

DOROTA SWĘDRZYŃSKA, ALICJA NIEWIADOMSKA, AGNIESZKA WOLNA-MARUWKA

Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

SPOSÓB INOKULACJI A EFEKTYWNOŚĆ ZASIEDLANIA RYZOSFERY OWSA (*AVENA SATIVA* L.) I KUKURYDZY (*ZEA MAYS* L.) PRZEZ BAKTERIE Z RODZAJU *AZOSPIRILLUM*

Streszczenie. Możliwość wykorzystania bakterii *Azospirillum* jako czynnika korzystnie wpływającego na plonowanie roślin uprawnych wymaga m.in. opracowania metod inokulacji tymi bakteriami zapewniających skuteczną kolonizację strefy korzeniowej roślin, a zarazem możliwych do zastosowania w praktyce rolniczej. Celem pracy było poznanie efektywności zasiedlania ryzosfery i ryzoplany owsa i kukurydzy przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* w zależności od sposobu inokulacji szczepem *A. brasilense*. W doświadczeniu wazonowym zastosowano cztery kombinacje: inokulację gleby przed siewem, inokulację ziarniaków, inokulację gleby po wschodach oraz jednocześnie te trzy warianty inokulacji. Zastosowano szczep 65B, wyizolowany w Zakładzie Mikrobiologii IUNG w Puławach. W okresie wegetacji prowadzono analizy służące określeniu liczebności bakterii z rodzaju *Azospirillum* w poszczególnych kombinacjach doświadczalnych. Jednocześnie kontrolowano koncentrację chlorofilu w blaszkach liściowych roślin oraz określano aktywność nitrogenazy w glebie metodą acetylenową. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że inokulacja ziarniaków jest najmniej skutecznym sposobem inicjowania kolonizacji ryzosfery owsa i kukurydzy przez *A. brasilense*. Wprowadzanie tych bakterii do gleby, zarówno bezpośrednio przed siewem ziarniaków, jak i po wschodach, zwiększa liczebność bakterii z rodzaju *Azospirillum* w ryzosferze owsa i kukurydzy. Zwiększenie liczebności *A. brasilense* na skutek inokulacji nie znajdowało pełnego odbicia w żywotności roślin wyrażonej koncentracją chlorofilu w ich blaszkach liściowych. O ile w przypadku owsa zależność pomiędzy samym faktem inokulacji a koncentracją chlorofilu była dość wyraźna, to u kukurydzy zaznaczała się bardzo słabo.

Słowa kluczowe: *Azospirillum*, aktywność nitrogenazy, gleba, inokulacja zbóż, kukurydza, owies

Wstęp

Jedną z grup drobnoustrojów wolno żyjących, z którymi wiąże się nadzieje praktycznego zastosowania w rolnictwie, są żyjące w układach asocjacyjnych, zwłaszcza ze zbożami, bakterie z rodzaju *Azospirillum*. Uważa się je, obok obligatoryjnych endofitów, za najbardziej aktywny komponent asocjacyjnego wiązania azotu (BALDANI i DÖBEREINER 1980). Dotyczy to zarówno upraw roślin tropikalnych – trzciny cukrowej, palmy olejowej, ryżu, ananasów, bananowców, jak i upraw klimatu umiarkowanego – traw pastewnych i zbóż (HARTMAN i IN. 1995, BALDANI 1996, BALDANI i IN. 1997, SWĘDRZYŃSKA 2000).

Efekt szczepienia upraw *Azospirillum* w dużej mierze jest uzależniony od zdolności przeżycia tych drobnoustrojów w glebie. Tymczasem ich przeżywalność w samej glebie przez dłuższy okres czasu jest niewielka. *Azospirillum* spp. żyjące w asocjacji z korzeniami roślin wykazują największą aktywność po wnikięciu do głębszych warstw korzenia. Środowisko wewnątrz korzenia dobrze – w porównaniu z glebą ryzosferową – chroni bakterie przed niekorzystnymi dla nich czynnikami środowiska (susza, mróz), pozwalając im jednocześnie z powodzeniem konkurować z innymi bakteriami o łatwy dostęp do źródła węgla i energii (BASHAN i IN. 2004). Ze względu na ograniczoną przeżywalność tych bakterii w glebie bez rośliny bardzo ważne jest precyzyjne określenie terminu inokulacji oraz znalezienie takiej metody, która zapewniałaby skuteczną kolonizację rośliny uprawnej, a zarazem była możliwa do zastosowania w praktyce rolniczej.

