



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS**

Mindaugas Vitkevičius

**AZOTĄ FIKSUOJANČIŲ BAKTERIJŲ SAVYBIŲ IR
PANAUDOJIMO KVIEČIŲ AUGINIMUI TYRIMAI**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

dr. Dalia Čižeikienė

KAUNAS, 2018

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

**AZOTĄ FIKSUOJANČIŲ BAKTERIJŲ SAVYBIŲ IR
PANAUDOJIMO KVIEČIŲ AUGINIMUI TYRIMAI**

Baigiamasis magistro projektas
Pramoninė biotechnologija (621J70004)

Vadovas

dr. Dalia Čižeikienė

Recenzentas

dr. Paulius Pavelas Danilovas

Projektą atliko

Mindaugas Vitkevičius

KAUNAS, 2018



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Mindaugas Vitkevičius

(Studento vardas, pavardė)

Pramoninė biotechnologija, 621J70004

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Azotą fiksuojančių bakterijų savybių ir panaudojimo kviečių auginimui tyrimai“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 18 . 06 04 .
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Mindaugo Vitkevičiaus**, baigiamasis projektas tema „Azotą fiksuojančių bakterijų savybių ir panaudojimo kviečių auginimui tyrimai“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

SANTRAUKA	5
SUMMARY	6
SANTRUMPOS	7
IŽANGA	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1 Paprastojo kviečio (<i>lot. Triticum aestivum</i>) bendrosios žinios	10
1.2 Paprastojo kviečio (<i>lot. Triticum aestivum</i>) morfologija	10
1.3 Paprastojo kviečio (<i>lot. Triticum aestivum</i>) vegetacinis augimas	11
1.4 Paprastojo kviečio (<i>lot. Triticum aestivum</i>) ligos	12
1.5 Maistinių medžiagų svarba kviečiams (<i>lot. Triticum aestivum</i>)	13
1.6 Dirvos fermentai.....	14
1.7 Dirvos kokybė	16
1.8 Augalų simbiotinių bakterijų įvairovė: endofitai ir epifitai	17
1.8.1 Azoto fiksacija.....	18
1.8.2 Antimikrobinių medžiagų išskyrimas.....	19
1.8.3 Fitohormonų sintezė	19
1.8.4 Aktyvių medžiagų sintezė	19
1.9 Bakterijų įtaka augalų abiotiniui stresui.....	20
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI	22
2.1 Tyrimo objektai, naudotos medžiagos ir grūdų apdorojimo būdai	22
2.2 Azotą fiksuojančių bakterijų kultūrų paruošimas tyrimui.....	23
2.3 Tinkamo anglies šaltinio mitybinei terpei parinkimas	24
2.4 Bakterijų gyvybingumo nustatymas.....	25
2.5 Rulonėlių metodas.....	25
2.6 Kviečių daiginimas žemėse.....	26
2.7 Kviečių daigumo nustatymas	27
2.8 Antimikrobinis tyrimas	27

2.9 Invertazinio aktyvumo nustatymas	28
2.10 Proteazinio aktyvumo nustatymas.....	29
2.11 Ureazinio aktyvumo nustatymas	31
2.12 Duomenų analizavimas	31
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	32
3.1 Anglies šaltinio įtaka azotą fiksuojančių bakterijų gyvybingumui	32
3.2 Auginimo trukmės įtaka azotą fiksuojančių bakterijų gyvybingumui	35
3.3 Azotą fiksuojančių bakterijų įtaka kviečių augimui vertinant rulonų metodu	36
3.4 Kviečių daiginimas žemėse	39
3.5 Lauko matavimai.....	42
3.6 Bakterijų antimikrobinis aktyvumas	43
3.7 Bakterinių preparatų įtaka kviečių daigumui	44
3.8 Bakterijų invertazinis aktyvumas	45
3.9 Bakterijų proteazinis aktyvumas	47
3.10 Bakterijų ureazinis aktyvumas	48
4. REKOMENDACIJOS.....	50
IŠVADOS.....	51
LITERATŪROS SĄRAŠAS	52
PADĖKOS	56

Vitkevičius, Mindaugas. Azotą fiksuojančių bakterijų savybių ir panaudojimo kviečių auginimui tyrimai. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovas dr. Dalia Čižeikienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: technologijų mokslai, biotechnologijos.

Reikšminiai žodžiai: *kviečiai, azotą fiksuojančios bakterijos, proteazė, invertazė, ureazė.*

Kaunas, 2018. 56 p.

SANTRAUKA

Siekiant kaip įmanoma labiau padidinti derlių, kviečiai dažnai yra tręšiami mineralinėmis trąšomis. Trąšos padidina derlių, tačiau neretai padaro ir žalos. Trąšos patenka į paviršinius ir gruntinius vandenį, sukelia vandens telkinių biotos žūtį, eutrofikaciją. Nualinus dirvą suprastėja derlius ir derliaus kokybė. Didėjantis dėmesys aplinkai ir žmonių sveikatai saugioms kultūrinių augalų auginimo technologijoms kelia naujų uždavinių mokslui – pasiūlyti cheminei augalų apsaugai alternatyvius metodus ir priemones.

Darbo tiriamasis objektas – azotą fiksuojančių bakterijų poveikis paprastojo kviečio (*Triticum aestivum*) daigų vystymuisi. Kviečiai apdoroti bakteriniais preparatais buvo daiginami žemėje ir rulonėlių metodu. Darbo tikslas – ištirti optimalioje terpėje užaugintų azotą fiksuojančių bakterijų poveikį vasarinių kviečių (*lot. Triticum aestivum*) vystymuisi, nustatyti pagrindinius bakterijų fermentinius aktyvumus. Uždaviniai – nustatyti bakterijų augimui optimalią terpę ir jų gyvybingumą, įvertinti bakterijų antimikrobinį ir fermentinius aktyvumus prieš grūdų grybelius, įvertinti bakterijų poveikį jomis apdorotų kviečių daigų ir šaknų vystymuisi.

Tyrimų metu nustatyta, kad bakterijos turi teigiamą poveikį prieš grybelius. 68,7 % kontrolinės grupės kviečių buvo užsikrėtę grybeliais, bakterijomis apdorotų kviečių užsikrėtimas grybeliais svyravo nuo 32,7 % iki 53,3 %. Didžiausią invertazinį aktyvumą turėjo kviečiai, kurie buvo apdoroti *Azospirillum* bakterijomis ir sudaiginti žemėje – 0,63 AV/ml. *Azospirillum* bakterijomis apdorotų kviečių invertazinis aktyvumas net 21 kartą didesnis už kontrolinės grupės kviečių. Didžiausią proteazinį aktyvumą turėjo *Azotobacter I* bakterijomis apdoroti ir rulonėliuose sudaiginti kviečiai – 0,05 AV/ml, tai yra 10 kartų didesnis aktyvumas nei kontrolinės grupės rulonėliuose sudaigintų kviečių invertazinis aktyvumas. Ureaziniu aktyvumu pasižymėjo visi naudoti bakteriniai preparatai, išskyrus *Rhizobium*. Bakterijomis apdorotų ir rulonuose sudaigintų kviečių daigai buvo iki 2,64 karto ilgesni, šaknys iki 1,26 karto ilgesnės, daigai turėjo iki 1,47 karto daugiau šaknų nei kontrolinė grupė. Bakterijomis apdoroti ir į žemę pasėti daigai buvo tik 1,1 karto ilgesni, tačiau šaknys iki 1,4 karto ilgesnės, daigai turėjo iki 1,45 karto daugiau šaknų.

Vitkevičius Mindaugas. *Studies on Nitrogen Fixing Bacteria and Their Application on the Growth of Wheat* / Master's thesis in industrial biotechnology / supervisor dr. Dalia Čižeikienė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: technology science, biotechnology.

Key words: *wheat, nitrogen fixing bacteria, protease, invertase, uraease.*

Kaunas, 2018. 56 p.

SUMMARY

Wheat is often fertilized with mineral fertilizers in order to maximize crop yields. Fertilizers increase yields, but also often does damage. Fertilizers enter the water and groundwater, causing the loss of water biota and eutrophication. When the soil runs out of growth materials, the yield of grains reduces as well as its' quality. Attention to the technologies of cultivating crops that are safe for the environment and human health is increasing. The new challenges for science is being raised - to offer alternative methods and means to chemical plant protection.

