

JUSTYNA KLAMA

*Katedra Mikrobiologii Rolnej
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego
Wołyńska 35, 60-637 Poznań
e-mail: jklama@owl.au.poznan.pl*

HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE – EFEKTYWNY DIAZOTROF KLIMATU UMIARKOWANEGO?

ROLA AZOTU W GLEBIE

Azot jest jednym z najpowszechniej występujących pierwiastków na kuli ziemskiej. Największe jego zasoby związane są w litosferze w skałach magmowych, osadowych i metamorficznych, a drugim pod względem wielkości jego rezerwuarem jest atmosfera. Chociaż w glebie znajdują się stosunkowo niewielkie ilości azotu, to decydują one o wzroście i rozwoju roślin, a pośrednio o życiu na Ziemi. Zawartość azotu w glebie uzależniona jest w dużej mierze od rodzaju gleby i kształtuje się na średnim poziomie 0,06–0,3%, z czego zdecydowaną większość stanowią związki organiczne (95–99%), a tylko 1–5% stanowią połączenia mineralne NH_4^+ i NO_3^- . Niektóre gleby, t.j. czarnoziemy, czarne ziemie, czy gleby torfowe mogą zawierać nawet 3,5% N, jednak zdecydowaną większość naszych gleb stanowią gleby piaskowe

zawierające nie więcej niż 0,1% N (FOTYMA i współaut. 1998).

Przemiany związków azotowych w glebie, t.j., mineralizacja i immobilizacja, utlenianie i redukcja, wywierają istotny wpływ na obieg azotu w przyrodzie. Równowaga tych przemian określa warunki żywienia roślin azotem i decyduje o stopniu wykorzystania przez nie nawozów azotowych (SCHRADER i współaut. 1981, PEARSON i współaut. 1984).

Ze wszystkich poznanych dotychczas pierwiastków odżywczych rośliny najsilniej reagują na niedobory azotu, co objawia się słabszym ich krzewieniem, wątłością, sztywnością i strzelistością. Liście są źle wykształcone, a plonowanie roślin oraz wartość biologiczna otrzymanego produktu obniżone.

WIĄZANIE AZOTU ATMOSFERYCZNEGO PRZEZ BAKTERIE

Bioróżnorodność, krążenie pierwiastków oraz przepływ energii są podstawowymi częściami składowymi umożliwiającymi funkcjonowanie wszystkich systemów w przyrodzie. Jednym ze sposobów zapewniających uzupełnianie zasobów podstawowych pierwiastków w glebie, takich jak azot, jest stosowanie nawozów chemicznych. Jest to jednak zabieg bardzo kosztowny, energochłonny, jednocze-

śnie wpływający na zanieczyszczenie środowiska, a przemysłowe wiązanie azotu z powietrza wymaga bardzo wysokich temperatur i ciśnień oraz użycia katalizatorów. Powodem tego jest obecność trzech kowalencyjnych wiązań w cząsteczce azotu, na zerwanie których potrzebna jest duża ilość energii, ok. 225 kcal/mol. Natomiast bakterie przeprowadzają ten proces w warunkach normalnych ciśnień i temperatur,

dzięki wykorzystaniu bardzo efektywnych biokatalizatorów i wytwarzaniu enzymu nitrogenazy (CZERWIŃSKI 1994, VANCE 1996).

Ocenia się, że ilości azotu związanego biologicznie przez drobnoustroje na kuli ziemskiej zamykają się w granicach 100–265 milionów ton rocznie, z czego 150 milionów ton przypada na mikroorganizmy glebowe (SAWICKA 1983).

Dlatego też znaczącą rolę przypisuje się biologicznemu wiązaniu azotu w rolnictwie, szczególnie pod uprawami zbóż, kukurydzy i ryżu (KAMMEN 1997).

