

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Bernarda BENKO

**ANALIZA POTENCIALA SEVOV *Bacillus* spp. ZA
BIOZAŠČITO IN POSPEŠEVANJE RASTI RASTLIN**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Bernarda BENKO

**ANALIZA POTENCIALA SEVOV *Bacillus* spp. ZA BIOZAŠČITO IN
POSPEŠEVANJE RASTI RASTLIN**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**ANALYSIS OF THE *Bacillus* STRAINS POTENTIAL FOR
BIOPROTECTION AND PLANT GROWTH PROMOTION**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Ines Mandić-Mulec, za somentorico dr. Anno Oslizlo in za recenzentko prof. dr. Majo Ravnikar.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Somentorica: dr. Anna Oslizlo

Recenzentka: prof. dr. Maja Ravnikar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marina DERMASTIA

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Članica: prof. dr. Ines MANDIĆ-MULEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: dr. Anna OSLIZLO

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Maja RAVNIKAR

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Datum zagovora:

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

Bernarda Benko

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 579.22/.26:579.852.1:631.461(043)=163.6
- KG rizobakterije/PGPR/*Bacillus/Arabidopsis thaliana*/vpliv na rast rastlin/biokontrolne lastnosti/litični encimi/siderofori/raztpljanje fosfatov/indol-3-ocetna kislina/biosurfaktanti/biofilm
- AV BENKO, Bernarda, dipl. mikrobiol. (UN)
- SA MANDIĆ-MULEC, Ines (mentorica)/ OSLIZLO, Anna (somentorica)/ RAVNIKAR, Maja (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
- LI 2015
- IN ANALIZA POTENCIALA SEVOV *Bacillus* spp. ZA BIOZAŠČITO IN POSPEŠEVANJE RASTI RASTLIN
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
- OP XI, 65 str., 11 pregl., 9 sl., 123 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) so koristne rizobakterije, ki kolonizirajo koreninski sistem in z molekulami, ki jih izločajo v rizosfero, spodbujajo rast gostiteljske rastline ali zavirajo patogene organizme. Zaradi svojih lastnosti se PGPR uporabljam kot biopesticidi in biognojila, ki predstavljajo alternativo oziroma dopolnitev kemičnim pesticidom in gnojilom. Med PGPR spadajo tudi nekatere bakterije iz rodu *Bacillus*. Namen dela je bil okarakterizirati lastnosti, ki so povezane z PGPR aktivnostjo pri izolatih rodu *Bacillus* iz rizosfere paradižnika ter izolatih *Bacillus subtilis* iz nabrežja Save. Magistrska naloga je temeljila na hipotezi, da se bodo izbrani izolati razlikovali v količini in vrsti bioaktivnih molekul in da bodo različno vplivali na rast modelne rastline *Arabidopsis thaliana*. Izolate smo testirali na zmožnost raztpljanja fosfatov, na prisotnost lithičnih encimov (proteaze, celulaze, hitinaze), sideroforov, biosurfaktantov in IAA (indol ocetna kislina). Preverili smo protibakterijsko aktivnost proti patogeni bakteriji *Ralstonia solanacearum*, učinek izolatov na rast modelne rastline *A. thaliana* ter vpliv ekstrakta in eksudata te rastline na tvorbo biofilma. Rezultati analize potrjujejo našo hipotezo, da se testirani izolati rodu *Bacillus* razlikujejo v količini in vrsti izločenih bioaktivnih molekul. Razlike v količini bioaktivnih molekul se pokažejo že pri izolatih iz iste rastline. Ugotovili smo tudi, da je dodatek rastlinskih komponent ali pektina pri večini izolatov spodbudil razvoj biofilma in da so nekateri izolati iz nabora zaradi svojih lastnosti zanimivi kot PGPR.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 579.22/.26:579.852.1:631.461(043)=163.6
CX rhizobacteria/PGPR/*Bacillus/Arabidopsis thaliana*/effect on plant growth/biocontrol traits/lytic enzymes/siderophores/phosphate solubilization/indole-3-acetic acid/biosurfactants/biofilm
AU BENKO, Bernarda
AA MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)/ OSLIZLO, Anna (co-advisor)/ RAVNIKAR, Maja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2015
TY ANALYSIS OF THE *Bacillus* STRAINS POTENTIAL FOR BIOPROTECTION AND PLANT GROWTH PROMOTION
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XI, 65 p., 11 tab., 9 fig., 123 ref.
LA sl
AI sl/en
AB PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) are the beneficial, root colonizing rhizobacteria which promote the growth of host plants or inhibit the growth of pathogens with molecules that are secreted into rhizosphere. Due to their traits, PGPR are used in biopesticides and biofertilizers as an alternative to chemical pesticides and fertilizers. Some bacteria of the genus *Bacillus* are also PGPR. The aim of this thesis was to characterize isolates of *Bacillus* isolated from the tomato rhizosphere and isolates of *Bacillus subtilis* from the Sava riverbank. We hypothesised that the selected isolates will differ in the quantity and the type of bioactive molecules and will have different influence on the growth of the model plant *Arabidopsis thaliana*. Isolates were tested for phosphate solubilization, for the presence of lytic enzymes (proteases, cellulases, chitinases), siderophores, the quantity of biosurfactants and IAA (indole acetic acid). We also tested antibacterial activity against the pathogen *Ralstonia solanacearum*, the ability of *Bacillus* isolates to form biofilms on a variety of liquid media and induce plant growth. The results of the analysis confirmed our hypothesis that the isolates of *Bacillus* differ in the quantity and the type of secreted bioactive molecules and based on their traits we identified isolates that have the potential to be exploited as PGPR.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RIZOBAKTERIJE, KI POSPEŠUJEJO RAST RASTLIN – PGPR	3
2.1.1 Neposredni mehanizmi delovanja PGPR	5
2.1.1.1 Fiksacija dušika	5
2.1.1.2 Raztopljanje fosfatov	5
2.1.1.3 Uravnavanje ravni fitohormonov	6
2.1.1.4 Siderofori	7
2.1.2 Posredni mehanizmi delovanja PGPR	8
2.1.2.1 Antibiotiki in litični encimi	8
2.1.2.2 Lipopeptidni biosurfaktanti	9
2.1.2.3 Inducirana sistemski odpornost (ISR)	10
2.1.3 Kolonizacija korenin	11
2.2 <i>BACILLUS</i> spp.	12
2.3 <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i>	13
2.4 NAVADNI REPENJAKOVEC (<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>)	14
2.5 BIOGNOJILA IN BIOPESTICIDI	15
2.5.1 Definicija	15
2.5.2 Omejitve ter prednosti biognojil in biopesticidov	16
2.5.3 <i>Bacillus</i> v biognojilih in biopesticidih	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Rastlinski material in rastni pogoji	18
3.1.2 Bakterijski sevi	18
3.1.3 Kemikalije	20

3.1.4 Gojišča	21
3.1.4.1 LB gojišča	21
3.1.4.2 CM tekoče gojišče.....	21
3.1.4.3 Trdno gojišče za proteaze	21
3.1.4.4 CMC agar.....	21
3.1.4.5 Gojišče za siderofore.....	22
3.1.4.6 Pikovskayas agar.....	22
3.1.4.7 King B agar	23
3.1.4.8 CPG agar.....	23
3.1.4.9 MSN gojišča.....	23
3.1.4.10 MS agar z 1% saharozo in 0,05% glukozo	24
3.1.5 Pufri in reagenti.....	24
3.1.5.1 Fiziološka raztopina	24
3.1.5.2 Salkowski reagent ($\text{FeCl}_3\text{-HClO}_4$)	24
3.1.5.3 Izotonični pufer (140 mM NaCl in 20 mM Tris, pH 7,4)	24
3.1.5.4 0,2 M fosfatni pufer, pH 7,0	24
3.1.5.5 10% taninska kislina	24
3.1.5.6 Jodovica	24
3.1.5.7 0,01 M PBS	25
3.1.6 Laboratorijska oprema.....	25
3.2 METODE.....	26
3.2.1 Posredni mehanizmi.....	26
3.2.1.1 Encimski litični testi	26
3.2.1.2 Hemolitični test na prisotnost biosurfaktantov	27
3.2.1.3 Protibakterijska aktivnost proti <i>Ralstonia solanacearum</i>	27
3.2.1.4 Biofilmi sevov <i>Bacillus</i> v tekočem gojišču z dodatkom rastlinskih komponent.....	28
3.2.2 Neposredni mehanizmi	29
3.2.2.1 Producija indol-3-ocetne kisline	29
3.2.2.2 Producija sideroforov.....	29
3.2.2.3 Raztplavljanje fosfatov	29
3.2.2.4 Spodbujanje rasti <i>Arabidopsis thaliana</i> s sevi <i>Bacillus</i> spp.	30
3.2.3 Skupna ocena posrednih/neposrednih mehanizmov	31
4 REZULTATI	32
4.1 POSREDNI MEHANIZMI – ZAVIRANJE RASTI PATOGENIH ORGANIZMOV.	32

4.1.1	Encimski litični testi.....	32
4.1.2	Hemolitični test na prisotnost biosurfaktantov	33
4.1.3	Protibakterijska aktivnost proti <i>Ralstonia solanacearum</i>	34
4.1.4	Biofilmi sevov <i>Bacillus</i> v tekočem gojišču z dodatkom rastlinskih komponent.....	36
4.1.5	Produkacija sideroforov	37
4.1.6	Skupna ocena – posredni mehanizmi	38
4.2	NEPOSREDNI MEHANIZMI – SPODBUJANJE RASTI RASTLIN	39
4.2.1	Raztpljanje fosfatov	39
4.2.2	Produkacija indol-3-oacetne kisline	40
4.2.3	Spodbujanje rasti <i>Arabidopsis thaliana</i> s sevi <i>Bacillus</i> spp.	40
4.2.4	Skupna ocena – neposredni mehanizmi	44
4.3	SKUPNA OCENA – NEPOSREDNI IN POSREDNI MEHANIZMI	45
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	46
5.1	RAZPRAVA.....	46
5.1.1	Posredni mehanizmi – zaviranje rasti patogenih organizmov	46
5.1.1.1	Litični encimi in biosurfaktanti.....	46
5.1.1.2	Zaviranje rasti patogene bakterije <i>Ralstonia solanacearum</i>	47
5.1.2	Biofilmi in kolonizacija rizosfere	48
5.1.3	Neposredni mehanizmi – spodbujanje rasti rastlin	49
5.1.3.1	Fosfati in siderofori.....	49
5.1.3.2	Spodbujanje rasti modelne rastline <i>Arabidopsis thaliana</i> in izločanje IAA	49
5.1.4	Potencialni biopesticidi in biognojila.....	50
5.2	SKLEPI.....	52
6	POVZETEK.....	53
7	VIRI.....	54

ZAHVALA**PRILOGE**

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sevi <i>Bacillus</i> , ki smo jih testirali.	19
Preglednica 2: Uporabljene kemikalije.....	20
Preglednica 3: Uporabljeni laboratorijski orodji.....	25
Preglednica 4: Uporabljeni laboratorijski material.	25
Preglednica 5: Biokontrolne lastnosti sevov <i>Bacillus</i> ; s krepko pisavo označeni sevi, ki izstopajo, s sivo sevi, ki imajo zelo nizke vrednosti; legenda: Ba - <i>B. amyloliquefaciens</i> , Bl – <i>B. licheniformis</i> , Bm – <i>B. megaterium</i> , Bp - <i>B. pumilus</i> , Bs - <i>B. subtilis</i> ; - negativen rezultat, + šibko pozitiven rezultat, ++ močno pozitiven rezultat, +++ zelo močno pozitiven rezultat.	35
Preglednica 6: Kvalitativna ocena biofilmov sevov <i>Bacillus</i> na različnih gojiščih ter njihova suha masa na gojišču s pektinom; s krepko pisavo označena suha teža sevov, ki izstopa, s sivo sevi, ki imajo zelo nizke vrednosti; legenda: Ba - <i>B. amyloliquefaciens</i> , Bl – <i>B. licheniformis</i> , Bm – <i>B. megaterium</i> , Bp - <i>B. pumilus</i> , Bs - <i>B. subtilis</i> ; Legenda: - ni tvorbe biofilma, + rahel biofilm, ++ močan biofilm, +++ zelo močan biofilm.	37
Preglednica 7: Seštevek točk, ki jih je posamezen sev <i>Bacillus</i> dobil pri ocenjevanju biokontrolnih lastnosti.....	39
Preglednica 8: Lastnosti sevov <i>Bacillus</i> , ki vplivajo na spodbujanje rasti rastlin; s krepko pisavo označeni sevi, ki izstopajo, s sivo sevi, ki imajo zelo nizke vrednosti; legenda: Ba - <i>B. amyloliquefaciens</i> , Bl – <i>B. licheniformis</i> , Bm – <i>B. megaterium</i> , Bp - <i>B. pumilus</i> , Bs - <i>B. subtilis</i> ; - negativen rezultat, + rahlo pozitiven rezultat, ++ močno pozitiven rezultat, +++ zelo močno pozitiven rezultat, * označuje rezultate večkratnika povečanja mase glede na kontrolo, za katere smo s t-testom izračunali, da so signifikantni ($p < 0,05$).	43
Preglednica 9: Seštevek točk, ki jih je posamezen sev <i>Bacillus</i> dobil pri oceni neposrednih mehanizmov (mehanizmi, ki spodbujajo rast rastlin).	44
Preglednica 10: Seštevek točk, ki jih je posamezen sev <i>Bacillus</i> dobil pri neposrednih (spodbujanje rasti) in posrednih (biokontrolnih) mehanizmih.	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Interakcije med rastlino, PGPR in patogenimi organizmi v tleh (modificirano po Haas in Defago, 2005).....	4
Slika 2: Encimski litični testi. Kvalitativna ocena proteaz (A). Kvalitativna ocena celulaz (B). Primerjava rezultatov hitinaz; BD2833, ki je negativen in PS-209, ki je močno pozitiven (C). Legenda: - negativen rezultat, + šibko pozitiven rezultat, +++ močno pozitiven rezultat.....	33
Slika 3: Inhibicija rasti <i>R. solanacearum</i> na CPG (zgoraj) in KingB (spodaj) gojišču.....	34
Slika 4: Kvalitativna ocena biofilma sevov <i>Bacillus</i> na različnih gojiščih. Legenda: - ni tvorbe biofilma, + rahel biofilm, ++ močan biofilm, +++ zelo močan biofilm.	36
Slika 5: Kvalitativna ocena delovanja sideroforov sevov <i>Bacillus</i> . Legenda: - negativen rezultat, + šibko pozitiven rezultat, +++ zelo močno pozitiven rezultat.....	38
Slika 6: Kvalitativna ocena raztplavljanja fosfatov sevov <i>Bacillus</i> . Legenda: - negativen rezultat, ++ močno pozitiven rezultat, +++ zelo močno pozitiven rezultat.	39
Slika 7: Primerjava izločanja indol-3-ocetne kisline (IAA) pri različnih sevih <i>Bacillus</i> , rožnato obarvanje pomeni pozitiven rezultat; na sliki je obkrožena reakcija seva T19-1; za vsak sev smo imeli 2 ponovitvi, ki sta v 2 zaporednih luknjicah, sevi si po vrsti od leve proti desni sledijo BD2833, PS-216, 6051, T14-1, T14-3, T14-4, T14-5, T15-1, T16-2, T16-3, T16-4, T16-5, PS-263, T16-7, T16-8, T16-10, T17-1, T19-1, T12-1, T21-2, T24-5, T26-2, T31-1, PS-95, PS-160, PS-194, PS-209, PS-210, T16-6 in negativna kontrola.....	40
Slika 8: Vpliva sevov <i>Bacillus</i> na rast <i>Arabidopsis</i> . Vpliv sevov <i>Bacillus</i> na maso korenin in listov <i>Arabidopsis</i> spp. na trdnem MS gojišču (A). Vpliv na maso korenin in listov je podan glede na kontrolo (vrednost 1, označeno z rdečo črto), ki ni bila izpostavljena bakteriji. Prikazani so le rezultati, kjer so povprečne vrednosti odstopale od vrednosti 1 in so razlike med sevom in kontrolo signifikantne. Prikazano je povprečje 3 ponovitev s standardnimi odkloni (B).	41
Slika 9: Primerjava vpliva posameznih sevov <i>Bacillus</i> z mešanicami sevov <i>Bacillus</i> na maso korenin in listov <i>Arabidopsis thaliana</i> . Vpliv na maso korenin in listov je podan glede na kontrolo (vrednost 1, označeno z rdečo črto), ki ni bila izpostavljena bakteriji. Prikazano je povprečje 3 ponovitev s standardnimi odkloni. Z * označeni rezultati, ki so signifikantni.....	42

KAZALO PRILOG

Priloga A: S t-testom izračunane p-vrednosti.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CAS	ang. Chrome azurol S
CMC	karboksimetil celuloza
HDTMA	ang. hexadecyltrimethyl ammonium bromide
IAA	indol-3-ocetna kislina (indole-3-acetic acid)
ISR	inducirana sistemска odpornost
MM9	ang. Minimal Media 9
MUF	ang. 4-metilumbeliferil-N-acetyl- β -glukozaminid
OD	optična gostota
PGPR	rizobakterije, ki pospešujejo rast rastlin (ang. plant growth promoting rhizobacteria)
RKC	rdeče krvne celice
VOC	hlapne organske snovi (ang. volatile organic compound)

1 UVOD

Rizosfera, vključuje korenine rastlin in tla v neposrednem stiku s koreninami, je izredno bogata s hranili in zelo gosto naseljen mikrohabitat (Hartmann in sod., 2009). Koristne rizobakterije, ki kolonizirajo koreninski sistem, se imenujejo PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) in pospešujejo rast gostiteljske rastline (Kloepper in Schroth, 1978). PGPR neposredno spodbujajo rast rastlin ali zavirajo fitopatogene organizme s pomočjo številnih aktivnih molekul, ki jih izločajo v rizosfero (Prashar in sod., 2014; Hayat in sod., 2010). Med PGPR spadajo tudi določene bakterije iz rodu *Bacillus*. *Bacillus* spp., ki imajo potencial za pospeševanje rasti rastlin, izločajo indol-3-ocetno kislino (IAA; Ali in sod., 2009), siderofore (Hafez in sod., 2006) ali raztopljujo fosfate (Trivedi in sod., 2007). Vrste *Bacillus* spp., ki izločajo biosurfaktante, antibiotike (Moyne in sod., 2001; Koumoutsi in sod., 2004; Bais in sod., 2004; Raaijmakers in sod., 2002) in/ali hidrolitične encime (Senol in sod., 2014; Wang in sod., 2002) pa lahko zaščitijo rastline pred patogenimi organizmi.

Arabidopsis thaliana je plevel iz družine križnic, ki ga najdemo v Evropi, Aziji in severni Ameriki. Uporablja se kot modelna rastlina, preprosta za gojenje v laboratoriju. Gojimo jo lahko celo na petrijevih ploščah v laboratoriju izpostavljeni svetlobi fluorescenčne žarnice (Meinke in sod., 1998). Na razvoj koreninskega sistema *Arabidopsis* vplivajo tudi rizosferne bakterije z izločanjem fitohormonov in drugih snovi (Lopez-Bucio in sod., 2006), zato je ta rastlina odličen modelni sistem za preučevanje pozitivnih vplivov sevov *Bacillus*.

V intenzivnem kmetijstvu prekomerno gnojenje s kemičnimi gnojili povzroči evtrofikacijo vodnih sistemov in sproščanje toplogrednih plinov (Tilman, 1999), kemični pesticidi pa imajo številne negativne učinke na človeško zdravje in okolje (Chandler in sod., 2011). Alternativo predstavljajo biognojila, ki netopna hranila v tleh naredijo dostopna za rastline (Hameedaa in sod., 2008) ali pri rastlinah izboljšajo prevzem hranil iz tal (Vessey, 2003). Bakterije lahko uporabljammo kot biopesticide, ki so učinkoviti zaviralci patogenih organizmov in so bolj selektivni od kemičnih pesticidov (Chandler in sod., 2011). *Bacillus* je zaradi številnih aktivnih substanc, ki jih izloča, primeren kandidat za uporabo kot biopesticid ali biognojilo, prednost pa predstavlja tudi njegova zmožnost tvorbe endospor, kar olajša formulacijo in shranjevanje biopesticidov/biognojil (Kumar in sod., 2012; Hayat in sod., 2010). Pomembna lastnost PGPR, uporabljenih v biognojilih/biopesticidih, je učinkovita kolonizacija rizosfere

(Bais in sod., 2004). Za predstavnike rodu *Bacillus* je za učinkovito aplikacijo v biognojilih/biopesticidih pomembna njihova sposobnost kolonizacije korenin, ki je vezana na sposobnost izgradnje biofilma (Chen in sod., 2013).

1.1 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je bil okarakterizirati 20 izolatov *Bacillus* iz rizosfere paradižnika (Oslizlo in sod., 2015) in 7 izolatov *Bacillus subtilis* iz nabrežja Save (Stefanic in Mandic-Mulec, 2009). Seve smo testirali za prisotnost litičnih encimov (proteaze, celulaze, hitinaze) in sideroforov, količino biosurfaktantov in IAA (indol acetna kislina) ter zmožnost raztplavljanja fosfatov. Preverili smo zmožnost tvorbe biofilmov na različnih tekočih gojiščih in protibakterijsko aktivnost proti patogeni bakteriji *Ralstonia solanacearum*. S pomočjo spremljanja rasti modelne rastline (*A. thaliana*) na trdnem gojišču smo preverili pozitivni učinek izbranih izolatov na rast.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Izbrani sevi se bodo razlikovali v količini bioaktivnih snovi.
- Sevi bodo na rast *Arabidopsis* vplivali negativno, pozitivno ali pa na rast ne bodo imeli vpliva.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RIZOBAKTERIJE, KI POSPEŠUJEJO RAST RASTLIN – PGPR

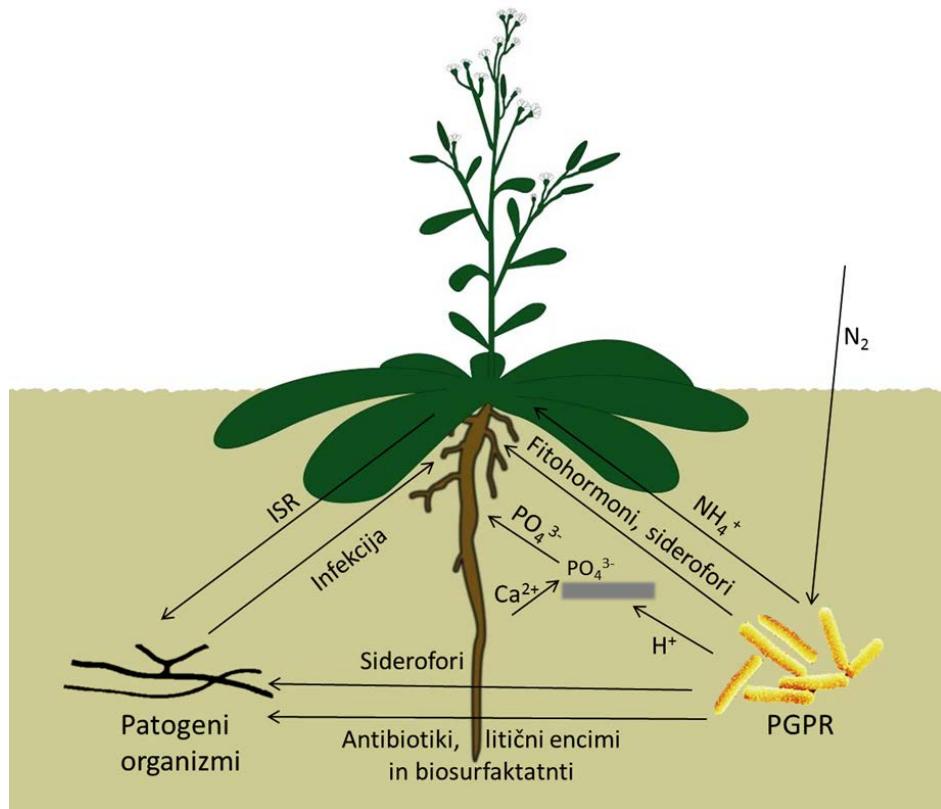
Rizosfera je ozko območje tal okoli korenin, kjer se lastnosti tal zaradi rasti in aktivnosti korenin spreminjajo fizikalno, kemijsko in biološko. Razdelimo jo lahko v tri cone. Endorizosfero predstavlja koreninsko tkivo z endodermisom in korteksom; rizoplan je površina korenine, na katero se pritrjujejo delčki tal in mikroorganizmi; ektorizosfera pa je sestavljena iz tal, ki neposredno mejijo na korenine (Prashar in sod., 2014). V rizosferi, ki je biološko in kemijsko zelo raznolika, se med rastlinskimi koreninami, talnimi organizmi (glove, bakterije in mikrofavna) in fizikalno-kemijskimi lastnostmi tal vseskozi odvijajo kompleksne in dinamične interakcije. Rastlina med rastjo iz korenin izgublja mrtve koreninske celice in organske eksudate, ki ji heterotrofni (mikro)organizmi porabijo kot vir ogljika in energije. Rizosfera je v primerjavi z okoliškimi tlemi izredno bogata s hranili in je posledično zelo gosto naseljen mikrohabitat, v katerem pride med njenimi prebivalci do kompeticije in predatorstva ali včasih tudi do mutualizma (Hartmann in sod., 2009).

