

Wykorzystanie kwasu kumarowego i ferulowego jako jedynego źródła węgla przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* wiążące wolny azot

Anna Gałązka, Małgorzata Łyszcz, Andrzej Perzyński

Zakład Mikrobiologii Rolniczej

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

Abstrakt. Obecność odpowiednio wyselekcjonowanych szczepów bakterii w ryzosferze ma pozytywny wpływ na kiełkowanie, wzrost i rozwój roślin. Szczepy bakterii z rodzaju *Azospirillum* są zdolne do wiązania azotu przy wykorzystaniu jako jedynego źródła węgla kwasów organicznych i ich soli, jak również węglowodorów i cukrów. Celem pracy była ocena wykorzystania kwasu ferulowego i kumarowego jako jedynych źródeł węgla w procesie wiązania wolnego azotu przez 12 szczepów bakterii z rodzaju *Azospirillum*. Szczepy te wyizolowano z endoryzosfery jęczmienia jarego (*Hordeum sativum* L.): 12/6, 1/7 i 15/7, kukurydzy (*Zea mays* L.): 4B, 23B, 35Bb, 48B, 77Bb1, 83B1 i trawy nadmorskiej z okolic Sobieszewa (*Elymus arenarius* L.): 29S, 36S, 42S. Szczepy te należały do gatunków: *A. amasoense* i *A. brasilense*. Wszystkie szczepy bakterii z rodzaju *Azospirillum* wiązały azot przy wykorzystaniu kwasu ferulowego i kumarowego jako jedynego źródła węgla. Wyniki badań przedstawiono jako aktywność nitrogenazy po 168 h hodowli “głodzonych” szczepów bakterii *Azospirillum* przy wykorzystaniu powyższych kwasów.

Aktywność nitrogenazy szczepów *Azospirillum* była bardzo zróżnicowana i zależała zarówno od gatunku szczepu, jak i czasu hodowli. Największą aktywność nitrogenazy stwierdzono u szczepów wyizolowanych z ryzosfery jęczmienia jarego przy wykorzystaniu kwasu ferulowego jako jedynego źródła węgla i energii (szczep 1/7 – $824,32 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \cdot 24 \text{ h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej, po 24 h inkubacji). W przypadku szczepów wyizolowanych z endoryzosfery kukurydzy najwyższą aktywnością nitrogenazy charakteryzował się szczep 4B ($715,14 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \cdot 24 \text{ h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej, po 24 h inkubacji). Szczepy z najniższą aktywnością nitrogenazy pochodziły z endoryzosfery trawy *Elymus arenarius*, gdzie najwyższą aktywnością nitrogenazy charakteryzował się szczep 29S przy wykorzystaniu kwasu ferulowego jako jedynego źródła węgla ($274,56 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \cdot 24 \text{ h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej). Badania *in vitro* wpływu różnych źródeł węgla na aktywność nitrogenazy szczepów bakterii z rodzaju *Azospirillum* pozwolą lepiej zrozumieć ich rolę i znaczenie w ryzosferze roślin.

słowa kluczowe: kwas ferulowy, kwas kumarowy, aktywność nitrogenazy, *Azospirillum* spp.

Autor do kontaktu:

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

WSTĘP

Wzrost i rozwój roślin w środowisku naturalnym jest uwarunkowany przez czynniki biotyczne i abiotyczne. Wśród czynników biotycznych najważniejszą rolę pełnią mikroorganizmy. Drobnoustroje glebowe wykazujące dużą aktywność fizjologiczną zasiedlają głównie strefę w pobliżu korzeni roślin tworzącą specyficzną niszę ekologiczną (Pisarska, Pietr, 2014). Korzenie roślin wydzielają wiele związków organicznych, które stymulują rozwój bakterii, co ma istotny wpływ na skład mikrobiomu ryzosfery (Grayston i in., 1998; Miethling i in., 2000; Gaiero i in., 2013; Gałązka i in., 2015). Wydzieliny korzeniowe stanowią źródło węgla i energii dla mikroorganizmów (Vettori i in., 2010; Ma i in., 2011; Napora i in., 2015), natomiast drobnoustroje metabolizując składniki odżywcze udostępniają je roślinie (Napora i in., 2015; Pisarska, Pietr, 2014). Istotną rolę w zwiększeniu efektywności wzrostu roślin w środowisku naturalnym odgrywają także mikroorganizmy, które wchodzą w specyficzny rodzaj symbiozy, zwany endosymbiozą (Tortora i in., 2011; Pisarska, Pietr, 2014).

Bakterie z rodzaju *Azospirillum* należą do jednych z najlepiej przebadanych ryzobakterii stymulujących wzrost roślin (PGPR – plant growth-promoting rhizobacteria) (Gałązka i in., 2015a, 2015b). Są to endofity fakultatywne, czyli mikroorganizmy występujące zarówno w glebie, jak również zdolne do kolonizacji zewnętrznych i wewnętrznych tkanek roślinnych (Rodrigues i in., 2015; Kłama, 2004; Pisarska, Pietr, 2014; Król, 2006; Gaiero i in., 2013; Gałązka i in., 2015).

