

»MLADI ZA NAPREDEK MARIBORA 2013«
30. SREČANJE

IZOLACIJA PSEVDOMONAD IZ RIZOSFERE PARADIŽNIKA IN SOLATE

Raziskovalno področje: biologija
Raziskovalna naloga

05.11.2012
T. A. J. K. P. S. U. Ö. Ö. Z.
T. A. J. K. P. S. U. Ö. Ö. Z.
T. A. J. K. P. S. U. Ö. Ö. Z.

Maribor, januar 2013

**»Mladi za napredek Maribora 2013«
30. srečanje**

**IZOLACIJA PSEVDOMONAD IZ RIZOSFERE PARADIŽNIKA IN SOLATE
Raziskovalno področje: biologija
Raziskovalna naloga**

PROSTOR ZA NALEPKO



Maribor, januar 2013

ZAHVALA

Zahvaljujem se obema mentorjema, ki sta mi omogočila delo na tako zanimivem področju, za njun čas, ki sta mi ga namenila, za vse odgovore na vprašanja, ki so se mi porodila in na splošno za ves njun trud pri pomoči in usmerjanju raziskovalne naloge. Za pomoč in razumevanje se zahvaljujem tudi koordinatorici na šoli in vsem ostalim, ki so me podpirali pri izdelavi naloge.

Kazalo vsebine

POVZETEK	5
1 UVOD	6
1.1 Namen	6
1.2 Hipoteze	6
2 PREGLED OBJAV	7
2.1 Rizosfera in rizobakterije	7
2.2 Pseudomonade.....	8
2.3 Vpliv pseudomonad v prsti na rast rastlin	8
3 METODOLOGIJA DELA	11
3.1 Material	11
3.1.1 Rastline.....	11
3.1.2 Gojišča:.....	11
3.1.3 Reagenti:.....	11
3.1.4 Drug laboratorijski material:	11
3.2 Metode.....	12
3.2.2 Izolacija bakterij iz rizosfere	13
3.2.3 Izolacija različnih morfoloških tipov bakterij v čisti kulturi	14
3.2.4 Testiranje rasti v prisotnosti in odsotnosti kisika	14
3.2.5 Barvanje po Gramu	14
3.2.6 Mikroskopiranje	14
3.2.7 MALDI-TOF identifikacija izolatov	15
4 REZULTATI.....	15
5 RAZPRAVA	18
6 ZAPIS O DRUŽBENI ODGOVORNOSTI	20
7 ZAKLJUČEK.....	21
8 PRILOGE	22
9 VIRI IN LITERATURA	24

Kazalo slik

Slika 1: Interakcije med PGPR, rastlino, patogeni in prstjo (povzeto po Haas, 2005).	10
Slika 2: Hodogram poteka dela.	13
Slika 3: Kolonije iz rizosfere paradižnika na gojišču MacConkey (zgornja vrsta) in cetrimid (spodnja vrsta). Od leve proti desni si sledijo redčine 10^{-2} , 10^{-3} in 10^{-4} . Plošče so bile inkubirane aerobno pri sobni temperaturi.....	16
Slika 4: Po Gramu negativne palčke pod svetlobnim mikroskopom (izolat 46).	16

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Primerjava bakterij izoliranih iz rizosfere paradižnika in solate. Upoštevani so samo izolati, ki so bili identificirani z visoko stopnjo zanesljivosti (vrednost Score value nad 2.000)	17
Preglednica 2: Primerjava bakterij izoliranih iz rizosfere paradižnika in solate. Upoštevani so tudi izolati, ki so bili identificirani z nizko stopnjo zanesljivosti (podčrtani - vrednost Score value med 1.700 in 1.999).....	18

POVZETEK

Bakterije, ki živijo v prsti lahko pozitivno vplivajo na rast rastlin tako, da izločajo snovi koristne za rastline, olajšajo vnos hranil ali ščitijo rastline pred boleznimi. Take bakterije imenujemo s kratico PGPR (plant growth - promoting rhizobacteria). Najdemo jih v območju rizosfere ali na površini korenin (rizoplan).

Namen raziskovalne naloge bo izolacija bakterij PGPR iz skupine psevdomonad s površine korenin pri vrtninah. Izolacija bakterij je potekala s pomočjo neselektivnih in selektivnih gojišč. Iz dveh vrtnin smo izolirali 62 sevov in jih identificirali s klasičnimi pristopi (barvanje po Gramu, testiranje rasti v prisotnosti in odsotnosti kisika, proizvodnja pigmentov) in sodobno avtomatizirano metodo za identifikacijo bakterij MALDI-TOF.

Rezultat naloge so pokazali raznolikost bakterij iz skupine psevdomonad ter njihovo povezavo z določenimi vrtninami.

1 UVOD

1.1 Namen

V raziskovalni nalogi sem želel podrobno raziskati svet rizobakterij, ki pospešujejo rast rastlin. Označimo jih s kratico PGPR (plant growth - promoting rhizobacteria). Naš namen je bil izolirati čim več bakterij iz skupine psevdomonad iz rizosfere paradižnika in solate. Ugotovitve smo primerjali z ugotovitvami ostalih raziskav po svetu. Na podlagi naših eksperimentov in tujih opažanj smo tvorili zaključke, razmislili smo o uporabi PGPR v praktične namene. Pričakovane rezultate smo strnili v obliki hipotez.

1.2 Hipoteze

Glede na to, da rizosfera rastlin predstavlja edinstven življenjski prostor za mikroorganizme, lahko pričakujemo, da bomo izolirali veliko različnih vrst rizobakterij. Ker so psevdomonade znana skupina bakterij PGPR, bodo najverjetneje prisotne v rizosferi različnih vrtnin.

Verjetno je, da bodo nekatere vrste psevdomonad prisotne samo pri nekaterih rastlinah. Možni bodo pa tudi primeri, ko bodo na različnih vrtninah prisotne iste vrste psevdomonad.

Pričakujemo, da bodo naši izsledki primerljivi z rezultati ostalih raziskav. Na podlagi naših pričakovanj smo tvorili tri hipoteze:

1. Bakterije iz skupine psevdomonad so pogosto prisotne v rizosferi različnih vrtnin
2. Določene vrste psevdomonad bomo našli pri vseh preiskovanih rastlinah
3. Izolirane psevdomonade se bodo tudi razlikovale glede na rastlinsko vrsto in lokacijo, kjer je rastlina nabrana

2 PREGLED OBJAV

2.1 Rizosfera in rizobakterije

Rast rastlin je odvisna od številnih dejavnikov v okolju. Med temi je zelo pomembna rizosfera, ki je omejeno območje tik ob koreninah znotraj katerega delovanje korenin spremeni fizikalne, kemijske in biološke lastnosti prsti in vpliva na sestavo in aktivnost mikroorganizmov (McCully, 2005). Rizosfero naseljujejo različni mikroorganizmi, kot so bakterije, glive, praživali in alge. Najštevilčnejše med njimi so bakterije, ki imajo tudi največji vpliv na rast rastlin (Antoun in Kloepper, 2001; Barriuso in sod., 2008). Snovi, ki jih izločajo rastline delujejo selektivno na bakterijske populacije, zato je raznolikost bakterij v rizosferi manjša kot drugod v zemlji (Garcia in sod., 2001). Število bakterij, ki živijo v rizosferi, pa je po drugi strani lahko tudi do 100-krat večje od števila bakterij, ki živijo v tleh brez korenin. Razlog za to je v manjšem nihanju vlage in višjih koncentracijah hranil, ki jih izločajo korenine (Brock in Madigan, 1991; Haas in Défago, 2005). To sta glavna razloga, da je območje korenin glavno območje delovanja mikrobov v tleh.

