

Promowanie wzrostu roślin przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* oraz ich zastosowanie w rolnictwie

Anna Gałązka, Joanna Bigos, Sylwia Siebielec

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy,
Zakład Mikrobiologii Rolniczej ul. Czartoryskich 8; 24-100 Puławy, Polska

Abstrakt. *Azospirillum* to jeden z najlepiej scharakteryzowanych rodzajów w grupie bakterii wspierających wzrost i rozwój roślin. W opracowaniu omówiono aspekty istotne dla interakcji *Azospirillum* z roślinami: tworzenie asocjacji, wzajemne oddziaływanie między bakteriami i korzeniami, wiązanie azotu i syntezę fitohormonów. *Azospirillum* aktywnie kolonizują powierzchnię roślin. Asocjacja komórki *Azospirillum* do korzeni zachodzi w dwóch fazach. W pierwszym etapie, tzw. adsorpcji, jest indukowany przez glikoproteid flagellina, której obecność aktywuje drugi etap asocjacji. Bakterie z rodzaju *Azospirillum* zdolne są do wiązania azotu atmosferycznego. Geny strukturalne odpowiedzialne za wiązanie azotu (*nif*) są bardzo konserwatywne, podobne u wszystkich asymilatorów N_2 . Aktywator transkrypcji NifA jest potrzebny do ekspresji innych genów *nif* w odpowiedzi na dwa główne sygnały środowiskowe. Wiele genów bierze udział w procesie kolonizacji korzeni, wspieraniu rozwoju roślin i adaptacji do warunków w ryzosferze. Od dwóch dziesięcioleci *Azospirillum* pozostają w centrum uwagi naukowców, gdyż w odpowiednich warunkach mogą korzystnie oddziaływać na plonowanie wielu roślin uprawnych.

słowa kluczowe: *Azospirillum*; diazotrofy, hormony wzrostu roślin, interakcje roślina-korzeń, wiązanie azotu

WSTĘP

Do najbardziej znanych bakterii, żyjących w asocjacji z korzeniami wielu roślin, należą bakterie wiążące wolny azot z rodzaju *Azospirillum* (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). Po raz pierwszy zostały one opisane w 1925 r. przez Beijerinck jako *Spirillum lipoferum* (Döbereiner i in., 1976). Obecnie znanych jest 19 gatunków bakterii z ro-

dzaju *Azospirillum*. Bakterie te występują powszechnie w glebach i ryzosferze wielu roślin klimatu umiarkowanego, tropikalnego i zwrotnikowego (Król, 2006).

Azospirillum należą do drobnoustrojów ryzosferowych stymulujących wzrost roślin, tzw. PGPR (*plant growth-promoting rhizobacteria*) (Lucy i in., 2004). PGPR są to wolno żyjące bakterie glebowe, bytujące w strefie korzeniowej roślin lub jako endofity w powierzchniowych ich tkankach (Król, 2006). Wpływają pozytywnie na wegetację roślin poprzez stymulowanie ich wzrostu w dwojaki sposób: bezpośrednio i pośrednio (Bashan i in., 2004). Wspomaganie bezpośrednie polega między innymi na dostarczeniu roślinie składników mineralnych (azotu atmosferycznego, fosforu, żelaza), syntezie fitohormonów wpływających na rozwój roślin (auksyn, giberelin, cytokinin), obniżeniu poziomu etylenu niekorzystnie wpływającego na ukorzenianie roślin (Okon, Labandera-Gonzalez, 1994). Natomiast pośredni sposób stymulacji polega głównie na biologicznym zwalczaniu fitopatogenów (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). Od bardzo dawna łączono bezpośredni efekt oddziaływania mikroorganizmów ryzosferowych z promowaniem wzrostu roślin. Tien i in. (1979) jako pierwsi wskazali, że bakterie ryzosferowe należące do rodzaju *Azospirillum* mogły wspomagać wzrost roślin poprzez syntezę substancji biologicznie aktywnych. Mechanizm pobudzania wzrostu roślin przez PGPR mimo wielu lat badań wciąż nie jest w pełni poznany. Bakterie te posiadają wiele różnych cech odpowiedzialnych za działania stymulujące wzrost roślin (Bashan i in., 2004; Lucy i in., 2004). Na podstawie wieloletnich badań nad wykorzystaniem drobnoustrojów do promowania wzrostu i rozwoju roślin dużą rolę w tym procesie możemy przypisać bakteriom z rodzaju *Azospirillum* (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). Badania prowadzone w tym kierunku dotyczyły:

- identyfikacji substancji promujących wzrost roślin,
- potwierdzenia pozytywnego wpływu tych substancji na zmianę fizjologicznych i morfologicznych cech rośliny,

Autor do kontaktu:

Anna Gałązka
e-mail: agalazka@iung.pulawy.pl
tel. tel +48 81 4786 950

Praca wpłynęła do redakcji 14 grudnia 2015 r.

- identyfikacji genów odpowiedzialnych za syntezę substancji promujących wzrost roślin i ich regulację na poziomie genu,
- wpływu szczepienia roślin bakteriami *Azospirillum* na wzrost i plonowanie oraz kolonizację w ryzosferze z uwzględnieniem różnych warunków doświadczalnych,
- mutacji szczepów o polepszonych zdolnościach produkcji substancji wspomagających wzrost roślin.

Bakterie *Azospirillum*, żyjąc w asocjacji z korzeniami wielu roślin, przyczyniają się do poprawy kondycji roślin i wzrostu plonów, a fizjologia tych bakterii jest wciąż przedmiotem wielu badań (Okon, Kapulnik, 1986; Okon i in., 1995; Król, 2006). W niniejszej publikacji podsumowana zostanie dotychczasowa wiedza na temat fizjologii bakterii z rodzaju *Azospirillum*, ich asocjacji z rośliną oraz praktycznego zastosowania w rolnictwie.

ASOCJACJA *AZOSPIRILLUM*

Istotną rolę w zwiększeniu efektywności produkcji roślinnej, jak i możliwości zasiedlania i przetrwania roślin w środowiskach naturalnych odgrywają mikroorganizmy, które wchodzą w różnego rodzaju symbiotyczne interakcje z roślinami. Specyficznym rodzajem symbiozy pomiędzy drobnoustrojami a roślinami jest endosymbioza (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). Endosymbioza występuje wówczas, gdy komórki jednego organizmu żyją we wnętrzu komórek lub tkanek innego organizmu. Bakterie takie jak *Azospirillum*, zdolne do asocjacji z korzeniami roślin i zamieszkujące wnętrza komórek roślinnych nazywamy endofitami (*endophyte* z greckiego „wewnątrz rośliny”). Prawdopodobnie każda roślina jest gospodarzem dla jednego lub kilku gatunków bakterii nawet należących do jednego rodzaju (Król, 2006).

Drobnoustroje wchodzą w asocjacje z roślinami za pomocą różnorodnych mechanizmów. Jedne wynikają z bezpośrednich oddziaływań między mikroorganizmami a tkankami roślin, natomiast inne mają znaczenie pośrednie i są wywoływane modyfikacjami środowiska glebowego. Można sądzić, iż gleba jest głównym źródłem bakterii endofitycznych – organizmów, „które przez dłuższy lub krótszy okres swojego życia kolonizują bezobjawowo żywe tkanki wewnętrzne swojego gospodarza” (Klama, 2004). Baldani i in. (1997) zasugerowali podział tych drobnoustrojów na następujące kategorie:

- organizmy ryzosferowe, zasiedlające część ryzosferową gleby;
- fakultatywne endofity zawierające grupę mikroorganizmów dobrze rozwijających się w glebie, ponadto zdolnych do kolonizacji zewnętrznej powierzchni korzeni, jak również wewnętrznych tkanek,
- obligatoryjne endofity trudniej przeżywające w glebie bez obecności rośliny, występujące we wnętrzu korzeni oraz na nadziemnych częściach roślin.

Zjawisko powstawania układów symbiotycznych pomiędzy bakteriami z rodzaju *Azospirillum* a rośliną zostało

odkryte przez Döbereiner (1983). W przypadku *Azospirillum* nie stwierdzono jednak ścisłej specyficzności, a jedynie powinowactwo szczepów do ich gospodarzy (Król, 2006). Bakterie z rodzaju *Azospirillum*, a wśród nich gatunki *A. lipoferum* oraz *A. brasilense* należą do najbardziej poznanych z tego grona asymilatorów N₂. Odnaczają się one przede wszystkim dużą specyfiką kolonizacji w korzeniach roślin, i tak *A. lipoferum* – asocjuje głównie z roślinami C4 np. kukurydza, natomiast *A. brasilense* – asocjuje tworzy głównie z roślinami trawiastymi C3 (Döbereiner, 1983; Król, Perzyński, 2001).

Intensywność interakcji pomiędzy bakterią a rośliną jest zależna od fazy wzrostu rośliny. W badaniach Król (2006) najwyższą zawartość nitrogenazy stwierdzono w późniejszych fazach wzrostu rośliny, przed kwitnieniem i w stadium kłoszenia. *Azospirillum* spp., bytujące w asocjacji z korzeniami roślin, największą aktywność wykazują po wnikięciu komórek bakterii do głębszych warstw korzeniowych. Środowisko to w odniesieniu do gleby skutecznie zabezpiecza bakterie przed panującymi niedogodnymi warunkami, takimi jak susza, niska temperatura, co sprawia, iż *Azospirillum* z pozytywnym rezultatem może konkurować z innymi bakteriami o źródła węgla i energii (Patriquin, 1982; Venkateswarlu, Sethunathan, 1984).

Bashan i Holguin (1997) oraz Bashan i in. (2004) prowadzili badania nad kolonizacją korzeni 64 gatunków różnych roślin przez bakterie *A. brasilense*. Otrzymane wyniki informują o niespecyficzności badanej bakterii w odniesieniu do roślin. Przeprowadzona analiza dotycząca rozmieszczenia *Azospirillum* w korzeniach roślin dowodzi, iż bakterie te przywierają do ziarnistości na włóśnikach korzeniowych, przenikają do wnętrza, a następnie umieszczają się w przestrzeniach międzykomórkowych wzdłuż kory. Komórki bakterii z rodzaju *Azospirillum* wnikały do korzeni trzciny cukrowej przez nowo pojawiające się korzenie boczne (Bellone, de Bellone Silvia, 2012).

Do głównych dróg kolonizacji rośliny przez bakterie endofityczne należą m.in.: naturalne otwory (pory i hydatomy), mikropory, rany czy uszkodzenia, w tym uszkodzenia mechaniczne. Przypuszczać można, że najistotniejszą drogą przenikania są rany i mikropory pojawiające się już w pierwszym stadium rozwoju korzenia (Klama, 2004).

W roślinach jednoliściennych o dobrze rozwiniętym systemie korzeniowym, jak np. kukurydza, *Azospirillum* występuje głównie na powierzchni korzenia lub w wewnętrznej jego części (Hartmann, Baldani, 2006). Zakażenie wnętrza korzenia zachodzi dopiero w momencie:

- braku odpowiednich warunków do asocjacji na powierzchni korzenia (brak substancji odżywczych, fitohormonów, niskie pH),
- w przypadku zbyt gęstej kolonizacji bakteryjnej na powierzchni tkanki (komórki nie mogą przedostać się do wewnętrznych tkanek rośliny),
- uszkodzenia komórek peryferyjnych korzenia (lepszy dostęp bakterii do wnętrza tkanki).

