

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Sanja SEKOVANIĆ

**BAKTERIJSKI PRODUCENTI VODIKOVEGA CIANIDA V
RIZOSFERI ALPSKIH PIONIRSKIH RASTLIN**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**BACTERIAL PRODUCERS OF HYDROGEN CYANIDE IN THE
RHIZOSPHERE OF ALPINE PIONEER PLANTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Inštitutu za mikrobiološke znanosti in tehnologijo (prvotno Inštitutu za fizikalno biologijo) v Domžalah.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje je bila 18. 5. 2012 za mentorico predlagana doc. dr. Jasna Dolenc Koce, za somentorja dr. Tomaž Rijavec in za recenzentko diplomskega dela prof. dr. Marjana Regvar.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednica: doc. dr. Polona ZALAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Članica: prof. dr. Marjana REGVAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Članica: doc. dr. Jasna DOLENC KOCE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Član: dr. Tomaž RIJAVEC
Inštitut za mikrobiološke znanosti in tehnologijo

Datum zagovora: 23. 9. 2015

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Sanja Sekovanić

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 581:546(043.2)=163.6
KG bakterijski producenti vodikovega cianida/vodikov cianid/siderofori/mobilizacija fosfata/rizosfera/površina korenin/alpska velesa (*Dryas octopetala*)/ščitasta kislica (*Rumex scutatus*)/filogenetska analiza/biokontrola
AV SEKOVANIĆ, Sanja
SA DOLENC KOCE, Jasna (mentor)/RIJAVEC, Tomaž (somentor)/REGVAR, Marjana (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2015
IN BAKTERIJSKI PRODUCENTI VODIKOVEGA CIANDA V RIZOSFERI ALPSKIH PIONIRSKIH RASTLIN
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 67 str., 5 pregl., 31 sl., 8 pril., 90 vir.
IJ SI
JI sl/en
AI Pri izoliranih bakterijskih sevih s površine korenin in rizosfere alpskih pionirskih vrst ščitaste kislice (*Rumex scutatus* L.) in alpske velese (*Dryas octopetala* L.) ter s površine gole kamninske podlage smo preverili sintezo vodikovega cianida, fluorescentnih barvil in mobilizacijo fosfatov. Deleži izoliranih sevov so bili po lastnostih različni. Največ opisanih lastnosti so imeli sevi, izolirani iz rizosfere ščitaste kislice. Korelacije med sintezo vodikovega cianida, fluorescentnih barvil in mobilizacijo fosfatov nismo zaznali. Na podlagi analize profilov BOX smo izdelali filogenetsko drevo izoliranih sevov in preverili, ali izvor sevov vpliva na sorodnost ter kako sorodnost vpliva na lastnosti. Gensko so se najbolj razlikovali sevi, izolirani iz ščitaste kislice, in sevi, izolirani iz alpske velese. Obema skupinama so bili podobni sevi, izolirani s površine kamninske podlage. Sevi so si bili ne glede na lastnosti sorodni med seboj. Za ugotavljanje potenciala sevov za zaviranje rasti kmetijsko pomembnih rastlinskih patogenih bakterij in gliv smo izbrali 5 producentov in 5 neproducentov vodikovega cianida. Ugotovili smo, da ne zavirajo rasti bakterij, zavirajo pa rast gliv. Med poskusom smo preverjali tudi proizvodnjo vodikovega cianida z indikatorskimi lističi. Ne glede na to, ali so izbrani sevi proizvajali vodikov cianid, so vsi bolj zavirali rast gliv na gojišču z glicinom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 581:546(043.2)=163.6
- CX bacterial producers of hydrogen cyanide/ hydrogen cyanide/siderophores/phosphate mobilization/rhizosphere/rhizoplane/mountain avens (*Dryas octopetala*)/french sorrel (*Rumex scutatus*)/phylogenetic analysis /biocontrol
- AU SEKOVANIĆ, Sanja
- AA DOLENC KOCE, Jasna (supervisor)/RIJAVEC, Tomaž (co-supervisor)/REGVAR, Marjana (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2015
- TI BACTERIAL PRODUCERS OF HYDROGEN CYANIDE IN THE RHIZOSPHERE OF ALPINE PIONEER PLANTS
- DT Graduation thesis (university studies)
- NO X, 67 p., 5 tab., 31 fig., 8 ann., 90 ref.
- LA Sl
- AL sl/en
- AB Isolated bacterial strains from rhizoplane and rhizosphere of two model scree pioneer plants, *Rumex scutatus* L. and *Dryas octopetala* L., and strains from bedrock surface were tested for production of hydrogen cyanide, production of fluorescent pigments and ability to mobilize phosphate. Proportion of isolates were various for different traits. Strains with most traits were isolated from rhizosphere of *Rumex scutatus*. The correlation among production of hydrogen cyanide, production of fluorescent pigment and ability to mobilize phosphate was not detected. Phylogenetic tree was made to test how does location from where strains were isolated impact on genetic similarity and how does genetic similarity affect on traits. Isolates from *Rumex scutatus* and *Dryas octopetala* were the least similar. Strains from bedrock surface were similar to them both. Isolates with common traits were not genetically similar. 5 strongest producers and 5 non-producers of HCN were tested for growth inhibition of phytopathogenic bacteria and fungi. They did not inhibit growth of bacteria, but they did inhibit growth of fungi. During the test strains were tested for production of cyanide with indicator strips. All isolates, including non-producers inhibited fungi growth, especially on glycine medium.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 Namen dela	1
1.2 Delovne hipoteze	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PRODUCENTI VODIKOVEGA CIANIDA	3
2.1.1 Bakterijski producenti vodikovega cianida	3
2.1.1.1 Bakterije rodu <i>Pseudomonas</i>	4
2.1.2 Bakterijska sinteza HCN	5
2.2 BAKTERIJSKI PRODUCENTI VODIKOVEGA CIANIDA IN RASTLINE	5
2.2.1 Razmere v tleh in rizosferi	6
2.2.1.1 Tla	6
2.2.1.2 Rizosfera in rizoplan	7
2.2.1.3 Razmere v tleh melišč in v rizosferi tamkajšnjih pionirskih rastlin	8
2.2.2 Vpliv bakterijskih producentov vodikovega cianida na rastline	8
2.2.2.1 Vpliv HCN na rastline	9
2.2.2.2 Druge potencialne lastnosti cianogenih bakterij, ki vplivajo na rastline	9
2.2.2.2.1 Bakterijsko izločanje sideroforov	10
2.2.2.2.2 Bakterijska mobilizacija fosfatov	10
2.3 POTENCIALNA UPORABA CIANOGENIH BAKTERIJ	11
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 MATERIALI	13
3.1.1 Mikroorganizmi	13
3.1.2 Gojišča in pufri	14
3.1.3 Pribor	15
3.2 METODE	16
3.2.1 Preverjanje čistosti zbirke bakterijskih izolatov	16
3.2.1.1 Shranjevanje bakterijskih kultur pri temperaturi –80 °C	16
3.2.2 Pregled lastnosti bakterijskih sevov	17
3.2.2.1 Sinteza fluorescentnih barvil	17
3.2.2.2 Mobilizacija fosfata	18
3.2.3 Sinteza vodikovega cianida	18
3.2.3.1 Test sinteze HCN s kolorimetrično reakcijo	18
3.2.3.2 HCN-test s hemoglobinom	19
3.2.4 Potencial sevov za zaviranje rasti	20
3.2.4.1 Poskus s patogenimi bakterijami	21
3.2.4.2 Poskus s patogenimi glivami	21
3.2.5 Filogenetske raziskave	23

3.2.5.1	Izolacija DNA	23
3.2.5.2	Merjenje količine DNA	23
3.2.5.3	BOX-PCR	24
3.2.6	Statistična obdelava podatkov	25
4	REZULTATI	26
4.1	SINTEZA FLUORESCENTNIH BARVIL	26
4.2	MOBILIZACIJA FOSFATA	28
4.3	SINTEZA VODIKOVEGA CIANIDA	31
4.3.1	Test sinteze HCN s kolorimetrično reakcijo	31
4.3.2	Test HCN s hemoglobinom	32
4.4	POTENCIAL SEVOV ZA ZAVIRANJE RASTI	36
4.4.1	Poskus s patogenimi bakterijami	36
4.4.2	Poskus s patogenimi glivami	37
4.5	FILOGENETSKA ANALIZA	41
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	48
5.1	RAZPRAVA	48
5.1.1	Preverjanje lastnosti izolatov	48
5.1.2	Filogenetska analiza	52
5.1.3	Potencial sevov za zaviranje rasti	53
5.2	SKLEPI	55
6	POVZETEK	56
	VIRI	59
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Razlaga oznak izoliranih sevov.....	13
Preglednica 2: Seznam izoliranih bakterijskih sevov.....	17
Preglednica 3: Sestavine za reakcijsko mešanico za PCR.	24
Preglednica 4: Seznam bakterijskih sevov izbranih za ugotavljanje potenciala za zaviranje rasti.....	36
Preglednica 5: Vrednosti α pri primerjavi zaviranja rasti gliv.	40

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Potek nastanka HCN iz glicina pri bakterijah.....	5
Slika 2: Primer rezultatov testa z barvnim indikatorjem.....	19
Slika 3: Skica gojišča.....	21
Slika 4: Shematski prikaz poskusa s patogenimi glivami.....	22
Slika 5: Primera nastavitve poskusa s patogenimi glivami.....	22
Slika 6: Primera nastavitve poskusa s patogenimi glivami z indikatorskim lističem.....	23
Slika 7: Število bakterijskih sevov glede na oceno jakosti sinteze fluorescentnih barvil.....	26
Slika 8: Število bakterijskih sevov z oceno jakosti sinteze fluorescentnih barvil glede na njihov izvor.....	27
Slika 9: Delež bakterijskih sevov z oceno jakosti sinteze fluorescentnih barvil glede na njihov izvor.....	28
Slika 10: Število bakterijskih sevov glede na oceno jakosti mobilizacije fosfata.....	29
Slika 11: Število sevov z oceno jakosti mobilizacije fosfata glede na njihov izvor.....	30
Slika 12: Delež sevov z oceno jakosti mobilizacije fosfata glede na njihov izvor.....	31
Slika 13: Število sevov s sintezo HCN pri testu z barvnim indikatorjem.....	32
Slika 14: Koncentracija sintetiziranega HCN na bakterijsko kulturo.....	33
Slika 15: Delež pozitivnih in negativnih sevov za HCN glede na izvor sevov.....	34
Slika 16: Delež pozitivnih in negativnih sevov za HCN glede na vrsto rastline in izvor iz rizosfere ali s površin korenin ter površino kamninske podlage.....	34
Slika 17: Koncentracija bakterijskega HCN glede na njihov izvor.....	35
Slika 18: Koncentracija bakterijskega HCN glede na vrsto rastline in izvor iz rizosfere ali s površine korenin ter površino kamninske podlage.....	35
Slika 19: Del rezultatov poskusa s patogenimi bakterijami.....	36
Slika 20: Rast glive <i>Fusarium graminearum</i> na gojišču LB.....	37
Slika 21: Rast glive <i>Fusarium graminearum</i> na gojišču LB z glicinom.....	38
Slika 22: Rast glive <i>Fusarium moniliforme</i> na gojišču LB.....	38
Slika 23: Rast glive <i>Fusarium moniliforme</i> na gojišču LB z glicinom.....	39
Slika 24: Primerjava rasti glive <i>Fusarium graminearum</i> na gojišču LB z glicinom.....	40
Slika 25: Legenda filogenetskega drevesa bakterijskih sevov.....	41
Slika 26: Filogenetsko drevo skupine A.....	42
Slika 27: Filogenetsko drevo skupine B.....	42
Slika 28: Filogenetsko drevo skupine C.....	43
Slika 29: Filogenetsko drevo skupine D.....	44
Slika 30: Filogenetsko drevo skupine E.....	45
Slika 31: Filogenetsko drevo skupine F.....	46

KAZALO PRILOG

	str.
Priloga A	69
Priloga B	70
Priloga C	73
Priloga D	74
Priloga E1	75
Priloga E2	76
Priloga F	77
Priloga G	78

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

HCN	vodikov cianid
PO ₄	Fosfat
KCN	kalijev cianid
PGPR	rizosferne bakterije, ki pospešujejo rast rastlin
DK	sevi s površine korenin alpske velese
DR	sevi iz rizosfere alpske velese
RK	sevi s površine korenin ščitaste kislice
RR	sevi iz rizosfere ščitaste kislice
P	sevi s površine gole kamninske podlage
OD600	test za merjenje gostote pri valovni dolžini 600 nm
NB	gojišče Nutrient broth
NA	gojišče Nutrient agar
LB	gojišče Luria-Bertani broth
KB	gojišče King's B
PDA	gojišče Potato Dextrose Agar
PBS	puferska raztopina Phosphate Buffer Saline
TBE	puferska raztopina 5x Tris Borat EDTA
rpm	obratov na minuto
DNA	deoksiribonukleinska kislina
BOX-PCR	verižna reakcija s polimerazo s palindromskimi box elementi v genomu

1 UVOD

Živa bitja v različnih okoljih tekmujejo med seboj za življenjski prostor in hranila, se izogibajo plenilcem in se spopadajo z nedostopnostjo hranil. Za to uporabljajo različne mehanizme in izločajo različne snovi. Ena takšnih je vodikov cianid.

Vodikov cianid je sekundarni metabolit cianogenih bakterij, ki ga tvorijo v procesu cianogeneze in izločajo v okolje (Castric, 1975). Njegova natančna vloga ni znana, vendar raziskave potrjujejo, da cianogenim bakterijam koristi, čeprav je strupen. Njegova kislost pospešuje raztapljanje kamnin in s tem sproščanje posameznih kemijskih elementov iz mineralov, s čimer postanejo hranila dostopnejša (Frey in sod., 2010). Njegova strupenost pa tudi povzroča, da se jim plenilci izogibajo. Cianogene bakterije prevladujejo tudi pri tekmovanju z drugimi vrstami bakterij zaradi antagonizma, ki ga omogoča HCN (Dalal in Kulkarni, 2013).

Cianogene bakterije najdemo v vseh okoljih. Najbolj so raziskane tiste, ki uspevajo v rizosferi in jih večinoma uvrščamo v rodova *Pseudomonas* in *Bacillus* (Ahmad in sod., 2008; Kremer in Souissi, 2001). Raziskave kažejo, da je veliko rastlinskih vrst uspešnejših, če imajo v rizosferi in na koreninah (rizoplan) cianogene bakterije. HCN povečuje dostopnost hranil tudi za gostiteljsko rastlino in preprečuje kolonizacijo patogenih mikroorganizmov na koreninah. Niso pa vse rastlinske vrste enako tolerantne do HCN (Zeller in sod., 2007). Pri tistih, ki so manj tolerantne, je HCN strupen, ker zavira metabolizem korenin.

Zaradi pozitivnih učinkov, ki ga imajo na rastline, bi lahko cianogene bakterije uporabili v kmetijstvu. Nekatere cianogene bakterije poleg HCN izločajo tudi druge snovi za izboljšanje življenjskega okolja. Take bakterije še bolj pospešujejo rast rastlin in pridelka in na račun uspešnejšega antagonizma zavirajo rast drugih mikrobov. To potrjuje vse več raziskav, namenjenih nadomeščanju pesticidov z biološkimi sredstvi za zatiranje škodljivcev (Defago in sod., 1990; Rudrappa in sod., 2008; Heydari in sod., 2008; Devi in sod., 2007).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je preučiti lastnosti bakterijskih producentov HCN, izoliranih s površine korenin, imenovane rizoplan, iz rizosfere ščitaste kislice (*Rumex scutatus* L.) in alpske velese (*Dryas octopetala* L.) ter s kamninske podlage melišča na južni strani Krnskega jezera. S tem znanjem bomo dopolnili razumevanje delovanja HCN in ugotovili, zakaj je število prostoživečih producentov HCN v primerjavi z rizosfernimi bistveno

manjše ter kakšne so razlike med obema skupinama bakterij. Zato smo si zadali naslednje cilje:

- ugotoviti, koliko izoliranih bakterijskih sevov proizvaja HCN;
- preveriti druge lastnosti sevov, kot sta sinteza sideroforov in mobilizacija fosfata, ter ugotoviti, ali so te lastnosti povezane s proizvodnjo HCN;
- preveriti potencial izoliranih sevov za zaviranje rasti patogenih mikroorganizmov;
- raziskati genetsko raznolikost sevov ter povezave med njihovo filogenijo in sintezo HCN.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Rizosferni sevi, sevi z rizoplana in prostoživeči izolirani sevi proizvajajo HCN.
- Ker je v rizosferi in na rizoplanu več mikroorganizmov, ki tekmujejo za življenjski prostor in hranila, predpostavljamo, da proizvajajo rizosferni producenti in producenti z rizoplana več HCN kot prostoživeči.
- Producenti HCN izločajo siderofore. Zaradi razmer v rizosferi in na rizoplanu jih morajo tamkajšnji sevi izločati več kot prostoživeči.
- Producenti HCN raztapljajo fosfat. Sevi rizosfere in rizoplana ga morajo raztopiti več kot prostoživeči zaradi tekmovanja med organizmi za hranila.
- HCN upočasnuje rast mikroorganizmov, ker je strupen. Pričakujemo, da producenti, ki proizvajajo višje koncentracije HCN, zavirajo rast patogenih mikroorganizmov.
- Genetsko najbolj podobni so si sevi, izolirani z rizoplana in iz rizosfere iste rastlinske vrste. Če primerjamo seve, izolirane iz različnih rastlinskih vrst, so si bolj različni. Najmanj podobni pa so jim prostoživeči sevi zaradi drugačnih razmer v okolju, v katerem uspevajo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PRODUCENTI VODIKOVEGA CIANIDA

Vodikov cianid (HCN) je zelo hlapna brezbarvna tekočina, ki hitro prehaja v plinasto stanje ($pK_a \approx 9,8$). Sodi med šibke anorganske kisline in nastaja v procesu cianogeneze (Castric, 1975). Mikrobi, ki so zmožni cianogeneze, so vodni in kopenski, spadajo pa med bakterije, glive in alge (Castric in Castric, 1983; Bunch in Knowles, 1980; Vennesland in sod., 1981). Tudi nekatere višje rastline tvorijo cianidne spojine, in sicer cianogene glikozide (Brinker in sod., 1989). HCN je strupen, saj deluje kot metabolni inhibitor, ki zavira celično dihanje. Cianidni ion se veže na Fe^{3+} v citokromu in s tem prekine transport elektronov po dihalni verigi (Van Buuren in sod., 1972). Čeprav je strupen, ga veliko organizmov sintetizira, izloča in pretvarja. Uporabljajo ga kot sredstvo za izogibanje plenilstvu in za tekmovanje z drugimi organizmi za hranila in prostor (Dalal in Kulkarni, 2013).

2.1.1 Bakterijski producenti vodikovega cianida

Bakterije, ki sintetizirajo HCN, so v tleh, vodi, tudi v hrani (Castric in Castric, 1983; Freeman in sod., 1975). V preteklosti je bilo zaznavanje cianogenih bakterij ovirano zaradi zapletenih postopkov. Potencialno cianogene organizme so nanесли na agarne plošče. Nad rastoče celice so pritrdili filtrirni papir, ki so ga predhodno prepojili s kemikalijo, občutljivo za cianid (Castric in Castric, 1983). Ta metoda je bila počasna in neučinkovita za presejalni test večje količine sevov ter nenatančna. Sedaj so v uporabi mikrotitrne ploščice, kar omogoča hitrejše zaznavanje producentov HCN. Danes je na voljo tudi več natančnejših kvantitativnih tehnik merjenja HCN, na primer kolorimetrične detekcije in elektrode HCN (Von Rohr in sod, 2009).

Ob izboljšanju tehnik zaznavanja cianogenih bakterij se je povečala tudi količina znanja o njih. Najbolj raziskane so cianogene bakterije iz rizosfere, ki bi jih zaradi pozitivnih učinkov na nekatere rastline lahko uporabili v kmetijstvu namesto kemičnih škropiv. Rastline, ki imajo v rizosferi cianogene bakterije, lažje dostopajo do hranil, ker HCN zaradi kislosti pospešuje raztapljanje kamnine in s tem sproščanje posameznih elementov iz mineralov (Frey in sod., 2010). Zaradi strupenosti HCN se rastlina izogne plenjenju korenin, škodljivi mikrobi pa oslabijo zaradi antagonizma cianogenih bakterij (Devi in sod., 2007; Defago in Haas, 1990). Večina odkritih sevov cianogenih bakterij spada v rodova *Pseudomonas* in *Bacillus* (Ahmad in sod., 2008). Cianogeneza je najbolj raziskana pri fluorescirajočih psevdomonadah, posebno pri vrstah *Pseudomonas fluorescens* in *Pseudomonas aeruginosa* (Castric, 1977; Blumer in Haas, 2000). Število znanih

cianogenih bakterij se z novimi raziskavami povečuje. Razen psevdomonad so cianogene tudi *Chromobacterium violaceum*, nekatere cianobakterije (npr. *Anacystis nidulans*, *Nostoc muscorum*) ter nekateri prostoživeči sevi vrste *Rhizobium leguminosarum* (Rudrappa in Bais, 2008). V večini primerov tvorijo HCN iz aminokislina glicin (Castric, 1977).

2.1.1.1 Bakterije rodu *Pseudomonas*

Psevdomonade so po Gramu negativne, aerobne, kemoorganotrofne proteobakterije (Haynes 1957). So ravne ali rahlo ukrivljene paličice s polarnimi bički (Haynes, 1957). Večina vrst oksidira glukozo v glukonsko kislino, 2-ketoglukonsko kislino ali v druge metabolne produkte. Navadno so neaktivne pri oksidaciji laktoze (Haynes, 1957).

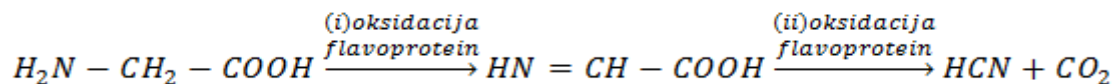
Sposobne so zasesti zelo različne ekološke niše. Veliko vrst najdemo v tleh, sladki vodi, morski vodi ali celo v slanica (Haynes, 1957). Nekatere vrste so škodljive za zdravje rastlin, živali in ljudi. Čeprav so aerobne, lahko veliko psevdomonad raste v anoksičnih razmerah z nitratom, s fumaratom ali z drugimi anoksičnimi sprejemniki elektronov (Kornaros in Lyberatos, 1998). Imajo tudi enostavne hranilne zahteve. Lahko uporabijo zelo različne organske spojine kot vir ogljika in energije, nekatere vrste uporabljajo 100 različnih spojin, druge le 20 (Madigan in sod., 2012). Navadno jim manjkajo hidrolitični encimi, ki so potrebni za pretvorbo polimerov v monomere.

Psevdomonade so ekološko pomembne v tleh in vodi. Ker so zmožne razkrajati veliko različnih snovi, tudi ksenobiotičnih spojin (npr. pesticidi), so pomembni dejavniki za bioremediacijo in imajo potencial za uporabo v ekoremediacijskih postopkih (Zhang in sod., 2005; Sarkar in sod., 2009). Nekatere vrste kvarijo živila in so zato pomembne v živilski industriji (Freeman in sod., 1975). Imajo veliko lastnosti, ki so pomembne pri pospeševanju rasti rastlin. Pri tem je najuspešnejša podskupina fluorescentnih psevdomonad (Haas in Defago, 2005).

Posebnost podskupine fluorescentnih psevdomonad, kot so *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* in *P. stutzeri*, je, da večinoma proizvajajo vodotopno, rumeno zeleno fluorescentno barvilo, imenovano pioverdina (Schalk in Guillon, 2013). To so siderofori, ki jih bakterije sintetizirajo v razmerah, ko primanjkuje železa (Likar, 2000). Nekatere vrste psevdomonad lahko proizvajajo tudi druge tipe sideroforov, kot sta piocianin, ki ga proizvaja *Pseudomonas aeruginosa*, in tiokinolobaktin, ki ga sintetizira *Pseudomonas fluorescens* (Lau in sod., 2004; Matthijs in sod., 2007).

2.1.2 Bakterijska sinteza HCN

Bakterijska sinteza HCN je najbolj raziskana pri psevdomonadah. HCN je sekundarni metabolit, ki nastane iz aminokislina glicin v oksidativni reakciji, ki jo katalizira encim HCN-sintaza, ob tem se sprošča CO₂ (Castric, 1975; Castric, 1994). Encim je zgrajen iz treh podenot, HcnA, HcnB in HcnC, od katerih sta slednji transmembranski (Wissing, 1983). Nukleotidno zaporedje kaže, da je HCN-sintaza aminokislinska oksidaza, in sicer flavoencim (Laville in sod., 1998). Reakcija poteka tako, da glicin oksidira v iminoacetatno kislino [H-C(NH)-COOH], s sočasno drugo dehidrogenazno reakcijo se cepi vez C-C in nastane HCN in CO₂ (Wissing, 1974). V reakciji HCN-sintaza prenese štiri elektrone v dihalno verigo z molekularnim kisikom kot končnim sprejemnikom elektronov. Encim je zelo občutljiv za molekularni kisik in pri višji koncentraciji takoj preneha delovati (Castric, 1983). V anaerobnem okolju, kjer je sprejemnik elektronov dušik, reakcija ne deluje (Castric, 1975). HCN-sintaza deluje optimalno na prehodu iz eksponentne v stacionarno fazo bakterijske rasti, ko je količina kisika majhna (Castric in sod., 1979; Castric, 1983).



Slika 1: Potek nastanka HCN iz glicina pri bakterijah (Wissing, 1974: 1293).

Sintezo HCN razen glicina lahko spodbujajo tudi nekatere druge aminokislina, vendar ima najmočnejši vpliv glicin (Voisard in sod., 1989). Več raziskav je pokazalo, da tudi železo Fe³⁺ in fosfor spodbujata proizvodnjo HCN. Od železa je odvisno izražanje genov za cianogenezo, pomanjkanje železa jo ustavi. Verjetno je, da je železo pomemben del enega od proteinov, ki nadzirajo cianogenezo (Blumer in Haas, 2000). Ob višanju koncentracije železa v gojišču se večja tudi količina HCN, kar dokazuje, da je železo pomemben dejavnik sinteze HCN (Von Rohr in sod., 2009). Fosfat verjetno regulira encimatsko dejavnost s spreminjanjem adenilatnega naboja celic (Castric, 1981).

2.2 BAKTERIJSKI PRODUCENTI VODIKOVEGA CIANIDA IN RASTLINE

Rastline služijo bakterijam kot habitat. Nekatere bakterije so patogene, druge so nevtralne, tretje pa spodbujajo njihovo rast. Cianogene bakterije praviloma spadajo zaradi svojih lastnosti med bakterije, ki spodbujajo rast rastlin, lahko jim pa tudi škodijo s preveč HCN (Saharan in Nehra, 2011). Veliko vrst cianogenih bakterij uspeva v rizosferi in na rizoplanu rastlin.

2.2.1 Razmere v tleh in rizosferi

Cianogene bakterije uspevajo tako v tleh kot v rizosferi in na rizoplanu rastlin. Bakterije rizosfere in rizoplana vplivajo na rastline in obratno. Za razumevanje teh odnosov moramo poznati razmere v rizosferi ter na rizoplanu, in ker sta habitata del tal, moramo poznati tudi tamkajšnje razmere.

2.2.1.1 Tla

Tla so dom različnih organizmov. So izjemno heterogen habitat za mikroorganizme, kjer raste številna in fiziološko raznolika mikroba populacija (Gans in sod, 2005). V gramu prsti lahko najdemo 10^{10} – 10^{11} bakterij in več kot 200 m glivnih hif (Horner-Devine in sod., 2003; Leake in sod., 2004).

So heterogen material, ki sestoji iz trdne, tekoče in plinaste faze. Vse faze so v stiku z mineralnimi elementi. Anorganski delci trdne faze so zbirnik kalcija, kalija, magnezija in železa. V stiku s trdno fazo so tudi organske spojine, ki vsebujejo med drugim tudi dušik, fosfor, in žveplo. Tekočo fazo tvori talna raztopina, ki vsebuje raztopljene mineralne ione in je medij za premikanje ionov na površino korenin in do mikroorganizmov. Talna raztopina vsebuje tudi raztopljene pline, kot so kisik, ogljikov dioksid in dušik (Brady, 2002). Zaradi heterogenosti so tla raznolik ekosistem, v katerem mikroorganizmi in rastline tekmujejo za hranila (Harrison in sod., 2008). Lahko pa tudi živijo v simbiozi.

Na dostopnost hranil ter s tem na rast mikroorganizmov in korenin vpliva koncentracija vodikovih ionov (vrednost pH) in tako določa kakovost tal. Kislost spodbuja preperevanje kamnin, kar sprošča elemente, kot so kalcij, kalij, magnezij in mangan, ter večja topnost karbonatov, sulfatov in fosfatov. Povečanje topnosti hranil olajša njihovo dostopnost organizmom. Rast korenin je na splošno boljša v rahlo kislih tleh, z vrednostmi pH med 5,5 in 6,5. Večja dejavnika, ki nižata pH tal, sta razkrajanje organskih snovi in količina padavin. Navadno v kislih tleh prevladujejo glive, v bazičnih pa bakterije (Lucas in Davis, 1961).

