

Anna Strzelec

Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach

Wpływ drobnoustrojów glebowych na rozwój *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* i ich symbiozę z roślinami motylkowatymi

I. Wpływ autochtonicznej mikroflory glebowej i wolno żyjących asymilatorów N₂ z rodzajów *Azospirillum* i *Azotobacter*

Badania wpływu autochtonicznej mikroflory glebowej na rozwój *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* i symbiozę z roślinami motylkowatymi oraz oddziaływania na ten proces szczepienia roślin wolno żyjącymi asymilatorami N₂ z rodzaju *Azospirillum* i *Azotobacter* prowadzone są w poszukiwaniu możliwości zwiększenia efektywności symbiozy i poprzez lepsze wykorzystanie azotu atmosferycznego zwiększenie plonów tych roślin.

Wpływ autochtonicznej mikroflory glebowej na rozwój i efektywność bakterii symbiotycznych został stwierdzony przez licznych badaczy [8, 9, 16, 17, 19, 24, 25, 40, 58, 59]. Wyniki ich badań wykazały duże różnice pomiędzy rodzajami bakterii symbiotycznych, a w ich obrębie pomiędzy gatunkami, a nawet szczepami, w zakresie reakcji na fagi i wytwarzane przez drobnoustroje glebowe toksyny i antybiotyki. Różna reakcja szczepów na warunki środowiska może decydować o ich konkurencyjności w zakażaniu roślin motylkowatych, a tym samym o efektywności szczepionek.

Khan, Moore i Webster [24], szukając przyczyn słabego efektu szczepienia lucerny uprawianej na niektórych glebach Kanady, stwierdzili, że częściowa sterylizacja gleb znacznie poprawiła brodawkowanie i zwiększyła efektywność szczepienia roślin. Zdaniem autorów mogło to być spowodowane eliminowaniem z gleb podczas sterylizacji endemicznej mikroflory, hamującej rozwój szczepu wprowadzonego w szczepionce, lecz nie wpływającej na rozwój autochtonicznych szczepów *R. meliloti*, bądź też eliminowaniem z gleb autochtonicznych szczepów *R. meliloti* i tym samym braku z ich strony konkurencji w zakażaniu roślin przez szczep wprowadzony w szczepionce.

Chatel i Parker [9] wykazali, że wodny ekstrakt z gleby, na której uzyskiwano słaby efekt szczepienia koniczyny i dobry efekt szczepienia łubinu, hamował rozwój szczepów *R. leguminosarum* biov. *trifolii*, natomiast nie wpływał na rozwój szczepów *Bradyrhizobium* sp. (*lupini*). Zdaniem badaczy świadczyło to o biotycznym charakterze oddziaływania ekstraktu. Sprawdzone interakcję szczepów bakterii symbiotycznych użytych do szczepienia koniczyny i łubinu z ponad 500 szczepami bakterii, promieniowców i grzybów wyodrębnionych z badanej gleby. Stwierdzono, że większość testowanych drobnoustrojów nie wpływała na wzrost szczepów łubinowych, natomiast hamowała wzrost szczepów koniczynowych, przy czym znacznie większe zahamowanie wzrostu szczepów koniczynowych obserwowano w obecności drobnoustrojów wyodrębnionych z ryzosfery tej rośliny niż ze strefy pozakorzeniowej [9].

Występowanie w glebach drobnoustrojów antagonistycznych w stosunku do bakterii symbiotycznych stwierdzili także inni badacze. Na przykład w glebach badanych przez Pugashetti, Angle i Wagnera [40] populacja promieniowców antagonistycznych w stosunku do *Rhizobium* wahała się od $1,3 \cdot 10^3$ do $4,5 \cdot 10^3$ g⁻¹ s.m. gleby, antagonistyczne bakterie stanowiły aż 90% ogólnej ich liczebności, natomiast tylko nieliczne bakterie i promieniowce stymulowały wzrost *Rhizobium*.

Duża liczebność w glebach drobnoustrojów antagonistycznych w stosunku do bakterii symbiotycznych potwierdza celowość przedsięwzięcia nasion roślin motylkowatych specyficznym dla nich i konkurencyjnym w stosunku do szczepów autochtonicznych szczepem bakterii symbiotycznej. Zabieg ten ma na celu zapewnienie roślinie wysokiej liczby komórek tych bakterii, gwarantującej efektywną symbiozę.

W ostatnim dziesięcioleciu w literaturze światowej pojawiają się coraz liczniejsze doniesienia o możliwości korzystnego oddziaływania na rozwój i plon roślin uprawnych, w tym również roślin motylkowatych, szczepienia nasion drobnoustrojami ryzosferowymi wpływającymi korzystnie na rozwój i plon roślin. Drobnoustroje te określane są jako PGPR, od skrótu angielskiego określenia plant growth-promoting rhizobacteria. Wykorzystują one jako źródło C, N i energii substancje wchodzące w skład wydzielin korzeniowych i mogą stymulować wzrost roślin. Stymulacja może być wynikiem bezpośredniego zaopatrywania roślin w substancje pokarmowe, np. w azot (bakterie z rodziny *Rhizobacteriaceae*, promieniowce *Frankia*, wolno żyjące asymilatory N₂, bakterie wiążące N₂, żyjące w asocjacji z rośliną) lub fosfor (grzyby mikoryzowe), jak też zwiększenia przyswajalności substancji znajdujących się w podłożu (drobnoustroje udostępniające fosfor lub żelazo ze związków trudno rozpuszczalnych).

