

Grażyna Dąbrowska¹, Katarzyna Hrynkiewicz², Agnieszka Mierek-Adamska¹,
Anna Goc¹

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

¹ Zakład Genetyki, ² Zakład Mikrobiologii

Adres do korespondencji: browsk@umk.pl

Wrażliwość odmian jarych i ozimych rzepaku na metale ciężkie i bakterie glebowe

The sensitivity of spring and winter varieties of oilseed rape to heavy metals and rhizobacteria

Słowa kluczowe: *Brassica napus*, bakterie ryzosferowe, metale ciężkie, wzrost roślin

Streszczenie

Sprawdzono wpływ metali ciężkich (cynk, kadm, miedź, ołów) oraz bakterii ryzosferowych na wzrost siewek *Brassica napus* L. Przeanalizowano trzy odmiany rzepaku: dwie jare – Belinda i Clipper oraz jedną ozimą – Kronos. Wykazano, że porównywane odmiany charakteryzowały się zróżnicowaną wrażliwością na obecność metali ciężkich w środowisku. Najbardziej wrażliwa na metale ciężkie była odmiana ozima Kronos, natomiast najmniej – odmiana Clipper. Wszystkie analizowane szczepy ryzobakterii: *Bacillus* sp., *Bacteroidetes bacterium*, *Flavobacterium* sp., *Luteibactor rhizovicina*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia entomophila* i *Variovorax* sp. stymulowały wzrost siewek, zwłaszcza korzeni, odmian jarych rzepaku, zaś hamowały w przypadku odmiany ozimej. Szczepy *Bacteroidetes bacterium* i *Bacillus* sp. najsilniej stymulowały wzrost siewek odmiany Kronos, a *Flavobacterium* sp. siewek odmiany Belinda w obecności miedzi, cynku i kadmu. Większość badanych bakterii ułatwiała rozwój siewek odmiany Clipper w środowisku zanieczyszczonym jonami cynku i ołowiu.

Key words: *Brassica napus*, rhizobacteria, heavy metals, plant growth

Abstract

We have examined the impact of heavy metals (zinc, cadmium, copper, lead) and rhizobacteria on the growth of seedlings of *Brassica napus* L. We analyzed three varieties of rape: two spring – Belinda and Clipper and one winter – Kronos. It was shown that the varieties possess different sensitivity to heavy metals in the environment. The most sensitive to heavy metals was Kronos winter variety, and the least – Clipper. All analyzed rhizobacteria strains: *Bacillus* sp, *Bacteroidetes bacterium*, *Flavobacterium* sp., *Luteibactor rhizovicina*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia entomophila* and *Variovorax* sp. stimulated the growth of seedlings, especially their roots, of spring rape varieties, but inhibited in case of winter variety. *Bacteroidetes bacterium* and *Bacillus* sp. strains mostly stimulated the growth of winter cultivar, and *Flavobacterium* sp. of Belinda variety in the presence of copper, zinc and cadmium. Almost all studied bacteria promoted growth of Clipper seedlings in the environment polluted by zinc and lead.

Wstęp

Metale ciężkie, takie jak: kadm, miedź, ołów i cynk, należą do czynników, które w większości przypadków wykazują niekorzystny wpływ na środowisko i organizmy żywe (Jing i in. 2007, Memon i Schröder 2009). Niektóre z nich, np. cynk i miedź są mikroelementami istotnymi dla prawidłowego rozwoju roślin. Nadmierna akumulacja metali ciężkich w organach roślin może przyczyniać się do zahamowania procesów fizjologicznych i biochemicznych, fotosyntezy oraz oddychania. Ponadto mogą prowadzić do degradacji głównych organelli komórkowych i w ostateczności powodować śmierć rośliny (Jing i in. 2007). Ze względu na fakt, że wzrasta uprzemysłowienie, a ekosystemy są ekspozowane na szereg zanieczyszczeń, w tym metalami ciężkimi, poszukiwane są rośliny zdolne do ich akumulacji w biomacie, które mogą być wykorzystane np. w procesie fitoremediacji (Koo i Cho 2009).

Rzepak, *Brassica napus* L., należy do rodziny *Brassicaceae* i podobnie jak np. tobołek alpejski (*Thlaspi caerulescens* J. Presl & C. Presl.), gorczyca sarepska (*Brassica juncea* (L.) Czern.) i inne gatunki należące do tej rodziny zaliczany jest do hiperakumulatorów roślinnych (Sheng i Xia 2006, Mierek-Adamska i in. 2009). Rzepak ma zdolność do pobierania z gleby dużych ilości cynku, miedzi, ołowiu i kadmu. Roślina gromadzi te metale w nasionach i organach wegetatywnych (Szulc i in. 2010, Dąbrowska i in. 2011a). Marchiol i in. (2004) wykazali, że rzepak może również być wykorzystywany do oczyszczania gleb z kadmu, chromu, miedzi, niklu, ołowiu i cynku. Inne badania pokazały, że roślina ta również dobrze usuwa z podłoża arsen (Nie i in. 2002).

Bakterie promujące wzrost roślin, PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) wpływają na rozwój rośliny poprzez syntezę fitohormonów lub obniżanie poziomu inhibitorów, co stymuluje kiełkowanie i wzrost roślin (np. rozwój liści i korzeni) oraz zwiększa tolerancję na zasolenie i suszę, ale także poprzez podwyższenie biodostępności azotu, cynku czy fosforanów (Kandasamy i in. 2009). PGPR występują w ryzosferze oraz na powierzchni korzeni. Wykazano, że ponad 15% powierzchni korzeni może być pokryte mikrokoloniami różnych szczepów bakteryjnych (van Loon 2007). Korzystny wpływ bakterii na wzrost roślin uprawnych: soi, pszenicy, jęczmienia i innych stwierdzono w przypadku: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Rhizobium* i *Serratia* (Saharan i Nehra 2011).

Szczepy bakteryjne, które posiadają odporność na metale ciężkie, mogą stymulować wzrost roślin rosnących w środowiskach zanieczyszczonych (Khan i in. 2009, Dąbrowska i in. 2011). Z kolei bakterie ryzosferowe, wykazujące zdolność do wydzielania kwasów organicznych, mogą przyczyniać się do wzrostu biodostępności metali ciężkich w glebie (Koo i Cho 2009).

Celem prezentowanej pracy była: ocena wrażliwości siewek *Brassica napus* L. odmian jarych i ozimej na szkodliwe działanie metali ciężkich oraz selekcja szczepów bakteryjnych PGPR wspomagających wzrost i rozwój rzepaku rosnącego w obecności metali ciężkich: cynku, kadmu, miedzi i ołowiu.

Material i metody

Przygotowanie materiału badawczego

W doświadczeniu wykorzystano szczepy bakteryjne: *Bacillus* sp., *Bacteroidetes bacterium*, *Flavobacterium* sp., *Luteibactor rhizovicina*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia entomophila* i *Variovorax* sp. (tab. 1), które charakteryzowały się dużą tolerancją na metale ciężkie oraz wykazywały stymulujący wpływ na kiełkowanie i wzrost rzepaku w obecności soli kadmu (Dąbrowska i in. 2010, 2011). Bakterie hodowano na pożywce stałej R2A (Difco) (18 g/l) w temperaturze 25°C. Czas inkubacji szczepów bakteryjnych w termostacie (1–2 dni) zależał od ich indywidualnego tempa wzrostu. Następnie, przy zastosowaniu metody turbidymetrycznej, z kolejnych szczepów przygotowywano zawiesiny bakteryjne o stężeniu $5,0 \times 10^7$ ml⁻¹.

Tabela 1

Opis szczepów bakteryjnych użytych w doświadczeniach — *Description of bacterial strains used in the experiments*

| Szczep — Strain | Opis szczepów — Description of strains | Referencje — References |
|---|---|-------------------------|
| <i>Bacillus</i> sp. | Szczep wyizolowano z ektomikoryzofery <i>Tomentella</i> sp. | Hryniewicz i in. 2010 |
| <i>Bacteroidetes bacterium</i> <i>Flavobacterium</i> sp. <i>L. rhizovicina</i> <i>S. entomophila</i> | Szczepy wyizolowane z ryzofery wierzb (<i>Salix viminalis</i>) rosnących na obszarach silnie zdegradowanych. Szczepy charakteryzują się wysoką aktywnością enzymatyczną oraz zdolnością do produkcji sideroforów. | |
| <i>P. fluorescens</i> <i>Variovorax</i> sp. | Szczepy pozyskano z owocnika włośnianki brunatnej (<i>Hebeloma mesopheum</i>) lub ektomikoryzofery <i>Hebeloma</i> sp. | |

Nasiona *B. napus* L.: odmiana ozima Kronos, odmiany jare Belinda i Clipper (Agrobras, Polska) wysterylizowano w mieszaninie 96% alkoholu etylowego i 30% perhydrolu (1 : 1). Nasiona wstrząsano w mieszaninie przez 7 minut, a następnie dokonywano serii płukań w wodzie destylowanej.

Warunki wzrostu *in vitro* rzepaku

Przygotowano roztwory soli metali ciężkich – CuSO₄, CdSO₄ i (CH₃COO)₂Pb o następujących stężeniach: 50, 100 i 250 μM oraz ZnSO₄: 250, 500 i 1000 μM. W sterylnych płytkach Petriego, o średnicy 90 mm, umieszczano bibułę filtracyjną, którą nasączano 6 ml: wody (kontrola), roztworu soli metali ciężkich, zawiesiny bakteryjnej pozbawionej lub zawierającej jony metali ciężkich. Na płytki wykładano 15 nasion rzepaku, inkubowano w ciemności, w temperaturze 25°C przez 6 dni, a następnie mierzono długość korzeni i hypokotyli siewek rzepaku.

