

# WPLYW MIEDZI NA BAKTERIE Z RODZAJU *Azospirillum* WYSTĘPUJĄCE W RYZOSFERZE SIEWEK KUKURYDZY I PSZENICY

**Dorota SWĘDRZYŃSKA, Aleksandra SAWICKA**

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej

*Słowa kluczowe: Azospirillum brasilense, Azospirillum lipoferum, kukurydza, miedź, pszenica*

## Streszczenie

Miedź jest pierwiastkiem niezbędnym w życiu organizmów, a zarazem silnie toksycznym, jeśli występuje w środowisku w nadmiarze. Toksyczne oddziaływanie miedzi dotyczy zarówno roślin, jak i mikroorganizmów glebowych. Zależy od wielu czynników, takich jak: rodzaj gleby, jej właściwości fizyczne i chemiczne, ale także od gatunku rośliny oraz interakcji zachodzących między rośliną a drobnoustrojami glebowymi. Jedną z grup mikroorganizmów endofitycznych, pozytywnie oddziałujących na rośliny, są bakterie z rodzaju *Azospirillum*.

Celem badań prezentowanych w pracy było poznanie reakcji bakterii z rodzaju *Azospirillum* na różne stężenia miedzi w ryzosferze siewek kukurydzy i pszenicy.

Hodowle *in vitro* kukurydzy i pszenicy inokulowano szczepami bakterii, odpowiednio *Azospirillum lipoferum* i *Azospirillum brasilense*. Czynnikiem doświadczalnym było wzbogacenie podłoża miedzią (25, 150 i 350 mg·kg<sup>-1</sup>). Analizowano liczebność bakterii z rodzaju *Azospirillum* oraz aktywność nitrogenazy. Monitorowano także wzrost i rozwój siewek oraz zawartość chlorofilu w ich blaszkach liściowych.

Wyniki badań wskazują na silną reakcję roślin i bakterii z rodzaju *Azospirillum* na zwiększone ilości miedzi w podłożu. Największe zastosowane stężenie (350 mg·kg<sup>-1</sup> pożywki) spowodowało całkowite zamieranie siewek pszenicy i kukurydzy. Pozostałe stężenia wyraźnie ograniczyły liczebność *Azospirillum* oraz wzrost roślin. Siewki pszenicy inokulowane *Azospirillum* były większe i wykazywały większą koncentrację chlorofilu od nieinokulowanych. Inokulacja siewek w niewielkim stopniu przyczyniała się do zmniejszenia toksycznego oddziaływania zwiększonego stężenia miedzi na rośliny.

## WSTĘP

Jednym z elementów środowiska glebowego, niezwykle silnie oddziałujących na organizmy żywe, jest obecność makro- i mikroelementów, szczególnie tych, które już w bardzo małych ilościach decydują o przebiegu procesów biologicznych. Do takich pierwiastków, niewątpliwie, należy miedź. Jest to pierwiastek niezbędny w życiu organizmów, a z drugiej strony silnie toksyczny, jeśli występuje w nadmiarze. Zawartość miedzi w glebie zależy głównie od właściwości skały macierzystej i działalności człowieka. Gleby w wielu uprzemysłowionych regionach Polski i całego świata, także te użytkowane rolniczo, są skażone nadmiarem miedzi [GAMBUŚ, GORLACH, 2001]. Toksyczne oddziaływanie miedzi dotyczy zarówno roślin, jak i mikroorganizmów glebowych i zależy od wielu czynników, takich jak: rodzaj gleby, jej właściwości fizyczne i chemiczne [MOCEK, DRZYMAŁA, MASZNER, 2004], ale także od gatunku rośliny oraz interakcji, zachodzących między nimi a drobnoustrojami glebowymi. Dlatego ważne jest poznanie wpływu zarówno niedoboru, jak i nadmiaru tego pierwiastka na rośliny i mikroflorę glebową, a także opracowanie skutecznych metod ich usuwania ze środowiska glebowego, w tym bioremediacji. W tym przypadku niemałą rolę do odegrania mają drobnoustroje glebowe, zwłaszcza wchodzące w układy asocjacyjne z roślinami. Jedną z grup mikroorganizmów endofitycznych, pozytywnie oddziałujących na rośliny i wdrażanych do praktyki rolniczej, są bakterie z rodzaju *Azospirillum* [BASHAN, HOLGUIN, BASHAN, 2004; SWĘDRZYŃSKA, 2000]. Oddziaływanie *Azospirillum* na rośliny jest bardzo złożone i wynika zarówno ze zdolności tych bakterii do wiązania azotu cząsteczkowego [HAATHELA in., 1981], jak też syntetyzowania fitohormonów i innych substancji biologicznie czynnych [ZIMMER, BOTHE, 1988], co w konsekwencji, niewątpliwie, wpływa korzystnie na plony roślin uprawnych, zarówno w warunkach klimatu tropikalnego, jak i umiarkowanego [BALDANI i in., 1997; SWĘDRZYŃSKA, SAWICKA, 2001]. Jeszcze dalej idące zależności ekologiczne wykazali GAŁAZKA, KRÓL i PERZYŃSKI [2008], inokulując kostrzewę łąkową, rosnącą w glebie skażonej ropą naftową szczepami *Azospirillum* sp. i *Pseudomonas stutzeri*. Inokulacja – przyczyniając się do lepszego wzrostu i rozwoju roślin – wywołała tym samym większy przyrost ogólnej liczebności drobnoustrojów oraz wzrost aktywności enzymatycznej gleby. Powodowało to szybsze zmniejszenie zawartości węglowodorów w glebie.