The research object of this study is the effect of nitrogen fixing bacteria on the development of common wheat (*Triticum aestivum*). The wheat was treated with bacterial preparations and then sown to the soil or by roll method. The aim of this study was to investigate the effect of nitrogen fixing bacteria grown in optimum medium on the development of summer wheat (*Triticum aestivum*) and to determine the main enzyme activity of the bacteria. Objectives - to determine the optimum medium for bacterial growth and their viability, to evaluate bacterial antimicrobial and enzymatic activity against grain fungi, to estimate the effect of bacteria on the development of wheat germs and roots treated with them.

Studies have shown that bacteria have a positive effect on fungi. 68.7 % of the control wheat were infected with fungi, bacterial-infected wheat infections with fungi fluctuated from 32.7 % to 53.3 %. The highest invertase activity was determined in the wheat sample, which was treated with *Azospirillum* bacteria and sown to the soil (0.63 AU / ml). The invasive activity of *Azospirillum* bacteria treated wheat is 21 times higher than the result control group has shown. The highest protease activity was determined in the sample of *Azotobacter I* bacteria (grown by roll method) 0.05 AU / ml, which was 10 times higher than the invertase activity of the control group in rolls. Urease activity was determined in all bacterial samples except *Rhizobium*. Wheats processed with bacteria and germinated by roll method was up to 2.64 times longer, roots up to 1.26 times longer and had up to 1.47 times more sprouts than the control group. The seeds treated with bacteria and seeded to the soil were only 1.1 times long, but had up to 1.4 times longer roots and up to 1.45 times more roots.

SANTRUMPOS

Y5M15 – terpės sudėtyje yra mielių ekstrakto 5 g/l, manitolio 15 g/l.

Y1M1 – terpės sudėtyje yra mielių ekstrakto 1 g/l, manitolio 1 g/l.

Y1M5 – terpės sudėtyje yra mielių ekstrakto 1 g/l, manitolio 5 g/l.

G5M5 – terpės sudėtyje yra gliukozės 5 g/l, manitolio 5 g/l.

M20 – terpės sudėtyje yra manitolio 20 g/l.

G20 – terpės sudėtyje yra gliukozės 20 g/l.

KSV – Kolonijas sudarantys vienetai.

GEV – gliukozės ekvivalento vertė gradavimo tiesėje

PF – praskiedimų faktorius

AV/ml – fermento aktyvumo vienetai mililitre.

Aps/min – centrifugos apsisukimai per minutę.

D, a.v. – Sugertis, sugerties vienetai.

DSMZ – Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.

IŽANGA

Kviečiai yra vienas pagrindinių ir labiausiai naudojamų maisto šaltinių pasaulyje. Už kviečius gaminama daugiau tik kukurūzų produkcijos, tačiau didžioji dalis kukurūzų yra sunaudojama gyvūnų pašarams ir biokuro gamybai. Kviečiai taip pat naudojami maisto, gėrimų, medicinos pramonėse, o kviečių atliekos naudojamos kaip biokuras šilumos energijai išgauti. Kokybiškuose kviečiuose gausu angliavandenių, baltymų ir vitaminų. Kviečiuose esantis krakmolai lengvai suvirškinamas, kaip ir dauguma kviečio baltymų. Valgant kviečius organizmas gauna reikalingų skaidulų.

Siekiant kaip įmanoma labiau padidinti derlių, kviečiai dažnai yra tręšiami mineralinėmis trąšomis. Trąšos padidina derlių, tačiau neretai padaro ir žalos. Trąšos patenka į paviršinius ir gruntinius vandenis, sukelia vandens telkinių biotos žūtį, eutrofikaciją. Trąšų perdozavimas sukelia dirvožemio druskėjimą, padidina rūgštumą. Pakitus dirvos savybėms netenkama dirvožemio mikroorganizmų ir dirvožemyje gyvenančių gyvūnų, inaktyvuojami dirvoje natūraliai randami fermentai, sutrikdoma jų natūrali sintezė. Nualinus dirvą suprastėja derlius ir derliaus kokybė. Didėjantis dėmesys aplinkai ir žmonių sveikatai saugioms kultūrinių augalų auginimo technologijoms kelia naujų uždavinių mokslui – pasiūlyti cheminei augalų apsaugai alternatyvius metodus ir priemones.

Bakteriniai preparatai yra daug žadantys ir vis daugiau dėmesio susilaukiantys tyrimų objektai. Augalų simbiotinės bakterijos augalams gali teikti didelę naudą, nes bakterijos geba fiksuoti azotą, išskirti antimikrobines medžiagas ir fitohormonus, kurie yra identiški augalų fitohormonams. Simbiotinės bakterijos augalus dažnai kolonizuoja per šaknis, pažeistus lapus. Bakteriniais preparatais apdoroti augalai auga geriau, yra atsparesnis abiotinės gamtos veiksniams, duoda gausesnę ir kokybiškesnę derlių. Tokie preparatai nekenkia gamtai, nes bakterijos natūraliai yra randamos aplinkoje, dirvožemį praturtina ekstraląsteliniiais fermentais, papildo jų atsargas dirvoje.

Projekto tikslas – ištirti azotą fiksuojančių bakterijų *Rhizobium leguminosarum*, *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum* ir *Azotobacter vinelandii* I savybes bei jų panaudojimo vasarinių kviečių augimo gerinimui galimybes. Šiam tikslui pasiekti buvo iškelti tokie **uždaviniai**:

1. Parinkti *Rhizobium leguminosarum*, *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum* ir *Azotobacter vinelandii* I bakterijų augimui tinkamą anglies šaltinį.
2. Nustatyti bakterijų fermentinius aktyvumus (invertazinį, proteazinį ir ureazinį) bei ištirti jų antimikrobinį poveikį grūdų mikroskopiniams grybeliams.
3. Įvertinti naujų bakterijų padermių preparatų ir komercinių biologinių preparatų poveikį kviečių daigumui, daigų aukščiui, šaknų ilgiui ir jų skaičiui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Paprastojo kviečio (*lot. Triticum aestivum*) bendrosios žinios

Mokslinė klasifikacija:

Domenas: eukariotai

Karalystė: augalai (*lot. Plantae*);

Skyrius: magnolijūnai (*lot. Magnoliophyta*);

Klasė: lelijainiai (*lot. Liliopsida*);

Poklasis: lelijažiedžiai (*lot. Liliidae*);

Šeima: migliniai (*lot. Poaceae*);

Gentis: kvietys (*lot. Triticum*);

Rūšis: paprastasis kvietys (*lot. Triticum aestivum*).

Paprastasis kvietys (*lot. Triticum aestivum*) vienas iš dažniausiai kultivuojamų kultūrinių augalų Lietuvoje. Kvietys yra vienametis augalas. Kviečio sėklos gali būti sėjamos rudenį (žieminiai kviečiai, turintys šalčio atsparumo geną) ir pavasarį, pasibaigus stiprioms šalnoms (vasariniai kviečiai, neturintys šalčio atsparumo geno). Kviečiai naudojami gyvūnų pašarams, maisto ir gėrimų pramonėje, medicinoje ir kaip biokuras – šilumos energijai išgauti [1].



1.1 pav. Kviečiai

1.2 Paprastojo kviečio (*lot. Triticum aestivum*) morfologija

Subrendęs kvietys turi vieną pagrindinį stiebą ant kurio lapai auga priešingose pusėse. Stiebas yra sudarytas iš pasikartojančių segmentų – fitomerų, kuris turi mazgą, tuščią vidinį mazgą, lapus ir

šonines atšakas randamas vienoje ašyje su lapais. Lapai išsidėsto ratu aplink stiebą taip palaikydami atramą greitai augančiam ūgliui [2].

Lapų struktūra susideda iš apvalkalo lapų mentės, kurie susiformuoja iš skirtingų meristemų. Lapų mentės apačioje, kur lapo mentė jungiasi prie apvalkalo yra struktūrų pora sudaryta iš vidinės šerdies ir prieširdžio. Lapai auga priešingose stiebo pusėse ir sunumeravus visus lapus, lyginiai lapai bus vienoje pusėje, o nelyginiai kitoje stiebo pusėje. Lapai tįsta į ilgį nuo lapo pagrindo. Lapų audinys yra sudarytas iš trijų audinių tipų. Ląstelių tipai sudarantys lapo viršaus epidermį skiriasi nuo apatinio lapų epidermio sluoksnio. Abu epiderminiai sluoksniai yra padengti vašku. Mezofilinis sluoksnis yra apsuptas epiderminių sluoksnių ir perskiriamas indų audinio [2, 3].