Początkowo komórki bakterii gromadzą się na powierzchniowych warstwach tkanki korzenia, a w miarę namnożenia komórek bakterie mogą przenikać do wnętrza tkanki rośliny. Zakażenie występuje początkowo w tkankach korzeniowych i rozprzestrzenia się do głównych korzeni (Schemat 1) (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000).

Modelowa asocjacja bakterii z rodzaju *Azospirillum* z rośliną przebiega dwuetapowo. Pierwszy etap procesu kolonizacji rozpoczyna się od rozpoznania specyficznych wydzielin korzeniowych rośliny przez bakterie. W wyniku rozpoznania specyficznych związków organicznych w wydzielinach (chemotakcja), np. określonych kwasów fenolowych lub aminokwasów, drobnoustroje migrują w kierunku ich źródła (Hartmann, Baldani, 2006). Atraktantami dla bakterii z rodzaju *Azospirillum* jest szereg związków organicznych (metabolitów korzeniowych) tj.: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, bursztyniany, jabłczany, glicyna, galaktoza i arabinoza w optymalnej koncentracji 10^{-3} M na 1 ml hodowli (Król, 2006). Substraty metabolizowane przez *Azospirillum* spp., takie jak D-fruktoza i L-arabinoza, nie przyciągają ani *A. lipoferum* ER 15, ani *A. brasilense* JM 6A2. Dla gatunku *A. brasilense* najlepszymi chemotaktycznymi związkami są cukry: arabinoza, fukoza i galaktoza. Bakterie z rodzaju *Azospirillum* (np. *A. lipoferum* Sp 59b, *A. brasilense* Sp 7 i Sp CD) są również przyciągane chemotaktycznie przez związki aromatyczne, takie jak benzoesany i hydroksybenzoesany w optymalnej koncentracji 10^{-6} – 10^{-11} M na 1 ml hodowli (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000).

W dodatku przyciąganie chemotaktyczne *Azospirillum* spp. przez różne organiczne związki preferuje migrację komórek w kierunku stref o niskiej rozpuszczalności tlenu (Król, 2006). W konsekwencji, bakterie tworzą błonkę w półpłynnej bezazotowej pożywce w pewnej odległości od powierzchni (Döbereiner, 1983; Döbereiner i in., 1976). Ta mikroaerofilność w pożywkach bezazotowych jest standardową procedurą w izolacji *Azospirillum* spp. i innych bakterii diazotroficznych.

Wiadomo, że w obecności *Azospirillum* następuje indukcja hydrolizy fitohormonów i flawonoidów roślinnych (np. przez β -glukozydazy) w tkance korzenia, wskutek czego powstają aktywne związki biorące bezpośredni udział w asocjacji komórek bakteryjnych (Aßmus i in., 1997). Taka stymulacja wzrostu komórek bakteryjnych daje im możliwość intensywnego rozwoju na powierzchni korzenia oraz zapewnia *Azospirillum* znaczne poszerzenie strefy kolonizacji m.in. o ryzosferę roślin (Dobbelaere i in., 2001). Bakterie przedostają się do wnętrza korzenia m.in. poprzez uszkodzenie włosników korzeniowych (złuszczenie nabłonka) i liżę komórek roślinnych. Przy niedostatecznych warunkach do rozwoju bakterii w glebie oraz na powierzchni komórek roślinnych *Azospirillum* intensywnie przenikają do wnętrza tkanki, gdzie zachodzi logarytmiczny ich wzrost (Patriguin, 1982). Kolejnym etapem kolonizacji jest adhezja do powierzchni korzenia,

a następnie intensywne podziały, które skutkują powstaniem mikrokolonii (Aßmus i in., 1997). Wstępny etap adhezji to słabe, odwracalne oddziaływania międzycząsteczkowe, np. typu oddziaływań van der Waalsa. Po nich następuje kolejna, nieodwracalna faza spowodowana wiązaniem się za pośrednictwem fimbrii lub flagelli. Do kontaktu pomiędzy bakterią a powierzchnią korzenia może również dochodzić przy udziale zewnątrzkomórkowych białek bądź polimerów otoczkowych biorących udział w formowaniu kolonii (Aßmus i in., 1995). Potencjał adhezyjny drobnoustrojów uzależniony jest od fazy wzrostu i stopnia odżywienia komórek. *Azospirillum* spp. żyjące w asocjacji z korzeniami wielu roślin wykazuje największą aktywność kilka godzin po wnikięciu komórek bakterii do głębszych warstw korzenia (Vande Broek i in., 1993). W przypadku kolonizacji korzenia pszenicy przez bakterie *A. brasilense* Sp7 w warunkach doświadczalnych wykazano, iż adsorpcja komórek bakteryjnych na powierzchni korzenia osiąga maksymalny poziom po 2 godzinach inkubacji. Przy czym adsorpcja ta uzależniona była od bakteryjnych białek powierzchniowych. Drugi etap kolonizacji, czyli zakotwiczenie komórek zaabsorbowanych na powierzchni rozpoczynał się dopiero po 8 godzinach inkubacji, a maksimum osiągał po 16 godzinach inkubacji (Van de Broek i in., 1993). Oba etapy są od siebie niezależne, gdyż mutanty izolatów *A. brasilense* Sp7 pozbawione zdolności do adsorpcji nadal wykazywały zdolność do zakotwiczenia na powierzchni. Etap zakotwiczenia uzależniony jest natomiast od syntezy bakteryjnych zewnątrzkomórkowych polisacharydów (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000).

Środowisko wewnątrz korzenia w porównaniu z glebą dobrze chroni bakterie, a *Azospirillum* może z powodzeniem konkurować z innymi bakteriami o źródło energii i węgla (Bashan i in., 2004; Król, 2006). Stwierdzono także, że genotyp rośliny wpływa zasadniczo na stopień asocjacji rośliny z bakteriami (Bashan, Holguin, 1997).

Powyższe obserwacje kolonizacji korzeni roślin przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* były możliwe przy zastosowaniu m.in. niespecyficznych technik barwienia, specyficznych sond fluorescencyjnych i konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej (James, 2000) oraz swoistych przeciwciał monoklonalnych (Schloter, Hartmann, 1998) lub fuzji genów *nifH* (Van de Broek, Vanderleyden, 1995). W przypadku modelowego badania wpływu szczepu *A. brasilense* Sp245 na asocjację korzeni pszenicy dużą liczebność tych bakterii stwierdzono w głównych systemach korzeniowych, natomiast znacznie mniej komórek potwierdzono w korzeniach bocznych i włosnikach korzeniowych rośliny (Aßmus i in., 1995). Zaobserwowano ponadto, że mikrokolonie tych bakterii powstają w przestrzeni międzykomórkowej tkanek korzenia pszenicy (Schloter, Hartmann, 1998).

Asocjacje bakterii z rodzaju *Azospirillum* z roślinami wspomagają również rozwój roślin i samych bakterii w warunkach stresu chemicznego. Badania Swędryńskiej

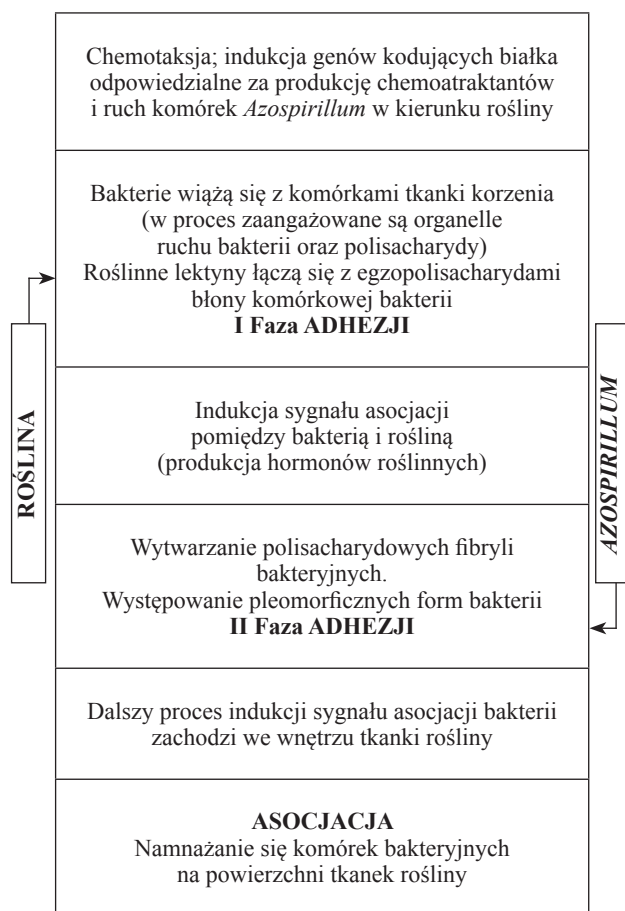
i Sawickiej (2010) na temat wpływu miedzi na bakterie z rodzaju *Azospirillum* występujące w ryzosferze siewek kukurydzy i pszenicy wykazały, iż miedź we wszystkich z zastosowanych stężeniach w pożywce okazała się bardzo toksyczna zarówno dla roślin, jak i drobnoustrojów. Natomiast inokulacja bakteriami z rodzaju *Azospirillum* siewek pszenicy oraz siewek kukurydzy miała korzystny wpływ na wzrost i rozwój roślin, w porównaniu do roślin nieszczepionych, a także w sposób nieznaczny niwelowała toksyczne oddziaływanie miedzi dla mikroorganizmów.

Pozytywnie zachodzące procesy asocjacji bakterii z korzeniami roślin wymagają również pominięcia szeregu czynników stresowych (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). Bakterie glebowe i kolonizujące ryzosferę, tj. *Azospirillum* spp., są poddawane różnorodnym czynnikom stresowym. Jednym z nich jest roztwór wodny. W słonej glebie komórki bakteryjne muszą pokonać wysoki potencjał osmotyczny, natomiast w suchej glebie niski potencjał ogranicza ich aktywność i żywotność. Dlatego podłoża piaskowe lub gleba o małej zawartości substancji organicznej nie są wskazane dla dobrej kolonizacji korzeni przez bakterie ryzosferowe z rodzaju *Azospirillum*. Jak donoszą Bashan

i Holguin (1997), bakterie wytwarzają w tym środowisku siatkę mostków białkowych pomiędzy swoimi komórkami a cząsteczkami kwarcu. Aby pokonać te bariery i skolonizować korzenie roślin komórki *Azospirillum* muszą użyć dużo energii na poruszanie się poprzez cząstki piasku czy gleby.

Z zasolonego środowiska glebowego można wyizolować bakterie tolerujące wysoki potencjał osmotyczny (Hartmann, Baldani, 2006). Podobnie jak inne mikroorganizmy, *Azospirillum* spp. akumulują organiczne związki, które nie ograniczają ich aktywności komórkowej, a pomagają w środowisku wodnego stresu, takie jak trehaloza, glicyna, betaina, glutaminiany i prolina (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). Odporne na zwiększenie potencjału osmotycznego są szczepy bakterii z gatunków: *A. amazonense*, *A. brasilense*, *A. lipoferum* i *A. halopraeferens*, szczególnie osmotolerancją odznaczają się szczepy z gatunku *A. irakense*, natomiast niektóre szczepy *A. brasilense* i *A. halopraeferens* mogą różnie reagować. U bakterii *A. halopraeferens* i *A. brasilense* glicyna i betaina stymulowały wzrost i wiązanie azotu w warunkach stresu spowodowanego zasoleniem środowiska. Osmotolerancyjne szczepy *Azospirillum* spp. nie używają lub używają w małym tylko stopniu jako źródła azotu i węgla: cholicy, glicyny, betainy, glutaminianów, proliny i innych aminokwasów (Khammas i in., 1989).

