

Potencijal rizosfernog mikrobioma u prilagodbi poljoprivrede klimatskim promjenama

PERSPIRE

KK.05.1.1.02.0001

Shema za jačanje primijenjenih istraživanja za mjere prilagodbe
klimatskim promjenama

Potencijal rizosfernog mikrobioma u prilagodbi poljoprivrede klimatskim promjenama



3 ekosistemske komponente:

- Mikrobiom
- Biljka
- Tla

RP3	UTJECAJ NA BIORAZNOLIKOSTI I FUNKCIONIRANJE MIKROBIOMA TLA	
RP4	UTJECAJ NA PRINOS BILJKE, MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE TE RAZINU STRESA	
RP5	UTJECAJ NA PONAŠANJE I BIORAZGRADIVOST PESTICIDA	
RP6	UTJECAJ NA POJAVU I ŠIRENJE ANTIBIOTIČKE OTPORNOSTI	
RP7	IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA KORISNIH MIKROORGANIZAMA ADAPTIRANIH NA EKSTREMNE VREMENSKE DOGAĐAJE	
RP8	UTJECAJ NA BILJNO-HRANIDBENI KAPACITET TLA I MINERALNI SASTAV POLJOPRIVREDNE KULTURE	



Učinci poplava na bakterije koje svojim svojstvima potiču rast biljaka eng. Plant-Growth-Promoting

Bakterije koje svojim svojstvima potiču rast biljaka (eng. **Plant-Growth-Promoting Bacteria, PGPB**), rastu u, na i oko tkiva korijena te štite biljku domaćina od patogena i abiotičkih stresova putem različiti mehanizama:



- (i) sinteza fitohormona koje apsorbiraju biljke,
- (ii) fiksacija atmosferskog dušika
- (iii) mobilizacija drugih biljnih hranjiva (P i K) stavljajući ih na raspolaganje biljci,
- (iv) zaštita biljaka u stresnim uvjetima, čime se suprotstavlja negativnim učincima stresa ili
- (v) obrana od biljnih patogena, smanjenje bolesti ili oštećenja biljaka.

PGPB se koriste diljem svijeta dugi niz godina kao bioinokulat za poboljšanje prinosa usjeva, kvalitetu i plodnost tla te doprinose održivijoj poljoprivredi.

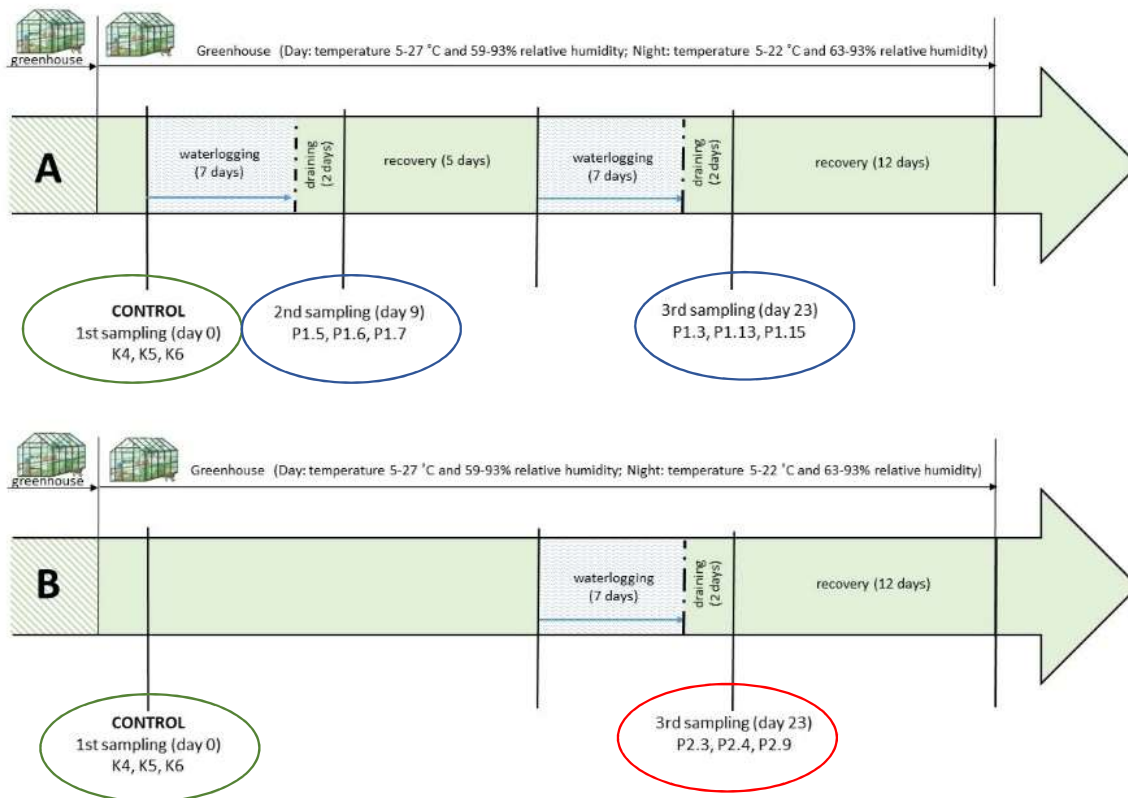


Cilj je vidjeti kako će poplavni uvjeti kao dio predviđenih klimatskih promjena doprinijeti promjeni strukture PGPB zajednice te promjeni korisnih svojstava koja posjeduju.