Rastlina v rizosfero aktivno izloča različne organske snovi (ogljikove hidrate, karboksilne kisline, fenole, aminokisline) in anorganske ione ter s tem spreminja kemijo in biologijo mikrookolja korenin. Mešanica eksudatov in s tem okolje, ki ga rastlina ustvarja, je specifično za vrsto. Specifična mešanica eksudatov in specifično okolje rizosfere privlači le določene vrste mikroorganizmov iz celotnega nabora talnih mikroorganizmov. Rastline tako selekcionirajo izbor mikroorganizmov in ustvarjajo unikatne rizosferne združbe (Hartmann in sod., 2009).

Ena izmed vrst organizmov, ki naseljujejo rizosfero, so tudi bakterije. Rizobakterije so podskupina vseh rizosferskih bakterij, ki imajo zmožnost, da ob predhodni inokulaciji na semena ali vegetativne dele rastlin (npr. semenski krompir), kolonizirajo razvijajoči se koreninski sistem ob prisotnosti talnih mikroorganizmov. Odnosi med rastlino in mikroorganizmom v rizosferi so lahko negativni (škodljive rizobakterije), nevtralni (komenzali) ali pozitivni (Prashar in sod., 2014). Kloepper in Schroth (1978) sta koristne rizobakterije poimenovala PGPR (plant growth promoting rhizobacteria). PGPR kolonizirajo korenine in pospešujejo rast gostiteljske rastline. Glede na odnos med rastlino in PGPR lahko PGPR razdelimo na simbiotske bakterije (živijo znotraj rastlinskih celic in povzročajo

nastanek nodulov) in prostoživeče rizobakterije (živijo zunaj celic, ne delajo nodulov, vendar vseeno vplivajo na rast rastlin) (Hayat in sod., 2010). Najpogosteje simbiontske PGPR so rizobiji (rodovi *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* in *Sinorhizobium*) in predstavniki rodu *Frankia*, med prostoživečimi PGPR najdemo predstavnike iz rodov *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* in *Serratia* (Gray in Smith, 2005). Pomembni predstavniki PGPR so tudi aktinomicete (Bhattacharyya in Jha, 2012).

PGPR spodbujajo rast rastlin posredno in neposredno. Neposredni mehanizmi spodbujanja rasti temeljijo na oskrbovanju rastlin s koristnimi bakterijskimi produkti ali na izboljšanem rastlinskem prevzemu hranil iz tal. Posredni mehanizmi spodbujanja rasti rastlin temeljijo na zmanjšanju ali preprečevanju škodljivih posledic fitopatogenih organizmov in s tem tudi bolezni. PGPR lahko delujejo v treh različnih smereh: sintetizirajo različne snovi, ki pomagajo pri rasti rastlin; zavirajo rast patogenih organizmov ali izboljšajo rastlinski prevzem hranil iz tal. Iz mikroorganizmov, ki so se izkazali koristni za rastline, so izdelali biopesticide in biognojila, ki vsebujejo žive celice ali njihove spore (Prashar in sod., 2014; Hayat in sod., 2010).



Slika 1: Interakcije med rastlino, PGPR in patogenimi organizmi v tleh (modificirano po Haas in Defago, 2005)

2.1.1 Neposredni mehanizmi delovanja PGPR

2.1.1.1 Fiksacija dušika

Dušik je pomemben gradnik rastlinskih celic, vendar rastline ne morejo uporabljati atmosferskega dušika. Simbiontski (rizobiji, *Frankia*) ali prostoživeči fiksatorji dušika povečujejo količino dostopnega dušika za rastline. Fiksatorji dušika pretvorijo atmosferski dušik v amonij, ki ga rastline lahko asimilirajo (Slika 1; Hayat in sod., 2010). Povezava med rizobijem in stročnico je specifična. Stročnica izloča signalne molekule imenovane flavonoidi, na katere se rizobij odzove s kemotakso in ekspresijo *nod* genov. Izražanje *nod* genov sproži v koreninah rastlin formacijo nodulov (Redmond in sod., 1986). Določene bakterije v tleh fiksirajo atmosferski dušik v nesimbiontskem odnosu z gostiteljem. Dokazali so, da je izboljšana rast rastline posledica bakterijske fiksacije dušika pri naslednjih rodovih: *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Acetobacter* spp., *Burkholderia* spp., *Herbaspirillum* spp. (Hayat in sod., 2010).

2.1.1.2 Raztpljanje fosfatov

Fosfor se v zemlji nahaja v mineralni in organski oblikah v koncentracijah od 400 do 1,200 mg/kg in je eden glavnih esencialnih makrohranil za rast in razvoj rastlin. Večina se ga nahaja v netopni obliki in zato predstavlja limitirajoče hranilo za rast. Količina prostega fosforja v tleh je v veliki meri odvisna od tipa in pH-ja tal (Hayat in sod., 2010). V kislih tleh se fosfat veže s prostimi oksidi in hidroksidi aluminija in železa, medtem ko se v alkalnih tleh veže s kalcijem in je težko dostopen. Mikroorganizmi izločajo organske kisline ali protone in s tem nižajo pH svojega okolja. Zaradi protonske substitucije s Ca^{2+} se iz mineralnih fosfatov posledično lahko sprosti topen PO_4^{3-} (Slika 1). Vrste, ki najmočneje raztpljajo mineralne fosfate, prihajajo iz rodov *Rhizobium*, *Pseudomonas* ter *Bacillus* in učinkovito raztpljajo hidroksiapatit in trikalcijev fosfat. Mineralizacija organskih fosfatov običajno poteka s pomočjo fosfataz in fitaz (Rodriguez in Fraga, 1999). Sevi, ki izločajo veliko količino kislih fosfataz, prihajajo iz rodov *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* in *Serratia* (Hayat in sod., 2010). Mikroorganizmi, ki raztpljajo fosfate, omogočajo rastlini boljši dostop do fosforja in posledično spodbujajo rast gostiteljskih rastlin v primerjavi s kontrolo (Hameedaa in sod., 2008). Pokazali so, da podobno

pripomorejo k rasti rastlin tudi zunajcelične fitaze sevov *Bacillus amyloliquefaciens* (Idriss in sod., 2002).

2.1.1.3 Uravnavanje ravni fitohormonov

Citokinini in giberelini

Giberelini so fitohormoni, ki vplivajo na več razvojnih in fizioloških procesov v rastlinah. Sodelujejo pri kalitvi semen, rasti stebla in listov, cvetenju in razvoju plodu. Pri več različnih vrstah PGPR so pokazali povezavo med giberelini in pospeševanjem rasti rastlin (Bottini in sod., 2004); med njimi so tudi določene vrste *Bacillus* (Joo in sod., 2005; Gutierrez-Manero in sod., 2001).

Citokinini spodbujajo celično delitev, formacijo brstičev, sprostitev brstičev iz apikalne dominance, podaljševanje listov, spodbujajo tudi kalitev semen in formacijo kloroplastov ter zaviralno delujejo na staranje (Mok, 1994). Določene PGPR lahko izločajo citokinine, med njimi tudi *Paenibacillus polymyxa* in *Pseudomonas fluorescens* (Timmusk in sod., 1999; de Salamone in sod., 2001).

Indol-3-octetna kislina (IAA)

Ena izmed lastnosti fitohormonov avskinov je spodbujanje rasti korenin. PGPR najpogosteje izločajo avksin imenovan indol-3-octetna kislina (IAA). IAA spodbuja delitev rastlinskih celic ali njihovo podaljševanje (Patten in Glick, 2002). Za razvoj koreninskega sistema je izredno pomembna koncentracija IAA. Pilet in Saugy (1987) sta ugotovila, da če rastlinam dodajamo IAA v koncentraciji 5×10^{-9} M, IAA spodbuja rast hitrorastočih korenin, koncentracija 10^{-6} M pa rast zavira. Dobbelaere in sod. (1999) so ugotovili, da pri koncentraciji IAA 10^{-6} M pride do skrajšanja korenin in povečanja števila koreninskih laskov, medtem ko koncentracija IAA 10^{-4} M popolnoma inhibira rast koreninskega sistema. Rezultati predstavljajo tipični rastni odziv na avksine, ki so v visokih koncentracijah inhibitorni in stimulativni pri nižjih koncentracijah.

Spodbujanje rasti korenin, tako spodbujanje rasti primarne korenine, kot spodbujanje tvorbe stranskih korenin, je pomembna lastnost PGPR, ker mladim rastlinam poveča njihovo sposobnost sprejemanja vode in hranič iz okolja. Divji sev *Pseudomonas putida* GR12-2 spodbuja rast tako glavne kot stranskih korenin, česar ni sposobna mutanta, ki ima okvarjeno

funkcijo sinteze IAA (Patten in Glick, 2002). Pri določenih sevih je sinteza IAA odvisna od prisotnosti triptofana, ki je eden od možnih prekurzorjev IAA (Patten in Glick, 2002; Dobbelaere in sod., 1999). Izločanje IAA so opazili pri različnih vrstah rodu *Bacillus* (Barnawal in sod., 2013; Ali in sod., 2009; Wahyudi in sod., 2011).

IAA izločajo tudi določeni patogeni sevi. IAA so detektirali v gojišču z dodanim triptofanom ali brez njega pri določenih sevih *Pseudomonas syringae*, sevih iz rodu *Agrobacterium* in pri *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* (Glickmann in sod., 1998). Pri patogenih sevih se IAA večinoma sintetizira iz triptofana preko indolacetamida in sproži razvoj tumorjev. Sinteza IAA pri koristnih bakterijah običajno poteka preko indolpiruvične kisline (Patten in Glick, 2002).

Etilen in ACC deaminaza

Eliten je nujno potreben za normalno rast in razvoj rastlin, vendar je v visokih koncentracijah škodljiv (Bhattacharyya in Jha, 2012). Njegova sinteza je pospešena z različnimi stresnimi signali in je zato tudi stresni hormon. Prevelika produkcija etilena zavira rast zelenega dela rastline in rast korenin (Gontia-Mishra in sod., 2014). Sinteza etilena je odvisna od koncentracije njegovega prekurzorja, 1-aminociklopropan-1-karboksilne kisline (ali ACC). Določene PGPR izločajo ACC deaminazo, ki cepi ACC do α -ketobutirata in amonija, in znižajo koncentracijo etilena ter ponovno vzpostavijo ravnotesje v koreninskem sistemu (Shaharoona in sod., 2006). Bakterije z ACC deaminaze izboljšajo rast rastlin v stresnih pogojih, kot so slanost, suša in patogeni organizmi (Bhattacharyya in Jha, 2012). Sev *Bacillus subtilis* LDR2, ki izloča ACC deaminazo, tako lahko v sušnih pogojih izboljša rast *Trigonella foenum-graecum* v primerjavi s kontrolo brez inokuliranih mikroorganizmov (Barnawal in sod., 2013).

2.1.1.4 Siderofori

Železa je v tleh veliko, vendar ga je večina vezanega v obliki netopnih železovih (III) oksidov in hidroksidov. Železo ima pomembno vlogo v rasti in razvoju rastlin in je pomembno pri sintezi tilakoid, klorofila in kloroplastov (Sharma in sod., 2003). Ker je prostega železa v tleh relativno malo, je mikrobna aktivnost v rizosferi pomembna za pridobivanje prostega železa. Masalha in sod. (2000) so izvedli poskus, kjer so gojili sončnice in koruzo v sterilni in nesterilni zemlji z dovolj visoko vsebnostjo fosfatov in nitratov. V nesterilnih tleh rastline

niso kazale znakov pomanjkanja železa in količina železa je bila v koreninah visoka. Na drugi strani so rastline, ki so rasle v sterilnih tleh, kazale znake pomanjkanja železa ali poslabšanje rasti, koncentracija železa v koreninah pa je bila mnogo nižja. Poskus kaže na možno vlogo mikroorganizmov pri prevzemu železa. Za prevzem železa so pomembni mikrobni siderofori, ki nase vežejo železo iz netopnih železovih hidroksidov, rastline pa s pomočjo njihovih sideroforov heterologno prevzamejo železo (Sharma in sod., 2003). S pomočjo označenega siderofora pioveridina so ugotovili, da rastline inkorporirajo celoten siderofor z vezanim železom (Slika 1), ni pa jasno, na kakšen način pride do inkorporacije siderofora (Shirley in sod., 2011). Izločanje sideroforov so opazili tudi med predstavniki rodu *Bacillus* (Wahyudi in sod., 2011).

Siderofori, ki jih izločajo PGPR, lahko na rastline delujejo tudi posredno. Mikrobi lahko s svojimi siderofori tekmujejo za železo z glavnimi siderofori, ki imajo slabšo afiniteto do železa. Na ta način PGPR inhibirajo rast patogenih mikroorganizmov, kar vodi do manjšega obolevanja gostiteljske rastline (Buysens in sod., 1996; Yu in sod., 2011).

2.1.2 Posredni mehanizmi delovanja PGPR

2.1.2.1 Antibiotiki in litični encimi

Antibiotiki in litični encimi, ki jih PGPR izločajo iz celic, lahko pomagajo zaščititi rastlino pred fitopatogenimi organizmi. PGPR, med njimi tudi vrste iz rodu *Bacillus*, pogosto izločajo različne antibiotike, ki zavirajo rast rastlinskih škodljivih mikrobov, večinoma gliv (Mazurier in sod., 2009; Raaijmakers in sod., 2002; Moyne in sod., 2001; Koumoutsi in sod., 2004).

Kutikula nematod je večplastna rigidna struktura, ki ščiti nematode pred zunanjimi vplivi. Sestavljena je iz strukturne komponente (kolagena), topnega proteina (glikoproteini) in lipidov, dodatno je površina kutikule lahko prekrita s proteinsko plastjo (Niu in sod., 2006). Glavna komponenta celične stene jajčec nematod pa je hitin (Cronin in sod., 1997). Pri zaščiti rastlin pred nematodami so pomembne bakterijske proteaze in glivne ter bakterijske hitinaze (Niu in sod., 2006; Cronin in sod., 1997). *Bacillus nematocida* izloča zunajcelično serinsko proteazo, ki povzroči razpad kutikule nematode. Bakterija izloča tudi nevtralno proteazo, ki povzroči smrt prostoživeče nematode *Panagrellus redivivus* in rastlinskega parazita *Bursaphelenchus xylophilus* (Niu in sod., 2006).

Do razgradnje celične stene gliv pride, če fitopatogene glive izpostavimo litičnim encimom kot so proteaze, amilaze in hitinaze (Dunne in sod., 1997). Hitinaze katalizirajo hidrolizo hitina (Frankowski in sod., 2001) in povzročijo razgradnjo micelija, inhibirajo germinacijo spor in podaljševanje hif (Frankowski in sod., 2001; Lim in sod., 1991). S hitinazami lahko PGPR zaščitijo rastline pred patogeni glivami, kot so *Botrytis cinerea* (Frankowski in sod., 2001), *Fusarium solani* (Lim in sod., 1991), *F. culmorum* (Senol in sod., 2014) in *F. oxysporum* (Wang, 2002), *Aspergillus flavus* in *A. niger* (Gomaa, 2012). Rizobakterija *Stenotrophomonas maltophilia* W81 izloča proteaze in hitinaze, vendar rast fitopatogene glive *Pythium ultimum* inhibirajo le proteaze, ker celična stena *P. ultimum* ne vsebuje hitina, vsebuje pa proteine (Dunne in sod., 1997). Tudi rastline same se pred patogenimi glivami zaščitijo z izločanjem hitinaz (Senol in sod., 2014).

Bakterije pa lahko z litičnimi encimi rastlinam tudi škodujejo. Fitopatogene bakterije pogosto izločajo celulaze, ki razgradijo celično steno rastlin in omogočajo vstop in razširjenje patogene bakterije po rastlini (Laine in sod., 2000; Walker in sod., 1994). Tudi vrste iz rodu *Rhizobium* izločajo celulaze, ker jim le-te omogočajo vzpostavitev primarne simbiotske infekcije pri stročnicah, ki je potrebna za razvoj endosimbioze (Robledo in sod., 2008). Njihove celulaze so vezane na celično steno in imajo manjšo aktivnost od celulaz fitopatogenih bakterij (Jimenez-Zurdo in sod., 1996; Mateos in sod., 1992).

2.1.2.2 Lipopeptidni biosurfaktanti

Biosurfaktanti so površinsko aktivne snovi, ki jih izločajo nekateri mikroorganizmi in so sestavljene iz hidrofilnega in hidrofobnega dela (Lee in sod., 2007; Raaijmakers in sod., 2010). Lipopeptidni biosurfaktanti so sestavljeni iz lipidnega repa, vezanega na kratek linearni ali ciklični oligopeptid. Večino lipopeptidnih biosurfaktantov, ki jih izloča *Bacillus*, spada v 3 družine: surfaktini (esperin, lihenizin, pumilacidin, surfaktin), fengicini (fengicin A,D) in iturini (iturin A,C; bacilomicin D,F,L; mikosubtilin). Lipopeptidni biosurfaktanti iz iste družine so sestavljeni iz peptidov enake dolžine, ki imajo na specifičnih mestih različne ostanke. Vsaka varianta ima lahko več homologov različne dolžine in izomerov lipidne verige (Raaijmakers in sod., 2010). *B. amyloliquefaciens* lahko izloča surfaktinu podoben bamilocin A (Lee in sod., 2007).

Biosurfaktanti lahko delujejo na več načinov:

- Delujejo protivirusno, običajno inaktivirajo virus z ovojnico. Surfaktin *B. subtilis* deluje neposredno na virusno lipidno ovojnico (Vollenbroich in sod., 1997). Protivirusno deluje tudi analog surfaktina pumilacidin, ki ga izloča *B. pumilus* (Naruse in sod., 1990).
- Delujejo protitumorsko (surfaktin iz *B. subtilis*; Cao in sod., 2009).
- Delujejo protibakterijsko in protiglivno (Moyne in sod., 2001; Koumoutsu in sod., 2004; Lee in sod., 2007; Bais in sod., 2004; Pueyo in sod., 2009).
- Preprečijo tvorbo biofilma humanim patogenim mikrobom (Rivardo in sod., 2009).

Bacillus ne izloča surfaktantov le na umetnih gojiščih. *B. subtilis* naseli rizosfero paradižnika in v njegovi rizosferi izloča biološko signifikantne količine surfaktina (Nihorimbere in sod., 2009). Iz rizosfere kumar so izolirali surfaktin in iturin A, ki ju izloča *B. subtilis* (Kinsella in sod., 2009).

Bacillus z biosurfaktanti pomaga pri zaščiti gostiteljske rastline na več načinov:

- Rastlino lahko zaščitijo pred patogeni bakterijami in glivami. Bacilomicin D, ki ga izloča *B. subtilis*, deluje proti glivi *Aspergillus flavus* (Moyne in sod., 2001). *B. amyloliquefaciens* FZB42 izloča bacilomicin in fengicin, ki sinergistično delujeta proti *Fusarium oxysporum* (Koumoutsu in sod., 2004). Surfaktin *B. subtilis* lahko neposredno zavira rast razširjene fitopatogenene bakterije *Pseudomonas syringae* (Bais in sod., 2004).
- Biosurfaktanti delujejo kot signal za tvorbo biofilma na rastlini. Surfaktin *B. subtilis* deluje kot signal za tvorbo biofilma (Lopez in sod., 2009), zaradi njega se *Bacillus* obdrži na koreninah rastline in zaščiti rastline pred patogeni mikroorganizmi (Chen in sod., 2013; Bais in sod., 2004).
- Biosurfaktanti lahko sprožijo inducirano sistemsko odpornost. Ongena s sod. (2007), je dokazal, da *B. subtilis* z izločanjem fengicina in surfaktina sproži ISR.

2.1.2.3 Inducirana sistemska odpornost (ISR)

Določene nepatogene rizobakterije lahko sprožijo v rastlinah inducirano sistemsko odpornost (ISR), s čimer se rastlina sama sistemsko zaščiti pred različnimi patogeni organizmi (glivami, bakterijami, virusi, nematodami, parazitskimi rastlinami in celo insekti), tudi v nadzemnih

delih rastline. Rizobakterije, ki sprožijo ISR, ne izločajo nobenih metabolitov, ki bi delovali proti škodljivemu organizmu, na rastlini ne pustijo nobenih vidnih simptomov in izboljšajo rast gostiteljske rastline (van Loon in sod., 1998; Wei in sod., 1991). Sevi, ki sprožijo ISR, so prostorsko ločeni od patogenega organizma. Bakterije izzovejo ISR na paradižniku, papriki, dinjah, lubenici, sladkorni pesi, tobaku, *Arabidopsis* spp. in kumarah. V večini primerov sevi, ki sprožijo ISR, tudi spodbujajo rast rastlin (Kloepper in sod., 2004). *Bacillus* sproži ISR v rastlini preko različnih signalov, kot so: povečana peroksidazna aktivnosti, povečana produkcija hitinaz in β -1,3-glukanaz (Bargabus in sod., 2002), izločanje salicilne kislinske (Zhang in sod., 2002) ali surfaktina in fengicina (Ongena in sod., 2007).

