

STUDIA I RAPORTY IUNG-PIB

ZESZYT 54(8): 111-121

2017

Monika Koziel, Sylwia Siebielec, Grzegorz Siebielec, Stefan Martyniuk*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach***OCENA EFEKTYWNOŚCI SYMBIOTYCZNEJ SZCZEPÓW BAKTERII
Z RODZAJU *RHIZOBIUM* WYIZOLOWANYCH Z BRODAWEK
KORZENIOWYCH BOBIKU (*VICIA FABA L. VAR. MINOR*)
I GROCHU (*PISUM SATIVUM L.*)*****Słowa kluczowe:** bakterie, brodawki korzeniowe, bobik, groch**Wstęp**

Rośliny bobowate (*Fabaceae*) są ważnym źródłem białka dla ludzi i zwierząt hodowlanych, a ich uprawa wpływa korzystnie na żyzność gleb i plonowanie innych roślin uprawianych w płodozmianie, zwłaszcza w warunkach rolnictwa integrowanego i ekologicznego (4). Jednym z najważniejszych czynników oddziałujących na wzrost i plonowanie omawianych roślin są bakterie z rodzaju *Rhizobium* indukujące powstawanie na korzeniach brodawek symbiotycznych, w których odbywa się proces redukcji azotu atmosferycznego do formy amonowej, pobieranej przez roślinę bobowatą. Biopreparaty zawierające bakterie symbiotyczne przyczyniają się do zwiększenia plonów roślin bobowatych, w związku z tym stosowane są one dość powszechnie w nowoczesnej agrotechnice tych roślin do przedsięwziętego otoczkowania nasion. Badania przeprowadzone w różnych krajach wykazały, że stosowanie preparatów zawierających bakterie symbiotyczne daje bardzo pozytywne efekty plonotwórcze wówczas, gdy rośliny bobowate uprawiane są na glebach nie zawierających rizobiów lub na glebach zasiedlonych przez małe i nieefektywne populacje wymienionych bakterii. W przypadku upraw na glebach zasiedlonych przez duże populacje bakterii symbiotycznych aplikacja szczepionek rizobiowych nie przyczynia się na ogół do istotnych przyrostów plonów (2, 5, 6, 14, 16). Najważniejszymi czynnikami, od których zależą efekty stosowania biopreparatów jest liczebność rizobiów w preparacie, a przede wszystkim efektywność symbiotyczna

* Opracowanie wykonano w ramach zadania 1.3 i 1.4 w programie wieloletnim IUNG-PIB.

wyselekcjonowanych szczepów bakteryjnych wchodzących w skład preparatu szczepionkowego (2, 4, 5, 6, 11).

Zakład Mikrobiologii Rolniczej IUNG-PIB w Puławach posiada kolekcję licznych izolatów bakterii brodawkowych, a najefektywniejsze symbiotycznie szczepy wykorzystywane są do badań i produkcji szczepionek. Z tego też względu bardzo ważne jest pozyskiwanie nowych szczepów, które wzbogaciłyby istniejącą kolekcję i mogłyby być wykorzystywane w praktyce.

Celem przeprowadzonych badań było wyodrębnienie nowych izolatów bakterii symbiotycznych grochu i bobiku z ekstensywnych upraw tych roślin oraz ocena efektywności symbiotycznej wyizolowanych szczepów.

Materiały i metody

Próbki gleb i roślin bobowatych pobrano w lipcu 2015 roku z pól, na których uprawiano groch w miejscowości Gołąb oraz bobik w miejscowościach Stara Wieś i Pożóg. Na polach, z których pobierano materiał do badań nie stosowano szczepionek zawierających bakterie brodawkowe dla roślin bobowatych oraz środków ochrony roślin. Próbki glebowe pobierano z warstwy 0-15 cm w 3 powtórzeniach. Glebę spod roślin bobowatych, przeznaczoną do analiz mikrobiologicznych przesiano na sicie o średnicy oczek 2 mm. Próbki glebowe przechowywano w zamkniętych woreczkach foliowych w temperaturze 4°C. Próbki powietrznie suche przeznaczono do oznaczeń fizykochemicznych gleb: odczyn gleby (pH w H₂O) oraz skład granulometryczny.

- Wyodrębnienie szczepów

Korzenie roślin bobowatych wysterylizowano w 70% etanolu, a następnie pobrano brodawki i wyłożono na płytki Petriego zawierające agarową pożywkę YEMA z dodatkiem Czerwieni Kongo. Płytki inkubowano w 28°C przez okres 5 dni. Następnie uzyskane kolonie bakterii z rodzaju *Rhizobium* doczyszczano metodą posiewów redukcyjnych, a uzyskane czyste kolonie przenoszono na skosy agarowe YEMA z 3 g CaCO₃ L⁻¹ według metodyk (17) i przechowywano do dalszych analiz w 4°C.