Ataugos – tai šoninės šakos, kurios auga iš pagrindinio augalo stiebo. Ataugų lapai taip pat auga priešingose stiebo pusėse, kaip ir ant pagrindinio stiebo. Kai kurios ataugos geba subrandinti net varpą, tačiau tokių ataugų skaičius nėra didelis dėl šviesos ir maistinių medžiagų trūkumo.

Subrendę kviečiai turi du pagrindinius šaknų tipus – sėklinės ir mazginės šaknis. Sėklinės šaknys auga iš grūdo, mazginės šaknys pradeda vystytis atsirandant šoninėms ataugoms [3].

1.3 Paprastojo kviečio (*lot. Triticum aestivum*) vegetacinis augimas

Žieminiai kviečiai į dirvą sėjami rugsėjo pabaigoje, spalio pradžioje. Jiems būtinas šalčio periodas, kuris inicijuoja augalo vystymąsi. Šių kviečių vegetacinis augimas trunka nuo 280 – 350 dienų. Vasariniai kviečiai į dirvą sėjami balandžio pabaigoje, gegužės pradžioje siekiant išvengti šalno, nes vasarinių kviečių želmenys nėra atsparūs šalčiui. Kviečio sudygimas trunka nuo 4 iki 10 dienų, minimali oro temperatūra 3 – 4 laipsniai, o optimaliausia 12 – 25 laipsniai. Kviečių žydėjimas trunka nuo 4 iki 15 dienų, minimali reikalinga temperatūra 14 laipsnių [2].

Kviečių šaknų augimas tiesiogiai priklauso nuo ūglio vystymosi, o visas suformuotų šaknų skaičius yra susijęs su lapų skaičiumi ant pagrindinio stiebo ir ataugų skaičiaus. Šaknys, kurios yra kilusios iš kviečio ataugų (atžalų) pradeda formotis tik ataugai turint tris ir daugiau lapų. Nustatyta, kad nėra jokios koreliacijos tarp kviečio aukščio ir šaknijimosi gylio [2].

Po sudygimo vegetatyvinio ūglio viršūnė inicijuoja pirminio lapo vystymąsi. Pirminių lapų skaičius gali kisti nuo 7 iki 15 ir priklausomai nuo genotipo, temperatūros, šviesos intensyvumo ir dirvožemio turtingumo. Šiluma turi didelę įtaką lapų atsiradimui, vystymuisi ir ilgėjimui. Minimali lapam ilgėti temperatūra yra beveik nulinė, optimali 28 °C, o maksimali 38 °C [4, 5].

Pagrindinio stiebo ilgėjimas sutampa su lapų, šaknų, ataugų augimu bei su žydėjimu. Stiebo ilgėjimas prasideda, kai yra inicijuojama dauguma žiedynų ant besivystančios varpos. Vasariniuose kviečiuose pirmiausia ilgėja pirmieji keturi vidiniai mazgai, kurie suformuoja 9 lapus, o likę vidiniai

mazgai išlieka trumpi. Kai vidinis mazgas pasiekia pusę savo galutinio ilgio, vidiniai mazgai esantys virš jo pradeda ilgėti. Ši seka kartojasi tol, kol stiebo ilgėjimas yra visiškai užbaigtas. Žiedkotis yra paskutinis kviečio segmentas, kuris baigia ilgėti. Kviečio aukštis kinta nuo 30 iki 150 centimetrų priklausomai nuo genotipo ir augimo sąlygų. Kviečio aukštis priklauso nuo vidinio mazgo ilgio, o ne nuo mazgų skaičiaus [3].

Pirmosios ataugos (atžalos) atsiranda tarp diegamakštės šonų ir pirmojo tikro lapo. Žieminiuose kviečiuose ataugos (atžalos) gali susidaryti rudenį ar net žiemą, jei oro sąlygos yra švelnios. Ataugos sparčiai pradeda atsirasti atėjus pavasariui ir kylant temperatūrai. Pagrindinis stiebas ir anksti suformuotos ataugos geba išsivystyti iki galo ir suformuoja grūdus. Vėliau suformuotos ataugos grūdų nesuformuoja dėl priešlaikinio senėjimo [4, 5].

1.4 Paprastojo kviečio (*lot. Triticum aestivum*) ligos

Kviečiai, kaip ir dauguma kitų augalų serga įvairiomis ligomis, kurios kenkia kviečiui ir neleidžia pasiekti norimo derliaus. Dažniausiai šios ligos yra sukeltos grybelių, bakterijų, virusų ir nematodų. Nesiimant tam tikrų priemonių, kaip sėklų apdorojimas fungicidais ar lapų purškimas fungicidais derlius būna menkas, dažnai netinkamas naudojimui. Tiesa, galimos ligos pavojų galima išvengti naudojant patikrintas ir sertifikuotas sėklas, genetinį atsparumą tam tikroms ligoms turinčias sėklas. Kviečių ligas galima skirstyti į tris grupes, pagal pažeidžiamą kviečio dalį:

1. Ligos pažeidžiančios varpas ir grūdus;
2. Ligos pažeidžiančios lapus;
3. Ligos pažeidžiančios stiebus ir šaknis [6].

Toliau bus apžvelgiamos dažniausiai pasitaikančios kviečių ligos, ką jos pažeidžia, kaip tai paveikia kviečius, kokios galimos prevencijos priemonės ligai sustabdyti.

Fuzariozė – kviečio varpas pažeidžianti grybelinė liga. Ant varpų matomi nudegimai ar švelniai rudos spalvos pažeidimai. Kai kurios pažeistos varputės gali būti tamsiai rudos spalvos prie pagrindo, o lukštas aplipęs oranžine grybo mase. Šia liga pažeisti grūdai dažnai būna susitraukę ir turi baltą atspalvį, o kai kurie branduoliai yra rožinės spalvos. Norint išvengti fuzariozės patariama kviečių nesėti į laukus, kuriuose prieš tai buvo kukurūzai ir yra likę jų liekanų. Jau užsikrėtusius kviečius purkšti fungicidais [7].

Septoriozė – taip pat varpas pažeidžianti liga. Ši liga sukelia tamsiai rudus arba rožinius pažeidimus ant varpų. Pažeidimai geriausiai matomi ant lukšto viršutinės dalies, rudi dryžiai plinta nuo viršaus iki varputės pagrindo. Šiai ligai išvengti gali būti naudojamas profilaktinis purškimas fungi-

cidais, purškimas fungicidais jau pasirodžius ligai, sėklų apdorojimas fungicidais. Yra kviečių veislių, kurios turi genetinį atsparumą septoriozei [6].

Lapų rūdys – oranžinės – rudos spalvos pažeidimai atsirandantys ant lapų paviršiaus. Šie spuogelius primenantys pažeidimai dažniausiai atsiranda ant lapo apvalkalo ir gali plisti ant stiebo. Šie pažeidimai dažniausiai būna mažesni, labiau apvalūs nei pažeidimai sukeliama stiebo rūdžių. Ligai išplitus, pažeisti lapai gali būti stipriai pažeidžiami, todėl lapai galiausiai nudžiūsta. Prieš lapų rūdis naudojami įvairūs purškiamieji fungicidai. Taip pat yra išvesta kviečių veislių, turinčių genetinį atsparumą šiai ligai [6, 7].

Dryžligė – ant lapų matomi pailgi dryžiai, kurių centras yra tamsiai rudos spalvos, o prie pažeistos vietos ribos matoma geltona spalva. Dryžiai eina išilgai lapo. Dažnai šie pažeidimai gali susijungti, todėl dideli augalo plotai tampa pažeisti. Grybas, kuris sukelia dryžligę žiemoja dirvoje, kur anksčiau buvo kviečiai, o pavasarį ant šiaudų suformuoja mažas, juodas reprodukcinės struktūras. Šios ligos galima išvengti stengiantis nesėti kviečių į prieš tai naudotą dirvą, purkšti fungicidais ar naudoti genetiškai atsparias veisles [6].

Šaknų puvinys – šią ligą sukelia įvairūs grybeliai. Ši liga sukelia priešlaikinę kviečių žūtį. Laukuose atsiranda daug baltų dėmių su jau žuvusiais kviečiais. Užsikrėtę augalai dažnai prie pagrindo yra tamsūs, turi menkai išsivysčiusią šaknų sistemą. Ant kviečio stiebo pagrindo matomi tamsiai rudi pažeidimai, kurie leidžiasi žemyn iki sėklos liekanų. Šios ligos galima išvengti naudojant fungicidus, ilsinant dirvą arba periodiškai keičiant pasėlius [6, 7].

