Tretiranje pšenice bakterijskim kulturama iz tla u svrhu proučavanja utjecaja bakterija na rast biljke

Čičić, Mirjam

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:631585

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

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

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski studij Zaštite prirode i okoliša

Mirjam Čičić

TRETIRANJE PŠENICE BAKTERIJSKIM KULTURAMA IZ TLA U SVRHU PROUČAVANJA UTJECAJA BAKTERIJA NA RAST BILJKE

Diplomski rad

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Diplomski studij Zaštite prirode i okoliša
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

TRETIRANJE PŠENICE BAKTERIJSKIM KULTURAMA IZ TLA U SVRHU PROUČAVANJA UTJECAJA BAKTERIJA NA RAST BILJKE

Mirjam Čičić

Rad je izrađen: 2016. godine na Zavodu za kvantitativnu ekologiju, Odjela za biologiju u Osijeku

Mentor: doc.dr.sc. Goran Palijan

Kratak sažetak diplomskog rada:

Pšenica (*Triticum aestivum*) je u laboratorijskim uvjetima, tretirana suspenzijama tri vrste bakterija iz tla te njihovim kombinacijama. Rađena su dva istraživanja, na crnici i lesu, od kojih je u jednom bilo korišteno sterilno tlo a u drugom nesterilno tlo. Od svih kombinacija izoliranih bakterijskih kultura najveći učinak na rast pšenice je pokazala kultura C, kod istraživanja na sterilnom lesu te kombinacija kultura AB u slučaju istraživanja na sterilnoj crnici. Kulture ABC su u oba slučaja pokazale negativan utjecaj na rast pšenice. Pozitivan utjecaj na rast biljke može biti uzrokovan bakterijskom produkcijom fitohormona, fiksacijom dušika, obranom od biljnih patogena te drugim mehanizmima.

Broj stranica: 64
Broj slika:67
Broj tablica:3
Broj literaturnih navoda:21
Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: *Triticum aestivum*, bakterije koje potiču rast biljaka, sinergija bakterija
Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Doc. dr. sc. Ivna Štolfa
2. Doc. dr. sc. Davorka K. Hackenberger
3. Doc. dr. sc. Goran Palijan
4. Prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger

BASIC DOCUMENTAL CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Biology
Graduate Programme: Nature and Environment Preservation
Scientific field: Natural Sciences
Field of study: Biology

TREATMENT OF WHEAT WITH BACTERIAL CULTURES FROM THE SOIL FOR THE PURPOSE TO OBSERVE THE EFFECT OF THE BACTERIA ON THEGROWTH OF THE PLANT

Mirjam Čičić

The Paper was created: in 2016. at the Institute for Quantitative Ecology, Department of Biology in Osijek
Mentor: doc.dr.sc. Goran Palijan

A brief summary of thesis:

Common wheat (*Trtticum aestivum*) was treated with three types of bacteria from the soil and with their combinations. Research was conducted in laboratory conditions. Two researches were done, on mould (humus) and loess soil, where in one case the sterile soil was used and in other non-sterile soil. From all the combinations of isolated bacterial cultures the most impact on the growth of the wheat had C culture on sterile loess, and combination of AB cultures on sterile mould soil. ABC cultures showed negative impacts on growth of the wheat. Positive impact on the growth of the plant could be caused by bacterial production of phytohormones, nitrogen fixation, protection from plant pathogens and other mechanisms.

Number of pages: 64
Number of pictures: 67
Number of tables: 3
Number of literary citations: 21
Language of the original: Croatian

Key words: *Triticum aestivum*, bacteria promoting growth, bacterial synergy
Date of thesis defense:

The expert committee for the defense:
1. Doc. dr. sc. Ivna Štolfa
2. Doc. dr. sc. Davorka K. Hackenberger
3. Doc. dr. sc. Goran Palijan
4. Prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger

Tablica sadržaja

1. UVOD 1
1.1. INTERAKCIJE IZMEĐU BILJAKA I BAKTERIJA RIZOSFERE 2
1.2. MEHANIZMI POTICANJA RASTA BILJAKA 3
1.2.1. DIREKTNI MEHANIZMI 3
1.2.1.1. BIOLOŠKA FIKSACIJA DUŠIKA 3
1.2.1.2. POVEĆAVANJE DOSTUPNOSTI FOSFORA POTREBNOG ZA RAST BILJAKA 4
1.2.1.3. BAKTERIJSKA PROIZVODNJA BILJNIH HORMONA 4
1.2.2. INDIREKTNI MEHANIZMI 5
1.2.2.1. BAKTERIJSKA PROIZVODNJA ANTIBIOTIKA 5
1.2.2.2. BAKTERIJSKA PROIZVODNJA HCN-a 6
1.2.2.3. PROIZVODNJA SIDEROFORA 6
1.3. INOKULACIJA TLA MIKROORGANIZMIMA 7
1.4. ZNAČAJ BIOFILMOVA U RASTU I RAZVOJU BILJAKA 8
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 9
3. MARTERIJALI I METODE 10
3.1. PRIPREMA SJEMENKI ZA KLIJANJE I NJIHOVA DEZINFEKCIJA 10
3.2. IZOLACIJA BAKTERIJSKIH KULTURA IZ TLA 11
3.3. PRIPREMA BAKTERIJSKE SUSPENZIJE 13
3.4. ODREĐIVANJE SUHE TVARI I UDJELA PEPELA U PŠENICI 13
3.5. TRETIRANJE SJEMENKI BAKTERIJSKIM KULTURAMA 14
3.6. DIZAJN EKSPERIMENTA 14
3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 17
4. REZULTATI 18
4.1. PRVI EKSPERIMENT (30. lipnja do 29. srpnja 2016.) 18
4.1.1. KLIJAVOST SJEMENKI PŠENICE 18
4.1.2. VELIČINA STABLJIKA PŠENICE 19
4.1.2.1. VELIČINA STABLJIKA PŠENICE NAKON PETOG DANA UZGOJA 19
4.1.2.2. VELIČINA STABLJIKA PŠENICE NAKON TRIDESETOG DANA UZGOJA 20
4.1.3. SVJEŽA MASA, SUHA MASA, ORGANSKA I ANORGANSKA TVAR PŠENICE (nakon 5 dana) 25
4.1.4. SVJEŽA MASA, SUHA MASA, ORGANSKA I ANORGANSKA TVAR PŠENICE (nakon 25 dana na tlu) 31
4.2. DRUGI EKSPERIMENT (od 7. srpnja do 6. kolovoza2016.) 38

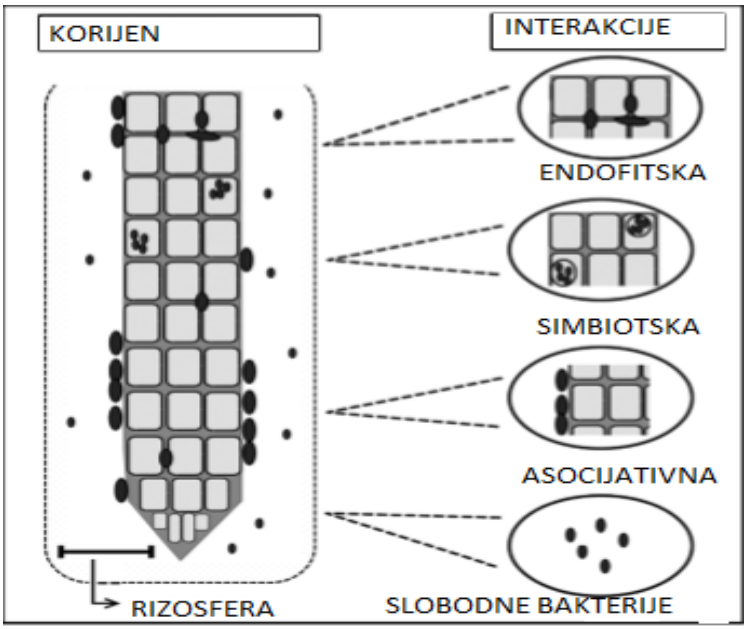
4.2.1. KLIJAVOST SJEMENKI PŠENICE 38
4.2.2. VELIČINA STABLJIKA PŠENICE 39
4.2.2.1. VELIČINE STABLJIKA PŠENICE NAKON PETOG DANA UZGOJA 39
4.2.2.2. VELIČINE STABLJIKA PŠENICE NAKON TRIDESETOG DANA UZGOJA 40
4.2.3. SVJEŽA MASA, SUHA MASA, ORGANSKA I ANORGANSKA TVAR PŠENICE (nakon 5 dana) 45
4.2.4. SVJEŽA MASA, SUHA MASA, ORGANSKA I ANORGANSKA TVAR PŠENICE (nakon 25 dana na tlu) 50
5. RASPRAVA 57
6. GLAVNI REZULTATI 61
7. ZAKLJUČAK 62
8. LITERATURA 63

1. UVOD

Kako raste veličina ljudske populacije javlja se sve veća potreba za hranom, iz koje proizlaze brojna istraživanja temeljena na problemu povećanja proizvodnje poljoprivrednih usjeva. Znanstvenici diljem svijeta pronalaze ekološki prihvatljive, jeftine i efikasne načine povećanja prinosa. Istraživanja temeljena na djelovanju bakterija na rast biomase biljaka su brojna i od velike koristi. Takva istraživanja, temeljena su u većoj mjeri na odnosu bakterija iz rizosfere biljaka te tih istih biljaka. Rizosfera se može definirati kao područje korijena, koje uključuje i tlo oko korijena u kojemu se razvijaju brojne bakterijske kolonije. Za veliki broj kolonija u području rizosfere zaslužna je okolina u kojoj se nalaze, gdje korijenje biljaka ispušta primarne i sekundarne izlučevine u kojima se nalaze šećeri, regulatori rasta, aminokiseline, masne kiseline, flavonoidi, enzimi, stereoidi, alkaloidi i vitamini (Gopalakrishnan i sur., 2012). Bakterije koje potiču rast biljaka najčešće koloniziraju područje rizosfere te utječu na rast pomoću različitih mehanizama, bilo direktno ili indirektno. Zabilježeno je i da kombinacije bakterija rizosfere mogu utjecati na rast i razvoj korijenja (Egamberdieva, 2010). U direktne mehanizme poticanja rasta biljaka spadaju fiksacija dušika, koji je potreban biljkama za njihove metaboličke procese te proizvodnja određenih enzima i fitohormona. Indirektan utjecaj bakterija na rast biljaka uključuje inhibiciju negativnog djelovanja biljnih patogena. Koristeći znanje o pojedinim interakcijama, bakterijske kulture se mogu inokulirati u tlo i na taj način pozitivno utjecati na rast i razvoj uzgajanih kultura te se može smanjiti unos kemijskih pripravaka reducirajući tako štetu na okoliš, tlo i podzemne vode (Saharan i Nehra, 2011). Kako je ranije rečeno, većina istraživanja se odnosi na utjecaj bakterija rizosfere s matičnim biljkama. Međutim, tlo kao veliki izvor mikroorganizama omogućuje nam da izoliramo i promatramo odnose biljaka i bakterija izoliranih iz drugih dijelova pedosfere.

1.1. INTERAKCIJE IZMEĐU BILJAKA I BAKTERIJA RIZOSFERE

Interakcije bakterija rizosfere i biljaka promatraju se s obzirom na položaj bakterije u odnosu na korijen pa se tako bakterije mogu nalaziti u unutrašnjosti korijena, u međustaničnim prostorima ili samim stanicama korijenja, gdje imaju savršene uvjete za djelovanje na rast biljaka. Takva vrsta odnosa se zove endosimbiotski odnos. Također, bakterije mogu biti i izvan, na površini korijenja te ostvarivati takozvani asocijativni odnos ili biti raspršene u području rizosfere (Slika 1.) (Souza i sur., 2015). U kojem god položaju one bile, na rast biljke djeluju uvijek na jedan od tri načina: pozitivno (potiču rast biljke), negativno (inhibiraju rast biljke) i neutralno (Glick, 2012). U većini slučajeva rizosferu nastanjuju bakterije koje nemaju vidljivi utjecaj na rast i razvoj biljaka. Rizobakterije koje inhibiraju rast biljaka djeluju različitim mehanizmima negativno na fiziologiju biljaka te se jednom riječju nazivaju fitopatogeni. Oni mogu uzrokovati bolesti u biljaka te proizvoditi fitotoksične tvari kao što su etilen i vodikov cijanid (Glick, 2012). Za pozitivan utjecaj rizobakterija na rast biljaka zaslužni su direktni i indirektni mehanizmi koji uključuju fiksaciju dušika, proizvodnju biljnih hormona, inhibiciju djelovanja ranije spomenutih biljnih patogena i dr.



Slika 1. Interakcije između korijenja i bakterija rizosfere (Glick, 2012)

1.2. MEHANIZMI POTICANJA RASTA BILJAKA

Ne postoji jedan mehanizam za koji možemo reći da je zaslužan za bolji rast biljaka već je to skup mehanizama koji ponekad djeluju i u kombinaciji. Dijelimo ih na direktne mehanizme i indirektne mehanizme.

1.2.1. DIREKTNI MEHANIZMI

1.2.1.1. BIOLOŠKA FIKSACIJA DUŠIKA

Kako bi proizvodile aminokiseline, proteine i druge tvari, biljkama je potreban dušik kojeg mogu primiti samo u mineralnom obliku i to kao NH_4^+ i NO_3^-. U tlu se dušik nalazi u organskoj tvari, u humusu, iako je većina dušika prisutna u atmosferi u molekularnom obliku (N_2). Pošto biljke ne mogu fiksirati atmosferski dušik, ulogu fiksatora preuzimaju bakterije, koje inertni atmosferski dušik prevode u oblike dostupne drugim mikroorganizmima i višim biljkama. Organizmi koji imaju sposobnost fiksacije dušika jednim imenom se nazivaju diazotrofi te svi posjeduju enzim nitrogenazu (metaloprotein) koji djeluje kao katalizator redukcije dušika (Kapilan i Thavaranjit, 2015). Inhibitor enzima nitrogenaze, pomoću kojega se održava ravnoteža, je kisik. Jedan od primjera endosimbioze diazotrofa su bakterije porodice Rhizobiaceae i mahunarki (leguminoze). Bakterije inficiraju korijen leguminoze te na području korijenovih dlačica stvaraju nodule, unutar kojih si stvaraju okolinu za razmnožavanje i mogućnost obavljanja mehanizama kao što su fiksacija atmosferskog dušika. Osim Rhizobiaceae postoje mnoge bakterije koje se koriste u poljoprivredi kao fiksatori dušika, što uvelike smanjuje korištenje dušičnih gnojiva. U neke od njih spadaju i *Bradyrhizobium sp* , koje su zaslužne za poboljšan rast soje (*Glycine max* L), zatim *Herbaspirillum sp* koje vežemo uz rižu (*Oryza sativa* L.), kukuruz (*Zea mays* L.) i ostale žitarice (Souza i sur., 2015). Nesimbiotske bakterije koje imaju sposobnost fiksacije dušika spadaju u rodove *Azoarcus , Azospirillum, Burkholderia, Gluconacetobacter* i *Pseudomonas* (Jorquera i sur., 2010). Smatra se da je mehanizam fiksacije dušika efikasniji kod endosimbiotskih bakterija za razliku od slobodnih bakterija ili asocijativnih bakterija.

1.2.1.2. POVEĆAVANJE DOSTUPNOSTI FOSFORA POTREBNOG ZA RAST BILJAKA

Fosfor je esencijalni nutrijent potreban za rast biljaka, koje ga apsorbiraju u obliku iona ortofosfatne kiseline ($H_2PO_4^-$ i HPO_4^{2-}) ili fosfatnu kiselinu (H_3PO_4). Iako je koncentracija samog fosfora u tlu velika (400-1200 $mgkg^{-1}$), mala količina je dostupna biljkama u adekvatnom obliku. U samom tlu, fosfor se pojavljuje u organskoj tvari i mineralima, kao što je npr. apatit. U kiselim tlima netopivi fosfor je vezan u aluminijskim i željeznim mineralima, dok je u lužnatim tlima vezan u obliku kalcijevih fosfata, kao što su apatit ($Ca_{10}(PO_4)_6$(OH, F, Cl, $Br)_2$), hidroksiapatit ($Ca_5(PO_4)_3(OH)$), monokalcij-fosfat($Ca(H_2PO_4)_2$), dikalcij-fosfat($CaHPO_4$), kalcij-ortofosfat ($Ca_3(PO_4)_2$) i dr. Za povećavanje dostupnosti fosfora biljkama zaslužne su bakterije, koje posjeduju sposobnost otapanja anorganskog fosfora u mineralima, sinetiziranjem kiselina kao što su glukonska i limunska. Mineralizacija organskog fosfora je još jedan od procesa koji se odvija u korist nastajanja biljkama dostupnog fosfora. Bakterije koje obavljaju mineralizaciju, pomažu sintezu fosfata te kataliziranje reakcije hidrolize fosfornih estera (Glick, 2012). Dokazano je da vrste roda *Rhizobium* i *Pseudomonas* pospješuju apsorpciju fosfata kod pšenice (*Triticum aestivum* L.) (Afzal i sur., 2014).

1.2.1.3. BAKTERIJSKA PROIZVODNJA BILJNIH HORMONA

Biljni hormoni su organske molekule koje imaju sposobnost već u malim količinama utjecati na rast biljaka, djelujući na fiziološke i biokemijske mehanizme. Neke bakterije sintezom hormona mogu poticati rast biljaka. Kada govorimo o biljnim hormonima koji pomažu rast biljke spominjemo auksine (indoloctena kiselina ili IAA), gibereline i citokinine. Također, neke bakterije imaju sposobnost regulacije etilena u biljkama. IAA, biljni hormon koji je najviše istraživan kod rizobakterija, sintetizira se iz triptofana različitim putovima. Najčešći organizmi koji sintetiziraju IAA su biljni patogeni te je sinteza IAA povezana sa uzrokovanjem biljnih tumora. Inokulanti koji sintetiziraju IAA se na taj način koriste za povećavanje biomase korijenja, zatim modifikaciju korijenske arhitekture te spadaju u rodove *Azospirillum, Aeromonas, Azobacter* i *Pseudomonas* (Jorquera i sur., 2010). Zabilježeno je da *Bacillus licheniformis* i *Azotobacter chroococcum* zajedno uzrokuju povećanu proizvodnju

IAA kod pšenice pozitivnije u slučaju kada se pojavljuju u kombinaciji, nego kada se inokuliraju same (Radan, 2011).

Jedan od jednostavnijih biljnih hormona je etilen, koji posjeduje širok raspon utjecaja na biljni rast. Neki od tih utjecaja su stimuliranje klijanja sjemenja, rasta korijenja, cvjetanja te zrenja voća. O tome kakav će točno utjecaj etilen imati na biljku odlučuje koncentracija u kojoj je prisutan u tkivima korijenja. Etilen može biti štetan za biljku ukoliko je prisutan u visokim koncentracijama, pa tako može izazvati defolijaciju i različite stanične procese koji inhibiraju rast korijenja. Pod stresnim uvjetima kao što su suša, poplave, infekcije biljnim patogenima ili u prisutnost teških metala u tlu, biljke sintetiziraju spoj 1-aminociklopropan-1-karboksilat ili ACC i otpuštaju u tlo. ACC je prekursor etilena te ga biljka ima sposobnost ponovno apsorbirati iz rizosfere u korijen gdje nastaje etilen (Glick, 2012). Takav etilen se naziva i stres etilen te njegova povećana koncentracija u korijenu dovodi do inhibicije rasta korijena te smanjene sposobnosti apsorbiranja nutrijenata i vode, što daje dodatni stres biljci. Međutim, u rizosferi postoje bakterije koje imaju sposobnost razlaganja ACC-a te na taj način reguliraju etilenom uzrokovan stres i potiču rast biljaka. Bakterije rodova *Azospirillum, Enterobacter, Pseudomonas* i *Rhizobium* imaju sposobnost sinteze ACC deaminaze, enzima koji razlaže ACC na ketobutirat i amonijak te samim time biljke u čijoj rizosferi su prisutne, postaju otpornije na okolišni stres (Jorquera i sur., 2010).

1.2.2. INDIREKTNI MEHANIZMI

1.2.2.1. BAKTERIJSKA PROIZVODNJA ANTIBIOTIKA

Kao indirektni mehanizam poticanja rasta biljaka, bakterijska proizvodnja antibiotika predstavlja biokontrolu različitih biljnih bolesti. Biljni patogeni mogu imati veliki utjecaj na kvalitetu i prinos usjeva te se većinom eliminiraju pomoću različitih kemijskih pripravaka. Bakterije rizosfere koje imaju sposobnost proizvodnje antibiotika ekološki su prihvatljivije rješenje za biljne patogene pa se sve više istražuju. Antibiotici su heterogene organske molekule koje su od velike važnosti. Velik je broj različitih tipova antibiotika od kojih neki mogu imati i više djelovanja, antifungalno, antibakterijsko i dr. Jedan od takvih primjera je 2,4-DPG (2,4-diacetil fluoroglucinol) koji inhibira rast patogena koji napada pšenicu, gljivicu

Gaeumannomyces graminis var. *Tritici*. Bakterijska vrsta kod koje je zabilježena produkcija 2,4-DPG-a je *Pseudomonas fluorescens* (Jorquera i sur., 2010).

1.2.2.2. BAKTERIJSKA PROIZVODNJA HCN-a

HCN ili cijanid spada u sekundarne metabolite te nastaje iz glicina uz pomoć HCN-sintetaze. Spoj ima sposobnost inhibicije razvoja i razmnožavanja mikroorganizama te također na taj način indirektno utječe na razvoj i rast biljaka. Različita istraživanja su dokazala da neke bakterijske vrste mogu proizvoditi HCN *in vitro*, također da sam spoj ima zaštitnu ulogu u slučaju bolesti ali da može i negativno djelovati na biljke inhibirajući pojedine fiziološke procese (Jorquera i sur., 2010).

1.2.2.3. PROIZVODNJA SIDEROFORA

Željezo spada u esencijalne mikronutrijente za rast i razvoj biljaka jer o njemu ovise fiziološki procesi kao što su fotosinteza, respiracija i biosinteza klorofila. Najviše dostupnog željeza ima u poplavljenim tlima, koja su anaerobna i kisela, gdje se nalazi u Fe^{2+} obliku te u tim količinama može biti i toksičan. U dobro aeriranim tlima, nalazi se u obliku oksihidroksidnih polimera, teško dostupan biljkama. Siderofori su molekule koje proizvode bakterije nastanjene u rizosferi biljaka (Jorquera i sur., 2010). Same molekule indirektno djeluju na rast i razvoj biljaka tako što na sebe vežu željezo iz okoline, s obzirom na svoj veliki afinitet prema istom. Bakterije koje proizvode siderofore kompetiraju za željezne ione s drugim, patogenim bakterijama te tako onemogućavaju njihovo razmnožavanje. Iako biljke koriste neke vlastite mehanizme za dobivanje željeznih iona, siderofori također mogu koristiti kao izvori željeza, iako u mnogo manjim količinama (Glick, 2012).

1.3. INOKULACIJA TLA MIKROORGANIZMIMA

Kao što je prije spomenuto, najveća količina bakterija koje potiču rast biljaka, nalazi se u zoni korijenja ili rizosferi. Zrelo korijenje je kolonizirano sa čak 10^8-10^9 bakterijskih stanica g^{-1}. Odnos određene vrste biljke i bakterije u zoni korijenja je vrlo važan te kako bi inokulanti mogli preživjeti uvjete u zoni korijenja, biljke moraju lučiti određene spojeve koji bakterijama služe kao metaboliti. Među takve spojeve spadaju kisik, različiti ioni, primarni i sekundarni metaboliti koji sadrže ugljik te drugi. Neke tvari, izlučene u zoni korijena mogu poslužiti kao inhibitori rasta određene vrste mikroorganizama dok na druge organizme mogu utjecati pozitivno, potičući rast i razmnožavanje (Souza i sur., 2015). Tako je zabilježeno da neke endofitske bakterije imaju sposobnost izazivanja stresa u biljke kako bi kontrolirale brojnost neke druge bakterijske vrste u zoni korijena koje utječu na njih same. Za održavanje bakterijskih kultura koje su nam zanimljive i od koristi, tlo mora biti određene kvalitete. Ta kvaliteta se mjeri tako da se u obzir uzimaju pH, tla, količina organske i anorganske tvari te raznolikost bakterijskih populacija i ostalih mikroorganizama (Souza i sur., 2015). Tlo je nastanjeno sa velikom količinom bakterijskih kultura. Jedan od razloga je prisutnost mikrostaništa i makrostaništa u koja spadaju prostori između čvrste komponente tla. Naime, ono je izgrađeno od organske i anorganske komponente te zračnih prostora koji također mogu biti ispunjeni vodom. Iz tih razloga, jedan od glavnih pokazatelja kvalitete tla je pregled vrsta mikroorganizama, koji nam svojom prisutnošću mogu opisati kakve su osobine tih mikro i makrostaništa.

