ACTA AGROBOTANICA
Vol. XXXII, z. 2 — 1979
185-193

Porównawcze badania nad występowaniem bakterii w hydroponicznych uprawach sałaty (Lactuca sativa L.) z azotanową i amonową formą azotu w pożywce

Z. KOBIERZYŃSKA-GOŁĄB

Instytut Botaniki Uniwersytetu Wrocławskiego
Akademia Rolnicza we Wrocławiu

(Przyjęto dn. 18 IX 1978 r.)

Z. Kobierzyńska-Gołąb *(Institute of Botany, Wrocław University, 50-328 Wrocław Poland)* Acta Agrobotanica 32 (2): 185-193, 1979.

Comparative studies on the occurrence of bacteria in hydroponic cultures of lettuce (Lactuca sativa L.) enriched with nitrate or ammonia forms of nitrogen in the nutrient medium

The experiment demonstrated the greatest number of bacteria on the surface of roots immersed in nutrient solution, next on the epidermis of the parts of roots remaining in the air space above the nutrient solution and on the roots growing in the seed-bed; a smaller number in the seed-bed itself and the smallest number in the nutrient solution. The population of bacteria consisted of up to 90% short rod of bacilli. The total number of bacteria in hydroponic culture with ammonium was higher than in that with nitrate. As a rule the bacteria belonging to the separate physiological groups, participating in nitrogen metabolism (ammonifying, proteolytic, proteinizing, denitrifying and oligonitrophilic bacteria) appeared to be more numerus in the culture with ammonium than in that with nitrate. The growth of plants in hydroponic culture with ammonium was weaker than in that with nitrate.

WSTĘP

Powszechnie znany jest fakt, że drobnoustroje glebowe gromadzą się wokół korzeni roślin, gdzie ich liczba i aktywność jest wyższa niż w glebie oddalonej od korzeni. O ile bardzo dużo jest opracowań dotyczących drobnoustrojów ryzosfery roślin uprawianych w glebie, o tyle na temat mikroorganizmów zasiedlających korzenie roślin w kulturach wodnych, żwirowych i hydroponicznych brak jest jak dotychczas danych.

Uprawy hydroponiczne stwarzają odmienne niż w glebie warunki dla życia roślin i drobnoustrojów. Roślina w hydroponiku pobiera potrzebne jej do życia pierwiastki z pożywki mineralnej. Bardzo ważna i zarazem interesująca w uprawach hydroponicznych jest kwestia odżywiania azo-

towego, nie tylko ze względu na doniosłe znaczenie tego pierwiastka, lecz także ze względu na to, że sprawa ta przedstawia się inaczej w takiej uprawie, a inaczej w glebie. W uprawach glebowych zarówno azotany, jak i sole amonowe są równowartościowym pokarmem dla bardzo wielu gatunków roślin, natomiast z pracy Gumińskiej i in. (1967) wynika, że najlepszą formą azotu w uprawie hydroponicznej wrocławskiej jest azot azotanowy. Z kolei ta forma jest najmniej przydatnym źródłem azotu dla bakterii glebowych i ryzosferowych (Gołębiowska i in. 1972). Dzięki temu rośliny odżywiane azotanami nie muszą dodatkowo konkurować z mikroorganizmami o zdobycie tego pierwiastka. Najbardziej uniwersalnym i najłatwiej przyswajalnym źródłem azotu dla bakterii glebowych są sole amonowe. Dlatego też wydaje się zupełnie prawdopodobne, że zastosowanie ich do pożywek w uprawach hydroponicznych może powodować silniejszy rozwój mikroorganizmów w pożywce i na korzeniach roślin. Nadmierny rozwój tych mikroorganizmów mógłby być jedną z przyczyn słabszego wzrostu roślin w uprawach hydroponicznych, gdzie źródłem azotu jest $N\text{-}NH_4^+$.

Brak danych na temat występowania i roli bakterii w uprawach hydroponicznych oraz fakt, że rośliny rosną w takich uprawach znacznie lepiej przy podawaniu azotanów niż soli amonowych, skłonił do podjęcia tematu tej pracy. Celem jej była ogólna analiza ilościowa i jakościowa bakterii w hydroponicznej uprawie sałaty z pożywką podstawową, a następnie porównanie ogólnej liczby bakterii oraz liczebności bakterii w obrębie grup fizjologicznych biorących udział w przemianach azotu w dwóch równoległych hydroponikach: z $N\text{-}NH_4^+$ i $N\text{-}NO_3^-$.