Próby szczepienia roślin uprawnych, wiążącymi azot cząsteczkowy bakteriami z rodzaju *Azospirillum* podjęto w połowie lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia. Wielokrotnie szczepiono nimi nasiona i siewki kukurydzy (FALLIK i IN. 1988, SWĘDRZYŃSKA i SAWICKA 2000), jęczmienia, sorgo, proso, pszenicy (BALDANI i IN. 1983, SWĘDRZYŃSKA i SAWICKA 2001), żyta oraz innych roślin uprawnych w doświadczeniach wazonowych i polowych (JAGNOW 1983). Badano wpływ tych szczepień na ukorzenianie roślin, pobieranie przez nie składników odżywczych (N, P, K), na aktywność nitrogenazy, czas kwitnienia, zawartość chlorofilu w blaszkach liściowych roślin, zawartość azotu w roślinach i ziarnach, plony ziarna i suchej masy. Najczęściej wyniki były pozytywne. Uzyskiwano znaczący wzrost plonów części wegetatywnych (o 18-39%) i ziarna (o 5-30%), lepszy rozwój i rozgałęzienie systemu korzeniowego (BASHAN i IN. 2004). Wpływ inokulacji szczepami *Azospirillum* na wzrost plonu uprawianych roślin wykazali także BASHAN i LEVANONY (1990), natomiast NGUYEN i IN. (1998) dowiedli pozytywnego wpływu szczepienia na przyspieszenie dojrzewania ryżu.

W literaturze najczęściej przedstawiana jest metoda inokulacji polegająca na aplikacji *Azospirillum* bezpośrednio do gleby lub nasion w formie płynnej zawiesiny (ALBRECHT i IN. 1981, RAI i GAUR 1982, REYNDEERS i VLASSAK 1982, SMITH i IN. 1984, MILLET i FELDMAN 1986, FALLIK i IN. 1988) oraz aplikacji z zastosowaniem różnych organicznych nośników, najczęściej torfu (OKON 1985, OKON i HADAR 1987, SADASIVAN i NEYRA 1987, MARIOTTI i IN. 1992, NGUYEN i IN. 1998).

Celem pracy jest poznanie efektywności zasiedlania ryzosfery i ryzoplany owsa i kukurydzy cukrowej przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* w zależności od sposobu inokulacji szczepem *A. brasilense*.

Material i metody

Badania przeprowadzono na podstawie doświadczeń wazonowych wykonanych w 2007 roku w hali wegetacyjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Badano wpływ różnych sposobów inokulacji roślin szczepem *A. brasilense* (szczep 65B, pochodzący z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach) na efektywność kolonizacji ryzosfery owsa (*Avena sativa* L.) odmiany 'Akt' i kukurydzy cukrowej (*Zea mays* L. ssp *saccharata*) odmiany 'RS-21'. Podłoże uprawianych roślin stanowiła gleba wykształcona z piasków słabo gliniastych, klas IVa i IVb, pochodząca z pól Zakładu Doświadczalno-Dydaktycznego w Złotnikach, należącego do Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Glebę nawieziono saletrą amonową, superfosfatem potrójnym i solą potasową. W przeliczeniu na ilość czystego składnika na 1 m³ gleby nawożenie to odpowiadało, odpowiednio dla owsa i kukurydzy, następującym dawkom: N – 26 g i 35 g, P – 26 g i 30 g, K – 34 g i 40 g.

Zawartość składników mineralnych: azotu mineralnego, fosforu i potasu w glebie użytej do doświadczenia przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Zawartość azotu, fosforu i potasu w podłożu użytym do doświadczeń wazonowych (mg w 100 g)

Table 1. Nitrogen, phosphorus and potassium content in substratum used in pot experiments (mg per 100 g)

Metoda	Azot mineralny		Fosfor	Potas
	NH ₄	NO ₃		
Kjeldahla				
kukurydza	30,50	72,80		–
owies	22,40	59,90		
Egenera-Riehma				
kukurydza		–	10,25	13,05
owies			8,49	13,44

Odczyn gleby (pH w H₂O) oznaczano równoległe z analizami mikrobiologicznymi. W czasie trwania doświadczenia kształtował się on na poziomie 7,3-7,6 w przypadku owsa i 7,0-7,7 w przypadku kukurydzy.

Średnia dobową temperaturę od kwietnia do sierpnia wynosiła 15,5°C, a średnia miesięczna suma opadów – 59,1 mm.