Liczne badania wskazują, że zdolność wiązania azotu atmosferycznego jest przypisana tylko niektórym mikroorganizmom prokariotycznym, takim jak bakterie, sinice i promieniowce, zwanymi powszechnie diazotrofami. Wszystkie te organizmy zawierają informację genetyczną umożliwiającą syntezę enzymu – nitrogenazy, który katalizuje redukcję N_2 do NH_3 . Zdolność do przeprowadzenia takiego procesu kontrolowana jest przez 17-genowy operon *nif*, odpowiedzialny za prawidłową syntezę odpowiednich produktów białkowych. Ponadto, w kontroli procesu wiązania N_2 oprócz genów *nif* uczestniczą geny nod oraz szereg genów rośliny gospodarza (ŁORKIEWICZ i SKORUPKA 1982, BARABASZ 1992, MAŁDZAK i GOLIŃSKA 1999).

Wiele czynników wpływa na duże zainteresowanie wiązaniem azotu przez bakterie symbiotyczne. Rośliny, z jakimi bakterie te wchodzi w symbiozę są dokładnie taksonomicznie określone, procesy brodawkowania roślin i wiązania azotu są skorelowane, badania prowadzone na brodawkach roślin motylkowatych prowadzą nadal do pasjonujących odkryć, a ich praktyczna rola doceniona była już

w starożytności. Proces symbiotycznego wiązania azotu jest również obecnie powszechnie wykorzystywany w rolnictwie, ze względu na znaczne ilości związywanego azotu przez drobnoustroje symbiotyczne, które kształtują się na poziomie od 50 do 500 kg N/ha/rok. Jednak szereg prowadzonych w ostatnich latach badań, wskazuje na możliwości wykorzystania w praktyce rolniczej zdolności wiązania tego pierwiastka również przez liczne drobnoustroje niesymbiotyczne, zwane endofitami (DART i współaut. 1975, SAWICKA i SWĘDRZYŃSKA 1997) które, tak jak np. *Azotobacter paspali*, wchodząc w asocjacyjny układ z trawą *Paspalum notatum*, wiążą nawet do 100 kg N/ha/rok (DART i współaut. 1975). Inspiracją badań nad tą grupą drobnoustrojów jest z pewnością nie do końca poznany ich system aktywności nitrogenazy; a rośliny, z którymi te drobnoustroje wchodzi w asocjacje należą do różnorodnych grup. Dlatego też obecnie głównym celem badawczym są asocjacje endofitów zdolnych do wiązania azotu atmosferycznego pod powszechnie uprawianymi zbożami oraz pozostałymi roślinami niestrączkowymi o dużym znaczeniu gospodarczym.

Światową reakcją na ten problem są podejmowane próby utworzenia Akcji Międzynarodowego Porozumienia Programowego Badań nad Nowymi Technologiami Bionawożenia. Głównym celem programowym tej organizacji byłoby wykorzystanie możliwości inokulacji zbóż i pozostałych roślin niestrączkowych różnymi diazotrofami, a także prowadzenie szczegółowych badań nad ich zasiedlaniem i zdolnością wiązania azotu jako czynnikami wpływającymi na wzrost i rozwój roślin (DÖBEREINER 1989).

ENDOFITY BAKTERYJNE JAKO ALTERNATYWNE NAWOZY AZOTOWE

W odniesieniu do „endofitycznych bakterii diazotroficznych” termin ten obejmuje wszystkie diazotrofy zdolne do zasiedlania głównie strefy korzeniowej roślin, przeżywających dość trudno w glebie i mających zdolność wiązania azotu w asocjacjach z roślinami.

W zamian za zaopatrywanie rośliny–gospodarza bezpośrednio w azot endofity czerpią korzyści, takie jak zmniejszona konkurencja o pokarm, jaka istnieje w części przykorzeniowej gleby, tzw. ryzosferze, większe zaopatrzenie w substraty, a także ochrona przed nadmierną

koncentracją tlenu, jako czynnika mogącego działać destrukcyjnie na nitrogenazę (STRZELCZYK 2001).

Liczne badania prowadzone na organizmach endofitycznych w przeciągu ostatnich lat nie wyjaśniły jednak dotychczas wielu zagadnień związanych z ich występowaniem w środowisku. Ważnym elementem stało się lepsze poznanie i zrozumienie interakcji między mikroorganizmami diazotroficznymi a roślinami (FRANCO 1998, MEHNAZ i współaut. 1998).

