PROGRESS IN PLANT PROTECTION
61 (1): 17-23, 2021
ISSN 1427-4337

DOI: 10.14199/ppp-2021-002
Published online: 01.02.2021

Received: 13.10.2020 / Accepted: 19.01.2021

Wpływ wybranych mikroelementowych nawozów nasiennych na przeżywalność bakterii *Bradyrhizobium japonicum*

Effect of selected micronutrient seed fertilizers on the viability of *Bradyrhizobium japonicum*

Agnieszka Brzezińska*, Anika Mrozek-Niećko

Streszczenie

Symbiotyczne bakterie glebowe *Bradyrhizobium japonicum* wiążące azot atmosferyczny mają zdolność wytwarzania brodawek korzeniowych na roślinach soi. Gleby w Polsce naturalnie nie zawierają tych bakterii i dlatego zaleca się zaprawianie nasion odpowiednią szczepionką. Celem pracy było zbadanie wpływu stężenia mikroelementowych nawozów nasiennych na żywotność bakterii z rodzaju *B. japonicum*. Zastosowane nawozy różniły się składem chemicznym. Określono również wpływ czasu zaprawiania nasion bakteriami i mikroelementowymi nawozami nasiennymi na przeżywalność bakterii. Badania wykonano bezpośrednio po szczepieniu nasion oraz po upływie 1, 3 i 24 godzin od aplikacji. Przeprowadzone badania wskazują negatywny wpływ zbyt wysokiego stężenia zastosowanych mikroelementowych nawozów nasiennych na żywotność bakterii. Nawóz nasienny zawierający w swoim składzie miedź i mangan w każdym zastosowanym w doświadczeniu stężeniu działał toksycznie na bakterie. Czas kontaktu nawozów z bakteriami wpływał ujemnie na liczebność kolonii, po upływie 1 godziny od zaprawienia nasion nawozem nasiennym zaobserwowano spadek liczby bakterii na nasionach.

Słowa kluczowe: *Bradyrhizobium japonicum*, soja, symbioza, nawozy nasienne

Summary

Symbiotic soil bacteria *Bradyrhizobium japonicum* bind atmospheric nitrogen and have the ability to produce root nodules on soybean plants. The soil in Poland does not contain these bacteria naturally and therefore it is recommended that seeds be treated with an appropriate preparation containing the bacteria. The aim of the study was to examine the effect of different concentrations of micronutrient seed fertilizers on the viability of the *B. japonicum* bacteria. The study included various fertilizers with different chemical compositions. The duration of the treatment of seeds with both bacteria and microelement seed fertilizers was also considered when analysing the bacterial survival rate. The tests were carried out immediately after seed vaccination, and, subsequently, after one, three and 24 hours from the vaccination. The study showed that a too high concentration of the microelement seed fertilizers has a negative impact on on the viability of the bacteria. Regardless of its concentration, seed fertilizer containing copper and manganese proved to be toxic to the bacteria. The duration of contact of the fertilizers with the bacteria had a negative effect on the abundance of the colonies. As soon as one hour after the seeds were treated with the seed fertilizer, a decrease in the number of bacteria on seeds was observed.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, soybean, symbiosis, seed fertilizers

Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Konsultingowe ADOB Sp. z o.o. Sp. jawna
Kołodzieja 11, 61-070 Poznań
*corresponding author: agnieszka.brzezinska@adob.com.pl

Wstęp / Introduction

Rośliny bobowate mają zdolność do symbiozy z bakteriami glebowymi – *Rhizobium*, wiążącymi azot atmosferyczny. Efektem symbiozy (bakterioryzy) jest wzajemna wymiana substancji pomiędzy rośliną a bakteriami, znajdującymi się wewnątrz brodawek umiejscowionych na korzeniach (Martyniuk 2008, 2012). W wyniku licznych procesów, azot atmosferyczny przekształcany jest w przyswajalny przez roślinę azot amonowy (Gage 2004; Ferguson 2013). Brodawki roślin bobowatych różnią się między sobą cechami anatomicznymi i fizjologicznymi. Soja ma zdolność symbiozy z bakteriami *Bradyrhizobium japonicum*. Wytwarzane brodawki są typu zdeterminowanego i rozwijają się z komórek kory zewnętrznej korzenia. Wzrost brodawek soi wynika z rozrostu komórek, a nie z ich podziałów, przez co kształt brodawek jest okrągły (Stasiak i wsp. 2016). Komórki zewnętrzne brodawki nie są zainfekowane i odpowiadają za funkcję ochronną przed patogenami (Horiuchi i wsp. 2005; Nomura i wsp. 2010; Ferguson 2013; Stasiak i wsp. 2016). Pierwsze brodawki zaczynają wytwarzać się bezpośrednio po wykiełkowaniu rośliny. Jednak proces wiązania azotu przez bakterie zaczyna się dopiero w momencie wytworzenia przez soję pierwszej lub drugiej pary trójlistków. Maksymalną liczbę brodawek obserwuje się dopiero na etapie wytworzenia nasion w strąkach (Alves i wsp. 2003).