Celem niniejszych badań jest poznanie reakcji bakterii z rodzaju *Azospirillum*, mierzonej liczebnością ich populacji oraz aktywnością nitrogenazy, na obecność różnych wartości stężenia miedzi w ryzosferze siewek kukurydzy i pszenicy. Poznanie reakcji *Azospirillum* na zwiększone stężenie miedzi w podłożu umożliwi lepszą ocenę tych drobnoustrojów w aspekcie ekologicznym, a zarazem określenie ich oddziaływania na rośliny w tych warunkach.

## METODY BADAŃ

Przeprowadzono 2 równoległe doświadczenia laboratoryjne *in vitro* w hodowlach roślin kukurydzy (*Zea mays* L.) odmiany Claudia i pszenicy (*Triticum vulgare*) odmiany Kris, inokulowanych odpowiednio szczepami bakterii *Azospirillum lipoferum* i *Azospirillum brasilense*. Bakterie *Azospirillum lipoferum* Br 17 pochodziły z Zakładu Mikrobiologii IUNG w Puławach, natomiast *Azospirillum brasilense* SP T60 (wyizolowany z korzeni pszenicy) z Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH w Braunschweig w Niemczech. Czynnikiem doświadczalnym było wzbogacenie podłoża miedzią, przy czym zastosowano trzy poziomy doświadczone: 25, 150 i 350 mg·kg<sup>-1</sup> podłoża. Miedź do pożywki wprowadzono w postaci siarczanu miedzi (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O). Kontrolę stanowiły same rośliny oraz rośliny inokulowane odpowiednimi szczepami bakterii. Na każdą kombinację składało się 20 próbek z roślinami kukurydzy i 20 próbek z roślinami pszenicy. Podłoże stanowiła sterylna, stała mineralno-witaminowa pożywka, służąca do hodowli roślin jednoliściennych – SHM (Schenk & Hildebrandt Medium). Ziarniki kukurydzy i pszenicy użyte do doświadczenia poddano sterylizacji – wypłukiwano je przez 5 minut w 70-procentowym roztworze alkoholu, następnie przez 2 minuty w 5-procentowej wodzie utlenionej i ostatecznie przepłukano je wodą sterylną (5 razy przez 2 minuty każdą). Tak przygotowane ziarniki podkiełkowano i umieszczono w próbkach na skosach, następnie zaszczerpiono je odpowiednio płynną, 24-godziną hodowłą bakterii *Azospirillum* w ilości 0,1 ml zawiesiny na roślinę. Kolejnym etapem doświadczenia była inokulacja ziarniaków. Liczba komórek *Azospirillum* w 1 ml zawiesiny wynosiła od 10<sup>8</sup> do 10<sup>9</sup> jtk. Zawiesinę wprowadzano w ilości 0,1 ml na każde powtórzenie. Do sporządzenia zawiesiny wykorzystano płynną pożywkę DAS [DÖBERREINER, 1980], służącą do oznaczania i namnażania *Azospirillum*. W ciągu trzech tygodni od inokulacji (po 7, 14 i po 21 dniach) obserwowano jej efektywność, porównując zastosowanie szczepienia *Azospirillum lipoferum* w kukurydzy i *Azospirillum brasilense* w pszenicy w warunkach zwiększonego stężenia miedzi w podłożu z analogicznymi kombinacjami, nieszczepionymi tymi bakteriami. Za miarę tej efektywności przyjęto:

- liczebności bakterii w obrębie korzeni kukurydzy i pszenicy,
- aktywność nitrogenazy w asocjacyjnym układzie roślina–diazotrofy,
- zawartość chlorofilu w blaszkach liściowych siewek kukurydzy,
- masę siewek (pędu oraz korzeni).

Parametry te uznano za wymierne wskaźniki zależności między miedzią, roślinami i bakteriami użytymi w doświadczeniu.

Liczebność bakterii określano metodą płytek lanych, stosując pożywkę DAS [DÖBERREINER, 1980]. Aktywność nitrogenazy badanych szczepów oznaczano metodą acetylenową [SAWICKA, 1978], a analizy gazów wykonywano na chromatografie gazowym typ: CHROM 5.

