. Ich rola w tworzonych „konsorcjach mikroorganizmów” przypisywana jest głównie zdolności tych szczepów do udostępniania składników pokarmowych, w tym głównie fosforu niezbędnego do zainicjowania symbiozy. Mikroorganizmy te w głównej mierze stymulują wzrost korzeni bocznych i włośników, przez co zwiększa się powierzchnia chłonna korzenia, a tym samym adhezja mikroorganizmów symbiotycznych. Bakteriom rodzaju *Pseudomonas* przypisuje się także zdolność indukcji odporności systemicznej rośliny, której istotą jest uruchomienie w roślinie naturalnych mechanizmów obronnych, chroniących ją przed licznymi i różnorodnymi patogenami oraz szkodnikami [KACPRZAK i in. 2011]. Do patogenów atakujących rośliny bobowate należą m.in. grzyby z rodzaju *Phytophthora*. Odporność na te patogeny jest pobudzana przez wydzielanie przez bakterie *Pseudomonas* substancji o działaniu bezpośrednim i pośrednim. Czynniki bezpośrednie to m.in. uczestniczące w konkurencji o żelazo siderofory i produkcja antybiotyków 2,4-diacetylofloroglucyny i fenazy. Z kolei czynnikami pośrednimi są elicytory, do których zalicza się lipopolisacharyd (LPS) będący składnikiem błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych, massetolid A

i pochodną N-alkilowanej benzylaminy (NABA) oraz laktoz N-acylo-L-homoseryny (AHL) [ZIPFEL, FELIX 2005].

Coraz więcej ostatnich doniesień [SINGH i in. 2015; ZHU i in. 2016] wskazuje także na istotne synergistyczne oddziaływanie arbuskularnych grzybów mykoryzowych (AMF) (ang. arbuscular mycorrhizae fungi) na plonowanie roślin bobowatych, szczególnie w warunkach stresowych, m.in. zasolenia gleby.

Należy wspomnieć, że w literaturze pojawiają się także doniesienia na temat antagonistycznych oddziaływań w układach stosowanych koinokulatów, a więc drobnoustrojów wykorzystywanych do jednoczesnego zaszczepiania roślin bobowatych. Efekt ten można tłumaczyć syntezą związków antagonistycznych o charakterze toksyn bakteryjnych lub enzymów wydzielanych do środowiska przez takie zespoły bakterii. Już w 1994 r. LORKIEWICZ zwrócił uwagę na niektóre właściwości fenotypowe bakterii brodawkowych, np. produkcję antybiotyków, które mogą uczestniczyć w takich oddziaływaniach. Bakterie te mają zdolność wytwarzania antybiotyków przeciwbakteryjnych lub przeciwgrzybowych o charakterze beta-laktamów lub polietarów makrotetralidowych oraz do syntezy egzoenzymów [MUNOZ-ROJAS i in. 2005]. *Sinorhizobium meliloti* ma zdolność produkowania i gromadzenia glutaminianów oraz dwupeptydo-N-acetyloglutaminylo-glutaminy o charakterze antibakteryjnym.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przedstawionego przeglądu literatury dotyczącego roli drobnoustrojów o działaniu synergistycznym w procesie biologicznego wiązania azotu można stwierdzić, że ostatnie lata przyniosły wiele ważnych obserwacji dotyczących tego tematu. Zbadano szereg interakcji zachodzących między bakteriami symbiotycznymi, endofitami a korzeniami roślin bobowatych.

Bakterie glebowe, zwłaszcza rozwijające się w ryzosferze, mogą być źródłem pozyskiwania pożądaných bioinokulantów lub biopromotorów. Dają możliwość wytworzenia preparatu biologicznego składającego się z dziesiątek, a nawet setek gatunków bakterii lub grzybów zbadanych pod kątem zdolności stymulujących wzrost i kontrolę biologiczną roślin. Taki bioinokulant mógłby być wykorzystany w uprawach rolniczych w celu poprawy żyzności gleby, a tym samym zwiększenia produkcji roślinnej.

Potencjał bakterii należących do grupy stymulujących wzrost roślin (PGPR – ang. Promoting Growth Plant Rhizobacteria), do wykorzystania w produkcji rolnej został szeroko udokumentowany w licznych pracach naukowych, ale nie został dotychczas dostatecznie wykorzystany i wdrożony, szczególnie w krajach rozwijających się. Pestycydy, nawozy azotowe oraz inne związki chemiczne nadal są wykorzystywane i nadużywane w celu zwiększenia produkcji rolnej. Należy mieć jednak na uwadze, że długoterminowa chemizacja może przynieść negatywne skutki dla

środowiska glebowego oraz zdrowia ludzi i zwierząt. Alternatywą dla obecnego rolnictwa jest połączenie metod konwencjonalnych i biologicznych. W nowoczesnym rolnictwie powinno się dbać o ochronę organizmów pożytecznych oraz stwarzać warunki sprzyjające ich występowaniu.