Ključno vlogo pri rodovitnosti tal imajo mikroorganizmi. Uravnavajo dostopnost vseh 20 biogenih elementov in s tem uravnavajo tudi populacije organizmov (Van Der Heijden in sod., 2008). Na hranila vplivajo z začasno imobilizacijo, s tekmovanjem in s simbiotskimi povezavami. Z razkrajanjem organskega materiala, s topljenjem kamnin z izločki ter z mobilizacijo hranil z različnimi mehanizmi omogočajo kroženje hranil (Frey in sod, 2010; Barker-Jorgensen, 1982). Tvorijo humus in mešajo organske ostanke z anorganskim delom tal. Zaradi teh lastnosti so ključni pri tvorjenju tal in ohranjanju njihove strukture.

2.2.1.2 Rizosfera in rizoplan

Rizosfera z rizoplanom je mikrookolje v tleh, kjer korenine s svojimi izločki vplivajo na okolico fizično, kemično in biološko (Bais in sod., 2006). Ti izločki so aktivno izločeni proteini, aminokisljine, sladkorji, sluz, plini, lahko tudi celice. Zaradi velike količine hranilnih snovi je v rizosferi in na rizoplanu največja gostota mikroorganizmov, kot so bakterije, glive, alge in praživali (Baudoin in sod., 2003). Bakterij je največ, zato imajo verjetno največji vpliv na rastline, zlasti ker kolonizirajo korenine ter tekmujejo za izločke in hranila z drugimi mikroorganizmi in z rastlino (Bais in sod., 2004; Hodge in sod., 2000). Z razvojem rastline se spreminjajo njeni izločki in s tem populacija rizosfernih in rizoplanih mikroorganizmov (Gransee in Wittenmayer, 2000). Izločki določajo tudi številnost mikroorganizmov. Na rizoplanu je več izločkov, zato je tam gostota mikroorganizmov največja. Z oddaljenostjo od korenine se količina mikroorganizmov postopoma manjša (Azad in sod., 1985). Rastline s svojimi izločki imajo največji vpliv na mikroorganizme na rizoplanu. V rizosferi in na rizoplanu živijo tako rastlinski simbioti kot tudi patogeni (Bais in sod., 2004).

V rizosferi in na rizoplanu so mikroorganizmi večinoma v antagonističnih odnosih, zato jih veliko proizvaja spojine, ki jim pomagajo v boju za prevlado, kot so na primer HCN, antibiotiki, siderofori, ki služijo za prevzem železa, in druge (Ahmad in sod., 2008). Takšni izločki nekaterih mikroorganizmov so lahko koristni tudi za rastline. Zanje so najkoristnejše bakterije, ki spodbujajo rast rastlin – »plant growth promoting rhizobacteria« ali na kratko PGPR (Saharan in Nehra, 2011). Te so iz različnih rodov, kot so *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* in druge (Glick, 1995; Joseph in sod., 2007). Med PGPR spadajo simbiotske in nesimbiotske bakterije, ki fiksirajo dušik, cianogene bakterije, bakterijski producenti spojin, ki so podobne rastlinskim rastnim hormonom, bakterije, ki izločajo siderofore, bakterije, ki mobilizirajo fosfat, in bakterije, ki proizvajajo antibiotike (Saharan in Nehra, 2011). S svojimi lastnostmi spodbujajo rast rastline in ji povečajo učinkovitost. Nekatere bakterije PGPR vplivajo na fiziologijo rastline, tako da proizvajajo hormone, podobne rastlinskim, druge povečajo dostopnost hranil. En sev ima lahko več različnih lastnosti (Steenhoudt in Vanderleyden, 2000). S prevlado v rizosferi zmanjšajo število in vpliv škodljivih mikrobov (Defago in Haas, 1990).

Rizosferni mikrobi in mikrobi z rizoplana lahko tudi škodijo rastlini, saj se zaradi njih zmanjša količina razpoložljivih hranil za rastlino (Hodge in sod., 2000). Rizosferne bakterije lahko rastlinam škodijo tudi s svojimi izločki (Rudrappa in sod., 2008). V večini primerov ni tako, ker ima vsaka vrsta ali variacija rastline v svoji rizosferi in na rizoplanu določene seve ali vrste bakterij in tolerira njihove izločke (Zeller in sod., 2007).

2.2.1.3 Razmere v tleh melišč in v rizosferi tamkajšnjih pionirskih rastlin

Melišče je naravno nasipavališče ob vznožju skalovja. Na melišču so tla nemirna, saj so sestavljena iz velikih in manjših kosov skalovja. Nastanejo s krušenjem in z drobljenjem skal med kotaljenjem po pobočju. Na dnu melišča prevladujejo večje skale, proti vrhu so delci vse manjši, na vrhu pa je sipki pesek. Pod slojem kamenja in skal je plast drobnejšega peska, pod peskom pa še sloj humusa (Geister, 1999).

Tla alpskih melišč so bazična, karbonatna ali kislja, silikatna. V slovenskih Alpah so najpogostejša karbonatna tla, silikatna so redka (Jogan in sod., 2004). Bakterijski izolati, s katerimi se ukvarjamo v tem diplomskem delu, so z melišča nad Krnskim jezerom, kjer so tla karbonatna. Karbonatna alpska melišča so bolj prepustna za vodo, so bolj suha in zato toplejša. Tla so bazična, zato so hranila slabo topna in varna pred izpiranjem (Hegi in sod., 1980). Ker so tla prepustna za vodo, prenikajoča deževnica hitro prenaša v globlje talne plasti tudi tista hranila, ki se jim je uspelo raztopiti, zato prihaja do pomanjkanja hranil. Melišča so zaradi nemirnih tal manj poseljena, zato ni veliko razkroja organskih snovi, kar dodatno viša vrednost pH (Hegi in sod., 1980).

Zaradi zahtevnih razmer na meliščih najbolje uspevajo pionirske rastline (Wardle, 1972). To so rastline, ki med prvimi naselijo na novo nastala tla in so sposobne preživeti na odprtem, klimatološko stresnem in pogosto s hranili revnem in nestabilnem substratu (Tivy, 1993). V rizosferi in na rizoplanu imajo veliko mikroorganizmov, ki jim med drugim omogočajo dostop do hranil (Maki in sod., 2008).

Zaradi stalnega gibanja tal so korenine rastlin na meliščih zelo obremenjene. Poleg tega bazičnost apnenčastih tal otežuje dostop do hranil in zaradi njihove poroznosti voda hitro spere raztopljena hranila v spodnje sloje (Hegi in sod., 1980). Zato si rastline na meliščih prizadevajo z globokimi koreninami doseči vlažen humusni sloj in se z razvejanim koreninskim pletežem obdržati na nemirnih tleh (t. i. sidranje). Nekatere vrste pa so razvile sposobnost ustvarjanja humusnih otočkov na površju melišč (Geister, 1999). Takšne humusne otočke ustvarja alpska velesa (*Dryas octopetala* L.), ki je kot pionirska rastlina na apnenčastem grušču pomembna gradnica združb čvrstega šaša in modrike z vednozelenim šašem (Hegi in sod., 1980). Nasprotno ima ščitasta kislica (*Rumex scutatus* L.) lesnato korenino, ki prodira globoko v tla, in večinoma poganja po več stebel. Precej pogosto je na meliščih v velikih skupinah (Hegi in sod., 1980).

2.2.2 Vpliv bakterijskih producentov vodikovega cianida na rastline

Vodikov cianid, ki ga izločajo cianogene bakterije v rizosferi in na rizoplanu rastline, ima nanjo velik vpliv. Razen sinteze in izločanja HCN pa so cianogene bakterije zmožne tudi

izločati več vrst drugih snovi ali pa imajo takšne mehanizme, ki jim koristijo pri tekmovanju, izogibanju plenjenju in lažjemu sprejemanju hranil. Tudi ti mehanizmi in izločki vplivajo na gostiteljsko rastlino.

2.2.2.1 Vpliv HCN na rastline

Cianid je strupena snov, ki zavira celično dihanje. Naglo zastrupi mitohondrije tako, da se cianidni ion veže na Fe^{3+} v citokromu in s tem prekine prenos elektronov po dihalni verigi (Van Buuren in sod., 1972). Nekatere rastline imajo mehanizem, ki jih varuje pred zastrupitvijo s cianidom. Če na primer dodamo 1 mM cianid v živalska tkiva, celično dihanje hitro pade na manj kot odstotek začetne stopnje. Večina rastlinskih tkiv v enakem primeru kaže od 10- do 25-odstotno stopnjo dihanja, pri nekaterih tkivih ostane tudi 100-odstotna, kar kaže na odpornost proti cianidu (Vanleberghe in McIntosh, 1997). Encim, ki je odgovoren za tak potek dihanja, je proti cianidu odporna alternativna oksidaza, ki je sestavina rastlinske mitohondrijske verige prenosa elektronov (Vanleberghe in McIntosh, 1997).

Strupene koncentracije cianida zavirajo tudi rast korenin. Nekatere fluorescentne psevdomonade lahko v rizosferi tvorijo velike količine cianida in zavirajo rast korenin rastline *Arabidopsis thaliana* prek zavrite sinteze rastlinskega hormona auksina (Rudrappa in sod., 2008). Posredno lahko takšne psevdomonade škodijo tudi tako, da preprečujejo nastanek biofilma koristnih bakterij, ki spodbujajo rast rastlin, kot je *Bacillus subtilis* (Rudrappa in sod., 2008).

Rizosferne cianogene bakterije in bakterije z rizoplana ne škodijo svojim gostiteljem, ker proizvajajo majhne količine HCN in uravnavajo njegovo sintezo (Rudrappa in sod., 2008). Poleg tega ima vsaka vrsta ali variacija rastline v svoji rizosferi določene seve ali vrste bakterij in tolerira njihove izločke (Zeller in sod., 2007). Rastline, ki imajo v rizosferi cianogene bakterije, lažje dostopajo do hranil, ker HCN zaradi kislosti pospešuje raztapljanje kamnine in s tem sproščanje posameznih elementov iz mineralov (Frey in sod., 2010). Zaradi strupenosti HCN se rastlina izogne predaciji korenin, škodljivi mikrobi pa oslabijo zaradi antagonizma cianogenih bakterij (Devi in sod., 2007; Defago in Haas, 1990).

2.2.2.2 Druge potencialne lastnosti cianogenih bakterij, ki vplivajo na rastline

Rizosferne in prostoživeče cianogene bakterije imajo lahko, razen sposobnosti sinteze in sproščanja HCN, tudi druge lastnosti, ki spodbujajo rast rastlin (Ahmad in sod., 2008). Takšni lastnosti sta izločanje sideroforov za pridobivanje železa in sposobnost mobilizacije fosfatov.

2.2.2.2.1 Bakterijsko izločanje sideroforov

Železo je esencialni element. Dostopnost železa za organizme je odvisna od njegovega redoks stanja. Če ga v tleh ni dovolj v ustrezni obliki, poteka zanj močan boj (Loper in Henkels, 1997). Ker je rast organizmov velikokrat omejena z železom, so številne bakterije, glive in trave razvile siderofore (Loper in Henkels, 1997; Neilands, 1952; Ueno in Ma, 2009).

Siderofori so spojine nizke molekulske mase, ki jih organizmi izločajo, kadar je v tleh premalo dostopnega železa v ustrezni obliki. So kelatorji in imajo močno afiniteto do železa (Schwyn in Neilands, 1987). Mikrob jih izloči v mineralno fazo, kjer tvorijo topne komplekse Fe^{3+} , z aktivnim transportom pa jih ponovno privzamejo (Schalk, 2008). Na sintezo sideroforov vplivajo vrednost pH, količina železa in njegove oblike, prisotnost drugih elementov, saj se nanje vežejo tudi železu podobne kovine, ter količina ogljika, dušika in fosforja (Duffy in Defago, 1999). Večina sideroforov je neribosomalnih peptidov (Mossialos in sod., 2002). Poznamo tri vrste sideroforov, ki se ločijo po ligandih: hidroksamatne, kateholatne in karboksilatne siderofore (Hider in Kong, 2010). Lahko vsebujejo tudi mešane ligande. Pioverdin, ki ga izločajo fluorescirajoče psevdomonade, vsebuje hidroksimat in kateholat (Schalk, 2008).

Simbiotske rizosferne bakterije, ki izločijo siderofore, so zelo koristne za rastline, saj izboljšujejo kakovost tal in preprečujejo rast škodljivih mikroorganizmov. Siderofori so vir železa v tleh. Za kakovost tal je zelo dobro, če je v njej čim več različnih bakterij, ki izločajo različne vrste sideroforov (Jurkevitch in sod., 1992). Simbiotske bakterije tudi vežejo feri železo iz rizosfere, zato ga fitopatogeni ne morejo dobiti in se ne morejo razmnožiti tako, da bi škodili rastlini (Kloepper in sod., 1980). Siderofori, ki jih izločajo glive, imajo manjšo afiniteto do železa kot bakterijski (Loper in Henkels, 1999). Nekatere psevdomonade lahko izkoriščajo siderofore drugih mikrobov, ki prebivajo v njihovi okolici (Loper in Henkels, 1999).

2.2.2.2.2 Bakterijska mobilizacija fosfatov

Fosfor je esencialni makronutrient. V tleh ga je veliko, vendar je netopen in zato nedostopen za organizme. Organizmi ga sprejemajo iz okolja v obliki fosfatov, kot so ortofosfati H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} ali PO_4^{3-} . Zaradi slabe topnosti je fosfat velikokrat omejujoči dejavnik rasti (Alden in sod., 2001).

Najpomembnejši mobilizatorji fosfata so mikroorganizmi, ki ga topijo in tako povečajo njegovo dostopnost tudi za rastline (Kucey, 1983). Najboljši bakterijski mobilizatorji fosfatov so iz rodov *Bacillus*, *Rhizobium* in *Pseudomonas* (Ahmad in sod., 2008; Chabot in sod., 1996). Poleg bakterij v manjšem številu mobilizirajo fosfate tudi glive, ki so močnejši

mobilizatorji (Alam in sod., 2002; Kucey, 1983). Večina mikroorganizmov mobilizira fosfat iz kalcijevih fosfatnih kompleksov, redki pa iz aluminijevih in železovih (De Bolle in sod., 2013). Da se fosfat raztopi, mikrobi spremenijo vrednost pH mineralne faze tako, da izločijo organske kisline ali protone (Illmer in Schinner, 1995). Z mobilizacijo fosfata dvigujejo kakovost zemlje in povečajo donos rastlin (Goldstein in sod., 1999). Ob mikrobnih mobilizacijah fosfatov se poveča tudi sprejem fosfatov pri rastlinah (Raj in sod., 1981).

2.3 POTENCIALNA UPORABA CIANOGENIH BAKTERIJ

Že več kot pol stoletja so za povečanje pridelkov po svetu v uporabi pesticidi, kar vodi v nižjo kakovost hrane in okolja (Nasreddine in Parent-Massin, 2002). Že veliko raziskav je pokazalo, da so pesticidi nevarni za zdravje, nekateri so tudi že prepovedani. Raziskave se usmerjajo v proučevanje alternativnih načinov za zatiranje škodljivcev in večanje pridelka. Eden od takšnih načinov je biološko zatiranje škodljivcev in izboljševanje kakovosti tal z mikroorganizmi (Defago in sod., 1990; Jurkevitch in sod., 1992).

Biološko zatiranje je mogoče doseči na različne načine. Metode lahko delimo na posredne in neposredne (Likar, 2000). Posredne metode poskušajo zatirati škodljivce na dva načina. Prvi način je spremeniti tla, da bi v njej spodbudili delovanje mikrobov, ki so naravni antagonisti škodljivih mikrobov. Populacija škodljivih mikrobov bi tako oslabela na račun koristnih. Drugi način je pridelovati škropiva, ki bi spodbujala fiziološke odzive, s katerimi se rastlina brani. Škropiva bi vsebovala seve mikrobov, ki so podobni patogenim sevom, vendar ne škodijo rastlinam. S tako spodbujenim varstvenim mehanizmom bi rastlina otežila rast patogenim mikroorganizmom in ne bi prišlo do okužb. Neposredne metode pa uporabljajo specifične mikrobne antagoniste, ki jih dodajajo v zemljo ali k semenom med sejanjem (Likar, 2000).

Kot specifične mikrobne antagoniste in za izboljševanje kakovosti tal bi lahko uporabili bakterije PGPR, ki fiksirajo dušik, proizvajajo HCN ali spojine, podobne rastlinskemu rastnemu hormonu, izločajo siderofore, mobilizirajo fosfat ali proizvajajo antibiotike (Saharan in Nehra, 2011). S tem pospešujejo rast, zatirajo škodljive mikrobe in omogočajo dostop do hranil za rastlino gostiteljico. Ena vrsta bakterij ali en sev ima lahko več takšnih lastnosti, ki delujejo sinergistično (Ahmad in sod., 2008). Zato bi bili v agronomiji za biokontrolo in za izboljševanje kakovosti tal najboljši sevi, ki imajo največ lastnosti, ki pomagajo rastlinam pri delovanju in rasti (Kumar-Deshwal in Kumar, 2013). Uspešno se je izkazala tudi mešanica več vrst PGRP v boju proti patogenim mikrobom (Raupach in Kloepper, 1998). Pri izbiri bakterijskih vrst in sevov pa je treba paziti in narediti več raziskav, ker različne vrste in variacije rastlin izločkov ne tolerirajo enako (Zeller in sod., 2007).

Med PGRP sodijo tudi cianogene bakterije. Več raziskav je pokazalo, da so rizosferne cianogene bakterije primerne kot specifični mikrobní antagonisti (Defago in sod., 1990; Viosard in sod., 1989). Izkazalo se je, da so nekatere vrste uspešne pri zatiranju fitopatogenih gliv, bakterij, plevela in celo živalskih škodljivcev.

Na rast fitopatogenih bakterij in gliv vplivajo tako, da te zaradi antagonizma ob pomoči HCN oslabijo in se ne morejo toliko namnožiti, da bi lahko škodile rastlini. Na primer vrsta *Pseudomonas fluorescens* zavira rast glive *Thivealiopsis basicola*, ki povzroča gnitje korenin pri tobaku, bombažu in češnji (Defago in sod., 1990). Strupenost HCN preprečuje tako tudi nastajanje biofilma bakterij (Rudrappa in sod., 2008).

Čeprav je HCN strupen, so raziskave pokazale, da imajo različne rastlinske vrste različno toleranco za HCN. Heydari in sod. (2008) so v raziskavi primerjali rast korenin pšenice in treh različnih plevelov po tretiranju z bakterijo *Pseudomonas fluorescens* in pokazali, da je pšenica rastla boljše kot plevel. V tem primeru so cianogene bakterije primerne za zatiranje plevela. Po drugi strani so na solati psevdomonade zavirale rast korenin (Kremer in Souissi, 2001).

Z bakterijskim HCN se rastline lahko izognejo plenilcem. Cianogene bakterije s HCN ubijajo podzemne termite, ki povzročajo ogromno škodo kmetijstvu na indijski podcelini (Devi in sod., 2007).

Cianogene bakterije niso koristne za uporabo v kmetijstvu le zaradi uravnavanja organizmov v rizosferi. Rastline, ki imajo v rizosferi cianogene bakterije, lažje dostopajo do hranil, ker HCN zaradi kislosti pospešuje raztapljanje kamnine in s tem sproščanje posameznih elementov iz mineralov (Frey in sod., 2010). Posebno je to pomembno za fosfate, saj so težko dostopni zaradi svoje netopnosti, sploh v bazičnih apnenčastih tleh (Alden in sod., 2001). Dodatno večina teh bakterij izloča še siderofore, ki pripomorejo k večji topnosti železa (Kumar-Deshwal in Kumar, 2013).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Mikroorganizmi

Biološko sintezo vodikovega cianida smo preverjali pri bakterijskih sevih, izoliranih iz rizosfere in s površine korenin dveh alpskih pionirskih vrst, ščitaste kislice (*Rumex scutatus* L.) in alpske velese (*Dryas octopetala* L.), ter s površine kamninske podlage. Vzorčenje materiala je potekalo na melišču na južni strani Krnskega jezera (lokacija: N46.282598, E13.681625). Rastline in površina kamninske podlage so bile vzorčene naključno po melišču po tri iz vsake kategorije, torej na devetih nepovezanih lokacijah. Zbirka izoliranih bakterijskih sevov je del zbirke Inštituta za mikrobiološke znanosti in tehnologije in je označena takole:

Preglednica 1: Razlaga oznak izoliranih sevov.

1. oznaka	2. oznaka	3. oznaka	4. oznaka
D – <i>Dryas octopetala</i> L.	K – korenina	1 – lokacija 1	zaporedna številka
R – <i>Rumex scutatus</i> L.	R – rizosfera	2 – lokacija 2	
P – površina kamninske podlage		3 – lokacija 3	

Primer: bakterijski sev DR 2-6 je šesti sev, izoliran iz rizosfere alpske velese (*Dryas octopetala*) na lokaciji 2.

Za testiranje potenciala izoliranih bakterijskih sevov za biokontrolo in ugotavljanje povezave med sintezo HCN in zaviranjem rasti drugih mikroorganizmov smo uporabili kmetijsko pomembne patogene vrste gliv in bakterij.

Po en sev izolatov dveh vrst rastlinskih patogenih gliv nam je posredoval dr. Hans Josef Schroers s Kemijskega inštituta v Ljubljani, in sicer:

- *Fusarium moniliforme*,
- *Fusarium graminearum*.

Po en sev štirih izolatov rastlinskih patogenih bakterij nam je posredovala dr. Tanja Dreo z Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani, in sicer:

- *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*,
- *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*,
- *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*,
- *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*.

3.1.2 Gojišča in pufri

Gojišče Nutrient broth (NB) (SIGMA, ZDA):

- gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca,
- za trdno gojišče Nutrient agar (NA) smo dodali 15,0 g agarja (MERCK, Nemčija).

Gojišče Luria-Bertani broth (LB) (SIGMA, ZDA):

- gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca,
- za trdno gojišče smo dodali 15,0 g agarja (MERCK, Nemčija),
- za gojišče z glicinom smo dodali 5,0 g glicina, pH 7,3 (Glycine for electrophoresis, SIGMA ZDA).

Gojišče King's B (KB), trdno, pH 7,2:

- 20,0 g proteose pepton (di Bacto peptone),
- 10,0 ml glicerola,
- 1,5 g K_2HPO_4 ,
- 1,5 g $MgSO_4$,
- 15,0 g agarja,
- 1000 ml destilirane vode.

Gojišče Pikovskaya, trdno (SIGMA, ZDA P1602):

- 0,5 g kvasnega ekstrakta,
- 10,0 g dekstroze,
- 5,0 g kalcijevega fosfata,
- 0,5 g amonijevega sulfata,
- 0,2 g kalijevega klorida,
- 0,1 g magnezijevega sulfata,
- 0,1 μ g manganovega sulfata,
- 0,1 μ g železovega sulfata,
- 15,0 g agarja,
- 1000 ml destilirane vode.

Gojišče Potato Dextrose Agar (PDA) (SIGMA, ZDA 70139):

- gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca.

Puferska raztopina Phosphate Buffer Saline (PBS), pH 7,4:

- 8,0 g NaCl,
- 0,2 g KCl,

- 1,44 Na₂HPO₄,
- 0,24 KH₂PO₄,
- 1000 ml destilirane vode.

Puferska raztopina 5x Tris Borat EDTA (5x TBE):

- 54,0 g baze TRIS,
- 27,5 g borove kisline
- 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,
- 980 ml destilirane vode,
- pred uporabo smo 5x pufer TBE redčili 5x.

Vsa gojišča smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C.

3.1.3 Pribor

Reagenti in kemikalije: 4,4'-metilen-bis-(N,N dimetilanilin) (Alfa Aesar, ZDA), nanašalno barvilo 6X DNA Loading dye (Thermo scientific, ZDA), oligonukleotidni začetnik 10 µM primer BOX A1R, pufer 10x PCR Buffer II (Roche applied science, Nemčija), Agar-agar (MERCK, Nemčija), agaroz (Sigma, ZDA), bakrov(II)etil/acetoacetat (Alfa Aesar, ZDA), destilirana voda, dNTP MIX 10 mM (Life technologies, ZDA), glicerol, hemoglobin iz krvi goveda (Sigma, ZDA), KCN (Alfa Aesar, ZDA), kloroform (Carlo Erba, Francija), komplet za izolacijo DNA SmartHelix® EZextract kit (Inštitut za mikrobiološke znanosti in tehnologije, Slovenija), MgCl₂ (Roche applied science, Nemčija), molekularni označevalec pomnožkov DNA (Thermo scientific, ZDA), NaNO₂, DNA-standardi Qubit (Life technologies, ZDA), SYBR Green I (Sigma, ZDA), Taq DNA-polimeraza (Life technologies, ZDA).

Naprave: avtoklav (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija), centrifugi (Sigma, Nemčija, in Tehtnica, Slovenija), čitalnik mikrotitrskih plošč Synergy H4 (BioTek, ZDA), digestorij (Waldner, Nemčija), elektroforeza (Biorad, ZDA), hladilnik (Gorenje, Slovenija), inkubator (Mettler, Nemčija), laminarij (Iskra PIO, Slovenija), komora za pripravo reakcijskih mešanic (Labgene scientific, Švica), magnetna mešalnica (Hanna instruments, ZDA, in Tehtnica, Slovenija), mešalnik (Labnet, ZDA), mikrovalovna pečica (Gorenje, Slovenija), pH-meter (WTW, Nemčija), pipete in multikanalna pipeta (Eppendorf, Nemčija), tehtnica (Kern & Sohn GmbH, Nemčija), termocikler (Biometra, Nemčija), transiluminator BioDocAnalyze (Biometra, Nemčija), vodna kopel (Tehtnica, Slovenija), rotacijski mešalnik (Assistent, Nemčija), hladilna skrinja za stalne mikrobiološke zbirke (Sanyo, Japonska).

Drugi pribor: centrifugirke po Eppendorfu volumnov 1,5 ml, 0,5 ml in 0,2 ml, črna mikrotitrna plošča (Greiner bio – one, Nemčija), eza, centrifugirke Falcon različnih volumnov, mikrotitrne plošče (Greiner bio – one, Nemčija, in Brand, Nemčija), petrijevke, pinceta, plinski gorilnik, neprepustna folija AMP LIseal™ Transparent Microplate Sealer (Greiner bio – one, Nemčija), steklena palčka, sterilne vatenke, sterilni zobotrepci, stojala za centrifugirke, stojalo za centrifugirke po Eppendorfu, stojalo za centrifugirke Falcon, stojalo za mikrotitrne plošče, žličke.

3.2 METODE

3.2.1 Preverjanje čistosti zbirke bakterijskih izolatov

Bakterijski sevi so bili v ločeni raziskavi izolirani iz oligotrofnega okolja apnenčaste kamninske podlage na prodnatem melišču na jugozahodni strani Krnskega jezera v Julijskih Alpah in shranjeni v trajni zbirki bakterijskih sevov Inštituta za mikrobiološke znanosti in tehnologijo. Pred začetkom biokemijske in genetske karakterizacije sevov smo preverili njihovo čistost z gojenjem čistih kultur. Iz zbirke, kjer so bili sevi shranjeni v gojišču s 15 % glicerola pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo jih nacepili na trdna gojišča LB in naprej do posameznih kolonij na trdna gojišča NA. Tiste bakterijske kulture, ki niso bile čiste, smo prečistili z nadaljnjim precepljanjem do posameznih kolonij na trdnem gojišču NA. Vse izolirane seve smo inkubirali pri sobni temperaturi ($20\text{--}26\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po čiščenju smo imeli 145 bakterijskih kultur. Za raziskave smo pripravili nabor sevov na ploščah, ki so bili vir inokulatov za analize.

3.2.1.1 Shranjevanje bakterijskih kultur pri temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Očiščene kulture smo pripravili za shranjevanje v bakterijski zbirki Inštituta za mikrobiološke znanosti in tehnologije. Pripravili smo 30-odstotni glicerol v destilirani vodi in ga avtoklavirali. V centrifugirke po Eppendorfu s sistemom »safe lock« smo odpipetirali po 250 μl tekočega gojišča LB in nacepili po en sev v vsako epico. Inkubirali smo jih na stresalniku pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ čez noč. Počasi rastoče seve smo inkubirali dlje časa (24 ur ali več). Pred shranjevanjem smo vsaki kulturi dodali 250 μl 30-odstotnega glicerola, tako da je bila končna koncentracija glicerola 15 %. Pomešali smo jih na rotacijskem mešalniku in jih trajno shranili v hladilno skrinjo za trajne mikrobiološke zbirke pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preglednica 2: Seznam izoliranih bakterijskih sevov. DK - površina korenin alpske velese, DR - rizosfera alpske velese, RK - površina korenin ščitaste kislice, RR - rizosfera ščitaste kislice, P - površina gole kamninske podlage, števila 1 do 3 - lokacija, števila 1 do 14 - zaporedna številka seva.