Azospirillum spp. są Gram-ujemne i należą do klasy α -Proteobacteria, w której znajdują się także inne grupy mikroorganizmów wpływających na wzrost roślin, jak: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* oraz *Glucacetobacter* (Rodrigues i in., 2015; Król, 2006). *Azospirillum* są szeroko rozpowszechnione na całym świecie i występują w dużych ilościach nawet do 10^7 komórek g^{-1} gleby ryzosferowej (Hartmann, Baldani, 2006) oraz w asocjacji z korzeniami, łodygami i liśćmi różnych roślin

(głównie zbóż i traw) uprawianych zarówno w klimacie umiarkowanym, jak i tropikalnym (Rodrigues i in., 2015; Król, 2006; Hartmann, Baldani, 2006). Odgrywają one znaczącą rolę w rolnictwie, gdyż posiadają zdolność wiązania azotu (*biological nitrogen fixation* – BNF), zwalczania chorób roślinnych (bioprotektanty), poprawy zaopatrzenia roślin w składniki odżywcze (bionawozy) oraz produkcji fitohormonów (biostymulatory) (Rodrigues i in., 2015).

Związki fenolowe stanowią szeroko rozpowszechnioną w świecie roślin grupę metabolitów wtórnych. Na szczególną uwagę zasługują funkcje biologiczne tych związków, wyrażające się aktywnością antyoksydacyjną i antyrodnicową (Peterson, 2001). Kwasy fenolowe, takie jak: kwas kawowy, ferulowy, *p*-kumarowy, *o*-kumarowy, *p*-hydroksybenzoesowy, syringinowy, wanilinowy, występują powszechnie zarówno w tkankach roślin (pszenicy, jęczmienia, owsa, ryżu, sorgo i innych), jak i w glebie, w której są one uprawiane (Gałązka, 2013; Pocięjowska i in., 2014).

Związki fenolowe stanowią jedną z klas metabolitów wtórnych, które są bezpośrednio zaangażowane w podstawowe procesy biochemiczne regulujące wzrost, rozwój i reprodukcję roślin, w których są wytwarzane. Synteza i dalsze przemiany tych związków zależą od stadium rozwojowego rośliny, a także od bodźców pochodzących z otaczającego środowiska.

Kwas ferulowy (kwas 4-hydroksy-5-metoksycynamonowy) jest pochodną kwasu cynamonowego, występuje naturalnie w stanie wolnym i w postaci estrów w wielu roślinach, głównie w liściach, nasionach i korze drzew iglastych, w ziarnach pszenicy, ryżu, kukurydzy i żyta (Lin i in., 2005). Kwas *p*-kumarowy jest jednym z głównych budulców lignocelulozy z grupy aromatycznych hydroksykwasów. Ze względu na położenie grupy hydroksylowej można wyróżnić trzy izomery: orto, meta i para. Różny poziom aktywności przeciwutleniającej kwasu kawowego, ferulowego i *p*-kumarowego jest związany z ich strukturą chemiczną – zależy od liczby grup hydroksylowych w cząsteczce i jest wyższy wówczas, gdy są one zestryfikowane (Zupfer i in., 1998). Kwas synapinowy z dwiema grupami metoksyłowymi jest bardziej aktywny niż ferulowy (jedna grupa metoksylova), a ten jest aktywniejszy niż kwas kumarowy (jedna grupa hydroksylova). Pochodne kwasu hydroksycynamonowego – kwas *p*-kumarowy i ferulowy mają zdolność do wiązania wolnych rodników tiolowych.

Obecność tych związków została stwierdzona w zewnętrznej warstwie ziarniaków zbóż, które jest bogate w związki fenolowe, głównie w kwasy fenolowe, tj. kwas ferulowy, wanilinowy, *p*-kumarowy i kawowy (Peterson, 2001). Spośród kwasów fenolowych w największej ilości występuje kwas ferulowy, połączony za pomocą wiązania estrowego z resztą α -L-arabinozy łańcucha arabinoksyłanowego roślinnej ściany komórkowej (Zupfer i in., 1998). Rozkład związków fenolowych przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* jest mało zbadany. Wstępne badania dotyczące wykorzystywania drobnoustrojów w rozkładzie związków

fenolowych prowadzone były w wielu ośrodkach badawczych na całym świecie. Jako modelowe mikroorganizmy degradujące związki fenolowe z wykorzystaniem ich jako jedyne źródła węgla i energii stosowano bakterie z rodzaju: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Rhodococcus*, *Phanerochaete* (Król, 2006). W dostępnej literaturze brak jednak danych dotyczących rozkładu związków fenolowych przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. Gałązka i in. w roku 2010 przeprowadzili wstępne badania aktywności nitrogenazy szczepów z rodzaju *Azospirillum* spp. przy wykorzystaniu kwasu syringowego i kawowego jako źródła węgla i energii (Gałązka i in., 2010). Niniejsza publikacja stanowi kontynuację tych badań w oparciu o wykorzystanie kwasu ferulowego i kumarowego w wiązaniu azotu przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*.

Celem niniejszej pracy były badania aktywności nitrogenazy szczepów bakterii z rodzaju *Azospirillum* hodowanych w pożywkach bezazotowych z kwasem ferulowym i kumarowym jako jedynym źródłem węgla i energii.

MATERIAŁY I METODY

Szczepy bakterii *Azospirillum* spp. badano, określając wykorzystywanie kwasu ferulowego i kumarowego jako jedyne źródła węgla, podczas wzrostu i wiązania azotu w ciągu 168 godzin na pożywce mineralnej, bezazotowej (Döbereiner, 1988) z tymi kwasami, w dawce $5 \text{ g} \cdot 1000 \text{ cm}^{-3}$ z dodatkiem węglanu wapnia (CaCO_3) w dawce $3 \text{ g} \cdot 1000 \text{ cm}^{-3}$. Bakterie po zmyciu solą fizjologiczną ze skosów ziemniaczanych były głodzone przez 15 godzin na pożywce bez źródła węgla (w celu wykorzystania endogennych zapasów). Następnie przenoszono je na półpłynne podłoże z badanym kwasem i oznaczano aktywność nitrogenazy. Hodowle prowadzono w dwóch powtórzeniach w temperaturze 30°C . Określano liczebność bakterii (przeżywalność) na agarze odżywczym i ziemniaczanym po głodzeniu i po 7-dniowej hodowli komórek w podłożu z tymi kwasami. Jako kontrolę stosowano wyjściową liczebność bakterii na tych samych podłożach. Hodowle na płytkach prowadzono w trzech powtórzeniach.