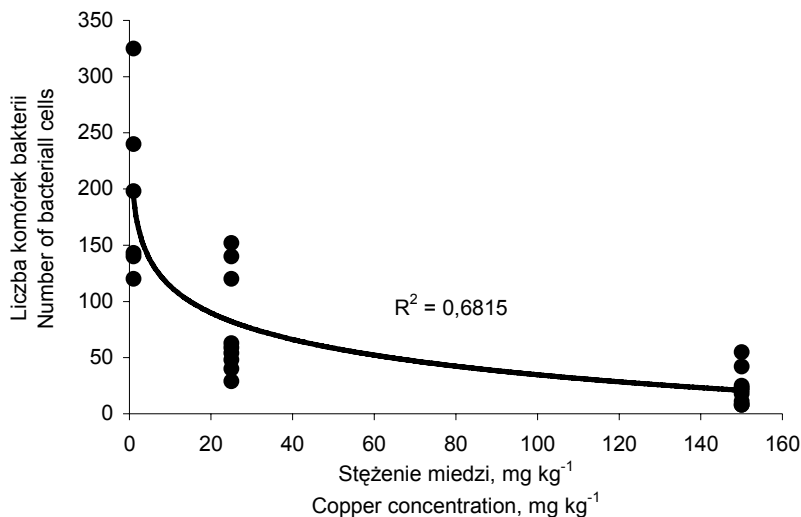
Zawartość chlorofilu w blaszkach liściowych siewek kukurydzy i pszenicy w poszczególnych kombinacjach porównywano za pomocą chlorofilomierza (N-TESTER). Pomiary te określają tzw. indeks zieloności liścia, wyrażony wartością SPAD (ang. „soil plant analyses development”), czyli różnicą między absorpcją światła 650 nm i 940 nm [GÁBORČIK, 2006].

Masę siewek (osobno masę korzeni i pędu) określono po ich wyjęciu z próbki, optukaniu z pożywki i odsączeniu z wody pozostałej po płukaniu.

## WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

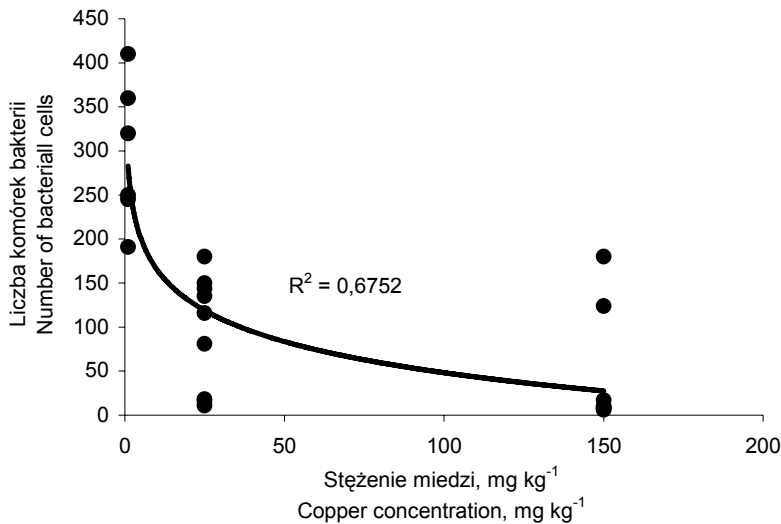
Wyniki badań wskazują na bardzo silne oddziaływanie zastosowanych wartości stężenia miedzi w pożywce, zarówno na bakterie z rodzaju *Azospirillum*, jak i na siewki kukurydzy i pszenicy. Największe stężenie ( $350 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  pożywki) spowodowało całkowite zamieranie siewek pszenicy i kukurydzy, w związku z czym nie było możliwości analizy liczebności *Azospirillum* oraz wybranych parametrów rozwoju roślin.

Wpływ miedzi na liczebność *Azospirillum brasilense*, którymi inokulowane były siewki pszenicy, przedstawiono na rysunku 1., a na *Azospirillum lipoferum*, którymi szczepiono siewki kukurydzy – na rysunku 2. Okazuje się, że w obydwu przypadkach, w warunkach zwiększonej ilości miedzi w pożywce, populacje bakterii były wyraźnie, nawet kilkakrotnie, mniej liczne niż w kombinacji kontrolnej.



Rys. 1. Wpływ różnych wartości stężenia miedzi na liczebność *Azospirillum brasilense* ( $n\cdot 10^6$ ) w 1 g korzeni siewek pszenicy

Fig. 1. The effect of various copper concentrations on the number of *Azospirillum brasilense* ( $n\cdot 10^6$ ) in 1 g of roots of wheat seedlings



Rys. 2. Wpływ różnych wartości stężenia miedzi na liczebność *Azospirillum brasilense* ( $n \cdot 10^6$ ) w 1 g korzeni siewek kukurydzy

Fig. 2. The effect of various copper concentrations on the number of *Azospirillum brasilense* ( $n \cdot 10^6$ ) in 1 g of roots of maize seedlings

Jednocześnie można zauważyć, że gwałtowne zmniejszenie liczebności bakterii nastąpiło już w warunkach najmniejszej z zastosowanych wartości stężenia miedzi w pożywce, czyli 25 mg Cu na 1 kg podłoża. Zwiększenie stężenia do 150 mg Cu na 1 kg podłoża nie miało już tak dużego wpływu na dalsze zmniejszenie liczebności *Azospirillum*, które utrzymywało się na poziomie kilkakrotnie niższym niż w kombinacji kontrolnej. Tymczasem naturalna ilość miedzi w glebach kształtuje się na poziomie od 2 do 40 mg w 1 kg gleby [SIUTA, 1995], natomiast według Rozporządzenia MŚ... [2002] zawartość tego składnika na obszarach przemysłowych nie powinna przekraczać  $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Jest to zatem ilość znacznie większa niż w doświadczeniu.

