Bakterije promotori rasta biljaka

Vukadinović, Lovro

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:454703

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Lovro Vukadinović

Bakterije promotori rasta biljaka

Završni rad

Mentor: doc.dr.sc. Goran Palijan

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Završni rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Bakterije promotori rasta biljaka

Lovro Vukadinović

Rad je izrađen na: Zavod za kvantitativnu ekologiju

Mentor: doc.dr.sc. Goran Palijan

Kratak sažetak završnog rada: Završni rad se bazira na teorijskom pregledu svojstava bakterija promotora rasta biljka i mehanizmima njihovog djelovanja na rast biljke te na vlatitom, eksperimentalnom dijelu kojim se pokazuje učinak inokulacije sjemenke biljke (pšenica) s bakterijskom kulturom. Provedena su tri eksperimenta koristeći dvije bakterijske kulture (2 i 35) od kojih je bakterijska kultura 2 pokazala stimulaciju rasta bakterija, dok je kultura 35 izazvala inhibiciju rasta. Eksperimenti su se međusobno razlikovali po vlažnosti zraka te je promjena uvjeta uzgoja pokazala varijabilnost efekata bakterija promotora rasta biljaka u odnosu na te uvjete.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: mikrobiologija, promotri, rast biljaka

BASIC DOCUMENTATION CARD **Bachelor thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijeku
Department of biology
Undergraduate university study programme in Biology
Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Biology

Plant growth promoting bacteria

Lovro Vukadinović

Thesis performed at: Department for quantitative ecology

Supervisor: Goran Palijan, PhD, Asst. Prof.

Short abstract: The thesis is based on theoretical revison of plant growth promoting bactria properties and mechanisms of their action, also on conducted experiment which serves the purpouse of demonstrating effects of seed (wheat) inoculation with bacterial culture. Three experiments were conducted using two bacterial cultures (2 and 35) of which bacterial culture 2 showed stimultion of plant growth, whereas culture 35 showed inhibition. Experiments differed from each other in air humidity which demonstrated that change in growing conditions causes variability of bacterial effects on the plant.

Original at: Croatian

Key words: microbiology, promotors, plant growth

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

2. MATERIJAL I METODE.....9

3. REZULTATI.....11

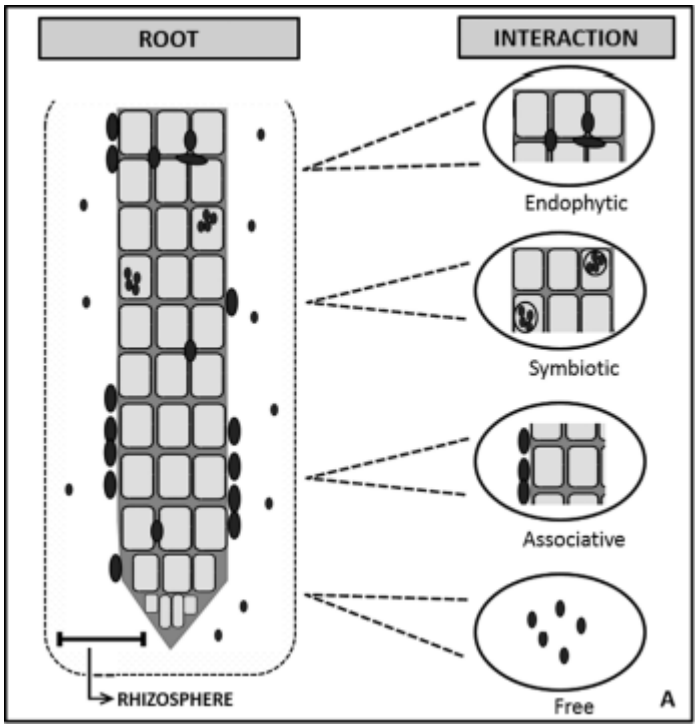
4. RASPRAVA.....25

5. ZAKLJUČAK.....28

6. LITERATURA.....29

1. UVOD

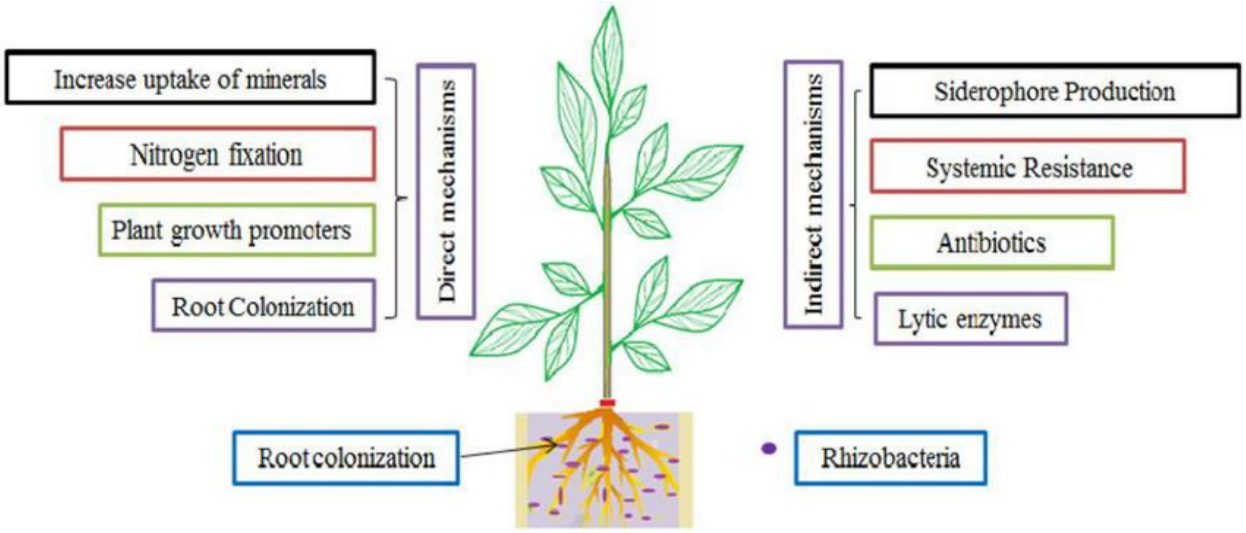
Bakterije imaju izrazit utjecaj na razne kemijsko-fiziološke procese svoje okoline. Ovaj završni rad se fokusira na interakcije mikroba rizosfere viših biljaka i samih tih biljaka, specifično s funkcijom promocije njihovog rasta s pregledom iz stručne literature kao i spoznajama dobivenim iz vlastitog eksperimentalnog rada na tom području. Te interakcije određuju zdravlje biljke, produktivnost te samu plodnost tla. Ovi mikroorganizmi pospješuju rast biljaka i štite ih od bolesti i abiotičkog stresa putem raznih mehanizama koji su manje ili više učinkoviti ovisno o samoj bakteriji te njenom pozicioniranju u odnosu na biljku
(endofitske,simbiotske,površinske,slobodne).
Kao što je već spomenuto, navedeni mikroorganizmi nastanjuju područje rizosfere koja je interfaza između tla i korijena biljke, a može se definirati i kao volumen tla koji okružuje korijenje biljke u kojem se odvijaju bitne interakcije između tla, mikroorganizama i samog korijena biljaka. U tlu živi golem broj bakterija (oko 10^8 do 10^9 bakteriskih stanica po gramu tla) te nisu ravnomjerno raspoređene. Koncentracija bakterija oko korijena biljaka je mnogo veća od koncentracije bakterija drugdje u tlu, a razlog tomu je prisustnost nutrijenata i drugih molekula potrebnih za bakterijski rast. Na Slici 1. možemo vidjeti primjere interakcija bakterija i korijena biljaka kao i sam sloj rizosfere. Bitno je spomenuti da u različitim tlima su prisutne različite bakterijske vrste u različitoj brojnosti, ovisno o vrsti tla te karakteristikama tla poput temperature, vlažnosti, prisutnosti soli i drugih kemijskih spojeva, količini i vrsti biljaka koje se nalaze u tlima. Također, promjenom uvijeta unutar tla modificira se i sposobnost bakterija da vrše učinak na biljku koja se uzgaja.



Slika 1. Interakcije bakterija-rizosfera. Različiti odnosi bakterija i korijena biljaka (Preuzeto i prilagođeno prema Souza *et al.* 2015.)

Od različitih bakterija koje nastanjuju tlo neke mogu djelovati korisno (stimulirajuće), negativno (inhibirajuće), a neke nemaju nikakav efekt na rast i razvoj biljke. Od svih ovih bakterija, stimulirajuće, koje su predmet ovoga rada, imaju mehanizme kojima ostvaruju svoje efekte. Oni se dijele na direktne i indirektne mehanizme.

Direktni mehanizmi promocije rasta biljaka se mogu opisati preko kolonizacije korijena, produkcijom regulatora rasta biljaka, fiksacijom dušika i povećanjem reapsorpcije korisnih minerala dok indirektni mehanizmi opisuju svojstvo promotorskih bakterija da proizvedu antibiotike, da su uspješni u kompeticiji za nutrijente s „lošim“ bakterijama na korijenu, da posjeduju sposobnost induciranja sistemskog otpora poticanjem obrambenog sustava biljke i krajnje da proizvode siderofore, litičke enzime, cianide i amonijak.



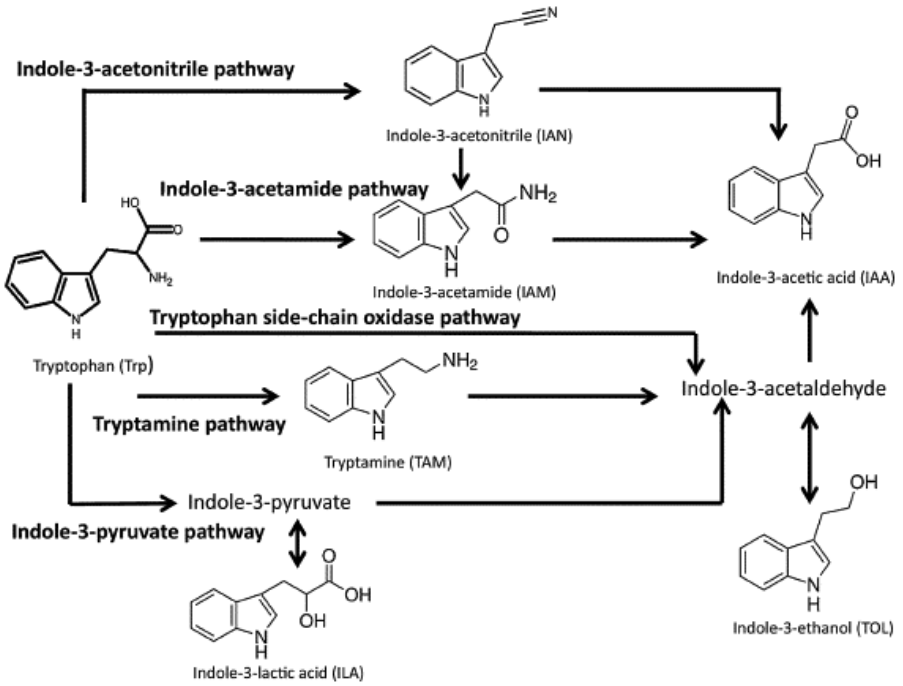
Slika 2. Shematski prikaz direktnih i indirektnih mehanizama promocije rasta biljaka pomoću bakterija (Preuzeto i prilagođeno prema Ngoma *et al.* 2012.)

Direktni mehanizmi

Kolonizacija korijenovog sustava je osnova biološke kontrole od strane ovih bakterija. Prije nego se njihovi korisni učinci mogu eksprimirati potrebno je moći naseliti stanište korijena i uspješno opstati radi daljnjeg razvoja. To je uvjetovano prirodom samih bakterija i sastavom sadržaja koje korijen luči. Biljka kroz korijen luči u tlo spojeve od kojih su najzastupljeniji ugljikohidrati, proteini, aminokiseline, organske kiseline, vitamini i ostali nutrijenti. Te izlučevine se smatraju odgovorne za regulaciju rasta i razvoja promotorskih bakterija te mijenjaju sastav i svojstva okolnog tla. Rizosferni mikroorganizmi se također mogu oslanjati na druge komponente tog ekosustava kao izvore nutrijenata pošto svojim biokemijskim procesima određeni mikroorganizmi mogu prevesti drugima neiskoristive spojeve u korisne nutrijente.
Distribucija bakterija ovisi o njihovoj pokretljivosti i toku vode. Najvažniji faktor u tome je tip bakterijskih flagella, pilia, lipopolisaharida i exopolisaharida. Također je bitno spomenuti da postoji bakterijska specifičnost kolonizacije za pojedine vrste biljaka (Babalola et al.,2007a) što znači da različiti sojevi bakterija promotora rasta mogu kolonizirati jednu vrstu biljke u različitoj brojnosti (Ngoma et al., 2012).

