

ANNA GAŁĄZKA, MARIA KRÓL, ANDRZEJ PERZYŃSKI

Zakład Mikrobiologii Rolniczej

Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

WYKORZYSTANIE KWASÓW FENOLOWYCH JAKO JEDYNEGO ŹRÓDŁA WĘGLA PRZEZ BAKTERIE Z RODZAJU *AZOSPIRILLUM* WIĄŻĄCE AZOT

Streszczenie. W badaniach wykorzystano 12 szczepów bakterii *Azospirillum* spp., wyizolowanych z endoryzofery jęczmienia jarego (*Hordeum sativum*), kukurydzy (*Zea mays*), wydmuchrzycy piaskowej (*Elymus arenarius*). We wcześniejszych badaniach potwierdzono zdolność tychże szczepów do rozkładu WWA. Szczepy te należały do trzech odrębnych grup systematycznych oznaczonych na podstawie sekwencjonowania genu 16S rDNA. U szczepów bakterii *Azospirillum* spp. badano wykorzystywanie kwasu kawowego i syringowego jako jedyne źródła węgla i energii podczas wzrostu i wiązania azotu w ciągu 168 h. Pomiar redukcji acetyleny do etylenu oznaczano po 2, 24, 48, 72, 86, 120, 144 i 168 h inkubacji. Stwierdzono, iż badane szczepy charakteryzują się dużą aktywnością nitrogenazy podczas wzrostu w podłożach bezazotowych zawierających kwas kawowy i syringowy jako jedyne źródła węgla i energii. Największe średnie wartości aktywności nitrogenazy szczepów bakterii *Azospirillum* spp. uzyskano w czasie 24 i 48 h inkubacji na podłożu z kwasem kawowym oraz w czasie 48 h w przypadku kwasu syringowego. Największą średnią aktywność nitrogenazy stwierdzono w przypadku szczepów wyizolowanych z endoryzofery jęczmienia: 1/7 (364,87 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej) i 12/6 (245,14 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³) oraz szczepu pochodzącego z endoryzofery kukurydzy – 4B (248,46 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³). Z kolei najmniejszą średnią aktywność nitrogenazy zaobserwowano u szczepów wyizolowanych z endoryzofery wydmuchrzycy piaskowej (29S i 36S) hodowanych w pożywce z kwasem kawowym (kolejno 68,78 i 77,63 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³) i syringowym (1,13 i 27,92 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³). Zdolność degradacji związków fenolowych przez szczepy bakterii *Azospirillum* spp. wyizolowane z wnętrza korzeni roślin zwiększa prawdopodobieństwo nabycia przez roślinę odporności na infekcję patogenami zbóż.

Słowa kluczowe: kwasy fenolowe, *Azospirillum* spp., redukcja acetyleny

Wstęp

Związki fenolowe stanowią szeroko rozpowszechnioną w świecie roślin grupę metabolitów wtórnych. Na szczególną uwagę zasługują ich funkcje biologiczne, wyrażające się aktywnością antyoksydacyjną i antyrodnikową, dlatego też wraz z karotenoidami, tokoferolami i witaminą C są one zaliczane do naturalnych substancji o charakterze przeciwutleniaczy (PETERSON i IN. 2001). Właściwości antyoksydacyjne tych związków polegają na eliminowaniu reaktywnych form tlenu, blokowaniu (zmiataniu) wolnych rodników (najczęściej nadtlenkowych, hydroksyloowych i hydroksynadtlenkowych), inhibicji enzymów z grupy oksydaz oraz chelatowaniu jonów metali (żelaza, miedzi) (YAO i IN. 2006, HUNG i MORITA 2008, JU i IN. 2009).

Kwasy fenolowe, takie jak: kawowy, ferulowy, *p*-kumarowy, *o*-kumarowy, *p*-hydroksybenzoesowy, syringowy, wanilinowy, występują powszechnie zarówno w tkankach roślin (pszenicy, jęczmienia, owsa, ryżu, sorgo i innych), jak i w glebie, w której są one uprawiane (WOJTASZEK 1993). Zdolność ich syntezy jest związana z nabyciem przez roślinę odporności na infekcję (AGRIOS 1997). Wśród czynników istotnie determinujących ten proces wymienia się ograniczanie wzrostu drobnoustrojów przez wykazujące silną aktywność biologiczną związki fenolowe, które występują w tkankach korzeni roślin i wchodzą w skład wydzielin korzeniowych. Obecność tych związków została stwierdzona w zewnętrznej warstwie ziarniaków zbóż, która jest bogata w związki fenolowe, głównie w kwasy fenolowe, tj. kwas ferulowy, wanilinowy, *p*-kumarowy i kawowy (KÄHKÖNEN i IN. 1999, PETERSON i IN. 2001). Spośród kwasów fenolowych w największej ilości występuje kwas ferulowy, połączony za pomocą wiązania estrowego z resztą α -L-arabinozy łańcucha arabinoksydanowego roślinnej ściany komórkowej, a także kwasy kawowy i syringowy (ZUPFER i IN. 1998).