- Oznaczenia właściwości gleb

Wykonano oznaczenia aktywności biochemicznej gleb: dehydrogenaz (1), fosfatazy zasadowej oraz fosfatazy kwaśnej (15). Badanie aktywności dehydrogenaz wykonano metodą kolorymetryczną, z zastosowaniem jako substratu 3-procentowego TTC (chlorku trójfenylotetrazolu), po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, przy długości fal 485 nm. Aktywność fosfatazy zasadowej i kwaśnej wykonano metodą kolorymetryczną z zastosowaniem PNP (p-nitrofenylofosforan sodu), po 1-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, przy długości fali 410nm.

Ogólną liczebność bakterii właściwych i liczebność bakterii promieniowców (18), ogólną liczebność bakterii z rodzaju *Azotobacter* (3) oraz ogólną liczebność grzybów (9) określono metodą wysiewu rozcieńczeń glebowych. Płytki inkubowano w temperaturze 28°C, natomiast liczbę kolonii drobnoustrojów hodowanych na poszczególnych pożywkach określono po upływie 3 do 5 dni. Następnie oznaczono liczbę jednostek tworzących kolonie (jtk) w przeliczeniu na 1 g s.m. gleby.

Skład granulometryczny gleb oznaczony został w Zakładzie Gleboznawstwa Erozji i Ochrony Gruntów IUNG-PIB metodą laserową (Tabela 1).

Tabela 1

Skład granulometryczny gleb z pól, na których uprawiano groch (Gołąb)
oraz bobik (Stara Wieś, Pożóg)

Zawartość procentowa frakcji granulometrycznych				
Miejscowość	Piaski 2,0-0,05mm	Pyły 0,05-0,002mm	Il <0,002mm	Gatunek ¹
Stara Wieś	33,02	62,81	4,17	pył gliniasty
Požóg	25,48	69,71	4,81	pył gliniasty
Gołąb	37,75	55,84	6,41	pył gliniasty

¹gatunek gleby wg klasyfikacji PTG z 2008 r.

Źródło: opracowanie własne

• Doświadczenie wazonowe

W doświadczeniu wazonowym przetestowano 9 nowo- pozyskanych szczepów bakterii symbiotycznych bobiku (*Rhizobium leguminosarum biovar viciae*): 1A1, 1A2, 1A3, 1A4 (Stara Wieś), 2A1, 2A2, 2A3, 2A4, 2A5 (Pożóg) oraz 2 szczepy pochodzące z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Rolniczej IUNG-PIB: N-96, BA1, dla uproszczenia zwane w dalszej części pracy szczepami kolekcyjnymi. Z kolei w przypadku grochu porównano 6 nowych izolatów bakterii symbiotycznych *Rhizobium leguminosarum biovar viciae*: 3A1, 3A2, 3A3, 3A4, 3A5, 3A6 (Gołąb) oraz 3 szczepy z istniejącej kolekcji: GGC, GGL, PRE (Tab. 2). Doświadczenie przeprowadzono w plastikowych wazonach o pojemności 1000 ml wypełnionych sterylnym podłożem (perlit). Każdy szczep bakteryjny testowano w 3 powtórzeniach (wazonach). Każdy z wazonów odpowiednio nawodniono płynną bezazotową pożywką (50 ml). Nasiona grochu (odm. Bobas) i bobiku (odm. Tarchalska) przed wysianiem zostały wysterylizowane w 5% H₂O₂ (10 minut) i dokładnie przepłukane sterylną wodą destylowaną i pozostawione do wyschnięcia. Tak przygotowane nasiona wprowadzono do dołków w podłożu perlitowym w ilości pięć sztuk nasion na jeden wazon. Przed wysianiem każdego pojedynczego nasiona do dołka dodano po 1 ml hodowli bakteryjnej reprezentującej dany szczep, natomiast do wazonów kontrolnych dodano po 1 ml płynnej pożywki YEMA. Po skiełkowaniu nasion pozostawiono po 3 rośliny w każdym wazonie. Wazony umieszczono w pokoju fitotronowym z regulowaną temperaturą i oświetleniem na okres czterech tygodni. Po tym czasie otrzymane rośliny zważono (części nadziemne oraz korzenie) i policzono brodawki na korzeniach roślin. Ocenę statystyczną doświadczenia wazonowego obejmującą analizę wariancji oraz test średnich Tukeya wykonano w programie Statistica.