Toksyczność metali względem mikroorganizmów nie do końca jest zatem jednoznaczna. W warunkach laboratoryjnych stężenie jakiegoś jonu może powodować ich obumarcie, natomiast w środowisku glebowym oddziaływanie to nie musi być już tak wyraźne i jednoznaczne, może być czynnikiem zupełnie obojętnym bądź nawet stymulującym ich rozwój. Zależy to od formy występowania tego pierwiastka i jego dostępności oraz innych czynników środowiskowych [BADURA, 1997; DURSKA, 2006; ZBOROWSKA, WYSZKOWSKA, KUCHARSKI, 2006].

Nie udało się wykazać wpływu zwiększonego stężenia miedzi na zdolność badanych szczepów do wiązania azotu atmosferycznego. Przeprowadzone trzykrotnie, w czasie trwania doświadczenia, analizy nie wykazały aktywności nitrogenazy w układzie *Azospirillum*–roślina w żadnej z kombinacji doświadczalnych.

W literaturze dotyczącej wpływu jonów metali ciężkich można znaleźć wiele doniesień, świadczących o bardzo zróżnicowanej reakcji drobnoustrojów glebowych na ich obecność w środowisku. Dzieje się tak za sprawą zróżnicowania układów enzymatycznych, specyficznych dla poszczególnych gatunków drobnoustrojów [SŁABA, DŁUGOŃSKI, 2002]. Toksyczny wpływ metali ciężkich na drobnoustroje najczęściej polega na zahamowaniu ich wzrostu, zmniejszeniu się zarówno ich liczby, jak i różnorodności oraz na ograniczeniu aktywności biologicznej [MAJEWSKA, KUREK, SZLACHETKA, 2006].

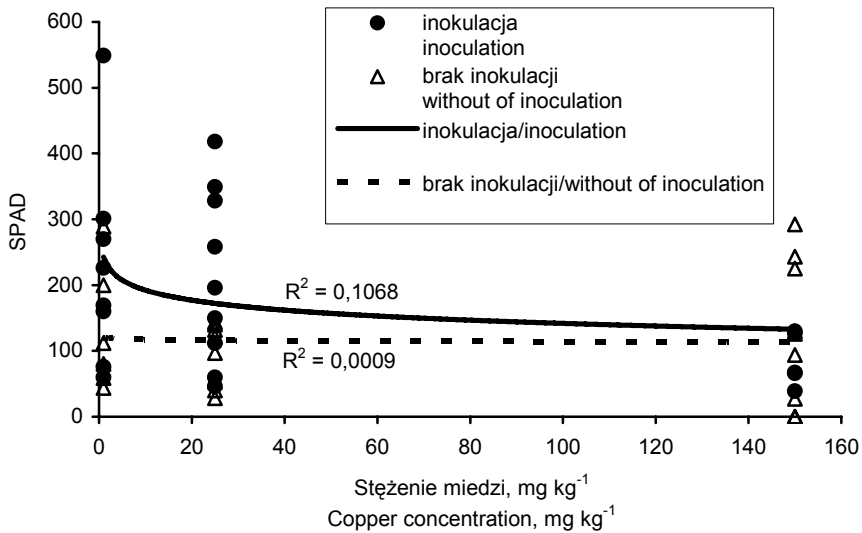
BADURA [1997], określając szacunkową wrażliwość organizmów żywych na jony metali, podaje że najsilniejszą reakcją na miedź wykazują rośliny, natomiast bakterie i zwierzęta średnią. Spośród mikroorganizmów – według WYSZKOWSKIEJ i KUCHARSKIEGO [2003] – najbardziej odporne na zanieczyszczenie gleb metalami ciężkimi są z reguły grzyby, mniej promieniowce, a najmniej bakterie.

Analizując wpływ zwiększonego stężenia miedzi na siewki pszenicy i kukurydzy, za jeden ze wskaźników żywotności roślin przyjęto koncentrację barwników chlorofilowych. Barwniki roślinne spełniają bardzo ważne i wielorakie funkcje w procesach życiowych roślin, determinują m.in. ich odporność na zmieniające się uwarunkowania środowiskowe oraz przebieg fotosyntezy, a tym samym wpływają na ilość wytworzonej biomasy i jej cechy jakościowe [KOZŁOWSKI, GOLIŃSKI, GOLIŃSKA, 2001].