Obecność w strefie korzeniowej roślin odpowiednio wyselekcjonowanych bakterii wpływa pozytywnie na: kiełkowanie nasion, wydłużanie się siewek, rozwój korzenia, pobieranie wody i składników odżywczych z gleby, wzrost i zdrowie roślin, a w końcowym etapie na wielkość plonów (KUREK i KOBUS 1990, KOBAYASHI i IN. 1996). Jednym z podstawowych czynników decydujących o skuteczności biologicznej kontroli rozwoju fitopatogenów jest zdolność szczepów określanych jako PGPR (ang. *Plant Growth Promotion Rhizobacteria*) do zasiedlania strefy korzeniowej roślin (KUREK i KOBUS 1990, LAM i GAFFNEY 1993). Jednakże w celu pełniejszego zrozumienia mechanizmów funkcjonowania bakterii w ryzosferze należy także rozpatrywać oddziaływanie ze strony roślin (BLOEMBERG i LUGTENBERG 2001). Przypuszcza się, że pewne genotypy bakterii są wysoce przystosowane do zasiedlenia ryzosfery właściwych dla siebie roślin i że jest to w dużej mierze uzależnione od uwalniania przez korzenie biologicznie czynnych związków fenolowych (KOBAYASHI i IN. 1996). Pojawianie się ich w środowisku jest rozpoznawalne i wykorzystywane przez bakterie wolno żyjące rodzajów *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, a także *Azospirillum* jako chemiczne sygnały odpowiedzialne za inicjację oddziaływań ryzosferycznych, wskazujące na obecność rośliny będącej odpowiednim gospodarzem dla danej grupy drobnoustrojów (WOJTASZEK 1993, KOBAYASHI i IN. 1996, VEREECKE i IN. 1997).

Celem niniejszej pracy były badania aktywności nitrogenazy szczepów bakterii z rodzaju *Azospirillum* hodowanych w pożywkach bezazotowych z kwasami fenolowymi jako jedynym źródłem węgla.

Material i metody

W badaniach wykorzystano 12 szczepów bakterii *Azospirillum* spp., wyizolowanych z endoryzofery jęczmienia jarego (*Hordeum sativum*): 12/6, 1/7 i 15/7, kukurydzy (*Zea mays*): 4B, 23B, 35Bb, 48B, 77Bb1 i 83B1 oraz wydmuchrzy cy piaskowej (*Elymus arenarius*): 29S, 36S i 42S z wydm nadbałtyckich. We wcześniejszych badaniach stwierdzono zdolność powyższych szczepów do rozkładu wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych (WWA) (KRÓL 1997, KRÓL i KOBUS 1997, KRÓL i PERZYŃSKI 2002). Szczepy te należały do trzech odrębnych grup systematycznych oznaczonych na podstawie sekwencjonowania genu 16S rDNA. Pierwsza grupa to szczepy: 35Bb, 83B1, 77Bb1 i 4B, druga grupa to szczepy 1/7 i 12/6 i trzecia grupa to szczep 36S. Na podstawie wcześniejszych badań genetycznych, sekwencjonowania fragmentu genu 16-23S rDNA, stwierdzono również, że istnieją różnice pomiędzy wszystkimi tymi szczepami, dla których wcześniej w regionie 16S rDNA różnic nie było widać.

U badanych szczepów bakterii *Azospirillum* spp. badano wykorzystywanie kwasów kawowego i syringowego jako jedynych źródeł węgla i energii podczas wzrostu i wiązania azotu w ciągu 168 h w bezazotowej pożywce mineralnej (DÖBEREINER i IN. 1979, DÖBEREINER 1988) z tymi kwasami w dawce 5 g na 1000 cm³ i z dodatkiem węglanu wapnia (CaCO₃) w dawce 3 g na 1000 cm³. Bakterie po zmyciu solą fizjologiczną ze skosów ziemniaczanych były głodzone przez 15 h na pożywce bez źródła węgla (w celu wykorzystania zapasów endogennych), następnie przenoszono je na półpłynne podłoże z kwasem kawowym lub syringowym i oznaczano aktywność nitrogenazy.

Aktywność nitrogenazy szczepów *Azospirillum* spp. oznaczano metodą redukcji acetyleny na chromatografie gazowym PAY UNICAM – 204 (detektor płomieniowo-jonizacyjny FID, kolumna szklana o długości 2,1 m, wypełnienie: Poropak Q 80-120 mesh., temperatury: dozownik – 135°C, detektor – 125°C, kolumna – 60°C, jako gaz nośny stosowano odtleniony azot, zawartość O₂: poniżej 2 mg·kg⁻¹). Bakterie hodowano w kalibrowanych butelczkach zawierających 6 cm³ bezazotowego, półpłynnego podłoża z kwasem i inkubowano przez 168 h w atmosferze 10-procentowego acetyleny w temperaturze 30°C (pojemność fazy gazowej: 7 cm³). Pomiary redukcji acetyleny do etyleny oznaczano po 2, 24, 48, 72, 86, 120, 144 i 168 h inkubacji. Hodowle prowadzono w trzech powtórzeniach w temperaturze 30°C. Jako kontrolę stosowano nieszczepione podłoże z kwasem i bez niego.

Do oceny istotności różnic między szczepami wykorzystującymi kwasy fenolowe jako jedyne źródło węgla przy wiązaniu wolnego azotu wykorzystano wielokrotny test LSD. Różnice aktywności nitrogenazy bakterii podczas hodowli, w czasie 168 h inkubacji, oceniono tym samym testem.