Kviečių javaklupė – kviečių šaknis infekuojanti grybelinė liga. Pasėlių liekanos yra pagrindinis užkrato šaltinis, tačiau grybelio askosporos gali plisti oru. Javaklupė užsikrėtęs vienas kvietys, grybelinę ligą perduoda per šaknų sistemą kitiems, šalia jo esantiems kviečiams, taip liga plinta per visą lauką ir matomi pažeisti kviečių lopiniai. Liga dažniausiai pasireiškia vietovėse, kur prasta drenažinė sistema, laukai yra drėgni. Pažeisti kviečiai prie stiebo pagrindo ir šaknų pajuoduoja. Siekiant išvengti ligos patartina keisti pasėlius, beicuoti grūdus [6, 7].

1.5 Maistinių medžiagų svarba kviečiams (*lot. Triticum aestivum*)

Norint kaip įmanoma labiau padidinti kviečių derlių yra būtina juos papildomai tręšti trąšomis. Trys pagrindiniai reikalingi maisto šaltiniai geram kviečių derliui užauginti yra azotas, fosforas ir kalis. Siera ir cinkas taip pat yra svarbūs, tačiau šių elementų kiekiai reikalingi praturtinti kviečių maisto šaltinį yra mažesni. Nustatyta, kad dviem tonoms viename hektare kviečių užauginti reikia 42 kilogramų azoto, 9 kilogramų fosforo, 10 kilogramų kalio ir 2,5 kilogramo sieros [3].

Baltymų gamyba kviečių grūduose yra tiesiogiai priklausoma nuo esamo azoto kiekio dirvoje. Azoto turinčios trąšos įprastai į dirvožemį yra įterpiamos prieš kviečių sėją, tačiau dažnai azoto trąšomis kviečiai papildomai yra tręšiami iki žydėjimo siekiant kaip įmanoma labiau padidinti derliaus išeią ir baltymų kiekį grūduose. Dirvą azotu galima praturtinti į ją sėjant ankštines kultūras ant kurių šaknų esantys mikroorganizmai fiksuoja azotą.

Fosforo turinčias trąšas geriausia į dirvą įterpti sėjos metu. Fosforas yra reikalingas geram kviečių augimui ir kviečių dauginimuisi, geresniam sėklų nokimui [3, 8].

Kalis yra reikalingas optimaliam kviečių augimui ir vystymuisi. Tinkamai kviečius patręšus kalio trąšomis, želmenys būna kokybiški dėl suaktyvėjusios fotosintezės, padidėjusio atsparumo kai kurioms ligoms ir geresnio vandens įsiurbimo. Visa tai padeda palaikyti gerą balansą tarp angliavandenių ir baltymų. Dėl kalio kviečių šiaudai tampa tvirtesni, kviečiai sunkiau yra išguldomi vėjo [8].

Per didelis tręšimas azoto trąšomis daro ir neigiamą poveikį aplinkai. Kyla didelė grėsmė dėl dirvos ir aplinkinių vandens telkinių rūgštingumo padidėjimo, paviršinio ir požeminio vandens užsiteršimui, invazinių žolių atsiradimui rūgštingose dirvose. Dėl kasmet gaminamų vis didesnių trąšų kiekio yra išmetami dideli kiekiai šiltnamio efektą sukeliančių dujų [9].

Vis daugiau dėmesio sulaukia biologiniai preparatai, kurių pagrindas yra azotą fiksuojančios bakterijos. Bakterijos aplinkai yra visiškai nepavojingos, nes jos yra randamos natūraliai aplinkoje.

1.6 Dirvos fermentai

Dirvožemio fermentai yra fermentai, kurie natūraliai randami žemėje ir turi didelę įtaką dirvožemio ekologijai, fizikinėms ir cheminėms savybėms, derlingumui ir sveikam dirvožemiui. Šie fermentai yra svarbūs dėl savo biocheminių savybių, nes skaido organines medžiagas atsidūrusias dirvožemyje. Fermentai esantys dirvožemyje katalizuoja gyvybiškai svarbias reakcijas mikroorganizmams esantiems dirvožemyje, stabilizuoja dirvožemio struktūrą, vykdo organinių medžiagų degradaciją, organinių junginių susidarymą, palaiko maisto ciklą [10].

Fermentų kiekiai esantys dirvožemyje gali kisti priklausomai nuo dirvožemio savybių: dirvožemio drėgnio, organinių medžiagų kiekio ir pobūdžio, mikroorganizmo aktyvumo, biologinių procesų intensyvumo. Taigi, biocheminės reakcijos vykdomos žemėje esančių fermentų turi didelę įtaką mikroorganizmams, nes nuo fermentų priklauso ar mikroorganizmai gaus pakankamai maistingų medžiagų [11]. Pastebėta, kad tręšimas organinėmis trąšomis turi prieštarinę poveikį. Kai kurie mokslininkai teigia, kad tręšimas organinėmis trąšomis padidina dirvožemio biocheminį aktyvumą, dėl organinių medžiagų ir mikroorganizmų įterpimo į dirvožemį, tačiau prastos kokybės trąšų įter-

pimas gali sumažinti dirvožemio biocheminį aktyvumą. Neorganinių trąšų įterpimas į dirvožemį gali slopinti (inhibuoti) fermentų sintezę dirvoje, tačiau neorganinės trąšos stimuliuoja augalų augimą ir fermentų išskyrimą į žemę per trąšas [12].

Dirvožemyje galima rasti šių fermentų: amilazių, celiulazių, fosfatazių, proteazių, sacharazių (invertazių), ureazių ir kitų. Pagal esančius fermentus dirvožemyje galima nustatyti dirvožemio tipą, mikrobiologinį aktyvumą, dirvožemio ekologinės sistemos pokyčius, derlingumą [10].

Proteazės dirvožemyje atlieka svarbų vaidmenį azoto mineralizacijos procese, reguliuoja procesus, nuo kurių priklauso kiek azoto bus prieinama augalams ir pačių augalų augimą. Šis fermentas yra susijęs su neorganiniais ir organiniais koloidais dirvožemyje. Šio esktraląstelinio fermento kiekis ne tik nurodo biologinę dirvožemio talpą, fermentų sunaudojamo substrato, bet turi didelės įtakos mikroorganizmų ekologijai ir bendrai ekosistemoms. Reikia išstudijuoti visus galimus faktorius, kurie gali paveikti natūraliai aplinkoje randamų fermentų kiekį ir aktyvumą, nes nuo to priklauso dirvožemis bus kokybiškas ir derlingas [13].

Ureazės fermentas yra atsakingas už karbamido trąšų hidrolizę į amoniaką ir anglies dvideginį, dėl ko pakyla dirvožemio pH. Tai lemia greitą azoto praradimą, dėl amoniako išgaravimo. Dėl šitos savybės ureazės fermentas buvo pradėtas intensyviai tyrinėti nuo jo atradimo. Procesas sukliamas ureazės fermentų apibūdinamas kaip gyvybiškai svarbus, dėl kurio augalai yra aprūpinami azotu po tręšimo karbamido trąšomis. Ureazės, randamos dirvožemyje, pagrinde yra kilusios iš augalų ar mikroorganizmų. Ureazės išskirtos augalų ar mikroorganizmų į dirvožemį yra greitai suskaidomos proteolitinių fermentų. Fermento aktyvumas dirvoje priklauso nuo daugelio faktorių: derliaus nuėmimo, organinių medžiagų kiekio, dirvožemio tręšimo, sunkiųjų metalų, temperatūros ir drėgnio. Nustatyta, kad sunkiesiems metalams fermentas yra itin jautrus, o prie aukštesnės aplinkos temperatūros ureazės aktyvumas padidėja [10].

Invertazės fermentai katalizuoja reakcijas, kurių metu sacharozė skyla į gliukozę ir fruktozę. Fermentas randamas daugelyje bakterijų, augalų, gyvūnų, mikroorganizmų ir dirvožemyje. Invertazės aktyvumas dirvožemyje yra itin svarbus nes šio fermento substratas – sacharozė yra vienas iš gausiausiai randamų tirpių cukrų augaluose. Invertazės dalinai yra atsakingos už augalinių atliekų suirimą dirvožemyje [14].

