

Vpliv bakterije *Klebsiella oxytoca* na privzem cinka in svinca pri sončnici (*Helianthus annuus*)

Jan Dolenc, Martina Mravinec, Matic Pinter, Klavdija Plesnik, Janja Skok, Dejan Slokar

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Ugotoviti vpliv bakterije *Klebsiella oxytoca* na privzem težkih kovin, predvsem cinka in svinca, pri sončnici (*Helianthus annuus*).
- Kalitev sončnice in spremljanje rasti korenin ter poganjkov v treh serijah (kontrola (K), živa bakterija (ŽB), avtoklavirana bakterija (AB)), primerjava sveže in suhe mase poganjkov in korenin, analiza koncentracije kovin v koreninah in poganjkih, merjenje vsebnosti fotosinteznih pigmentov poganjkov, merjenje transpiracije, merjenje učinkovitosti fotosistema II. Statistična obdelava v R studiu, z enosmerno analizo variance (ANOVA), post-hoc s Tukeyevim testom ter obdelava podatkov iz rentgenske fluorescenčne spektroskopije s programom Microsoft Office Excel z dodatkom XL Toolbox z metodo Dunnettovega testa.
- Vidne so nekroze listov pri vseh testiranih serijah, pri seriji z dodatkom živih bakterij opazimo povišane koncentracije izmerjenih elementov (osredotočili smo se na koncentracijo cinka in svinca), v seriji ŽB sta opazni zmanjšana transpiracija in dejanska fotosintezna učinkovitost fotosistema II. Statističnih razlik pri vsebnosti fotosinteznih barvil nismo opazili.
- Prisotnost bakterije *Klebsiella oxytoca* poveča privzem snovi v rastlino, kar je v našem primeru predvsem negativno vplivalo na nekatere merljive fiziološke parametre. Za zanesljivejše zaključke bi morali izvesti več ponovitev.

Ključne besede: *Klebsiella oxytoca*, svinec, cink, akumulacija, fitoremediacija

Uvod

Ena izmed večjih posledic antropogenega pritiska na okolje je kopičenje težkih kovin, kot sta svinec (Pb) in cink (Zn) v različnih plasteh prsti in v vodi. Kontaminacija s težkimi kovinami predstavlja veliko nevarnost za ekosisteme, kmetijstvo in zdravje ljudi in živali (Kong in Glick, 2017).

Za odstranjevanje težkih kovin iz okolja lahko uporabimo pristop imenovan fitoremediacija, ki za namene razstrupljanja uporablja rastline in z njimi povezane mikrobe (Kong in Glick, 2017). Učinkovitost fitoakumulacije je odvisna od sposobnosti rastline, da privzame visoke koncentracije kovin in da proizvede čim več biomase. Na žalost pa lahko, čeprav je veliko kovinskih elementov esencialnih za rastline, povečan privzem negativno vpliva na rast in razvoj rastlin (Burd in sod., 2000). Vzrok za strupenost kovinskih elementov v sledih pri visokih koncentracijah je oksidativni stres, ki je posledica tvorbe prostih radikalov in motenje pigmentnih ter encimskih funkcij (Ghosh in Singh, 2005). Splošni simptomi, ki jih povzročijo strupenost cinka so manjši, nekrotični listi, takšni so predvsem mlajši listi. Glavna korenina je manjša kot običajno, manj je tudi stranskih korenin, vse korenine pa so na splošno bolj rumenkaste barve (Reichman, 2002). Prevelika koncentracija svınca v rastlinah pa se opazi kot zmanjšanje rasti, ovenelost starejših listov, kratke, rjave korenine in temno zeleni listi (Sharma in Dubey, 2005).