Wyniki i dyskusja

Badania dotyczące wykorzystywania drobnoustrojów w rozkładzie związków fenolowych były prowadzone w wielu ośrodkach badawczych na całym świecie. Jako modelowe mikroorganizmy degradujące związki fenolowe z wykorzystaniem ich jako jedy-

nego źródła węgla i energii stosowano bakterie rodzajów: *Pseudomonas* sp. (EL-NAAS i IN. 2009), *Alcaligenes* sp. (VALENZUELA i IN. 1997), *Azotobacter* sp. (WIESER i IN. 1994), *Rhodococcus* sp. (OH i HAN 1997), *Phanerochaete* sp. (LU i IN. 2009) oraz *Cryptococcus* sp. (MORSEN i REHM 1987). W dostępnej literaturze brak jednak danych dotyczących rozkładu związków fenolowych przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* sp.

Bakterie z tego rodzaju wykorzystują przy wiązaniu azotu różne źródła węgla: kwasy organiczne i ich sole, różne cukry (GILLIS i REINHOLD-HUREK 1994), a także wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (KRÓL i PERZYŃSKI 2002, 2004 b, c). Wiązanie wolnego azotu w korzeniach roślin szczepionych *Azospirillum* spp. było badane przez wielu autorów w doświadczeniach polowych i *in vitro*, ale wyniki tych badań nie były porównywalne (DE POLLI i IN. 1982, BOTHE i IN. 1983, WATANABE i LIN 1984). Wynika to m.in. z korzystania przez bakterie z różnych rodzajów węgla zawartego w substratach wydzielin korzeniowych, które mają duży wpływ na wiązanie azotu w ryzosferze (KROTZKY i IN. 1986) i na aktywność nitrogenazy tych bakterii (BECK i GILMOUR 1982).

Zbadano aktywność nitrogenazy, mierzoną redukcją acetylenu, 12 szczepów bakterii z rodzaju *Azospirillum* spp. w pożywce bezazotowej z kwasem kawowym i kwasem syringowym jako jedynym źródłem węgla. W początkowej fazie wzrostu hodowli, na podłożu zarówno z kwasem kawowym, jak i syringowym, stwierdzono największą redukcję acetylenu (tab. 1). Redukcja acetylenu niektórych szczepów w przypadku kwasu kawowego była bardzo duża i dla szczepów bakterii wyizolowanych z endoryzofery kukurydzy i jęczmienia jarego mieściła się w zakresie 609,52-377,90 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej po 48 h inkubacji z kwasami i nawet po 6 dniach hodowli komórek w tych kwasach redukcja acetylenu niektórych szczepów (1/7, 12/6 i 35Bb) nie spadła poniżej 100 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej (rys. 1).

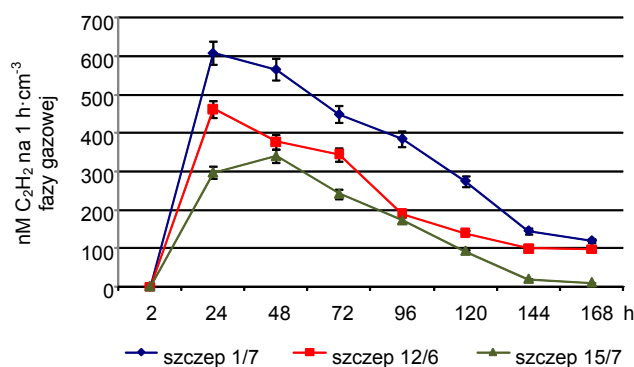
Tabela 1. Aktywność nitrogenazy szczepów bakterii z rodzaju *Azospirillum* rosnących w pożywkach półpłynnych z kwasami fenolowymi (n = 3) (nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej)

Table 1. The nitrogenase activity of the bacteria strains of *Azospirillum* species grown in semi-solid media with phenolic acids (n = 3) (nM C₂H₄ per 1 h·cm⁻³ of gas phase)

Symbol szczepu	Po 24 h		Po 48 h	
	kwas kawowy	kwas syringowy	kwas kawowy	kwas syringowy
1	2	3	4	5
Jęczmień jary				
12/6	463,23	682,607	377,9	412,581
1/7	609,52	0	566,85	414,561
15/7	298,66	0	341,33	65,081
Kukurydza				
4B	649,14	0	377,9	255,694
23B	0	0	0	0

Tabela 1 – cd. / Table 1 – cont.

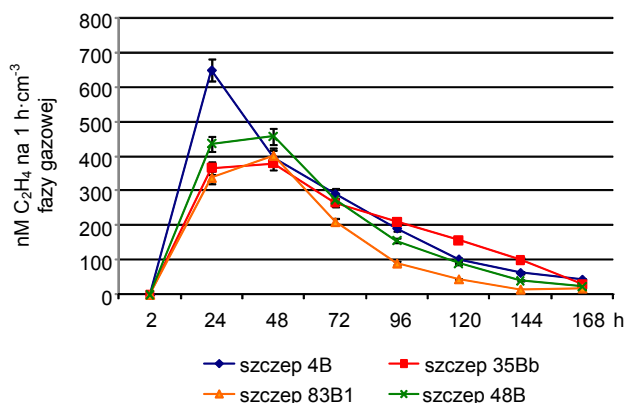
1	2	3	4	5
35Bb	365,71	0	396,19	101,55
48B	435,8	0	457,14	0
77Bb1	0	0	0	0
83B1	338,28	198,72	402,28	134,43
Wydmuchrzyca piaskowa				
29S	128,14	0	152,38	0
36S	167,61	0	128,15	30,02
42S	0	0	0	0