Bakterie *B. japonicum* nie występują naturalnie w polskich glebach, dlatego konieczna jest inokulacja nasion przed siewem odpowiednio dobranymi szczepami bakterii. Dana roślina może współżyć tylko z określonym gatunkiem bakterii. Przykładowo fasola ma zdolność do symbiozy z bakteriamii *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, a koniczyna z *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Na polskim rynku dostępna jest m.in. Nitragina pochodząca z Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach (IUNG – PIB). Jest to preparat biologiczny zawierający specjalnie dopasowany szczep bakterii do zaprawiania nasion roślin bobowatych. Brodawki znajdujące się na korzeniu głównym są wynikiem otoczkowania nasion bakteriami w danym sezonie, natomiast te na korzeniach bocznych pochodzą od bakterii znajdujących się w glebie przed siewem (Martyniuk 2008). Białko Leghemoglobina (Lb) odpowiada za utrzymanie odpowiednich warunków tlenowych podczas procesów przekształcania azotu atmosferycznego w komórkach (Łotocka i Golinowski 1995). Nadaje ono również określony kolor wnętrzu brodawki korzeniowej zależny od stopnia aktywności bakterii. Kolor różowy lub czerwony wewnątrz brodawki związany jest z efektywnym wiązaniem azotu, kolor biały lub brązowy świadczy natomiast o braku wiązania azotu przez bakterie (Martyniuk 2012).

Na spadek aktywności bakterii i liczby brodawek na korzeniach może wpływać zbyt intensywne nawożenie pól azotem, zła jakość uprawianej gleby lub za niska temperatura gleby podczas siewu (Korsak-Adamowicz i wsp. 2007). Niewłaściwe i zbyt długie przechowywanie szczepów bakterii lub wystawienie ich na bezpośrednie działanie promieni słonecznych może spowodować ograniczenie aktywności i spadek liczby aktywnych komórek bakterii (Brear i wsp. 2013; Jarecki i Bobrecka-Jamro 2016). Zaleca się zaprawiać nasiona bakteriami bezpośrednio przed siewem, w chłodnym i zacienionym miejscu.

We wczesnych fazach rozwojowych roślin bobowatych, będących w symbiozie z bakteriami brodawkowymi, nie zaleca się stosowania nawozów lub środków ochrony roślin zawierających w swoim składzie miedź i mangan. Pierwiastki te ograniczają aktywność bakterii brodawkowych, zaburzają proces powstawania nowych brodawek i hamują pracę bakterii w brodawkach już wytworzonych (Bethelenfalvay i Franson 1989; Nogueira i wsp. 2007; El-Jaoual i Cox 2008). Udowodniono, że miedź ma silne działanie bakteriobójcze (Sanchez-Pardo i wsp. 2012). Dane te dotyczą szkodliwości działania miedzi i manganu wprowadzonych na zaprawione bakteriami nasiona w formie siarczanów lub chlorków (Bethelenfalvay i Franson 1989; Nogueira i wsp. 2007; Swędrzyńska i Sawicka 2010). Wpływ mikroelementów w formie schelatowanej na aktywność bakterii nie został dotychczas zbadany.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu wybranych mikroelementowych nawozów nasiennych na wzrost i liczebność bakterii *B. japonicum*. Zastosowane nawozy nasienne różniły się składem chemicznym.

Materiały i metody / Materials and methods

Badania wykonano w Katedrze Przyrodniczych Podstaw Jakości na Wydziale Towaroznawstwa Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu. W badaniach wykorzystano bakterie *B. japonicum*, które zostały wyizolowane z handlowego preparatu Nitragina pochodzącego z IUNG – PIB w Puławach. Wyizolowane bakterie zidentyfikowano na podstawie analizy sekwencji fragmentu genomu. Sekwencjonowaniu poddano gen rpoB (częściowa sekwencja). Jako starterów sekwencjonowania użyto rpoB83F oraz rpoB1061R (Martens i wsp. 2008). Alignment sekwencji wykonano przy użyciu programu BioEdit. Nie uzyskano numerów akcesyjnych GenBanku dla pozyskanych sekwencji, jedynym celem zastosowania metody sekwencjonowania w badaniach było potwierdzenie tożsamości szczepów bakterii *B. japonicum*. Bakterie te hodowano na pożywce YMB (Yeast Mannitol Broth – Fluka) lub YMA (Yeast Mannitol Agar – Fluka) odpowiednio z dodatkiem i bez dodatku czerwieni Congo o stężeniu 0,0025%. Bakterie inkubowano w temperaturze 30°C przez 5 dni.

Zastosowane mikroelementowe nawozy nasienne miały następujący skład:

A1 – B 0,2%; Co 0,05%; Fe 0,1%; MgO 1%; Mo 0,1%; Zn 1,5%; N 2% (m/m),
A2 – B 0,2%; Cu 0,2%; Co 0,05%; Fe 0,1%; MgO 1%; Mn 1%; Mo 0,1%; Zn 1,5%; N 2% (m/m).