Kiekybiškai dirvos fermentai sudaro labai mažą dirvos dalį, tačiau jie yra nepaprastai svarbi jo dalis, nes visos biocheminės reakcijos priklauso nuo jų arba yra su jais susijusios. Fermentai dirvožemyje nuolat yra sintetinami, kaupiami, inaktyvuojami arba suskaidomi, todėl jie ypač yra svarbūs žemdirbystėje, nes dalyvauja maistinių medžiagų perdirbimo cikluose [10, 13].

1.7 Dirvos kokybė

Dirvožemis atlieka daugybę funkcijų, kurios yra labai svarbios gyvybei: suteikia terpę augalams įsitvirtinti, teikia augalams vandenį, maisto medžiagas, deguonį augalų šaknims ir mikroorganizmų vystymuisi, sukuria tinkamą buveinę mikroorganizmams daugintis. Dirvožemiai, kuriuose randama daug organinių anglies junginių dažniausiai yra laikomi kokybiškais dirvožemiais, jei nesukelia augalams ligų ar dirvožemyje nėra didelių parazitų populiacijų [15, 16].

Neigiami poveikiai dėl kurių dirvožemis degraduoja gali būti suskirstyti į dvi kategorijas. Pirmajai kategorijai priklauso dirvožemio praradimas dėl vandens ir vėjų sukeltų erozijų, antrajai kategorijai priklauso fizikiniai, cheminiai ir biologiniai dirvožemio nualinimai. Antrajai kategorijai priskiriami nualinimai atsiranda dėl organinių medžiagų stygiaus, vandens nuleidimo, dėl padidėjusio druskingumo, rūgštingumo ir vandens šaltinių taršos. Dėl žemės kokybės ir derlingumo suprastėjimo, sumažėja derlius ir derliaus kokybė [17, 18].

Dirvožemio mikroorganizmai ir jų išskiriami fermentai nepaisant jų mažo kiekio yra atsakingi už azoto, sieros ir fosforo ciklus ir organinių atliekų skaidymą. Todėl mikroorganizmai ir jų išskiriami fermentai dirvožemį palaiko kokybišku ir sveiku. Mikroorganizmai greitai reaguoja į besikeičiančią aplinką ir greitai prie jos prisitaiko, lyginant su aukštesniais organizmais ir būtent dėl to mikroorganizmai yra puikūs dirvožemio kokybės indikatoriai [10]. Žinoma, kad geras dirvožemis pasižymi šiomis savybėmis:

1. švelnus ir lengvai trupantis;
2. gerai nusausėja ir greitai sušyla;
3. nepasidengia pluta po sėjos;
4. išlaiko drėgmę sausrų metu;
5. nevyksta erozija ir nepraranda derlingumo;
6. turi žemei būdinga kvapą;
7. sudėtyje yra didelė mikroorganizmų populiacija;
8. nereikalauja daug trąšų geram derliui;
9. išaugina sveikus, geros kokybės grūdus.

Pagrindinis tikslas žemės kokybei palaikyti nėra kaip įmanoma labiau pakelti bendrą biologinį aktyvumą, stabilumą, bet saugoti ir gerinti ilgalaikę žemdirbystę, vandens kokybę ir bendrą visų organizmų aplinką [12]. Kokybiškas dirvožemis geba užauginti didelius pasėlių kiekius nenaudojant daug pridėtinių trąšų. Dirvožemyje daug organizmų rūšių, kurios natūraliai yra randamos dirvože-

myje, nekenkia pasėliams ir gyvūnams. Produktai, pagaminti iš pasėlių užaugintų kokybiškame dirvožemyje, pasižymi aukšta maistine verte [16].

1.8 Augalų simbiotinių bakterijų įvairovė: endofitai ir epifitai

Simbiotinės bakterijos – bakterijos, kurios gyvena augalo vidiniuose audiniuose arba ant augalo paviršiaus ir su augalu sudaro simbiozės ryšius. Endofitinės bakterijos randamos augalo vidiniuose audiniuose, o epifitinės ant augalo paviršiaus. Priešingai nei įprasta, patogeninėms bakterijoms kolonizavus augalo audinius ar paviršius, simbiotinių bakterijų buvimas nerodo jokių infekcijos požymių [19]. Simbiotinės bakterijos randamos – šaknyse, stiebuose, lapuose, žieduose ir net sėklose. Šie mikroorganizmai aptinkami daugelyje augalų, kai kurios bakterijos gali kolonizuoti tik tam tikrą augalų rūšį, o kitos gali daugintis net visai negimininguose augaluose. Šie mikroorganizmai gali skatinti augalo augimą išskirdamos tam tikrus fitohormonus – auksinus, citokininus bei giberelinus. Geba fiksuoti azotą, kuris būtinas augalo augimui. Taip pat bakterijos geba išskirti antibiotines medžiagas, kurios slopina patogenų dauginimąsi, taip jos užsitikrina sau vietą dauginimuisi bei netiesiogiai padeda augalui apsiginti nuo patogenų [20]. Bakterijų paplitimas priklauso nuo klimato sąlygų.

Dažniausiai randamos simbiotinės bakterijos:

1. *Enterobacter sp.*;
2. *Colletotrichum sp.*;
3. *Phomopsis sp.*;
4. *Paenibacillus sp.*

Neretai augalai limituoja simbiotinių bakterijų augimą, todėl bakterijos siekdamos užsitikrinti sau palankesnę terpę augti, išskiria tam tikras medžiagas, kurios skatina augalo augimą, gyvybingumą, padeda prisitaikyti prie aplinkos ir taip užsitikrina sau palankias sąlygas augti. Dėl šių savybių šie mikroorganizmai išpopuliarėjo, tikimasi juos pritaikyti žemės ūkio agrokultūroje, medicinoje bei pramonėje [20, 21].

Simbiotinių bakterijų teikiama nauda augalui:

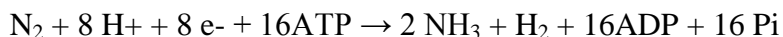
1. Azoto fiksacija;
2. Fitohormonų sintezė;
3. Antimikrobinių medžiagų išskyrimas;
4. Aktyvių medžiagų sintezė;
5. Ektomikorizės skatinimas.

Simbiotinės bakterijos turi gana daug ir efektyvių būdų geresnėms aplinkoms sąlygoms užsitikrinti augalų išorėje ar viduje. Dauguma kviečių epifitinių bakterijų randama ant lapų, o jų skaičius viename kvadratiname centimetre gali siekti kelis milijonus. Bakterijų skaičius gali skirtis net ant tos pačios rūšies augalų, taip pat įtakos bakterijų skaičiui turi augalo augimo laikotarpis. Dėl nuolatinio kontaktavimo su aplinka bakterijų rūšys ir kolonijų dydžiai gali skirtis [22].

1.8.1 Azoto fiksacija

Tik nedaugelis bakterijų atmosferinį azotą N_2 gali paversti į NH_3 amoniaką, kuris gali būti panaudotas augalų. Bakterijos atsakingos už azoto fiksaciją vadinamos diazotrofais, kurie gamina nitrogenazę, kuri atmosferinį azotą paverčia į amoniaką. Šios bakterijos dažniausiai aptinkamos augalo šaknyse, tačiau gali būti aptinkamos ir kituose organuose. Dažniausiai aptinkamos cianobakterijos (*Nostoc sp.*), *Azotobacter*, *Azospirillum spp.*, *Rhizobium* ir endofitinės (*Paenibacillus sp.*) [19, 23]. Azotas yra itin svarbus, nes azotas įeina į baltymų ir nukleino rūgščių sudėtį, taip pat yra chlorofilo, ATP ir kitų nukleozidtrifosfatų, daugelio kofermentų, vitaminų, kai kurių fosfolipidų, augimo reguliatorių (auksinų, citokininų), antrinės kilmės medžiagų (glikozidų, alkaloidų) ir kitų junginių sudėtinė dalis.

Azoto fiksacijos lygtis:



Mikroorganizmai, kurie fiksuoja azotą sunaudoja daug energijos – 16 molių ATP (adenosino trifosfato) vienam moliui azoto paversti į amoniaką. Organizmai energiją gauna oksiduodami organines molekules, nefotosintetinantys, laisvai gyvenantys mikroorganizmai energiją gauna iš kitų organizmų, fotosintezę vykdančių mikroorganizmai energijai gauti naudoja fotosintezės metu pagamintus cukrus. Simbiotiniai azotą fiksuojuojantys mikroorganizmai energiją gauna iš augalų šaknų sistemos. Tvirtus ryšius su dauguma augalų suformuoja *Azotobacter* ir *Azospirillum*, *Rhizobium* ir *Bradyrhizobium* dažniausiai yra randamos ant ankštinių augalų šaknų, tačiau gali būti randamos ir prie kitų augalų šaknų [24].