Rys. 1. Aktywność nitrogenazy bakterii *Azospirillum* spp. wyizolowanych z endorhizosfery jęczmienia hodowanych w pożywce bezazotowej z kwasem kawowym jako jedynym źródłem węgla

Fig. 1. The nitrogenase activity of bacteria of *Azospirillum* spp. isolated from the endorhizosphere of barley grown in nitrogen-free medium with caffeic acid as the sole carbon source

Największą redukcję acetylenu z wykorzystaniem kwasu kawowego uzyskano w przypadku szczepu 4B z endorhizosfery kukurydzy, gdzie już po 24 h jego aktywność wynosiła 649,14 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej i utrzymywała się na wysokim poziomie aż do 120 h doświadczenia, kiedy to wynosiła aż 102,47 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej. Aktywność pozostałych szczepów: 48B, 35Bb i 83B1 izolowanych z tej rośliny z wykorzystywaniem kwasu kawowego była na podobnym poziomie po 24 h i wynosiła odpowiednio: 435,8 nM, 365,71 nM i 338,28 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej (rys. 2). Po upływie 120 h hodowli komórek z kwasem kawowym aktywność nitrogenazy spadła poniżej 100 nM w szczepach 83B1 i 48B, jedynie w przypadku szczepu 35Bb poziom aktywności redukcji acetylenu wynosił 156,8 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej (rys. 2). Szczepy 23B oraz 77Bb1 nie wykazywały aktywności

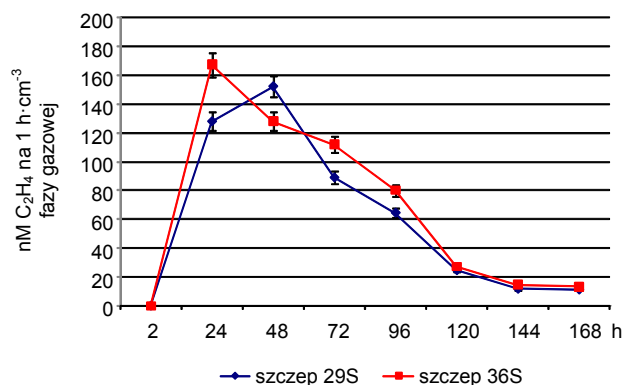


Rys. 2. Aktywność nitrogenazy bakterii *Azospirillum* spp. wyizolowanych z endoryzofery kukurydzy hodowanych w pożywce bezazotowej z kwasem kawowym jako jedynym źródłem węgla

Fig. 2. The nitrogenase activity of bacteria of *Azospirillum* spp. isolated from the endorhizosphere of maize grown in nitrogen-free medium with caffeic acid as the sole carbon source

redukcji acetyleny z wykorzystywaniem kwasu kawowego jako jedynego źródła węgla, mimo że aktywnie wiązały azot z wykorzystaniem WWA jako jedynego źródła węgla, co udokumentowano we wcześniejszych pracach KRÓL i PERZYŃSKIEGO (2002, 2004 b, c). W pracach tych największą aktywność nitrogenazy z wykorzystywaniem m.in. naftalenu, antracenu i pirenu stwierdzono u szczepów 83B1 i 77Bb1 między 48- a 120-godzinnym okresem inkubacji. Wiązanie wolnego azotu, wyrażone aktywnością nitrogenazy, szczepów bakterii hodowanych w pożywkach bezazotowych z fenantrenem było także bardzo duże, szczególnie szczepu wyizolowanego z endoryzofery kukurydzy 77Bb1, i przewyższało dwukrotnie redukcję acetyleny przez pozostałe szczepy.

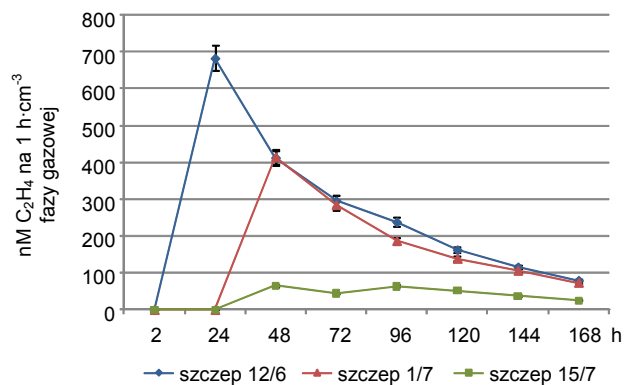
Szczepy pochodzące z endoryzofery jęczmienia jarego wiązały aktywnie N_2 w hodowlach bezazotowych z kwasem kawowym i kwasem syringowym. W obecności kwasu kawowego aktywność nitrogenazy szczepu 1/7 już po 24 h była bardzo duża i wynosiła 609,52 nM C_2H_4 na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej i nie zmniejszyła się poniżej 100 nM nawet po 168 h hodowli komórek. Podobnie szczep 12/6 wiązał aktywnie azot, od 463,23 nM C_2H_4 na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej po 24 h do 100,09 nM po 144 h hodowli komórek. Najmniejszą aktywność wiązania azotu odnotowano w przypadku szczepu 15/7, którego zakres aktywności mieścił się w granicach od 298,66 nM C_2H_4 na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej po 24 h do 93,42 nM C_2H_4 na 1 h·cm⁻³ po 120 h, a po 144 h jego aktywność spadła do 20,19 nM C_2H_4 na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej (rys. 1). Spośród szczepów wyizolowanych z endoryzofery wydmuchrzycej piaskowej tylko szczep 42S nie redukował acetyleny z wykorzystaniem zastosowanych kwasów. Pozostałe szczepy (29S i 36S) wykazywały mniejszą aktywność wiązania wolnego azotu, która wynosiła w przypadku wykorzystania kwasu kawowego: dla szczepu 29S – od 128 nM po 24 h do 11,14 nM C_2H_4 na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej po 168 h, dla szczepu 36S zaś od 167 nM po 24 h do 13,42 nM po 168 h inkubacji (rys. 3).