Nawozy różniły się zawartością miedzi i manganu. Mikroelementy aplikowano w formie schelatowanej, jako czynnik kompleksujący zastosowano IDHA [D,L-Aspartic acid, N-(1,2-dicaroxylethyl) tertrasodium salt]. Miedź i mangan wprowadzono w celu zbadania ich potencjalnie szkodliwego wpływu na aktywność bakterii brodawkowych. Do badań wykorzystano nasiona soi odmiany Merlin.

Wpływ zastosowanych mikroelementowych nawozów nasiennych na przeżywalność bakterii został określony metodą płytkową (Malarska 2005). Do badań wykorzystano mikropłytki AB-1400 firmy Thermo Scientific. Mikropłytkę zawierającą 96 studzienek podzielono na pionowe kolumny (1–12) i poziome rzędy (A–H). Badania prowadzono równolegle w trzech powtórzeniach. Kolumny oznaczone numerami 1, 5 i 6 stanowiły kontrole negatywne – pożywka bez dodatku bakterii, kolumny 2–4 stanowiły natomiast kontrole pozytywne – pożywka z dodatkiem bakterii. Do kolumny 5 i 6 dodano dodatkowo mikroelementowy nawóz nasienny A1 (5) i A2 (6). Kolumny 7–12 zawierały pożywkę z dodatkiem bakterii i badanych nawozów A1 (7–9) lub A2 (10–12). W pierwszym etapie do wszystkich studzienek mikropłytki wprowadzono po 100 µl bulionu YMB (Fluka) (Stojakowska i wsp. 1995). Następnie do studzienek kolumn 2–4 i 7–12 wprowadzono po 100 µl zawiesiny bakterii w bulionie YMB o koncentracji 10^5 jtk/ml. W kolejnym etapie do studzienek kolumn 5–12 pierwszego rzędu (A) wprowadzono po 100 µl nawozu nasiennego A1 (5, 7–9) lub A2 (6, 10–12). W studzienkach znajdowało się już 100 µl bulionu YMB, dlatego stężenie nawozu zmalało o 50%. W kolejnym etapie do drugiego rzędu studzienek (B) przeniesiono 100 µl roztworu ze studzienki z rzędu A, wykonując rozcieńczenie koncentratu nawozowego do 25% zawartości początkowej. Analogicznie wykonano kolejnych sześć rozcieńczeń, otrzymując roztwory nawozów o stężeniach: 12,5% (rząd C), 6,25% (rząd D), 3,1% (rząd E), 1,6% (rząd F), 0,8% (rząd G) i 0,4% (rząd H). W kolejnym etapie do wszystkich studzienek dodano 10 µl 1% (w/w) roztworu barwnika – resazuryny. Jest to nietoksyczny dla bakterii wskaźnik redox o niebieskiej barwie. W wyniku działania oksydoreduktaz wewnątrz żywych komórek, barwnik przekształca się w różową resorufinę. Zmiana barwy wskaźnika pozwala na wizualną ocenę rezultatów. Płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 5 dni. Oddziaływanie badanych nawozów na żywotność bakterii określono na podstawie wizualnej oceny zmiany barwy wskaźnika.

Liczebność bakterii ustalono wykonując posiewy na pożywki i zliczając wyrosłe kolonie. Badania prowadzono równolegle w trzech powtórzeniach. Nasiona soi zaprawiono bakteriami oraz mikroelementowym nawozem nasiennym A1 lub A2. Zastosowana w badaniach dawka Nitraginy wynosiła 300 g/ha (koncentracja bakterii 10^6–10^7 jtk/g), a dawka nawozów nasiennych 250 ml na 100 kg nasion. Nitraginę zgodnie z zaleceniami IUNG – PIB w Puławach przygotowano w proporcji 300 g preparatu na 1 l wody. W wyniku wytrząsania nasion z Nitraginą przez 10 minut nasiona zostały pokryte bakteriami. W ten sam sposób, w kolejnym etapie, na zaszczepione nasiona zostały zaaplikowane nawozy nasienne. Odważono 10 g tak przygotowanych nasion i wytrząsano je z 90 ml soli fizjologicznej przez 20 minut. Następnie, z tak przygotowanych próbek wykonano posiew na szalki Petriego metodą zalewową z wykorzystaniem pożywki YMA (Fluka) z dodatkiem czerwieni Congo o stężeniu 0,0025% (Klama i wsp. 2010; Niewiadomska i Swędrzyńska 2011). Płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 5 dni. Po zakończeniu inkubacji liczono kolonie bakterii o morfologii typowej dla *B. japonicum*. Liczebność bakterii oznaczono bezpośrednio po zaprawieniu nasion oraz po upływie 1, 3 i 24 godzin od aplikacji.