Drobnoustroje zaliczane do grupy PGPR mogą stymulować rozwój roślin także pośrednio, poprzez ograniczenie rozwoju patogenów i/lub drobnoustrojów szkodliwie oddziałujących na wzrost roślin (określanych skrótem DRMO od deleterious rhizosphere microorganisms), usuwanie z podłoża substancji hamujących wzrost roślin lub stymulację rozwoju drobnoustrojów korzystnie wpływających na rośliny (PGPR).

Wyniki badań dowodzą, że przynależność jakiegoś drobnoustroju ryzosferowego do PGPR lub DRMO nie jest jego stałą cechą, lecz zależy od rośliny. Na przykład.

szczep *Serratia plymuthica* G15 wprowadzony do ryzosfery sałaty zachowywał się jak drobnoustrój z grupy PGPR, stymulując jej wzrost, natomiast w przypadku grochu zachował się drobnoustrój z grupy DRMO [1, 2].

Przegląd literatury na temat oddziaływania mikroflory ryzosferowej na rozwój roślin zawierają prace Kurek i Kobusa [27] oraz Paszkowskiego [31].

W literaturze światowej coraz częściej pojawiają się doniesienia o możliwości zwiększenia efektywności symbiozy poprzez wprowadzanie na nasiona roślin motylkowatych, oprócz bakterii symbiotycznych, również odpowiednio dobranych szczepów innych drobnoustrojów z grupy PGPR, np. bakterii z rodzaju *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, bakterii rozpuszczających fosforany, grzybów mikoryzowych.

Wpływ *Azospirillum*. Stosunkowo duże zainteresowanie badaczy wzbudził wpływ na proces symbiozy bakterii z rodzaju *Azospirillum*, żyjących w asocjacji z korzeniami różnych roślin [3, 6, 12–15, 21, 29, 34–39, 41–43, 46, 50–52, 57, 60–63].

Interakcja pomiędzy tymi bakteriami a roślinami ma miejsce w ryzosferze lub tkance korzenia, jednak w jej wyniku nie tworzą się struktury dające się porównać do brodawek korzeniowych indukowanych przez bakterie symbiotyczne [6]. Asocjacja polega jedynie na intensywnej kolonizacji przez komórki *Azospirillum* ryzosfery, ryzoplany i/lub wnętrza korzenia [14, 28].

Sposób kolonizacji korzeni roślin przez *Azospirillum* jest bardzo różny i zależy od gatunku rośliny, właściwości szczepu, warunków środowiska i innych dotychczas nie określonych czynników [6, 28]. Dla większości badanych gatunków roślin głównym miejscem kolonizacji są strefy wydłużenia korzenia i włósniki korzeniowe.

Wielu badaczy stwierdziło zdolność przylegania *Azospirillum* do komórek korzenia różnych roślin, a niektórych gatunków tej bakterii do kolonizacji powierzchni korzenia lub zewnętrznych warstw korowych i penetracji do przestrzeni międzykomórkowych pomiędzy skórą i korą, a nawet systemu naczyniowego [32, 33, 60].

Sposób penetracji *Azospirillum* do przestrzeni międzykomórkowych nie jest dotychczas poznany. Istnieje kilka teorii [6] sugerujących, że penetracja komórek może przebiegać poprzez: 1. uszkodzenia tkanki korowej w miejscu rozgałęzień korzeni bocznych z korzeniem głównym, 2. miejsca lizy włósników korzeniowych i ich mechanicznych uszkodzeń w czasie wzrostu roślin, 3. bezpośrednią penetrację poprzez ściany komórkowe w wyniku pektolitycznej aktywności tych bakterii. Teorię tę potwierdza wykazana w warunkach *in vitro* zdolność szczepów *Azospirillum* do wytwarzania niektórych pektynaz [30, 36, 55].

Badania nad asocjacją *Azospirillum* z roślinami dotyczyły głównie zbóż i traw i wykazały, że szczepienie *Azospirillum* wpływało na różne właściwości tych roślin, mające lub nie mające wpływu na wysokość plonu [6].

Efekt szczepienia roślin *Azospirillum* zależy od właściwości rośliny oraz od właściwości szczepu, między innymi od zdolności chemotaksji jego komórek do aminokwasów, kwasów organicznych i cukrów znajdujących się w wydzielinach korzeniowych roślin [18, 42, 43, 48].

Rai [42] wykazał, że chemotaksja *Azospirillum brasilense* jest zjawiskiem specyficznym szczepowo, natomiast Bashan i in. [5] w badaniach przeprowadzonych w kontrolowanych warunkach wykazali, że użyty przez nich szczep *Azospirillum brasilense* kolonizował system korzeniowy aż 64 gatunków roślin należących do 19 różnych rodzin botanicznych.