BIBLIOGRAFIA

- BADURA L. 2006. Czy mikroorganizmy są niezbędne dla życia roślin [Are microorganisms essential for plant life]. W: Materials of National Symposium on Microbiology. Red. W. Barabasz. Kraków. AR s. 5–6.
- BASTIÁN F., COHEN A., PICCOLI P., LUNA V., BOTTINI R., BARALDI R. 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*. Vol. 24(1) s. 7–11.
- BIELIŃSKA E.J., ŻUKOWSKA G. 2002. Aktywność proteazy i ureazy w glebie lekkiej użyźnionej osadem ściekowym [The activity of protease and urease in light soil fertilized with sewage sludge]. *Acta Agrophysica*. T. 70 s. 41–47.
- BONILLA I., BOLAÑOS L. 2009. Mineral nutrition for legume-rhizobia symbiosis: B, Ca, N, P, S, K, Fe, Mo, Co, and Ni. A review. *Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants*. Red. E. Lichtfouse. Dordrecht. Springer. Vol. 1. s. 253–274.
- BOTTINI R., CASSÁN F., PICCOLI P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 65(5) s. 497–503.
- BROWN P.H., BELLALOUI N., WIMMER M.A., BASSI E.S., RUIZ J., HU H., PFEFFER H., DANNEL F., RÖMHELD V. 2002. Boron in plant biology. *Plant Biology*. Vol. 4 s. 205–223.
- BUCHER M. 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist*. Vol. 173(1) s. 11–26.
- CHENG Q. 2008. Perspectives in biological nitrogen fixation research. *Journal of Integrative Plant Biology*. Vol. 50(7) s. 786–798.
- EGAMBERDIEVA D., BERG G., LINDSTRÖM K., RÄSÄNEN L.A. 2010. Co-inoculation of *Pseudomonas* spp. with *Rhizobium* improves growth and symbiotic performance of fodder galega (*Galega orientalis* Lam.). *European Journal of Soil Biology*. Vol. 46(3) s. 269–272.
- FERNANDEZ-PIÑAS F., MATEO P., BONILLA I. 1995. Cadmium toxicity in *Nostoc* UAM208: Protection by calcium. *New Phytologist*. Vol. 131(3) s. 403–407.
- GLICK B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*. ID 963401 ss. 15.
- GLICK B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*. Vol. 169(1) s. 30–39.
- GULDEN R.H., VESSEY J.K. 1997. The stimulating effect of ammonium on nodulation in *Pisum sativum* L. is not long lived once ammonium supply is discontinued. *Plant Soil*. Vol. 195(1) s. 195–205.
- HONTZEAS N., HONTZEAS C.E., GLICK B.R. 2006. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotechnology Advances*. Vol. 24(4) s. 420–426.
- HUNGRIA M., NOGUEIRA M. A., ARAUJO R.S. 2013. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biology and Fertility of Soils*. Vol. 49(7). s. 791–801.

