

HANNA REKOSZ-BURLAGA, MAŁGORZATA WASZEWSKA

Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

## WPLYW RÓŻNORODNOŚCI GATUNKOWEJ TRAW I DŹDŻOWNIC *APORRECTODEA CALIGINOSA* NA LICZEBNOŚĆ *AZOSPIRILLUM* SPP. W GLEBIE

**Streszczenie.** Obiektem badań była gleba z doświadczenia wazonowego, w którym prowadzono uprawę kostrzewy czerwonej oraz uprawę wielogatunkową traw. W obrębie każdej grupy połowa wazonów została wzbogacona w dżdżownicę *Aporrectodea caliginosa*. W przeprowadzonych badaniach podjęto próbę oceny wpływu różnorodności gatunkowej traw oraz obecności dżdżownicy na liczebność w glebie *Azospirillum* spp. Badania obejmowały: oznaczenie w próbkach gleby NPL *Azospirillum* spp., izolację ich czystych kultur, ich identyfikację, a następnie oznaczenie aktywności nitrogenazy. Wyniki badań wykazały, że różnorodność gatunkowa traw oraz obecność dżdżownicy mają istotny wpływ na liczebność *Azospirillum* tylko w jednym terminie oznaczenia. Większość uzyskanych szczepów wyizolowano z gleby spod uprawy kostrzewy czerwonej, dominował wśród nich gatunek *A. brasilense*. Uzyskane izolaty charakteryzowały się dużą aktywnością wiązania  $N_2$ : od 143,8 do 1478,0 nmol  $C_2H_4$  na 1 h dla hodowli.

**Słowa kluczowe:** *Azospirillum*, uprawa traw, *Aporrectodea caliginosa*, dżdżownice

### Wstęp

Badania dotyczące wzajemnych powiązań między roślinami, fauną glebową i drobnoustrojami prowadzone są już od wielu lat (BONKOWSKI i IN. 2000, DIGHTON i IN. 1997, MAKULEC 2002). Do dziś nie udało się jednak sprecyzować jednoznacznych wniosków określających te zależności. Przykładem mogą być podejmowane próby wyjaśnienia wpływu dżdżownicy na kształtowanie się populacji drobnoustrojów glebowych (KULIŃSKA 1961, KRISTUFEK i IN. 1992, CHMIELEWSKI i MAKULEC 1993, MAKULEC i IN. 1994, DEVLIEGHER i VERSTRAETE 1995, WINDING i IN. 1997, REKOSZ-BURLAGA i IN. 2006). Powszechnie wiadomo, że dżdżownice stanowią ważną grupę wśród organizmów mezofauny glebowej. Ich oddziaływanie na środowisko glebowe jest różnorodne w zależności od miejsca bytowania i rodzaju spożywanego pokarmu (BROWN 1995,

WOJEWODA 2002). Najlepiej poznaną grupą są dżdżownice ściółkożerne. W głębszych warstwach gleby żyją gatunki żywiące się detrytusem glebowym zmieszany z frakcją mineralną. Wśród nich jest m.in. *Aporrectodea caliginosa*, który to gatunek występuje powszechnie w glebach łąk i pól uprawnych. Na łąkach wydała od 2 do 8,5 kg s.m. koprolitów na 1 m<sup>2</sup> w ciągu sezonu, przy czym koprolity tego gatunku są uboższe w materię organiczną w porównaniu z odchodami dżdżownic ściółkożernych, np. *Lumbricus rubellus* (MAKULEC i IN. 1994).

Z uprawą traw związane są szczególnie mocno bakterie diazotroficzne z rodzaju *Azospirillum*. Występują one w glebie i ryzosferze traw ekosystemów łąkowych oraz zbóż (ILYAS i BANO 2010, UMALI-GARCIA i IN. 1980). Uważane są za bardzo ważną grupę ryzobakterii, które w istotny sposób poprawiają wzrost roślin i zwiększają wielkość ich plonów (BASHAN i IN. 2004).