ISR lahko sprožijo tudi hlapne organske snovi (volatile organic compounds –VOC), ki jih izločajo nekatere PGPR. *Bacillus subtilis* GB03 in *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a izločata acetion in 2,3-butandiol, ki pospešujejo rast *Arabidopsis* (Ryu in sod., 2003) ter sprožita ISR (Ryu in sod., 2004). Hlapljiv 2R, 3R-butandiol, ki ga izloča *Pseudomonas chlororaphis* O6, spodbuja rast tobaka in sproži ISR proti patogeni bakteriji *Erwinia carotovora* (Han in sod., 2006).

2.1.3 Kolonizacija korenin

PGPR mora učinkovito kolonizirati rizosfero in se v njej tudi obdržati, da sploh lahko pozitivno vpliva na gostiteljsko rastlino. Slaba kolonizacija vodi do zmanjšane biokontrolne učinkovitosti (Bais in sod., 2004). Kolonizacija korenin poteka pri večini mikroorganizmov zelo podobno. Koraki kolonizacije so prepoznavanje, adhezija (vezava), invazija (pri endofitih in patogenih mikrobih) in rast. Korenine izločajo majhne organske molekule, ki jih prepoznaajo rizobakterije in v njih sprožijo kemotakso. Rizobakterije se začnejo premikati proti koreninam in njenim eksudatom, kjer sledi kolonizacija korenin (Hartmann in sod., 2009). V *Bacillus subtilis* FB17 sproži kemotasko 2L-hidroksibutandiojska kislina, ki jo iz korenin izloča *Arabidopsis thaliana* okužen s *Pseudomonas syringae*. *Bacillus* se začne premikati proti koreninam, se nanje veže in jih kolonizira (Rudrappa in sod., 2008). Pomembno vlogo pri kolonizaciji korenin pri vrstah *Bacillus* igra biofilm. Dokazali so, da *B. subtilis*, ki ima okvarjen gen za surfaktin in zato ne tvori biofilma, zelo slabo kolonizira korenine *Arabidopsis* spp. in posledično ne zaščiti rastline pred *P. syringae* (Bais in sod., 2004). Podoben učinek so opazili tudi pri drugih vrstah *Bacillus*. Različne vrste *Bacillus* spp., ki so zmožne zaščititi paradižnik pred *Ralstonia solanacearum*, tvorijo na definiranih medijih

in na koreninah paradižnika močne biofilme. Če v teh sevih okvarimo gene za tvorbo biofilma, je njihova sposobnost biozaščite močno zmanjšana (Chen in sod., 2013).

2.2 *BACILLUS* SPP.

Bacillus subtilis je tipska vrsta rodu *Bacillus* in vegetativne celice so pogosto izolirali iz rizosfere rastlin. Vrsta izloča lipopetidne biosurfaktante in antibiotike, ki delujejo protiglivno in protibakterijsko (Moyne in sod., 2001; Bais in sod., 2004; Kinsella in sod., 2009). Vrsta pri rastlinah sproži ISR (Ongena in sod., 2007), spodbuja rast rastlin in zaščiti pred patogenimi mikrobi (Yu in sod., 2011). Zaradi svojih lastnosti se pogosto uporablja kot biokontrolni agens proti patogenim glivam in bakterijam (Bhattacharyya in Jha, 2012; Bais in sod., 2004). Določeni sevi so v Evropi registrirani kot aktivna substanca v biopesticidih (EU Commission, 2014).

B. subtilis je modelni organizem v raziskavah po Gramu pozitivnih bakterij. Kot modelni organizem se uporablja zaradi preproste genetske manipulacije, zaradi velike količine fizioloških in biokemijskih podatkov in dostopnosti genomskeh sekvenc. V veliki večini se v akademskih raziskavah in v veliko industrijskih procesih uporablajo sevi, ki so izpeljani iz seva 168 (Zeigler in sod., 2008). Sev sta izolirala Paul Burkholder in Norman Giles (1947) iz seva Marburg, ki sta ga obsevala z X-žarki. Sev 168 se je adaptiral na življenje v laboratoriju (se je udomačil; Zeigler in sod., 2008) in izgubil nekatere lastnosti, ki jih imajo drugi naravni izolati. Sev ne more producirati surfaktina (mutacija v genu *sfp*), tvoriti robustnega biofilma (mutacija v genu *epsC*), izločati zunajceličnih degradativnih encimov, kot so amilaze in proteaze (mutacija v genu *degQ*) in ne more polzeti (mutacija v genu *swrA*) (McLoon in sod., 2011). *Bacillus subtilis* BD2833 je sev, izpeljan iz seva 168, ki vsebuje fuzijo *srfA-lacZ*, kar omogoča spremljanje izražanja surfaktinskega operona s pomočjo beta galaktozidaze (Tortosa in sod., 2001).

B. amyloliquefaciens FZB42 je naravni izolat, ki spodbuja rast rastlin (Idris in sod., 2007) ter zavira patogene organizme (Koumoutsi in sod., 2004; Burkett-Cadena in sod., 2008). Sev je naravno kompetenten, njegov genom pa v celoti sekvenciran (Chen in sod., 2007). Sev je tudi komercialno dostopen (Biomex (Omx), RhizoVital® 42 (ABiTEP GmbH)) kot biognojilo. Tvorí močne biofilme, kar mu pomaga, da se obdrži v rizosferi (Beauregard in sod., 2013). Izloča fitaze (Idriss in sod., 2002) in ob prisotnosti triptofana tudi IAA (Idris in sod., 2007).

Na njegovem genomu so našli genske klastre, ki so povezani s sintezo lipopetidnih biosurfaktantov (geni za surfaktin, bacilomicin D in fengicin), genske klastre za sintezo antibakterijskega dipeptida bacilizina in genske klastre za siderofor (Chen in sod., 2007).

2.3 *RALSTONIA SOLANACEARUM*

R. solanacearum je po Gramu negativna, aerobna, gibljiva palčka, ki spada med proteobakterije. Je pomembna fitopatogena bakterija, ki povzroča velike ekonomske izgube po vsem svetu. Bakterija je endemična v večini subtropskih in tropskih regij, našli pa so jo tudi v zahodni Evropi. Povzroča bakterijsko venenje pri rastlinah iz družine razhudnikovk (paradižnik, krompir, tobak, jajčevci), nanjo pa so občutljive tudi določene stročnice (navadni fižol), enokaličnice (banane, ingver) in drevesa ter grmovnice (oliva, evkaliptus, manioka, murva). *R. solanacearum* lahko v zemlji v odsotnosti gostitelja preživi dolga obdobja, kar lahko pripisemo njeni zmožnosti, da vstopi v dormantno stanje, v katerem je ne moremo vzgojiti v laboratorijskih pogojih (»viable but not culturable«), poleg tega pa lahko preživi tudi v vodotokih in v plevelih. Mikrob okuži rastlino preko ran na koreninah ali na mestih pojavljanja sekundarnih korenin. Bakterija nato vstopi v žilni sistem in se po njem širi (Genin in Boucher, 2002).

R. solanacearum je fenotipsko in genetsko zelo raznolika, kar otežuje vzgojo univerzalno odpornih rastlinskih linij. Na voljo je malo načinov zaščite pred patogeno bakterijo, večinoma so vezani na uporabo semen in sadik, ki so brez škodljivih organizmov (Genin in Boucher, 2002). Proti njej ne obstaja nobeno učinkovito kemično sredstvo. Obstajajo dokazi, da lahko nekatere antagonistične rizobakterije zavirajo rast *R. solanacearum*. *B. amyloliquefaciens* v kombinaciji z organskimi gnojili zavira rast *R. solanacearum* na jajčevcih (Chen in sod., 2014). Na paradižniku sta se kot potencialna biokontrolna agensa pokazala *Acinetobacter* spp. (Xa6) (Xue in sod., 2009) in *B. subtilis* B2G (Lemessa in Zeller, 2007), bakterijsko venenje krompirja signifikantno zmanjšajo *Bacillus subtilis* PFMRI in *Paenibacillus macerans* BS-DFS ter PF9 (Aliye in sod., 2008).

2.4 NAVADNI REPENJAKOVEC (*ARABIDOPSIS THALIANA*)

Arabidopsis thaliana je dvokaličnica iz družine križnic (*Brassicaceae*) in se v naravi pojavlja v Evropi, Aziji in severni Ameriki. Ima majhen genom, ki je organiziran v 5 kromosomov. Iz narave so zbrali veliko različnih ekotipov, kot standarda za genetske in molekularne študije pa se uporablja ekotipa Columbia in Landsberg. Celoten življenjski cikel rastline traja 6 tednov. Cvetovi so veliki 2 mm in se lahko samooprašijo. Sadike se razvijejo v rozetno rastlico, katere listi so pokriti s trihomimi (enocelični laski). Odrasla rastlina doseže višino 15 do 20 cm in proizvede veliko število majhnih semen (Meinke in sod., 1998). Korenina je preprosta, ima glavno korenino z več manjšimi stranskimi koreninami. Na začetku razvoja je rast korenine omejena na glavno korenino, kasneje se koreninski sistem razširi z razvojem stranskih korenin. Pod optimalnimi rastnimi pogoji glavna korenina raste vztrajno navzdol. Stresni okoljski dražljaji (npr. pomanjkanje hranil) lahko zavrejo podaljševanje glavne korenine, kar privede do povečanega razvoja stranskih korenin. Na razvoj koreninskega sistema vplivajo tudi rizosferne bakterije z izločanjem fitohormonov in drugih snovi (Lopez-Bucio in sod., 2006). *Arabidopsis* je preprost za gojenje. Gojimo ga lahko na petrijevih ploščah v laboratoriju pod fluorescentno svetlobo ali v rastlinjakih v lončkih (Meinke in sod., 1998).

Arabidopsis thaliana je uporaben kot modelna rastlina zaradi:

- majhnega genoma, kar omogoča natančne molekularne analize,
- izdelanega protokola transformacije z *Agrobacterium*,
- kratkega življenjskega cikla (6 tednov),
- velikega števila semen,
- preprostega gojenja v laboratoriju,
- velikega števila mutant z različnim fenotipom (Meinke in sod., 1998; Lopez-Bucio in sod., 2006).

2.5 BIOGNOJILA IN BIOPESTICIDI

Intenzivno kmetijstvo povečuje pridelke z izborom varietet, ki so prilagojene lokalnim razmeram, omejevalni dejavniki – voda, dušik in fosfati – pa se z namakanjem in gnojenjem zagotavlja v presežkih (Tilman, 1999). Fosfati, ki jih v zemljo dodajo z gnojili, se hitro pretvorijo v netopne komplekse in postanejo nedostopni za rastline. Rastline zato porabijo manj fosfatov, kot pa se jih v tla doda z gnojili. Potrebna je nenehna ponovna aplikacija fosfatnih gnojil v tla (Hameedaa in sod., 2008), zaradi prepogoste aplikacije fosfatov pa lahko ti pronica do podzemnih vod (Chen in sod., 2006). Dušik je v tleh zelo mobilen in v obliki nitrata hitro pronica v podtalnico ali se po denitrifikaciji kot N_2 ali N_2O izgublja v ozračje. Zaradi nenehnega gnojenja zato prihaja do evtrofikacije vodnih ekosistemov in posledično do prevlade določenih prej redkih živalskih in rastlinskih vrst (Tilman, 1999). Škodljivce se aktivno kontrolira s sintetičnimi pesticidi. Le-ti imajo negativen vpliv na človeško zdravje in okolje, zaradi prekomerne uporabe se pojavljajo odpornosti, potrošnike pa skrbi pojavljanje ostankov pesticidov in njihovih pogosto še bolj toksičnih metabolitov v hrani (Chandler in sod., 2011). Alternativo oziroma dopolnitev pesticidom in gnojilom predstavljajo biopesticidi ter biognojila.

2.5.1 Definicija

Vessey (2003) je kot biognojilo definiral substanco, ki vsebuje žive mikroorganizme, ki izboljšajo stanje hranil v rastlini. Apliciramo ga lahko na semena, rastlinske površine ali v tla. Biognojila lahko vsebujejo PGPR in določene glive (običajno arbuskularne mikorizne glive). Največ na prevzem hranil iz tal vplivajo vrste, ki povečajo površino koreninskega sistema. V biognojilih zato najdemo mikroorganizme, ki izločajo določene fitohormone (citokinini, giberelini, IAA) in ACC deaminazo. PGPR lahko delujejo tudi kot pomočniške bakterije (»helper« bacteria) in spodbujajo simbiozo med stročnicami in rizobiji ali simbiozo med rastlino in glivami (Barnawal in sod., 2013; Trivedi in sod., 2007). Kot pomočniške bakterije posredno pomagajo pri prevzemu in razpoložljivosti primarnih hranil. Običajno je izboljšana rast rastline zaradi ene vrste PGPR posledica več različnih mehanizmov delovanja, pa tudi posledica skupnega delovanja več mikroorganizmov v rizosferi. Določene PGPR pa lahko delujejo hkrati kot biognojila in biopesticidi (Vessey, 2003).

Široka definicija biopesticida obsega snovi, ki so namenjene obvladovanju rastlinskih škodljivcev (patogeni mikrobi, pleveli, vretenčarske in nevretenčarske vrste) in vsebujejo žive mikroorganizme ali naravne produkte. Glede na aktivne substance jih lahko razdelimo na mikroorganizme, biokemikalije (sekundarni metaboliti rastlin, ki odganjajo herbivore) in semiokemikalije (kemijski signal, ki ga izloča organizem, in spremeni vedenje posameznika iste ali druge vrste). Agencija za varstvo okolja ZDA (EPA ZDA) med biopesticide uvršča tudi določene transgene rastline (Chandler in sod., 2011). Mikroorganizmi, ki se lahko uporabljajo v biopesticidih, zavirajo patogene organizme s pomočjo proizvodnje antibiotikov, sideroforov, HCN, litičnih encimov, določeni pa rastlino pred škodljivci zavarujejo, ker v gostiteljski rastlini sprožijo ISR (Bhattacharyya in Jha, 2012). Rizobakterije lahko rastline zaščitijo pred patogenimi mikroorganizmi s preprostim mehanizmom, imenovanim »tekmovanje za nišo in hranila«. Bakterije patogenemu mikrobu zasedejo prostor v rizosferi in porabijo hranila za njegovo rast, posledično pa patogen mikroorganizem ne more kolonizirati gostitelja (Kamilova in sod., 2005). V Evropi so kot aktivne substance v pesticidih registrirani *Bacillus firmus* I-1582, *Bacillus pumilus* QST 2808 in *Bacillus subtilis* str. QST 713, več sevov *Bacillus thuringiensis*, določeni sevi *Pseudomonas* in še nekaj bakterij, gliv ter virusov (EU Commision, 2014).

2.5.2 Omejitve ter prednosti biognojil in biopesticidov

Biopesticidi so selektivni, za njimi ostane malo toksičnih ostankov, mikrobiološki pesticidi pa se razmnožujejo celo na ali v bližini škodljivca (Chandler in sod., 2011). Omejitve biopesticidov so počasnejše delovanje, krajsa obstojnost v okolju in doveznost za neugodne okoljske razmere. Biopesticidi niso tako učinkoviti kot sintetični in njihov razvoj in fiksni stroški so višji kot pri sintetičnih pesticidih. Ozka specifičnost biopesticidov je dobra za okolje, vendar je kmetu zaradi nezanesljivosti delovanja za zdaj manj zanimiva. V Evropi je registriranih le nekaj mikrobnih biopesticidov, saj so stroški razvoja in končni stroški prodaje višji kot pri sintetičnih pesticidih, biopesticidi pa tudi morajo zadostiti vsem zahtevam zakonov, kar včasih zavira razvoj in registracijo (Chandler in sod., 2011). Biognojila lahko rastlini zagotovijo pomembna hranila z raztplavljanjem netopnih oblik hranil, ki rastlini prej niso bila dostopna in tako lahko zmanjšamo vnos dušika in fosforja v okolje (Hameedaa in sod., 2008). Problem biognojil je, da vsi laboratorijski ali terenski poskusi ne dajejo enoznačnih rezultatov, učinkovitost inokulacije mikroorganizmov je namreč odvisna od vrste

tal, gostiteljskega kultivarja, vsebnosti hrani v tleh in drugih parametrov (Rodriguez in Fraga, 1999; Vessey, 2003).

2.5.3 *Bacillus* v biognojilih in biopesticidih

PGPR so zaradi svojih lastnosti odlični kandidati za uporabo kot biopesticidi in biognojila. Med njimi je dober kandidat *Bacillus*, ki tvori endospore, kar omogoča lažjo formulacijo in lažje shranjevanje komercialnih proizvodov. Rok trajanja bioloških produktov, osnovanih na bakterijskih sporah, je lahko 1–3 let. Prednost spor je njihova robustnost in odpornost na povišane temperature in visoke koncentracije kemikalij. Slabost spor v komercialnih proizvodih je čas, ki je potreben, da postanejo organizmi zopet metabolno aktivni (Kumar in sod., 2012; Hayat in sod., 2010). V ZDA je na trgu komercialno dostopnih več različnih produktov na podlagi PGPR. Večina teh produktov vsebuje seve *Bacillus*, ki so se na trgu bolje obnesli kot produkti na osnovi asporogenih pseudomonad, katerih čas viabilnosti je krajši (Kloepper in sod., 2004).

Učinkovit biokontrolni mikroorganizem (kot tudi mikroorganizem, ki je aktivna substanca v biognojilu) mora imeti zmožnost, da se obdrži v tleh in agresivno kolonizira rizosfero rastline (Dunne in sod., 1997). Prednost rodu *Bacillus* je zmožnost določenih sevov, da tvorijo biofilme, ki jim omogočajo kolonizacijo korenin (Bais in sod., 2004).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Rastlinski material in rastni pogoji

Uporabljali smo *Arabidopsis thaliana* Col-0 (wt), ki smo ga gojili v rastni komori. Dnevna temperatura je bila 23 °C in dan je trajal od 7:00 do 23:00 (16h), nočna temperatura je bila 19 °C in noč je trajala od 23:00 do 7:00 (8h). Vlaženje je bilo izklopljeno. Za osvetlitev smo uporabljali neonske luči z intenziteto 600 mS.

3.1.2 Bakterijski sevi

Seve 6051, GB03 in FZB42 smo uporabili kot pozitivno kontrolo, ker so že prej pokazali pozitiven vpliv na rast rastlin (Bais in sod., 2004; Ryu in sod., 2003; Xie in sod., 2009; Idris in sod., 2007). Sevi z oznako T so bili izolirani iz rizosfere paradižnika v Sloveniji (T za tomato), sledeča številka označuje rastlino, iz katere so bili izolirani, npr. sevi T14-1, T14-3 in T14-4 so bili izolirani iz rizosfere iste rastline (Oslizlo in sod., 2015). Sevi z oznako PS so bili izolirani iz nabrežja Save (Stefanic in Mandic-Mulec, 2009). Vsi sevi, ki smo jih uporabili, so zapisani v Preglednici 1.

Pri testu protibakterijske aktivnosti sevov *Bacillus* smo uporabili *Ralstonia solanacearum* (sev NCPBB 4156).

Preglednica 1: Sevi *Bacillus*, ki smo jih testirali.

Vrsta <i>Bacillus</i>	Sev	Izvor ali izolacija seva
<i>B. subtilis</i>	BD2833	Tortosa in sod., 2001
<i>B. subtilis</i>	PS-216	Stefanic in Mandic-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i>	6051	ATCC DSM 10
<i>B. subtilis</i>	T12-1	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i>	T14-1	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i>	T14-3	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i>	T14-4	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i>	T14-5	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. licheniformis</i>	T15-1	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i>	T16-2	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i>	T16-3	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i>	T16-4	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i>	T16-5	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. licheniformis</i>	T16-6	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. amyloliquefaciens</i>	T16-7	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i>	T16-8	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i>	T16-10	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i>	T17-1	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. megaterium</i>	T19-1	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i>	T21-2	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. pumilus</i>	T24-5	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. licheniformis</i>	T26-2	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. licheniformis</i>	T31-1	Oslizlo in sod., 2015
<i>B. subtilis</i>	PS-95	Stefanic in Mandic-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i>	PS-160	Stefanic in Mandic-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i>	PS-194	Stefanic in Mandic-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i>	PS-209	Stefanic in Mandic-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i>	PS-210	Stefanic in Mandic-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i>	PS-263	Stefanic in Mandic-Mulec, 2009
<i>B. subtilis</i>	GB03	BGSC 3A37
<i>B. amyloliquefaciens</i>	FZB42	BGSC 10A6

3.1.3 Kemikalije

Vse kemikalije, ki smo jih uporabili, so zapisane v Preglednici 2.

Preglednica 2: Uporabljeni kemikaliji.

Kemikalija	Proizvajalec	Kemikalije	Proizvajalec
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Merck (Nemčija)	LB broth	Sigma-Aldrich (ZDA)
13% Na hipoklorit	Kemika (Hrvaška)	L-histidin	Fluka (Švica)
70% HClO_4	Merck (Nemčija)	L-metionin	Merck (Nemčija)
8-hidroskikvinolin	Fluka (Švica)	L-triptofan	Sigma-Aldrich (ZDA)
96% etanol	Merck (Nemčija)	maltoza	Difco
Agar-agar	Fluka (Švica)	$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich (ZDA)
$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck (Nemčija)	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Merck (Nemčija)
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Sigma-Aldrich (ZDA)	$\text{MnCl} \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck (Nemčija)
CaCl_2	Sigma-Aldrich (ZDA)	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Merck (Nemčija)
Chrome azurol S	Sigma-Aldrich (ZDA)	MOPS	Merck (Nemčija)
CMC	Sigma-Aldrich (ZDA)	MS prah	Sigma-Aldrich (ZDA)
D-glukoza	Sigma-Aldrich (ZDA)	MUF	Sigma-Aldrich (ZDA)
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Fluka (Švica)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich (ZDA)
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Merck (Nemčija)	NaCl	Merck (Nemčija)
glicerol	Sigma-Aldrich (ZDA)	NaH_2PO_4	Fluka (Švica)
HCl	Merck (Nemčija)	NaHCO_3	Merck (Nemčija)
HDTMA	Sigma-Aldrich (ZDA)	NaNO_3	Sigma-Aldrich (ZDA)
IAA	Sigma-Aldrich (ZDA)	NH_4Cl	Kemika (Hrvaška)
Jod	Kemika (Hrvaška)	Ortofosforna kislina	Merck (Nemčija)
K_2HPO_4	Sigma-Aldrich	Pektin iz citrusov	Sigma-Aldrich (ZDA)
Kazamino kisline	BD (ZDA)	pepton	Biolife (Italija)
Kazein hidrolizat	BD (ZDA)	PIPES	Roth
KCl	Sigma-Aldrich (ZDA)	Saharoza	Merck (Nemčija)
KH_2PO_4	Sigma-Aldrich (ZDA)	Skim milk	BD (ZDA)
KI	Kemika (Hrvaška)	Taninska kislina	Riedel
kloroform	Sigma-Aldrich (ZDA)	Tiamin	Fluka (Švica)
Kvasni ekstrakt	Biolife (Italija)	Tris HCl	Sigma-Aldrich (ZDA)
LB agar	Sigma-Aldrich (ZDA)	ZnCl_2	Sigma-Aldrich (ZDA)

3.1.4 Gojišča

3.1.4.1 LB gojišča

Pri eksperimentih smo uporabljali trdno in tekoče gojišče LB. Za trdno LB gojišče smo v 1 L destilirane vode raztopili 35 g LB agar, gojišče smo nato avtoklavirali in ohladili na 55 °C v vodni kopeli. Ohlajeno gojišče smo nalili v plastične petrijevke s premerom 70 mm. Za tekoče gojišče smo v 1 L destilirane vode raztopili 20 g LB broth in gojišče avtoklavirali. Avtoklavirana gojišča smo do uporabe hranili v hladni sobi na 4 °C.