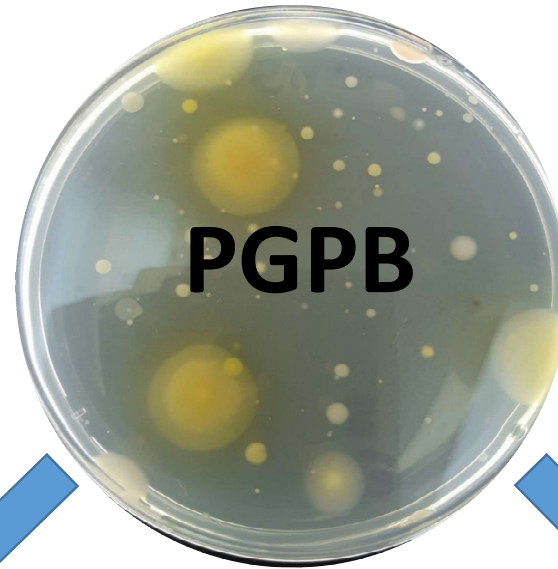
Model A- dvije poplave

Model B- jedna poplava u kasnijem stadiju rasta biljke



185 BAKTERIJSKIH IZOLATA OD KOJIH:

- (i) **45 IZOLATA IZ KONTROLA**, označenih s K (K4, K5, K6)
- (ii) **94 IZOLATA IZ MODELA A**, marked with P1 (P1.5, P1.6, P1.7, P1.3, P1.13, P1.15)
- (iii) **46 IZOLATA IZ MODELA B**, marked with P2 (P2.3, P2.4, P2.9)



STRUKTURA MIKROBNE
ZAJEDNICE

KORISNA PGP SVOJSTVA U NEKOLIKO SKUPINA
ODREĐENA UZGOJNIM METODAMA U/NA
MEDIJIMA S DODATKOM SUPSTRATA ČIJE
ISKORIŠTAVANJE JE VIZUALIZIRANO PROMJENOM
BOJE ILI ZONOM RAZGRADNJE

Model A- dvije poplave

Model B- jedna poplava u kasnijem stadiju rasta biljke

KOMPLEKSNA BAKTERIJSKA ZAJEDNICA OD 20 BAKTERIJSKIH RODOVA KOJI SE I UOBIČAJENO NALAZE U TLU:

Bacillus 22% ukupne zajednice

Peribacillus 16% ukupne zajednice

Pseudomonas 28% ukupne zajednice

Stenotrophomonas 15% ukupne zajednice

Arthrobacter

Priestia

Brevibacillus

Brevibacterium

Chryseobacterium

Ensifer

Enterobacter

Flavobacterium

Lysinibacillus

Microbacterium

Micrococcus

Oerskovia

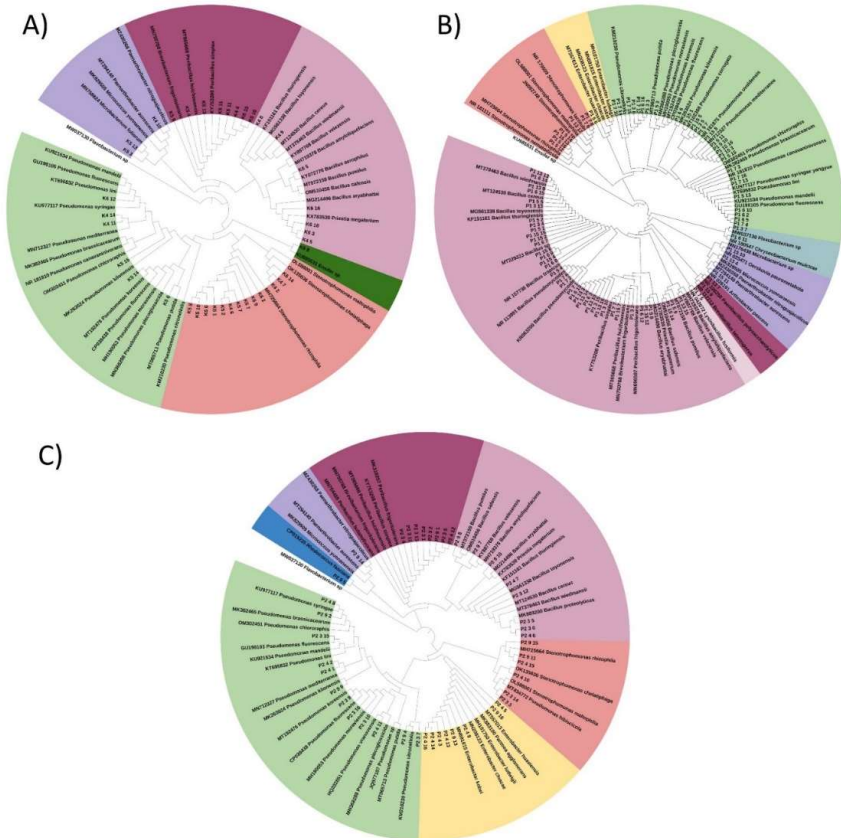
Paenarthrobacter

Paenibacillus

Pantoea

Rhodococcus

ostali rodovi predstavljaju 0,6- 4% ukupne zajednice



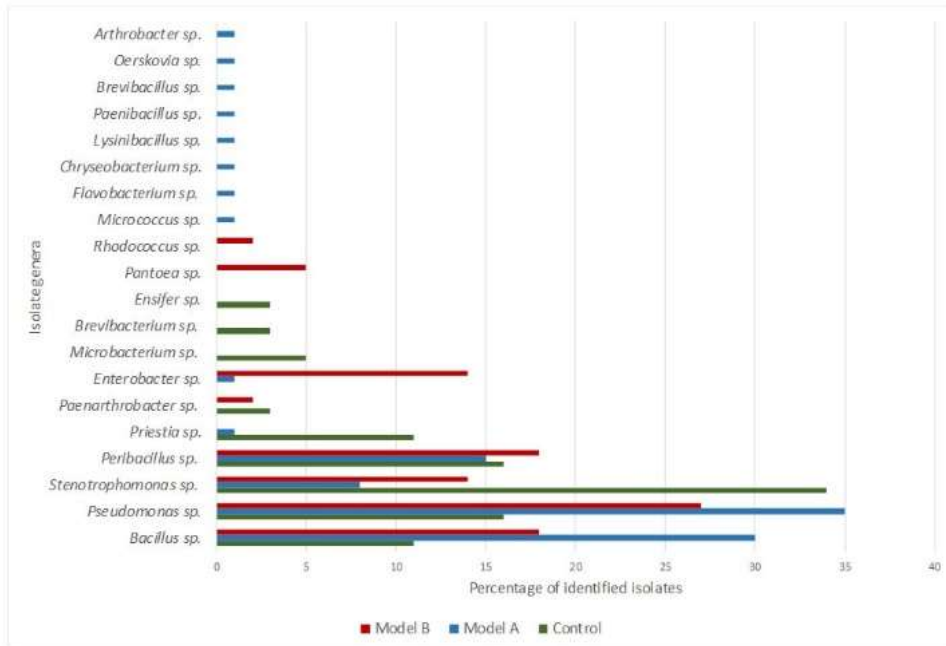
KOJI PRIPADAJU KOLJENIMA:

Actinobacteria

Bacteroidetes

Firmicutes

Proteobacteria



4 DOMINANTNA RODA

Peribacillus

Stenotrophomonas ↓

Pseudomonas ↑

Bacillus ↑

Model A- dvije poplave

Model B- jedna poplava u kasnijem stadiju rasta biljke

- Istraživanje je pokazalo da **poplave uzrokuju promjene u strukturi** PGP bakterijske zajednice kao i njihova korisna svojstva za biljku.
- „kostur” **mikrobne zajednice je sačuvan i u poplavnim uvjetima.**
- Poplava je utjecala na **smanjenje brojnosti *Stenotrophomonas* populacije** u poplavnim uvjetima čiji uzrok može biti slabija flagelarna pokretljivost ili drugi faktori koji ometaju kolonijalizaciju biljnog tkiva.
- S druge strane poplavni uvjeti su utjecali **pozitivno na *Pseudomonas* i *Bacillus* populaciju** koje su bogate vrstama s PGP svojstvima, njihovo preživljavanje može biti povezano s produkcijom endospora ili enzima koje luče.

Model A- dvije poplave

Model B- jedna poplava u kasnijem stadiju rasta biljke

Arthrobacter

Priestia

Brevibacillus

Brevibacterium

Chryseobacterium

Ensifer

Enterobacter

Flavobacterium

Lysinibacillus

Microbacterium

Micrococcus

Oerskovia

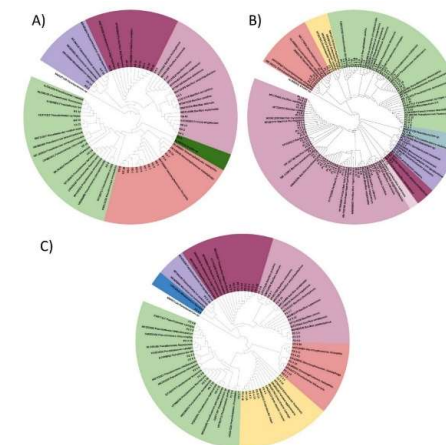
Paenarthrobacter

Paenibacillus

Pantoea

Rhodococcus

- *Brevibacterium*, *Ensifer*, *Micrbacterium* rodovi nestaju u poplavnim uvjetima
- *Pantoea*, *Rhodococcus* i *Enterobacter* rodovi se pojavljuju isključivo u uvjetima s jednom poplavom
- *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Oerskovia* i *Arthrobacter* se pojavljuju u uvjetima s dvije poplave