Rys. 3. Aktywność nitrogenazy bakterii *Azospirillum* spp. wyizolowanych z endoryzofery wydmuchrzycy piaskowej hodowanych w pożywce bezazotowej z kwasem kawowym jako jedynym źródłem węgla

Fig. 3. The nitrogenase activity of bacteria of *Azospirillum* spp. isolated from the endorhizosphere of lyme grass grown in nitrogen-free medium with caffeic acid as the sole carbon source

Z kolei w przypadku wykorzystywania kwasu syringowego przez szczepy *Azospirillum* spp. uzyskano znacznie mniejsze wartości aktywności nitrogenazy, szczególnie wśród szczepów wyizolowanych z endoryzofery kukurydzy i wydmuchrzycy piaskowej. Jedynie znaczną redukcję acetylenu stwierdzono u dwóch szczepów: 12/6 i 1/7, wyizolowanych z endoryzofery jęczmienia (rys. 4). W obecności kwasu syringowego

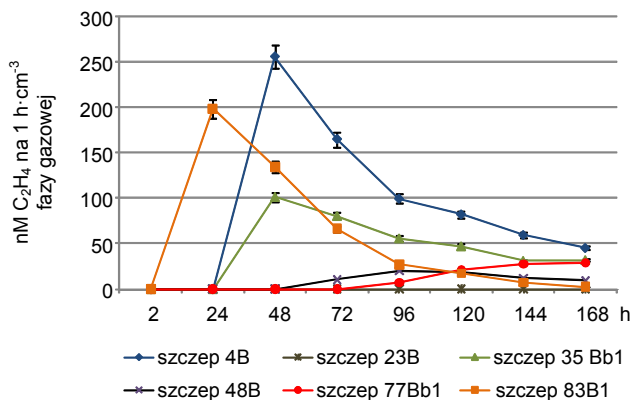


Rys. 4. Aktywność nitrogenazy bakterii *Azospirillum* spp. wyizolowanych z endoryzofery jęczmienia hodowanych w pożywce bezazotowej z kwasem syringowym jako jedynym źródłem węgla

Fig. 4. The nitrogenase activity of bacteria of *Azospirillum* spp. isolated from the endorhizosphere of barley grown in nitrogen-free medium with syringic acid as the sole carbon source

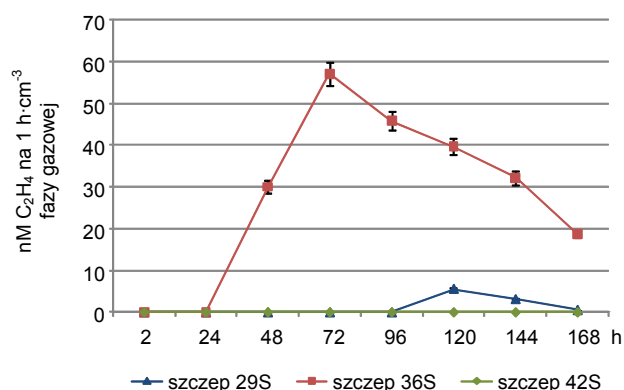
stwierdzono dużą aktywność nitrogeazy szczepu 12/6, która już po upływie 24 h inkubacji wynosiła 682,607 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej i utrzymywała się na poziomie 106,639 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej jeszcze po upływie 144 h. Również dużą aktywność nitrogeazy uzyskano w przypadku szczepu 1/7 po 48-godzinnym okresie inkubacji komórek, w granicach od 414,561 do 73,425 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej, która to aktywność utrzymywała się jeszcze po 7 dniach (rys. 4). Dużo mniejszą redukcję acetylenu, poniżej 100 nM, stwierdzono u trzeciego szczepu – 15/7, izolowanego również z endoryzofery jęczmienia jarego.

W przypadku szczepów wyizolowanych z endoryzofery kukurydzy i wydmuchrzy cy piaskowej hodowanych z kwasem syringowym aktywność nitrogeazy była nawet trzykrotnie mniejsza w stosunku do szczepów inkubowanych z kwasem kawowym. Największe wartości aktywności nitrogeazy uzyskano w przypadku szczepu 4B dopiero po 48-godzinnym okresie inkubacji bakterii. Wartości te mieściły się w granicach od 255,694 do 99,451 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej po 96 h (rys. 5). Również aktywny był drugi szczep, 83B1, którego redukcja acetylenu po 24 h inkubacji z kwasem syringowym wynosiła 198,72 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej. Najmniejszą aktywność nitrogeazy stwierdzono w przypadku szczepu 35Bb1. Pozostałe trzy szczepy: 48B, 23B i 77Bb1 charakteryzowały się również małą aktywnością nitrogeazy, a stopień redukcji acetylenu w tych przypadkach utrzymywał się na poziomie 20 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej. Najmniejszą aktywność nitrogeazy w pożywce z kwasem syringowym stwierdzono u szczepów pochodzących z endoryzofery wydmuchrzy cy piaskowej. W tym przypadku największą redukcję acetylenu wykazywał jedynie szczep 36S, a jej zakres mieścił się w granicach od 57,079 nM po 72 h do 18,695 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej po 168 h hodowli komórek (rys. 6). Pozostałe dwa szczepy: 29S i 42S nie były aktywne i u nich redukcja acetylenu wynosiła poniżej 5,464 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej.