Važan mehanizam kojim promotorske bakterije utječu na rast i razvoj biljaka od klijanja je produkcija fitohormona. Ove bakterije pospješuju rast proizvodnjom fitohormona poput indole-3-acetic kiseline (IAA), auksina, etilena, citoksina i giberelina. Oni utječu na koordinaciju rasta biljke, primjerice regulacijom gustoće i duljine korjenovih dlačica. A najistraženiji među njima su auksini i IAA. IAA je najbitniji biljni auksin odgovoran za

dijeljenje, ekspanziju i diferencijaciju biljnih stanica i tkiva te stimulira elongaciju korijena. Sposobnost sintetiziranja ovog spoja je primjećena kod mnogih rizobakterija od patogenih, simbiotskih pa do slobodnoživučih. Ove bakterije sintetiziraju IAA od aminokiseline triptofana različitim metaboličkim putovima. Fitopatogene bakterije koriste indol acetamidni put za sintezu IAA dok promotorske bakterije koriste indol piruvatski put što možemo vidjeti na Slici 3.



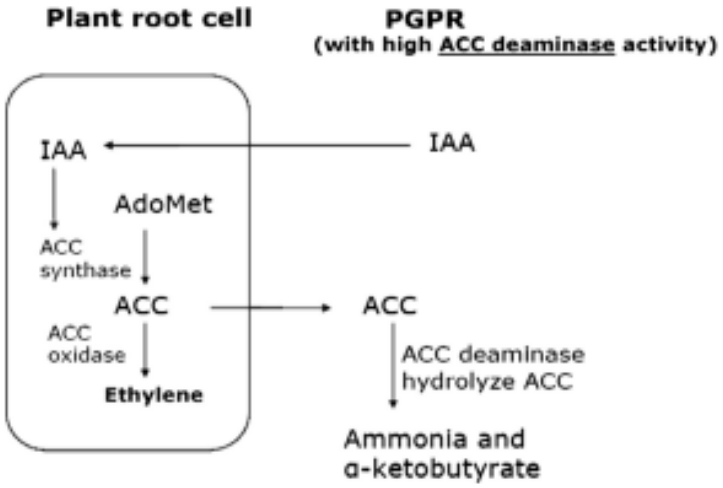
Slika 3. Putovi sinteze IAA iz L-triptofana (preuzeto i prilagođeno prema Lin et al., 2015)

Količine IAA-e proizvedene *in vitro* mogu biti vrlo značajne s koncentracijama izlučenih u medij na nano- do milimolarnoj skali. Sposobnost bakterija da sintetiziraju IAA može utjecat kako na razvoj biljke tako i na preživljavanje same bakterije. Primjerice, divlji tip bakterije *Erwinia herbicola* 299R je bila kompetitivno uspješnija nego izogenetički *ipdC* mutant koji nije mogao sintetizirati IAA. Još jedan primjer dolazi sa klijanaca uljane repice gdje je divlji tip bakterije Pseudomonas putida GR12-2 uzrokovao produljenje primarnog kornijena za 50% nego svoj mutant s nemogućnošću sinteze IAA (Cheol Kim et al., 2011). Učinci auksina na mladice/klijance biljaka su koncentracijski ovisne, u malim količinama djeluju stimulativno dok u velikim imaju inhibitorni učinak (Saharan et al., 2011).

Etilen je biljni hormon sa širokom primjenom i biološkom aktivnošću pri malim koncentracijama od svega 0.05µL/L (Glick 2012.). On može utjecati na rast biljke na više načina od poticanja inicijacije korijena, inhibiranja elongacije korijena, poticanje zrenja voća, stimuliranjem klijanja sjemena, poticanje venuća listova, poticanjem sinteze ostalih

biljnih hormona, inhibiranju interakcija mikoriza i biljke te odgovorom na biotički i abiotički stres. Velike količine etilena u stanju duljeg stresa potiču upravo negativne procese za biljku (venuće, truljenje).

Prekursor za sintezu etilena je metionin koji se prevodi u etilen preko 1-aminociklopropan-1-karboksilata (ACC). Otkriveno je da neke bakterije promotori rasta posjeduju enzim ACC deaminazu koja cijepa ACC na α-ketobutirat i amonijak koji bakterije mogu koristiti kao izvor dušika i ugljika i time smanjiti razinu etilena kod primjerice biljaka u stresu. Slika 4.



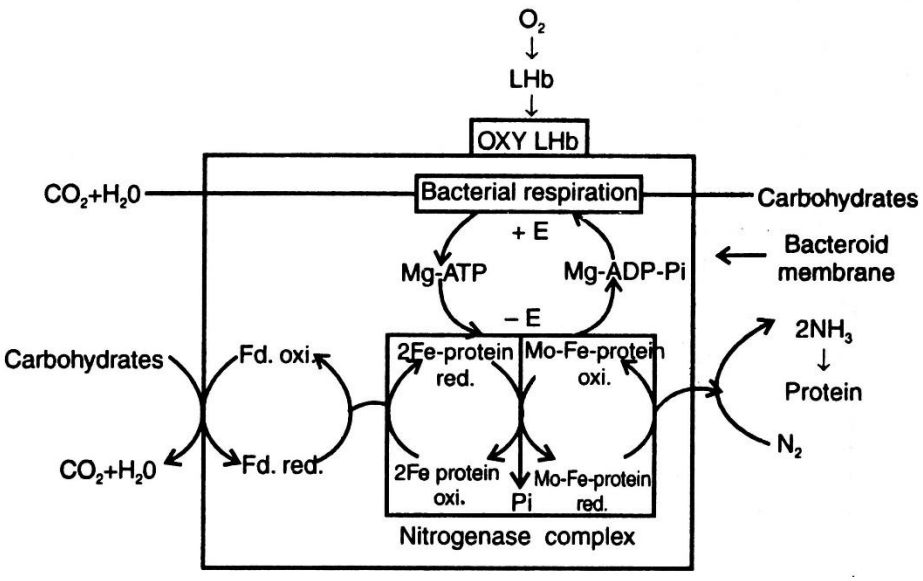
Slika 4. ACC deaminaza kod bakterija promotora rasta cijepa prekursor etilena ACC. Time smanjuje količinu etilena smanjujući stres, a time i pospješuje razvoj (preuzeto i prilagođeno prema M.Saraf et al., 2010)

Giberelini su skupina biljnih hormona koji djeluju kroz životni ciklus biljaka inducirajući mnoge fiziološke efekte poput stimulacije klijanja sjemenki, elongacija stapke, induciraju cvijetanje i rast perikarpa sjemenke. Stoga je regulacija sinteze giberelina od fundamentalnog značaja za rast biljke i prilagodbe na okoliš. Od 136 tipova giberelina samo dva (GA1 i GA4) djeluju na biljke kao hormoni (MacMillan, 2002).

Citokinini su spojevi koji reguliraju širok spektar fizioloških i razvojnih procesa u biljci. Između ostalog utječe na regulaciju rasta korjena i izdanka, kao i na grananje, kontrole apikalne domene izdanka, razvoj kloroplasta i starenje listova. U maloj količini bakterijski citokinini pospješuju rast biljke no u prekomjernoj koncentraciji dovode do inhibicije razvoja korijena. Smatra se da su citokinini signali povezani s medijacijom okolišnog stresa između korijena i izdanka.

Fiksacija dušika je vrlo bitna funkcija ovih bakterija. Dušik je potreban svim živim organizmima kao sastavnica proteina, aminokiselina i drugih esencijalnih biomolekula.

Zemljina atmosfera se sastoji od 78% dušika (N_2), ali on u tom obliku nije iskoristiv biljkama. Prokarioti su razvili proces fiksacije dušika kojim se biljkama omogućava iskorištavanje dušika. Ta skupina prokariota se naziva diazotrofi i oni u tom procesu reduciraju atmosferski dušik do amonijaka pomoću enzima nitrogenaze. To su najčešće slobodno živuće bakterije no postoje i one koje su direktno povezane s biljkom, primjerice *Azospirillum, Bacillus, Enterobacter, Klebsiella, Pseudomonas, Gluconacetobacter...* A najpoznatije bakterije s ovom funkcijom su *Rhizobium* koje nastanjuju korjenje mahunarki stvarajući kvržice gdje se odvija fiksacija dušika. Kisik inhibira nitrogenazu i također je negativni regulator ekspresije *nif* gena (*engl.* nitrogen fixing), no potreban je za respiraciju. Radi toga je potrebna kontrola količine kisika u kvržicama, što se postiže hemoglobinu sličnim pigmentom LHb koji se nalazi samo u kvržicama mahunarki.



Slika 5. Shema fiksacije dušika u kvržicama korjena (preuzeto i prilagođeno prema Bioencyclopedia)

Uz dušik, fosfor ima vrlo bitnu ulogu u ishrani i razvoju biljke uključujući metaboličke procese prijenosa energije, sintezu makromolekula, fotosintezu i reakcije dišnog lanca. Tla posjeduju određene količine fosfora no da bi bio iskoristiv biljkama treba se prevesti u drugi, anorganski oblik što se događa pomoću enzima fosfataze. Velika aktivnost fosfataze iz tla proizlazi upravo od mikrobijalnih oblika, specifičnije bakterije rodova *Pseudomonas, Bacillus, Rhizobium, Burkholdeira, Achromobacter, Agrobacterium, Micrococcus, Aerobacter, Flavobacterium* i *Erwinia* imaju ključnu ulogu u cirkulaciji biogeokemijskog fosfora u poljoprivrednim ekosistemima (Ngoma et al., 2012).

Indirektni mehanizmi

Proizvodnja antibiotika se smatra jednom od najbitnijih svojstava bakterija promotora rasta jer se njima bore protiv proliferacije patogena. Neki od tih antibiotika su butirolaceton, zwittermicin A, kanosamin, oligomicin A, oomicin A, fenazin-1-karboksilična kiselina, pyrollnitrin, 2,4-diacetil floroglucinol (2,4-DAPG), ksantobacin i drugi. Od navedenih 2,4-DAPG se pokazao kao najdjelotvorniji antibiotik u borbi protiv biljnih patogena, a proizvode ga razni sojevi *Pseudomonas*-a (Fernando et al., 2006). Ne samo da različite bakterije proizvode različite tipove antibiotika već pojedine bakterije i same proizvode više antibiotika od jednom poput *B. cereus* soja UW85, *P. fluorescens* soja CHA0 i Pf5 s različitim stupnjem djelotvornosti protiv patogena (Raajimakers et al., 2002).

Induciranje sistemskog otpora je svojstvo bakterija da stimuliraju prirodne mehanizme biljnog otpora. Neki sojevi bakterija promotora rasta luče salicilnu kiselinu koja je odgovorna za induciranje tog otpora. Osim salicilne kiseline flagelarni proteini bakterijske stanice, pioverdin, hitin, β-glukani, ciklički lipopeptidni surfaktanti su pokazali induciranje odgovora biljke.

Litičkim enizimima koje neke bakterije promotori rasta luče se može narušiti rast i aktivnost patogenih bakterija. Oni mogu reducirati razne polimerne molekule neophodne za život patogena od hitina, proteina, celuloze, hemiceluloze pa i DNA.

Željezo je neophodan element skoro svom životu na Zemlji i ima važnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima od respiracije, fotosinteze, sinteze DNA i dr. Iako ga ima u izobilju on je u svom obliku nepristupačan i neiskoristiv biljkama. Djelomično dostupnim ga čini bakterijska produkcija siderofora, stoga je sinteza siderofora zadnji opisani mehanizam kojim bakterije dijeluju na promociju rasta biljaka. To su spojevi male molekulske težine (< 1000 Da) koji se sintetiziraju u bakterijama ali i nekim gljivama kao kelirajući agenti za željezo u uvjetima nedostatka željeza koji često nastupa u tlima lužnatog do neutralnog pH, zbog željezove netopljivosti pri povišenim vrijednostima pH. Iako biljke mogu koristiti bakterijske siderofore kao izvor željeza, njihova koncentracija je premala da bi značajno utjecala na biljni unos željeza. Međutim, bakterije promotori rasta koje sintetiziraju siderofore mogu spriječiti proliferaciju patogena izdvajanjem Fe^{3+} u područje oko korijena.

Još jedan od faktora koji utječu na zdravlje biljke, tla i mikroflore tla je kiselost tla. To je pogotovo vidljivo kod mahunarki koje žive u simbiozi s dušik-fiksirajućim bakterijama koje nastanjuju kvržice korjena pri pH od 6 do 7. Ta simbioza je od velike važnosti za

biljke kako je već napomenuto u prethodnom tekstu. Međutim, velikom primjenom gnojiva koja se baziraju na amonijaku, smanjuje se učinkovitost ovih bakterija također povečavajući kiselost tla. Smanjena sposobnost ostvarivanja simbioze smanjuje se i „zdravlje“ biljke te je podložnija negativnim utjecajima.
Kiselost tla također može modulirati biosintezu IAA kod određenih bakterija (Spaepen et al., 2007)

U nastavku slijedi pregled eksperimentalnog dijela završnog rada.