Kada govorimo o inokulaciji bakterija koje potiču rast biljaka, u stvarnoj primjeni kultura na neke poljoprivredne usjeve, možemo naići na brojne izazove. Jedan od takvih izazova je pokušaj uspostavljanja stabilne gustoće populacije, koja će imati nekakav efekt na rast biljaka. Problem se javlja kod pronalaska ispravne gustoće inokulanta kod kojeg bi se vidio efekt i s kojim bi se mogla definirati korelacija sa rastom biljaka. Također, problem koji slijedi je nepoznavanje utjecaja već nastanjenih bakterija u rizosferi na inokulant. Kako bi se riješio taj problem, određena količina inokulanta se periodično ponovno dodaje. Načini inokulacije su različiti pa se tako odabrane kulture mogu dodavati sa supstratima kao što su kalcificirana glina. Takvi supstrati se u poljoprivredi pomoću nosača transportiraju na tlo te se moraju promiješati s istim. Također, bakterijske kulture koje potiču rast biljaka mogu se dodavati i u sustav irigacije, što je mnogo jednostavnije i jeftinije. Cijena održavanja i uzgoja mikroorganizama koji se koriste u poljoprivredi kao inokulanti je velika. Najzahvalniji

organizmi za skladištenje, koji mogu preživjeti različite uvjete te opstati u skladištu dug period su gram pozitivne bakterije koje proizvode spore (Souza i sur., 2015).

1.4. ZNAČAJ BIOFILMOVA U RASTU I RAZVOJU BILJAKA

Kao što je ranije spomenuto, na rast biljaka ne mora utjecati jedan od nabrojanih mehanizama već njihova kombinacija, koja ne mora biti produkt jedne vrste. Sinergija bakterijskih vrsta je česta pojava u bakterijskim biofilmovima sastavljenim od različitih bakterijskih vrsta. Takvi biofilmovi se pojavljuju na organskim i anorganskim podlogama te ih možemo definirati kao zajednicu jedne ili više vrsta bakterija, omotane egzopolisaharidima te pričvršćene za podlogu. Biofilmovi koji se nalaze na površini korijenja mogu biti od velike važnosti u kontroli rasta i razvoja biljaka čije korijenje nastanjuju. Novija istraživanja nam pokazuju kako je bolji utjecaj na rast pojedinih biljaka ukoliko se njihova rizosfera nastani kombinacijom više bakterija sastavljenih u biofilmu nego ako pojedinačne bakterije same kompetiraju. Prilikom nastanjivanja rizosfere, najbitnija su početna bakterijska međudjelovanja. Kao organizmi, koji su svojim ekskretima pričvršćeni za podlogu korijena, u biokontroli se uglavnom spominju kao kompetitori koji zauzimaju mjesto biljnim patogenima te na taj način onemogućavaju inicijaciju bolesti (Elias i Banin, 2012). Tako su dokumentirani biofilmovi vrste *Pseudomonas fluorescens,* korišteni na korijenju pšenice, koji sačinjavaju niše u kojima luče antibiotike koji čuvaju rizosferu (Angus i Hirsch, 2013). Bakterije u zajednicama, u biofilmovima, također mogu pozitivno utjecati jedne na druge. Tko su četiri izolata *Microbacterium phyllosphaerae, Shewanella japonica, Dokdonia donghaensis, i Acinetobacter lwoffii,* pokazala pozitivan utjecaj jedni na druge. Zabilježeno je povećanje biomase te otpornost same zajednice u slučaju invazije *Pseudoalteromonas tunicata,* koja proizvodi antibakterijske proteine (Burmølle i sur., 2006). Također, u nekim slučajevima je zabilježena i pozitivna sinergija bakterija i cijanobakterija na biomasu pšenice (Nain i sur., 2010).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog rada su slijedeći:

- odrediti utjecaj bakterijskih vrsta i njihovih kombinacija na rast pšenice, na dva različita tla u sterilnim i nesterilnim uvjetima
- odrediti klijavost pšenice
- odrediti veličinu stabljika pšenice
- odrediti svježu masu, suhu masu i anorgansku tvar pšenice
- odrediti masu organske tvari u pšenici
- odrediti udio anorganske i organske tvari u suhoj masi tvari

3. MARTERIJALI I METODE

Testiran je utjecaj tri vrste bakterija iz tla na rast i biomasu pšenice (*Triticum aestivum*) uzgojene na dva različita tipa tla: crnica i les. Dvije vrste tala uzorkovane su na području šume Haljevo u Osječko-baranjskoj županiji. Netretirane sjemenke pšenice dezinficirane su 6% otopinom Izosana te tretirane bakterijskim kulturama izoliranim iz tla. Nakon pet dana izmjerena je klijavost te su isklijale sjemenke zasađene na dvije vrste tla na kojima su se razvijale po 25 dana. Rađena su dva pokusa gdje su se klice sadile na sterilno tlo i nesterilno tlo. Prvi pokus je trajao od 30. lipnja 2016. do 29. srpnja 2016. (pokus sa autoklaviranim tlom). Drugi pokus je trajao od 7. srpnja do 6. kolovoza2016.

3.1. PRIPREMA SJEMENKI ZA KLIJANJE I NJIHOVA DEZINFEKCIJA

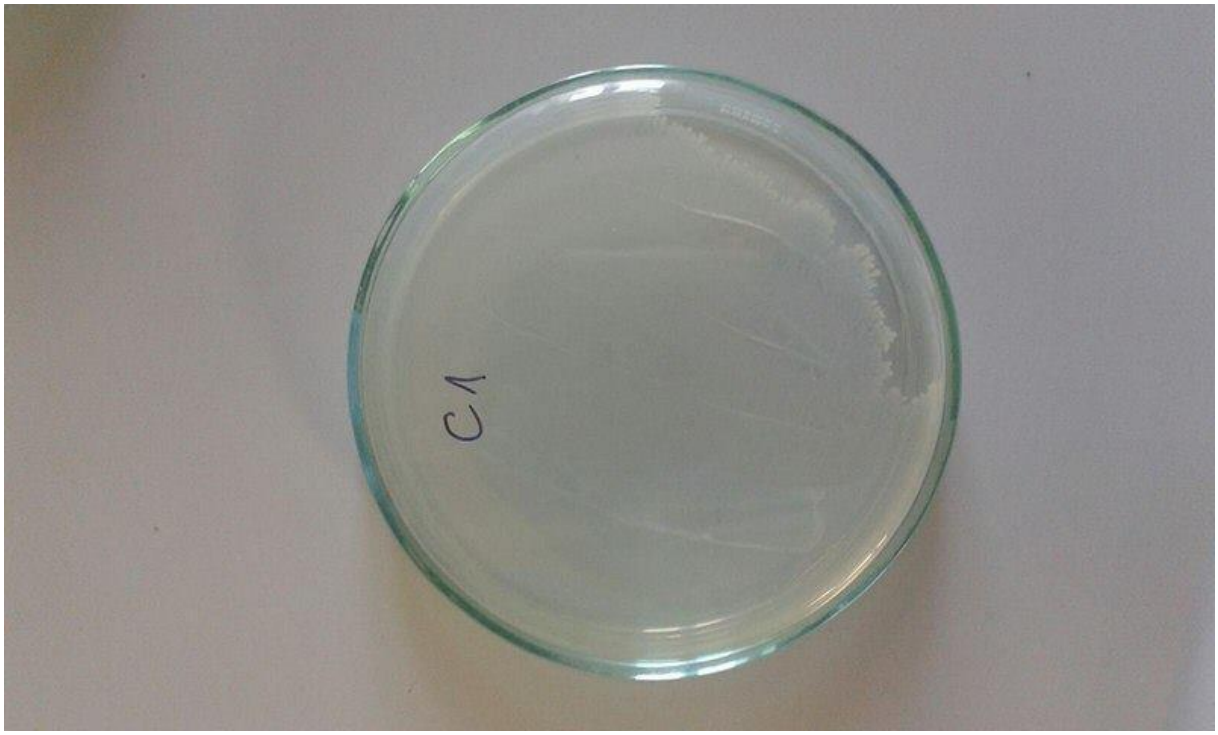
Netretirane sjemenke su dezinficirane pomoću 6%-tne otopine Izosana. Korišten je Plivin Izosan G u obliku granulata (Slika 2.). Šest grama granulata otopljeno je u 100 ml sterilne destilirane vode. Granulat sadržava 100% natrijevog diklorizocijanurat dihidrata. Sjemenke su tretirane otopinom 20 min, te su nakon toga prebačene u sterilnu destiliranu vodu na 5 minuta. Ispiranje vodom je ponovljeno tri puta. Tako dezinficirane sjemenke su se koristile u ostatku eksperimenta.



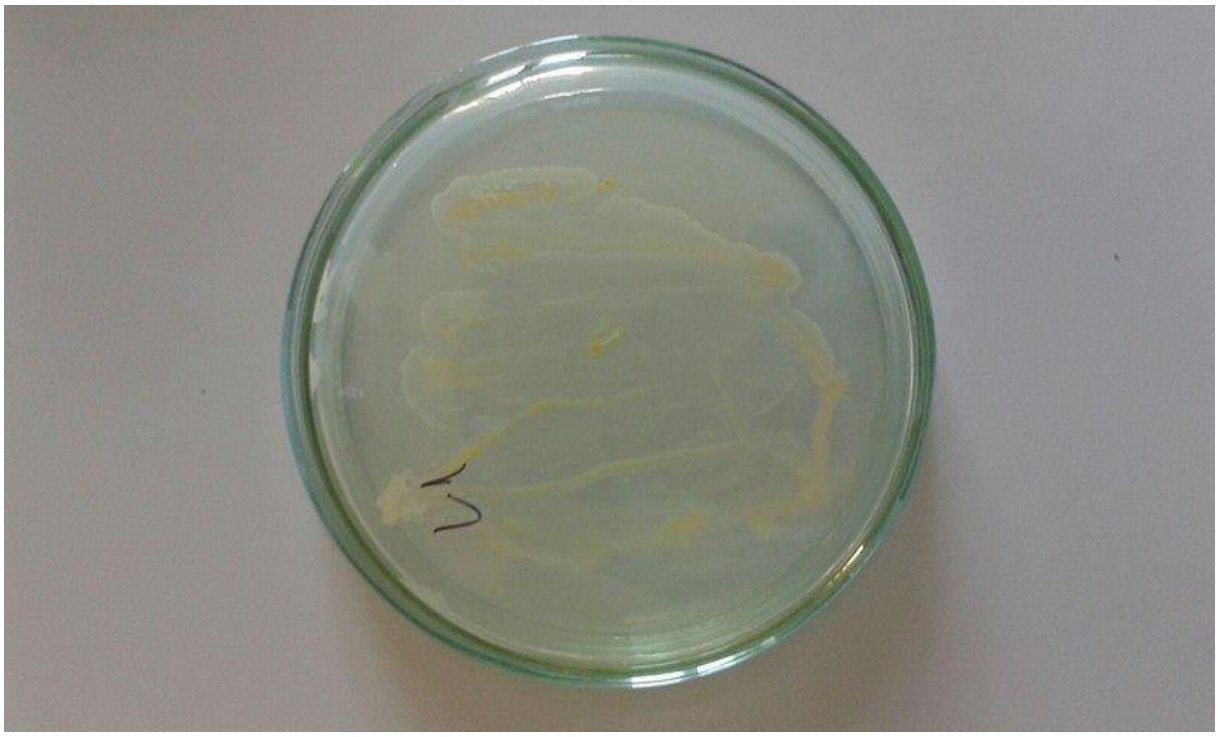
Slika 2. Izosan G u granulama

3.2. IZOLACIJA BAKTERIJSKIH KULTURA IZ TLA

Tri bakterijske kulture su izolirane iz dvije vrste tla. Proces je za obije bio jednak. Odvagan je 1 gram tla te otopljen u 9 ml sterilne vode. Dobivena suspenzija je nasađena na Petrijevu zdjelicu sa hranjivim agarom u razrjeđenjima 10^{-1} , 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}. Petrijeve zdjelice su stavljene na inkubiranje 48 h na 30 ^{o}C. Nakon dva dana razvile su se bakterijske kulture od kojih su odabrane tri nasumično izolirane kulture. Tri kulture su morfološki različite te su dvije izolirane iz lesa a jedna iz crnice. Kultura izolirana iz crnice je nazvana C1 ili A (Slika 3.). Kulture izolirane iz lesa su nazvane L1 ili B (Slika 4.) te L2 ili C (Slika 5.). Kolonije monokultura su prebačene na Petrijeve zdjelice sa hranjivim agarom pomoću eze (Palijan, n.d.). Takve monokulture također su inkubirane 48 h na 30 ^{o}C. Cijeli proces izolacije bakterijskih monokultura je rađen u sterilnim uvjetima u laminaru.



Slika 3. Prikaz kulture C1 uzgojene na hranjivoj površini u Petrijevoj zdjelici



Slika 4. Prikaz L1 kulture uzgojene na hranjivoj površini u Petrijevoj zdjelici



Slika 5. Prikaz L2 kulture uzgojene na hranjivoj površini u Petrijevoj zdjelici

3.3. PRIPREMA BAKTERIJSKE SUSPENZIJE

Nakon razvoja, od čistih kultura je pripremljena suspenzija stanica za tretiranje biljaka. U tri Falkonove epruvete (prethodno sterilizirane) se pripremi 14 ml destilirane sterilne vode u koju se pomoću sterilizirane eze prenosi bakterijska monokultura. Tako se ponovi za svaku od tri monokulture. Kako bi se dobila jednaka koncentracija bakterijskih kultura za tretiranje biljaka pomoću spektrofotometra izmjerena je optička gustoća, na 600 nm. Kao slijepa proba je korištena sterilizirana destilirana voda. Za tretiranje biljaka korištene su suspenzije optičke gustoće 0.94.

3.4. ODREĐIVANJE SUHE TVARI I UDJELA PEPELA U PŠENICI

Peti dan nakon što su sterilizirane sjemenke tretirane bakterijskim kulturama odvojeno je 25% klijanaca iz svakog uzorka. Uzorci su kvantitativno preneseni u lončiće za žarenje, prethodno već izvagane. Izvagana je njihova svježa masa, kako za korijen, tako i za stabljiku. Korištena je analitička vaga. Uzorci su tada preneseni u sušionik, gdje su sušeni preko noći pri 105 ^{o}C, kako bi se dobila suha masa. Potom su uzorci preneseni u eksikator kako bi se ohladili te tako ohlađeni izvagani na analitičkoj vagi. Zadnji postupak uključuje određivanje pepela ili anorganske tvari u uzorku koju dobivamo žarenjem uzoraka na 3h pri 400^{o}C. Tako žareni uzorci se nakon tri sata prenose u eksikator, radi hlađenja prije vaganja analitičkom vagom.

Dvadeset i peti dan nakon što su biljke presađene na dvije vrste tla mjerenja su ponovljena. 15 zasađenih stabljika u svakoj staklenki je pobrano te je izvagano kako bi se dobila svježa masa uzorka. Nakon toga utvrđene su suha masa uzoraka i udio anorganske tvari prema prethodno opisanim postupcima.

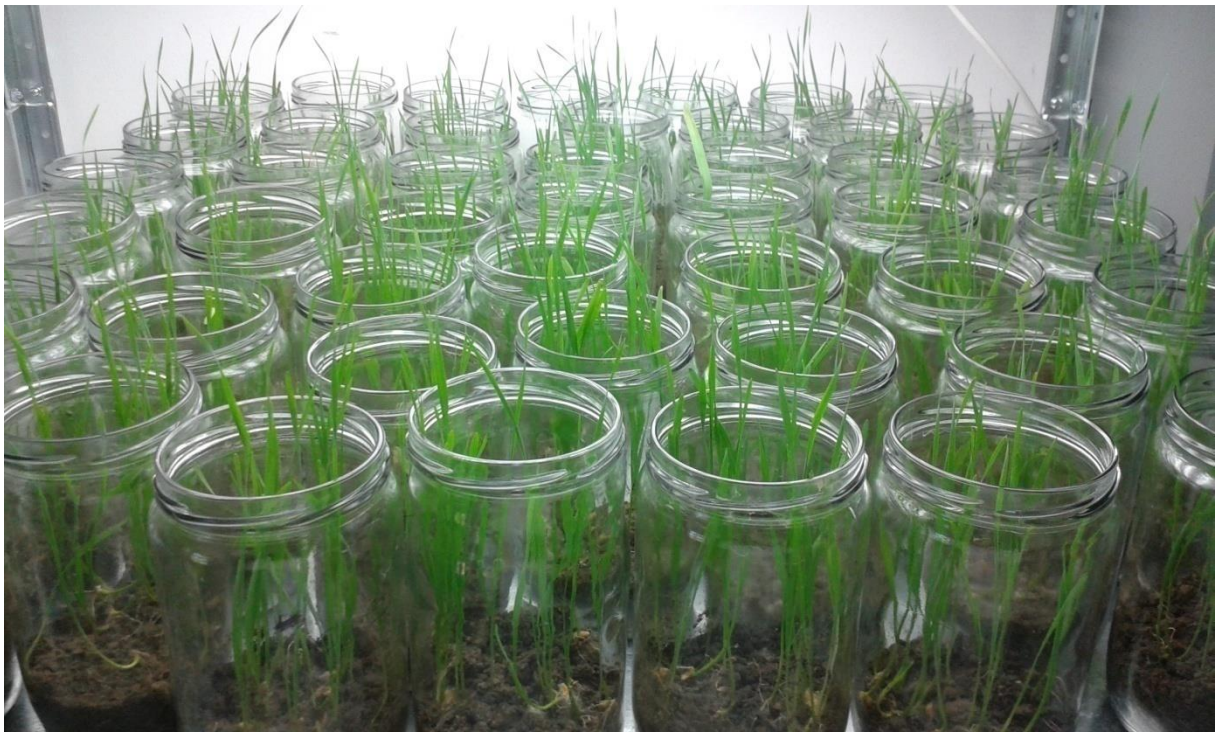
3.5. TRETIRANJE SJEMENKI BAKTERIJSKIM KULTURAMA

Sjemenke su tretiranje sa po 3 ml bakterijskih kultura C1, L1 i L2 u kombinacijama A, B, C, AB, BC, AC, ABC gdje je C1=A, L1=B, L2=C. Suspenzija je na sjemenke nanošena pomoću mikropipete. Sjemenke su tretirane svaki dan suspenzijom bakterija te nisu dodatno zalijevane. Također, postavljena su dva kontrolna uzorka koja su tretirana sterilnom destiliranom vodom: K1 i K2. U jednoj od kontrola (K2) sjemenke nisu dezinficirane Izosanom.

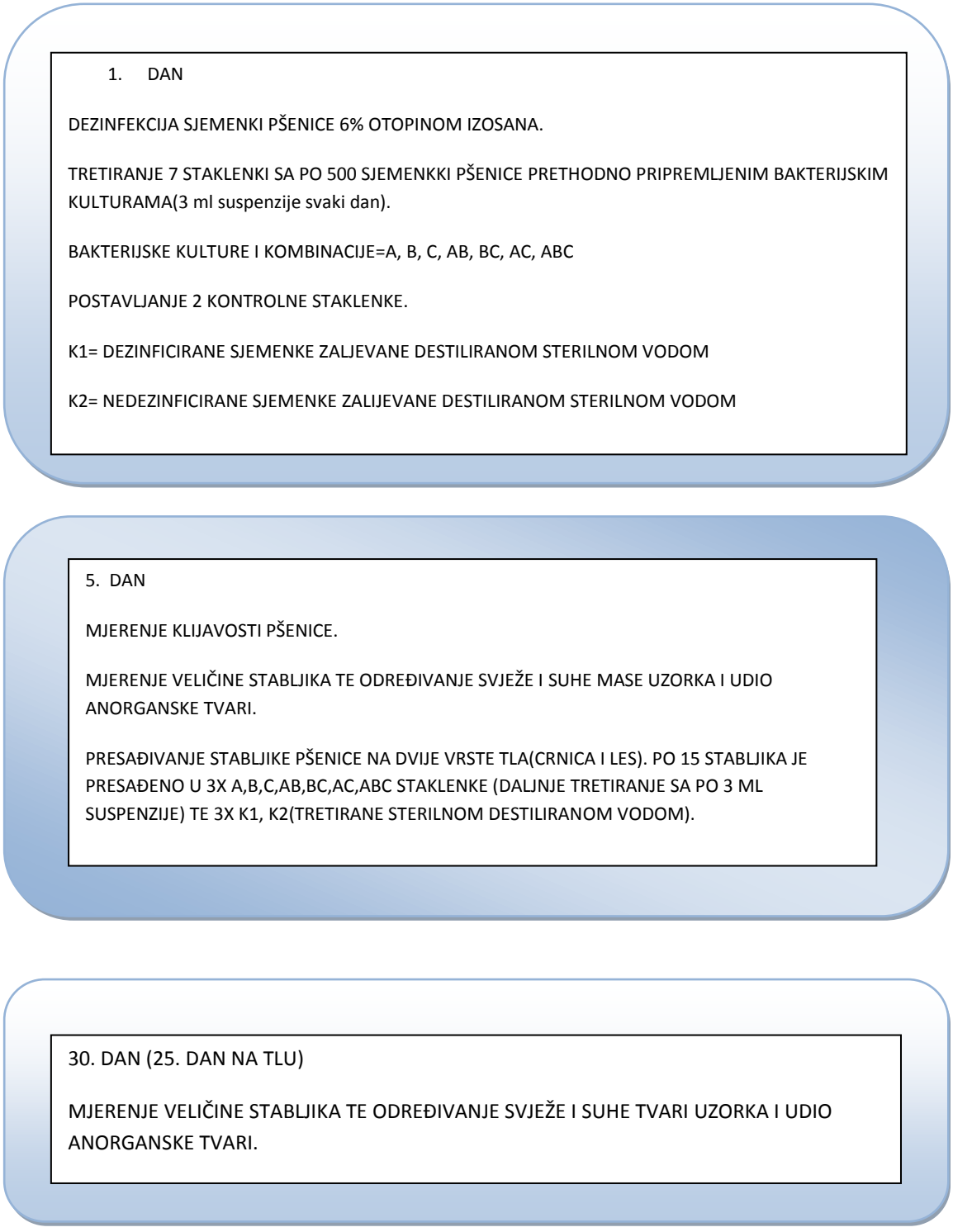
3.6. DIZAJN EKSPERIMENTA

Izvedena su dva eksperimenta u trajanju od sveukupno 30 dana. Netretirane sjemenke su dezinficirane otopinom Izosana te tretirane bakterijskim kulturama na prethodno opisan način. Sjemenke su zalijevane bakterijskom suspenzijom svaki dan. Peti dan klijanja izmjerena je dužina stabljika te klijavost pojedinog uzorka. 25% klica iz svakog uzorka je odvojeno za mjerenje svježe mase te nakon toga prebačeno u ranije žarene i izvagane lončiće za žarenje. Po tome su smješteni u sušionik na 12h pri 105^{o}C. Nakon 12 h izmjerena im je suha masa te su uzorci potom prebačeni u žarnu peć na 3h pri 400 ^{o}C. Po 15 klica iz svake staklenke je zasađeno na dvije vrste tla, koje je prethodno autoklavirano. Staklenke sa zasađenim biljkama prebačene su u fotobioreaktor (Slika 6.) u kojem su sve dobile iste uvjete za rast. Biljke su također ostale dane zalijevane sa po 3 ml suspenzije bakterija. Osamnaesti dan nakon presađivanja na tlo biljke su prebačene iz fotobioreaktora na stol kraj prozora u hodniku fakulteta. 25. dan nakon presađivanja na tlo biljke su pobrane. Izmjerena je dužina 15 stabljika u svim uzorcima te su stabljike odvojene kako bi se mogla vagati svježa i suha masa. Nakon sušenja, stabljike biljke su prenesene u žarnu peć na 400 ^{o}C na tri sata. Svi dobiveni podatci su uspoređeni sa dvije kontrole (Slika 7.)

Isti eksperiment je ponovljen dva puta. U prvom slučaju se koristilo autoklavirano ili sterilno tlo, dok je u drugom slučaju korišteno nesterilno tlo (Nezarat i Gholami, 2009).



Slika 6. Pšenica u fotobioreaktoru nakon 18 dana razvoja



Slika 7. Grafički prikaz eksperimentalnog postupka

Isti postupak je rađen dva puta. Prvi put na autoklaviranom tlu a drugi put na nesterilnom tlu

3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za statističku obradu podataka korištena je ANOVA ili jednosmjerna analiza varijance, koja je pokazala postoji li statistički značajna razlika među uzorcima. Ukoliko je postojala statistički značajna razlika, post hoc LSD testom se odgovorilo na pitanje između kojih je to uzoraka statistički značajna razlika. Razlika je mjerena između K1, K2 te ostalih uzoraka A, B, C, AB, BC, AC i ABC. Kod veličine stabljika je nakon petog dana mjerena veličina od 25% stabljika za svaki tretman, dok je 25 dana nakon rasta na tlu mjereno po 15 stabljika iz svakog tretmana. Za svaki od tretmana je napravljeno tri ponavljanja (n1, n2, n3). Statistički testovi su rađeni za svako ponavljanje posebno te za sva tri ponavljanja. Također, grafički su prikazane svježa masa, suha masa te anorganska tvar. Oduzimanjem suhe mase od anorganske tvari dobivena je masa organske tvari te su izračunati postotni udjeli anorganske i organske tvari u suhoj masi, koji su također grafički prikazani. Podaci su obrađivani u Microsoft Excelu i u R-u.