Rys. 5. Aktywność nitrogeazy bakterii *Azospirillum* spp. wyizolowanych z endoryzofery kukurydzy hodowanych w pożywce bezazotowej z kwasem syringowym jako jedynym źródłem węgla

Fig. 5. The nitrogenase activity of bacteria of *Azospirillum* spp. isolated from the endorhizosphere of maize grown in nitrogen-free medium with syringic acid as the sole carbon source



Rys. 6. Aktywność nitrogenazy bakterii *Azospirillum* spp. wyizolowanych z endoryzofery wydmuchrzycy piaskowej hodowanych w pożywce bezazotowej z kwasem syringowym jako jedynym źródłem węgla

Fig. 6. The nitrogenase activity of bacteria of *Azospirillum* spp. isolated from the endorhizosphere of lyme grass grown in nitrogen-free medium with syringic acid as the sole carbon source

Do oceny istotności różnic między szczepami wykorzystującymi kwasy kawowy i syringowy jako jedyne źródło węgla przy wiązaniu wolnego azotu wykorzystano wielokrotny test LSD. Różnice aktywności nitrogenazy bakterii podczas hodowli, w czasie 168 h inkubacji, oceniono tym samym testem (tab. 2 i 3). Największą średnią aktywność nitrogenazy stwierdzono w przypadku szczepów wyizolowanych z endoryzofery jęczmienia: 1/7 (364,87 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej), 12/6 (245,14 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³) oraz szczepu pochodzącego z endoryzofery kukurydzy – 4B (248,46 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³). Z kolei najmniejszą średnią aktywność nitrogenazy zaobserwowano u szczepów wyizolowanych z endoryzofery wydmuchrzycy piaskowej (29S i 36S) hodowanych w pożywce z kwasem kawowym (kolejno 68,78 i 77,63 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³) i syringowym (1,13 i 27,92 nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³) (tab. 2). Największe średnie wartości aktywności nitrogenazy szczepów bakterii *Azospirillum* spp., w czasie 168 h inkubacji, hodowanych w pożywkach bezazotowych z kwasami fenolowymi jako jedynym źródłem węgla uzyskano w czasie 24 i 48 h inkubacji w przypadku kwasu kawowego oraz w czasie 48 h w przypadku kwasu syringowego (tab. 3). We wcześniejszych naszych badaniach z tymi samymi szczepami również aktywniej wiązały wolny azot bakterie z rodzaju *Azospirillum* wyizolowane z endoryzofery jęczmienia i kukurydzy w hodowlach bezazotowych z innymi aromatycznymi węglowodorami, m.in. naftalenem, antracenenem, fenantrenem, pirenem i chryzenem (KRÓL i PERZYŃSKI 2002, 2004 a, b). Obliczenia statystyczne, testy LSD, potwierdzają zróżnicowanie średnich wartości aktywności nitrogenazy szczepów bakterii *Azospirillum* spp. (tab. 3) otrzymanych w czasie 168 h inkubacji podczas hodowli w pożywkach bezazotowych z kwasami fenolowymi jako jedynym źródłem węgla.

Tabela 2. Średnie wartości aktywności nitrogenazy szczepów bakterii *Azospirillum* spp. hodowanych w pożywkach bezazotowych z kwasami fenolowymi jako jedynym źródłem węgla (n = 24) (nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej)

Table 2. Mean values of nitrogenase activity of the bacteria strains of *Azospirillum* spp. grown in nitrogen-free media with phenolic acids as the sole carbon source (n = 24) (nM C₂H₄ per 1 h·cm⁻³ of gas phase)

Symbol szczepu	Kwas kawowy	Kwas syringowy
12/6	245,14 b	248,37 a
1/7	364,87 a	150,61 ab
15/7	168,65 c	35,86 b
4B	248,46 b	88,35 b
23B	0	0
35Bb	215,14 ab	43,50 b
48B	210,86 ab	8,75 bc
77Bb1	0	10,55 c
83B1	160,01 c	56,64 b
29S	68,78 d	1,13 d
36S	77,63 d	27,92 b
42S	0	0
Średnia	146,63	55,97
NIR	139,311	48,78

Wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($\alpha \leq 0,05$).