DK 1-1	DK 2-1	DK 3-1	RK 1-1	RK 2-1	RK 3-1	P 2-1
DK 1-2	DK 2-2	DK 3-2	RK 1-2	RK 2-2	RK 3-2	P 2-2
DK 1-3	DK 2-3	DK 3-3	RK 1-3	RK 2-3	RK 3-3	P 2-3
DK 1-4	DK 2-4	DK 3-4	RK 1-4	RK 2-4	RK 3-4	P 2-4
DK 1-5	DK 2-5	DK 3-5	RK 1-5	RK 2-5	RK 3-5	P 2-5
DK 1-6	DK 2-6	DK 3-6	RK 1-6	RK 2-6	RK 3-6	P 2-6
DK 1-7	DK 2-7	DK 3-7	RK 1-7	RK 2-7	RK 3-7	P 2-7
DK 1-8	DK 2-8	DK 3-8	RK 1-8	RK 2-8	RK 3-8	P 2-8
DK 1-9	DK 2-9		RK 1-9	RK 2-9	RK 3-9	P 2-9
DK 1-10	DK 2-10		RK 1-10		RK 3-10	
DK 1-11	DK 2-11		RK 1-11		RK 3-11	
	DK 2-12		RK 1-12		RK 3-12	
	DK 2-13				RK 3-13	
DR 1-1	DR 2-1	DR 3-1	RR 1-1	RR 2-1	P 1-1	P 3-1
DR 1-2	DR 2-2	DR 3-2	RR 1-2	RR 2-2	P 1-2	P 3-2
DR 1-3	DR 2-3	DR 3-3	RR 1-3	RR 2-3	P 1-3	P 3-3
DR 1-4	DR 2-4	DR 3-4	RR 1-4	RR 2-4	P 1-4	P 3-4
DR 1-5	DR 2-5	DR 3-5	RR 1-5	RR 2-5	P 1-5	P 3-5
DR 1-6	DR 2-6	DR 3-7	RR 1-6	RR 2-6	P 1-6	P 3-6
DR 1-7	DR 2-7	DR 3-8	RR 1-7	RR 2-7	P 1-7	P 3-7
DR 1-8	DR 2-8		RR 1-8	RR 2-8	P 1-8	P 3-8
DR 1-9	DR 2-9			RR 2-9		
DR 1-10	DR 2-10			RR 2-10		
DR 1-11	DR 2-11			RR 2-11		
DR 1-12	DR 2-12			RR 2-12		
DR 1-13				RR 2-13		
				RR 2-14		

3.2.2 Pregled lastnosti bakterijskih sevov

3.2.2.1 Sinteza fluorescentnih barvil

Bakterijske kulture smo s sterilnimi zobotrebcami nacepili na trdna gojišča KB. Prvi in drugi dan rasti smo jih pregledali pod UV-svetlobo v transiluminatorju. Posnetke smo obdelali in dokumentirali s programsko opremo BioDocAnalyze. Na podlagi posnetkov gojišč smo ocenili jakost in izmerili premer fluorescentnega signala. Po teh parametrih smo izdelali lestvico za ocenjevanje sinteze fluorescentnih barvil sevov:

- rang 1: sevi s šibkim signalom KB,
- rang 2: sevi s srednje močnim signalom KB ali z močnim signalom do premera 2 mm,

- rang 3: sevi z močnim signalom premera 2 do 4 mm,
- rang 4: sevi z močnim signalom premera 4 mm ali več.

3.2.2.2 Mobilizacija fosfata

Bakterijske kulture smo s sterilnimi zobotrebcami nacepili na trdna gojišča Pikovskaya. Po petih dneh, ko so bile opazne čistine pri vseh kolonijah, smo jih pregledali pri beli svetlobi v transiluminatorju. Posnetke smo obdelali in dokumentirali s programsko opremo BioDocAnalyze. Na podlagi posnetkov gojišč smo ocenili vidnost in izmerili premer čistin. Po teh parametrih smo izdelali lestvico za ocenjevanje mobilizacije fosfata:

- rang 1: sevi s slabo vidnimi čistinami do premera 3 mm, srednje vidnimi do premera 2 mm in z dobro vidnimi čistinami do premera 1 mm,
- rang 2: sevi s slabo vidnimi čistinami premera od 3 do 4 mm, srednje vidnimi premera 2 do 3 mm in z dobro vidnimi čistinami do premera 2 mm,
- rang 3: sevi z dobro vidnimi čistinami premera 2 do 4 mm,
- rang 4: sevi z dobro vidnimi čistinami premera 4 mm ali več.

3.2.3 Sinteza vodikovega cianida

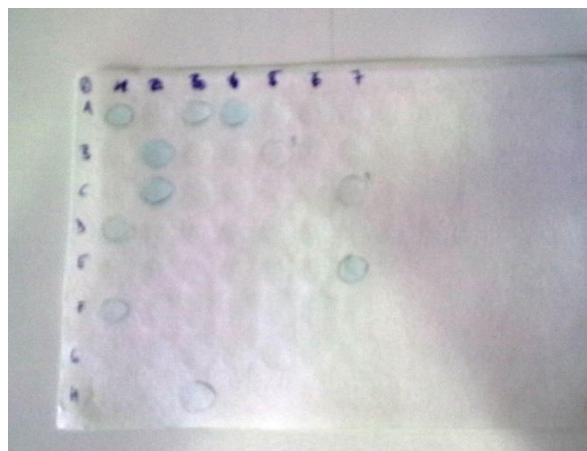
3.2.3.1 Test sinteze HCN s kolorimetrično reakcijo

S tem testom na hitro zaznamo, kateri sevi proizvajajo HCN, s filtrirnim papirjem, prepojenim s kemikalijo, občutljivo za cianid (Castric in Castric, 1982). V raziskavi smo uporabili kemikaliji bakrov(II)etil/acetoacetat in 4,4'-metilen-bis-(N,N dimetilanilin). Ob sproščanju HCN pride do reakcije med tremi omenjenimi spojinami in listič se obarva modro (Feigl in Anger, 1966).

V digestoriju smo pripravili indikatorski papir tako, da smo v kozarcu, zavitem v aluminijasto folijo, s pokrovom zamešali 5 mg bakrovega(II)etil/acetoacetata, 5 mg 4,4'-metilen-bis-(N,N dimetilanilina) in 1 ml kloroforma. Sterilne lističe filtrirnega papirja, s površino, enako površini mikrotitrne plošče, smo vsakega posebej s pinceto prenesli v kozarec in mešali dve minuti, da se je mešanica vpila vanj. Lističe smo posušili in jih shranili v sterilno aluminijasto folijo pri 4 °C. Pred testom smo kontrolno testirali naključni indikatorski listič z vzorcem 50 mM KCN, da smo preverili ustreznost priprave indikatorskega papirja.

Nadaljnje delo je potekalo v laminariju. V vsako jamico na mikrotitrski plošči smo odpipetirali 100 µl tekočega gojišča LB z glicinom in nacepili po en sev iz petrijevke s

kulturami s sterilnimi zobotrebcami. Naslednji dan smo v vsako jamico na novi mikrotitrski plošči odpipetirali 200 µl tekočega gojišča LB z glicinom in vnesli po 1 µl ocepka vsakega seva iz plošč s sevi iz prejšnjega dne. Počasi rastoče seve smo inkubirali dlje časa. Na ploščo z ocepki smo namestili neprepustno folijo in dali stresati čez noč v stresalnik na 250 rpm pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo odstranili folijo in namestili na mikrotitrsko ploščo indikatorski papir, jo obtežili in čez eno uro pregledali rezultate. Modra barva na indikatorskem papirju pomeni, da sevi proizvajajo HCN. Intenzivnejša barva pomeni več proizvedenega HCN. Slike smo obdelali in dokumentirali s transiluminatorjem. Gojenje in meritve smo ponovili dvakrat.



Slika 2: Primer rezultatov testa z barvnim indikatorjem. Na indikatorskem papirju je 96 krogcev, odtisov jamic mikrotitrskje ploščje, v katerih so bili izolirani sevi. Krogci, ki so zaradi kemikalije, občutljive za cianid obarvani modro, dokazujejo producente HCN.

3.2.3.2 HCN-test s hemoglobinom

HCN-test s hemoglobinom je kvantitativna metoda merjenja ionov CN^- v raztopini, ki temelji na spektrofotometrični metodi z metemoglobinom, ki sta jo razvila Baumeister in Schievebein (1971) v krvnem serumu. Zaradi prisotnosti natrijevega nitrita hemoglobin oksidira v metemoglobin. Z dodatkom cianida nastane stabilni cianometemoglobinski kompleks, ki ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini približno 422 nm, medtem ko ga ima metemoglobin pri približno 407 nm (Von Rohr in sod., 2009). Za meritve smo vzeli valovno dolžino, optimizirano za čitalnik mikrotitrskih plošč Synergy H4, kjer je razlika med absorbcijama obeh oblik hemoglobina maksimalna, to je 425 nm. To valovno dolžino smo določili s predhodnimi meritvami okoli absorpcijskih maksimumov metemoglobina in cianometemoglobinskega kompleksa.

Seve smo en dan pred meritvijo nacepili v 1 ml tekočega gojišča LB z glicinom v centrifugirke po Eppendorfu. Stresali smo jih čez noč pri 250 rpm in 26 °C. Naslednji dan smo za pravilno kvantifikacijo nastalega HCN najprej izmerili gostoto kultur s pogosto

spektrofotometrično metodo za merjenje koncentracije bakterijskih celic v tekočini (OD600). Pripravljene kulture smo na kratko premešali na rotacijskem mešalniku. Na mikrotitrsko ploščo smo v vsako jamico odpipetirali 200 μ l gojišča s sevom in s čitalnikom Synergy H4 spektrofotometrično pri valovni dolžini 600 nm izmerili koncentracije bakterijskih kultur. Nato smo opravili še HCN-test.

Priprave na test:

- priprava nitrita (NaNO_2): v centrifugirki Falcon smo raztopili 6 mg NaNO_2 v 20 ml destilirane vode;
- priprava hemoglobinskega reagenta: v centrifugirki Falcon smo zamešali 17 mg hemoglobina in 2,5 ml NaNO_2 ter stresali 10 min, nato smo dodali 2,5 ml pufru BPS in stresali še 30 min;
- priprava kultur: gojišča s sevi v centrifugirkah po Eppendorfu smo centrifugirali 10 min, pri 21460 x g pri 4 °C; po 500 μ l supernatanta smo odpipetirali v nove epice in jih spravili v hladilnik pri 4 °C;
- priprava umeritvene krivulje: v centrifugirkah Falcon smo pripravili 5, 10, 15, 20 in 25 μ M KCN.

V digestoriju smo vnesli vse snovi in seve na mikrotitrsko ploščo:

- vzorci: v jamice smo odpipetirali po 50 μ l gojišča s sevom, 10 μ l hemoglobinskega reagenta in 140 μ l destilirane vode, po 5 paralelk vsakega seva;
- umeritvena krivulja: v jamice smo odpipetirali po 190 μ l 25, 20, 15, 10 in 5 μ M KCN in 10 μ l hemoglobinskega reagenta, za izračun vrednosti mešanice brez KCN smo dodali reagentu destilirano vodo;
- kontrola: na ploščo smo vnesli 50 μ l gojišča in 150 μ l destilirane vode.

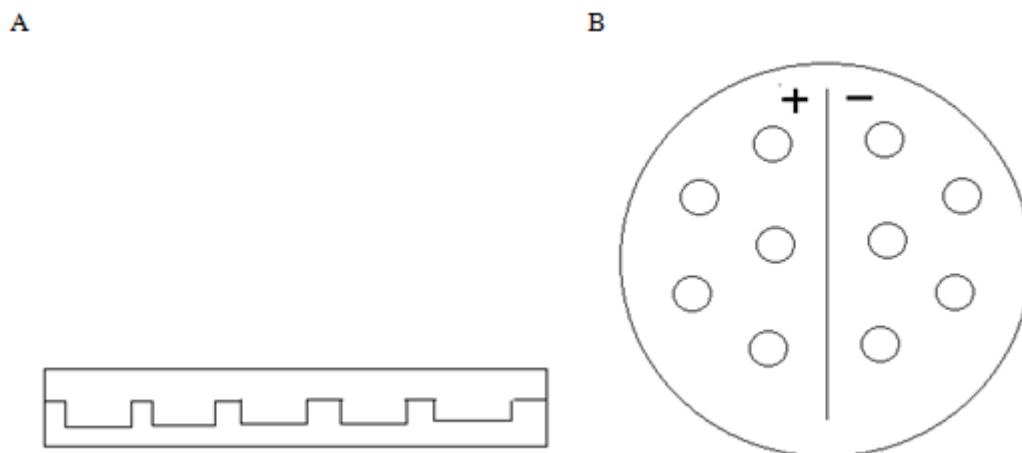
Seve, katerim smo izmerili vrednost OD600, manjšo od 1, smo ponovno testirali. Seve, ki so rastle počasi, smo inkubirali do 14 dni oziroma do vidne rasti ($\text{OD600} \geq 1$).

3.2.4 Potencial sevov za zaviranje rasti

Na podlagi HCN-testa s hemoglobinom smo izbrali 5 sevov, ki so proizvajali največ HCN, in 5 sevov, ki niso proizvajali HCN (rezultati vseh paralelk so bili pod mejo detekcije). S poskusi smo želeli preveriti njihov potencial za biokontrolo patogenih vrst bakterij in gliv, ki okužujejo koruzo, in ugotoviti, ali HCN, ki ga proizvajajo izolirani bakterijski sevi, vpliva na njihovo rast.

3.2.4.1 Poskus s patogenimi bakterijami

Seve patogenih bakterij *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* in 10 sevov, producentov in neproducentov HCN, izbranih za test, smo s sterilnimi zobotrebcami nacepili v centrifugirke Falcon s 4 ml tekočega gojišča LB. Inkubirali smo jih čez noč s stresanjem pri 250 rpm in 26 °C. Petrijevke s trdimi gojišči LB in LB z glicinom smo pripravili tako, da smo na gojišču s stekleno palčko izdoblili luknjice za vsak izolat (slika 3 A). Vdolbinice za producente HCN in vdolbinice za neproducente smo ločili z navidezno črto (slika 3 B). Po inkubaciji smo patogene bakterije razmazali s sterilnimi vatenkami, vsak sev v njegovo petrijevko z gojiščem LB in LB z glicinom. Seve cianogenih bakterij smo odpipetirali v luknjice in na vsako nastavili sterilni filtrirni papir. Nastanek čistin ob vdolbinicah smo spremljali en teden.



Slika 3: Skica gojišča. (A) Pogled od strani. V gojišču so vdolbinice, v katere smo odpipetirali gojišča s sevi. (B) Pogled od zgoraj. Levo od navidezne črte (oznaka +) so vdolbinice za producente HCN, desno (-) pa za neproducente.

3.2.4.2 Poskus s patogenimi glivami

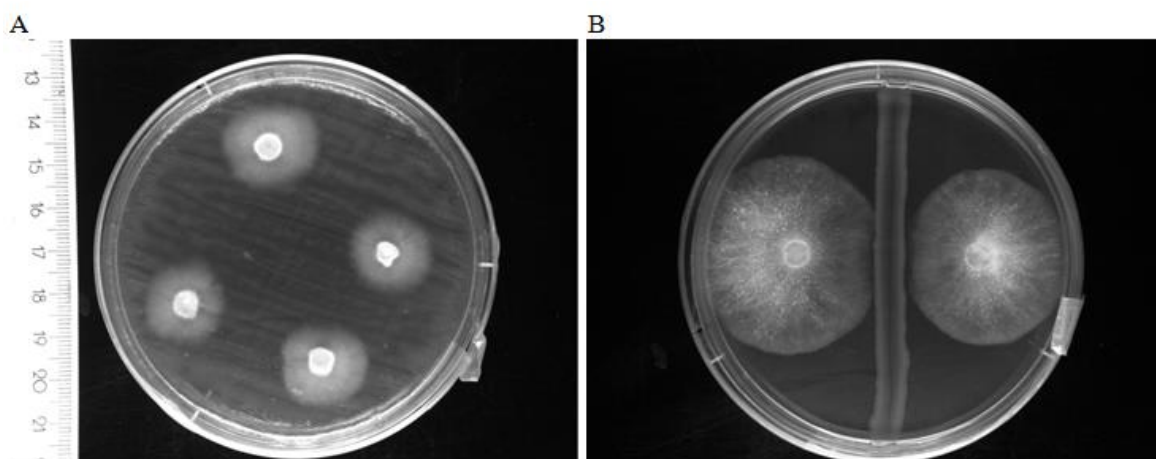
Za poskus smo uporabili vrsti *Fusarium moniliforme* in *Fusarium graminearum*, ki smo ju inkubirali na trdnih gojiščih PDA in LB, dokler niso hife prekrile celotne površine gojišča v petrijevkah. Dan pred nastavitvijo poskusa smo v centrifugirke Falcon s tekočim gojiščem LB nacepili izolirane seve, izbrane za poskus, in jih inkubirali čez noč pri 26 °C s stresanjem pri 250 rpm. Naslednji dan smo v laminariju s sterilnimi vatenkami razmazali seve na trdna gojišča LB in LB z glicinom (5g/l) tako, da smo zagotovili konfluentno razrast bakterij po površini. Iz gojišč s predhodno nacepljenimi glivami, ki so se razrasle po celotni petrijevki, smo s stekleno palčko oblikovali agarjeve čepke (slika 4). Po 4

agarjeve čepke z glivo iste vrste smo vstavili v vsako petrijevko z bakterijami (slika 5 A). Glive z bakterijami smo inkubirali pri 26 °C, spremljali njihovo rast in jih slikali s transiluminatorjem.

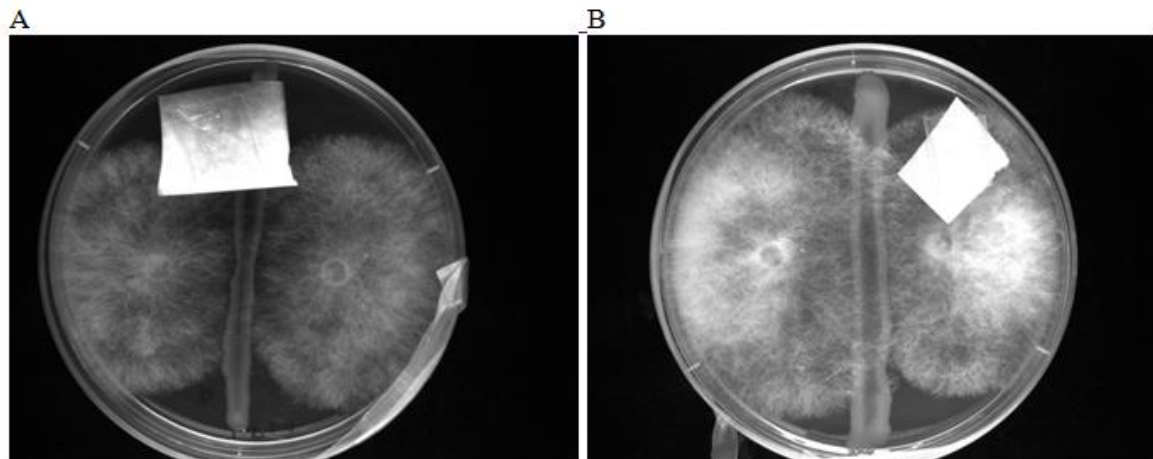


Slika 4: Shematski prikaz poskusa s patogenimi glivami.

Da bi lahko z večjo verjetnostjo potrdili ali zavrgli svojo hipotezo, smo izbrali nekaj sevov in jih pripravili kot za prejšnji poskus. Vsak sev smo razmazali s sterilno vatenko v ravni črti na sredino petrijevke, inkubirali en dan, nato pa vnesli na vsako stran po en agarjev čepok z isto vrsto glive (slika 5 B). Za potrditev nastajanja HCN smo dodali v nekaj petrijevki indikatorski papir iz testa HCN z indikatorskim papirjem (slika 6). Glive s sevi smo inkubirali pri 26 °C, spremljali smo njihovo rast in jih slikali s transiluminatorjem.



Slika 5: Primera nastavitve poskusa s patogenimi glivami. (A) Agarjevi čepki z glivo *Fusarium graminearum* na konfluentni rasti bakterijskega izolata RR 2-14. (B) Agarjeva čepka glive *Fusarium moniliforme*, med njima je izolat RR 2-4.



Slika 6: Primera nastavitve poskusa s patogenimi glivami z indikatorskim lističem. (A) Obarvan indikatorski listič dokazuje, da sev sintetizira HCN. (B) Indikatorski listič ni obarvan.

3.2.5 Filogenetske raziskave

Pri filogenetskih raziskavah smo uporabili BOX-PCR, ki je ena od metod rep-PCR. Metoda BOX-PCR se uporablja za genski »fingerprinting«, za določanje sorodnosti sevov in njihovega izvora (Mohapatra in Mazumder, 2008). Zanja je značilno, da ustvarja specifične vzorce sevov, tako da pomnoži elemente, ki se ponavljajo v genomu določene vrste. Oligonukleotidni začetnik za BOX-PCR je BOX A1R (Versalovic in sod., 1994).

3.2.5.1 Izolacija DNA

Za izolacijo DNA smo uporabili komplet SmartHelix® EZextract kit. Delo je potekalo po navodilih proizvajalca.

3.2.5.2 Merjenje količine DNA

Količino DNA smo izmerili s spektrofotometrom Synergy H4 po principu fluorometrične meritve koncentracije DNA z napravo qBit. Osnovno založno raztopino SYBR Green smo 1000x razredčili z destilirano vodo, nato smo v temnem prostoru odpipetirali vzorce in standarda v jamice na črno titrsko ploščo:

- standard 1: 10 μ l SYBR Green in 90 μ l MQ – slepa kontrola, 2 paralelki;
- standard 2: 6 μ l standarda qBit, 10 μ l SYBR Green in 84 μ l MQ – 2 paralelki;
- Vzorec: 1 μ l DNA, 10 μ l SYBR Green in 89 μ l MQ.

Meritev fluorescence smo izvajali pri ekscitacijski valovni dolžini 497 nm in emisijski 520 nm. Po opravljenih meritvah smo vse vzorce razredčili z destilirano vodo do koncentracije 1,5 ng/ μ l.

3.2.5.3 BOX-PCR

Za 25 µl reakcijske mešanice smo uporabili sestavine, prikazane v preglednici 3.

Preglednica 3: Sestavine za reakcijsko mešanico za PCR

Sestavina	Količina v 25 µl mešanice	Količina v 100 µl mešanice	Končna koncentracija
10 x PCR pufer	2,5 µl	10 µl	
25 mM MgCl ₂	1,5 µl	6 µl	1,5 mM
10 µM oligonukleotidni začetnik BOX A1R	2,0 µl	8 µl	0,8 µM
10 mM mešanica dNTP	0,25 µl	1 µl	0,1 mM
Taq DNA-polimeraza	0,2 µl	0,8 µl	
H ₂ O	17,55 µl	70,2 µl	
DNA	1 µl	4 µl	

Za kontrolo smo v eno mikrocentrifugirko namesto DNA odpipetirali 1 µl H₂O. Mikrocentrifugirke s pripravljenimi mešanicami smo prenesli v aparaturo za PCR. Program PCR:

- 10 ciklov:
 - 95 °C, 5 min,
 - 94 °C, 10 s,
 - 52 °C, 1 min,
 - 68 °C, 4 min;
- 25 ciklov:
 - 94 °C, 10 s,
 - 52 °C, 1 min,
 - 68 °C, 4 min, vsak naslednji cikel 10 s;
- na koncu hlajenje na 4 °C.

Pomnožke smo analizirali z 2-odstotno agarozno gelsko elektroforezo v 0,5x pufri TBE. V vsako luknjico na gelu smo odpipetirali po 25 µl pomnožka, ki smo mu dodali 2 µl barvila loading dye. SYBR green smo dodajali ločeno, tako da smo barvali celoten gel. Na gel smo nanesti tudi več molekularnih označevalcev pomnožkov DNA, ki so bili za referenco. Elektroforeza je potekala pri napetosti 65 V, 8 ur, pri 4 °C. Po končani elektroforezi smo gel barvali v banjici v raztopini 1x SYBR green 20 minut in pomnožke odčitali in dokumentirali v transiluminatorju pod UV-svetlobo. Na podlagi analize profilov BOX smo določili filogenetsko sorodnost izoliranih bakterijskih sevov.

3.2.6 Statistična obdelava podatkov

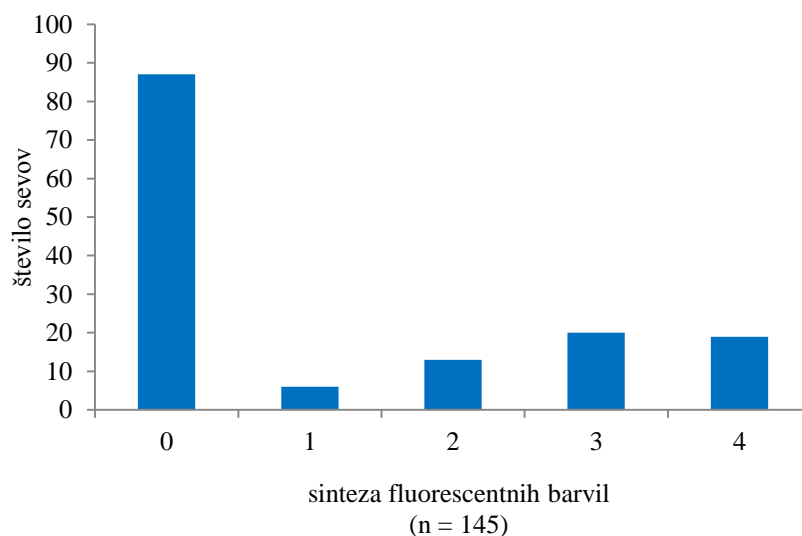
Pri ugotavljanju potenciala sevov za zaviranje rasti smo uporabili statistični t-test v programu Microsoft Excel. Razlike so statistično značilne pri vrednosti $p \leq 0,05$.

4 REZULTATI

V raziskavi smo testirali 145 bakterijskih sevov iz rizosfere in s površine korenin (rizoplana) alpske velese in ščitaste kislice ter s površine kamninske podlage. V izoliranih sevih smo ugotavljali sintezo fluorescentnih barvil pioverdin, mobilizacijo fosfata in sinteze HCN. Preverili smo njihov potencial za zaviranje rasti škodljivih bakterij in gliv ter s filogenetsko analizo določili medsebojno sorodnost.

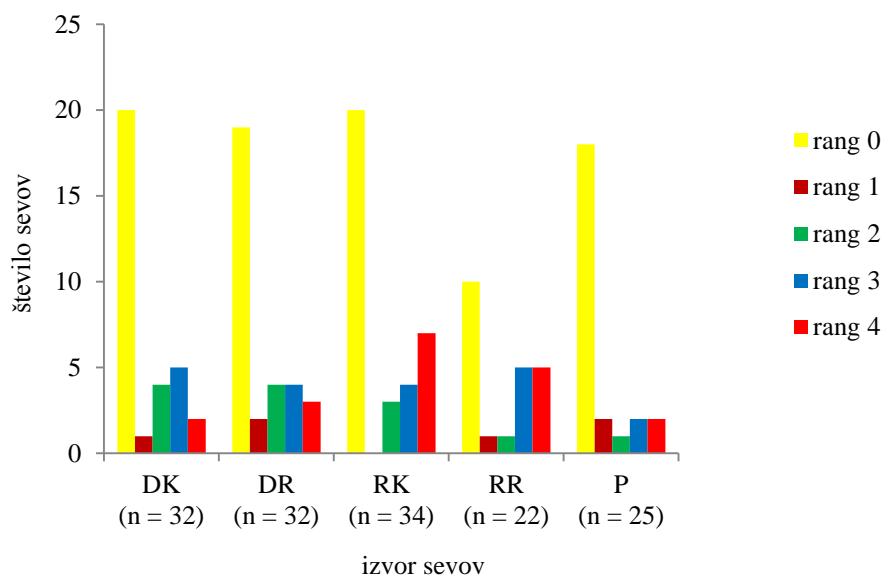
4.1 SINTEZA FLUORESCENTNIH BARVIL

Testirali smo 145 sevov, od teh jih je 58 proizvajalo fluorescentna barvila, kar znaša 40 % vseh testiranih sevov (priloga A). Šibko sintezo barvil (rang 1) smo zaznali pri 6 sevih (4 %), srednje močno (rang 2) pri 13 sevih (9 %), močno (rang 3) pri 20 sevih (14 %) in najmočnejšo (rang 4) pri 19 sevih (13 %) (slika 7). Največ barvil sta proizvajala seva, izolirana s površine kamninske podlage, P 2-2 in P 2-4. Od sevov, ki so bili izolirani iz rastlin, sta največ barvil proizvajala sev s površine korenin alpske velese DK 1-11 in sev iz rizosfere ščitaste kislice RR 2-2 (priloga B). Skupina z največjim deležem najmočnejše sinteze fluorescentnih barvil je skupina rizosfere ščitaste kislice z lokacije 2 (RR2), kjer je bilo takih sevov 5 od 14. Skupina rizosfere alpske velese z lokacije 2 (DR2) je skupina z največjim deležem sevov, ki so proizvajali fluorescentna barvila, in sicer 9 od 12. Največji delež sevov, ki niso proizvajali barvil, pripada skupini, izolirani s površine kamninske podlage z lokacije 3 (P3), saj barvil ni proizvajal noben sev, in skupini iz rizosfere alpske velese z lokacije 1 (DR1), od katerih so proizvajali barvila le 3 sevi od 13 (priloga A).



Slika 7: Število bakterijskih sevov glede na oceno jakosti sinteze fluorescentnih barvil. (n = 145) 0 – ni signala KB, rang 1 – šibek signal, rang 2 – srednje močan signal ali močan signal do d = 2 mm, rang 3 – močan signal, d = od 2 do 4 mm, rang 4 – močan signal, d ≥ 4 mm.

