

N. BALICKA

Wyższa Szkoła Roln., Wrocław

Wyniki badań własnych nad rhizosferą roślin uprawnych

Coraz większa popularyzacja siewów mieszanych w naszych gospodarstwach rolnych, a w związku z tym dostosowanie systemu Williama do naszych warunków klimatycznych, wywołało konieczność typowania nowych roślin jako komponentów mieszanek strukturotwórczych. Efektywność strukturotwórcza tych roślin jest uzależniona od możliwości uzyskania wysokiego plonu, a więc odpowiednich warunków klimatyczno-glebowych oraz wzajemnego ustosunkowania się roślin do siebie.

Literatura podaje, że oddziaływanie roślin na siebie jest niejednakowe. Jedne gatunki roślin mogą wpływać na siebie antagonistycznie, inne we wspólnym siewie rozwijają się lepiej albo też specjalnie na to nie reagują.

Przyczyny tego zjawiska poszukuje się obecnie między innymi w stosunkach mikrobiologicznych rhizosfery roślin, gdzie mikroflora właściwa każdemu gatunkowi rośliny, jeżeli nie decyduje, to w każdym razie wywiera wielki wpływ na wzajemne ustosunkowanie się roślin do siebie. Tłumaczy się to między innymi produkowaniem przez rośliny i drobnoustroje różnych substancji antybiotycznych, które działają regulująco na zespoły drobnoustrojów w rhizosferze roślin.

Dobieranie więc do mieszanek roślin wpływających na siebie ujemnie mijałoby się z celem ich uprawy. Najwłaściwsze byłoby stosowanie roślin dodatnio na siebie oddziaływających. Jeżeli zgodzimy się, że odbywa się to przy współdziałaniu mikroflory ich rhizosfery, to słuszne jest skierowanie prac badawczych na to zagadnienie.

Dla zapoczątkowania badań wytypowano mieszanek koniczyny czerwonej z tymotką, jako najbardziej standardową mieszanek w płodozmianie systemu Williama. W założeniu było porównanie mikroflory w rhizosferze roślin oraz w glebie, w większej odległości od korzeni. Następnie zbadanie rhizosfery roślin w warunkach siewu czystego i mieszanego dla stwierdzenia czy siew mieszany wywarł wpływ na mikroflorę roślin.

W pracy zastosowano metodykę Afanasjewej, według której wykopano rośliny z możliwie nie uszkodzonym systemem korzeniowym otrząsano tak, aby pozostały na korzeniach tylko drobne grudki gleby, które wytrząsano w wodzie sterylnej. W ten sposób w uzyskanej zawieszynie powinno się uchwycić mikroflorę korzeniową i przykorzeniową (wg definicji Krasilnikowa). Równolegle pobierano próbki gleby z międzyrzędzi z dwu

poziomów: 5—10 cm i 15—20 cm. Glebą z rhizosfery i międzyrzędzi, w odpowiednim rozcieńczeniu, szczepiono pożywki agarowe o różnym składzie. Ilość drobnoustrojów określono w stosunku do 1 g suchej masy gleby.

Analizę ilości drobnoustrojów w glebie i w rhizosferze przeprowadzono dwukrotnie: wczesną wiosną (28.IV.51) oraz w okresie kwitnienia tymotki (14.VI.51).

W y n i k i

1. Na wiosnę w rhizosferze roślin młodych ilość drobnoustrojów była większa aniżeli w okresie kwitnienia traw (latem wilgotność gleby była bardzo niska).

2. Ogólna ilość drobnoustrojów w rhizosferze roślin była większa niż w próbkach pobranych z międzyrzędzi.

3. W rhizosferze tymotki rosnącej w siewie czystym stwierdzono mniejszą ilość drobnoustrojów niż w rhizosferze koniczyny rosnącej w siewie czystym.

4. Mieszanka koniczyny z tymotką spowodowała zwiększenie liczby bakterii w rhizosferze obu roślin oraz w międzyrzędziach.

5. Ilość tlenowych asymilatorów wolnego azotu wzrosła pod mieszankami w porównaniu z siewem czystym.

6. Stwierdzono różnice w składzie jakościowym mikroflory rhizosfery i gleby w międzyrzędziach oraz w składzie jakościowym mikroflory rhizosfery koniczyny i tymotki.