Tabela 3. Średnie wartości aktywności nitrogenazy szczepów bakterii *Azospirillum* spp., w czasie 168 h inkubacji, hodowanych w pożywkach bezazotowych z kwasami fenolowymi jako jedynym źródłem węgla (n = 36) (nM C₂H₄ na 1 h·cm⁻³ fazy gazowej)

Table 3. Mean values of nitrogenase activity of the bacteria strains of *Azospirillum* spp., in the time 168 h, grown in nitrogen-free media with phenolic acids as the sole carbon source (n = 36) (nM C₂H₄ per 1 h·cm⁻³ of gas phase)

Godziny inkubacji	Kwas kawowy	Kwas syringowy
2	0	0
24	383,99 a	73,44 a
48	355,89 a	117,82 a
72	253,34 ab	83,66 a
96	171,65 ab	61,96 a
120	106,23 b	48,68 b
144	56,83 c	36,01 bc
168	41,01 c	26,20 bc
Średnia	195,56	55,97
NIR	158,312	47,23

Wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($\alpha \leq 0,05$).

Wnioski

1. Szczepy bakterii *Azospirillum* spp. wyizolowane z endoryzofery jęczmienia jarego i kukurydzy charakteryzują się dużą aktywnością nitrogenazy podczas wzrostu w podłożach bezazotowych zawierających kwas kawowy i syringowy jako jedyne źródła węgla i energii.

2. Zdolność degradacji związków fenolowych przez szczepy bakterii *Azospirillum* spp. zwiększa prawdopodobieństwo nabycia przez roślinę odporności na infekcję.

Literatura

- AGRIOS G.N., 1997. Plant diseases caused by Mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. W: Plant pathology. Red. G.N. Agrios. Academic Press, New York: 457-470.
- BECK S.N., GILMOUR C.M., 1982. Role of wheat root exudates in associative nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* 15: 33-42.
- BLOEMBERG G.V., LUGTENBERG B.J.J., 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 4: 343-350.
- BOTHE H., KRONENBERG A., STEPHAN U.P., TIMMER W., NEUER G., 1983. Nitrogen fixation and denitrification by a wheat – *Azospirillum* associated. W: *Azospirillum* II. Red. W. Klingmuller. Birkhauser, Basel: 28-35.
- BUTLAND S.L., CHOW M.L., ELLIS B.L., 1998. A diverse family of phenylalanine ammonialyase genes expressed in pine trees and cell cultures. *Plant Mol. Biol.* 37: 15-24.
- DÖBEREINER J., 1988. Isolation and identification of root associated diazotrophs. *Plant Soil* 110: 202-212.
- DÖBEREINER J., MARRIEL J.E., NERY M., 1979. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22: 1464-1474.
- EL-NAAS M.H., AL-MUHTASEB S.A., MAKHLOUF S., 2009. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. *J. Hazard. Mater.* 164: 720-725.
- GILLIS M., REINHOLD-HUREK B., 1994. Taxonomy of *Azospirillum*. W: *Azospirillum/plant association*. Red. Y. Okon. CRC Press, Boca Raton, FL: 1-15.
- HUNG P.V., MORITA M., 2008. Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their antioxidant capacities. *Food Chem.* 109: 325-331.
- JU H.K., CHO E.J., JANG M.H., LEE Y.Y., HONG S.S., PARK J.H., KWON S.W., 2009. Characterization of increased phenolic compounds from fermented *Bokbunja* (*Rubus coreanus* Miq.) and related antioxidant activity. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49: 820-827.
- KÄHKÖNEN M.P., HOPIA A.I., VOURELA H.J., RAUHA J.P., PIHLAJA K., KUJALA T.S., HEINONEN M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3954-3962.
- KOBAYASHI A., MYONG J.K., KAWAZU K., 1996. Uptake and exudation of phenolic compounds by wheat and antimicrobial components of the root exudate. *Z. Naturforsch.* 51: 527-533.
- KROTZKY A., BERGGOLD R., WERNER D., 1986. Analysis of factors limiting associative N₂ fixation with two cultivars of sorghum mutants. *Soil Biol. Biochem.* 18: 201-211.
- KRÓL M.J., 1997. Występowanie bakterii z rodzaju *Azospirillum* w ryzosferze traw. *Zesz. Nauk. AR Szczec.* 181, Roln. 68: 133-140.
- KRÓL M.J., KOBUS J., 1997. Występowanie bakterii z rodzaju *Azospirillum* w ryzosferze kukurydzy i jęczmienia uprawianych na różnych glebach. *Zesz. Nauk. AR Szczec.* 181, Roln. 68: 141-151.