Stwierdzono, że rośliny szczepione *Azospirillum* mają na ogół lepiej rozwinięty system korzeniowy. Tien, Gaskins i Hubbel [56] sądzą, że jest to spowodowane wytwarzanymi przez *Azospirillum* substancjami stymulującymi wzrost roślin. Badacze ci wykazali obecność w czystych hodowlach *A. brasilense* auksyn, giberelin i cytokinin. Wprowadzając te substancje do pożywki, w której zanurzone były korzenie roślin, uzyskali identyczny efekt jak przy szczepieniu nasion *Azospirillum*.

Niektórzy badacze kwestionują zdolność *Azospirillum* do produkcji cytokinin i giberelin. Ich zdaniem substancje te są wytwarzane jedynie w obecności w pożywce tryptofanu, a deformacje korzeni może powodować czynnik wzrostowy wytwarzany przez roślinę w odpowiedzi na kolonizację korzeni przez *Azospirillum* [20, 64]. Reynders i Vlassak [49] stwierdzili zdolność *Azospirillum* do przemiany tryptofanu w kwas indolilo-octowy.

Wyniki badań nad wpływem *Azospirillum* na proces symbiozy roślin motylkowatych z bakteriami brodawkowymi, a tym samym na rozwój i plonowanie tych roślin, nie są jednoznaczne.

Pod wpływem skojarzonego szczepienia roślin motylkowatych *Rhizobium* lub *Bradyrhizobium* i *Azospirillum* wielu badaczy wykazało zwiększenie liczby i masy brodawek korzeniowych oraz aktywności wiązania N_2 , prowadzące do wzrostu plonu w stosunku do wartości uzyskanych w roślinach zakażonych jedynie bakteriami symbiotycznymi [3, 12, 13, 15, 21, 35, 41, 50, 57, 62, 63]. Są również doniesienia o braku wpływu *Azospirillum*, a nawet ich niekorzystnym oddziaływaniu na przebieg symbiozy i plonowanie roślin motylkowatych [35, 37, 38, 39].

Poszukując przyczyn rozbieżności wyników wykazano, że efekt skojarzonego szczepienia roślin motylkowatych bakteriami symbiotycznymi i *Azospirillum* zależy od wielu czynników, między innymi od gatunku, a nawet odmiany szczepionej rośliny, właściwości szczepów obu bakterii, liczebności komórek w szczepionkach oraz sposobu i terminu ich stosowania [3, 14, 35, 46, 52].

Fayez, Emam i Makboul [13], badając kolonizację przez *Azospirillum brasilense* korzeni i brodawek korzeniowych sześciu uprawianych w Egipcie odmian bobiku, stwierdzili obecność bakterii zarówno na korzeniach, jak i brodawkach badanych odmian. Szczepienie *Azospirillum* dwu wybranych odmian bobiku poprawiało brodawkowanie oraz zwiększało aktywność nitrogenazy i plon s.m. roślin zakażonych autochtonicznym szczepem *Rhizobium*. Ten korzystny efekt zwiększał się, gdy *Azospirillum* wprowadzano w kombinacji z *Rhizobium*. Podobne wyniki uzyskał Sing i Subba Rao [52] w doświadczeniu z soją.

Galanti, Giannellimi i Bazzicalupo [14] stwierdzili, że z badanych przez nich szczepów *Azospirillum* tylko niektóre stymulowały brodawkowanie koniczyny i tylko wówczas, gdy liczebność ich komórek w szczepionce wynosiła co najmniej 10^7 , natomiast szczepionki o niższej liczebności komórek nie wpływały na brodawkowanie.

Badania przeprowadzone z fasolą i soją, szczepionymi specyficznymi dla tych roślin szczepami bakterii symbiotycznych oraz ich mieszaniną z jednym z czterech użytych w doświadczeniu szczepów *Azospirillum brasilense*, wykazały że szczepy *Azospirillum* stymulowały aktywność nitrogenazy i wzrost fasoli, a dwa z nich miało podobny wpływ na soję. *Azospirillum* zwiększało liczbę miejsc infekcji korzeni badanych roślin przez *Rhizobium* lub *Bradyrhizobium*, zwiększając liczbę brodawek i ich masę. Szczepy *Azospirillum* wyraźniej stymulujące brodawkowanie i aktywność nitrogenazy wykazały większą zdolność przemiany tryptofanu do IAA od szczepów mniej aktywnych [3].

Synergistyczny efekt *Rhizobium* i *Azospirillum* stwierdzili także inni badacze. Na przykład badając w warunkach polowych wpływ szczepienia dwu odmian *Arachis hypogea* *Rhizobium* i/lub *Azospirillum lipoferum* stwierdzono, że każda z tych bakterii stosowana oddzielnie stymulowała brodawkowanie i plon roślin oraz zawartość w nich N, natomiast wpływ szczepienia mieszaniną hodowli tych bakterii był znacznie mniej korzystny [46].