LB gojišče s triptofanom (1 mg/mL) smo pripravili tako, da smo v 1 L LB tekočega gojišča dodali 1 g triptofana, nato avtoklavirali.

3.1.4.2 CM tekoče gojišče

Najprej smo pripravili 1x SS raztopino. V 1 L destilirane vode smo po vrstnem redu dodali 6 g KH₂PO₄, 14 g K₂HPO₄, 2 g (NH₄)₂SO₄, 1 g C₆H₅Na₃O₇ x 2 H₂O in 0,2 g MgSO₄ x 7 H₂O. Raztopino smo nato avtoklavirali. V 1x SS raztopino smo nato sterilno dodali naslednje sterilne raztopine: 10 mL 50% glukoze, 10 mL 2% kazein hidrolizata, 10 mL 10% kvasnega ekstrakta, 5 mL histidina, 5 mL metionina in 2,5 mL 1M MgCl₂ (Albano in sod., 1987). 1x SS raztopino in posamezne komponente smo do uporabe hranili na 4 °C in jih šele pred uporabo sterilno zmešali.

3.1.4.3 Trdno gojišče za proteaze

V 200 mL destilirane vode smo raztopili 20 g mleka v prahu in v 200 mL destilirane vode smo raztopili 20 g agarja. Dodatno smo pripravili 600 mL 0,2 M fosfatnega pufra s pH 7,0. Vse 3 komponente smo avtoklavirali in jih po avtoklaviranju zmešali v sterilnih pogojih (Saran in sod., 2007) in nalili na petrijevke s premerom 70 mm. Do uporabe smo gojišča hranili na 4 °C.

3.1.4.4 CMC agar

V 900 mL destilirane vode smo najprej raztopili 1,8 g CMC (karboksimetil celuloza), nato smo dodali 1,8 g NaNO₃, 0,9 g K₂HPO₄, 0,92 g MgSO₄ x 7H₂O, 0,45 g KCl, 0,18 g peptona, 15,3 g agarja in nato smo pH prilagodili na 7 (Kasana in sod., 2008). Gojišče smo

avtoklavirali in nalili v petrijevke s premerom 70 mm. Do uporabe smo gojišča hranili na 4 °C.

3.1.4.5 Gojišče za siderofore

Gojišče je bilo sestavljeno iz zgornjega in spodnjega medija.

Spodnji medij

Najprej smo vso steklovino splaknili s HCl in destilirano vodo, da smo se znebili vseh sledi železa. Pripravili smo 100 mL MM9 (Minimal Media 9), tako da smo v bidestilirani vodi (ddH₂O) raztopili 3 g KH₂PO₄, 5 g NaCl in 10 g NH₄Cl in nato dolili vodo do 100 mL. V 750 mL destilirane vode smo raztopili 15 g agarja. V 100 mL ddH₂O smo raztopili 20 g glukoze. Vsako raztopino posebej smo avtoklavirali. V 27 mL ddH₂O smo raztopili 3 g kazamino kislin (angl. casamino acids), iz katerih smo odstranili železo tako, da smo v razmerju 1:1 zmešali 10% raztopino kazamino kislin s 3% raztopino 8-hidroksikvinolina (angl. hydroxyquinoline) v kloroformu in izluževali železo 2 dni na 4 °C. Kazamino kisline smo nato filtrirali s filtri s premerom por 0,20 µm. Nato smo sterilno zmešali 750 mL agarja z 100 mL MM9, 30 mL 10% kazamino kislin in 10 ml 10% glukoze (Schwyn in Neilands, 1987). Gojišče smo nalili na petrijevke in do uporabe shranili na 4 °C.

Zgornji medij

Vrhni medij smo pripravili, kot je zapisal Perez-Miranda s sod. (2007). V 17,5 mL ddH₂O smo raztopili 0,021 g Chrome azurol S (CAS), v 10 mL 10 mM HCl smo raztopili 0,003 g FeCl₃ x 6H₂O in v 14 mL ddH₂O smo raztopili 0,026 g HDTMA (angl. hexadecyltrimethyl ammonium bromide). Nato smo v CAS raztopino dodali 3,15 mL FeCl₃ v HCl in 14 mL HDTMA in raztopino avtoklavirali. 315 mL destilirane vode smo pH uravnali na 6 in v njej raztopili 10,584 g PIPES (angl. piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)), tako da smo dvigovali pH do 6,8, nato smo dodali še 3,15 g agarja. Raztopino smo nato avtoklavirali. Aseptično smo ju nato združili ob nenehnem mešanju in takoj uporabili.

3.1.4.6 Pikovskayas agar

V 1 L destilirane vode smo dodali 15 g agarja, 10 g glukoze, 5 g Ca₃(PO₄)₂, 0,5 g kvasnega ekstrakta, 0,5 g (NH₄)₂SO₄, 0,2 g KCl, 0,1 g MgSO₄ x 7H₂O, 100 µL 5,3 mM MnSO₄ (9 mg

$MnSO_4 \times H_2O$ v 10 mL dH₂O) in 100 µL 6,5 mM FeSO₄ (18 mg FeSO₄ × 7H₂O v 10 mL dH₂O) (Sundara-Rao in Sinha, 1963). Gojišče smo avtoklavirali in nalili v petrijevke. Do uporabe smo plošče hranili na 4 °C.

3.1.4.7 King B agar

V 1 L ddH₂O smo raztopili 20 g proteoznega peptona (Oxoid, LP0085), 1,5 g K₂HPO₄ (Kemika/Merk), 1,5 g MgSO₄ × 7H₂O, 15 mL (18,9 g) glicerola (Difco glicerol 228220) in 15 g agarja (Oxoid agar No. 3) (King in sod., 1954).

3.1.4.8 CPG agar

V 1 L ddH₂O smo raztopili 1 g kazamino kislin, 10 g peptona, 10 g glukoze, 18 g agarja. Gojišče smo avtoklavirali pri 110 °C 20 min in nato ohladili na 55 °C in razlili na petrijeve plošče (Kelman, 1954). Do uporabe smo gojišče hranili na 4 °C.

3.1.4.9 MSN gojišča

Gojišča smo pripravili, kot je opisal Pascale s sod. (2012).

MSNg

Založno koncentracijo 10x MSNg smo pripravili tako, da smo v 100 mL raztopili 0,566 g K₂HPO₄, 0,272 g KH₂PO₄, 20,93 g MOPS (angl. 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) in uravnali na pH 7. Nato smo dodali 0,405 g MgCl₂ × 6H₂O, 50 µL 1 M MnCl (0,161 g MnCl v 1 mL dH₂O), 1 µL 1 M ZnCl₂ (0,136 g v 1 mL dH₂O), 0,104 g CaCl₂, 2 g NH₄Cl in 0,5 g glicerola. Gojišče smo avtoklavirali in po avtoklaviranju dodali še 2 µL filtriranega 1 M tiamina. Pred uporabo smo gojišče primerno redčili s sterilno dH₂O.

MSNc in MSNc s pektinom

10x MSNc smo pripravili na enak način kot MSNg, le da smo namesto glicerola dodali 5 g maltoze. V MSNc z 0,5% pektinom smo v redčeno gojišče dodali primerno količino sterilnega 2% pektina iz citrusov.

3.1.4.10 MS agar z 1% saharozo in 0,05% glukozo

V 1 L dH₂O smo dodali 2,2 g MS mešanice (Murashige and Skoog basal salts mixture) in 10 g saharoze. pH samo nato umerili na 5,6 do 5,8 in dodali 10 g agarja. Gojišče smo nato avtoklavirali in ohladili na 55 °C. Gojišče smo razlili na kvadratne plošče s stranico 10 cm. Do uporabe smo gojišča hranili na 4 °C. Enako smo pripravili tudi gojišča z 0,05% glukozo, le da smo namesto saharoze dodali 0,5 g glukoze.

3.1.5 Pufri in reagenti

3.1.5.1 Fiziološka raztopina

V 1 L destilirane vode smo raztopili 9 g NaCl.

3.1.5.2 Salkowski reagent (FeCl₃-HClO₄)

Reagent smo pripravili, kot sta zapisala Gordon in Weber (1951). Za reagent smo uporabili 70% HClO₄, ki smo jo v razmerju 1:1 zmešali z destilirano vodo. Na 50 mL 35% HClO₄ smo dodali 1 mL 0,5 M FeCl₃, ki smo ga pripravili tako, da smo v 1 mL dH₂O raztopili 81 mg FeCl₃.

3.1.5.3 Izotonični pufer (140 mM NaCl in 20 mM Tris, pH 7,4)

V 1 L destilirane vode smo raztopili 3,15 g Tris HCl in 8,150 g NaCl, nato smo pH uravnali na 7,4.

3.1.5.4 0,2 M fosfatni pufer, pH 7,0

V 1 L destilirane vode smo raztopili 42,306 g Na₂HPO₄ x 2H₂O in 17,06 g NaH₂PO₄. pH smo uravnali na 7.

3.1.5.5 10% taninska kislina

V 100 mL destilirane vode smo raztopili 10 g taninske kisline (angl. tannic acid).

3.1.5.6 Jodovica

V 300 mL destilirane vode smo raztopili 2 g KI in 1 g joda.

3.1.5.7 0,01 M PBS

V ddH₂O smo raztopili 1,071 g Na₂HPO₄, 0,4 g NaH₂PO₄ · 2H₂O in 8 g NaCl.

3.1.6 Laboratorijska oprema

Vsa laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili, je zapisana v Preglednici 3, laboratorijski material pa v Preglednici 4.

Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
avtoklav (A-21)	Kambič (Slovenija)
centrifuge (Centrifuge 5424; Centric 150; Sigma 3K30)	Eppendorf (Nemčija); Tehnica (Slovenija); Labcare (Velika Britanija)
DEN-1B Densitometer	Biosan
fotometer (MA 9150)	Iskra (Slovenija)
laminarij (Laminar Flow Cabinet)	ESCO (ZDA)
magnetno mešalo (Rotamix 550 MMH)	Tehnica (Slovenija)
pH meter (inoLab)	WTW (Nemčija)
rotavapor (Waterbath B-480)	BUCHI (Nemčija)
Safire II microplate reader	Tecan
stresalnik (Vibromix 40; V. EV 403; V. EVT 403)	Tehnica (Slovenija)
tehnicna (Mettler PM4600 DeltaRange Balance)	Lab Extrem (ZDA)
UV/VIS spektrofotometer (Multiskan Spectrum Microplate Reader)	Thermo Scientific (ZDA)
vortexno mešalo (MS 3 digital)	IKA (Nemčija)
lupa (Wild M10)	Lecia

Preglednica 4: Uporabljen laboratorijski material.

Material	Proizvajalec
avtomatske pipete	Eppendorf (Nemčija)
multikanalna pipeta	Brand (Nemčija)
filtri 0,20 µm	Sigma-Aldrich (ZDA)
mikrocentrifugirke	Sigma-Aldrich (ZDA)
mikrotitrskie plošče	Brand (Nemčija)
petrijevke (70 mm)	Golias Laboratehnika (Slovenija)
pipetni nastavki	Sarstedt (Nemčija)

3.2 METODE

3.2.1 Posredni mehanizmi

S spodnjimi testi smo pri sevih *Bacillus* preverjali, če imajo določene posredne mehanizme, ki bi potencialno lahko pomagali pri zaščiti rastline pred patogenimi organizmi.

3.2.1.1 Encimski litični testi

Priprava bakterijskih kultur je v vseh primerih encimskih litičnih testov potekala na enak način. Prekonočnim kulturam iz LB smo izmerili optično gostoto (OD_{650}) in celice iz 1 mL kulture dvakrat sprali s fiziološko raztopino. Celice smo nato resuspendirali v fiziološki raztopini, tako da smo izenačili gostoto celic pri vseh testiranih sevih. V primeru proteaz in celulaz smo na primerno trdno gojišče nacepili 5 μL pripravljene suspenzije celic v 2 bioloških ponovitvah v 2 paralelkah. Pri testu za hitinaze pa smo tako pripravljeni suspenziji dodali ustrezno količino reagentov in poskus izvedli v 2 bioloških ponovitvah.

Test za proteaze

Test za proteaze smo izvedli po metodi, ki jo je opisal Saran s sod. (2007). Test smo izvajali na trdnih gojiščih za proteaze. Gojišča smo nato 24 ur inkubirali pri 37 °C. Gojišča z nastalimi kolonijami smo prelili z 10% taninsko kislino in opazovali cone zbistritve (halo cone). Rezultate smo kvalitativno ocenili.

Test za celulaze

Test za celulaze smo izvedli, kot je opisal Kasana s sodelavci (2008). Test smo izvajali na trdnem CMC gojišču. Gojišča smo inkubirali pri 37 °C 5 dni in jih nato prelili z 2–3 mL jodovice in inkubirali 5 min. Okoli kolonij smo opazovali cono razbarvanja. Rezultate smo kvalitativno ocenili.

Test za hitinaze

Test smo izvedli po metodi, ki sta jo opisala O'Brien in Colwell (1987). V 500 μL suspenzije smo dodali 20 μL reagenta MUF (4-metilumbeliferil-N-acetyl- β -glukozaminid) in inkubirali s stresanjem 10 min pri 37 °C. Po inkubaciji smo v suspenzijo dodali 2 kapljici nasičenega NaHCO_3 in prenesli po 200 μL suspenzije na črno mikrotitrsko ploščo. Fluorescenco smo

določili z uporabo Safire II microplate reader z vzbujevalno valovno dolžino 360 nm in emisijsko valovno dolžino 450 nm.

3.2.1.2 Hemolitični test na prisotnost biosurfaktantov

Prekonočno kulturo celic smo iz LB tekočega gojišča precepili v CM tekoče gojišče (Albano in sod., 1987) in inkubirali pri 37 °C. Po 6 (faza T2) in 24 urah (pozna stacionarna faza) smo celice odcentrifugirali (8000 g, 5 min) in za nadaljnje poskuse uporabili izrabljeno gojišče. Za vsak sev smo imeli 2 biološki ponovitvi. Aktivnost biosurfaktantov v izrabljenem gojišču smo merili s hemolitičnim testom (Moran in sod., 2002). Rdeče krvne celice (RKC) iz goveda smo spirali z izotoničnim pufrom (140 mM NaCl in 20 mM Tris, pH 7,4) dokler supernatant nad krvnimi celicami ni postal bister. Na koncu smo krvne celice sprali s fiziološko raztopino. RKC smo nato resuspendirali v fiziološki raztopini do optične gostote 0,7. Izrabljeno gojišče smo razredčili s CM gojiščem v razmerju 1:1 in 4:1. V mikrotitrski plošči smo zmešali 100 µL izrabljenega gojišča (neredčenega, 2x in 5x redčenega), 30 µL 96% etanola in 100 µL RKC. Optično gostoto ($\lambda=650$ nm) smo zmerili takoj po dodatku RKC in po 15 minutni inkubaciji na sobni temperaturi. Za vsak sev smo izračunali odstotek zmanjšanja optične gostote, ki smo ga pretvorili v odstotek hemolize. Odstotek hemolize smo nato delili z optično gostoto kulture, ki smo jo izmerili pred centrifugiranjem CM gojišča s celicami.

3.2.1.3 Protibakterijska aktivnost proti *Ralstonia solanacearum*

Protibakterijsko aktivnost sevov *Bacillus* proti *R. solanacearum* (sev NCPBB 4156) smo preizkusili z difuzijsko metodo z diskami na dveh vrstah trdnega gojišča: na neselektivnem CPG agarju (casamino acid-peptone-glucose medium; Kelman, 1954), kjer je bila glukoza glavni vir ogljika in na selektivnem agarju King B (King in sod., 1954), kjer je bil glavni vir ogljika glicerol. V 0,01 M PBS pufru smo pripravili suspenzijo celic *R. solanacearum* z gostoto 10^8 celic/mL (turbidnost smo izmerili z DEN-1B Densitometer, Biosan). Na CPG in King B agar (plošče s premerom 70 mm) smo razmazali 100 µL suspenzije celic. Nato smo na agar nanesli 3 diske in na vsak disk 5 µL suspenzije sevov *Bacillus* v 0,01 M PBS z gostoto 10^8 celic/mL. Plošče smo nato inkubirali na 28 °C 2 dni in po koncu inkubacije smo izmerili premer cone inhibicije rasti *R. solanacearum*. Kot negativno kontrolo smo na disk nanesli PBS pufer.

3.2.1.4 Biofilmi sevov *Bacillus* v tekočem gojišču z dodatkom rastlinskih komponent

Gojišče z dodatkom rastlinskih komponent smo pripravili po modificirani metodi, ki jo je opisal Beauregard s sod. (2013). Rastline *A. thaliana* smo gojili 10 dni na trdnem MS gojišču z 0,05% glukozo. Nato smo izbrane, približno 2 cm dolge sadike, prenesli na plošče z 12 luknjicami, ki so vsebovale po 4 ml tekočega 0,2x MSNg gojišča (10x MSNg ustrezeno razredčen s sterilno dH₂O) – po 4 sadike na luknjico. Ploščo smo nato inkubirali 2 tedna v rastni komori. Rastline smo odstranili in preko noči posušili pri 37 °C. Trdne dele rastlin smo naslednji dan zdrobili v terilnici v tekočem dušiku in jih raztopili v 60 mL dH₂O (1 ml na 5 rastlin). Raztopino smo prefiltrirali (premer por filtra 0,2 µm) in suspenzijo 10x koncentrirali s pomočjo rotavaporja. Suspenzijo smo nato ponovno sterilizirali preko filtracije. Suspenzijo smo poimenovali ekstrakti rastlin. Izrabljeno MSNg gojišče, v katerem so rastle, smo 10x koncentrirali s pomočjo rota vaporja in suspenzijo sterilizirali preko filtracije. Suspenzijo smo poimenovali eksudati korenin.

Seve *Bacillus* smo preko noči gojili v tekočem LB gojišču, jih nato dvakrat sprali s fiziološko raztopino in resuspendirali v primerni količini fiziološke raztopine, da smo dosegli enako celično gostoto suspenzij vseh sevov. Suspenzijo smo nacepili (2% končni delež) v mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami. Vsaka luknjica je vsebovala 160 µL gojišča: 0,5x ekstrakt rastlin (redčen v MSNc); 0,5x eksudat korenin (redčen v MSNc); MSNc gojišče z 0,5% pektinom in MSNc gojišče. Vsak sev smo nacepili v dveh bioloških ponovitvah. Mikrotitrsko ploščo smo pri 37 °C inkubirali 24 h brez stresanja. Biofilme smo nato najprej kvalitativno ocenili z uporabo lupe.

Naknadno smo ocenili še suho maso biofilmov *Bacillus*. Seve *Bacillus* spp. smo gojili 24 ur pri 37 °C v petrijevkah (premer 70 mm) v 10 ml MSNc gojišča z 0,5% pektinom. Celice smo centrifugirali (8000 g, 5 min), odstranili smo supernatant in jih dvakrat sprali s fiziološko raztopino. Biofilme smo preko noči sušili na 60 °C in nato stehtali maso suhe snovi.

3.2.2 Neposredni mehanizmi

S spodnjimi testi smo pri sevih *Bacillus* preverjali, če imajo določene neposredne mehanizme, ki bi potencialno lahko pomagali spodbujati rast gostiteljske rastline.

3.2.2.1 Producija indol-3-ocetne kisline

Prekonočne kulture smo gojili v gojišču LB in nato precepili v sveže gojišče LB s triptofanom (1 mg/mL) ter inkubirali 48 h pri 28 °C s stresanjem na 200 rpm. Vsak sev smo nacepili v 2 bioloških ponovitvah. Celice smo odcentrifugirali in v izrabljenem gojišču smo merili količino indol-3-ocetne kisline (IAA) s pomočjo metode, ki sta jo opisala Gordon in Weber (1951). Pripravili smo mešanico Salkowski reagenta ($\text{FeCl}_3\text{-HClO}_4$) in ga dodali izrabljenemu gojišču v razmerju 1:2 (izrabljeno gojišče : reagent) ter inkubirali 15 min v temi. Po končani inkubaciji smo dodali kapljico ortofosforne kisline in izmerili absorbanco pri $\lambda=530$ nm. Koncentracijo IAA smo izračunali s pomočjo standardne krivulje, ki smo jo pripravili s pomočjo komercialnega IAA (Sigma). Založno raztopino IAA smo pripravili v 98% etanolu, nadaljnje redčitve za standardno krivuljo pa smo pripravili s pomočjo LB tekočega gojišča s triptofanom. Koncentracije IAA, ki smo jih uporabili za standardno krivuljo: 50 µg/mL, 40 µg/mL, 30 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2 µg/mL, kot ničlo smo uporabili LB tekoče gojišče s triptofanom.

3.2.2.2 Producija sideroforov

Na trdno gojišče za ugotavljanje prisotnosti sideroforov (Schwyn in Neilands, 1987) smo nacepili 5 µL suspenzije celic (priprava suspenzij – glej 3.2.1.1); in sicer smo nacepili na eno trdno gojišče po dve paralelni dveh bioloških ponovitev in inkubirali preko noči pri 37 °C. Detekcijo sideroforov smo izvedli s pomočjo vrhnjega medija za siderofore (Perez-Miranda in sod., 2007). 10 mL vrhnjega medija smo prelimi čez spodnje gojišče za detekcijo sideroforov, na katerem so preko noči zrastle kolonije. Po 15 min smo preverili spremembo barve gojišča, in sicer sprememba iz modre barve v rumeno kaže na prisotnost sideroforov. Rezultate smo kvalitativno ocenili.

3.2.2.3 Raztpljanje fosfatov

S pomočjo Pikovskaya agarja smo določili sposobnost raztpljanja trikalcijevega fosfata (Sundara-Rao in Sinha, 1963). Na eno agarsko gojišče smo nanesli 5 µL pripravljene

suspenzije (glej 3.2.1.1) v dveh paralelkah za dve biološki ponovitvi. Plošče smo inkubirali 7 dni pri 37 °C. Če je bil določen sev sposoben raztopljalni fosfat, se je okoli kolonije pokazala cona zbistritve. Za boljše vrednotenje rezultata smo nežno odstranili kolonije z gojišča. Rezultate smo kvalitativno ocenili.