Analiza statystyczna

Wyniki pomiarów długości korzeni i hypokotyli 30 siewek trzech odmian rzepaku dla każdego wariantu doświadczalnego przeanalizowano z użyciem programu Excel. Analizy istotności statystycznej wyników dokonano wykorzystując program Past (Hammer i in. 2001) i jednoczynnikową analizę wariancji (*one-way ANOVA*), za poziom istotności przyjmowano $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$.

Wyniki

Wpływ metali ciężkich na długość korzeni i hypokotyli siewek rzepaku

Odmiany rzepaku wykazały zróżnicowaną wrażliwość na zanieczyszczenie środowiska metalami ciężkimi (tab. 2). Użyte stężenia jonów miedzi, cynku, kadmu i ołowiu hamowały wzrost siewek odmiany ozimej Kronos, zarówno ich korzeni, jak i hypokotyli. Negatywny wpływ badanych metali na korzenie odmian jarych odnotowano jedynie dla kadmu i 250 μM miedzi w przypadku odmiany Belinda oraz 250 μM miedzi i 250 μM kadmu dla odmiany Clipper. Pozostałe stężenia miedzi i kadmu oraz wszystkie użyte stężenia cynku i ołowiu stymulowały wydłużanie korzeni odmian jarych (tab. 2). Najsilniejszy ujemny wpływ na wzrost hypokotyli siewek odmiany Clipper zaobserwowano w obecności 250 μM kadmu i ołowiu, a w przypadku hypokotyli siewek odmiany Belinda w obecności każdego ze stężeń kadmu (tab. 2).

Spośród badanych odmian najbardziej odporna na obecność metali ciężkich w podłożu była odmiana jara Clipper, a najbardziej wrażliwa odmiana ozima Kronos.

Tabela 2

Wyniki pomiarów długości (cm) korzeni i hypokotyli (średnia \pm odchylenie standardowe) siewek rzepaku odmian Kronos, Belinda i Clipper, rosnących w warunkach kontrolnych (Ctr), w obecności jonów Cd, Cu, Pb i Zn i/lub bakterii ryzosferowych. Szczepy bakterii są oznaczone pierwszymi literami nazw — *The length (cm) of roots and hypocotyls (mean \pm standard deviation) of seedlings of Kronos, Belinda and Clipper varieties of oilseed rape growing under control conditions (Ctr), in the presence of Cd, Cu, Pb and Zn, and/or the rhizobacteria. Bacterial strains are denoted by first letters of their names*

| | Kronos | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------------------------------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | długość korzenia — length of roots | | | | | | | | długość hypokotyli — length of hypocotyl | | | | | | | |
| | – | Pf | Lr | B sp. | F sp. | Bb | Se | V sp. | – | Pf | Lr | B sp. | F sp. | Bb | Se | V sp. |
| Ctr Control | 12,38 \pm | 11,19 \pm | 9,53 \pm | 6,77 \pm | 10,51 \pm | 11,22 \pm | 3,47 \pm | 10,64 \pm | 5,01 \pm | 5,09 \pm | 5,23 \pm | 4,06 \pm | 5,80 \pm | 5,44 \pm | 3,56 \pm | 6,33 \pm |
| | 1,52 | 1,44** | 1,75*** | 4,10*** | 2,07*** | 1,42** | 3,35*** | 1,55*** | 0,93 | 1,23 | 1,66 | 1,96* | 0,94** | 1,46 | 2,59** | 1,53*** |
| Cu | 1,67 \pm | 1,30 \pm | 0,59 \pm | 1,73 \pm | 1,16 \pm | 2,21 \pm | 0,99 \pm | 2,29 \pm | 3,81 \pm | 3,38 \pm | 2,06 \pm | 3,64 \pm | 2,89 \pm | 4,01 \pm | 3,02 \pm | 3,20 \pm |
| | 1,45 | 1,01 | 0,65*** | 1,50 | 1,09 | 1,48 | 0,84* | 2,27 | 1,63 | 1,76 | 1,62*** | 1,97 | 2,11 | 1,59 | 1,76 | 2,49 |
| | 0,42 \pm | 1,15 \pm | 0,40 \pm | 1,22 \pm | 0,63 \pm | 1,35 \pm | 0,45 \pm | 0,99 \pm | 1,96 \pm | 3,07 \pm | 1,68 \pm | 3,30 \pm | 2,34 \pm | 3,63 \pm | 2,00 \pm | 2,76 \pm |
| 100 μ M | 0,37 | 1,52* | 0,59 | 1,09*** | 1,02 | 1,29*** | 0,45 | 1,37* | 1,64 | 2,06* | 1,62 | 1,96*** | 1,54 | 1,24*** | 1,60 | 1,43* |
| 250 μ M | 0,44 \pm | 0,73 \pm | 0,17 \pm | 0,47 \pm | 0,28 \pm | 0,26 \pm | 0,23 \pm | 0,79 \pm | 1,41 \pm | 2,46 \pm | 1,14 \pm | 2,19 \pm | 1,01 \pm | 1,04 \pm | 0,69 \pm | 2,93 \pm |
| | 1,10 | 0,54 | 0,12 | 0,36 | 0,18 | 0,17 | 0,13 | 0,67 | 0,90 | 1,48** | 0,96 | 1,46* | 0,94 | 0,83 | 0,49*** | 1,62*** |
| 250 μ M | 4,23 \pm | 3,41 \pm | 3,23 \pm | 6,60 \pm | 3,87 \pm | 6,73 \pm | 3,29 \pm | 5,67 \pm | 2,67 \pm | 3,15 \pm | 2,75 \pm | 4,22 \pm | 2,92 \pm | 4,18 \pm | 3,68 \pm | 3,43 \pm |
| | 4,04 | 3,38 | 3,32 | 3,61* | 3,46 | 3,94* | 2,27 | 3,86 | 2,04 | 2,41 | 2,22 | 1,72*** | 2,19 | 1,54** | 1,95 | 1,96 |
| 500 μ M | 5,06 \pm | 5,20 \pm | 2,32 \pm | 4,93 \pm | 4,31 \pm | 4,59 \pm | 3,10 \pm | 5,26 \pm | 3,40 \pm | 3,29 \pm | 2,75 \pm | 3,35 \pm | 3,52 \pm | 3,29 \pm | 3,85 \pm | 3,58 \pm |
| | 3,34 | 2,98 | 2,25*** | 3,15 | 3,00 | 3,59 | 1,84** | 3,85 | 1,47 | 1,45 | 1,86 | 1,72 | 1,96 | 2,12 | 1,55 | 2,01 |
| 1000 μ M | 1,23 \pm | 1,17 \pm | 1,17 \pm | 2,96 \pm | 1,09 \pm | 2,20 \pm | 1,92 \pm | 1,92 \pm | 2,90 \pm | 3,20 \pm | 2,53 \pm | 3,82 \pm | 2,80 \pm | 3,21 \pm | 3,56 \pm | 2,78 \pm |
| | 1,18 | 1,04 | 1,23 | 1,76*** | 1,07 | 1,94* | 1,38* | 1,70 | 1,26 | 1,37 | 1,41 | 1,10** | 1,55 | 1,67 | 1,31 | 1,41 |
| 50 μ M | 2,35 \pm | 2,42 \pm | 0,92 \pm | 2,71 \pm | 2,06 \pm | 2,48 \pm | 1,66 \pm | 3,27 \pm | 3,11 \pm | 3,34 \pm | 2,08 \pm | 4,12 \pm | 3,75 \pm | 3,66 \pm | 3,63 \pm | 3,91 \pm |
| | 2,33 | 1,81 | 1,20** | 1,50 | 1,55 | 2,10 | 1,28 | 2,31 | 1,98 | 1,60 | 2,11 | 1,52* | 2,06 | 1,70 | 2,16 | 2,20 |
| 100 μ M | 1,13 \pm | 1,08 \pm | 0,40 \pm | 2,17 \pm | 0,43 \pm | 2,02 \pm | 0,37 \pm | 0,76 \pm | 2,18 \pm | 1,95 \pm | 1,01 \pm | 3,90 \pm | 1,30 \pm | 3,32 \pm | 0,96 \pm | 2,19 \pm |
| | 1,19 | 1,14 | 0,39** | 1,89* | 0,42** | 1,55* | 0,43** | 0,90 | 1,63 | 1,21 | 1,04** | 1,72*** | 1,35* | 1,39** | 1,00*** | 2,44 |
| 250 μ M | 0,07 \pm | 0,12 \pm | 0,11 \pm | 0,16 \pm | 0,15 \pm | 0,10 \pm | 0,08 \pm | 1,64 \pm | 0,33 \pm | 0,48 \pm | 0,26 \pm | 0,35 \pm | 0,21 \pm | 0,28 \pm | 0,17 \pm | 3,19 \pm |
| | 0,11 | 0,14 | 0,18 | 0,21* | 0,10** | 0,09 | 0,11 | 1,75*** | 0,28 | 0,46 | 0,35 | 0,31 | 0,24 | 0,31 | 0,13** | 2,05*** |
| 50 μ M | 5,07 \pm | 5,11 \pm | 3,91 \pm | 5,08 \pm | 4,03 \pm | 5,06 \pm | 2,72 \pm | 4,32 \pm | 3,44 \pm | 4,09 \pm | 3,65 \pm | 4,18 \pm | 4,27 \pm | 3,99 \pm | 3,51 \pm | 4,00 \pm |
| | 3,33 | 3,13 | 2,97 | 2,82 | 2,61 | 3,80 | 1,93* | 3,56 | 1,88 | 2,10 | 2,00 | 1,45 | 1,57 | 1,95 | 1,88 | 2,85 |
| 100 μ M | 4,64 \pm | 4,15 \pm | 4,12 \pm | 2,82 \pm | 2,87 \pm | 5,32 \pm | 2,61 \pm | 3,93 \pm | 3,68 \pm | 3,85 \pm | 3,46 \pm | 3,22 \pm | 3,46 \pm | 4,25 \pm | 3,62 \pm | 3,25 \pm |
| | 3,04 | 2,27 | 2,28 | 2,85* | 2,31* | 2,33 | 2,10** | 4,13 | 1,60 | 1,93 | 1,57 | 2,46 | 2,40 | 1,19 | 2,53 | 2,60 |
| 250 μ M | 3,89 \pm | 3,07 \pm | 2,24 \pm | 2,61 \pm | 1,62 \pm | 3,21 \pm | 2,05 \pm | 6,04 \pm | 3,58 \pm | 3,24 \pm | 3,13 \pm | 3,55 \pm | 3,28 \pm | 3,56 \pm | 3,54 \pm | 3,99 \pm |
| | 2,25 | 2,12 | 1,76** | 1,82* | 1,30*** | 2,14 | 1,52*** | 3,76** | 1,45 | 1,85 | 1,84 | 1,83 | 1,66 | 1,54 | 2,26 | 2,18 |