2. MATERIJAL I METODE

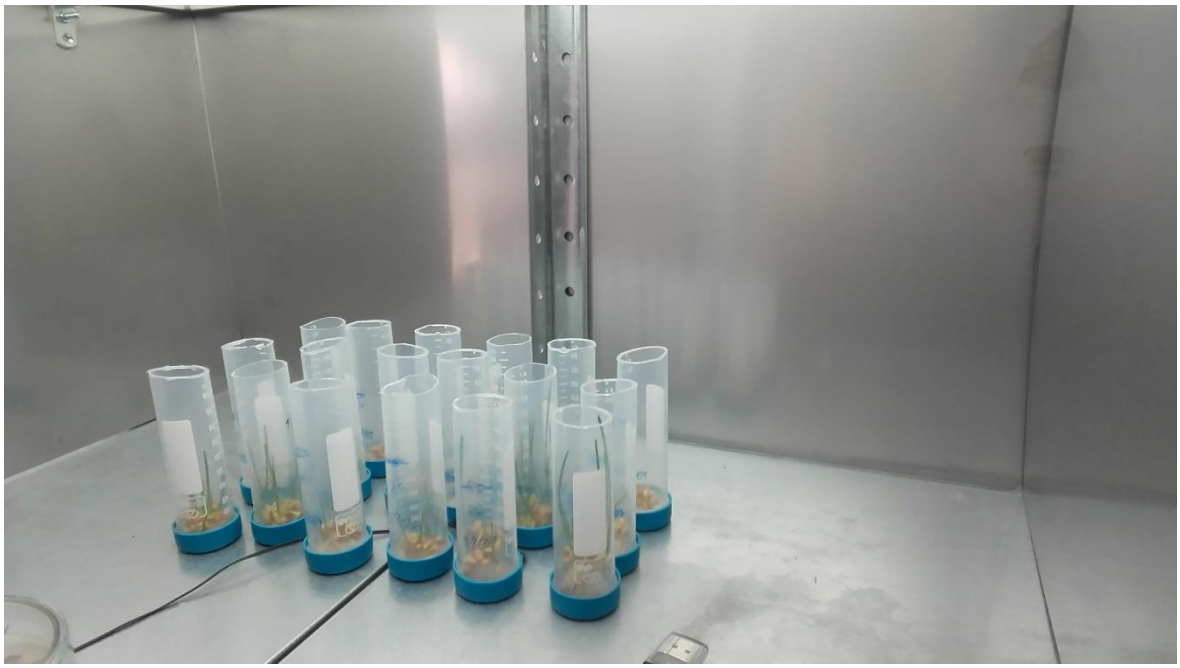
Biljka korištena u eksperimentu je pšenica, a bakterijske kulture (2 i 35) su izolati sa sljedećih lokacija:
2 - Kompa šumsko tlo (geografske koordinate: 45°39'51,6" N i 18°51'55,6" E);
35 - Bat siget šumsko tlo (geografske koordinate: 45°38'52,6" N i 18°51'53,1" E).

Sjemenke su uzgajane u falkonicama s odstranjenim konusnim vrhom i s 4 listića staničevine na dnu čepa falkonice kako bi se postigla retencija vode. U svakoj falkonici je nasađeno 20 sjemenaka te su bile inokulirane suspenzijom bakterijske kulture optičke gustoće pri 600 nm ≈ 0.2 jedinica absorbance. Medij za suspendiranje bakterija je bila deionizirana sterilna voda.

Prije postavljanja sjemenki u falkonice, sjemenke su bile natapane u drugom setu standardnih falkonica u 3ml deionizirane sterilne vode preko noći te zatim tretirane 8%-tnom otopinom izosana u volumenu isto 3ml tokom perioda od 20min. Po isteku 20min tekući sadržaj je izbačen te je zamjenjen s 3ml deionizirane sterilne vode u kojoj su se sjemenke ispirale 5min. Proces ispiranja je ponovljen 3 puta.

Nakon tretmana sjemenke pšenice su prebačene u uzgojne falkonice s odrezanim vrhom i listićima staničevine. U kontrolne falkonice je bilo dodano 500µl sterilne deionizirane vode kao i naredne dane tokom tjedan dana uzgoja. U falkonice s bakterijskim inokulatima bio je dodan jednak volumen suspenzije, a kroz tjedan dana su se zalijevale deioniziranom sterilnom vodom. Polovicu svih sjemenaka se prestalo zalijevati 3 dana nakon nasađivanja kako bi se vidio učinak sušnih uvjeta.

Sjemenke su bile uzgajane u kontroliranim uvjetima unutar fotobioreaktora kako je prikazano na slici 6. Temperatura i vlaga su bile kontrolirane kombiniranom upotrebom rashladnog klima uređaja u prostoriji i grijalice zraka koja je bila spojena na sučelje sa senzorom temperature te se time ostvarila automatizacija regulacije temperature.



Slika 6. Uzgoj unutar fotobioreaktora

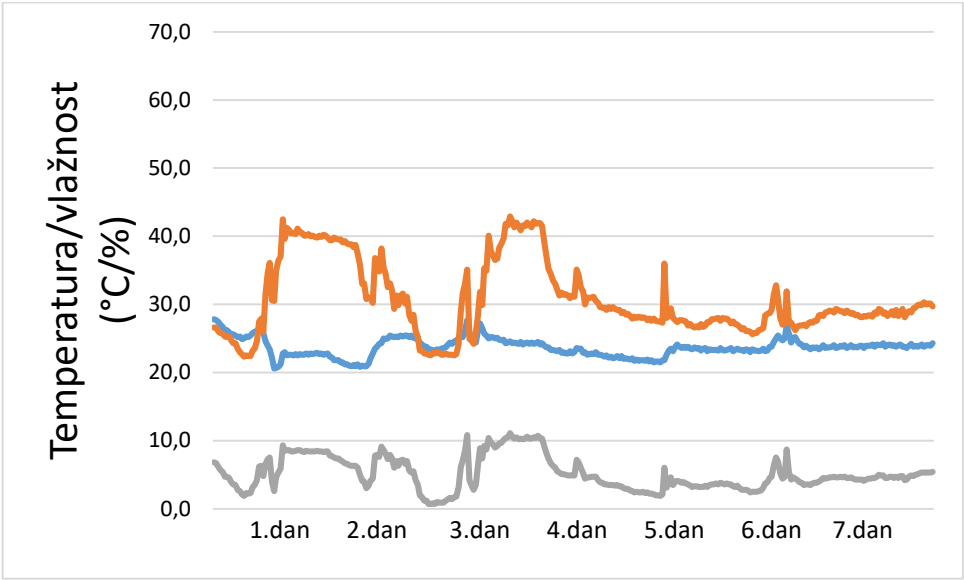
Nakon tjedan dana uzgoja slijedilo je odvajanje izdanka i korjena od sjemenki pazeći na očuvanje integriteta sjemenke pomoću škara. Korijenčići, izdanci i sjemenke su zatim bile prebačene u vatrostalne lončiće prethodno izvagane na analitičkoj vagi. Svi lončići su zatim bili podvrgnuti sušenju u sušioniku na 105°C preko noći kako bi se eliminirala vlaga iz uzoraka. Lončići sa sadržajem su zatim bili ponovno vagani. Na kraju su se lončići žarili u peći na 400°C tri sata te su ponovo bili izvagani. Između procesa sušenja i žarenja lončići su bili pohranjeni u posudi sa silikagelom kako se bi se izbjeglo ponovno vezanje vlage za uzorke.

Podatci su obrađeniprogramom Microsoft Office Excel 2016.

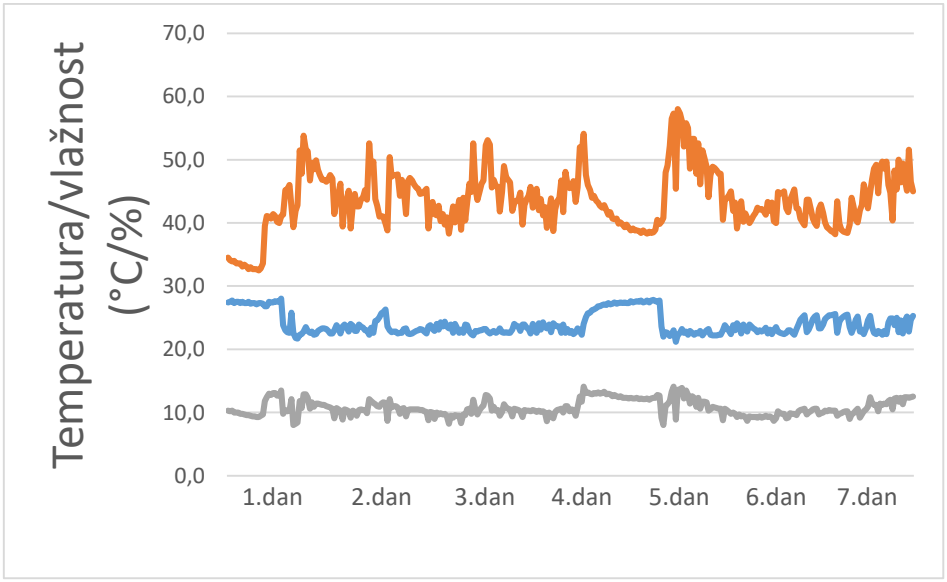
3. REZULTATI

Eksperiment se sastojao od tri vremenski udaljena eksperimenta u kojem su svi postupci i metode identični, jedina varijabilnost je bila u temperaturi i vlažnosti zraka. Rezultati kronološki prate redoslijed provedenih eksperimenata.

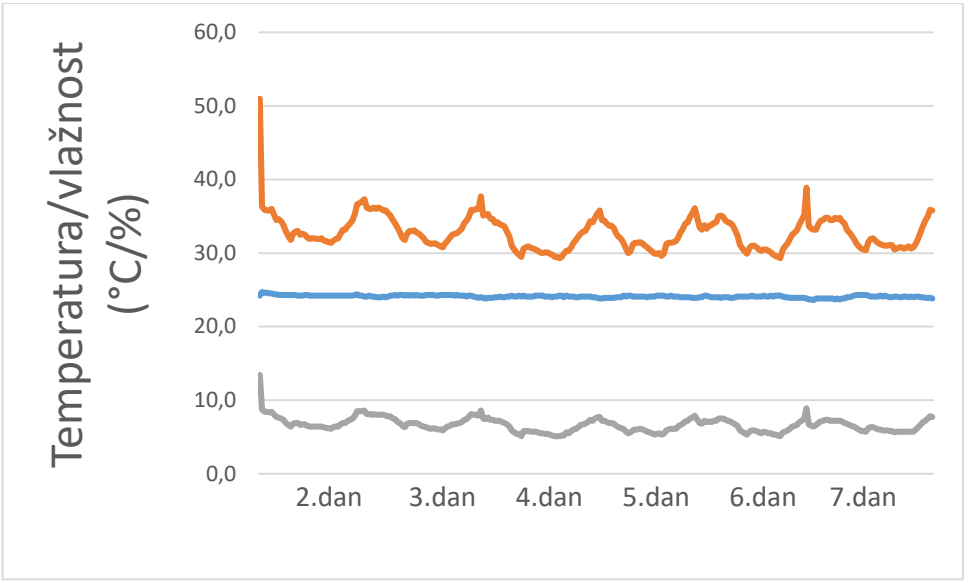
Uvijeti u pojedinom eksperimentu su prikazani sljedećim slikama:



Slika 7. Uzgojni uvjeti u I. eksperimentu. Mjerenja su zabilježena svakih 30 minuta kroz tjedan dana. Plava-temperatura (°C), narančasta-vlaga (%), siva-rosište (°C)