W prezentowanej pracy przedstawiono wyniki badań, w których podjęto próbę oceny wpływu obecności w glebie dżdżownic oraz różnorodności gatunkowej traw na liczebność bakterii diazotroficznycy z rodzaju *Azospirillum*.

## **Materiały i metody**

Materiałem do badań były próbki gleby pochodzące z doświadczenia wazonowego założonego w Centrum Badań Ekologicznych PAN w Dziekanowie Leśnym w ramach projektu badawczego „Wpływ zróżnicowanej roślinności i gatunków inżynierskich na kształtowanie się bioróżnorodności edafonu i przebieg podstawowych procesów glebowych – eksperyment terenowy” (grant PBZ-KBN-087/PO4/2003). Jesienią izolatory z PCV (pojemność 10 dm<sup>3</sup>) wypełniono piaskiem słabogliniastym i umieszczono na poletku CBE, a następnie na wiosnę glebę obsiano trawą. Do połowy wazonów wysiano kostrzewę czerwoną (*Festuca rubra* L.), a do pozostałych mieszankę siedmiu gatunków traw: kostrzewy łąkowej (*Festuca pratensis* Huds.), tymotki łąkowej (*Phelum pratense* L.), kupkówki pospolitej (*Dactylis glomerata* L.), stokłosa bezostnej (*Bromus inermis* Leys.), kostrzewy trzcinowej (*Festuca arudinacea* Schleb.), wiechliny łąkowej (*Poa pratensis* L.) i życicy trwałej (*Lolium perenne* L.). Po ukształtowaniu się darni (pierwsza połowa maja), do połowy wazonów każdej z upraw wprowadzono dżdżownice *Aporrectodea caliginosa*. W pierwszym sezonie próbki gleby pobrano w czterech terminach: w kwietniu (przed wprowadzeniem dżdżownic do gleby), w lipcu (po 60 dniach od wprowadzenia do gleby dżdżownic) oraz we wrześniu i listopadzie. W drugim sezonie oznaczenia prowadzono w maju, lipcu i październiku. Dla każdej kombinacji próby pobrano z trzech izolatorów, z głębokości 0-20 cm. Wykonane badania obejmowały: oznaczenie w próbkach gleby liczebności bakterii diazotroficznycy (NPL) z rodzaju *Azospirillum* w pożywce półpłynnej z kwasem jabłkowym (HEGAZI i IN. 1979), izolację i identyfikację szczepów (TARRAND i IN. 1978), a następnie oznaczenie ich aktywności wiązania N<sub>2</sub> metodą acetylenową z użyciem chromatografu gazowego Unicam 610 (wg HARDY i IN. 1968). Aktywność enzymu wyrażono w nanomolach C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> na 1 h dla hodowli.

Wyniki badań ilościowych z poszczególnych terminów oznaczeń poddano dwuczynnikowej analizie wariancji (pierwszy czynnik – rodzaj uprawy, drugi czynnik – obecność dżdżownic). Dla porównania średnich zastosowano test Tukeya przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

## Wyniki

Przeprowadzone doświadczenie stanowi uzupełnienie badań, w których poddano ocenie wpływ różnorodności gatunkowej traw oraz obecności dżdżownic geofagicznych *A. caliginosa* na liczebność wybranych grup drobnoustrojów glebowych oraz ich aktywność enzymatyczną (GAJEWSKA i IN. 2007, REKOSZ-BURLAGA i IN. 2006, REKOSZ-BURLAGA i IN. 2008). Analizując dane zawarte w tabelach 1 i 2, można stwierdzić, że bakterie z rodzaju *Azospirillum* występowały w glebie w każdym terminie oznaczeń. Pomimo stosunkowo niewysokiej liczebności tych bakterii ich obecność odnotowano w glebie większości wazonów doświadczalnych. W 1 g s.m. gleby pozaryzosferowej najczęściej wykrywano od kilkudziesięciu do kilkuset komórek *Azospirillum* spp., w niektórych przypadkach ich liczebność była rzędu  $10^4$ . Wyniki te są porównywalne z wynikami innych badaczy (DE CONINCK i IN. 1988, MARKUS i KRÄMER 1988). Należy przy tym zaznaczyć, że gatunki z rodzaju *Azospirillum* są typowymi ryzobakteriami, ich liczebność w glebie pozaryzosferowej jest mniejsza niż w strefie korzeniowej. Z danych literaturowych wiadomo, że w 1 g gleby ryzosferowej liczebność *Azospirillum* spp. wynosi do około kilku tysięcy komórek (KRÓL 1997), a w ryzosferze kostrzewy czerwonej – 33 komórki w 1 g s.m. gleby (KRÓL 2006).