Plaziński i in. [35–39], badając wpływ pięciu szczepów *Azospirillum* na wytwarzanie brodawek korzeniowych przez 14 szczepów reprezentujących różne gatunki *Rizobium*, wykazali, że efekt szczepienia zależał od liczebności w szczepionkach komórek obu bakterii oraz terminu ich stosowania. Stymulację brodawkowania stwierdzono, gdy rośliny szczepiono najpierw *Rhizobium*, a *Azospirillum* wprowadzono co najmniej 24 godziny później lub odwrotnie, natomiast równocześnie stosowanie obu bakterii hamowało brodawkowanie. Szczególnie wyraźny hamujący wpływ *Azospirillum* obserwowano wówczas, gdy w użytej do szczepienia mieszaninie liczba komórek *Azospirillum* znacznie przewyższała liczbę komórek *rizobium* lub była do niej zbliżona. W niektórych kombinacjach szczepów *Azospirillum* i *R. leguminosarum biov. trifolii* stwierdzono hamowanie brodawkowania koniczyny z równoczesną stymulacją wzrostu włośników i nadprodukcją przez rośliny śluzów. Taka reakcja roślin na *Azospirillum* mogła być, zdaniem autorów, przyczyną zmniejszonej podatności włośników na zakażenie przez *rizobium* i była podobna do reakcji obserwowanej u roślin szczepionych *Rhizobium* w obecności w podłożu fitohormonów. Autorzy sugerują, że kolonizacja włośników przez *Azospirillum* może blokować miejsca ich infekcji przez *rizobium*. *Azospirillum* stwierdzono zarówno w korzeniach, jak i brodawkach wszystkich badanych roślin motylkowatych.

Singh [51] wykazał, że dializaty ze sterylnych supernatantów z hodowli szczepów *Azospirillum brasilense* wpływały stymulująco na wzrost badanych przez niego szczepów *Bradyrhizobium japonicum*. Wielkość stymulacji zależała od właściwości

szczepów obu bakterii, co — zadaniem autora — może świadczyć o wytwarzaniu przez *Azospirillum* substancji sprzyjających wzrostowi bakterii brodawkowych.

Bashan i in. [4] badali reakcję błon komórkowych korzeni *Glycine max* i *Vigna unguiculata* na szczepienie *Azospirillum brasilense*. Stwierdzili, że szczepienie tą bakterią wyraźnie zwiększyło wpływ protonów z korzeni badanych roślin, zmieniło ilość fosfolipidów w błonie komórek *V. unguiculata* i redukowało potencjał błon komórkowych soi. Badania te sugerują, że błony komórkowe korzeni roślin są prawdopodobnie głównym miejscem kolonizacji *Azospirillum* i mogą służyć jako wskaźnik zasiedlenia rośliny przez tę bakterię.

Stwierdzany przez różnych badaczy, w wyniku szczepienia roślin motylkowatych *Rhizobium* lub *Bradyrhizobium* i *Azospirillum*, wzrost nodulacji i plonu ziarna [51, 52], jak też wzrost plonu zielonej masy [57] może być wynikiem działania takich mechanizmów, jak wzbogacanie roślin w azot poprzez wiązanie N₂, wytwarzanie hormonów roślinnych zmieniających metabolizm roślin i wpływających na ich wzrost, ogólną poprawę wzrostu roślin przez stymulację pobierania składników mineralnych i ich akumulację w liściach, zwiększenie pobierania wody, redukcję azotanów i zwiększenie ich akumulacji w roślinach szczepionych *Azospirillum* oraz poprawę innych wskaźników wzrostu tych roślin [6, 49, 56].

Wpływ Azotobacter. Asymilatorem N₂, zaliczanym do grupy PGPR, zwiększającym plon wielu roślin uprawnych jest *Azotobacter*. Prowadzone były również badania nad oddziaływaniem tych bakterii na rozwój i plonowanie roślin motylkowatych [7, 11, 12, 22, 23, 26, 44, 45, 47, 54].

Jauhri, Bhatnagar i Iswaran [22] wykazali, że szczepienie nasion *Vigna radiata* i *Glycine max*, specyficznymi dla tych roślin szczepami bakterii symbiotycznych i odpowiednio dobranym szczepem *Azotobacter chroococcum*, istotnie zwiększało ich plony w stosunku do plonów roślin szczepionych jedynie bakterią symbiotyczną. Jeden z badanych przez nich szczepów azotobaktera, wyizolowany z ryzosfery *Trifolium alexandrinum*, powodował wzrost plonu *V. radiata* zbliżony do wzrostu uzyskanego w wyniku szczepienia *Rhizobium*. Również w doświadczeniu z grochem, w wyniku asocjacji *Rhizobium* z wyizolowanym z ryzosfery tej rośliny szczepem *Azotobacter chroococcum*, uzyskano wyższy plon niż w przypadku roślin szczepionych samym *Rhizobium*. Korzystny efekt równoczesnego szczepienia nasion roślin motylkowatych *Rhizobium* i azotobakterem może być, zdaniem tych badaczy, wynikiem wytwarzanych przez azotobaktera substancji stymulujących wzrost roślin oraz lepszej przeżywalności *Rhizobium* w obecności wydzielanych przez azotobaktera dużych ilości polisacharydowych śluzów.