W rhizosferze przeważały formy nie przetrwalnikujące, zaś w glebie pobranej z międzyrzędzi było więcej form przetrwalnikujących.

Otrzymane wyniki są zadowalające, tzn. że są zgodne ze spostrzeżeniami praktyki nad dobrym rozwojem koniczyny czerwonej i tymotki w siewie mieszanym. Widocznie jest on korzystny dla roślin i dla ich drobnoustrojów. Pod wpływem siewu mieszanego wzrasta ilość drobnoustrojów tlenowych w rhizosferze obydwu roślin w porównaniu z ich siewem czystym. Zwiększenie ilości drobnoustrojów w warunkach siewu mieszanego obserwuje się nie tylko przy korzeniach roślin, ale też w glebie nie będącej w bezpośredniej styczności z nimi, mianowicie w międzyrzędziach. Świadczyłoby to o tym, że siew mieszany tych dwóch roślin wpływa dodatnio na ich rozwój oraz zwiększa aktywność mikrobiologiczną gleby.

Zauważono pewne różnice w składzie zespołów drobnoustrojów w rhizosferze roślin i w międzyrzędziach. W rhizosferze przeważały formy nie przetrwalnikujące, zaś w glebie pobranej z większej odległości od korzenia było więcej laseczek przetrwalnikujących (dokładne wyniki w nr 1/52 Acta Microb.).

Ponieważ podany sposób pobierania roślin i gleby do badań był dosyć trudny i nasuwał obawy czy rzeczywiście analizowana gleba pochodzi z rhizosfery roślin, wobec tego dla sprawdzenia wyników należało podejść do zagadnienia jeszcze z innej strony, mianowicie — nie badać już istniejącego stanu, tj. rhizosfery dookoła rosnących roślin, ale spróbować prześledzić od samego początku rozwoju rośliny, w jaki sposób drobnoustroje rozwijają się i rozmieszczają w rhizosferze. Dlatego zaczęto od nasion,

znowu tejże koniczyny czerwonej i tymotki, bowiem nasienie jest żywym organizmem, jest zaczątkiem rośliny będącym w stanie spoczynku. Na powierzchni nasion, jak na każdym przedmiocie żywym i martwym, znajduje się szereg drobnoustrojów. Zachodzi tylko pytanie, czy samo nasienie wpływa w jakiś sposób na ich ilość i jakość, czy też nie.

W poszukiwaniu odpowiedzi zastosowano następującą metodykę. Nasiona wymienionych roślin w ilości 1 g wytrząsano w 100 cm³ wody sterylnej i tą zawiesiną szczepiono pożywki agarowe o różnych źródłach azotu i węgla. W wyniku otrzymano wzrost wyłącznie bakteryjny, utworzony przez pałeczki gramujemne. Z powierzchni nasion koniczyny czerwonej uzyskano kilka lub kilkadziesiąt razy większą ilość ogólną drobnoustrojów niż z powierzchni tymotki (*Acta Microb.* nr 1/52). Na koniczynie były przeważnie dwa gatunki pałeczek. Jedne — tworzące kolonie niebieskawe, lekko fluoryzujące (prawdopodobnie *Ps. fluorescens*) oraz drugie — mętne, o niewyraźnie zarysowanym brzegu i gęściejszym, żółtawym środku. Na tymotce, poza ogólnie mniej liczebną mikroflorą wystąpiła większa różnorodność form bakteryjnych, przeważnie różnych pałeczek, ziarniaków, czasem laseczek.

Można przypuścić, że ta mikroflora, która występuje na powierzchni nasion pochodzi z zakażenia przypadkowego. Załóżmy, że tak jest, ale w takim razie dlaczego przypadkowe zakażenie na koniczynie jest inne niż przypadkowe zakażenie na tymotce, jeżeli przechowuje się je w jednakowych warunkach? Oprócz tego, gdyby to było zakażenie przypadkowe z powietrza, to takie samo powinno być na powierzchni każdego przedmiotu leżącego obok nasion. Razem z nasionami, w tej samej szafie leżały szklane kulki służące do tarowania. Wytrząsano je w wodzie, tak jak nasiona i zawiesiną tą szczepiono różne pożywki. Uzyskano wtedy wzrost w znacznie mniejszej ilości, ale ważniejsze, że zupełnie inny, taki jaki się trafiał na nasionach tylko sporadycznie jako pojedyncze kolonie; były to ziarniaki i laseczki (formy przetrwalnikowe).

