

BIORÓŻNORODNOŚĆ MIKROBIOLOGICZNA GLEB NA PRZYKŁADZIE BAKTERII WIĄŻĄCYCH AZOT ATMOSFERYCZNY – ODDZIAŁYWANIE WYBRANYCH ZABIEGÓW AGROTECHNICZNYCH

STEFAN MARTYNIUK, JADWIGA OROŃ

Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – PIB w Puławach

Synopsis. W badanych glebach doświadczalnych nie stwierdzano obecności bakterii symbiotycznych lucerny, a liczebności symbiontów seradeli były małe, prawdopodobnie głównie dlatego, że w doświadczalniach tych nie uprawiano lucerny i seradeli. Symbionty koniczyny i grochu występowały natomiast w stosunkowo dużych liczebnościach we wszystkich badanych glebach, także tych, na których od ponad 20 lat nie uprawiano rośliny-gospodarza (koniczyny i grochu). Populacje tych bakterii były mniejsze w glebie lżejszej, tj. w piasku gliniastym lekkim, niż w glinie lekkiej. Wapnowanie obydwu gleb sprzyjało przeżywaniu w nich liczniejszych populacji symbiontów koniczyny i lucerny. Potwierdzono, że kwaśny odczyn gleby jest czynnikiem ograniczającym występowanie w glebach bakterii z rodzaju *Azotobacter*.

Słowa kluczowe – *key words*: bakterie – *bacteria*, wiązanie N_2 – N_2 fixation, bioróżnorodność – *biodiversity*, zabiegi agrotechniczne – *agrotechnical practices*

WSTĘP

Zdolność do biologicznego wiązania azotu atmosferycznego (BWAA) jest dość szeroko rozpowszechniona w przyrodzie, ale tylko wśród mikroorganizmów prokariotycznych. Proces BWAA przeprowadzany jest przez różne grupy fizjologiczne bakterii, które pod względem ekologicznym podzielić można na: – swobodnie żyjące asymilatory N_2 (*Azotobacter*, *Clostridium*, *Nostoc*), zasiedlające zarówno gleby jak i zbiorniki wodne, – bakterie asocjacyjne (*Azospirillum*), wiążące azot na powierzchni lub w głębszych warstwach korzeni roślin oraz – bakterie symbiotyczne (*Rhizobium*, *Frankia*), wiążące N_2 w ścisłych układach symbiotycznych z korzeniami roślin motylkowatych lub niektórych drzew, np. olszy [Król 2006, Martyniuk 2002]. Z szacunkowej ilości 139×10^6 – 170×10^6 ton azotu dostającego się corocznie do globalnego cyklu N w wyniku procesu BWAA, azot związany w systemach symbiotycznych stanowi około 70-80% [Peoples i Craswell 1992, Sawicka 1981]. Tak więc, spośród wymienionych powyżej grup bakterii asymilujących N_2 największe znaczenie ma, zwłaszcza w agroekosystemach, symbioza roślin motylkowatych z bakteriami brodawkowymi (rizobiami).

Rizobia, w czasie kiedy nie tworzą symbiozy z korzeniami roślin motylkowatych, bytują w glebie jako saprofity, a liczebność ich populacji w środowisku glebowym zależy zarówno od czynników glebowo-klimatycznych jak i od zabiegów agrotechnicznych. Wyniki naszych najnowszych badań wskazują, że zasiedlenie gleb Polski przez poszczególne gatunki bakterii symbiotycznych jest bardzo zróżnicowane [Martyniuk i in. 2005]. Na przykład, symbionty koniczyny występują w naszych glebach powszechnie i na ogół w dużych liczebnościach, natomiast symbiontów lucerny nie wykryto lub ich populacje były bardzo niskie w większości (93%) spośród 80 badanych gleb, prawdopodobnie głównie dlatego, że lucerna jest od co najmniej