Interakcije med rastlino in mikroorganizmi so lahko pozitivne, negativne ali nevtralne. Tiste bakterije, ki se nahajajo v rizosferi in imajo pozitiven učinek na rast rastlin imenujemo z angleško kratico PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) (Kloepper in sod., 1980). Število na novo odkritih bakterij PGPR v zadnjih letih močno narašča in vključuje številne bakterijske rodove, kot so *Pseudomonas* sp., *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Arthrobacter* sp., *Burkholderia* sp., *Bacillus* sp. in *Serratia* sp. (Antoun in Kloepper, 2001; Barriuso in sod., 2008).

Bakterije PGPR lahko delujejo na rast rastlin direktno preko izločanja rastlinskih rastnih hormonov ali posredno tako, da povečajo dostopnost hranil (dušika in fosforja). Posamezne bakterije PGPR lahko vplivajo na rast rastlin preko več različnih mehanizmov hkrati (Joseph in sod., 2007; Yasmin in sod., 2007). Pomemben mehanizem boljšega zagotavljanja hranil je vezava dušika. Bakterije in arheje z encimi reducirajo dušik iz zraka (N_2) v amonijak, ki je dostopen rastlinam. Bakterije, ki vežejo dušik lahko živijo z rastlinami v simbiozi, kjer rastline simbiotske bakterije oskrbujejo s produkti fotosinteze, same pa uporabijo produkte vezave dušika (Kubik, 2002; Haas in Défago, 2005). V rizosferi pa se nahajajo tudi

nesimbiontske bakterije, ki vežejo dušik v dušikove spojine. V to skupino spadajo tudi bakterije rodu *Pseudomonas* sp..

2.2 Psevdomonade

Psevdomonade so Gram negativne bakterije, kar pomeni, da se po barvanju po Gramu obarvajo rdeče. Pod mikroskopom jih vidimo kot palčke, ki so lahko ravne ali ukrivljene. So organotrofni aerobi, imajo zelo preproste zahteve za prehranjevanje, živijo samo ob prisotnosti kisika, glavni produkt njihovega metabolizma pa je CO₂. Živijo v pH nevtralnem okolju. Glede temperature spadajo med mezofilne bakterije, ki uspevajo v temperaturnem območju med 20 in 45 stopinj Celzija. Psevdomonade se premikajo s pomočjo bička. V nasprotju z nekaterimi bakterijami, ki tvorijo spore, da lahko preživijo v neugodnih razmerah, psevdomonade spore ne tvorijo. (Brock in Madigan, 1991; Haas in Défago, 2005)

Nekatere psevdomonade so patogene. Ker spadajo med temperaturne mezofile, najbolje uspevajo ravno pri temperaturi človeškega telesa. Povzročajo predvsem bolezni izločal in dihal. *Pseudomonas aeruginosa* je pogosto prisoten v bolnišnicah, z njo se okužijo predvsem bolniki, ki se zdravijo za drugimi boleznimi. Je zelo odporen na številne antibiotike (Brock in Madigan, 1991).

2.3 Vpliv psevdomonad v prsti na rast rastlin

Psevdomonade lahko uporabljajo veliko različnih organskih snovi kot vir ogljika in energije, zato so v naravi splošno prisotne. Pogosto jih najdemo tudi v rizosferi (Marquez-Santacruz in sod., 2010; Mishra in Arora, 2012). Kot PGPR so učinkovite predvsem psevdomonade, ki spadajo v skupino *Pseudomonas fluorescens-putida*. Za to skupino so ugotovili, da spodbuja rast različnih kmetijskih rastlin kot na primer čičerike (Rokhzadi in sod., 2008), sladkornega trsa (Mehnaz in sod., 2009) in stročnic (Johri in sod., 2001). Testi, kjer so rastline okužili z določenimi sevi teh bakterij, so pokazali, da le-te pozitivno vplivajo na pridelek krompirja, sladkorne pese in redkvic. Pridelek se je po okužbi s psevdomonadami povečal tudi za 144 % (Kloepper in Schroth, 1978; Kloepper in sod., 1980; Burr in sod., 1978).

Poleg pozitivnega vpliva na rast rastlin preko boljšega dostopa hranil, lahko psevdomonade vplivajo na rast gostiteljske rastline tako, da zavirajo rast ostalih rastlin in si na ta način zagotovijo boljši dostop do hranil. Nekatere psevdomonade lahko proizvajajo plin vodikov cianid (HCN), ki zavira rast korenin sosednjih rastlin, pri tem pa gostiteljska rastlina ni prizadeta (Schippers in sod., 1990). Psevdomonade bi tako lahko uporabljali tudi za biološki nadzor plevela. Okužba žitaric s *Pseudomonas fragi*, ki tudi izloča vodikov cianid, vpliva na boljše kaljenje semen, biomaso rastlin in sposobnost črpanja hranil iz okolja.