Schemat 1. Model interakcji pomiędzy bakteriami z rodzaju *Azospirillum* i rośliną (Hartmann, Baldani, 2006, zmodyfikowano)



WYTWARZANIE SUBSTANCJI PROMUJĄCYCH WZROST ROŚLIN

Synteza fitohormonów u bakterii z rodzaju *Azospirillum* jest niezbędna do wytwarzania trwałych asocjacji z korzeniami roślin. Hormony roślinne powodują podział i różnicowanie komórek w merystematycznej tkance korzenia, wskutek czego następuje wydłużanie się korzenia, produkowanie większej liczby włośników i rozgałęzianie się korzeni. Niewykluczone też, że na skutek kolonizacji korzeni przez bakterie i wytwarzania fitohormonów, sama roślina zostaje pobudzona do wydzielania substancji stymulujących wzrost (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000).

Po raz pierwszy w 1979 roku stwierdzono u *A. brasilense* wytwarzanie auksyn oraz substancji podobnych do cytokinin i giberelin (Tien i in., 1979). Obserwowano zwiększenie liczby włośników korzeniowych i korzeni bocznych po zaszczepieniu roślin mieszaną kwasu indolo-3-octowego, kinetyną i kwasem giberelinowym GA3, otrzymaną z tych bakterii.

Bakterie z rodzaju *Azospirillum* zaliczane są do grupy PGPR (Cassán i in., 2011), której przypisuje się stymulację wzrostu roślin poprzez dostarczanie składników mineralnych, syntezę fitohormonów oraz obniżanie poziomu etylenu (Khammas i in., 1989). Jak sugerują wyniki badań, wiązanie azotu atmosferycznego prowadzone przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* wykazuje mniejsze znaczenie dla rozwoju roślin niż spodziewano się pierwotnie (Bashan

Zestawienie 1. Fitohormony oraz ich funkcje w organizmie roślinnym (Cacciari i in., 1989, Cassán i in., 2011).

Hormon roślinny	Funkcje
Auksyny	Regulacja wzrostu komórek roślin, ukorzeniania i ruchów roślin, dojrzewania owoców, starzenia się roślin
Cytokininy	Regulacja podziałów i różnicowania komórek roślinnych, regulacja wzrostu, spoczynku, transportu asymilatów i starzenia się
Gibereliny	Regulacja wzrostu i spoczynku roślin, kiełkowania nasion, kwitnienia i zawiązywania owoców
Etylen	Podobnie jak w przypadku auksyn, aczkolwiek efekt działania jest inny, często przeciwny. Bierze również udział w reakcji roślin na stresy
Kwas abscysynowy	Regulacja pąkowania roślin, spoczynku nasion, dojrzewania owoców. Odpowiedź roślin na stresy abiotyczne

i in., 2004). Głównym mechanizmem przyczyniającym się do promowania wzrostu roślin może okazać się zdolność *Azospirillum* do produkcji bądź metabolizowania fitohormonów (zestawienie 1). Pierwsze doniesienia mówiące o produkcji hormonów roślinnych takich jak auksyny (głównie IAA), cytokininy i gibereliny przez *Azospirillum* pochodzą z prac Tien i in. (1979). W kolejnych publikacjach można znaleźć informacje mówiące o produkcji przez te bakterie również etylenu (Strzelczyk i in., 1994a) oraz kwasu abscysynowego (Perrig i in., 2007).

Wśród substancji auksynopodobnych będących produktem metabolizmu czystej kultury *Azospirillum*, oprócz głównego kwasu indolilo-3-octowego (IAA – ang. *indole-3-acetic acid*), wyróżnia się: kwas indolilo-3-masłowy (IBA – ang. *indole-3-butyric acid*), indolilo-3-acetaldehyd (Costacurta i in., 1994), kwas indolilo-3-mlekowy (ILA – ang. *indole-3-lactic acid*), indolilo-3-etanol, indolilo-3-metanol (Crozier i in., 1988), indolilo-3-acetamid (IAM – ang. *indole-3-acetamide*), tryptaminę oraz antranilan (Hartmann i in., 1983).

W komórkach *Azospirillum* zidentyfikowano kilka szlaków syntezy IAA. Głównym jej prekursorem jest tryptofan (Trp). Jego dodatek do hodowli bakteryjnej skutkuje wyższym poziomem produkcji IAA (Hartmann i in., 1983), natomiast biosynteza tego związku pod nieobecność Trp znana jest u roślin, ale nie została zaobserwowana w przypadku bakterii (Wright i in., 1991). Odnosnie tych ostatnich opisano wiele szlaków syntezy IAA. Dotychczas u *Azospirillum* wykryto trzy spośród nich: szlak kwasu indolilo-3-pirogronowego (IPyA – *the indole-3-pyruvic acid pathway*), szlak indolilo-3-acetamidu (IAM – *the indole-3-acetamide pathway*), szlak trypraminowy (TAM – *the*

tryptamine pathway) (Costacurta, Vanderleyden, 1995). Próby wyizolowania mutantu *Azospirillum* kompletnie niezdolnego do syntezy IAA nie zostały zakończone powodzeniem (Zimmer, Elmerich, 1991).

U *A. brasilense* zidentyfikowano gen *ipdC*, kodujący dekarboksylazę indolilo-3-pirogronianu, odpowiedzialną za szlak IPyA (Costacurta i in., 1994). Podobną sekwencję wykryto u *A. lipoferum* i *A. halopraeferens*, natomiast nie wykryto takowej w przypadku *A. irakense*. Knockout *ipdC* w genomie *A. brasilense* powodował syntezę IAA na poziomie 10% w porównaniu do szczepu dzikiego, co nasuwa wniosek, iż dekarboksylaza indolilo-3-pirogronianu jest kluczowym enzymem na szlaku biosyntezy IAA u tych bakterii (Prinsen i in., 1993). Niższy stopień produkcji IAA wykazują również szczepy bakterii z mutacją w *rpoN* (Dobbelaere i in., 2001). Produkcja auksyn przez *Azospirillum* podlega ścisłej regulacji w zależności od warunków środowiska zewnętrznego (Costacurta, Vanderleyden, 1995). Jednym z czynników mających wpływ na poziom ekspresji genu *ipdC* jest obecność samego IAA, a także syntetycznych auksyn (np. kwasu 1-naftalenoocetowego, kwasu 2,4-dichlorofenoksypropionowego) (Vande Broek i in., 1995). Jak już wspomniano, IAA uwalniane jest przez komórki *Azospirillum* jedynie w obecności tryptofanu. Pod jego nieobecność, geny syntezy Trp ulegają transkrypcji i translacji. Wzrasta wtedy poziom antranilanu, który powoduje inhibicję syntezy IAA i chroni komórkę bakteryjną przed utratą tryptofanu. W przypadku dostępu do zewnętrznego źródła Trp, jego synteza w komórce zostaje zahamowana, przez co zewnątrzkomórkowe stężenie antranilanu jest niskie, w związku z czym możliwa jest produkcja IAA (Zimmer, Elmerich, 1991).

W płynnej hodowli *A. brasilense* notowano nagłe podwyższenie koncentracji IAA wraz z początkiem stacjonarnej fazy wzrostu. Można podejrzewać, że wysoki poziom produkcji IAA w takim wieku hodowli związany jest z ogólnymi zmianami w metabolizmie komórki bakterii, w odpowiedzi na wyczerpanie źródeł węgla (Omay i in., 1993). Produkcja IAA w środkowej fazie stacjonarnej pochodzi prawdopodobnie z uwalniania tryptofanu z martwych komórek, co stymuluje jego produkcję w jeszcze żywych bakteriach. W późniejszej fazie stacjonarnej stężenie IAA maleje, co wskazuje na to, że komórki mogą wykorzystywać ten związek, kiedy zaczyna brakować składników odżywczych (Zimmer, Bothe, 1989).

Obecność IAA ma wpływ na poziom wzrostu *Azospirillum*. Zależy on zarówno od stężenia tego związku, jak i od rodzaju źródła węgla. Według Strzelczyk i in. (1994a, 1994b), w pożywce z dodatkiem jabłczanu stężenie IAA nie ma wpływu na gęstość optyczną hodowli bakterii, natomiast stymulacja ich wzrostu poprzez IAA następuje w podłożu zawierającym bursztynian i jest ona proporcjonalna do stężenia tego związku (Strzelczyk i in., 1994a).

Korzenie kukurydzy zaszczone inokulum *Azospirillum* charakteryzowały się wyższym stężeniem wolnego

i związanego IAA oraz IBA w porównaniu do roślin kontrolnych (Fallik i in., 1989). Nie jest jednak do końca wyjaśnione, czy wyższy poziom tego fitohormonu w tkankach roślin powodowany jest pobieraniem przez nie substancji wydzielanych przez komórki *Azospirillum*, czy też na przykład poprzez zmiany gospodarki hormonalnej roślin pod wpływem interakcji z bakteriami (Hartmann, Baldani, 2006).

Wyniki wielu badań wskazują na zaangażowanie auksyn produkowanych przez *Azospirillum* w zmiany morfologii korzeni roślin. Skutek ich działania zależy głównie od stężenia, w jakim zostaną zaaplikowane. Wiadomo, że wzrost korzenia stymulowany jest przez stosunkowo niskie stężenia IAA, ok. 10^{-9} – 10^{-12} M na 1 ml hodowli komórek (Kalitkiewicz, Kępczyńska, 2008). Obecność auksyn w wyższym stężeniu pobudza formowanie korzeni bocznych i przybyszowych, natomiast hamuje rozwój korzenia głównego, co związane jest z indukcją biosyntezy etylenu, będącego inhibitorem wzrostu roślin (Król, 2006).

Inokulacja siewek pszenicy *A. brasilense* SpM7918, produkującym bardzo małe ilości IAA wykazała, że bakterie te mają obniżoną zdolność do promowania rozwoju systemu korzeniowego i wspierania zdolności roślin do pobierania związków mineralnych w porównaniu do szczepu dzikiego (Barbieri, Galli, 1993). Podobnie, inokulacja pszenicy szczepem *Azospirillum* ze zmodyfikowanym szlakiem IPyA (inaktywacja genu *ipdC*) wykazała znacznie mniejszy wpływ tych bakterii na rozwój korzeni. Nie powodowały one skrócenia korzeni, a także prawie nie wpływały na formowanie włośników. Natomiast szczep Sp245, posiadający dodatkową kopię genu *ipdC*, co dawało nadzieję na wywołanie wzmocnionego wpływu na morfologię korzeni pszenicy, nie wykazał takowego, co można wytłumaczyć na dwa sposoby: a) wzrost produkcji IAA spowodowany obecnością dodatkowej sekwencji genu *ipdC* jest zbyt niski, by wywołać zauważalne efekty; b) nie dochodzi do ekspresji dodatkowego genu, będącego pod kontrolą własnego promotora (Dobbelaere i in., 1999). Bottini i in. (1989) zidentyfikowali gibereliny A_1 , A_3 oraz izo- A_3 w czystej kulturze *A. lipoferum*. Stężenie GA_1 oraz GA_3 wahało się na poziomie 20–40 pg·cm⁻³ hodowli zawierającej 10^9 komórek, natomiast zawartość izo- GA_3 była dużo wyższa. Nie ma pewności, czy związek ten pochodzi z komórek bakteryjnych, czy też powstaje z GA_3 jako artefakt podczas procesu ekstrakcji i oczyszczania. Jak podają Piccoli i Bottini (1994), produkcja GA_3 w fazie stacjonarnej czystej kultury *A. lipoferum* wydaje się być skorelowana z żywotnością hodowli i wydzielaniem polisacharydów. Sprzyja temu specyficzna koncentracja azotu oraz początkowe pH hodowli (Piccoli, Bottini, 1994).