kilkunastu lat rzadko uprawiana przez rolników. Należy jednak dodać, że areal uprawy koniczyny jest obecnie również niewielki, pomimo to glebowe populacje bakterii symbiotycznych tej rośliny są wysokie. Świadczy to wyraźnie, że poszczególne gatunki rizobiów wykazują zróżnicowane przystosowanie do przeżywania w glebie bez rośliny-gospodarza. W przytoczonych badaniach stwierdzono także istotne zależności pomiędzy liczebnościami bakterii symbiotycznych a niektórymi właściwościami analizowanych gleb. Spośród badanych właściwości fizycznych i chemicznych gleb skład granulometryczny, a zwłaszcza zawartość części splawialnych, oraz odczyn gleb mają największy wpływ na liczebność glebowych populacji bakterii brodawkowych. Symbionty koniczyny i lucerny są na ogół liczniejsze w glebach o większej zawartości części splawialnych i odczynie obojętnym lub zbliżonym do obojętnego, natomiast takie gleby nie sprzyjają symbiontom łubinu [Martyniuk i in. 2005].

Odczyn środowiska glebowego ma również bardzo wyraźny wpływ na występowanie w glebach bakterii z rodzaju *Azotobacter*. Bakterie te na ogół nie występują w glebach o odczynie kwaśnym poniżej pH 6 [Martyniuk i Martyniuk 2002, Ziemięcka 1923].

W niniejszej pracy omówiono oddziaływanie niektórych zabiegów agrotechnicznych na występowanie i liczebności w glebie wybranych gatunków bakterii symbiotycznych roślin motylkowatych oraz bakterii z rodzaju *Azotobacter*, wykorzystując do tego celu wieloletnie doświadczenia poletkowe prowadzone w IUNG-PIB Puławy.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie I. Jest to wieloletnie, 3-czynnikowe doświadczenie statyczne założone w 1980 roku w RZD IUNG Grabów, na glebie kompleksu żytniego dobrego (piasek gliniasty, Albic Luvisols). Czynniki I: zmianowanie roślin; A (ziemniak – pszenica ozima – jęczmień jary – kukurydza), B (ziemniak – pszenica ozima + poplon – jęczmień jary z wsiewką – mieszanka koniczyny z trawami). Czynniki II: nawożenie obornikiem (dawki od 0 do 80 t·ha⁻¹) pod ziemniak i czynniki III: zróżnicowane nawożenie N (od 0 do 120 kg N·ha⁻¹). Dokładny opis omawianego doświadczenia podano w [Maćkowiak 2000].

W czerwcu 2000 i 2001 roku z wybranych obiektów tego doświadczenia pobrano próbki gleby z warstwy ornej (0-20 cm) i oznaczono w nich metodą biotestów najbardziej prawdopodobną liczebność (NPL) następujących gatunków bakterii symbiotycznych:

- 1 – *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus) – symbiont seradeli i łubinu,
- 2 – *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii* – symbiont koniczyny,
- 3 – *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* – symbiont grochu i bobiku,
- 4 – *Sinorhizobium meliloti* – symbiont lucerny.

W próbkach tych oznaczano również liczebność swobodnie żyjących w glebie asymilatorów N₂ z rodzaju *Azotobacter* metodą płytkową z selektywną (bez źródła azotu) pożywką agarową. Wymienione analizy wykonano wg metodyki podanej w [Martyniuk i in. 2005].

Doświadczenie II, założone w 1974 roku, składa się z obetonowanych poletek o pow. 0,8 m² wypełnionych naturalnymi profilami dwu gleb: piasku gliniastego lekkiego oraz gliny lekkiej, obsiewanych tylko roślinami zbożowymi, w rotacji: owies - pszenica ozima - żyto - jęczmień jary. Gleby w tym doświadczeniu nawożone były różnymi dawkami NPK + wapnowanie (co 4 lata) oraz NPK bez wapnowania. Analizy mikrobiologiczne próbek gleb pobranych z wybranych obiektów omawianego doświadczenia były takie same jak w pierwszym doświadczeniu.

NPL bakterii symbiotycznych odczytywano z tablic matematycznych [Vincent 1970], a liczebności bakterii z rodzaju *Azotobacter* analizowano metodą wariancji oceniając istotność różnic testem Tukeya.