W badaniach wykorzystano 12 szczepów bakterii *Azospirillum* spp., wyizolowanych z endoryzofery jęczmienia jarego (*Hordeum sativum*): 12/6, 1/7 i 15/7, kukurydzy (*Zea mays*): 4B, 23B, 35Bb, 48B, 77Bb1 i 83B1, wydmuchrzycy piaskowej (*Elymus arenarius*): 29S, 36S i 42S z wydm nadbałtyckich, które wcześniej przebadano pod kątem rozkładu związków ropopochodnych (Król, Perzyński, 2004).

Aktywność nitrogenazy szczepów *Azospirillum* spp. oznaczano metodą redukcji acetyleny na chromatografie gazowym PAY UNICAM - 204 (detektor płomieniowo-jonizacyjny FID. Kolumna szklana, długości 2,1 m, wypełnienie Poropak Q 80-120 mesh. Temperatury: dozownik 135°C , detektor 125°C , kolumna 60°C . Jako gaz nośny stosowano odtleniony azot, zawartość O_2 poniżej $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Bakterie hodowano w kalibrowanych buteleczkach zawierających 6 cm³ bezazotowego, półpłynnego podłoża z kwasami i inkubowano przez 168 godzin w atmosferze 10% acetyleny w temp. 30°C (pojemność fazy gazowej 7 cm³). Pomiary redukcji acetyleny do etyleny oznaczano po 2, 24, 48, 72, 86, 120, 144 i 168 godzinach inkubacji. Hodowlę prowadzono w trzech powtórzeniach w temperaturze 30°C. Jako kontrolę stosowano podłoża nie szczepione z kwasem i bez niego.

W celu oszacowania istotnych różnic pomiędzy średnimi zastosowano test t-studenta, przyjęto poziom ufności 0,95. Do statystycznej oceny wyników wykorzystano pakiet programów STATISTICA.PL (7) (Stat. Soft. Inc.).

WYNIKI I DYKUSJA

Bakterie z rodzaju *Azospirillum* wykorzystują przy wiązaniu azotu różne źródła węgla: kwasy organiczne i ich sole, jak również różne cukry (Hardoim i in., 2008; Mendes i in., 2012), a także wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (Król, Perzyński, 2002). Bakterie z rodzaju *Azospirillum* były także z powodzeniem wykorzystywane w procesach bioremediacji gleb skażonych wielopierścieniowymi węglowodarami aromatycznymi (Gałązka i in., 2012; Gałązka, Gałązka, 2015). Wiązanie azotu w korzeniach roślin szczepionych *Azospirillum* spp. było badane w doświadczeniach polowych i *in vitro*, ale wyniki tych badań nie były porównywalne. Wynika to między innymi z korzystania przez bakterie z różnych rodzajów węgla zawartego w substratach wydzielin korzeniowych, które mają duży wpływ na wiązanie azotu w ryzosferze (Król, Perzyński, 2004) i na aktywność nitrogenazy tych bakterii. Obliczenia statystyczne potwierdzają zróżnicowanie średnich wartości aktywności nitrogenazy szczepów bakterii *Azospirillum* spp. (tab. 1, 2) otrzymanych w czasie 168 godzin inkubacji podczas hodowli w pożywkach bezazotowych z kwasami fenolowymi jako jedynym źródłem węgla. Szczepy bakterii *Azospirillum* spp. wyizolowane z endoryzofery jęczmienia jarego i kukurydzy charakteryzowały się wysoką aktywnością nitrogenazy podczas wzrostu w podłożach bezazotowych zawierających kwas ferulowy i kumarowy jako jedyne źródła węgla i energii.

Na podstawie badań genetycznych szczepów *Azospirillum* spp. (15/7, 12/6 i 77Bb1) zidentyfikowano geny dla nitrogenazy (Gałązka, Gałązka, 2015). Reakcja PCR z wykorzystaniem starterów homologicznych do fragmentu tego genu wykazała, że zawierają one informację genetyczną niezbędną dla wiązania azotu. Otrzymano 100% zgodności w genie 16S rDNA w przypadku szczepów 1/7 i 12/6 dla gatunku *Azospirillum brasilense*, oraz 100% zgodności w przypadku szczepów 35Bb, 83B1, 77Bb1, 4B, 36S i 15/7 dla gatunku *Azospirillum amoazeense*.

Najwyższe aktywności nitrogenazy szczepów stwierdzono po 24 i 48 godzinach inkubacji. Po upływie 120–144 godzin aktywność nitrogenazy statystycznie istotnie

zmniejszyła się. Bakterie z rodzaju *Azospirillum* aktywnie wykorzystywały kwasy fenolowe jako jedyne źródło węgla i energii. Redukcja acetyleny niektórych szczepów w przypadku kwasu ferulowego była bardzo wysoka. Szczególnie

Tabela 1. Średnie wartości aktywności nitrogenazy szczepów bakterii *Azospirillum* spp. hodowanych w pożywkach bezazotowych z kwasami fenolowymi jako jedynym źródłem węgla (n=24) (nM C₂H₄·h⁻¹·cm⁻³ fazy gazowej).

Table 1. The nitrogenase activity of *Azospirillum* species grown in semisolid media with phenolic acids (n = 24) (nM C₂H₄·h⁻¹·cm⁻³ of gas phase).