ciąg dalszy tabeli 2

| | | Belinda | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|---------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | długość korzenia — <i>length of root</i> | | | | | | | | długość hypokotylu — <i>length of hypocotyl</i> | | | | | | | |
| | | – | Pf | Lr | B sp. | F sp. | Bb | Se | V sp. | – | Pf | Lr | B sp. | F sp. | Bb | Se | V sp. |
| Ctr Control | 2,76± 1,17 | 5,21± 0,91*** | 5,11± 0,92*** | 4,79± 1,66*** | 4,90± 1,83*** | 6,05± 1,57*** | 4,54± 1,64*** | 7,86± 2,38*** | 3,12± 0,63 | 3,34± 0,92 | 3,17± 0,88 | 2,88± 0,55 | 2,64± 0,79* | 3,24± 0,72 | 2,50± 0,84** | 3,75± 0,71*** | |
| | 50 µM | 4,93± 1,69 | 2,73± 1,26*** | 2,03± 0,79*** | 1,31± 0,36*** | 2,27± 1,31*** | 2,11± 0,97*** | 2,85± 1,11*** | 2,92± 1,24*** | 2,91± 0,68 | 3,39± 0,48** | 3,29± 0,40** | 3,03± 0,67 | 3,24± 0,58* | 3,06± 0,98 | 2,94± 0,73 | 2,71± 0,64 |
| Cu | 100 µM | 1,31± 0,81 | 1,26± 0,59 | 1,13± 0,48 | 1,37± 0,43 | 1,96± 0,65** | 1,32± 0,52 | 1,95± 1,12* | 1,13± 0,82 | 2,69± 0,82 | 2,85± 0,70 | 2,96± 0,78 | 3,60± 1,01*** | 2,78± 0,62 | 3,10± 0,41*** | 3,35± 0,70** | |
| | 250 µM | 0,70± 0,27 | 0,89± 0,16** | 0,69± 0,19 | 0,57± 0,11* | 0,91± 0,13*** | 0,75± 0,17 | 0,25± 0,31*** | 0,60± 0,13 | 1,59± 0,76 | 1,59± 0,44* | 1,52± 0,56 | 1,52± 0,32 | 1,37± 0,39 | 1,29± 0,56 | 1,13± 0,30** | 1,13± 0,50** |
| Zn | 250 µM | 5,16± 1,32 | 4,65± 1,03 | 7,53± 1,53*** | 4,71± 1,56 | 6,32± 1,49** | 4,94± 1,80 | 5,03± 1,53 | 8,15± 2,61*** | 3,47± 0,78 | 3,31± 0,80 | 3,38± 0,51 | 2,67± 0,61*** | 2,63± 0,49*** | 3,26± 0,55 | 3,06± 0,65* | |
| | 500 µM | 4,16± 1,64 | 5,57± 2,11** | 4,76± 1,28 | 3,91± 1,99 | 5,16± 1,21** | 3,82± 1,71 | 2,44± 1,58 | 4,97± 1,92 | 3,01± 0,76 | 2,77± 0,63 | 2,96± 0,56 | 2,81± 0,42 | 2,49± 0,46** | 2,90± 0,51 | 2,74± 0,75 | 2,73± 0,58 |
| Cd | 1000 µM | 3,68± 2,25 | 3,32± 1,50 | 4,00± 0,85 | 2,41± 1,42* | 3,13± 1,09 | 1,56± 0,54*** | 2,88± 1,81 | 4,13± 1,58 | 2,79± 0,55 | 3,00± 0,78 | 2,84± 0,49 | 2,82± 0,62 | 2,27± 0,42*** | 2,88± 0,44 | 2,64± 0,66 | 2,78± 0,47 |
| | 50 µM | 1,21± 0,28 | 1,87± 0,74*** | 1,23± 0,62 | 0,91± 0,29*** | 1,76± 0,98** | 1,73± 0,54*** | 1,59± 0,69** | 1,90± 1,15** | 1,44± 0,96 | 2,48± 0,54*** | 2,63± 0,60*** | 2,30± 0,71*** | 2,75± 1,14*** | 2,80± 0,62*** | 2,11± 0,70** | 2,78± 0,58*** |
| Pb | 100 µM | 0,76± 0,21 | 0,31± 0,32*** | 0,96± 0,27** | 0,61± 0,45 | 0,70± 0,28 | 0,96± 0,40* | 0,24± 0,32*** | 0,23± 0,25*** | 1,08± 0,51 | 1,57± 0,63** | 1,84± 0,36*** | 1,79± 0,33*** | 1,28± 0,28 | 1,33± 0,41* | 0,95± 0,20 | 0,76± 0,25** |
| | 250 µM | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,18*** |
| Pb | 50 µM | 5,75± 1,50 | 4,02± 1,65*** | 4,00± 1,09*** | 3,99± 1,08*** | 4,97± 1,28* | 5,14± 1,76 | 3,08± 1,19*** | 6,17± 1,49 | 2,94± 0,74 | 2,70± 0,63 | 2,99± 0,63 | 2,35± 0,47*** | 2,81± 0,73 | 2,88± 0,66 | 2,54± 0,94 | 2,64± 0,77 |
| | 100 µM | 5,66± 2,17 | 3,06± 1,21*** | 4,37± 1,08** | 3,41± 1,37*** | 3,11± 0,66*** | 4,55± 1,39* | 2,55± 0,66*** | 6,01± 1,73 | 2,70± 0,72 | 2,90± 0,61 | 3,23± 0,55** | 2,51± 0,53 | 2,55± 0,51 | 2,73± 0,86 | 2,80± 0,59 | 2,30± 0,41* |
| 250 µM | 3,97± 0,78 | 2,87± 1,50*** | 2,09± 0,77*** | 2,55± 0,69*** | 4,03± 1,21 | 1,85± 0,93*** | 2,23± 0,76*** | 4,17± 1,42 | 2,52± 0,62 | 3,07± 0,53*** | 2,81± 0,53 | 2,86± 0,64* | 2,46± 0,63 | 2,59± 0,62 | 2,25± 0,46 | 2,66± 0,50 | |