Ze względu na dużą rozpiętość otrzymanych wyników trudno w sposób jednoznaczny określić wpływ analizowanych czynników na koncentrację barwników chlorofilowych w blaszkach liściowych siewek pszenicy i kukurydzy (rys. 3, 4). Powodem takiej sytuacji była zapewne zbyt duża zmienność osobnicza roślin, maskująca efekt doświadczalny, co było szczególnie widoczne w przypadku siewek kukurydzy. Jednakże w przypadku siewek pszenicy można zauważyć, że w kombinacjach inokulowanych *Azospirillum* koncentracja chlorofilu była większa niż w nieinokulowanych, nie tylko w kombinacji kontrolnej, ale także gdy dodatek miedzi wynosił 25 mg Cu na 1 kg podłoża (rys. 3). Inokulacja przyczyniła się zatem do częściowego zniwelowania toksycznego oddziaływania miedzi na siewki pszenicy.

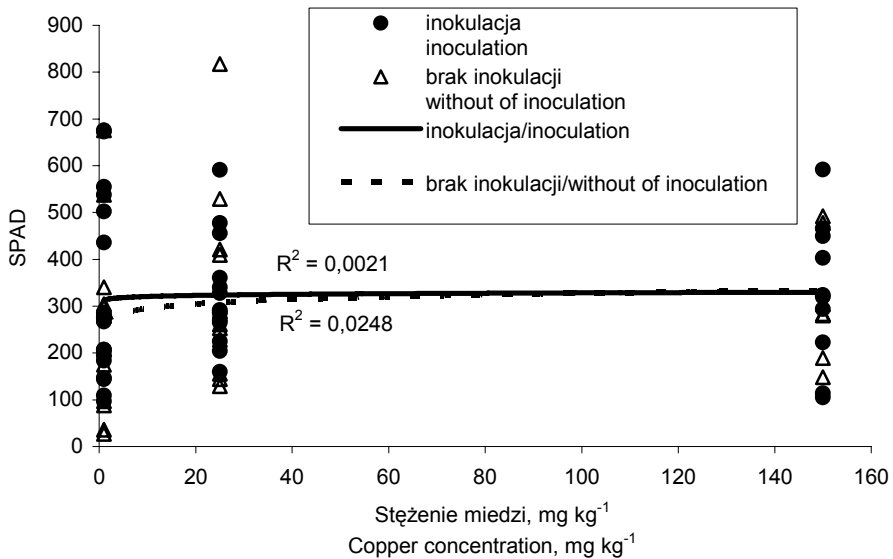
ORZECZOWSKA, BŁASIŃSKA i JEŻEWSKA [1994] donoszą, że charakterystyczną właściwością chlorofilu jest możliwość łatwej wymiany jonów  $Mg^{+2}$  na jony innych metali dwuwartościowych. Efektem tych reakcji jest zmiana barwy, a wprowadzenie do cząsteczki chlorofilu jonów  $Cu^{+2}$  lub  $Zn^{+2}$  powoduje zwiększenie stabilności naturalnej zielonej barwy. Znane są ponadto wyniki wskazujące na udział Cu w syntezie chlorofilu i innych barwników roślinnych [MENDEL, KIRBY, 1983].

Kolejnym parametrem analizowanym w doświadczeniu była masa siewek (pędu oraz korzeni) pszenicy i kukurydzy. W przypadku pszenicy duża rozpiętość wyników uniemożliwiła ocenę wpływu inokulacji *Azospirillum* i różnego stężenia miedzi na masę korzeni (rys. 5). Wyraźny wpływ inokulacji na masę korzeni zanotowano natomiast w przypadku siewek kukurydzy (rys. 6). Efekt ten jest szczegól-



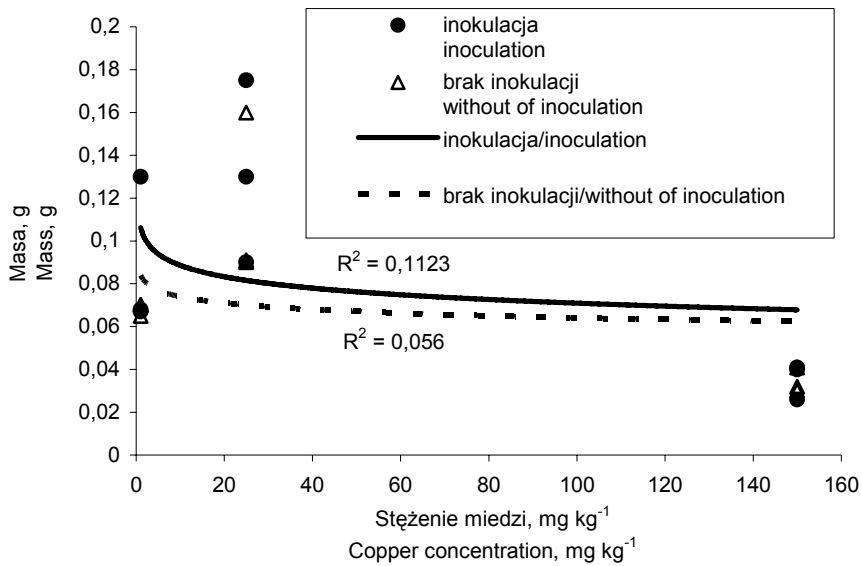
Rys. 3. Wpływ różnych wartości stężenia miedzi na koncentrację barwników chlorofilowych (SPAD) w blaszkach liściowych siewek pszenicy

