

Dr hab. Piotr Krupa, prof. AJD

ul. Morcinka 6

42-620 Nakło Śląskie

SPRAWOZDANIE Z BADAŃ:

Opracowanie szczepionki zawierającej mikroorganizmy, która w połączeniu z nawozami na bazie mocznika i triazonu wzmacniają wzrost i rozwój roślin”

W ramach realizacji Projektu:

„Opracowanie innowacyjnej metody produkcji nawozów na bazie mocznika i triazonu”

WSTĘP

Mikroorganizmy efektywnie wpływają na wzrost i rozwój roślin. Wolno żyjące bakterie są zdolne do polepszenia wzrostu roślin za pomocą pośrednich i bezpośrednich mechanizmów. Kolonizując liście łodygi a w szczególności strefę przykorzeniową i korzenie modyfikują ich warunki wzrostowe. Może to mieć miejsce poprzez mineralizację związków organicznych, dostarczanie makro i mikroelementów, optymalizację pH środowiska, wytwarzanie metabolitów, składników odżywczych lub polepszających anabolizm kwasów organicznych (malonowy, cytrynowy), lotnych związków (CO₂, etylen). Postuluje się że poprzez modyfikację substancji nawozowych przyczyniają się do ich lepszego przyswajania przez rośliny. Mikroorganizmy w strefie ryzosferowej umownie podzielono na mikroorganizmy wywierające korzystny wpływ (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) lub niekorzystny wpływ (deleterious rhizosphere micoorganisms, DRMO) na rozwój rośliny. W warunkach naturalnych obie grupy mikroorganizmów pozostają w dynamicznej równowadze, co ma dodatni wpływ na wzrost rośliny poprzez ograniczenia do tej strefy mikroorganizmów pochodzących „z zewnątrz”, mogących zakłócić tę równowagę i prawidłowy rozwój rośliny (mikroorganizmy szkodliwe i fitopatogenne).

Odpowiednio dobrane mikroorganizmy wprowadzone wraz z substancjami nawozowymi na liście czy korzenie roślin przyczynią się do efektywniejszego wykorzystania makro i mikro elementów jednocześnie stymulując rośliny do obrony przed patogenami. Wypełniając nisze ekologiczną i konkurując o pokarm z patogenami będą zapewniać homeostazę co w konsekwencji odniesie korzystny skutek wzrostowy i zdrowotny roślin.

PRZEGLĄD LITERATURY

Bakterie wspomagające wzrost roślin

Dwie grupy bakterii wspomagają wzrost i rozwój roślin. Są to bakterie endofityczne i ryzosferowe bakterie promujące PGPR (ang. plant growth-promoting rhizobacteria).

Bakterie endofityczne to grupa mikroorganizmów wchodzących w specyficzne interakcje z rośliną. Mikroorganizmy kolonizują wnętrza zdrowych tkanek roślin wyższych nie powodując zmian chorobowych [Izumi i in., 2006. Bakterie endofityczne, ze względu na charakter związku z gospodarzem mogą być obligatoryjne (związane ściśle z roślinnym gospodarzem) lub fakultatywne (bytujące przez pewien czas). Najczęściej zasiedlanymi miejscami w tkankach są przestrzenie międzykomórkowe oraz ksylem (drewno) [Pawlik, Płociniczak, Piotrowska-Seget, 2015]. Bakterie obecne są w liściach, łodygach i nasionach [Pisarska, Pietr, 2014] jednak najliczniej występują w tkankach korzenia [Zemleduch, Tomaszewska, 2007]. Występowanie w określonych miejscach ma charakter stały lub cykliczny, wynikający z transportu przez apoplast lub system wiązki przewodzącej [Pawlik, Płociniczak, Piotrowska-Seget, 2015]. Zaproponowano podział endofitów na cztery grupy w zależności od sposobu stymulacji wzrostu gospodarza przez:

- (1) zwiększenie przyswajalności substancji odżywczych lub produkcja fitostymulatorów,
- (2) produkcję antybiotyków, biocydów, związków immunosupresyjnych
- (3) indukcja odporności
- (4) degradacja toksycznych związków organicznych i immobilizacja metali ciężkich.