Podstawowym kryterium doboru roślin do doświadczenia była ich zdolność tworzenia związków asocjacyjnych z bakteriami z rodzaju *Azospirillum*, znaczenie gospodarcze w naszym kraju, a w przypadku owsa także niewielkie wymagania względem azotu.

Zastosowano pięć kombinacji doświadczalnych w trzech powtórzeniach:

- I – kontrola – gleba bez inokulacji,
- II – inokulacja gleby przed siewem szczepem bakterii z rodzaju *Azospirillum*,
- III – inokulacja ziarniaków szczepem bakterii z rodzaju *Azospirillum*,

- IV – inokulacja gleby po wschodach roślin szczepem bakterii z rodzaju *Azospirillum*,
- V – inokulacja gleby + inokulacja nasion + inokulacja gleby po wschodach roślin szczepem bakterii z rodzaju *Azospirillum*.

Jako inokulum zastosowano 250 ml zawiesiny o gęstości 10^8 - 10^9 komórek na każde powtórzenie w każdej kombinacji. Hodowlę inkubowano w wytrząsarce (100 wahań na 1 min) w temperaturze 28°C przez 24 h. Takie metody były wielokrotnie stosowane w doświadczeniach polowych (MILLET i FELDMAN 1986, FALLIK i IN. 1988).

Liczebność bakterii z rodzaju *Azospirillum* w ryzosferze i ryzoplacie owsa i kukurydzy określano czterokrotnie w sezonie wegetacyjnym. Terminy analiz wyznaczały fazy rozwojowe roślin: owsa – wschody (2-3 liście), krzewienie, strzelanie w źdźbło i kwitnienie, kukurydzy – faza 2-3 liści, faza 6-7 liści, faza 2. kolanka i faza wyrzucania wiech. Liczebność bakterii określano z użyciem półpłynnej pożywki NFB (DÖBEREINER 1980) metodą kolejnych rozcieńczeń, a najbardziej prawdopodobną ilość drobnoustrojów (NPL), będącą wypadkową wszystkich powtórzeń, odczytywano z tablic Mc Cardy'ego (DÖBEREINER 1980, SAWICKA 1983). Tablice te są skonstruowane z wykorzystaniem rachunku prawdopodobieństwa, a odczytany wynik jest wypadkową wyników powtórzeń, dlatego też różnice między kombinacjami doświadczenia lub ich brak interpretować należy jako istotne.

W tych samych terminach, w których określano liczebność drobnoustrojów, określano żywotność roślin na podstawie zawartości barwników chlorofilowych. Oznaczenia dokonano w każdym powtórzeniu każdej kombinacji na 30 najmłodszych, lecz w pełni wykształconych blaszkach liściowych. Badanie przeprowadzono za pomocą chlorofilomierza (N-Tester). Określono tzw. indeks zieloności liścia, wyrażony wartością SPAD (ang. *soil plant analyses development*), czyli różnicą między absorpcją światła 650 i 940 nm (GÁBORČIK 2006).

Jednorazowo w okresie trwania doświadczenia oznaczano wiązanie azotu atmosferycznego na podstawie aktywności nitrogenazy w glebie pod roślinami. Posłużono się metodą acetylenową, w wersji zaproponowanej przez SAWICKĄ (1983). Oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach dla każdej kombinacji doświadczalnej w fazie 6-7 liści u kukurydzy, a u owsa – w fazie strzelania w źdźbło. Analizy mieszaniny gazów pobranych spod klosza wykonano na chromatografie gazowym typu Chrom 5.

Uzyskane wyniki poddano ocenie statystycznej z zastosowaniem wielokierunkowej analizy wariancji, a porównań średnich dokonano testem Tukeya.

Wyniki i dyskusja

Wyniki badań nad wpływem sposobu inokulacji na liczebność *Azospirillum* w próbach glebowych pobranych czterokrotnie w sezonie wegetacyjnym ze strefy korzeniowej owsa i kukurydzy przedstawiono w tabelach 2 i 3.

Ilości bakterii z rodzaju *Azospirillum* stwierdzone w ryzosferze i ryzoplacie roślin były duże. W przypadku owsa (tab. 2) większość kombinacji inokulowanych odznaczała się większą średnią liczebnością *Azospirillum* w ryzosferze i ryzoplacie niż kombinacja kontrolna. Wyróżniały się zwłaszcza kombinacja V, w której zastosowano zarówno

Swedrzyńska D., Niewiadomska A., Wolna-Maruwka A., 2010. Sposób inokulacji a efektywność zasiedlania ryzosfer-y owsa (*Avena sativa* L.) i kukurydzy (*Zea mays* L.) przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. Nauka Przyr. Technol. 4, 6, #95.