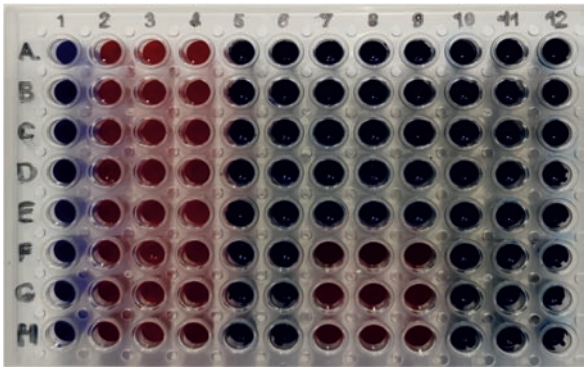
Wyniki i dyskusja / Results and discussion

W badaniach określono wpływ stężenia mikroelementowych nawozów nasiennych na aktywność bakterii *B. japonicum* metodą mikropłytkową z wykorzystaniem resazuryny jako wskaźnika. Wyniki przedstawiono na fotografii 1.

We wszystkich studzienkach kolumn 2–4, stanowiących kontrolę pozytywną zaobserwowano zmianę koloru roztworu barwnika – resazuryny z niebieskiej na różową. Różowa barwa roztworu świadczyła o aktywności bakterii. Natomiast w studzienkach kolumny 1 oraz 5 i 6 stanowiących kontrolę negatywną (bez dodatku bakterii) resazuryna miała kolor niebieski, świadczący o braku aktywności bakterii. Działanie bakteriobójcze nawozu A2 (kolumny 10–12), zawierającego w swoim składzie Cu i Mn, zaobserwowano w całym zakresie badanych stężeń (powyżej 0,4% początkowej dawki koncentratu nawozowego – niebieski kolor wskaźnika). Zawartość miedzi i manganu w rozcieńczeniu 0,4% koncentratu nawozu A2 wynosiła odpowiednio 10 i 50 mg/l. Nawóz A1 (kolumny 7–9) hamował aktywność bakterii w stężeniu powyżej 3,1% początkowej dawki koncentratu nawozowego (rząd E).

W kolejnym doświadczeniu oceniono liczebność kolonii bakterii na nasionach soi zaprawianych Nitraginą oraz mikroelementowymi nawozami nasiennymi. Kolonie bakterii liczono bezpośrednio po aplikacji oraz po upływie 1, 3 i 24 godzin. W zaprezentowanych badaniach jako jednostkę stosowaną do określania liczebności bakterii przyjęto jtk/g (CFU – colony forming unit). Przykładowe wyniki badań dla nasion soi zaprawianych nawozem nasiennym A2 przedstawiono na fotografiach 2 i 3 oraz zebrano w tabeli 1.

Nasiona z prób kontrolnych i badanych zaprawiono Nitraginą. Po upływie 1 godziny od aplikacji na szalkach prób kontrolnych z dodatkiem i bez dodatku glukozy nie



Fot. 1. Wpływ nawozów nasiennych na żywotność bakterii *Bradyrhizobium japonicum* określony za pomocą wizualnej obserwacji zmiany barwy wskaźnika

Photo 1. The effect of seed fertilizers on the viability of *Bradyrhizobium japonicum* bacteria determined by visual observation of the color change of the indicator

Kolumna 1 – Kontrola negatywna (pożywka bez bakterii) – Column 1 – Negative control (medium without bacteria)

Kolumna 2–4 – Kontrola pozytywna (pożywka z dodatkiem bakterii) – Column 2–4 – Positive control (medium with the addition of bacteria)

Kolumna 5 – Kontrola negatywna A1 (pożywka bez bakterii z nawozem A1) – Column 5 – Negative control A1 (medium with bacteria and seed fertilizer A1)

Kolumna 6 – Kontrola negatywna A2 (pożywka bez bakterii z nawozem A2) – Column 6 – Negative control A2 (medium with bacteria and seed fertilizer A2)

Kolumna 7–9 – Nawóz nasienny A1 (pożywka z dodatkiem bakterii i nawozem nasiennym A1) – Column 7–9 – Seed fertilizer A1 (medium with bacteria and seed fertilizer)

Kolumna 10–12 – Nawóz nasienny A2 (pożywka z dodatkiem bakterii i nawozem nasiennym A2) – Column 10–12 – Seed fertilizer A2 (medium with bacteria and seed fertilizer)

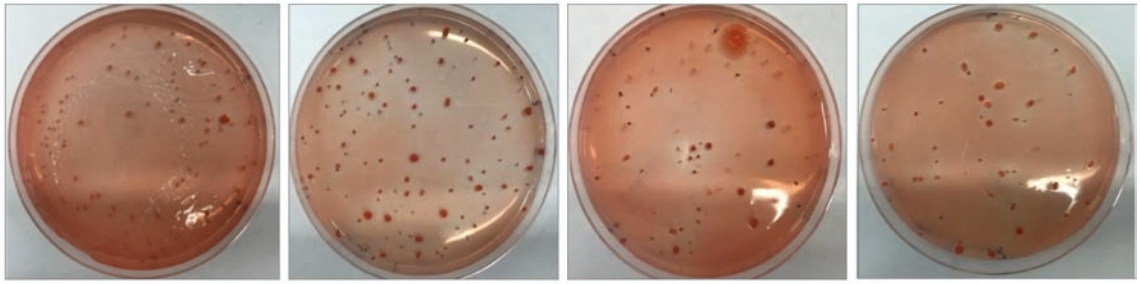
Rząd A–H – Rozcieńczenia nawozów nasiennych: 50% (A), 25% (B), 12,5% (C), 6,25% (D), 3,1% (E), 1,6% (F), 0,8% (G) i 0,4% (H)