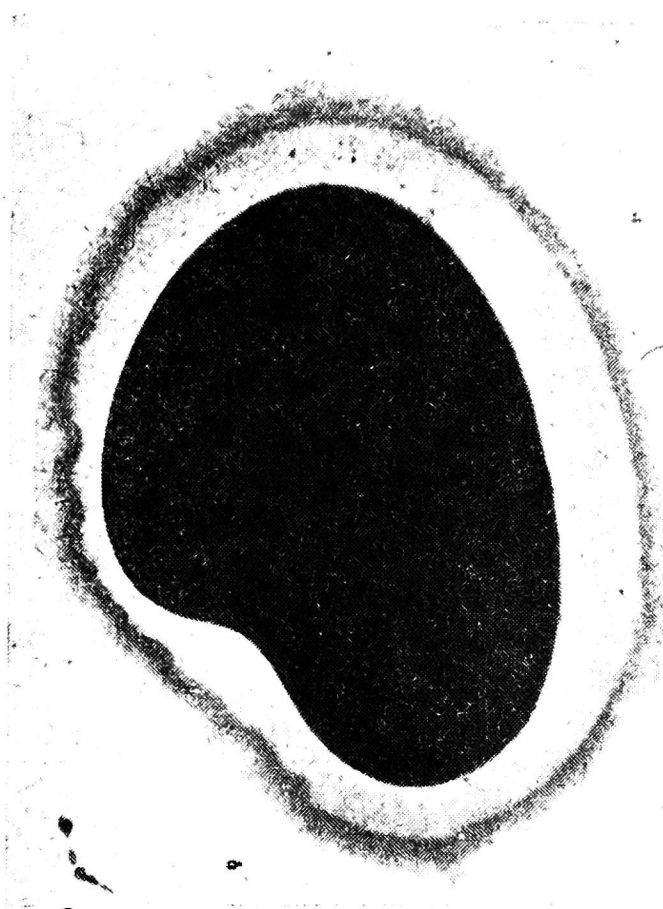
Wallace i Loschhead, badając mikroflorę nasion, doszli do wniosku, że każdy gatunek nasion ma sobie właściwą mikroflorę. Dla koniczyny czerwonej za typ dominujący i współżyjący z nasionami uznali krótką gramujemną pałeczkę, dla tymotki i owsa — średnią gramujemną pałeczkę.

Badania te pozwalają przypuszczać, że nasiona, podobnie jak korzenie, mają właściwą sobie mikroflorę, dzięki selekcyonującym wpływom samego nasienia. Krasilnikow, badając działanie antybiotyków wydzielanych przez różne drobnoustroje na rośliny, stwierdził, że niektóre z tych antybiotyków mają zdolność przenikania przez system korzeniowy i następnie rozprzestrzeniania się po całej roślinie, gromadząc się nawet w pewnych jej częściach, np. w liściach czy łodygach nie naruszając ich normalnego życia. Zresztą niekoniecznie antybiotyki hamujące wzrost drobnoustrojów mają hamować wzrost tkanek roślinnych, przeciwnie, przypuszczam, że może się nawet zdarzyć, że będą aktywatorami wzrostu.

Krasilnikow wykonał doświadczenia nad przenikaniem antybiotyków do rośliny. Hodował on rośliny na podłożu z dodatkiem antybiotyków w różnych rozcieńczeniach: penicyliny, streptomycyny i mycetyny. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że niektóre antybiotyki nie roz-

chodziły się po roślinie, jak np. mycetyna, która nie uległa przemieszczeniu poza korzenie. Inne antybiotyki, jak penicylina i streptomycyna docierały do liści i tam się gromadziły. Rośliny w starszym wieku nie były badane. Dlaczego więc nie można przypuścić, że te substancje w miarę rozwoju roślin przesuwiają się dalej i docierają do kwiatu i nasienia?