- JANKIEWICZ U. 2010. Bioaktywne metabolity ryzosferowych bakterii *Pseudomonas* [Bioactive metabolites the rhizosphere *Pseudomonas* bacteria]. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie. T. 10. Z. 2(30) s. 83–92.
- KACPRZAK P., MACIOSZEK V.K., KONOWICZ A.K. 2011. Indukowana odporność systemiczna ISR w ochronie roślin przed patogennymi grzybami [Induced systemic resistance ISR in plant protection against pathogenic fungi]. Postępy Biologii Komórki. T. 38. Nr 1. s. 129–142.
- KALITKIEWICZ A., KĘPCZYŃSKA A. 2008. Wykorzystanie ryzobakterii do stymulacji wzrostu roślin [The use of rhizobacteria in plant growth promoting proces]. Biotechnologia. Vol. 2(81) s. 102–114.
- KIDAJ D. 2004. Bionawozy zawierające rizobiowe czynniki Nod jako nowy trend w uprawie roślin motylkowatych [Organic fertilizers containing Rhizobium Nod factors as a new trend in the cultivation of plants legume] [online]. [Dostęp 13.10.2016]. Dostępny w Internecie: http://www.rsi2004.lubelskie.pl/doc/sty5/art/Kidaj_D_art
- KING R.W., EVANS L.T. 2003. Gibberellins and flowering of grasses and cereals: prizing open the lid of the “florigen” black box. Annual Review of Plant Biology. Vol. 54(1) s. 307–328.
- KLAMA J., NIEWIADOMSKA A., WOLNA-MARUWKA A. 2010. Koinokulacja *in vitro* siewek kukurydzy bakteriami diazotroficznymi [In vitro co-inoculation of maize seedlings with diazotrophic bacteria]. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie. T. 10. Z. 2(30) s.103–110.
- KOZŁOWSKI S., SWĘDRZYŃSKI A., ZIELEWICZ W. 2011. Rośliny motylkowe w środowisku przyrodniczym [Leguminous plants in communities of the *Molinio-Arrhenatheretea* class in lowlands and mountains]. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie. T. 11. Z 3(35) s. 161–181.
- KRÓL M.J. 2003. Interakcje *Azospirillum* spp. z mikroorganizmami glebowymi [Interaction of *Azospirillum* spp. from soil microorganisms]. Postępy Nauk Rolniczych. Vol. 5. Nr 50 s. 3–13.
- LI J., OVAKIM D. H., CHARLES T. C., GLICK, B. R. 2000. An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4No longer promotes root elongation. Current Microbiology. Vol. 41(2) s. 101–105.
- LORKIEWICZ Z. 1994. Konkurencja *Rhizobium* w brodawkowaniu roślin motylkowatych [Competition of nodulation *Rhizobium* in legume plants]. Postępy Mikrobiologii. T. 33. Nr 2 s. 137–146.
- MASCIARELLI O., LIANES A., LUNA V. 2014. A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. Microbiological Research. Vol. 169 (7–8) s. 609–615.
- MUNOZ-ROJAS J., FUENTES-RAMÍREZ L.E., CABALLERO-MELLADO J. 2005. Antagonism among Gluconacetobacter diazotrophicus strains in culture media and in endophytic association. FEMS Microbiology Ecology. Vol. 54(1) s. 57–66.
- NIEWIADOMSKA A. 2013. Ocena wpływu nawozu PRP SOL i koinokulacji bakteriami na proces diazotrofii, aktywność biologiczną i właściwości fizykochemiczne gleby oraz kondycję i plon koni czyny i lucerny [Assessment of the impact of PRP SOL fertilizer and coinoculation on the process diazotrophy, biological and chemical properties of soil and crop condition under clover and alfalfa cultivation]. Rozprawy Naukowe. Nr 462. Poznań. Wydaw. UP w Poznaniu. ISBN 978-83-7160-710-3 ss. 106.
- NIEWIADOMSKA A., SAWICKA A. 2005. Diazotrofia – charakterystyka układu symbiotycznego roślin motylkowatych – *Rhizobia*. W: Rośliny motylkowe w rolnictwie polskim: Genetyka, hodowla, uprawa i użytkowanie [Diazotroph – characteristics of the symbiotic legume – *Rhizobium*. In: Leguminous plants in Polish agriculture: Genetics, breeding, cultivating and using]. Materiały Konferencji Naukowej. Poznań. Wydaw. AR im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu s. 83–94.
- NIEWIADOMSKA A., SWĘDRZYŃSKA D. 2011. Effect of the co-inoculation of lucerne (*Medicago sativa* L.) with *Sinorhizobium meliloti* and *Herbaspirillum frisingense* in relation to the interactions between bacterial strain. Archives of Environmental Protection. Vol. 37(4) s. 37–48.