Szczep Strain	Źródło węgla; Carbon source	
	kwas ferulowy ferulic acid	kwas kumarowy coumaric acid
12/6	349,57 a	241,01 a
1/7	236,67 a	156,95 b
15/7	142,08 b	63,89 c
4B	94,12 c	102,58 b
23B	90,381 c	101,91 b
35Bb	48,13 c	133,49 b
48B	297,91 a	193,23 a
77Bb1	202,80 a	185,35 a
83B1	212,05 a	220,06 a
29S	171,75 a b	127,37 b
36S	107,00 b	202,34 a
42S	241,53 a	101,61 b

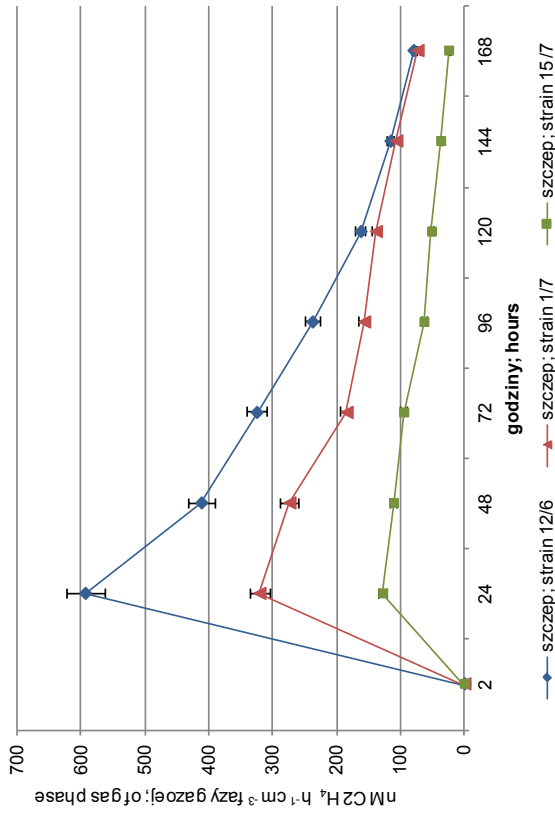
Wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($\alpha \leq 0,05$); Values with different letters are significantly different ($\alpha \leq 0,05$)

Tabela 2. Średnie wartości aktywności nitrogenazy szczepów bakterii *Azospirillum* spp., w czasie 168 godzin inkubacji, hodowanych w pożywkach bezazotowych z kwasami fenolowymi jako jedynym źródłem węgla (n=288) (nM C₂H₄·h⁻¹·cm⁻³ fazy gazowej).

Table 2. Average values of nitrogenase activities of *Azospirillum* species grown in semisolid media with phenolic acids (n = 288) in 168 h incubation time (nM C₂H₄·h⁻¹·cm⁻³ of gas phase).

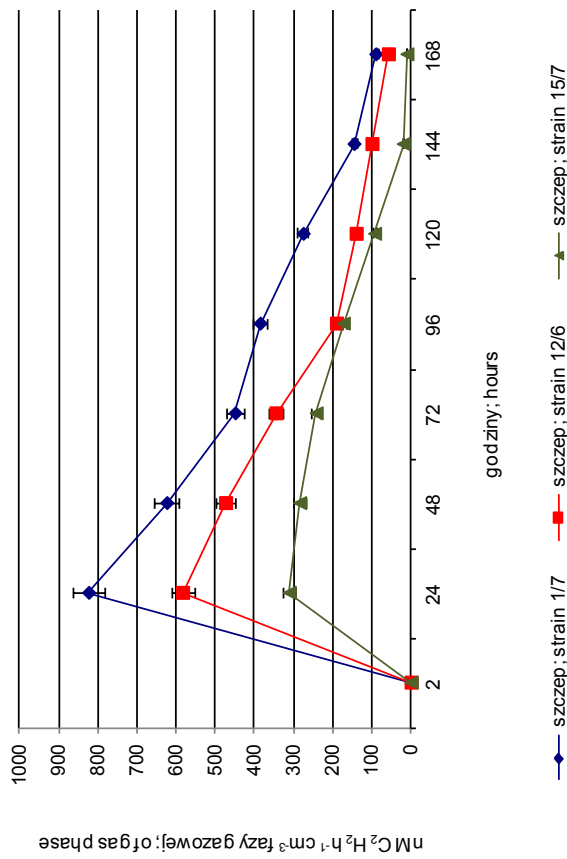
Czas Time	Źródło węgla; carbon source	
	kwas ferulowy ferulic acid	kwas kumarowy coumaric acid
2	0	0
24	430,05 a	266,44 a
48	349,26 a	272,80 a
72	277,41 a	226,22 a
96	187,33 b	186,26 a
120	122,80 b	129,62 b
144	61,66 c	87,68 b
168	34,16 c	50,82 c

Wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie ($\alpha \leq 0,05$); Values with different letters are significantly different ($\alpha \leq 0,05$)