Gdyby tak było faktycznie, to nasienie mając w sobie antybiotyki, mogłoby już w początkowym okresie korzystać z nich przy regulowaniu swojego bakteryjnego otoczenia. Możliwe, że antybiotyki po przejściu przez roślinę ulegają pewnym zmianom, tym niemniej przypuszczenie, że drobnoustroje same dostarczają roślinie materiału do walki z nimi, niekoniecznie musi być błędne, aczkolwiek brzmi nieco paradoksalnie.



Rys. 1. Napęczniałe nasienie koniczyny czerwonej na agarze. Dookoła strefa wzrostu bakterii. Pow. 30x

Wyżej wymienieni autorzy pracy nad mikroflorą nasion wysuwają koncepcję, że zespoły drobnoustrojów w rhizosferze roślin powstają jako wypadkowa z mikroflory gleby i nasion dostających się tam. Z powierzchni nasion drobnoustroje przechodzą na korzeń, stamtąd do rhizosfery i częściowo dalej do gleby; z gleby zaś pewne grupy drobnoustrojów przenikają do rhizosfery rośliny i tak kształtuje się typowa dla rhizosfery mikroflora. Wzmianki o przenikaniu bakterii z warstw przykorzeniowych do gleby i przeciwnie spotyka się również i w literaturze radzieckiej.

Aby w dalszym ciągu obserwować jak zachowuje się mikroflora nasienna w procesie kiełkowania, układano nasiona na szkiełkach podstawowych, oblanych pożywką agarową z dodatkiem wyciągu korzeniowego tej rośliny, której nasiona badano, oraz w drugim powtórzeniu z wyciągiem glebowym.

Szkiełka te układano w naczyniu przykrytym płytką szklaną na wilgotnej bibule (wszystko sterylne). Trzymano w termostacie w $t = 28^\circ$. Stwierdzono, że po 24 godz. dookoła nasienia powstaje otoczka, która jest utworzona przez bakterie i stanowi jakby dużą złożoną kolonię, reszta zaś agaru pozostaje czysta.

Przy porównaniu kształtu tej otoczki dookoła nasienia tymotki i koniczyny w większości przypadków zauważono, co następuje: Dookoła nasienia koniczyny otoczka ma zarys równy i utworzona jest prawie wyłącznie z grubych, krótkich i bardzo ruchliwych pałeczek (podobnych do spotykanych w zmywach z nasion koniczyny). Nie są one rozmieszczone równomiernie w całej otoczce — największe zagęszczenie bakterii jest nie przy samym nasieniu, ale w odległości ok. 20—30 mikronów, przy brzegu otoczki ilość ich zmniejsza się, są też mniej ruchliwe lub całkiem nieruchome (rys. 1). Dookoła nasienia tymotki otoczka była przeważnie zarysowana inaczej niż u koniczyny, miała brzeg z wypustkami przypominającymi kolonie, jakie tworzyły się ze zmywów nasienia tymotki (rys. 2); utworzona była z grubych, krótkich pałeczek jak na koniczynie, tylko mało ruchliwych lub całkiem nieruchomych. Oprócz nich spotykało się sporo innych pałeczek nieruchomych i nieco ziarniaków. Z chwilą wyrośnięcia korzonka obserwowano, że otoczka bakteryjna przesuwana się i tworzy się wzdłuż całej jego długości i jest podobna do otoczki występującej dookoła nasienia (rys. 3). U koniczyny otoczka ma brzeg równy i składa się z grubych, krótkich pałeczek i drobniejszych cieńszych pałeczek. W 10 przypadkach na 100 badań pałeczki te były nieruchome, w 12 — ruchome, a w 78 — otoczka była utworzona z dwu warstw: przy korzeniu warstewką grubości ok. 30 mikronów — warstwa bardzo ruchliwych, drobnych pałeczek i z brzegu — warstewką nieruchomych, drobnych pałeczek.

U tymotki — zarys otoczki przeważnie nierówny, z wypustkami. Otoczka składa się z różnych pałeczek: w 49 przypadkach — nieruchomych, w 44% — z ruchomymi; w 7% — otoczka dwuwarstwowa tak jak u koniczyny. U tymotki obserwuje się nieco większą różnorodność form bakteryjnych, oprócz pałeczek spotykanych również przy koniczynie są pałeczki dłuższe oraz ziarniaki. Poza tym w 67% przypadków stwierdzono na powierzchni korzeni mnóstwo żyjących pierwotniaków (*Paramaecium caudatum*).