Ena izmed možnosti, da zmanjšamo strupenost kovin za rastline, je inokulacija korenin z bakterijami, ki promovirajo rast rastlin (Li, 2007). V prsti lahko najdemo veliko število različnih mikroorganizmov, ki skupaj s koreninskim delom rastline tvorijo rizosfero. V takšnih specifičnih združbah rastlina preskrbuje bakterijo z virom ogljika in drugimi hranili, v zameno pa bakterije spodbujajo rast rastlin (Burd in sod., 2000). Rizobakterije, ki promovirajo rast rastlin, so lahko prostoživeče in jih najdemo v bližini ali celo v samih koreninah. Med bakterije, ki kolonizirajo površino korenine in se po vsem svetu uporabljajo z namenom povečanja rastlinske biomase, spadajo tudi bakterije iz rodu *Klebsiella* (Kennedy in sod., 2004). Mehanizmi, ki jih bakterije uporabljajo za promocijo rasti rastlin, vključujejo fiksacijo dušika, sintezo sideroforov in s tem privzem železa v rastlino, proizvodnjo fitohormonov, kot so avksini in citokini ter raztapljanje mineralov. Poleg tega pa lahko znižajo nivo etilena v rastlinah, ki nastane ob stresu in s tem omogočijo razvoj daljših korenin (Burd in sod., 2000). Rizobakterije lahko tudi neposredno vplivajo na mobilnost in biodostopnost kovin tako, da sproščajo kelatorje, spremenijo njihove kemijske lastnosti, kot so pH in redoks stanje (Abou-Shanab in sod., 2003).

Namen naše raziskave je bil ugotoviti kakšen vpliv ima bakterija *Klebsiella oxytoca* na rast in razvoj sončnic (*Helianthus annuus*), ki rastejo na onesnaženi prsti. Sončnice so bile vzgojene na prsti, ki je mešanica klasičnega vrtnega substrata in prsti, pridobljene v Mežiški dolini. Tam je, zaradi dolgoletnega rudarjenja in predelovanja svınca, prst zelo onesnažena s svincem, prav tako pa tam najdemo tudi povišane vsebnosti cinka in kadmija. Predpostavili smo hipotezo, da bo rastlina privzela višje koncentracije različnih mineralov in s tem tudi težkih kovin. Ker pa rizobakterije promovirajo rast rastlin z različnimi mehanizmi, tudi z detoksifikacijo kovin, akumulacija težkih kovin ne bo imela bistvenega negativnega učinka na rastline.

Metode in materiali

Uporabili smo semena navadne sončnice (*Helianthus annuus*), ki smo jih posadili v lončke z zemljo onesnaženo s svincem, cinkom in kadmijem, pridobljeno iz Mežiške doline. Sadike smo 5 tednov gojili v rastni komori s stalnimi pogoji: temperatura: 21°C, zračna vlaga: 45%, fotoperioda: 16h svetlobe, 8h teme. Kalili smo 3 serije (serije: kontrola, dodane žive bakterije, dodane avtoklavirane bakterije), 5 lončkov za vsako serijo, v vsakem lončku po 5 semen. Po 14 dnevih smo število poganjkov zreducirali na 10 na serijo, torej dva poganjka na lonček. Pred sajenjem smo vzorčili prst za analizo vsebnosti težkih kovin. Pripravek z avtoklavirano bakterijo nam je predstavljal kontrolo, da preverimo vpliv bakterij na rast rastlin in ne snovi v mediju v katerem so bakterije rasle. Vse tri serije smo zalivali enkrat tedensko s 100 mL vode oz. z enakim volumnom 100x redčenega živega ali avtoklaviranega bakterijskega inokuluma (*Klebsiella oxytoca*) ter po potrebi še z vodovodno vodo.

Iz zemlje in obravnavanih rastlin smo pripravili tablete, ki smo jih potrebovali za določanje koncentracije kovin. Za vsako serijo smo izmerili vsebnosti svınca in cinka v poganjkih in koreninah rastlin. Vsebnosti kadmija nismo določali. Analizo vsebnosti izbranih kovin smo izvedli z metodo rentgenske fluorescenčne spektroskopije (Peduzo T02, IJS). Izmerili in primerjali smo transpiracijo, učinkovitost fotosistema II, vsebnost pigmentov (klorofil A, klorofil B, karotenoidi) ter sveže in suhe mase korenin in poganjkov. Pridobljene podatke smo obdelali v R studiu, statistične razlike med skupinami smo določili z enosmerno analizo variance (ANOVA), post-hoc pa s Tukeyevim testom. Podatke iz rentgenske fluorescenčne spektroskopije smo obdelali v programu Microsoft Office Excel z dodatkom XL Toolbox z metodo Dunnettovega testa.