Z literatury naukowej wiadomo, że roślina wpływa na występowanie i liczebność bakterii z rodzaju *Azospirillum* w glebie. Analiza statystyczna wyników badań własnych wykazała, że w większości terminów oznaczeń wpływ różnorodności gatunkowej traw na liczebność badanej grupy diazotrofów był nieistotny statystycznie. Korzystny wpływ uprawy wielogatunkowej traw zaobserwowano tylko w dwóch terminach (tab. 1). W oznaczeniach wykonanych przed wprowadzeniem dżdżownic do wazonów i ukształtowaniem się darni liczebność *Azospirillum* spp. w glebie, do której wsiano mieszankę traw, była około stukrotnie większa niż w glebie, do której wsiano kostrzewę czerwoną. Zapewne było to spowodowane różnym stopniem kolonizacji nasion kostrzewy i mieszanki traw przez diazotrofy. Różnice te nie były jednak istotne statystycznie. Korzystny wpływ uprawy wielogatunkowej traw stwierdzono również w lipcu. Należy zaznaczyć, że w tym przypadku liczebność *Azospirillum* w glebie spod mieszanki traw była istotnie większa niż w glebie spod uprawy kostrzewy czerwonej. Natomiast w listopadzie w pierwszym sezonie wegetacyjnym oraz w lipcu i październiku w drugim sezonie *Azospirillum* liczniej występowały w glebie spod uprawy jednogatunkowej traw. Różnice te nie były jednak istotne statystycznie.

Dżdżownice glebowe nazywane są organizmami inżynierskimi ze względu na funkcje, jakie pełnią w glebie. Ich biomasa i aktywność życiowa stanowią bardzo silny czynnik modyfikujący strukturę oraz funkcjonowanie systemu glebowego. W dostępnej literaturze brak jest prac dotyczących oddziaływania *A. caliginosa* na liczebność diazotrofów. Wyjątek stanowią badania TERESHCHENKO i IN. (1998), z których wynika, że dżdżownice tego gatunku wywierają korzystny wpływ na liczebność bakterii wiążących  $N_2$  oraz na intensywność wiązania  $N_2$ . Wyniki badań własnych wskazują, że wprowadzone do gleby dżdżownice *A. caliginosa* mogą spowodować okresowy spadek liczebności populacji *Azospirillum* w glebie (tab. 2). W trzech terminach oznaczeń liczebność badanych diazotrofów była niższa w glebie z dżdżownicami niż w glebie kontrolnej. Różnice te były istotne statystycznie jedynie w lipcu w pierwszym sezonie wegetacyjnym.

Tabela 1. Wpływ zróżnicowania gatunkowego traw na liczebność *Azospirillum* spp. w glebie  
Table 1. The influence of grass species diversity on the number of *Azospirillum* spp. in soil

Termin	Liczba komórek w 1 g s.m. gleby		NIR <sub>α = 0,05</sub>
	kostrzewa czerwona	mieszanka traw	
Sezon wegetacyjny I			
Kwiecień	747 <sup>a</sup>	31 559 <sup>a</sup>	ni
Lipiec	83 <sup>b</sup>	727 <sup>a</sup>	513,5
Wrzesień	12 695 <sup>a</sup>	434 <sup>a</sup>	ni
Listopad	6 264 <sup>a</sup>	1 180 <sup>a</sup>	ni
Sezon wegetacyjny II			
Maj	50 <sup>a</sup>	58 <sup>a</sup>	ni
Lipiec	12 044 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>	ni
Październik	168 <sup>a</sup>	51 <sup>a</sup>	ni

\*Różnymi literami oznaczono średnie różniące się istotnie w poszczególnych terminach oznaczeń w każdym sezonie wegetacyjnym.  
ni – różnice nieistotne.