Row A–H – Dilutions of seeds fertilizers: 50% (A), 25% (B), 12.5% (C), 6.25% (D), 3.1% (E), 1.6% (F), 0.8% (G) and 0.4% (H)

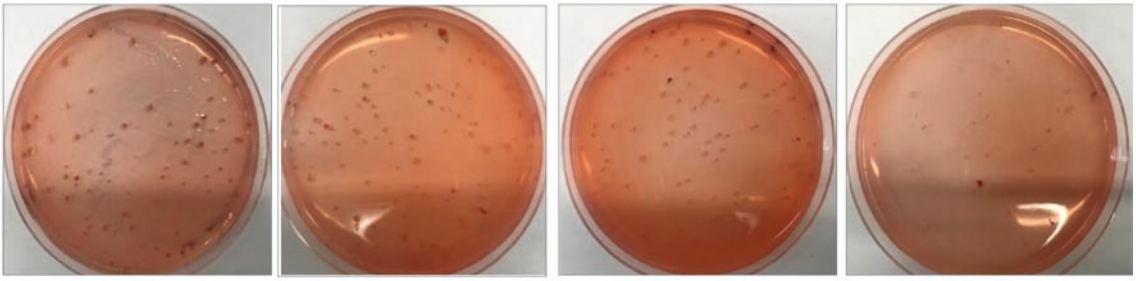
odnotowano spadku liczby bakterii (10^7 jtk/g) (tab. 1). Maksymalny spadek liczby bakterii nastąpił po 3 h od aplikacji i wynosił 10^6 jtk/g dla obu badanych prób kontrolnych. Po 24 h nie zaobserwowano dalszego spadku liczby bakterii dla prób kontrolnych, ich ilość utrzymywała się na poziomie 10^6 jtk/g. Natomiast dla prób zaprawianych nawozami, zaobserwowano spadek liczby bakterii już po upływie 1 h od aplikacji do poziomu 10^5 jtk/g (tab. 1). Po upływie 3 h nastąpił maksymalny spadek liczby bakterii, który po upływie 24 h utrzymywał się na takim samym poziomie i wynosił 10^4 jtk/g. Zaobserwowano zmniejszenie liczby bakterii dla prób zaprawionych nawozem nasiennym A2, zawierającym Cu i Mn, bezpośrednio po aplikacji (0 h) do wartości 10^6 jtk/g w porównaniu z analogicznymi próbami zaprawianymi nawozem A1, w których liczba bakterii wynosiła 10^7 jtk/g. Spadek liczby bakterii potwierdza toksyczny wpływ Cu i Mn na ich przeżywalność (Bethelenfalvay i Franson 1989; Nogueira i wsp. 2007; El-Jaoual i Cox 2008; Sanchez-Pardo i wsp. 2012). Mikroelementy te hamują aktywność bakterii już w momencie ich aplikacji na zaszczepione nasiona.

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach zaleca stosowanie 10% roztworu glukozy w celu ułatwienia aplikacji szczepów bakterii pochodzących z Nitraginy na powierzchnię nasion. W próbkach z dodatkiem glukozy można zauważyć pojawienie się zanieczyszczeń obcą mikrobiotą. Zwiększona w ten sposób konkurencja na skutek obecnej mikrobioty może doprowadzić do spadku aktywności *Rhizobium*, co w konsekwencji może doprowadzić do zmniejszenia liczby kolonii.