ciąg dalszy tabeli 2

| | | Clipper | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|--------|------------------------------------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | długość korzenia — length of roots | | | | | | | długość hypocotyłu — length of hypocotyl | | | | | | | |
| | | – | Pf | Lr | B sp. | F sp. | Bb | Se | V sp. | – | Pf | Lr | B sp. | F sp. | Bb | Se |
| Ctr Control | | 0,82± | 4,73± | 5,12± | 3,05± | 5,53± | 4,87± | 6,25± | 4,82± | 2,58± | 3,17± | 3,50± | 3,44± | 3,90± | 4,07± | 3,47± |
| | | 0,55 | 1,46*** | 0,85*** | 0,84*** | 1,53*** | 1,33*** | 1,76*** | 1,92*** | 0,95 | 0,43** | 0,59*** | 1,36** | 0,80*** | 0,61*** | 1,42** |
| | | 1,23± | 0,001** | 2,01± | 0,12±0,4 | 1,62± | 2,18± | 0*** | 1,82± | 2,28± | 3,33± | 3,27± | 2,90± | 3,07± | 3,70± | 3,02± |
| Cu | 50 µM | 0,87 | * | 0,84*** | 9*** | 1,32 | 1,10*** | 0,77** | 1,16 | 0,51*** | 0,40*** | 0,57*** | 0,20** | 0,69** | 0,34*** | 0,61** |
| | 100 µM | 1,13± | 0,37± | 1,05± | 0,20±0,5 | 0*** | 3,20± | 0,001** | 2,58± | 2,98± | 2,71± | 2,73± | 2,10± | 3,22± | 1,83± | 1,52± |
| | 250 µM | 1,06 | 0,49*** | 0,46 | 2*** | 0*** | 2,20*** | * | 0,55 | 0,28*** | 0,70 | 0,72 | 0,50*** | 0,98** | 1,31** | 0,65*** |
| Zn | 50 µM | 0,53± | 0,001** | 0,69± | 0,001 | 0*** | 0,001** | 0,001** | 1,94± | 1,87± | 1,52± | 1,58± | 1,95± | 1,69± | 0,92± | 1,20± |
| | | 0,47 | * | 0,19 | *** | 0*** | * | * | 0,52 | 0,51 | 0,56** | 0,28** | 0,74 | 1,03 | 0,19*** | 0,85*** |
| | | 2,16± | 4,10± | 7,53± | 4,17±0,7 | 3,18± | 4,17± | 3,17± | 3,00± | 3,00± | 4,57± | 4,78± | 3,28± | 3,80± | 2,75± | 3,12± |
| Cd | 50 µM | 1,60 | 1,06*** | 1,53*** | 5*** | 1,00** | 1,21*** | 0,92** | 0,63 | 0,50*** | 0,51* | 0,84*** | 0,72 | 0,76*** | 0,74 | 0,53 |
| | 100 µM | 1,35± | 3,47± | 4,76± | 2,47±0,5 | 3,22± | 2,72± | 3,02± | 1,83± | 3,83± | 2,96± | 3,65± | 2,65± | 4,28± | 4,21± | 2,80± |
| | 250 µM | 1,56 | 1,00*** | 1,28*** | 4*** | 1,05*** | 1,32*** | 1,29*** | 1,50 | 0,53*** | 0,56*** | 0,48*** | 0,27** | 0,61*** | 0,42*** | 0,52*** |
| Pb | 50 µM | 2,22± | 1,23± | 3,97± | 2,52±1,1 | 2,22± | 2,69± | 3,27± | 2,84± | 3,53± | 2,82± | 2,45± | 2,58± | 3,10± | 3,25± | 2,62± |
| | | 1,04 | 1,14*** | 0,88*** | 2 | 1,41 | 1,53 | 1,24*** | 0,82 | 0,51*** | 0,47 | 1,06 | 0,63 | 1,37 | 0,66* | 1,49 |
| | | 2,87± | 0,83± | 1,23± | 0,001 | 0*** | 0,32± | 1,83± | 2,77± | 1,78± | 2,52± | 0,97± | 1,20± | 1,46± | 3,00± | 1,55± |
| Cd | 50 µM | 1,14 | 1,08*** | 0,62*** | *** | 0*** | 0,33*** | 0,38*** | 0,81 | 0,75*** | 0,71 | 0,13*** | 0,70*** | 1,00*** | 0,23 | 0,52*** |
| | 100 µM | 1,64± | 0,001 | 0,96± | 0,001 | 0*** | 0,001 | 0,001 | 2,67± | 1,16± | 1,77± | 1,15± | 0,68± | 1,08± | 1,83± | 0,70*** |
| | 250 µM | 1,10 | *** | 0,27** | *** | 0*** | *** | *** | 0,67 | 0,74*** | 0,54*** | 0,08*** | 0,04*** | 0,24*** | 1,31** | 0,49± |
| Pb | 50 µM | 0,34± | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 3,15± | 0,001 | 0,001 | 1,29± | 0,66± | 0,96± | 0,40± | 0,50 | 0,21± | 0,92± | 0,49± |
| | | 0,40 | *** | *** | *** | 0,38*** | *** | *** | 0,89 | 0,09*** | 0,13 | 0,41*** | *** | 0,12*** | 0,19* | 0,003 |
| | | 2,61± | 6,20± | 4,00± | 2,40± | 3,15± | 3,97± | 2,07± | 2,71± | 3,45± | 3,12± | 4,17± | 3,00* | 3,63± | 2,27± | 3,12± |
| Pb | 50 µM | 1,05 | 9,63* | 1,09*** | 0,50 | 0,38** | 0,93*** | 1,33 | 1,02 | 0,38*** | 0,46** | 0,24*** | 1,40 | 0,49*** | 1,40 | 0,39*** |
| | 100 µM | 2,40± | 2,83± | 4,12± | 2,03± | 2,67± | 4,20± | 3,25± | 2,33± | 3,77± | 2,70± | 3,13± | 2,43± | 2,90± | 4,10± | 2,90± |
| | 250 µM | 0,91 | 0,48* | 1,14*** | 0,81 | 0,42 | 0,96*** | 1,36** | 1,23* | 0,67 | 0,43*** | 0,65* | 0,89*** | 0,57 | 0,79*** | 0,61** |
| Pb | 50 µM | 1,66± | 2,47± | 1,81± | 2,00± | 2,60± | 2,28± | 1,82± | 1,62± | 3,37± | 2,81± | 2,93± | 2,80± | 3,28± | 2,50± | 2,37± |
| | | 1,09 | 0,51*** | 0,80 | 0,90 | 0,50*** | 0,75 | 0,48 | 1,01 | 0,49*** | 0,53*** | 0,82*** | 0,25*** | 0,45*** | 0,47*** | 0,45*** |
| | | 2,61± | 9,63* | 1,09*** | 0,50 | 0,38** | 0,93*** | 1,33 | 1,02 | 0,67 | 0,38*** | 0,46** | 0,24*** | 1,40 | 0,49*** | 1,40 |

(*) – istotność wyniku przy $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ porównanie do kontroli z danym stężeniem metalu bez bakterii — significance of result at $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ in comparison to the control with the specified concentration of the metal without bacteria

Wzrost rzepaku odmian ozimej i jarych w obecności bakterii ryzosferowych

Sprawdzono wpływ bakterii *Bacillus* sp., *Bacteroidetes bacterium*, *Flavobacterium* sp., *L. rhizovicina*, *P. fluorescens*, *S. entomophila* i *Variovorax* sp. na wzrost siewek rzepaku (tab. 2, 3).

Tabela 3

Trójczynnikiowa analiza wariancji ANOVA3 przedstawiająca interakcję: (1) trzech odmian *B. napus* L. (Kronos, Belinda, Clipper), (2) inokulację nasion 7 różnymi szczepami bakterii (Pf – *P. fluorescens*, Lr – *L. Rhizovicina*, B sp. – *Bacillus* sp., F sp. – *Flavobacterium* sp., Bb – *Bacteroidetes bacterium*, Se – *S. entomophila*, V sp. – *Variovorax* sp. i K – wariant kontrolny, brak inokulacji), (3) obecność w podłożu metali ciężkich (Cu, Zn, Cd, Pb – każdy w trzech różnych stężeniach) na wzrost korzeni i hypokotyli — *Three-way ANOVA3 analysis of variance showing the interaction: (1) Three varieties of B. napus L. (Kronos, Belinda, Clipper), (2) inoculation of seeds with seven different bacteria strains (Pf – P. fluorescens, Lr – L. Rhizovicina, B sp. – Bacillus sp., F sp. – Flavobacterium sp., Bb – Bacteroidetes bacterium, Se – S. entomophila, V sp. – Variovorax sp. and K – control, no inoculation), (3) the presence of heavy metals in the substrate (Cu, Zn, Cd, Pb – each at three different concentrations) on the growth of roots and hypocotyls*

| Czynnik — Factor | Korzenie — Roots [mm] | | | Hypokotyle — Hypocotyls [mm] | | |
|---|-----------------------|----------|------------------|------------------------------|----------|------------------|
| | MS Efekt | F | poziom p level p | MS Efekt | F | poziom p level p |
| (1) Odmiana — Variety | 575,045 | 232,754 | 0,0000* | 212,297 | 171,350 | 0,0000* |
| (2) Inokulacja — Inoculation | 120,698 | 48,853 | 0,0000* | 25,0232* | 20,197 | 0,0000* |
| (3) Stężenia metali Concentrations of metals | 1805,376 | 730,739 | 0,0000* | 538,318 | 434,490 | 0,0000* |
| (1) × (2) | 84,881 | 34,356 | 0,0000* | 28,405 | 22,926 | 0,0000* |
| (1) × (3) | 44,874 | 18,163 | 0,0000* | 20,271 | 16,361 | 0,0000* |
| (2) × (3) | 24,501 | 9,917 | 0,0000* | 7,431 | 5,997 | 0,0000* |
| (1) × (2) × (3) | 15,716 | 6,361 | 0,0000* | 6,691 | 5,401 | 0,0000* |
| Błąd — Error | 2,471 | | | 1,239 | | |
| Test Newman-Keuls'a | | | | | | |
| (1) Odmiana — Variety | Kronos | 2,360 b | | Kronos | 2,874 c | |
| | Belinda | 2,656 c | | Belinda | 2,367 a | |
| | Clipper | 1,778 a | | Clipper | 2,453 b | |
| (2) Inokulacja — Inoculation | K | 2,434 d | | K | 2,430 a | |
| | Pf | 2,249 c | | Pf | 2,772 c | |
| | Lr | 2,348 cd | | Lr | 2,457 ab | |
| | B sp | 2,087 b | | B sp | 2,758 c | |
| | F sp | 2,097 b | | F sp | 2,376 a | |
| | Bb | 2,583 e | | Bb | 2,668 c | |
| | Se | 1,628 a | | Se | 2,491 a | |
| | V sp | 2,689 e | | V sp | 2,564 b | |

| Czynnik — <i>Factor</i> | Korzenie — <i>Roots</i> [mm] | | | Hypokotyle — <i>Hypocotyls</i> [mm] | | |
|--|------------------------------|---------|-------------------------|-------------------------------------|----------|-------------------------|
| | MS Efekt | F | poziom p level <i>p</i> | MS Efekt | F | poziom p level <i>p</i> |
| (3) Stężenie metali <i>Concentrations of metals</i> | Cu 50 | 1,749 c | | Cu 50 | 3,144 e | |
| | Cu 100 | 0,922 k | | Cu 100 | 2,705 c | |
| | Cu 250 | 0,447 b | | Cu 250 | 1,526 b | |
| | Zn 250 | 4,699 i | | Zn 250 | 3,320 f | |
| | Zn 500 | 3,938 g | | Zn 500 | 3,094 e | |
| | Zn 1000 | 2,417 d | | Zn 1000 | 2,908 d | |
| | Cd 50 | 1,608 c | | Cd 50 | 2,644 c | |
| | Cd 100 | 0,696 b | | Cd 100 | 1,611 b | |
| | Cd 250 | 0,116 a | | Cd 250 | 0,557 a | |
| | Pb 50 | 4,207 h | | Pb 50 | 3,237 ef | |
| | Pb 100 | 3,674 f | | Pb 100 | 3,109 e | |
| | Pb 250 | 2,701 e | | Pb 250 | 2,920 d | |

* $p \leq 0,05$, MS – średni kwadrat, F – stosunek MS do MS błąd, $n = 30$.

Istotne różnice testu Newman-Keuls'a oznaczono różnymi literami

* $p \leq 0,05$, MS – mean square, F – the ratio of MS to MS error, $n = 30$.

Significant differences in Newman-Keuls test marked with different letters

Wszystkie badane szczepy bakterii ryzosferowych stymulowały wydłużanie korzeni siewek obu odmian jarych, natomiast hamowały wzrost korzeni siewek odmiany ozimej (tab. 2).