Dla przykładu u trzciny cukrowej zasiedlonej przez *G.diazotrophicus* obserwuje się zwiększenie wiązania azotu atmosferycznego. Stwierdzono również zdolność bakterii do produkcji fitohormonów (IAA) oraz regulacji poziomu etylenu [Pisarska, Pietr, 2014]. Bakterie *P.fluorescens* i *B.subtilis* wykazują antagonizm w stosunku do patogenów grzybowych z rodziny *Fusarium* [Ziedan, 2006]. Zdolność tolerancji endofitów na metale ciężkie budzi duże zainteresowanie do zastosowania tych mikroorganizmów w procesach bioremediacji i fitoremediacji. Procesy metaboliczne przeprowadzane przez endofity indukują zmiany odczynu spowodowane produkcją kwasów, chelatowania żelaza i produkcją soli kwasów organicznych, modyfikując dostępność i toksyczność metali [Pisarska, Pietr, 2014]. Bakterie poprzez stymulację przyrostu biomasy roślin zdolnych do degradacji zanieczyszczeń organicznych w znacznym stopniu przyspieszają szybkość eliminacji substancji aromatycznych ze środowiska w fitodegradacji [Pawlik, Płociniczak, Piotrowska-Seget, 2015].

Druga grupa bakterii aktywnie kolonizujących korzenie roślin i promujących ich wzrost roślin to grupa bakterii ryzosferowych PGPR (*ang. plant growth-promoting rhizobacteria*). Mikroorganizmy te zasiedlają powierzchniowe tkanki korzeni lub bytują wolno w strefie korzeniowej [Figueiredo i in. 2010; Pocijowska, Natywa, Gałązka, 2013]. Stymulacja bakterii ryzosferowych opiera się na pośrednich i bezpośrednich mechanizmach. Stymulacja pośrednia dotyczy poprawy kondycji zdrowotnej roślinnego gospodarza poprzez biologiczną ochronę przed fitopatogenami (inhibicja wzrostu fitopatogenów i indukcja odporności na choroby), natomiast bezpośrednia działalność mikroorganizmów glebowych dotyczy wzbogacenia środowiska glebowego w substancje odżywcze, zwiększenie ich przyswajalności i produkcję fitohormonów [Rabęda, Woźny, Krzesłowska, 2011]

Mechanizmy stymulacji aktywowane są jednocześnie bądź w różnych fazach wzrostu rośliny [Figueiredo, Seldin, Araujo i in. 2010]. Działalność bakterii promujących może spowodować zmianę w morfologii korzeni, zwiększenie jego powierzchni chłonnej i tym samym zwiększenie przyswajalności składników mineralnych [Rabęda, Woźny, Krzesłowska, 2011]. U roślin inokulowanych *Azospirillum* występuje tendencja do zwiększonego pobierania przez roślinę pierwiastków biogennych z gleby [Pocijowska, Natywa, Gałązka, 2014]. Bakterie wpływają na poziom endogennych regulatorów wzrostu roślin dzięki możliwości produkcji fitohormonów. Auksyny (IAA) produkowane przez PGPR biorą udział w rozpoznawaniu i kontaktowaniu się z rośliną. Hormon IAA produkowany przez bakterie z tryptofanu wpływa na powstawanie korzeni bocznych. IAA stymuluje też poziom etylenu w komórkach roślinnych.

Pojawienie etylenu w tkankach wynika z pojawienia się czynników stresowych (działanie fitopatogenów, susza, metale ciężkie). Obecność u drobnoustrojów deaminazy ACC wpływa korzystnie na rośliny z uwagi na obniżenie poziomu etylenu i zwiększeniu odporności na niekorzystne warunki. Produkcja giberelin wspomaga kiełkowanie nasion, przyrost łodygi, stymuluje kwitnienie i wzrost korzenia [Pociejska, Natywa, Gałązka, 2014].

Grzyby promujące wzrost roślin

Najczęściej grzyby rodzaju *Trichoderma* wymieniane są jako czynniki hamujące lub ograniczające występowanie fitopatogenów. Grzyby z tego rodzaju są silnymi antagonistami mikroorganizmów pasożytniczych z rodzaju: *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Gaeumannomyces*, *Thielaviopsis*, *Verticillium*, *Botrytis*, a także licznych bakterii i wirusów (Howell 2003, Benitez 2004). W ostatnich latach notuje się wzrost zainteresowania tymi mikroorganizmami, które mogą być komponentami w preparatach ochrony roślin (Alfano i wsp. 2007; Ebtsam i wsp. 2009; Świerczyńska i wsp. 2011). Obecnie na rynku *Trichoderma spp.* jest jednym z najbardziej popularnych rodzajów grzybów wykorzystywanym jako tzw. grzyby poprawiające wzrost roślin (PGPF - plant growth promoting fungus) (Chetan i wsp. 2014).