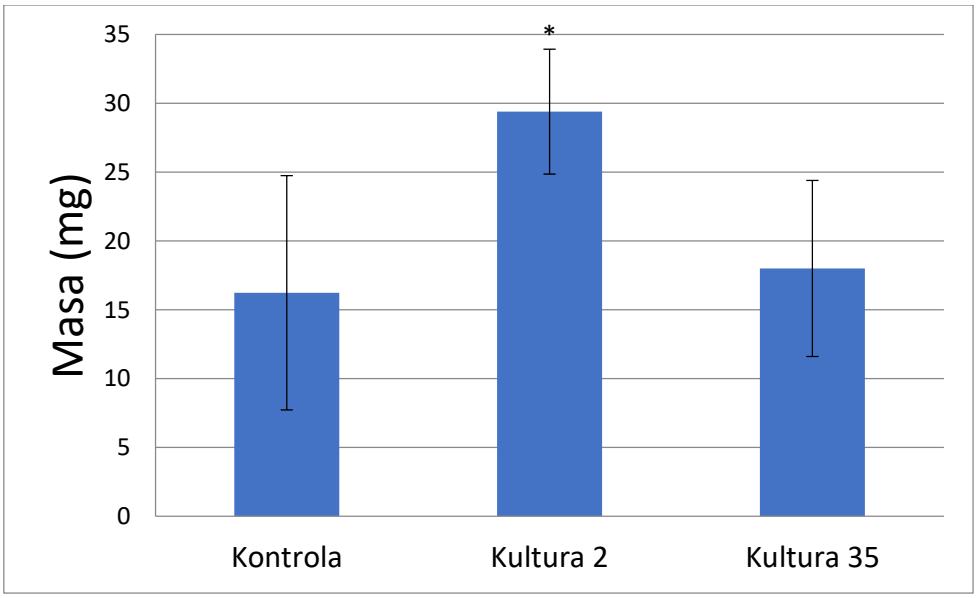
Slika 8. Uzgojni uvjeti u II. eksperimentu. Mjerenja su zabilježena svakih 30 minuta kroz tjedan dana. Plava-temperatura (°C), narančasta-vlaga (%), siva-rosište (°C)



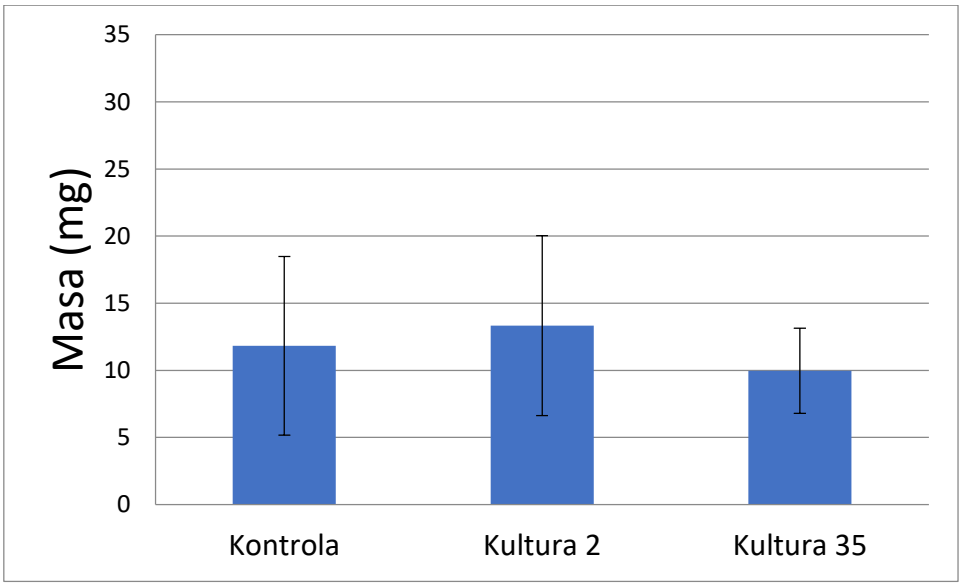
Slika 9. Uzgojni uvjeti u III. eksperimentu. Mjerenja su zabilježena svakih 30 minuta kroz tjedan dana. Plava- temperatura (°C), narančasta-vlaga (%), siva-rosište (°C)

Kultura 2 statistički značajno pospješuje razvoj u standardnim uvjetima (Slika 10) dok taj efekt nije prisutan u sušnim uvjetima (Slika 11).

Kultura 35 inhibira razvoj korjenčića u standardnim uvjetima (Slika 10), no u sušnim uvjetima razvoj korjenčića je približno jednak onome u kontrolne skupine (Slika 11).



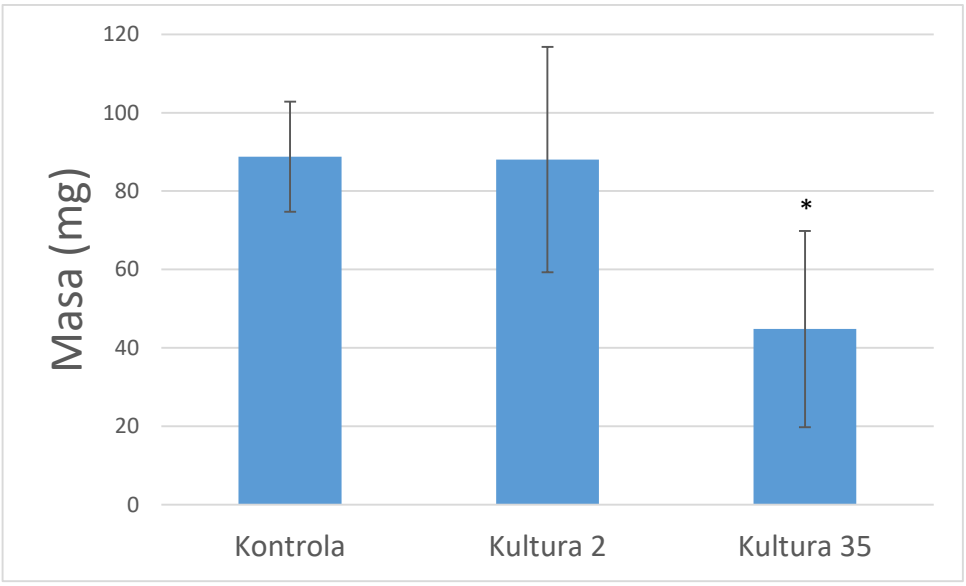
Slika 10. Masa anorgaske tvari izdanaka nakon uzgoja pri standardnim uvjetima. Asterisk označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu.



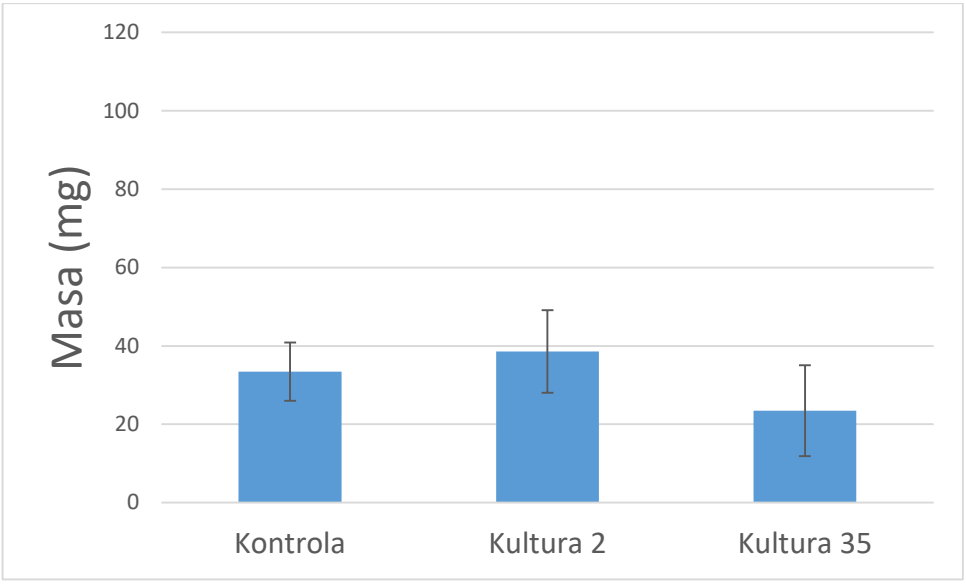
Slika 11. Masa anorganske tvari izdanaka nakon uzgoja u sušnim uvjetima

Masa anorganske tvari izdanaka pšenice tretirane kulturom 35 premašuje onu kontrolne skupine u standardnim uvjetima (Slika 10) dok je najmanja pri uzgoju u sušnim uvjetima (Slika 11).

Masa anorganske tvari izdanaka pšenice tretirane kulturom 2 iz oba uvjeta uzgoja je veća od ostalih uzoraka uz veću razliku pri uzgoju u standardnim uvjetima (Slike 10 i 11).

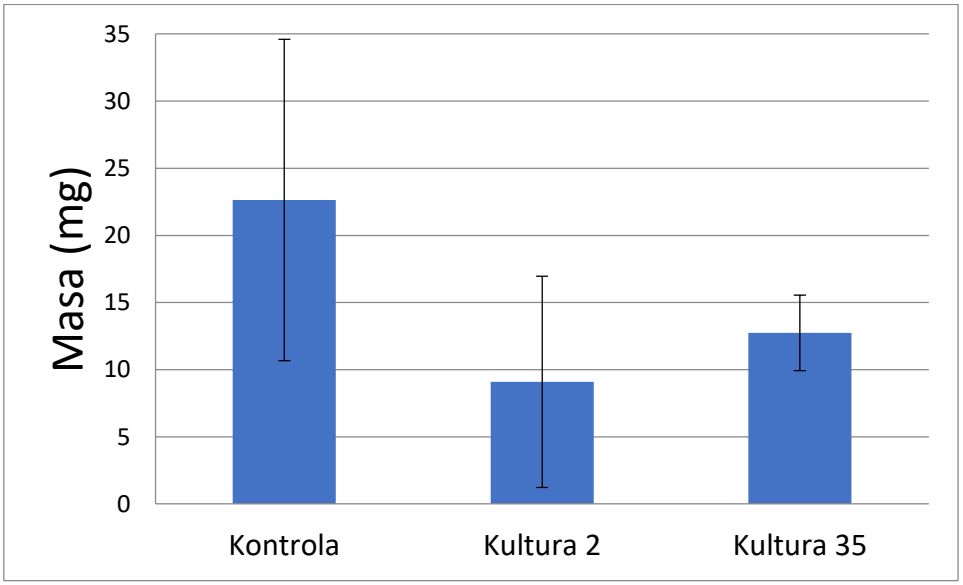


Slika 12. Masa organske tvari izdanaka nakon uzgoja pri standardnim uvjetima. Asterisk označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu.

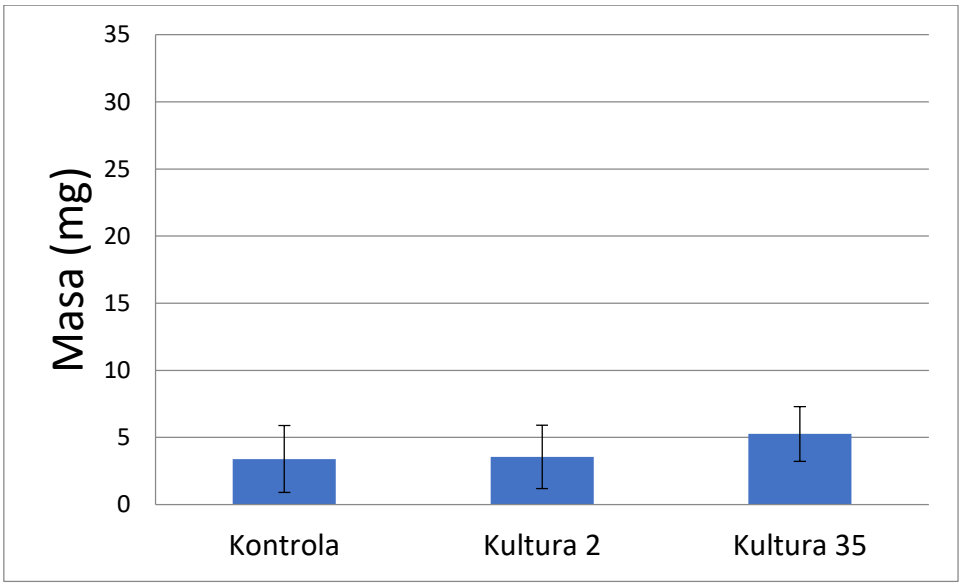


Slika 13. Masa organske tvari izdanaka nakon uzgoja u sušnim uvjetima

Kontrolna skupina ima najveću masu organske tvari izdanaka pri standardnim uvjetima (Slika 12) dok u sušnim uvjetima najveću ima pšenica tretirana kulturom 2 (Slika 13). Pšenica tretirana kulturom 35 pri oba uvjeta ima najmanju masu organske tvari, a statistički značajno manju masu pri standardnim uvjetima (Slika 12).