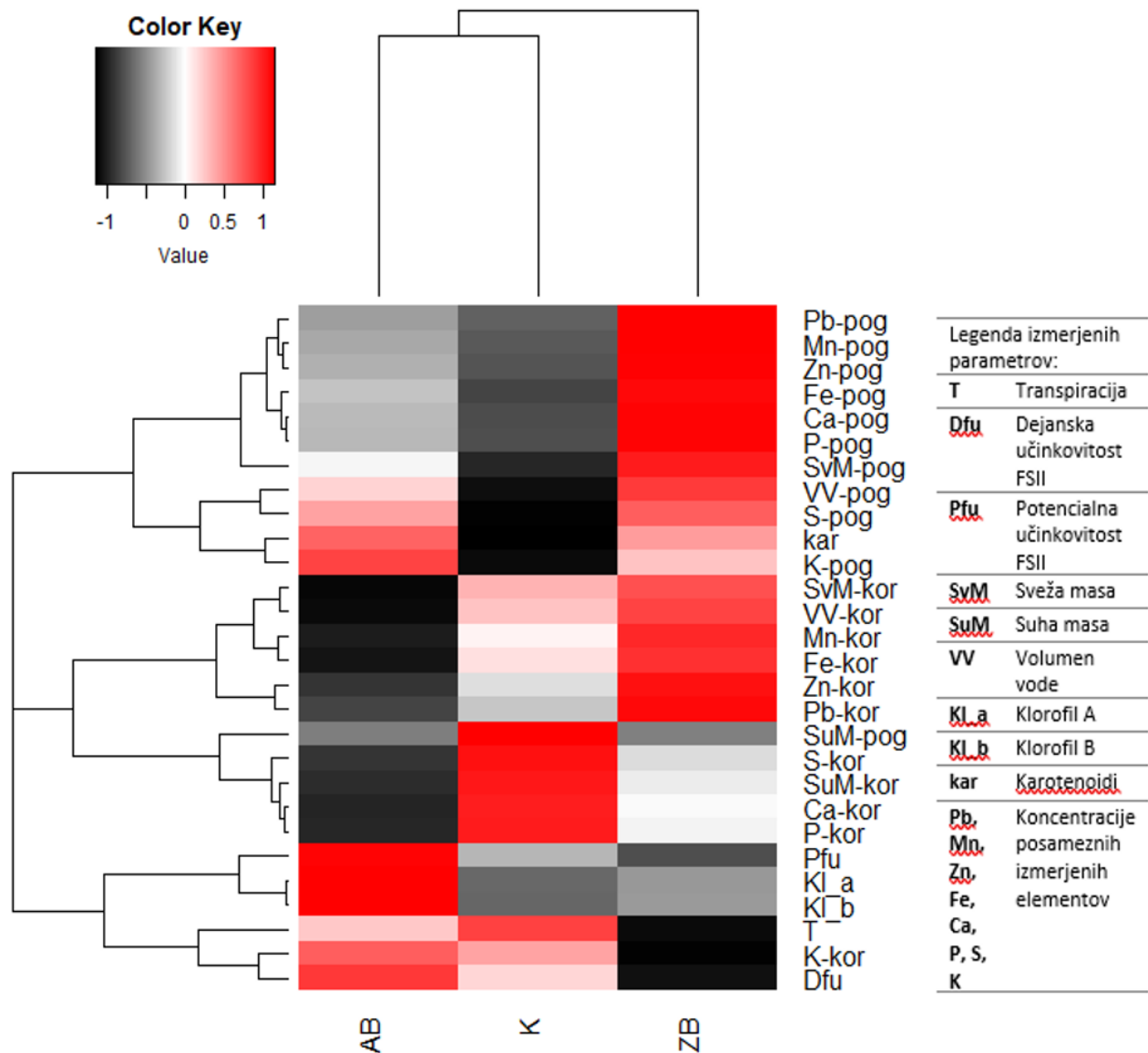


Slika 1: Nekroze listov pri kontrolni skupini.