W badaniu wzrostu hypokotyli zaobserwowano stymulujący wpływ wszystkich szczepów bakterii u odmiany jarej Clipper. Obecność bakterii *Variovorax* sp. stymulowała wzrost hypokotyli wszystkich badanych odmian rzepaku. W przypadku odmiany Kronos wydłużanie hypokotyli stymulował też szczep *Flavobacterium* sp., choć hamował ten sam proces u odmiany Belinda. Z kolei szczep *S. entomophila* hamował rozwój hypokotyli obu wymienionych odmian. Wzrostowi hypokotyli u odmiany Kronos nie sprzyjały też bakterie *Bacillus* sp. (tab. 2).

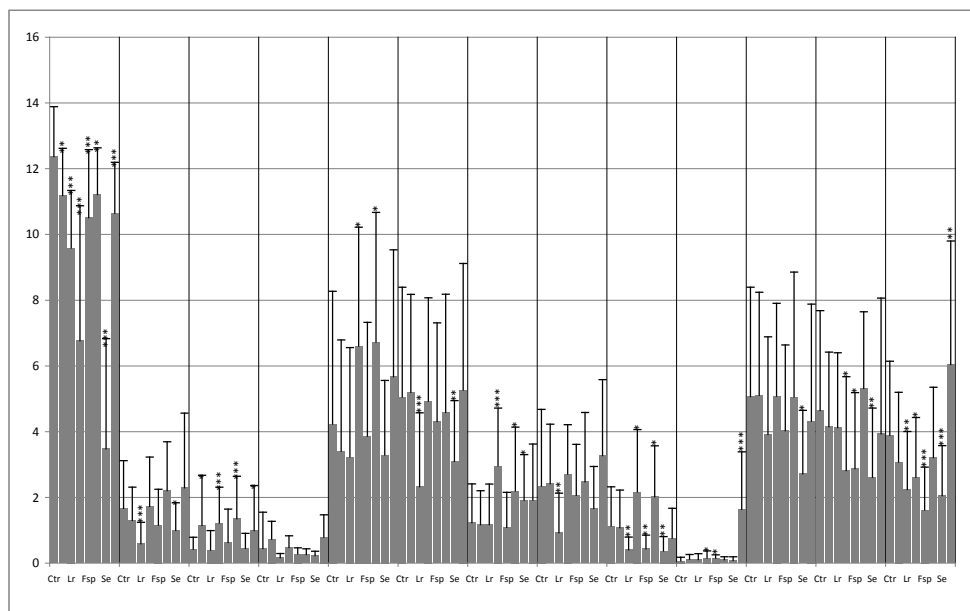
Badane mikroorganizmy glebowe najsilniej stymulowały wzrost siewek odmiany jarej Clipper, słabiej drugiej z odmian jarych Belinda, zaś dla odmiany ozimej Kronos były raczej inhibitorami wzrostu.

Selekcja bakterii ryzosferowych promujących wzrost rzepaku rosnącego w obecności metali ciężkich

Badane bakterie glebowe mogą zarówno stymulować, jak i hamować wzrost siewek rzepaku w środowisku zawierającym metale ciężkie.

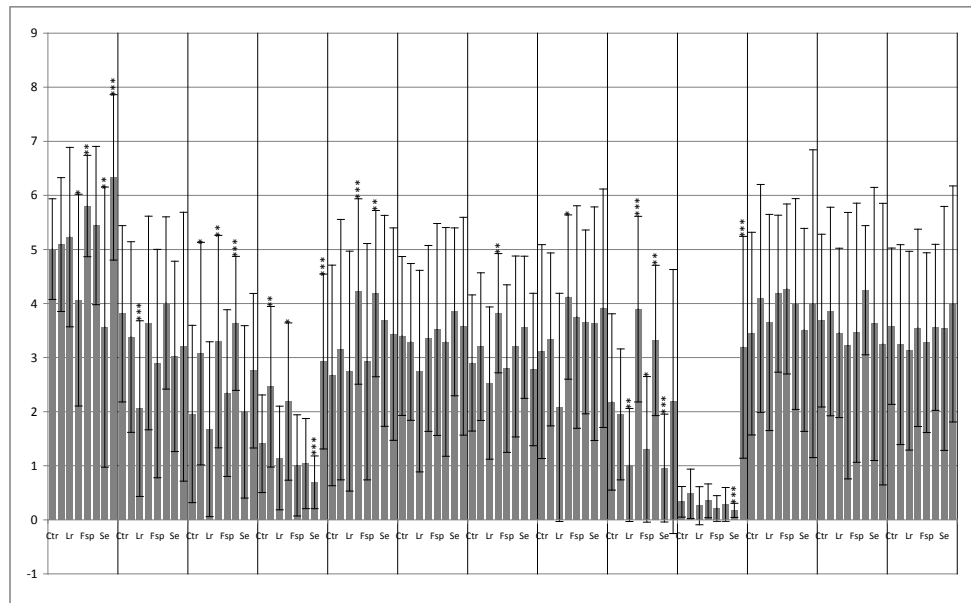
Bakterie *P. fluorescens* i *Variovorax* sp. na ogół nie wpływały na wzrost korzeni i hypokotyli siewek odmiany Kronos rosnących w zanieczyszczonym metalami środowisku, choć niekiedy obserwowano ich stymulujący efekt. Dodatkową inhibicję wzrostu, zwłaszcza korzeni siewek odmiany Kronos, spowodowaną

jonami metali często wywoływała inokulacja szczepami *L. rhizovicina* i *S. entomophila*, rzadziej *Flavobacterium* sp. Najkorzystniejszy wpływ na wzrost siewek tej odmiany w obecności metali ciężkich miały bakterie *Bacillus* sp. i *Bacteroidetes bacterium* (rys. 1 i 2).



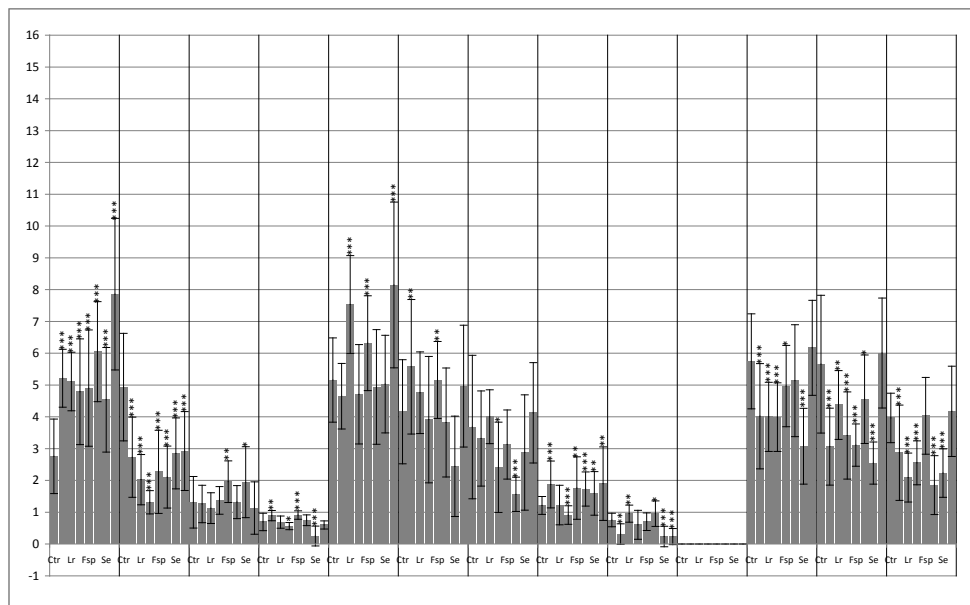
Rys. 1. Wyniki pomiarów długości korzeni siewek rzepaku odmiany Kronos rosnących w warunkach kontrolnych (Ctr), w obecności jonów Cd, Cu, Pb i Zn i/lub bakterii ryzosferowych. Szczepy bakterii są oznaczone pierwszymi literami nazw: Pf – *P. fluorescens*, Lr – *L. rhizovicina*, B sp. – *Bacillus* sp., F sp. – *Flavobacterium* sp., Bb – *Bacteroidetes bacterium*, Se – *S. entomophila*, V sp. – *Variovorax* sp.) — The length of seedlings roots of Kronos variety of oilseed rape growing under control conditions (Ctr), in the presence of Cd, Cu, Pb and Zn, and/or the rhizobacteria. Bacterial strains are denoted by first letters of their names

W przypadku odmiany Belinda, mimo że obecność 50 μM miedzi lub inokulacja którymkolwiek badanym szczepem bakterii stymulowała wzrost korzeni siewek, to jednoczesne występowanie tego stężenia miedzi i bakterii utrudniał ich wydłużanie. Podobny efekt zaobserwowano dla pojedynczego skumulowanego działania jonów ołowiu i bakterii (z wyjątkiem szczepu *Variovorax* sp.). Wyjątkowe wydłużanie korzeni, przekraczające z kolei stymulujący efekt samych bakterii i samego metalu, obserwowano dla szczepów *L. rhizovicina*, *Flavobacterium* sp. i *Variovorax* sp. przy 250 μM cynku oraz *P. fluorescens* i *Flavobacterium* sp. przy 500 μM cynku. Bakterie, z wyjątkiem *L. rhizovicina* i *Bacillus* sp., zmniejszały toksyczność 50 μM kadmu na wzrost korzeni, ale przy wyższych