Tabela 2. Wpływ dżdżownic na liczebność *Azospirillum* spp. w glebie  
Table 2. The influence of earthworms on the number of *Azospirillum* spp. in soil

Termin	Liczba komórek w 1 g s.m. gleby		NIR <sub>α = 0,05</sub>
	bez dżdżownic	z dżdżownicami	
Sezon wegetacyjny I			
Lipiec	719 <sup>b</sup>	91 <sup>a</sup>	513,48
Wrzesień	12 520 <sup>a</sup>	609 <sup>a</sup>	ni
Listopad	1 453 <sup>a</sup>	5 991 <sup>a</sup>	ni
Sezon wegetacyjny II			
Maj	26 <sup>a</sup>	82 <sup>a</sup>	ni
Lipiec	12 050 <sup>a</sup>	58 <sup>a</sup>	ni
Październik	129 <sup>a</sup>	89 <sup>a</sup>	ni

\*Różnymi literami oznaczono średnie różniące się istotnie w poszczególnych terminach oznaczeń w każdym sezonie wegetacyjnym.  
ni – różnice nieistotne.

Z badanych gleb udało się wyizolować dziesięć szczepów, z których osiem zaklasyfikowano do gatunku *A. brasilense*, a tylko dwa do *A. lipoferum* (tab. 3). Należy przy tym zaznaczyć, że osiem spośród dziesięciu uzyskanych szczepów zostało wyizolowanych z gleby spod kostrzewy czerwonej. To sugeruje, że w tym wariacie uprawowym

Tabela 3. Aktywność nitrogenazy *Azospirillum* spp. wyizolowanych spod uprawy traw  
Table 3. The nitrogenase activity of the isolated *Azospirillum* spp. from grass cultivation

Pochodzenie	Oznaczony gatunek <i>Azospirillum</i>	Numer szczepu	Aktywność nitrogenazy (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> na 1 h dla hodowli)
Monokultura	<i>A. brasilense</i>	KI06a/2	1 243,7
		KI049a/2	1 237,5
		KI0109a/2	253,1
	<i>A. lipoferum</i>	KI0125a/1	0,0
Monokultura z dodatkiem dżdżownic	<i>A. brasilense</i>	KIDz30a/2	1 478,0
		KIDz10b/2	0,0
		KIDz23b/1	1 190,6
	<i>A. lipoferum</i>	KIDz10a/2	0,0
Mieszanka traw bez dżdżownic	<i>Azospirillum</i> sp.	MI087a/1	159,4
Mieszanka traw z dodatkiem dżdżownic	<i>A. brasilense</i>	MIDz137b/1	143,8

*A. brasilense* dominuje wśród innych diazotrofów. Po przeniesieniu ich komórek do pożywki bezazotowej z łatwością uzyskiwano czyste kultury. Wyizolowane szczepy charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością nitrogenazy. Trzy spośród nich nie wykazały żadnej aktywności tego enzymu. Były to dwa szczepy należące do gatunku *A. lipoferum* i jeden do *A. brasilense*. Pozostałe izolaty wykazywały stosunkowo dużą aktywność nitrogenazy, od 143,8 do 1478 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> na 1 h dla hodowli. Największą aktywność stwierdzono u trzech szczepów pochodzących spod uprawy kostrzewy czerwonej.

## Wnioski

1. Bakterie z rodzaju *Azospirillum* występowały w glebie pozaryzosferowej pod uprawą kostrzewy czerwonej oraz uprawy wielogatunkowej traw w ciągu całego sezonu wegetacyjnego.