Podobne wyniki uzyskali Burns, Bishop i Israel [7]. Stwierdzili oni, że szczep *Azotobacter vinelandii* zwiększał o 20 do 46% liczbę brodawek zawiązywanych na korzeniach *Glycine max*, *Vigna unguiculata* i *Trifolium repens* przez ich bakteryjne symbionty. Wykazali ponadto, że niezdolny do wiązania N₂ mutant szczepu *A. vinelandii* wywołał wzrost nodulacji porównywalny do wzrostu wywołanego przez

szczep wiążący N₂. Stwierdzenie to świadczy, zdaniem badaczy, o tym, że czynnikiem zwiększającym nodulację nie jest azot wiązany przez azotobaktera. Stymulacja brodawkowania przez *A. vinelandii* była największa, gdy do szczepienia użyto komórek w połowie logarytmicznej fazy wzrostu. Badania wpływu na nodulację soi szczepienia nasion martwymi komórkami *A. vinelandii* wykazały, że komórki zabite w wyniku działania światła ultrafioletowego stymulowały brodawkowanie, natomiast zabite termicznie (autoklawowanie) lub w wyniku stosowania letalnych dawek streptomycyny zmniejszały liczebność brodawek. Stymulację nodulacji uzyskano również pod wpływem bezkomórkowego ekstraktu z hodowli *A. vinelandii*, podczas gdy supernatant nie miał wpływu na brodawkowanie. Doświadczenie przeprowadzone z rozdzielonym systemem korzeniowym wykazało, że czynnik odpowiedzialny za stymulację nodulacji nie był przenoszony przez roślinę. Autorzy prac sugerują, że czynnikiem stymulującym brodawkowanie są białka wytwarzane przez *A. vinelandii*, lecz nie wydzielane na zewnątrz komórki.

Omówione wyżej wyniki Bumsa i in. [7] zostały potwierdzone przez El-Bahrawy [11]. Autor ten wykazał, że szczepienie soi mieszaniną *Br. japonicum* i szczepów azotobaktera wytwarzającymi IAA i gibereliny zwiększyło liczbę i świeżą masę brodawek oraz suchą masę roślin i zawartość w nich N ogólnego, w stosunku do roślin szczepionych tylko *Bradyrhizobium*. Podobny wpływ, lecz mniej wyraźny, uzyskał autor, stosując zamiast hodowli azotobaktera filtraty płynu pohodowlanego. Korzystny wpływ azotobaktera na symbiozę soi z *Br. japonicum* El-Bahrawy [11] przypisuje wytwarzaniu przez azotobaktera IAA i giberelin oraz białka nie wydzielanego na zewnątrz komórki.

Analogiczne badania przeprowadził El-Bahrawy [10, 11] ze szczepieniem soi mieszaniną *Br. japonicum* i wytwarzającymi IAA i gibereliny grzybami izolowanymi z ryzosfery tej rośliny. Wykazały one hamujący wpływ zarówno hodowli tych grzybów, jak i filtratów z ich płynu pohodowlanego na liczebność i świeżą masę brodawek, suchą masę roślin i zawartość w nich N. Wyjątek stanowił szczep *Fusarium moniliflorum*, który nieznacznie je stymulował. Hamowanie rozwoju roślin przez grzyby wytwarzające substancje wzrostowe autorzy tłumaczą obecnością w filtratach pohodowlanych niektórych grzybów inhibitorów auksyn [10, 19].

Autorka artykułu porównywała efekt szczepienia nasion lucerny, koniczyny oraz różnych odmian grochu, bobiku i łubinu specyficznymi dla tych roślin rizobiami lub bradyrhizobiami z efektem szczepienia skojarzonego, w którym oprócz bakterii symbiotycznych na nasiona wprowadzono także hodowlę *Azotobacter chroococcum*. Wyniki doświadczeń wazonowych, prowadzonych na jałowionym piasku, wzbogaconym CaCO₃ i bezazotową pożywką dla roślin motylkowatych, wykazały, że efekt doszczepiania azotobakterem zależał od gatunku rośliny i jej odmiany oraz od właściwości zakażającego roślinę szczepu *Rhizobium* lub *Bradyrhizobium*. Azotobakter na ogół przyspieszał wzrost grochu, bobiku i łubinu, zwiększając ich plony, natomiast obniżał plon koniczyny i lucerny [54].

El-Mokadem i in. [12] badali wpływ asocjacji *Rhizobium* spp. z *Azospirillum lipoferum* lub *Azotobacter chroococcum* na wzrost i skład mineralny *Cicer arietinum* uprawianej na dwu różnych glebach. Skojarzone szczepienie zwiększało liczbę brodawek i ich wielkość, wysokość i wagę roślin oraz zawartość w nich N w stosunku do roślin szczepionych samym *Rhizobium*. Doszczepianie roślin obu bakteriami lub samym *Azospirillum* dawało lepszy efekt niż doszczepianie samym azotobakterem.

Wyniki prac omawianych w artykule wykazują, że mikroflora glebowa może oddziaływać niekorzystnie na proces symbiozy roślin motylkowatych z ich bakteryjnym symbiontem, natomiast odpowiednio wyselekcjonowane szczepy *Azospirillum* lub *Azotobacter* mogą zwiększać efektywność tego procesu.