ostali rodovi predstavljaju 0,6- 4% ukupne zajednice

Model A- dvije poplave

Model B- jedna poplava u kasnijem stadiju rasta biljke



Solubilizacija fosfora



Proizvodnja organskih kiselina

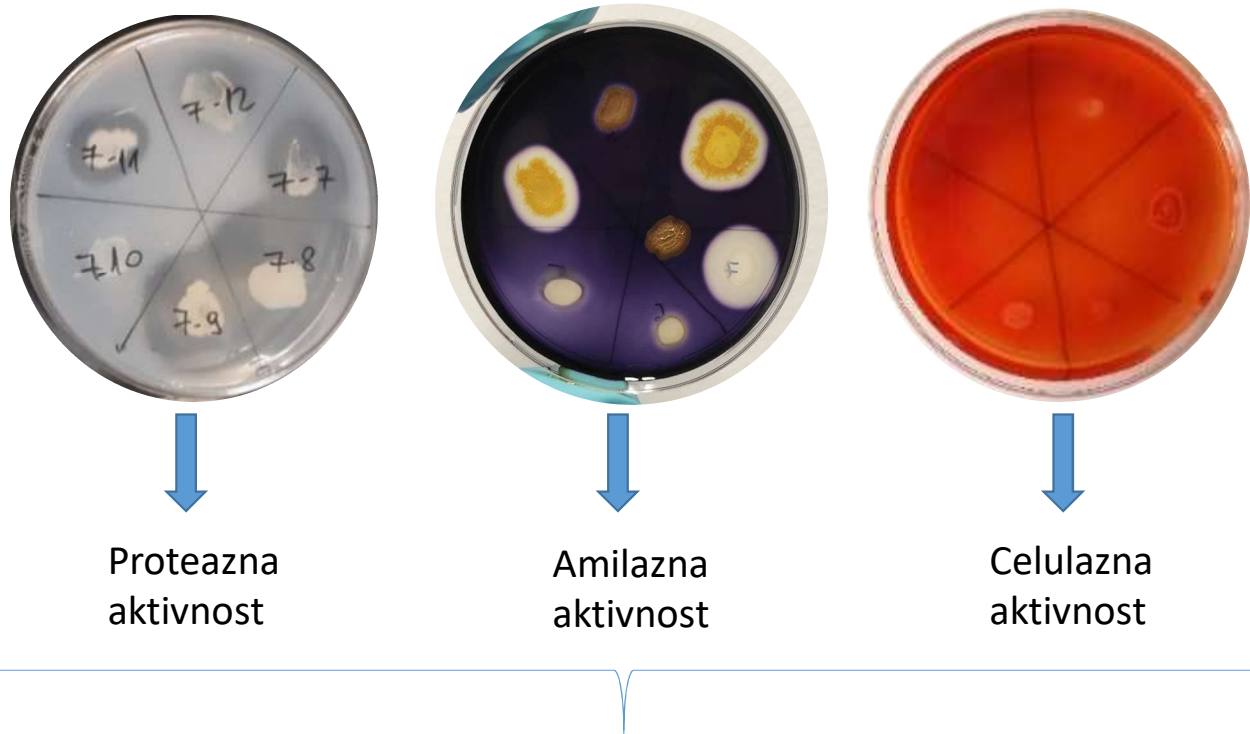


Solubilizacija kalija

NUTRITIVNA GRUPA SVOJSTAVA

Model A- dvije poplave

Model B- jedna poplava u kasnijem stadiju
rasta biljke



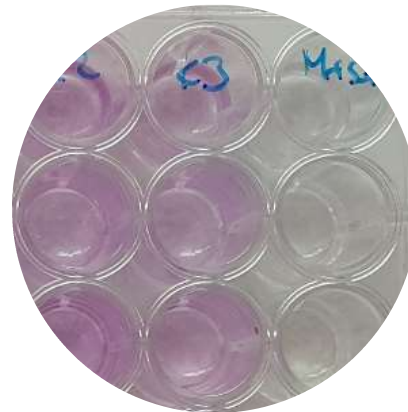
BIOKONTROLNA GRUPA SVOJSTAVA

Model A- dvije poplave

Model B- jedna poplava u kasnijem stadiju
rasta biljke



Proizvodnja
egzopolisaharida

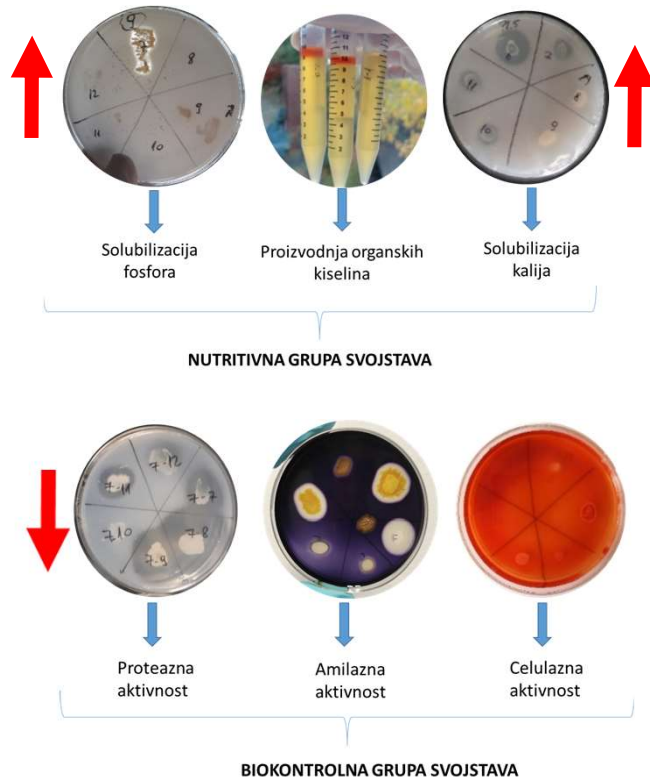


Formiranje
biofilma

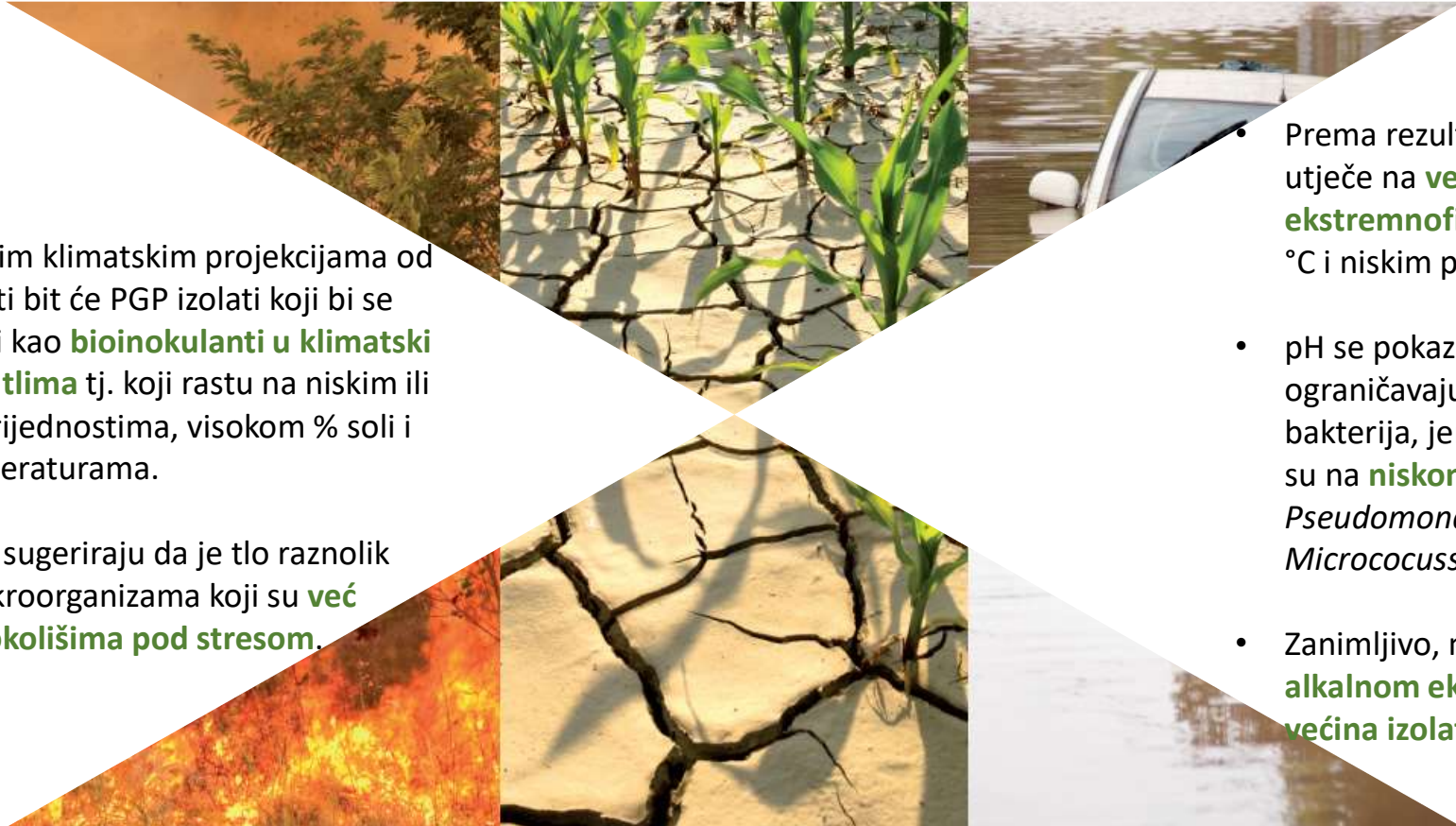


Rast na različitim temperaturama,
zaslanjenosti i pH vrijednosti

GRUPA SVOJSTAVA KOJA OMOGUĆAVA PREŽIVLJAVANJE U STRESNIM UVJETIMA

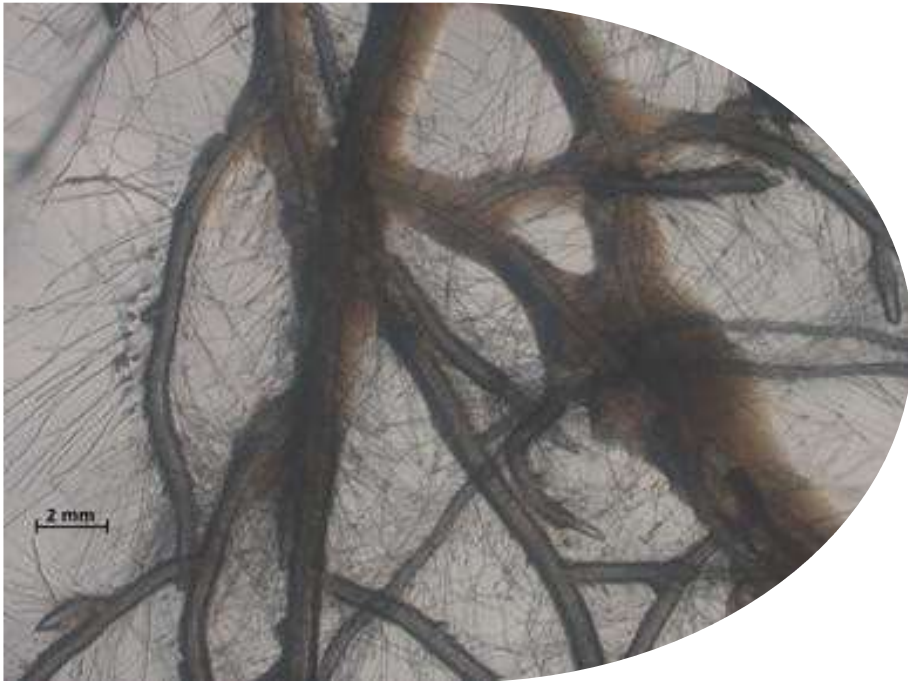


- Rezultati pokazuju da poplava **utječe na PGPB svojstva** što može voditi do promocije ili redukcije biljnog rasta i razvoja
- **Dostupnost** hranjiva **P i K se može povećati** u poplavnim uvjetima
- **Obrana od patogena** (testirana proteaznom aktivnošću) može biti **reducirana u poplavnim uvjetima** dok je amilazna aktivnost reducirana u uvjetima jedne poplave i povećana u uvjetima dvije poplave- utjecaj na oboljenje biljke pod poplavnim uvjetima?
- Bakterije koje pokazuju celulaznu aktivnost i proizvodnju amonijaka **nisu reagirale na poplave**



- Prema budućim klimatskim projekcijama od velike važnosti bit će PGP izolati koji bi se mogli koristiti kao **bioinokulanti u klimatski opterećenim tlima** tj. koji rastu na niskim ili visokim pH vrijednostima, visokom % soli i visokim temperaturama.
- Naši rezultati sugeriraju da je tlo raznolik rezervoar mikroorganizama koji su **već prilagođeni okolišima pod stresom**.

- Prema rezultatima čini se da poplava utječe na **veću pojavu ekstremofilnijih bakterija** (rast na 50 °C i niskim pH 4).
- pH se pokazao najvećim ograničavajućim faktorom za rast bakterija, jer samo 6% svih izolata rasli su na **niskom pH 4** - *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* ili *Micrococuss*.