Badania nad wpływem GA_3 na wzrost *Azospirillum* wskazują, że podobnie jak w przypadku auksyn, zależy on od rodzaju źródła węgla. W podłożu z dodatkiem jabłczanu, giberelina A_3 nieznacznie wpływała na wzrost bakterii, podczas gdy obecność bursztynianu lub fumaranu

w podłożu potęgowała efekt działania GA_3 (Strzelczyk i in., 1994b).

Stosowanie oczyszczonej gibereliny A_3 powoduje podobny efekt jak inokulacja *A. lipoferum* na zagęszczenie włośników korzeniowych, natomiast ta ostatnia przyczynia się do wzrostu stężenia giberelin w siewkach roślin (Fulchieri i in., 1993). Jak podają Tien i in. (1979), gibereliny wydzielane przez *Azospirillum* powodują wzrost produkcji korzeni bocznych roślin. Produkcja większej ilości giberelin i IAA w starszej hodowli nasuwa wniosek, że może być to sytuacja podobna do interakcji *Azospirillum* z roślinami w ryzosferze, gdzie bakterie rzadko występują w logarytmicznej fazie wzrostu, a wpływają na rozwój (Bashan, Holguin, 1997). Badania prowadzone z wykorzystaniem mutantów roślin niezdolnych do syntezy giberelin wykazały, iż GA_3 obecna była w tkankach roślin w przypadku, kiedy zostały one zaszczerpione *Azospirillum*, natomiast nie występowała w zmutowanych roślinach kontrolnych (Hartmann, Baldani, 2006).

Cytokiny (podobnie jak auksyny) produkowane przez mikroorganizmy mogą uzupełniać syntezę tych substancji przez rośliny i promować ich wzrost lub wykazywać fitotoksyczność (Cassán i in., 2011). Produkcja cytokinin przez *Azospirillum* była szeroko badana w przypadku *A. brasilense*.

Jeśli chodzi o wpływ cytokinin na komórki *Azospirillum*, to badania z użyciem różnych stężeń kinetyn jako dodatku do hodowli na pożywkach zawierających odmienne źródła węgla wykazały, że mają one znaczny dodatni wpływ na wzrost bakterii na podłożu z dodatkiem jabłczanu, jednak wysokie stężenie kinetyn powoduje inhibicję wzrostu hodowli (Strzelczyk i in., 1994a).

Jak donoszą Strzelczyk i in. (1994b), produkcja cytokinin przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* zależna jest od rodzaju dostępnego źródła węgla. Szczepy wykorzystane przez autorów (wyizolowane z *Rhizopogon vinicolor* i *Hebelomacrus tuliniforme*) produkowały cytokiny na podłożu z dodatkiem jabłczanu lub fumaranu, natomiast nie wykazywały takiej zdolności w przypadku hodowli na podłożu zawierającym bursztynian bądź pirogronian. Badania nad produkcją cytokinin przez *A. brasilense* i *A. lipoferum* wykazały, że substancje te nie są wydzielane w logarytmicznej fazie i wczesnej stacjonarnej fazie wzrostu. W późnej fazie stacjonarnej lub kiedy hodowla zamiera, bakterie mogą produkować cytokiny jako produkt degradacji DNA lub RNA (Zimmer, Bothe, 1989).

Cytokiny syntetyzowane przez bakterie oddziałują na rośliny, stymulując formowanie włośników oraz redukując produkcję korzeni bocznych i wydłużanie korzenia głównego (Król, 2006).

W literaturze niewiele jest informacji dotyczących produkcji etylenu przez *Azospirillum* i jego działania na rozwój roślin. Strzelczyk i in. (1994b) badali produkcję etylenu przez bakterie tego rodzaju na podłożach zawierających różne źródła węgla, co pozwoliło im stwierdzić, iż

Azospirillum mają zdolność do produkcji etylenu i że jest ona zależna od obecności w pożywce α -metioniny. Według autorów wszystkie badane szczepy produkowały ten związek w obecności metioniny oraz jabłczanu, bursztynianu i pirogronianu, natomiast tylko jeden szczep zidentyfikowano jako zdolny do wydzielania etylenu w podłożu zawierającym metioninę i fumaran. Wszystkie badane szczepy produkowały etylen również wykorzystując jako źródło węgla pirogronian, pod nieobecność metioniny, jednak jego stężenie było niższe w porównaniu do tego, jakie stwierdzono w podłożu z metioniną.

Według innych autorów produkcja etylenu przez mikroorganizmy zależy od wieku hodowli, składu podłoża hodowlanego oraz od obecności bądź braku dostępu tlenu, jak również od temperatury, pH i potencjału redox (Thomas, Spencer, 1978). Niektóre bakterie wykorzystują etylen jako źródło węgla, a to sugeruje, iż mogą one odgrywać istotną rolę w usuwaniu tego związku z atmosfery gleby, co sprzyja wzrostowi roślin.

Badania nad wpływem inokulum *A. brasilense* (FT326) na siewki pomidorów wykazały korelację pomiędzy produkcją etylenu a wzrostem długości i liczby korzeni (Cassán i in., 2011).

Pierwsze doniesienia o produkcji ABA przez *Azospirillum* pochodzą z prac Kolb i Martina (2006), którzy wykryli ten związek w hodowli *A. brasilense* Ft326. Jednak dotychczas niewiele jest dostępnych publikacji na temat produkcji tego hormonu przez bakterie, a jeszcze mniej z nich mówi o jego oddziaływaniu na rozwój roślin. W 2008 roku Cohen i in. opisali zwiększoną zawartość kwasu abscysynowego wydzielanego do podłoża przez *A. brasilense* Sp245 w przypadku obecności w nim NaCl (100 mM) jako czynnika stresowego, w porównaniu do hodowli bez dodatku soli (Cohen i in., 2008).

Tlenek azotu (NO) odgrywa główną rolę na drodze transdukcji sygnału produkcji auksyn i jego udział prowadzi do formowania korzeni bocznych, gdzie NO działa jako pośrednik w rozwoju korzeni indukowanym przez auksyny (Correa-Aragunde i in., 2006).

Tlenek azotu wydzielany jest w środkowej i późnej fazie logarytmicznego wzrostu, natomiast w przypadku zaszczepienia korzeni pomidora zawieszoną bakterijną szczepu Sp245 obserwowano indukcję ich zmian morfologicznych, bez względu na zdolność bakterii do produkcji IAA, co sugeruje NO-zależną promocję rozgałęziania korzenia pomidora (Cassán i in., 2011).

Rośliny zaszczepione bakteriami z rodzaju *Azospirillum* wykazują większe rozgałęzienie korzeni, a tym samym charakteryzują się zwiększoną ich powierzchnią, co z kolei tłumaczy wzmożone pobieranie związków mineralnych i wody (Okon, Labandera-Gonzalez, 1994). Według Dobbelaere i in. (1999, 2001) inokulacja ziaren pszenicy *A. brasilense* Sp245 oraz Sp7 w koncentracjach od 10^6 do 10^9 jtk·cm⁻³ miała wyraźny wpływ na rozwój i morfologię korzeni, powodując ich skrócenie i wzmożone wytwarzanie włóśników. Stężenie bakterii na poziomie

$5 \cdot 10^8$ i 10^9 jtk·cm⁻³ wykazuje silną inhibicję wzrostu korzenia, natomiast przy zastosowaniu niższej koncentracji bakterii (10^6 jtk·cm⁻³) również nie obserwowano jego wydłużania, co sugeruje, iż taka liczba bakterii jest wciąż zbyt wysoka do indukcji wydłużania korzenia.

Nie jest jasne, czy wyższe stężenie fitohormonów w roślinach zaszczepionych *Azospirillum* związane jest z pobieraniem substancji wydzielanych przez bakterie. Być może jest ono związane ze wzmożoną produkcją tych substancji przez tkanki roślinne w odpowiedzi na kolonizację korzeni przez mikroorganizmy, co może być wywołane przez związki obecne na powierzchni komórki bakteryjnej bądź przez enzymy syntetyzowane i wydzielane przez *Azospirillum* (Okon, Kapulnik, 1986; Król, 2006).

Z pewnością natomiast można stwierdzić, że obecność bakterii z rodzaju *Azospirillum* w ryzosferze korzeni roślin ma silny wpływ na ich morfologię. Wpływ oczyszczonych fitohormonów oraz inokulum *A. brasilense* na wzrost rozplenicy perłowej badano w pracy Tien i in. (1979). Przy zastosowaniu stężenia fitohormonów: IAA – $0,005 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, GA3 – $0,05 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, kinetyny – $0,001 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ oraz zaszczepienia roślin zawieszoną bakterii *A. brasilense* najwyższy plon suchej masy korzeni i części nadziemnych uzyskano w przypadku zastosowanego zaszczepienia bakteriami (Masciarelli i in., 2013).

W środowisku tlenowym w ryzosferze dostępność żelaza jest ograniczona przez skrajnie niską rozpuszczalność kompleksów żelaza [K_D : 10^{-38}], jak również przez dużą konkurencję wśród mikroorganizmów, a także zależy od ilości koloidów hydrofobowych w glebie (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). Najniższe stężenie żelaza, które pokrywa zapotrzebowanie bakterii Gram-ujemnych, wynosi $3 \cdot 10^{-7}$ M na 1 ml hodowli komórek. Tak więc środowisko ryzosferowe nie zapewnia odpowiedniego stężenia wolnych jonów żelaza, które podtrzymywałyby wzrost bakterii.

Wśród bakterii spotykamy dwa systemy asymilacji żelaza. Pierwszy z nich to system niskiego powinowactwa oparty na swobodnej dyfuzji, który jest czynny przy stężeniach żelaza rzędu $10 \mu\text{M}$ na 1 ml hodowli komórek i wyższych. Drugi to system wysokiego powinowactwa do żelaza, działający w warunkach niedoboru tego pierwiastka, składający się z dwóch elementów – sideroforu i systemu aktywnego transportu (Król, Perzyński, 2001).

Większość sideroforów należy do dwóch znanych grup chemicznych: pochodnych kwasów hydroksamowych tworzących klasę sideroforów hydroksamowych i pochodnych fenolu tworzących klasę sideroforów fenolanowo-katecholowych. Znane są również siderofory tzw. klasy mieszanej, które są ligandami hybrydowymi zawierającymi jednocześnie ugrupowania hydroksamowe i katecholowe. W literaturze są jedynie nieliczne prace dotyczące informacji o wytwarzaniu sideroforów przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* (Król, 2006).

Bakterie te syntetyzują siderofory, które są głównie związkami hydroksamowymi lub fenolowymi i mają duże

powinowactwo do Fe^{3+} . W procesie wiązania azotu cząsteczkowego Fe i Mo są głównie potrzebne do budowy i funkcjonowania nitrogenazy. W większości przypadków u *A. lipoferum* siderofory były identyfikowane jako pochodne kwasu dihydroksybenzoesowego (DHBA) – 2,3-DHBA i 3,5-DHBA (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). U *A. brasilense* RG, kwas 2,3-dihydroksybenzoesowy związany z ornityną i seryną tworzy związek zwany spirillobaktyną. Spirillobaktyny pośredniczą nie tylko w systemie transportu żelaza u mikroorganizmów, ale również biorą udział w procesach dysocjacji membranowej Fe^{3+} w komórkach roślin.