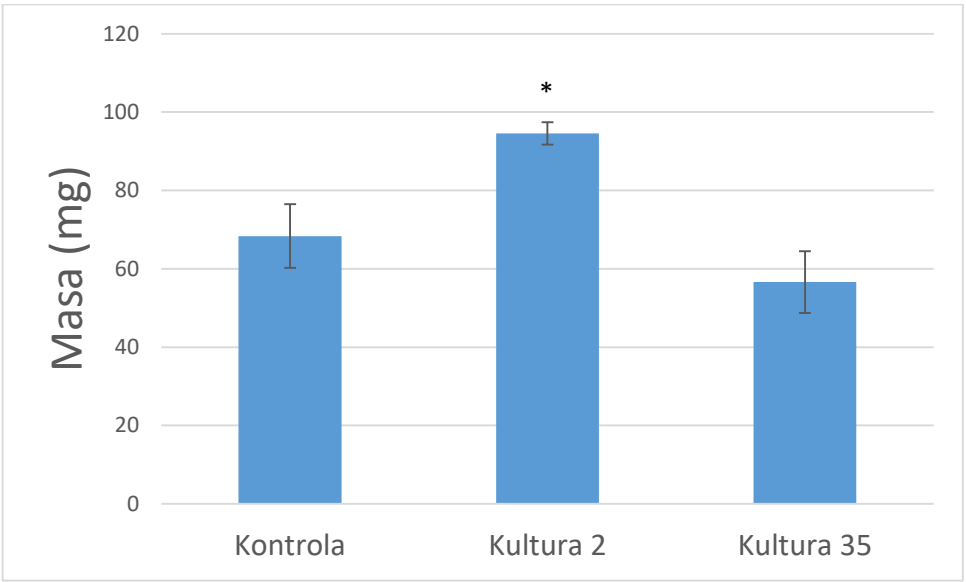
Slika 14. Masa anorganske tvari korjenčića nakon uzgoja pri standardnim uvjetima



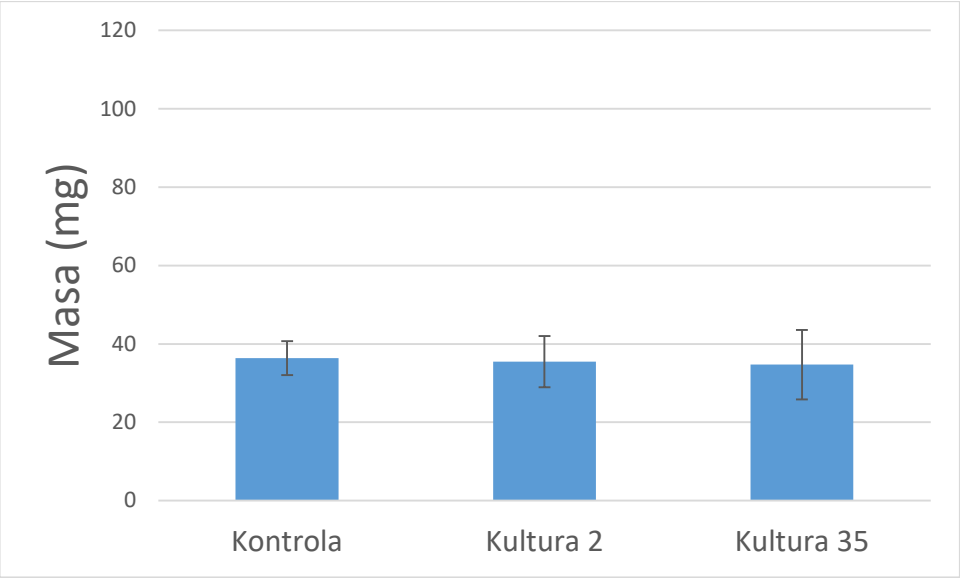
Slika 15. Masa anorganske tvari korjenčića nakon uzgoja u sušnim uvjetima

U standardnim uvjetima vrijednosti mase anorganske tvari korjenčića pšenice tretirane kulturom 2 drastično opada u odnosu na ostale uzorke (Slika 14).

Masa anorganske tvari korjenčića pšenice tretirane kulturom 35 iz sušnih uvjeta premašuje masu kontrolne skupine (Slika 15).



Slika 16. Masa organske tvari korjenčića nakon uzgoja pri standardnim uvjetima. Asterisk označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu.



Slika 17. Masa organske tvari korjenčića nakon uzgoja u sušnim uvjetima

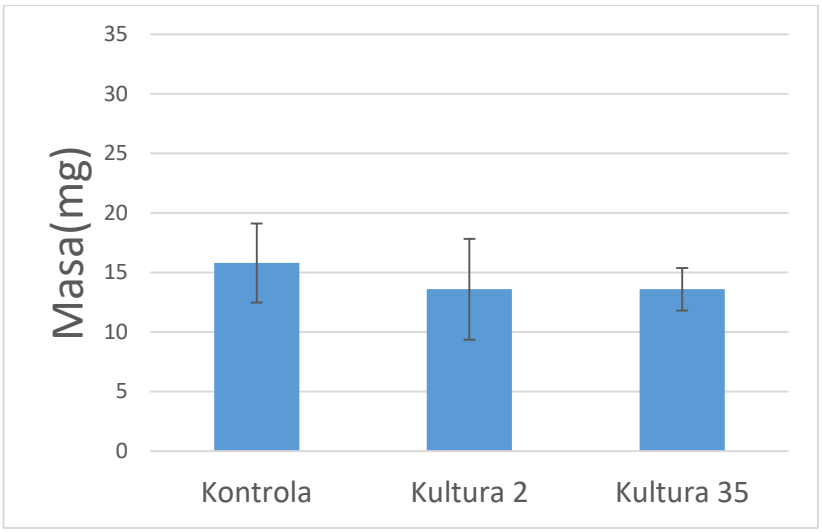
Pšenica tretirana kulturom 2 pri standardnim uvjetima ima najveću i statistički značajno veću masu organske tvari korjenčića od kontrole, dok kultura 35 ima najmanju masu (Slika 16)

Pri sušnim uvjetima mase organskih tvari korjenčića su približno jednake gdje najveću masu imaju korjenčići kontrolne skupine a najmanju korjenčići tretirani kulturom 35 (Slika 17).

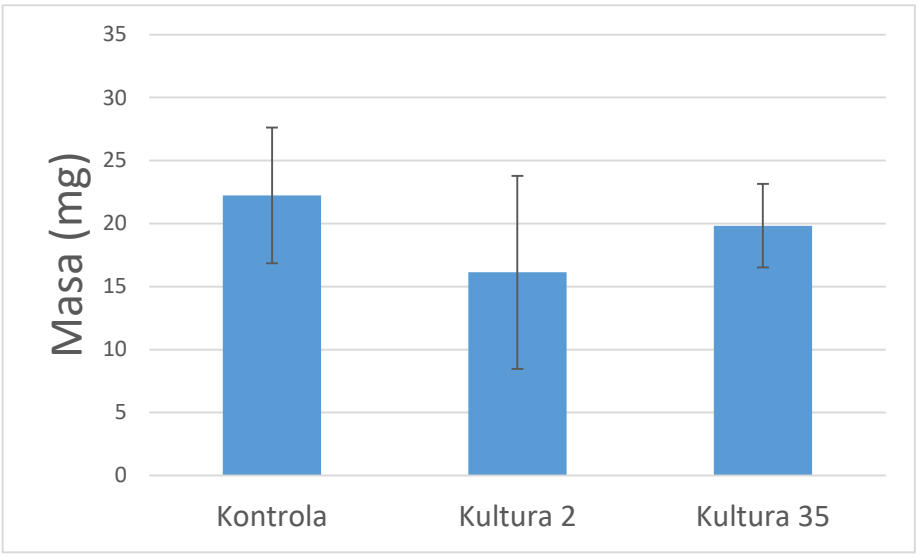
Rezultati drugog eksperimenta pokazuju da bakterijske kulture inhibiraju rast pšenice pri standardnim uvjetima (Slika 18) kao i pri sušnim uvjetima (Slika 19).

U sušnim uvjetima kultura 2 inhibira više dok pri standardnim uvjetima više inhibira kultura 35.

Iz priloženih grafova vidimo suprotan efekt kulture 2 na rast pšenice od onoga u prvom eksperimentu (Slike 18 i 19).

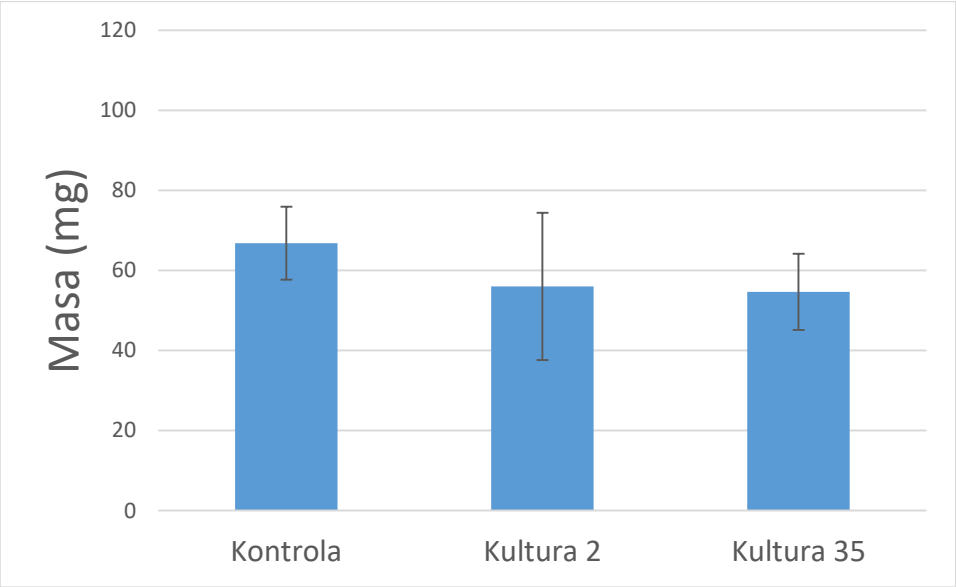


Slika 18. Masa anorgaske tvari izdanaka nakon uzgoja pri standardnim uvjet

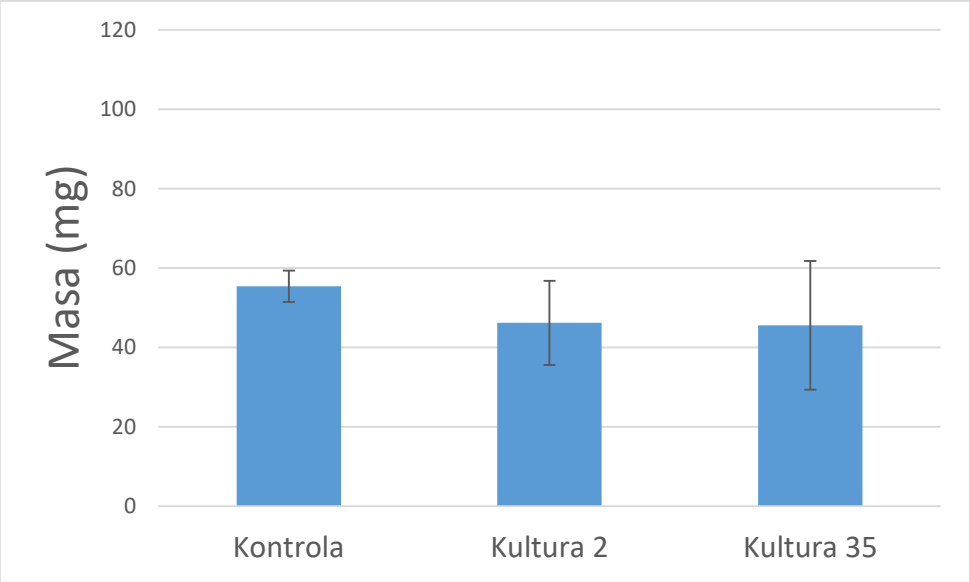


Slika 19. Masa anorgaske tvari izdanaka nakon uzgoja u sušnim uvjetima

Kontrolna skupina ima najveću masu anorganske tvari izdanaka i pri standardnim (Slika 18.) i pri sušnim uvjetima (Slika 19) dok pšenica tretirana kulturom 2 ima najmanju u oba slučaja.