- Zanimljivo, na **pH 11**, kao **izrazito alkalnom ekstremnom okruženju**, **većina izolata dobro raste**.



Kolonizacija korijena i stvaranje biofilma oko korijena
Arabidopsis thaliana sojem 5B5

Preuzeto:

<file:///C:/Users/User/Downloads/Kielaketal.2016.pdf>

- U poljoprivredi je važna učinkovitost PGPB u kolonizaciji korijena biljaka i u razvoju zaštitne strukture - **biofilma**
- Biofilm je "višestanična strukturirana zajednica" koja omogućuje bakterijama da prežive u raznim stresnim uvjetima, štiti biljke od patogena, poboljšava usvajanje hranjivih tvari koje se oslobađaju u okolišu biljaka i olakšava korisne interakcije između bakterija i biljaka
- U našem istraživanju samo 15 sojeva, koji pripadaju rodovima *Stenotrophomonas*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Enterobacter*, pokazalo je **jaku sposobnost stvaranja biofilma**.
- Gotovo svi sojevi potječu iz **poplavnih tla**

U konačnici naše istraživanje dovelo je do otkrića **11 izolata koje smo odabrali kao potencijalne bioinokulante** koji bi se mogli koristiti za ublažavanje negativnih učinaka poplavlivanja i provedbu daljnjih istraživanja.

7 izolata

4 izolata

Izolirani većinom iz jedne poplave

Izolirani u jednakom omjeru iz jedne i dvije poplave

Enterobacter
(P2.4-3, P2.4-9, P2.4-16)

Bacillus
(P2.4-7, P1.15-6)

Stenotrophomonas
(P2.4-10)

Pantoea (P2.9-13).

Bacillus
(P1 15-12, P1 15-14,
P2 9-7, P2 9-8)



pokazali su većinu ispitanih korisnih svojstava, ali su također bili otporni na barem jedan od ispitanih ekstremnih abiotičkih stresova i imali su dodatnu sposobnost razvijanja biofilma.

Druga skupina se sastojala od "ekstremofila", koji su pokazali manje korisna svojstva, ali su mogli rasti u ekstremnim uvjetima

DNA

EKSTRAKCIJA

Quick - DNA Miniprep
Plus Kit
Zymo research



SEKVENCIRANJE



16S rRNA V4 region - **Bakterije**
ITS2 region - **Gljive**

✓ sekvence su analizirane u Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2' (QIIME2) softveru

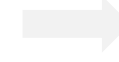
DNA
EXTRACTION
Quick - DNA Miniprep
Plus Kit
Zymo research