Tabela 2. Wpływ sposobu inokulacji na liczebność bakterii z rodzaju *Azospirillum* w ryzosferze i ryzoplacie owsa ($\times 10^3$ w 1 g s.m. gleby)

Table 2. Influence of inoculation method on the number of *Azospirillum* bacteria in the rhizosphere and rhizoplane of oat ($\times 10^3$ per 1 g of soil d.m.)

Faza rozwojowa	Kombinacje				
	I	II	III	IV	V
Ryzosfera					
2-3 liście	30,0	122,6	31,0	305,0	567,0
Krzewienie	2,4	193,5	5,2	9,5	54,0
Strzelanie w źdźbło	27,5	17,3	8,6	29,8	29,5
Kłoszenie	15,9	2,2	0,8	2,2	0,4
Średnio	19,0	83,9	11,4	86,6	162,7
Ryzoplana					
2-3 liście	1,1	12,3	31,0	305,0	144,9
Krzewienie	180,0	193,5	12,4	252,0	300,0
Strzelanie w źdźbło	10,5	74,8	22,8	53,5	53,1
Kłoszenie	0,4	104,5	81,0	48,6	275,0
Średnio	48,0	96,3	38,6	164,8	193,3

inokulację gleby, jak i ziarniaków, oraz kombinacja IV, w której inokulum wprowadzono do gleby po wschodach roślin, natomiast przedsięwzięta inokulacja samych ziarniaków w ogóle nie była efektywna; liczebność *Azospirillum* była identyczna jak w kontroli.

W przypadku kukurydzy (tab. 3) już we wczesnych fazach rozwojowych roślin stwierdzono bardzo duże ilości bakterii tak w ryzosferze, jak i w ryzoplacie, jednakże efekt inokulacji można było dostrzec tylko w ryzosferze. Dotyczy to przede wszystkim kombinacji IV, gdzie bakterie były wprowadzane do gleby po wschodach roślin, i kombinacji V, gdzie zastosowano łącznie wszystkie warianty inokulacji. Ponieważ w ryzoplacie kukurydzy występują bardzo dobre warunki dla bakterii z rodzaju *Azospirillum*, można wnioskować, iż ich naturalna populacja szybko się rozmnożyła, niwelując wpływ inokulacji.

Stwierdzoną w glebie liczebność *Azospirillum* (tab. 2, 3) należy uznać za charakterystyczną dla klimatu umiarkowanego. OKON (1985) podaje, że bakterie z rodzaju *Azospirillum* stanowią 1-10% populacji wszystkich drobnoustrojów ryzosferowych, choć przez niektórych autorów ta ilość jest uważana za zawyżoną, zwłaszcza w warunkach klimatu umiarkowanego (O'HARA i IN. 1981). Rekordowa ilość została stwierdzona w ryzosferze pszenicy jarej w Brazylii: 10^8 komórek w 1 g gleby. Zwykle jednak stwierdzane ilości były mniejsze i kształtowały się w przypadku pszenicy na poziomie 10^3 - 10^6 komórek w 1 g s.m. gleby (BALANDREAU 1986). Największe rozbieżności dotyczą gleb klimatu umiarkowanego lub zimnego. W tych warunkach stwierdzano w glebie ryzosferowej od 0 do 10^7 komórek *Azospirillum* w 1 g s.m. gleby (DE CONINCK i IN. 1988, JAŚKOWSKA 1995).

Tabela 3. Wpływ sposobu inokulacji na liczebność bakterii z rodzaju *Azospirillum* w ryzosferze i ryzoplacie kukurydzy ($\times 10^3$ w 1 g s.m. gleby)

Table 3. Influence of inoculation method on the number of *Azospirillum* bacteria in the rhizosphere and rhizoplane of maize ($\times 10^3$ per 1 g of soil d.m.)