MATERIAŁY I METODYKA

Materiał badawczy stanowiły szczepy bakterii i grzybów wyizolowane z roślin wyróżniających się witalnością i wzrostem w porównaniu z roślinami hodowanymi w tych samych warunkach i pochodzących z tej samej partii nasion. Roślinami testowymi był pomidor szklarniowy rosnący na plantacji doświadczalnej. Bakterie i grzyby izolowano z liści, łodyg i korzeni (ryzosfera). Dokonując posiewów redukcyjnych uzyskano 47 szczepów bakterii i 8 szczepów grzybów. Analiza mikroskopowa wykazała 30 % laseczek Gram dodatnich, 20% pałeczek gram ujemnych i 50 % form gram ujemnych pleomorficznych. W warunkach laboratoryjnych dokonywano selekcji uzyskanych szczepów wykonując doświadczalne posiewy na podłoża agarowe. Sprawdzano szybkość wzrostu i wytrzymałość bakterii na zmianę temperatury. Przeżywalność w roztworach nawozów na bazie mocznika i triazonu. Wybrano 6 szczepów bakterii: 07, 20, 22, 31, 44, 46 i dwa szczepy grzybów, które namnożono w pożywce płynnej i po zmieszaniu traktowano jako szczepionkę. Z wyizolowanych na pożywce ziemniaczanej grzybów wybrano szczepy G1 i G6 należące do rodzaju *Trichoderma*. Szczepionkę wprowadzano do roztworu roboczego nawozu tak by ich liczebność była nie mniejsza niż 1×10^8

cfu. Nawozem spryskiwano wcześniej wyprowadzone hodowle wazonowe pomidorów w następujących wariantach:

1 rośliny bez oprysku – kontrola

2 rośliny opryskane nawozem

3 rośliny opryskane nawozem z szczepionką bakteryjną.

Wzrost roślin odbywał się w kontrolowanych warunkach fitotronowych.

WYNIKI

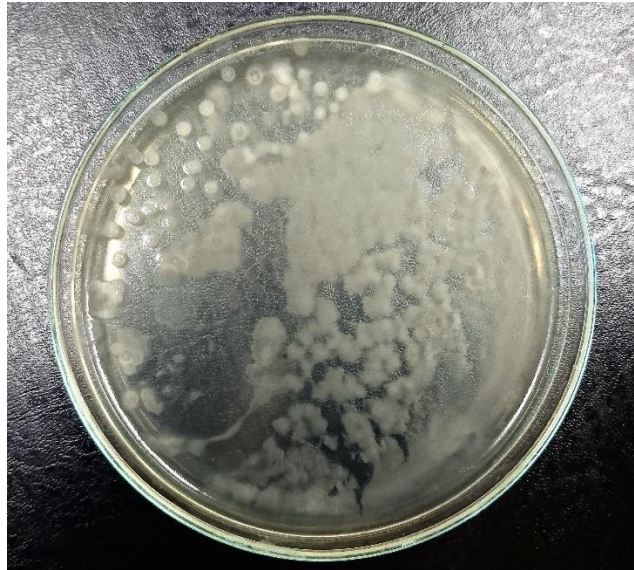
Mikroorganizmy zostały tak dobrane by nie następował wzrost form przetrwalnych w stężonym roztworze nawozowym (fot.1)



Fot.1. Wzrost mikroorganizmów wspomagających w podłożach płynnych.

Kolba prawa -brak wzrostu w stężonym roztworze nawozu triazonowego

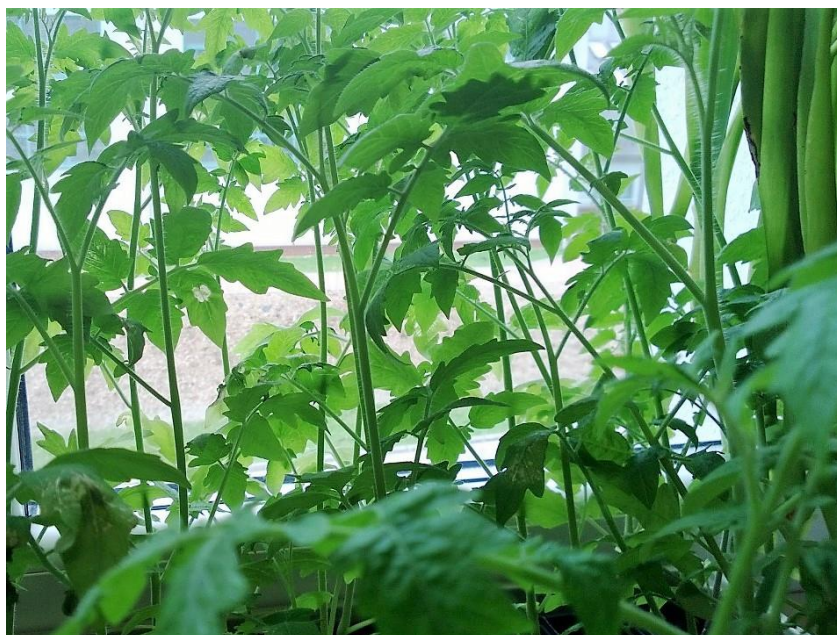
Po natrysku na podłoże – zapewniające warunki wzrostowe, formy przetrwalne kiełkują i rozmnażają się dając kolonie Fot.2. i 3.