Tabela 2

Schemat doświadczenia wazonowego przeprowadzonego w celu porównania nowo-pozyskanych szczepów z upraw ekstensywnych oraz szczepów z istniejącej kolekcji

Roślina	Szczep	Miejsce pozyskania szczepu	Rok pozyskania
Bobik	1A ₁ 1A ₂ 1A ₃ 1A ₄	Stara Wieś	2015
	2A ₁ 2A ₂ 2A ₃ 2A ₄ 2A ₅	Požóg	2015
	N-96	Puławy	1997
	BA ₁	Antopol	1990
Groch	3A ₁ 3A ₂ 3A ₃ 3A ₄ 3A ₅ 3A ₆	Gołąb	2015
	GGC	Puławy	1990
	GGL	Puławy	1990
	PRE	Holandia	1958

Źródło: opracowanie własne

Wyniki i dyskusja

Gleby, z których wyizolowano nowe szczepy bakterii charakteryzował podobny skład granulometryczny, wszystkie posiadały uziarnienie pyłu gliniastego. Odczyn gleb wahał się od pH 4,3 (gleba z Gołębia) do pH 5,8 gleba ze Starej Wsi (Tab. 1). Pomimo ekstensywności produkcji na polach, z których pobierano materiał, niektóre z gleb charakteryzowały się wysoką aktywnością enzymatyczną. Zbliżone wartości dla aktywności dehydrogenaz oraz fosfatazy kwaśnej i fosfatazy zasadowej zanotowano dla gleb ze Starej Wsi i Pożoga. W glebie pochodzącej z Gołębia, charakteryzującej się najniższym pH, stwierdzono też niższą aktywność dehydrogenaz ($50,1 \mu\text{g g}^{-1}$) i fosfatazy zasadowej ($16,7 \mu\text{g g}^{-1}$), natomiast aktywność fosfatazy kwaśnej była dwukrotnie wyższa ($103,7 \mu\text{g g}^{-1}$) w porównaniu z aktywnością tego enzymu dla dwóch pozostałych gleb (Tabela 2). Badania innych autorów wskazują, że grupa enzymów glebowych jest wrażliwa i w dużym stopniu zależna od odczynu gleby (7). Ogólna liczebność bakterii i grzybów była podobna we wszystkich analizowanych glebach, jedynie w glebie z Gołębia (pH 4,3) nie stwierdzono bakterii z rodzaju *Azotobacter*.

Jak wynika z danych literaturowych te niesymbiotyczne bakterie wiążące azot atmosferyczny preferują gleby zasadowe i rzadko występują w glebach kwaśnych o pH poniżej 6 (10); (Tabela 3).

Tabela 3

Odczyn oraz charakterystyka mikrobiologiczna gleb spod uprawy grochu i bobiku

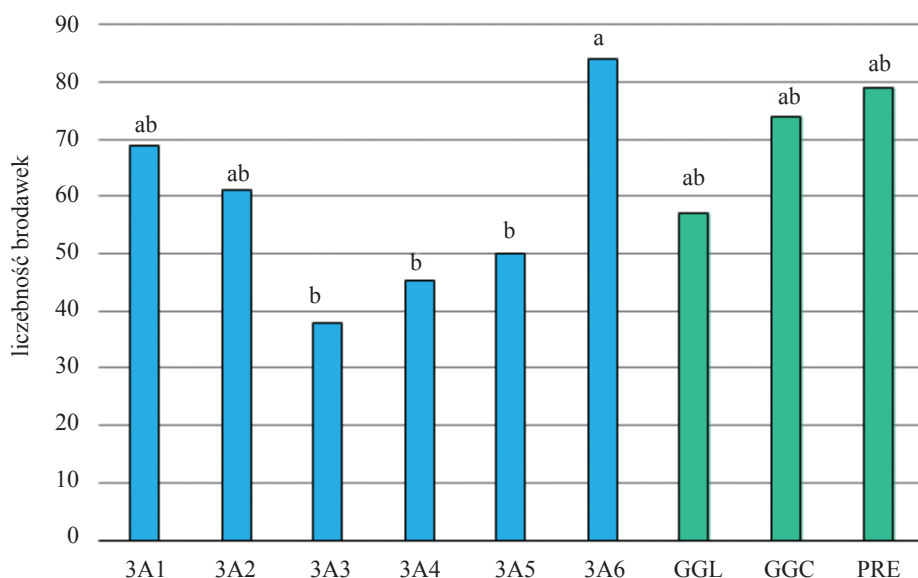
Miejscowość	pH gleby (w H ₂ O)	Ogólna liczebność bakterii z rodzaju <i>Azotobacter</i> (10 ³ jtk·g ⁻¹ s.m. gleby)	Ogólna liczebność grzybów (10 ⁵ jtk·g ⁻¹ s.m. gleby)	Ogólna liczebność bakterii (10 ⁷ jtk·g ⁻¹ s.m. gleby)	Fosfataza kwaśna (μg p-nitrofenolu·g s.m. ⁻¹)	Fosfataza zasadowa (μg p-nitrofenolu·g s.m. ⁻¹)	Dehydrogenaza (μg TPF·g s.m. ⁻¹)
Stara Wieś	5,8	1,20 x 10 ³	11,61 x 10 ⁵	10,8 x 10 ⁷	64,90	56,43	257,20
Pożóg	4,9	1,17 x 10 ³	14,64 x 10 ⁵	15,96 x 10 ⁷	53,29	71,48	214,36
Gołąb	4,3	brak	8,00 x 10 ⁵	19,7 x 10 ⁷	103,73	16,65	50,12