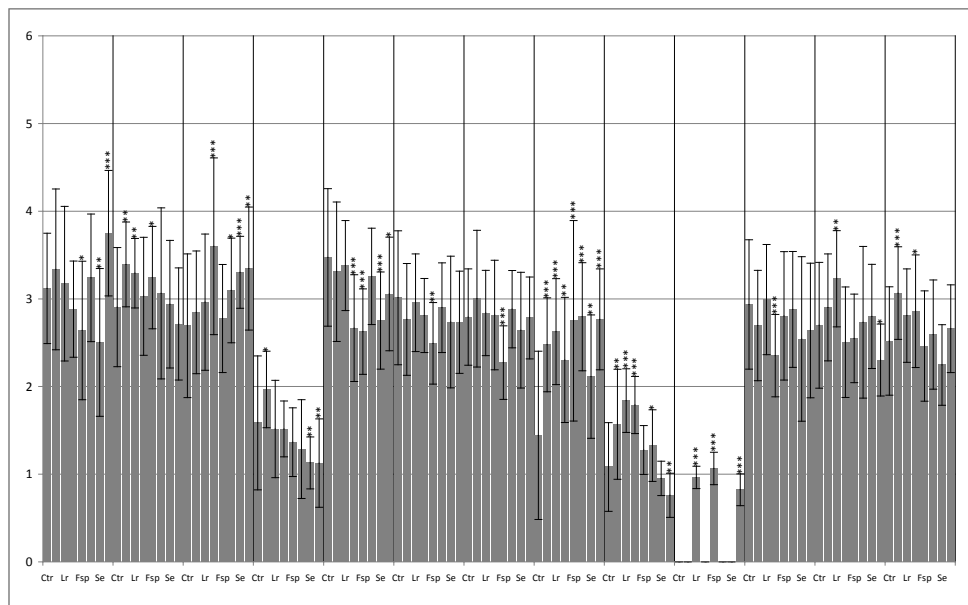


Rys. 2. Wyniki pomiarów długości hypocotyli siewek rzepaku odmiany Kronos rosnących w warunkach kontrolnych (Ctr), w obecności jonów Cd, Cu, Pb i Zn i/lub bakterii ryzosferowych. Szczepy bakterii są oznaczone pierwszymi literami nazw: Pf – *P. fluorescens*, Lr – *L. rhizovicina*, B sp. – *Bacillus sp.*, F sp. – *Flavobacterium sp.*, Bb – *Bacteroidetes bacterium*, Se – *S. entomophila*, V sp. – *Variovorax sp.*) — The length of seedlings hypocotyls of Kronos variety of oilseed rape growing under control conditions (Ctr), in the presence of Cd, Cu, Pb and Zn, and/or the rhizobacteria. Bacterial strains are denoted by first letters of their names

stężeniach tego metalu raczej były dodatkowym stresorem (tab. 2, rys. 3). Wzrost hypocotyli siewek tej odmiany był stymulowany przez niemal wszystkie badane szczepy bakterii w obecności toksycznego kadmu i 50–100 μM miedzi, zaś hamowany przez jednoczesną inokulację *Flavobacterium sp.* i obecność cynku. Szczep *Variovorax sp.*, jedyny bakteryjny stymulator wzrostu hypocotyli siewek odmiany Belinda, chronił przed toksycznym działaniem 100 μM miedzi, 50 i 250 μM kadmu, ale kiedy indziej bywał dodatkowym inhibitorem tego wzrostu (tab. 2, rys. 4).

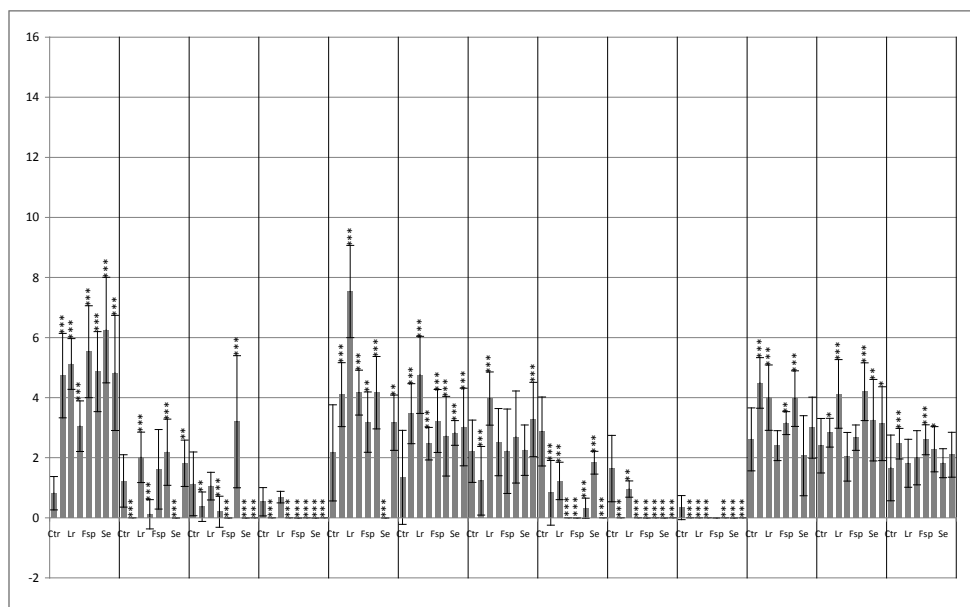


Rys. 3. Wyniki pomiarów długości korzeni siewek rzepaku odmiany Belinda rosnących w warunkach kontrolnych (Ctr), w obecności jonów Cd, Cu, Pb i Zn i/lub bakterii ryzosferowych. Szczepy bakterii są oznaczone pierwszymi literami nazw: Pf – *P. fluorescens*, Lr – *L. rhizovicina*, B sp. – *Bacillus sp.*, F sp. – *Flavobacterium sp.*, Bb – *Bacteroidetes bacterium*, Se – *S. entomophila*, V sp. – *Variovorax sp.*) — The length of seedlings roots of Belinda variety of oilseed rape growing under control conditions (Ctr), in the presence of Cd, Cu, Pb and Zn, and/or the rhizobacteria. Bacterial strains are denoted by first letters of their names



Rys. 4. Wyniki pomiarów długości hypocotyli siewek rzepaku odmiany Belinda rosnących w warunkach kontrolnych (Ctr), w obecności jonów Cd, Cu, Pb i Zn i/lub bakterii ryzosferowych. Szczepy bakterii są oznaczone pierwszymi literami nazw: Pf – *P. fluorescens*, Lr – *L. rhizovicina*, B sp. – *Bacillus sp.*, F sp. – *Flavobacterium sp.*, Bb – *Bacteroidetes bacterium*, Se – *S. entomophila*, V sp. – *Variovorax sp.*) — The length of seedlings hypocotyls of Belinda variety of oilseed rape growing under control conditions (Ctr), in the presence of Cd, Cu, Pb and Zn, and/or the rhizobacteria. Bacterial strains are denoted by first letters of their names

Dla odmiany Clipper kielkującej w środowisku zawierającym kadm i miedź, nawet w nietoksycznych stężeniach, obecność bakterii glebowych była na ogół stresorem hamującym wzrost siewek, a zwłaszcza wzrost korzenia. Wyjątkowo przy 50 μM miedzi szczepy *L. rhizovicina*, *Bacteroidetes bacterium* i *Variovorax sp.*, a przy 100 μM miedzi *B. bacterium* stymulowały wydłużanie korzeni, ale dużo słabiej niż w środowisku wolnym od metali (tab. 2, rys. 5). Wzrost hypocotyli siewek tej odmiany inokulowanych wszystkimi bakteriami był silniejszy w obecności 50 μM miedzi w porównaniu do siewek niezakażonych (tab. 2, rys. 6). W obecności cynku i ołowiu, metali, które nie były toksyczne dla siewek odmiany Clipper, bakterie w większości przypadków stymulowały ich wzrost, jedynie *P. fluorescens* w środowisku zawierającym 1000 μM cynku ograniczał wydłużanie korzeni (tab. 2, rys. 5 i 6).

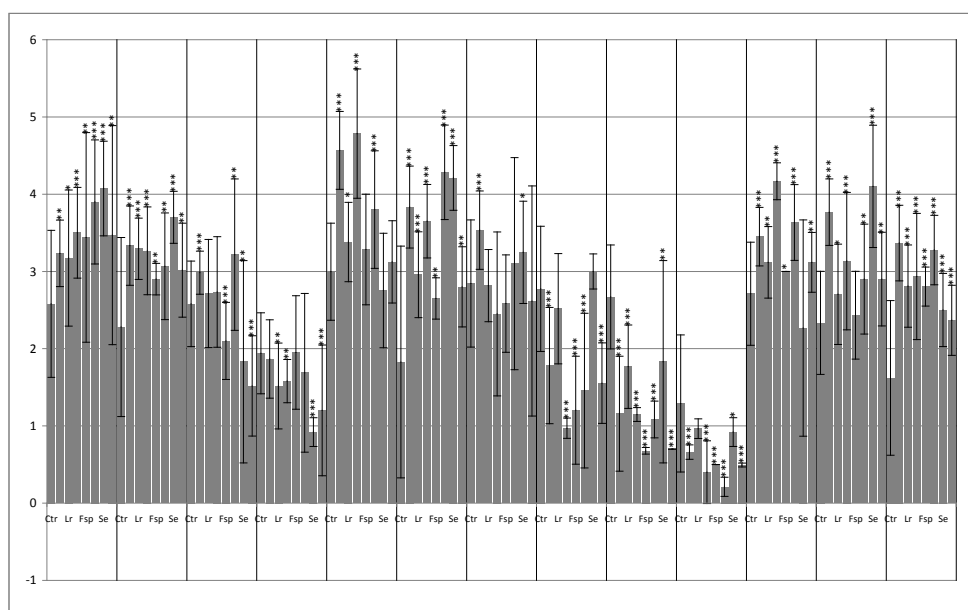


Rys. 5. Wyniki pomiarów długości korzeni siewek rzepaku odmiany Clipper rosnących w warunkach kontrolnych (Ctr), w obecności jonów Cd, Cu, Pb i Zn i/lub bakterii ryzosferowych. Szczepy bakterii są oznaczone pierwszymi literami nazw: Pf – *P. fluorescens*, Lr – *L. rhizovicina*, B sp. – *Bacillus sp.*, F sp. – *Flavobacterium sp.*, Bb – *Bacteroidetes bacterium*, Se – *S. entomophila*, V sp. – *Variovorax sp.*) — The length of seedlings roots of Clipper variety of oilseed rape growing under control conditions (Ctr), in the presence of Cd, Cu, Pb and Zn, and/or the rhizobacteria. Bacterial strains are denoted by first letters of their names

Najsilniejszy stymulujący wpływ bakterii na wzrost siewek w środowisku zawierającym miedź, cynk i ołów stwierdzono w przypadku odmiany jarej Clipper – dotyczyło to szczepów *Bacteroidetes bacterium* i *L. rhizovicina* oraz *P. fluorescens* i *Variovorax sp.* Wzrost korzeni siewek odmiany Belinda najsilniej stymulowały bakterie *Flavobacterium sp.* w obecności nietoksycznego cynku i toksycznych stężeń miedzi oraz *Variovorax sp.* wobec nietoksycznego cynku (tab. 2).