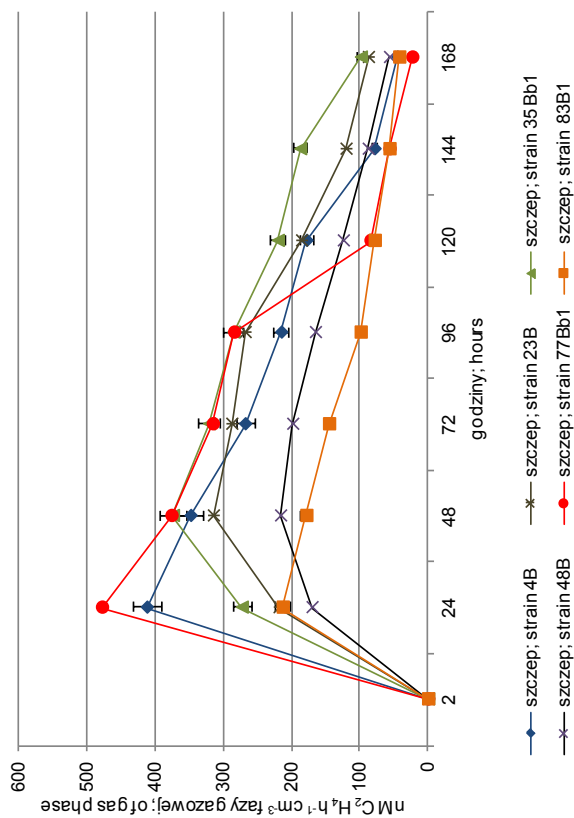
Rysunek 2. Aktywność nitrogenazy bakterii *Azospirillum* spp., wyizolowanych z endoryzofery jęczmienia hodowanych w pożywce bezazotowej z kwasem p-kumarowym jako jedynym źródłem węgla.

Figure 2. The nitrogenase activity of the bacteria strains of *Azospirillum* species, isolated from endorizosphere of barley grown in nitrogen-free medium with p-coumaric acid as the sole carbon source.



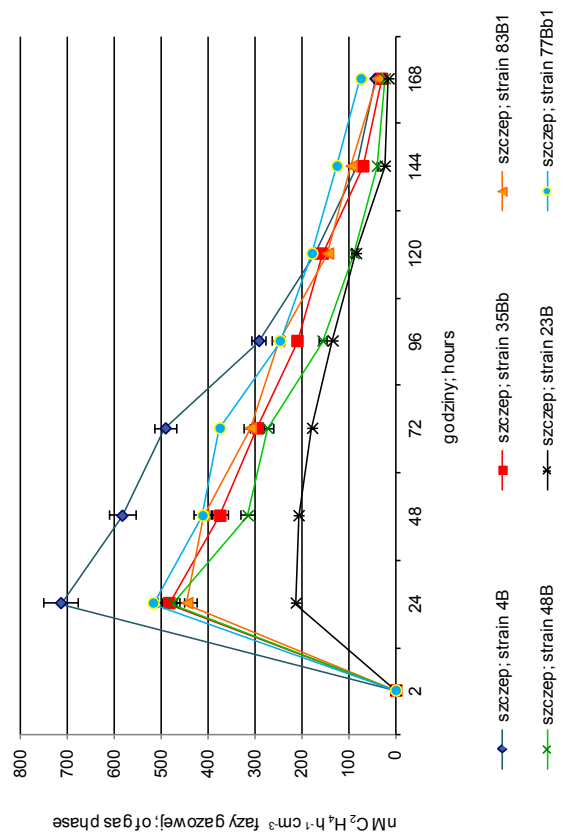
Rysunek 1. Aktywność nitrogenazy bakterii *Azospirillum* spp. wyizolowanych z endoryzofery jęczmienia hodowanych w pożywce bezazotowej z kwasem ferulowym jako jedynym źródłem węgla.

Figure 1. The nitrogenase activity of the bacteria strains of *Azospirillum* species, isolated from endorizosphere of barley grown in nitrogen-free medium with ferulic acid as the sole carbon source.



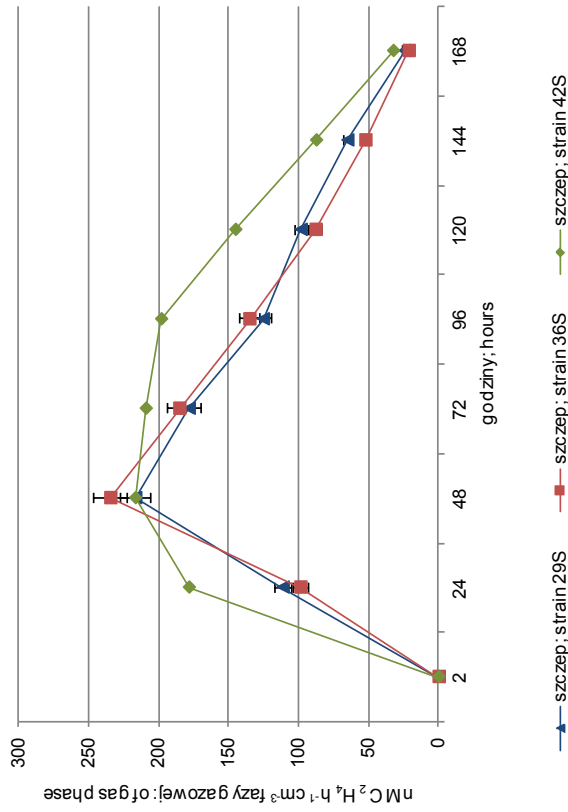
Rysunek 4. Aktywność nitrogenazy bakterii *Azospirillum* spp., wyizolowanych z endoryzosfery kukurydzy, hodowanych w pożywce bezazotowej z kwasem p-kumarowym jako jedynym źródłem węgla.

Figure 4. The nitrogenase activity of the bacteria strains of *Azospirillum* species, isolated from endorizosphere of maize grown in nitrogen-free medium with p-coumaric acid as the sole carbon source.