MATERIAŁ I METODY

Sałatę (*Lactuca sativa* L.) odmiany Królowa majowa (szklarniowa) uprawiano metodą hydroponiczną na pożywce podstawowej wg Gumińskiej o składzie:

Makroelementy (w gramach na 1000 ml)		Mikroelementy (w miligramach na 1000 ml)	
superfosfat	1,0	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,6
$Ca(NO_3)_2$	0,7	H_3BO_3	0,6
KNO_3	0,7	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,6
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,7	$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0,6
$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 7H_2O$	0,1	$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0,6

Pożywkę sporządzano z wody wodociągowej. Ustalano pH pożywki na 6,5 stosując do alkalizacji 20% NaOH, a do zakwaszania 20% H_2SO_4. Jako ściółki w uprawie hydroponicznej używano torfu zmieszanego z węglem brunatnym w stosunku 1:1. Tygodniowe siewki sałaty, skiełkowane w ste-

rylnym piasku, pikowano do ściółki przygotowanej w kamionkowych naczyniach hydroponicznych. Uprawę prowadzono przez miesiąc w temperaturze ± 18°C, w zimie doświetlając światłem o natężeniu 4,5 tys. lx.

Próbki do badań pobierano ze ściółki i korzeni 1-tygodniowych siewek sałaty przed założeniem hydroponiku, a w czasie prowadzenia uprawy hydroponicznej — ze ściółki, pożywki oraz korzeni znajdujących się w pożywce, korzeni z przestrzeni powietrznej nad pożywką i korzeni ze ściółki. Do analiz używano próbek mieszanych z materiału z trzech różnych miejsc hydroponiku. Pożywkę pobierano po 10 ml, a korzenie i ściółkę po 2 g. Po oznaczeniu wilgotności prób, ilość materiału odpowiadającą 1 g suchej masy wytrząsano w 100 ml jałowej wody wodociągowej przez 15 min. Wysiewy robiono metodą kolejnych rozcieńczeń $10^{-1}-10^{-5}$ po 0,1 ml na powierzchnię podłoży rozlanych do płytek Petriego. Stosowano: wyciąg glebowy, wyciąg z kapusty, podłoże minimalne Davisa (Lederberg 1950), podłoże bezazotowe Ashby (Burbianka i in. 1971) oraz podłoża różnicujące bakterie na grupy fizjologiczne. Były to: dla bakterii proteolitycznych — podłoże z żelatyną i agarem (płytki po 48 godz. inkubacji zalewano odczynnikiem Fraziera dla odróżnienia kolonii bakterii proteolitycznych — Burbianka i in. 1971), dla amonifikatorów — pożywka z peptonem wg Rodiny 1968, dla bakterii zbiałczających i denitryfikatorów — agar azotanowo-sacharozowy wg Rodiny (1968) (denitryfikatory wyodrębniano po 3 dniach inkubacji zalewając płytki odczynnikiem Grissa, który daje wokół ich kolonii czerwone zabarwienie), dla oligonitrofilów — pożywka bezazotowa Ashby (Burbianka et al. 1971). Wszystkie wysiewy wykonywano w trzech powtórzeniach. Płytki inkubowano w temperaturze 28°C przez 6 dni. Po tym czasie liczono kolonie bakterii i przeprowadzono obserwacje mikroskopowe tych mikroorganizmów. Liczbę bakterii przeliczano na gram suchej masy korzeni lub ściółki i na 1 ml pożywki. Analizy wykonywano co tydzień przez cały okres prowadzenia uprawy. Ogólną liczbę bakterii oraz liczbę bakterii należących do poszczególnych grup fizjologicznych biorących udział w przemianach azotu (bakterie: proteolityczne, amonifikujące, zbiałczające, denitryfikujące i oligonitrofilne) badano w dwóch równoległych hydroponikach. W jednym jako związku azotowego do pożywki użyto azotanów (pożywka podstawowa), w drugim natomiast soli amonowej $(NH_4)_2SO_4$ w ilości 0,95 g/l wg Gumińskiej).