3.2.2.4 Spodbujanje rasti *Arabidopsis thaliana* s sevi *Bacillus* spp.

Semena *A. thaliana* smo površinsko sterilizirali z 2% natrijevim hipokloritom (varekina), tako da smo semena v suspenziji 2% varekine 20 min stresali na vorteksnem mešalu in jih nato 5x sprali s sterilno destilirano vodo. Semena smo sterilno nacepili na kvadratne plošče (premer 10 cm) s trdnim MS gojiščem z 1% saharozo, v dveh vrstah po 25 semen, ki smo jih razporedili v čim bolj enakomerno vrsto. Plošče smo 3 dni inkubirali pri 4 °C (stratifikacija semena; Xu in sod., 2013), in jih nato prenesli v rastno komoro. Plošče smo namestili pod kotom 65°. Po 10 dneh smo izbrali približno enako velike rastline (velike okoli 2 cm) za nadaljnji preizkus.

Prekonočne kulture *Bacillus* smo redčili v sveže tekoče LB gojišče (2% končni delež) in gojili na 37 °C pri 200 rpm do OD₆₅₀ = 0,9 (začetek stacionarne faze). Celice smo nato sprali s fiziološko raztopino in na MS trdno gojišče s saharozo nanesli 100 µL celic v ravni črti. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo približno 5 cm stran od bakterijske črte prenesli 18 približno 2 cm velikih rastlin *Arabidopsis*, kot je opisal Lopez-Bucio s sod. (2006). Kot kontrolo smo uporabili sterilne plošče, na katere smo enako prenesli 18 rastlin. Po 10 dneh inkubacije v rastni komori smo odstranili sadike iz agarja. Korenine smo sprali z vodo MiliQ in jih izmerili z merilom. Korenine in liste iz ene plošče smo zbrali v dve ločeni stehtani epici, ki smo jih stehtali pred in po sušenju. Težo korenin in listov smo nato primerjali s kontrolo in izračunali povečanje/zmanjšanje mase korenin in listov glede na kontrolo. Za vsako vrednost smo izračunali standardni odklon in s t-testom preverili, če so razlike med sevi in kontrolo signifikantne.

Dodatno smo testirali vpliv mešanice sevov T16-7, T19-1 in PS-216 na rast modelne rastline. Podobno kot za monokulture – ko so sevi dosegli OD₆₅₀ = 0,9, smo jih sprali s fiziološko raztopino (kot opisano zgoraj) in nanesli na plošče z MS trdnim gojiščem. Seve smo mešali v razmerju 1:1 (T16-7 in T19-1, ter T16-7 in PS-216) in razmerju 1:1:1 (vsi trije sevi).

3.2.3 Skupna ocena posrednih/neposrednih mehanizmov

Ocenili smo posredne (encimski litični testi, vrednotenje biofilmov, biosurfaktantov, protibakterijske aktivnosti proti *R. solanacearum* in sideroforov) in neposredne lastnosti sevov (siderofori, fosfati, IAA in spodbujanje rasti *Arabidopsis*), ki so odgovorne za klasifikacijo bakterijskega seva kot PGPR. Skupna ocena posrednih mehanizmov predstavlja oceno biopesticidnega potenciala naših sevov, skupna ocena neposrednih mehanizmov pa oceno potenciala za biognojenje. Rezultate sideroforov smo uporabili v obeh primerih, saj lahko delujejo tako posredno (Yu in sod., 2011) kot neposredno (Shirley in sod., 2011). Vsaki lastnosti smo glede na rezultat pripisali tudi točke. Točke smo izračunali tako, da smo pri posamezni lastnosti vsak rezultat delil z maksimalno vrednostjo, ki so jo nek sev ali sevi dosegli v okviru ene lastnosti. Pri sevu z maksimalno vrednostjo smo dobili rezultat 1, vsi ostali sevi so imeli rezultate nižje od 1. Pri kvalitativnih ocenah smo točke pretvorili po naslednjem kriteriju $+++ = 1$, $++ = 0,66$ in $+ = 0,33$. Na koncu smo za vsak sev sešeli vse točke, ki jih je dobil za posamezno lastnost.

4 REZULTATI

V okviru magistrske naloge smo testirali naravne izolate iz rizosfere paradižnika in iz nabrežja reke Save. Poleg teh smo v raziskavo vključili še laboratorijske in komercialne seve, ki so nam služili za kontrolo. Sev BD2833 je laboratorijski sev izpeljan iz seva 168 in zato predvidevamo, da bo zaradi adaptacije na življenje v laboratoriju v večini testov negativen (negativna kontrola). Komercialna biopesticida *B. subtilis* GB03 (Xie in sod., 2009) in *B. amyloliquefaciens* FZB42 (Chowdhury in sod., 2013) ter predhodno preučevan sev 6051 (Bais in sod., 2004) so služili kot pozitivne kontrole. Sev *B. subtilis* PS-216 je soroden sevu 168, vendar je bil izoliran šele pred kratkim iz nabrežja Save (Stefanic in Mandic-Mulec, 2009) in se zato še ni adaptiral na laboratorijske pogoje. Zato predvidevamo da bo v več testih pokazal pozitiven rezultat.

4.1 POSREDNI MEHANIZMI – ZAVIRANJE RASTI PATOGENIH ORGANIZMOV

4.1.1 Encimski litični testi

Skoraj vsi izolati *B. subtilis* iz rizosfere paradižnika, z izjemo T16-2, so izkazali proteazno aktivnost, vsi sevi *B. subtilis* iz nabrežja Save pa zelo močno (+++) ali močno (++) proteazno aktivnost (Slika 2A, Preglednica 5). Pri treh od štirih sevov *B. licheniformis* (T16-2, T26-2, T31-1) nismo zaznali proteazne aktivnosti. Proteazne aktivnosti nismo zaznali tudi pri laboratorijskem sevu *B. subtilis* BD2833 in dveh komercialnih sevih: sevu 6051 in sevu GB03 (Preglednica 5). Prav tako proteaza negativna sta seva *B. megaterium* (T19-1) in *B. amyloliquefaciens* (T16-7). Največjo cono zbistritve smo zaznali pri 3 sevih *B. subtilis* iz nabrežja Save (PS-95, PS-210 in PS-263) in pri sevu *B. pumilus* T24-5, izoliranem iz rizosfere (Preglednica 5). Vsi sevi, razen T24-5 (*B. pumilus*), so izkazali tudi zelo močno celulazno aktivnost (Slika 2B, Preglednica 5).

A. Proteaze



B. licheniformis
T16-6 (-)

B. subtilis
T21-2 (+)

B. pumilus
T24-5 (+++)

B. Celulaze

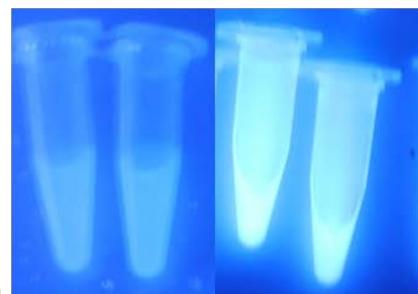


(-)

B. pumilus
T24-5 (+)

B. subtilis
T16-2 (+++)

B. Hitinaze



B. subtilis
BD2833 (-)

B. subtilis
PS 209 (+++)

Slika 2: Encimski litični testi. Kvalitativna ocena proteaz (A). Kvalitativna ocena celulaz (B). Primerjava rezultatov hitinaz; BD2833, ki je negativen in PS-209, ki je močno pozitiven (C). Legenda: - negativen rezultat, + šibko pozitiven rezultat, +++ močno pozitiven rezultat.

Merili smo tudi hitinazno aktivnost. Test z MUF je test aktivnosti zadnje stopnje razgradnje hitina, ko encim razcepi hitobazio do N-acetilglukozamina. V testu encim cepi substrat 4-metilumbeliferil-N-acetyl- β -glukozaminid (reagent MUF), od katerega se odcepi metilumbeliferon, ki fluorescira z značilno svetlo modro svetlobo (O'Brien in Colwell, 1987). Višja intenziteta svetlobe pomeni večjo hitinazno aktivnost. Večina sevov je pokazala hitinazno aktivnost. Negativen rezultat smo dobili pri sevih *B. licheniformis* T16-6, *B. megaterium* T19-1, *B. subtilis* BD2833, 6051, GB03 in *B. amyloliquefaciens* FZB42 (Slika 2C). Največjo hitinazno aktivnost smo izmerili pri sevih *B. subtilis* T14-4 in PS-209 in sevu *B. amyloliquefaciens* T16-7 (Preglednica 5).

4.1.2 Hemolitični test na prisotnost biosurfaktantov

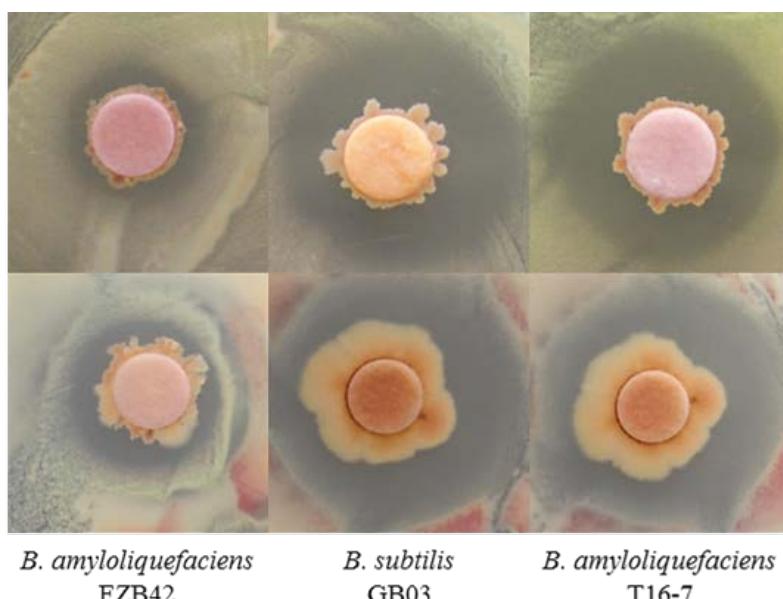
Hemolitično aktivnost smo merili v neredčenem, 2x redčenem in 5x redčenem supernatantu izrabljenega gojišča, pridobljenih iz 6 h in 24 h stresanih bakterijskih kultur. Sinteza surfaktinov se običajno zazna že na prehodu iz eksponentne faze v stacionarno, medtem ko

sinteza fengicinov in iturinov običajno poteka v pozni stacionarni fazi (Raaijmakers in sod., 2010). Procent hemolize smo izračunali v vseh redčitvah. Za računanje končnega rezultata smo vzeli tisto redčitev, kjer ni prišlo do popolne lize (100 %). Procent hemolize smo nato delili s celično gostoto in dobili hemolitično aktivnost, ki smo jo delili s hemolitično aktivnostjo seva *B. subtilis* PS-216, za katerega smo že predhodno vedeli, da povzroča hemolizo. Končen rezultat je zapisan v Preglednici 5.

Sev BD2833, ki izhaja iz seva 168 (Tortosa in sod., 2001), ima okvarjen gen *sfp*, zato ne more producirati surfaktina (McLoon in sod., 2011) in ne povzroča hemolize. Poleg seva BD2833 hemolitične aktivnosti nismo zaznali še pri 17 sevih, med njimi sta tudi seva 6051 in GB03. Iz iste rastline smo izolirali 3 seve z najvišjo hemolitično aktivnostjo (*B. subtilis* T16-4, T16-8 in *B. licheniformis* T16-6), poleg še treh sevov, pri katerih nismo izmerili hemolitične aktivnosti (*B. subtilis* T16-3, T16-5 in T16-10) in seva *B. subtilis* T16-2 z rahlo hemolitično aktivnostjo.

4.1.3 Protibakterijska aktivnost proti *Ralstonia solanacearum*

Izmerili smo premer cone inhibicije rasti in iz treh ponovitev smo izračunali povprečje ter rezultat zapisali v mm. Na neselektivnem CPG gojišču je večina sevov pokazala protibakterijsko aktivnost proti *R. solanacearum* s conami inhibicije rasti okoli diska, ki smo ga nacepili z izbranim sevom *Bacillus* (raziskava je bila izvedena v sodelovanju z Nacionalnim inštitutom za biologijo – dr. Tanjo Drejo in prof. Majo Ravnikar).



Slika 3: Inhibicija rasti *R. solanacearum* na CPG (zgoraj) in KingB (spodaj) gojišču

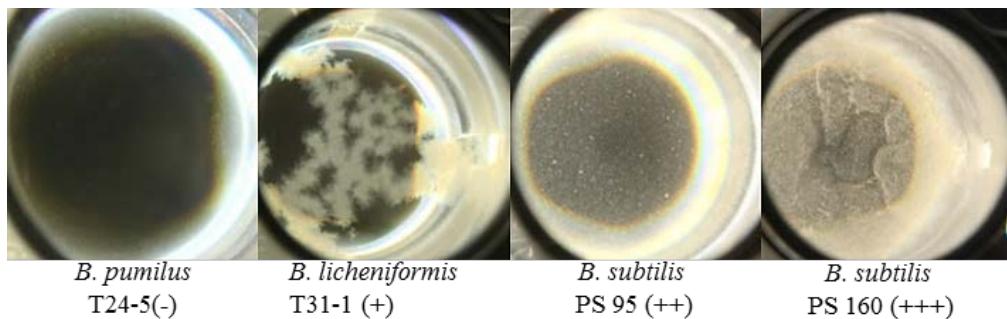
Največje cone inhibicije smo izmerili pri *B. amyloliquefaciens* T16-7 (cona inhibicije [23(±1) mm]) in komercialno dostopnem sevu GB03 [23(±1) mm] (Slika 3). Aktivnosti proti patogeni bakteriji niso kazali sevi *B. subtilis* BD2833, T12-1, PS-160, PS-194, PS-216, PS-203, *B. licheniformis* T15-1, *B. megaterium* T19-1 in *B. pumilus* T24-5. Na selektivnem gojišču King B smo cono inhibicije zaznali samo pri T16-7 [15,7(±0,3) mm], GB03 [16,7(±0,9) mm] in pri FZB42 [10(±0) mm] (Slika 3, Preglednica 5).

Preglednica 5: Biokontrolne lastnosti sevov *Bacillus*; s krepko pisavo označeni sevi, ki izstopajo, s sivo sevi, ki imajo zelo nizke vrednosti; legenda: Ba - *B. amyloliquefaciens*, Bl - *B. licheniformis*, Bm - *B. megaterium*, Bp - *B. pumilus*, Bs - *B. subtilis*; - negativen rezultat, + šibko pozitiven rezultat, ++ močno pozitiven rezultat, +++ zelo močno pozitiven rezultat.

Sev	Encimski litični testi			Biosurfaktanti (hemolitska aktivnost/ hemolitska aktivnost PS-216)	Protibakterijska aktivnost proti <i>Ralstonia solanacearum</i> (cona inhibicije v mm)	
	Proteaze	Celuaze	Hitinaze (intenziteta svetlobe*10 ³)		CPG	KingB
Bs BD2833	-	+++	2,7 ± 1,4	-	-	-
Bs PS-216	++	+++	12,6 ± 1,4	1 ± 0,3	10,7 ± 0,9	-
Bs 6051	-	+++	3,8 ± 1,0	-	12,7 ± 0,3	-
Bs T12-1	+	+++	15,0 ± 3,7	1,1 ± 0,3	-	-
Bs T14-1	++	+++	20,9 ± 3,5	-	12,7 ± 0,3	-
Bs T14-3	+	+++	8,9 ± 1,9	0,8 ± 0,8	11,3 ± 0,3	-
Bs T14-4	++	+++	38,6 ± 7,0	1,0 ± 0,4	16 ± 1	-
Bs T14-5	++	+++	13,8 ± 2,3	0,9 ± 0,3	12,0 ± 0,6	-
Bl T15-1	+	+++	8,6 ± 3,8	-	-	-
Bs T16-2	-	+++	13,7 ± 2,0	0,7 ± 0,2	14,7 ± 0,3	-
Bs T16-3	++	+++	21,8 ± 7,3	-	14,7 ± 0,3	-
Bs T16-4	+	+++	20,2 ± 5,3	2,7 ± 1,6	11,3 ± 0,3	-
Bs T16-5	++	+++	12,6 ± 2,1	-	13,7 ± 0,9	-
Bl T16-6	-	+++	2,1 ± 0,7	2,0 ± 0,6	10,3 ± 0,3	-
Ba T16-7	-	+++	27,4 ± 8,7	-	23 ± 1	15,7 ± 0,3
Bs T16-8	+	+++	12,0 ± 2,5	2,0 ± 0,8	14,3 ± 0,7	-
Bs T16-10	+	+++	14,6 ± 5,4	-	13,7 ± 0,3	-
Bs T17-1	++	+++	10,6 ± 5,3	-	11,7 ± 0,9	-
Bm T19-1	-	+++	3,6 ± 1,8	-	-	-
Bs T21-2	+	+++	7,1 ± 3,3	-	12,0 ± 0,6	-
Bp T24-5	+++	+	13,9 ± 7,1	1,0 ± 0,6	-	-
Bl T26-2	-	+++	8,4 ± 1,2	-	10,3 ± 0,3	-
Bl T31-1	-	+++	6,8 ± 0,3	-	10 ± 0,6	-
Bs PS-95	+++	+++	18,9 ± 6,6	1,0 ± 0,4	14 ± 1	-
Bs PS-160	++	+++	17,5 ± 4,8	-	-	-
Bs PS-194	++	+++	14,8 ± 6,2	0,7 ± 0,3	-	-
Bs PS-209	++	+++	37,7 ± 5,7	-	13 ± 0	-
Bs PS-210	+++	+++	9,4 ± 2,8	-	-	-
Bs PS-263	+++	+++	17 ± 10	0,9 ± 0,2	-	-
Bs GB03	-	+++	2,0 ± 1,9	-	23 ± 2	16,7 ± 0,9
Ba FZB42	+++	+++	2,7 ± 1,4	0,2 ± 0,1	16,3 ± 0,3	10 ± 0

4.1.4 Biofilmi sevov *Bacillus* v tekočem gojišču z dodatkom rastlinskih komponent

V MSN gojišču brez dodatkov večina sevov ne tvori biofilmov. Izjema so sevi T16-5, PS-95 in FZB42. Seva BD2833 in *B. pumilus* T24-5 ne tvorita biofilmov v nobenem izmed testiranih gojišč. Sevi *B. subtilis* PS-216, T12-1, T14-4, T14-5, T16-3, T16-8, T16-10, T17-1, PS-95 in PS-194 tvorijo v gojiščih MSN z dodatki izrazite biofilme (++). V gojiščih z dodatki tvori sev PS-160 zelo močne biofilme (+++; Slika 4). Na pektinu tvorita zelo močne biofilme tudi seva *B. subtilis* T16-2 in T16-5, sev FZB42 pa tvori močne biofilme v gojiščih z dodatkom rastlinskih komponent (Preglednica 6). Pri sevih BD2833 in T24-5 je na gojišču s pektinom biomasa biofilma zelo nizka (pod 1 µg/mL), medtem ko imajo sevi *B. subtilis* T14-4, T16-2, T16-5, PS-95 in PS-209 biomaso biofilma nad 6,0 µg/mL (Preglednica 6).



Slika 4: Kvalitativna ocena biofilma sevov *Bacillus* na različnih gojiščih. Legenda: - ni tvorbe biofilma, + rahel biofilm, ++ močan biofilm, +++ zelo močan biofilm.

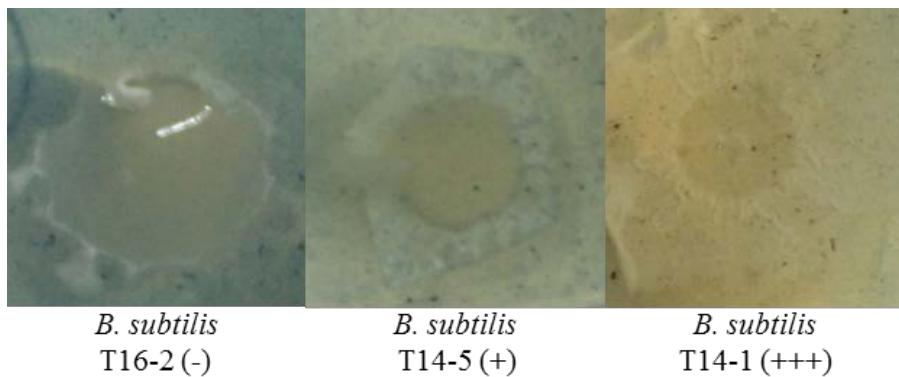
Preglednica 6: Kvalitativna ocena biofilmov sevov *Bacillus* na različnih gojiščih ter njihova suha masa na gojišču s pektinom; s krepko pisavo označena suha teža sevov, ki izstopa, s sivo sevi, ki imajo zelo nizke vrednosti; legenda: Ba - *B. amyloliquefaciens*, Bl - *B. licheniformis*, Bm - *B. megaterium*, Bp - *B. pumilus*, Bs - *B. subtilis*; Legenda: - ni tvorbe biofilma, + rahel biofilm, ++ močan biofilm, +++ zelo močan biofilm.

Sev	Biofilmi				Suha masa biofilma ($\mu\text{g/mL}$)
	MSN	Ekstrakti	Eksudati	Pektin	
Bs BD2833	-	-	-	-	$0,7 \pm 0,1$
Bs PS-216	-	++	++	++	$4,0 \pm 0,3$
Bs 6051	-	+	+	++	$5,1 \pm 0,6$
Bs T12-1	-	++	++	++	$5,3 \pm 0,2$
Bs T14-1	-	+	+	++	$6,0 \pm 0,1$
Bs T14-3	-	+	+	++	$3,2 \pm 0,1$
Bs T14-4	-	++	++	++	$8,0 \pm 0,7$
Bs T14-5	-	++	++	++	$2,9 \pm 0,4$
Bl T15-1	-	+	+	++	$2,9 \pm 0,1$
Bs T16-2	-	++	++	+++	$7,4 \pm 1,3$
Bs T16-3	-	++	++	++	$2,4 \pm 0,2$
Bs T16-4	-	++	+	++	$2,3 \pm 1,2$
Bs T16-5	++	+	++	+++	$7,0 \pm 0,5$
Bl T16-6	-	+	+	+	$2,8 \pm 0,1$
Ba T16-7	-	++	+	+	$4,3 \pm 0,4$
Bs T16-8	-	++	++	++	$5,1 \pm 0,5$
Bs T16-10	-	++	++	++	$5,5 \pm 0,3$
Bs T17-1	-	++	++	++	$5,8 \pm 0,1$
Bm T19-1	-	+	+	+	$2,4 \pm 0,1$
Bs T21-2	-	++	++	+	4,5
Bp T24-5	-	-	-	-	$0,3 \pm 0,2$
Bl T26-2	-	+	+	+	$2,23 \pm 0,05$
Bl T31-1	-	+	+	+	$2,7 \pm 0,4$
Bs PS-95	+	++	++	++	$6,6 \pm 0,1$
Bs PS-160	-	+++	+++	+++	$2,4 \pm 0,1$
Bs PS-194	-	++	++	++	$4,8 \pm 0,1$
Bs PS-209	-	+	++	++	$7,3 \pm 0,7$
Bs PS-210	-	+	++	+	$3,9 \pm 1,0$
Bs PS-263	-	+	++	++	$2,2 \pm 0,3$
Bs GB03	-	+	+	++	1,4
Ba FZB42	+	+++	+++	+	$4,0 \pm 0,2$

4.1.5 Producija sideroforov

Test za siderofore smo izvedli tako, da smo preko gojišča z nizko vsebnostjo železa, na katerem smo nagojili naše testne organizme, prelimini vrhnji medij za detekcijo sideroforov, ki je vseboval CAS. Siderofori so difundirali v zgornji sloj in prisotnost sideroforov se je pokazala kot rumeno razbarvanje modrega zgornjega sloja. Do tega pride, ker se iz modro obarvanega kompleksa CASSeFe(III) zaradi sideroforov sprosti Fe(III) (Yu in sod., 2011).