Przeprowadzono trójczynnikową analizę wariancji ANOVA3 przedstawiającą interakcję: trzech odmian *B. napus* L. (Belinda, Clipper i Kronos), inokulację nasion siedmioma szczepami bakterii ryzosferowych i wariant kontrolny (brak inokulacji) oraz obecność w podłożu jonów metali ciężkich (miedź, kadm, ołów w stężeniach 50, 100, 250 μM ; cynk – 250, 500, 1000 μM) na wzrost korzeni i hypokotyli siewek rzepaku. Stwierdzono, że szczepy *Bacteroidetes bacterium* i *Variovorax sp.* istotnie statystycznie wpływały na wydłużanie korzeni i hypokotyli wszystkich badanych odmian rzepaku. Ponadto bakterie *P. fluorescens* i *Bacillus sp.* stymulowały jedynie wzrost hypokotyli, a *L. rhizovicina* elongację korzeni.

Zarówno jony kadmu we wszystkich badanych stężeniach, jak i miedzi w najwyższym stężeniu (250 μM) istotnie statystycznie hamowały wydłużanie korzeni i hypokotyli *B. napus* L. Obecność jonów cynku i ołowiu w zastosowanych stężeniach w najmniejszym stopniu hamowała wzrost organów siewek (tab. 3).



Rys. 6. Wyniki pomiarów długości hypokotyli siewek rzepaku odmiany Clipper rosnących w warunkach kontrolnych (Ctr), w obecności jonów Cd, Cu, Pb i Zn i/lub bakterii ryzosferowych. Szczepy bakterii są oznaczone pierwszymi literami nazw: Pf – *P. fluorescens*, Lr – *L. rhizovicina*, B sp. – *Bacillus* sp., F sp. – *Flavobacterium* sp., Bb – *Bacteroidetes bacterium*, Se – *S. entomophila*, V sp. – *Variovorax* sp.) — The length of seedlings hypocotyls of Clipper variety of oilseed rape growing under control conditions (Ctr), in the presence of Cd, Cu, Pb and Zn, and/or the rhizobacteria. Bacterial strains are denoted by first letters of their names

Dyskusja

Obecność metali ciężkich w glebie wywiera negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin uprawnych, a w efekcie na wysokość uzyskiwanych plonów (Khan i in. 2009). Przeprowadzone przez nas badania na siewkach odmiany ozimej i dwu odmian jarych rzepaku tylko częściowo potwierdzają te spostrzeżenia. Wrażliwość na obecność cynku, miedzi, kadmu i ołowiu wykazywała odmiana ozima Kronos, natomiast bardziej odporne na działanie powyższych czynników były odmiany jare Belinda i Clipper (tab. 2). Ponadto wykazano, że cynk i ołów, a także niektóre

stężenia jonów kadmu i miedzi stymulowały wzrost korzeni jarych odmian rzepaku. W większości zbadanych wariantów obecność w podłożu metali ciężkich w większym stopniu hamowała wzrost korzeni niż hypokotyli siewek. Zależność tę zaobserwowano dla wszystkich badanych odmian rzepaku (tab. 2). Hamowaniu rozwoju korzeni roślin sprzyja stres, wywołany np. obecnością jonów metali ciężkich. Wykazano, że w wyniku stresu spowodowanego obecnością metali ciężkich w podłożu, w roślinach wzrasta poziom etylenu, co powoduje zahamowanie rozwoju korzeni (Zhuang i in. 2007, Gamalero i in. 2009). Nasze badania nie wykazały znaczącego ujemnego wpływu jonów ołowiu i cynku na wzrost siewek badanych odmian jarych (tab. 2). Wierzbicka i Obidzińska (1998) analizując wpływ ołowiu na kiełkowanie *Rumex thyrsiphlorus*, także nie stwierdziły negatywnego działania tych jonów na wzrost i rozwój badanych roślin.

Hamowanie wzrostu siewek roślin przez wysokie stężenie metali ciężkich wynika z niedoboru białek związanych z jonami metali i syntezą etylenu, a niezbędnych dla metabolizmu komórek (Van Assche i Clijstres 2006, Saharan i Nehra 2011). Wzrost korzeni *B. napus* odmian ozimej i jarych był niemal całkowicie zahamowany w obecności najwyższych zastosowanych stężeń jonów miedzi i kadmu (tab. 2). Podobnych obserwacji dokonali Marchiol i in. (2004). Toksyczny wpływ kadmu jest związany z zaburzeniami przemian związków azotowych oraz obniżeniem przepuszczalności błon biologicznych i jego wpływem na strukturę DNA (Gruca-Królikowska i Waclawek 2006). Devi i Prasad (1998) zbadali wpływ miedzi na fizjologię rogatka sztywnego (*Ceratophyllum demersum* L.) i wykazali spadek ilości chlorofilu, najprawdopodobniej spowodowany przez peroksydację błon chloroplastów oraz zaburzenie transportu przez błony plazmatyczne wywołane nadmierną produkcją wolnych rodników.

Kiełkowanie, wzrost i rozwój wielu gatunków roślin użytkowych mogą być promowane przez bakterie nazywane wówczas PGPR. W badaniach przeprowadzonych na kiwi (*Actinidia deliciosa*) dowiedziono, że bakterie z rodziny *Bacillus*, *Paenibacillus* i *Comamonas* przyczyniały się do stymulacji formowania korzeni (Erturk i in. 2010). Gutierrez Manero i in. (2003) zidentyfikowali szczepy należące do *Aureobacterium* i *Cellulomonas* promujące wzrost i kiełkowanie nasion łubinu (*Lupinus* L.). Natomiast szczep *P. fluorescens* jest istotnym czynnikiem biologicznym wpływającym pozytywnie na powyższe procesy u ryżu (*Oryza sativa* L.) (Mishra i Sinha 2000). Siedem analizowanych przez nas szczepów bakterii wykazywało cechy PGPR, stymulując wzrost korzeni siewek rzepaku dla obu odmian jarych Belinda i Clipper, w przypadku tej ostatniej stymulowały one również wzrost hypokotyli. Dla odmiany Kronos obserwowano hamowanie rozwoju korzeni po inokulacji nasion analizowanymi szczepami (tab. 2, rys. 3, 5 i 6).

Zdolność do wzrostu przy wysokich stężeniach metali ciężkich wykazują liczne drobnoustroje ryzosferowe, w tym bakterie PGPR. Mikroorganizmy wykorzystywane są do usuwania i redukcji zanieczyszczeń organicznych, a także

metali ciężkich (Mierek-Adamska i in. 2009). Poprzez produkcję specyficznych egzopolisacharydów mikroorganizmy są także w stanie wiązać metale takie jak ołów, kadm, kobalt, nikiel, miedź i cynk (Pérez 2008).

Wzrost odmiany jarej rzepaku Clipper po zainokulowaniu nasion badanymi bakteriami PGPR był na ogół stymulowany w środowisku zawierającym cynk i ołów (najmniejszą skuteczność tego typu miały bakterie *Bacillus* sp.), ale często hamowany w obecności badanych stężeń miedzi i kadmu. To ostatnie zjawisko jest o tyle zaskakujące, że obecność samych bakterii bądź tylko jonów miedzi czy kadmu zwykle ułatwiała wzrost siewek tej odmiany (rys. 5 i 6). Także u odmiany Belinda obserwowano stymulowanie wzrostu korzeni siewek przez szczepy bakterii, ołów i 50 μM miedzi, ale tylko wówczas gdy pojedynczo występowały w środowisku, zaś jednoczesna aplikacja silnie go hamowała (rys. 3).

Wszystkie szczepy stymulowały wydłużanie hypokotyli siewek odmiany Belinda w obecności 50–100 μM miedzi i kadmu, ale wzrost korzeni tylko przy 50–100 μM kadmu (rys. 3 i 4). Rozwój korzeni siewek odmiany Belinda w środowisku zanieczyszczonym miedzią, cynkiem i kadmem najsilniej wspomagały bakterie *Flavobacterium* sp. (rys. 3). Zaś *Bacteroidetes bacterium* najsilniej stymulował wzrost siewek Clipper w obecności jonów miedzi, cynku i ołowiu (rys. 5 i 6). Badane jare odmiany rzepaku różnią się wrażliwością na stymulujące działanie bakterii. W przypadku odmiany Clipper wszystkie bakterie nie tylko stymulują rozwój całych siewek (a nie tylko korzeni, jak miało to miejsce w przypadku odmiany Belinda), ale też silniej niwelują toksyczność metali, niekiedy nawet stymulując wzrost roślin w środowisku metali. Obecność bakterii *Bacillus* sp. i *Bacteroidetes bacterium* pomaga przetrwać siewkom odmiany Kronos w środowisku zawierającym jony miedzi, cynku i kadmu (rys. 1 i 2).

We wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, że inokulacja nasion rzepaku ozimego odmiany Kronos bakteriami ryzosferowym, zwłaszcza *Bacillus* sp., *Bacteroidetes bacterium*, *Flavobacterium* sp. i *S. entomophila*, zwiększa ich energię kiełkowania w obecności jonów metali ciężkich w porównaniu z nasionami nieinokulowanymi (Dąbrowska i in. 2010). Wydaje się więc, że charakter oddziaływań bakterii glebowych może się zmieniać wraz ze stadiem rozwojowym rośliny.