4. REZULTATI

4.1. PRVI EKSPERIMENT (30. lipnja do 29. srpnja 2016.)

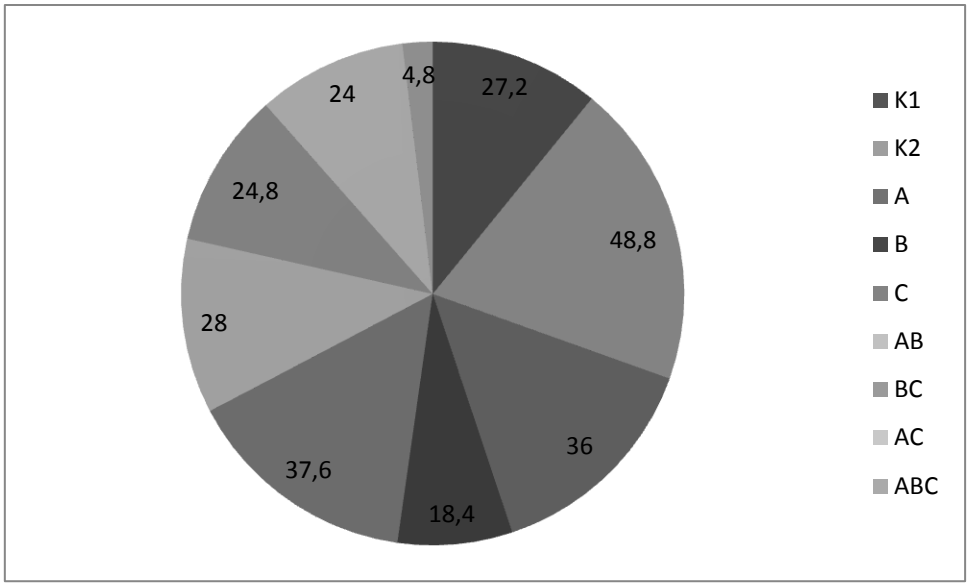
4.1.1. KLIJAVOST SJEMENKI PŠENICE

U prvom eksperimentu na klijanje je stavljeno po 500 sjemenki za svaki uzorak. Od tih 500 sjemenki u svakom uzorku isklijao je manji broj sjemenki. (Tablica 1.) Tretman K1 odnosi se na kontrolu tretiranu sterilnom destiliranom vodom, koja je dezinficirana otopinom Izosana. Tretman K2 se odnosi na kontrolu tretiranu sterilnom destiliranom vodom, koja nije dezinficirana otopinom Izosana. Tretman A predstavlja bakterijsku kulturu C1, tretman B predstavlja bakterijsku kulturu L1 dok tretman C predstavlja bakterijsku kulturu L2. Tretmani AB, BC, AC i ABC predstavljaju njihove kombinacije od kojih AB= C1 + L1, BC= L1 + L2, AC= C1 + L2 i ABC= C1 + L1 + L2.

Tablica 1. Broj isklijalih sjemenki po uzorku($n_{početni}$=500) nakon 5 dana

Tretman	Broj isklijalih sjemenki po staklenci
K1	136
K2	244
A	180
B	92
C	188
AB	140
BC	124
AB	120
ABC	24

Najveći broj klijanaca se nalazi u kontroli 2, tretiranoj samo sa sterilnom destiliranom vodom. Najmanji broj klijanaca se nalazi u uzorku ABC tretiranim C1, L1 i L2 bakterijskim kulturama. Klijavost sjemenki pšenice najbolje možemo izraziti u postotcima što je prikazano na Slici 8.

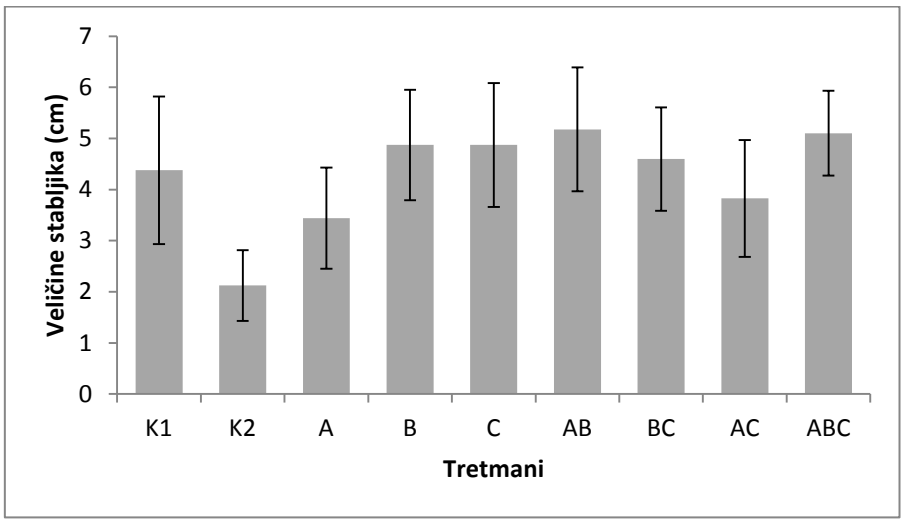


Slika 8. Grafički prikaz klijavosti u prvom eksperimentu (%)

4.1.2. VELIČINA STABLJIKA PŠENICE

4.1.2.1. VELIČINA STABLJIKA PŠENICE NAKON PETOG DANA UZGOJA

Peti dan je izmjerena veličina 25% stabljika u svakom uzorku. Veličine su prikazane na Slici 9.



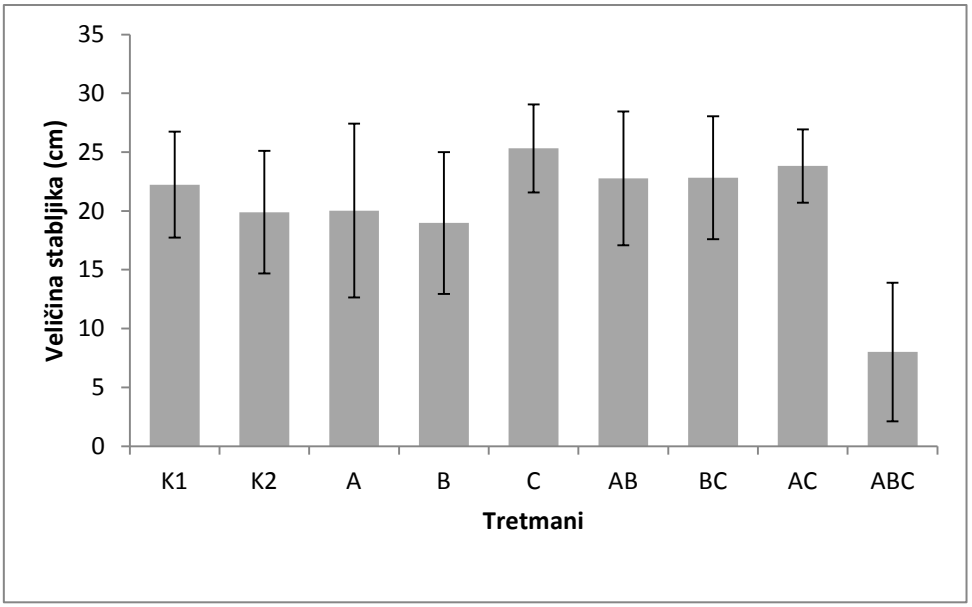
Slika 9. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 5 dana uzgoja

ANOVA testom je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika između mjerenih uzoraka. ANOVA je popraćena LSD post hoc testom koji je ukazao da postoji statistički značajna razlika između K1 ili dezinficirane kontrole i uzoraka tretiranih kulturama B, C, AB, BC i ABC. Također, statistički značajna razlika je vidljiva i između K2 te svih ostalih uzoraka. K2 je značajno manja od K1.

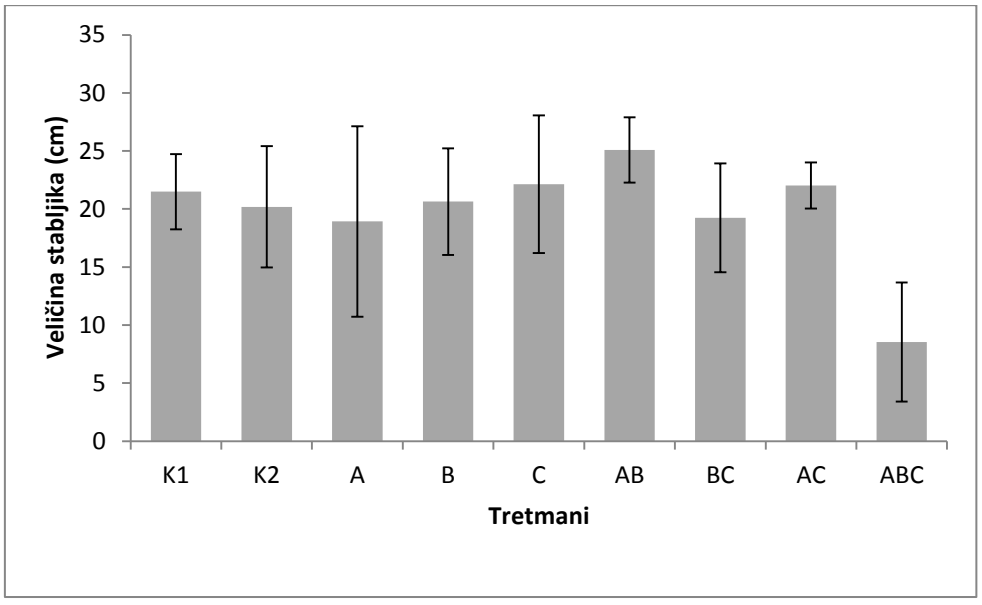
4.1.2.2. VELIČINA STABLJIKA PŠENICE NAKON TRIDESETOG DANA UZGOJA

Statističkom obradom veličine stabljika mjerenih nakon 25 dana rasta na dvije vrste tla možemo zaključiti da postoje statistički značajne razlike između uzoraka u sva tri ponavljanja tretmana na crnici i na lesu. Veličine stabljika nakon 25 dana rasta na crnici su prikazane u Slikama 10., 11. i 12. Iz tri grafa koja pokazuju veličine stabljika uzgajanih 25 dana na crnici možemo zaključiti da kontrola 1 ili kontrola tretirana otopinom Izosana uvijek sadrži veće vrijednosti nego kontrola 2. Također, možemo zaključiti da su najslabije narasle stabljike pšenice iz tretmana sa svim bakterijskim kulturama ili u uzorku ABC.

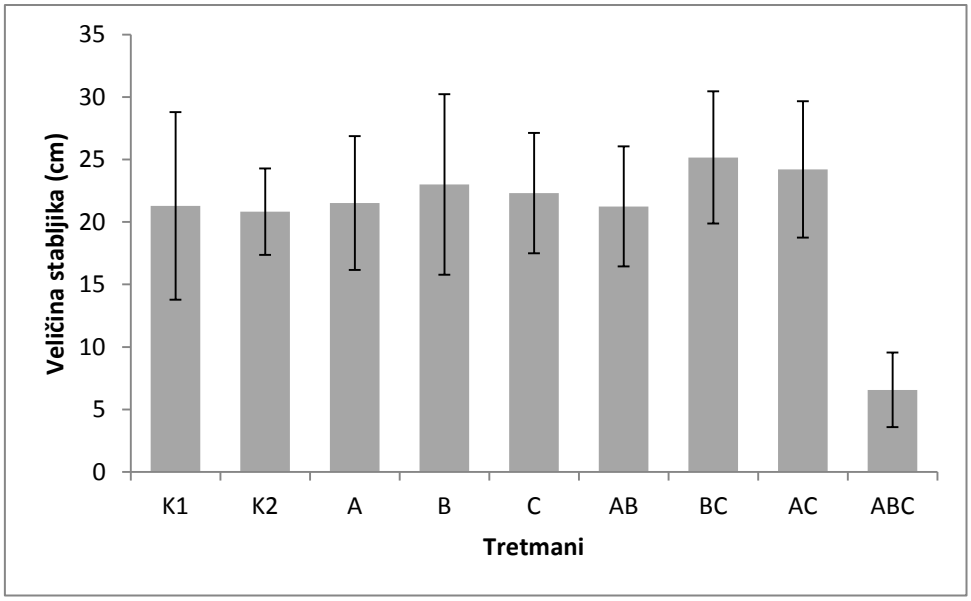
ANOVA je pokazala da postoji statistički značajna razlika između mjerenih uzoraka u sva tri ponavljanja. Također, ANOVA je popraćena LSD post hoc testovima u kojima se vidi statistički značajna razlika između K1 i uzoraka tretiranih kulturama A, B, AB, BC, AC i ABC u prvom mjerenju (n1). Također, vidljiva je statistički značajna razlika između K2 i uzoraka A, B, AC i ABC (Slika 10.) Detektirana je statistički značajna razlika između K1 te AB, ABC u drugom mjerenju (n2), kao i statistički značajna razlika između K2 te AB, ABC (Slika 11.). U trećem (n3) mjerenju LSD testom detektirana je statistički značajna razlika između uzoraka ABC i K1, te statistički značajna razlika između K2 te uzoraka BC i ABC (Slika 12.). U prva dva mjerenja zabilježena je razlika između K1 i AB te u svim mjerenjima razlika između kontrola i ABC gdje je ABC značajno nižih vrijednosti u svim mjerenjima.



Slika 10. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na crnici (n1)

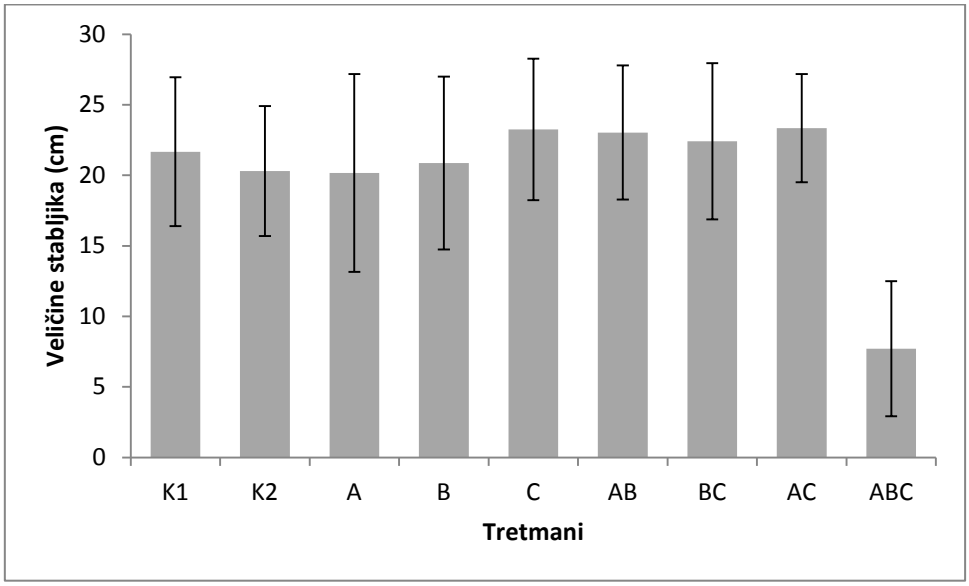


Slika 11. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na crnici (n2)



Slika 12. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na crnici (n3)

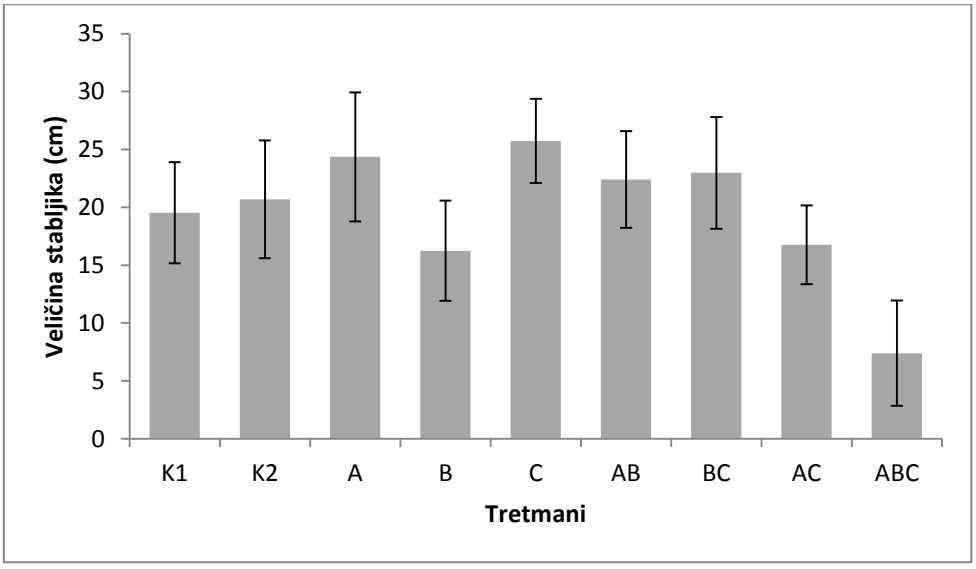
Uzevši u obzir sva tri mjerenja, ANOVA ili analiza varijance je pokazala statistički značajnu razliku među uzorcima. LSD post hoc test je pokazao statistički značajnu razliku između K2 i uzoraka C, AB, AC i ABC te statistički značajnu razliku između K1 i uzorka ABC (Slika 13.).



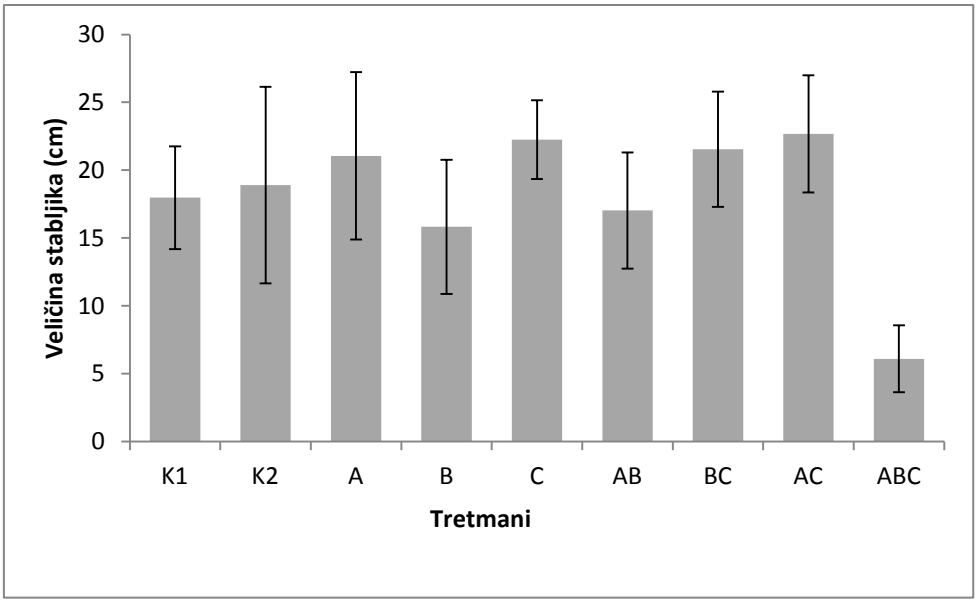
Slika 13. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na crnici (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)

U sva tri ponavljanja eksperimenta na lesu, kada se statistički obrađivala veličina stabljika, ANOVA test je ustvrdio da postoji statistički značajna razlika između uzoraka. LSD post hoc

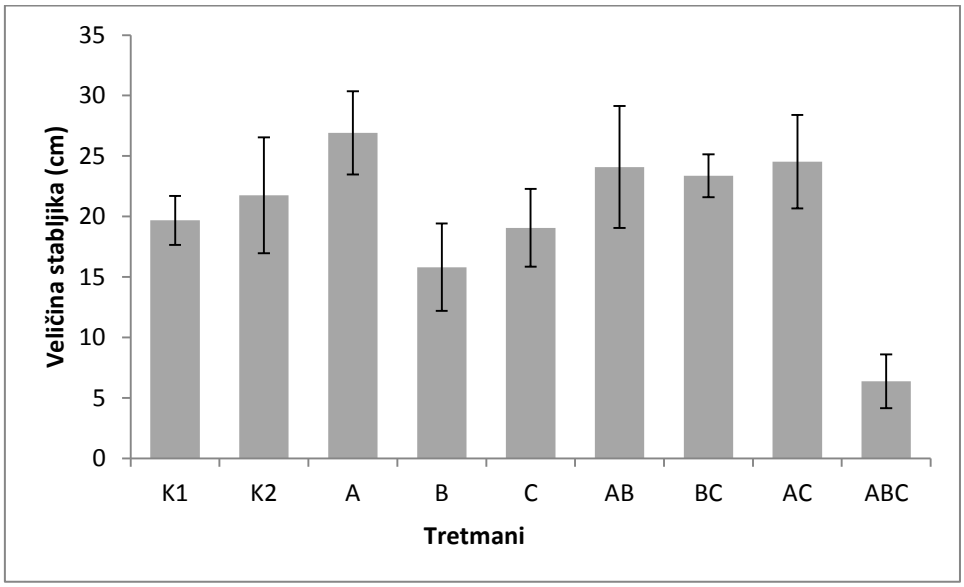
test je pokazao statistički značajnu razliku u prvom mjerenju (n1) između K1 i uzoraka tretiranim kulturama A, B, C, BC i ABC te K2 i A, B, C, AC i ABC (Slika 14.). U drugom mjerenju (n2), statistički značajna razlika je zabilježena između K1 i uzoraka C, BC, AC i ABC te između K2 i uzoraka tretiranih kulturama AC i ABC (Slika 15.). U trećem uzorku (n3), pozitivna statistički značajna razlika zabilježena je između K1 i A, B, AB, BC, AC i ABC te K2 i uzoraka tretiranih kulturama A, B, AC i ABC (Slika 16.). Na mjerenjima veličine stabljika na lesu može se vidjeti da je kontrola 2, koja je netretirana Izosanom već sterilnom destiliranom vodom veća u sva tri mjerenja za razliku od crnice gdje je obratno, a tretman sa sve tri kulture ABC najmanji, kao i kod crnice. U sva tri mjerenja možemo vidjeti da je BC različit od K1, dok je u prva dva mjerenja C različit od K1. Također, AC je različita od K2 u sva tri mjerenja. ABC je značajno različit i od K1 i od K2 u sva tri mjerenja te puno niži od kontrola u istima.



Slika 14. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na lesu (n1)

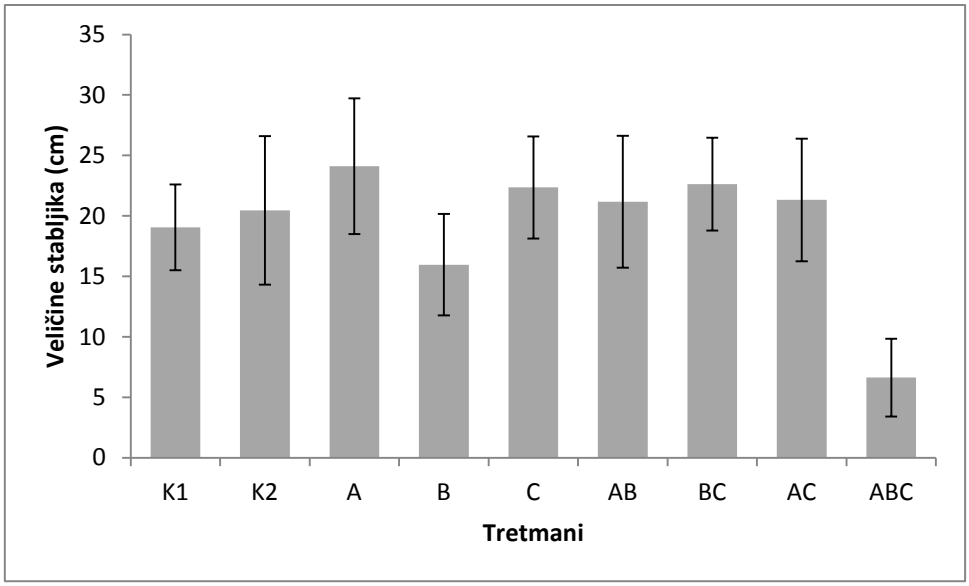


Slika 15. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na lesu (n2)



Slika 16. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na lesu (n3)

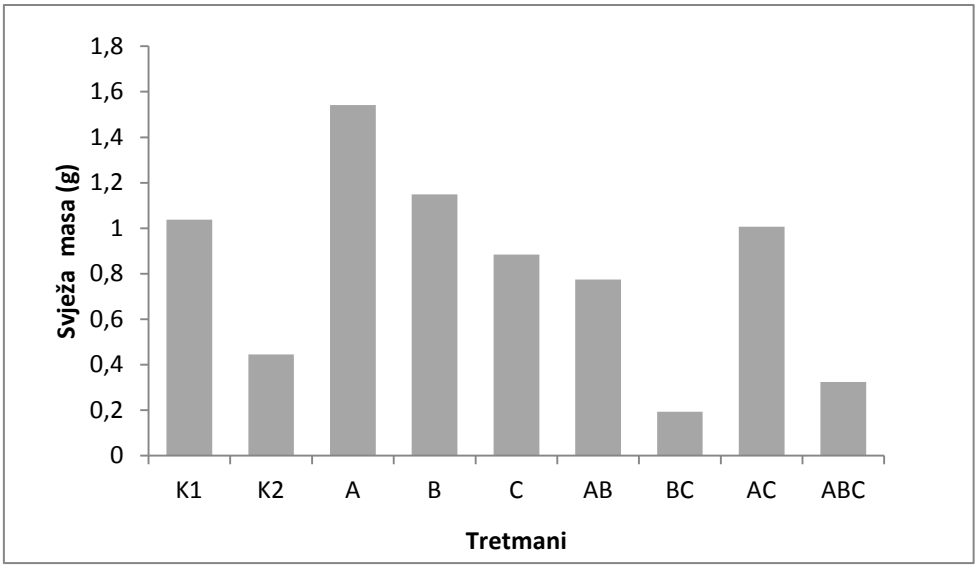
Kada se u obzir uzmu sva tri mjerenja, ANOVA ili analiza varijance detektira statistički značajnu razliku među uzorcima. LSD detektira pozitivnu statistički značajnu razliku između K1 i uzoraka A, B, C, AB, BC, AC i ABC te između K2 i A , B, BC i ABC (Slika 17.).