WYNIKI I DYSKUSJA

Doświadczenie I. Pomiarzy odczynu gleby (pH w H₂O) wykazały wyraźne różnice pomiędzy wartościami tego parametru w obiektach zmianowania A i B (tab. 1). Odczyn gleby w badanych obiektach nawożeniowych zmianowania A był wyraźnie wyższy niż w takich samych obiektach nawożeniowych zmianowania B, prawdopodobnie dlatego, że w zmianowaniu B przerywane są duże ilości świeżej masy roślinnej z poplonu. To właśnie niższe pH gleby i produkty rozkładu masy roślinnej były prawdopodobnie główną przyczyną obniżenia liczebności bakterii *Azotobacter* w glebie zmianowania B do poziomu niewykrywalnego (tab. 1). Porównując liczebności tych bakterii w obiektach nawożeniowych zmianowania A można stwierdzić, że stosowanie obornika niweluje niekorzystnie wpływ NPK na rozwój w glebie bakterii z rodzaju *Azotobacter*. Ogólnie liczebności omawianych bakterii w glebie zmianowania A należy uznać za małe, ale były one podobne do populacji stwierdzanych w wielu glebach Polski [Martyniuk i Martyniuk 2002, Zawiślak 1963, Ziemięcka 1923].

Tabela 1. Liczebności badanych grup drobnoustrojów (jtk·g⁻¹ s.m. gleby) w glebie w zależności od nawożenia i zmianowania roślin (Doświadczenie I, średnia z lat 2000 i 2001)

Table 1. Numbers of the studied groups of microorganisms (cfu·g⁻¹ soil d.m.) in soil as influenced by fertilisation and crop rotation (Experiment I, mean for 2000 and 2001)

Nawożenie/zmianowanie <i>Fertilisation/rotation</i>	pH (H ₂ O)	<i>Azotobacter</i>	Bakterie brodawkowe <i>Root-nodule bacteria</i>			
			lucerny <i>alfalfa</i>	koniczyny <i>red clover</i>	serdela <i>seradella</i>	grochu <i>pea</i>
Bez nawożenia <i>No fertilization</i>						
A*	7,4	173 a	0	639 c	5	1600 a
B**	6,8	0	0	3330 a	10	1700 a
Nawożenie NPK <i>NPK treatment</i>						
A	7,2	51 c	0	1330 b	5	1700 a
B	6,7	0	0	3290 a	0	1700 a
NPK + obornik (40 t·ha ⁻¹) <i>NPK + manure (40 t·ha⁻¹)</i>						
A	7,0	131 b	0	3290 a	5	1700 a
B	6,6	0	0	3280 a	0	1600 a

*Zmianowanie A: ziemniak – pszenica ozima – jęczmień jary – kukurydza,

Crop rotation A: potato – winter wheat – spring barley – corn

** Zmianowanie B: ziemniak – pszenica ozima + poplon – jęczmień jary z wsiewką – mieszanka koniczyny z trawami, *Crop rotation B: potato – winter wheat + intercrop – spring barley (undersown) – grass-red clover mixture*

Spośród badanych gatunków bakterii brodawkowych tylko symbionty koniczyny i grochu stwierdzono we wszystkich analizowanych próbkach gleby w doświadczeniu I, natomiast symbiontów lucerny nie wykryto w żadnym obiekcie tego doświadczenia (tab. 1). Brak bakterii symbiotycznych lucerny w badanych glebach związany jest z tym, że w omawianym doświadczeniu lucerna nie była uprawiana od wielu lat, a bakterie symbiotyczne tej rośliny są bardzo wrażliwe na dłuższe przerwy w uprawie rośliny-gospodarza [Amarger 1980, Martyniuk in. 2005,

Nutman i Hyrner 1979]. Seradela również nie jest uprawiana w omawianym doświadczeniu i dlatego populacje bakterii symbiotycznych tej rośliny w analizowanych glebach były niewielkie (do 10 komórek w jednym gramie gleby) lub nie stwierdzano ich wcale.

Bakterie brodawkowe koniczyny stwierdzano w stosunkowo wysokich liczebnościach we wszystkich analizowanych próbkach gleby, także w zmianowaniu A, pomimo, że w tym zmianowaniu koniczyna, podobnie jak lucerna czy seradela, nie była uprawiana od co najmniej 20 lat. To samo można stwierdzić w przypadku symbiontów grochu (tab. 1). Wyniki te potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że niektóre gatunki rizobiów, a zwłaszcza te tworzące symbiozę z koniczyną oraz z grochem i bobikiem, dobrze przeżywają w glebach, nawet wtedy gdy przerwa w uprawie rośliny-gospodarza jest długa [Martyniuk in. 2005, Nutman i Hyrner 1979].