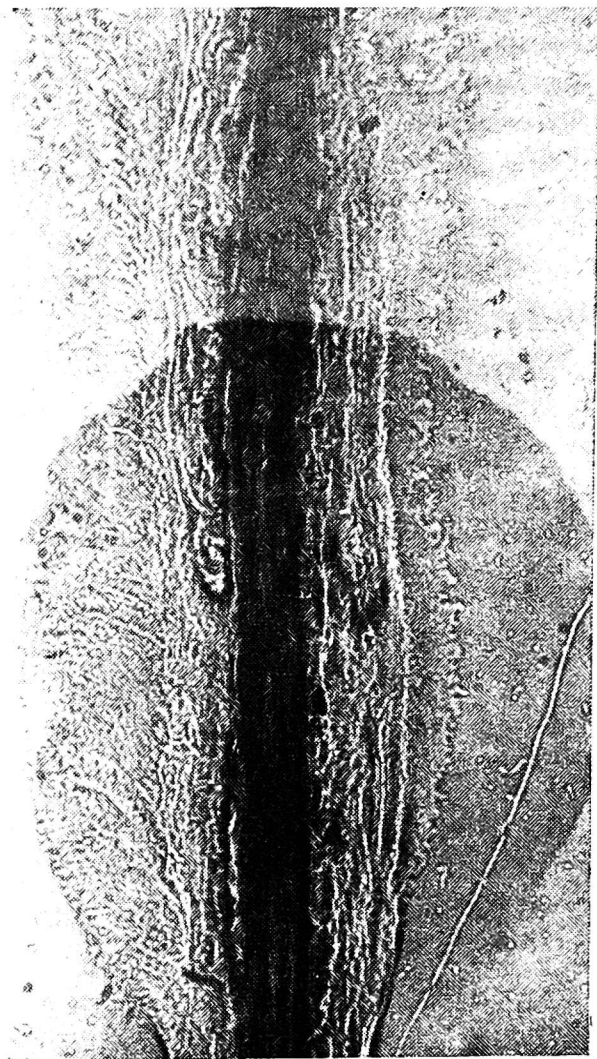
Następnym etapem pracy była próba przejścia z warunków sztucznych, czysto laboratoryjnych do bardziej bliskich warunkom terenowym, bo do wazonowych. Do tego użyto szklanych płaskich wazonów Niklewskiego i zastosowano metodykę zaproponowaną przez prof. Świętochowskiego, polegającą na tym, że nasiona sadziło się tuż przy szklanej ścianie, dzięki czemu system korzeniowy rosnącej rośliny leżał z jednej strony na glebie, a więc na podłożu naturalnym, a z drugiej przylegał do szkła. Zaletą tej metody jest możliwość stałej obserwacji rozwoju korzeni, łatwość dostępu i badanie w każdym okresie rozwojowym bez niszczenia samego obiektu. Jest to możliwe dzięki wstawianym ruchomym ściankom, które można w każdej chwili wyjąć.

Nasiona koniczyny sadzono w tych wazonach i po kilku dniach, kiedy spęczniały i zaczęły kiełkować, zdejmowano ściankę szklaną i następnie

małą łopatką szklaną o pow. ok. 1 mm² pobierano niewielkie próbki gleby (ok. 10—20 mg) z następujących miejsc: 1) przy powierzchni nasion, 2) z odległości 0,5 cm od powierzchni, 3) z odległości kilku lub kilkunastu cm od powierzchni, tam gdzie przypuszczalnie nie sięgają wpływy roślin. Glebę tą, po wytrząśnięciu z wodą sterylną, szczepiono pożywki agarowe o różnym składzie (uniwersalna, MPA, z brzeczką dla *Rhizobium*, dla denitryfikatorów).