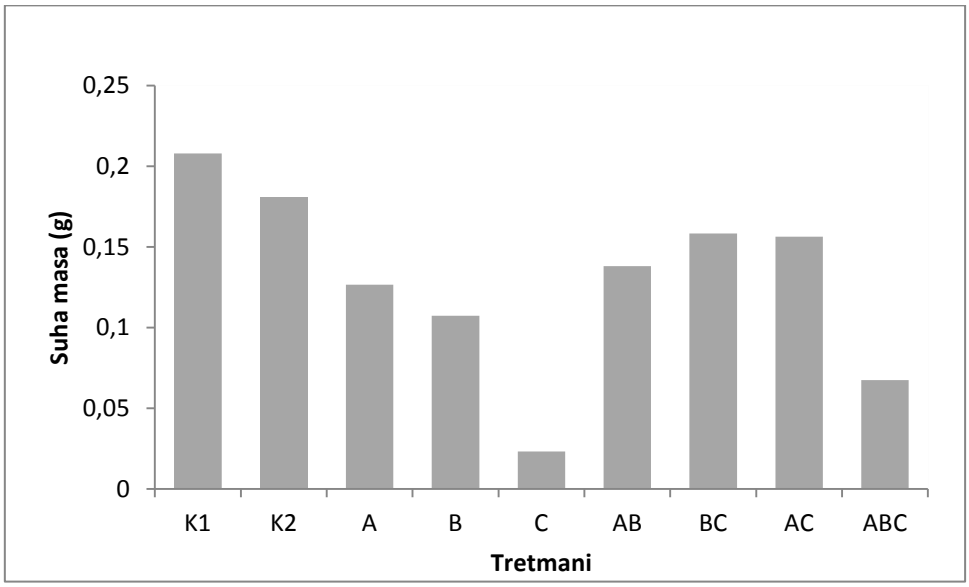
Slika 17. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na lesu (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)

4.1.3. SVJEŽA MASA, SUHA MASA, ORGANSKA I ANORGANSKA TVAR PŠENICE (nakon 5 dana)

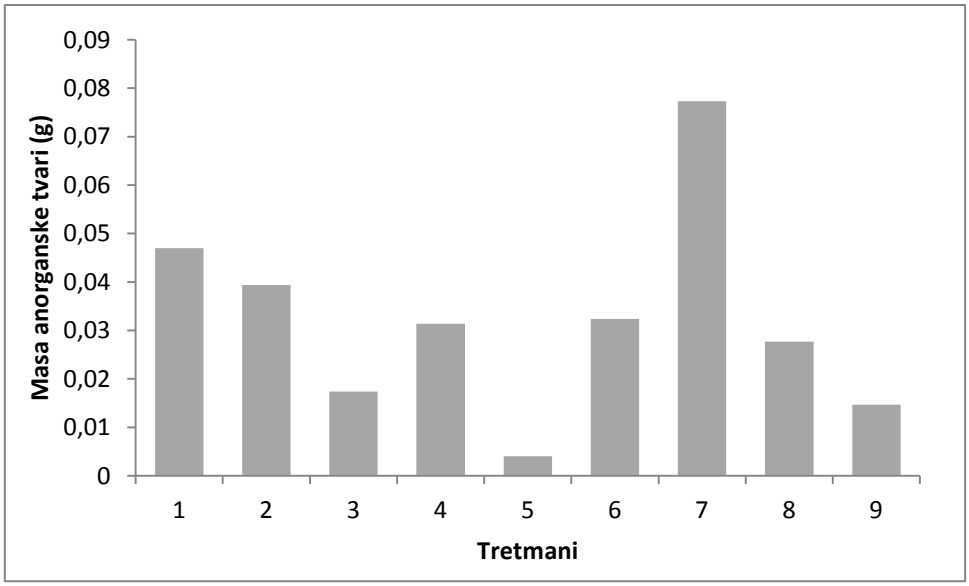
Najmanja masa svježe tvari je u uzorku BC dok je u istom najveći udio pepela. U usporedbi s K1 veće svježe mase imaju uzorak A i B, dok je K2 bliža uzorku ABC. K1 je u svim slučajevima veći od K2. Svježu masu tvari, suhu masu tvari i udio pepela u stabljici, možemo vidjeti na slikama 18., 19. i 20.



Slika 18. Grafički prikaz mase svježih stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 5 dana

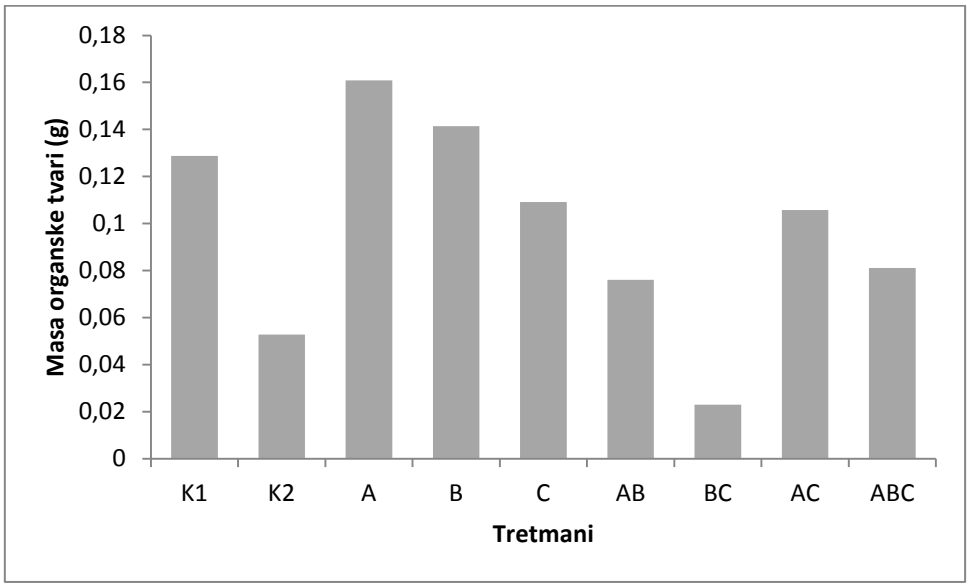


Slika 19. Grafički prikaz mase suhih stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 5 dana



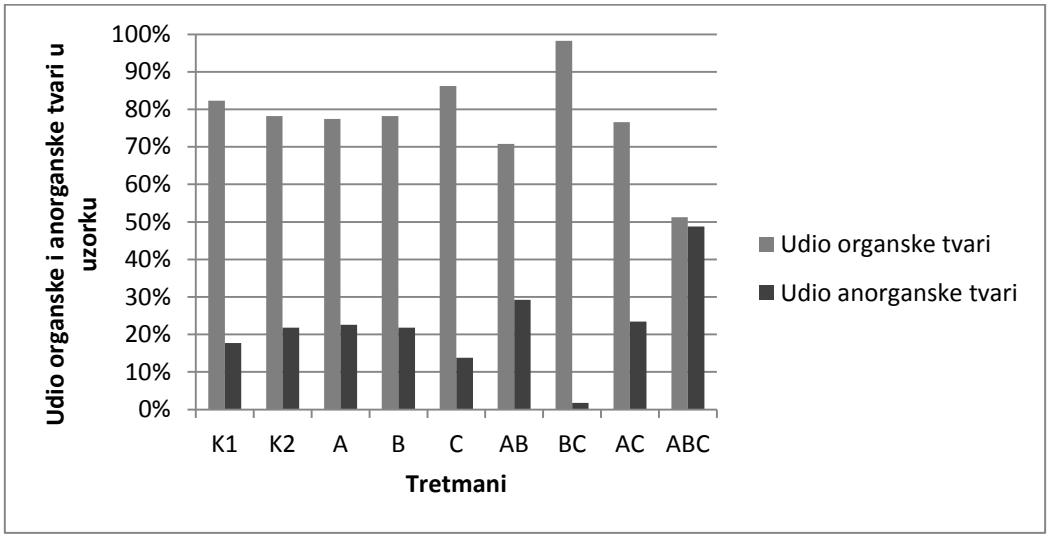
Slika 20. Grafički prikaz mase anorganske tvari stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 5 dana

K1 je znatno veća od K2, što nam govori da je veća količina organske tvari u kontroli tretiranoj Izosanom. Također, visok udio organske tvari pokazuju i tretmani A i B koji su veći od samih kontrola (Slika 21.).



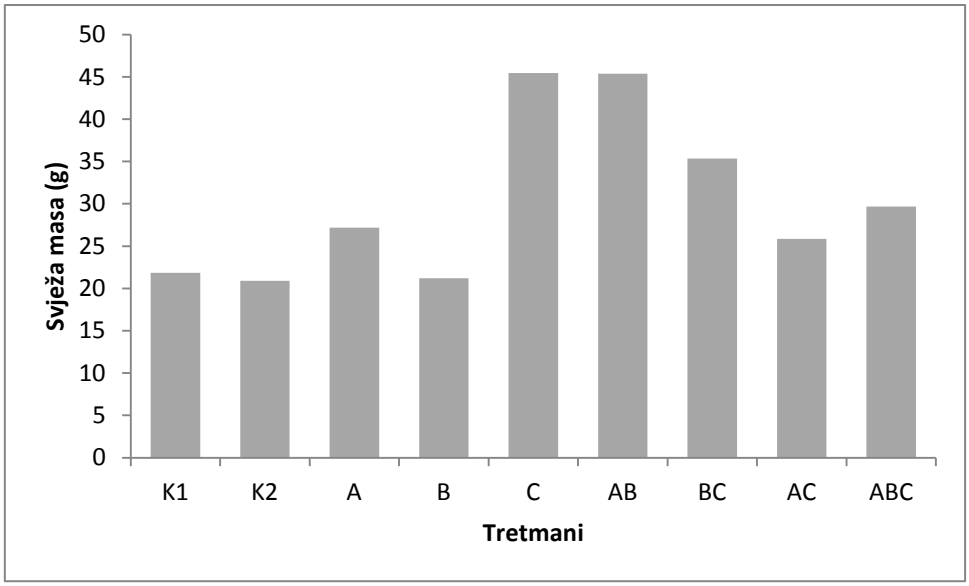
Slika 21. Grafički prikaz mase organske tvari stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 5 dana

Izražavanjem postotnih udjela anorganske i organske tvari vidljivo je da je veći postotak organske tvari u svim tretmanima te je najveći u tretmanu C. Također, udio anorganske tvari ukazuje na to da je najveći udio anorganske tvari u tretmanu ABC koji je tretiran sa sve tri kulture, dok je u tretmanu BC izuzetno mali, od samih 12%. Postotni udjeli anorganske i organske tvari u suhoj masi uzoraka su vidljivi na slici 22.

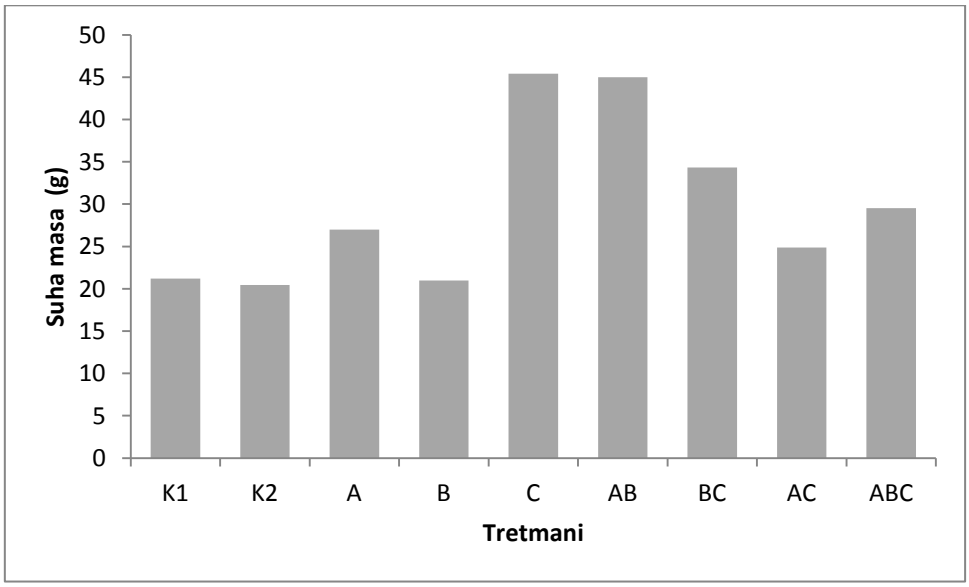


Slika 22. Grafički prikaz postotnog udjela organske i anorganske tvari u suhoj masi stabljike biljaka nakon 5 dana klijanja

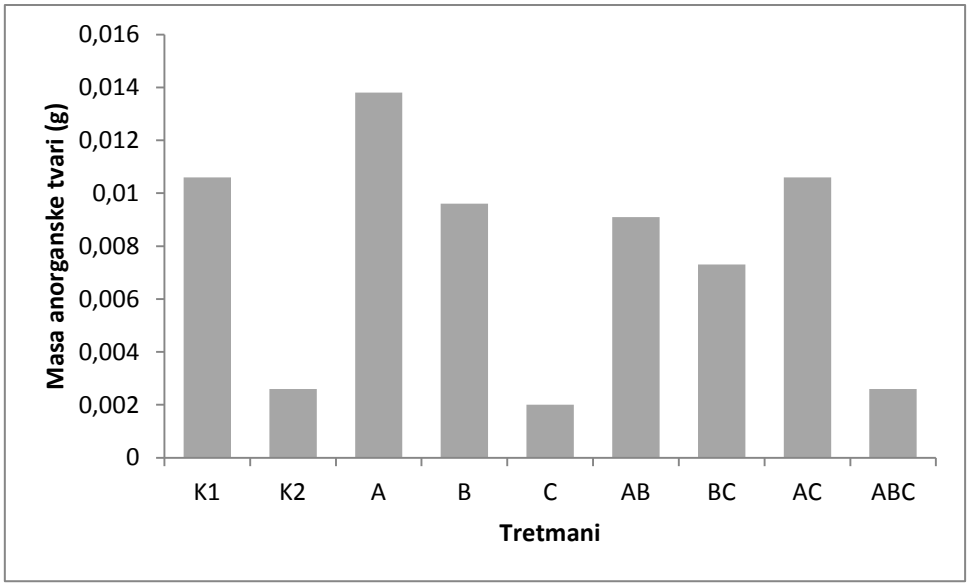
Vidljivo je da dezinficirana kontrola u svim slučajevima ima veću masu od kontrole 2, pogotovo se ta razlika primijeti kod udjela anorganske tvari. Također je vidljivo da tretmani AB i C imaju znatno veću svježu i suhu masu, dok opadaju drastično kod mjerenja udjela anorganske tvari. Svježu masu tvari, suhu masu tvari i udio pepela u korijenju, možemo vidjeti na slikama 23., 24. i 25.



Slika 23. Grafički prikaz mase svježeg korijenja tretiranog bakterijskim kulturama nakon 5 dana

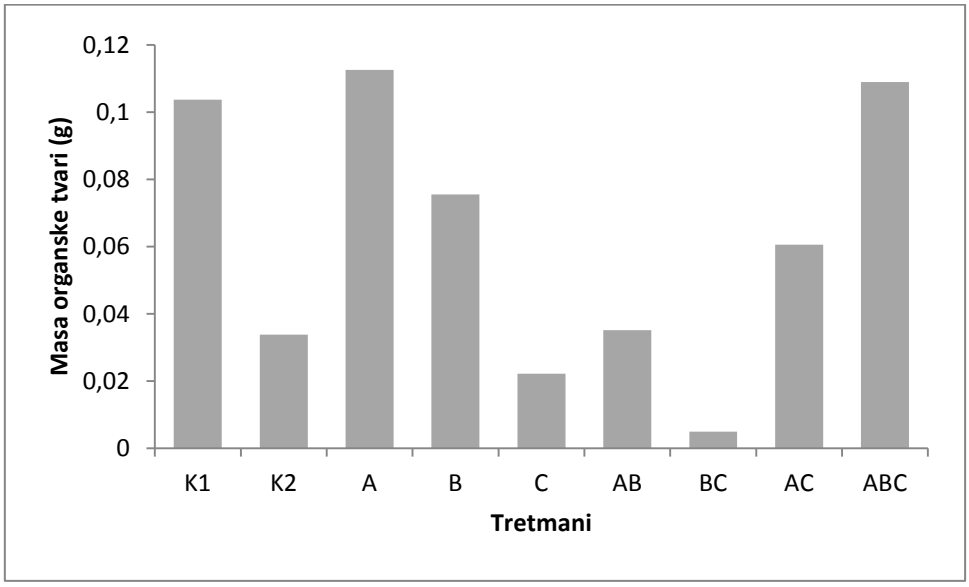


Slika 24. Grafički prikaz mase suhog korijenja tretiranog bakterijskim kulturama nakon 5 dana



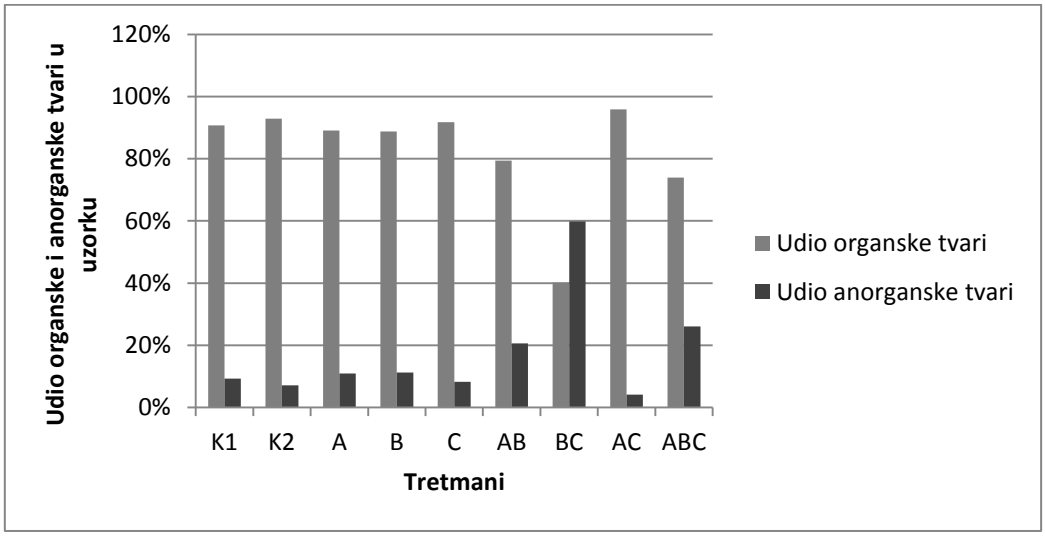
Slika 25. Grafički prikaz mase anorganske tvari korijenja tretiranog bakterijskim kulturama nakon 5 dana

Masa organske tvari korijena biljaka tretiranih nakon 5 dana znatno je veća u kontroli tretiranoj Izosanom, kao i kod mase stabljike. Tretmani A i ABC su se pokazali većim od kontrola, dok je tretman BC znatno manji od ostalih tretmana (Slika 26.).



Slika 26. Grafički prikaz mase organske tvari korijenja tretiranog bakterijskim kulturama nakon 5 dana

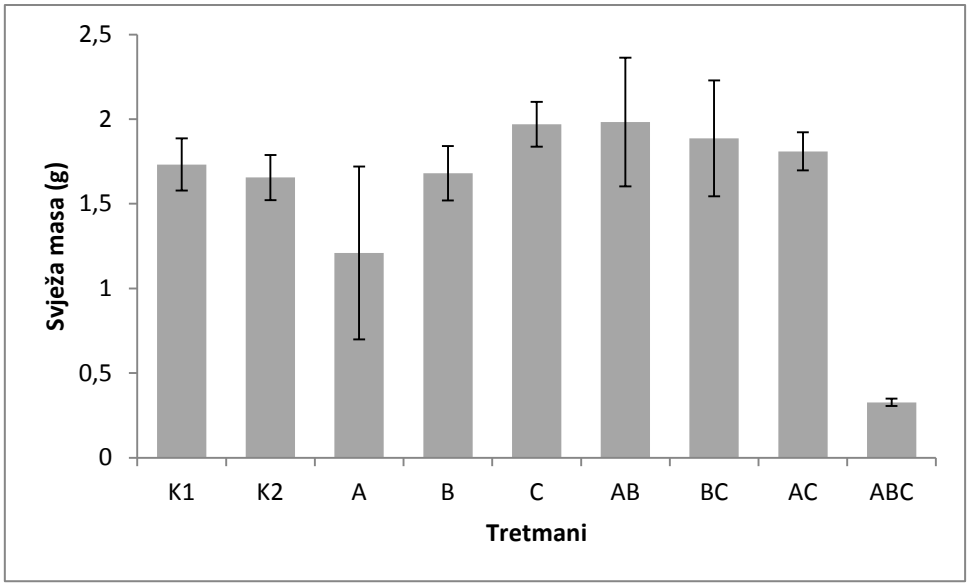
Postotni udio anorganske tvari u suhoj masi korijenja je izražen visokim postotkom u tretmanu BC, dok je najmanji postotak u tretmanu AC, što je u potpunosti različito od postotnog udjela anorganske tvari u stabljikama gdje je BC pokazala najmanji udio. Udio organske tvari u suhoj masi uzorka je visoka u svim tretmanima osim u BC gdje pokazuje značajniji pad (Slika 27.).



Slika 27. Grafički prikaz postotnog udjela organske i anorganske tvari u suhoj masi korijenja biljaka nakon 5 dana klijanja

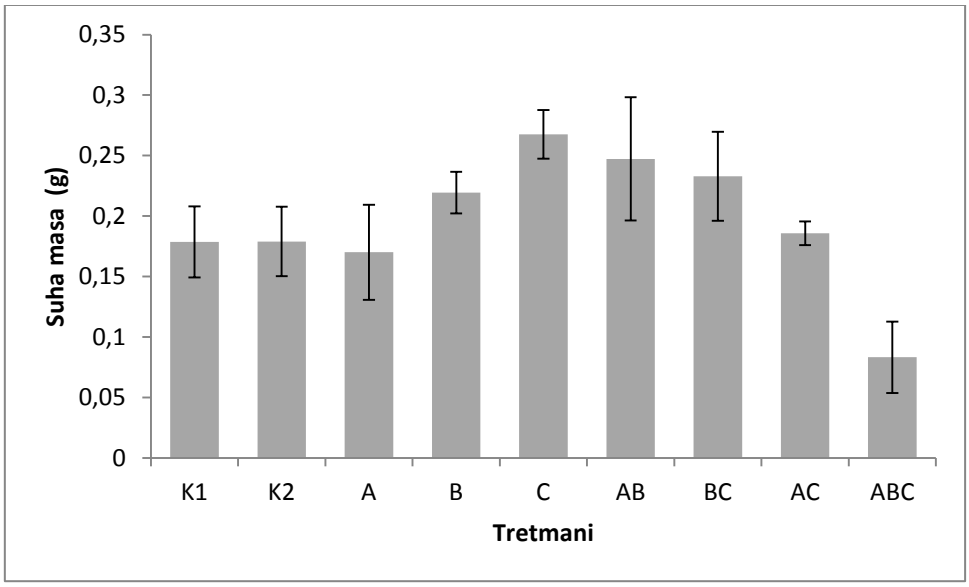
4.1.4. SVJEŽA MASA, SUHA MASA, ORGANSKA I ANORGANSKA TVAR PŠENICE (nakon 25 dana na tlu)

Nakon 25 dana na tlu za oba tla su se mjerile svježa masa, suha masa uzorka, udio anorganske tvari te organska tvar. Kod sva tri mjerenja za svježu masu ANOVA je potvrdila da se vrijednosti tretmana statistički značajno razlikuju. Post hoc LSD test je potvrdio i pojedinačno. Statistički značajna razlika je između K1 i ABC te između K2 i ABC, gdje je ABC značajno manji od ostalih uzoraka. Svježa masa uzoraka za sva tri mjerenja (n1,n2,n3) na crnici prikazana je na Slici 28.