WIĄZANIE AZOTU ATMOSFERYCZNEGO

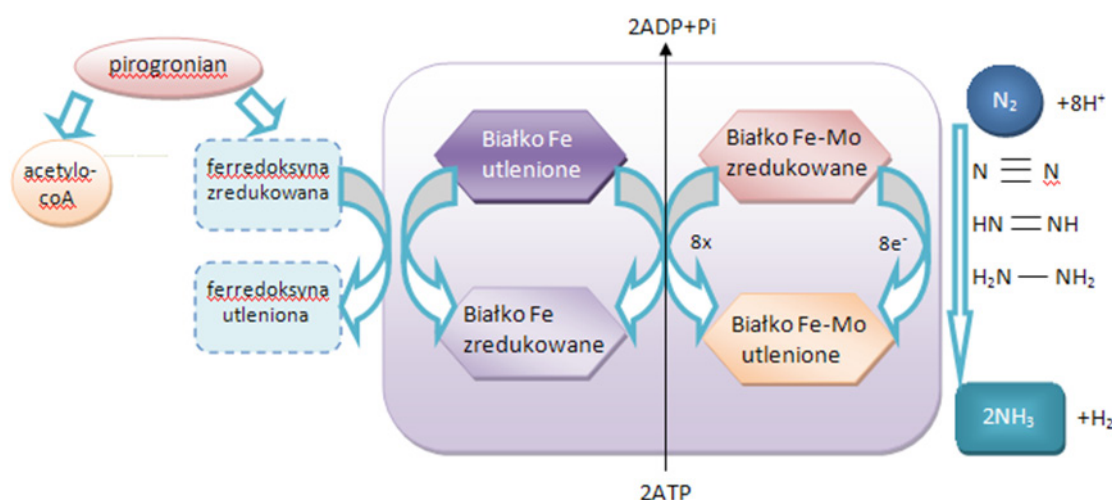
Istotną właściwością bakterii z rodzaju *Azospirillum*, żyjących w asocjacji z korzeniami roślin, jest zdolność do wiązania azotu atmosferycznego (N_2). Pomimo tego, że *Azospirillum*, podobnie jak inne wolno żyjące asymilatory azotu, nie wydzielają związanego pierwiastka na zewnątrz komórki, to wykazują pozytywny wpływ na zawartość związków azotowych w roślinach niezdolnych do pobierania azotu w formie cząsteczkowej, ze względu na jego niską reaktywność. Prawdopodobnie dzieje się tak na skutek uwalniania azotu po rozpadzie komórki bakteryjnej (James, 2000).

Produkcja syntetycznych nawozów azotowych dla roślin, z wykorzystaniem wolnego azotu, wymaga wysokich nakładów energii, ma szkodliwy wpływ na środowisko naturalne, natomiast rośliny wykorzystują jedynie ok. 50% N_2 zawartego w nawozach mineralnych, podczas gdy azot wiązany biologicznie pobierany jest przez nie w 100%, a ze względu na produkcję przez bakterie skutecznych katalizatorów, reakcja przebiega w naturalnych warunkach

temperatury i ciśnienia (Król, 2006). Dlatego też proces biologicznego wiązania azotu atmosferycznego (w wyniku którego wiązane zostaje ok. 172 mln ton azotu rocznie) ma ogromne znaczenie ekologiczne i ekonomiczne (Ishizuka, 1992).

Proces biologicznego wiązania azotu katalizowany jest przez enzymatyczny kompleks nitrogenazy, złożony z dwóch metaloprotein: a) reduktazy dinitrogenazy (białko żelazowe, białko Fe, składnik II, azoferredoksyna), której rolą jest przeniesienie elektronów ze zredukowanej cząsteczki bezpośredniego ich donora – ferredoksyny (białko Fe – S), na drugie białko kompleksu; b) dinitrogenazę (białko żelazo-molibdenowe, białko Fe-Mo, składnik I, molibdoferredoksyna), która wykorzystuje te elektrony do procesu redukcji azotu cząsteczkowego do amoniaku (rys. 1) (Rees, Howard, 2000; Baj, 2007; Zhou i in., 2013).

Silna stabilność potrójnego wiązania w cząsteczce N_2 sprawia, iż reakcja jej redukcji jest wysoce endoergiczna – wymaga co najmniej 16 cząsteczek ATP w przeliczeniu na jedną cząsteczkę azotu. Osłabienie potrójnego wiązania jest wynikiem reakcji pomiędzy cząsteczką azotu a atomami żelaza koenzymu Fe-Mo (składnik białka Fe-Mo), będącego miejscem wiązania N_2 , co ułatwia redukcję tej cząsteczki. Natomiast źródłem ATP niezbędnego do reakcji wiązania azotu atmosferycznego jest cykl Krebsa, w wyniku którego elektrony przekazywane są na ferredoksynę (Baj, 2007). Wodór, będący dodatkowym produktem procesu redukcji N_2 , służy jako donor w łańcuchu oddychowym (Berlier, Lespinat, 1980; Pedrosa i in., 1982). Ze względu na wysokie koszty energetyczne w wyniku reakcji redukcji azotu cząsteczkowego przez bakterie maleje wydajność ich wzrostu, natomiast w sytuacji, kiedy w środowisku dostępne jest inne źródło tego pierwiastka (amoniak, glutaminian), proces asymilacji N_2 zostaje zahamowany



Rys. 1. Mechanizm wiązania azotu cząsteczkowego z udziałem nitrogenazy (Rees, Howard, 2000, Baj, 2007, zmodyfikowano)
Fig. 1. The mechanism of molecular nitrogen fixation involving nitrogenase.

Zestawienie 2. Przykładowe wartości aktywności nitrogenazy charakterystyczne dla danych gatunków *Azospirillum* sp. (Rees, Howard, 2000; Baj, 2007)

Gatunek	Aktywność nitrogenazy	Podłoże hodowlane
<i>Azospirillum brasilense</i>	39,2 nM C ₂ H ₄ h ⁻¹ mg ⁻¹ białka	Nfb
<i>Azospirillum lipoferum</i>	67,6 nM C ₂ H ₄ h ⁻¹ mg ⁻¹ białka	Nfb
<i>Azospirillum amazonense</i>	36 nM C ₂ H ₄ h ⁻¹ mg ⁻¹	zawierające jabłczan
<i>Azospirillum largomobile</i>	brak dostępnych danych	-
<i>Azospirillum halopraeferens</i>	50 nM C ₂ H ₄ h ⁻¹ na 10 ³ komórek	SM
<i>Azospirillum irakense</i>	259,2 nM C ₂ H ₄ h ⁻¹ cm ⁻³ fazy gazowej	zawierające glukozę
<i>Azospirillum doebereineriae</i>	100 nM C ₂ H ₄ h ⁻¹ na 10 ⁸ komórek	Nfb
<i>Azospirillum oryzae</i>	brak dostępnych danych	-
<i>Azospirillum melinis</i>	90 nM C ₂ H ₄ h ⁻¹ na 10 ⁸ komórek	Nfb
<i>Azospirillum canadense</i>	brak dostępnych danych	-
<i>Azospirillum zeae</i>	5,9 – 6,6 C ₂ H ₄ h ⁻¹ mg ⁻¹ białka	M
<i>Azospirillum rugosum</i>	brak dostępnych danych	-
<i>Azospirillum picis</i>	93 C ₂ H ₄ h ⁻¹ na 10 ⁸ komórek	Nfb
<i>Azospirillum thiophilum</i>	1000 – 2000 nM h ⁻¹ mg ⁻¹ białka	zawierające bursztynian
<i>Azospirillum formosense</i>	brak dostępnych danych	-
<i>Azospirillum fermentarium</i>	10,6 nM C ₂ H ₄ h ⁻¹	brak dostępnych danych
<i>Azospirillum humicireducens</i>	brak dostępnych danych	-

(Gallori, Bazzicalupo, 1985; Hartmann, Kleiner, 1982; Dixon, 1998). Pomiaru aktywności nitrogenazy dokonuje się poprzez detekcję ilości etylenu powstałego w wyniku redukcji acetyleny przez komórki bakteryjne (Król, 2006). Przykładowe wartości aktywności enzymu (w przypadku hodowli czystej kultury) charakterystyczne dla danych gatunków *Azospirillum* sp. przedstawiono w zestawieniu 2.

Poziom wiązania N₂ przez bakterie *Azospirillum* w czystej kulturze nie pokrywa się z poziomem aktywności enzymu tego samego szczepu w asocjacji z korzeniami roślin. Przykładowo, średni poziom aktywności nitrogenazy jednego ze szczepów *A. lipoferum* hodowanego na w pożywce Nfb wynosił 67,6 nM C₂H₄·h⁻¹·mg⁻¹ białka, natomiast w asocjacji z korzeniami pszenicy osiągała ona średnią wartość 4,3 nM C₂H₄·mg⁻¹ suchej masy korzeni na dobę. Wyższa aktywność nitrogenazy w czystej kulturze *Azospirillum* w porównaniu do tej występującej w zależności asocjacyjnej nie jest regułą (Han, New, 1998).

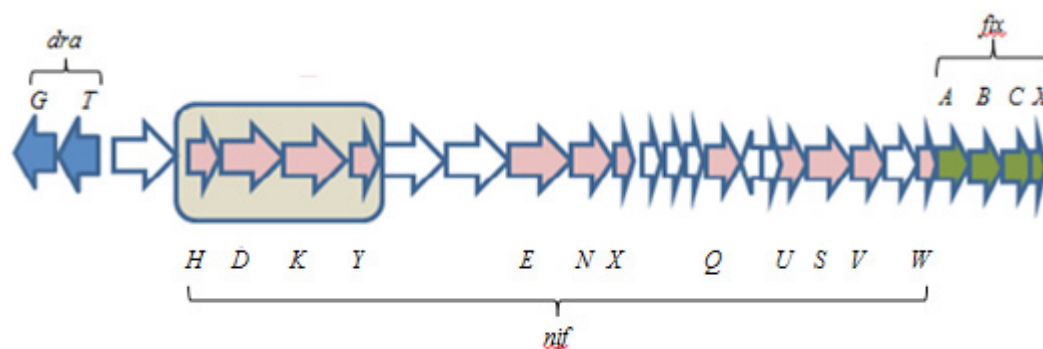
Proces biologicznego wiązania azotu atmosferycznego podlega ścisłej regulacji, która jest odpowiedzią na stężenie tlenu oraz dostępne źródła azotu w środowisku. Antropomorfizując można stwierdzić, że bakterie chętniej wybierają inne źródła azotu niż N₂ ze względu na wysoki koszt energetyczny asymilacji azotu w tej postaci. Jak podają Ruppel i Merbach (1995), dodanie do hodowli *Azospirillum* sp. glutaminy w stężeniu 0,2–0,3 mM powoduje częściową inhibicję aktywności nitrogenazy, natomiast aplikacja 1 mM tego związku skutkuje całkowitą inaktywacją enzymu, podobnie jak dodanie 1 mM KNO₃. W przypadku *A. brasilense* i *A. lipoferum* dodanie do podłoża NH₄Cl w stężeniu 1 mM powoduje zupełną i permanentną inhibicję nitrogenazy, natomiast *A. amazonense* wykazuje zdolność do wiązania azotu cząsteczkowego nawet przy

koncentracji chlorku amonu wynoszącej 10 mM na 1 ml hodowli komórek o stężeniu 10⁸ jtk (Hartmann i in., 1985).