We wszystkich obiektach zmianowania B gleba zasiedlona była przez prawie takie same populacje rizobiów koniczyny, natomiast w glebie nienawożonej żadnymi nawozami w zmianowaniu A liczebności tych bakterii były dużo niższe niż w glebie obiektów nawożonych NPK i NPK z obornikiem (tab. 1). Wyniki te wskazują, że żyzność gleby jest również ważnym czynnikiem korzystnie oddziałującym na rozwój rizobiów w środowisku glebowym.

W oparciu o wybrane obiekty doświadczenia II analizowano wpływ wapnowania na zasiedlenie dwóch gleb, o różnym składzie mechanicznym, przez badane bakterie wiążące azot atmosferyczny (tab. 2). Bakterie z rodzaju *Azotobacter* wykryto tylko w glinie lekkiej wapnowanej (pH 7,1), natomiast podobnie jak w przypadku doświadczenia I, zasiedlenie gleb doświadczenia II przez bakterie symbiotyczne roślin motylkowatych (rizobia) było większe i bardziej zróżnicowane (tab. 2).

Tabela 2. Liczebności badanych grup drobnoustrojów ($\text{jtk} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. gleby) w dwóch glebach nawożonych NPK lub NPK+Ca (Doświadczenie II, średnie z lat 2000 i 2001)

Table 2. Numbers of the studied groups of microorganisms ($\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ soil d.m.) in two soils fertilised with NPK or NPK+Ca (Experiment II, mean for 2000 and 2001)

Gleba/nawożenie <i>Soil/fertilisation</i>	pH (H ₂ O)	<i>Azotobacter</i>	Bakterie brodawkowe <i>Root-nodule bacteria</i>			
			lucerny <i>alfalfa</i>	koniczyny <i>red clover</i>	serdeli <i>seradella</i>	grochu <i>pea</i>
Piasek gliniasty – NPK <i>Loamy sand – NPK</i>	6,2	0	0	6 d	0 c	0 d
Piasek glin. – NPK+Ca <i>Loamy sand – NPK+Ca</i>	6,8	0	0	176 b	6 b	170 b
Glina lekka – NPK <i>Light loam – NPK</i>	6,7	0	0	58 c	10 a	6 c
Glina lekka – NPK+Ca <i>Light loam – NPK+Ca</i>	7,1	12	0	1700 a	0 c	1700 a

Symbiontów lucerny nie wykryto w obydwu glebach, populacje symbiontów seradeli były niewielkie, a bakterie symbiotyczne koniczyny i grochu zasiedlały analizowane gleby w największych liczebnościach. Biorąc pod uwagę, że gleby w doświadczeniu II przez ponad 20 lat nie były obsiewane żadną z roślin motylkowatych, można stwierdzić, że symbionty koniczyny i grochu, w przeciwieństwie do symbiontów lucerny i seradeli, uzdolnione są do wieloletniego przeżywania w glebach bez rośliny-gospodarza. Pod tym względem wyniki uzyskane w obydwu doświadczeniach są zbieżne.

Na podstawie liczebności populacji bakterii brodawkowych koniczyny i grochu, można też sądzić, że rodzaj gleby oraz wapnowanie mają wpływ na przeżywanie badanych rizobiów w środowisku glebowym. Obie wymienione grupy symbiontów były liczniejsze w glinie lekkiej niż w piasku gliniastym lekkim, a wapnowanie tych gleb sprzyjało wyraźnie rozwojowi bakterii symbiotycznych koniczyny i grochu (tab. 2). Wyraźne związki pomiędzy liczebnościami bakterii brodawkowych a zwięzłością i odczynem gleb uprawnych stwierdzano we wcześniejszych badaniach [Amarger 1980, Martyniuk i in. 2005].