W następnych częściach artykułu omówione zostaną prace dotyczące wpływu na efektywność symbiozy bakterii z rodzaju *Pseudomonas* i grzybów mikoryzowych.

Literatura

- [1] Alström S., Aström B. 1985. Plant growth inhibition induced by rhizosphere bacteria through soil inoculation. Abstr. FEMS Symp. on Microbial Comm. in Soil. Aug. 4–8, Kolloid Denmark.
- [2] Alström S., Gehardson B. 1987. Characteristics of *Serratia plymuthica* isolate from plant rhizosphere. *Plant and Soil* 103: 185–189.
- [3] Andreeva I. N., Redkina T. V., Mandkhan K., Kozlova G. I., Izmailov S. F. 1990. Stimulating effect of *Azospirillum brasilense* on rhizobium legume symbiosis and plant productivity. *Doklady Botan.* 313–315.
- [4] Bashan Y., Alcaraz-Melendez L., Toledo G. 1992. Responses of soybean and cowpea root membranes to inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Symbiosis* 13 (1/3).
- [5] Bashan Y., Holugin G., Rodriguez N., Puente M. E., Ferrera-Cerreto R. 1994. *Azospirillum brasilense*: Root Colonization of Weeds and Crop Plants, Inter-Root Movement and Survival in Soils and Rhizosphere. W: 15th World Congress of Soil Science, Acapulco, Mexico, July 10–16, 4a: Comision III: Symposia 13–29.
- [6] Bashan Y., Levanony H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36: 591–608.
- [7] Burns Jr T. A., Bishop P. E., Israel D. W. 1981. Enhanced nodulation of leguminous plant roots by mixed cultures of *Azotobacter vinelandii* and rhizobium. *Plant and Soil* 62: 399–412.
- [8] Chatel D. L., Greenwood R. M., Parker C. A. 1968. Saprophytic competence as an important character in the selection of *Rhizobium* for inoculation. W: Transactions of the Ninth International Congress of Soil Science, Adelaide, 2: 65–73.
- [9] Chatel D. L., Parker C. A. 1972. Inhibition of rhizobia by toxic soil-water extracts. *Soil Biol. Biochem.* 4: 289–294.
- [10] El-Bahrawy A. A. 1982. Effect of gibberellic acid on some microbial growth and spore germination of some fungi. *Zbl. Mikrobiol.* 137: 238–240.
- [11] El-Bahrawy S. 1983. Associative effect of mixed cultures of *Azotobacter* and different rhizosphere fungi, *Rhizobium japonicum* on nodulation and symbiotic nitrogen fixation of soybean. *Zbl. Mikrobiol.* 138: 443–449.
- [12] El-Mokadem M. T., Helemish F. A., Bakr Z. Y. M., Sheteawi S. A. 1989. Associative effect of *Azospirillum lipoferum* and *Azotobacter chroococcum* with *Rhizobium* spp. on mineral composition and growth chickpea (*Cicer arietinum*) on sandy soils. *Zbl. Mikrobiol.* 144: 255–265.
- [13] Fayez M., Emam N. F., Makboul H. E. 1988. Interaction between *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* and their influence on nodulation and growth of broad