Fig. 3. The effect of various copper concentrations on the chlorophyll concentration (SPAD) in leaf blades of wheat seedlings



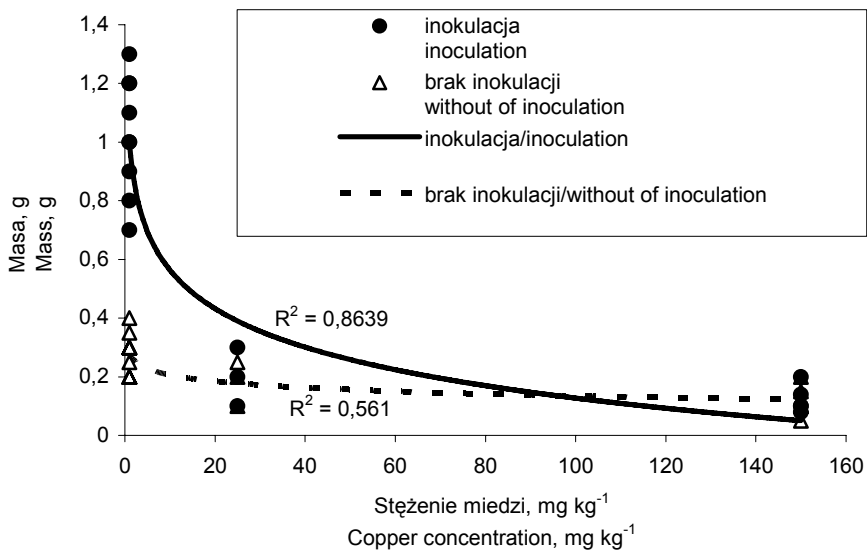
Rys. 4. Wpływ różnych wartości stężenia miedzi na koncentrację barwników chlorofilowych (SPAD) w blaszkach liściowych siewek kukurydzy

Fig. 4. The effect of various copper concentrations on the chlorophyll concentration (SPAD) in leaf blades of maize seedlings



Rys. 5. Wpływ różnych wartości stężenia miedzi na masę korzeni siewek pszenicy

Fig. 5. The effect of various copper concentrations on root mass of wheat seedlings



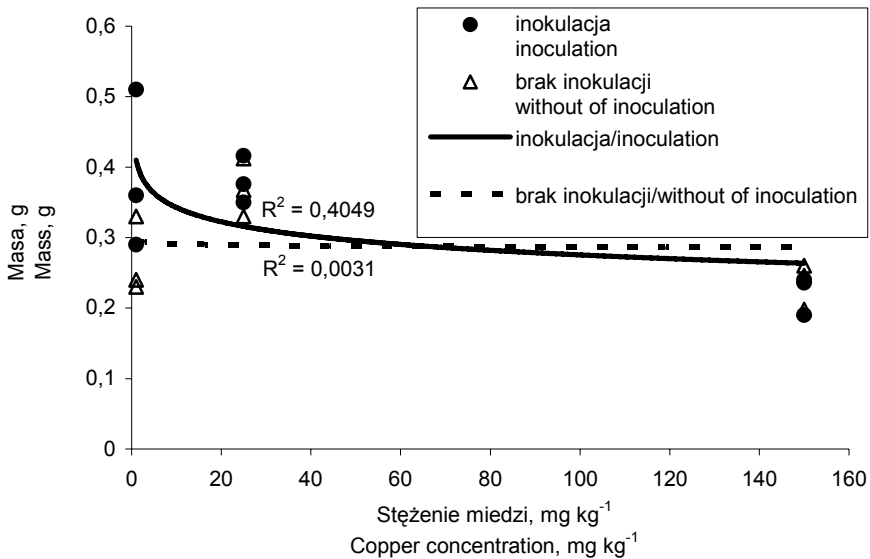
Rys. 6. Wpływ różnych wartości stężenia miedzi na masę korzeni siewek kukurydzy

Fig. 6. The effect of various copper concentrations on root mass of maize seedlings