- KRÓL M.J., PERZYŃSKI A., 2002. Wykorzystanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) jako jedyne źródła węgla w wiązaniu wolnego azotu przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. Pam. Puław. 131: 69-80.
- KRÓL M.J., PERZYŃSKI A., 2004 a. Wykorzystanie antracenu w wiązaniu wolnego azotu przez bakterie diazotoficzne. Acta Agr. Silv. Ser. Agr. 42: 229-237.
- KRÓL M.J., PERZYŃSKI A., 2004 b. Wykorzystanie chryzenu jako jedyne źródła węgla w wiązaniu wolnego azotu przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. Pam. Puław. 137: 77-94.
- KRÓL M.J., PERZYŃSKI A., 2004 c. Wykorzystanie pirenu jako jedyne źródła węgla w wiązaniu wolnego azotu przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. Pam. Puław. 137: 95-105.
- KUREK E., KOBUS J., 1990. Korzystne i szkodliwe oddziaływanie mikroflory ryzosferowej na wzrost i rozwój roślin. Post. Mikrobiol. 29: 103-123.
- LAM S.T., GAFFNEY T.D., 1993. Biological activities of bacteria used in plant pathogen control. W: Biotechnology in plant disease control. Red. I. Ched. Wiley, New York: 291-320.
- LIKA K., PAPADAKIS I.A., 2009. Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae. J. Sea Res. 62: 135-146.
- LU Y., YAN L., WANG Y., ZHOU S., FU J., ZHANG J., 2009. Biodegradation of phenolic compounds from cooking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. J. Hazard. Mater. 165: 1091-1097.
- MORSE A., REHM H.J., 1987. Degradation of phenol by mixed culture of *Pseudomonas putida* and *Cryptococcus elinii* adsorbed on activated carbon. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 283-288.
- OH J.S., HAN Y.H., 1997. Isolation and characterization of phenol degrading *Phodococcus* sp. DGUM 2011. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 459-463.
- ORCZYK W., HIPSKIND J., DE NEERGAARD E., GOLDSBROUGH P., NICHOLSON R.L., 1996. Stimulation of phenylalanine ammonia-lyase in sorghum in response to inoculation with *Bipolaris maydis*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 48: 55-64.
- PETERSON D.M., EMMONS C.L., HIBBS A.H., 2001. Phenolic antioxidant and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. J. Cereal Sci. 33: 97-103.
- DE POLLI H., BOYER C.D., NEYRA C.A., 1982. Nitrogenase activity associated with roots and stems of field grown corn plants. Plant Physiol. 70: 1609-1615.
- RODRÍGUEZ H., CURIEL J.A., LANDETE J.M., DE LAS RIVAS B., DE FELIPE F.L., GÓMEZ-CORDOVÉS C., MANCHEÑO J.M., MUÑOZ R., 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 132: 79-90.
- SHAH N.W., THORNTON S.F., BOTTRELL S.H., SPENCE M.J., 2009. Biodegradation potential of MTBE in a fractured chalk aquifer under aerobic conditions in long-term uncontaminated and contaminated aquifer microcosms. J. Contam. Hydrol. 103: 119-133.
- SREELAKSHMI Y., SHARMA R., 2008. Differential regulation of phenylalanine ammonia lyase activity and protein level by light in tomato seedlings. Plant Physiol. Biochem. 46: 444-451.
- VALENZUELA J., BUMANN U., CESPEDES R., PADILA L., GONZALEZ B., 1997. Degradation of chlorophenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4) in bleached kraft mill effluent. Appl. Environ. Microbiol. 63: 227-232.
- VERECKE D., MESSENS E., KLARSKOR K., DE BRUYN A., VAN MONTAGU M., GOETHALS K., 1997. Patterns of phenolic compounds in leafy galls of tobacco. Planta 201: 342-348.
- WATANABE J., LIN C., 1984. Respons of wetland rice to inoculation with *Azospirillum lipoferum* and *Pseudomonas* sp. Soil Sci. Nutr. 30: 117-123.
- WIESER M., EBERSPÄCHER J., VOGLER B., LINGENS F., 1994. Metabolism of 4-chlorophenol by *Azotobacter* sp. GP1: structure of the meta cleavage product of 4-chlorocatechol. FEMS Microbiol. Lett. 166: 73-78.
- WOJTASZEK P., 1993. Fenolowe metabolity wtórne jako sygnały roślin w oddziaływaniach międzygatunkowych. Post. Biochem. 39: 139-146.

Galązka A., Król M., Perzyński A., 2010. Wykorzystanie kwasów fenolowych jako jedyne źródła węgla przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* wiążące azot. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #78.

YAO R.-S., SUN M., WANG CH.-L., DENG S.-S., 2006. Degradation of phenolic compounds with hydrogen peroxide catalyzed by enzyme from *Serratia marcescens* AB 90027. *Water Res.* 40: 3091-3098.

ZUPFER J.M., CHURCHILL K.E., RASMUSSEN D.C., FULCHER R.G., 1998. Variation in ferulic acid concentration among diverse barley cultivars measured by HPLC and microspectrophotometry. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1350-1354.

UTILISATION OF PHENOLIC ACIDS AS THE SOLE CARBON SOURCE IN FIXATION OF NITROGEN-FREE BY *AZOSPIRILLUM* SPP. STRAINS OF BACTERIA

Summary. *Azospirillum* spp. strains of bacteria were isolated from the endorhizosphere of spring barley (*Hordeum sativum*) and maize (*Zea mays*), cultivated on different soils and lyme grass (*Elymus arenarius*) grown on sands of the Baltic seaside (Sobieszewo and Świnoujście). These strains were able to degrade the caffeic and syringic acids. Nitrogen fixation of *Azospirillum* spp. strains (starved) determined, as reduction of C_2H_2 , was demonstrated in free-N medium with phenolic acids as the sole carbon source, in the times of 168 h. The highest nitrogenase activity of *Azospirillum* spp. was found after 24 h for 48 h. These ranged from 649.14 nM to 566.85 nM for the caffeic acid and from 682.61 nM to 414.56 nM C_2H_4 per 1 h·cm⁻³ of gas phase for syringic acid. The highest value of nitrogenase activity was indicated in strains isolated from barley and maize, lowest values were observed in strains isolated from grass.

Key words: phenolic acids, *Azospirillum* spp., acetylene reduction

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Anna Galązka, Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, Poland, e-mail: agalazka@iung.pulawy.pl

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:
18.10.2010

Do cytowania – For citation:

Galązka A., Król M., Perzyński A., 2010. Wykorzystanie kwasów fenolowych jako jedyne źródła węgla przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* wiążące azot. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #78.