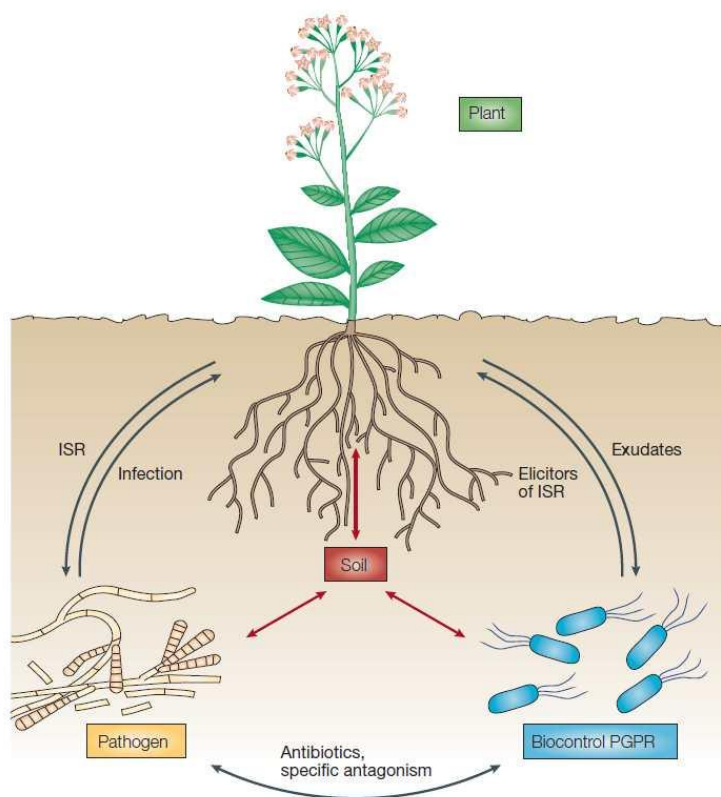
Poleg posrednega vpliva na rast preko lažjega dostopa do hranil v okolju, lahko psevdomonade vplivajo tudi neposredno na rast rastlin. Rast je pri rastlinah regulirana z različnimi rastlinskimi hormoni kot so npr. avksini, giberelini, citokinini. Bakterije, ki so sposobne sintetizirati rastlinske hormone ali njihove analoge, lahko tudi vplivajo na rast rastlin. Številne bakterije iz rizosfere so sposobne sintetizirati rastlinske hormone (predvsem avksine) v prsti ali v čisti kulturi. *Pseudomonas fluorescens* in *Pseudomonas putida* lahko proizvajata velike količine avksinov in tako pospešujeta rast. Psevdomonade izločajo tudi še slabo raziskano snov, ki vpliva na rast koreninskih laskov, kar poveča površino korenin in s tem boljše črpanje vode in hranil iz prsti (Khakipour in sod., 2008).

Železovi ioni so nujno potrebni za vsa živa bitja. Ker je dostopnega železa v prsti zelo malo, med organizmi poteka oster boj za vezavo tega omejujočega dejavnika. V pogojih pomanjkanja železa v prsti bakterije PGPR začnejo izločati snovi (siderofore), ki učinkovito vežejo železove ione in tako lažje pridejo do železovih ionov prsti (Whipps, 2001). Večina bakterij, ki proizvajajo siderofore pripada bakterijskim Gram negativnim bakterijam rodov *Pseudomonas* sp. in *Enterobacter* sp.. Določeni sevi skupine *Pseudomonas fluorescens-putida* izboljšajo rast rastlin z izločanjem sideroforov, pomanjkanje dostopnega železa pa zavre rast potencialno škodljivih bakterij in gliv na površini korenin (rizoplan) (Kloepper in sod., 1980).

Poleg dušikovih spojin, je omejujoč dejavnik za rast rastlin tudi dostopnost organskih fosfatov. Nekateri mikroorganizmi so sposobni pretvoriti anorganski fosfor v topne fosfate, ki jih rastline lahko uporabijo. Prav sposobnost pretvorbe fosforja v fosfate je pomemben mehanizem, s katerim bakterije PGPR omogočajo boljšo rast rastlin (Rodriguez in sod., 2006). Med najbolj pomembne bakterije, ki so sposobne te pretvorbe spadajo tudi psevdomonade (Ramachandran in sod., 2007).

Poleg vpliva na rast rastlin, so bakterije PGPR učinkovite tudi kot biološka zaščita rastlin. Pseudomonade so še posebej primerne, saj so splošno prisotne v prsti, se hitro razmnožujejo, hitro naselijo rizosfero, površino korenin in notranjost rastlin, in lahko proizvajajo širok spekter bioaktivnih snovi (antibiotike, siderofore, hlapne hormone in druge snovi, ki vplivajo na rast). *Pseudomonas fluorescens* proizvaja številne antibiotike, hitinolitične encime, siderofore, vodikov cianid in katalazo, in tako deluje zaviralno na potencialne patogene bakterije in glive v prsti, v nekaterih primerih pa tudi proti razvitejšim organizmom (Haas in Défago, 2005; Banasco in sod., 1998; Kraus in Loper, 1995; Seong in Shin, 1996).

Tiste PGPR, pri katerih prevladuje pospeševanje rasti rastlin, imenujemo biognojila. Če pa je prevladujoča biokontrola, jih imenujemo tudi biopesticidi. Te PGPR, med katere večinoma spadajo pseudomonade in bacilusi, so sovražniki prepoznanih koreninskih patogenov. Nekatere teorije govorijo o tem, da te vrste PGPR izključujejo za rastline škodljive patogene, vendar niso dovolj prepričljive (Haas in Défago, 2005).



Slika 1: Interakcije med PGPR, rastlino, patogeni in prstjo (povzeto po Haas, 2005).

3 METODOLOGIJA DELA

3.1 Material

V raziskovalni nalogi smo analizirali psevdomonade v rizosferi povrtnin.

3.1.1 Rastline

Za eksperimentalni del smo uporabili korenine ene sadike paradižnika in ene sadiko solate. Paradižnik je bil nabran v sredini oktobra 2012 na domačem vrtu v Miklavžu na Dravskem polju, solata pa ob koncu novembra 2012 na domačem vrtu v Murski Soboti.

3.1.2 Gojišča:

- selektivno in diferencialno gojišče za Gram negativne bakterije MacConkey plošče
- selektivno gojišče za psevdomonade s cetrimidom
- gojišče z navadnim agarjem