WYNIKI

W hydroponiku z amonową formą azotu w pożywce wzrost sałaty był wolniejszy, a liście były mniejsze w porównaniu z równoległą uprawą z azotanami. Po upływie tygodnia od założenia upraw w hydroponiku z

Tabela 1 — Table 1

Ogólna liczba bakterii oraz liczba bakterii: proteolitycznych, amonifikujących, zbiałczających, denitryfikacyjnych i oligonitrofilnych w poszczególnych próbach w czasie prowadzenia upraw hydroponicznych z różnymi formami azotu w pożywce (w tys. na 1 g suchej masy korzeni i ściółki oraz na 1 ml pożywki)

Total number of bacteria and number of bacteria: proteolytic, ammonifying, proteinizing, denitrifying and oligonitrophilic bacteria in separate parts of two hydroponic lettuce cultures, containing either ammonium or nitrate (in thousands per 1 g of dry matter roots and seed-bed and on 1 ml of nutrient solution)

Miejsce pobierania prób z hydroponików Site of sampling of the hydroponic culture		Pożywka Nutrient solution		Korzenie w pożywce Roots immersed in nutrient solution		Korzenie nad pożywką Roots remaining in the air space above nutrient solution		Korzenie w ściółce Roots in the seed-bed		Ściółka Seed-bed	
Bakterie Bacteria	czas trwania uprawy — tygodnie time of cultivation — weeks / forma azotu w pożywce kind of nitrogen in nutrient solution	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+	NO_3^-	NH_4^+
Ogólna liczba Total number	1	89	220	4 500	—	900	8 900	6 600	3 000	2 200	100
	2	323	600	23 100	79 500	10 300	22 600	28 400	8 000	19 000	5 400
	3	310	820	54 500	135 000	19 000	162 000	37 000	115 000	20 000	10 000
	4	125	85	35 500	49 000	105 000	135 000	12 000	65 000	8 000	8 500
Proteolityczne Proteolytic	1	12	25	7 100	—	15 000	11 000	17 000	17 000	6 000	400
	2	50	40	11 000	13 000	27 000	32 000	28 000	32 000	10 000	1 700
	3	20	120	13 500	18 000	35 000	41 000	8 000	41 000	7 000	800
	4	15	250	43 000	48 000	40 000	45 000	3 500	45 000	3 000	500

	1	30	150	900	—	11 200	16 500	10 500	8 700	2 300	1 800
Amonifikujące	2	360	440	3 600	127 000	21 300	22 300	5 700	4 500	4 000	3 000
Ammonifying	3	50	500	14 500	281 000	40 000	175 000	10 500	12 000	8 000	2 500
	4	20	40	31 500	23 500	55 000	100 200	12 000	15 000	11 000	8 000
	1	11	620	1 330	—	23 000	8 700	1 900	3 000	900	2 300
Zbiałczające	2	46	25 400	7 500	83 500	40 000	13 000	4 400	7 300	1 600	3 400
Proteinizing	3	29	630	4 600	109 500	33 000	112 000	51 000	23 000	25 500	14 000
	4	15	5	81 500	6 000	21 000	25 000	5 500	42 500	2 000	32 100
	1	6	2	1 300	—	500	800	800	2 000	800	1 100
Denitryfikacyjne	2	14	7	2 400	9 000	600	1 000	1 400	3 300	700	1 700
Denitrifying	3	15	85	2 500	23 500	16 500	32 500	21 000	5 000	4 000	500
	4	10	2	2 000	6 000	3 500	8 000	2 000	4 500	200	200
	1	9	1	3 400	—	2 700	200	700	100	1 200	800
Oligonitrofilne	2	30	10	9 600	17 000	8 500	1 100	3 800	200	2 400	1 200
Oligonitrophilic	3	38	150	11 800	53 500	11 500	59 500	12 000	5 000	27 000	10 500
	4	150	1	46 500	5 500	14 500	21 500	1 500	1 500	4 500	8 500

$N\text{-}NO_3^-$ korzenie sałaty dorastały do pożywki, czego nie stwierdzono w uprawie z $N\text{-}NH_4^+$.