Natomiast obecność tlenu jest szkodliwa dla reduktazy dinitrogenazy. Szczególna wrażliwość tego białka prowadzi do nieodwracalnej inaktywacji jego funkcji enzymatycznych w wyniku utlenienia żelaza i usunięcia go w postaci tlenku żelazowego (Król, 2006). *Azospirillum brasilense* i *Azospirillum lipoferum* mogą wiązać azot cząsteczkowy tylko przy bardzo niskiej koncentracji tlenu, w zakresie 0,001–0,005 atm. Koncentracja tego pierwiastka na poziomie 0,02 atm powoduje całkowitą inaktywację enzymu w przypadku wymienionych gatunków *Azospirillum*, co związane jest z kowalencyjną modyfikacją reduktazy nitrogenazy, natomiast wyłączenie działania nitrogenazy u *A. amazonense* wymaga wyższego stężenia O₂ (Hartmann, Burris, 1987; Hartmann i in., 1985, 1986).

Koncentracja tlenu oraz dostępność źródeł azotu stanowią główne czynniki oddziałujące na nitrogenazę. Dodatkowo jej aktywność regulują: pH (Tchan, Zeman, 1995), dostępne źródła węgla i temperatura (Haahtela i in., 1983). Aktywność nitrogenazy w zależności od dostępnego źródła węgla i początkowego ciśnienia cząsteczkowego tlenu na przykładzie *Azospirillum lipoferum* wyizolowanego z *Festuca rubra* przedstawiono w pracy Haahtela i in. (1983). Istotnie wyższą aktywność nitrogenazy uzyskano w obecności arabinazy, fruktozy, galaktozy i glukozy jako źródeł węgla.

Za proces wiązania azotu atmosferycznego, który najlepiej poznany został u *A. brasilense*, odpowiedzialne są geny *nif* (*nitrogen fixation*), zebrane na odcinku chromosomu liczącym 30 kb, z wyłączeniem genów *nifA* i *nifB*, znajdujących się w innym miejscu genomu *Azospirillum* (Liang i in., 1991). Białka strukturalne nitrogenazy kodo-



Rys. 2. Geny odpowiedzialne za wiązanie azotu atmosferycznego u *Azospirillum brasilense* (Sant'Anna i in., 2011, zmodyfikowano)
Fig. 2. The genes responsible for nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*.

wane są przez geny zebrane w operonie *nifHDKY* (rys. 2) (Sant'Anna i in., 2011). Dodatkowo w genomie *Azospirillum* sp. kodowanych jest szereg białek funkcjonalnych biorących udział w asymilacji azotu cząsteczkowego (zestawienie 3).

Regulacja procesu asymilacji N_2 może odbywać się na poziomie transkrypcji, jak również w warunkach posttranslacyjnych (Steenhoudt, Vanderleyden, 2000).

Aktywacja ekspresji genów *nif* wymaga obecności aktywatora transkrypcji – białka NifA, oraz alternatywnego czynnika σ^{54} polimerazy RNA, kodowanego przez gen *ntrA/rpoN* (Passaglia i in., 1998). Białko NifA należy do rodziny białek EBP (białka aktywatorowe zależne od σ^{54}), których budowę cechuje obecność trzech domen: a) C – końcowej domeny wiążącej, zawierającej motyw „helisa – zwrot – helisa”; b) N – końcowej części regulatorowej zawierającej domenę GAF; c) centralnej, konserwatywnej domeny katalitycznej (AAA^+) reagującej z σ^{54} (Arsene i in., 1996, 1999; Dixon, Kahn, 2004).

W genomie *A. brasilense* zidentyfikowano gen *amtB*, kodujący białko transmembranowe, uczestniczące w ak-

tywnym transporcie jonów amonowych. Za jego regulację odpowiada system białek NtrB – NtrC (Van Dommelen i in., 1998). W obecności amoniaku N – końcowa domena NifA zaangażowana jest w proces negatywnej autoregulacji białka. Do inhibicji aktywności białka NifA przyczynia się również wspólnie z nim transkrybowane białko NifL. Reagując z domeną GAF powoduje ono inaktywację ATPazy domeny AAA^+ w sytuacji obecności innych źródeł azotu niż N_2 (Martinez-Argudo i in., 2004). W regulacji procesu wiązania N_2 bierze również udział białko P_{II} (produkt genu *glnB*), które prawdopodobnie uczestniczy w przekazywaniu informacji o dostępności azotu w komórce do białka NifA, tym samym wpływa na jego aktywność (de Zamaroczy i in., 1993; de Zamaroczy, 1998).

W wyniku kontroli ekspresji genów odpowiedzialnych za wiązanie azotu atmosferycznego sekwencje kodujące białka strukturalne NifHDK ulegają transkrypcji jedynie w warunkach mikroaerofilnych, kiedy źródło azotu jest ograniczone.

Dodatkowym poziomem regulacji wiązania azotu cząsteczkowego m.in. u *A. brasilense* jest posttranslacyjna kontrola aktywności nitrogenazy. W warunkach środowiska niekompatybilnych do asymilacji N_2 podjednostka reduktazy dinitrogenazy ulega odwracalnej inaktywacji poprzez rybozylację ADP (Dixon, Kahn 2004). Mechanizm ten został opisany również u *A. lipoferum*, natomiast nie zidentyfikowano go w przypadku *A. amazonense* (Fu, Burris, 1989). W proces ten zaangażowane są produkty dwóch genów – *draT* oraz *draG* (Zhang i in., 1992). Białko DraT pełni rolę ADP – rybozylotransferazy reduktazy dinitrogenazy, natomiast DraG jest glikohydrolazą aktywującą reduktazę dinitrogenazy. W obecności amoniaku DraT katalizuje transfer ADP-rybozy z NAD^+ na Arg101 jednej z podjednostek białka Fe. Kowalencyjnie zmodyfikowana nitrogenaza staje się nieaktywna. W sytuacji, kiedy stężenie amoniaku jest niskie, inaktywacja enzymu zostaje zniesiona poprzez aktywność DraG (Zhang i in., 1993, 1996).

Zestawienie 3. Geny *Azospirillum* sp. zaangażowane w proces wiązania azotu cząsteczkowego (na podstawie Król, 2006)

Gen	Funkcja
<i>nifH</i>	Strukturalny gen nitrogenazy (białko Fe)
<i>nifD</i>	Strukturalny gen nitrogenazy (Fe-Mo)
<i>nifK</i>	Strukturalny gen nitrogenazy (Fe-Mo)
<i>nifA</i>	Aktywator transkrypcji genów <i>nif</i>
<i>glnB</i>	Białko transdukcyjne P_{II}
<i>glnZ</i>	Homolog białka P_{II}
<i>ntrB</i>	Regulacja aktywności nitrogenazy
<i>ntrC</i>	Regulacja aktywności nitrogenazy
<i>ntrA/rpoN</i>	Alternatywny czynnik σ^{54}
<i>draT</i>	ADP-rybozylotransferaza reduktazy dinitrogenazy
<i>draG</i>	Glikohydrolaza aktywująca reduktazę dinitrogenazy

SZCZEPIENIE ROŚLIN BAKTERIAMI Z RODZAJU *AZOSPIRILLUM*, ZASTOSOWANIE W ROLNICTWIE

Interakcje *Azospirillum* z korzeniami roślin są zjawiskiem powszechnie występującym w przyrodzie (Conn i in., 1997; Steenhoudt, Vanderleyden, 2000). Zrozumienie mechanizmów działania systemów wspomagających wzrost roślin ma kluczowe znaczenie w produkcji roślin uprawianych rolniczo. Stąd też tego typu badania powinny koncentrować się zarówno wokół badań opisujących nowe gatunki *Azospirillum* izolowane z różnych geograficznie miejsc oraz ocenie ich właściwości i bioróżnorodności gatunkowej, jaki i jednocześnie potwierdzeniu interakcji bakterii z rośliną i promowaniu wzrostu, ochrony i rozwoju roślin (Eckert i in., 2001; Lavrinenko i in., 2010).

Efekt szczepienia roślin bakteriami z rodzaju *Azospirillum* w dużej mierze jest uzależniony od zdolności przeżycia tych drobnoustrojów w glebie. 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 (Król, 2006). Próby szczepienia roślin uprawnych bakteriami z rodzaju *Azospirillum* podjęto w połowie lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia (Fallik i in., 1989). Zastosowanie bakterii z rodzaju *Azospirillum* w rolnictwie przy wykazaniu pozytywnego wpływu szczepienia na wzrost i plonowanie roślin potwierdzono w wielu doświadczeniach (Bashan i in., 2004; Gałązka i in., 2012; Gałązka, Gałązka 2015). Szczepieniom poddawane były nasiona i siewki takich roślin jak: kukurydza, pszenica, jęczmień, żyto, sorgo, trawa, proso oraz inne rośliny zarówno w warunkach doświadczeń polowych, jak i wazonowych. Badaniom podlegały przede wszystkim korzenie roślin, analizowano pobieranie takich składników odżywczych jak azot, fosfor czy potas, a ponadto zawartość suchej masy, aktywność nitrogenazy, zawartość azotu zarówno w roślinach, jak i nasionach, plony roślin oraz porę kwitnienia. Użytkiwano znaczący wzrost plonów części vegetatywnych (o 15–42%) i ziarna (o 10–35%), lepszy rozwój i rozgałęzienie systemu korzeniowego (Bashan i in., 2004). W literaturze najczęściej przedstawiana jest metoda inokulacji polegająca na aplikacji *Azospirillum* bezpośrednio do gleby lub nasion w formie płynnej zawiesiny oraz aplikacji z zastosowaniem różnych organicznych nośników, najczęściej torfu (Okon, Labandera-Gonzalez, 1994). Również szczepienie łączne grzybami mikoryzowymi VAM – *Glomus fasciculatum*, czy też bakteriami z rodzaju *Rhizobium* (Klama i in., 2010) podnosiło poziom Fe i Zn, rośliny były zdolne do uzupełniania N i P (Król, Perzyński, 2001). Wydaje się, że do osiągnięcia powodzenia w szczepieniach roślin bakteriami z rodzaju *Azospirillum* konieczne jest spełnienie kilku warunków:

- przede wszystkim wyselekcjonowanie odpowiednich szczepów będących w przewadze w stosunku do wszystkich innych obecnych w danej glebie;

- szczepy powinny być wyizolowane z tego samego gatunku roślin;
- do osiągnięcia właściwego efektu szczepienia niezbędna jest obecność w glebie azotu związanego, którą można zapewnić przez zastosowanie niewielkiej dawki nawozu azotowego ($60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, czyli $40 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$).

Badania naukowe prowadzone nad oddziaływaniem omawianych bakterii na wzrost i plonowanie traw oraz zbóż w różnych strefach klimatycznych nie wykazywały jednoznacznie pozytywnych rezultatów. Najwyższe przyrosty plonów roślin szczepionych *Azospirillum* uzyskano w krajach o ciepłym i gorącym klimacie, gdzie naturalne asocjacje pomiędzy *Azospirillum* i korzeniami roślin (kukurydza, sorgo, trzcina cukrowa) są zjawiskiem często występującym (Kennedy, Tchan, 1992). Natomiast populacje drobnoustrojów asocjacyjnych występujące w regionach strefy klimatu umiarkowanego, w tym także w glebach Polski są znacznie mniejsze (Król, 2006).