Ochronne działanie bakterii PGPR przed szkodliwym działaniem metali ciężkich na rośliny wykazywano wielokrotnie. Wykazano, że *Methylobacterium oryzae* i *Burkholderia* sp. ograniczają toksyczny wpływ kadmu i niklu na wzrost pomidora (Madhaiyan i in. 2007). Szczepy *Kluyvera ascorbata* SUD 165 i mutant SUD 165/26 stymulowały wzrost pomidora, rzepaku i kapusty sitowej w obecności hamujących stężeń jonów cynku (Gamalero i in. 2009). Doświadczenia prowadzone na *Azotobacter chroococcum* HKN-h, *B. megaterium* HKP-1, *B. mucilaginosus* HKK-1 i *B. subtilis* SJ-101 wykazały, że szczepy te chronią kapustę sitową przed toksycznym działaniem jonów cynku oraz stymulują jej wzrost w obecności tego metalu (Wu i in. 2006). Badania Wani i in. (2007) wykazały, że inokulacja

fasoli mung (*Vigna radiata* L. wilczek) bakteriami *Pseudomonas aeruginosa* wpływała na lepsze ukorzenianie i stymulowanie wzrostu oraz zmniejszoną akumulację kadmu w biomacie. Sinha and Muherjee (2008) zaobserwowali poprawę wzrostu i redukcję pobierania kadmu u gorczycy i dyni rosnących w obecności *Pseudomonas aeruginosa*. Wzrost roślin i pobieranie składników odżywczych były stymulowane u jęczmienia szczepionego bakteriami *Azospirillum lipoferum*, *Arthrobacter mysorens* i *Agrobacterium radiobacter*, ale akumulacja kadmu i ołowiu była mniejsza (Belimov i in. 2004). Dell Amico i in. (2008) wykazali, że obecność bakterii *Pseudomonas tolaasii* i *P. fluorescens* wpływała na zwiększenie gromadzenia kadmu oraz stymulowała wzrost korzeni i pędów *B. napus*. Znaczne podwyższenie biomasy roślin oraz wzrost zawartości kadmu i ołowiu u kukurydzy i pomidora inokulowanych *Burkholderia* sp. stwierdzili Jiang i in. (2008). Stwierdzono zwiększenie wzrostu oraz zawartości kadmu i cynku u *Sedum alfredii* inokulowanego *Burkholderia cepacia* (Li i in. 2007).

Podsumowanie

Zastosowana metoda testowania szczepów bakteryjnych pozwala na skuteczną selekcję bakterii stymulujących wzrost rzepaku w glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Niezbędne są jeszcze badania polowe, które pozwolą potwierdzić wyniki badań laboratoryjnych w warunkach naturalnych. Ponieważ rzepak, jako roślina należąca do hyperakumulatorów, może być z dużym sukcesem stosowana w procesie fitoremediacji, to wyselekcjonowanie bakterii odpornych na stres metali ciężkich i jednocześnie o cechach PGPR względem tego gatunku, może zwiększyć wydajność tej technologii poprzez lepszą aklimatyzację roślin w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Wyniki naszych badań wykazały, że każda z odmian rzepaku charakteryzuje się różną wrażliwością na obecność w podłożu metali ciężkich i bakterii PGPR. Stąd też niezbędne jest dopasowanie szczepów bakteryjnych, specyficznych dla każdego gatunku rośliny, a nawet odmiany.

Badania sfinansowano ze środków przyznanych przez UMK na badania własne oraz przez MNiSW, grant numer: N N310 285337.

Autorzy dziękują panu Dariuszowi Frątczakowi oraz firmie AgroBras Sp. z o.o. z Wągrowca za udostępnienie nasion rzepaku do eksperymentów.

Literatura

- Belimov A.A., Hontzeas N., Safronova V.I., Demchinskaya S.V., Piluzza G., Bullitta S., Glick B.R. 2004. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biol. Biochem.*, 37: 241-250.
- Dąbrowska G., Hryniewicz K., Kłosowska K., Trejgell A., Adamska-Mierek A. 2010. Wpływ bakterii ryzosferowych na kiełkowanie nasion *Brassica napus* L. w obecności metali ciężkich (Cd, Cu, Pb, Zn). *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, 31: 85-97.
- Dąbrowska G., Trejgell A., Hryniewicz K. 2011a. Wpływ inokulacji bakteriami ryzosferowymi na akumulację metali i wzrost *Brassica napus* L. odmiany ozimej. 45 Ogólnopolska Konferencja Naukowa Mikroorganizmy środowisk naturalnych i zanieczyszczonych. Olsztyn, 12-15.09.2011, materiały pokonferencyjne, s. 28.
- Dell'Amico E., Cavalca L., Andreoni V. 2008. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. *Soil Biol. Biochem.*, 40: 74-84.
- Devi P., Prasad M.N.V. 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Sci.*, 138: 157-165.
- Erturk Y., Ercisli S., Haznedar A., Cakmakci R. 2010. Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. *Biol. Res.*, 42: 91-98.
- Gamalero E., Lingua G., Berta G., Glick B.R. 2009. Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Can. J. Microbiol.*, 55: 501-514.
- Gruca-Królikowska S., Waclawek W. 2006. Metale w środowisku. Cz. 2. Wpływ metali ciężkich na rośliny. *Metrologia*, 11: 41-56.
- Gutierrez Manero F.J., Probanza A., Ramos B., Colon Flores J.J., Lucas Garcia J.A. 2003. Effects of culture filtrates of rhizobacteria isolated from wild lupine on germination, growth, and biological nitrogen fixation of lupine seedlings. *J. Plant Nutr.*, 26 (5): 1101-1115.
- Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. 2001. PAST: paleontological statistic software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electronica*, 4 (1): 9.
- Hryniewicz K., Baum Ch., Leinweber P. 2010. Density, metabolic activity, and identity of cultivable rhizosphere bacteria on *Salix viminalis* in disturbed arable and landfill soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 173: 1-10.
- Hryniewicz K., Kłosowska K., Goc A. 2011. Selekcja bakterii ryzosferowych usprawniających procesy fitoremediacji gleb zawierających związki metali ciężkich. *Ochr. Środow.*, 33: 53-58.
- Jiang Ch., Sheng X., Qian M., Wang Q. 2008. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*, 72 (2): 157-164.
- Jing Y., He Z., Yang X. 2007. Role of soil rhizobacteria in pyto remediation of heavy metal contaminated soils. *J. Zhejiang Univ. Sci.*, B, 8 (3): 192-207.
- Kandasamy S., Loganathan K., Muthuraj R., Duraisamy S., Seetharaman S., Thiruvengadam R., Ponnusamy B., Ramasamy S. 2009. Understanding the molecular basis of plant growth promotional effect of *Pseudomonas fluorescens* on rice through protein profiling. *Proteome Sci.*, 7: 47.
- Khan M.S., Zaidi A., Wani P.A., Oves M. 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ. Chem.*, 7: 1-19.

- Koo S-Y., Cho K-S. 2009. Isolation and Characterization of a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5. *J. Microbiol. Biotech.*, 19 (11): 1431-1438.
- Li W.C., Ye Z.H., Wong M.H. 2007. Effects of bacteria on enhanced metal uptake of the Cd/Zn-hyperaccumulating plant, *Sedum alfredii*. *J. Exp. Bot.*, 58 (15-16): 4173-82.
- Lone M.I., He Z., Stoffella P.J., Yang X. 2008. Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *J. Zhejiang Univ. Sci., B*, 9 (3): 210-220.
- Madhaiyan M., Poonguzhali S., Sa T. 2007. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere*, 69: 220-228.
- Marchiol L., Assolari S., Sacco P., Zerbi G. 2004. Phytoextraction of heavy metals by canola (*Brassica napus*) and radish (*Raphanus sativus*) grown on multicontaminated soil. *Environ. Pollut.*, 132: 21-27.
- Memon A.R. i Schröder P. 2009. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 16: 162-175.
- Mierek-Adamska A., Dąbrowska G., Goc A. Rośliny modyfikowane genetycznie a strategie oczyszczania gleb z metali ciężkich. *Post. Biol. Kom.*, 36 (4): 649-662.
- Mishra D.S., Sinha A.P. 2000. Plant growth-promoting activity of some fungal and bacterial agents on rice seed germination and seedling growth. *Tropical Agricult.*, 77 (3): 188-191.
- Nie L., Shah S., Rashid A., Burd G.I., Dixon D.G., Glick B.R. 2002. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. *Plant Physiol. Biochem.*, 40: 355-361.
- Saharan B.S., Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sci. Med. Res.*, 2011: LSMR-21.
- Sheng X.F., Xia J.J. 2006. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere*, 64: 1036-1042.
- Sheng X.F., Xia J.J., Jiang C.Y., He L.Y., Qian M. 2008. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environ. Pollut.*, 156: 1164-1170.
- Sinha S., Mukherjee S.K. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* KUCd1, a possible candidate for cadmium bioremediation. *Brazil. J. Microbiol.*, 40: 655-662.
- Szulc P.M., Kobierski M., Gaca J., Nnuji U. 2010. Akumulacja cynku i miedzi w organach wegetatywnych *Brassica napus* na podstawie doświadczenia wegetacyjnego. *Ekologia i Technika*, 2 (105): 78-82.
- Van Assche F., Clijsters H. 2006. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell Environ.*, 13: 195-206.
- van Loon L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.*, 119: 243-254.
- Wani P.A., Khan M.S., Zaidi A. 2007. Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram plants. *Chemosphere*, 70: 36-45.
- Wierzbicka M., Obidzińska J. 1998. The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. *Plant Sci.*, 137: 155-171.
- Xue T., Li X., Zhu W., Wu Ch., Yang G., Zheng Ch. 2009. Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. *J. Exp. Bot.*, 60: 339-349.
- Zhuang X., Chen J., Shim H., Bai Z. 2007. New advances in plant growth promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ. International*, 33: 406-413.