Dėl itin didelio tręšimo cheminėmis trąšomis sutrinka azoto ciklas, dėl ko padidėja paviršinio ir gruntinio vandens tarša. Dėl padidėjusios azoto koncentracijos gėlame ir sūriame vandenyje itin sparčiai vystosi įvairūs mikroorganizmai, o ypač dumbliai, dėl to prasideda vandens telkinių eutrofikacija. Gausus vandens žydėjimas dėl dumblių sunaudoja daug vandenyje ištirpusio deguonies, o dėl sumažėjusio ištirpusio deguonies miršta planktonas. Dėl ištirpusio deguonies stokos masiškai žūva

įvairūs organizmai ir yra sukuriamos zonos, kuriose gyvybės yra labai mažai ar jos visai jau nelikę [25].

1.8.2 Antimikrobinių medžiagų išskyrimas

Dauguma augalo simbiotinių bakterijų, kurios yra išskirtos iš augalų dalių, pasižymi antimikrobinėmis savybėmis. Iš jų išskirtos antimikrobinės medžiagos padeda kovoti tiek su augalų, tiek su gyvūnų patogeniniais mikroorganizmais. Išskiriamos medžiagos inhibuoja patogenų augimą, neleidžia jiems toliau plisti, taip simbiotinės bakterijos pačios įsitvirtina augalo audiniuose bei padeda augalui įveikti patogenus. Dažniausiai išskiriami šie augalų simbiotai, kurie išskiria aktyvias antimikrobines medžiagas – *Dothideomyces sp.*, *Alternaria tenuissima*, *Thielavia subthermophila*, *Paenibacillus sp.*, *Nigrospora oryzae*, *Colletotrichum truncatum* [19, 20].

1.8.3 Fitohormonų sintezė

Simbiotinės bakterijos sintetina lygiai tokius pat fitohormonus, kaip ir augalai. Bakterijų sintetinami hormonai padeda sudygti jauniems augalams, iškęsti nepalankias sąlygas bei padidinti augalų augimo greitį. Simbiotinių bakterijų gaminami fitohormonai:

1. Auksinai – indolilacto rūgštis (IAR). Šis fitohormonas skatina ląstelių elongaciją, pridėtinių ir šoninių šakų formavimąsi, daro didelę įtaką šaknų formavimuisi, indų audinio diferenciacijai. Reikalingas vaisių vystymuisi bei reguliuoja augalo tropinį judėjimą – ūglių linkimą į šviesą.
2. Citokininai – gausiausiai aptinkamas zeatinas, kuris turi adenino žiedo ir N – 6 šoninę grandinę. Citokininai skatina ląstelių dalijimąsi, naujų ūglių formavimąsi, stabo lapų senėjimą, žiedų ir lapų kritimą bei aktyvuoja ramybės būsenoje esančius pumpurus.
3. Giberelinai – diterpenai, žymima GA_x. Skatina tarpubamblių tįstamąjį augimą, stiebo tįsimą bei lapų vystymąsi. Giberelinai mažina citoplazmos klampą, skatina transpiraciją. Taip pat šio fitohormono dėka aktyvinama nukleorūgščių sintezė ląstelių branduoliuose [24–26].

1.8.4 Aktyvių medžiagų sintezė

Augalų simbiotai taip pat sintetina ir aktyvias medžiagas, kurios padeda augalui įveikti aplinkos stresą ar apsiginti nuo kenkėjų. Šių bakterijų išskiriamas aktyvias medžiagas tikimasi panaudoti žemės ūkio kultūroje, gaminant natūralius produktus, kurie degradoja žymiai lengviau bei nelieka chemikalų liekanų produktuose [27, 28]. Medicina taip pat įžvelgia simbiotų išskiriamų medžiagų poveikio pritaikymą vėžio terapijoje. Simbiotinių bakterijų išskiriamos aktyviosios medžiagos:

1. Alkaloidai – ši medžiaga yra itin rūgšti, todėl žolėdžiai gyvūnai yra atbaidomi. Alkaloidai taip pat veikia centrinę ir periferinę nervų sistemas, blokuoja eukariotinės topoizomerazės 1 prisijungimą.

2. Amidai – amidai yra vieni dažniausių metabolinių simbiotų produktų, kurie yra toksiški vabzdžiams, bet nedaro jokios įtakos žinduoliams, tarp jų ir žmogui. Dėl šios priežasties itin susidomėtą amidų panaudojimu žemės ūkyje. Ši aktyvioji medžiaga lengvai ir greitai degraduoja, nelieka jos buvimo požymių galutiniame produkte.

3. Terpenoidai – biologiniai chemikalai, kurie taip pat augalui padeda kovoti su abiotinėmis sąlygomis, apsiginti nuo kenkėjų [28].

1.9 Bakterijų įtaka augalų abiotiniui stresui

Nustatyta, kad šaknis kolonizuojančios nepatogeninės bakterijos gali padidinti augalų atsparumą biotinėms ir abiotinėms sąlygoms. Šaknis kolonizuojančios bakterijos padeda augalams iškęsti sausras, dirvos druskėjimą ir toksinių metalų buvimą dirvoje. Šios bakterijos sulaukia vis daugiau susidomėjimo, nes padeda augalams prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų. Labiausiai ištirtos yra *Azospirillum* ir *Azotobacter* bakterijos, jų daroma įtaka kviečių atsparumui nepalankioms abiotinėms sąlygoms [29].

Daigai apdoroti *Azospirillum* bakterijomis sausros metu prarasdavo žymiai mažiau vandens lyginant su daigais, kurie nebuvo apdoroti bakterijomis. Bakterijos skatino pasėlių šaknų augimą, bendros augalo masės padidėjimą ir lapų užimamo ploto padidėjimą, prolino kaupimąsi lapuose ir šaknyse. Kviečiai apdoroti *Azospirillum* davė didesnę derlių, grūduose buvo ženkliai didesnis kiekis magnio, kalio ir kalcio net ir po sausros periodo. Buvo pastebėta, kad augalų vandens kiekis, santykinio vandens kiekis ir vandens potencialas augale buvo padidėję. Augalo elastiškumui įtakos turėjo mažesnis ląstelės sienelės tūris, todėl manoma, kad dėl pasikeitusios augalo morfologijos, kvietys įgyją didesnę atsparumą sausroms. Taip pat kviečiuose pastebėtas kitas bakterijų sukeliamas poveikis. *Azospirillum* bakterijos neleidžia įvykti fosfolipidų struktūros pokyčiams šaknyse, kuomet padidėja fosfatidicholino kiekis, o fosfatidiletanolamino kiekis sumažėja. Dėl augalo šaknies ląstelės membranos elastiškumo padidėjimo augalas tampa atsparesnis sausras [29, 30, 31].

Rhizobium bakterijos padidina kviečių atsparumą stresui, augalai lengviau toleruoja sausras arba įgauna joms atsparumą dėl fitohormono abciso rūgšties, lumichromo. Šios bakterijų išskiriamos medžiagos sumažina žiotelių prasivėrimą, dėl to augalas praranda mažiau vandens kvėpavimo metu [32].

Druskingose dirvose kviečiai ir kiti augalai sunkiai sudygsta, nes daug energijos sunaudoja osmosinio slėgio palaikymui, todėl želmenys sunkiai auga. Dirvožemio druskingumas kasmet vis didėja dėl tręšimo įvairiomis cheminėmis trąšomis. Įvairios *Azospirillum* bakterijų rūšys toleruoja iki 3 % druskingumą. Bakterijos išskiria auksiną, kuris skatina sėklų sudygimą, šaknų ilgėjimą ir didina bendrą šaknų biomasę. Bakterijų išskiriamas auksinas skatina šaknų ilgėjimą dėl ląstelės ilgėjimo ar pasidalijimo [33]. Kviečius apdorojus druskingam dirvožemiui atspariomis *Azobacter* rūšimis, dėl padidėjusio azoto pasisavinimo, įvairių bakterijų išskiriamų augimo hormonų ir antimikrobinių medžiagų prieš šaknų patogenus galima gauti 10 – 30 % didesnę išeigą [34].