Rezultati primerjave števila sevov z oceno sinteze fluorescentnih barvil glede na izvor sevov (slika 8) kažejo, da so največjo sintezo barvil imeli sevi, izolirani iz rizosfere ščitaste kislice. Od 22 jih je proizvajalo barvila 55 %, največ jih je spadalo v ranga z najmočnejšo in močno sintezo (ranga 4 in 3). Manj dejavni so bili sevi, izolirani s površine korenin ščitaste kislice. Od 34 jih je proizvedlo barvila 41 %. Tudi teh je največ spadalo v najvišja ranga. Sevi rizosfere alpske velese so proizvajali barvila v enakem deležu kot slednji (od 32 jih je fluoresciral 41 %), vendar jih je največ spadalo v ranga srednje in močne sinteze barvil (ranga 2 in 3). V istih dveh rangih jih je bilo največ tudi v skupini sevov s površine korenin alpske velese, od 32 jih je proizvajalo barvila 38 %. Najmanjšo sintezo fluorescentnih barvil so imeli sevi, izolirani s površine kamninske podlage. Od 25 sevov jih je proizvajalo barvila le 28 % in so bili enakomerno razvrščeni po rangih (priloga A).

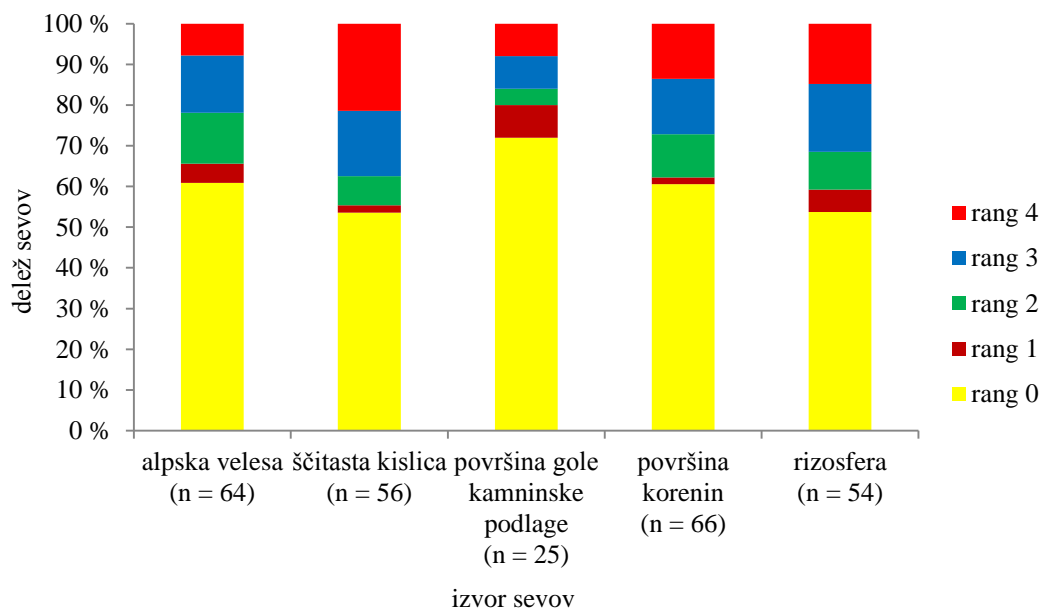


Slika 8: Število bakterijskih sevov z oceno jakosti sinteze fluorescentnih barvil glede na njihov izvor. DK – površina korenin alpske velese, DR – rizosfera alpske velese, RK – površina korenin ščitaste kislice, RR – rizosfera ščitaste kislice, P – površina gole kamninske podlage.

Deleži sevov z izmerjeno oceno jakosti sinteze fluorescentnih barvil glede na izvor sevov s površine korenin in iz rizosfere alpske velese, s površine korenin in iz rizosfere ščitaste kislice ter s površine gole kamninske podlage (slika 9) potrjujejo, da so največ fluorescentnih barvil proizvajali sevi, izolirani s površine korenin in iz rizosfere ščitaste kislice, saj je proizvajalo barvila 46 % od skupno 56 sevov. Največ jih je spadalo v rang z najmočnejšo sintezo (rang 4), najmanj pa v rang s šibko (rang 1). Manjšo sintezo barvil so imeli sevi, izolirani s površine korenin in iz rizosfere alpske velese. Barvila je proizvajalo 39 % od skupno 64 sevov, največ jih je spadalo v rang močne sinteze barvil (rang 3), najmanj pa v rang s šibko sintezo (rang 1). Najmanj fluorescentnih barvil so proizvajali

sevi s površine kamninske podlage. Iz te skupine jih je proizvajalo barvila 28 % od skupno 25 sevov, ki so enakomerno razporejeni po rangih (priloga A).

Kot kaže primerjava deleža sevov z oceno jakosti sinteze fluorescentnih barvil glede na izvor sevov iz rizosfere ali s površine korenin ali površine kamninske podlage (slika 9), so največ barvil proizvajali sevi, izolirani iz rizosfer. Barvila je proizvedlo 46 % od skupno 54 sevov. Največ jih je spadalo v rang z najmočnejšo (rang 4), najmanj pa v rang s šibko sintezo (rang 1). Manjšo sintezo fluorescentnih barvil so imeli sevi, izolirani s površin korenin. Barvila jih je proizvajalo 39 % od skupno 66 sevov, največ jih je bilo v rangih močne in najmočnejše sinteze barvil (ranga 3 in 4), najmanj pa v rangu s šibko sintezo (rang 1). Najmanj fluorescentnih barvil so proizvajali sevi, izolirani s površine kamninske podlage (priloga A).

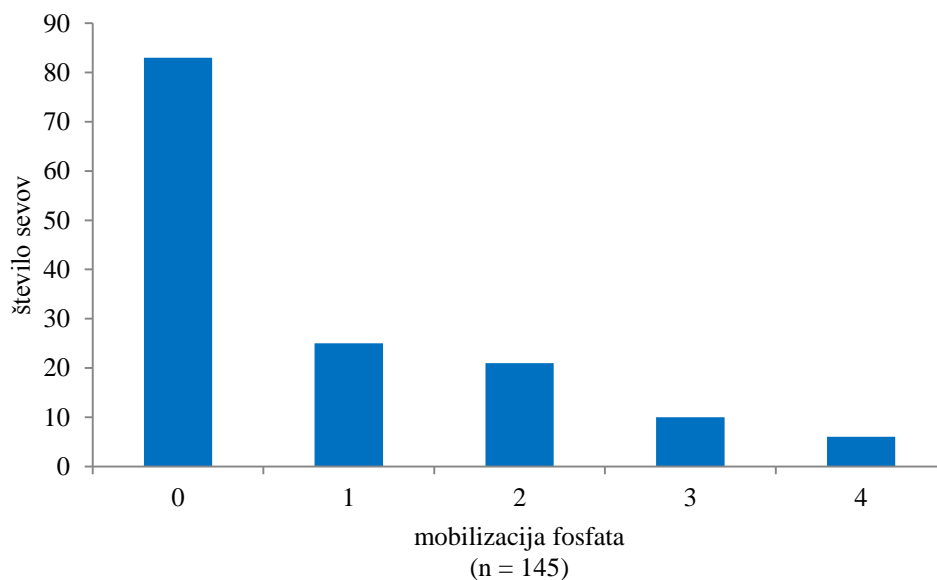


Slika 9: Delež bakterijskih sevov z oceno jakosti sinteze fluorescentnih barvil glede na njihov izvor.

4.2 MOBILIZACIJA FOSFATA

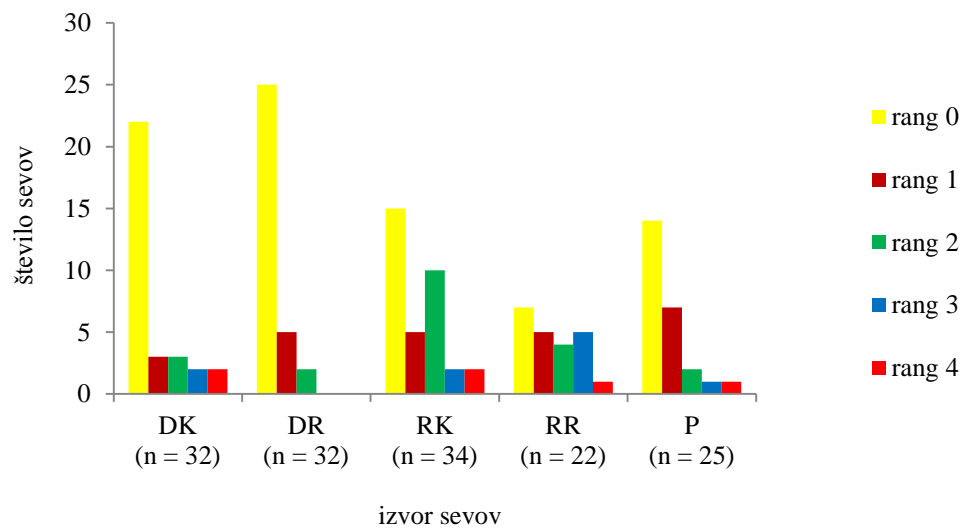
Testirali smo 145 sevov. Pri 62 sevih (43 %) so bile čistine v gojišču vidne, kar pomeni, da so mobilizirali fosfat (priloga C). Šibko mobilizacijo fosfata (rang 1) smo zaznali pri 25 sevih (17 %), srednje močno (rang 2) pri 21 sevih (15 %), močno (rang 3) pri 10 sevih (7 %) in najmočnejšo (rang 4) pri 6 sevih (4 %) (slika 10). Največji čistini sta ustvarila sev, izoliran s površine korenin ščitaste kislice, RK 2-4, in sev, izoliran s površine korenin alpske velese, DK 1-9 (priloga B). Sevi z največ čistin so iz skupine sevov, izoliranih iz rizosfere ščitaste kislice, z lokacije 2 (RR2), le pri dveh od 14 ni bilo videti čistin. Najmanj

čistini sta imeli skupina rizosfere alpske velese (DR1) in skupina sevov površine gole kamninske podlage (P3), v prvem primeru 2 od 13, pri drugem pa 2 od 8. Skupina z največ sevi z najmočnejšo mobilizacijo fosfata je skupina sevov, izoliranih s površine korenin alpske velese, z lokacije 1 (DK1). Od 11 sevov sta 2 spadala v najvišji rang (priloga C).



Slika 10: Število bakterijskih sevov glede na oceno jakosti mobilizacije fosfata. Rang 0 – ni čistin na gojišču; rang 1 – slabo vidne čistine do $d = 3$ mm, srednje vidne čistine do $d = 2$ mm, dobro vidne čistine do $d = 1$ mm; rang 2 – slabo vidne čistine $d =$ od 3 do 4 mm, srednje vidne čistine $d =$ od 2 do 3 mm, dobro vidne čistine do $d = 2$ mm; rang 3 – dobro vidne čistine $d =$ od 2 do 4 mm; rang 4 – dobro vidne čistine $d \geq 4$ mm.

S slike števila sevov z oceno jakosti mobilizacije fosfata glede na izvor sevov (slika 11) je razvidno, da so največ fosfata mobilizirali sevi, izolirani iz rizosfere ščitaste kislice. Od skupno 22 sevov je ustvarilo lezije 68 %. Največ sevov je spadalo v range s šibko, srednje močno in močno mobilizacijo fosfata (rangi 1, 2 in 3). Manj fosfata so mobilizirali sevi, izolirani s površine korenin ščitaste kislice. Fosfat je mobiliziralo 56 % od 34 sevov. Največ jih je bilo v rangu srednje močne mobilizacije fosfata. Od 25 sevov, izoliranih s površine kamninske podlage, je fosfat mobiliziralo 44 % sevov, največ jih je spadalo v rang s šibko mobilizacijo fosfata (rang 1). Čistine na gojišču smo opazili pri 31 % sevov, izoliranih s površine korenin alpske velese, od skupno 32. Po jakosti mobilizacije fosfata so enakomerno porazdeljeni po vseh rangih. Najmanj čistin smo našli pri sevih, izoliranih iz rizosfere alpske velese. Od skupno 32 je mobiliziralo fosfat le 22 % sevov, vsi so spadali v ranga šibke in srednje močne mobilizacije fosfata (ranga 1 in 2). Nobena skupina ni izstopala s številom sevov v rangu najmočnejše mobilizacije fosfata, razen skupina sevov iz rizosfere ščitaste kislice, ki je imela največji delež sevov v rangu močne mobilizacije fosfata (rang 3) (priloga C).

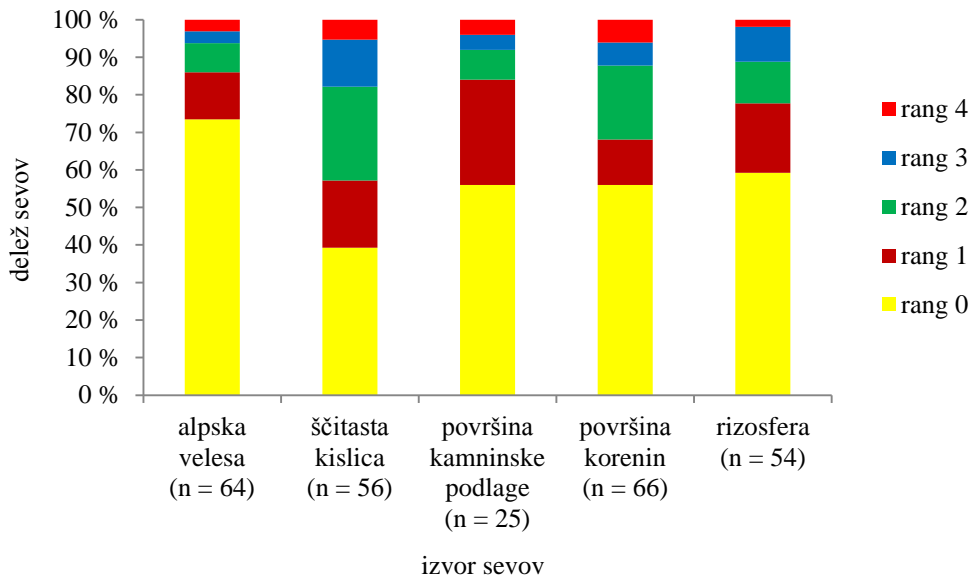


Slika 11: Število sevov z oceno jakosti mobilizacije fosfata glede na njihov izvor. DK – površina korenin alpske velese, DR – rizosfera alpske velese, RK – površina korenin ščitaste kislice, RR – rizosfera ščitaste kislice, P – površina gole kamninske podlage.

Primerjava deleža sevov z oceno jakosti mobilizacije fosfata glede na njihov izvor iz rizosfere in s površine korenin alpske velese ali iz rizosfere in s površine korenin ščitaste kislice ali površine kamninske podlage (slika 12) potrjuje, da so sevi, izolirani s površine kamninske podlage, po mobilizaciji fosfata med tistimi iz ščitaste kislice in alpske velese. Fosfat je mobiliziralo 61 % sevov od skupno 56 sevov ščitaste kislice. Največ jih je spadalo v rang srednje močne (rang 2), najmanj pa v rang najmočnejše mobilizacije fosfata (rang 4). Čistine so bile vidne tudi pri 44 % od skupno 25 sevov, izoliranih s površine kamninske podlage. Največ jih je spadalo v rang šibke mobilizacije (rang 1) in najmanj v ranga močne in najmočnejše mobilizacije fosfata (ranga 3 in 4). Sevi alpske velese so najmanj mobilizirali fosfat, in sicer smo čistine opazili pri 27 % od skupno 64 sevov. Tudi v tem primeru je največ sevov spadalo v rang šibke mobilizacije (rang 1) in najmanj v ranga močne in najmočnejše mobilizacije fosfata (ranga 3 in 4) (priloga C).

S slike, ki prikazuje deleže sevov z oceno jakosti mobilizacije fosfata glede na njihov izvor iz rizosfere ali s površin korenin ter površine kamninske podlage (slika 12) lahko razberemo, da je fosfat mobiliziral približno enak delež sevov, ne glede na to, ali izhajajo iz rizosfere, s površine korenin ali s površine gole kamninske podlage. Razlikujejo pa se po rangih. Čistine so nastale pri 44 % sevov od skupno 66, izoliranih s površine korenin. Največ sevov je spadalo v rang srednje močne mobilizacije fosfata (rang 2) in najmanj v ranga močne in najmočnejše mobilizacije (ranga 3 in 4). V enakem odstotku so mobilizirali fosfat sevi površine kamninske podlage, mobilizacija pa je bila šibkejša. Največ sevov je spadalo v rang šibke mobilizacije (rang 1), najmanj pa v najvišja ranga. Najslabše so

mobilizirali fosfat sevi, izolirani iz rizosfer, saj jih je na gojišču od skupno 54 sevov 41 % ustvarilo čistine. Tudi v tem primeru je največ sevov spadalo v rang šibke mobilizacije (rang 1), najmanj pa v najvišja ranga (priloga C).

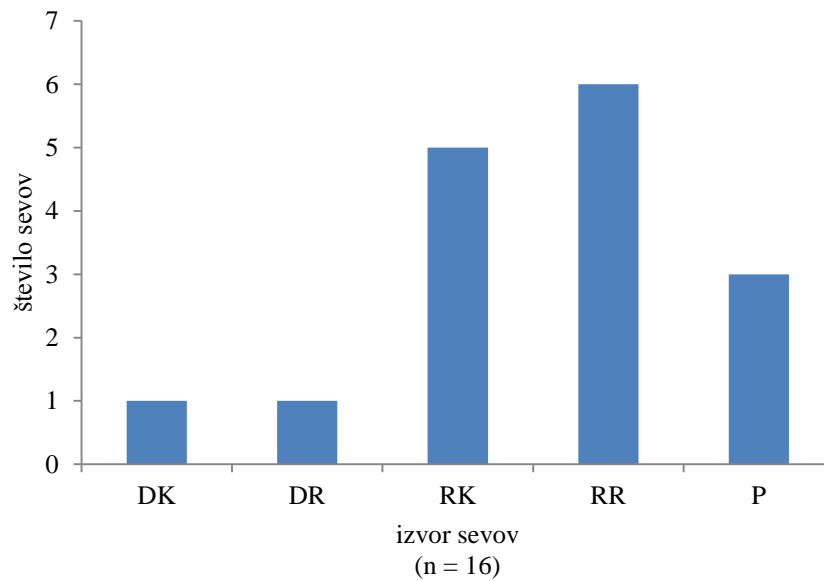


Slika 12: Delež sevov z oceno jakosti mobilizacije fosfata glede na njihov izvor.

4.3 SINTEZA VODIKOVEGA CIANIDA

4.3.1 Test sinteze HCN s kolorimetrično reakcijo

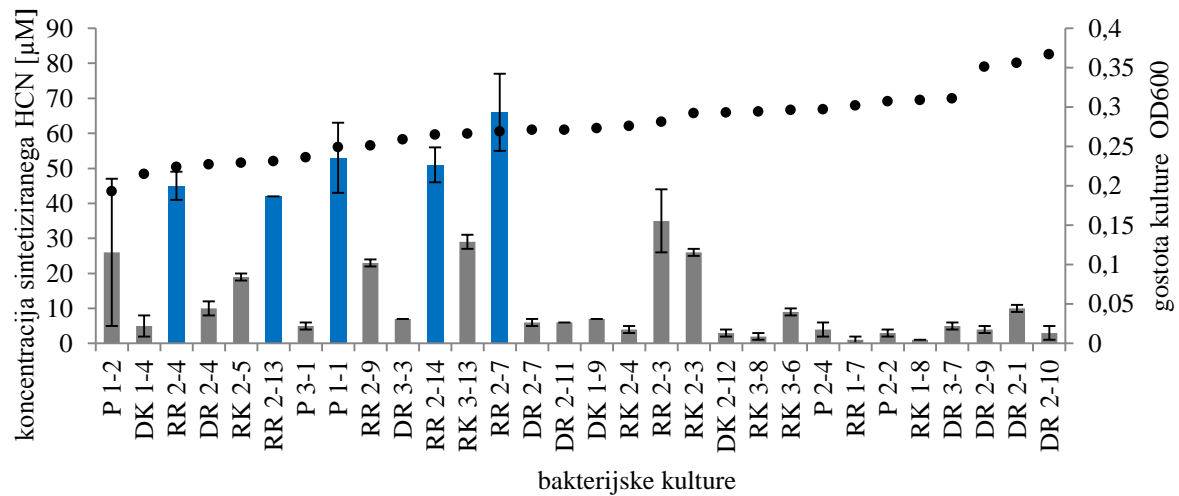
Prvi test, ki smo ga uporabili za dokazovanje sinteze HCN, je temeljil na kolorimetrični reakciji z barvnim indikatorjem. Testirali smo 145 bakterijskih sevov, od teh jih je 16 sintetiziralo HCN (priloga D). Skupino z največjim deležem sevov, ki so proizvajali HCN, so tvorili sevi iz rizosfere ščitaste kislice z lokacije 2 (RR2) s 6 pozitivnimi sevi (slika 13). Sledili so jim sevi, izolirani s površine korenin ščitaste kislice z lokacije 2 (RK2), s 3 pozitivnimi sevi. Tudi seva, izolirana s površine korenin ščitaste kislice z lokacije 3 (RK3), sta proizvajala HCN. Skupine s po enim sevom, ki je proizvajal HCN, so sevi s površine korenin alpske velese z lokacije 1 (RK1), sevi iz rizosfere alpske velese z lokacije 2 (DR2) in sevi s površine kamninske podlage z vseh treh lokacij (P1, P2 in P3). Ker je 5 izolatov od teh bilo pozitivnih le v enem poskusu, ne moremo zagotovo trditi, da so proizvajali HCN. To so DK 1-9, RK 2-5, RR 2-9, RK 3-13, P 2-2 in P 3-7. V vseh treh poskusih so več HCN proizvajali sevi RK 2-3, RR 2-4, RR 2-7, RR 2-13, RR 2-14 in P1-1. Največ HCN sta sintetizirala seva RR 2-13 in RR 2-14.



Slika 13: Število sevov s sintezo HCN pri testu z barvnim indikatorjem glede na njihov izvor. DK – površina korenin alpske velese, DR – rizosfera alpske velese, RK – površina korenin ščitaste kislice, RR – rizosfera ščitaste kislice, P – površina gole kamninske podlage. n = 16.

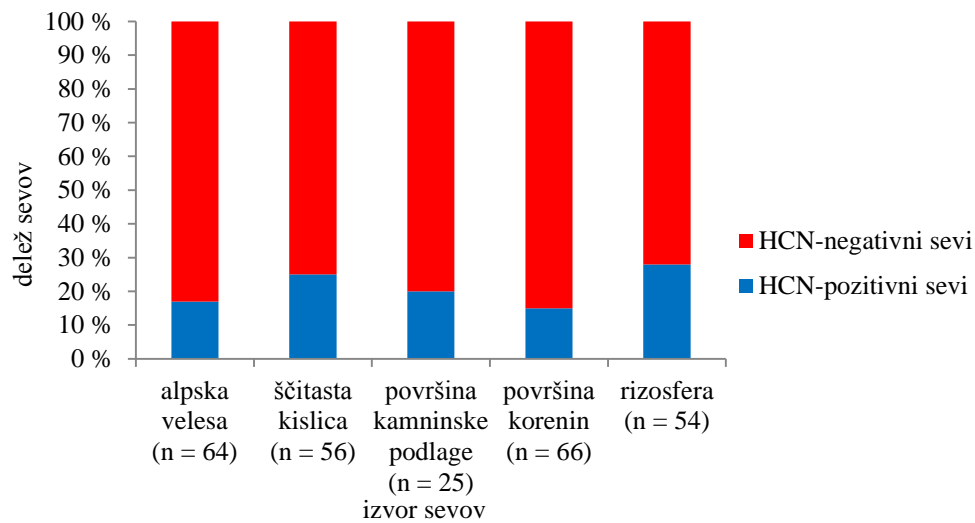
4.3.2 Test HCN s hemoglobinom

V drugem primeru smo HCN dokazovali s hemoglobinom. Od 145 testiranih bakterijskih sevov je 30 sintetiziralo HCN, kar znaša 21 % vseh testiranih sevov (priloge E1 in E2). Kot lahko razberemo s slike koncentracije sintetiziranega HCN na bakterijsko kulturo (slika 14), so največ HCN sintetizirali 4 sevi, izolirani iz rizosfere ščitaste kislice z lokacije 2, in sev, izoliran s površine kamninske podlage z lokacije 1, in sicer sev RR 2-7 je proizvedel $66 \pm 11 \mu\text{M}$ HCN, sev P 1-1 $53 \pm 10 \mu\text{M}$ HCN, sev RR 2-14 $51 \pm 5 \mu\text{M}$ HCN, sev RR 2-4 $45 \pm 4 \mu\text{M}$ HCN in sev RR 2-13 $42 \pm 0 \mu\text{M}$ HCN (slika 14). Na sliki so sevi na osi x razporejeni po gostoti, od najmanjše od največje, z razponom OD600 od 0,193 do 0,367. Razvidno je, da so kulture z večjo gostoto vsebovale manj HCN.



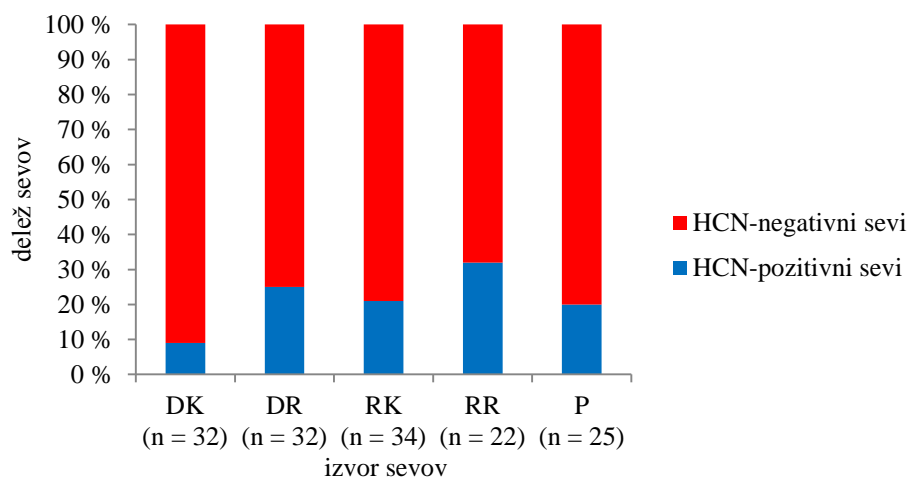
Slika 14: Koncentracija sintetiziranega HCN na bakterijsko kulturo (stolpci) in njihova gostota (•). Sevi z največjo sintezo HCN so označeni z modro barvo. Bakterijske kulture so na osi x urejene po svoji gostoti OD600 od najmanjše od največje gostote. DK - površina korenin alpske velese, DR - rizosfera alpske velese, RK - površina korenin ščitaste kislice, RR - rizosfera ščitaste kislice, P - površina gole kamninske podlage, števila 1 do 3 - lokacija, števila 1 do 14 - zaporedna številka seva.

Primerjava bakterijskih sevov glede na izvor iz rizosfere in s površine korenin alpske velese, iz rizosfere in površine korenin ščitaste kislice ter s površine gole kamninske podlage (slika 15) kaže, da je najmanjši delež cianogenih sevov, izoliranih iz alpske velese, saj je od 64 sevov sintetiziralo HCN le 11, kar znaša 17 %. Od 25 sevov, izoliranih s površine kamninske podlage, je HCN sintetiziralo 5, kar znaša 20 %. Največji delež pozitivnih sevov je bil izoliran iz ščitaste kislice. Od 56 sevov jih je 14 sintetiziralo HCN, kar je četrtnina sevov. Ugotovili smo tudi, da je bil največji delež cianogenih sevov izoliran iz rizosfere, in sicer 28 %. Od 54 sevov je bilo pozitivnih 15. Manj HCN so sintetizirali sevi s površine kamninske podlage. Najmanjši delež cianogenih sevov je bil izoliran s površine korenin, saj je od 66 sevov HCN sintetiziralo 10, kar znaša 15 % (priloga E2).



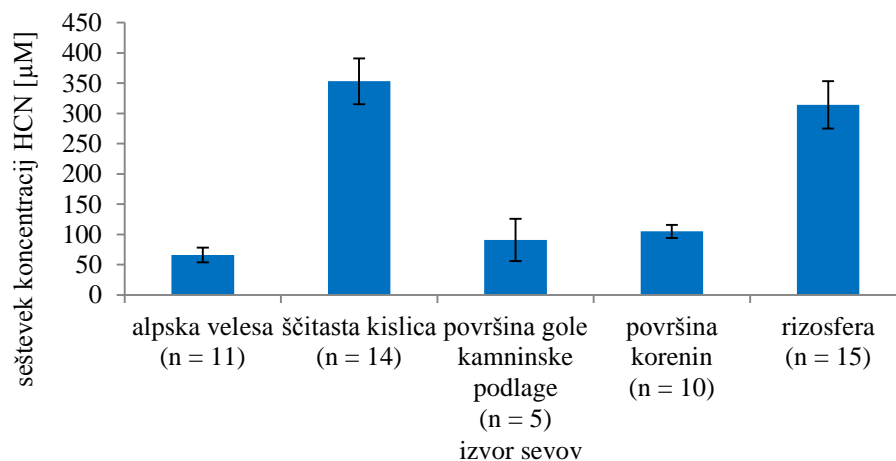
Slika 15: Delež pozitivnih in negativnih sevov za HCN glede na njihov izvor.