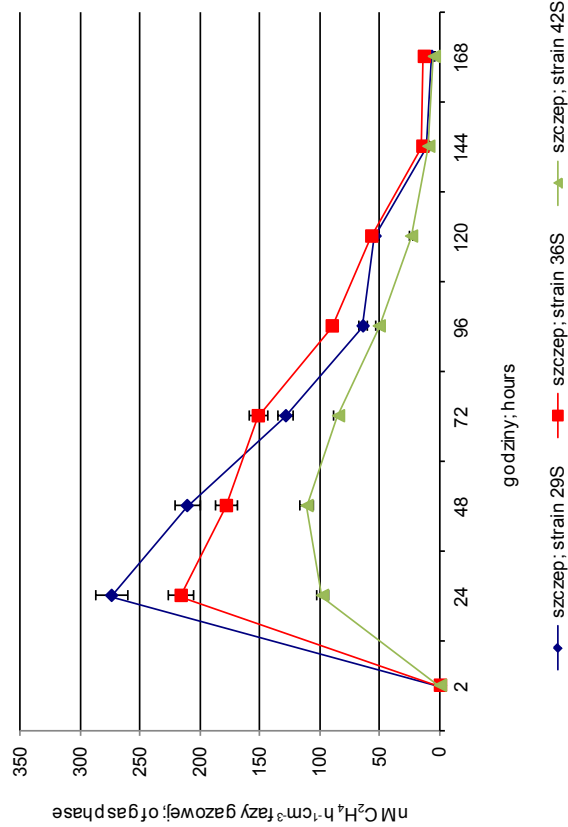


Rysunek 3. Aktywność nitrogenazy bakterii *Azospirillum* spp. wyizolowanych z endoryzosfery kukurydzy, hodowanych w pożywce bezazotowej z kwasem ferulowym jako jedynym źródłem węgla.

Figure 3. The nitrogenase activity of the bacteria strains of *Azospirillum* species, isolated from endorizosphere of maize grown in nitrogen-free medium with ferulic acid as the sole carbon source.



Rysunek 6. Aktywność nitrogenazy bakterii *Azospirillum* spp., wyizolowanych z endoryzofery wdmuchrzycy piaskowej, hodowanych w pożywce bezazotowej z kwasem p-kumarowym jako jedynym źródłem węgla.
 Figure 6. The nitrogenase activity of the bacteria strains of *Azospirillum* species, isolated from endorizosphere of lyme grass grown in nitrogen-free medium with p-coumaric acid as the sole carbon source.



Rysunek 5. Aktywność nitrogenazy bakterii *Azospirillum* spp., wyizolowanych z endoryzofery wdmuchrzycy piaskowej, hodowanych w pożywce bezazotowej z kwasem ferulowym jako jedynym źródłem węgla.
 Figure 5. The nitrogenase activity of the bacteria strains of *Azospirillum* species, isolated from endorizosphere of lyme grass grown in nitrogen-free medium with ferulic acid as the sole carbon source.

aktywne były szczepy bakterii wyizolowane z endoryzosfery jęczmienia jarego i kukurydzy, których aktywność nitrogenazy mieściła się w zakresie 200–850 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej (szczep 1/7 – 349,57 $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej; szczep 4B – 715,14 $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej). Z kolei w przypadku kwasu kumarowego uzyskano niższą aktywność nitrogenazy, szczególnie wśród szczepów wyizolowanych z endoryzosfery kukurydzy i wydmuchrzy cy piaskowej, gdzie aktywność nitrogenazy mieściła się w granicach 100–350 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej. W pracach Król i Perzyńskiego (2002, 2004) najwyższą aktywność nitrogenazy przy wykorzystywaniu m.in. nadtalenu, antracenu i pirenu stwierdzono u szczepów 83B1 i 77Bb1 między 48- a 120-godzinnym okresem inkubacji.

Szczepy pochodzące z endoryzosfery jęczmienia jarego (*Hordeum sativum*) wiązały aktywnie N_2 w hodowlach bezazotowych z kwasem ferulowym (rys. 1). Aktywność szczepu 1/7 już po 24 godz. była bardzo wysoka i wynosiła 824,32 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej i nie spadła poniżej 100 nM nawet po 168 h hodowli komórek. Podobnie szczep 12/6 wiązał aktywnie azot, od 584,24 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej po 24 h do 100,09 nM po 144 h hodowli komórek. Najniższą aktywność wiązania azotu odnotowano dla szczepu 15/7, w granicach od 311,42 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej po 24 godz., zaś po 144 h aktywność spadła do 15,19 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej (rys. 1). Te same szczepy w doświadczeniu z kwasem kumarowym wykazały równie aktywne wiązanie azotu przy wykorzystywaniu tegoż związku jako jedyne źródła węgla (rys. 2). Szczep 12/6 wykazywał najwyższą aktywność w początkowych godzinach doświadczenia wynoszącą po 24 godzinach 594,11 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej i utrzymującej się po 48 godzinach na poziomie 412,15 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej. Szczepy 1/7 i 15/7 wykazywały znacznie niższą aktywność nitrogenazy przy wykorzystywaniu kwasu kumarowego jako jedyne źródła węgla mieszczącą się w zakresie 100–300 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej.

Ze szczepów pochodzących z endoryzosfery kukurydzy wszystkie wiązały wolny azot zarówno w hodowlach z kwasem ferulowym, jak i kumarowym, przy czym aktywność ich przy wykorzystywaniu kwasu kumarowego jako jedyne źródła węgla była istotnie niższa (rys. 3 i 4). Najwyższe aktywności redukcji acetyleny przy wykorzystaniu kwasu ferulowego uzyskano dla szczepu 4B, gdzie już po 24 h jego aktywność wynosiła 715,14 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej i utrzymywała się na wysokim poziomie aż do 120 godzin inkubacji. Aktywność pozostałych szczepów przy wykorzystywaniu kwasu ferulowego mieściła się w zakresie 200–400 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ po 24 godzinach. W przypadku wykorzystywania kwasu kumarowego jako jedyne źródła węgla redukcja acetyleny przez szczep 4B mieściła się w zakresie od 412,32 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej po 24 h do 93,23 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ po 144 godz.