W tabeli 1. zebrano średnie wyniki pomiarów liczby kolonii bakterii dla próby kontrolnej (K) i prób badanych, zaprawianych mikroelementowymi nawozami nasiennymi A1 lub A2. W próbkach kontrolnych zarówno z dodatkiem, jak i bez glukozy (G) odnotowano spadek liczby bakterii po 3 godzinach od aplikacji do wartości 10^6 jtk/g. Zauważalny jest spadek liczby bakterii pod wpływem działania mikroelementowych nawozów nasiennych A1 lub A2 po upływie 1, 3 i 24 h od aplikacji (10^4–10^5 jtk/g) w porównaniu z próbą kontrolną (10^6–10^7 jtk/g). Wraz ze wzrostem czasu inkubacji spada liczba bakterii we wszystkich wariantach, przy czym dla prób kontrolnych spadek ten był najmniejszy, zarówno po 3, jak i po 24 godzinach. Po 1 godzinie inkubacji we wszystkich badanych próbach odnotowano spadek liczby bakterii (10^6 jtk/g). Największy spadek odnotowano dla nasion soi zaprawianych nawozem A2 zarówno z dodatkiem, jak i bez glukozy – z 10^6 jtk/g (0 h) do 10^4 jtk/g (3 i 24 h). We wszystkich badanych próbach maksymalny spadek liczby bakterii nastąpił po 3 godzinach inkubacji. Po 24 godzinach nie zaobserwowano znaczącego spadku liczby bakterii w materiale badanym w porównaniu z próbkami po 3 godzinach, zarówno dla prób kontrolnych, jak i badanych. Podaje się, że ogólna liczba kolonii bakterii i promieniowców w glebie (w warstwie próchniczej i podornej) powinna wynosić 10^4–10^6 jtk/g s.m. (Sosnowski i Jankowski 2013; Galus-Barchan i Chmiel 2019). Ilość i aktywność bakterii w glebie uzależniona jest od jej właściwości fizykochemicznych (pH, skład granulometryczny), od czynników klimatycznych (wielkość opadów, temperatura) oraz od stosowanych zabiegów agrotechnicznych (nawożenie, orka, płodozmian) (Martyniuk i wsp. 2007; Sosnowski i Jankowski 2013). Dodatek roztworu glukozy (G) nie wpłynął na zmniejszenie liczebności bakterii w porównaniu z wariantami bez glukozy. Przedstawione wyniki dowodzą słuszności szczepienia nasion soi bakteriami bezpośrednio przed siewem. Dla prób kontrolnych maksymalny czas przeżywal-



Fot. 2. Posiewy ilościowe bakterii na szalkach Petriego z próby nasion soi zaprawianej mikroelementowym nawozem nasiennym A2
Photo 2. Bacteria quantitative cultures on Petri dishes from of sample soybean seeds treated with microelement seeds fertilizer A2



Fot. 3. Posiewy ilościowe bakterii na szalkach Petriego z próby nasion soi zaprawianej mikroelementowym nawozem nasiennym A2 z dodatkiem glukozy (G)
Photo 3. Bacteria quantitative cultures on Petri dishes from of sample soybean seeds treated with microelement seeds fertilizer A2 with the addition of glucose (G)

Tabela 1. Wpływ badanych nawozów nasiennych na liczebność bakterii *Bradyrhizobium japonicum* na ziarnie soi w zależności od czasu inkubacji i dodatku glukozy [jtk/g]
Table 1. Impact of the tested seed fertilizers on the number of *Bradyrhizobium japonicum* bacteria on soybeans depending on the incubation time and glucose addition [cfu/g]

Czas inkubacji Incubation time	Liczba bakterii – Number of bacteria [jtk/g]					
	posiew bez dodatku glukozy culture without the addition of glucose			posiew z dodatkiem glukozy (G) culture with the addition of glucose (G)		
	K	A1	A2	K	A1	A2
0 h	$7,6 \times 10^7$	$7,6 \times 10^7$	$7,6 \times 10^6$	$3,9 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$
1 h	$5,1 \times 10^7$	$7,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$3,8 \times 10^7$	$2,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
3 h	$1,5 \times 10^6$	$7,6 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$	$3,5 \times 10^6$	$9,9 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
24 h	$1,2 \times 10^6$	$6,8 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,9 \times 10^6$	$5,6 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$

K – kontrola – control, A1, A2 – nawóz nasienny – seed fertilizer

ności 100% wprowadzonych bakterii na nasiona wynosił 1 godzinę, po tym czasie liczba bakterii znacząco spadła.

Przeprowadzone badania zostały wykonane w sterylnych warunkach laboratoryjnych, bez dostępu czynników zewnętrznych, które występują w warunkach polowych. Liczne badania na temat analizy ilościowej bakterii brodawkowych opisane w literaturze skupiają się przede wszystkim na badaniach terenowych. Równoległe z badaniami laboratoryjnymi prowadzone były również trzyletnie badania dotyczące zaprawiania nasion soi nawozami nasiennymi przeprowadzone w warunkach polowych. Badania te potwierdzają negatywny wpływ stosowania nawozu nasiennego A2, zawierającego w swoim składzie miedź i mangan, na plon soi (Brzezińska i Mrozek-Niećko 2019). Soja, której nasiona zaprawiane były nawozem nasiennym A1, osiągała w warunkach polowych wyższe plony niż soja zaprawiana nawozem A2 lub ta niezaprawiona nawozem przed siewem (próba kontrolna). Aplikacja dolistna mikroelementowym

nawozem A2 wpłynęła korzystnie na prawidłowy rozwój i wyższy plon soi.

Badania polowe prowadzone przez Sosnowskiego i Jankowskiego (2013) wskazują, że stosowanie zwiększonych dawek nawożenia azotowego może działać ograniczająco na rozwój bakterii w glebie. Natywa i wsp. (2014) wskazują, że jedynie pełne nawożenie mineralne (makro- i mikroelementowe) przyczynia się do stworzenia optymalnych warunków bytowania drobnoustrojów w glebie oraz prawidłowego rozwoju roślin. Natomiast Jodełka i wsp. (2008) podają, że dolistne nawożenie mikroelementowe zwiększa liczebność bakterii w glebie w porównaniu z próbami nawożonymi tylko doglebowo. pH nawozów stosowanych doglebowo powinno być obojętne lub słabo alkaliczne (Wielgosz i Szember 2006). pH nawozów nasiennych zastosowanych w badaniach wynosiło 6,0–6,5, niższe pH nawozów oraz wyższe dawki nawożenia azotem mogą ograniczać rozwój bakterii brodawkowych (Frączek 2010; Sosnowski i Jankowski 2013).