**Fot.2 Wzrost mikroorganizmów wspomagających na podłożu agarowym.
Widoczne kolonie bakterii i grzyba rodzaju *Trichoderma***



Fot.3. Wzrost grzyba rodzaju *Trichoderma* na pożywce ziemniaczanej



Fot.4. Hodowla testowa do badań skuteczności działania preparatu nawozowego zawierającego mikroorganizmy wspomagające.

Z hodowli wazonowej losowo pobierano 10 roślin z każdego wariantu mierzono ich wysokość od poziomu gleby. Wyniki porównawcze zamieszczone są w Tab.1.

Tab.1 Test 10 roślin

Lp	Wysokość roślin [cm]	
	Kontrola	Rośliny+ nawóz
1	12	15
2	11	16
3	11	12
4	11	11
5	10	13
6	12	15
7	12	16
8	10	12
9	12	16
10	11	12

Wnioski

1. Odpowiednio wyselekcjonowane bakterie i grzyby mogą być wprowadzane z nawozem triazonowym.
2. Mikroorganizmy wspomagające dodatnio wpływają na wzrost roślin doświadczalnych

3. Obserwuje się zwiększenie powierzchni chłonnej korzeni.
4. Traktowane nawozem triazonowym z mikroorganizmami rośliny, cechuje lepszy rozwój i mniejsza ilość zmian nekrotycznych liści.

Literatura

- 1** Izumi H., Anderson I. C., Alexander I. J., Killham K., Moore E. R. B. 2006. Endobacteria in some ectomycorrhiza of Scots pine (*Pinus sylvestris*). FEMS Microbiology Ecology 56: 34–43
- 2** Pawlik M., Płociniczak T., Piotrowska-Seget Z. 2015. Bakterie endofityczne i ich znaczenie w mikrobiologii środowiskowej, medycynie i przemyśle. Postępy Mikrobiologii 54(2): 115-122
- 3** Pisarska K., Pietr S. J. 2014. Bakterie endofityczne – ich pochodzenie i interakcje z roślinami. Postępy mikrobiologii 53(2): 141-151
- 4** Zemleduch A., Tomaszewska B. 2007. Mechanizmy, procesy i oddziaływania w fitoremediacji. Kosmos 56(2/3): 393-407
- 5** Ziedan E.H.E. 2006. Manipulating Endophytic Bacteria for Biological Control to Soil Borne Diseases of Peanut. Journal of Applied Sciences Research 2(8): 497-502
- 6** Figueiredo M. V.B., Seldin L., Araujo F. F., Ramos Mariano R. L. 2010. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications 21-43
- 7** Gałązka A. 2013. Charakterystyka glomalin i oddziaływania różnych systemów uprawy na ich zawartość w glebie. Polish Journal of Agronomy 15: 75-82
- 8** Rabęda I., Woźny, Krzesłowska M. 2011. Bakterie i grzyby mikoryzowe zwiększają wydajność roślin w fitoremediacji metali śladowych. Kosmos 60(3/4): 423-433
- 9** Pocijowska M., Natywa M., Gałązka A. 2014. Stymulacja wzrostu roślin przez bakterie PGPR. Kosmos 63(4): 603-610

- ~~10~~ **HOWELL C.R. 2003.** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.*, 87 s. 4 – 10.
- ~~11~~ **BENÌTEZ T., RINCÒN A.M., LIMÒN M.C., CODÒN A.C. 2004.** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7 s. 249 – 260.
- ~~12~~ **ALFANO G., LEWIS IVEY M.L.C., CAKIR C., BOS J.I.B., MILLER S.A., MADDEN L.V., KAMOUN S., HOITINK H.A.J. 2007.** Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum*. *Phytopathology* 97 s. 429-437
- ~~13~~ **EBTSAM M. M., ABDEL-KAWI K.A., KHALIL M.N.A. 2009.** Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents against *Fusarium solani* on tomato plants. *Egypt. J. Phytopathol* 37 (1). s.47-57.
- ~~14~~ **ŚWIERCZYŃSKA I., KORBAS M., HOROSZKIEWICZ-JANKA J., DANIELEWICZ J. 2011.** Antagonistyczne oddziaływanie *Trichoderma viride* na patogeny z rodzaju *Fusarium* w obecności biopreparatów. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*. 56 (4) s. 157-160.
- ~~15~~