Spośród szczepów wyizolowanych z endoryzosfery wydmuchrzy cy piaskowej najwyższą aktywność nitrogenazy przy wykorzystaniu kwasu ferulowego jako jedyne źródła węgla już po 24 godzinach wykazał szczep 29S (274,56 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej) (rys. 5). W przypadku aktywności nitrogenazy przy wykorzystaniu kwasu kumarowego najwyższą aktywność uzyskano dopiero po 48 godzinach inkubacji, która dla szczepu 36S wynosiła 234,46 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej (rys. 6).

Fenolowe oksydazy są szeroko rozpowszechnione wśród grzybów i roślin wyższych. Po raz pierwszy ten enzym został opisany u szczepu *Azospirillum lipoferum* 4T, wyizolowanego z ryzofery ryżu (Król, 2006; Bashan, de-Bashan, 2010; do Carmo i in., 2012). Lakkaza utlenia różne związki fenolowe do *para* lub *orto*-chinonów, w tym przypadku do 2,6-dimetoksy-1,4-benzochinonu. Przekształcanie związków fenolowych przez wyciągi enzymatyczne mieszanek szczepów *A. lipoferum* 4Bp i 4T oraz grzybową lakkazę *Pyricularia oryzae* było badane przez Hartmann i Baldani (2006). W tym samym czasie wyizolowano z ryzofery i ryzoplany różnych roślin 31 szczepów bakterii z gatunków *A. brasilense* i *A. lipoferum*, które miały zdolność degradacji fenoli (Miethling i in., 2000). Jedne szczepy metabolizowały benzoesyany, inne fenol. Kilka lat później autorzy podali informację o wyizolowaniu z gleby zanieczyszczonej smołą i olejem napędowym *Azospirillum brasilense* ZM-87 (Marchenko i in., 2001).

Szczepy bakterii z rodzaju *Azospirillum* wyizolowane ze strefy korzeniowej i wnętrza korzeni tych roślin mogą być prawdopodobnie używane jako szczepionki, szczególnie wykorzystywane do roślin zbożowych, a ich zdolność do degradacji związków fenolowych syntetyzowanych przez rośliny zwiększa prawdopodobieństwo nabycia przez roślinę odporności na infekcję patogenami zbóż.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Szczepy bakterii z rodzaju *Azospirillum* wyizolowane ze strefy korzeniowej i wnętrza korzeni roślin mogą być prawdopodobnie używane jako szczepionki, szczególnie dla roślin zbożowych, a ich zdolność do degradacji związków fenolowych syntetyzowanych przez rośliny zwiększa prawdopodobieństwo nabycia przez roślinę odporności na infekcję patogenami zbóż.

2. Najwyższą aktywność nitrogenazy stwierdzono po 24 h inkubacji szczepów na podłożu zawierającym kwas ferulowy. W przypadku kwasu kumarowego uzyskano niższą w porównaniu do kwasu ferulowego aktywność nitrogenazy, mieszczącą się w granicach 100–350 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej).

3. Szczepy charakteryzujące się najwyższą aktywnością nitrogenazy przy wykorzystaniu jako źródła węgla kwasu ferulowego i kumarowego wyizolowano z endoryzosfery jęczmienia jarego.