Wnioski / Conclusions

1. Stężenie badanych mikroelementowych nawozów nasiennych A1 i A2, stosowanych do zaprawiania nasion soi przed siewem, wpływa na liczebność bakterii *B. japonicum*.
2. Na obniżenie liczby kolonii bakterii (jtk/g) wpływa czas przechowywania nasion soi zaprawionych bakteriami i mikroelementowymi nawozami nasiennymi. Maksymalny spadek liczby bakterii obserwuje się po 3 godzinach inkubacji.
3. Nawóz nasienny zawierający miedź i mangan w każdym zastosowanym w doświadczeniu stężeniu działał toksycznie na bakterie *B. japonicum*.
4. Dodatek glukozy podczas szczepienia nasion nie wpływa ujemnie na liczbę bakterii.

Literatura / References

Alves B., Boddey R., Urquiaga S. 2003. The success of BNF in soybean in Brazil. Plant and Soil 252: 1–9. DOI: 10.1023/A:1024191913296

Bethelenfalvay G., Franson R. 1989. Manganese toxicity alleviated by mycorrhizae in soybean. Journal of Plant Nutrition 12 (8): 953–970. DOI: 10.1080/01904168909364006

Brear E.M., Day D.A., Smith P.M.C. 2013. Iron: an essential micronutrient for the legume-rhizobium symbiosis. Frontiers in Plant Science 4: 359. DOI: 10.3389/fpls.2013.00359

Brzezińska A., Mrozek-Niećko A. 2019. Wpływ zaprawiania nasion nawozem mikroelementowym na zawartość chlorofilu w liściach oraz plon nasion soi. [The effect of seeds treatment with a micronutrient fertilizer on chlorophyll content in leaves and yield of soya]. Fragmenta Agronomica 36 (1): 7–15. DOI: 10.26374/fa.2019.36.01

El-Jaoual T., Cox D.A. 2008. Manganese toxicity in plants. Journal of Plant Nutrition 21 (2): 353–386. DOI: 10.1080/01904169809365409

Ferguson B.J. 2013. The development and regulation of soybean nodules. s. 31–47. W: A Comprehensive Survey of International Soybean Research – Genetics, Physiology, Agronomy, and Nitrogen Relationships (J.E. Board, red.). IntechOpen. Available from: https://www.intechopen.com/books/a-comprehensive-survey-of-international-soybean-research-genetics-physiology--agronomy-and-nitrogen-relationships/the-development-and-regulation-of-soybean-nodules. DOI: 10.5772/52573

Frączek K. 2010. Skład mikrobiocenotyczny drobnoustrojów biorących udział w procesach przemian azotu w glebie w otoczeniu składowiska odpadów komunalnych. [Microbiocoenotic composition of nitrogen processing soil microorganisms around the municipal waste dumping site]. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie / Water-Environment-Rural Areas 10 (2) (30): 61–71.

Gage D.J. 2004. Infection and invasion of root by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68 (2): 280–300. DOI: 10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004

Galus-Barchan A., Chmiel M.J. 2019. Rola drobnoustrojów w pozyskiwaniu przez rośliny składników pokarmowych. Kosmos Problemy Nauk Biologicznych 68 (1): 107–114. DOI: 10.36921/kos.2019_2483

Horiuchi J., Prithviraj B., Bais H.P., Kimball B.A., Vivanco J.M. 2005. Soil nematodes mediate positive interactions between legume plants and rhizobium bacteria. Planta 222 (5): 848–857. DOI: 10.1007/s00425-005-0025-y

Jarecki W., Bobrecka-Jamro D. 2016. Reakcja roślin soi na szczepienie nasion nitraginą oraz nawożenie startowe azotem. [Reaction of soybean plants to the vaccination of seeds with nitragine and initial nitrogen fertilization]. Nauka Przyroda Technologie 10 (1): # 12. DOI: 10.17306/J.NPT.2016.1.12

Jodełka J., Jankowski K., Jakubczak A. 2008. Sezonowe zmiany liczebności drobnoustrojów w strefie ryzosferowej łąki nawożonej doglebowo i dolistnie. [Seasonal changing of the microorganisms in the rhizosphere level of the meadow fertilized to the soil or as foliar]. Polskie Towarzystwo Łąkarskie, Łąkarstwo w Polsce 11: 67–76.

Klama J., Niewiadomska A., Wolna-Maruwka A. 2010. Koinkulacja *in vitro* siewek kukurydzy bakteriami diazotroficznymi. [*In vitro* co-inoculation of maize seedlings with diazotrophic bacteria]. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie / Water--Environment-Rural Areas 10 (2) (30): 103–110.