Analiza morfologicznych form bakterii występujących na nasionach sałaty, powierzchni korzeni tygodniowych siewek skiełkowanych w sterylnym piasku i w ściółce przed założeniem hydroponiku wykazała, że największy udział mają tu pałeczki. Stanowiły one ok. 90% ogólnej liczby izolowanych bakterii. Dominowały one także w próbach pobieranych z różnych części uprawy przez cały okres jej prowadzenia.

Ogólna liczba bakterii izolowanych z hydroponików z różnymi formami azotu wzrastała z czasem, osiągała maksimum na ogół w 3 tygodniu i wyraźnie malała w 4 tygodniu prowadzenia upraw (tab. 1). Wyjątek stanowiły próby pobierane z korzeni nad pożywką, gdzie ogólna liczba bakterii rosła przez cały czas trwania doświadczenia. Liczba bakterii w ciągu całego okresu uprawy była z reguły wyraźnie większa w hydroponiku z amonową formą azotu niż w hydroponiku z azotanami. Jedynie w przypadku ściółki, w całym okresie uprawy, i powierzchni korzeni w ściółce, w dwu pierwszych tygodniach doświadczenia, stosunki ilościowe bakterii kształtowały się odwrotnie.

Porównując ogólną liczbę bakterii izolowanych z prób pobieranych z różnych części upraw należy stwierdzić, że niezależnie od formy azotu w pożywce hydroponicznej najwięcej bakterii występowało na korzeniach nad pożywką, szczególnie w 3 i 4 tygodniu trwania doświadczenia, zaś najmniej w pożywce (tab. 1). Przed założeniem hydroponiku także więcej bakterii występowało na korzeniach 1-tygodniowych siewek sałaty skiełkowanych w sterylnym piasku, niż w ściółce (tab. 2). Prawidłowość ta dotyczy również wszystkich przebadanych grup fizjologicznych bakterii uczestniczących w przemianach azotu (bakterie: proteolityczne, amonifikujące, zbiałczające, denitryfikacyjne i oligonitrofilne), zarówno przed założeniem hydroponików, jak i w trakcie prowadzenia upraw (tab. 1, 2). Ilościowy udział tych grup bakterii w ściółce i na korzeniach 1-tygodniowych siewek sałaty przed założeniem hydroponików i w uprawach z różnymi formami azotu w pożywce nie był jednakowy (tab. 1, 2). Zdecydowanie najwięcej występowało bakterii amonifikujących, szczególnie na korzeniach nad pożywką, w obu hydroponikach. Licznie reprezentowane były też bakterie zbiałczające, których wyjątkowo dużą ilość izolowano z pożywki uprawy hydroponicznej z amonową formą azotu w 2 tygodniu uprawy. Najmniej w badanych próbach było denitryfikatorów. Na uwagę zasługuje stosunkowo duży udział oligonitrofilów. Liczba bakterii należących do poszczególnych grup fizjologicznych biorących udział w przemianach azotu, podobnie jak i ogólna liczba bakterii była przeważnie wyższa w uprawie hydroponicznej z azotem amonowym niż w równoległej uprawie z azotanami (tab. 1). Obserwowano to szczególnie wyraźnie w próbach pobieranych w 3 tygodniu doświadczenia z korzeni znajdujących

Tabela 2 — Table 2

Ogólna liczba bakterii oraz liczba bakterii należących do poszczególnych grup fizjologicznych, izolowanych przed założeniem hydroponików ze ściółki i korzeni siewek sałaty (w tys. na 1 g suchej masy)
Total number of bacteria and number of bacteria belonging to separate physiological groups, participating in nitrogen metabolism: in seed-bed and on surface of lettuce seedlings (in thousands per 1 g of dry weight)

Bakterie Bacteria	Ściółka Seed-bed	Powierzchnia korzeni Surface of roots
Ogólna liczba Total number	13 500	17 800
Proteolityczne Proteolytic	3 000	5 200
Amonifikujące Ammonifying	23 000	53 500
Zbiałczające Proteinizing	500	24 500
Denitryfikacyjne Denitrifying	200	6 000
Oligonitrofilne Oligonitrophylic	500	6 700

się w pożywce i korzeni nad pożywką. Nie wykazano takiej prawidłowości dla bakterii proteolitycznych, amonifikujących i oligonitrofilnych izolowanych ze ściółki hydroponików.