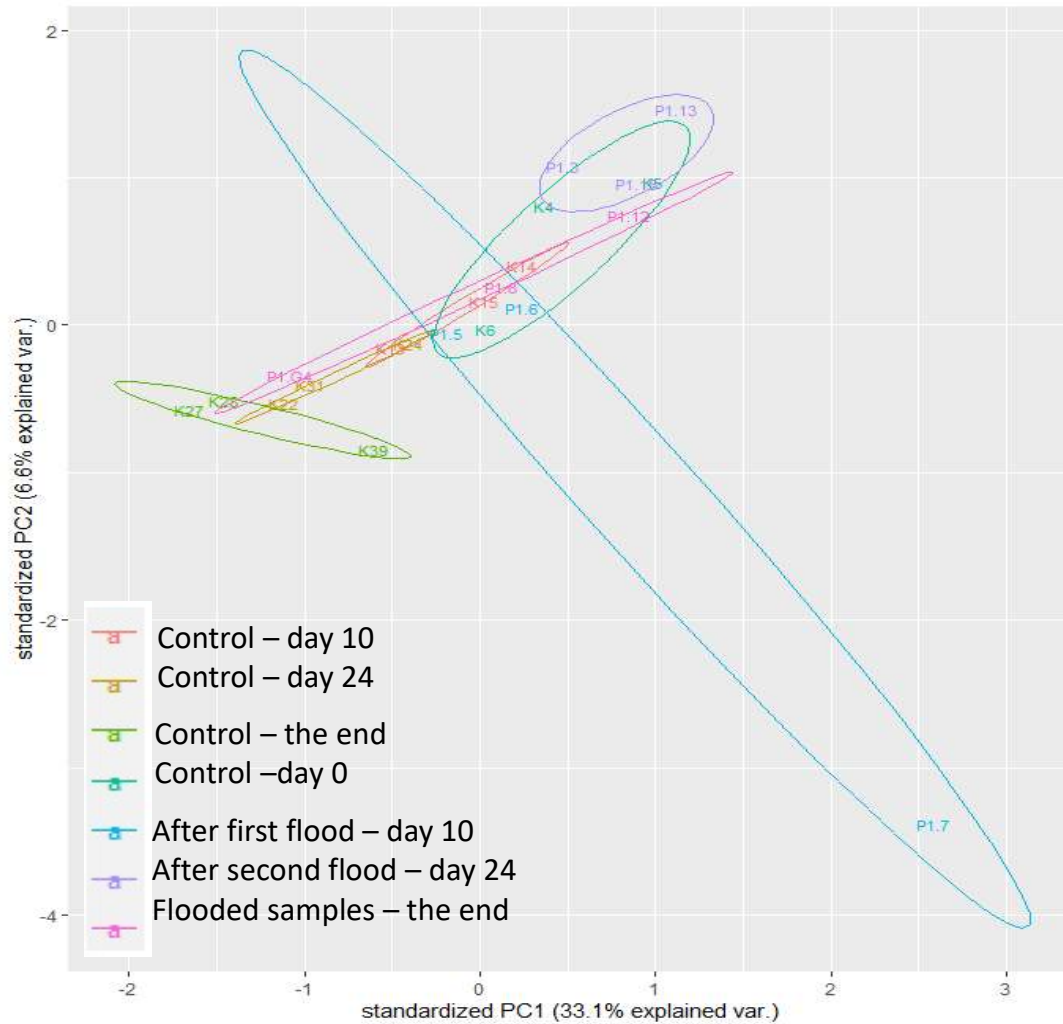
SEQUENCING



16S rRNA V4
regija - Bakterije



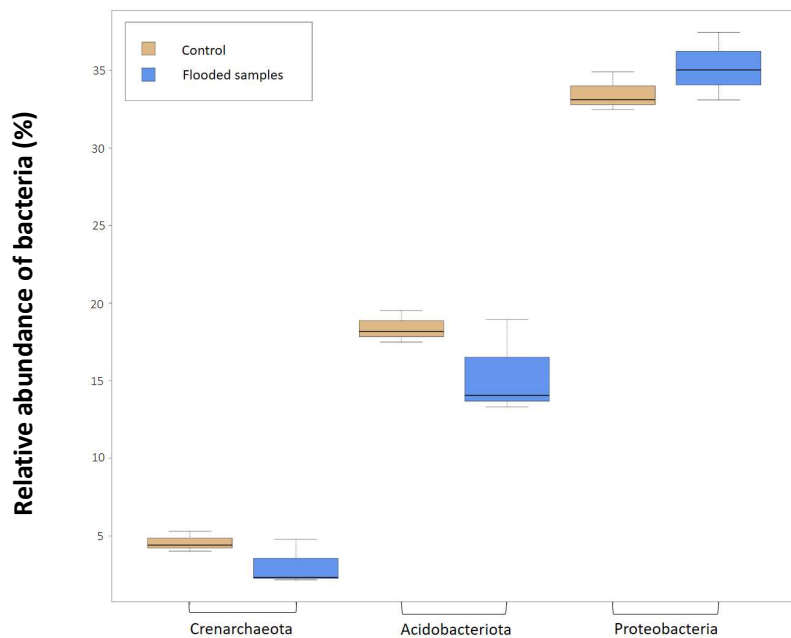
✓ sequences were analyzed in 'Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2' (QIIME2) software



- PCA pokazuje da:
- poplava uzrokuje promjene u strukturi bakterijske zajednice u tlu
 - nakon uklanjanja stresora zajednica se oporavlja
 - jedna i repetitivne poplave različito strukturiraju zajednicu

Model A – dvije poplave

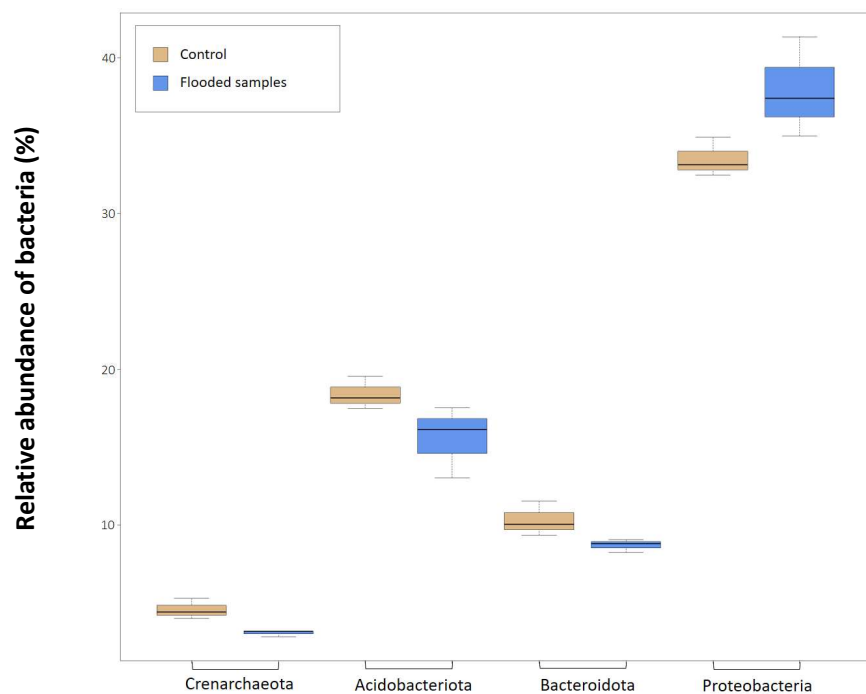
Nakon druge poplave



3 glavna bakterijska koljena koja pokazuju promjene u svojoj brojnosti u korelaciji s dvije poplave (*Crenarchaeota*, *Acidobacteriota*, *Proteobacteria*)