S slike, ki prikazuje delež pozitivnih in negativnih sevov za HCN glede na rastlinsko vrsto in izvor iz rizosfere ali s površine korenin ter površine kamninske podlage (slika 16), je razvidno, da so od 32 le 3 sevi s površine korenin alpske velese sintetizirali HCN, kar je najmanjši delež pozitivnih sevov (9 %). Sevi s površine korenin ščitaste kislice in s površine gole kamninske podlage so približno v enakem deležu sintetizirali HCN. Od 25 sevov, izoliranih s površine gole kamninske podlage, jih je HCN proizvajalo 5, kar znaša 20 %. Pozitivnih je bilo tudi 7 sevov (21 %), izoliranih s površine korenin ščitaste kislice, 27 pa negativnih. Od 32 sevov, izoliranih iz rizosfere alpske velese, je bilo 8 pozitivnih, kar znaša 25 %. Največji delež sevov, ki so sintetizirali HCN, ima skupina iz rizosfere ščitaste kislice, saj jih je bilo 7 pozitivnih (32 %) in 15 negativnih (priloga E2).



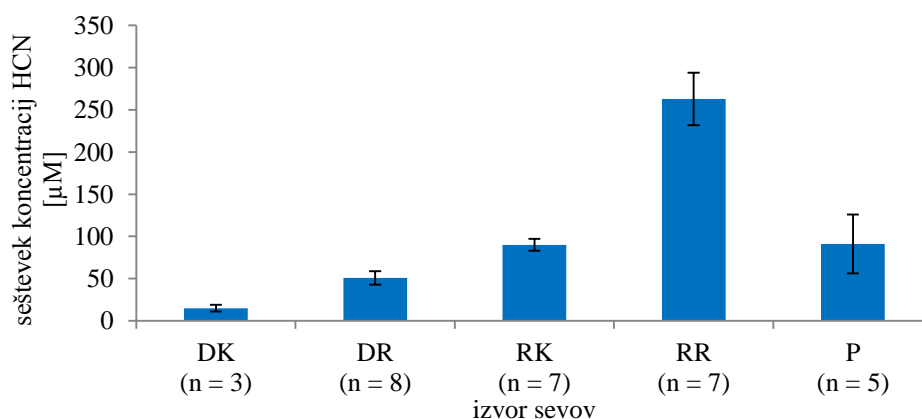
Slika 16: Delež pozitivnih in negativnih sevov za HCN glede na vrsto rastline in izvor iz rizosfere ali s površin korenin ter površine kamninske podlage. DK – površina korenin alpske velese, DR – rizosfera alpske velese, RK – površina korenin ščitaste kislice, RR – rizosfera ščitaste kislice, P – površina gole kamninske podlage.

Koncentracije HCN, ki pomenijo skupno koncentracijo HCN, ki so jo izločale bakterijske kulture (slika 17), kažejo, da so bakterije iz rizosfere in s površine korenin ščitaste kislice sintetizirale trikrat več HCN kot bakterije, izolirane iz rizosfere in s površine korenin alpske velese ali s površine kamninske podlage. Sevi alpske velese so sintetizirali najmanj HCN. Pri primerjavi sintetiziranega HCN sevov, izoliranih s površin korenin, iz rizosfer in s površine kamninske podlage, smo opazili, da so sevi iz rizosfer sintetizirali trikrat več HCN kot sevi s površin korenin in površine kamninske podlage (priloga E2).



Slika 17: Koncentracija bakterijskega HCN glede na njihov izvor.

Sevi s površine korenin alpske velese so imeli najnižjo skupno koncentracijo HCN (slika 18). Sledili so jim sevi iz rizosfere alpske velese. Sevi, izolirani s površine korenin ščitaste kislice in s površine kamninske podlage, so sintetizirali podobno količino HCN. Kar dvakrat več HCN so sintetizirali sevi iz rizosfere ščitaste kislice.



Slika 18: Koncentracija bakterijskega HCN glede na vrsto rastline in izvor iz rizosfere ali s površine korenin ter površine kamninske podlage. DK – površina korenin alpske velese, DR – rizosfera alpske velese, RK – površina korenin ščitaste kislice, RR – rizosfera ščitaste kislice, P – površina gole kamninske podlage.

4.4 POTENCIAL SEVOV ZA ZAVIRANJE RASTI

Bakterijske seve za ta poskus smo izbrali na podlagi testa HCN s hemoglobinom in glede na izvor seva. Izbrali smo 5 izolatov, ki so proizvajali največ HCN, in 5 sevov, za katere je bila največja možnost, da ne proizvajajo HCN (rezultati vseh paralelk so bili pod mejo detekcije). Pri tem smo pazili, da so bili sevi, ki niso proizvajali HCN, izolirani iz različnih rastlin, iz rizosfere, s površin korenin, s površine kamninske podlage in z različnih lokacij. Izbrani sevi so prikazani v preglednici 4.

Preglednica 4: Seznam bakterijskih sevov, izbranih za ugotavljanje potenciala za zaviranje rasti. DK - površina korenin alpske velese, DR - rizosfera alpske velese, RK - površina korenin ščitaste kislice, RR - rizosfera ščitaste kislice, P - površina gole kamninske podlage, števila 1 do 3 - lokacija, števila 1 do 14 - zaporedna številka seva.

Sevi z največjo sintezo HCN	Sevi brez sinteze HCN
RR 2-7	DK 2-5
P 1-1	DR 1-2
RR 2-14	RK 3-3
RR 2-4	RR 2-2
RR 2-13	P 1-7

4.4.1 Poskus s patogenimi bakterijami

Pričakovali smo, da bodo lezije vidne na konfluentni rasti patogenih sevov ob vdolbincih na gojišču z izoliranimi sevi. Po tednu spremljanja rasti nismo opazili lezij, kar pomeni, da izolirani sevi niso zavirali rasti patogenov (slika 19).

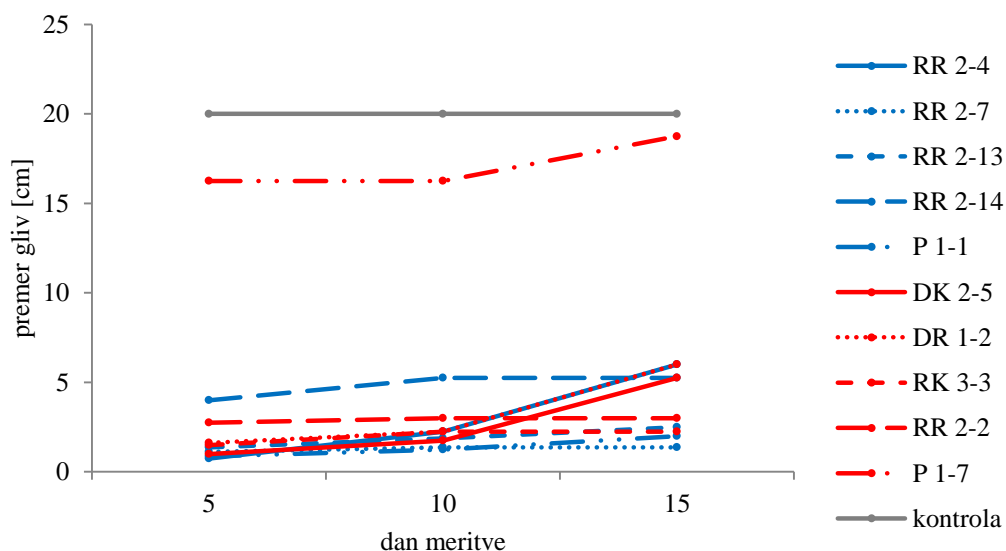


Slika 19: Del rezultatov poskusa s patogenimi bakterijami.

4.4.2 Poskus s patogenimi glivami

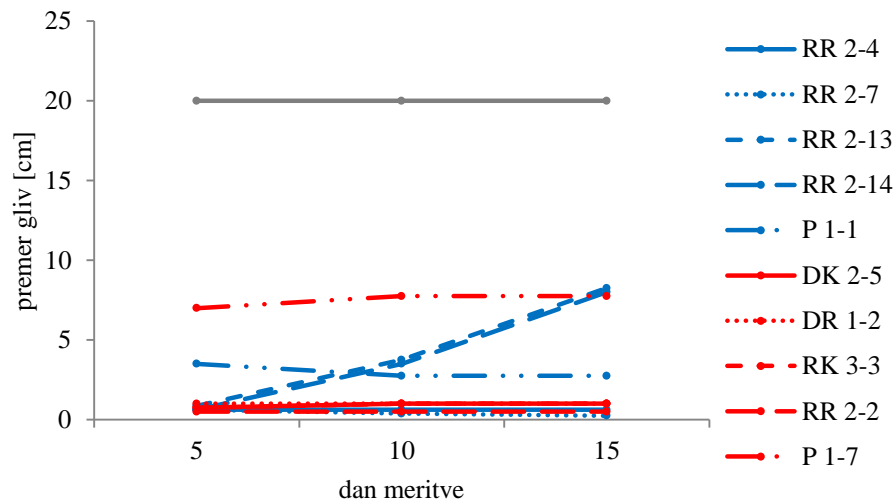
V petrijevke z gojiščem LB ali LB z glicinom smo istočasno nacepili izbrani izolirani sev, tako, da smo mu zagotovili konfluentno rast, in štiri čepke z glivo *Fusarium graminearum* ali *Fusarium moniliforme* (slika 5A, str. 23). V kontrolnih petrijevkah smo inkubirali samo glive. Te so do prvih meritev (5. dan rasti) obrastle celotne petrijevke.

Na sliki 20 lahko opazimo, da so vsi sevi na gojišču LB zavirali rast gliv *Fusarium graminearum* za 75 % ali več, razen seva P 1-7, ki spada v skupino sevov, ki niso proizvajali HCN. Iz te skupine sta najbolj zavirala rast gliv seva DK 2-5 in RR 2-2. Uspešneje so glive zavirali sevi, ki so proizvajali HCN, najbolj seva RR 2-7 in P 1-1. Iz te skupine sta najmanj zavirala rast seva RR 2-4 in RR 2-14.



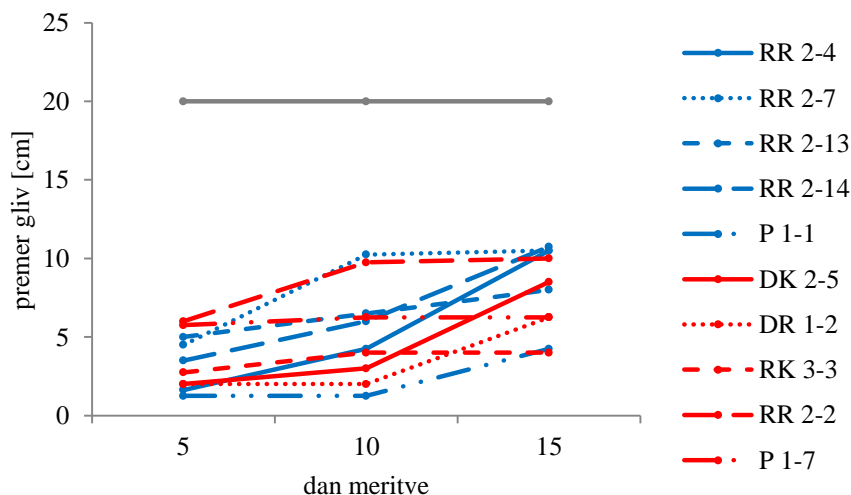
Slika 20: Rast glive *Fusarium graminearum* na gojišču LB 5., 10. in 15. dan v prisotnosti bakterijskih sevov. Producenti HCN so označeni modro, preostali sevi rdeče. Prikazana je povprečna vrednost ($n = 4$). DK - površina korenin alpske velese, DR - rizosfera alpske velese, RK - površina korenin ščitaste kislice, RR - rizosfera ščitaste kislice, P - površina gole kamninske podlage, števila 1 do 3 - lokacija, števila 1 do 14 - zaporedna številka seva.

Na gojišču LB z glicinom so sevi, ki niso proizvajali HCN, bolj zavirali rast glive *Fusarium graminearum* kot na gojišču brez glicina. Tudi v tem primeru je od sevov, ki niso proizvajali HCN, sev RR 2-2 najbolj zaviral rast, P 1-7 pa najmanj (slika 21). Od sevov, ki so proizvajali HCN, sta seva RR 2-4 in RR 2-7 najbolj zavirala rast, najmanj pa RR 2-13 in RR 2-14. Slednja seva in sev P 1-1 so bolj zavirali rast na gojišču brez glicina. Sevi, ki niso proizvajali HCN, so v tem primeru uspešneje zavirali rast gliv kot tisti, ki so. Vsi sevi so zavirali rast za 50 % ali več.



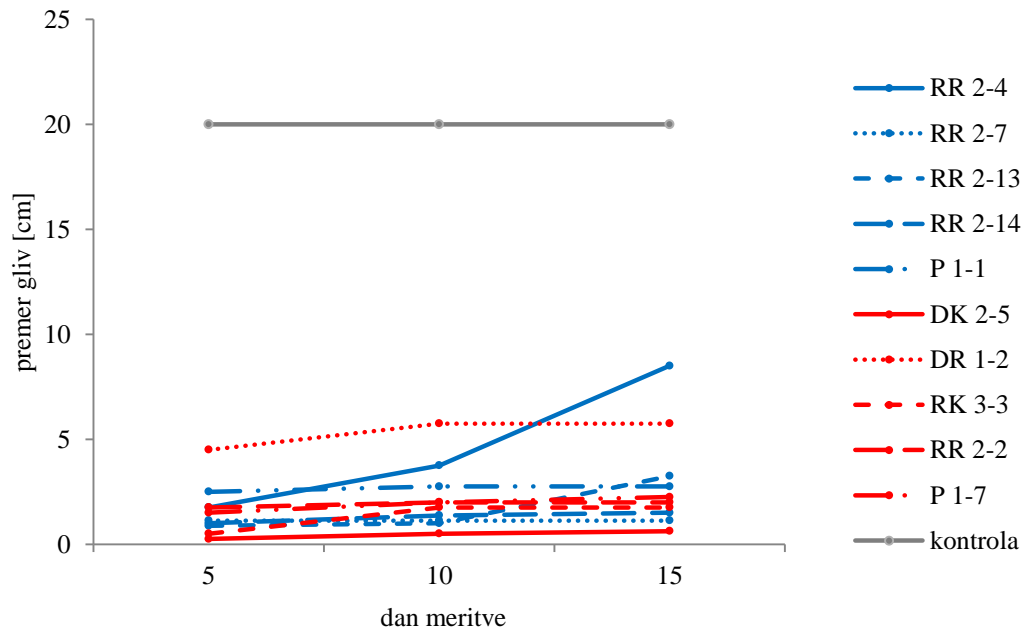
Slika 21: Rast glive *Fusarium graminearum* na gojišču LB z glicinom 5., 10. in 15. dan rasti v prisotnosti bakterijskih sevov. Producenti HCN so označeni modro, preostali sevi rdeče. Prikazana je povprečna vrednost ($n = 4$). DK - površina korenin alpske velese, DR - rizosfera alpske velese, RK - površina korenin ščitaste kislice, RR - rizosfera ščitaste kislice, P - površina gole kamninske podlage, števila 1 do 3 - lokacija, števila 1 do 14 - zaporedna številka seva.

Pri poskusih z glivo *Fusarium moniliforme* na gojiščih LB smo ugotovili, da so bili vsi sevi, ne glede na proizvodnjo HCN, podobno uspešni pri zatiranju rasti glive, in sicer za 50 % ali več (slika 22). Najuspešnejši pri tem je bil sev P 1-1, ki je proizvajal HCN. Od sevov, ki so proizvajali HCN, so najslabše zavirali rast RR 2-4, RR 2-7 in RR 2-14. Iz skupine sevov, ki niso proizvajali HCN, sta najbolj zavirala rast glive seva DR 1-2 in RK 3-3. Iz te skupine je najmanj zaviral rast glive sev RR 2-2.



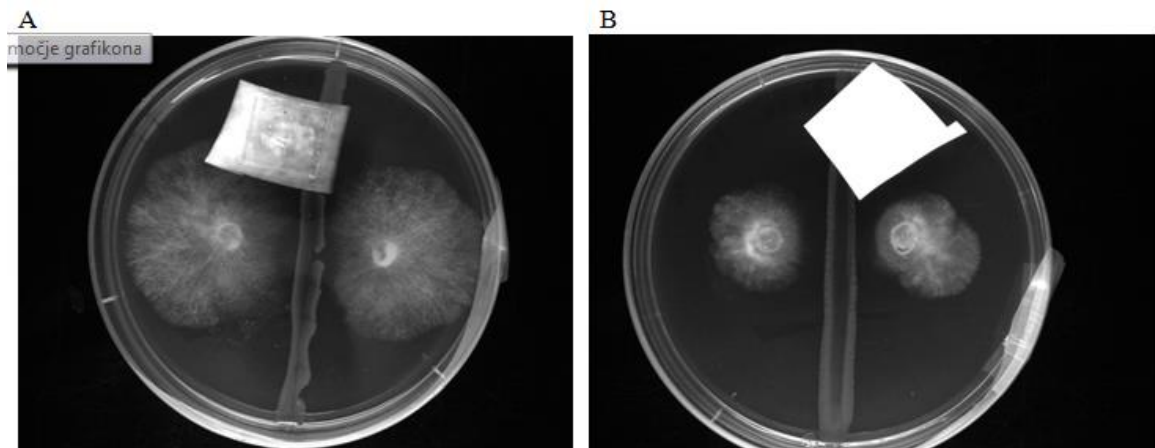
Slika 22: Rast glive *Fusarium moniliforme* na gojišču LB 5., 10. in 15. dan rasti v prisotnosti bakterijskih sevov. Producenti HCN so označeni modro, preostali sevi rdeče. Prikazana je povprečna vrednost ($n = 4$). DK - površina korenin alpske velese, DR - rizosfera alpske velese, RK - površina korenin ščitaste kislice, RR - rizosfera ščitaste kislice, P - površina gole kamninske podlage, števila 1 do 3 - lokacija, števila 1 do 14 - zaporedna številka seva.

Sevi so bili pri zaviranju rasti glive *Fusarium moniliforme* uspešnejši na gojišču LB z glicinom (slika 23). Tudi v tem primeru so, ne glede na proizvodnjo HCN, vsi sevi podobno zavirali rast, večina za več kot 75 %. Najuspešnejši sev pri tem je bil DK 2-5, iz skupine, ki ni proizvajala HCN. Iz te skupine je najmanj zaviral rast sev DR 1-2. Iz skupine sevov, ki so proizvajali HCN, je najmanj zaviral rast glive sev RR 2-4, najbolj pa RR 2-7.



Slika 23: Rast glive *Fusarium moniliforme* na gojišču LB z glicinom 5., 10. in 15. dan rasti v prisotnosti bakterijskih sevov. Producenti HCN so označeni modro, preostali sevi rdeče. Prikazana je povprečna vrednost (N = 4). DK - površina korenin alpske velese, DR - rizosfera alpske velese, RK - površina korenin ščitaste kislice, RR - rizosfera ščitaste kislice, P - površina gole kamninske podlage, števila 1 do 3 - lokacija, števila 1 do 14 - zaporedna številka seva.

Da bi preverili zgornje rezultate, smo nastavili še drugi poskus z dvema agarjevima čepkoma z glivo, med njima pa sev. V nekatere petrijevke smo nastavili barvni indikator iz testa sinteze HCN s preprosto kolorimetrično reakcijo (slika 24). Noben sev, ki smo ga označili kot sev brez sinteze HCN, med poskusom ni proizvajal HCN. Tisti, ki smo jih označili kot seve z največjo sintezo HCN, so proizvajali HCN. Za vse seve pri obeh glivah smo potrdili, da bolj zavirajo rast gliv, če je v gojišču glicin, ne glede na to, ali sevi proizvajajo HCN ali ne. Vsi so zatirali podobno.



Slika 24: Primerjava rasti glive *Fusarium graminearum* na gojišču LB z glicinom 3. dan rasti. (A) Sev P 1-1, obarvan indikatorski listič kaže, da sev sintetizira HCN. (B) Sev DR 1-2, indikatorski listič ni obarvan, ker sev ne proizvaja HCN.















Na podlagi izračunov t-testa nismo mogli zavrniti domneve, da med sevi, ki so proizvajali HCN, in sevi, ki niso cianogeni, ni razlike v zaviranju rasti gliv, saj razlika ni bila statistično značilna. To je veljalo za obe vrsti gliv. Smo pa ugotovili, da sta pri poskusu z glivo *Fusarium moniliforme* obe skupini sevov bolj zavirali rast glive na gojišču LB z glicinom kot na gojišču LB brez glicina. Razlike za te meritve so bile statistično značilne pri stopnji značilnosti $\alpha \leq 0,05$ (preglednica 5).

Preglednica 5: Vrednosti α pri primerjavi zaviranja rasti gliv rodu *Fusarium*; ns – razlika ni statistično značilna ($\alpha > 0,05$).

Primerjava med HCN-pozitivnimi in HCN-negativnimi sevi				
gojišče	čas rasti			
	5 dni		15 dni	
	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
LB	ns	ns	0,1	0,1
LB z glicinom	ns	ns	ns	ns
Primerjava med gojiščema LB in LB z glicinom				
test HCN	čas rasti			
	5 dni		15 dni	
	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
pozitiven	ns	0,025	ns	0,01
negativen	ns	0,05	0,1	0,005

4.5 FILOGENETSKA ANALIZA

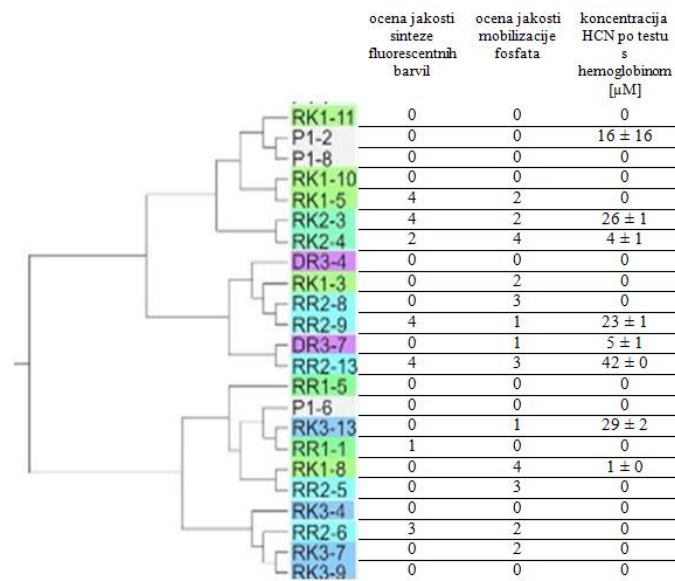
Na podlagi analize profilov BOX smo določili filogenetsko sorodnost izoliranih bakterijskih sevov. Filogenetsko drevo izoliranih bakterij je sestavljeno iz 5 večjih skupin med seboj sorodnih sevov (priloga G). Za lažjo primerjavo smo seve alpske velese obarvali z rumeno-rdeče-vijoličastimi barvami, seve ščitaste kislice z zeleno-modrimi barvami in seve, izolirane s površine kamninske podlage, z belo in s sivo barvo. Pri tem so sevi s površine korenin in iz rizosfere posamezne rastline obarvani z različnimi odtenki podobne barve (slika 25).

DK1		RK1		P1	
DR1		RR1		P2	
DK2		RK2		P3	
DR2		RR2			
DK3		RK3			
DR3					

Slika 25: Legenda filogenetskega drevesa bakterijskih sevov. DK – sevi s površine korenin alpske velese, DR – sevi iz rizosfere alpske velese, RK – sevi s površine korenin ščitaste kislice, RR – sevi iz rizosfere ščitaste kislice, P – sevi s površine gole kamninske podlage.

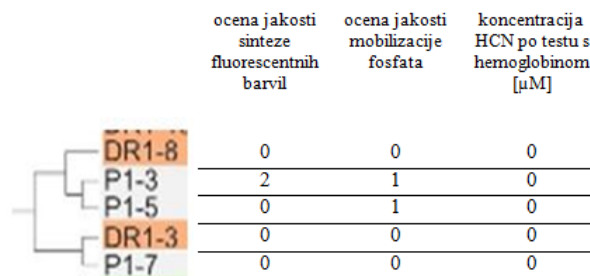
Celotno filogenetsko drevo je zaradi lažje predstavljenosti razdeljeno na 5 večjih, sorodnih skupin po razvejitvah (priloga G).

Skupina A, ki se loči od drugih na prvi razvejitvi, se najbolj gensko razlikuje od preostalih sevov (slika 26). Večinoma jo sestavljajo sevi, izolirani iz ščitaste kislice, ki na drugi razvejitvi te skupine tvorijo največjo gručo z 9 sevi. V skupini so tudi 2 seva iz rizosfere alpske velese z lokacije 3 in 3 sevi s površine gole kamninske podlage z lokacije 1. V gruči ni vidno, da bi se gensko razlikovali sevi glede na izvor iz rizosfere ali s površine korenin ali da bi si bili sevi istega primerka rastline podobni.



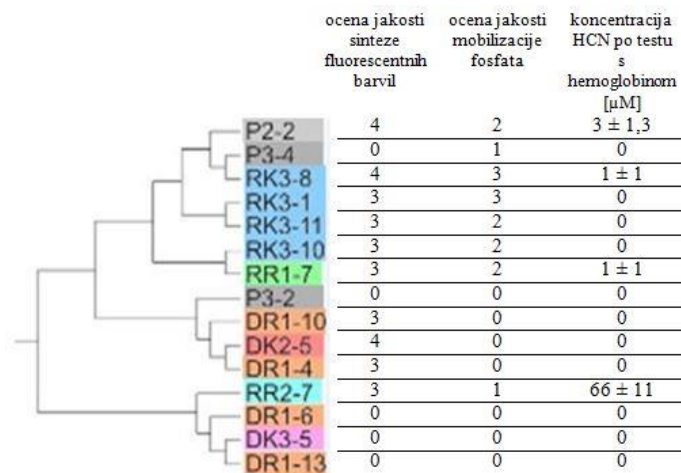
Slika 26: Filogenetsko drevo skupine A. DR - rizosfera alpske velese, RK - površina korenin ščitaste kislice, RR - rizosfera ščitaste kislice, P - površina gole kamninske podlage, števila 1 do 3 - lokacija, števila 1 do 14 - zaporedna številka seva.

Pri drugi razvejitvi (slika 27) tvorijo manjšo skupino B sevi iz rizosfere alpske velese in s površine kamninske podlage.



Slika 27: Filogenetsko drevo skupine B. DR - rizosfera alpske velese, P - površina gole kamninske podlage, število 1 - lokacija, števila 3 do 8 - zaporedna številka seva.

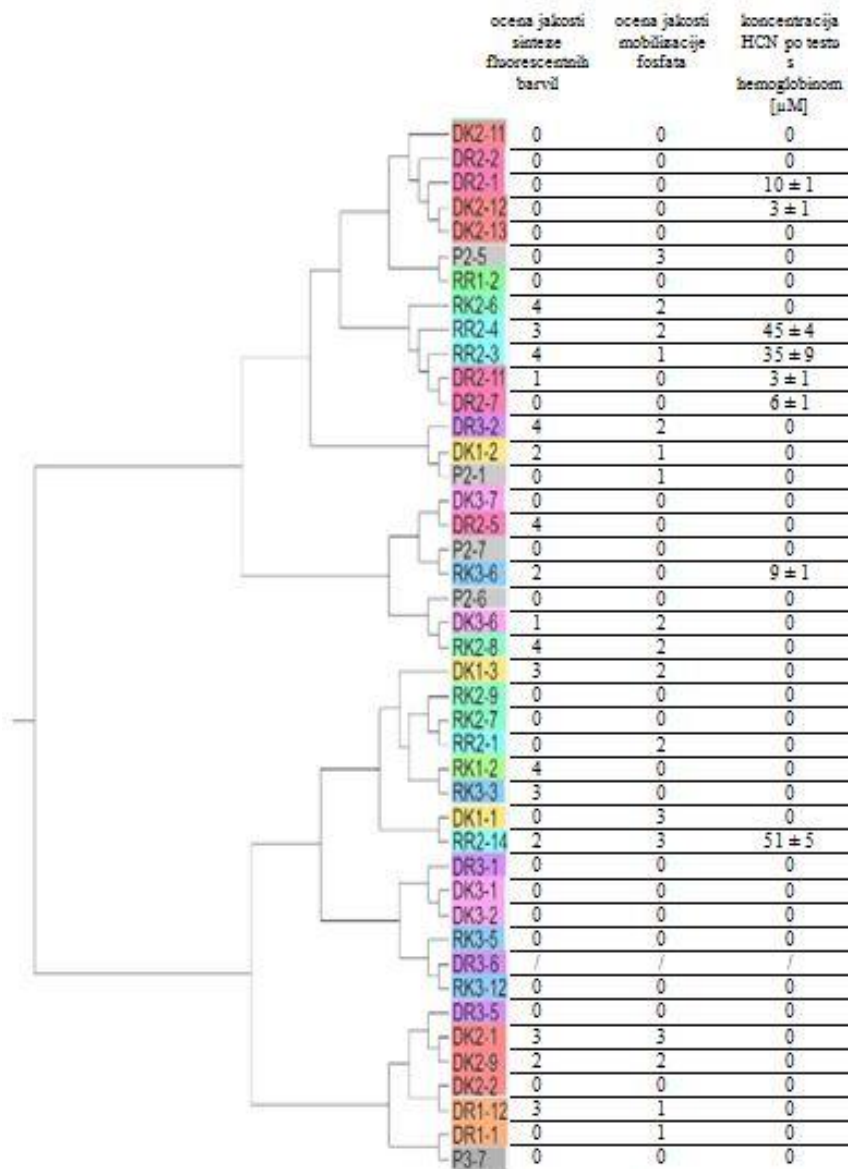
Na tretji razvejitvi (slika 28) so jasno vidne gruče sevov, izoliranih s površine kamninske podlage, sevov ščitaste kislice in dve gruči sevov, izoliranih iz alpske velese (skupina C). Spet v gručah ni vidno, da bi se gensko razlikovali izolati s površine korenin in izolati iz rizosfere ter s površine korenin ali pa da bi si bili sevi istega primerka rastline podobni.