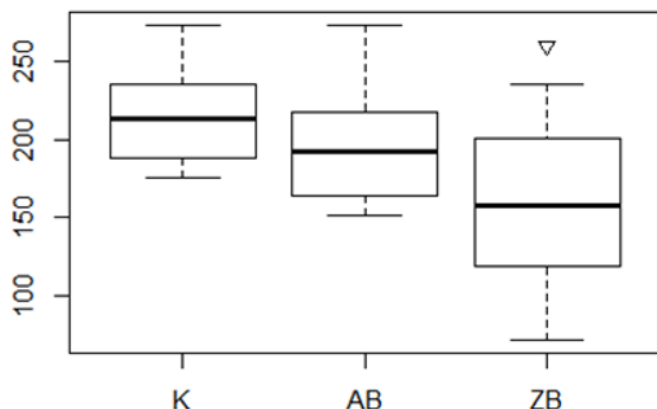
Rezultati in Diskusija

Pred začetkom opravljanja meritev smo rastline vizualno ocenili. Večina listov je bilo vidno nekrotičnih. Med samimi skupinami ni bilo vidnih razlik, veliko nekroze je bilo prisotne tako pri skupini inokulirani z živimi bakterijami, kot tudi pri skupini inokulirani z avtoklaviranimi bakterijami in kontroli. Sklepamo lahko da je za nekrozo kriva akumulacija Pb in Zn, saj je bila zemlja močno onesnažena s temi kovinami. Koncentracija cinka je znašala 495 $\mu\text{g/g}$, svinca pa 3302 $\mu\text{g/g}$. Prisotnost težkih kovin v rastlinskih tkivih moti številne fiziološke procese (Burd in sod., 2000) (Slika 1). Zaostala rast, kloroze in nekroze so vidni simptomi hude fitotoksičnosti kovin. Zn in Pb vplivata na celično delitev in rast, saj sta induktorja oksidativnih poškodb. Povišano prisotnost ROS lahko opazimo kot razbarvanje, deformacijo in zvijanje listov (Nagajyoti in sod., 2010; Senevirante in sod., 2017).

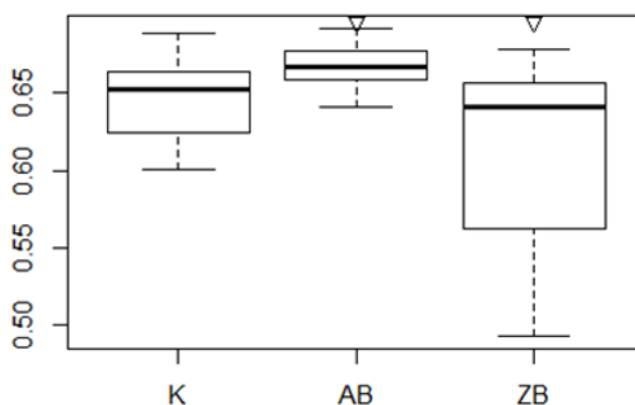
Veliko rizobakterij, ki jih najdemo okoli korenin, omogoča večjo dostopnost mineralnih hranil in pospešuje njihov privzem v rastline. Tako naj bi bakterije, ki promovirajo rast in razvoj rastlin, z različnim mehanizmi pomagale rastlini, da je njena rast čim bolj optimalna, kljub visoki akumulaciji težkih kovin v tkivih. Na grafu (Slika 2) lahko vidimo, da bakterije *Klebsiella oxytoca* res spodbudijo privzem številnih mineralov (Mn, Fe, Ca, P). Hkrati pa lahko pri skupini ŽB (žive bakterije) opazimo, da je prišlo tudi do povišanja koncentracije težkih kovin, kot sta Pb in Zn v primerjavi s skupino AB (avtoklavirane bakterije) in kontrolo. Višje koncentracije pri skupini ŽB lahko opazimo tako v koreninah, kot tudi v poganjkih. Različni mehanizmi, ki jih uporabljajo bakterije, so namreč vpleteni v izboljšanje stopnje akumulacije težkih kovin v rastlinah, saj izboljšajo njihovo mobilnost in privzem (Senevirante in sod., 2017). Ugotovitve naših poskusov se tako skladajo z našo hipotezo, da bodo bakterije promovirale privzem mineralov in hkrati tudi težkih



Slika 2: Primerjava izmerjenih parametrov med proučevanimi skupinami (ŽB- živa bakterija, AB- avtoklavirana bakterija, K- kontrola) v poganjkih (pog) in koreninah (kor).



Slika 3: Primerjava transpiracije med skupinami.



Slika 4: Primerjava dejanske fotosintezne učinkovitosti FSII med skupinami.

kovin.