3.1.3 Reagenti:

- fiziološka raztopina
- kristal vijolično barvilo
- lugol
- etanol
- safranin

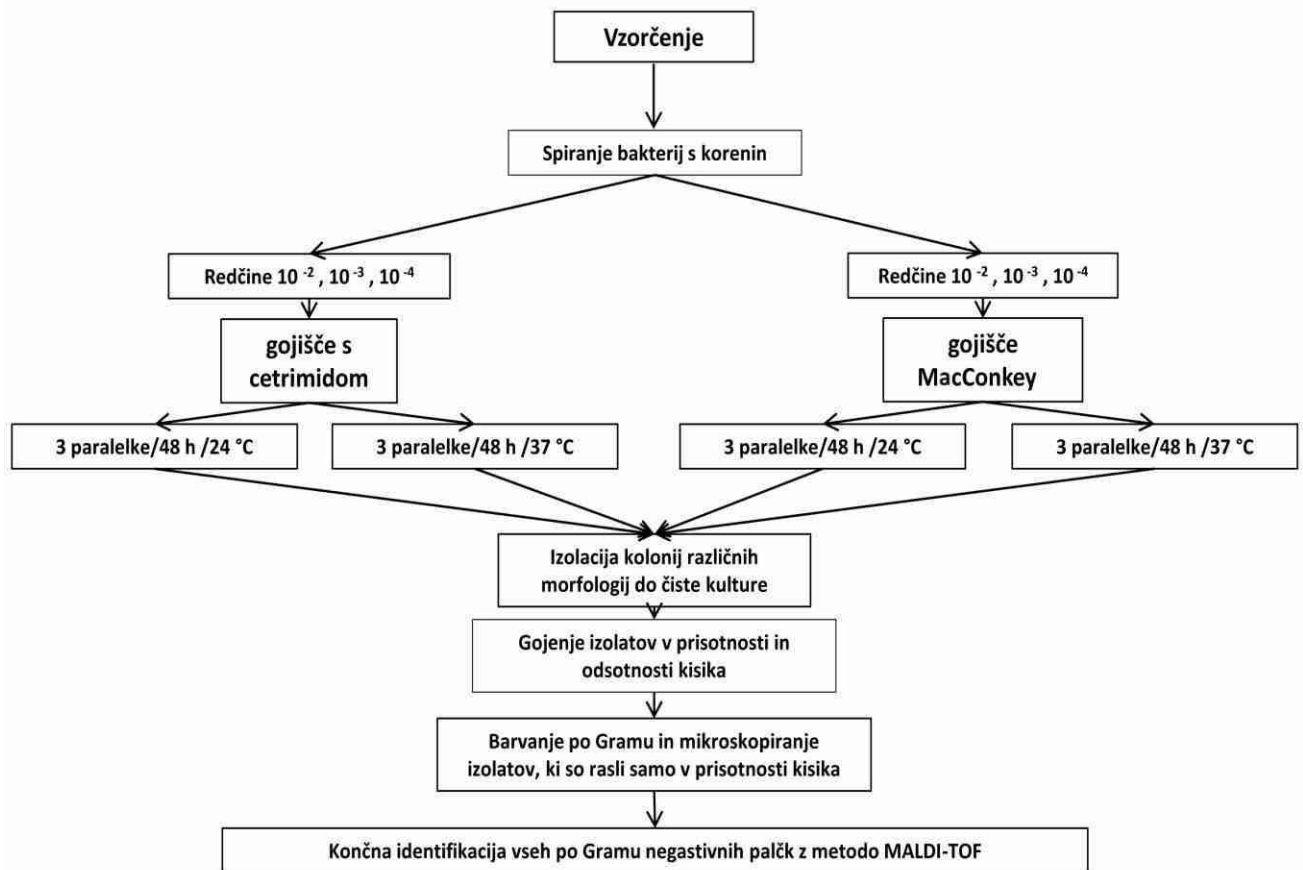
3.1.4 Drug laboratorijski material:

- sterilna pinceta
- sterilne škarjice
- epice
- vorteks
- centrifuga
- petrijevka z navadnim agarjem

- hokejke
- cepilne zanke
- gorilnik
- anaerobni lonec
- anaerobna vrečka
- objektna stekelca
- imerzijsko olje
- mikroskop
- pipete
- kapalke

3.2 Metode

Metode, ki smo jih uporabili pri delu in so opisane v nadaljevanju, lahko razdelimo v dva sklopa. V prvi sklop smo uvrstili metode za izolacijo psevdomonad iz vzorcev korenin. V drugem sklopu bodo opisane metode za identifikacijo izolatov. Za boljši pregled, smo potek dela shematsko prikazali na sliki 2.



Slika 2: Hodogram poteka dela.

3.2.2 Izolacija bakterij iz rizosfere

Korenine smo dali v centrifugirke s 5 mL fiziološke raztopine in jih najprej narahlo sprali, da smo odstranili zemljo s korenin. Nato smo jih s sterilnimi škarjicami narezali na centimetrskede dele in jih dali v mikrocentrifugirko z 1 ml fiziološke raztopine. Epico s koreninami smo nato 4 minute vorteksirali, da smo odstranili bakterije s površine korenin in po koncu vorteksiranja na hitro centrifugirali, da so se koreninice in ostanki prsti posedli. Suspenzijo smo nato v fiziološki raztopini redčili do redčine 10^{-3} tako, da smo si pripravili redčitveno vrsto mikrocentrifugirk z 0,9 mL fiziološke raztopine. Redčine od 10^{-1} do 10^{-3} smo dobili s prenašanjem 0,1 ml suspenzije med redčinami. Pred vsako naslednjo redčitvijo smo suspenzijo vedno dobro premešali z vorteksom. Na koncu smo 0,1 ml vsake redčine enakomerno razmazali na šest gojišč MacConkey in šest plošč s cetrimidom. Končne redčine na ploščah so tako bile od 10^{-2} do 10^{-4} . Polovico plošč smo inkubirali pri sobni temperaturi, drugo polovico pa pri 37 °C . Enak postopek smo uporabili pri paradižniku in solati.

3.2.3 Izolacija različnih morfoloških tipov bakterij v čisti kulturi

Po 48-urni inkubaciji smo plošče pregledali in vse različne morfološke tipe kolonij izolirali v čisti kulturi. S cepilno zanko smo izbrane kolonije v dveh paralelkah cepili na redko do posamezne kolonije na sveža gojišča z navadnim agarjem. Eno paralelko smo inkubirali v anaerobnih, drugo pa pri aerobnih pogojih 48 ur na sobni temperaturi oziroma pri 37 stopinjah Celzija.

3.2.4 Testiranje rasti v prisotnosti in odsotnosti kisika

Anaerobne pogoje smo vzpostavili z anaerobno vrečko in anaerobnim loncem, v katerega smo dali plošče. Po inkubaciji smo primerjali rast na ploščah, ki so bile inkubirane anaerobno in aerobno. Tisti izolati, ki so zrastle samo na aerobnih ploščah, so bili možni kandidati za psevdomonade in smo jih nadalje identificirali z barvanjem po Gramu in sistemom za avtomatsko identifikacijo MALDI-TOF.

3.2.5 Barvanje po Gramu

Z barvanjem po Gramu ločimo Gram pozitivne in Gram negativne bakterije. Psevdomonade spadajo med Gram negativne bakterije. Barvanje po Gramu poteka tako, da na objektno stekelce kanemo 2 kapljici fiziološke raztopine in s cepilno zanko v njej resuspendiramo bakterije. Ko se stekelce posuši, nad plamenom bakterije nanj pritrdimo. Sledi postopek barvanja. Stekelce prelijemo s kristal vijoličnim barvilom, počakamo eno minuto in ga speremo z vodo. Nato ga prelijemo z lugolom, počakamo eno minuto in znova speremo. Sledi razbarvanje z etanolom, stekelce ponovno speremo z vodo, nato ga prelijemo s safraninom, počakamo eno minuto in speremo. S pomočjo mikroskopa lahko nato razločimo Gram negativne bakterije, ki so rdeče, in temno vijolične Gram pozitivne bakterije.

3.2.6 Mikroskopiranje

Po barvanju po Gramu smo vzorce mikroskopirali s svetlobnim mikroskopom. Na objektno stekelce smo kanili imerzijsko olje, okular smo nastavljali z makrometrskim in mikrometrskim vijakom. Uporabljali smo objektiv s 1000-kratno povečavo. Ko smo objekte

jasno videli, smo določili Gram pozitivne in negativne bakterije. Vse po Gramu negativne aerobne palčke smo dokončno identificirali z metodo MALDI-TOF.