Slika 28: Filogenetsko drevo skupine C. DK - površina korenin alpske velese, DR - rizosfera alpske velese, RK - površina korenin ščitaste kislice, RR - rizosfera ščitaste kislice, P - površina gole kamninske podlage, števila 1 do 3 - lokacija, števila 1 do 14 - zaporedna številka seva.

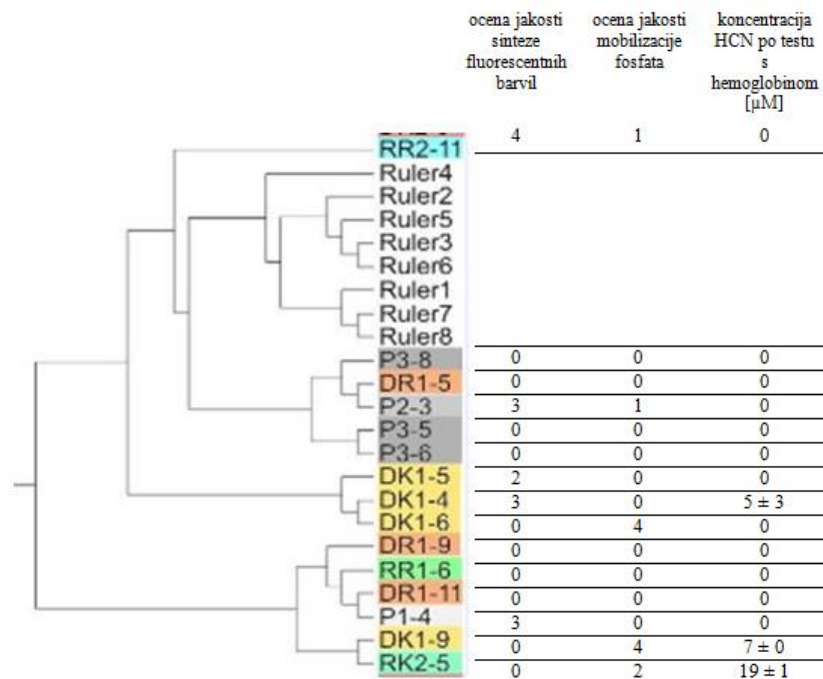
Na četrti razvejitvi se drevo razveji na dve sestrski skupini, ki ju sestavljajo skupina D ter sestrski skupini E in F.

Skupino D sestavljajo gruče sevov, izoliranih iz alpske velese, in gruče sevov iz ščitaste kislice (slika 29). V teh gručah se ponekod pojavljajo sevi s površine kamninske podlage. V nekaterih gručah lahko opazimo, da so si sevi po izvoru iz rizosfere ali s površine korenin bolj sorodni. Enako velja tudi, če so izolirani iz iste rastlinske vrste ali iz istega primerka rastline.



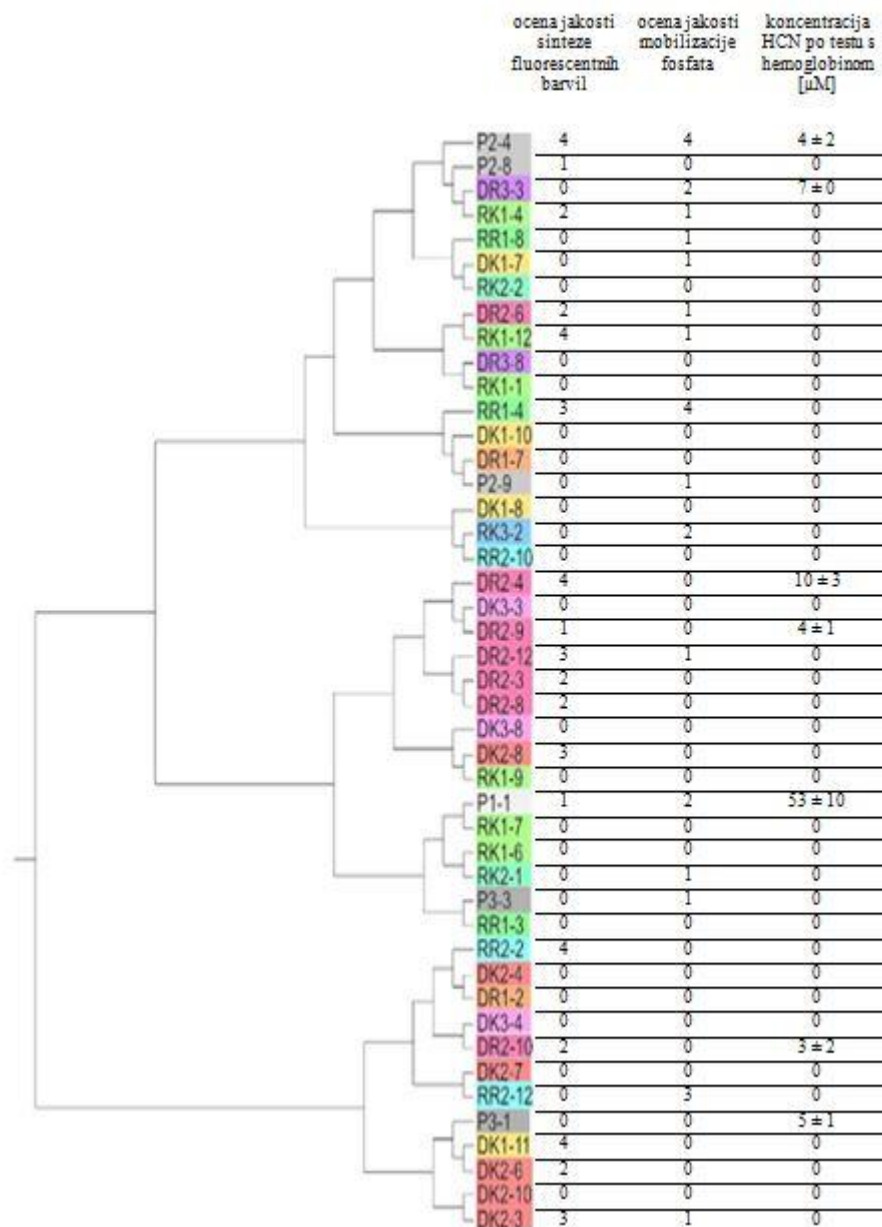
Slika 29: Filogenetsko drevo skupine D. DK - površina korenin alpske velese, DR - rizosfera alpske velese, RK - površina korenin ščitaste kislice, RR - rizosfera ščitaste kislice, P - površina gole kamninske podlage, števila 1 do 3 - lokacija, števila 1 do 14 - zaporedna številka seva.

Skupino E sestavljajo sevi iz obeh rastlin in s površine kamninske podlage (slika 30). Sevi, izolirani s površine kamninske podlage, in sevi s površine korenin alpske velese z lokacije 1 sestavljajo dve gruči.



Slika 30: Filogenetsko drevo skupine E. DK - površina korenin alpske velese, DR - rizosfera alpske velese, RK - površina korenin ščitaste kislice, RR - rizosfera ščitaste kislice, P - površina gole kamninske podlage, števila 1 do 3 - lokacija, števila 1 do 14 - zaporedna številka seva.

Skupino F sestavljajo večinoma sevi, izolirani iz alpske velese (slika 31). Ti sestavljajo tri gruče, največja šteje 8 sevov. Vmes so sevi, izolirani iz ščitaste kislice in s površine kamninske podlage. Pri dveh gručah vidimo, da so sestavljene le iz sevov, izoliranih iz korenin ali pa samo iz rizosfer istega primerka rastline.



Slika 31: Filogenetsko drevo skupine F. DK - površina korenin alpske velese, DR - rizosfera alpske velese, RK - površina korenin ščitaste kislice, RR - rizosfera ščitaste kislice, P - površina gole kaminske podlage, števila 1 do 3 - lokacija, števila 1 do 14 - zaporedna številka seva.

Ob pregledu celotnega filogenetskega drevesa je razvidno, da se izolirani sevi iz ščitaste kislice kar precej gensko razlikujejo od sevov alpske velese, saj tvorijo dve veliki gruči, ki se ločita že pri prvi razvejitvi. Sevi se gensko manj razlikujejo, če primerjamo, ali so izolirani s površine korenin ali iz rizosfere. Pri primerjavi izolatov po posamičnih rastlinah ne moremo trditi, da so najbolj sorodni sevi, izolirani iz posamične rastline, ker so rezultati zelo različni. Na primer sevi alpske velese z lokacije 3 so razkropljeni po celotnem drevesu in ne tvorijo večje gruče, sevi alpske velese z lokacije 2 pa tvorijo več gruč, ki se med seboj razlikujejo tudi po izvoru (iz rizosfere ali s površine korenin). Sevi, izolirani s

površine kamninske podlage, se ne razlikujejo veliko od drugih sevov, saj ne tvorijo posebne skupine. Sevi ne sestavljajo večjih gruč, tudi če jih primerjamo po sintezi HCN, mobilizaciji PO_4 , niti po fluoresciranju. Le 13 sevov od 145 je bilo takšnih, da so sintetizirali HCN, mobilizirali fosfat in proizvajali fluorescentna barvila. Razporejeni so po celotnem filogenetskem drevesu, kar pomeni, da si med sabo niso zelo sorodni. Več je sevov, ki so mobilizirali fosfat in proizvajali fluorescentna barvila. Takšnih je 23 in tvorijo majhne gruče, ki so razporejene po celotnem drevesu. Med njimi najbolj izstopa gruča sevov, izoliranih s površine korenin ščitaste kislice 3 skupine C, kjer ima 5 sevov zelo podobne ocene mobilizacije fosfata in tvorjenja barvil (slika 28). Ocene se razlikujejo le za eno vrednost.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Preverjanje lastnosti izolatov

Rizosferne bakterije in bakterije s površine korenin (rizoplan) imajo pogosto lastnosti in sposobnosti, ki pomagajo rastlinam pri rasti, zato je bilo narejenih mnogo raziskav, da bi takšne bakterije lahko uporabili v kmetijstvu za izboljšanje rasti kulturnih rastlin in pridelka (Ahmad in sod., 2008; Ambrosini in sod., 2012). V diplomskem delu smo raziskali rizosferne bakterije in bakterije s površine korenin pionirskih rastlin alpskih melišč. Da bi izvedeli, kako se razlikujejo rizosferni sevi, sevi s površine korenin, prostoživeči sevi in sevi različnih pionirskih vrst rastlin, smo preverili njihove lastnosti, kot so izločanje HCN, izločanje fluorescentnih barvil in mobilizacija fosfata. Pričakovali smo, da bodo deleži sevov s temi lastnostmi manjši pri prostoživečih sevih kot pri sevih s površine korenin in iz rizosfere, saj je gostota mikroorganizmov zaradi rastlinskih izločkov tik ob rastlinah večja in morajo bolj tekmovati za življenjski prostor in hranila (Baudoin in sod., 2003). Po analizi rezultatov smo ugotovili, da to ne velja za vse lastnosti izoliranih bakterijskih sevov.

Za ugotavljanje sinteze vodikovega cianida smo uporabili dve metodi, in sicer test sinteze HCN s kolorimetrično reakcijo z barvnim indikatorjem in test HCN s hemoglobinom. Pri prvem testu smo zaznali 16 cianogenih sevov (priloga D), pri drugem pa 30 (prilogi E1 in E2). Testa sta se ujemala pri zaznavi šestih najbolj cianogenih sevov. Štirje so bili izolirani sevi iz rizosfere ščitaste kislice z lokacije 2, eden s površine gole kamninske podlage z lokacije 1 in eden s površine korenin ščitaste kislice z lokacije 2 (slika 14). Pri testu z barvnim indikatorjem smo zaznali manj sevov, ker je test semikvantitativen, manj občutljiv in ni toliko natančen (Castric in Castric, 1982). Zaradi majhnih količin sestavin je težko zagotoviti natančnost pri odmerjanju, pride do šibkejše cianidne reakcije in posledično so rezultati slabo vidni (Castric in Castric, 1982). Čeprav je test z barvnim indikatorjem nenatančen, je hitrejši kot test s hemoglobinom, saj zahteva manj priprav. Zato je primeren za hitro zaznavanje močno cianogenih bakterij. Za določanje natančnega števila cianogenih bakterij in količine pridelanega HCN je primernejši test s hemoglobinom.

Z analizo rezultatov testa HCN s hemoglobinom smo ugotovili, da je 30 od 145 izoliranih sevov proizvajalo HCN (21 %). Največji delež cianogenih sevov so imeli sevi ščitaste kislice (25 %), manj jih je bilo med sevi površine gole kamninske podlage (20 %), najmanj (17 %) pa med sevi alpske velese (slika 15), kar našo hipotezo, da bo največ cianogenih sevov v neposredni bližini rastlin, delno zavrne. Ti rezultati potrjujejo, da ima zaradi

izločkov, ki jih izločajo rastlina in bakterije, vsaka vrsta rastline v svoji rizosferi določene seve ali vrste bakterij (Zeller in sod., 2007). Na količino cianogenih bakterij v rizosferi in na površini korenin bi lahko vplivala tudi rast korenin. Alpska velesa in ščitasta kislica imata različno, kar ustvarja različna habitata za bakterije. Velesa ustvarja humusne otočke na površju melišč, kar pomeni, da ima korenine blizu površine kamninske podlage, kislica pa ima lesnato korenino, ki seže globoko do humusa ki ga prekriva grušč (Hegi in sod., 1980). To pomeni, da imata koreninska sistema med drugim tudi različen dostop do hranil, kar pa vpliva na izločke bakterij (Frey in sod., 2010; Duffy in Defago, 1999).

Pri primerjavi deležev cianogenih sevov glede na rizosfero, površino korenin ali kamninsko podlago smo ugotovili, da je največ cianogenih sevov izhajalo iz rizosfere (28 %), manj s površine gole kamninske podlage (20 %) in najmanj (15 %) s površine korenin (slika 15). S tem potrjujemo, kar je že znano iz več raziskav, da je delež cianogenih bakterij v rizosferi večji kot na površini kamninske podlage zaradi večje gostote mikroorganizmov, s katerimi morajo tekrovati za hranila (Baudoin in sod., 2003). Verjetno je tudi, da je delež cianogenih bakterij na površini korenin najmanjši, da ne bi škodili koreninam gostiteljske rastline s strupenim HCN. Iz literature je razvidno, da rizosferne cianogene bakterije in cianogene bakterije s površine korenin ne škodijo svojim gostiteljem, ker proizvajajo majhne količine HCN in uravnavajo njegovo sintezo (Rudrappa in sod., 2008). Rastline imajo na mikroorganizme, ki so na koreninah, večji vpliv kot na tiste v rizosferi. Ne vplivajo na vrsto in tip sevov, ampak na njihovo številnost (Azad in sod., 1985). Mogoče je, da so se rastline tudi tako zavarovale proti strupenemu HCN, ko so se razvijale (koevoluirale) skupaj s cianogenimi bakterijami.

V enakem vrstnem redu si sevi sledijo tudi po skupni količini proizvedenega HCN. Največ HCN so proizvedli sevi iz rizosfere, najmanj pa s površine korenin. Vendar ti rezultati niso dovolj zanesljivi, ker je sinteza HCN odvisna od sinteze HCN, ki deluje optimalno na prehodu iz eksponentne v stacionarno fazo (Castric in sod., 1979). Kulture so bile v času merjenja različnih gostot in v različnih fazah rasti, kar je morda pomembno vplivalo na skupno količino proizvedenega HCN. Kulture z večjo gostoto so vsebovale manj HCN (slika 14).

Pri raziskavi mobilizacije fosfata smo pričakovali potrditev naše hipoteze, še posebej zato, ker je fosfat zaradi netopnosti velikokrat omejujoč dejavnik rasti, mikroorganizmi pa so njegovi najpomembnejši mobilizatorji (Alden in sod., 2001; Kucey, 1983). Od 145 sevov je fosfat mobiliziralo 43 % (priloga C). Pri večini takšnih sevov (17 %) so bile čistine slabo vidne in majhnega premera, kar pomeni, da so sevi mobilizirali malo fosfata (slika 10). Največje in najvidnejše čistine so bile pri najmanjšem številu sevov (4 %). Hipotezo, da bo največ sevov, ki mobilizirajo fosfat, v neposredni bližini rastlin, smo delno zavrnil, saj je fosfat mobiliziralo 61 % sevov ščitaste kislice, 44 % sevov s površine gole kamninske podlage in le 27 % sevov alpske velese (slika 12). Samo sevi ščitaste kislice so imeli

najvišji delež sevov v rangu srednje močne mobilizacije fosfata, preostali pa v rangu šibke mobilizacije. Znova smo potrdili, da ima vsaka vrsta rastline v svoji rizosferi določene seve ali vrste bakterij (Zeller in sod., 2007). Potrdili smo tudi, da bi lahko način rasti ter struktura korenin vplivala na količino bakterij z nekaterimi lastnostmi v rizosferi in na površini korenin, v tem primeru na količino mobilizatorjev fosfata (Hegi in sod., 1980).

Večje razlike v deležih sevov s površine korenin, iz rizosfere in s površine gole kamninske podlage, ki so mobilizirali fosfat, ni. Mobiliziralo ga je 44 % sevov s površine korenin, 44 % sevov s površine gole kamninske podlage in 41 % sevov iz rizosfere (slika 12). Sevi, izolirani s površine korenin, so bili pri mobilizaciji fosfata boljši, saj so imeli največji delež sevov v rangu s srednje močno mobilizacijo. Seva s površine korenin ščitaste kislice z lokacije 2 in s površine korenin alpske velese z lokacije 1 sta ustvarila največji in najvidnejši čistini. Preostali skupini sta imeli največji delež sevov v rangu šibke mobilizacije fosfata. Ob mikrobnih mobilizacijah fosfatov se poveča tudi sprejem fosfatov pri rastlinah, zato bi pomislili, da jih morajo bakterije iz rizosfere in s površine korenin več mobilizirati (Raj in sod., 1981). Mogoče je vzrok, da ni razlik med deleži, ta, da bakterije mobilizirajo več fosfata, kot ga potrebujejo, in ga zato v bližini rastlin ni treba mobilizirati v večjih količinah. Še boljši mobilizator fosfata so glive in morda bolj doprinesejo k oskrbi gostiteljske rastline s fosfatom (Kucey, 1983).

Raziskali smo tudi izločanje pioverdinskih sideroforov oziroma sintezo fluorescentnih barvil pri izoliranih sevih. Siderofori so vir železa v tleh in izboljšujejo njeno kakovost (Jurkevitch in sod., 1992). Bakterije, ki izločajo siderofore, z njimi vežejo železo iz rizosfere. Tako postane železo nedostopno za rastlinske patogene, kar preprečuje njihovo rast (Kloepper in sod., 1980). V raziskavi smo ugotovili prisotnost fluorescentnih psevdomonad v vzorcu, saj je iz literature znano, da je proizvodnja pioverdina njihova posebnost (Shalk in Guillon, 2013). Od 145 testiranih izoliranih sevov je 40 % proizvajalo fluorescentna barvila (priloga A). Večina sevov je spadala v ranga močne in najmočnejše sinteze fluorescentnih barvil (slika 7). V tem primeru smo potrdili hipotezo, da sevi s površine korenin in iz rizosfere zaradi tekmovanja tvorijo več sideroforov kot prstoživeči sevi, saj je fluorescentna barvila proizvajalo 46 % sevov ščitaste kislice, 39 % sevov alpske velese in le 29 % sevov s površine gole kamninske podlage (slika 9). Pri tem je bila večina sevov ščitaste kislice v rangu najmočnejše sinteze fluorescentnih barvil, večina sevov alpske velese v rangu močne sinteze barvil, prstoživeči sevi pa so bili enakomerno porazdeljeni po rangih s šibko, z močno in najmočnejšo sintezo barvil. Ščitasta kislica in alpska velesa imata v rizosferi in na površini korenin različno količino bakterij, ki izločajo siderofore, kar znova dokazuje, da ima vsaka rastlina takšne seve in toliko sevov, ki izločajo izločke v rizosferi in na površinah korenin kot ji odgovarja (Zeller in sod., 2007).

Tudi pri primerjavi sevov iz rizosfere, s površine korenin in površine gole kamninske podlage smo zaznali, da so slednji v najmanjšem številu proizvajali fluorescentna barvila.

Barvila so v največjem deležu (46 %) proizvajali sevi iz rizosfere. Manj (39 %) so jih proizvajali sevi s površine korenin (slika 9). Bakterijski siderofori imajo največjo afiniteto do železa (Loper in Henkels, 1999). Nekatere psevdomonade so sposobne izkoriščati tudi siderofore drugih mikrobov (Loper in Henkels, 1999), zato so močan tekmeč v boju za železo, kar je slabo za rastline. Ker rastline bolj uravnavajo številnost mikrobov na koreninah kot v rizosferi, je lahko to vzrok, da je delež bakterij, ki izločajo siderofore, večji v rizosferi kot na koreninah. Obe vrsti rastlin sta imeli največji delež sevov v rangih močne in najmočnejše sinteze fluorescentnih barvil. Največ sevov iz rizosfere ščitaste kislice z lokacije 2 je tvorilo močna barvila, največ sevov iz rizosfere alpske velese z lokacije 2 je izločalo barvila, vendar ta niso bila tako močna. Zanimivo je, da sta najmočnejša barvila izločila seva, izolirana s površine gole kamninske podlage, P 2-2 in P 2-4.

Če povzamemo rezultate in podatke v omenjenih virih, lahko ugotovimo, da za vse tri merjene lastnosti (sinteza HCN, fluorescentnih barvil in mobilizacija fosfata) velja, da na količino sevov z določenimi lastnostmi v rizosferi in na površini korenin vpliva vrsta rastline, ker so različne vrste rastlin različno tolerantne za izločke (Zeller in sod., 2007). Različna je tudi rast korenin pri različnih vrstah, kar pomeni, da imajo različne vrste različen dostop do hranil, četudi rastejo na istem habitatnem tipu, v našem primeru na apnenčastem melišču (Hegi in sod., 1980). Rezultati v naši raziskavi, ki ugotavlja sintezo HCN in sideroforov, potrjujejo, da rastlina uravnava količino sevov v svoji okolici glede na korist ali strupenost njihovih izločkov (Azad in sod., 1985). Na količino sevov v rizosferi ali na površini korenin in količino prostoživečih sevov z določenimi lastnostmi vpliva gostota mikroorganizmov zaradi tekmovanja. Na količino sevov z določenimi lastnostmi v rizosferi in na koreninah pa vpliva gostiteljska rastlina.

V več raziskavah je bilo dokazano, da fosfat in železo spodbujata nastanek HCN (Von Rohr in sod, 2009). V svoji raziskavi smo preverili, ali sposobnost mobilizacije fosfata in sinteze fluorescentnih barvil vpliva na sintezo HCN. Od 30 sevov, ki so proizvajali HCN, jih je 18 izločevalo tudi barvila in 19 mobiliziralo fosfat (priloga G). Vse tri lastnosti je imelo 13 sevov, tri s površine gole kamninske podlage, tri s površine korenin ščitaste kislice in sedem iz rizosfere ščitaste kislice. Od teh je bilo kar šest sevov iz rizosfere ščitaste kislice z lokacije 2. Vseh šest sevov, ki so proizvajali največ HCN, je imelo vse tri lastnosti in različno jakost sinteze fluorescentnih barvil ter so različno močno mobilizirali fosfat. Pet sevov je izločalo HCN in mobiliziralo fosfat, šest sevov je izločalo HCN in fluorescentna barvila. Kar 23 sevov je izločalo barvila in mobiliziralo fosfat. Samo HCN sta izločala seva s površine gole kamninske podlage in seva iz alpske velese z lokacije 2. V vsaki skupini je bilo vsaj nekaj sevov, ki niso imeli nobene lastnosti, skupaj jih je bilo 48 (33 % vseh testiranih sevov). Korelacija med sintezo HCN, fluorescentnih barvil in mobilizacijo fosfata je vidna samo pri najmočnejših sevih in tistih, ki so bili izolirani iz ščitaste kislice z lokacije 2, kar je premalo, da bi hipotezo potrdili.

V agronomiji so za biokontrolo in izboljševanje kakovosti tal najboljši sevi, ki imajo največ lastnosti, ki pomagajo rastlinam pri delovanju in rasti (Kumar-Deshwal in Kumar, 2013). Takšni so izolati ščitaste kislice z lokacije 2. Vsi sevi, ki so proizvajali HCN, so bili sposobni mobilizirati fosfat in izločati siderofore, kar pet jih je proizvedlo največ HCN (slika 14).

5.1.2 Filogenetska analiza

Po pregledu lastnosti sevov nas je zanimalo, kakšni so sorodstveni odnosi med njimi. Na podlagi analize profilov BOX smo določili filogenetsko sorodnost izoliranih bakterijskih sevov. Primerjali smo sorodnost sevov po tem, kje so bili izolirani, po proizvodnji HCN, izločanju fluorescentnih barvil in mobilizaciji fosfata. Postavili smo naslednje hipoteze. Ker vrste cianogenih bakterij, ki uspevajo v rizosferi, spadajo večinoma v rodova *Bacillus* in *Pseudomonas* (Ahmad in sod., 2008), smo sklepali da so cianogeni izolirani sevi v sorodstvu. Najbolj sorodni naj bi si bili sevi iz rizosfere in s površin korenin, ker rastline ne vplivajo na vrste ali tipe sevov v svoji rizosferi in na koreninah, ampak le na njihovo gostoto (Azad in sod., 1985). Manj sorodni naj bi si bili sevi alpske velese in ščitaste kislice, ker ima vsaka rastlinska vrsta v svoji rizosferi določene seve ali vrste bakterij (Zeller in sod., 2007). Na strukturo populacije sevov v rizosferi in na površini korenin vplivajo koreninski izločki in struktura korenin. Alpska velesa in ščitasta kislica imata različno rast korenin, velesa ustvarja humusne otočke na površju melišč, kislica pa ima lesnato korenino, ki seže globoko do humusa (Hegi in sod., 1980). Najmanj sorodni naj bi si bili prostoživeči sevi in sevi iz gostiteljskih rastlin, ker živijo v različnih okoljih.

Filogenetsko drevo izoliranih bakterij je sestavljeno iz petih večjih skupin med seboj sorodnih sevov (priloga G). Ob pregledu celotnega filogenetskega drevesa je razvidno, da hipoteze, ki pravi, da so prostoživeči sevi manj sorodni s sevi iz rizosfere in s površine korenin, ne moremo potrditi, saj se sevi, izolirani s površine gole kamninske podlage, ne razlikujejo veliko od drugih sevov, ker ne tvorijo posebne skupine. Večina prostoživečih sevov je bolj sorodna sevom alpske velese kot sevom ščitaste kislice. Verjetno je to zaradi podobnih rastiščnih razmer, saj sta obe skupini sevov s površja melišča. Prostoživeči sevi so s površine gole kamninske podlage, sevi velese pa s površine korenin in iz rizosfere, ki sta blizu površja melišča, saj velesa tvori humusne otočke na površju melišč. Sevi kislice živijo globlje, kajti korenine in rizosfera segajo globoko do humusa (Hegi in sod., 1980). Glede na filogenetsko analizo se gensko najbolj razlikujejo sevi iz ščitaste kislice in sevi iz alpske velese, ker tvorijo dve veliki gruči, ki se ločita že pri prvi razvejitvi (skupini A in F). Toda pri sprejemanju hipoteze moramo biti pazljivi, kajti pri nadaljnji primerjavi sevov glede na izvorno rastlino ne moremo potrditi, da so najbolj sorodni sevi, izolirani iz posamične rastline, ker so rezultati zelo različni. Na primer sevi iz alpske velese z lokacije

3 so razkropljeni po celotnem drevesu in ne tvorijo večje gruče, sevi alpske velese z lokacije 2 pa tvorijo več gruč, ki se med seboj razlikujejo tudi po izvoru iz rizosfere ali s površine korenin. Torej vrste sevov verjetno niso odvisne le od vrste rastline, ampak tudi od njenih različnih rastnih razmer. Sevi se gensko manj razlikujejo, če primerjamo, ali so izolirani s površine korenin ali iz rizosfere, kar potrjuje našo hipotezo. S tem potrjujemo, da imajo rastline večji vpliv na seve na površini korenin, vendar ne vplivajo na vrste ali tipe sevov, ampak na njihovo gostoto (Azad in sod., 1985).