DYSKUSJA

Wyniki badań wskazują, że w uprawach hydroponicznych przewagę nad innymi formami morfologicznymi mają drobne pałeczki, podobnie jak to obserwowano w glebie, ryzosferze i wodzie (Krasilnikov 1958; Darbyshire; Greaves 1973; Donderski, Strzelczyk 1974). Ogólna liczba bakterii bytujących na powierzchni korzeni w hydroponikach znacznie przewyższa ich liczbę w pożywce i ściółce. Taki układ przypomina stosunki panujące w uprawach glebowych i kulturach wodnych, gdzie liczba drobnoustrojów w ryzosferze jest wyższa niż w glebie i pożywce oddalonej od korzeni (Krasilnikov 1958; Rempe 1972). Zmiany ogólnej liczby bakterii, wyrażające się wzrostem do pewnego maksimum w trakcie trwania uprawy i spadek pod koniec jej prowadzenia, są także podobne jak w ryzosferze roślin uprawianych w glebie (Starkey 1929; Rovira 1956; Gyllenberg 1957).

Z danych na temat występowania różnych grup fizjologicznych bakterii w ryzosferze roślin uprawianych w glebie wynika, że strefa korzeniowa sprzyja rozwojowi bakterii amonifikujących i denitryfikacyjnych (Rouatt, Katznelson 1961). W uprawach hydroponicznych najwięcej było także bakterii amonifikujących, ale nie ustępowały im pod względem ilości bakterie zbiałczające. Liczba denitryfikatorów natomiast, w stosunku do tych grup, była w hydroponikach niższa. Duży rozwój amonifikatorów w uprawach hydroponicznych był zapewne spowodowany wydzielaniem aminokwasów przez korzenie roślin. Ponieważ korzenie są tutaj zanurzone do pożywki, ich wydzieliny mogą się w niej rozprzestrzeniać lepiej niż w glebie i przez to rozwój wspomnianych bakterii może być nasilony nawet w dużej odległości od korzeni. Interesujący jest dość znaczny udział oligonitrofilów w uprawach hydroponicznych. Podobne wyniki uzyskali też Tirranen i Rerberg (1972) analizując pożywkę hydroponiczną. Możliwość występowania dużej liczby tych bakterii potwierdzałyby także badania Malčeva i in. (1973).

Namnażające się w uprawach bakterie w rozmaity sposób mogą wpływać na rośliny poprzez ich system korzeniowy. W uprawach bezglebowych, ze względu na brak sorbcyjnych właściwości środowiska, najsilniejsze oddziaływanie wydają się mieć gromadzące się produkty metabolizmu bakterii rozwijających się w pożywce i na korzeniach roślin. Rempe (1972) wykazał, że w kulturach wodnych, w których następowało zahamowanie wzrostu roślin, było więcej mikroorganizmów (15-30 razy) niż w kulturach, gdzie rośliny rosły normalnie. Autor ten zaobserwował również, że zjawiska takie nie zachodziły w kulturach piaskowych i w glebie dzięki właściwościom sorpcyjnym podłoża.

Z zagadnieniem oddziaływania bakterii na rośliny można powiązać wykazany przez Gumińską i in. (1967) i potwierdzony w tej pracy fakt gorszego wzrostu roślin w hydroponikach z amonową formą azotu w pożywce niż z azotanami. W hydroponiku bowiem z $N\text{-}NH_4^+$ rozwój bakterii był znacznie silniejszy niż w równoległej uprawie z $N\text{-}NO_3^-$. Wszystkie z przebadanych grup fizjologicznych bakterii biorących udział w przemianach azotu rozwijały się intensywniej w uprawie z $N\text{-}NH_4^+$ niż w równoległej z $N\text{-}NO_3^-$. Na gorszy wzrost roślin w hydroponiku z amonową formą azotu mogły wpływać szczególnie bakterie amonifikujące i zbiałczające. Duży rozwój amonifikatorów w hydroponiku z $N\text{-}NH_4^+$ mógł bowiem prowadzić do gromadzenia się szkodliwie działającego na rośliny amoniaku, produkowanego przez te bakterie. Ogromna liczba bakterii zbiałczających w pożywce zawierającej sole amonowe mogła natomiast prowadzić do głodu azotowego roślin na skutek unieruchamiania tego pierwiastka w komórkach drobnoustrojów. Bakterie te mogły także, choć w mniejszym stopniu, pobierać tak ważne dla roślin pierwiastki jak: fosfor, potas, siarka i magnez. Spadek ilości bakterii zbiałczających w 4 tygodniu uprawy moż-