- bean (*Vicia Faba*). W: Proceedings of the sec. conf. of the agricultural research, Cairo, 17–19 Dec. vol. II. Food Science and Microbiol. Cairo, Egipt. 253–261.
- [14] Galanti N., Giannellini I., Bazzicalupo M. 1991. Effect of some *Azospirillum* strains on *Rhizobium* induced nodulation of clover. *Soil and Fert.* 54(10): 1560.
- [15] Gallo M. Del., Fabbri P. 1992. Inoculation of *Azospirillum brasilense* Cd on chickpea (*Cicer arietinum*). *Soil and Fert.* 55(3): 429.
- [16] Harris J. R. 1953. The influence of rhizosphere microorganisms on the virulence of *Rhizobium trifolii*. *Nature*, London 172: 507–508.
- [17] Hattingh M. J., Louw H. A. 1966. The antagonistic effects of soil microorganisms, isolated from the root region of clovers, on *Rhizobium trifolii*. *South Afric. J. of Agric. Sci.* 9: 239–252.
- [18] Heinrich D., Hess D. 1985. Chemotaxic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat and characterization of same attractants. *Can. J. Microbiol.* 31: 26–34.
- [19] Holland A. A., Parker C. A. 1966. Studies on microbial antagonism in the establishment of clover pasture II. The effect of saprophytic soil fungi upon *Rhizobium trifolii* and the growth of subterranean clover. *Plant and Soil* 25: 329–340.
- [20] Horemans S., De Coninck K., Neuray J., Horemans R., Vlassak K. 1986. Production of plant growth substances by *Azospirillum* sp. and the rhizosphere bacteria. *Symbiosis* 2: 341–346.
- [21] Iruthayathas E. E., Gunasekaran S., Vlassak K. 1983. Effect of combined inoculation of *Azospirillum* and *Rhizobium* on nodulation and N₂-fixation of winged bean and soybean. *Sci Hartic.* (Amsterdam) 20: 231–240.
- [22] Jauhri K. S., Bhatnagar R. S., Iswaran V. 1979. Associative effect of different strains of *Azotobacter* and homologous *Rhizobium* on the yield of moong (*Vigna radiata*), soybean and pea. *Plant and Soil* 53: 105–108.
- [23] Kale N. Y., Patil P. L., Patil B. C., 1982. A study on effect of *Rhizobium* and *Azotobacter* inoculation on nodulation, N₂ — fixation and yield of gram (*Cicer arietinum* L.). *Indian Microbiol.* 22(3): 203–205.
- [24] Khan S.U., Moore A. W., Webster G. R. 1968. Influence of partial soil sterilization on nodulation of alfalfa. *Plant and Soil* 28: 476–477.
- [25] Krasilnikow N. A., Korenyako A. I. 1944. Influence of soil bacteria on the virulence and activity of nodule bacteria. *Mikrobiologia* 13: 39–44.
- [26] Kumar Rao J. V. D. K., Patil R. B. 1976. Effect of *Azotobacter* inoculation with *Rhizobium* and *Azotobacter* on nodulation, growth and yield of soybean. *Curr. Sci.* 45: 523–524.
- [27] Kurek E., Kobus J. 1990. Korzystne i szkodliwe oddziaływanie mikroflory ryzosferowej na wzrost i rozwój roślin. *Post. Mikrobiol.* 29(1–2): 103–123.
- [28] Michiels K., Vanderleyden J., Van Gool A. 1989. *Azospirillum* — plant root associations: A review. *Biol. and Fertility of Soil* 8: 356–368.
- [29] Okon Y. 1988. Recent greenhouse and field studies on plant-growth-promoting effects of *Azospirillum*. W: 7-th Inter. Congress on N=Nitrogen fix. Køl, F. R. G. March 13–20.
- [30] Okon Y., Kapulnik Y. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant and Soil* 90: 3–16.
- [31] Paszkowski W. 1993. Mikroflora ryzosfery owsa i jej wpływ na rozwój i zdrowotność roślin. Praca doktorska, IUNG, Puławy.
- [32] Patriquin D. G., Döbereiner J. 1978. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Can. J. Microbiol.* 24: 734–742.
- [33] Patriquin D. G., Döbereiner J., Jain D. K. 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* 29: 900–915.
- [34] Piana L., Delledonne M., Antonelli M. N., Fogher C. 1988. Root hair deformation induced on maize and medicago by an *Azospirillum* transconjugant containing a *Rhizobium meliloti* nodulation region. W: *Azospirillum*. IV Genetics, physiology, ecology, ecology. Ed. Klingmüller, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 83–91.