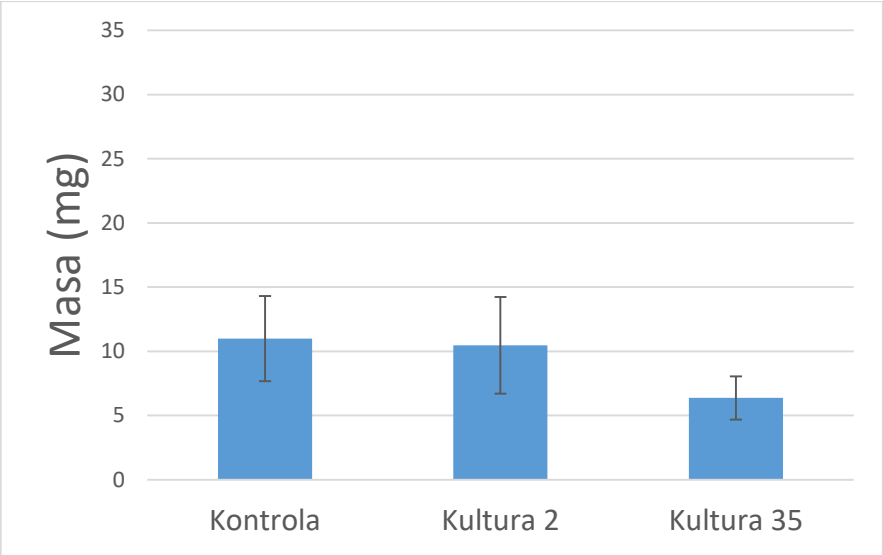
Slika 20. Masa organske tvari izdanaka nakon uzgoja pri standardnim uvjetima



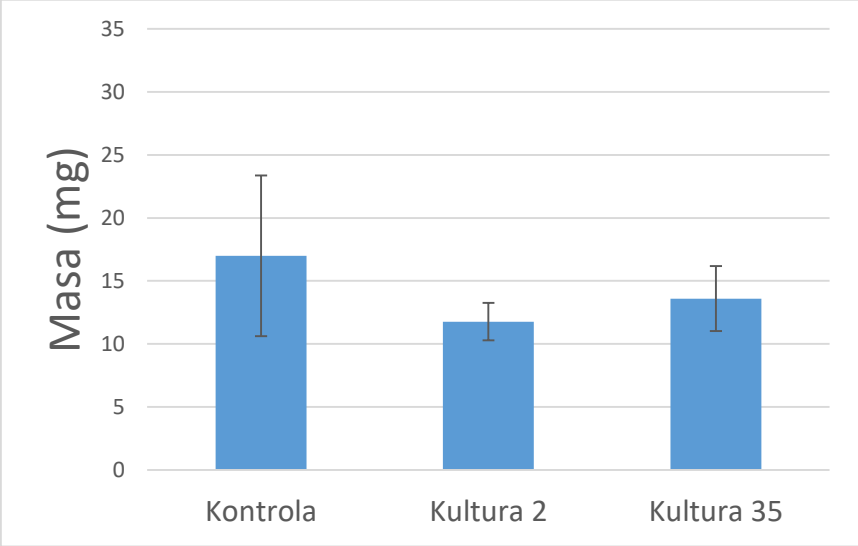
Slika 21. Masa organske tvari izdanaka nakon uzgoja u sušnim uvjetima

Masa organske tvari izdanka je najveća kod kontrolne skupine, a najmanja kod pšenice tretirane kulturom 35 u oba slučaja (Slike 20 i 21).

Izdanci pšenice tretirane kulturom 2 u ovom eksperimentu imaju veću masu organske tvari od onih tretiranih kulturom 35, no manju od kontrolne skupine u sušnim uvjetima po čemu se razlikuje od prvog eksperimenta I.



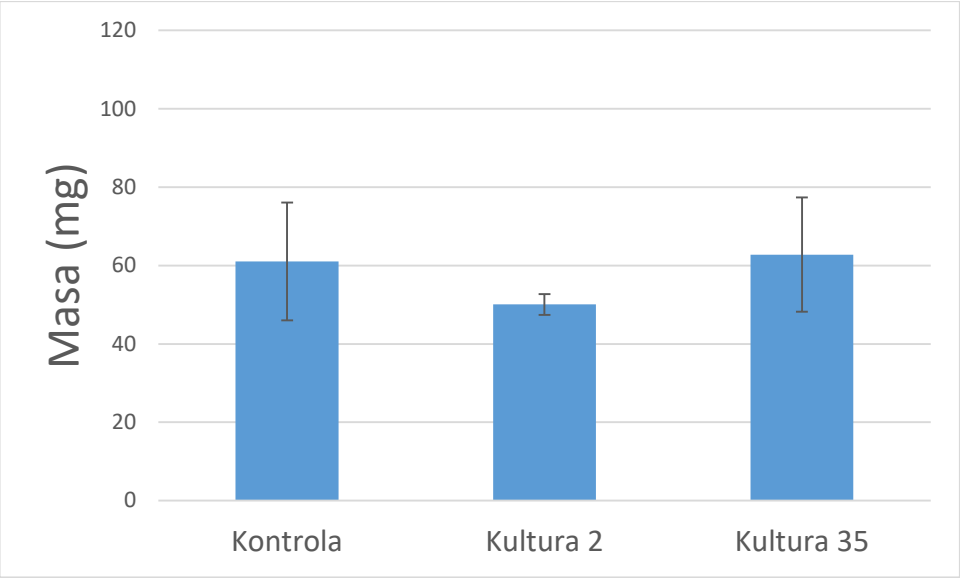
Slika 22. Masa anorganske tvari korjenčića nakon uzgoja pri standardnim uvjetima izražena u mg



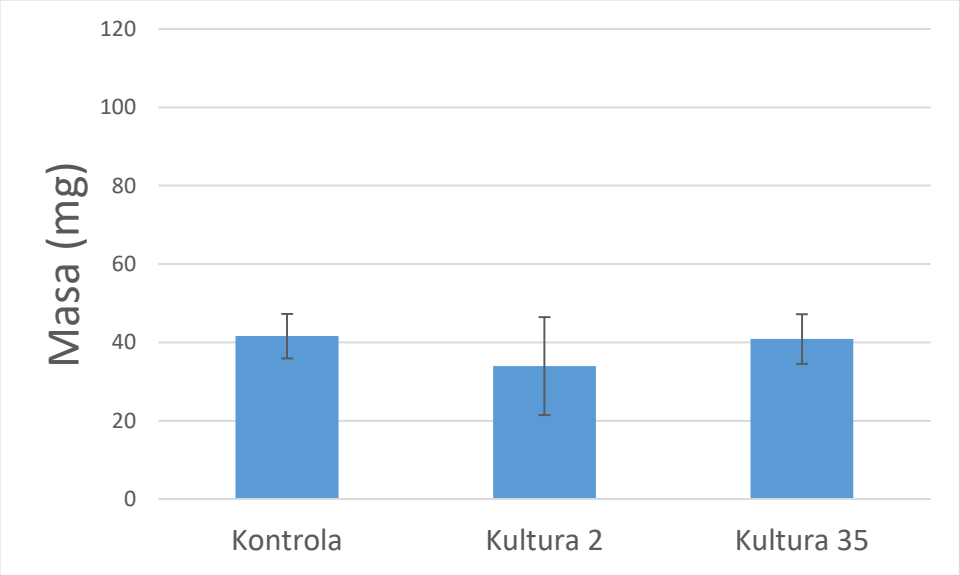
Slika 23. Masa anorganske tvari korjenčića nakon uzgoja u sušnim uvjetima

Kontrolna skupina ima najveću masu anorganske tvari korjenčića i pri standardnim uvjetima (Slika 22) i u sušnim (Slika 23).

Korjenčići pšenice tretirane kulturom 2 u sušnim uvjetima ostvaruju veću masu anorganske tvari od onih tretiranih kulturom 35, no manju od kontrolne skupine (Slika 23).



Slika 24. Masa organske tvari korjenčića nakon uzgoja pri standardnim uvjetima



Slika 25. Masa organske tvari korjenčića nakon uzgoja pri standardnim uvjetima

Korjenčići kontrolne skupine i pšenice tretirane kulturom 35 u oba slučaja imaju približno jednaku masu organske tvari korjenčića.

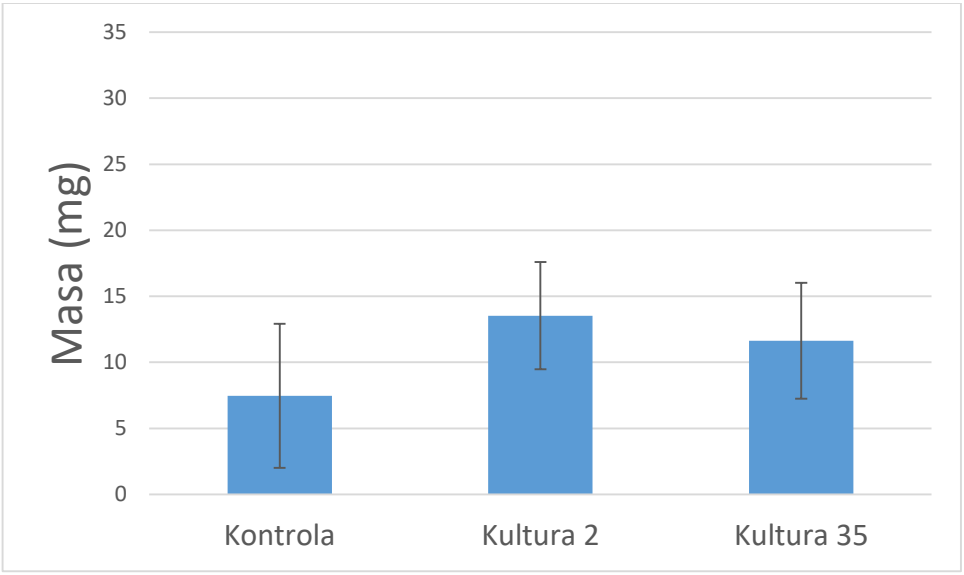
Pšenica tretirana kulturom 35 pri standardnim uvjetima ima najveću organsku masu korjenčića (Slika 24).

Pšenica tretirana kulturom 2 ima najmanju masu organske u oba slučaja (Slike 24 i 25).

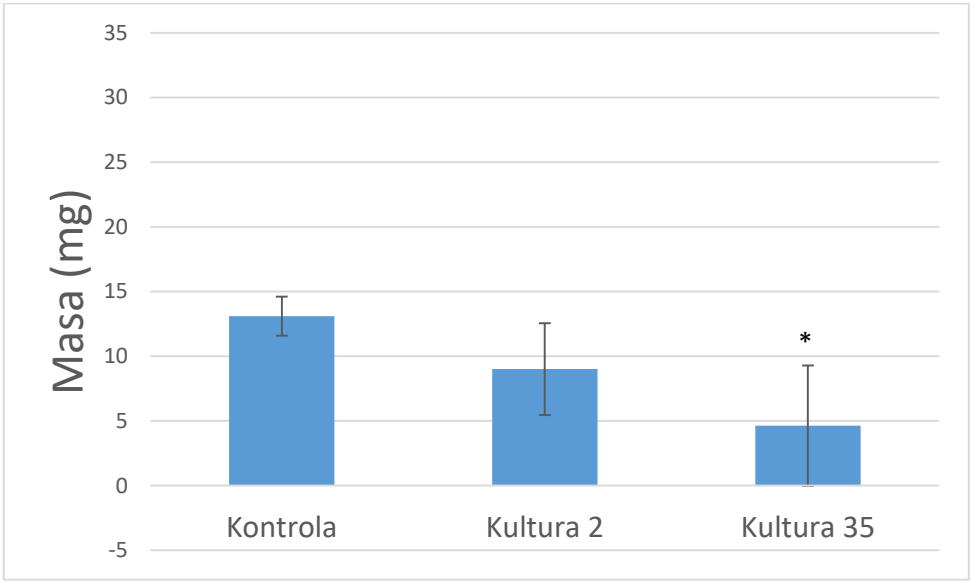
U zadnjem, trećem, eksperimentu je pokušana replikacija uvjeta koji su bili prisutni unutar laboratorija i fotobioreaktora tijekom trajanja prvog eksperimenta.

Rezultati III. eksperimenta pokazuju stimulaciju rasta pšenice tretirane kulturom 2 pri standardnim uvjetim (Slika 26) te nešto manju stimulaciju s tretmanom kulture 35 u istom slučaju.

Sušni uvjeti ovoga eksperimenta pokazuju sličnosti rezultata sa standardnim uvjetima II. eksperimenta.