2. Nie stwierdzono korelacji między liczebnością *Azospirillum* w glebie a różnorodnością gatunkową traw i obecnością dżdżownic.

3. W glebie spod uprawy kostrzewy czerwonej dominował gatunek *Azospirillum brasilense*.

4. Szczepy *Azospirillum brasilense* wyizolowane z gleby spod uprawy kostrzewy czerwonej charakteryzowały się wysoką aktywnością nitrogenazy.

## Literatura

- BASHAN Y., HOLGUIN G. DE-BASHAN I., 2004. Azospirillum-plant relationship: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). Can. J. Microbiol. 50: 521-577.
- BONKOWSKI M., CHENG W., GRIFFITHS B.S., ALPHEI J., SCHEU S., 2000. Microbial-faunal interactions in the rhizosphere and effects on plant growth. Eur. J. Soil Biol. 36: 135-147.
- BROWN G.G., 1995. How the earthworms affect microfloral and faunal community diversity? Plant Soil 170: 209-231.
- CHMIELEWSKI K., MAKULEC G., 1993. Microflora and enzymatic activity of earthworm (*Lumbricidae*) casts in hydrogenous soil. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 406: 135-138.
- DE CONINCK K., HOREMANS S., RANDOMBAGE S., VLASSAK K., 1988. Occurrence and survival of *Azospirillum* spp. In temperate regions. Plant Soil 9: 119-123.
- DEVLIEGHER W., VERSTRAETE W., 1995. *Lumbricus terrestris* in a soil core experiment: nutrient-enrichment processes (NEP) and gut-associated processes (GAP) and their effect on microbial biomass and microbial activity. Soil Biol. Biochem. 27, 12: 1573-1580.
- DIGHTON J., JONES H.E., ROBINSON C.H., BECKETT J., 1997. The role of abiotic factors, cultivation practices and soil fauna in dispersal of genetically modified microorganisms in soils. Appl. Soil Ecol. 5: 109-131.
- GAJEWSKA J., GRĄDZIEL A., REKOSZ-BURLAGA H., MAKULEC G., 2007. Mikrobiologiczne aspekty żyzności gleby w doświadczeniu spod uprawy traw z dodatkiem dżdżownic (*Aporrectodea caliginosa*). Ochr. Środ. Zas. Nat. 32: 207-212.
- HARDY R.W.F., HOLSTEN R.D., JACKSON E.K., BURNS R.C., 1968. The acetylene – ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol. 43: 1185-1207.
- HEGAZI N.A., AMER H.A., MONIB M., 1979. Enumeration of N<sub>2</sub>-fixing spirylla. Soil Biol. Biochem. 11: 437-443.
- ILYAS N., BANO A., 2010. Azospirillum strains isolated from roots and rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under different soil moisture conditions. Biol. Fertil. Soils 46: 393-406.
- KRISTUFEK V., RAVASZ K., PIZL V., 1992. Changes in densities of bacteria and microfungi during gut transit in *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta; Lumbricidae). Soil Biol. Biochem. 24, 12: 1499-1500.
- KRÓL M., 1997. Występowanie bakterii z rodzaju *Azospirillum* w ryzosferze traw. Zesz. Nauk. AR Szczec. 181, Roln. 68: 133-140.
- KRÓL M., 2006. *Azospirillum* – asocjacyjne bakterie wiążące wolny azot. Monogr. Rozpr. Nauk. IUNG – PIB.
- KULIŃSKA D., 1961. Wpływ dżdżownic na mikroflorę gleby. Acta Microbiol. Pol. 10: 339-346.
- MAKULEC G., 2002. The role of *Lumbricus rubellus* Hoffm. in determining biotic and abiotic properties of peat soils. Pol. J. Ecol. 50, 3: 301-339.
- MAKULEC G., CHMIELEWSKI K., KUSIŃSKA A., 1994. Znaczenie *Lumbricus rubellus* w transformacji materii organicznej i kształtowaniu składu i liczebności mikroflory gleb łąkowych. Zesz. Nauk. AR Krak. 41: 51-59.
- MARKUS P., KRÄMER J., 1988. Importance of nonsymbiotic nitrogen-fixing bacterian organic forming system. W: Azospirillum IV. Genetics, physiology, ecology. Springer, Berlin: 197-204.
- REKOSZ-BURLAGA H., GARBOLIŃSKA M., NAPRAWKA A., MAKULEC G., GAJEWSKA J., 2008. Wpływ dżdżownic *Aporrectodea caliginosa* na wybrane wskaźniki mikrobiologiczne w glebie. Ekol. Techn. 16, 96A, 5: 146-149.
- REKOSZ-BURLAGA H., GUMENIUK I., GAJEWSKA J., GARBOLIŃSKA M., 2006. Wpływ dżdżownic *Aporrectodea caliginosa* i różnorodności roślin na liczebność wybranych grup drobnoustrojów glebowych. Acta Agr. Silv. 49: 405-413.
- TARRAND J.J., KRIEG N.R., DÖBEREINER J., 1978. A taxonomy study of *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species *Azospirillum*