WNIOSKI

1. Bakterie symbiotyczne lucerny nie występowały w analizowanych glebach, a populacje symbiontów seradeli i łubinu były niskie lub nie stwierdzano ich wcale, prawdopodobnie dlatego, że w badanych doświadczeniach nie uprawiano roślin motylkowatych, z którymi bakterie te tworzą symbiozę.
2. Symbionty koniczyny czerwonej i grochu były stwierdzane w stosunkowo dużych liczebnościach, także w glebach nie obsiewanych koniczyną i grochem, co świadczy, że bakterie te mogą długo przeżywać w glebach bez rośliny-gospodarza.
3. Bakterie symbiotyczne koniczyny i grochu były liczniejsze w glinie lekkiej niż w piasku gliniastym lekkim, a wapnowanie obydwu gleb korzystnie oddziaływało na liczebność tych bakterii w omawianych glebach.

PIŚMIENNICTWO

1. Amarger, N. 1980. Aspect microbiologique de la culture des legumineuses. Le Selectionneur Francais 28: 61–66.
2. Król, M. 2006. *Azospirillum* – asocjacyjne bakterie wiążące wolny azot. Monogr. i Rozpr. Nauk. IUNG-PIB 15. ss. 163.
3. Mackowiak, Cz. 2000. Wpływ doboru roślin w zmianowaniu, obornika i nawozów mineralnych na zawartość węgla organicznego w glebie i produktywność zmianowań. Nawozy i Nawoż. 4: 102–109.
4. Martyniuk, S. 2002. Systemy biologicznego wiązania azotu. Nawozy i Nawoż. 1: 264–277.
5. Martyniuk, S., Martyniuk, M. 2002. Occurrence of *Azotobacter* spp. in some Polish soils. Pol. J. Envir. Stud. 12: 371–374.
6. Martyniuk, S., Oroń, J., Martyniuk, M. 2005. Diversity and numbers of root-nodule bacteria (rhizobia) in Polish soils. Acta Soc. Bot. Pol. 74: 83–86.
7. Nutman, P. S., Hearn, R. 1979. Persistence of nodule bacteria in soil under long term cereal cultivation. Rothamsted Raport 2: 77–90.
8. Peoples, M. B., Craswell, E. T. 1992. Biological nitrogen fixation: investments, expectations, and actual contributions to agriculture. Plant Soil 141: 13–40.
9. Sawicka, A. 1981. Ekologiczne problemy wiązania azotu atmosferycznego. W: „Mikrobiologiczne przemiany związków azotowych w glebie w różnych warunkach ekologicznych”, IUNG, Puławy: 25–44.
10. Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell, Oxford. ss. 164.
11. Zawislak, K. 1973. Występowanie azotobaktera w glebach na stokach w województwie olsztyńskim. Roczn. Glebozn. 24: 344–365.
12. Ziemięcka, J. 1923. Występowanie azotobaktera w glebach polskich. Roczn. Nauk Rol. 10: 1–78.

S. MARTYNIUK, J.OROŃ

**N₂ FIXING BACTERIA AS AN EXAMPLE OF SOIL MICROBIAL DIVERSITY
– EFFECTS OF SOME AGROTECHNICAL PRACTICES**

Summary

In soil samples collected from two long-term and complex plot experiments the occurrence and numbers of the following groups of bacteria fixing N₂ were studied: symbiotic root-nodule bacteria (rhizobia) of leguminous plants and free-living in soil bacteria from the genus *Azotobacter*, using biotests or plating method on N-free agar medium, respectively.

Root-nodule bacteria of alfalfa (*S. meliloti*) and seradella (*Bradyrhizobium* sp.) were absent or occurred in low numbers in the examined soils, mainly because of the lack of their host plants in the crop rotations studied in the plot experiments. On the other hand, symbionts of red clover and peas (*Rh. leguminosarum* bv. *trifolii* and bv. *viciae*, respectively) were found in relatively large numbers, even in soils with long breaks in cultivation of their host legumes, indicating that these symbiotic bacteria are able to survive in the soil for long time, even in the absence of their host plants. Rhizobia nodulating clover and peas were more numerous in the light loamy soil than in the loamy sand, and liming of both soils had a beneficial effect on populations of these bacteria. In the case of *Azotobacter* spp., soil acidity was also an important factor restricting the occurrence of these bacteria in soils.

Prof. dr hab. Stefan Martyniuk
Zakład Mikrobiologii Rolniczej
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, PIB
Czartoryskich 8, 24-100 Puławy
sm@iung.pulawy.pl