na tłumaczyć toksycznością produkowanych przez nie metabolitów i substancji pochodzących z obumarłych komórek. Substancje te, jak już wspomniano, mogły wpływać na gorszy rozwój roślin w uprawie z $N\text{-}NH_4^+$ niż z $N\text{-}NO_3^-$

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania Pani Doc. dr hab. Z. Gumińskiej, Pani Prof. dr J. Gołębiowskiej, Panu Prof. dr J. Sobieszczańskiemu, oraz Panu Prof. dr St. Gumińskiemu za cenne rady oraz krytyczne uwagi dotyczące tej pracy.

LITERATURA

Burbianka M., Pliszka A., Janczura E., Teisseyre T., Załęska H., 1971. Mikrobiologia Żywności (Mikrobiologiczne metody badania produktów żywnościowych). PZWL, Warszawa.

Darbyshire J. F., Greaves M. P., 1973. *Bacteria* and *Protozoa* in the rhizosphere. Pestic. Sci. 4: 349.

Donderski W., Strzelczyk E., 1974. Generic composition and nutritional requirements of bacteria isolated from three lakes. Acta Microb. Polon. ser. B, 6: 67.

Gołębiowska J., Sawicka A., Skalski B., 1972. Nitrogen nutrition of some soil bacteria. Polish J. Sci. 5: 45.

Gumińska Z., Kukułczanka K., Graczówna M., 1967. Poszukiwania najodpowiedniejszego stężenia soli mineralnych w pożywce i ściółce upraw hydroponicznych dla niektórych roślin ozdobnych. Acta. agrobot. 20: 153.

Gyllenberg H. G., 1957. Seasonal variation in the composition of the bacteria soil flora in relation to plant development. Can. J. Microb. 3: 131.

Krasilnikov N. A., 1958. Mikroorganizmy Počvy i Wyzšije Rastenija. Nauka. Moskva.

Lederberg J., 1950. Isolation and characterisation of biochemical mutants of bacteria. [In:] Methods in Medical Research, Year Book Publishers, Chicago.

Malčeva N. N., Ižeurova V. V., Rožanskaja A. M., 1973. Osobennosti razvitija oligonitrofilov pri ustrojenii svjazannych form azota. Mikrobiologija 42: 468.

Rempe A. H., 1972. O pričinie ugnietienija rosta rastenii bakterizovannych kornevoj mikrofloroj v bessmiennych vodnych kulturach. Fizjoł. Rast. 19: 412.

Rodina A., 1968. Mikrobiologiczne Metody Badania Wód. PWRiL, Warszawa.

Rouatt J. W., Katznelson H., 1961. A study of bacteria on the root surface and in the rhizosphere of the crop plants. J. Appl. Bacteriol. 24: 164.

Rovira A. D., 1956. Plant root exudation to the rhizosphere effect. Pl. Soil 7: 178.

Starkey R. L., 1929. Some influences of the development of higher plants upon the microorganisms in the soil. II. Influence of the stage of plant growth upon abundance of organisms. Soil Sci. 27: 355.

Tirranen Ł. S., Rerberg M. S., 1972. Mikroflora pitatielnogo roztvora pri gidroponnom vyraščivanii ovoščnych polikultur. Izv. Sibirsk. Otdel. Acad. Nauk SSSR, ser. Biologičeskich nauk, 3: 68.

Vagnérova K., Mačura J., Čatska V., 1960. Rhizosphere mikroflora of wheat. II. Composition and properties of bacterial flora during the vegetation period of wheat. Folia Microb. 5: 311.