Badania Rekosz-Burlagi i Waszewskiej (2010) dotyczyły wpływu różnorodności gatunkowej traw i dżdżownic *Aporrectodea caliginosa* na liczebność *Azospirillum* spp. w glebie. Obiektem badań było doświadczenie wazonowe, w którym uprawę stanowiły kostrzewa czerwona oraz mieszanka traw. Połowa wazonów dodatkowo została wzbogacona w dżdżownicę *Aporrectodea caliginosa*. Różnorodność gatunkowa traw, a także pojawienie się populacji dżdżownic w glebie wpływała istotnie na liczebność *Azospirillum* tylko w jednym terminie (lipiec) spośród przeprowadzonej serii oznaczeń. Znaczna część wyizolowanych szczepów bakteryjnych pochodziła spod uprawy kostrzewy czerwonej, w której dominował gatunek *Azospirillum brasilense*. Autorzy stwierdzili także, iż bakterie z rodzaju *Azospirillum* były obecne w glebie (część pozaryzosferowa), na której prowadzono uprawę kostrzewy czerwonej, a także wielogatunkową uprawę traw przez cały okres sezonu wegetacyjnego. Nie zauważyli oni natomiast korelacji pomiędzy liczbą *Azospirillum* w glebie a różnorodnością traw i występowaniem dżdżownic.

Badania Dobbelaere i in. (2001) polegały na inokulacji gleb pól uprawnych w Belgii i Meksyku szczepem bakterii *Azospirillum brasilense*. Uzyskali wzrost plonów (o 26%) takich roślin jak jęczmień, pszenica czy sorgo. Zastosowanie bakterii stymulujących wzrost roślin w przypadku kukurydzy przyczyniło się do osiągnięcia znacznego przyrostu liczby korzeni bocznych i ich długości, a także suchej masy korzenia. Inne badania potwierdzały także istotny wzrost plonów części vegetatywnych roślin oraz ziarna (odpowiednio o 18–39% i 5–30%) po zastosowaniu szczepienia bakteriami z rodzaju *Azospirillum*, a także znaczący wpływ na rozgałęzienie i rozwój systemu korzeniowego roślin. Z badań Klamy i in. (2010) wynika, iż bakterie *Azospirillum* i *Herbaspirillum* posiadają zdolność do kolonizacji korzeni roślin pszenicy zwyczajnej. Najbardziej efektywny sposób zasiedlania miał miejsce w wyniku łącznego szczepienia korzeni bakteriami *Azospirillum* i *Rhizobium*. Potwierdzeniem synergistycznego korzyst-

nego oddziaływania analizowanych szczepów *Rhizobium* z *Herbaspirillum* i *Azospirillum* na kondycję roślin była największa w końcowym etapie rozwoju siewek zawartość chlorofilu w blaszkach liściowych pszenicy. Według Król (2006) wdrożenie metod szczepienia roślin bakteriami z rodzaju *Azospirillum* może okazać się kluczowym elementem praktycznego zwiększania plonów upraw rolnych.

Obecnie bakterie z rodzaju *Azospirillum* mają również zastosowanie w kontroli biologicznej występowania patogenów roślin. Dla przykładu *Azospirillum brasilense* stymulowało systemiczną odporność truskawki na antraknozę (Tortora, Diaz-Ricci, 2012; Truba i in., 2012). Ponadto, jak wykazały najnowsze badania, inokulacja siewek zbóż *Azospirillum* spp. zwiększała odporność roślin na zasolenie i suszę (Arzanesh i in., 2011; Zawoznik i in., 2011).

PODSUMOWANIE

Ścisłe asocjacje bakterii endofitycznych z roślinami są powszechnie znanym zjawiskiem objawiającym się obustronnymi korzyściami. Na sukces tego zjawiska składa się szereg czynników zarówno biotycznych, jak i abiotycznych środowiska, w którym przebiega symbioza. Skuteczna kolonizacja roślin przez bakterie endofityczne ma wpływ przede wszystkim na rozwój roślin i ich wzrost. Na coraz większą uwagę zasługują próby zastosowania w rolnictwie szczepionek z udziałem bakterii endofitycznych mających zdolność wiązania azotu atmosferycznego, czego skutkiem może być zmniejszenie ilości nawozów syntetycznych.

Obecnie podstawowym wyzwaniem pozostaje opracowanie skutecznych i powtarzalnych metod szczepień umożliwiających ich praktyczne wdrożenie, opartych na wykorzystaniu aktualnej wiedzy mikrobiologicznej i rolniczej oraz udokumentowanych wiarygodnymi badaniami naukowymi. Szczepienie roślin bakteriami z rodzaju *Azospirillum* może okazać się w przyszłości jeszcze jednym sposobem praktycznego zwiększania plonów upraw rolnych niezależnie od tego, czy korzystny wpływ takich zabiegów dotyczy wiązania azotu atmosferycznego, produkcji fitohormonów czy też innych, nie odkrytych do tej pory, skutków oddziaływania tych bakterii na rośliny. Mankamentem biopreparatów oferowanych obecnie jako między innymi szczepionki z bakterii *Azospirillum* jest niedostatek ich naukowo potwierdzonej skuteczności oraz przypisywanie im nadmiernych i nieuzasadnionych efektów, przez co szersze stosowanie biopreparatów budzi kontrowersje i często sprzeciw środowiska naukowego.

PIŚMIENNICTWO

- Arsene F., Kaminski P.A., Elmerich C., 1999. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by PII: effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. FEMS Microbiology Letters, 179: 339-343.
- Arsene F., Kaminski P.A., Elmerich C., 1996. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. Journal of Bacteriology, 178: 4830-4838.
- Arzanesh M.H., Alikhani H.A., Khavazi K., Rahimian H.A., Miransari M., 2011. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27: 197-205.
- Aßmus, B., Schloter M., Kirchhof G., Hutzler P., Hartmann A., 1997. Improved *in situ* tracking of rhizosphere bacteria using dual straining with fluorescent-labeled antibodies and rRNA-targeted oligonucleotides. Microbial Ecology, 33: 32-40.
- Aßmus B., Hutzler P., Kirchhof G., Amann R., Lawrence J. R., Hartmann A., 1995. *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. Applied and Environmental Microbiology, 61: 1013-1019.
- Baj J., 2007. Metabolizm. ss. 139-143. W: Biologia molekularna bakterii, red. Baj J., Markiewicz Z., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Baldani J.I., Caruso L., Baldani V.L.D., Goi S.R., Döbereiner J., 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. Soil Biology and Biochemistry, 29: 911-922.
- Barbieri P., Galli E., 1993. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic production. Research in Microbiology, 144: 69-75.
- Bashan Y., Holguin G., 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Canadian Journal of Microbiology, 43: 103-121.
- Bashan Y., Holguin G., Bashan L., 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Canadian Journal of Microbiology, 50: 521-577.
- Bellone C.H., de Bellone Silvia C., 2012. Interaction of *Azospirillum brasilense* and *Glomus intraradix* in Sugar Cane Roots. Indian Journal of Microbiology, 52: 70-75.
- Berlier Y.M., Lospinat P.A., 1980. Mass-spectrometric kinetic studies of the nitrogenase and hydrogenase activities in *in-vivo* cultures of *Azospirillum brasilense* Sp. 7. Archives of Microbiology, 125: 67-72.
- Bottini R., Fulchieri M., Pearce D., Pharis R.P., 1989. Identification of gibberellins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. Plant Physiology, 90: 45-47.
- Cacciari I., Lippi D., Pietrosanti T., Pietrosanti W., 1989. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. Plant and Soil, 115: 151-153.
- Cassán F., Perrig D., Sgroi V., Luna V., 2011. Basic and technological aspects of phytohormone production by microorganisms: *Azospirillum* sp. as a model of plant growth promoting rhizobacteria. ss. 141-167. W: Bacteria in agrobiology: plant nutrient management, red. Maheshwari D.K.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Cohen A., Bottini R., Piccoli P., 2008. *Azospirillum brasilense* Sp245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in Arabidopsis plants. Plant Growth Regulator, 54: 97-103.
- Conn K.L., Nowak J., Lazarovits G., 1997. A gnotobiotic bioassay for studying interactions between potatoes and plant

- growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 801-808.
- Correa-Aragunde N., Graziano M., Chevalier C., Lamattina L., 2006.** Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 57: 581-588.
- Costacurta A., Keijers V., Vanderleyden J., 1994.** Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Molecular Genetics and Genomics*, 243: 463-472.
- Costacurta A., Vanderleyden J., 1995.** Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 21: 1-18.
- Crozier A., Arruda P., Jasmim J.M., Monteiro A.M., Sandberg G., 1988.** Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2833-2837.
- de Zamaroczy M., 1998.** Structural homologues PII and PZ of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signaling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. *Molecular Microbiology*, 29: 449-463.
- de Zamaroczy M., Paquelin A., Elmerich C., 1993.** Functional organization of the glnB – glnA cluster of *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 175: 2507-2515.
- Dixon R., 1998.** The oxygen-responsive NifL-NifA complex: a novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in gamma-proteobacteria. *Archives of Microbiology*, 169: 371-380.
- Dixon R., Kahn D., 2004.** Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 621-631.
- Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Vande Broek A., Vanderleyden J., 1999.** Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, 212: 155-164.
- Dobbelaere S., Croonenborghs A., Tys A., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Labandera-Gonzales C., Caballero-Mellado J., Aguirre J.F., Kapulnik Y., Brener S., Burdman S., Kadouri D., Sarig S., Okon Y., 2001.** Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Journal of Plant Physiology*, 28: 871-879.
- Döbereiner J., 1983.** Dinitrogen fixation in rhizosphere and phyllosphere association. ss. 332-350. W: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 15 A, Eds. A. Lauchli and R.L. Bielski., Springer-Verlag, Berlin.
- Döbereiner J., Marriel I.E., Nery M., 1976.** Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology*, 22: 1464-1473.
- Eckert B., Weber O.B., Kirchhof G., Halbritter A., Stoffels M., Hartmann A., 2001.** *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4 – grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 17-26.
- Fallik E., Okon Y., Epstein E., Goldman A., Fischer M., 1989.** Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense*-inoculated maize roots. *Soil Biology and Biochemistry*, 21: 147-153.
- Fu H., Burris R.H., 1989.** Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. *Journal of Bacteriology*, 171: 3168-3175.
- Fulchieri M., Lucangeli C., Bottini R., 1993.** Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberellin status on corn seedling roots. *Plant Cell Physiology*, 34: 1305-1309.
- Galazka A., Król M., Perzyński A., 2012.** The efficiency of rhizosphere bioremediation with *Azospirillum* sp. and *Pseudomonas stutzeri* in soils freshly contaminated with PAHs and diesel fuel. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21: 343-351.
- Galazka A., Galazka R., 2015.** Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils artificially polluted using plant-associated-endophytic bacteria and *Dactylis glomerata* as the bioremediation plant. *Polish Journal of Microbiology*, 64(3): 239-250.
- Gallori E., Bazzicalupo M., 1985.** Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, 28: 35-38.
- Haahtela A., Kari K., Sundman V., 1983.** Nitrogenase activity (acetylene reduction) of root-associated, cold-climate *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, and *Pseudomonas* species during growth on various carbon sources and at various partial pressures of oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 563-570.
- Han S.O., New P.B., 1998.** Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. *Microbial Ecology*, 36: 193-201.
- Hartmann A., Baldani J.I., 2006.** The genus *Azospirillum*. *Prokaryotes*, 5: 115-140.
- Hartmann A., Burris R.H., 1987.** Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology*, 169: 944-948.
- Hartmann A., Fu H., Burris R.H., 1986.** Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. *Journal of Bacteriology*, 165: 864-870.
- Hartmann A., Fu H., Song S., Burris R.H., 1985.** Comparison of nitrogenase regulation in *A. brasilense*, *A. lipoferum*, and *A. amazonense*. ss. 116-126. W: *Azospirillum* III: Genetics, Physiology, Ecology, red. Klingmüller W., Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hartmann A., Kleiner D., 1982.** Ammonium (methylammonium) transport by *Azospirillum* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 15: 65-67.
- Hartmann A., Singh M., Klingmüller M., 1983.** Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 29: 916-923.
- Ishizuka J., 1992.** Trends in biological nitrogen fixation research and application. *Plant and Soil*, 141: 197-209.
- James E.K., 2000.** Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crop Research*, 65: 197-209.
- Kalitkiewicz A., Kępczyńska E., 2008.** Wykorzystanie ryzobakterii do stymulacji wzrostu roślin. *Biotechnologia*, 81: 102-114.
- Kennedy I.R., Tchan Y.T., 1992.** Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: recent advances. *Plant and Soil*, 141: 93-118.
- Khammas K.M., Ageron E., Grimont P.A.D., Kaiser P., 1989.** *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the rice roots and rhizosphere soil. *Research of Microbiology*, 140: 679-693.
- Klama J., 2004.** Współżycie endofitów bakteryjnych z roślinami. *Acta Scientiarum Polonorum, Agricultura*, 3(1): 19-28.
- Klama J., Wolna-Maruwka A., Niewiadomska A., 2010.** Wpływ koinokulacji bakteriami diazotroficznymi na rozwój siewek pszenicy zwyczajnej. *Nauka Przyroda Technologie*, 4: 1-7.
- Kolb W., Martin P., 2006.** Response of plant roots to inoculation with *Azospirillum brasilense* and to application of indoleace-