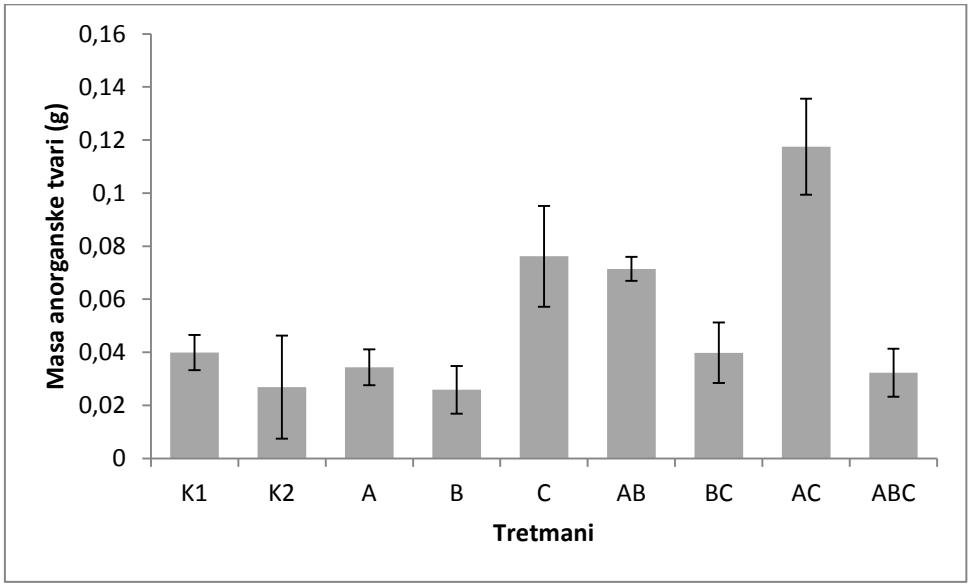
Slika 28. Grafički prikaz mase svježih stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na crnici (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)

ANOVA je potvrdila da se vrijednosti tretmana u sva tri mjerenja suhe mase statistički značajno razlikuju. Post hoc LSD test je potvrdio i pojedinačno. Statistički značajna razlika je između K1 i uzoraka C, AB, BC i ABC te između K2 i C, AB i ABC. Suhe mase uzoraka kod crnice su prikazane na slici 29.



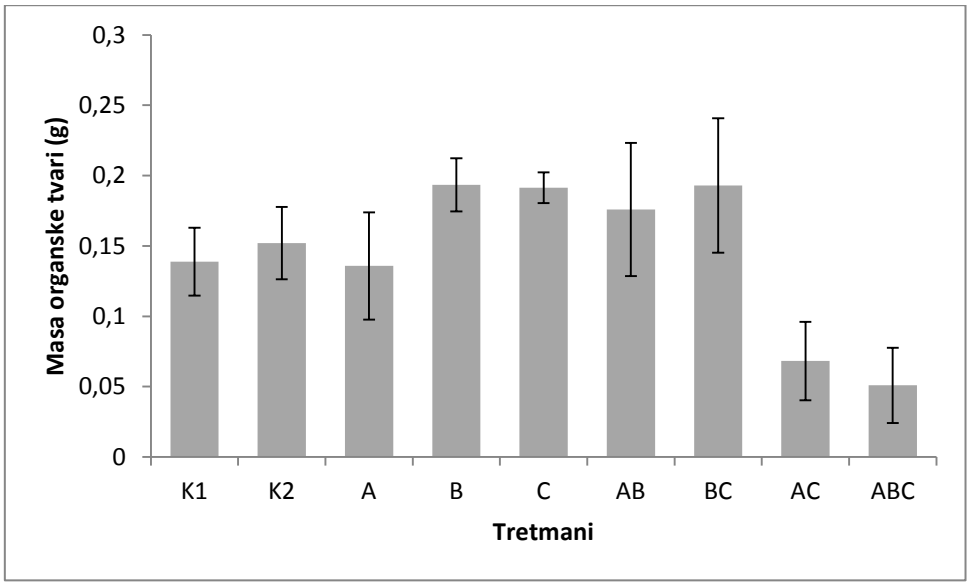
Slika 29. Grafički prikaz mase suhih stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na crnici (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)

ANOVA je potvrdila da se vrijednosti tretmana statistički značajno razlikuju i kod anorganske tvari. Statistički značajna razlika je pokazana između K1 i C, AB i AC te između K2 i C, AB i AC (Slika 30.).



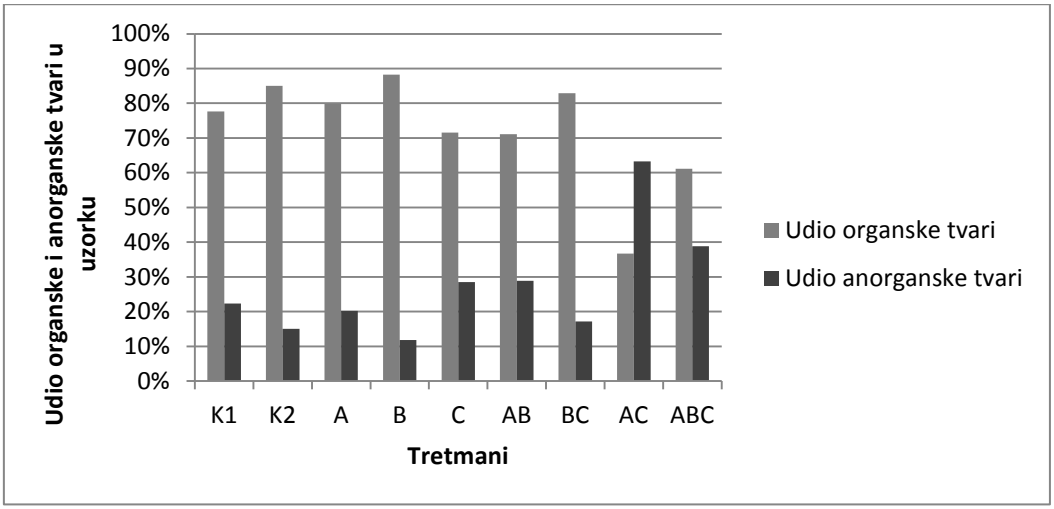
Slika 30. Grafički prikaz anorganske tvari stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na crnici (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)

K2 pokazuje veću količinu organske tvari od K1. Veća je masa B, C, AB, BC od obije kontrole, dok je ABC znatno manja od istih (Slika 31.).



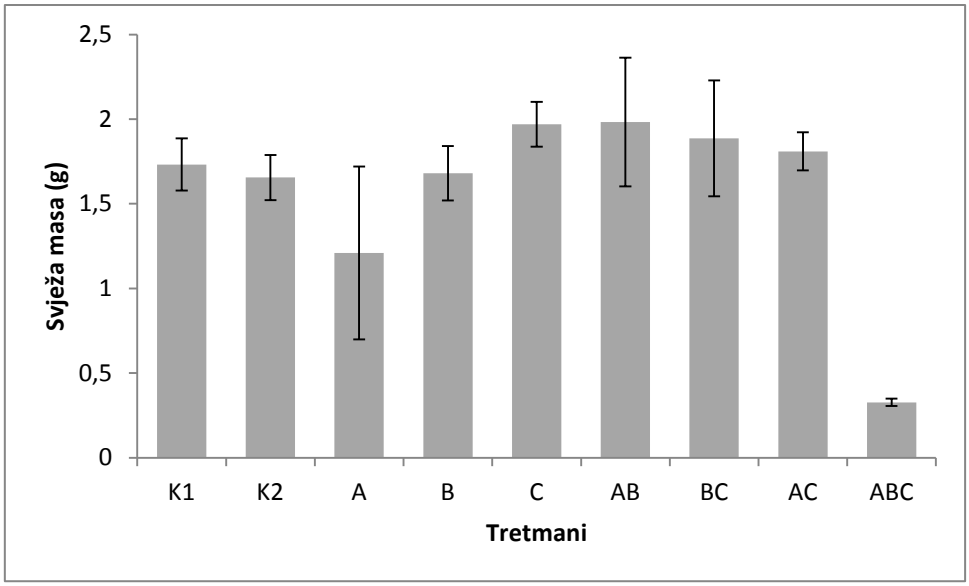
Slika 31. Grafički prikaz mase organske tvari stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na crnici (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)

Postotni udio anorganske tvari je manji od organske, jedino tretman AC pokazuje znatno veći postotak, dok B najmanji. Najmanji postotni udio organske tvari sadržava tretman AC, dok B ima veći udio od obije kontrole (Slika 32.).

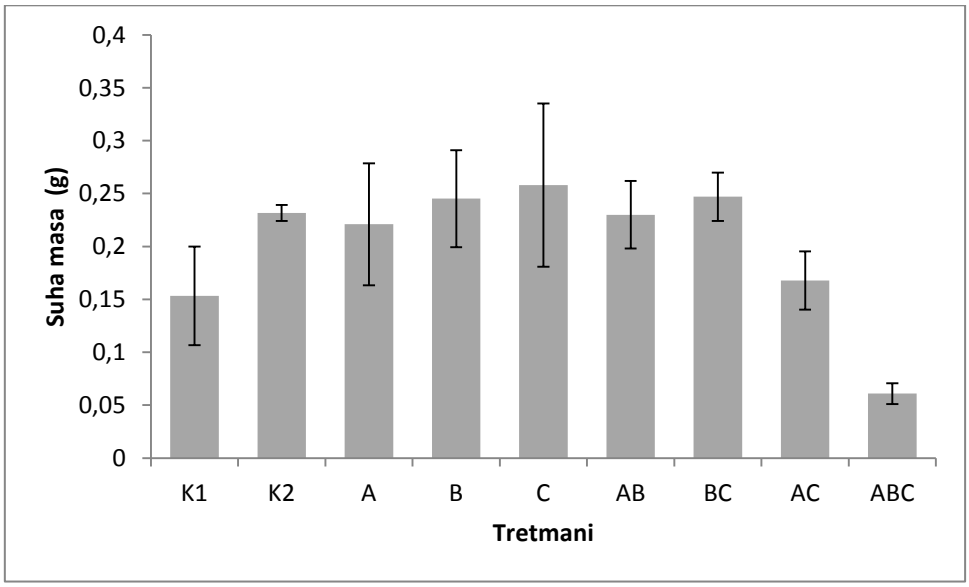


Slika 32. Grafički prikaz postotnog udjela organske i anorganske tvari u suhoj masi stabljika uzgajanih na crnici nakon 25 dana

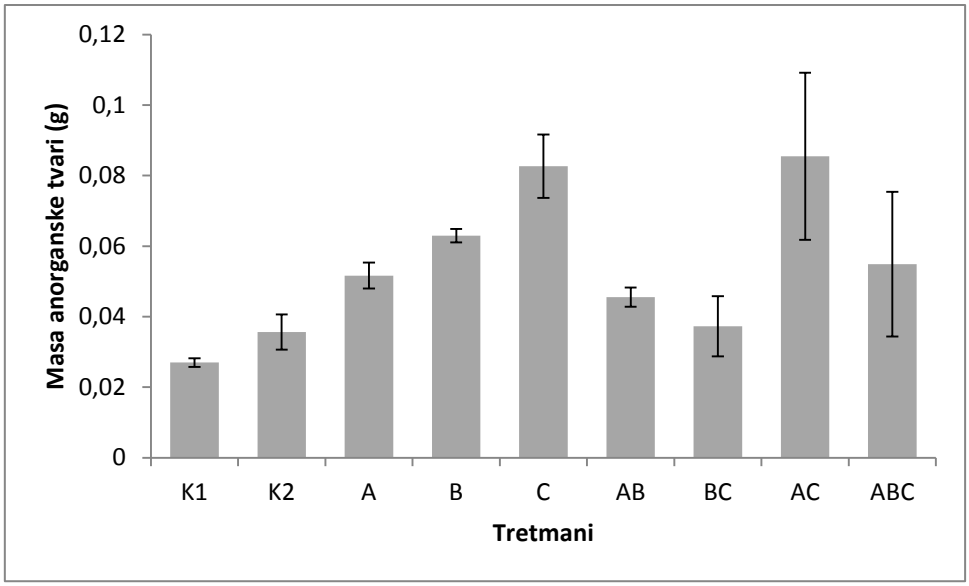
ANOVA je potvrdila da se vrijednosti svježe mase uzorka na lesu statistički značajno razlikuju. Post hoc LSD test je potvrdio i pojedinačno. Dokazana je statistički značajna razlika između K1 i ABC te K2 i ABC (Slika 33.). ANOV-om je ustanovljeno da se vrijednosti varijabla statistički značajno razlikuju i kod suhe mase biljaka uzgajanih na lesu. Post hoc test LSD je utvrdio da su statistički značajno različiti uzorci K1 i B, C, AB, BC i ABC. K2 ne pokazuje statistički značajnu razliku sa ABC (Slika 34.). Također, mjerenjem udjela pepela u masi uzorka kod lesa, ANOVA potvrđuje da postoji statistički značajna razlika između varijabli tj, uzoraka. Post hoc testom je ustanovljeno da se ta razlika nalazi između K1 i uzoraka A, B, C, AC i ABC. Također, razlika između K2 i uzoraka B, C i AC je statistički značajna (Slika 35.).



Slika 33. Grafički prikaz mase svježih stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na lesu (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)

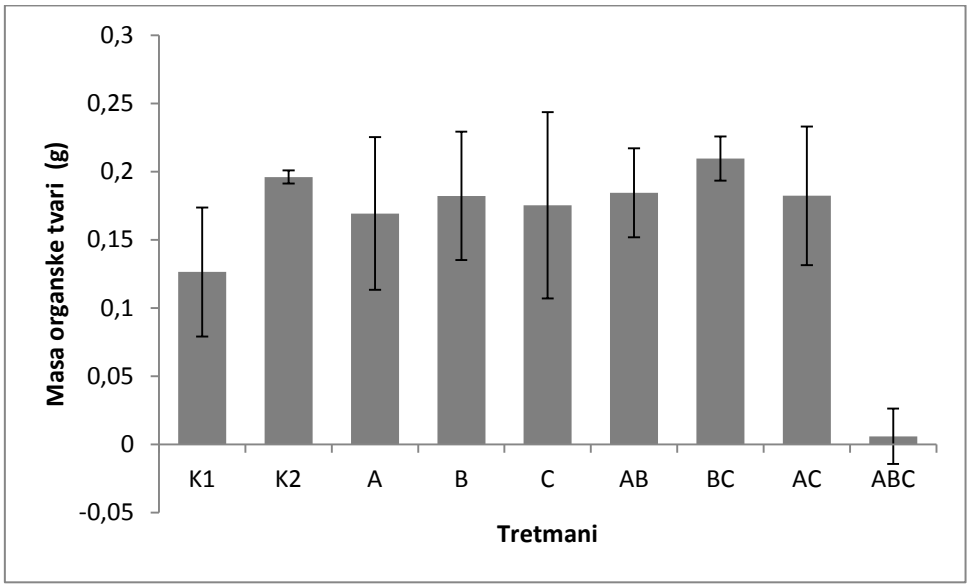


Slika 34. Grafički prikaz mase suhih stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na lesu (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)



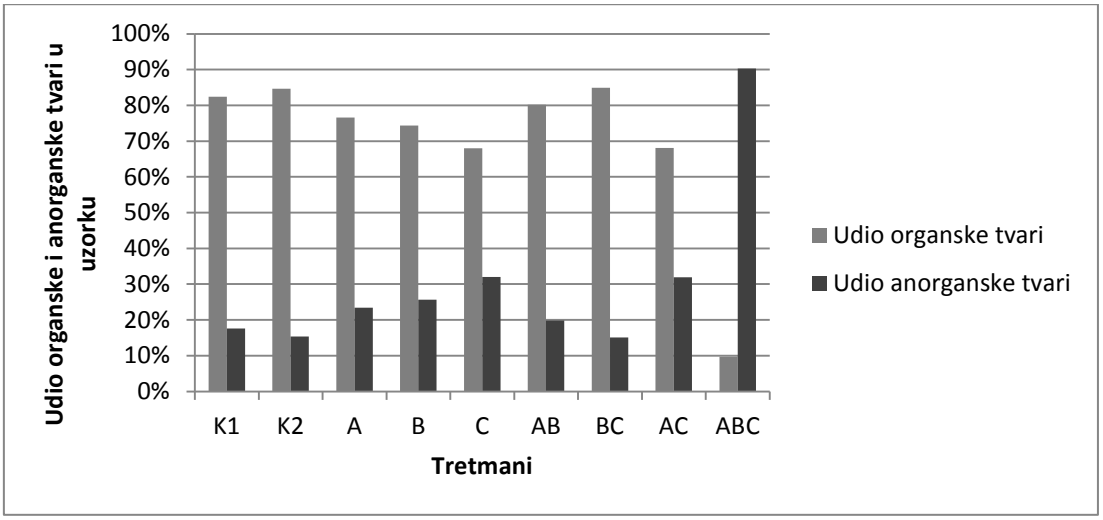
Slika 35. Grafički prikaz mase anorganske tvari stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na lesu (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)

Udio organske tvari se pokazao veći u K2 kao i kod crnice, također tretman BC je veći od K2 dok su svi ostali tretmani, osim ABC koji je znatno manji od K1 i K2, veći od K1 (Slika 36.).



Slika 36. Grafički prikaz mase organske tvari stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na lesu (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)

Postotni udio anorganske tvari u tretmanu ABC je izuzetno velik sa svojih 90 %, dok su K1 i K2 manje od svih ostalih tretmana (Slika 37.). Postotni udio organske tvari u svim tretmanima je izuzetno velik, osim u tretmanu A gdje pokazuje drastični pad sa svojih 10 %.



Slika 37. Grafički prikaz postotnog udjela organske i anorganske tvari u suhoj masi stabljika lesa nakon 25 dana

4.2. DRUGI EKSPERIMENT (od 7. srpnja do 6. kolovoza2016.)

4.2.1. KLIJAVOST SJEMENKI PŠENICE

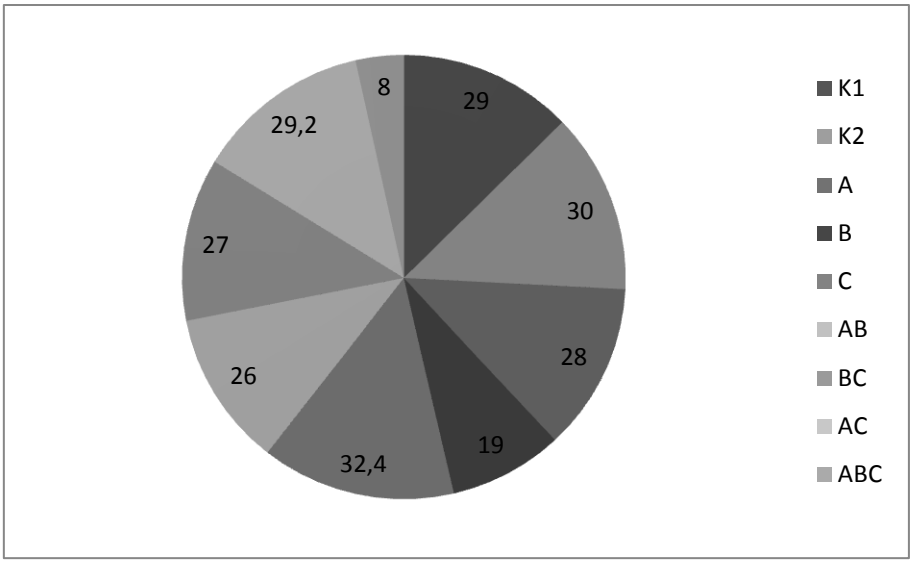
Klijavost sjemenki u drugom eksperimentu (Tablica 2.) se može uspoređivati sa klijavosti sjemenki u prvom eksperimentu s obzirom da se radi o istom tretmanu. Tretman K1 odnosi se na kontrolu tretiranu sterilnom destiliranom vodom, koja je dezinficirana otopinom Izosana. Tretman K2 se odnosi na kontrolu tretiranu sterilnom destiliranom vodom, koja nije dezinficirana otopinom Izosana. Tretman A predstavlja bakterijsku kulturu C1, tretman B predstavlja bakterijsku kulturu L1 dok tretman C predstavlja bakterijsku kulturu L2. Tretmani AB, BC, AC i ABC predstavljaju njihove kombinacije od kojih AB= C1 + L1, BC= L1 + L2, AC= C1 + L2 i ABC= C1 + L1 + L2.

Najveću klijavost u oba tretmana imaju C vrijednosti. Najmanja klijavost se vidi u tretmanu ABC te B kako u jednom, tako i u drugom eksperimentu. Također u oba eksperimenta pokazala se bolja klijavost sjemenki u kontroli 2, koja je nesterilna, nego u kontroli 1.

Tablica 2. Broj isklijalih sjemenki po uzorku ($n_{početni}$=500) nakon 5 dana

Tretmani	Broj proklijalih sjemenki
K1	145
K2	150
A	140
B	95
C	162
AB	130
BC	135
AC	146
ABC	40

Klijavost sjemenki je također izražena u postotcima na Slici 38.

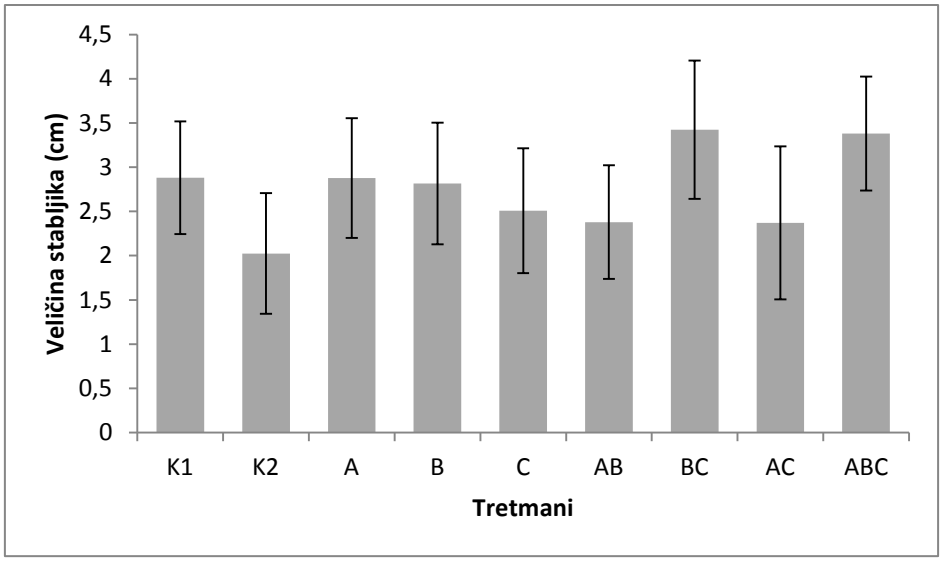


Slika 38. Grafički prikaz klijavosti u drugom eksperimentu (%)

4.2.2. VELIČINA STABLJIKA PŠENICE

4.2.2.1. VELIČINE STABLJIKA PŠENICE NAKON PETOG DANA UZGOJA

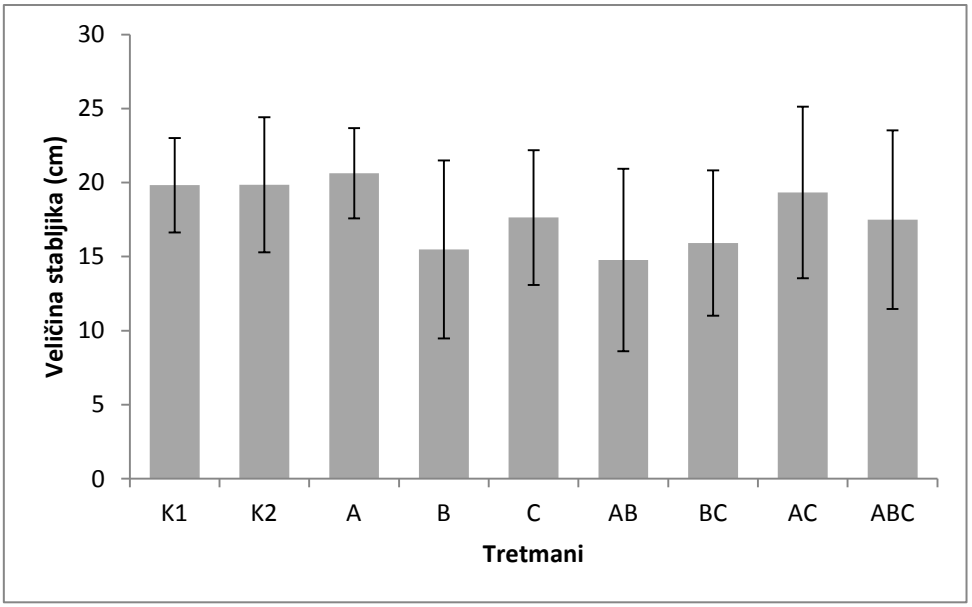
Veličine stabljika između prvog i drugog eksperimenta se razlikuju iako je K1 i u prvom i u drugom veći od K2. Veličine stabljika u drugom eksperimentu su prikazane na Slici 39. ANOVA je pokazala da postoji statistički značajna razlika između mjerenih uzoraka. ANOVA je popraćena LSD testom u kojem je pokazala statistički značajnu razliku između K1 i uzoraka tretiranih kulturama C, AB, BC i AC. Također, razlika je vidljiva između K2 i tretmana A, B, C, AB, BC, AC i ABC.