HERBASPIRILLUM SEROPEDICEAE – BAKTERIE WYŁĄCZNIE TROPIKALNE?

Bakterie *Herbaspirillum seropedicae* są Gram-ujemnymi przecinkowcami o średnicy 0,5–0,7 µm i długości 1,4–1,8 µm, czasem przybierającymi kształty spiralne. Posiadają jedną do trzech, a najczęściej dwie unipolarne rzęski, dzięki którym charakteryzują się dość dużą ruchliwością. Są bakteriami chemoorganotroficznymi, swobodnieżyjącymi, zdolnymi do wiązania azotu atmosferycznego w warunkach tlenowych lub przy ograniczonym dostępie tlenu (PEDROSA i współaut. 1998). Izolaty *Herbaspirillum seropedicae* wykazują aktywność enzymów katalazy, oksydazy i ureazy; natomiast nie mają zdolności hydrolizowania żelatyny. Redukują jony NO_3^- do NO_2^- , jednak nie wszystkie szczepy *Herbaspirillum* przeprowadzają denitryfikację całkowitą do N_2 .

Herbaspirillum seropedicae wzrasta w postaci wilgotnych, białawych kolonii z niebieskawym środkiem pojawiającym się po 7–10 dniach hodowli. Najlepiej rozwija się w środowisku o pH 5,0–8,0. Wykazano wrażliwość bakterii na obecność jonów amonowych i tlenu, który hamuje ekspresję genu odpowiadającego za wiązanie azotu (RUDNICK i współaut. 1997), choć późniejsze doniesienia wskazują, iż NH_4^+ tylko częściowo hamuje aktywność nitrogenazy (FU i BURRIS 1989).

Bakterie *Herbaspirillum seropedicae* po raz pierwszy zostały wyizolowane z korzeni i strefy ryzosferowej pod uprawami pszenicy w Brazylii (BALDANI i współaut. 1986). Jednak często stwierdzano, że ich liczebność w glebie, nawet w części ryzosferowej, jest niewielka, a identyfikowane stąd szczepy bakterii pochodziły, zdaniem niektórych badaczy, z włóków lub niewielkich cząstek korzeni, które przedostały się do analizowanych próbek gleby (OLIVARES i współaut. 1995). Autorzy ci wskazują jednocześnie, że w glebie inokulowanej *Herbaspirillum seropedicae* nie stwierdzono obecności tych bakterii już po 30 dniach od inokulacji, za wyjątkiem gleby, na której posadzono sorgo, w którego ryzosferze korzeni namnożyły się bakterie. Stąd też, często określa się ten gatunek bakterii jako niezdolny do przeżycia poza tkankami roślin.

Doświadczenia, których celem jest określenie miejsc kolonizacji rośliny przez *Herbaspirillum seropedicae* wskazują na duże zróżnicowanie zasiedlenia roślin w zależności od ich gatunku.

Kolejne badania potwierdziły występowanie omawianego szczepu również pod uprawami ryżu (*Oryza sativa*), gdzie zasiedlał tkanki korzeni, łodyg, liści i nasion, kukurydzy (*Zea mays*) i sorgo (*Sorghum bicolor*). Na tym poziomie badań bakterie funkcjonowały tylko pod jedną nazwą gatunkową – *Herbaspirillum seropedicae*. Później wyodrębniono nowy szczep, będący łagodnym patogenem trzciny cukrowej, nazywany początkowo *Pseudomonas rubrisubalbicans* przekwalifikowany w 1996 roku na *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI i współaut. 1996). Oba gatunki zasiedlały korzenie oraz łodygi trzciny cukrowej, sorgo i ryżu, wykazując jednocześnie zdolność do wiązania azotu atmosferycznego pod ich uprawami (PIMENTEL i współaut. 1991, URETA i współaut. 1995).