Vsi sevi iz nabrežja Save kažejo pozitiven rezultat, še posebej močno rumene cone okoli kolonij pa smo opazili pri sevih *B. subtilis* PS-95, PS-160 in PS-194. Tudi 4 izolati iz rizosfere paradižnika *B. subtilis* T14-1, T16-10, T17-1, T12-1 so dali zelo močno pozitivne rezultate (+++; Slika 5, Preglednica 8). Pozitiven rezultat so dali tudi sevi *B. subtilis* T14-4, T14-5, T16-5, T16-8, T21-2 in sev *B. pumilus* T24-5. Sevi *B. subtilis* BD2833, PS-216 in GB03 niso producirali sideroforov, sev *B. amyloliquefaciens* FZB42 pa je bil šibko pozitiven (+; Slika 5, Preglednica 8).



Slika 5: Kvalitativna ocena delovanja sideroforov sevov *Bacillus*. Legenda: - negativen rezultat, + šibko pozitiven rezultat, +++ zelo močno pozitiven rezultat.

4.1.6 Skupna ocena – posredni mehanizmi

Na osnovi pridobljenih podatkov smo ocenili posredne lastnosti (encimsko lizo, biomasa biofilmov, kvalitativna ocena biofilmov, količina biosurfaktantov, protibakterijska aktivnost proti *Ralstonia solanacearum* in količina sideroforov), ki pomagajo pri zaviranju rasti patogenih organizmov. Z oceno smo ocenili biopesticidni potencial med našimi sevi. Postopek ocenjevanja je opisan v metodah. Rezultati so prikazani v Preglednici 7, kjer so sevi razporejeni glede na število točk od najvišjega proti najnižjemu. Največ točk sta pridobila seva *B. subtilis* PS-95 in T14-3, sledi jima komercialni sev FZB42, nato pa še seva *B. subtilis* T16-5 in PS-160. Vsi sevi so imeli število točk 6,4 ali višje. Najnižje število točk je nabral laboratorijski sev *B. subtilis* BD2833, kar je bilo pričakovano, nizko oceno sta pridobila tudi *B. megaterium* T19-1 in *B. pumilus* T24-5.

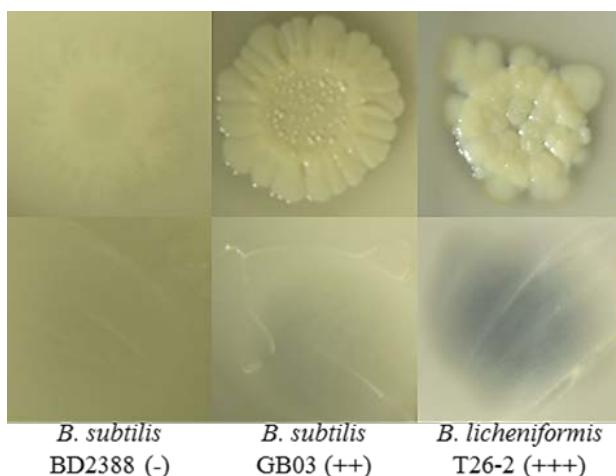
Preglednica 7: Seštevek točk, ki jih je posamezen sev *Bacillus* dobil pri ocenjevanju biokontrolnih lastnosti.

Sev	Točke	Sev	Točke
<i>B. subtilis</i> PS-95	7,4	<i>B. subtilis</i> PS-263	5,1
<i>B. subtilis</i> T14-4	7,1	<i>B. subtilis</i> T16-3	5,1
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	7,0	<i>B. subtilis</i> T21-2	4,6
<i>B. subtilis</i> T16-5	6,4	<i>B. subtilis</i> GB03	4,6
<i>B. subtilis</i> PS-160	6,4	<i>B. subtilis</i> PS-210	4,4
<i>B. subtilis</i> T16-8	6,2	<i>B. subtilis</i> T16-4	4,4
<i>B. subtilis</i> T17-1	6,2	<i>B. subtilis</i> T14-3	4,2
<i>B. subtilis</i> PS-209	6,1	<i>B. subtilis</i> 6051	3,9
<i>B. subtilis</i> T16-10	6,0	<i>B. licheniformis</i> T16-6	3,9
<i>B. subtilis</i> PS-194	6,0	<i>B. licheniformis</i> T15-1	3,2
<i>B. subtilis</i> T12-1	5,9	<i>B. licheniformis</i> T31-1	2,9
<i>B. subtilis</i> T14-1	5,8	<i>B. licheniformis</i> T26-2	2,9
<i>B. subtilis</i> T14-5	5,6	<i>B. pumilus</i> T24-5	2,6
<i>B. subtilis</i> T16-2	5,6	<i>B. megaterium</i> T19-1	2,4
<i>B. amyloliquefaciens</i> T16-7	5,5	<i>B. subtilis</i> BD2833	1,2
<i>B. subtilis</i> PS-216	5,4		

4.2 NEPOSREDNI MEHANIZMI – SPODBUJANJE RASTI RASTLIN

4.2.1 Raztpljanje fosfatov

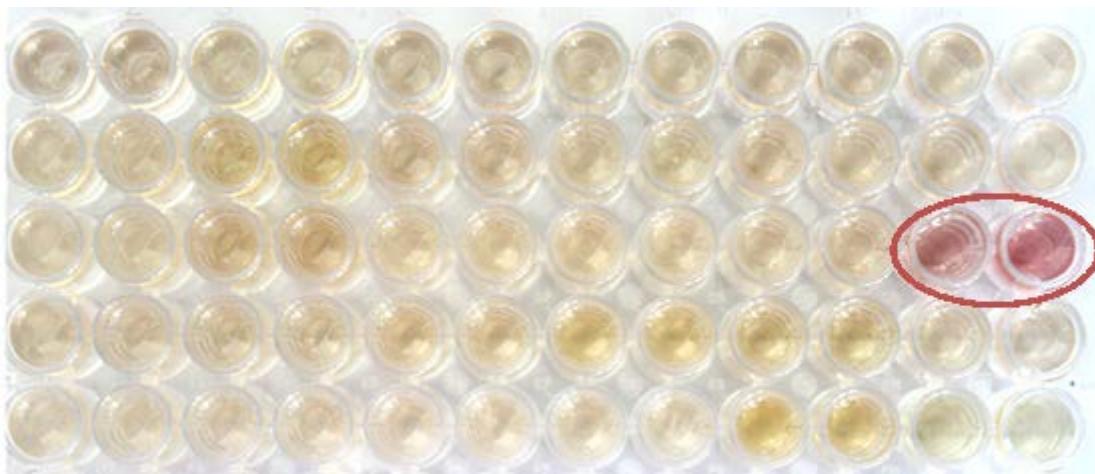
Z izjemo 5 sevov *B. subtilis* BD2833, T16-3, T16-4, PS-160, PS-210 so vsi sevi vsaj šibko raztpljali fosfate. Največjo zbistritev gojišča po odstranitvi kolonije smo opazili pri sevu *B. licheniformis* T26-2 (Slika 6). Dobro zbistritev gojišča (++) smo opazili tudi pri sevih *B. licheniformis* T15-1 in T31-1, *B. megaterium* T19-1, *B. subtilis* T16-2 in T17-1, *B. pumilus* T24-5 in pri kontrolnih sevih 6051, GB03 in FZB42 (Slika 6, Preglednica 8).



Slika 6: Kvalitativna ocena raztpljanja fosfatov sevov *Bacillus*. Legenda: - negativen rezultat, ++ močno pozitiven rezultat, +++; zelo močno pozitiven rezultat.

4.2.2 Producija indol-3-ojetne kisline

Sev *B. megaterium* T19-1 je proizvajal veliko višje koncentracije IAA ($25,3 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$) v primerjavi z ostalimi sevi. Večina sevov je proizvajala komaj zaznavne koncentracije IAA (manj kot $5 \mu\text{g/mL}$), pri 7 sevih pa smo izmerili IAA v koncentracijah višjih od $5 \mu\text{g/mL}$, to so bili sevi *B. subtilis* PS-216, T16-8, T12-1 in PS-263, *B. amyloliquefaciens* T16-7, *B. licheniformis* T26-2, in GB03 (Slika 7, Preglednica 8).

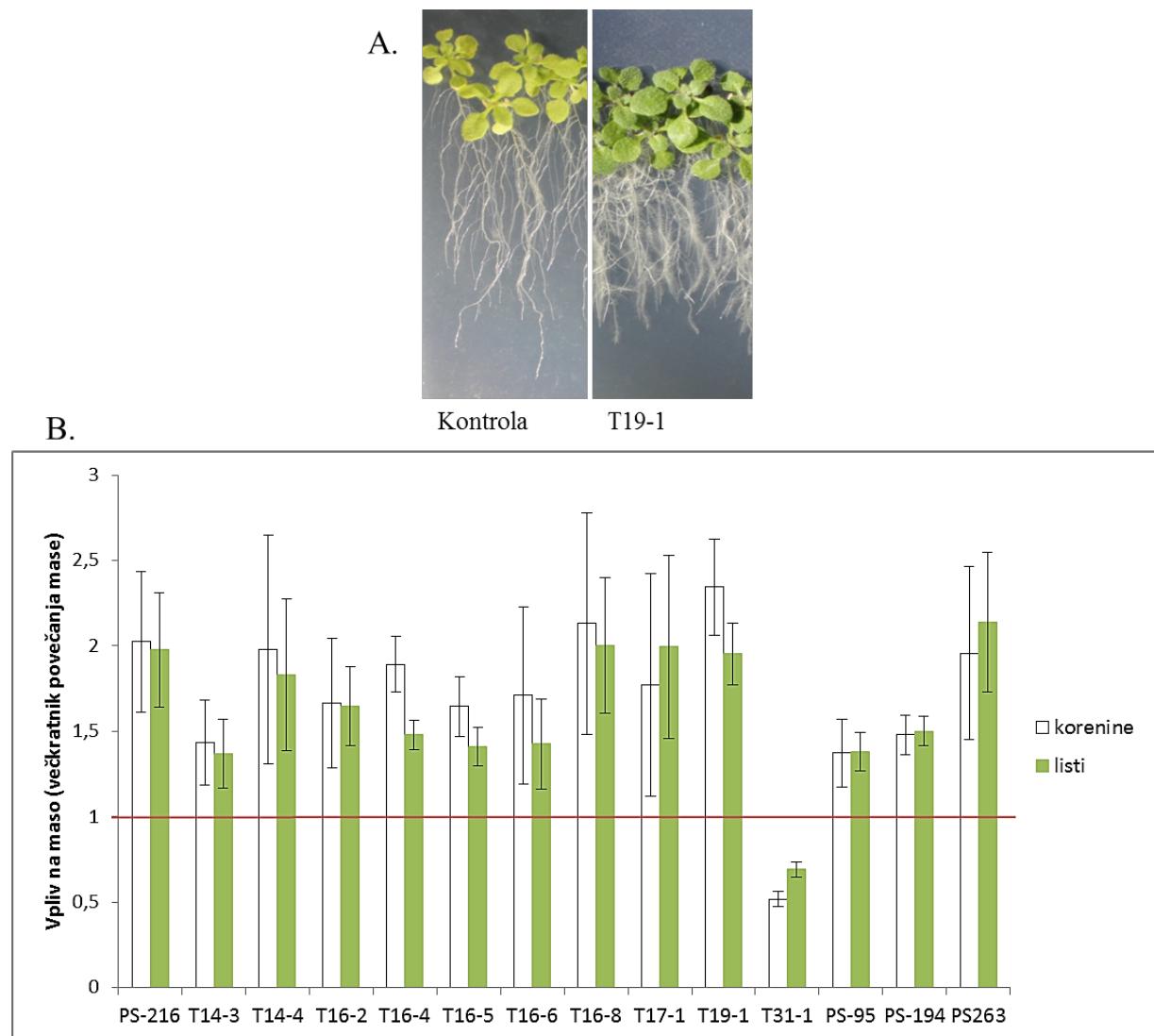


Slika 7: Primerjava izločanja indol-3-ojetne kisline (IAA) pri različnih sevih *Bacillus*, rožnato obarvanje pomeni pozitiven rezultat; na sliki je obkrožena reakcija seva T19-1; za vsak sev smo imeli 2 ponovitvi, ki sta v 2 zaporednih luknjicah, sevi si po vrsti od leve proti desni sledijo BD2833, PS-216, 6051, T14-1, T14-3, T14-4, T14-5, T15-1, T16-2, T16-3, T16-4, T16-5, PS-263, T16-7, T16-8, T16-10, T17-1, T19-1, T12-1, T21-2, T24-5, T26-2, T31-1, PS-95, PS-160, PS-194, PS-209, PS-210, T16-6 in negativna kontrola.

4.2.3 Spodbujanje rasti *Arabidopsis thaliana* s sevi *Bacillus* spp.

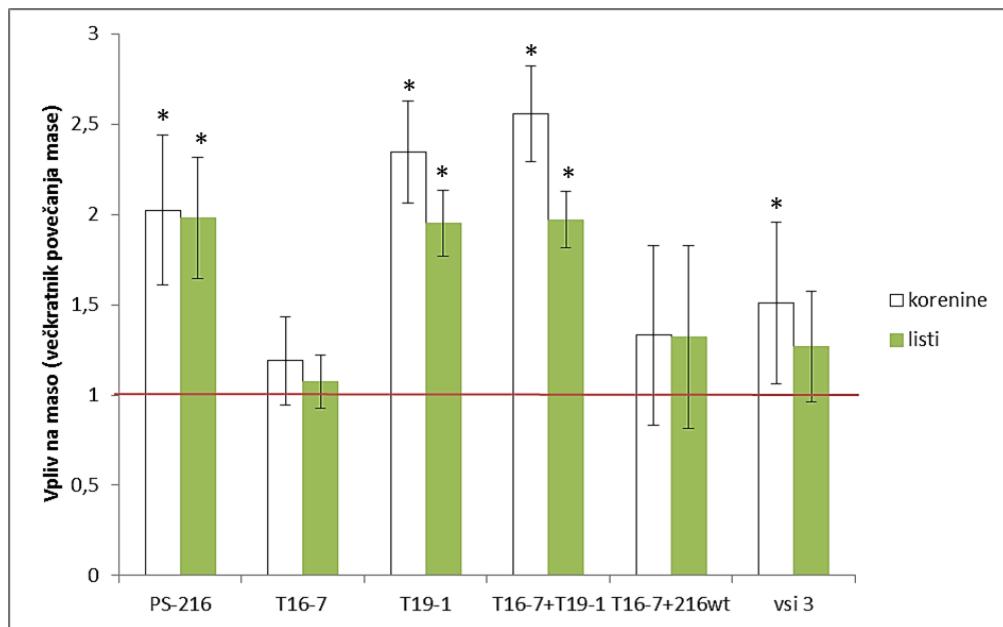
Pri približno polovici sevov je bil večkratnik povečanja mase korenin in listov v okviru napake enak 1, kar pomeni, da nismo opazili vpliva bakterije na rastlino. Pri sevu *B. licheniformis* T31-1 je bil večkratnik povečanja mase manjši od 1, kar kaže na negativen vpliv na rast rastlin (Slika 8B, Preglednica 8). Sevi *B. subtilis* T14-3, T14-4, T16-2, T16-4, T16-5, T17-1, PS-95, PS-194 in sev *B. licheniformis* T16-6 so pozitivno vplivali na maso korenin in listov (Slika 8B, Preglednica 8). Pri sevih *B. subtilis* T16-8, PS-216, PS-263 ter sevu *B. megaterium* T19-1 pa smo izmerili še posebej močen vpliv, saj je bil večkratnik povečanja mase korenin in listov celo večji od 1,5 (Slika 8B, Preglednica 8). Pri sevu T19-1 smo izračunali tudi večkratnik povečanja dolžine korenin glede na kontollo, ki je $0,82 \pm 0,07$ (izračunan p vrednost s t-testom pa je 0,001), kar pomeni, da je prišlo do inhibicije rasti

korenin v dolžino. Za vse rezultate smo s t-testom izračunali tudi p-vrednosti, ki so prikazane v Prilogi A. Kot signifikantne smo vzeli tiste rezultate, katerih $p < 0,05$.



Slika 8: Vpliva sevov *Bacillus* na rast *Arabidopsis*. Vpliv sevov *Bacillus* na maso korenin in listov *Arabidopsis* spp. na trdnem MS gojišču (A). Vpliv na maso korenin in listov je podan glede na kontrolo (vrednost 1, označeno z rdečo črto), ki ni bila izpostavljena bakteriji. Prikazani so le rezultati, kjer so povprečne vrednosti odstopale od vrednosti 1 in so razlike med sevom in kontrolo signifikantne. Prikazano je povprečje 3 ponovitev s standardnimi odkloni (B).

Dodatno smo izvedli tudi poskus, kjer smo testirali vpliv mešanice sevov na rast modelne rastline *Arabidopsis*. Rezultati so prikazani na Sliki 9. Seva *B. megaterium* T19-1 in *B. subtilis* PS-216 spodbujata rast *Arabidopsis*, edina mešanica, ki je pokazala pozitiven učinek na rast *Arabidopsis*, je mešanica sevov *B. megaterium* T19-1 in *B. amyloliquefaciens* T16-7.



Slika 9: Primerjava vpliva posameznih sevov *Bacillus* z mešanicami sevov *Bacillus* na maso korenin in listov *Arabidopsis thaliana*. Vpliv na maso korenin in listov je podan glede na kontrolo (vrednost 1, označeno z rdečo črto), ki ni bila izpostavljena bakteriji. Prikazano je povprečje 3 ponovitev s standardnimi odkloni. Z * označeni rezultati, ki so signifikantni.

Preglednica 8: Lastnosti sevov *Bacillus*, ki vplivajo na spodbujanje rasti rastlin; s krepko pisavo označeni sevi, ki izstopajo, s sivo sevi, ki imajo zelo nizke vrednosti; legenda: Ba - *B. amyloliquefaciens*, Bl - *B. licheniformis*, Bm - *B. megaterium*, Bp - *B. pumilus*, Bs - *B. subtilis*; - negativen rezultat, + rahlo pozitiven rezultat, ++ močno pozitiven rezultat, +++ zelo močno pozitiven rezultat, * označuje rezultate večkratnika povečanja mase glede na kontrolo, za katere smo s t-testom izračunali, da so signifikantni ($p < 0,05$).

Sev	Večkratnik povečanja mase glede na kontrolo		Raztopljanje fosfatov	Siderofori	Producija IAA ($\mu\text{g/mL}$)
	Vpliv na korenine	Vpliv na liste			
Bs BD2833	1,0 ± 0,4	1,1 ± 0,4	-	-	2,1 ± 0,1
Bs PS-216	2,0 ± 0,4 *	2,0 ± 0,3 *	+	-	6,7 ± 0,4
Bs 6051	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,1	++	+	2,8 ± 0,4
Bs T12-1	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,3	+	+++	5,0 ± 0,1
Bs T14-1	1,7 ± 0,9 *	1,4 ± 0,4	+	+++	3,3 ± 0,2
Bs T14-3	1,4 ± 0,2 *	1,4 ± 0,2 *	+	-	4,14 ± 0,05
Bs T14-4	2,0 ± 0,7 *	1,8 ± 0,4 *	+	+	4,0 ± 0,7
Bs T14-5	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	+	+	5,4 ± 0,4
Bl T15-1	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1	++	-	4,0 ± 0,6
Bs T16-2	1,7 ± 0,4 *	1,6 ± 0,2 *	++	-	3,5 ± 0,2
Bs T16-3	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,1	-	-	3,1 ± 0,1
Bs T16-4	1,9 ± 0,2 *	1,5 ± 0,1 *	-	-	1,9 ± 0,4
Bs T16-5	1,6 ± 0,2 *	1,4 ± 0,1 *	+	+	2,8 ± 0,5
Bl T16-6	1,7 ± 0,5 *	1,4 ± 0,3 *	+	-	3,3 ± 0,5
Ba T16-7	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1	+	-	5,5 ± 0,2
Bs T16-8	2,1 ± 0,7 *	2,0 ± 0,4 *	+	+	9,2 ± 4,4
Bs T16-10	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,1 *	+	+++	3,7 ± 0,5
Bs T17-1	1,8 ± 0,7 *	2,0 ± 0,5 *	++	+++	4,4 ± 0,4
Bm T19-1	2,3 ± 0,3 *	2,0 ± 0,2 *	++	-	25,3 ± 0,8
Bs T21-2	1,2 ± 0,3	1,4 ± 0,2 *	+	+	3,6 ± 0,9
Bp T24-5	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1	++	+	3,1 ± 0,4
Bl T26-2	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2	+++	-	5,2 ± 0,1
Bl T31-1	0,52 ± 0,05 *	0,69 ± 0,04 *	++	-	3,8 ± 0,2
Bs PS-95	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,1 *	++	++	2,00 ± 0,01
Bs PS-160	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,2	-	+++	4,0 ± 0,2
Bs PS-194	1,5 ± 0,1 *	1,5 ± 0,1 *	+	+++	4,7 ± 0,1
Bs PS-209	1,2 ± 0,5	1,4 ± 0,3 *	+	+	2,9 ± 0,5
Bs PS-210	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	-	+	3,9 ± 0,5
Bs PS-263	2,0 ± 0,5 *	2,1 ± 0,4 *	+	+	6,0 ± 0,1
Bs GB03	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,3	++	-	7,5 ± 2,3
Ba FZB42	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	++	+	3,8 ± 0,4

4.2.4 Skupna ocena – neposredni mehanizmi

Ocena neposrednih mehanizmov je zajela rezultate o količini sideroforov, raztpljanju fosfatov, koncentraciji IAA in spodbujanju rasti *Arabidopsis thaliana*. Z oceno smo ocenili potencial naših sevov za biognojenje, saj zgoraj našteti mehanizmi vplivajo na rast rastlin. Postopek ocenjevanje je opisan v metodah. Največ točk je dobil sev *B. megaterium* T19-1, sledi mu sev *B. subtilis* T17-1. Najniže ocenjena seva sta bila sev *B. subtilis* BD2833 in T16-3. Število točk, više od 2,6, so dobili tudi sevi *B. subtilis* T16-10, T16-8, PS-194, T14-1 in PS-263. Rezultati so prikazani v Preglednici 9.

Preglednica 9: Seštevek točk, ki jih je posamezen sev *Bacillus* dobil pri oceni neposrednih mehanizmov (mehanizmi, ki spodbujajo rast rastlin).