Slika 39. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 5 dana uzgoja

4.2.2.2. VELIČINE STABLJIKA PŠENICE NAKON TRIDESETOG DANA UZGOJA

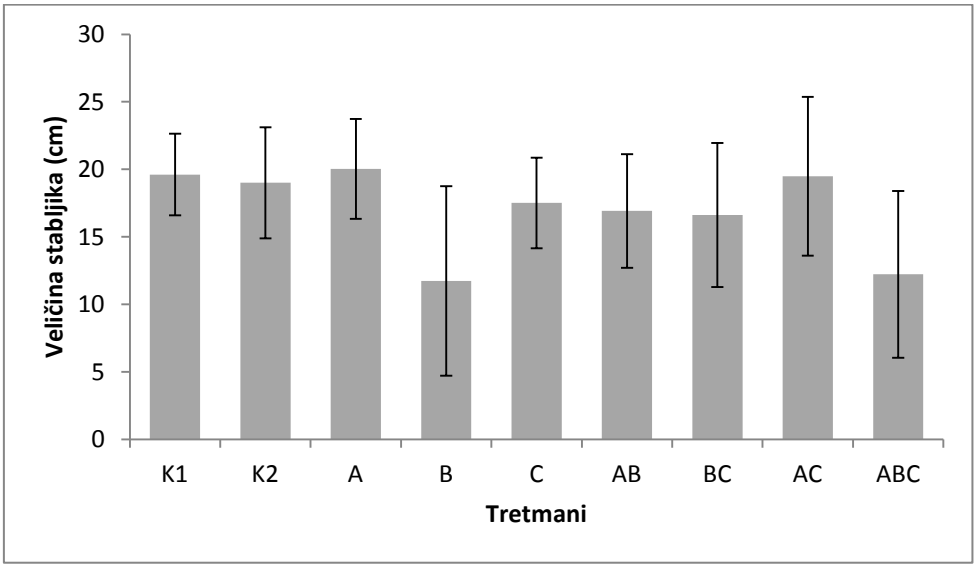
U n1, n2 i n3 ANOVA je pokazala da postoji statistički značajna razlika među uzorcima. Post hoc LSD test je pokazao i između kojih, pa tako u n1 postoji statistički značajna razlika između K1 i tretmana A, dok se razlika javlja i između K2 i tretmana C, AB, BC, AC i ABC (Slika 40.).



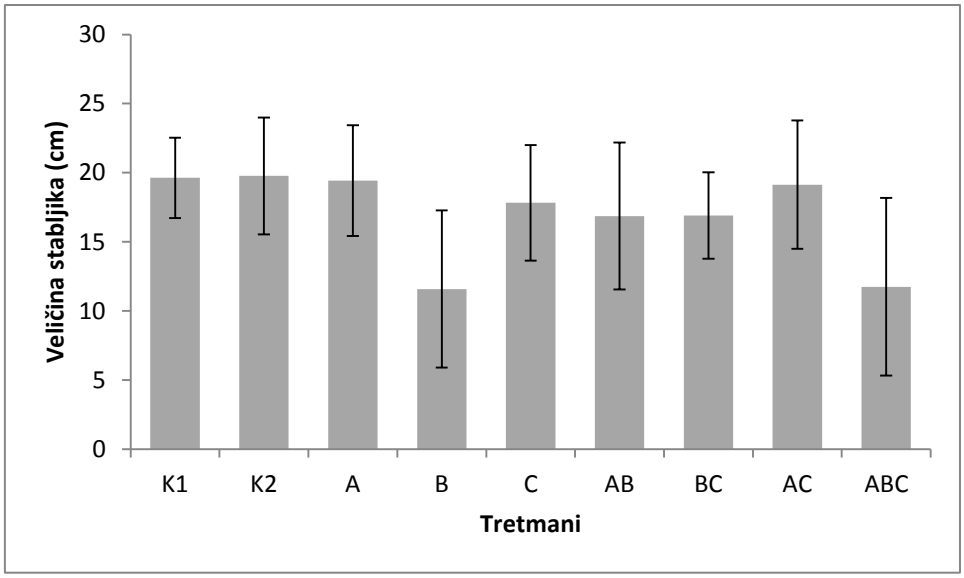
Slika 40. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na crnici (n1)

U n2 statistički značajna razlika postoji između K1 i tretmana A, B, BC, AC i ABC te između K2 i tretmana C i AB (Slika 41.).

U n3 se javlja statistički značajna razlika između K1 i tretmana A i ABC, također između K2 i tretmana B, C, AB, BC i AC (Slika 42.).



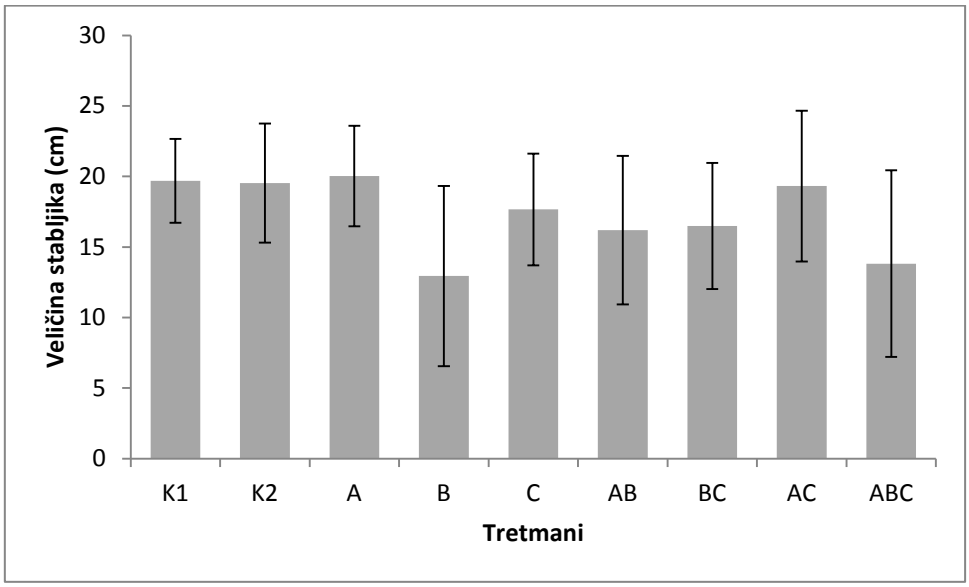
Slika 41. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na crnici (n2)



Slika 42. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na crnici (n3)

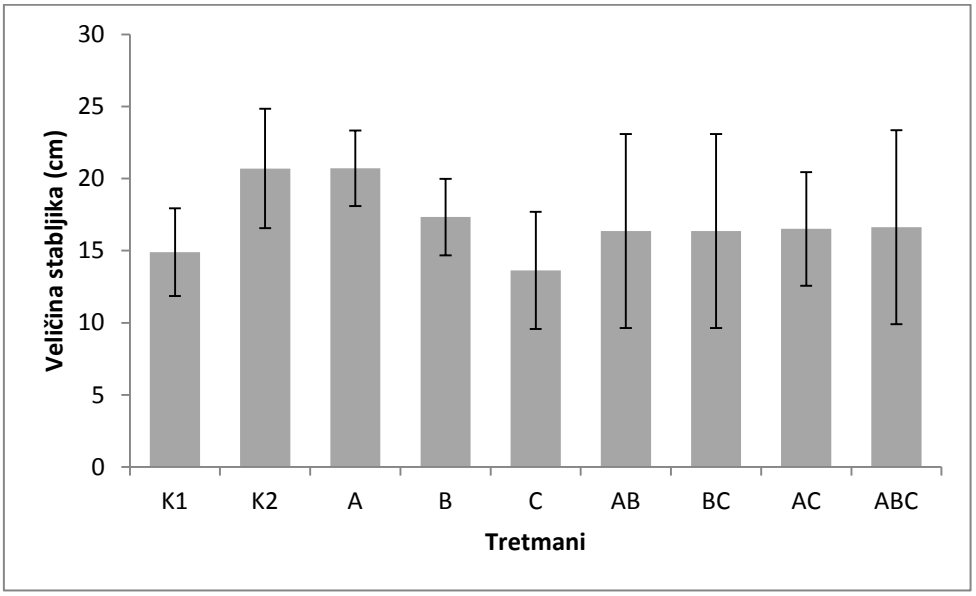
Ono što je zajedničko svim mjerenjima je to da razlika postoji između K1 i A te između K2 i tretmana C i AB.

U sva tri mjerenja ANOVA je detektirala statistički značajnu razliku među uzorcima a LSD je detektirao statistički značajnu razliku između kontrola i uzoraka B i ABC, gdje se ABC kao i u prvom eksperimentu pokazuje značajno manji od kontrola (Slika 43.).



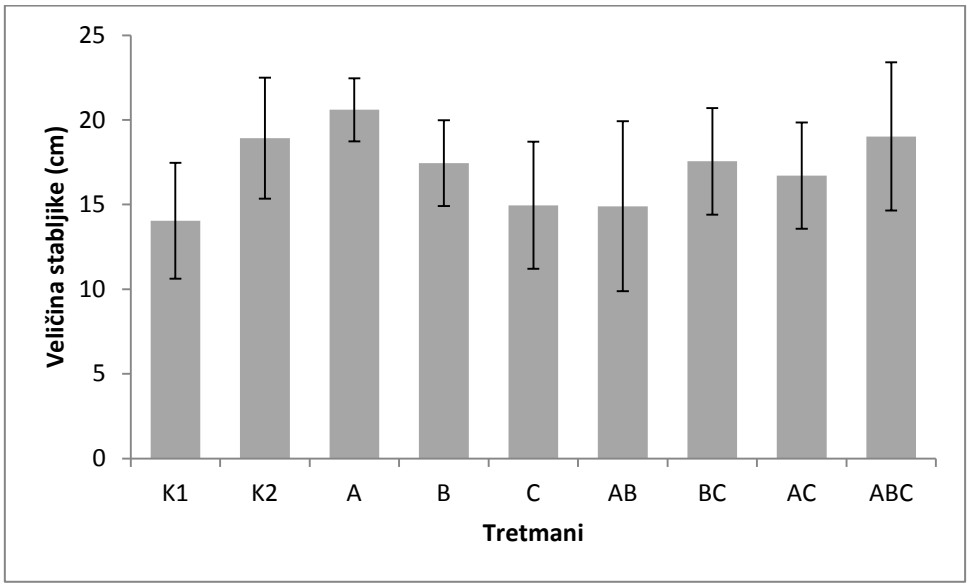
Slika 43. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na crnici (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)

ANOVA je pokazala statistički značajnu razliku između veličina stabljika kod uzoraka koji su bili 25 dana nasađeni na lesu. Post hoc LSD testom je ustvrđeno koji su uzorci značajno različiti. U n1 uzorku pozitivno statistički su značajno različiti K1 i tretmani A, ABC. Također, K2, koja je veća od K1 se statistički značajno razlikuje od tretmana C, AB ,BC, AC i ABC (Slika 44.).



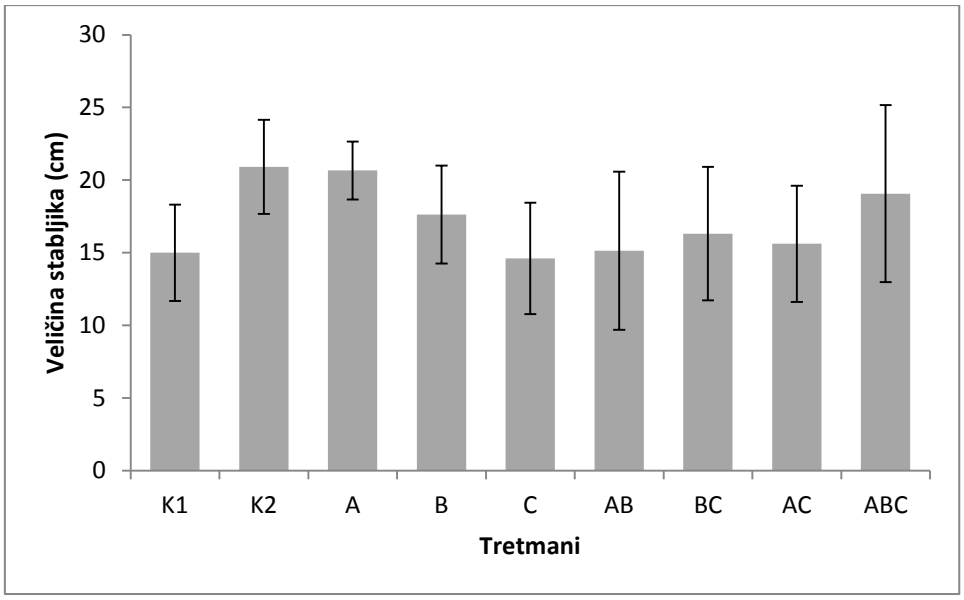
Slika 44. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na lesu (n1)

Statistički značajna razlika u n2 uzorku se vidi između K1 i uzoraka A, B, BC, AB i ABC dok statistički značajna razlika postoji između K2 i tretmana C i AB (Slika 45.).



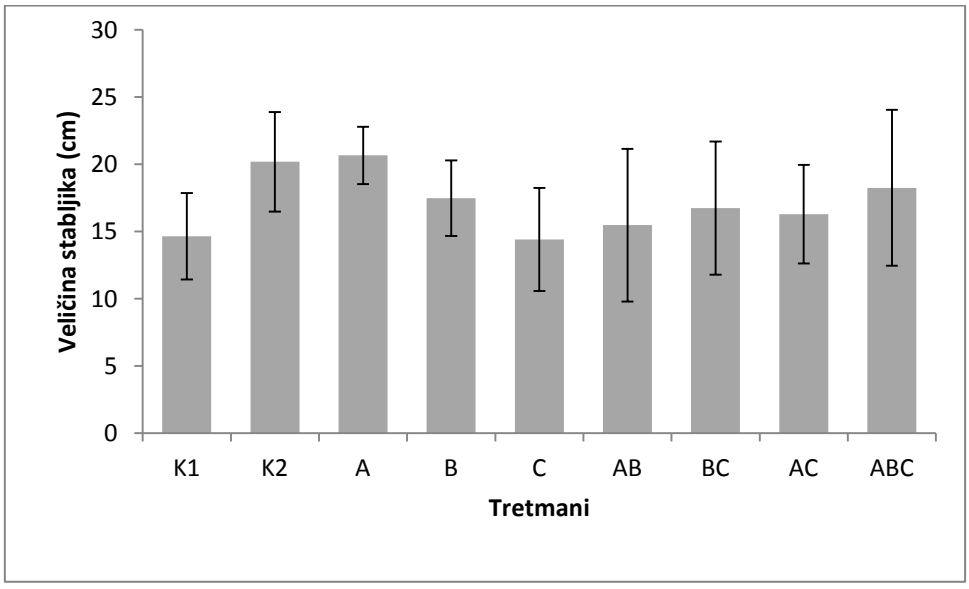
Slika 45. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na lesu (n2)

Značajna razlika u n3 uzorku se vidi između K1 te uzoraka A i ABC. Također, statistički značajna razlika je vidljiva između K2 i B, C, AB, BC i AC (Slika 46.).



Slika 46. Grafički prikaz veličine stabljika 25 dana nakon nasađivanja na les (n3)

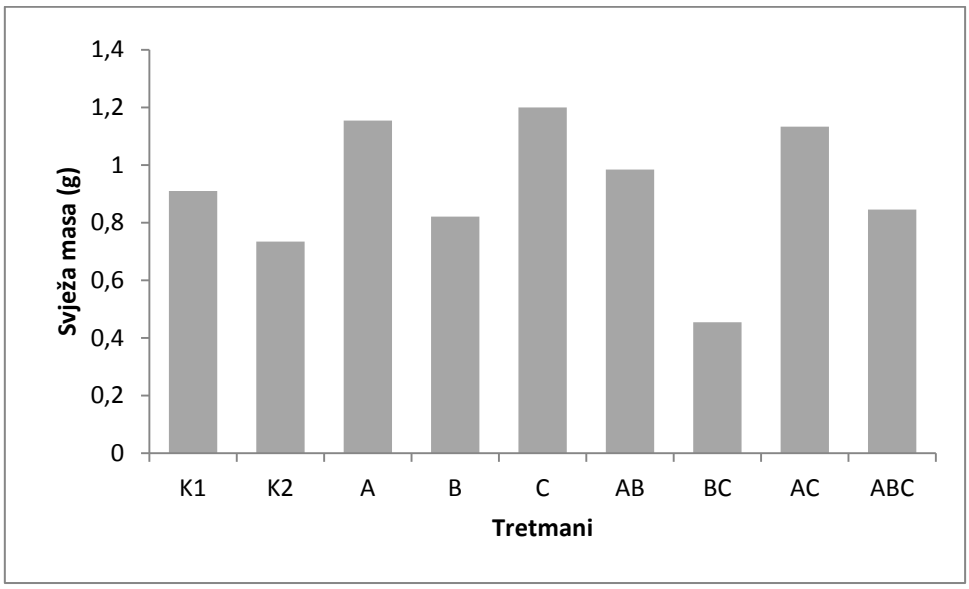
Svim mjerenjima, zajedničke su razlike između K1 i tretmana A te ABC, također, između K2 i tretmana C i AB. U dva mjerenja zabilježene su razlike između K2 i BC, AC. ANOVA je pokazala statistički značajnu razliku kada se u obzir uzmu sva tri mjerenja veličine stabljika na lesu. Ta razlika je između K1 i uzoraka A, B i ABC te između K2 i C (Slika 47.).



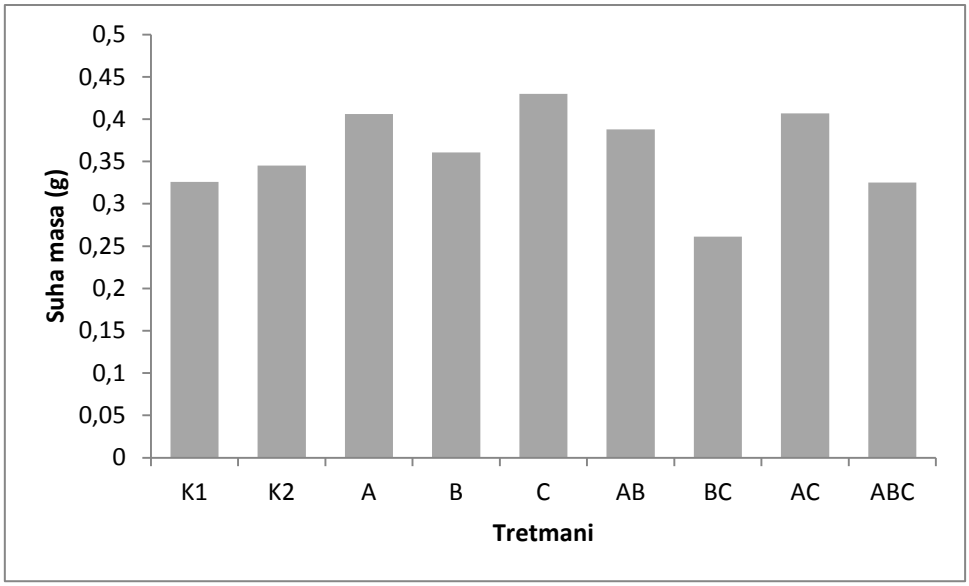
Slika 47. Grafički prikaz veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na lesu (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)

4.2.3. SVJEŽA MASA, SUHA MASA, ORGANSKA I ANORGANSKA TVAR PŠENICE (nakon 5 dana)

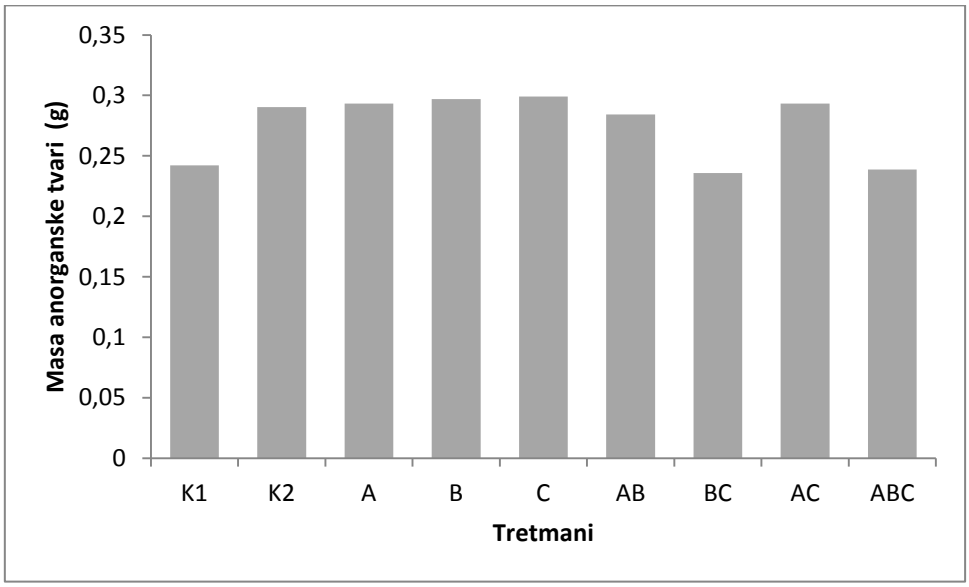
U dijagramima se može primijetiti da postoji statistički veća razlika među uzorcima kod svježe mase tvari. Ta razlika se smanjuje kod suhe mase tvari te je gotovo vidljiva na primjeru udjela anorganske tvari, bez obzira na tretman kulturama. BC i u prvom eksperimentu ima najmanju svježu tvar, ali drastično veći udio pepela. Uzorak C je u svim slučajevima veći od K1. Kada promatramo organsku tvar, vidimo da su tretmani A, B, AB i ABC znatno veći od kontrola i ostalih uzoraka. Svježu masu, suhu masu, anorgansku i organsku tvar možemo vidjeti na slikama 48., 49., 50. i 51. Za razliku od prvog eksperimenta, postotni udio anorganske tvari se u drugom eksperimentu pokazao puno veći, dok se postotni udio organske tvari pokazao izuzetno mali, sa najmanjih 10 % u tretmanu BC. Postotne udjele organske i anorganske tvari u suhoj masi stabljike možemo vidjeti na slici 52. Masa korijenja je u svim slučajevima veća kod K2 ili netretirane kontrole Izosanom. Uzorci BC, AC i ABC su pokazali znatno veću masu od kontrola u svim slučajevima. Organska tvar se pokazala znatno veća u tretmanu C, AB te ABC. Svježu masu, suhu masu, anorgansku i organsku tvar korijenja možemo vidjeti na slikama 53., 54., 55. i 56.