Diazotrof ten wyizolowany został też z *Penisetum purpureum*, trzciny cukrowej, różnych gatunków traw zachwaszczających uprawy, a nawet z roślin strączkowych, rosnących na polach kukurydzy. Badania prowadzone przez BALDANIEGO i współaut. (1997) dowodzą, że zasiedlanie przez bakterie strefy korzeniowej tych roślin charakterystyczne jest głównie dla korzeni bocznych, gdzie przedstawia się przez przestwory międzykomórkowe kolonizują tkanki ksylemu. Liczne badania potwierdzają występowanie *Herbaspirillum seropedicae* również w różnych gatunkach palm, bananowcach, ananasowcach oraz innych roślinach dwuliściennych (DÖBEREINER i współaut. 1995, DÖBEREINER 1997).

Stwierdzono, iż w przeciwieństwie do innych endofitów, bakterie *Herbaspirillum seropedicae* mogą rozwijać się w roślinach dzięki przedostawaniu się do nich przez zainfekowane nasiona.

Badania przeprowadzone przez SABRY'EGO i SALEA (2002) wskazują, że łączna inokulacja *Herbaspirillum seropedicae* i *Azospirillum* lub *Azorhizobium* pokrywa 50% zapotrzebowania nawożenia azotowego pod uprawą pszenicy. WIELAND i FEEDRIK (1998) wskazują, że inokulacja powyższymi bakteriami wpływa nie tylko na wspomaganie pokarmowe roślin, ale też jest powodem wzrostu populacji bakterii. *Herbaspirillum seropedicae* wchodzi również w korzystne interakcje z innym endofitycznym gatunkiem bakterii wiążącej azot atmosferyczny *Acetobacter diazotrophicus*. HEMERLY i

współaut. (1998) wykazali, że inokulacja trzcin cukrowej mieszaniną tych dwóch szczepów daje lepsze wiązanie azotu pod uprawami, aniżeli szczepienie wyłącznie jednym gatunkiem bakterii. DÖBEREINER i BALDANI (1998) inokulując trzinę cukrową badanymi szczepami przedstawili hipotezę potwierdzającą stymulujący, wzajemny wpływ obu gatunków bakterii. Zdaniem badaczy, *Acetobacter diazotrophicus*, wykorzystując zawartą w roślinach sacharozę, produkuje kwasy organiczne, wykorzystywane przez *Herbaspirillum seropedicae*. Dzięki temu pH środowiska utrzymuje się na stałym poziomie 5,5, który jest optymalny dla rozwoju obu endofitów.

Obiecujące wyniki ilości związanego azotu przez *Herbaspirillum seropedicae* w warunkach laboratoryjnych (całkowita akumulacja azotu wynosząca $0,44 \text{ mg/5 ml}^{-1}$) oraz odnotowanie korzystnych efektów inokulacji badanym szczepem wielu upraw w krajach tropikalnych skłoniło autorkę do podjęcia prób wykorzystania cennej właściwości *Herbaspirillum* pod uprawami roślin odgrywających znaczącą rolę w polskim rolnictwie. Inokulacja

wybranych traw (stokłosa spleaszczona, życica wielokwiatowa i festulolium) omawianym gatunkiem bakterii dała pozytywne rezultaty. Poziom związanego azotu pod uprawami traw szczepionymi *Herbaspirillum* różnił się istotnie ($P < 0,001$) w porównaniu do prób kontrolnych nieszczepionych bakteriami i wynosił średnio $8,22 \text{ nanomole C}_2\text{H}_4 \times \text{h}^{-1} \times \text{roślina}^{-1}$, co w przeliczeniu na azot związany stanowiłoby ok. $0,7 \text{ kg/m}^2/\text{sezon wegetacyjny}$.

Analiza podstawowych grup drobnoustrojów glebowych w glebie szczepionej *Herbaspirillum seropedicae* nie wykazała wpływu endofitycznej bakterii na zmiany stanu mikrobiologicznego badanego środowiska. Fakt ten wydaje się potwierdzać wcześniejsze badania prowadzone w różnych ośrodkach naukowych na świecie, wykluczające patogeniczność tego gatunku w stosunku do towarzyszących drobnoustrojów oraz organizmów wyższych.