Zaradi prevelikih koncentracij težkih kovin (Zn, Pb) je prišlo do negativnega vpliva na nekatere fiziološke parametre. To se ne sklada z drugim delom naše hipoteze, kjer smo predvidevali, da bakterije z različnimi procesi tudi razstrupljajo težke kovine, spodbujajo rast in razvoj rastlin in posledično akumulacija kovin ne bo imela negativnih učinkov na procese v rastlini. Primarni toksični mehanizmi težkih kovin spremenijo katalitično funkcijo encimov in poškodujejo celične membrane. Te spremembe povzročijo številne sekundarne učinke, kot so inhibicija fotosinteze, zmanjšan privzem hranil, hormonsko neravnovesje in vodni stres (Kastori in sod., 1992). Statistično značilne razlike opazimo pri transpiraciji (Slika 3) in dejanski učinkovitosti fotosistema II (FSII) (Slika 4). Tudi pri teh parametrih najbolj statistično odstopa skupina ŽB. Interakcija ionov težkih kovin s fotosintezni encimi in membranami kloroplastov vpliva na zmanjšanje fotosintezne aktivnosti. Težke kovine vplivajo tako na fotokemične kot nefotokemične reakcije. Neposredno vplivajo na redukcijo NADP in fotofosforilacijo, posredno pa na sintezo klorofila in na spremembe v razmerju med Chl A in Chl B. Slednjega ne moremo potrditi, saj pri nobeni skupini nismo zaznali statistično značilnih razlik pri vsebnosti klorofilov. Kovinska indukcija oksidativnih poškodb vpliva tudi na proteine in lipide, ki so neposredno vpleteni v elektronskem toku pri fotosintezi (Aggarwal in sod., 2011). Nalaganje težkih kovin v listih (predvsem svinca) negativno vpliva na normalno delovanje listnih rež. Poleg dejanske učinkovitosti FSII smo pri skupini ŽB opazili tudi zmanjšano transpiracijo. Vpliv kovin na odpiranje listnih rež bi lahko bila posledica sprememb v pretoku kalijevih ionov preko membrane ali pa posledica inhibicije energijskega sistema (Kastori in sod., 1992).

Med kontrolno skupino in AB nismo pričakovali statistično značilnih razlik, a jih vseeno lahko opazimo pri nekaterih fizioloških faktorjih. Do tega je verjetno prišlo zaradi dejstva, da so rastline z avtoklaviranimi bakterijami (AB) dobile več hranilnih snovi, kot pa rastline iz kontrolne skupine. Te hranilne snovi so prišle iz gojišča bakterij in bakterij samih. Pri skupini AB zaznamo največjo vsebnost klorofilov (Slika 2). Temu sovпада tudi graf (Slika 4), saj je pri tej skupini moč pri meritvah na svetlobi opaziti rahlo povišano dejansko učinkovitost FSII. Torej so rastline iz skupine AB zaradi dodatnih

hranil iz bakterijskih gojišč lahko bolje opravljale fotosintezo. Pridobljeni rezultati nakazujejo tudi na veliko variabilnost med samimi rastlinami. Ta je največja pri skupini ŽB (Slika 3 in Slika 4). To je bilo tudi pričakovano, saj smo na živ sistem (sončnice) vplivali z drugim živim sistemom (bakterije), kar povzroči bolj variabilen odgovor.

Bakterije sicer lahko delujejo kot bioremediatorji, a teh značilnosti pri našem poskusu nismo zaznali. To dejstvo odstopa od naše hipoteze. Za svinec je dokazano, da je lahko strupen za mikroorganizme tudi pri zelo nizkih koncentracijah. Svinec ima negativne učinke na mikrobo respiracijo. Večina encimov, ki so udeleženi pri denitrifikaciji, je lociranih v perioplazemskem prostoru, blizu celične površine, kar še poveča njihovo občutljivost. Bakterije se lahko prilagodijo na visoke koncentracije kovin, tako da uporabijo odporne nitrat reduktaze (Sobolev in Begonia, 2008). Obstaja verjetnost, da je *Klebsiella oxytoca* skozi generacije kulture v umetnih pogojih, izgubila toleranco na težke kovine, zaradi česar je odmrla in tako ni pripomogla k izboljšani rasti rastlin. Tako je na začetni stopnji še omogočala večji privzem mineralnih hranil in težkih kovin, kasneje pa odmrla, zaradi česar s svojimi procesi ni mogla kompenzirati negativnih učinkov akumuliranih težkih kovin.

Še en razlog za odstopanje od naše hipoteze lahko tiči tudi v tem, da bakterija (*Klebsiella oxytoca*) in sončnica nista kompatibilni v teh razmerah. Prišlo je do hiperakumulacije težkih kovin, bakterija pa ni zagotovila dovolj dobre obrambe, da bi to hiperakumulacijo kompenzirala. Sama rastlina tudi nima nobenih posebnih mehanizmov na celičnem nivoju, ki bi ji omogočili toleranco na težke kovine. Mogoče bi ta vrsta bakterije sončnicam pomagala pri rasti v kakšnih drugih stresnih pogojih, kot sta npr. slanost ali suša; a v našem primeru onesnažene zemlje s težkimi kovinami, do tega ni prišlo.