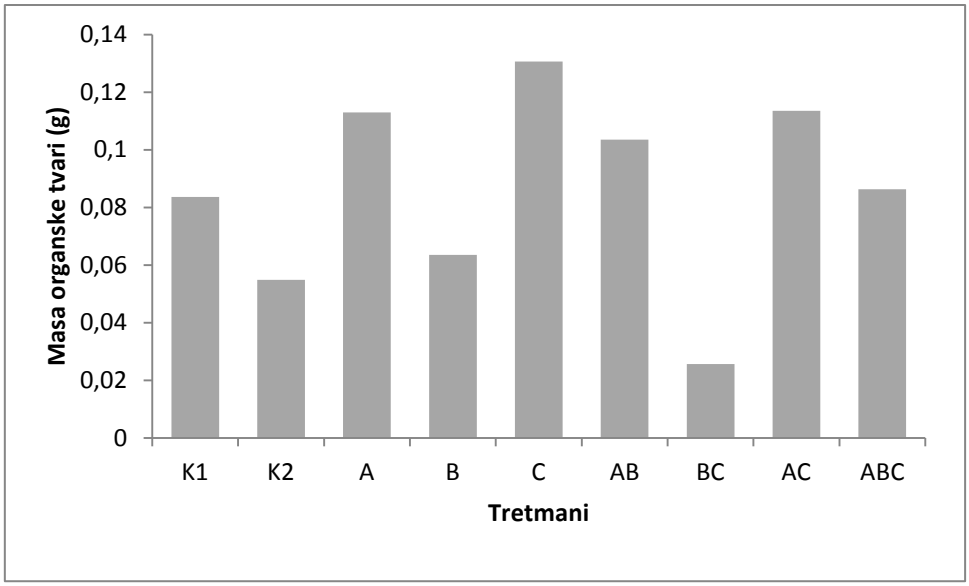
Slika 48. Grafički prikaz mase svježih stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 5 dana



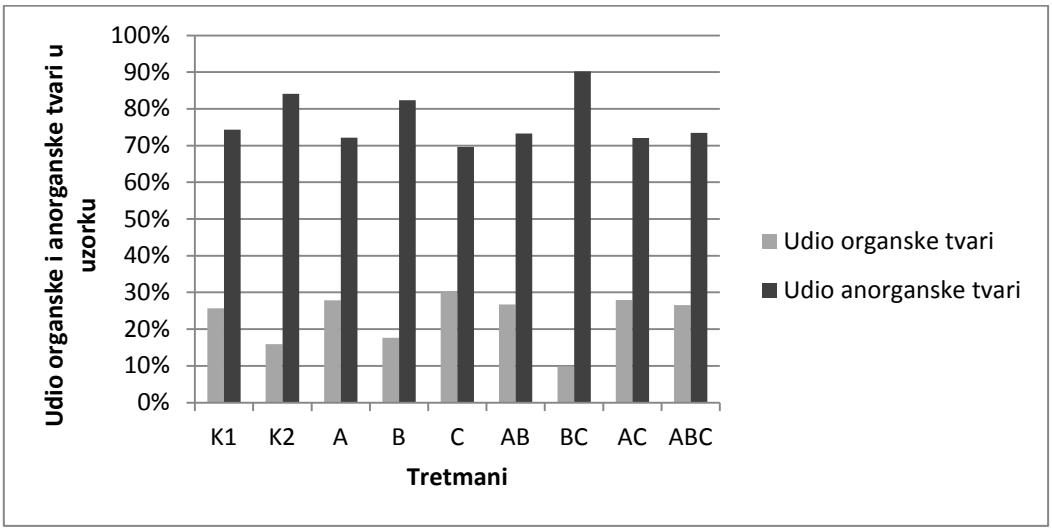
Slika 49. Grafički prikaz mase suhih stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 5 dana



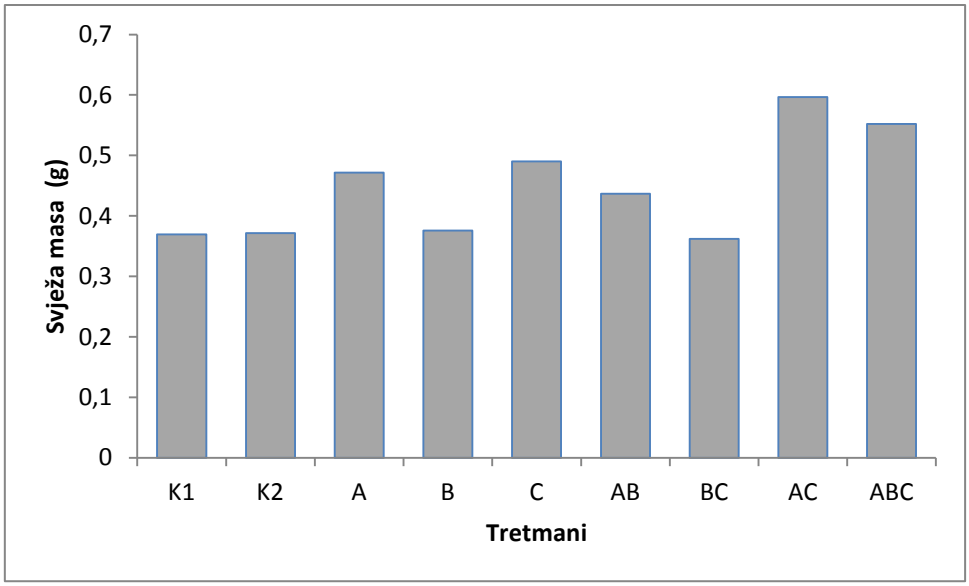
Slika 50. Grafički prikaz mase anorganske tvari stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 5 dana



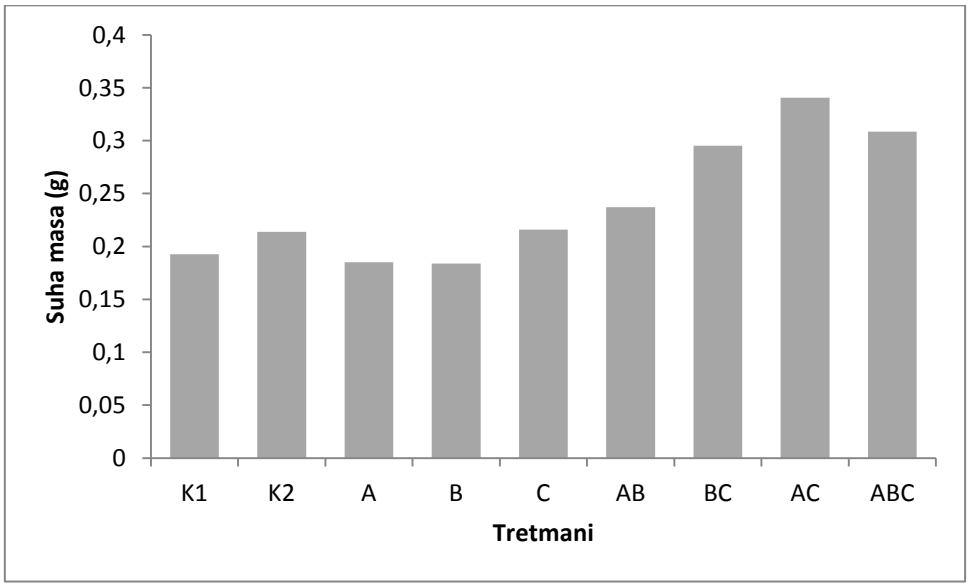
Slika 51. Grafički prikaz mase organske tvari stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 5 dana



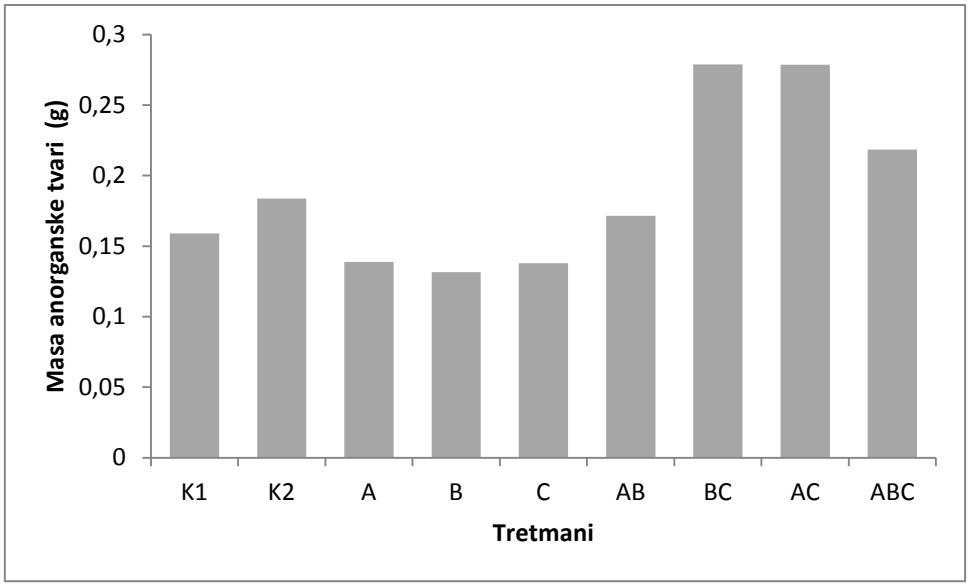
Slika 52. Postotni udio organske i anorganske tvari u suhoj masi stabljike nakon 5 dana klijanja



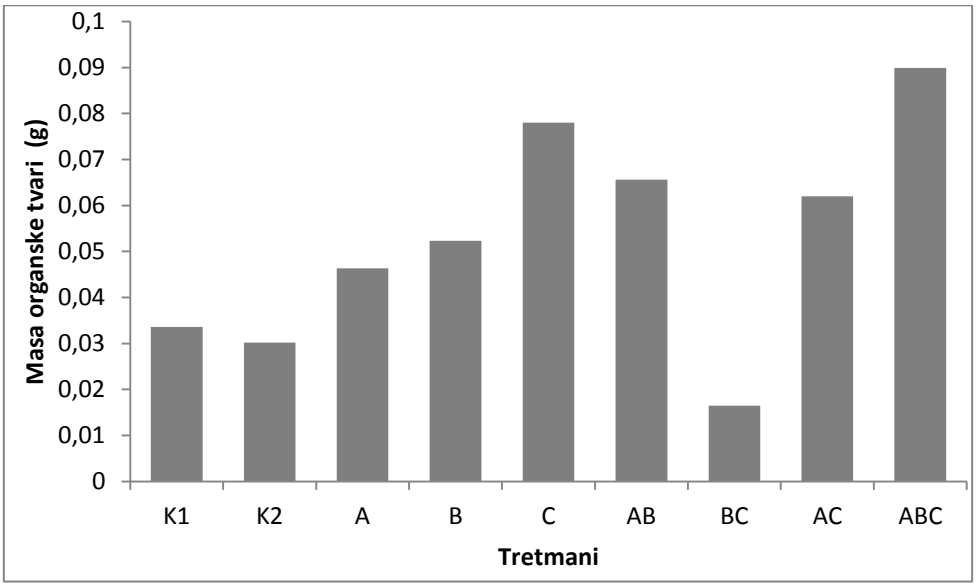
Slika 53. Grafički prikaz mase svježeg korijenja tretiranog bakterijskim kulturama nakon 5 dana



Slika 54. Grafički prikaz mase suhog korijenja tretiranog bakterijskim kulturama nakon 5 dana



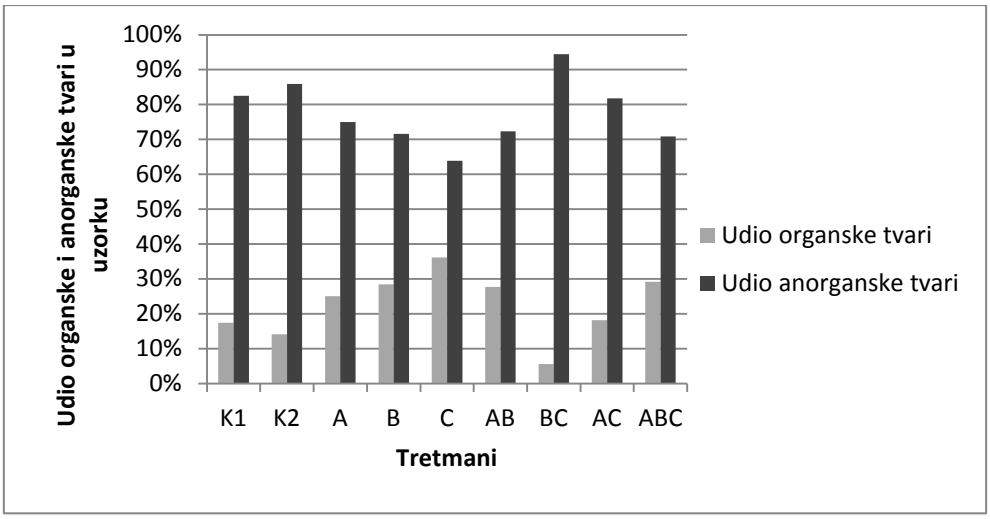
Slika 55. Grafički prikaz mase anorganske tvari korijenja tretiranog bakterijskim kulturama nakon 5 dana



Slika 56. Grafički prikaz mase organske tvari korijenja tretiranog bakterijskim kulturama nakon 5 dana

Postotni udio organske tvari korijena u svim uzorcima je manji od tog istog u prvom eksperimentu. Također, sa najmanjim udjelom u tretmanu BC, kao i kod stabljike. Udio

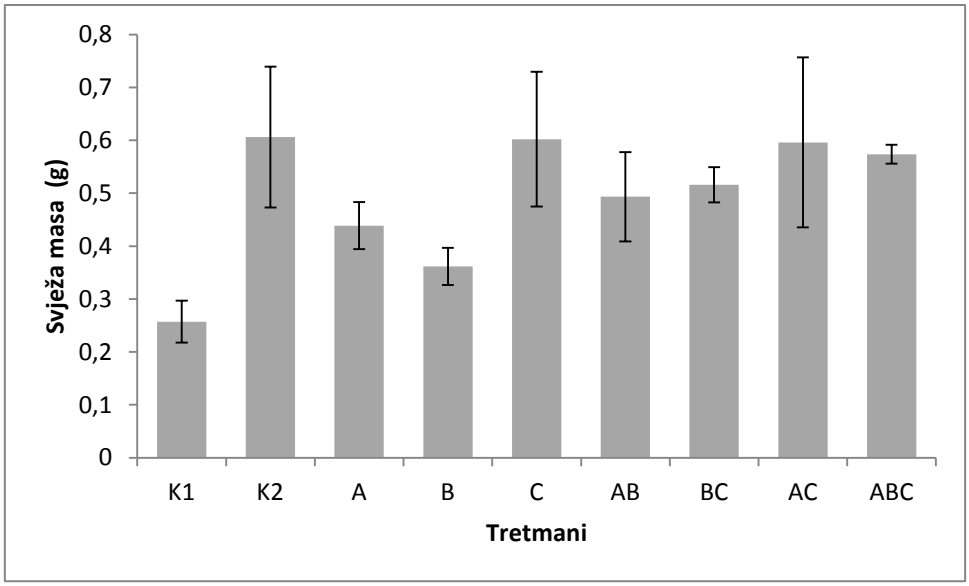
anorganske tvari u suhoj masi uzorka je manji u svim uzorcima od K1 i K2. Postotne udjele anorganske i organske tvari u suhoj masi možemo vidjeti na Slici 57.



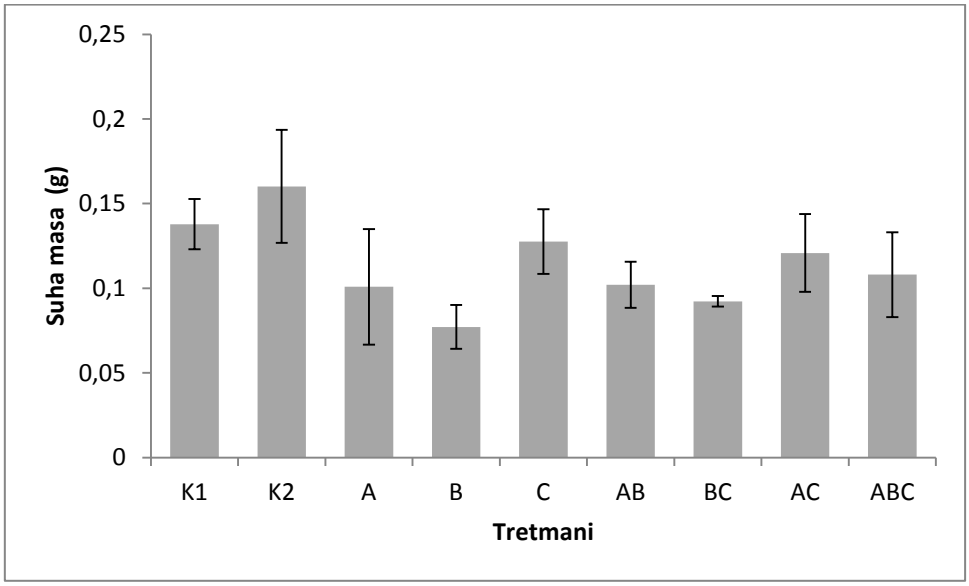
Slika 57. Postotni udio organske i anorganske tvari u suhoj masi korijena nakon 5 dana klijanja

4.2.4. SVJEŽA MASA, SUHA MASA, ORGANSKA I ANORGANSKA TVAR PŠENICE (nakon 25 dana na tlu)

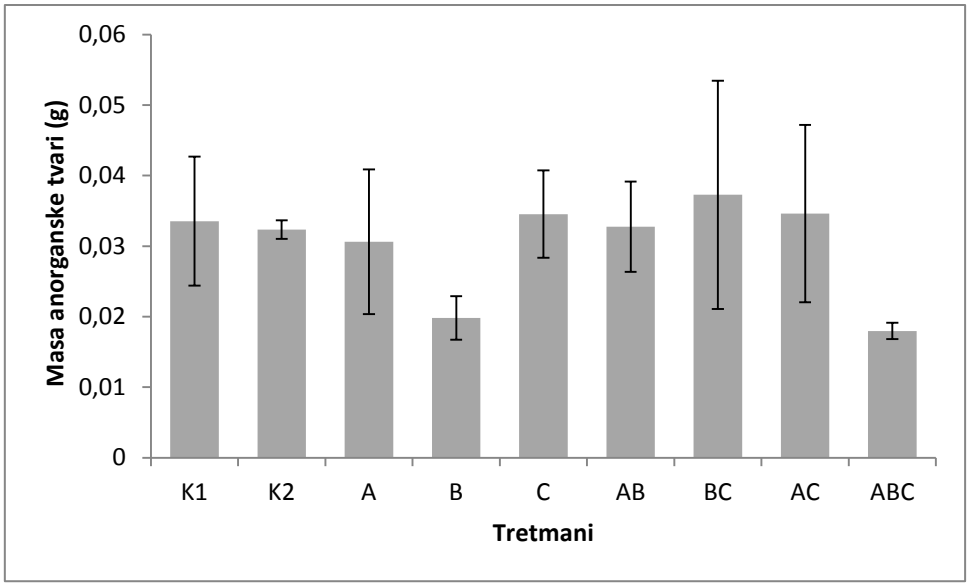
ANOVA je pokazala da postoji statistički značajna razlika između uzoraka kod svježe mase tvari. Post hoc LSD test je pokazao da se K1 statistički značajno razlikuje od svih uzoraka, koji su ujedno i manji od K1, tretiranih bakterijskim kulturama dok između K2 i tretmana A i B postoji statistički značajna razlika (Slika 58.). ANOVA je također pokazala da ne postoji statistički značajna razlika između tretmana kod mase suhih stabljika uzgajanih na crnici (Slika 59.) te između tretmana kod mase anorganske tvari istih (Slika 60.). Masa organske tvari u crnici je znatno veća od mase anorganske tvari što se bilo obrnuto u mjerenjima nakon 5 dana. K2 je veća od K1, te su svi ostali tretmani manji od kontrola (Slika 61.).



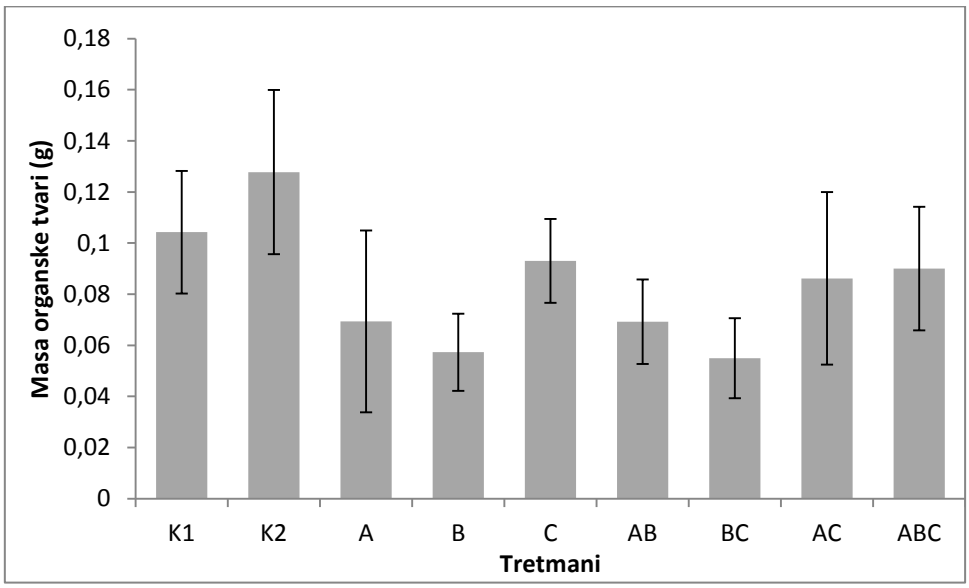
Slika 58. Grafički prikaz mase svježih stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na crnici (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)



Slika 59. Grafički prikaz mase suhih stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na crnici (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)

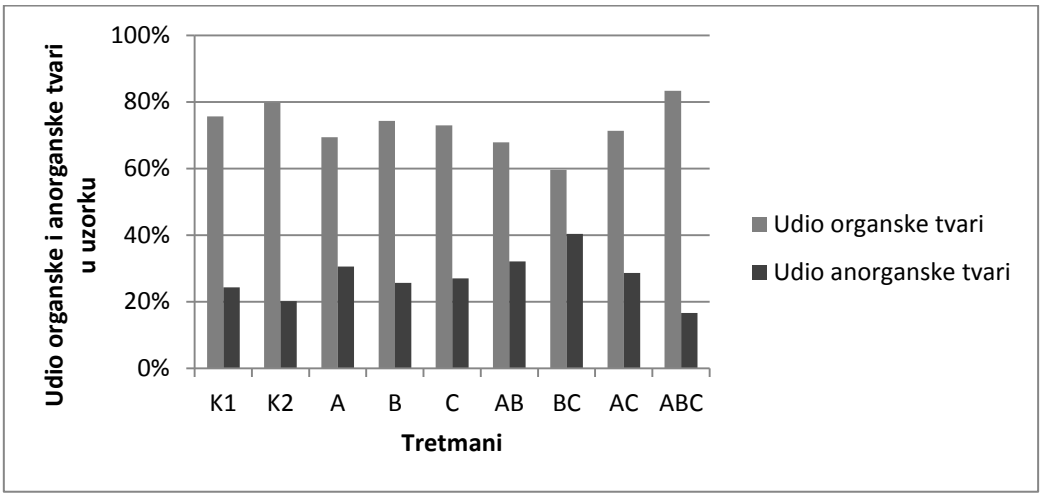


Slika 60. Grafički prikaz mase anorganske tvari stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na crnici (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)



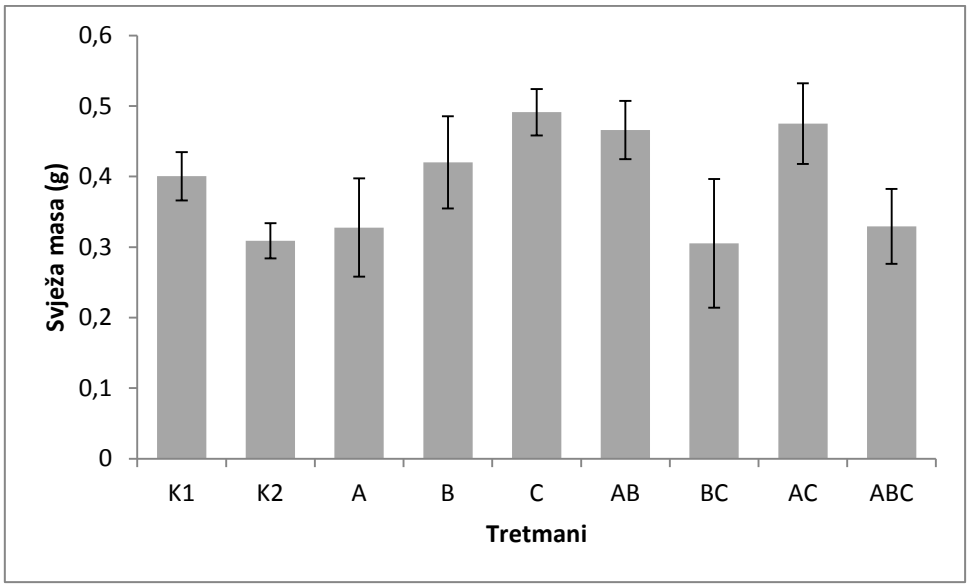
Slika 61. Grafički prikaz mase organske tvari stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na crnici (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)

Udio anorganske tvari je manji nego udio organske tvari u stabljikama nakon 25 dana na crnici,što je bilo obrnuto u mjerenjima nakon 5 dana. Najmanji udio anorganske tvari je u tretmanu ABC a organske u tretmanu BC. Postotne udjele anorganske i organske tvari možemo vidjeti na Slici 62.

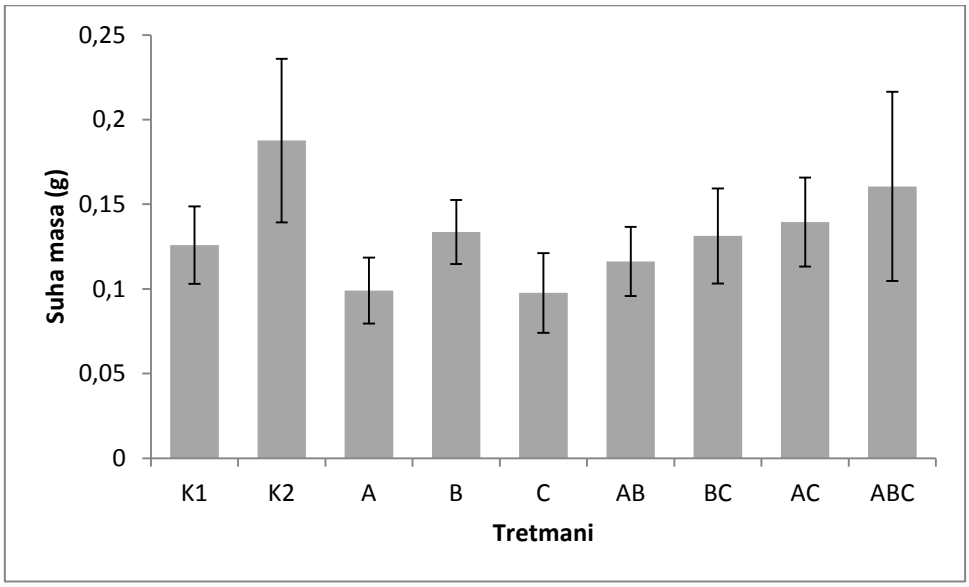


Slika 62. Postotni udio organske i anorganske tvari u suhoj masi stabljike nakon 25 dana na crnici

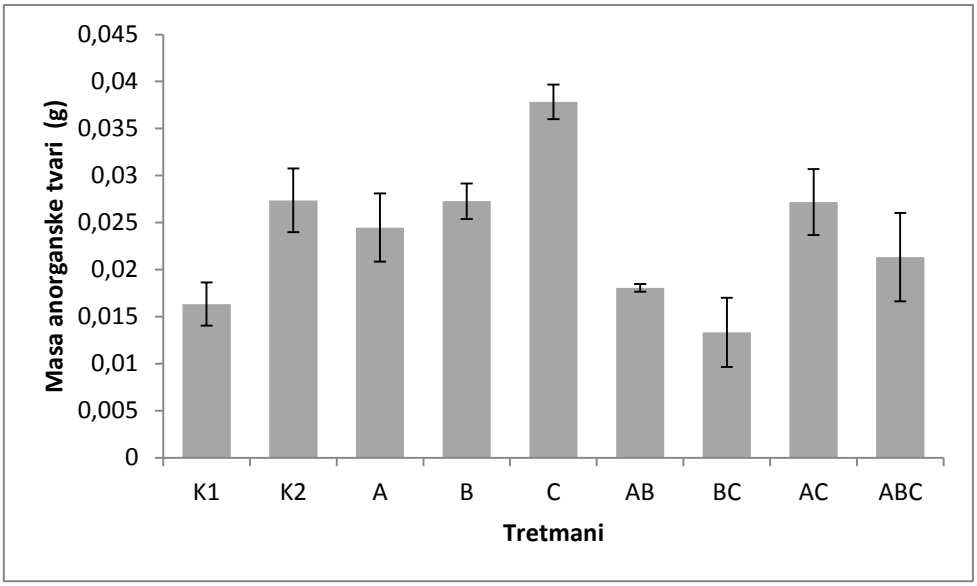
ANOVA je pokazala statistički značajnu razliku između svježe mase uzoraka uzgajanih na lesu. LSD post hoc testom je kasnije dokazao da je to između K2 i tretmana B, C, AB i AC (Slika 63.). Svaki od navedenih tretmana je veći od kontrole 1. ANOVA je pokazala da postoji statistički značajna razlika između uzoraka u suhoj masi tvari. LSD test je pokazao da je ta razlika između K2 i svih ostalih tretmana (Slika 64.). ANOVA je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika između uzoraka u anorganskoj tvari (Slika 65.). Masa organske tvari iz stabljika na lesu nakon 25 dana je veća od mase anorganske tvari za razliku od mjerenja nakon 5 dana klijanja, gdje je veća bila anorganska tvar. Najveća masa je u K2 ili kontroli koja nije tretirana Izosanom (Slika 66.). Tretman BC je manji od kontrola kod udjela anorganske tvari dok je tretman C najveći. Jedino tretman BC ima veći udio organske tvari kada ga uspoređujemo sa kontrolama promatrajući masu organske tvari (Slika 67.).