Czy nie warto więc zastanowić się nad rozwinięciem badań, które mogłyby pozwolić na wykorzystanie *Herbaspirillum seropedicae* jako skutecznej szczepionki pod uprawy w nowoczesnym polskim rolnictwie?

HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE – EFFECTIVE DIAZOTROPHIC BACTERIUM OF TEMPORATE CLIMATE?

S u m m a r y

The only procaryotic organisms, which are capable of fixing atmospheric nitrogen, are those that can synthesize nitrogenase. This is an enzyme that plays a key role in the process of biological dinitrogen fixation. A widespread and well-known phenomenon is the fixation of this element by bacteria living in symbiosis with leguminous plants. However, also some free-living bacteria, frequently entering into associations with various plants, reveal capabilities of fixing molecular nitrogen. Such endophytes include bacteria

like *Herbaspirillum seropedicae* and *Acetobacter diazotrophicus* were first discovered in countries of the tropical climate.

The influence of inoculation with *Herbaspirillum seropedicae* on dinitrogen fixation was studied in different grasses in temperate climate. A beneficial effect of inoculation the grasses seeds with *Herbaspirillum seropedicae* was noted and the quantity of fixed nitrogen was larger in comparison with control.

LITERATURA

- BALDANI J. I., BALDANI V. L. D., SELDIN L., DÖBEREINER J., 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 36, 86–93.
- BALDANI J. I., BALDANI V. L. D., SELDIN L., DÖBEREINER J., 1996. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, a mild pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov., and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 802–810.
- BALDANI J. I., CARUSO L., BALDANI V. L. D., GOI S. R., J., 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. Soil Biol. Biochem. 29, 911–922.
- BARABASZ W., 1992. Mikrobiologiczne przemiany azotu glebowego. Post. Mikrobiol. 31, 3–24.
- CZERWIŃSKI M., 1994. Oddziaływanie N_2 z nitroge-nazą. Wiad. Chem. 48, 131–140.
- DART P. J., DAY J. M., 1975. Non-symbiotic nitrogen fixation in soil. [W:] Soil microbiology. WALKER N. (red.). Butterworths, Ltd., 225–252.
- DÖBEREINER J., 1989. Recent advances in associations of diazotrophs with plant roots. [W:] Interrelationships between microorganisms and plants in