Zródło: opracowanie własne

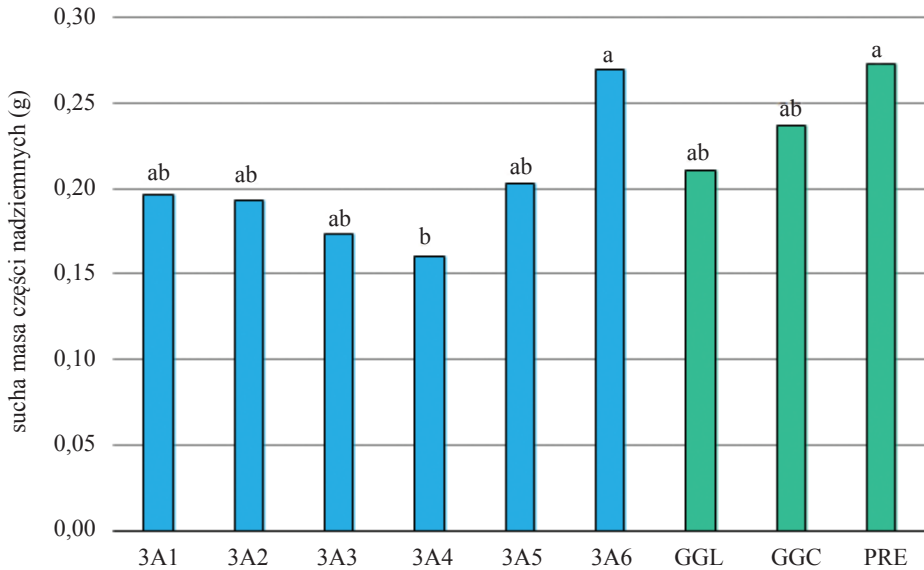
W przeprowadzonym doświadczeniu wazonowym analizowano wpływ badanych szczepów na intensywność brodawkowania, wzrost części nadziemnych i korzeni grochu i bobiku.

W bioteście z grochem stwierdzono, że rośliny zaszczone szczepem 3A₆, wyizolowanym z brodawek tej rośliny uprawianej w Gołębiu, charakteryzowały się największą liczebnością brodawek (84 brodawek/roślinę); (Rys. 1). Dwa spośród trzech szczepów *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*: GGC (74 brodawek/roślinę) i PRE (79 brodawek/roślinę), pochodzące z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Rolniczej również miały korzystny wpływ na proces brodawkowania. Z reguły nowe izolaty były nieco gorsze od szczepów kolekcyjnych (Rys. 1). Również w przypadku masy części nadziemnych wykazano dużą zmienność wśród testowanych szczepów a zaobserwowane różnice w pewnym stopniu odzwierciedlały zróżnicowanie w liczbie brodawek. Największa sucha masa części nadziemnych grochu charakteryzowała rośliny zaszczone szczepem 3A₆ (0,27 g) oraz szczepami z istniejącej kolekcji GGC (0,24 g) i PRE (0,27g). Zbliżone zależności uzyskano w stosunku do suchej masy korzeni grochu (Rys. 2 i 3). Średnia wielkość suchej masy części nadziemnych roślin szczepionych nowymi szczepami była nieco niższa (0,20 g) niż w przypadku szczepów kolekcyjnych (0,24 g) jednak z reguły nowe szczepy nie były istotnie mniej efektywne niż szczepy z kolekcji. Podobne rezultaty uzyskano w przypadku średnich wartości dla suchej masy korzeni grochu (Rys. 2 i 3).