- OWEN D., WILLIAMS A.P., GRIFFITH G.W., WITHERS P.J.A. 2015. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology*. Vol. 86 s. 41–54.
- PASSAM H.C., KARAPANOS I.C., BEBELI P.J., SAVVAS D. 2007. A review of recent research on tomato nutrition, breeding and post-harvest technology with reference to fruit quality. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*. Vol. 1(1) s. 1–21.
- PATTEN C.L., GLICK B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68(8) s. 3795–3801.
- PERSELLO-CARTIEAUX F., NUSSAUME L., ROBAGLIA C. 2003. Tales from the underground: Molecular. *Plant, Cell and Environment*. Vol. 26(2) s. 189–199.
- SANTOYO G., OROZCO-MOSQUEDA M.C., GOVINDAPPA M. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A review. *Bio-control Science and Technology*. Vol. 22(8) s. 855–872.
- SÁNCHEZ A.C., GUTIÉRREZ R.T., SANTANA R.C., URRUTIA A.R., FAUVART M., MICHIELS J., VANDERLEYDEN J. 2014. Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *European Journal of Soil Biology*. Vol. 62 s. 105–112.
- SINGH M., KUMAR N., KUMAR S., LAL M. 2015. Effect of co-inoculation of b. Japonicum, psb and an fungi on microbial biomass carbon, nutrient uptake and yield of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Agriways*. Vol. 3(1) s. 14–18.
- SUBRAMANIAN P., KIM K., KRISHNAMOORTHY R., SUNDARAM S., SA T. 2015. Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. *Plant Growth Regulation*. Vol. 76(3) s. 327–332.
- SYMANOWICZ B., PALA J., KALEMBASA S. 2005. Wpływ procesu biologicznej redukcji N₂ na pobieranie azotu przez rutwicę wschodnią (*Galega orientalis*) [Influence of biological reduction of N₂ on the uptake of nitrogen by goat's rue (*Galega orientalis* Lam.)]. *Acta Scientiarum Polonorum. Agricultura*. Vol. 4(2) s. 93–99.
- VAN LOON L.C. 2007. Plant response to plant growth-promoting bacteria. *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 119(3) s. 243–254.
- VIEIRA R.F., CARDOSO E.J.B.N., VIEIRA C., CASSINI S.T.A. 1998. Foliar application of molybdenum in common beans. I. Nitrogenase and reductase activities in a soil of high fertility. *Journal of Plant Nutrition*. Vol. 21 s. 169–180.
- WAIS R.J., KEATING D.H., LONG S.R. 2002. Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiology*. Vol. 129 s. 211–224.
- WEISANY W., RAEI Y., ALLAHVERDIPOOR K. H. 2013. Role of some of mineral nutrients in biological nitrogen fixation. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. Vol. 2(4) s. 77–84.
- WYSZCZÓLKOWSKI A., DĄBEK-SZRENIAWSKA M. 2002. Wpływ różniących się rozpuszczalnością substancji organicznych na liczebność i aktywność drobnoustrojów glebowych [The influence of organic substances various solubility on the number and activity of the soil microorganisms]. *Acta Agrophysica*. T. 73 s. 349–356.
- YU X., LIU X., ZHU T. H. LIU, G. H., MAO C. 2012. Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *European Journal of Soil Biology*. Vol. 50 s. 112–117.
- ZAHRAN H.H. 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 63(4) s. 968–989.
- ZHU R.F., TANG F., LIU J., LIU F.Q., DENG X.Y., CHEN J.S. 2016. Co-inoculation of arbuscular mycorrhizae and nitrogen fixing bacteria enhance alfalfa yield under saline conditions. *Pakistan Journal of Botany*. Vol. 48(2) s. 763–769.

ZIPFEL C., FELIX G. 2005. Plants and animals: A different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology*. Vol. 8(4) s. 353–360.

Zyta WARACZEWSKA, Alicja NIEWIADOMSKA, Donata KOSICKA-DZIECHCIAREK

THE USE OF SYNERGISTIC MICROORGANISMS IN THE PROCESS OF NITROGEN BIOLOGICAL FIXATION

Key words: *coinoculation, diazotroph, endophyte, Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Rhizobium*

S u m m a r y

In recent years, researchers have increasingly focused their interests on searching for products allowing optimisation and enhancement of biological nitrogen fixation with the assistance of symbiotic systems accompanied by a simultaneous improvement of soil chemical, biological and physical properties. “Green biotechnology” confronted these issues indicating possibilities of utilisation of microorganisms stimulating plant growth, the so called Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) employing coinoculation (simultaneous inoculation) of (plant) macrosymbionts with an appropriate strain from the Rhizobiaceae family and an endophytic bacteria characterised by synergistic action.

Bacteria from the PGPR group employed for the coinoculation of legume plants affect these plants directly, among others, by supplying nutrients for plants as well as indirectly by inducing plant resistance against pathogens and pests. In addition, endophytes are capable of secreting growth regulators such as auxins, gibberellins or cytokinins, which can exert impact on increased diazotroph efficiency. Application of coinoculation results in amplified numbers of nodules, strengthening of root colonisation with bacteria from the Rhizobiaceae family and in increased levels of nitrogenase activity.

Potentials of PGPR group employed in symbiotic systems have been documented extensively in numerous scientific publications but until now these capabilities have not been sufficiently utilised. The discussed literature review aims at presenting and systematising our current knowledge regarding influence of plant coinoculation on the optimisation of the biological nitrogen fixation process.

Adres do korespondencji: mgr inż. Z. Waraczewska, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej, ul. Szydłowska 50, 60-656 Poznań; tel. + 48 61 848-71-94, e-mail: zyta.waraczewska@wp.pl