Rys. 2. Napęczniałe nasienie tymotki na agarze. Dookoła strefa wzrostu bakterii. Pow. 3,5x



Rys. 3. Korzeń kielkującej tymotki. Wokół korzenia strefa wzrostu bakterii na agarze z wyciągiem korzeniowym. Pow. 94x

To samo doświadczenie przeprowadzono na roślinach starszych o kilka dni, a więc w stadium, kiedy wytworzyły się korzonki około 2—4 cm długości. Glebę do badania pobierano wówczas nie przy nasieniu, a wzdłuż korzenia. Poza tym samo nasienie i korzonek, po usunięciu z niego przyczepionych grudek ziemi, wrzucano do wody sterylnej i uzyskaną zawiesinę szczepiono te same pożywki.

Uzyskane wyniki uważane są za tymczasowe, chociaż należy podkreślić, że na ogół dosyć zgodne. Kilkundniowa różnica wieku roślin, tj. od okresu pęcznienia nasienia do wytworzenia korzonka zarodkowego nie wprowadziła większych zmian w stosunki mikrobiologiczne ich otoczenia. W poniższym zestawieniu są podane liczby wyrażające ilość mikro-

flory w różnej odległości od korzenia, uzyskane przy zastosowaniu pożywki z mannitem i asparaginą (korzonek koniczyny, o długości około 2—4 cm, kilkudniowy).

Kombinacja	Pałeczki nie przetrwalnik.		Laseczki przetrwalnik.		R a z e m	
	w milion. w l g suchej masy gleby	w % og. ilości drobn.	w milion. w l g suchej masy gleby	w % og. ilości drobn.	w milion. w l g suchej masy gleby	%
Korzonek koniczyny o dł. 2—4 cm	0,034 ¹⁾	100,0	—	—	0,034 ¹⁾	100
Gleba pobrana przy korzeniu (ze śladu)	8,9	89,0	1,1	11,0	10,0	100
Gleba pobrana w odl. 0,5 cm od korzenia	16,8	96,0	0,7	4,0	17,5	100
Gleba pobrana spoza zasięgu korzenia	0,06	75,0	0,02	25,0	00,8	100

¹⁾ Liczba określa ilość drobnoustrojów na korzonku, a nie w stosunku do jednego grama suchej masy gleby, jak w innych rubrykach.

S t r e s z c z e n i e

1. Stwierdzono, że liczebność mikroflory zmienia się w zależności od odległości od korzenia.

Najliczniej występują drobnoustroje tuż przy korzeniu. W miarę oddalania się od korzeni ilość drobnoustrojów maleje aż do osiągnięcia liczebności około 100 razy mniejszej.

2. Oprócz ilości zmienia się też stosunek występujących form bakteryjnych pałeczek i laseczek. Na powierzchni korzenia znajdują się wyłącznie pałeczki nie przetrwalnikujące. W glebie w miarę oddalania się od korzenia wzrasta ilość laseczek przetrwalnikujących.

Należy też zaznaczyć, że wzrost bakteryjny uzyskiwany na płytkach agarowych przez zaszczepienie ich glebą pobraną z powierzchni korzenia, jak też zawiesiną otrzymaną z opłukania samego korzonka daje bardzo podobny obraz do tego, jaki był utworzony przez mikroflorę z powierzchni suchych nasion koniczyny — przeważają takie same grupy pałeczek nie przetrwalnikujących.

Na podstawie wszystkich przytoczonych tu fragmentów badań nad mikroflorą rhizosfery koniczyny czerwonej i częściowo tymotki wysuwają się następujące wnioski:

1. Ogólna liczebność mikroflory w rhizosferze tych roślin jest stale wielokrotnie większa niż z samej gleby.

2. Na nasionach suchych koniczyny czerwonej, na nasionach kiełkujących i w warstwie gleby bezpośrednio przylegającej do nasienia lub młodego korzonka, czy też w warstwie pożywki sztucznej otaczającej kieł-

kujące nasienie stale przeważają te same grupy bakterii, tak jakby były one w jakiś sposób związane z nasieniem i powierzchnią młodego korzonka. W samej glebie obok tych form, występuje sporo innych, przede wszystkim form przetrwalnikujących.

Gdyby uzyskane wyniki powtarzały się w dalszych badaniach, to można by się było zgodzić z sugestiami Wallace'a i Loschhead'a o kształtowaniu się zespołów drobnoustrojów w rhizosferze roślin jako wypadkowej ze specyficznej mikroflory nasienia i mikroflory gleby, naturalnie (dodałabym), że na tle określonych warunków siedliskowych.