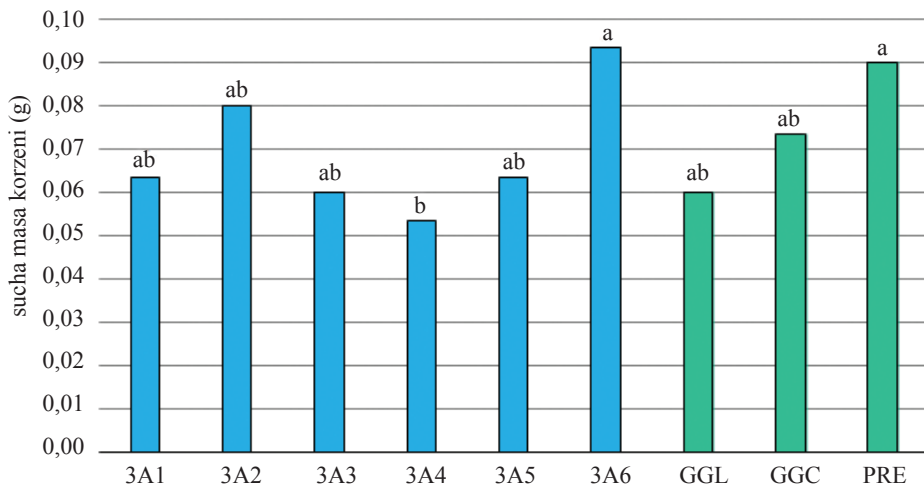
Wyniki doświadczenia wazonowego z bobikiem wskazują, że spośród symbiontów bobiku wyizolowanych z brodawek korzeniowych tej rośliny szczepy 1A₂ (31 brodawek/roślinę) i 2A₅ (29 brodawek/roślinę) indukowały największą liczbę brodawek korzeniowych a liczba brodawek była mocno zróżnicowana pomiędzy poszczególnymi szczepami (Rys. 4). Szczepy kolekcyjne (N-96, BA1) były mniej zróżnicowane pod tym względem i nie zapewniały większej liczby brodawek niż nowe szczepy pozyskane z upraw ekstensywnych. Średnie intensywności brodawkowania dla szczepów wyizolowanych z brodawek korzeniowych bobiku zarówno ze Starej Wsi (24 brodawek/roślinę), jak i Pożoga (20 brodawek/roślinę) były tylko nieco wyższe w porównaniu ze szczepami kolekcyjnymi (18 brodawek/roślinę). Zwiększenie intensywności brodawkowania przez szczepy 1A₂ i 2A₅ nie miało jednak wpływu na wzrost bobiku. Duże zróżnicowanie liczby brodawek na roślinach bobiku szczepionych testowanymi szczepami, nie znalazło również odzwierciedlenia w masie nadziemnych części tych roślin, gdzie praktycznie nie stwierdzono istotnej zmienności. Jeden ze szczepów kolekcyjnych (BA1) zapewniał istotnie wyższą masę nadziemną bobiku, w przypadku pozostałych szczepów nie było istotnych różnic (Rys. 5). Średnia wartość suchej masy części nadziemnych dla szczepów kolekcyjnych wynosiła w przeliczeniu na 1 roślinę 0,29 g, natomiast dla izolatów pochodzących ze Starej Wsi i Pożoga, odpowiednio 0,23 g i 0,26 g. Z kolei średnie wartości suchej masy korzeni dla szczepów ze Starej Wsi były z reguły nieco niższe niż w przypadku szczepów z Pożoga (Rys. 6). W większości przypadków nowe szczepy z upraw ekstensywnych nie były jednak istotnie słabsze od szczepów kolekcyjnych pod względem wpływu na masę korzeni roślin.