Sev	Točke	Sev	Točke
<i>B. megaterium</i> T19-1	3,6	<i>B. subtilis</i> PS-209	2,0
<i>B. subtilis</i> T17-1	3,5	<i>B. subtilis</i> T21-2	2,0
<i>B. subtilis</i> T16-10	2,9	<i>B. subtilis</i> 6051	1,9
<i>B. subtilis</i> T16-8	2,9	<i>B. licheniformis</i> T16-6	1,9
<i>B. subtilis</i> PS-194	2,8	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	1,9
<i>B. subtilis</i> T14-1	2,8	<i>B. pumilus</i> T24-5	1,8
<i>B. subtilis</i> PS-263	2,7	<i>B. subtilis</i> T14-3	1,7
<i>B. subtilis</i> PS-95	2,6	<i>B. subtilis</i> T14-5	1,6
<i>B. subtilis</i> T12-1	2,6	<i>B. subtilis</i> T16-4	1,6
<i>B. subtilis</i> T14-4	2,5	<i>B. amyloliquefaciens</i> T16-7	1,6
<i>B. subtilis</i> PS-216	2,4	<i>B. licheniformis</i> T15-1	1,5
<i>B. subtilis</i> T16-2	2,3	<i>B. subtilis</i> PS-210	1,5
<i>B. licheniformis</i> T26-2	2,2	<i>B. licheniformis</i> T31-1	1,4
<i>B. subtilis</i> T16-5	2,1	<i>B. subtilis</i> BD2833	1,1
<i>B. subtilis</i> PS-160	2,1	<i>B. subtilis</i> T16-3	1,0
<i>B. subtilis</i> GB03	2,0		

4.3 SKUPNA OCENA – NEPOSREDNI IN POSREDNI MEHANIZMI

Seštevek točk neposrednih (spodbujanje rasti) in posrednih (biokontrolnih) mehanizmov je izpostavil seva *B. subtilis* PS-95 in T14-4, ki sta zbrala enako število točk; sledita pa jima seva *B. subtilis* T16-8 in T17-1 z 8,7 točke. Najmanj točk je po pričakovanju nabral sev *B. subtilis* BD2833. Rezultati so prikazani v Preglednici 10.

Preglednica 10: Seštevek točk, ki jih je posamezen sev *Bacillus* dobil pri neposrednih (spodbujanje rasti) in posrednih (biokontrolnih) mehanizmih.

Sev	Točke	Sev	Točke
<i>B. subtilis</i> PS-95	9,3	<i>B. subtilis</i> T14-5	6,9
<i>B. subtilis</i> T14-4	9,3	<i>B. subtilis</i> GB03	6,5
<i>B. subtilis</i> T16-8	8,7	<i>B. subtilis</i> T21-2	6,2
<i>B. subtilis</i> T17-1	8,7	<i>B. subtilis</i> T16-3	6,1
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	8,5	<i>B. megaterium</i> T19-1	6,0
<i>B. subtilis</i> T16-5	8,2	<i>B. subtilis</i> T16-4	6,0
<i>B. subtilis</i> T16-2	7,9	<i>B. subtilis</i> T14-3	6,0
<i>B. subtilis</i> T16-10	7,8	<i>B. licheniformis</i> T16-6	5,7
<i>B. subtilis</i> PS-216	7,8	<i>B. subtilis</i> 6051	5,6
<i>B. subtilis</i> PS-194	7,8	<i>B. subtilis</i> PS-210	5,5
<i>B. subtilis</i> PS-209	7,7	<i>B. licheniformis</i> T26-2	5,1
<i>B. subtilis</i> T14-1	7,7	<i>B. licheniformis</i> T15-1	4,8
<i>B. subtilis</i> PS-160	7,5	<i>B. licheniformis</i> T31-1	4,3
<i>B. subtilis</i> PS-263	7,5	<i>B. pumilus</i> T24-5	4,0
<i>B. subtilis</i> T12-1	7,5	<i>B. subtilis</i> BD2833	2,2
<i>B. amyloliquefaciens</i> T16-7	7,1		

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Cilj raziskovalne naloge je bil okarakterizirati biokontrolni potencial izolatov vrste *Bacillus subtilis* in sorodnikov iz rizosfere paradižnika ter izolate *B. subtilis* iz nabrežja Save (Stefanic in Mandic-Mulec, 2009; Oslizlo in sod., 2015). Seve smo testirali za lastnosti, za katere so predhodno poročali (Prashar in sod., 2014; Hayat in sod., 2010), da spodbujajo rast gostiteljskih rastlin (raztopljanje fosfatov, produkcija sideroforov, IAA) ali delujejo proti škodljivcem (litični encimi, biosurfaktanti, protibakterijska aktivnost). Priredili smo protokol, ki ga je izdelal Lopez-Bucio s sod. (2006), in z njim preverili vpliv posameznih sevov rodu *Bacillus* na rast modelne rastline *Arabidopsis thaliana*. Potrdili smo tudi opažanja Beauregarda in sod. (2013), da rastlinske komponente spodbudijo nastanek biofilma pri sevih *Bacillus*.

5.1.1 Posredni mehanizmi – zaviranje rasti patogenih organizmov

5.1.1.1 Litični encimi in biosurfaktanti

Z metodo na trdnih gojiščih (Saran in sod., 2007) smo ocenili zunajcelične proteaze, ki jih izločajo naši sevi. Proteaze iz rodu *Bacillus* so razširjene v industrijski uporabi, še vedno pa odkrivajo nove, ki imajo tudi potencial, da zavirajo rast določenih patogenih organizmov (Jaouadi in sod., 2009; Saran in sod., 2007; Lian in sod., 2007). Sevi, izolirani iz nabrežja Save, imajo v povprečju močnejšo proteolitično aktivnost kot sevi izolirani iz paradižnika. Vsi sevi iz nabrežja Save so pokazali proteolitično aktivnost, medtem ko 6 od 20 sevov iz paradižnika te aktivnosti ni imelo. Trije sevi *B. subtilis* iz nabrežja Save in sev *B. pumilus* so pokazali zelo močno proteolitično aktivnost. Zelo močno proteolitično aktivnost smo izmerili tudi pri FZB42, medtem ko laboratorijski sev BD2833, ki ima mutacijo v genu *degQ*, ne more izločati litičnih encimov (proteaze, hitinaze) (McLoon in sod., 2011), kar so naši testi potrdili.

Večina sevov iz naše zbirke, ki so kazali močno hitinazno aktivnost (intenziteta svetlobe nad 15000), spada v vrsto *Bacillus subtilis*, z izjemo seva *B. amyloliquefaciens* T16-7. Za seve *B. subtilis* in *B. amyloliquefaciens* so že prej pokazali, da izločajo hitinaze in da te zavirajo rast gliv (Senol in sod., 2014; Wang in sod., 2002). Sevi z visoko hitinazno aktivnostjo imajo potencial, da zaščitijo rastlino pred patogenimi glivami (Wang in sod., 2002). Predhodne

raziskave so pokazale, da različne vrste *B. pumilus* in *B. licheniformis* sintetizirajo zunajcelične hitinaze (Gomaa, 2012; Shali in sod., 2010), naši sevi teh vrst pa so kazali nizko hitinazno aktivnost.

Vsi naši sevi, z izjemo seva *B. pumilus* T24-5, so pokazali zelo močno celulazno aktivnost. Sevom *Bacillus*, ki so lahko endofiti (Huang in sod., 2011), celulaze, tako kot rizobijem, morda pomagajo pri kolonizaciji gostiteljske rastline (Robledo in sod., 2008).

Zaradi svoje amfifilne narave surfaktanti pri določeni koncentraciji povzročijo hemolizo (Moran in sod., 2002). Hemolitični test je primeren za hiter pregled večjih zbirk izolatov, vendar pozitiven rezultat ni nujno povezan s produkcijo lipidnih biosurfaktantov. Med biosurfaktante, poleg lipidov in lipopetidov, spadajo tudi različni glikolipidi, polisaharidi, proteini in lipoproteini (Raaijmakers in sod., 2010), ki bi prav tako lahko povzročili hemolizo. Za seve *Bacillus* so predhodno dokazali, da izločajo različne surfaktante (Kinsella in sod., 2009; Ongena in sod., 2007; Koumoutsi in sod., 2004; Lee in sod., 2007; Naruse in sod., 1990; Pueyo in sod., 2009; Li in sod., 2008). V naši zbirki pri 17 od 31 sevov nismo zaznali hemolitične aktivnosti. Najvišjo hemolitično aktivnost smo zaznali pri sevu *B. licheniformis* T16-6, pri katerem bi hemolizo lahko povzročil lihenizin. Lihenizin izloča *B. licheniformis* in je podoben surfaktinu, vendar ima večjo hemolitično aktivnost od surfaktina (100% hemoliza že pri 15 µM koncentraciji namesto pri 200 µM koncentraciji; Grangemard in sod., 2001). Naslednjo najvišjo hemolitično aktivost sta imela seva *B. subtilis* T16-4 in T16-8. Pri teh dveh sevih hemolizo najverjetneje povzroča surfaktin, kar so z inaktivacijo gena *srfA* tudi dokazali Oslizlo in sod. (2015). Za sev 6051 so dokazali, da izloča surfaktin v gojiščih LB, NB, MS (Bais in sod., 2004), vendar sev v našem primeru v tekočem CM gojišču ni izločal biosurfaktantov. Tipi biosurfaktantov, ki jih izločajo bakterije, so odvisni od sestave rastnega gojišča, predvsem sta pomembna vira ogljika in dušika (Li in sod., 2008). Seve smo gojili v CM gojišču, kjer sev PS-216 izloča znatne količine surfaktina, vendar bi morda drugi sevi potrebovali drugačno sestavo gojišča za optimalno izločanje biosurfaktantov.

5.1.1.2 Zaviranje rasti patogene bakterije *Ralstonia solanacearum*

Na neselektivnem gojišču CPG je večina sevov (17/20) izoliranih iz rizosfere paradižnika pokazala protibakterijsko delovanje proti *R. solanacearum*, na selektivnem gojišču King B pa je protibakterijsko delovanje pokazal le sev *B. amyloliquefaciens* T16-7, ki je bil sicer

najmočnejši zaviralec rasti te patogene bakterije tudi na CPG gojišču. Za seve vrste *B. amyloliquefaciens* so že prej dokazali delovanje proti *R. solanacearum* (Chen in sod., 2014). Poleg tega je znano, da pri zaščiti pred *R. solanacearum* igra pomembno vlogo biofilm in surfaktin (Chen in sod., 2013). Biosurfaktanti lahko delujejo protibakterijsko in protiglivno (Moyne in sod., 2001; Koumoutsi in sod., 2004), vendar je zanimivo, da pri sevu T16-7 v tekočem gojišču CM nismo zaznali hemolize, zato zaščitne vloge verjetno ne moremo pripisati surfaktinu. Sev tudi ne izloča sideroforov in proteaz. Sev najverjetneje izloča antibiotike, na katere je patogena bakterija občutljiva, kar je sicer značilnost dobrih biopesticidov (Raaijmakers in sod., 2002). S T16-7 primerljivo protibakterijsko aktivnost proti *R. solanacearum* sta na obeh gojiščih pokazala komercialno dostopna seva *B. subtilis* GB03 in *B. amyloliquefaciens* FZB42.

5.1.2 Biofilmi in kolonizacija rizosfere

Beauregard in sodelavci (2013) so ugotovili, da rastlinski polisaharidi (npr. pektin, ekstrakti rastlin) spodbudijo nastanek biofilma, zato smo v okviru te raziskave preverili vpliv rastlinskega ekstrakta, rastlinskih eksudatov in pektina na tvorbo plavajočih biofilmov (pelikel). Tudi izolati iz naše zbirke so se odzvali na dodajanje rastlinskih ekstraktov ali pektina v gojišče MSN oziroma so tvorili biofilme v MSN z eksudati rastlin, medtem ko brez teh večina izolatov ni tvorila plavajočih biofilmov (pelikle) na MSN, kar je v skladu z opažanji Beauregard s sod. (2013). Izjema sta bila seva BD2833 in T24-5, ki nista na nobenem izmed testiranih gojišč tvorila dobro opaznih biofilmov. BD2833 ima mutacijo v genu *eps* (McLoon in sod., 2011) in zato je slab filmotvor. Vzroka za šibko filmotvornost seva *B. pumilus* T24-5 ne poznamo. Višjo suho maso biofilma na pektinu od komercialnega seva FZB42 smo izmerili pri 12 sevih, kar pomeni, da so ti sevi tvorili močnejše biofilme od komercialnega seva. Ocena biofilmov na ekstraktih in eksudatih je izpostavila sev *B. subtilis* PS-160, saj je ta edini tvoril biofilm primerljiv s komercialnim sevom FZB42. Učinkovita kolonizacija rizosfere gostiteljske rastline je ključna lastnost dobrih biopesticidov oziroma biognojil (Bhattacharyya in Jha, 2012) in ta je tesno povezana prav s sposobnostjo tvorbe biofilmov (Bais in sod., 2004).

5.1.3 Neposredni mehanizmi – spodbujanje rasti rastlin

5.1.3.1 Fosfati in siderofori

Bakterije pospešijo raztpljanje fosfata v tleh zaradi produkcije kislin (Vazquez in sod., 2000) in jih zato poimenujemo tudi biognojila. Sevi *B. megaterium*, ki raztpljajo trikalcijev fosfat, izločajo citronsko, mlečno in propanojsko kislino (Chen in sod., 2006), fosfate je raztpljal tudi sev *B. megaterium* T19-1. V naši zbirki so fosfate najučinkoviteje raztpljali sevi *B. licheniformis*, med njimi je izstopal sev T26-2. Aktivnost smo zaznali tudi pri sevih *B. amyloliquefaciens* in *B. pumilus*, pri katerih so že pokazali zmožnost raztpljanja fosfatov (Hafeez in sod., 2006). Trivedi in sod. (2007) so objavili, da sevi *B. subtilis* raztpljajo fosfate slabše kot *B. megaterium*, vendar so se prvi še vedno pokazali kot boljša biognojila. V naši zbirki so sevi *B. subtilis* pokazali zelo veliko raznolikost učinkovitosti raztpljanja fosfatov.

Siderofori so molekule, ki vežejo železo in jih bakterije (tudi vrste *B. subtilis*) izločajo v okolje (Yu in sod., 2011) in tako posredno zagotovijo železo rastlini (Sharma in sod., 2003; Shirley in sod., 2011) ali jo zaščitijo pred patogeni organizmi (Buysens in sod., 1996; Yu in sod., 2011). *B. amyloliquefaciens* FZB42, ki ima gene za sintezo siderofora (Chen in sod., 2007), je pokazal le šibko pozitiven (+) rezultat, medtem ko so nekateri sevi *B. subtilis* pokazali zelo močno reakcijo za prisotnost sideroforov (+++). Vsi sevi iz nabrežja so izločali siderofore, medtem ko je bila med sevi, izoliranimi iz rizosfere paradižnika, kar polovica sevov negativnih. Udomačeni sev BD2833 po pričakovanjih ni izločal sideroforov. Tudi pri sevih *B. licheniformis* in *B. amyloliquefaciens* nismo zaznali sideroforov.

5.1.3.2 Spodbujanje rasti modelne rastline *Arabidopsis thaliana* in izločanje IAA

Fitihormoni, kot je indol ocetna kislina (IAA), so znani pospeševalci rasti rastlin (Kloepper in sod., 2004) in sevi rodu *Bacillus* sintetizirajo ta fitohormon (Ali in sod., 2009; Barnawal in sod., 2013; Ali in sod., 2009; Wahyudi in sod., 2011; Idris in sod., 2007). Tudi nekateri sevi iz naše zbirke so sintetizirali IAA, med katerimi je *B. megaterium* T19-1 najbolj izstopal z $25,3 \pm 0,8 \mu\text{g IAA/mL}$. Ta sev je tudi vzpodbudil rast korenin in listov (suha masa korenin je bila $2,3 \pm 0,3$ večkratnik kontrole, suhe masa listov pa $2,0 \pm 0,2$ večkratnik kontrole). Zaznavne količine IAA in hkrati spodbujanje rasti modelne rastline smo zaznali še pri treh sevih *B. subtilis* (PS-216, PS-263 in T16-8). Za *B. subtilis* in *B. megaterium* so že prej dokazali, da

spodbujata rast *Arabidopsis*. Prav tako lahko rast spodbuja *B. amyloliquefaciens* (Ryu in sod., 2003; Lopez-Bucio in sod., 2006), vendar tega nismo zaznali pri naših sevih. Spodbujanje rasti *Arabidopsis* smo preverili na MS trdnem gojišču s saharozo, pri tem *Arabidopsis* in *Bacillus* nista bila v neposrednem stiku.

Rizobakterije lahko tudi inhibirajo rast korenin in poganjkov, ker izločajo cianid, fitotoksine in fitohormone (negativno lahko deluje tudi IAA v previsokih koncentracijah; Nehl in sod., 1997). Med testiranimi sevi je sev *B. licheniformis* T31-1 najmočneje zaviral rast *Arabidopsis*.

Večina komercialnih biognojil in biopesticidov vsebuje le posamezne seve, vendar se je izkazalo, da je včasih kombinacija različnih sevov in vrst bakterij lahko učinkovitejša od posameznih sevov. Določene mešanice sevov sprožijo v rastlinah ISR in jih tako zaščitijo pred več različnimi patogenimi organizmi (Jetiyanona in Kloepper, 2002). Vrste v mešanicah pa tudi spodbujajo rast druga druge (Liu in sod., 2012) in izboljšajo rast v sušnih pogojih (Barnawal in sod., 2013). Mešanice, v katerih so uporabili tudi seve *Bacillus*, so zaščitile rastline pred nematodami, bakterijami, glivami in virusi (Jetiyanona in Kloepper, 2002; Liu in sod., 2014). Zanimalo nas je, če bi mešanice naših sevov, ki so pokazali zanimive lastnosti, učinkoviteje spodbujale rast, kot posamezni sevi. V mešanice sevov smo vključili seve *B. amyloliquefaciens* T16-7 (aktivnost proti *Ralstonia*), *B. megaterium* T19-1 (visoka koncentracija IAA) in sev *B. subtilis* PS-216 (spodbujanje rasti modelne rastline, izločanje biosurfaktantov). V poskusu v monokulturah je sev T19-1 spodbujal rast, prav tako je sev spodbujal rast rastline v mešanici s T16-7. Ostale mešanice rasti niso spodbujale oziroma rezultati niso bili signifikantni. Problem mešanic sevov je, da med sevi pogosto pride do kompeticije in pozitivni učinek sevov lahko celo izgine (Foster in Bell, 2012), kar smo pokazali tudi v našem poskusu.

5.1.4 Potencialni biopesticidi in biognojila

Večina učinkovitih bioloških kontrolnih sevov in biognojil deluje preko več mehanizmov (Kumar in sod., 2012; Vessey, 2003), ki smo jih ovrednotili v okviru tega dela in jih nato uporabili za končno oceno biopesticidnega potenciala, potenciala za biognojenje in skupno oceno vseh lastnosti.

Kot potencialna biopesticida sta se z najvišjim številom točk pri posrednih mehanizmih izkazala seva *B. subtilis* PS-95 in T14-4. Oba seva izločata proteaze in siderofore, imata

močno hitinazno aktivnost, na CPG gojišču zavirata rast *R. solanacearum*. Seva na pektinu tvorita dokaj močne biofilme in izločata biosurfaktante, kar glede na objavo Beauregard s sod. (2013), omogoča lažjo kolonizacijo gostiteljske rastline in tudi prednost v tekmovanju z naravno mikrobnim združbo tal (Kinsella in sod., 2009; Raaijmakers in sod., 2010). Sev PS-95 je tudi nabral najviše število točk, ko smo sešteli točke za neposredne in posredne lastnosti, kar ga naredi še bolj zanimivega. Tretje najviše število točk je nabral *B. amyloliquefaciens* FZB42, znan zaviralec rasti določenih patogenih organizmov (Koumoutsi in sod., 2004; Burkett-Cadena in sod., 2008), ki je pokazal dober učinek tudi v poljskem poskusu (Chowdhury in sod., 2013) in je patentiran kot biokontrolni agens (Borriss in sod., 2010). Kljub dokazani biokontrolni učinkovitosti seva GB03 proti *R. solanacearum* (Ryu in sod., 2004) je ta v naši oceni zbral nizko število točk. Izpostavila bi tudi sev PS-160, ki je po številu točk za posredne lastnosti četrti, saj je sev zaradi izredno močnih biofilmov na rastlinskih ekstraktih in eksudatih izredno zanimiv tudi za raziskave mehanizmov tvorbe biofilmov.

Sev *B. amyloliquefaciens* T16-7 ni v nobeni izmed ocen nabral zelo visokega števila točk, vendar je zanimiv, ker najmočneje inhibira rast *R. solanacearum* in ker v kombinaciji s sevom *B. megaterium* T19-1 spodbuja rast *Arabidopsis*. Kot potencialno biognojilo je zelo zanimiv prav sev T19-1, ki je največ točk pri neposrednih mehanizmih zbral zaradi visoke koncentracije IAA in spodbujanja rasti *Arabidopsis*. Kljub temu, da je sev FZB42 dostopen kot biognojilo (Biomex (Omx), RhizoVital® 42 (ABiTEP GmbH)), je v našem primeru kot potencialno biognojilo nabral zelo malo točk, se je pa izkazal v skupni oceni.

Po pričakovanjih so bile ocene seva *B. subtilis* BD2833 med najnižjimi, saj je zaradi adaptacije na življenje v laboratoriju v večini testov negativen oz. so vrednosti rezultatov nizke.

5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov raziskovalnega dela lahko zaključimo naslednje:

- Sevi *Bacillus* se razlikujejo v količini bioaktivnih snovi, ki jih izločajo. Razlike v količini bioaktivnih snovi se pokažejo že pri sevih, izoliranih iz ene rastline.
- Sevi v večini primerov na MSN gojišču ne tvorijo biofilmov, medtem ko dodatek rastlinskih komponent ali pektina pri večini sevov sproži nastanek biofilma.
- Sev *B. megaterium* T19-1 se je glede na naše točkovanje kot potencialno biognojilo izkazal najbolje, saj izloča bistveno večje količine IAA od ostalih sevov in močno spodbuja rast *Arabidopsis*.
- Sev *B. amyloliquefaciens* T16-7 zavira rast patogene bakterije *R. solanacearum* na trdnih gojiščih in v kombinaciji z *B. megaterium* T19-1 spodbuja rast *Arabidopsis*.
- Sevi *Bacillus* na rast modelne rastline delujejo pozitivno, nanjo nimajo vpliva ali pa rast celo zavirajo.

6 POVZETEK

Povečana skrb za okolje je spodbudila iskanje alternativ sintetičnim pesticidom in gnojilom. Ena izmed možnosti so biognojila in biopesticidi, ki vsebujejo PGPR, in preko različnih mehanizmov spodbujajo rast rastlin ali zavirajo patogene organizme. Biognojila bi lahko pomagala zmanjšati vnos fosfatov in dušikov v okolje s sproščanjem nedostopnih fosfatov iz tal in fiksacijo atmosferskega dušika, biopesticidi pa za razliko od kemičnih pesticidov za sabo puščajo manj toksičnih ostankov.