Esant neorganinių maisto medžiagų stygiui dirvožemyje, *Rhizobium* bakterijos padeda kviečiams pasisavinti netirpius geležies ir fosforo makroelementus išskiriant organines rūgštis, kurios yra lengvai prieinamos augalams. Bakterijos pagerina apdorotų šaknų morfologines savybes dėl kurių pagerėja vandens ir maisto medžiagų pasisavinimo efektyvumas. Taip pat pagerina azoto įsisavinimą augaluose. Nustatyta, kad naudojant *Rhizobium* bakterijas kartu su fosforo trąšomis, azoto, fosforo ir kalio koncentracijas augaluose buvo didesnė 20 % lyginant su kontroliniais augalais [32].

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1 Tyrimo objektai, naudotos medžiagos ir grūdų apdorojimo būdai

Darbo tiriamasis objektas – azotą fiksuojančios bakterijos. Darbo metu tirtos 5 skirtingos azotą fiksuojančios bakterijos: *Azospirillum* (lot. *Azospirillum lipoferum*), *Rhizobium* (lot. *Rhizobium leguminosarum*), *Azotobacter 1* (lot. *Azotobacter vinelandii*), *Azotobacter 3* (lot. *Azotobacter chroococcum*), *Azotobacter 4* (lot. *Azotobacter vinelandii 1*) ir komercinis bakterinis preparatas *BactoFil* (Vengrija).

Tyrimui naudota vasarinių kviečių veislė Hamlet, išvesta selekcinėje kompanijoje Wiersum Plantbreeding (Olandija). Šios veislės kviečiai yra vidutinio aukščio ir vegetacijos trukmės, pasižymi dideliu atsparumu miltligei.

Bakterijos pirmiausia buvo sėtos į sterilias *Petri* lėkšteles su standžia terpe, išskirta kolonija, kuri perkelta į skystą terpę ir padauginta (auginta 1 – 3 savaites 25 °C temperatūroje, 150 aps./min). Bakterijos padaugintos skystoje terpėje buvo naudotos grūdams apdoroti.

Vasariniai kviečiai apdoroti bakteriniais preparatais (išlaikant 30 min) buvo daiginti rulonėlių metodu ir žemėse.

Rulonėlių metodas. Apdoroti bakterijomis ar bakteriniu preparatu kviečiai susukami į filtrinį popierių buvo įstatyti į stiklinėlę su vandeniu ir daiginami 9 dienas, tada išmatuotas daigų ilgis, šaknų ilgis ir šaknų skaičius.

Kviečių daiginimo žemėse metodas. Apdoroti azotą fiksuojančiomis bakterijomis vasariniai kviečiai buvo pasėti žemėse „Natūralios sodo žemės kekkila, Suomija“ 1 cm gylyje.

Darbe naudotos medžiagos ir jų charakteristikos pateiktos 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Naudotos medžiagos ir jų charakteristikos.

Medžiaga	Cheminė formulė	Grynumas
Kalio fosfatas	KH_2PO_4	Chemiškai švarus, 99,0 %
Dikalio fosfatas	K_2HPO_4	Chemiškai švarus, 99,0 %
Magnio sulfato heptahidratas	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	p.a./G.R. 99,0 %
Natrio chloridas	NaCl	p.a./G.R. 99,0 %
Kalcio chloridas	CaCl_2	p.a./G.R. 96,0 %
Geležies trichloridas	FeCl_3	ACS Reagentas 97 %
Natrio Molibdato dihidratas	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Chemiškai švarus, 99,5 %

Natrio malatas	$C_4H_4Na_2O_5$	Chemiškai švarus, 99,0 %
Mielių ekstraktas	$C_{19}H_{14}O_2$	Mikrobiologijai.
Agaras	$C_{14}H_{24}O_9$	Mikrobiologijai
Geležies sulfato heptahidratas	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	ACS reagentas 99,0 %
Manitolis	$C_6H_{14}O_6$	p.a./G.R. 98,0 %
Gliukozė	$C_6H_{12}O_6$	Chemiškai švarus, 99,5 %
Natrio šarmas	NaOH	Chemiškai švarus, 99,0 %
Druskos rūgštis	HCl	p.a./G.R. 36,5 %
Sabouraud Dextrose Agar	-	Chemiškai švarus. 99,5 %
3,5 – dinitrosalicilo rūgštis	$(O_2N)_2C_6H_2-2-(OH)CO_2H$	Chemiškai švarus, 98 %
4 – hidroksi-benzhidrazidą	-	Chemiškai švarus
L-tirozinas	$O(CC(N)C(=O)O)$	Chemiškai švarus
Kalcio acetatas	$Ca(C_2H_3OO)_2$	Chemiškai švarus
Natrio acetatas	CH_3COONa	Chemiškai švarus, 99,9 %
Natrio karbonatas	Na_2CO_3	p.a./G.R. 99,0 %
Folin & Ciocalteu's Phenol	-	Chemiškai švarus
Trichloracto rūgštis	Cl_3CCOOH	Chemiškai švarus, 100 %
Kazeinas	-	Technical grade.
Karbamidas	$(NH_2)_2CO$	p.a./G.R. 99,5 %
Peptonas	-	Chemiškai švarus, 99,9 %
Dekstrozė	$C_6H_{12}O_6$	p.a./G.R. 99,5 %
Fenolio raudonasis	$C_{19}H_{14}O_5S$	Chemiškai švarus, 98 %

2.2 Azotą fiksuojančių bakterijų kultūrų paruošimas tyrimui

Norint padauginti kaip įmanoma grynesnes bakterijų kolonijas, būtina bakterijas pasėti ant standžios terpės. Padauginimui atlikti paruoštos rekomenduojamos *Azotobacter*, *Azospirillum* ir *Rhizobium* bakterijų terpės (2.2 lentelė). Užšaldyti bakteriniai preparatai pasėti ant standžių bakterijom rekomenduojamų mitybinių terpių. Į termostatą įdėtos *Petri* lėkštelės su pasėtomis bakterijomis laikomos 7 dienas. Iš *Petri* lėkštelėlių paimtos vizualiai grynos bakterijų kolonijos persėtos į skystą mitybinę terpę. Persėtos bakterijos įdedamos į termostatą – purtyklę, kur palaikoma 26 °C temperatūra, ir

150 apsisukimų per minutę apsuokos. Dėl nuolatinių apsisukimų terpė nuolat yra maišoma, todėl bakterijos auga sparčiai ir nepritrūksta maistinių medžiagų. Bakterijos buteliukuose augintos nuo 1 iki 3 savaičių.

2.3 Tinkamo anglies šaltinio mitybinei terpei parinkimas

Tinkamiausioms bakterijų mitybinėms terpėms nustatyti buvo naudotos rekomenduojamos bakterijų terpės ir modifikuotos rekomenduojamos terpės, kuriose pakeistas anglies šaltinio kiekis.

2.2 lentelė. Rekomenduojamų bakterinių terpių sudėtis.

<i>Azospirillum</i>		<i>Rhizobium</i>		<i>Azotobacter</i>	
Medžiaga	g/l	Medžiaga	g/l	Medžiaga	g/l
KH ₂ PO ₄	0,4	Mielių ekstraktas	1	Gliukozė	5
K ₂ HPO ₄	0,1	Manitolis	10	Manitolis	5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2	Agaras	15	Agaras	15
NaCl	0,1	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,1	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,1
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,02	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,1	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,1
FeCl ₃	0,01	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,005	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,005
Agaras	15	K ₂ HPO ₄	0,9	K ₂ HPO ₄	0,9
Natrio malatas	5	KH ₂ PO ₄	0,1	KH ₂ PO ₄	0,1
Mielių ekstraktas	0,05	FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,01	FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,01

Azospirillum padauginti buvo naudota mitybinė terpė pagal mikroorganizmų tiekėjo Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) rekomendacijas. *Rhizobium* bakterijoms buvo naudota ir DSMZ rekomenduojama terpė ir du terpės pakeitimai: (i) naudota 5 g/l manitolio, 1 g/l mielių ekstrakto ir (ii) 15 g/l manitolio, 5 g/l mielių ekstrakto. *Azotobacter* bakterijų terpei buvo naudota ir DSMZ rekomenduojama terpė ir šie terpės pakeitimai: (i) naudota 20 g/l gliukozės, kai neįdėta manitolio visai, ir (ii) 20 g/l manitolio, kai neįdėta gliukozės.

Ant standžios terpės, esant 26 °C temperatūrai, bakterijos buvo augintos 7 dienas. Tada suskaičiuota, kiek kolonijų buvo suformuota ant kiekvienos terpės.