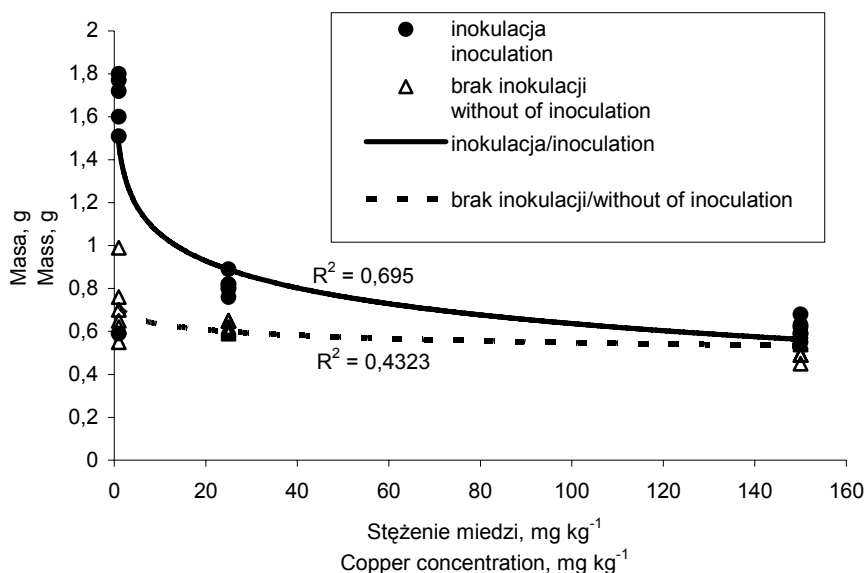
nie widoczny w kombinacji kontrolnej, bez dodatku miedzi. Dodatek miedzi już w najmniejszym z analizowanych stężeń wyraźnie zmniejszał masę korzeni, hamując równocześnie efekt inokulacji *Azospirillum*. Jak podają MENDEL i KIRBY [1983], zahamowanie wzrostu korzeni jest zazwyczaj pierwszą reakcją rośliny na toksyczny poziom miedzi w środowisku. Oddziaływanie to polega głównie na uszkodzeniu komórek korzeniowych i ograniczaniu ich wzrostu.

Zanotowano wyraźny wpływ inokulacji *Azospirillum* na masę pędów siewek pszenicy (rys. 7) i kukurydzy (rys. 8) w kombinacjach kontrolnych. Masa pędów inokulowanych była kilkakrotnie większa niż masa pędów nieinokulowanych. Zwiększone stężenie miedzi w pożywce niwelowało efekt inokulacji. W doświadczeniu z pszenicą wpływ inokulacji zanikał już, gdy dawka miedzi wynosiła 25 mg na 1 kg podłoża (rys. 7), natomiast w przypadku kukurydzy dopiero, gdy stosowano 150 mg Cu na 1 kg podłoża (rys. 8). Nadmiar miedzi w roślinach uszkadza głównie DNA oraz ogranicza procesy fotosyntezy, podlega silnemu wiązaniu z białkami i odkładaniu w przestrzeniach międzykomórkowych, najczęściej w korzeniach. Dla większości roślin wysoki poziom tego składnika jest toksyczny i powoduje zahamowanie wzrostu [KABATA-PENDIAS, PENDIAS, 1993].



Rys. 7. Wpływ różnych wartości stężenia miedzi na masę pędów siewek pszenicy

Fig. 7. The effect of various copper concentrations on shoot mass of wheat seedlings



Rys. 8. Wpływ różnych stężeń miedzi na masę pędów siewek kukurydzy

Fig. 8. The effect of various copper concentrations on shoot mass of maize seedlings

## WNIOSKI

1. Miedź, we wszystkich z zastosowanych stężeń w pożywce, okazała się czynnikiem silnie toksycznym wobec roślin i drobnoustrojów.
2. Inokulacja *Azospirillum* siewek pszenicy i kukurydzy wpływała korzystnie na ich wzrost i rozwój, w niewielkim stopniu niwelując toksyczne oddziaływanie miedzi na rośliny.
3. Uzyskane wyniki badań sugerują konieczność zweryfikowania ich w podobnym doświadczeniu, przeprowadzonym w warunkach glebowych.

## LITERATURA

- BADURA L., 1997. Metale ciężkie w ekosystemach lądowych a ekotoksykologia. W: Drobnoustroje w środowisku, występowanie, aktywność i znaczenie. Kraków: Wydaw. AR s. 13–21.
- BALDANI J.I., CARUZO L., BALDANI V.L.D., GOI S.R., DOBEREINER J., 1997. Recent advanced in BNF with non legume plants. Soil Biol. Biochem. 129 5/6 s. 911–922.
- BASHAN Y., HOLGUIN G., BASHAN L.E., 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). Can. J. Microbiol. 50 s. 521–577.
- DÖBEREINER J., 1980. Forage grasses and grain crops. W: Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Pr. zbior. Red. F.J. Bergsen. New York: Wiley and Sons s. 535–555.