Faza rozwojowa	Kombinacje				
	I	II	III	IV	V
Ryzosfera					
2-3 liście	134,8	58,5	13,4	448,6	349,0
6-7 liści	2,8	34,1	6,4	64,5	21,3
2. kolanko	40,6	122,0	26,4	27,5	106,5
Wyrzucanie wiech	6,5	325,0	148,6	122,7	20,8
Średnio	46,2	134,9	48,7	165,8	203,4
Ryzoplana					
2-3 liście	1 320,0	322,5	1 575,0	44,9	1349,0
6-7 liści	204,3	2 860,0	21,0	135,9	641,7
2. kolanko	2 248,8	122,0	988,5	275,0	284,0
Wyrzucanie wiech	10,9	195,0	32,3	969,0	1317,7
Średnio	946,0	874,9	654,2	356,2	898,1

Przeprowadzona analiza wiązania azotu nie wykazała aktywności nitrogenazy w glebie pod roślinami w żadnej kombinacji doświadczalnej, nie ma zatem możliwości stwierdzenia wpływu szczepienia roślin na proces wiązania azotu atmosferycznego. Nie można jednak wykluczyć, iż proces wiązania azotu atmosferycznego zachodził, choć nie udało się go uchwycić na drodze zastosowanej metodyki badawczej, na co autorzy zwracali już uwagę we wcześniejszych pracach (SWĘDRZYŃSKA 2000). Opisano wiele doświadczeń polowych, w tym także przeprowadzanych w warunkach klimatu umiarkowanego, w których stwierdzano wiązanie azotu atmosferycznego (m.in. DE CONINCK i IN. 1988, SAWICKA 1997). CHALK (1991) stwierdził, że bakterie z rodzaju *Azospirillum* mogą związać 30-40 kg azotu rocznie w asocjacji z trawami pastewnymi i zbożami i do 200 kg w asocjacji z trzciną cukrową. Niejednokrotnie obserwowano wzrost plonów i koncentracji chlorofilu w blaszkach liściowych zbóż pod wpływem inokulacji *Azospirillum* (SWĘDRZYŃSKA 2000). Z tych powodów wpływ inokulacji na aktywność nitrogenazy bakterii z rodzaju *Azospirillum* pozostaje wciąż aktualnym tematem dalszych prac badawczych.

Najczęściej spotykanymi w literaturze miernikami wpływu inokulacji na rośliny są wielkość plonu lub też masa całych roślin czy wybranych organów. Różnice w tych parametrach najczęściej są nieuchwytnie w warunkach doświadczeń wazonowych, a ich określenie w trakcie trwania doświadczenia jest najczęściej niemożliwe, gdyż na ogół wiąże się z koniecznością zniszczenia całych roślin. Z tego powodu, wzorem wcześniejszych prac autorów (np. SWĘDRZYŃSKA i IN. 2008), jako wskaźnik kondycji roślin i ich

Swedrzyńska D., Niewiadomska A., Wolna-Maruwka A., 2010. Sposób inokulacji a efektywność zasiedlania ryzofery owsa (*Avena sativa* L.) i kukurydzy (*Zea mays* L.) przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. Nauka Przyr. Technol. 4, 6, #95.

żywności wykorzystano koncentrację barwników chlorofilowych w blaszkach liściowych owsa i kukurydzy, oznaczaną za pomocą chlorofilomierza. Pomiarów wykonano czterokrotnie w ciągu sezonu wegetacyjnego, w tych samych terminach, w których oznaczano liczebność *Azospirillum*. Wyniki tych analiz przedstawiono w tabelach 4 i 5.

W przypadku owsa (tab. 4) koncentracja chlorofilu była dość mocno zróżnicowana w poszczególnych kombinacjach doświadczalnych, ale przede wszystkim dotyczyło to faz rozwojowych. Najmniej chlorofilu (wartość SPAD: 475) było w blaszkach liściowych młodych roślin, w stadium siewki z kilkoma wykształconymi liśćmi, a najwięcej (wartość SPAD: 732) – w stadium strzelania w źdźbło. Pozytywny wpływ inokulacji na żywotność roślin zaobserwowano w odniesieniu do wszystkich jej sposobów, jednakże istotność różnic pomiędzy kombinacjami inokulowanymi a kontrolą udało się wykazać tylko w odniesieniu do kombinacji III i IV (szczepienie samych nasion oraz szczepienie gleby po wschodach).