3.2.7 MALDI-TOF identifikacija izolatov

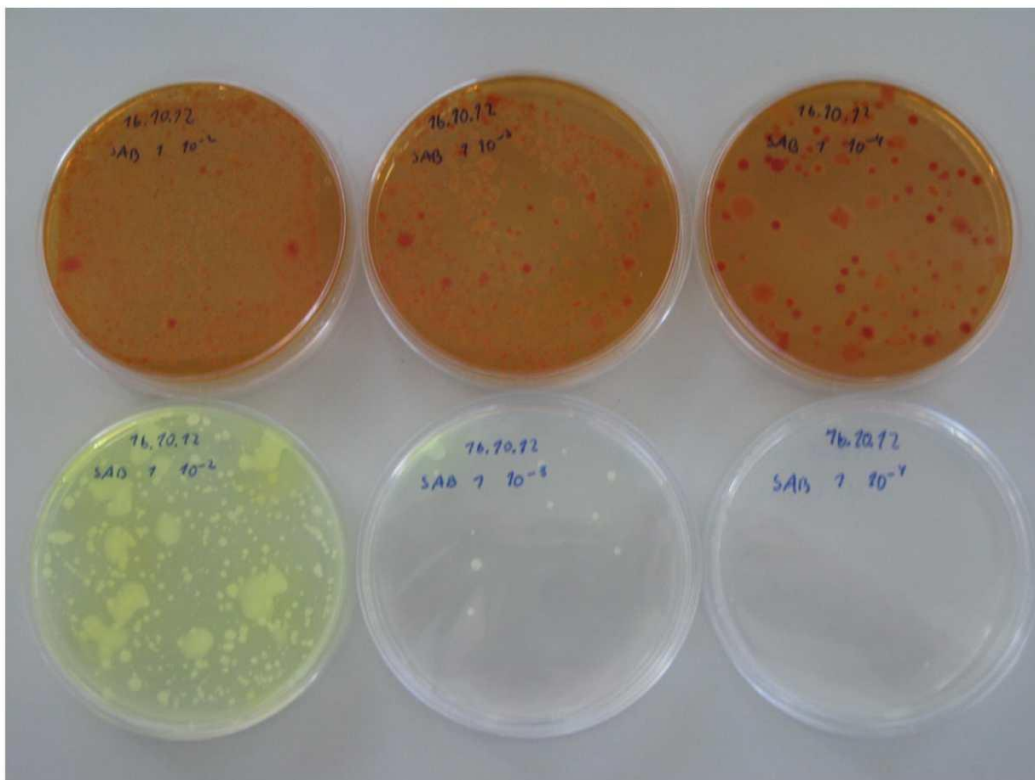
MALDI-TOF je sodobna avtomatizirana metoda za identifikacijo bakterij, ki temelji na določanju profilov vseh beljakovin v bakterijskih celicah. Čisto kulturo smo najprej enakomerno nanesti na kovinsko ploščico in nanjo kanili kapljico posebne tekočine (matriks), ki beljakovine ionizira. Ko snop svetlobe osvetli vzorec, izbije nabite beljakovine, ki potujejo do detektorja s hitrostjo, ki je odvisna od njihove mase. Sistem na ta način vsakemu vzorcu določi beljakovinski profil, ki je odvisen od beljakovinske sestave. Ker se beljakovinska sestava različnih bakterijskih vrst med sabo razlikuje, lahko bakterije uspešno identificiramo tako, da primerjamo beljakovinske profile (masne spektre) naših vzorcev z masnimi spektri znanih bakterij v knjižnici. Računalniški program nam nato prikaže rezultate in pove, kolikšna je verjetnost, da je naš vzorec res določena vrsta¹. S to metodo smo natančno določili vrste psevdomonad.

4 REZULTATI

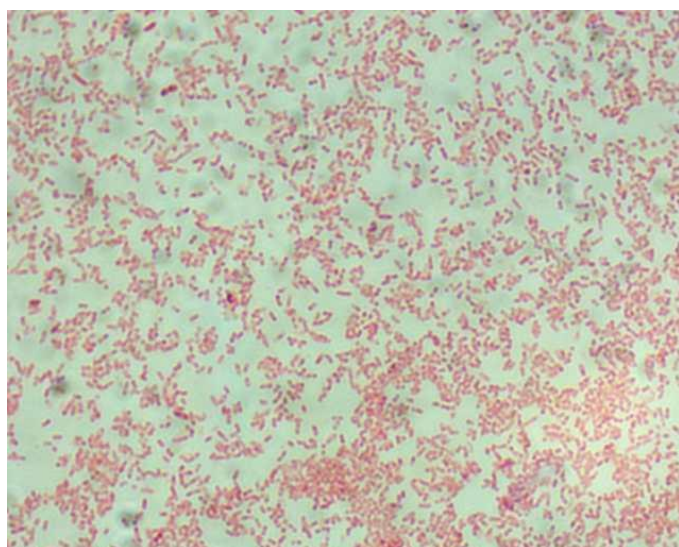
Rizobakterije smo izolirali s površine korenin paradižnika in solate. Na ploščah z redčinami 10^{-3} in 10^{-4} so po inkubaciji zrasle posamezne kolonije. Glede na morfološke značilnosti smo kolonije razlikovali po barvi, velikosti, obliki robov, sluzavosti in proizvodnji topnih pigmentov (slika 3). Na gojišču MacConkey smo razlikovali roza kolonije, ki fermentirajo laktozo in ob tem tvorijo kislino, od belih kolonij, ki ne fermentirajo laktoze. Psevdomonade ne fermentirajo laktoze, zato se na gojišču MacConkey ne obarvajo roza in ostanejo belkaste. Pri vzorcu paradižnika smo s plošče MacConkey naprej nacepili osem belih kolonij različnih morfotipov. Po testiranju rasti v anaerobnih in aerobnih pogojih nam je ostalo šest izolatov, ki so rasli samo v aerobnih razmerah, in ki smo jih naprej barvali po Gramu (slika 4). Od teh so bili le izolati označeni s številkami 46, 50, 53 in 55 po Gramu negativne palčke (slika 4). Kot

¹ priloga 1 in 2

kažejo rezultati identifikacije z metodo MALDI-TOF sta le izolata 46 in 55 pripadala psevdomonadam (preglednici 1 in 2).



Slika 3: Kolonije iz rizosfere paradižnika na gojišču MacConkey (zgornja vrsta) in cetrimid (spodnja vrsta). Od leve proti desni si sledijo redčine 10^{-2} , 10^{-3} in 10^{-4} . Plošče so bile inkubirane aerobno pri sobni temperaturi.