- [35] Plaziński J., Gärtner E., Mciver J., Jahnke R., Rolfe B. C. 1984. Effect of Azospirillum strains on Rhizobium-legume symbiosis. *Adv. in Nitr. Fix. R.*: 424.
- [36] Plaziński J., Rolfe B. C. 1985. Analysis of pectolytic activity of Rhizobium and Azospirillum strains isolated from *Trifolium repens*. *J. Plant Physiol.* 120: 181–187.
- [37] Plaziński J., Rolfe B. C. 1985. Azospirillum-Rhizobium interaction leading to a plant growth stimulation without nodule formation. *Can. J. Microbiol.* 31: 1026–1030.
- [38] Plaziński J., Rolfe B. C. 1985. Influence of Azospirillum strains on the nodulation of clovers by Rhizobium strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 984–989.
- [39] Plaziński J., Rolfe B. C. 1985. Interaction of Azospirillum and Rhizobium strains leading to inhibition of nodulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 990–993.
- [40] Pugashetti B. K., Angle J. S., Wagner G. H. 1982. Soil microorganisms antagonistic towards *Rhizobium japonicum*. *Soil Biol. Biochem.* 14: 45–49.
- [41] Rai R. 1983. Efficiency of associative N₂-fixation by streptomycin resistant mutants of *Azospirillum brasilense* with genotypes chickpea Rhizobium strains. *J. Agric. Sci. Comp.* 100: 75–80.
- [42] Rai R. 1991. Strain specific salt tolerance and chemotaxis of *Azospirillum brasilense* and their associative N₂-fixation with finger-millet in soline calcareous soil. *Plant and Soil.* 137: 55–59.
- [43] Reinhold B., Hurek T., Nieman E. G., Fendrik I. 1985. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.* 162: 190–195.
- [44] Rajni Apte, Iswaran V. 1971. Cultures of *Rhizobium* inoculation with these of *Beijerinckia* and *Azotobacter*. *Proc. Ind. Nat. Sci. Acad.* 40: 482.
- [45] Ram G., Rawat A. K., Joshi B. S. 1991. Effect of *Rhizobium* and *Azotobacter* on *Cicer arietinum* in Chhattisgarh of Madhya Pradesh. *Soil and Fert.* 54(2): 284.
- [46] Raverkar K. P., Konde B. K. 1988. Effect of *Rhizobium* and *Azospirillum lipoferum* inoculation on the nodulation, yield and nitrogen uptake of peanut cultivars. *Plant and Soil* 106: 249–252.
- [47] Rawat A. K., Sanoria C. L. 1976. Effect of *Rhizobium*, *Azotobacter* and *Beijerinckia* inoculation on *Cicer arietinum* var Type I. *Curr. Sci.* 45: 665–666.
- [48] Reinhold B., Hurek T., Nieman E. G., Fendrik I. 1985. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.* 162: 190–195.
- [49] Reynders L., Vlassak K. 1979. Conversion of tryptophan to indole acetic acid by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biol. Biochem.* 11: 547–548.
- [50] Sarig S., Kapulnik Y., Okon Y. 1986. Effect of *Azospirillum* inoculation on nitrogen fixation and growth of several winter legumes. *Plant and Soil.* 90: 335–342.
- [51] Singh C. S. 1989. The effect of culture filtrate of *Azospirillum brasilense* on the growth of *Rhizobium japonicum*. *Zbl. Mikrobiol.* 144: 267–270.
- [52] Singh C. S., Subba Rao N. S. 1979. Associative effect of *Azospirillum brasilense* with *Rhizobium japonicum* on nodulation and yield soybean (*Glycine max*). *Plant and Soil.* 53: 387–392.
- [53] Schmidt W., Martin P., Omay S. H., Bangerth F. 1988. Influence of *Azospirillum* on nodulation of legumes. W: *Azospirillum: IV Genetic, physiology, ecology*. Edited by w. Klingmüller, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.: 92–100.
- [54] Strzelec A. 1994. Efekt szczepienia roślin motylkowatych bakteriami symbiotycznymi i *Azotobacter chroococcum*. Ogólnopolskie Symp. "Oddziaływanie między mikroorganizmami i roślinami". Kazimierz Dolny, 19–20 V: 52.
- [55] Tien T. M., Diem H. G., Gaskins M. H., Hubbell D. H. 1981. Polygalacturonic acid transeliminase production by *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* 27: 426–431.
- [56] Tien T. M., Gaskins M. H., Hubbell D. H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L). *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1016–1024.
- [57] Tilak K. V. B. R., Singh C. S., Rana J. P. S. 1981. Effects of combined inoculation of *Azospirillum brasilense* with *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium* sp. (cowpea miscellany) on nodulation and yield of clover (*Trifolium repens*), lucerna (*Medicago sativa*) and chickpea (*Cicer arietinum*). *Zbl. Bakt.* 136: 117–120.

- [58] Trinick M. J., Parker C. A. 1982. Self-inhibition of rizobial strains and the influence of cultural conditions on microbial interactions. *Soil Biol. Biochem.* 14: 79–86.
- [59] Trinick M.J., Parker C. A., Palmer M. J. 1983. Interactions of the microflora from nodulation problem and non-problem soils towards *Rhizobium* spp on agar culture. *Soil Biol. Biochem.* 15: 295–301.
- [60] Umeli-Garcia M., Hubbel D. H., Gaskins M. H., Dozzo F. B. 1980. Associaton of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 219–226.
- [61] Yahalom E., Dovrat A., Okon Y., Czosnek H. 1991. Effect of inoculation with *Azospirillum* brasilense strain Cd and *Rhizobium* on the root morphology of burr medic (*Medicago polymarpha* L). *Israel J. of Botany* 40(2): 155–164.
- [62] Yahalom E., Okon Y., Dovrat A. 1987. *Azospirillum* effects on susceptibility to *Rhizobium* nodulation and on nitrogen fixation of several forage legumes. *Can. J. Microbiol.* 33: 510–514.
- [63] Yahalom E., Okon Y., Dovrat A. 1988. Early nodulation in legumes inoculated with *Azospirillum* and *Rhizobium*. *Symbiosis.* 6(1/2): 69–79.
- [64] Zimmer W., Bothe H. 1988. The phytohormonal interactions between *Azospirillum* and wheat. *Plant and Soil.* 110: 239–247.

The effect of soil microorganis on *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and their symbiosis with legume plants

1. The effect of autochthon soil microflora and free — living N₂ assimilators from the genera *Azospirillum* and *Azotobacter*

Summary

The results of investigations on the effect of soil microflora on *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains development, their symbiosis activity with Legume plants and the effect of joined seeds inoculation with specific symbiotic bacteria and *Azospirillum* or/and *Azotobacter* strains are discussed.

The results show the presence of high number of antagonistic microorganisms to symbiotic bacteria, which could inhibit their growth, proliferation and survival in soil environment. This confirms the necessity of pre-sowing Legume plant seeds inoculation with specific symbiotic bacterial strains.

Many investigators have observed the beneficial effect of joined Legume plant seeds inoculation with specific symbiotic bacteria and correctly selected *Azotobacter* or/and *Azospirillum* strains on symbiosis effectivity. The studies have shown that the effect of joined inoculation is influenced by plant species and cultivars, strain properties, the ratio of inoculant cell number in prepared inoculum, and the way and term of inoculum application.

The studies leading to the explanation of mechanisms of the *Azospirillum* and *Azotobacter* influence on symbiosis are also discussed here.