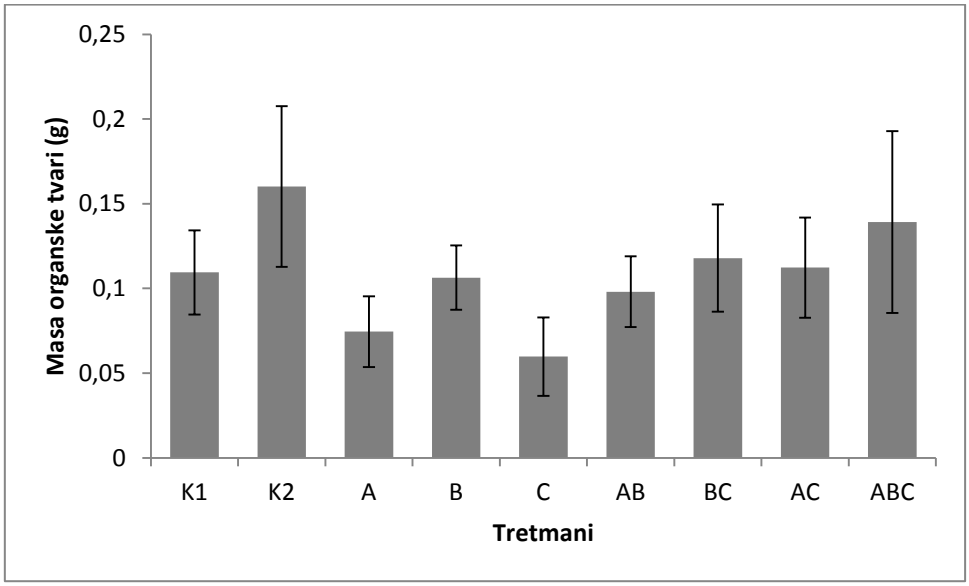
Slika 63. Grafički prikaz mase svježih stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na lesu (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)



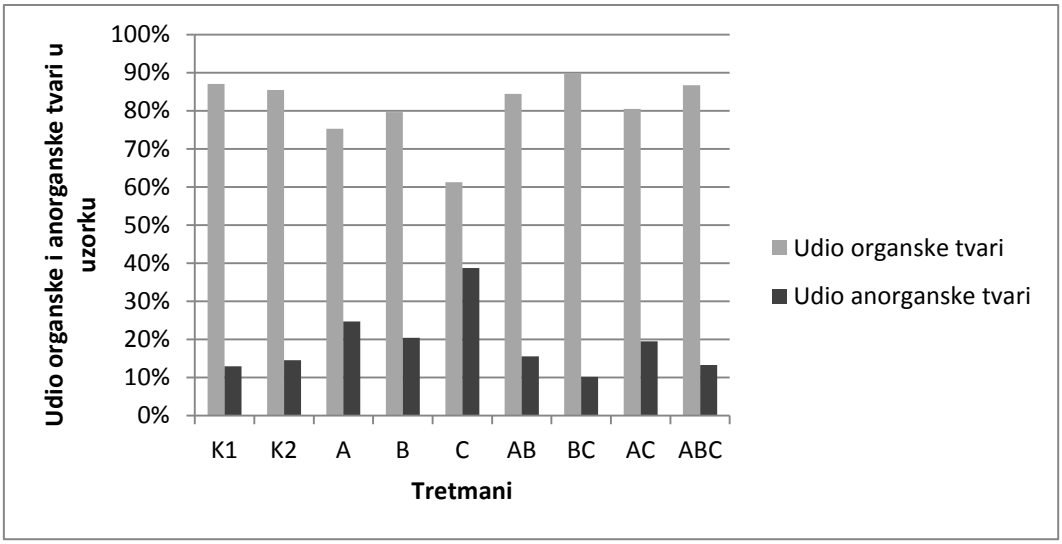
Slika 64. Grafički prikaz mase suhih stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na lesu (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)



Slika 65. Grafički prikaz mase anorganske tvari stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na lesu (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)



Slika 66. Grafički prikaz mase organske tvari stabljika tretiranih bakterijskim kulturama nakon 25 dana rasta na lesu (srednja vrijednost i standardna devijacija triju ponavljanja)



Slika 67. Postotni udio organske i anorganske tvari u suhoj masi stabljike nakon 25 dana uzgoja na lesu

5. RASPRAVA

Interakcije između biljaka i bakterija važan su dio terestričkih ekosustava te je stoga od velike važnosti istraživati ih (Wu i sur., 2009). Bakterije tla obuhvaćaju vrlo raznoliku skupinu organizama, o kojima se još uvijek malo zna. Jedan od razloga je taj što samo 1 % bakterija tla razvija svoje kolonije na agarnoj podlozi (Gosal i Mehta, 2015). Samo u području rizosfere postoji oko 10^9 bakterijskih stanica po gramu tla (Hol i sur., 2013). Kako su bakterijski organizmi rasprostranjeni i u drugim područjima tla, vrijedi istraživati i utjecaje istih na rast i biomasu biljaka (Deepa i sur., 2010). Najveća klijavost u prvom eksperimentu je zabilježena kod kontrole netretirane otopinom Izosana iz čega se može izvući zaključak da dezinfekcija sjemenki pšenice otopinom Izosana djeluje negativno na klijavost sjemenki. S obzirom na kontrolu 1, koja je tretirana otopinom Izosana, uzorci koji su tretirani kulturama A, C te kombinacijom kultura AB su pokazali veću klijavost iz čega izvodimo da bakterijske kulture A, C i AB potiču klijavost sjemenki pšenice koja je dezinficirana. U drugom eksperimentu je potvrđeno da netretirane sjemenke Izosanom imaju veću klijavost od sjemenki koje su tretirane. Zabilježena je veća klijavost u uzorku koji je tretiran kulturom C od klijavosti u K1 i K2 što za sobom vuče zaključak da bakterijska kultura C potiče klijavost sjemenki pšenice bila ona dezinficirana ili ne. Također, uočeno je da tretirane sjemenke, u slučaju tretmana sa svim bakterijskim kulturama, pokazuju znatno manju klijavost u usporedbi sa kontrolama te ostalim tretiranim uzorcima, iz čega se može zaključiti da u svojoj interakciji luče metabolite koji negativno utječu na klijavost sjemenki pšenice. Različiti rezultati su dobiveni u istraživanju utjecaja dvije vrste bakterija *Bacillus licheniformis* i *Azotobacter chroococcum* na klijavost pšenice, gdje su bakterije pokazale veći postotak klijavosti u sinergiji jedna s drugom nego zasebno (Radan, 2011). Također, u navedenom istraživanju kombinacije kultura su utjecale pozitivno i na rast stabljika. Nakon petog dana klijanja, zabilježena je veća prosječna veličina stabljika u kontroli 1 koja je tretirana Izosanom, kako u prvom, tako i u ponovljenom pokusu iz čega možemo zaključiti da sterilizacija sjemenki pozitivno utječe na veličinu stabljika. Kulture B, C te kombinacije kultura AB, BC i ABC su pokazale veću srednju vrijednost veličine stabljika u odnosu na K1 u prvom eksperimentu, a ponavljanjem istog su tu karakteristiku pokazale kulture BC i ABC. Ovo nam sa sigurnošću govori da kulture BC i ABC potiču rast pšenice ukoliko su sjemenke sterilizirane ali i ukoliko nisu sterilizirane, nakon petog dana promatranja. Zanimljivo je da kombinacija kultura ABC utječe znatno negativnije na klijavost sjemenki, od svih ostalih kultura i njihovih kombinacija ali

posjeduje pozitivan utjecaj na veličinu stabljika nakon pet dana za razliku od istraživanja koje su obavili Radan (2011.) i suradnici, gdje kombinacije kultura koje pokazuju veću klijavost također utječu na veću srednju vrijednost veličine stabljika. U prvom eksperimentu sa autoklaviranim tlom, mjerenjem veličine stabljika nakon 25 dana rasta na crnici je vidljivo da su srednje vrijednosti veličina stabljika veće u kontroli 1, gdje su sjemenke bile tretirane Izosanom nego u kontroli 2. Tu su kombinacije kultura AB pokazale pozitivan utjecaj na rast (veličinu stabljika) pšenice na sterilnoj crnici. U slučaju lesa, kontrola koja nije bila tretirana Izosanom pokazala je bolji rast. U sva tri mjerenja kulture C i kombinacija bakterijskih kultura AC su pokazale pozitivan utjecaj na rast pšenice. Zaključujemo da kulture C i AC potiču rast pšenice u sterilnim uvjetima na lesu. U drugom eksperimentu, gdje se rast pšenice odvijao na nesterilnoj crnici u samo dva mjerenja je pokazan pozitivan utjecaj bakterijske kulture A u odnosu na kontrolu 1 i kontrolu 2. Ne postoji statistički značajna razlika između uzoraka zbog čega pretpostavljamo da bakterijske kulture kojima su tretirani uzorci na nesterilnoj crnici ne posjeduju sposobnost poticanja rasta pšenice. Kao i u prvom eksperimentu, K2 se pokazala većom na lesu. U odnosu na K2 niti jedan od uzoraka nije pokazao veće vrijednosti i pri tome poticaj rasta pšenice. Zanimljivo je da se kod tretiranih uzoraka kulturama ABC u svim slučajevima pokazalo da su veličine stabljika manje nakon 25 dana na tlu. Taj rezultat je različit od onoga nakon 5 dana klijanja gdje su veličine stabljika tretiranih sa ABC bile najveće. Rezultat smanjenja veličine stabljike može biti promjena uvjeta ili presađivanje samih biljaka na tlo u ovom slučaju. Kombinacija kultura AB se u prvom eksperimentu pokazala kao pozitivan utjecaj na veličinu stabljika i nakon 5 dana i nakon 25 dana uzgoja na crnici, dok se kultura C pokazala jednako tako pozitivnom na lesu. Na samu veličinu stabljika bakterije su mogle utjecati pomoću direktnih i indirektnih mehanizama, izlučivanjem biljnih hormona, fiksacijom dušika, obranom od biljnih patogena kao što je to zabilježeno kod vrsta *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus subtilis* (Sivasakth i sur., 2014). Kada promatramo udio svježe mase, nakon petog dana klijanja, vidljivo je da je svježa masa veća u slučaju tretmana Izosanom, tj. kod dezinficiranih sjemenki što nam potvrđuje pretpostavku o pozitivnom utjecaju dezinfekcije Izosanom na rast biljaka. U odnosu na dezinficirane sjemenke ili K1, kultura A posjeduje pozitivan utjecaj na povećanje svježe mase stabljika što se ne može tvrditi za veličinu stabljika. U određivanju suhe mase tvari, dezinficirane biljke također imaju veću masu od nedezinficiranih ali su svi uzorci tretirani bakterijskim kulturama u opadanju, osim AB (drastično opada masa uzorka C). Mjerenjem mase pepela, također je veća masa K1 od K2 te je AB u drastičnom skoku što nam govori da kombinacija tih kultura utječe na povećanje anorganske tvari u pšenici. Zabilježena je visoka

količina organske tvari u uzorku tretiranim sa kulturom A i B ali ne i u njihovoj kombinaciji. S obzirom na drugi eksperiment, također možemo potvrditi da kultura A potiče povećanje svježe mase biljke no rezultati u mjerenju suhe mase tvari te anorganske tvari se ne podudaraju. Kada promatramo rezultate svježe mase korijenja zaključujemo da C kultura u odnosu na kontrole potiče rast svježe mase. Također, jednako možemo zaključiti i za suhu masu tvari. Kod udjela pepela ili anorganske tvari rezultati se ne podudaraju stoga ne možemo izvesti nikakav zaključak o utjecaju bakterija na udio anorganske tvari korijena. 25 dana nakon rasta na crnici (u eksperimentu sa autoklaviranim tlom) možemo zaključiti da određene bakterijske kulture potiču rast pšenice u odnosu na kontrole K1 i K2 što je zabilježeno i u slučaju uzgoja pšenice na lesu. U slučaju svježe mase tvari zabilježen je veći rast u tretmanima C, AB, BC i AC što je različito u mjerenjima nakon 5. dana klijanja. To nam može reći da promjena uvjeta, tj. medija u kojem se biljke pšenice uzgajaju u kombinaciji sa tretmanima utječu na rast same biljke (Yegorenkova i sur., 2015). Ono što je ostalo jednako je utjecaj kombinacije kultura ABC na manju svježu masu, suhu masu i organsku tvar. Mjerenjem suhe mase tvari zaključujemo da C, AB i BC bitno povećavaju suhu masu tvari u odnosu na kontrole od čega C i AB također pozitivno utječu na količinu anorganske tvari u biljci. Masa organske tvari zabilježena je kao veća od kontrole u slučajevima tretmana B, C, AB i BC. To je sve zabilježeno kod uzoraka uzgajanih na sterilnoj crnici. Rezultati suhe mase biljaka na lesu nam govore da kulture B, C, AB i BC pozitivno utječu na povećan udio suhe mase tvari u uzorku kada ih usporedimo sa kontrolama, dok A, B, C, BC i ABC utječu pozitivno na udio anorganske tvari. U drugom eksperimentu (sa nesterilnim tlom) ne možemo definirati utjecaj bakterija na udio svježe, suhe, anorganske i organske tvari kod biljaka uzgajanih na crnici, te udio suhe i anorganske tvari kod pšenice uzgajane na lesu jer nisu zabilježene statistički značajne razlike. Pretpostavka je da bakterije koje su u sastavu samog tla djeluju na metabolizam inokulanata. Doduše, mjerenjem svježe mase uzorka nakon 25 dana uzgoja na lesu, u uzorcima B,C,AB,AC i ABC zabilježena je veća masa u odnosu na kontrole što se ne podudara sa mjerenjima na sterilnom tlu gdje ABC znatno utječe na smanjenje svježe mase biljaka.

Tablica 3. Grafički prikaz statistički značajnih razlika u mjerenjima nakon 25 dana, u sva tri ponavljanja, na sterilnom (S) i nesterilnom tlu (N)

TRETMANI	Veličina stabljika Crnica (S)	Veličina stabljika Les (S)	Svježa masa Crnica (S)	Svježa masa Les (S)	Suha masa Crnica (S)	Suha masa Les (S)	Anorganska tvar Crnica (S)	Anorganska tvar Les (S)	Organska tvar Crnica (S)	Organska tvar Les (S)
K1										
K2										
A										
B								+	+	
C		+			+		+	+	+	
AB	+				+		+	+	+	
BC		+						+	+	
AC							+			
ABC	-	-	-	-	-	-		-	-	-
TRETMANI	Veličina stabljika Crnica (N)	Veličina stabljika Les (N)	Svježa masa Crnica (N)	Svježa masa Les (N)	Suha masa Crnica (N)	Suha masa Les (N)	Anorganska tvar Crnica (N)	Anorganska tvar Les (N)	Organska tvar Crnica (N)	Organska tvar Les (N)
K1										
K2										
A			-							
B			-	+					-	
C	-	-		+						+
AB	-	-		+						
BC										
AC				+						
ABC										

6. GLAVNI REZULTATI

- Može se zaključiti da kombinacija bakterijskih kultura AB utječe na povećanje svježe mase tvari nakon duže vremena tj., 25 dana na crnici u sterilnim uvjetima. Bakterijska kultura C utječe stimulirajuće na suhu masu uzoraka uzgajanih na crnici te anorgansku i organsku tvar istih u sterilnim uvjetima. Također, bakterijska kultura C utječe na povećanje stabljika u svim mjerenim uzorcima na lesu te na povećanje anorganske tvari kod istih u sterilnim uvjetima. Kultura C također utječe na povećanje svježe mase u svim uzorcima uzgajanim na lesu u nesterilnim uvjetima. Kultura AB pozitivno utječe na svježu masu i organsku tvar kao i kod crnice. Bakterijske kulture AB i C djeluju destimulirajuće na veličine stabljika u nesterilnim uvjetima na crnici i lesu. Kombinacija bakterijskih kultura ABC djeluje destimulirajuće u svim mjerenjima na oba tla u sterilnim uvjetima, dok u nesterilnim ne posjeduje nikakav utjecaj.
- Najveća klijavost od 48,8 % je zabilježena u K2. Zaključuje se da dezinfekcija sjemenki sa Izosanom djeluje negativno na klijanje. Zabilježena je veća klijavost u drugom eksperimentu u tretmanu C stoga se zaključuje da kultura C potiče klijanje pšenice. Kombinacija kultura ABC destimulira klijanje pšenice sa najmanjim zabilježenim postotkom od 4,8%.
- Najveće veličine stabljika pšenice zabilježene su u tretmanima C i BC, u sterilnim uvjetima kod uzoraka uzgajanih na lesu, dok je u istim uvjetima kod uzoraka uzgajanih na crnici najveća veličina stabljika bila zabilježena u tretmanu AB. Tretmani C, BC i AB bilježe najmanje veličine stabljika pšenice u nesterilnim uvjetima kod oba tla. Znatno manje veličine stabljika su zabilježene kod uzoraka tretiranim bakterijskim kulturama ABC u sterilnim uvjetima.
- Tretman ABC bilježi najmanju svježu masu, suhu masu, anorgansku i organsku tvar u sterilnim uvjetima. Najveća suha masa, anorganska i organska tvar su u tretmanima C i AB u sterilnim uvjetima na obije vrste tla i tretmanima B, C, AB i AC u nesterilnim uvjetima na lesu.
- Najveći udio organske tvari imaju stabljike tretirane bakterijskim kulturama B, C, AB i BC, uzgajane na crnici u sterilnim uvjetima. Najveći udio anorganske imaju stabljike tretirane bakterijskim kulturama B, C, AB i BC, uzgajane na lesu u sterilnim uvjetima. Najmanji udio anorganske i organske tvari u sterilnim uvjetima ima tretman ABC.

7. ZAKLJUČAK

- S obzirom na mjerenje veličine stabljika, može se zaključiti da kombinacija bakterijskih kultura AB te kultura C utječu na povećanje srednje veličine stabljika nakon 25 dana uzgoja na crnici u sterilnim uvjetima.
- Bakterijska kultura C je također pokazala utjecaj na povećanje stabljika u svim mjerenim uzorcima na lesu u sterilnim uvjetima te na povećanje svježe mase tvari i organske tvari pšenice, u nesterilnim uvjetima na lesu.
- Bakterijska kultura A je pokazala pozitivan utjecaj na povećanje srednje veličine stabljika na uzorcima uzgajanim na lesu u sterilnim uvjetima.
- U slučaju lesa je i kultura AB pokazala pozitivan utjecaj na svježu masu nakon 25. dana i nakon 5. dana uzgoja u nesterilnim uvjetima.
- Istraživanja temeljena na odnosu biljaka i bakterija su od velike važnosti jer se te iste bakterije mogu koristiti kao biokontrolni organizmi te na taj način smanjiti unos umjetnih gnojiva u tlo.

8. LITERATURA

1. Afzal, A., Saleem, S., Iqbal, Z., Jan, G., Anwar Malik, F. M. i Asad, S. A. (2014). Interaction of Rhizobium and Pseudomonas with Wheat (Triticum aestivum L.) in Potted Soil with or Without P2O5. Journal of Plant Nutrition. 37:2144–2156. http://doi.org/10.1080/01904167.2014.920374
2. Angus, A. A. i Hirsch, A. M. (2013). Biofilm formation in the Rhizosphere: Multispecies interactions and implications for plant growth, in molecular microbial ecology of the Rhizosphere: Volume 1 i 2 (ed F. J. de Bruijn), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9781118297674.ch66 3.
3. Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., i Kjelleberg, S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and aacterial anvasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. Applied Environmental Ecology. 72: 3916–3923http://doi.org/10.1128/AEM.0302205
4. Deepa, C. K., Dastager, S. G., (2010). Isolation and caracterization of plant groeth promoting bacteriafrom non- rhizospheric soil and their effect on cowpea (Vigna uncguiculata (L.) Walp.) seedling growth. World Journal of Microbiology Biotechnology. 26:1233-40. doi: 10.1007/s11274-009-0293-y.
5. Egamberdieva, D. (2010). Growth response of wheat cultivars to bacterial inoculation in calcareous soil. Plant Soil and Environment, 56:570-573.
6. Elias, S., i Banin, E. (2012). Multi-species biofilms : living with friendly neighbors. http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x
7. Bernard R. Glick, "Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications," Scientifica, vol. 2012, Article ID 963401, 15 pages, 2012. doi:10.6064/2012/963401
8. Gopalakrishnan, S., Upadhyaya, H. D., Vadlamudi, S., Humayun, P., Vidya, M. S., Alekhya, G., Singh, A.,Vijayabharathi, R., Bhimineni, R. K., Seema, M., Rathore, A., Rupela, O. (2012). Plant growth-promoting traits of biocontrol potential bacteria isolated from rice rhizosphere. Springerplus. 1:71. doi: 10.1186/2193-1801-1-71.
9. Gosal, S. K., i Mehta, A. (2015). Plant-Growth- Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants. Vol 2. Molecular approach to study soil bacterial diversity. 359380. http://doi.org/10.13140/RG.2.1.2703.8241
10. Hol, W. H. G., Bezemer, T. M., i Biere, A. (2013). Getting the ecology into interactions between plants and the plant growth-promoting bacterium Pseudomonas 64 fluorescens. Frontiers in Plant Science. 4:81. doi: 10.3389/fpls.2013.00081

11. Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G., i Mora, M. L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by Rhizobacteria. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 10: 293–319.
12. Kapilan, R., i Thavaranjit, A. C. (2015). Promotion of vegetable seed germination by soil borne bacteria. Archives of Applied Science Research. 7: 17–20.
13. Nain, L., Rana, A., Joshi, M., Jadhav, S. D., & Kumar, D. (2010). Evaluation of synergistic effects of bacterial and cyanobacterial strains as biofertilizers for wheat. Plant and soil. 217–230. http://doi.org/10.1007/s11104-009-0247-z
14. Nezaraht, S., Gholami, A. (2009). Screening plant growth promoting Rhizobacteria for improving seed germination, seedling growth andyield of Maize. Pakistan Journal of Biological Sciences. 12:26-32
15. Palijan, G. (n.d.). Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Praktikum iz mikrobiologije : bakteriologija (interni radni materijal), 0–37.
16. Radan, Z. (2011). Wheat seeds (Triticum aestivum L.) growth promotion by bacterial auxin , in vitro. Agroekologija, ekološka poljoprivreda i zaštita okoliša, 97–101.
17. Saharan, B. S., i Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria : A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research. 1–30.
18. Sivasakthi, S., Usharani, G., i Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - Pseudomonas fluorescens and Bacillus subtilis : A review. African Journal of Agricultural Research. 9:1265–1277. http://doi.org/10.5897/AJAR2013.7914
19. Souza, R. De, Ambrosini, A., i Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genetics and Molecular Biology. 401–419.
20. Wu, C. H., Bernard, S. M., Andersen, G. L., i Chen, W. (2009). Developing microbeplant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. Microbial Biotechnology. 2:428–440.http://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00109.x
21. Yegorenkova, I. V, Tregubova, K. V, Burygin, G. L., i Matora, L. Y. (n.d.). Assessing the efficacy of coinoculation of wheat seedlings with the associative bacteria Paenibacillus polymyxa 1465 and Azospirillum brasilense Sp245. Canadian Journal of Microbiology. 1–22. http://doi.org/10.1139/cjm-2015-0647