- DURSKA G., 2006. Wpływ miedzi i cynku na wzrost bakterii metylotroficznych wyodrębnionych z gleby rizosferowej i pozarizosferowej jęczmienia. Zesz. Nauk. UP Wroc. Rol. 89 546 s. 57–63.
- GÁBORČIK N., 2006. Koncentrácia minerálnych živin chlorofilu a+b (SPAD hodnoty) v listach tokajských odrôd víniča. Vinič vino 3 s. 2–4.
- GALAŻKA A., KRÓL M., PERZYŃSKI A., 2008. Zmiany abiotycznych i biotycznych czynników gleby skażonej ropą naftową przy wzroście *Festuca pratensis* szczepionej *Azospirillum* ssp. i *Pseudomonas stutzeri*. W: Toksyczne substancje w środowisku. Mater. 5 Międzyn. Konf. Nauk. Kraków, 02–03.09.2008 r. Kraków: UR, PTIE s. 17–18.
- GAMBUŚ F., GORLACH E., 2001. Przeciwdziałanie i łagodzenie skutków zanieczyszczeń gleb. Aura 8 s. 10–12.
- HAATHELA K., WARTIOVAARA T., SUNDMAN., SKUJINS J., 1981. Root-associated N<sub>2</sub> fixation (acetylene reduction): by *Enterobacter* and *Azospirillum* strains in cold-climate spodosols. Appl. Env. Microbiol. 41 s. 203–206.
- KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H., 1993. Biochemia pierwiastków śladowych. Warszawa: PWN ss. 364.
- KOZŁOWSKI S., GOLIŃSKI P., GOLIŃSKA B., 2001. Barwniki chlorofilowe jako wskaźniki wartości użytkowej gatunków i odmian traw. Zesz. Probl. Post. Nauk. Rol. z. 474 s. 215–223.
- MAJEWSKA M., KUREK E., SZLACHETKA D., 2006. Microbial activity-factor increasing retention of Cd addend to soil. Pol. J. Env. St. 15 (2a) s. 177–183.
- MENDEL K., KIRBY E., 1983. Podstawy żywienia roślin. Warszawa: PWRiL ss. 321.
- MOCEK A., DRZYMAŁA S., MASZNER P., 2004. Geneza, analiza i klasyfikacja gleb. Poznań: Wydaw. AR ss. 150.
- ORZECZOWSKA A., BŁASIŃSKA I., JEZEWSKA M., 1994. Barwniki naturalne w żywności. Przem. Spoż. 9 s. 275–277.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi. Dz. U. 2002 nr 165 poz. 1359.
- SAWICKA A., 1978. Aktywność wiązania azotu w glebie oznaczona metodą redukcji acetyleny. Roczn. AR Pozn. 102 s. 103–110.
- SŁABA M., DLUGOŃSKI J., 2002. Mikrobiologiczne usuwanie i odzyskiwanie metali ciężkich. Post. Mikrobiol. 41 (2) s. 167–183.
- SIUTA J., 1995. Gleba. Diagnozowanie stanu zagrożenia. Warszawa: IOŚ. ss. 218.
- SWĘDRZYŃSKA D., 2000. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on development and yielding of winter wheat and oat under different cultivation. Pol. J. Env. St. vol. 9 s. 423–428.
- SWĘDRZYŃSKA D., SAWICKA A., 2001. Effect of inoculation on population numbers of *Azospirillum* bacteria under winter wheat, oat and maize. Pol. J. Env. St. vol. 10 s. 21–25.
- WYSZKOWSKA J., KUCHARSKI J., 2003. Liczebność drobnoustrojów w glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. z. 492 s. 427–433.
- ZBOROWSKA M., WYSZKOWSKA J., KUCHARSKI J., 2006. Liczebność bakterii oligotroficznych i kopiotroficznych w glebie zanieczyszczonej cynkiem i nawożonej słomą i trocinami. Acta Agricult. Silv. Ser. Agraria vol. 49 s. 517–526.
- ZIMMER W., BOTHE H., 1988. The phytohormonal interactions between *Azospirillum* and wheat. Plant Soil 110 s. 239–247.

Dorota SWĘDRZYŃSKA, Aleksandra SAWICKA

**THE EFFECT OF COPPER ON BACTERIA OF THE GENUS *Azospirillum*  
IN THE RHIZOSPHERE OF MAIZE AND WHEAT SEEDLINGS**

*Key words:* *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, copper, maize, wheat

S u m m a r y

Copper is an element necessary for organisms but also strongly toxic if present in the environment in excess. Copper is toxic to both plants and soil microorganisms and its toxicity depends on many factors such as soil type, its physical and chemical properties, but also on plant species and the interactions between plants and soil microorganisms. One of the endophytic groups of microorganism showing a positive effect on plants is bacteria of the genus *Azospirillum*.

The aim of this work was to recognise the response of *Azospirillum* to the presence of different copper concentrations in the rhizosphere of maize and wheat.

*In vitro* cultures of maize and wheat were inoculated with the strains of *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*, respectively. The treatment consisted in the enrichment of the substrate with copper (25, 150, and 350 mg·kg<sup>-1</sup> substrate). The number of bacteria from the genus *Azospirillum* and the activity of nitrogenase were also examined. The growth and development of seedlings and the content of chlorophyll in leaf blades were monitored.

Results of the study showed a strong reaction of plants and bacteria of the genus *Azospirillum* to increasing amounts of copper in the substrate. The highest applied concentration (350 mg·kg<sup>-1</sup> of substrate) caused a complete dying out of wheat and maize seedlings. The remaining concentrations of copper distinctly limited the number of *Azospirillum* and the growth of plants. Bacterial populations were several times less numerous than in the control treatment. Wheat seedlings inoculated with *Azospirillum* were bigger and showed a higher concentration of chlorophyll than those not inoculated, even at higher concentrations of copper.

---

Recenzenci:

*prof. dr hab. Zbigniew Paluszak*

*prof. dr hab. Stefan Russel*

Praca wpłynęła do Redakcji 14.09.2009 r.