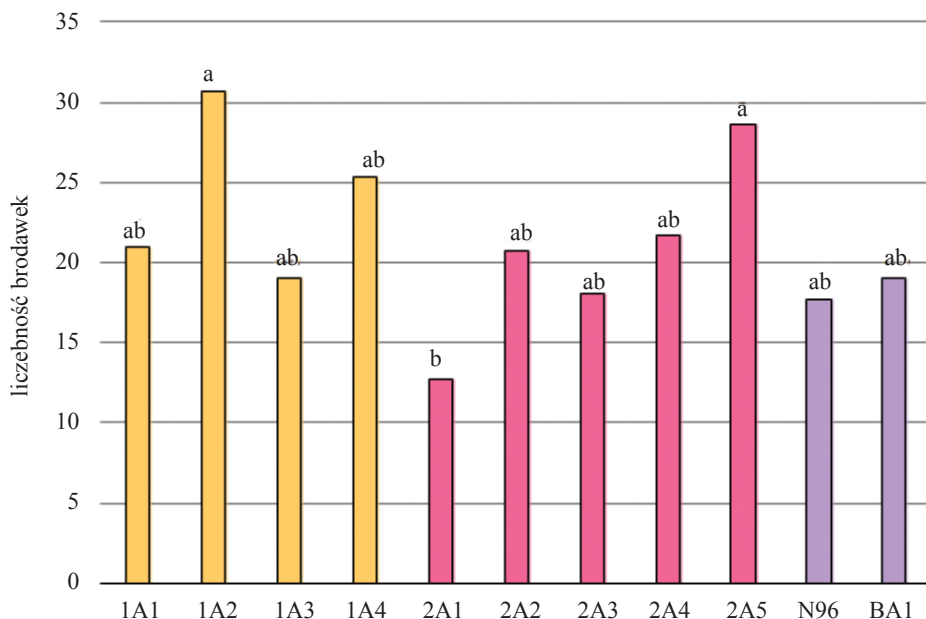
Rys. 1. Średnia liczebność brodawek na korzeniach grochu szczepionego badanymi izolatami bakterii symbiotycznych. Średnie oznaczonymi tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie wg testu Tukeya na poziomie istotności 0,05



Rys. 2. Sucha masa części nadziemnych grochu w przeliczeniu na 1 roślinę. Średnie oznaczonymi tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie wg testu Tukeya na poziomie istotności 0,05
Źródło: opracowanie własne.

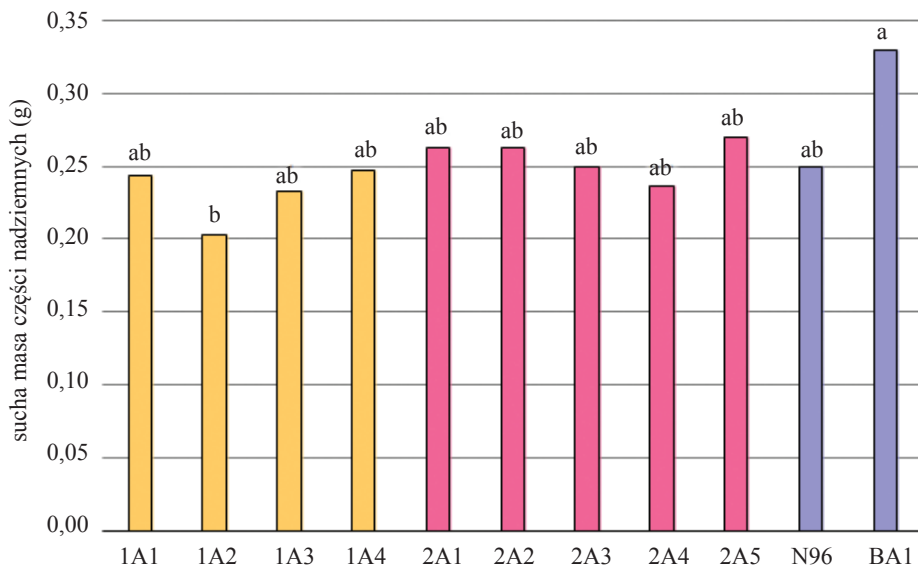


Rys. 3. Sucha masa korzeni grochu w przeliczeniu na 1 roślinę. Średnie oznaczonymi tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie wg testu Tukeya na poziomie istotności 0,05
Źródło: opracowanie własne