Sevi ne sestavljajo večjih gruč, niti če jih primerjamo po sintezi HCN, mobilizaciji fosfata in tvorjenju fluorescentnih barvil. Le 13 sevov od 145 je bilo takšnih, da so sintetizirali HCN, mobilizirali fosfat in proizvajali fluorescentna barvila. Razporejeni so po celotnem filogenetskem drevesu, kar pomeni, da si med seboj niso zelo sorodni. Več (23) je takšnih, ki so mobilizirali fosfat in proizvajali fluorescentna barvila. Tvorijo majhne gruče, ki so razporejene po celotnem drevesu.

Rezultati niso pokazali kakšne večje genske raznolikosti niti podobnosti pri primerjavi lastnosti, za katere smo mislili, da bi pokazale tesnejšo sorodnost. Lahko bi sklepali, da so si morda vsi testirani izolati v tesnejšem sorodstvu. Namreč pri poskusu merjenja sinteze fluorescentnih barvil smo ugotovili, da je 40 % izoliranih sevov fluorescentnih psevdomonad. Te ne tvorijo posebnih gruč, ampak tvorijo gruče skupaj s sevi, ki niso tvorili fluorescentnih barvil. To lahko pomeni, da večina sevov spada med psevdomonade. Ti, ki tvorijo iste gruče, so lahko tudi iste vrste z različnimi regulacijami, saj bakterije iz rizosfere in s površine korenin uravnavajo sintezo izločkov, da ne škodijo rastlini gostiteljici (Rudrappa in sod., 2008). Morda pa niso v tesnejšem sorodstvu in imajo podobne lastnosti zaradi posebnega habitata, melišča, s katerega so bili izolirani. Na meliščih je erozija močna, vlada suša in hranila so težko dostopna, ker tla še niso razvita, zato morajo biti sevi in rastline sposobni preživeti v substratu, ki je nestabilen in reven s hranili (Tivy, 1993). Da bi potrdili katero od zastavljenih hipotez, bi morali vse izolate natančno določiti.

5.1.3 Potencial sevov za zaviranje rasti

Več raziskav je pokazalo, da so cianogene bakterije zaradi sinteze HCN uspešne pri zatiranju rasti fitopatogenih gliv in bakterij (Defago in sod., 1990; Viosard in sod., 1989; Haas in Defago, 2005). Tudi mi smo preizkusili seve, izolirane v naši raziskavi. Za ta poskus smo izbrali bakterijske seve na podlagi testa HCN s hemoglobinom in glede na lokacijo seva. Izbrali smo pet sevov, ki so proizvajali največ HCN, in pet takšnih, za katere je bila največja možnost, da ne proizvajajo HCN. Pri tem smo pazili, da so bili sevi, ki ne proizvajajo HCN, izolirani iz različnih rastlinskih vrst, iz rizosfere, s površine korenin, s površine kamninske podlage in z različnih lokacij. Sposobnost sevov za zatiranje rasti smo

preizkusili na kmetijsko pomembnih rastlinskih patogenih bakterijah *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* ter glivah *Fusarium moniliforme* in *Fusarium graminearum*. Postavili smo hipotezo, da bodo izolirani sevi, ki so proizvedli največ HCN, najbolj zatirali rast patogenov, zlasti na gojiščih z glicinom, ker ima glicin največji vpliv pri stimulaciji proizvodnje HCN (Viosard in sod., 1983).

Pri poskusu s patogenimi bakterijami smo pričakovali, da bodo na konfluentni rasti patogenih sevov ob jamicah z izoliranimi sevi vidne čistine. Po tednu spremljanja rasti nismo opazili čistin, kar pomeni, da izolirani sevi niso zavirali rasti bakterijskih patogenov. Hipotezo, da cianogeni sevi zavirajo rast bakterij *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Pseudomonas syringae* pv. *Coronafaciens*, smo zavrnili.

Pri poskusu s patogenimi glivami smo opazili, da so vsi izbrani sevi zavirali rast gliv (priloga F). Pri zaviranju glive *Fusarium graminearum* na gojišču brez glicina so bili uspešnejši sevi, ki so proizvajali HCN, zlasti seva, ki sta ga proizvedla največ (slika 20). Na gojišču z glicinom so bili pri tem uspešnejši sevi, ki niso proizvajali HCN (slika 21). Od sevov, ki so proizvajali HCN, sta rast najbolj zavirala seva, ki sta proizvedla manj HCN. Razlike v rasti glive *Fusarium graminearum* v nobenem primeru niso bile statistično značilne. Pri poskusih z glivo *Fusarium moniliforme* na gojiščih brez glicina smo ugotovili, da so bili vsi sevi, ne glede na sintezo HCN, podobno uspešni pri zaviranju njene rasti (slika 22). Na gojišču z glicinom so bili sevi pri zaviranju rasti uspešnejši kot na gojišču brez glicina (slika 23). Tudi v tem primeru so vsi sevi, ne glede na sintezo HCN, podobno zavirali rast gliv. Najuspešnejši sev, ki je zaviral rast glive, je bil iz skupine, ki ni sintetizirala HCN. Najmanj je zaviral rast sev iz skupine, ki je proizvajala HCN. Pri primerjavi zaviranja rasti glive *Fusarium moniliforme* glede na proizvodnjo HCN med sevi ni bilo statistično značilnih razlik, bile pa so pri primerjavi zaviranja rasti glive glede na vrsto gojišča. Te rezultate je potrdil tudi drugi poskus z agarjevima čepkoma z glivo, med katera smo nacepili izbrani bakterijski sev. V nekatere petrijevke smo nastavili barvni indikator iz testa sinteze HCN s preprosto kolorimetrično reakcijo. Noben sev iz skupine sevov, ki niso proizvajali HCN, med poskusom ni proizvajal HCN. So ga pa proizvajali tisti, ki smo jih označili kot seve, ki so proizvajali HCN. Hipotezo, da HCN zavira rast gliv, smo zavrgli.

Vsi rezultati kažejo, da na zaviranje rasti gliv ni vplival HCN, ampak glicin. Ta bi lahko bil prekurzor za katero drugo snov, ki so jo izločali izolirani sevi in je zavirala rast gliv (Saharan in Nehra 2011). Takšna snov bi lahko bili antibiotiki. Nekatere raziskave so dokazale, da je za zaviranje rasti gliv dovolj že, če lahko bakterije prej porabijo hranila v gojiščih kot glive (Nourozian in sod., 2006). Glede na to bi lahko sklepali, da glicin morda pospešuje metabolizem bakterij. Treba bi bilo narediti dodatne raziskave, da bi izvedeli,

katere snovi so izločali sevi, ali so zavirale rast gliv in kakšna je vloga glicina pri zaviranju rasti gliv, če ni vključen v izdelavo HCN.

5.2 SKLEPI

- Sevi iz rizosfere ščitaste kislice z lokacije 2 so proizvedli največ HCN, mobilizirali največ fosfata in izločili največ sideroforov.
- Bakterijsko izločanje sideroforov je večje pri večji gostoti organizmov zaradi medsebojnega tekmovanja, odvisno je tudi od rastline gostiteljice.
- Od rastline gostiteljice je odvisno, koliko fosfata mobilizirajo bakterije. Deleži sevov iz rizosfere, s površine korenin in površine gole kamninske podlage, ki mobilizirajo fosfat, so podobni.
- Količina HCN, ki ga proizvajajo bakterije, je odvisna od rastline gostiteljice in njene občutljivosti za HCN.
- Med proizvodnjem HCN, tvorbo sideroforov in mobilizacijo fosfatov ni soodvisnosti.
- Sevi, pri katerih smo testirali njihov potencial za biokontrolo, niso primerni za zaviranje rasti bakterij. Primerni so za zaviranje rasti gliv, vendar ne zaradi proizvedenega vodikovega cianida.
- Prostoživeči sevi se gensko ne razlikujejo veliko od simbiotskih sevov. Sevi iz rizosfere in s površine korenin so gensko sorodni. Sevi se najbolj gensko ločijo glede na vrsto rastline gostiteljice.
- Proizvajanje HCN, fluorescentnih barvil in mobilizacija fosfata niso povezani z gensko sorodnostjo izoliranih sevov.

6 POVZETEK

Vodikov cianid je sekundarni metabolit cianogenih bakterij. Zaradi njegove strupenosti se jih plenilci izogibajo, njegova kislost pospešuje raztapljanje kamnin in s tem omogoča dostop do hranil, obe lastnosti pa jim koristita pri tekmovanju za življenjski prostor in hranila. Veliko rastlinskih vrst je uspešnejših, če imajo v rizosferi in na koreninah (rizoplan) cianogene bakterije. HCN povečuje dostopnost hranil tudi za gostiteljsko rastlino in preprečuje kolonizacijo patogenih mikroorganizmov na koreninah. Nekatere cianogene bakterije poleg HCN izločajo tudi druge snovi za izboljšanje življenjskega okolja. Take bakterije še bolj pospešujejo rast rastlin in na račun uspešnejšega antagonizma zavirajo rast drugih mikrobov. V nalogi smo preučili lastnosti producentov HCN izoliranih s površine korenin imenovane rizoplan ter rizosfere ščitaste kislice (*Rumex scutatus* L.) in alpske velese (*Dryas octopetala* L.) ter s kamninske podlage melišča na južni strani Krnskega jezera. Predpostavili smo, da rizosferni sevi, sevi iz rizoplana in prostoživeči izolirani sevi proizvajajo HCN, izločajo siderofore in raztapljajo fosfat. Ker je v rizosferi in rizoplanu več mikroorganizmov, ki tekmujejo za življenjski prostor in hranila smo predpostavili, da proizvajajo rizosferni producenti in producenti iz rizoplana več HCN, sideroforov in raztapljajo več fosfata kot prostoživeči. Preverili smo tudi ali producenti HCN, ki proizvajajo višje koncentracije HCN, zavirajo rast patogenih mikroorganizmov in kako so si vsi izolirani sevi genetsko podobni. Pričakovali smo, da so si genetsko najbolj podobni sevi, izolirani z rizoplana in iz rizosfere iste rastlinske vrste, sevi, izolirani iz različnih rastlinskih vrst, so si bolj različni, najmanj podobni pa so jim prostoživeči sevi zaradi drugačnih razmer v okolju, v katerem uspevajo.

Bakterijski sevi so bili izolirani v ločeni raziskavi in shranjeni v trajni zbirki, zato smo preverili njihovo čistost. Po čiščenju smo pridobili 145 bakterijskih kultur. Sintezo fluorescentnih barvil smo preverili tako, da smo bakterijske kulture nacepili na trdna gojišča KB ter jih pregledali in posneli pod UV-svetlobo v transiluminatorju. Glede na oceno jakosti in premer fluorescentnega signala smo seve razporedili po rangih. Za preverjanje mobilizacije fosfata smo bakterijske kulture nacepili na trdna gojišča Pikovskaya. Ko so bile opazne čistine pri vseh kolonijah, smo jih pregledali in posneli pri beli svetlobi v transiluminatorju ter razporedili seve po rangih glede na premer in oceno vidnosti čistin. Za preverjanje sinteze vodikovega cianida smo uporabili dva testa. Pri testu s kolorimetrično reakcijo smo na kulture sevov v tekočem gojišču LB z glicinom namestili indikatorski papir. Rezultate testa smo obdelali in dokumentirali s transiluminatorjem. Drugi test HCN smo opravili s hemoglobinskim reagentom. Seve smo nacepili v tekoča gojišča LB z glicinom, naslednji dan izmerili gostoto kultur s spektrofotometrično metodo OD600. Nato smo opravili še HCN-test, tako da smo pripravili bakterijske kulture, hemoglobinski reagent, umeritveno krivuljo s KCN, kontrolo, vnesli vse snovi in seve na mikrotitrsko ploščo in izmerili količino HCN s spektrofotometrično metodo. Na podlagi HCN-testa s hemoglobinom smo izbrali 5 sevov, ki so proizvajali največ HCN in 5 sevov,

ki niso proizvajali HCN. Po inkubaciji v tekočih gojiščih LB smo seve patogenih bakterij, ki okužujejo koruzo, razmazali v petrijevke z gojiščem LB in LB z glicinom. Deset izbranih izoliranih sevov smo odpipetirali v vdolbinice v gojiščih in spremljali nastanek čistin ob vdolbinicah. Istih 10 izoliranih sevov smo uporabili tudi pri testu zaviranja rasti patogenih gliv, ki okužujejo koruzo. Seve smo razmazali na trdna gojišča LB in LB z glicinom tako in v vsako petrijevko vstavili po 4 agarjeve čepke z glivo iste vrste. Glive z bakterijami smo inkubirali ter spremljali njihovo rast. Nadalje smo izbrali nekaj od desetih izoliranih sevov, vsak sev nanesti v ravni črti na sredino petrijevke, inkubirali en dan in vnesli na vsako stran po en agarjev čepok z isto vrsto glive. Za potrditev nastajanja HCN smo dodali v nekaj petrijevok indikatorski papir. Pri ugotavljanju potenciala sevov za zaviranje rasti smo uporabili statistični t-test. Pri filogenetskih raziskavah smo izolirali DNA s kompletom SmartHelix® EZextract kit in izmerili količino DNA s spektrofotometrično metodo po principu fluorometrične meritve koncentracije DNA z napravo qBit. Po opravljenih meritvah smo vse vzorce razredčili z destilirano vodo do koncentracije 1,5 ng/μl. Opravili smo BOX-PCR. Pomnožke smo analizirali z 2 % agarozno gelsko elektroforezo v 0,5x pufri TBE. Po končani elektroforezi smo pomnožke odčitali in dokumentirali v transiluminatorju pod svetlobo UV. S pomočjo analize profilov BOX smo določili filogenetsko sorodnost izoliranih bakterijskih sevov.

Pri testu sinteze HCN s kolorimetrično reakcijo z barvnim indikatorjem smo zaznali 16 cianogenih sevov, pri testu HCN s hemoglobinom pa 30. Testa sta se ujemala pri zaznavi šestih najbolj cianogenih sevov. Največji delež cianogenih sevov so imeli sevi ščitaste kislice, manj jih je bilo med sevi površine gole kamninske podlage, najmanj pa med sevi alpske velese. Pri primerjavi deležev cianogenih sevov glede na rizosfero, površino korenin ali kamninsko podlago smo ugotovili, da je največ cianogenih sevov izhajalo iz rizosfere, manj s površine gole kamninske podlage in najmanj s površine korenin.

Od 145 sevov je fosfat mobiliziralo 43 %, od tega 61 % sevov ščitaste kislice, 44 % sevov s površine gole kamninske podlage in le 27 % sevov alpske velese. Pri primerjavi deležev cianogenih sevov glede na rizosfero, površino korenin ali kamninsko podlago je fosfat mobiliziralo 44 % sevov s površine korenin, 44 % sevov s površine gole kamninske podlage in 41 % sevov iz rizosfere. Fluorescentna barvila je proizvajalo 40 % vseh izoliranih sevov, od tega 46 % sevov ščitaste kislice, 39 % sevov alpske velese in le 29 % sevov s površine gole kamninske podlage. Tudi pri primerjavi sevov iz rizosfere, s površine korenin in površine gole kamninske podlage smo zaznali, da so slednji v najmanjšem številu proizvajali fluorescentna barvila. Barvila so v največjem deležu (46 %) proizvajali sevi iz rizosfere. Manj (39 %) so jih proizvajali sevi s površine korenin.

Pri poskusu s patogenimi bakterijami po tednu spremljanja rasti nismo opazili čistin v gojiščih, kar pomeni, da izolirani sevi niso zavirali rasti bakterijskih patogenov. Pri poskusu s patogenimi glivami smo opazili, da so vsi izbrani sevi zavirali rast gliv. Pri

zaviranju glive *F. graminearum* na gojišču brez glicina so bili uspešnejši sevi, ki so proizvajali HCN. Na gojišču z glicinom so bili pri tem uspešnejši sevi, ki niso proizvajali HCN. Razlike v rasti glive *F. graminearum* v nobenem primeru niso bile statistično značilne. Pri poskusih z glivo *F. moniliforme* na gojiščih brez glicina smo ugotovili, da so bili vsi sevi, ne glede na sintezo HCN, podobno uspešni pri zaviranju njene rasti. Na gojišču z glicinom so bili sevi pri zaviranju rasti uspešnejši kot na gojišču brez glicina. Tudi v tem primeru so vsi sevi, ne glede na sintezo HCN, podobno zavirali rast gliv. Pri primerjavi zaviranja rasti glive *F. moniliforme* glede na proizvodnjo HCN med sevi ni bilo statistično značilnih razlik, bile pa so pri primerjavi zaviranja rasti glive glede na vrsto gojišča.

Filogenetsko drevo izoliranih bakterij je sestavljeno iz petih večjih skupin med seboj sorodnih sevov. Sevi, izolirani s površine gole kamninske podlage, se ne razlikujejo veliko od drugih sevov. Večina prostoživečih sevov je bolj sorodna sevom alpske velese kot sevom ščitaste kislice. Najbolj se razlikujejo sevi iz ščitaste kislice in sevi iz alpske velese. Sevi se genetsko manj razlikujejo, če primerjamo, ali so izolirani s površine korenin ali iz rizosfere. Sevi ne sestavljajo večjih gruč niti, če jih primerjamo po sintezi HCN, mobilizaciji fosfata in tvorjenju fluorescentnih barvil.

Če povzamemo rezultate in podatke v virih lahko ugotovimo, da za sintezo HCN, fluorescentnih barvil in mobilizacijo fosfata velja, da na količino sevov z določenimi lastnostmi v rizosferi in na površini korenin vpliva vrsta rastline. Različna je tudi rast korenin pri različnih vrstah, kar pomeni, da imajo različne vrste različen dostop do hranil, četudi rastejo na istem habitatnem tipu, v našem primeru na apnenčastem melišču. Rezultati, ki ugotavljajo sintezo HCN in sideroforov, potrjujejo, da rastlina uravnava količino sevov v svoji okolici glede na korist ali strupenost njihovih izločkov. Na količino sevov v rizosferi ali na površini korenin in količino prostoživečih sevov z določenimi lastnostmi, vpliva gostota mikroorganizmov zaradi tekmovanja. Na količino sevov z določenimi lastnostmi v rizosferi in na koreninah pa vpliva gostiteljska rastlina. Rezultati niso pokazali kakšne večje genetske raznolikosti niti podobnosti pri primerjavi lastnosti, za katere smo mislili, da bi pokazale tesnejšo sorodnost. Lahko bi sklepali, da so si morda vsi testirani izolati v tesnejšem sorodstvu ali pa niso v tesnejšem sorodstvu in imajo podobne lastnosti zaradi posebnega habitata, melišča. Na meliščih je erozija močna, vlada suša in hranila so težko dostopna, ker tla še niso razvita, zato morajo biti sevi in rastline sposobni preživeti v substratu, ki je reven s hranili. Da bi to potrdili, bi morali vse seve natančno določiti. Vsi rezultati testa biokontrole kažejo, da na zaviranje rasti gliv ni vplival HCN, ampak glicin. Ta bi lahko bil prekurzor za katero drugo snov, ki so jo izločali izolirani sevi in je zavirala rast gliv. Nekatero raziskavo so dokazale, da je za zaviranje rasti gliv dovolj že, če lahko bakterije prej porabijo hranila v gojiščih kot glive. Možno je, da glicin pospešuje metabolizem bakterij.

7 VIRI

- Ahmad F., Ahmad I., Khan M. S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163: 173–181
- Alam S., Khalil S., Ayub N., Rashid M. 2002. In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) for maize rhizosphere. *International journal of agriculture and biology*, 4, 4: 454–458
- Aldén L., Demoling F., Bååth E. 2001. Rapid method of determining factors limiting bacterial growth in soil. *Applied and environmental microbiology*, 67, 4: 1830–1838
- Ambrosini A., Beneduzi A., Stefanski T., Pinheiro F. G., Vargas L. K., Passaglia L. M. P. 2012. Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant and soil*, 356, 1–2: 245–264
- Azad H. R., Davis J. R., Schnathorst W. C., Kado C. I. 1985. Relationships between rhizoplane and rhizosphere bacteria and verticillium wilt resistance in potato. *Archives of microbiology*, 140, 4: 347–351
- Bais H. P., Fall R., Vivanco J. M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology*, 134: 307–319
- Bais H. P., Weir T. L., Perry L. G., Gilroy S., Vivanco J. M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual review of plant biology*, 57: 233–266
- Barker Jørgensen B. 1982. Mineralization of organic matter in the sea bed – the role of sulphate reduction. *Nature*, 296: 643–645
- Baudoin E., Benizri E., Guckert A. 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil biology and biochemistry*, 35, 9: 1183–1192
- Blumer C., Haas D. 2000. Iron regulation of the hcnABC genes encoding hydrogen cyanide synthase depends on the anaerobic regulator ANR rather than on the global activator GacA in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Microbiology*, 146: 2417–2424
- Brinker A. M., Seigler D. S. 1989. Methods for the detection and quantitative determination of cyanide in plant materials. *Phytochem bulletin*, 21: 24–31

- Brady N. C. 2002. The nature and properties of soil. V: Plant physiology. 3rd ed. Taiz L., Zeiger E. (eds.). Sunderland Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.: 78 str.
- Bunch A. W., Knowles C. J. 1980. The effect of growth conditions on cyanogenesis by the snow mould fungus. *Microbiology*, 116, 1: 9–16
- Castric K. F., Castric P. A. 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 45, 2: 701–702
- Castric P. 1994. Influence of oxygen on the *Pseudomonas aeruginosa* hydrogen cyanide synthase. *Current microbiology*, 29: 19–21
- Castric P. A. 1975. Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. *Canadian journal of microbiology*, 21: 613–618
- Castric P. A. 1977. Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. *Journal of bacteriology*, 130, 2: 826–831
- Castric P. A. 1981. The metabolism of hydrogen cyanide by bacteria. V: Cyanide in Biology. Vennesland B., Conn E. E., Knowles C. J., Westley J., Wissing F. (eds.). London, Academic Press: 233–261
- Castric P. A. 1983. Hydrogen cyanide production by *Pseudomonas aeruginosa* at reduced oxygen levels. *Canadian journal of microbiology*, 29: 1344–1349
- Castric P. A., Ebert R. F., Castric K. F. 1979. The relationship between growth phase and cyanogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Current microbiology*, 2: 287–292
- Chabot R., Antoun H., Cescas M. P. 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. *Plant and soil*, 184 2: 311–321
- Dalal J., Kulkarni N. 2013. Antagonistic and plant growth promoting potentials of indigenous endophytic bacteria of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Current research in microbiology and biotechnology*, 1, 2: 62–69
- De Bolle S., Gebremikael M. T., Maervoet V., De Neve S. 2013. Performance of phosphate-solubilizing bacteria in soil under high phosphorus conditions. *Biology and fertility of soils*, 49, 6: 705–714

- Defago G., Berling C. H., Burger U., Haas D., Kahr G., Keel C., Voisard C., Wirthner P. H., Wutrich B. 1990. Suppression of black root rot of tobacco by a *Pseudomonas* strain: potential applications and mechanisms. V: Biological control of soil-borne plant pathogens. Hornby D. (ed.). Wallingford, CAB International: 93–108
- Defago G., Haas D. 1990. Pseudomoads as antagonists of soilborne plant pathogens: mode of action and genetic analysis. *Soil Biochemistry*, 6, 249–291
- Devi K. K., Seth N., Kothamasi S., Kothamasi D. 2007. Hydrogen cyanide-producing rhizobacteria kill subterranean termite *Odontotermes obesus* (rambur) by cyanide poisoning under in vitro conditions. *Current microbiology*, 54, 1: 74–78
- Duffy B. K., Défago G. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and environmental microbiology*, 65, 6: 2429–2438
- Feigl F., Anger V. 1966. Replacement of benzidine by copper ethylacetoacetate and tetrabase as spot-test reagent for hydrogen cyanide and cyanogen. *Analyst*, 91: 282–284
- Freeman L. R., Angelini P., Silverman G. J., Merrit jr. C. 1975. Production of hydrogen cyanide by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied microbiology*, 29, 4: 560–561
- Frey B., Rieder S. R., Brunner I., Plötze M., Koetzsch S., Lapanje A., Brandl H., Furrer G. 2010. Weathering-associated bacteria from the Damma glacier forefield: physiological capabilities and impact on granite dissolution. *Applied and environmental microbiology*, 76, 14: 4788, doi: 10.1128/AEM.00657-10: 4788–4796
- Gans J., Wolinsky M., Dunbar J. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309, 5739: 1387–1390
- Geister I. 1999. Izbrana življenjska okolja rastlin in živali v Sloveniji. 1. izdaja. Ljubljana, Modrijan: 286 str.
- Glick B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 41, 2: 109–114.
- Goldstein A. H., Braverman K., Osorio N. 1999. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS microbiology ecology*, 30, 4: 295–300

- Gransee A., Wittenmayer L. 2000. Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development. *Journal of plant nutrition and soil science*, 163, 4: 381–385
- Haas D., Defago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews microbiology*, 3, 4: 307–319
- Harrison K. A., Bol R., Bardgett R. D. 2008. Do plant species with different growth strategies vary in their ability to compete with soil microbes for chemical forms of nitrogen? *Soil biology and biochemistry*, 40, 1: 228–237
- Haynes W. C. 1957. Genus I *Pseudomonas*. V: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 7th ed. Breed R. S., Murray E. G. D., Smith N. R. (eds.), Baltimore, The Williams & Wilkins company: 89–90
- Hegi G., Merxmüller H., Reisinger H. 1980. *Alpska flora*. Slovenska izdaja. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 223 str.
- Heydari S., Moghadam P. R., Arab S. M. 2008. Hydrogen cyanide production ability by *Pseudomonas* fluorescence bacteria and their inhibition potential on weed. V: *Proceedings "Competition for resources in a changing world: New drive for rural development"*, Tropentag, Hohenheim: 7–9 October 2008: 241–242
- Hider R. C., Kong X. 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Natural product report*, 27: 637–657
- Hodge A., Stewart J., Robinson D., Griffiths B. S., Fitter A. H. 2000. Competition between roots and soil micro-organisms for nutrients from nitrogen-rich patches of varying complexity. *Journal of Ecology*, 88, 1: 150–164
- Horner-Devine M. C., Leibold M. A., Smith V. H., Bohannan, B. J. M. 2003. Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology letters*, 6: 613–622
- Illmer P., Schinner F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil biology and biochemistry*, 27, 3: 257–263
- Jogan N., Kaligarič M., Leskovar I., Seliškar A., Dobravec J. 2004. *Habitatni tipi Slovenije*. Ljubljana, Agencija Republike Slovenije za okolje: 64 str.

- Joseph B., Patra R. R., Lawrence R. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). International journal of plant production, 1, 2: 141–152
- Jurkevitch E., Hadar Y., Chen Y., 1992. Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rhizosphere bacteria. Applied and environmental microbiology: 58, 1: 119–124
- Kloepper J. W., Leong J., Teintze M., Schroth M. N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature, 286: 885–886
- Kornaros M., Lyberatos G. 1998. Kinetic modelling of *Pseudomonas denitrificans* growth and denitrification under aerobic, anoxic and transient operating conditions. Water research, 32, 6: 1912–1922
- Kremer R. J., Souissi T. 2001. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. Current microbiology, 43: 182–186
- Kucey R. M. N. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. Canadian journal of soil science, 63: 671–667
- Kumar Deshwal V., Kumar P. 2013. Production of plant growth promoting substance by Pseudomonads. Journal of academia and industrial research, 2, 4: 221–225
- Laville J., Blumer C., Von Schroetter C., Gaia V., D'éfago G., Keel C., Haas D. 1998. Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Journal of bacteriology, 180, 12: 3187–3196
- Lau G. W., Hassett D. J., Ran H., Kong F. 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends in molecular medicine 10, 12: 599–606
- Leake J. R., Johnson D., Donnelly D. P., Muckle G. E., Boddy L., Read D. J. 2004. Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. Canadian journal of botany, 82: 1016–1045
- Likar M. 2000. Mikrobiologija okolja. Ljubljana, ZSTI Slovenije – Zbornica sanitarnih tehnikov in inženirjev Slovenije: 249 str.