Zaključki

Kljub precejšnji onesnaženosti prsti s težkimi kovinami, so rastline vseeno uspevale. Ena izmed bakterij, ki pomagajo rastlinam pri privzemu kovin, je bakterija *Klebsiella oxytoca*. Olajšan privzem je v našem primeru imel predvsem negativne vplive na merljive fiziološke parametre, kot so transpiracija in

dejanska učinkovitost fotosistema II. Opazili smo manjše razlike med posameznimi skupinami, a bi za gotovost o uspešnosti poskusa le-tega verjetno morali večkrat ponoviti. Zaskrbljujoče pa je dejstvo, da je prst iz Mežiške doline res tako onesnažena, saj so rastline v vseh skupinah že navzven pokazale vplive onesnaženosti s težkimi kovinami. Menimo, da bi se v bodoče morali bolj osredotočiti na ta problem in poiskati možne rešitve.

Zahvala

Zahvalili bi se radi vsem, ki so nam omogočili izvedbo projektne naloge pri predmetu Rast in razvoj rastlin. Asistentki in izredni profesorici dr. Katarini Vogel-Mikuš za idejno zasnovo in pomoč pri izvedbi projekta ter pri interpretaciji rezultatov, tehnični sodelavki Mileni Kubelj za nenehno pripravljenost pri nastavitvi in izvedbi poskusov ter prof. dr. Marjani Regvar za mentorstvo.

Literatura

1. Abou-Shanab R.A., Angle J.S., Delorme T.A., Chaney R.L., van Berkum P., Moawad H., Ghanem K., Ghazlan H.A., 2003. Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *New Phytologist*, 158(1): 219-224
2. Aggarwal A., Sharma I., Tripathi B.N., Munjal A.K., Baunthiyal M, Sharma V. 2011. Photosynthesis: Overviews on Recent Progress & Future Perspective, Edition: First, Chapter: Metal toxicity and Photosynthesis, Publisher: IK International Publishing House. New Delhi, pp.16: 229-236
3. Burd G., Dixon D. G., Glick B. R. 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can J Microbiol*, 46: 237–245
4. Chandra R., Kang H. 2016. Mixed heavy metal stress on photosynthesis, transpiration rate, and chlorophyll content in poplar hybrid., *Forest Science and Technology*, 12(2): 55-61
5. Ghosh M., in Singh S. P. 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Asian Journal of Energy & Environment*, 3(1): 1-18
6. Kastori R. , M. Petrović M.. Petrović N. 1992. Effect of excess lead, cadmium, copper, and zinc on water relations in sunflower. *Journal of Plant Nutrition*, 15(11): 2427-2439
7. Kennedy I.R., Choudhury A., KecSkcs M. L. 2004. Non-Symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8): 1229-1244
8. Kong Z., Glick B. R. 2017. The Role of Bacteria in Phytoremediation: Innovations and Future Directions. *Advances in Microbial Physiology*, 71: 97 - 131
9. Li W.C., Ye H., Wong M.H. 2007. Effects of bacteria on enhanced metal uptake of the Cd/Zn-hyperaccumulating plant, *Sedum alfredii*. *Journal of Experimental Botany*, 58(15/16): 4173 - 4182
10. Loeffler S., Hochberger A., Grill E., Winnacker E. L., Zenk M. H. 1989. Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. *FEBS Letters*, 258 : 42–46
11. Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett*, 8:199-216
12. Reichman S. M. 2002. The Responses of Plants to Metal Toxicity: A Review Focusing on Copper, Manganese & Zinc. Melbourne, The Australian Minerals & Energy Environment Foundation: 23.
13. Senevirante M., Senevirante G., Madawala H.M.S.P., Vithanage M. 2017. Role of Rhizospheric Microbes in Heavy Metal Uptake by Plants. *Agro*
14. Sharma P., Dubey R. S. 2005. Lead Toxicity in Plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1): 35-52
15. Sobolev D., Begonia M.F.T. 2008. Effects of Heavy Metal Contamination upon Soil Microbes: Lead-induced Changes in General and Denitrifying Microbial Communities as Evidenced by Molecular Markers. *Int. J. Environ. Res.*, 5(5): 450-456