Slika 4: Po Gramu negativne palčke pod svetlobnim mikroskopom (izolat 46).

Na ploščah s cetrimidom so bile vse kolonije belkaste. Okrog nekaterih kolonij se je v gojišču pojavil tudi rjav ali zelen pigment. Na sveže plošče smo nacepili 18 kolonij z različnimi morfološkiimi tipi, ki so se razlikovali po velikosti, sluzavosti in tvorbi topnih pigmentov. Vsi izolati so bili striktni aerobi in pod mikroskopom po Gramu negativne palčke, zato smo vse tudi identificirali naprej z metodo MALDI-TOF. Kot je razvidno iz preglednice 1, smo z gojiščem s cetrimidom uspeli identificirati več različnih vrst psevdomonad (skupno 8) v primerjavi z gojiščem MacConkey (skupno 1). Gojišče s cetrimidom je bolj selektivno za psevdomonade, zato tudi nismo našli ostalih bakterij, ki smo jih našli na gojišču MacConkey. Zaradi tega, smo v nadaljevanju za izolacijo psevdomonad uporabljali le gojišče s cetrimidom.

Podoben postopek smo izvedli pri izolaciji bakterij iz rizosfere solate. Tokrat smo cepili 3 paralelke treh razredčin le na selektivne plošče s cetrimidom . Devet morfološko različnih kolonij smo cepili naprej do posameznih kolonij. Po opazovanju rasti v prisotnosti in odsotnosti kisika smo izločili še 2 izolata. Vseh preostalih sedem izolatov se je po Gramu barvalo negativno. Tudi MALDI-TOF je vseh sedem uvrstil v rod *Pseudomonas* (preglednici 1 in 2). Vse identificirane vrste psevdomonad in število izolatov pri paradižniku in solati, in razlike med obema smo navedli v preglednicah 1 in 2. Zanesljivost identifikacije je pri vsakem izolatu izražena z vrednostjo (Score value)², preglednica 1 in 2 se razlikujeta v zanesljivosti identifikacije.

Preglednica 1: Primerjava bakterij izoliranih iz rizosfere paradižnika in solate. Upoštevani so samo izolati, ki so bili identificirani z visoko stopnjo zanesljivosti (vrednost Score value nad 2.000)

Vrsta bakterije	Število identificiranih izolatov		
	paradižnik		solata
	gojišče MacConkey	gojišče s cetrimidom	gojišče s cetrimidom
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2	3	
<i>Pseudomonas kilonensis</i>		1	
<i>Pseudomonas marginalis</i>			1
<i>Pseudomonas jessenii</i>		3	
<i>Pseudomonas putida</i>			2
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>		1	

² Natančni podatki o najbližjem, drugem najbližjem zadetku in zanesljivost identifikacije izolatov je navedena v prilogah 1 in 2.

Preglednica 2: Primerjava bakterij izoliranih iz rizosfere paradižnika in solate. Upoštevani so tudi izolati, ki so bili identificirani z nizko stopnjo zanesljivosti (podčrtani - vrednost Score value med 1.700 in 1.999).

Vrsta bakterije	Število identificiranih izolatov		
	paradižnik		solata
	gojišče MacConkey	gojišče s cetrimidom	gojišče s cetrimidom
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2	3	
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>		<u>2</u>	
<i>Pseudomonas thivervalensis</i>		<u>2</u>	
<i>Pseudomonas kilonensis</i>		1	
<i>Pseudomonas migulae</i>		<u>1</u>	
<i>Pseudomonas marginalis</i>			1
<i>Pseudomonas viridiflava</i>			<u>1</u>
<i>Pseudomonas jesenii</i>		3+ <u>1</u>	<u>2</u>
<i>Pseudomonas putida</i>		<u>4</u>	2
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>		1	<u>1</u>

Iz preglednic 1 in 2 je razvidno, katere vrste psevdomonad se pojavljajo samo v paradižniku oziroma solati in katere se pojavljajo v obeh. Od skupaj 27 različnih izolatov smo jih uspeli z visoko stopnjo zanesljivosti identificirati 13, pri čemer smo razločili 6 različnih vrst psevdomonad (preglednica 1). Če upoštevamo tudi izolate, ki smo jih identificirali z nizko stopnjo zanesljivosti, pa smo našli skupaj 10 različnih vrst psevdomonad (Preglednica 2). Prav tako je zanimiv podatek, da so bile 3 različne vrste psevdomonad (*P. jesenii*, *P. putida*, *P. brassicacearum*) prisotne tako v rizosferi paradižnika kot v rizosferi solate, obe vrtnini pa sta bili nabrani na različnih krajih v Sloveniji.

5 RAZPRAVA

Na področju rizosfere, rastlin in z njima povezanimi bakterijami je bilo izvedenih že veliko raziskav in eksperimentov. Kljub temu, da vloga rizobakterij še vedno ni popolnoma raziskana, se rezultati nagibajo v eno smer. Jasno je, da lahko PGPR občutno izboljšajo rast rastlin, lahko izločajo snovi, ki so koristne za rastlino, lahko pomagajo pri absorbiranju snovi ali pa ščitijo rastlino pred boleznimi.

Moja prva hipoteza je bila, da so bakterije iz skupine psevdomonad pogosto prisotne v rizosferi različnih vrtnin. Med drugim so jih identificirali tudi v raziskavah v Mehiki, Čilu in na Japonskem. Nekateri viri so celo navajali, da sta skupini bakterij *Pseudomonas* in *Bacillus* najpogosteje prisotni pri tako imenovani biokontroli (Haas in Défago, 2005). V našem eksperimentu smo v začetku izolirali skupno 27 različnih morfoloških tipov bakterij. Od tega smo izmed 27 sevov psevdomonad identificirali 10 različnih vrst.

Psevdomonade opisane v rizosferi rastlin pripadajo zelo različnim vrstam. Vrste, ki smo jih izolirali pri solati in paradižniku v tej nalogi, se deloma ujemajo z do sedaj opisanimi psevdomonadami, ki jih najdemo pri rastlinah.