Tabela 4. Średnia zawartość chlorofilu w blaszkach liściowych owsa w okresie wegetacji (wartość SPAD)

Table 4. Medium chlorophyll content in oat leaf blades during the vegetation period (SPAD value)

Faza rozwojowa	Kombinacje					
	I	II	III	IV	V	średnio
2-3 liście	476	440	481	508	472	475
Krzewienie	612	644	629	676	632	639
Strzelanie w źdźbło	686	744	736	750	725	728
Kłoszenie	555	616	651	637	652	622
Średnio	582	611	624	643	620	617
NIR _{0,05} dla kombinacji	41					
NIR _{0,05} dla faz rozwojowych	38					

Koncentracja chlorofilu w blaszkach liściowych kukurydzy wzrastała wraz z kolejnymi fazami rozwojowymi (tab. 5) i osiągnęła najwyższy poziom w fazie wyrzucania wiech. Nie udało się wykazać wpływu różnych sposobów inokulacji roślin i gleby bakteriami z rodzaju *Azospirillum* na koncentrację chlorofilu w blaszkach liściowych kukurydzy. Dodatni efekt w porównaniu z kontrolą zaobserwowano jedynie w kombinacji, w której zastosowano inokulację gleby po wschodach roślin (kombinacja IV). Rośliny tej kombinacji prawie zawsze charakteryzowały się większą w stosunku do pozostałych wariantów doświadczalnych koncentracją chlorofilu (różnica istotna statystycznie).

Koncentracja chlorofilu okazała się wskaźnikiem częściowo przydatnym w ocenie wpływu inokulacji na żywotność roślin. W przypadku owsa większa zawartość chlorofilu w kombinacjach inokulowanych odpowiada oczekiwanemu efektowi pozytywnego oddziaływania bakterii *Azospirillum* na rośliny, potwierdzając ten efekt. W odniesieniu do kukurydzy zależność ta nie wystąpiła. Na tym etapie badań nie można jednak uznać,

Tabela 5. Średnia zawartość chlorofilu w blaszkach liściowych kukurydzy w okresie wegetacji (wartość SPAD)

Table 5. Medium chlorophyll content in maize leaf blades during the vegetation period (SPAD value)

Faza rozwojowa	Kombinacje					
	I	II	III	IV	V	średnio
2-3 liście	406	434	405	423	419	417
6-7 liści	455	464	444	485	415	453
2. kolanko	510	498	530	551	491	516
Wyrzucanie wiech	586	566	584	621	547	581
Średnio	489	491	491	520	468	492
NIR _{0,05} dla kombinacji	27					
NIR _{0,05} dla faz rozwojowych	24					

że inokulacja nie wpłynęła korzystnie na żywotność roślin, jak i odrzucić przydatności stężenia barwników chlorofilowych jako wskaźnika tejże żywotności. Przyczyną braku możliwości wykorzystania koncentracji chlorofilu jako wskaźnika oceny wpływu inokulacji na żywotność roślin kukurydzy może być chociażby, wskazywana we wcześniejszych pracach autorów (SWĘDRZYŃSKA i IN. 2008), zmienność osobnicza, która w warunkach doświadczenia wazonowego odgrywa dużą rolę. Należy wziąć pod uwagę fakt, że przy takiej samej wielkości naczyń użytych w doświadczeniu znacznie mniej jest roślin kukurydzy oraz wykształconych przez nią pędów i liści niż roślin oraz pędów i liści owsa.

Podsumowanie

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że inokulacja ziarniaków jest najmniej skutecznym sposobem inicjowania kolonizacji ryzosfery owsa i kukurydzy przez *Azospirillum brasilense*, natomiast wprowadzanie tych bakterii do gleby, zarówno bezpośrednio przed siewem ziarniaków, jak i po wschodach, zwiększa liczebność bakterii z rodzaju *Azospirillum* w ryzosferze owsa i kukurydzy.

Zwiększenie liczebności *Azospirillum* na skutek inokulacji nie znajdowało pełnego odbicia w żywotności roślin wyrażonej koncentracją chlorofilu w ich blaszkach liściowych. O ile w przypadku owsa zależność pomiędzy samym faktem inokulacji a koncentracją chlorofilu była dość wyraźna, to u kukurydzy zaznaczała się bardzo słabo.

Swędryńska D., Niewiadomska A., Wolna-Maruwka A., 2010. Sposób inokulacji a efektywność zasiedlania ryzosfery owsa (*Avena sativa* L.) i kukurydzy (*Zea mays* L.) przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. Nauka Przyr. Technol. 4, 6, #95.