V tem magistrskem delu smo okarakterizirali 20 izolatov *Bacillus* iz rizosfere paradižnika in 6 izolatov *Bacillus subtilis* iz nabrežja Save za lastnosti, ki so pomembne pri spodbujanju rasti rastlin ali pri zatiranju fitopatogenih organizmov. Tako kot so dokazali Beauregard in sod. (2013), je tudi pri naših sevih dodatek rastlinskih komponent pri večini sevov sprožil nastanek biofilmov. Sevi so se razlikovali v količini izločenih bioaktivnih molekul in sama raznolikost v zunajceličnih metabolitih se je pokazala že na nivoju izolatov ene rastline. Ugotovili smo, da sev *B. megaterium* T19-1 izloča visoke koncentracije IAA in spodbuja rast modelne rastline, medtem ko določeni sevi rast rastline zavirajo. Sevi torej različno vplivajo na rast *Arabidopsis*. Sev *B. amyloliquefaciens* T16-7 zavira rast *R. solanacearum* na trdnem gojišču King B. Nekatere seve, ki so dosegli visoke celokupne ocene za biokontrolni potencial, bi bilo zanimivo testirati na kmetijsko pomembnih rastlinah in v daljšem časovnem okviru, kar bi nam dalo boljši vpogled v njihov potencial kot biognojilo ali biopesticid.

7 VIRI

- Albano M., Hahn J., Dubnau D. 1987. Expression of competence genes in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 169: 3110–3117.
- Ali B., Sabri A.N., Ljung K., Hasnain S. 2009. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25,3: 519–526.
- Aliye N., Fininsa C., Hiskias Y. 2008. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biological Control*, 47, 3: 282–288.
- 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.
- Bargabus R.L., Zidack N.K., Sherwood J.W., Jacobsen B.J. 2002. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61: 289–298.
- Barnawal D., Maji D., Bharti N., Chanotiya C.S., Kalra A. 2013. ACC deaminase-containing *Bacillus subtilis* reduces stress ethylene-induced damage and improves mycorrhizal colonization and rhizobial nodulation in *Trigonella foenum-graecum* under drought stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32, 4: 809–822.
- Beauregard P.B., Chai Y., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2013. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 17: E1621-E1630.
- Bhattacharyya P. N., Jha D. K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 4: 1327–1350.
- Borriss R., Borriss M., Harksen E., Beifort P., Junge H. 2010. Antibacterial agent for treating fire blight in fruit groves and other bacterially caused plant diseases. European Patent Office EP2179652 (A1): 22 str.
- Bottini R., Cassan F., Piccoli P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 5: 497–503.

- Burkett-Cadena M., Kokalis-Burelle N., Lawrence K.S., van Santen E., Kloepper J.W. 2008. Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. *Biological Control*, 47, 1: 55–59.
- Burkholder P. R., Giles N. H. 1947. Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*. *American Journal of Botany*, 34: 345–348.
- Buyssens S., Huengens K., Poppe J., Hofte M. 1996. Involvement of pyochelin and pyoverdin in suppression of Pythium-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3: 865–871.
- Cao X.H., Liao Z.Y., Wang C.L., Cai P., Yang W.Y., Lu M.F., Huang G.W. 2009. Purification and antitumour activity of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus natto* TK-1. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 52: 97–106.
- Chandler D., Bailey A.S., Tatchell G.M., Davidson G., Greaves J., Grant W.P. 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 366, 1573: 1987–1998.
- Chen D., Liu X., Li C.Y., Tian W., Shen Q.R., Shen B. 2014. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacterial wilt. *Journal of Environmental Management*, 137: 120–127.
- Chen X.H., Koumoutsi A., Scholz R., Eisenreich A., Schneider K., Heinemeyer I., Morgenstern B., Voss B., Hess W.R., Reva O., Junge H., Voigt B., Jungblut R. R., Vater J., Sussmuth R., Liesegang H., Strittmatter A., Gottschalk G., Borriß R. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, 25, 9: 1007–1014.
- Chen Y., Yan F., Chai Y.R., Liu H.X., Kolter R., Losick R., Guo J.H. 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 15, 3: 848–864.
- Chen Y.P., Rekha P.D., Arun A.B., Shen F.T., Lai W.A., Young C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34, 1: 33–41.
- Chowdhury S.P., Dietel K., Randler M., Schmid M., Junge H., Borriß R., Hartmann A., Grosch R. 2013. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and

- health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. PLoS ONE, 8, 7: e68818, doi:10.1371/journal.pone.0068818: 10 str.
- Cronin D., Moenne-Loccoz Y., Dunne C., O'Gara F. 1997. Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* by chitinase-producing bacteria. European Journal of Plant Pathology, 103: 433–440.
- de Salamone I.E.G., Hynes R.K., Nelson L.M. 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. Canadian Journal of Microbiology, 47, 5: 404–411.
- Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Vande Broek A., Vanderleyden J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. Plant and Soil, 212: 155–164.
- Dunne C., Crowley J.J., Moenne-Loccoz Y., Dowling D.N., de Bruijn F.J., O'Gara F. 1997. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. Microbiology, 143: 3921–3931.
- EU Commission. 2014. EU pesticides database, active substance. Brussels, European Commission: baza podatkov
http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=activesubstance.selection
(november 2014).
- Foster K.R., Bell T. 2012. Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species. Current Biology, 22: 1845–1850.
- Frankowski J., Lorito M., Scala F., Schmid R., Berg G., Bahl H. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. Archives of Microbiology, 176, 6: 421–426.
- Genin S., Boucher C. 2002. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. Molecular Plant Pathology, 3, 3: 111–118.
- Glickmann E., Gardan L., Jacquet S., Hussain S., Elasri M., Petit A., Dessaux Y. 1998. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 11, 2: 156–162.
- Gomaa E.Z. 2012. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. Journal of Microbiology, 50, 1: 103–111.
- Gontia-Mishra I., Sasidharan S., Tiwari S. 2014. Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress. Biotechnology Letters, 36, 5: 889–898.

- Gordon S.A., Weber R.P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26, 4: 192–195.
- Grangemard I., Wallach J., Maget-Dana R., Peypoux F. 2001. Lichenysin: A more efficient cation chelator than surfactin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90, 3: 199–210.
- Gray E.J., Smith D.L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 3: 395–412.
- Gutierrez-Manero F.J., Ramos-Solano B., Probanza A, Mehouachi J., Tadeo F. R., Talon M. 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilis* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111: 206–211.
- Haas D., Defago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 4: 307–319.
- Hafeez F.Y., Yasmin S., Ariani D., Mehboob-ur-Rahman., Zafar Y., Malik K.A. 2006. Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer. *Agronomy for Sustainable Development*, 26, 2: 143–150.
- Hameedaa B., Harinib G., Rupelab O.P., Wanib S.P., Reddy G. 2008. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research*, 163, 2: 234–242.
- Han S.H., Lee S.J., Moon J.H., Park K.H., Yang K.Y., Cho B.H., Kim K.Y., Kim Y.W., Lee M.C., Anderson A.J., Kim Y.C. 2006. GacS-dependent production of 2R, 3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 8: 924–930.
- Hartmann A., Schmid M., van Tuinen D., Berg G. 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil*, 321, 1–2: 235–257.
- Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., Ahmed I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60, 4: 579–598.
- Huang B., Zhuang P., Zhang H., Fan L. 2011. Endophytic colonisation of *Bacillus subtilis* in the roots of *Robinia pseudoacacia* L. *Plant Biology*, 13, 6: 925–931.

- Idris E.E., Iglesias D.J., Talon M., Borrius R. 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 6: 619–626.
- Idriss E.E., Makarewicz O., Farouk A., Rosner K., Greiner R., Bochow H., Richter T., Borrius R. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology*, 148, 7: 2097–2109.
- Jaouadi B., Ellouz-Chaabouni S., Ali M.B., Messaoud E.B., Naili B., Dhouib A., Bejar S. 2009. Excellent laundry detergent compatibility and high dehairing ability of the *Bacillus pumilus* CBS alkaline proteinase (SAPB). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 4: 503–512.
- Jetiyanon K., Kloepper J.W. 2002. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control*, 24, 3: 285–291.
- Jimenez-Zurdo J.I., Mateos P.F., Dazzo F.B., Martinez-Molina E. 1996. Cell-bound cellulase and polygalacturonase production by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 7: 917–921.
- Joo G.J., Kim Y.M., Kim J.T., Rhee I.K., Kim J.H., Lee I.J. 2005. Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. *Journal of Microbiology*, 43, 6: 510–515.
- Kamilova F., Validov S., Azarova T., Mulders I., Lugtenberg B. 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environmental Microbiology*, 7, 11: 1809–1817.
- Kasana R. C., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*, 57: 503–507.
- Kelman A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*, 44: 693–695.
- King E.O., Ward M.K., Raney D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44: 301–307.
- Kinsella K., Schulthess C.P., Morris T.F., Stuart J.D. 2009. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 2: 374–379.

- Kloepper J.W., Ryu C.M., Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94: 1259–1266.
- Kloepper J.W., Schroth M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. V: Proceedings on the 4th international conference on plant pathogenic bacteria, Tours (France), 27 avg. – 2 sep. 1978. Gilbert C. (ed.). Tours, Institut National de la Recherche Agronomique: 879–882.
- Koumoutsi A., Chen X. H., Henne A., Liesegang H., Gabriele H., Franke P., Vater J., Borris R. 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology* 186, 4: 1084–1096.
- Kumar P., Dubey R. C., Maheshwari D.K. 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, 167: 493–499.
- Laine M.J., Haapalainen M., Wahlroos T., Kankare K., Nissinen R., Kassuwi S., Metzler M.C. 2000. The cellulase encoded by the native plasmid of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* plays a role in virulence and contains an expansin-like domain. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57, 5: 221–233.
- Lee S.C., Kim S.H., Park I.H., Chung S.Y., Choi Y.L. 2007. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. *Archives of Microbiology*, 188, 4: 307–312.
- Lemessa F., Zeller W. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control* 42, 3: 336–344.
- Li Y.M., Haddad N.I.A., Yang S.Z., Mu B.Z. 2008. Variants of lipopeptides produced by *Bacillus licheniformis* HSN221 in different medium components evaluated by a rapid method ESI-MS. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 14, 3: 229–235.
- Lian L.H., Tian B.Y., Xiong R., Zhu M.Z., Xu J., Zhang K.Q. 2007. Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 3: 262–269.
- Lim H.S., Kim Y.S., Kim S.D. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 510–516.

- Liu H.X., Li S.M., Luo Y.M., Luo L.X., Li J.Q., Guo J.H. 2014. Biological control of Ralstonia wilt, Phytophthora blight, Meloidogyne root-knot on bell pepper by the combination of *Bacillus subtilis* AR12, *Bacillus subtilis* SM21 and *Chryseobacterium* spp. R89. European Journal of Plant Pathology, 139, 1: 107–116.
- Liu R.J., Dai M., Wu X., Li M., Liu X.Z. 2012. Suppression of the root-knot nematode [*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood] on tomato by dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria. Mycorrhiza, 22, 4: 289–296.
- Lopez D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. 2009. Paracrine signaling in a bacterium. Genes and Development, 23: 1631–1638.
- Lopez-Bucio J., Campos-Cuevas J.C., Hernández-Calderón E., Velásquez-Becerra C., Farías-Rodríguez R., Macías-Rodríguez L.I., Valencia-Cantero E. 2006. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 20, 2: 207–217.
- Masalha J., Kosegarten H., Elmaci O., Mengal K. 2000. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. Biology and Fertility of Soils, 30: 433–439.
- Mateos P., Jiminez-Zurdo J., Chen A., Squatrini S., Haack E., Martinez-Molina P., Hubbel D., Dazzo F.B. 1992. Cell associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Applied and Environmental Microbiology, 58: 1816–1822.
- Mazurier S., Corberand T., Lemanceau P., Raaijmakers J.M. 2009. Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to *Fusarium* wilt. ISME Journal, 3, 8: 977–991.
- McLoon A.L., Guttenplan S.B., Kearns D.B., Kolter R., Losick R. 2011. Tracing the domestication of a biofilm-forming bacterium. Journal of Bacteriology, 193, 8: 2027–2034.
- Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D., Koornneef M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. Science, 282, 5389: 662-682.
- Mok M.C. 1994. Cytokinins and plant development - an overview. V: Cytokinins: chemistry, activity and function. Mok D.W.S., Mok M.C. (eds.). New York, CRC Press: 115–166.

- Moran A.C., Martinez M.A., Sineriz F. 2002. Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity. *Biotechnology Letters*, 24, 3: 177–180.
- Moyne A.L., Shelby R., Cleveland T.E., Tuzun S. 2001. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 4: 622–629.
- Naruse N., Tenmyo O., Kobaru S., Kamei H., Miyaki T., Konishi M., Oki T. 1990. Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics – production, isolation, chemical-properties, structure and biological-activity. *Journal of Antibiotics*, 43, 3: 267–280.
- Nehl D.B., Allen S.J., Brown J.F. 1997. Deleterious rhizosphere bacteria: An integrating perspective. *Applied Soil Ecology*, 5, 1: 1–20.
- Nihorimbere V., Fickers P., Thonart P., Ongena M. 2009. Ecological fitness of *Bacillus subtilis* BGS3 regarding production of the surfactin lipopeptide in the rhizosphere. *Environmental Microbiology Reports*, 1, 2: 124–130.
- Niu Q.H., Huang X.W., Zhang L., Li Y.X., Li J., Yang J.K., Zhang K.Q. 2006. A neutral protease from *Bacillus nematocida*, another potential virulence factor in the infection against nematodes. *Archives of Microbiology*, 185, 6: 439–448.
- O'Brien M., Colwell R.R. 1987. A rapid test for chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminide. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 7: 1718–1720.
- Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J.L., Thonart P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9, 4: 1084–1090.
- Oslizlo A., Stefanic P., Vatovec S., Beigot Glaser S., Rupnik M., Mandic-Mulec I. 2015. Exploring ComQXPA quorum-sensing diversity and biocontrol potential of *Bacillus* spp. isolates from tomato rhizoplane. *Microbial Biotechnology*, 8, 3: 527–540.
- Patten C.L., Glick B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 8: 3795–3801.
- Perez-Miranda S., Cabirol N., George-Tellez R., Zamudio-Rivera L.S., Fernandez F.J. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70, 1: 127–131.
- Pilet P.E., Saugy M. 1987. Effect on root-growth of endogenous and applied IAA and ABA. *Plant Physiology*, 83, 1: 33–38.

- Prashar P., Kapoor N., Sachdeva S. 2014. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio-technology*, 13, 1: 63–77.
- Pueyo M., Bloch C., Carmona-Ribeiro A., di Mascio P. 2009. Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain. *Microbial Ecology*, 57, 2: 367–378.
- Raaijmakers J.M., de Bruijn I., Nybroe O., Ongena M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 6: 1037–1062.
- Raaijmakers J.M., Vlami M., de Souza J.T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 1–4: 537–547.
- Redmond J.W., Batley M., Djordjevic M.A., Innes R.W., Kuempel P.L., Rolfe B.G. 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in rhizobium. *Nature*, 323, 6089: 632–635.
- Rivardo F., Turner R.J., Allegrone G., Ceri H., Martinotti M.G. 2009. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 3: 541–553.
- Robledo M., Jimenez-Zurdo J.I., Velazquez E., Trujillo M.E., Zurdo-Pineiro J.L., Ramirez-Bahena M.H., Ramos B., Diaz-Minguez J.M., Dazzo F., Martinez-Molina E., Mateos P.F. 2008. *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 7064–7069.
- Rodriguez H., Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17, 4-5: 319–339.
- Rudrappa T., Czermek K.J., Pare P.W., Bais H.P. 2008. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology*, 148, 3: 1547–1556.
- Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Pare P.W., Kloepper J.W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 4927–4932.
- Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper J.W., Pare P.W. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134, 3: 1017–1026.
- Saran S., Iaar J., Kumar Saxena R. 2007. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70: 697–699.

- Schwyn B., Neilands J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160: 47–56.
- Senol M., Nadaroglu H., Dikbas N., Kotan R. 2014. Purification of chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* bacteria TV-125, investigation of kinetic properties and antifungal activity against *Fusarium culmorum*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 13: 35, doi: 10.1186/s12941-014-0035-3: 7 str.
- Shaharoona B., Arshad M., Zahir Z.A., Khalid A. 2006. Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 9: 2971–2975.
- Shali A., Ghasemi S., Ahmadian G., Ranjbar G., Dehestani A., Khalesi N., Motallebi E., Vahed M. 2010. *Bacillus pumilus* SG2 chitinases induced and regulated by chitin, show inhibitory activity against *Fusarium graminearum* and *Bipolaris sorokiniana*. *Phytoparasitica*, 38, 2: 141–147.
- Sharma A., Johri B.N., Sharma A.K., Glick B.R. 2003. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP(3) influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 7: 887–894.
- Shirley M., Avoscan L., Bernaud E., Vansuyt G., Lemanceau P. 2011. Comparison of iron acquisition from Fe-pyroverdine by strategy I and strategy II plants. *Botany-Botanique*, 89, 10: 731–735.
- Stefanic P., Mandic-Mulec I. 2009. Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* pherotypes at microscale. *Journal of Bacteriology*, 191, 6: 1756–1764.
- Sundara-Rao W.V.B., Sinha M.K. 1963. Phosphate dissolving microorganisms in the soil and rhizosphere. *Indian Journal of Agricultural Science*, 33: 272–278.
- Tilman D. 1999. Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 11: 5995–6000.
- Timmusk S., Nicander B., Granhall U., Tillberg E. 1999. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 13: 1847–1852.
- Tortosa P., Logsdon L., Kraigher B., Itoh Y., Mandic-Mulec I., Dubnau D. 2001. Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system. *Journal of Bacteriology*, 183, 3: 451–460.

- Trivedi P., Kumar B., Pandey A., Palni L.M.S. 2007. Growth promotion of rice by phosphate solubilizing bioinoculants in a Himalayan location. V: First international meeting on microbial phosphate solubilization. Velazquez E., Rodriguez-Barrueco C. (eds.). Dordrecht, Springer Netherlands: 291–299.
- van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology, 36: 453–483.
- Vazquez P., Holguin G., Puente M.E., Lopez-Cortes A., Bashan Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biology and Fertility of Soils, 30, 5–6: 460–468.
- Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil, 255, 2: 571–586.
- Vollenbroich D., Ozel M., Vater J., Kamp R.M., Pauli G. 1997. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. Biologicals, 25, 3: 289–297.
- Wahyudi A.T., Astuti R.P., Widayati A., Meryandini A., Nawangsih A.A. 2011. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. Journal of Microbiology and Antimicrobials, 3, 2. 34–40.
- Walker D.S., Reeves P.J., Salmond G.P.C. 1994. The major secreted cellulase, CelV, of *Erwinia carotovora* ssp. *Carotovora* is an important soft rot virulence factor. Molecular Plant Microbe Interactions, 7: 425–431.
- Wang S.L., Shih I.L., Liang T.W., Wang C.H. 2002. Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 8: 2241–2248.
- Wei G., Kloepper J.W., Tuzun S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology, 81: 1508–1512.
- Xie X., Zhang H., Pare P. 2009. Sustained growth promotion in *Arabidopsis* with longterm exposure to the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03). Plant Signaling and Behavior, 4, 10: 948–953.

- Xu W.F., Ding G.C., Yokawa K., Baluska F., Li Q.F., Liu Y.G., Shi W.M., Liang J.S., Zhang J.H. 2013. An improved agar-plate method for studying root growth and response of *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 3: 1273, doi:10.1038/srep01273; 7 str.
- Xue Q.Y., Chen Y., Li S.M., Chen L.F., Ding G.C., Guo D.W., Guo J.H. 2009. Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biological Control*, 48, 3: 252–258.
- Yu X.M., Ai C.X., Xin L., Zhou G.F. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on fusarium wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47, 2: 138–145.
- Zeigler D.R., Pragai Z., Rodriguez S., Chevreux B., Muffler A., Albert T., Bai R., Wyss M., Perkins J.B. 2008. The Origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains. *Journal of Bacteriology*, 190, 21: 6983–6995.
- Zhang S., Moyne A.L., Reddy M.S., Kloepper J.W. 2002. The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control*, 25: 288–296.

ZAHVALA

Somentorici dr. Anni Oslizlo za ves čas, vse nasvete, potrpežljivost, odzivnost, vodenje in dostopnost tako pri delu v laboratoriju kot pri pisanju tega dela.

Mentorici prof. dr. Ines Mandić-Mulec za pregled in strokovne nasvete pri nastajanju magistrskega dela.

Recenzentki prof. dr. Maji Ravnikar za hiter pregled magistrskega dela in koristne nasvete.

Dr. Tanji Dreo za pomoč in zaupanje pri delu z *Ralstonia solanacearum* na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

Mojim staršem in sestrama za vso podporo tekom študijskih let.

Boštjanu za vso potrpežljivost in podporo.

PRILOGE

Priloga A: S t-testom izračunane p-vrednosti. Vrednosti nižje od 0,05 pomenijo, da se rezultati seva signifikantno razlikujejo od kontrole, vrednosti večje od 0,05 (rdeče številke) kažejo, da ni signifikantne razlike med sevom in kontrolo.

Sev	p- vrednost	
	Vpliv na maso korenin	Vpliv na maso listov
<i>B. subtilis</i> BD2833	0,9378	0,4425
<i>B. subtilis</i> PS-216	0,0008	0,0001
<i>B. subtilis</i> 6051	0,8925	0,6988
<i>B. subtilis</i> T12-1	0,5067	0,2098
<i>B. subtilis</i> T14-1	0,0498	0,0624
<i>B. subtilis</i> T14-3	0,0419	0,0233
<i>B. subtilis</i> T14-4	0,0029	0,0005
<i>B. subtilis</i> T14-5	0,3062	0,2455
<i>B. licheniformis</i> T15-1	0,2707	0,1039
<i>B. subtilis</i> T16-2	0,0003	0,0004
<i>B. subtilis</i> T16-3	0,6173	0,4189
<i>B. subtilis</i> T16-4	0,0004	0,0020
<i>B. subtilis</i> T16-5	0,0086	0,0074
<i>B. licheniformis</i> T16-6	0,0107	0,0146
<i>B. amyloliquefaciens</i> T16-7	0,3565	0,6212
<i>B. subtilis</i> T16-8	0,0007	0,0000
<i>B. subtilis</i> T16-10	0,1219	0,0000
<i>B. subtilis</i> T17-1	0,0135	0,0003
<i>B. megaterium</i> T19-1	0,0000	0,0000
<i>B. subtilis</i> T21-2	0,3584	0,0108
<i>B. pumilus</i> T24-5	0,0665	0,3336
<i>B. licheniformis</i> T26-2	0,9920	0,1933
<i>B. licheniformis</i> T31-1	0,0164	0,0337
<i>B. subtilis</i> PS-95	0,0688	0,0122
<i>B. subtilis</i> PS-160	0,7284	0,4938
<i>B. subtilis</i> PS-194	0,0175	0,0014
<i>B. subtilis</i> PS-209	0,3449	0,0244
<i>B. subtilis</i> PS-210	0,4734	0,4651
<i>B. subtilis</i> PS-263	0,0010	0,0000
<i>B. subtilis</i> GB03	0,4760	0,5394
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	0,3861	0,2302
T16-7 + T19-1	0,000	0,0000
T19-1 + PS-216	0,1864	0,1002
T19-1 + PS-216 + T16-7	0,0436	0,1250