LITERATURA

- Bashan Y., de-Bashan L.E., 2010.** How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth – A Critical Assessment. *Advances in Agronomy*, 108: 77-136.
- 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.
- Becking, J. H., 1963.** Fixation of molecular nitrogen by an aerobic *Vibrio* or *Spirillum*. *Antonie van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology and Serology*, 29: 326.
- Döbereiner J., Marriel J. E., Nery M., 1979.** Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology*, 22: 1464-1474.
- do Carmo Lana M., Dartora J., Marini D., Hann J.E., 2012.** Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. *Revista Ceres Ceres, Viçosa*, 59(3): 399-405.
- Döbereiner J., 1988.** Isolation and identification of root associated diazotrophs. *Plant and Soil*, 110: 202-212.
- Gaiero J.R., Mccall C.A., Thompson K. A., Day N. J., Best A. S., Dunfield K.E., 2013.** Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 100(9): 1738-1750.
- Galązka A., 2013.** Przemiany związków fenolowych a rola amoniakolizacji L-fenylalaninowej (PAL) w indukcji mechanizmów obronnych rośliny. *Polish Journal of Agronomy*, 15: 83-88.
- Galązka A., Bigos J., Siebielec S., 2015.** Promowanie wzrostu roślin przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* oraz ich zastosowanie w rolnictwie. *Polish Journal of Agronomy*, 23: 48-62.
- Galązka A., Bigos J., Siebielec S., 2015.** Systematyka, genetyka i biologia bakterii z rodzaju *Azospirillum*. *Polish Journal of Agronomy*, 23: 31-47.
- Galązka A., Galązka 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.
- Galązka 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(2): 345-353.
- Galązka A., Król M., Perzyński A., 2010.** Wykorzystanie kwasów fenolowych jako jedynej źródła węgla przez bakterie z rodzaju *azospirillum* wiążące azot. *Nauka Przyroda Technologie*, 4, 6, #78.
- Grayston S.J., Ang S.W, Ampbell C.D.C., Dwards A.C.E., 1998.** Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*, 30: 369-378.
- Hardoim P.R., Van Ovebeek L.S., Van Elsas J.D., 2008.** Properties of bacterial endophytes and their role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16: 463-471.
- Hartmann A., Baldani J.I., 2006.** The Genus *Azospirillum*. *Prokaryotes*, 5: 115-140.
- Klama J., 2004.** Współżycie endofitów bakteryjnych z roślinami. *Acta Scientiarum Polonorum, Agricultura*, 3(1): 19-28.
- Król M., 2006.** *Azospirillum* – asocjacyjne bakterie wiążące azot. *Monografie i rozprawy naukowe IUNG-PIB, Puławy*, 15: 45-55, 66-74.
- Król M.J., Perzyński A., 2004.** Wykorzystanie antracenu w wiązaniu wolnego azotu przez bakterie diazotroficzne. *Acta Agraria et Silvestria*, 42: 229-237.
- Lin F.H., Lin J.Y., Gupta R.D., Tournas J.A., Burch J.A., Selim M.A., Monteiro-Riviere N.A., Grichnik J. M., Zielinski J., Pinnell S. R., 2005.** Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(4): 12-13.
- Ma Y., Prasad M.N., Rajkumar M., Freitas H., 2011.** Plant Growth Promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*, 29: 248-258.
- Marchenko A.I., Vorobyov A.V., Dyadishev N.R., Socolov M.S., 2011.** Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in plant rhizosphere. ss. 465-467. W: *Biogeochemical processes and cycling of elements in the environment*; wyd. Polish Society of Humic Substances, Wrocław.
- Mendes R., Kruijt M., De Bruijn I., Dekkers E., Van Der Voort M., Schneider J.H.M., Piceno Y.M., et al., 2011.** Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332: 1097-1100.
- Miethling R., Wieland G., Backhaus H., Tebbe A., 2000.** Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microbial Ecology*, 41: 43-56.
- Napora A., Kacprzak M., Nowak K., Grobelak A., 2015.** Wpływ bakterii endofitycznych na promowanie wzrostu roślin w warunkach stresowych. *Postępy Biochemii*, ss. 398-402.
- Peterson D.M., Emmons C.L., Hibbs A.H., 2001.** Phenolic antioxidant and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. *Journal of Cereal Science*, 33: 97-103.
- Pisarska K., Pietr S.J., 2014.** Bakterie endofityczne – ich pochodzenie i interakcje z roślinami. *Postępy Mikrobiologii*, 53(2): 141-151.
- Pociejowska M., Natywa M., Galązka A., 2014.** Stymulacja wzrostu roślin przez bakterie PGPR. *KOSMOS Problemy Nauk Biologicznych*, 64(4), (305), 603-610.
- Rodrigues A.C., Bonifacio A., de Araujo F.F., Lira Junior M.A., Figueiredo M.B., 2015.** *Azospirillum* sp. as a Challenge for Agriculture. ss. 29-51. W: *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem*, D.K. Maheshwari, Springer International Publishing Switzerland.
- Tortora M.L., Díaz-Ricci J.C., Pedraza R.O., 2011.** *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology*, 193: 275-286.
- Vettori L., Felici C., Russo A., Morini S., Toffanin A., Cummings S., 2010.** Biocontrol activity of *Azospirillum brasilense* Sp 245 against *Rhizoctonia solani* by in vitro/ in vivo tests, DGGE analysis. *Journal of Biotechnology*, 150: 503-503.

A. Gałązka, M. Łyszcz, A. Perzyński

UTILISATION OF FERULIC AND COUMARIC ACIDS AS THE SOLE CARBON SOURCE
IN FIXATION OF NITROGEN BY *AZOSPIRILLUM*

Summary

The presence of properly selected strains of bacteria in the rhizosphere has a positive effect on the germination, growth and development of plants. The strains of bacteria of *Azospirillum* genus are able to fix nitrogen using organic acids and their salts, hydrocarbons, and sugars as the sole sources of carbon. The aim of the work was to assess the use of ferulic and coumaric acids as sole carbon sources in the binding of free nitrogen by 12 strains of *Azospirillum* bacteria. These strains were isolated from the endorhizosphere of spring barley (*Hordeum sativum* L.): 12/6, 1/7 and 15/7, maize (*Zea mays* L.): 4B, 23B, 35Bb, 48B, 77Bb1, 83B1 and dune grass growing near Sobieszewo, Poland (*Elymus arenarius* L.): 29S, 36S, 42S. These strains belonged to the species: *A. amasoense* and *A. brasilense*. All the strains of *Azospirillum* bacteria bound nitrogen using ferulic and coumaric acid as their sole carbon source. The results of the surveys were presented as nitrogenase activity after 168 h of growing “starved” strains of *Azospirillum* bacteria using these acids.

Nitrogenase activity of the *Azospirillum* strains was very diverse and depended on both the strain species and the time of breeding. The highest nitrogenase activity was recorded for the strains isolated from the rhizosphere of spring barley using ferulic acid as the sole source of carbon and energy (strain 1/7 – 824,32 nM C₂H₄ 24 h⁻¹ cm⁻³ of gas phase, after 24 h incubation). Among the strains isolated from the endorhizosphere of maize, the highest nitrogenase activity was noted for the strain 4B (715,14 nM C₂H₄ 24 h⁻¹ cm⁻³ of gas phase, after 24 h of incubation). The strains with the lowest nitrogenase activity were from the endorhizosphere of *Elymus arenarius* grass, where the highest nitrogenase activity was recorded for the strain 29S using ferulic acid as the sole carbon source (274,56 nM C₂H₄ 24 h⁻¹ cm⁻³ of gas phase). *In vitro* studies on the impact of different carbon sources on nitrogenase activity of the strains of *Azospirillum* bacteria allow us to better understand their role and significance in plant rhizosphere.

key words: ferulic acid, coumaric acid, nitrogenase activity, *Azospirillum* spp.