Literatura

- ALBRECHT S.L., OKON Y., LONNQUIST L., BURRIS R.H., 1981. Nitrogen fixation by corn – *Azospirillum* associations in a temperate climate. *Crop Sci.* 21: 301-306.
- BALANDREAU J., 1986. Ecological factors and adaptive processes in N₂-fixing bacterial populations of the plant environment. *Plant Soil* 90: 73-92.
- BALDANI J.I., CARUZO L., BALDANI V.L.D., GOI S.R., DÖBEREINER J., 1997. Recent advances in BNF with non-leguminous plants. *Soil Biol. Biochem.* 129, 5/6: 911-922.
- BALDANI V.L.D., 1996. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma bactéria diazotrófica. *Maszynopsis. UFRRJ, Seropédica, RJ.*
- BALDANI V.L.D., BALDANI J.I., DÖBEREINER J., 1983. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. Microbiol.* 19: 924-929.
- BALDANI V.L.D., DÖBEREINER J., 1980. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.* 12, 4: 433-439.
- BASHAN Y., HOLGUIN G., BASHAN L., 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 50: 521-577.
- BASHAN Y., LEVANOY H., 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36: 591-608.
- CHALK P.M., 1991. The contribution of associative and symbiotic nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of non-legumes. *Plant Soil* 132: 29-39.
- DE CONINCK K., HOREMANS S., RANDOMBAGE S., VLASSAK K., 1988. Occurrence and survival of *Azospirillum* spp. in temperate regions. *Plant Soil* 110: 213-218.
- DÖBEREINER J., 1980. Forage grasses and grain crops. W: *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. Ed. F.J. Bergsen. Wiley, New York: 535-555.
- FALLIK E., OKON Y., FISCHER M., 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 20, 1: 45-49.
- GÁBORČIK N., 2006. Koncentrácia minerálnych živín chlorofylu a+b (SPAD hodnoty) v listoch tokajských odrôd viniča. *Vinič Vno* 3: 2-4.
- HARTMAN A., BALDANI J.I., KIRCHHOF G., ABMUS B., HUTZLER P., SPRINGER N., LUDWIG W., BALDANI V.L.D., DÖBEREINER J., 1995. Taxonomic and ecologic studies of diazotrophic rhizosphere bacteria using phylogenetic probes. W: *Azospirillum* VI and related microorganisms. Ed. I. Fendrik, M. del Gallo, J. Vanderleyden, M. Zamoroczy. Springer, Berlin: 415-428.
- JAGNOW G., 1983. Nitrogenase (C₂H₂)-activity in roots of non-cultivated cereal plants. Influence of nitrogen fertilizers on population and activity of nitrogen fixing bacteria. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* 146: 217-227.
- JAŚKOWSKA A., 1995. Occurrence and characteristic of *Azospirillum* spp. in the rhizosphere of cereals. *Acta Microbiol. Pol.* 44, 1: 69-77.
- MARIOTTI A., SOUGOUFARA B., DOMMERGUES Y.R., 1992. Estimation de la fixation d'azote atmosphérique par le tracage isotopique naturel dans une plantation de *Casuarina equisetifolia* (Frost). *Soil. Biol. Biochem.* 24, 7: 647-653.
- MILLET E., FELDMAN M., 1986. Yield response of a common spring wheat cultivar to inoculation with *Azospirillum brasilense* at various levels of nitrogen fertilization. *Plant Soil* 80: 255-259.
- NGUYEN T.P.C., HA HONG T., NGUYEN N.D., 1998. Responses of rice plants to inoculation with *Azospirillum* sp. under field conditions. W: *Nitrogen fixation with non-legumes*. Ed. K.A. Malik, M. Sajjad Mirza. Kluwer, Dordrecht: 237-242.

Swędrzyńska D., Niewiadomska A., Wolna-Maruwka A., 2010. Sposób inokulacji a efektywność zasiedlania ryzosfery owsa (*Avena sativa* L.) i kukurydzy (*Zea mays* L.) przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. Nauka Przyr. Technol. 4, 6, #95.