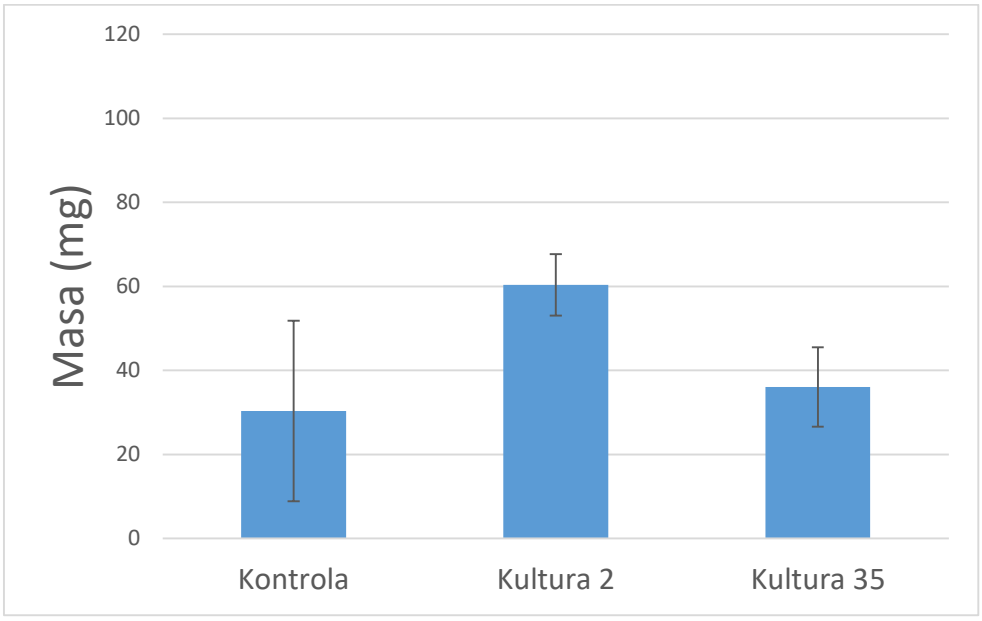
Slika 26. Masa anorganske tvari izdanaka nakon uzgoja pri standardnim uvjetima



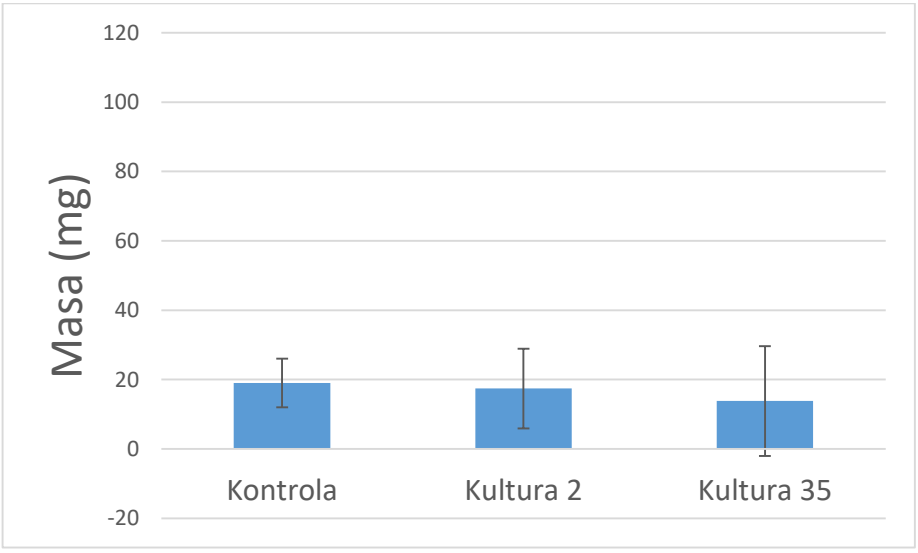
Slika 27. Masa anorganske tvari izdanaka nakon uzgoja u sušnim uvjetima. Asterisk označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu.

Pšenica tretirana kultura 2 ima najveću masu anorganske tvari izdanaka pri standardnim uvjetima, a kontrolna skupina najmanju (Slika 26) dok u sušnim uvjetima najveću masu

ima kontrolna skupina, a najmanju, statistički značajno manju izdanci pšenice s tretmanom kulture 35 (Slika 27).

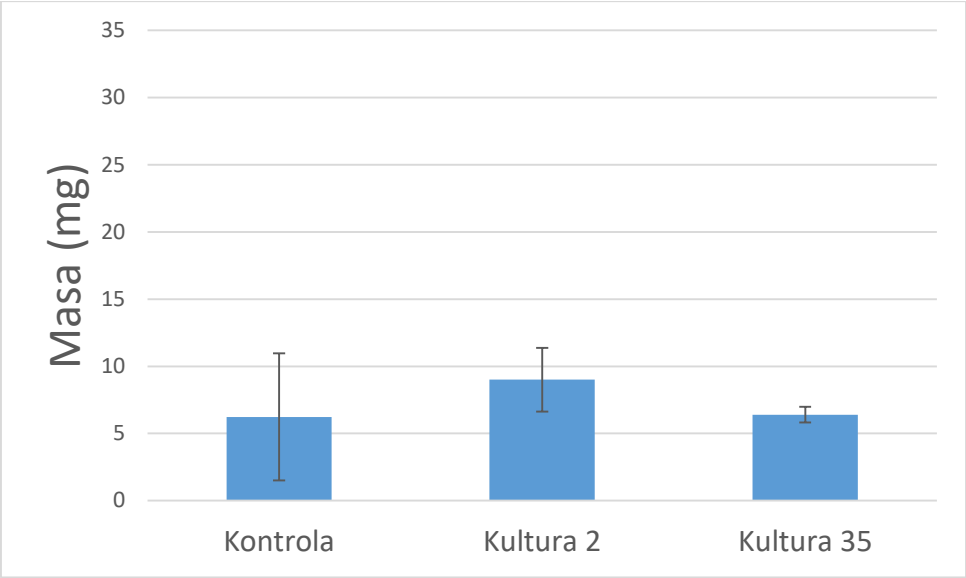


Slika 28. Masa organske tvari izdanka nakon uzgoja pri standardnim uvjetima

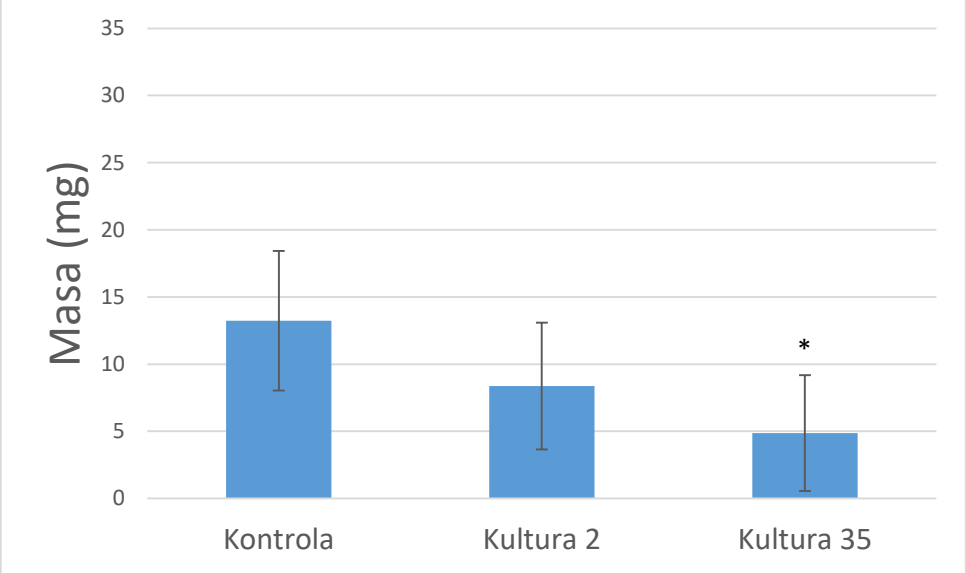


Slika 29. Masa organske tvari izdanka nakon uzgoja u sušnim uvjetima

Pšenica tretirana kulturom 2 pri standardnim uvjetima ima statistički značajno veću te najveću, a kontrolna skupina najmanju masu organske tvari izdanka (Slika 28) dok u sušnim uvjetima najveću masu ima kontrolna skupina, a najmanju pšenica tretirana kulturom 35 (Slika 29).



Slika 30. Masa anorganske tvari korjenčića nakon uzgoja pri standardnim uvjetima

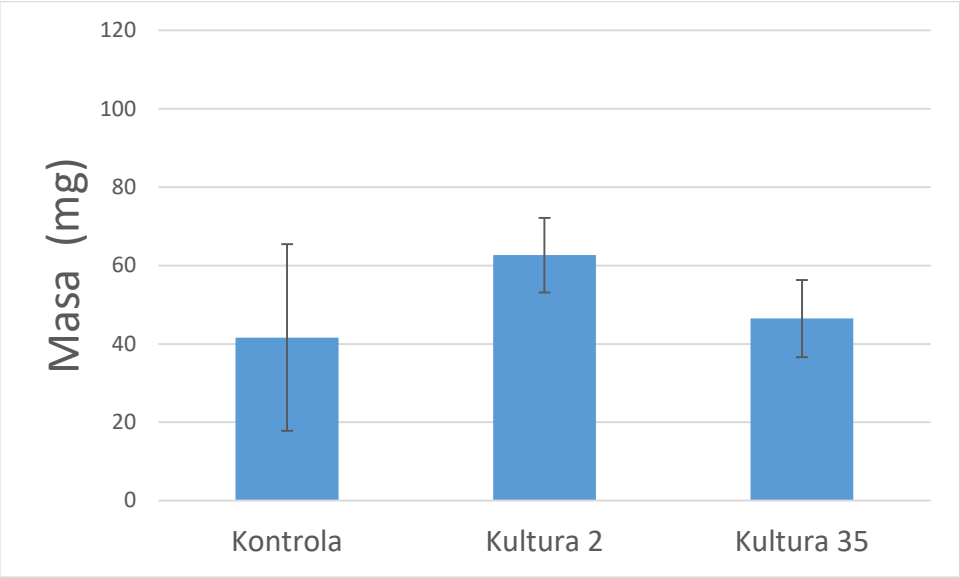


Slika 31. Masa anorganske tvari korjenčića nakon uzgoja u sušnim uvjetima. Asterisk označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu.

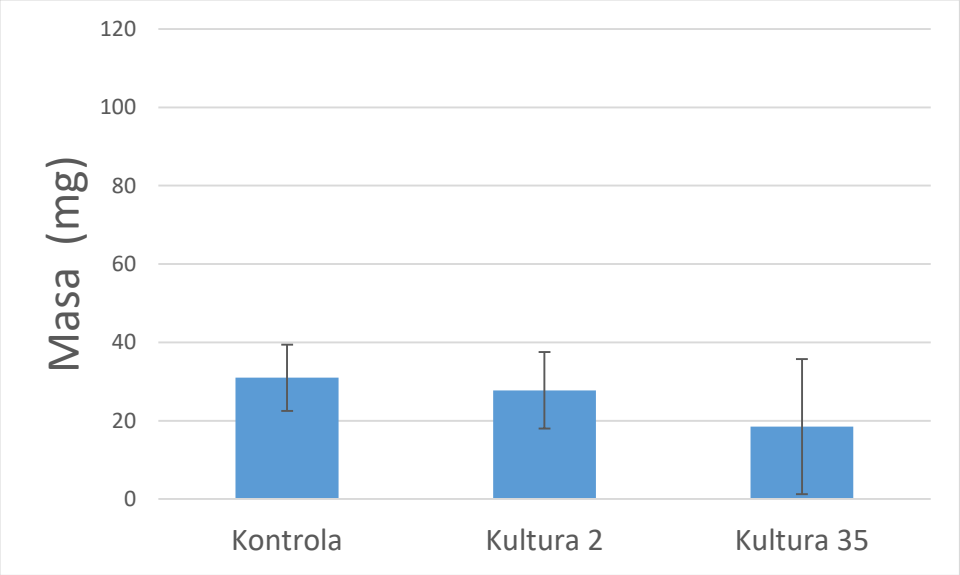
Pšenica tretirana kulturom 2 pri standarnim uvjetima ima najveću masu anorganske tvari korjenčića dok kontrola i pšenica tretirana kulturom 35 imaju približno jednake mase anorganske tvari korjenčića (Slika 30).

Kontrola ima najveću masu anorganske tvari korjenčića u sušnim uvjetima uzgoja, a pšenica tretirana kulturom 35 najmanju i statistički značajnu manju (Slika 31).

Mase anorganske tvari korjenčića iz sušnih uvjeta su slične masama anorganske tvari korjenčića iz standardnih uvjeta iz II. eksperimenta.



Slika 32. Masa organske tvari korjenčića nakon uzgoja pri standardnim uvjetima



Slika 33. Masa organske tvari korjenčića nakon uzgoja u sušnim uvjetima

Pšenica tretirana kulturom 2 pri standardnim uvjetima ima najveću masu organske tvari korjenčića dok kontrola ima najmanju (Slika 32).

Pri sušnim uvjetima kontrola ima najveću masu organske tvari korjenčića kod pšenica tretirana kulturom 35 ima najmanju (Slika 33).

4. RASPRAVA

Svrha ovog rada je bila upoznati se s načinima djelovanja bakterija na biljke te eksperimentalno pokazati djelotvornost bakterija u svrhu stimulacije rasta biljaka i intenzitet tih efekata za pojedinu bakterijsku kulturu u različitim uvjetima uzgoja pšenice. Iz I. i III. eksperimenta koji su se odvijali pri sličnim uvjetima smanjene vlažnosti zraka primjećujemo stimulaciju rasta kulturom 2. U prvom eksperimentu kultura 2 stimulira razvoj pšenice i u sušnim uvjetima (s manjim zaljevanjem) iz čega možemo zaključiti da kultura 2 posjeduje određenu toleranciju na sušu te može koristiti biljci i u takvim uvjetima abiotičkog stresa. Niu i sur. (2017) su istraživajući bakterijske kulture *Pseudomonas fluorescens, Enterobacter hormaechei* i *Pseudomonas migulae* pokazali da bakterije promotori rasta mogu vršiti taj efekt između ostalog, putem stvaranja EPS-a (egzopolisaharida) čiji se koncentracija i sastav mijenjaju pod utjecajem stresa. Bakterijski EPS posjeduje svojstvo retencije vode, stvara mikrookoliš iz kojeg se sporije izdvaja voda čime se štite bakterijske stanice i korijen biljke od sušenja (Hepper, 1975), a samim time se poboljšava i struktura tla te se ublažuje biljni stres izazvan sušom (Sandhya et al., 2009). Isti su fenomen pokazali Zheng i sur. (2018) eksperimentirajući s kulturom bakterije *Bacillus subtilis* koja je pokazala smanjen vodni konduktivitet i kumulativno isparavanje u odnosu na kontrolnu skupinu. Nadalje, navode i tri karakteristike koje su potencijalno zaslužne za promjenu tih svojstava: (i) EPS ima veći kapacitet za zadržavanje vode; (ii) EPS mijenja strukturu i povezanost pora u tlu; (iii) EPS mijenja fikalno-kemijska svojstva vode.