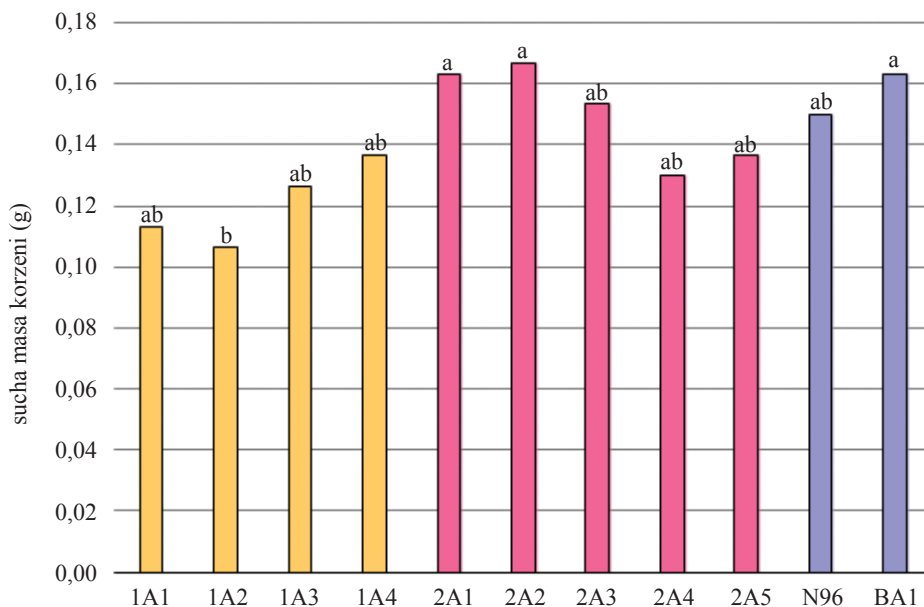
Rys. 4. Średnia liczebność brodawek na korzeniach bobiku szczepionego badanymi izolatami bakterii symbiotycznych. Średnie oznaczonymi tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie wg testu Tukeya na poziomie istotności 0,05

Źródło: opracowanie własne



Rys. 5. Sucha masa części nadziemnych bobiku w przeliczeniu na 1 roślinę. Średnie oznaczonymi tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie wg testu Tukeya na poziomie istotności 0,05

Źródło: opracowanie własne



Rys. 6. Sucha masa korzeni bobiku w przeliczeniu na 1 roślinę. Średnie oznaczonymi tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie wg testu Tukey'a na poziomie istotności 0,05

Źródło: opracowanie własne

Podsumowując, przeprowadzone doświadczenie wazonowe wykazało, że nowo wyizolowane szczepy bakterii symbiotycznych grochu i bobiku były bardzo zróżnicowane pod względem efektywności symbiotycznej. Spośród dziewięciu szczepów wyizolowanych z brodawek bobiku tylko trzy (1A₂, 1A₄ i 2A₅) indukowały znacznie więcej brodawek korzeniowych niż kolecyjne szczepy bobiku, natomiast na korzeniach siewek bobiku zaszczepionych pozostałymi izolatami stwierdzono podobne lub nawet mniejsze liczebności brodawek niż na korzeniach siewek zaszczepionych szczepami kolecyjnymi. Oznaczenia suchej masy pędów i korzeni bobiku (Rys. 5 i 6) wykazały, że parametry te miały najniższe wartości w przypadku siewek bobiku zaszczepionych szczepem 1A₂, pomimo że indukował on zawiązanie największej liczby brodawek na korzeniach tej rośliny. Wyniki te wskazują, że omawiany szczep mógł być mało efektywny pod względem symbiotycznym i prawdopodobnie wiązał małe ilości azotu atmosferycznego.

Spośród sześciu szczepów wyizolowanych z brodawek grochu tylko jeden (3A₆) indukował nieco więcej brodawek korzeniowych w porównaniu ze szczepami kolecyjnymi. Szczep ten zapewniał też największe wartości masy pędów i korzeni roślin. Wyniki te mogą wskazywać, że omawiany szczep jest szczególnie efektywny i wiąże największą ilość azotu atmosferycznego.

Nasze badania pozwoliły stwierdzić, że większość testowanych szczepów charakteryzował pozytywny wpływ na brodawkowanie i wzrost roślin wykorzystanych

w doświadczeniu w porównaniu ze szczepami kolekcyjnymi. Na uwagę zasługuje fakt, że szczepy kolekcyjne pomimo długoletniego przechowywania w warunkach laboratoryjnych wciąż wykazują dużą aktywność symbiotyczną. Szczep PRE wyizolowany został już w latach 50 XX w., natomiast pozostałe szczepy pozyskano w latach 90 XX w. Możliwe jest również pozyskanie nowych izolatów równie aktywnych bakterii symbiotycznych, czego dowodem są niniejsze wyniki.

Pudełko i Żarnicka (12) w swoich badaniach izolowali nowe szczepy bakterii symbiotycznych z brodawek korzeniowych różnych odmian łąbinu uprawianych w Polsce. Pozyskane izolaty sprawdzane były pod względem aktywności symbiotycznej, przy czym wykazano ich znaczne zróżnicowanie pod względem zdolności do indukcji brodawek, podobnie jak w naszym doświadczeniu w przypadku szczepów właściwych dla roślin bobiku. Pudełko (13) w swoich badaniach prowadzonych na szczepach wyizolowanych z brodawek korzeniowych łąbinu stwierdził, iż bakterie zdolne do brodawkowania stanowią populacje istotnie endogenne, doskonale przystosowane do lokalnych warunków środowiskowych gleb Polski.