Korsak-Adamowicz M., Starczewski J., Dopka D. 2007. Oddziaływanie niektórych zabiegów agrotechnicznych na brodawkowanie soi. [Influence of selected agrotechnological operation on soybean noduling]. Fragmenta Agronomica 24 (3) (95): 232–237.

Łotocka B., Golinowski W. 1995. Powstawanie i rozwój brodawek korzeniowych roślin motylkowatych. [Formation and development of legume root nodules]. Kosmos 44 (3–4): 569–578.

Malarska J. 2005. Tradycyjne i nowoczesne metody ilościowego oznaczania drobnoustrojów. [Traditionaland modern methods of quantitatiue detemination of miclo-organisms]. Medycyna Weterynaryjna 61 (10): 1090–1093.

Martens M., Dawyndt P., Coopman R., Gillis M., De Vos P., Willems A. 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58 (1): 200–214. DOI: 10.1099/ijs.0.65392-0

Martyniuk S. 2008. Znaczenie procesu biologicznego wiązania azotu atmosferycznego w rolnictwie ekologicznym. [The importance of biological fixation of atmospheric nitrogen in ecological agriculture]. Journal of Agricultural Engineering 53 (4): 9–14.

Martyniuk S. 2012. Naukowe i praktyczne aspekty symbiozy roślin strączkowych z bakteriami brodawkowymi. [Scientific and practical aspects of legumes symbiosis with root-nodule bacteria]. Polish Journal of Agronomy 9: 17–22.

Martyniuk S., Księżniak A., Jończyk K., Kuś J. 2007. Charakterystyka mikrobiologiczna gleby pod pszenicą ozimą uprawianą w systemie ekologicznym i konwencjonalnym. [Mikrobiological charakteristics of soil under winter wheat cultivated in ecological and conventional systems]. Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering 52 (3): 113–116.

Natywa M., Selwet M., Maciejewski T. 2014. Wpływ wybranych czynników agrotechnicznych na liczebność i aktywność drobnoustrojów glebowych. [Effect of some agrotechnical factors on the numer and activity soil microorganisms]. Fragmenta Agronomica 31 (2): 56–63.

Niewiadomska A., Swędrzyńska D. 2011. Wpływ jednoczesnej inokulacji lucerny (*Medicago sativa* L.) szczepami *Sinorhizobium meliloti* i *Herbaspirillum frisingense* w stosunku do zachodzących interakcji pomiędzy szczepami bakterii. Archives of Environmental Protection 37 (4): 37–47.

Nogueira M., Magalhaes G., Cardoso E. 2007. Manganese toxicity in mycorrhizal and phosphorus-fertilized soybean plants. Journal of Plant Nutrition 27 (1): 141–156. DOI: 10.1081/PLN-120027552

Nomura M., Arunothayanan H., Van dao T. 2010. Differential protein profiles of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 bacteroid during soybean nodule development. Soil Science and Plant Nutrition 56 (4): 579–590. DOI: 10.1111/j.1747-0765.2010.00500.x

Sanchez-Pardo B., Fernandez-Pascual M., Zornoza P. 2012. Copper microlocalisation, ultrastructural alterations and antioxidant responses in the nodules of white lupin and soybean plants grown under conditions of copper excess. Environmental and Experimental Botany 84: 52–60. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2012.04.017

Sosnowski J., Jankowski K. 2013. Ocena liczebności mikroorganizmów glebowych spod uprawy mieszanek *Festulolium braunii* z roślinami motylkowatymi nawożonych zróżnicowanymi dawkami azotu. [Assessment of the numbers of microorganisms from soil under the mixtures of *Festulolium braunii* with legume plants fertilized with varying levels of nitrogen]. Fragmenta Agronomica 30 (4): 129–137.

Stasiak G., Mazur A., Koper P., Żebracki K., Skorupska A. 2016. Symbioza rizobiów z roślinami bobowatymi (Fabaceae). Postępy Mikrobiologii 55 (3): 289–299.

Stojakowska A., Malarz J., Kisiel W., Kohlmünzer S. 1995. Hairy root culture of *Lactuca virosa* L. [Hodowla korzeni włośnikowatych *Lactuca virosa* L.]. Acta Societatis Botanicorum Poloniase 64 (1): 33–39.

Swędrzyńska D., Sawicka A. 2010. Wpływ miedzi na bakterie z rodzaju *Azospirillum* występujące w ryzosferze siewek kukurydzy i pszenicy. [The effect of copper on bacteria of the genus azospirillum in the rhizosphere of maize and wheat seedlings]. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie / Water-Environment-Rural Areas 10 (2) (30): 167–178.

Wielgosz E., Szember A. 2006. Wpływ wybranych roślin na liczebność i aktywność drobnoustrojów glebowych. [The effect of selected plants on the number and activity of soil microorganisms]. Annales Universitatis Maria Curie-Skłodowska, Sectio E, 61: 107–119.