Model B - 1 flood at the later growth stage

Jedna poplava u kasnijem stadiju



4 glavna bakterijska koljena pokazuju promjene u njihovoj brojnosti u korelaciji sa jednom poplavom (*Crenarchaeota*, *Acidobacteriota*, *Proteobacteria* i *Bacteroidota*)

DNA
EXTRACTION
Quick - DNA Miniprep
Plus Kit
Zymo research



SEQUENCING

ITS2 regija - Fungi

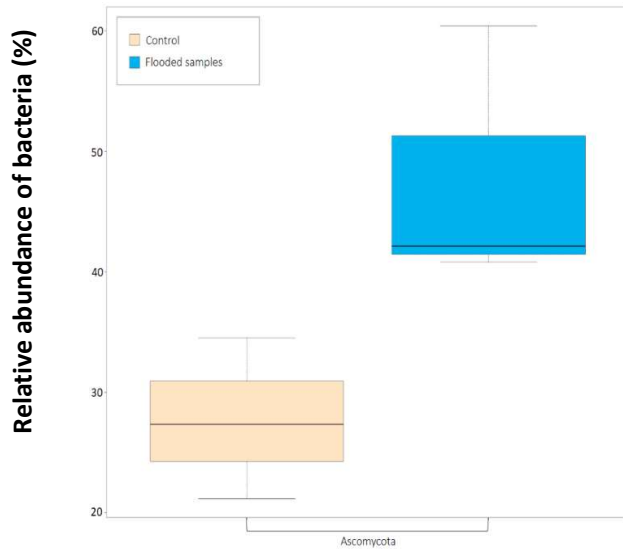
16S rRNA V4 region - Bacteria

✓ sequences were analyzed in 'Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2' (QIIME2) software

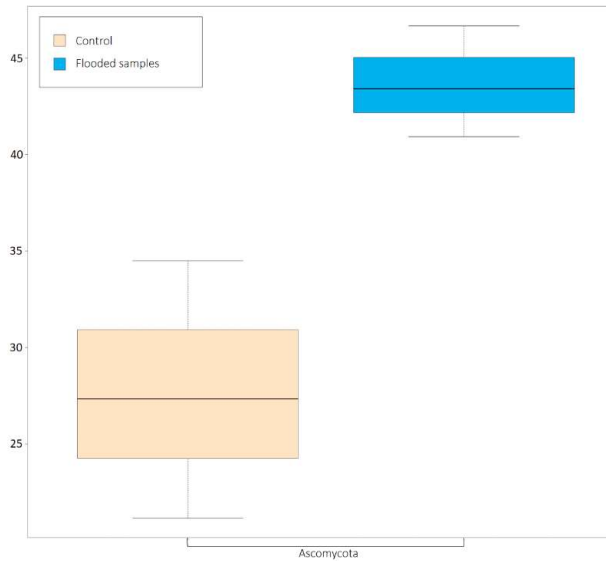
Model A – dvije poplave

Model B – jedna poplava u kasnijoj fazi rasta biljke

Nakon dvije poplave



Nakon poplave



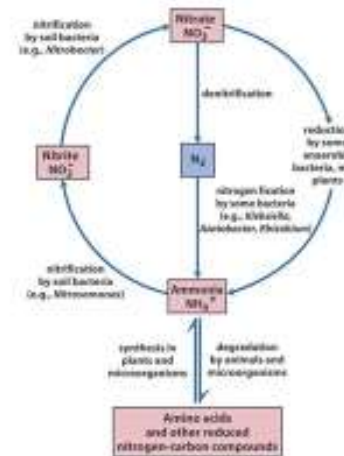
Ascomycota
pokazuje promjene u
svojoj brojnosti u korelaciji
sa stresom od dvije
poplave i jedne poplave

Domaine
16 S Bacteria
16 S Archaea
ITS
 Functional genes

qPCR analizom odredili smo utjecaj poplava na promjene u brojnosti ukupnih populacija bakterija, arheja i gljiva te na funkcionalne gene uključene u ciklus dušika.

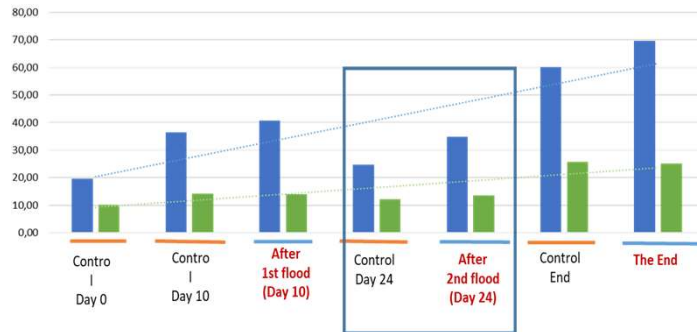
The Nitrogen Cycle

- | | |
|--|---|
| <i>nifH</i> | • Nitrogen Fixation
$N_2 \rightarrow NH_4^+$ |
| <i>amoA</i> AOA, <i>amoA</i> AOB | • Nitrification
$NH_3 \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$ |
| <i>nosZ</i> cl and <i>cll</i>, <i>nirK</i>, <i>nirS</i> | • Denitrification
$NO_2^- \text{ \& } NO_3^- \rightarrow N_2$ |
| | • Nitrogen Assimilation
$NH_4^+ \rightarrow \text{Organic nitrogen}$ |
| | • Deamination
Organic nitrogen $\rightarrow NH_4^+$ |