- soil. VANCURA V., KUNC F. (red.). Czechoslovak Acad. Scien., 229–242.
- DÖBEREINER J., 1997. *Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions*. Soil Biol. Biochem. 29, 771–774.
- DÖBEREINER J., BALDANI V. L. D., 1998. *Biological nitrogen fixation by endophytic diazotrophs in non-leguminous crops in the tropics*. [W:] *Nitrogen Fixation with Non-Legumes*. MALIK K. A. et al. (red.). Kulwer Acad. Publish., Dordrecht, Berlin, 3–7.
- DÖBEREINER J., BALDANI V. L. D., REIS V. M., 1995. *Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops*. [W:] *Azospirillum VI and related microorganisms*. FEDRIK I. (red.) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 3–14.
- FOTYMA E., WILKOS G., PIETRUCH C., 1998. *Test glebowy azotu mineralnego. Możliwości praktycznego wykorzystania*. IUNG, Puławy, 3–37.
- FRANCO A. A., 1998. *Importance of biological nitrogen fixation in sustainable agriculture*. Curr. Plant Sci. Biotech. Agric. 31, 615–616.
- FU A. H., BURRIS R. H., 1989. *Ammonium inhibition of nitrogenase activity in Herbaspirillum seropedicae*. J. Bacteriol. 171, 3168–3175.
- HEMERLY A. S., VILAR C. V., LIMA M. A. C., NOGUEIRA E., FERRIRA P. C. G., BALDANI J. I., 1998. *Isolation and characterization of sugarcane genes involved in the association with endophytic diazotrophs*. [W:] *Biological nitrogen fixation for the 21st Century*. Kluwer Acad. Publish., Heidelberg, 422.
- KAMMEN A., 1997. *Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 177–178.
- LORKIEWICZ Z., SKORUPSKA A., 1982. *Biologiczne wiązanie azotu*. Post. Mikrobiol., XXI, 1/2, 7–30.
- MĄDRZAK C. J., GOLIŃSKA B., 1999. *Współzawodnictwo pomiędzy szczepami bakterii brodawkujących rośliny motylkowate*. Biotechnologia 3, 106–124.
- MEHNAZ S., MIRZA M. S., HASSAN U., MALIK K. A., 1998. *Detection of inoculated plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere of rice*. [W:] *Nitrogen Fixation with Non-Legumes*. MALIK K. A. et al. (red.). Kulwer Acad. Publish., Dordrecht, Berlin, 75–83.
- OLIVARES F. L., BALDANI V. L., REIS V. M., BALDANI J. I., DÖBEREINER J., 1995. *Occurrence of the endophytic diazotrophs Herbaspirillum spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae*. Biol. Fert. Soil. 21, 197–200.
- PEARSON C. J., MUIRHEAD W. A., 1984. *Nitrogen uptake*. [W:] *Control of crop productivity*. PEARSON C. J. (red.). Academ. Press, Australia, 73–88.
- PEDROSA F. O., SOUZA E. M., BENELLI E. M., MACHADO I. M. P., STEFFENS M. B. R., KLASSEN G., MACHADO H. B., RIGO L. U., WASSEM R., MONTEIRO R. A., REGO F. G. M., CHUBATSU L. S., BUCK M., MOORE M., HARPER A., DRUMMOND M., YATES M. G., 1998. *Regulation of nitrogen fixation in Herbaspirillum seropedicae*. Curr. Plant Sci. Biotech. Agric. 31, 129–130.
- PIMENTEL J. P., OLIVARES F., PITARD R. M., URQUIAGA S., AKIBA F., DÖBEREINER J., 1991. *Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by Pseudomonas rubrisubalbicans and Herbaspirillum seropedicae*. Plant Soil 137, 61–65.
- RUDNICK P., MELETZUS D., GREEN A., HE L., KENNEDY C., 1997. *Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of Proteobacteria*. Soil Biol. Biochem. 29, 831–841.
- SABRY S. R. S., SALEH S. A., 2002. *Response of wheat to inoculation with different nitrogen fixing bacteria*. [W:] *Nitrogen fixation global perspectives*. FINAN T. M. et al. (red.). CAB Int., Canada, 488.
- SAWICKA A., 1983. *Ekologiczne aspekty wiązania azotu atmosferycznego*. Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu 138, 103–115.
- SAWICKA A., SWĘDRZYŃSKA D., 1997. *Wiązanie azotu atmosferycznego pod trawami nawożonymi azotem amonu*. Biul. Oceny Odm. 29, 59–63.
- SCHRADER L. E., THOMAS R. J., 1981. *Nitrate uptake, production and transport in the whole plant*. [W:] *Nitrogen and carbon metabolism*. BEWLEY J. D. (red.). Boston, 94–134.
- STRZELCZYK E., 2001. *Endofity*. [W:] *Drobnoustroje środowiska glebowego aspekty fizjologiczne, biochemiczne, genetyczne*. Toruń, 97–107.
- URETA A., ALVAREZ B., RAMON A., VERA M. A., MARTINEZ-DRETS G., 1995. *Identification of Acetobacter diazotrophicus, Herbaspirillum seropedicae and Herbaspirillum rubrisubalbicans using biochemical and genetic criteria*. Plant Soil 172, 271–277.
- VANCE C. P., 1996. *Root – bacteria interactions: Symbiotic nitrogen fixation*. [W:] *Plant Root, The Hidden Half*. WASEL J. et al. (red.). Marcel Dekker Inc., New York, 723–756.
- WIELAND G., FEDRIK I., 1998. *Colonization of wheat by Azoarcus sp. and interaction with other diazotrophs*. [W:] *Biological nitrogen fixation for the 21st Century*. Kluwer Acad. Publish., Heidelberg, 406.