- Loper J. E., Henkels M. D. 1997. Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1: 99–105
- Loper J. E., Henkels M. D. 1999. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Applied and environmental microbiology*: 65, 12: 5357–5363
- Lucas R. E., Davis J. F. 1961. Relationships between pH values of organic soils and availabilities of 12 plant nutrients. *Soil science*, 92: 177–182
- Madigan M., Martinko J., Stahl D., Clark D. 2012. *Brock biology of Microorganisms*. 13th ed. San Francisco, Pearson: 517 str.
- Maki T., Nomachi M., Yoshida S., Ezawa T. 2008. Plant symbiotic microorganisms in acid sulfate soil: significance in the growth of pioneer plants. *Plant and soil*, 310, 1–2: 55–65
- Matthijs .S, Tehrani K. A., Laus G., Jackson R. W., Cooper R. M., Cornelis P. 2007. Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-pythium activity. *Environmental microbiology* 9, 2: 425–434
- Mohapatra B. R., Mazumder A. 2008. Discrimination of *E. coli* populations in aquatic environments by rep-PCR. *Water science and technology*, 58, 3: 537 - 547
- Mossialos D., Ochsner U., Baysse C., Chablain P., Pirnay J. P., Koedam N., Budzikiewicz H., Fernández D. U., Schäfer M., Ravel J., Cornelis P. 2002. Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent pseudomonads involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. *Molecular microbiology*, 45, 6: 1673–1685
- Nasreddine L., Parent-Massin D. 2002. Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry? *Toxicology letters*, 127, 1–3: 29–41
- Neilands J. B. 1952. A crystalline organo-iron pigment from a rust fungus (*Ustilago sphaerogena*). *Journal of the American chemical society*, 74, 19: 4846–4847
- Raj J., Bagyaraj D. J., Manjunath A. 1981. Influence of soil inoculation with vesicular arbuscular mycorrhiza and a phosphate-dissolving bacterium on plant growth and ³²P-uptake. *Soil biology and biochemistry*, 13, 2: 105–108

- Raupach G. S., Kloepper J. W. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Biological control*, 88, 11: 1158–1164
- Rudrappa T., Bais H. P. 2008. Rhizospheric pseudomonas, friends or foes. *Plant signaling and behavior* 3, 12: 1132–1133
- Rudrappa T., Splaine R. E., Biedrzycki M. L., Bais H. P. 2008. Cyanogenic *Pseudomonas* influence multitrophic interactions in the rhizosphere. *PLoS ONE* 3, 4: e2073, doi: 10.1371/journal.pone.0002073: 11 str.
- Saharan B. S., Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life sciences and medicine research*, 2011, 21: 1-30
- Sarkar S., Satheshkumar A., Premkumar R. 2009. Biodegradation of Dicofol by *Pseudomonas* strains isolated from tea rhizosphere microflora. *International journal of integrative biology*, 5, 3: 164–166
- Schalk I. J. 2008. Metal trafficking via siderophores in gram-negative bacteria: specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *Journal of inorganic biochemistry*, 102, 5–6: 1159–1169
- Schalk I. J., Guillon L. 2013. Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. *Environmental microbiology*, 15, 6: 1661–1673
- Schwyn B., Neilands J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160, 1: 47–56
- Steenhoudt O., Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects *FEMS microbiology reviews*, 24: 487–506
- Tivy, J. 1993. *Biogeography, a study of plants in the ecosphere*. 3rd ed. London, Longman Scientific & Technical: 452 str.
- Ueno D., Ma J. F. 2009. Secretion time of phytosiderophore differs in two perennial grasses and is controlled by temperature. *Plant and soil*, 323, 1–2: 335–341

- Vennesland B., Pistorius E. K., Gewitz H. S. 1981. HCN production by microalgae. V: Cyanide in biology. Vennesland B., Conn E. E., Knowles C. J., Westley J., Wissing F. (ed.). London, Academic Press: 349–361
- Van Buuren K. J. H., Zuurendonk P. F., Van Gelder B. F., Muijsers A. O. 1972. Biochemical and biophysical studies on cytochrome aa3. V: Binding of cyanide to cytochrome aa3. *Biochimica et biophysica acta – bioenergetics*, 256, 2: 243–257
- Van Der Heijden M. G. A., Bardgett R. D., Van Straalen N. M. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, 11, 3: 296–310
- Vanlerberghe G. C., McIntosh L. 1997. Alternative oxidase: from gene to function. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 48: 703–734
- Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F. J., Lupski J. R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence – based polymerase chain reaction. *Methods of molecular cell biology*, 5: 25 - 40
- Viosard C., Keel C., Haas D., Defago G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *The EMBO journal*, 8: 351–358
- Von Rohr M. R., Furrer G., Brandl H. 2009. Effect of iron and phosphate on bacterial cyanide formation determined by methemoglobin in two-dimensional gradient microcultivations. *Journal of microbiological methods*, 79: 71–75
- Wardle P. 1972. Plant succession on Greywacke gravel and scree in the subalpine belt in Canterbury, New Zealand. *New Zealand journal of botany*, 10: 387–398
- Wissing F. 1983. Anaerobic column chromatography in the presence of detergents and its application to a bacterial HCN-producing enzyme. *Journal of microbiological methods*, 1: 31–39
- Wissing F. 1974. Cyanide formation from oxidation of glycine by a *Pseudomonas* species. *Journal of bacteriology*, 117: 1289–1294
- Zeller S. L., Brandl H., Schmid B. 2007. Host-plant selectivity of rhizobacteria in a crop/weed model system. *PLoS ONE* 2, 9: e846, doi:10.1371/journal.pone.0000846: 7 str.

Zhang G., Wu Y., Qian X., Meng Q. 2005. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. Journal of Zhejiang university Science B, 6, 8: 725–730

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem somentorju dr. Tomažu Rijavcu za strokovne nasvete in usmerjanje pri laboratorijskem delu. Zahvaljujem se tudi doc. dr. Jasni Dolenc Koce za mentorstvo in pomoč pri pisanju diplomske naloge. Hvala prof. dr. Marjani Regvar in doc. dr. Poloni Zalar za kritičen in hiter pregled diplomskega dela.

Zahvaljujem se Inštitutu za mikrobiološke znanosti in tehnologijo, da sem imela priložnost pri vas opravljati tako zanimivo nalogo.

Hvala vsem sošolcem in sošolkam, ki ste mi polepšali dni v času študija, predvsem pa hvala sošolkam, zdaj prijateljicam, Bernardi Bele, Sari Rezec, Tei Romih, Doroteji Čatorič in Lari Habič za študijske dneve polne zabavnih dogodivščin. Najlepše se zahvaljujem tudi staršem, bratu Krunu, Darinki Lamut, Vojku Bergantu in mojem sinku Vladu za vso podporo.

Priloga A

Število in delež bakterijskih sevov glede na oceno jakosti sinteze fluorescentnih barvil po kategorijah. 0 – ni signala KB; rang 1 – šibek signal; rang 2 – srednje močan signal ali močan signal do $d = 2\text{mm}$; rang 3 – močan signal, $d = \text{od } 2 \text{ do } 4 \text{ mm}$; rang 4 – močan signal, $d \geq 4 \text{ mm}$.

skupina sevov	rang	0		1		2		3		4	
	število sevov	Število	delež [%]	Število	delež [%]	število	delež [%]	število	delež [%]	število	delež [%]
DK1	11	6		0		2		2		1	
DR1	13	10		0		0		3		0	
DK2	13	7		0		2		3		1	
DR2	12	3		2		4		1		2	
DK3	8	7		1		0		0		0	
DR3	7	6		0		0		0		1	
RK1	12	8		0		1		0		3	
RR1	8	5		1		0		2		0	
RK2	9	5		0		1		0		3	
RR2	14	5		0		1		3		5	
RK3	13	7		0		1		4		1	
P1	8	5		1		1		1		0	
P2	9	5		1		0		1		2	
P3	8	8		0		0		0		0	
DK	32	20	62	1	3	4	13	5	16	2	6
DR	32	19	59	2	6	4	13	4	13	3	9
RK	34	20	59	0	0	3	9	4	12	7	20
RR	22	10	45	1	4,5	1	4,5	5	23	5	23
P	25	18	72	2	8	1	4	2	8	2	8
alpska velesa	64	39	61	3	5	8	12	9	14	5	8
ščitasta kislica	56	30	54	1	2	4	7	9	16	12	21
P	25	18	72	2	8	1	4	2	8	2	8
pov. korenin	66	40	61	1	1	7	10	9	14	9	14
rizosfera	54	29	54	3	5	5	9	9	17	8	15
P	25	18	72	2	8	1	4	2	8	2	8
skupno število sevov	145	87	60	6	4	13	9	20	14	19	13

Oznake:

DK – površina korenin alpske velese (*Dryas octopetala* L.)

DR – rizosfera alpske velese (*Dryas octopetala* L.)

RK – površina korenin ščitaste kislice (*Rumex scutatus* L.)

RR – rizosfera ščitaste kislice (*Rumex scutatus* L.)

P – površina gole kamninske podlage

pov. – površina

Priloga B

Seznam vseh izoliranih bakterijskih sevov in njihove lastnosti.

Sev	ocena jakosti sinteze fluorescentnih barvil	ocena jakosti mobilizacije fosfata	koncentracija HCN po testu s hemoglobinom		Jakost sinteze HCN pri testu s kolorimetrično metodo 1. test / 2. test
			cHCN[μ M]	SD	
DK 1-1	0	3	0	0	
DK 1-2	2	1	0	0	
DK 1-3	3	2	0	0	
DK 1-4	3	0	5,0	2,8	
DK 1-5	2	0	0	0	
DK 1-6	0	4	0	0	
DK 1-7	0	1	0	0	
DK 1-8	0	0	0	0	
DK 1-9	0	4	7,5	0,4	šibka / ni sinteze
DK 1-10	0	0	0	0	
DK 1-11	4	0	0	0	
DR 1-1	0	1	0	0	
DR 1-2	0	0	0	0	
DR 1-3	0	0	0	0	
DR 1-4	3	0	0	0	
DR 1-5	0	0	0	0	
DR 1-6	0	0	0	0	
DR 1-7	0	0	0	0	
DR 1-8	0	0	0	0	
DR 1-9	0	0	0	0	
DR 1-10	3	0	0	0	
DR 1-11	0	0	0	0	
DR 1-12	3	1	0	0	
DR 1-13	0	0	0	0	
DK 2-1	3	3	0	0	
DK 2-2	0	0	0	0	
DK 2-3	3	1	0	0	
DK 2-4	0	0	0	0	
DK 2-5	4	0	0	0	
DK 2-6	2	0	0	0	
DK 2-7	0	0	0	0	
DK 2-8	3	0	0	0	
DK 2-9	2	2	0	0	
DK 2-10	0	0	0	0	
DK 2-11	0	0	0	0	
DK 2-12	0	0	3,1	1,0	
DK 2-13	0	0	0	0	
DR 2-1	0	0	9,8	1,0	
DR 2-2	0	0	0	0	
DR 2-3	2	0	0	0	
DR 2-4	4	0	9,8	2,4	
DR 2-5	4	0	0	0	
DR 2-6	2	1	0	0	
DR 2-7	0	0	5,6	0,8	
DR 2-8	2	0	0	0	
DR 2-9	1	0	3,6	1,0	
DR 2-10	2	0	3,2	1,8	
DR 2-11	1	0	6,2	0,5	šibka / šibka
DR 2-12	3	1	0	0	
DK 3-1	0	0	0	0	
DK 3-2	0	0	0	0	
DK 3-3	0	0	0	0	
DK 3-4	0	0	0	0	
DK 3-5	0	0	0	0	
DK 3-6	1	2	0	0	
DK 3-7	0	0	0	0	
DK 3-8	0	0	0	0	
DR 3-1	0	0	0	0	

se nadaljuje

Seznam vseh izoliranih bakterijskih sevov in njihove lastnosti.

nadaljevanje					
DR 3-2	4	2	0	0	
DR 3-3	0	2	7,3	0,3	
DR 3-4	0	0	0	0	
DR 3-5	0	0	0	0	
DR 3-7	0	1	5,3	1,1	
DR 3-8	0	0	0	0	
RK 1-1	0	1	0	0	
RK 1-2	4	0	0	0	
RK 1-3	0	2	0	0	
RK 1-4	2	1	0	0	
RK 1-5	4	2	0	0	
RK 1-6	0	0	0	0	
RK 1-7	0	0	0	0	
RK 1-8	0	4	0,7	0,4	
RK 1-9	0	0	0	0	
RK 1-10	0	0	0	0	
RK 1-11	0	0	0	0	
RK 1-12	4	1	0	0	
RR 1-1	1	0	0	0	
RR 1-2	0	0	0	0	
RR 1-3	0	0	0	0	
RR 1-4	3	4	0	0	
RR 1-5	0	0	0	0	
RR 1-6	0	0	0	0	
RR 1-7	3	2	0,6	0,6	
RR 1-8	0	1	0	0	
RK 2-1	0	1	0	0	
RK 2-2	0	0	0	0	
RK 2-3	4	2	26,5	1,5	močna / srednja
RK 2-4	2	4	3,9	0,8	šibka / srednja
RK 2-5	0	2	18,8	1,0	srednja / ni sinteze
RK 2-6	4	2	0	0	
RK 2-7	0	0	0	0	
RK 2-8	4	2	0	0	
RK 2-9	0	0	0	0	
RR 2-1	0	2	0	0	
RR 2-2	4	0	0	0	
RR 2-3	4	1	35,4	8,8	močna / šibka
RR 2-4	3	2	45,2	3,8	srednja / močna
RR 2-5	0	3	0	0	
RR 2-6	3	2	0	0	
RR 2-7	3	1	65,6	11,1	srednja / srednja
RR 2-8	0	3	0	0	
RR 2-9	4	1	22,8	1,5	ni sinteze / šibka
RR 2-10	0	0	0	0	
RR 2-11	4	1	0	0	
RR 2-12	0	3	0	0	
RR 2-13	4	3	42,5	0,3	močna / močna
RR 2-14	2	3	51,1	5,3	močna / močna
RK 3-1	3	3	0	0	
RK 3-2	0	2	0	0	
RK 3-3	3	0	0	0	
RK 3-4	0	0	0	0	
RK 3-5	0	0	0	0	
RK 3-6	2	0	8,7	1,0	šibka / srednja
RK 3-7	0	2	0	0	
RK 3-8	4	3	0,8	1,2	
RK 3-9	0	0	0	0	
RK 3-10	3	2	0	0	
RK 3-11	3	2	0	0	
RK 3-12	0	0	0	0	
RK 3-13	0	1	28,9	1,7	ni sinteze / šibka
P 1-1	1	2	53,1	10,0	šibka / srednja
P 1-2	0	0	16,1	16,8	

se nadaljuje

Seznam vseh izoliranih bakterijskih sevov in njihove lastnosti.

nadaljevaje					
P 1-3	2	1	0	0	
P 1-4	3	0	0	0	
P 1-5	0	1	0	0	
P 1-6	0	0	0	0	
P 1-7	0	0	0	0	
P 1-8	0	0	0	0	
P 2-1	0	1	0	0	
P 2-2	4	2	3,0	1,3	ni sinteze / šibka
P 2-3	3	1	0	0	
P 2-4	4	4	4,1	2,0	
P 2-5	0	3	0	0	
P 2-6	0	0	0	0	
P 2-7	0	0	0	0	
P 2-8	1	0	0	0	
P 2-9	0	1	0	0	
P 3-1	0	0	4,5	1,2	
P 3-2	0	0	0	0	
P 3-3	0	1	0	0	
P 3-4	0	1	0	0	
P 3-5	0	0	0	0	
P 3-6	0	0	0	0	
P 3-7	0	0	0	0	ni sinteze / srednja
P 3-8	0	0	0	0	

Oznake:

DK – površina korenin alpske velese (*Dryas octopetala* L.)

DR – rizosfera alpske velese (*Dryas octopetala* L.)

RK – površina korenin ščitaste kislice (*Rumex scutatus* L.)

RR – rizosfera ščitaste kislice (*Rumex scutatus* L.)

P – površina gole kamninske podlage

Priloga C

Število in delež bakterijskih sevov glede na oceno jakosti mobilizacije fosfata po kategorijah. Rang 0 – ni čistin na gojišču; rang 1 – slabo vidne čistine do $d = 3$ mm, srednje vidne čistine do $d = 2$ mm, dobro vidne čistine do $d = 1$ mm; rang 2 – slabo vidne čistine $d =$ od 3 do 4 mm, srednje vidne čistine $d =$ od 2 do 3 mm, dobro vidne čistine do $d = 2$ mm; rang 3 – dobro vidne čistine $d =$ od 2 do 4 mm; rang 4 – dobro vidne čistine $d \geq 4$ mm.

skupina sevov	rang		0		1		2		3		4	
	število sevov	število	delež [%]	Število	delež [%]	število	delež [%]	število	delež [%]	število	delež [%]	
DK1	11	5		2		1		1		2		
DR1	13	11		2		0		0		0		
DK2	13	10		1		1		1		0		
DR2	12	10		2		0		0		0		
DK3	8	7		0		1		0		0		
DR3	7	4		1		2		0		0		
RK1	12	6		3		2		0		1		
RR1	8	5		1		1		0		1		
RK2	9	3		1		4		0		1		
RR2	14	2		4		3		5		0		
RK3	13	6		1		4		2		0		
P1	8	5		2		1		0		0		
P2	9	3		3		1		1		1		
P3	8	6		2		0		0		0		
DK	32	22	69	3	9,5	3	9,5	2	6	2	6	
DR	32	25	78	5	16	2	6	0	0	0	0	
RK	34	15	44	5	15	10	29	2	6	2	6	
RR	22	7	32	5	23	4	18	5	23	1	4	
P	25	14	56	7	28	2	8	1	4	1	4	
alpska velesa	64	47	73	8	13	5	8	2	3	2	3	
ščitasta kislica	56	22	39	10	18	14	25	7	13	3	5	
P	25	14	56	7	28	2	8	1	4	1	4	
pov. korenin	66	37	56	8	12	13	20	4	6	4	6	
rizosfera	54	32	59	10	19	6	11	5	9	1	2	
P	25	14	56	7	28	2	8	1	4	1	4	
skupno število sevov	145	83	57	25	17	21	15	10	7	6	4	

Oznake:

DK – površina korenin alpske velese (*Dryas octopetala* L.)

DR – rizosfera alpske velese (*Dryas octopetala* L.)

RK – površina korenin ščitaste kislice (*Rumex scutatus* L.)

RR – rizosfera ščitaste kislice (*Rumex scutatus* L.)

P – površina gole kamninske podlage

pov. – površina

Priloga D

Rezultati testa sinteze HCN s kolorimetrično reakcijo.

pozitivni sevi	ocene jakosti sinteze HCN	
	prvi poizkus	drugi poizkus
DK 1-9	Šibka	ni sinteze
DR 2-11	Šibka	šibka
RK 2-3	Močna	srednja
RK 2-4	Šibka	srednja
RK 2-5	Srednja	ni sinteze
RR 2-3	Močna	šibka
RR 2-4	Srednja	močna
RR 2-7	Srednja	srednja
RR 2-9	ni sinteze	šibka
RR 2-13	Močna	močna
RR 2-14	Močna	močna
RK 3-6	Šibka	sredna
RK 3-13	ni sinteze	šibka
P 1-1	Šibka	srednja
P 2-2	ni sinteze	šibka
P 3-7	ni sinteze	srednja

Priloga E1

Koncentracija bakterijskega HCN pri testu produkcije HCN s hemoglobinom.

sev	koncentracija HCN [μ M]	SD	OD600	sev	koncentracija HCN [μ M]	SD	OD600
RR 2-7	65,6	11,1	0,269	DR 3-3	7,3	0,3	0,259
P 1-1	53,1	10,0	0,249	DR 2-11	6,2	0,5	0,271
RR 2-14	51,1	5,3	0,265	DR 2-7	5,6	0,8	0,271
RR 2-4	45,2	3,8	0,224	DR 3-7	5,3	1,1	0,311
RR 2-13	42,5	0,3	0,231	DK 1-4	5,0	2,8	0,215
RR 2-3	35,4	8,8	0,281	P 3-1	4,5	1,2	0,236
RK 3-13	28,9	1,7	0,266	P 2-4	4,1	2,0	0,297
RK 2-3	26,5	1,5	0,292	RK 2-4	3,9	0,8	0,276
RR 2-9	22,8	1,5	0,251	DR 2-9	3,6	1,0	0,351
RK 2-5	18,8	1,0	0,229	DR 2-10	3,2	1,8	0,367
P 1-2	16,1	16,8	0,193	DK 2-12	3,1	1,0	0,293
DR 2-1	9,8	1,0	0,356	P 2-2	3,0	1,3	0,307
DR 2-4	9,8	2,4	0,227	RK 3-8	0,8	1,2	0,294
RK 3-6	8,7	1,0	0,296	RK 1-8	0,7	0,4	0,309
DK 1-9	7,5	0,4	0,273	RR 1-7	0,6	0,6	0,302

Oznake:

DK – površina korenin alpske velese (*Dryas octopetala* L.)

DR – rizosfera alpske velese (*Dryas octopetala* L.)

RK – površina korenin ščitaste kislice (*Rumex scutatus* L.)

RR – rizosfera ščitaste kislice (*Rumex scutatus* L.)

P – površina gole kamninske podlage

pov. – površina

SD – standardna deviacija

OD600 – gostota pri valovni dolžini 600 nm

Priloga E2

Število in delež HCN – pozitivnih sevov ter koncentracija bakterijskega HCN pri testu produkcije HCN s hemoglobinom po kategorijah.

skupina sevov	število sevov	HCN - pozitivni sevi		koncentracija bakterijskega HCN	
		število	delež [%]	koncentracija HCN [μ M]	SD
DK1	11	2		12	3
DR1	13	0		0	0
DK2	13	1		3	1
DR2	12	6		39	7
DK3	8	0		0	0
DR3	7	2		12	1
RK1	12	1		1	0
RR1	8	1		1	1
RK2	9	3		49	3
RR2	14	6		262	30
RK3	13	3		40	4
P1	8	2		79	31
P2	9	2		7	3
P3	8	1		5	1
DK	32	3	9	15	4
DR	32	8	25	51	8
RK	34	7	21	90	7
RR	22	7	32	263	31
P	25	5	20	91	35
alpska velesa	64	11	17	66	12
ščitasta kislica	56	14	25	353	38
P	25	5	20	91	35
pov. korenin	66	10	15	105	11
rizosfera	54	15	28	314	39
P	25	5	20	91	35
skupno	145	30	21	510	85

Oznake:

DK – površina korenin alpske velese (*Dryas octopetala* L.)

DR – rizosfera alpske velese (*Dryas octopetala* L.)

RK – površina korenin ščitaste kislice (*Rumex scutatus* L.)

RR – rizosfera ščitaste kislice (*Rumex scutatus* L.)

P – površina gole kamninske podlage

pov. – površina

SD – standardna deviacija

Priloga F

Rast gliv *Fusarium graminearum* in *Fusarium moniliforme* rastočih na konfluentni rasti izoliranih sevov na gojišču LB in LB z glicinom.

Fusarium graminearum

		5. dan rasti				10. dan rasti				15. dan rasti			
		gojišče LB		gojišče LB z glicinom		gojišče LB		gojišče LB z glicinom		gojišče LB		gojišče LB z glicinom	
		povp. premer [cm]	SD	povp. premer [cm]	SD	povp. premer [cm]	SD	povp. premer [cm]	SD	povp. premer [cm]	SD	povp. premer [cm]	SD
poz. sevi	RR 2-4	0,8	0,3	0,6	0,4	2,3	0,5	0,6	0,5	6,0	0,8	0,6	0,5
	RR 2-7	1,1	0,3	0,6	0,5	1,4	0,5	0,4	0,5	1,4	0,5	0,3	0,3
	RR 2-13	1,4	0,4	0,9	0,6	1,9	0,3	3,8	1,5	2,5	0,6	8,3	2,1
	RR 2-14	4,0	0,8	0,6	0,5	5,3	0,5	3,5	0,6	5,3	0,5	8,0	0
	P 1-1	0,9	0,2	3,5	0,5	1,3	0,5	2,8	1,0	2,0	0	2,8	1,0
neg. sevi	DK 2-5	1,0	0	0,8	0,3	1,8	0,9	1,0	0	5,3	1,0	1,0	0
	DR 1-2	1,6	0,5	1,0	0	2,3	1,0	1,0	0	6,0	0,8	1,0	0
	RK 3-3	1,5	0,5	0,8	0,3	2,3	1,0	1,0	0,7	2,3	1,0	1,0	0,7
	RR 2-2	2,8	2,2	0,5	0,4	3	2,2	0,5	0,4	3,0	2,2	0,5	0,4
	P 1-7	16,3	2,2	7,0	1,5	16,3	2,5	7,8	1,7	18,8	2,5	7,8	1,7
kontrola		20	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20	0

Fusarium moniliforme

poz. sevi	RR 2-4	1,6	0,4	1,8	0,4	4,3	0,5	3,8	0,5	10,5	1,3	8,5	1,3
	RR 2-7	4,5	0,6	1,1	0,6	10,3	1,0	1,1	0,6	10,5	0,6	1,1	0,6
	RR 2-13	5,0	0,7	0,9	0,2	6,5	0,6	1,0	0	8,0	1,6	3,3	0,5
	RR 2-14	3,5	0,6	1,0	0	6,0	0,8	1,4	0,5	10,8	1,0	1,5	0,6
	P 1-1	1,3	0,4	2,5	0,5	1,3	0,5	2,8	1,0	4,3	0,5	2,8	1,0
neg. sevi	DK 2-5	2,0	0,7	0,3	0,3	3,0	1,2	0,5	0,4	8,5	1,7	0,6	0,5
	DR 1-2	2,0	0	4,5	0,6	2,0	0	5,8	1,0	6,3	1,3	5,8	1,0
	RK 3-3	2,8	0,4	0,5	0,4	4,0	1,2	1,8	0,5	4,0	1,2	1,8	0,5
	RR 2-2	6,0	0	1,8	0,5	9,8	0,5	2,0	0	10,0	0,8	2,0	0
	P 1-7	5,8	0,4	1,5	0,5	6,3	0,5	2,0	0	6,3	0,5	2,3	0,5
kontrola		20	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20	0

Oznake:

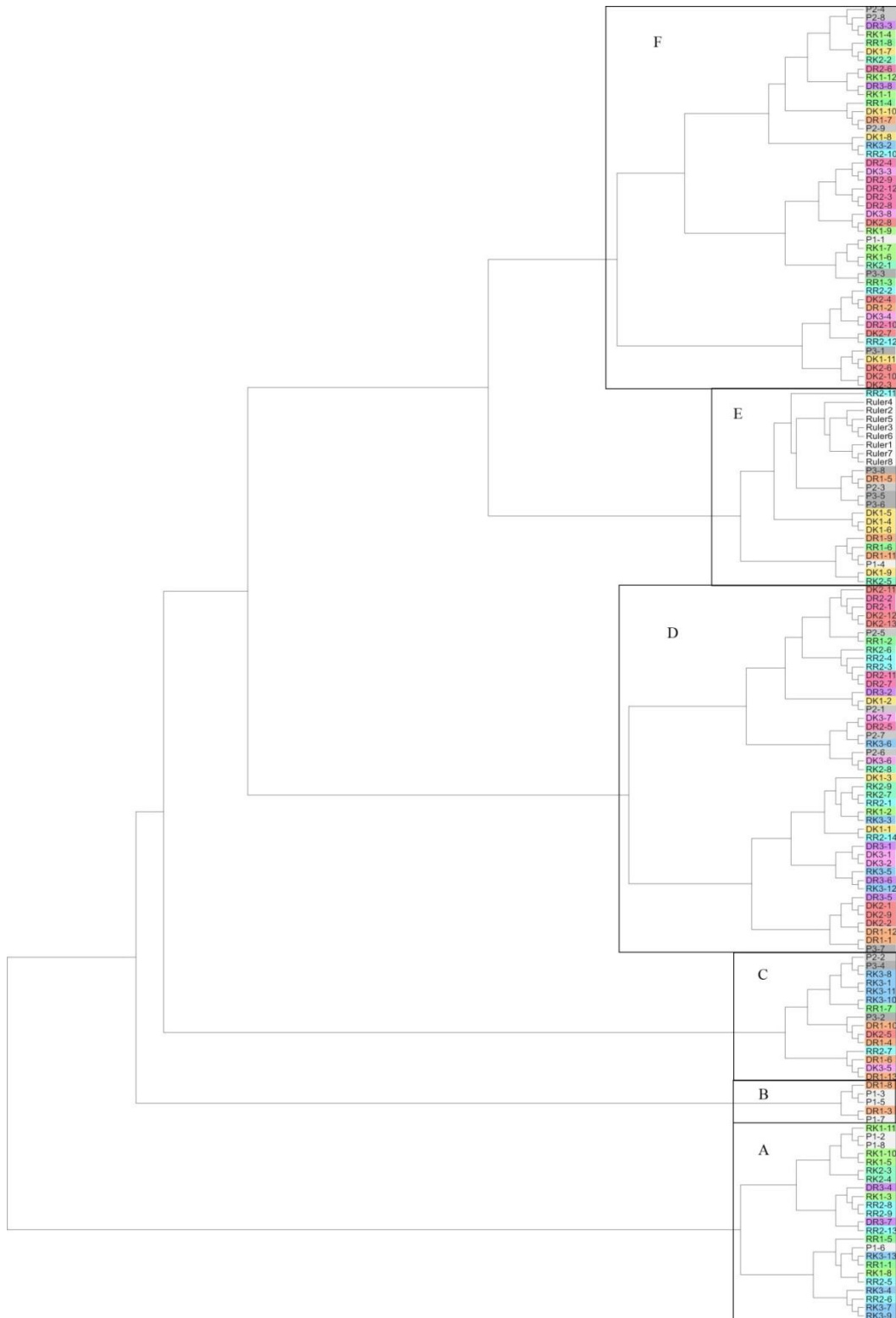
povp. – povprečni

poz. sevi – producenti HCN

neg. sevi – sevi, ki niso proizvajal HCN

Priloga G

Filogenetsko drevo izoliranih sevov z označenimi skupinami. DK - površina korenin alpske velese, DR - rizosfera alpske velese, RK - površina korenin ščitaste kislice, RR - rizosfera ščitaste kislice, P - površina gole kamninske podlage, števila 1 do 3 - lokacija, števila 1 do 14 - zaporedna številka seva.



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Sanja SEKOVANIĆ

**BAKTERIJSKI PRODUCENTI VODIKOVEGA
CIANIDA V RIZOSFERI ALPSKIH PIONIRSKIH
RASTLIN**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2015