Na Japonskem, v Tokiu, je leta 1999 Nishiyama s sodelavci raziskoval strukturo bakterijskih združb na rizoplanu paradižnika. Med drugim so identificirali *Pseudomonas pickettii*. Leta 2010 je Marquez-Santacruz s sodelavci raziskoval bakterije v rizosferi Mehiskega paradižnika. Zanimala jih je predvsem raznolikost bakterij, odkrili so številne Gram pozitivne in negativne bakterije, med njimi tudi *Pseudomonas stutzeri* in *Pseudomonas syringae*. Tudi oni so poznali pozitivne učinke PGPR, omenili so, da lahko rizobakterije uporabimo kot biokontrolne, uporabe kot biognojila pa pri njihovi raziskavi ni bilo. Vrste psevdomonad, ki smo jih izolirali v naši nalogi, so drugačne, kar pa je razumljivo, saj gre za druge rastline in drugo geografsko območje. Leta 1992 sta Guaiquil in Ciampi na Čilski univerzi raziskovala PGPR in njihov vpliv na sadike zelja in krompirja. Ugotovila sta, da so rastline, kolonizirane s PGPR, tudi do 30% bolj produktivne kot ostale. Psevdomonade, ki sta jih izolirala iz rizosfere krompirja so bile *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas marginalis* (ki smo ga v naši nalogi izolirali tudi mi) in *Pseudomonas solanacearum*. Iz rizosfere žita sta izolirala še *Pseudomonas syringae*. Zanimivo je, da so slednjo identificirali tudi pri raziskavi v Mehiki. Druga hipoteza je bila, da bomo določene vrste psevdomonad našli pri vseh preiskovanih rastlinah. Glede na prejšnjo hipotezo, da se psevdomonade pogosto pojavljajo v rizosferi rastlin, bi bilo možno tudi to, da obstaja povezava med določenimi vrtninami in bakterijami. V naši raziskavi so bile kar 3 vrste psevdomonad prisotne tako v rizosferi paradižnika kot v rizosferi solate. Vzroki za to, da smo na različnih vrstah vrtnin našli različne vrste psevdomonad, so različni. Prvi bi lahko bil v vrsti prsti. Nishiyama s sodelavci, 1999, je namreč opisal očitne povezave med vrstami prsti in vrstami bakterij v njih. Pri naših vzorcih nismo delali natančne analize prsti. Drugi razlog bi lahko bil v podnebjju. Oba kraja imata

skoraj enako podnebje, temperature in količina padavin sta podobna, zato je lahko samo podnebje vzrok za takšno podobnost. Iz tega lahko sklepamo, da vrsta rastline nima bistvenega vpliva na to, katere bakterije bodo uspevale v njeni rizosferi.

Tretja hipoteza je bila, da se bodo izolirane psevdomonade razlikovale glede na rastlinsko vrsto in lokacijo, kjer je rastlina nabrana. Izmed 10 različnih vrst psevdomonad, ki so bile identificirane, jih je bilo 7 prisotnih samo na eni izmed vrtnin in sicer 5 vrst pri paradižniku in 2 vrsti pri solati. Podobni rezultati so opisani tudi v drugih študijah. Kljub temu pa vedno obstajajo možnosti za izboljšave. Zelo dobro bi bilo, če bi obravnavali enake rastline iz različnih krajev, na primer paradižnik in solato iz Murske Sobote in Miklavža na Dravskem polju in ne eno vrtnino iz enega kraja in drugo iz drugega. V splošnem bi lahko nalogo izboljšali, če bi imeli še več izolatov in predvsem več različnih vrst rastlin.

Pri nadaljnjem delu bi lahko vključili tudi eksperimente z gojenjem rastlin v kontroliranih razmerah in opazovali strukturo združbe rizobakterij v odvisnosti od različnih dejavnikov. Spreminjali bi temperaturo, vlažnost, pH, vrsto prsti in s tem povezane snovi v njej, dejavnik sončnega obsevanja... Vključiti bi morali tudi čim več in čim bolj različne rastlinske vrste, testirali bi vpliv biognojil in biokontrolnih bakterij na njih. Na ta način bi prišli do uporabnih ugotovitev ali imajo izolirani sevi vpliv na izboljšano rast rastlin in s tem potencial za uporabo kot biognojila, s čemer bi bistveno pripomogli k zmanjšanju uporabe okolju nevarnih pesticidov in gnojil.

6 ZAPIS O DRUŽBENI ODGOVORNOSTI

Spoznal sem, kaj so PGPR in zakaj so pomembne. Odkril sem, da so bakterije iz skupine psevdomonad pogosto prisotne v rizosferi različnih vrtnin, natančneje v rizosferi paradižnika in solate. Določene vrste psevdomonad sem našel tako v rizosferi paradižnika kot v rizosferi solate. Izolirane psevdomonade so se razlikovale tudi glede rastlinske vrste in lokacije, kjer je bila rastlina nabrana. Spoznal smo pomen uporabe PGPR v biokontrolne namene in kot biognojila.

7 ZAKLJUČEK

Spoznal sem, kaj so PGPR in zakaj so pomembne. Odkril sem, da so bakterije iz skupine psevdomonad pogosto prisotne v rizosferi različnih vrtnin, natančneje v rizosferi paradižnika in solate. Določene vrste psevdomonad sem našel tako v rizosferi paradižnika kot v rizosferi solate. Izolirane psevdomonade so se razlikovale tudi glede rastlinske vrste in lokacije, kjer je bila rastlina nabrana. Ugotovil sem tudi, da obstajajo določene povezave med podnebjem, lokacijo in prstjo kraja, kjer rastline uspevajo. Spoznal smo pomen uporabe PGPR v biokontrolne namene in kot biognojila.

8 PRILOGE

Priloga 1: Pomen vrednosti (Score values) pri identifikaciji izolatov z metodo MALDI-TOF.

OBMOČJE (Score values)	OPIS	SIMBOL
2,300 - 3,000	pravilna identifikacija do vrste	+++
2,000 - 2,299	pravilna identifikacija do rodu, verjetno pravilna identifikacija do vrste	++
1,700 - 1,999	verjetno pravilna identifikacija do rodu	+
0,000 - 1.699	nezanesljiva identifikacija	-

Priloga 2: Rezultati identifikacije bakterijskih izolatov s korenin paradižnika z metodo MALDI-TOF.

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>C12</u> (++) (B)	1	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<u>2.271</u>	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>2.245</u>
<u>D9</u> (+) (B)	10	<u><i>Pseudomonas putida</i></u>	<u>1.834</u>	not reliable identification	<u>1.692</u>
<u>C9</u> (++) (A)	14	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>2.203</u>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>2.185</u>
<u>D3</u> (+) (B)	15	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	<u>1.911</u>	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	<u>1.888</u>
<u>C8</u> (-) (C)	16	no peaks found	<u>≤ 0</u>	no peaks found	<u>≤ 0</u>
<u>D12</u> (+) (B)	16	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	<u>1.791</u>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>1.757</u>
<u>D8</u> (+) (B)	17	<i>Pseudomonas jessenii</i>	<u>1.981</u>	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>1.857</u>
<u>18</u> (+++) (A)	18	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>2.319</u>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>2.206</u>