- O'HARA G.W., DAVEY M.R., LUCAS J.A., 1981. Effect of inoculation of *Zea mays* to inoculation with *Azospirillum brasilense* strains under temperate condition. Can. J. Microbiol. 27: 871-877.
- OKON Y., 1985. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. Trends Biotechnol. 3: 223-228.
- OKON Y., HADAR Y., 1987. Microbial inoculants as crop-yield enhancers. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 6: 61-65.
- RAI S.N., GAUR A.C., 1982. Nitrogen fixation by *Azospirillum* spp. and effect of *Azospirillum lipoferum* on the yield and N-uptake of wheat crop. Plant Soil 69: 233-238.
- REYNDERS L., VLASSAK K., 1982. Use of *Azospirillum brasilense* as biofertilizer in intensive wheat cropping. Plant Soil 66: 217-223.
- SADASIVAN L., NEYRA C.A., 1987. Cyst production and brown pigment formation in ageing cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. J. Bacteriol. 4: 1670-1677.
- SAWICKA A., 1983. Ekologiczne aspekty wiązania azotu atmosferycznego. Roczn. AR Pozn. Rozpr. Nauk. 134.
- SAWICKA A., 1997. Czynniki ograniczające wiązanie azotu atmosferycznego u roślin motylkowatych i u traw. Biul. Oceny Odm. 29: 53-58.
- SMITH R.L., SCHANK S.C., MILAM J.R., BALTENSPERGER A.A., 1984. Responses of *Sorghum* and *Pennisetum* species to the N₂-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 47: 1331-1336.
- SWĘDRZYŃSKA D., 2000. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on development and yielding of winter wheat and oat under different cultivation. Pol. J. Environ. Stud. 9, 5: 423-428.
- SWĘDRZYŃSKA D., NIEWIADOMSKA A., KLAMA J., 2008. Koncentracja chlorofilu w blaszkach liściowych kukurydzy i owsa jako wskaźnik żywotności roślin inokulowanych bakteriami z rodzaju *Azospirillum*. Ekol. Tech. 16, 4: 165-169.
- SWĘDRZYŃSKA D., SAWICKA A., 2000. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on development and yielding of maize (*Zea mays* spp. *saccharata* L.) under different cultivation conditions. Pol. J. Environ. Stud. 9, 6: 505-509.
- SWĘDRZYŃSKA D., SAWICKA A., 2001. Effect of inoculation on population numbers of *Azospirillum* bacteria under winter wheat, oat and maize. Pol. J. Environ. Stud. 10, 1: 21-25.

THE METHOD OF INOCULATION AND EFFECTIVENESS OF OAT (*AVENA SATIVA* L.) AND MAIZE (*ZEAMAYS* L.) RHIZOSPHERE SETTLING BY BACTERIA OF THE *AZOSPIRILLUM* GENUS

Summary. The possibility of utilisation of *Azospirillum* bacteria as a factor exerting a beneficial impact on yields of crop plants requires, among others, elaboration of inoculation methods with these bacteria ensuring effective colonisation of the plant root zone area and, at the same time, possible for the application in agricultural practice. The aim of the research project was to recognise the settling effectiveness of oats and maize rhizosphere and rhizoplane with bacteria of the *Azospirillum* genus depending on the method of inoculation with the *A. brasilense* strain. The following four combinations were employed in the performed pot experiment: pre-sowing soil inoculation, kernel inoculation, post-emergence soil inoculation and simultaneous application of all these three inoculation variants. The 65B strain isolated at the Section of Microbiology of Institute of Soil Science and Plant Cultivation – National Research Institute in Puławy was applied. Various analyses aiming to determine bacteria of the *Azospirillum* genus in individual

Swędryńska D., Niewiadomska A., Wolna-Maruwka A., 2010. Sposób inokulacji a efektywność zasiedlania ryzosfery owsa (*Avena sativa* L.) i kukurydzy (*Zea mays* L.) przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #95.

experimental combinations were carried out throughout the vegetation period. Simultaneously, chlorophyll concentrations in plant leaf blades were controlled and soil nitrogenase activity was determined by the acetylene method. The results of the performed investigations show that the least effective method of colonisation initiation of oats and maize rhizosphere by *A. brasilense* was kernel inoculation. On the other hand, introduction of these bacteria into the soil, both pre-sowing and post-emergence, increased counts of bacteria of the *Azospirillum* genus in the rhizosphere of oats and maize. Increased numbers of *A. brasilense* following inoculation failed to find its reflection in plant vitality expressed by chlorophyll concentration in their leaf blades. Although in the case of oats the relationship between the very fact of inoculation and chlorophyll concentration was fairly clear, in the case of maize, it was barely noticeable.

Key words: *Azospirillum*, nitrogenase activity, soil, crops inoculation, maize, oat

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Dorota Swędryńska, Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Szydlowska 50, 60-656 Poznań, Poland, e-mail: dorotas@up.poznan.pl

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

18.10.2010

Do cytowania – For citation:

Swędryńska D., Niewiadomska A., Wolna-Maruwka A., 2010. Sposób inokulacji a efektywność zasiedlania ryzosfery owsa (*Avena sativa* L.) i kukurydzy (*Zea mays* L.) przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #95.