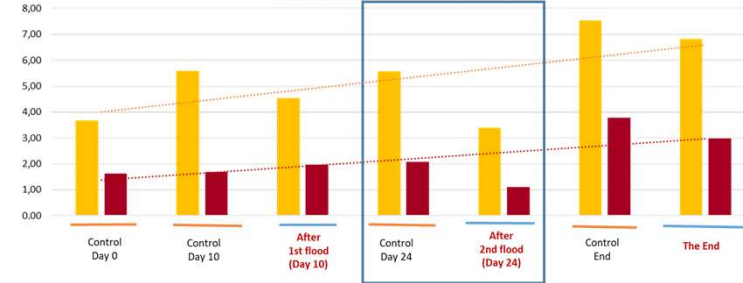
Model A – dvije poplave

nirK/16S (%) and nirS/16S (%)

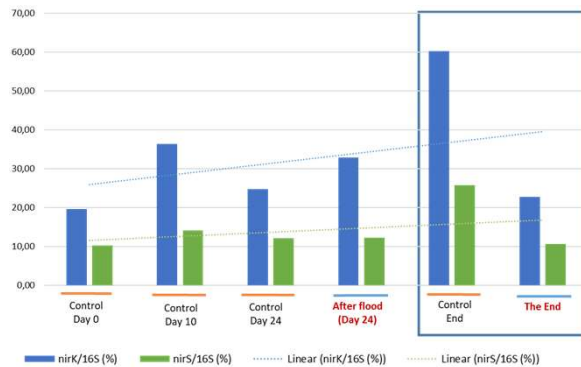


Model A – dvije poplave

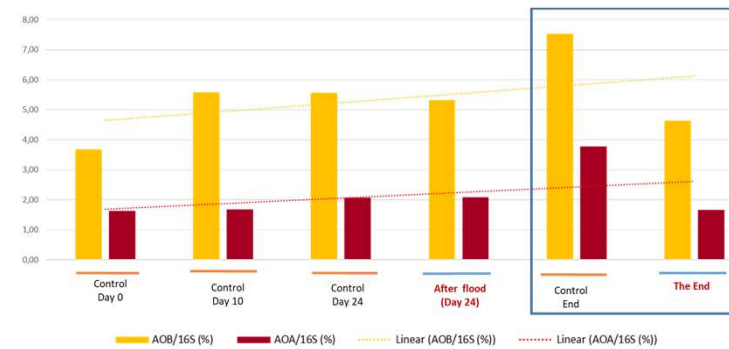
AOB/16S (%) and AOA/16S (%)



Model B – jedna poplava u kasnijoj fazi rasta biljke



Model B – jedna poplava u kasnijoj fazi rasta biljke

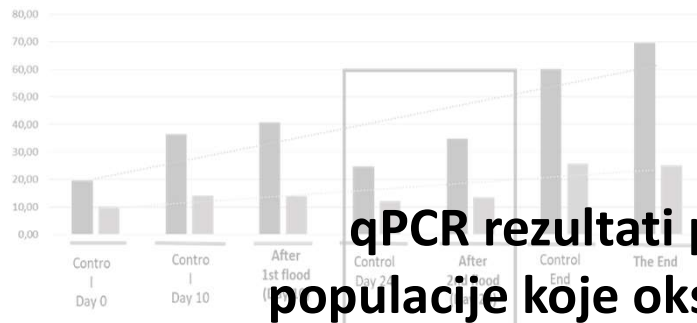


Model A- dvije poplave

Model B- jedna poplava u kasnijem stadiju rasta biljke

Model A – dvije poplave

nirK/16S (%) and nirS/16S (%)



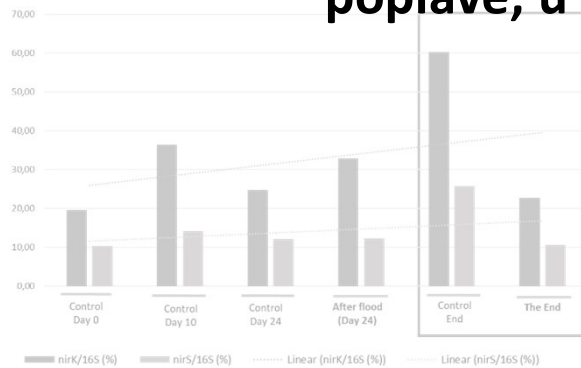
Model A – dvije poplave

AOB/16S (%) and AOA/16S (%)

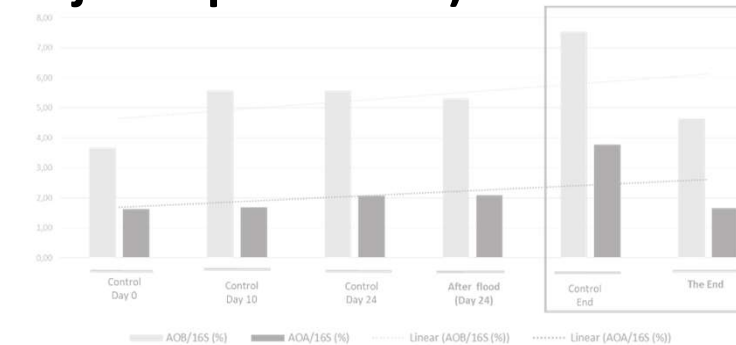


qPCR rezultati pokazuju da su denitrifikatori i populacije koje oksidiraju amonij (bakterije i arheje) pogođene poplavama (u modelu A nakon druge poplave; u modelu B na kraju eksperimenta)

Model B – jedna poplava u kasnijoj fazi rasta biljke



Model B – jedna poplava u kasnijoj fazi rasta biljke



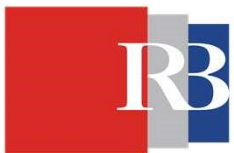
Zaključci



Poplave utječu na:

- strukturu i svojstva zajednice korisnih bakterija
- strukturu bakterijske zajednice i zajednice gljiva mijenjajući nekoliko subpopulacija
- aktivnost nekih funkcionalnih gena iz ciklusa dušika

PROJEKTNI TIM



Helena Senko, mag.ing.agr.

Ivana Babić, dr.sc.



UNIVERSITY OF
HOHENHEIM

Institut za znanost o tlu i procjenu zemljišta
Stuttgart, Njemačka

Ines Sviličić Petrić, dr.sc.

Anastazija Huđ, mag.bio.



Sanja Kajić, dr.sc.



Ivana Rajnović, dr.sc.



Goran Palijan, doc.dr.sc.



Sven Marhan, dr.sc.

蒸 ~~EXPIRED~~ PERSPIRE