- tic acid. ss. 215-221. W: *Azospirillum* III: genetics, physiology, ecology. Klingmüller W. (red.), Springer, Berlin.
- Król M., 2006.** *Azospirillum* – asocjacyjne bakterie wiążące azot. Monografie i rozprawy naukowe. IUNG-PIB, Puławy, 15: 45-55.
- Król M., Perzyński A., 2001.** Charakterystyka biochemiczna bakterii z rodzaju *Azospirillum* ryzosfery zbóż. Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Szczecinie, 221: 112-116.
- Lavrinenko K., Chernousova E., Gridneva E., Dubinina G., Akimov V., Kuever J., Lysenko A., Grabovich M., 2010.** *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60: 2832-2837.
- Liang Y.Y., Kaminski P.A., Elmerich C., 1991.** Identification of a nifA-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. Molecular Microbiology, 5: 2735-2744.
- Lucy M., Reed E., Glick B.R., 2004.** Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Antonie Van Leeuwenhoek, 86: 1-25.
- Martinez-Argudo I., Little R., Shearer N., Johnson P., Dixon R., 2004.** The NifL – NifA system: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. Journal of Bacteriology, 186: 601-610.
- Masciarelli O., Urbani L., Reinoso H., Luna V., 2013.** Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (iaa) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. Journal of Microbiology, 51: 590-597.
- Okon Y., Itzigsohn R., Burdman R., Hampel M., 1995.** Advances in agronomy and ecology of the *Azospirillum*-plant associations. ss. 635-639. W: nitrogen fixation : fundamentals and applications, Kluwer Acad. Pub., eds: I.A. Tikhonovich i in.
- Okon Y., Kapulnik Y., 1986.** Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. Plant and Soil, 90: 3-16.
- Okon Y., Labandera-Gonzalez C.A., 1994.** Agronomic application of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biology and Biochemistry, 26: 1591-1601.
- Omay S.H., Schmidt W.A., Martin P., Bangerth F., 1993.** Indoleacetic acid production by the rizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd under *in vitro* conditions. Canadian Journal of Microbiology, 39: 187-192.
- Passaglia L.M.P., Van Soom C., Schrank A., Schrank I.S., 1998.** Purification and binding analysis of the nitrogen fixation regulatory NifA protein from *Azospirillum brasilense*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 31: 1363-1374.
- Patriguin D.G., 1982.** Nitrogen fixation in sugar cane litter. Biological Agriculture and Horticulture, 1: 39-64.
- Pedrosa F.O., Stephan M., Dobereiner J., Yates M.G., 1982.** Hydrogen-uptake hydrogenase activity in nitrogen-fixing *Azospirillum brasilense*. Journal of General Microbiology, 128: 161-166.
- Perrig D., Boiero L., Masciarelli O., Penna C., Cassán F., Luna V., 2007.** Plant growth promoting compounds produced by two agronomical important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formation. Applied Microbiology and Biotechnology, 75: 1143-1150.
- Piccoli P., Bottini R., 1994.** Effects of C/N ratio, N content, pH, and incubation time on growth and gibberellin production by *Azospirillum lipoferum*. Symbiosis, 17: 229-236.
- Prinsen E., Costacurta A., Michiels K., Vanderleyden J., Van Onckelen H., 1993.** *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: Evidence for a nontryptophan dependent pathway. Molecular Plant-Microbe Interactions, 6: 609-615.
- Rees D.C., Howard J.B., 2000.** Nitrogenase: standing of the crossroads. Current Opinion in Chemical Biology, 4: 559-566.
- Rekosz-Burlaga H., Waszewska M., 2010.** Wpływ różnorodności gatunkowej traw i dżdżownic *Aporrectodea caliginosa* na liczebność *Azospirillum* spp. w glebie. Nauka Przyroda Technologie, 4: 1-6.
- Ruppel S., Merbach W., 1995.** Effects of different nitrogen sources on nitrogen fixation and bacterial growth of *Pantoea agglomerans* and *Azospirillum* sp. in bacterial pure culture: An investigation using ¹⁵N₂ incorporation and acetylene reduction measures. Microbiological Research, 150: 409-418.
- Sant'Anna F.H., Almeida L.G.P., Cecagno R., Reolon L.A., Siqueira F.M., Machado M.R.S., Vasconcelos A.T.R., Schrank I.S., 2011.** Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. BMC Genomics, 12: 409-412.
- Schlöter M., Hartmann A., 1998.** Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. Symbiosis, 25: 159-179.
- Steenhoudt O., Vanderleyden J., 2000.** *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiology Ecology, 24: 487-506.
- Strzelczyk E., Kampert M., Li C., 1994a.** Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. Microbiological Research, 149: 55-60.
- Strzelczyk E., Kampert M., Różycki H., Li C., 1994b.** Effect of plant growth hormones on growth of *Azospirillum* sp. in media with different carbon sources. Acta Microbiologica Polonica, 43: 89-95.
- Śwędryńska D., Sawicka A., 2010.** Wpływ miedzi na bakterie z rodzaju *Azospirillum* występujące w ryzosferze siewek kukurydzy i pszenicy. Woda – Środowisko – Obszary Wiejskie, 10: 167-178.
- Tchan Y.T., Zeman M.M., 1995.** N₂ fixation (C₂H₂ reduction) in 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid (2,4-D) treated wheat inoculated with free-living diazotrophs. Soil Biology and Biochemistry, 4/5: 453-457.
- Thomas K.C., Spencer M., 1978.** Evolution of ethylene by *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by the carbon source for growth and the presence of air. Canadian Journal of Microbiology, 24: 637-642.
- Tien T.M., Gaskins M.H., Hubbell D.H., 1979.** Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Applied and Environmental Microbiology, 37: 1016-1024.
- Tortora M.L., Díaz-Ricci J.C., 2012.** Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. Plant and Soil, 356: 279-290.

- Truba M., Jankowski K., Sosnowski J., 2012.** Reakcje roślin na stosowanie preparatów biologicznych. Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych, 53: 41-52.
- Vande Broek A., Michiels J., Van Gool A., Vanderleyden J., 1993.** Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH*-gene during association. Molecular Plant-Microbe Interactions, 6: 592-600.
- Vande Broek A., Vanderleyden J., 1995.** The role of bacterial motility, chemotaxis, and attachment in bacteria-plant interactions. Molecular Plant-Microbe Interactions, 8: 800-810.
- Vande Broek A., Lambrecht M., Eggermont K., Vanderleyden J., 1999.** Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. Journal of Bacteriology, 181: 1338-1342.
- Van Dommelen A., Keijers V., Vanderleyden J., De Zamaroczy M., 1998.** (Methyl)ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. Journal of Bacteriology, 180: 2652-2659.
- Venkateswarlu K., Sethunathan N., 1984.** Degradation of carbofuran by *Azospirillum lipoferum* and *Streptomyces* spp. isolated from flatted alluvial soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 33: 556-560.
- Wright A.D., Sampson M.B., Neuffer M.G., Michalczyk L., Slovin J.P., Cohen J.D., 1991.** Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotroph. Science, 254: 998-1000.
- Zawoznik M.S., Ameneiros M., Benavides M.P., Vázquez S., Groppa M.D., 2011.** Response to saline stress and aquaporin expression in *Azospirillum*-inoculated barley seedlings. Applied Microbiology and Biotechnology, 90: 1389-1397.
- Zhang Y., Burris R.H., Roberts G.P., 1992.** Cloning, sequencing, mutagenesis, and functional characterization of *draT* and *draG* genes from *Azospirillum brasilense*. Journal of Bacteriology, 174: 3364-3369.
- Zhang Y., Burris R.H., Ludden P.W., Roberts G.P., 1993.** Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. Journal of Bacteriology, 175: 6781-6788.
- Zhang Y., Burris R.H., Ludden P.W., Roberts G.P., 1996.** Presence of a second mechanism for the posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* in response to ammonium. Journal of Bacteriology, 178: 2948-2953.
- Zhou S., Han L., Wang Y., Yang G., Zhuang L., Hu P., 2013.** *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63: 2618-2624.
- Zimmer W., Bothe H., 1989.** The phytohormonal interactions between *Azospirillum* and wheat. Plant and Soil, 110: 239-247.
- Zimmer W., Elmerich C., 1991.** Regulation of the synthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum*. Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, 1: 465-468.

A. Gałzka, J. Bigos, S. Siebielec

PLANT GROWTH PROMOTION BY BACTERIA OF THE GENUS *AZOSPIRILLUM* AND THEIR APPLICATION IN AGRICULTURE

Azospirillum represents the best characterized genus of plant growth-promoting rhizobacteria. Four aspects of the *Azospirillum* plant root interaction are highlighted: associations, plant root interaction, nitrogen fixation and biosynthesis of plant growth hormones. Each of these aspects is dealt with in a comparative way. *Azospirilla* are predominantly surface colonizing bacteria. The attachment of *Azospirillum* cells to plant roots occurs in two steps. The polar flagellum, of which the flagellin was shown to be a glycoprotein, mediates the adsorption step. Nitrogen fixation structural genes (*nif*) are highly conserved among all nitrogen-fixing bacteria. The transcriptional activator NifA is required for expression of other *nif* genes in response to two major environmental signals. Many genes are involved in colonization of plant roots, plant-growth promotion, and properties related to rhizosphere adaptation. Those bacteria have been in the centre of scientific interest for the last two decades because under appropriate conditions members of this genus can enhance plant development and promote the yield of several agriculturally important crop plants.

key words: *Azospirillum*, endophytic diazotroph, nitrogen fixation, plant growth hormones, plant root interaction