Iz nadvedenog, vjerojatno je da bakterijska kultura 2 korištena u ovim eksperimentima spada u skupinu upravo tih bakterija promotora rasta sa svojstvima tolerancije suše. Tu pretpostavku mogu poduprijeti i rezultati II. eksperimenta koji su se odvijali su uvjetima veće vlažnosti te stimulirajući efekti ove kulture nisu bili prisutni dok je kontrolna skupina pokazivala bolje rezultate. U istraživanjima na uzgoju kukuruza inokuliranim s *Azospirillum brasilense* Casanovas i sur. (2002) su pokazali kako su efekti ovih bakterija varijabilni u odnosu na uvjete uzgoja, pri čemu su efekti stimulacije bili najznačajniji pri 75%-tnom smanjenju opskrbe vodom nasuprot 50%-tnom. Od preostalih mehanizama uključenih u toleranciju stresa izazvanog sušom bakterija promotora rasta navode se regulacija proizvodnje fitohormona, proizvodnja giberelina, citokinina, indol-3-octene kiseline i indukcija sistemskog otpora (Vurukonda i sur., 2016).

Barnawal i sur. (2017) su pokazali ublažavanje stresa pšenice u uvjetima suše pod

utjecajem kulture bakterije *Bacillus subtilis*. Nadalje analizom ekspresije gena su primjetili pojačanost ekspresije gena TaDERB2 koji kodira transkripcijski faktor koji se pokazao kao važan u poboljšavanju tolerancije biljaka u uvjetima abiotičkog stresa čime je pokazana funkcija bakterija promotora rasta u indukciji sistemskog otpora biljke.

Kultura 35 u ovim eksperimentima na pšenicu djeluje inhibirajuće, dok u II. eksperimentu manje inhibira od kulture 2. Odnosno, vrijednosti masa anorganske i organske tvari su približno jednake onima u kontrolne skupine. Ta inhibicija nije statistički značajna te s toga kulturu 35 ne možemo svrstati u skupinu fitopatogenih bakterija koje inhibiraju rast biljaka i protiv čijih se utjecaja bakterije promotori rasta bore.

U II. eksperimentu primjećujemo izostanak stimulirajućeg efekta kulture 2 te najveće mase organske i anorganske tvari u pravilu pripadaju upravo pšenici kontrolne skupine što je različito u odnosu na I. i III. eksperiment.

Istraživanja su pokazala kako na rast i klijavost pšenice znatno utječe uz promjenjivost relativne vlažnosti zraka i temperatura korijena gdje je primjećen pozitivan odgovor na povećanje relativne vlažnosti zraka (Mortley i sur., 1994) . Također i infektivnost bakterija i drugih mikroorganizama može biti uvjetovana ovim promjenama. Sudeći po navedenom, nije neočekivana varijabilnost i rezultata ovih eksperimenata. Puno se još ne zna o uzajamnom djelovanju kombinacije faktora na rast i razvoj biljke s bakterijama promotora rasta te će se dobiveni rezultati razjasniti napretkom u istraživanjima ove tematike. Gouda i sur. (2017) također primjećuju variabilnost efekata bakterija promotora rasta u odnosu na okolišne faktore te predlažu modernistički pristup i tehnike kako bi se problem varijabilnosti riješio. Navode moguću primjenu nano/mikro-enkapsuliranja uz primjenu multidisciplinarnih istraživanja koja objedinjuju primjene biotehnologije, nanotehnologije, agro biotehnologije i znanosti o materijalima

Zanimljivo je napomenut kako ova interakcija biljaka i bakterija nije jednostrana u pogledu signalizacije i upućivanja stimulansa. Nisu samo bakterije svojim naizgled slučajnim pozicioniranjem zaslužne za efekte kojima djeluju na biljku već su privučene u tu mikrosredinu rizosfere upravo biljnim izlučevinama. Efekt poboljšanja razvoja mikroorganizama tla rezultirajući fizikalnim i kemijskim promjenama tla s kontribucijom izlučevina korijena se naziva efekt rizosfere.
Biljke promjenom sastava i koncentracije izlučevina moduliraju svoj mikrobiom (Sharifi i Ryu 2017). Ta specifična struktura i raznolikost zajednice bakterija varira između različitih

vrsta biljaka, u vremenskom periodu te čak na različitim područjima korjena iste biljke (Narula i sur. 2008) iz čega proizlazi da određene bakterije pokazuju pozitivnu kemotaksiju prema izlučevinama određene biljke dok izlučevine druge biljke ne izazivaju kemotaksiju u istih. Nadalje, zabilježena je i negativna kemotaksija bakterijskih stanica u odnosu na izlučevine korjena biljaka (Currier i Strobel 1976). Takva izrazita povezanost mikroorganizama s biljkama je dovela do pojave koncepta holobionta kojeg se definira kao domaćin sa svi njemu pribrojenim mikrobima (Lemanceau i sur. 2017).
Lemanceau i sur. (2017) navode spermosferu koja obuhvaća dijelove sjemenke, rizosferu koje je ranije definirana i filosferu koja obuhvaća nadzemne dijelove biljke kao tri područja koja su nastanjena ovim mikroorganizmima što pokazuje rasprostranjenost njihovih utjecaja u puno širem opsegu, na cijeli holobiont. Ovakav pogled daje i evolucijski aspekt tematici gdje se najveća ekološka kompeticija ostvaruje upravo uzajamnim odnosom biljke i njoj pribrojenih bakterija.

5. ZAKLJUČAK

Iz provedenih eksperimenata zaključujemo sljedeće:

1. Kultura 2 statistički značajno stimulira rast pšenice pri standardnim uvjetima pri smanjenoj vlažnosti zraka
2. Kultura 35 statistički značajno inhibira rast pšenice pri standardnim uvjetima pri smanjenoj vlažnosti zraka
3. Kultura 35 statistički značajno inhibira rast pšenice pri sušnim uvjetima u manjoj vlažnosti zraka
4. Pri većoj vlažnosti zraka niti jedna kultura nema značajnog utjecaja na pšenicu
5. Postoji varijabilnost efekata bakterijskih kultura ovisno o različitim uvjetima uzgoja

6. LITERATURA

1. de Souza, R., Ambrosini, A.,M.P. Passaglia, L. (2015) Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genetics and Molecular Biology 38: 401-419

2. Glick, B.R. (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanism and Applications. Scientifica 2012: 1-15

3. Cheol Kim, Y., Leveau, J., McSpadden Gardener, B.B., Pierson, E.A., Pierson III, L.S., Ryu, C.-M. (2011) The Multifactorial Basis for Plant Health Promotion by Plant-Associated Bacteria. Applied and Environmental Microbiology 84: 1548-1555

4. Martínez-Viveros, O., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G., Mora, M.L. (2010) Mechanisms and Practical Considerations Involved in Plant Growth Promotion by Rhyzobacteria. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 10: 293-319

5. Gera Hol, W.H., Bezemer, T.M., Biere, A. (2013) Getting the Ecology into Interactions Between Plants and Plant-Growth Promoting Bacterium *Pseudomonas fluorescens*. Frontiers in Plant Science 4: 1-9

6. Saharan, B.S., Nehra, V. (2011) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research 2011: LSMR-21

7. Wu, C.J., Bernard, S.M., Andersen, G.L., Chen,W. (2009) Developing microbe-plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. Microbial Biotechnology 2: 428-440

8. Ngoma, L., Oluranti Babalola, O., Ahmad, F. (2012) Ecophysiology of plant growth promoting bacteria. Scientific Research and Essays 7: 4003-4013

9. Smits, T.H.M., Rezzonico, F., Kamber, T., Blom, J., Goesmann, A., Ishimaru, C.A., Frey, J.E., Stockwell, V.O., Duffy, B. (2011) Metabolic Versatility and Antibacterial Metabolite Biosynthesis Are Distinguishing Genomic Features of the Fire Blight Antagonist Pantoea vagans C9-1. PloS ONE 6: 1-8

10. Dinesh K. Maheshwari (2011) The Role of ACC Deaminase Producing PGPR in Sustainable Agriculture. U: Saraf, M., Jha, C.K., Patel, D. (2010) The Role of ACC Deaminase Producing PGPR in Sustainable Agriculture. (ur.) Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, str. 365-385

11. Sullivan, T.S. (2017) Soil Acidity Impacts Benificial Soil Microorganisms. WSU Department of Crop and Soil Sciences p.1-6

12. Niu, X., Song, L., Xiao, Y., Ge, W. (2017) Drought-Tolerant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Associated with Foxtail Millet in a Semi-arid Agroecosystem and Their Potential in Alleviating Drought Stress. Frontiers in Microbiology 8: 1-11

13. Mayak, S., Tirosh, T., Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomato and pepper. Plant Science 166: 525–530

14. Arshad, M., Shaharoona, B., Mahmood, T. (2008). Inoculation with *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth, yield, and ripening of pea (*Pisum sativum* L.). Pedosphere 18: 611–620.

15. Sandhya V., Ali S. K. Z., Grover M., Reddy G., Venkateswarlu B. (2009). Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. Biology and Fertility of Soils. 46: 17–26

16. Vurukonda, S.S.K.P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., SkZ, A. (2015). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant promoting rhizobacteria. Microbiological Research 184: 13-24

17. Mapelli, F., Marasco, R., Rolli, E., Barbato, M., Cherif, H., Guesmi, A., Ouzari, I., Daffonchio, D., Borin, S. (2013) Potential for Plant Growth Promotion of Rhizobacteria Associated with *Salicornia* Growing in Tunisian Hypersaline Soils. BioMed Research International. 2013: 1-13

18. Casanovas, E.M., Barassi, C.A., Sueldo, R.J. (2002) *Azospirillum* inoculation mitigates water stress effects in maize seedlings. Cereal Research Communications. 30: 343–350

19. Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiology Reviews. 31: 425-448

20. Lemanceau, P., Barret, M., Mazurier, S., Mondy, S., Pivato, B., Fort, T., Vacher, C. (2017) Chapter Five – Plant communication With Associated Microbiota in the Sermosphere, Rhizosphere and Phyllosphere. U: Becard, G. (ur.) Advances in Botanical Research. Elsevier Science & Technology Books, Paris, str. 102-123

21. Sharifi, R., Ryu, C.-M. (2017) Chapter Six – Chatting With a Tiny Belowground Member of the Holobiome: Communication Between Plants and Growth-Promoting Rhizobacteria. U: Becard, G. (ur.) Advances in Botanical Research. Elsevier Science & Technology Books, Paris, str. 135-160

22. Narula, N., Kothe, E., Behl, R.K. (2009) Role of Root Exudates in plant-microbe interactions. Journal of Applied Botany and Food Quality 82: 122-130

23. Currier, W.W., Strobel, G.A. (1976). Chemotaxis of Rhizobium spp. to Plant Root Exudates. Plant Physiology 57: 820-823

24. Mortley, D.G., Bonsi, C.K., Loretan, P.A., Hill, W.A., Morris, C.E. (1994) Relative Humidity Influences Yield, Edible Biomass, and Linear Growth Rate of Sweetpotato. Hort Science 29:609-610

25. Barnawal, D., Bharti, N., Pandey, S.S., Pandey, A., Chanotiya, C.S., Kalra, A. (2017) Plant growth-promoting rhizobacteriaenhance wheat salt and stress tolerance by altering

endogenous phytohormone levels and TaCTR1/TaDREB2 expression. U: Hurry, V. (ur.). Physiologia Plantarum. Wiley-Blackwell, str. 502-514

26. Zheng, W., Zeng, S., Bais, H., LaManna, J.M., Hussey, D.S., Jacobson, D.L., Jin, Y. (2018) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Reduce Evaporation and Increase Soil Water Retention. Water Resources Research 54: 3673-3687

27. Gouda, S., Kerry, R.G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.-S., Patra, J.K. (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. U: Wendland, J. (ur.). Microbiological Research, Elsevir 206: 131-140