Rekosz-Burlaga H., Waszewska M., 2010. Wpływ różnorodności gatunkowej traw i dżdżownic *Aporrectodea caliginosa* na liczebność *Azospirillum* spp. w glebie. Nauka Przyr. Technol. 4, 6, #105.

- lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 24: 967-980.
- TERESHCHENKO N.N., NAPLEKOVA N.N., 1998. Influence of different ecological groups of earthworms on the intensity of nitrogen fixation. Biol. Bull. 29, 6: 628-632.
- UMALI-GARCIA M., HUBBEL D.H., GASKINS F.B., 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. Appl. Environ. Microbiol. 39: 219-226.
- WINDING A., RØNN R., HENDRIKSEN N.B., 1997. Bacteria and protozoa in soil microhabitats as affected by earthworms. Biol. Fert. Soils 24: 133-140.
- WOJEWODA D., KAJAK A., SZANSER M., 2002. Rola mezo- i mikrofauny w funkcjonowaniu gleby. Kosmos 51, 1: 105-114.

#### THE INFLUENCE OF GRASS SPECIES DIVERSITY AND EARTHWORMS *APORRECTODEA CALIGINOSA* ON THE NUMBER OF *AZOSPIRILLUM* SPP. IN SOIL

**Summary.** The object of this study was a pot experiment in which red fescue and many-species-grass-cultivation were researched. Half the amount of the pots of every cultivation group researched was fertilized with earthworms of *Aporrectodea caliginosa* species. In the conducted research the investigators tried to estimate the influence of grass species diversity and presence of earthworms to a number of *Azospirillum* spp. in soil. The investigations contained: evaluation of *Azospirillum* spp. MPN in soil, isolation of clean cultures of these bacteria and determination of their nitrogenase activity. The study showed that grass species variety and presence of earthworms have a significantly influence on the number of *Azospirillum* spp. only during one period of the research. The majority of strains were isolated from the soil from red fescue cultivation and the most frequent species was *A. basilense*. Isolates obtained in this research had a high nitrogen fixing activity – from 143.8 to 1478.0 nmol of C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> per 1 h for cultivation.

**Key words:** *Azospirillum*, grass cultivation, *Aporrectodea caliginosa*, earthworms

*Adres do korespondencji – Corresponding address:*

Hanna Rekosz-Burlaga, Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, Poland, e-mail: h.rekosz@interia.pl

*Zaakceptowano do druku – Accepted for print:*  
16.11.2010

*Do cytowania – For citation:*

Rekosz-Burlaga H., Waszewska M., 2010. Wpływ różnorodności gatunkowej traw i dżdżownic *Aporrectodea caliginosa* na liczebność *Azospirillum* spp. w glebie. Nauka Przyr. Technol. 4, 6, #105.