<u>D2</u> (++) (A)	19	<i>Pseudomonas jessenii</i>	<u>2.26</u>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>1.985</u>
<u>C11</u> (++) (A)	2	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>2.065</u>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<u>1.98</u>
<u>C7</u> (+) (B)	20	<i>Pseudomonas putida</i>	<u>1.779</u>	<i>Pseudomonas putida</i>	<u>1.769</u>
<u>D1</u> (+++) (B)	21	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>2.351</u>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>2.284</u>
<u>C6</u> (+) (B)	22	<i>Pseudomonas putida</i>	<u>1.72</u>	not reliable identification	<u>1.631</u>
<u>C5</u> (+) (B)	23	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<u>1.963</u>	<i>Achromobacter denitrificans</i>	<u>1.753</u>
<u>C4</u> (+) (B)	24	<i>Pseudomonas putida</i>	<u>1.783</u>	<i>Pseudomonas putida</i>	<u>1.755</u>
<u>25</u> (++) (B)	25	<i>Pseudomonas jessenii</i>	<u>2.161</u>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>2.095</u>
<u>26</u> (-) (C)	26	no peaks found	<u><0</u>	no peaks found	<u><0</u>
<u>D11</u> (-) (C)	26	no peaks found	<u><0</u>	no peaks found	<u><0</u>
<u>C10</u> (-) (C)	3	no peaks found	<u><0</u>	no peaks found	<u><0</u>
<u>E1</u> (-) (C)	3	no peaks found	<u><0</u>	no peaks found	<u><0</u>
<u>46</u> (++) (A)	46	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>2.159</u>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>2.146</u>
<u>47</u> (++) (C)	47	<i>Bacillus pumilus</i>	<u>2.133</u>	<i>Bacillus pumilus</i>	<u>2.083</u>
<u>54</u> (-) (C)	54	no peaks found	<u><0</u>	no peaks found	<u><0</u>
<u>D10</u> (++) (A)	54	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<u>2.134</u>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<u>2.078</u>
<u>55</u> (++) (A)	55	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>2.16</u>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>2.133</u>
<u>D6</u> (+) (B)	6	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	<u>1.897</u>	<i>Pseudomonas jessenii</i>	<u>1.892</u>
<u>D7</u> (+) (B)	7	<i>Pseudomonas migulae</i>	<u>1.858</u>	<i>Pseudomonas libanensis</i>	<u>1.809</u>
<u>D5</u> (++) (A)	8	<i>Pseudomonas jessenii</i>	<u>2.153</u>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<u>1.959</u>
<u>D4</u> (+) (B)	9	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	<u>1.893</u>	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<u>1.881</u>

9 VIRI IN LITERATURA

Antoun H, Kloepper JW, 2001. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In Encyclopedia of Genetics. Academic Press, New York. Edited by Brenner S, Miller JH, 1477–1480.

Banasco P, Fuente LDeLa, Gaultieri G, Noya F, Arias, A, 1998. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 10 (Suppl 10-11): 1317–323.

Barriuso J, Solano BR, Lucas JA, Lobo AP, Villaraco AG, Mañero FJG, 2008. Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Edited by Ahmad I, Pichtel J, Hayat S, 1-17.

Brock, T. D. in Madigan, M. T., 1991. *Biology of Microorganisms*. New Jersey: Prentice Hall.

Burr TJ, Schroth MN, Suslow T, 1978. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Journal of Phytopathology*, 68: 1377–1383.

García JL, Probanza A, Ramos B, Mañero FJG, 2001. Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Nutrition and Soil Sciences*, 164: 1–7.

Guaiquil, V. H. in Ciampi, L., 1992. Plant growth promoting rhizobacteria and their effect on rapeseed (*Brassica napus* L.) and potato (*Solanum tuberosum* L.) seedlings. *Rev. Microbiol.*, Sao Paulo, 23(4): 264-273.

Haas, D. in Défago, G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonas. *Nat Rev Microbiol*, 3(4): 307-19.

Johri BN, 2001. Technology development and demonstration of a new bacterial inoculant (GRP3) for improved legume production. Uttar Pradesh Government, Project report.

Joseph B, Patra RR, Lawrence R, 2007. Characterization of plant growth promoting Rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L). *International Journal of Plant Production*, 1 (Suppl 2): 141-152.

Khakipour N, Khavazi K, Mojallali H, Pazira E, Asadirahmani H, 2008. Production of Auxin hormone by Fluorescent *Pseudomonads*. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 4 (Suppl 6): 687-692.

Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN, 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growthpromoting rhizobacteria. *Nature*, 286: 885–886.

Kloepper JW, Schroth MN, 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In *Station de pathologie vegetale et phyto-bacteriologie* (ed.), Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, vol. II. Gilbert-Clarey, Tours, France, 879-882.

Kloepper JW, Schroth MN, Miller TD, 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting Rhizobacteria on potato plant development and yield. *Journal of Phytopathology*, 70 (Suppl 11): 1078–1082.

Kraus J, Loper J, 1995. Characterization of genomic region required for production of antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (Suppl 3): 849–854.

Kubik, Š. *Diplomska naloga: Izolacija in karakterizacija bakterij iz rizoplana paradižnika*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani. 2002.

Marquez-Santacruz, H. A. et al., 2010. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*, 9(4): 2372-2380.

McCully M, 2005. The rhizosphere: the key functional unit in plant/soil/microbial interactions in the field. Implications for the understanding of allelopathic effects. In *Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy: 21-26 August 2005; Charles Sturt University, Wagga Wagga, NSW, Australia*. International Allelopathy Society. Edited by Harper J, An M, Wu H, Kent J.

- Mehnaz S, Weselowski B, Aftab F, Zahid S, Lazarovits G, Iqbal J, 2009. Isolation, characterization, and effect of fluorescent pseudomonads on micropropagated sugarcane. *Canadian Journal of Microbiology*, 55 (Suppl 8): 1007–1011.
- Mishra, S. in Arora, N. K., 2012. Evaluation of rhizospheric *Pseudomonas* and *Bacillus* as biocontrol tool for *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 693-702.
- Nishiyama, M., 1999. Comparison of bacterial community structures in the rhizoplane of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt. *Applied and environmental microbiology*, 65(9): 3996-4001.
- Ramachandran K, Srinivasan V, Hamza S, Anandaraj M, 2007. Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L) cuttings. *Developments in Plant and Soil Sciences*, 102: 324-331.
- Rodriguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y, 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and soil*, 287 (Suppl 1-2): 15-21.
- Rokhzadi A, Asgharzadeh A, Darvish F, Nour-Mohammadi G, Majidi E, 2008. Influence of plant growth promoting Rhizobacteria on dry matter accumulation of Chickpea (*Cicer arietinum* L) under field conditions. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 3 (Suppl 2): 253-257.
- Schippers B, Bakker A, Bakker P, van Peer R, 1990. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. *Plant and Soil*, 129 (Suppl 1): 75-83.
- Seong KY, Shin PG, 1996. Effect of siderophore on biological control of plant pathogens and promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* ps88. *Agricultural Chemistry & Biotechnology*, 39: 20–24.
- Whipps JM, 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52 (Suppl 1):487-511.

Yasmin F, Othman R, Saad MS, Sijam K, 2007. Screening for beneficial properties of Rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *Journal of Biotechnology*, 6 (Suppl 1): 49-52