Podsumowanie

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano dużą zmienność efektywności szczepienia roślin nowymi izolatami bakterii *Rhizobium*, wyrażoną liczbą brodawek oraz wielkością biomasy. Efektywność szczepienia testowanymi szczepami bakterii nie różniła się istotnie od wyników uzyskanych dla szczepów znajdujących się w kolekcji zakładowej, co sugeruje, że w uprawach ekstensywnych roślin bobowatych istnieje znaczny potencjał pozyskiwania nowych wydajnych szczepów bakterii brodawkowych. Najefektywniejsze symbiotycznie szczepy wyizolowane z brodawek korzeniowych grochu (3A₆) i bobiku (1A₂ i 2A5) mogłyby wzbogacić istniejącą zakładową kolekcję bakterii symbiotycznych i być wykorzystywane do produkcji szczepionek. Wyniki te wymagają jednak potwierdzenia w dalszych badaniach.

Literatura

1. Casida L., Klein D., Santoro T.: Soil Dehydrogenase Activity. *Soil Science*, 1964, **98**: 371-376.
2. Cheminingwa, G. N. and Vessey, J. K.: The abundance and efficacy of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, **38**: 294-302.
3. Fengerlowa W.: Simple method for counting *Azotobacter* in soil samples. *Acta Microbiologica Polonica*, 1965, **14(2)**: 203-206.
4. Gołębiowska J., Sypniewska U.: The effect of the plant and of ecological conditions on development of symbiosis between lupine and *Rhizobium lupini*. *Acta Microbiologi Polonica*, 1962, **11**: 319-328.
5. Graham P. H., Vance C. P.: Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 2003, **131**: 872-877.
6. Jensen E. S.: Inoculation of pea by application of *Rhizobium* in the planting furrow. *Plant and Soil*, 1987, **97**: 63-70.

7. Kaniuczak J., Kostecka J., Niemiec W.: Wybrane aspekty zagospodarowania odpadów organicznych a produkcja biomasy wierzby energetycznej. Uniwersytet Rzeszowski, Politechnika Rzeszowska, Rzeszów, 2005.
8. Księżak J., Staniak M., Bojarszczuk J.: The regional differentiation of legumes cropping area in Poland between 2001 and 2007. *Polish J. Agron.*, 2009, **1**: 25-31.
9. Martin J. P.: Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science*, 1950, **69**: 215-232.
10. Martyniuk S.: Znaczenie procesu biologicznego wiązania azotu atmosferycznego w rolnictwie ekologicznym. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 2008, **53**: 9-14.
11. Martyniuk S.: Naukowe i praktyczne aspekty symbiozy roślin strączkowych z bakteriami brodawkowymi. *Polish Journal of Agronomy*, 2012, **9**: 17-22.
12. Pudełko K., Zarnicka J.: Diversity in symbiotic specificity of bacterial strains nodulating lupins in Poland. *Polish Journal of Agronomy*, 2010, **2**: 50-56.
13. Pudełko K.: Diversity among field populations of bacterial strains nodulating lupins in Poland. *Fragmenta Agronomica*, 2010, **27(1)**: 107-116.
14. Singleton, P. W., Bohlool, B. B., Nakao, P. L.: Legume response to rhizobial inoculation in the Tropics: Myth and realities. In Lai, R. and Sanchez, P. (eds). *Myths and Science of the Soils of the Tropics*. Madison, WI, SSSA Spec. Publ., 1992, **29**: 135-155.
15. Tabatabai M. A., Bremner J. M.: Use of p-nitrophenylphosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1969, **1**: 301-307.
16. Thies J. E., Singleton P. W., Bohlool B. B.: Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, **57**: 19-28.
17. Vincent J. M.: *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Blackwell Scientific, Oxford, 1970.
18. Wallace R., Lochhead A.: Qualitative studies of soil microorganisms IX. Amino acid requirements of rhizosphere bacteria. *Canadian J. Res.*, 1950, **28**: 1-6.

Adres do korespondencji:

mgr Sylwia Siebielec
Zakład Mikrobiologii Rolniczej
IUNG-PIB
ul. Krańcowa 8, 24-100 Puławy
tel. 81 47 86 952
e-mail: sstaniak@iung.pulawy.pl