Bakterijų kiekiui suskaičiuoti naudojama (2.1) formulė.

$$N = A \cdot B \cdot C \quad (2.1)$$

čia: N – kolonijas sudarantys vienetai 1 ml terpės;

A – užaugusių kolonijų skaičius *Petri* lėkštelėje;

B – atliktas bakterijų suspensijos praskiedimas;

C – sėjama 0,1 ml, bet dauginama iš 10, nes norimas bakterijų skaičius 1 ml.

2.4 Bakterijų gyvybingumo nustatymas

Atrinkus tinkamą anglies šaltinį mitybinei terpei buvo tirtas bakterijų gyvybingumas. Tam nuo *Petri* lėkštelės agaru paimtos morfologiškai grynai atrodančios bakterijų kolonijos, kurios buvo perkeltos į buteliukus su skysta mitybine terpe (2.1 pav.). Bakterijos auginamos termostate – purtykleje, esant 26 °C temperatūrai ir 150 apsisukimų per minutę dažniui. Bakterijos buteliukuose iš viso auginamos tris savaites. Gyvybingumui įvertinti bakterijos į *Petri* lėkšteles su standžia mitybine terpe persėtos praėjus savaitei ir trim savaitėms po auginimo skystoje terpėje. Atlikti dešimtkartiniai skiedimai kolonijų skaičiui nustatyti.



2.1 pav. Bakterijos skystoje terpėje.

2.5 Rulonėlių metodas

Kviečių grūdai apdoroti naudojant bakterinius preparatus. 10 gramų kviečių grūdų buvo užpildyta 100 ml bakterinio preparato. Grūdai bakteriniuose preparatuose buvo laikyti po 30 minučių. Iš viso gautos 7 imtys – 6 apdorotos bakteriniais preparatais ir 1 apdorota vandeniu.

Tyrimui atlikti buvo naudoti filtrinio popieriaus lakštai (60 cm x 60 cm). Lakštai buvo padalinti į keturias dalis, kad kiekvienos dalies aukštis būtų 15 cm, o ilgis 60 cm. Iš kito filtrinio popieriaus lakšto iškirpta siaura 5 cm ir 60 cm ilgio juostelė. Ant didesniosios juostos išdėlioti kviečiai yra uždengti siauresnionios juostos. Kviečių grūdai ant linijos išdėlioti kas 1 cm. Iš viso ant vienos juostos išdėliota po 50 – 60 grūdų. Juostos susukamos į rulonėlius. Rulonėliai, kurių grūdai buvo apdoroti su tuo pačiu bakteriniu preparatu yra patalpinti į vieną 1000 ml stiklinę. Į stiklinę įpilta po 500 ml vandens, o stiklinės su rulonėliais pastatomos ant palangės 9 dienoms. Rulonėliai visą laiką privalo būti vandenyje, kad sėklos gautų pakankamai drėgmės sudygti, kitu atveju kviečiai gali nesudygti. Po 9 dienų iš stiklinių ištraukti rulonėliai pateikti paveiksle (2.2 pav). Rulonėlius stengiamasi išvynioti kaip įmanoma švelniau, kad nepažeisti kviečių šaknų. Atskirtus kviečius matuoti po vieną registruojant sudygusių kviečių šaknų skaičių, ilgiausios šaknies ilgį ir lapų ilgį. Nuo išmatuo-

tų kviečių atskirtos sėklos yra sudedamos į *Petri* lėkšteles. Tolimesniems tyrimams atlikti naudojamos išdžiovinti ir sumalti kviečių grūdai.



2.2 pav. Kviečiai sudaiginti rulonėlių metodu.

2.6 Kviečių daiginimas žemėse

Kviečių grūdai apdoroti naudojant bakterinius preparatus. 10 gramų kviečių grūdų buvo užpildyta 100 ml bakterinio preparato. Grūdai bakteriniuose preparatuose buvo laikyti po 30 minučių. Iš viso gautos 7 imtys – 6 apdorotos bakteriniais preparatais ir 1 apdorota vandeniu.

Į sėklų daigyklos įpiltos žemės, žemės išlygintos ir ant jų paviršiaus pincetu eilėmis išdėlioti grūdai maždaug kas centimetrą vienas nuo kito (5 eiles po 20 vienetų kviečių grūdų). Grūdų sėklos apipurškotos 200 ml vandens naudojant rankinį purkštuvą. Apipurškotos sėklos (2.3 pav.) švelniai uždengtos žemių sluoksniu, žemės vėl apipurškotos tokiu pat vandens kiekiu. Visi anksčiau aprašyti žingsniai kartojami ir su kitais paruoštais preparatais. Daigyklos laistomos kas dvi dienas, kad žemės paviršius neišdžiūtų ir kviečiai greičiau sudygtų. Praėjus 10 dienų po pasėjimo į žemę, atliktas kviečių šaknų ir daigų matavimo tyrimas. Kviečiai iš žemės atsargiai ištraukti naudojant pincetą, kad nepažeisti šaknų. Išmatuotas kviečių šaknų skaičius, ilgiausios šaknies ilgis ir daigo ilgis. Nuo išmatuotų kviečių atskirtos sėklos išdžiovintos, sumaltos malūnu ir toliau naudotos fermentiniuose tyrimuose.



2.3 pav. Kviečiai paruošti sėti.

2.7 Kviečių daigumo nustatymas

Kviečių daigumui nustatyti buvo naudoti rulonėliuose ir žemėje sudaiginti kviečiai. Atlikti kviečių daigų matavimai (šaknų skaičius, šaknų ilgis ir daigo ilgis) ir suskaičiuota kokia dalis kviečių sudygo iš visų pasėtų kviečių. Sėklos surinktos ir naudotos tolimesniuose fermentiniuose tyrimuose.

2.8 Antimikrobinis tyrimas

Antimikrobiniui tyrimui atlikti buvo naudota bulvių dekstrozės agarų terpė. 10 gramų kviečių grūdų apdorota 100 ml bakterinio preparato. Iš viso paruoštos 7 stiklinėlės – 6 su bakteriniu preparatu ir 1 kontrolinė grupė su vandeniu. Grūdai stiklinėlėse su bakterijomis ir vandeniu buvo laikyti 30 minučių, sumaišant stiklinėlių turinį kas 10 minučių. Naudojant sterilų pincetą grūdai išdėlioti ant bulvių dekstrozės agarų terpės eilėmis po 3, 4 ir 3. Procedūra kartota, kol su vienu bakteriniu preparatu išdėliota po 150 kviečių grūdų. Paruoštos *Petri* lėkštelės laikytos termostate 23 °C temperatūroje. *Petri* lėkštelės termostate laikytos 2 dienas, tada atlikti skaičiavimai, kiek grūdų užsikrėtė grybeliu. Po atliktų skaičiavimų grūdai *Petri* lėkštelėse palikti termostate dar 3 dienoms, kad atsirastų sporos ir būtų galima fenotipiškai identifikuoti kokiais grybeliais buvo užsikrėtę grūdai (2.4 pav.). Fenotipiškai grybeliai nustatyti naudojant mikroskopą.



2.4 pav. Azotą fiksuojančių bakterijų antimikrobinis tyrimas.

2.9 Invertazinio aktyvumo nustatymas

Invertazės aktyvumas išmatuotas pagal susidariusius reakcijos produktus – gliukozės ir fruktozės mišinį. Redukuojančius cukrus galima nustatyti kolorimetriniu metodu, naudojant 3,5 – dinitrosalicilo rūgštį (DNS reagentą) arba 4 – hidroksi-benzhidrazidą. Darbo metu naudotas 4 – hidroksi-benzhidrazidas, su kuriuo redukuojantys sacharidai sudaro spalvotus junginius. Spalvos intensyvumas įvertintas spektrofotometru išmatavus monochromatinio spindulio sugertį tiriamuoju tirpalu. Naudojant kalibracinę gliukozės tiesę rastas gliukozės ekvivalentas, išlaisvintas iš sacharozės, vertė, kurią naudojant paskaičiuotas fermento aktyvumas.

Gliukozės gradavimo tiesei sudaryti buvo naudotas acetatinis buferis (100 mM, pH 4,5), gliukozės standartinis tirpalas (1 mg/ml) ir 4 – hidroksi-benzhidrazido tirpalas (5 mg/ml). Į 7 mėgintuvėlius įpilta nuo 0,95 ml iki 0 ml acetatinio buferio, nuo 0,05 ml iki 1 ml standartinio gliukozės tirpalo, į visus mėgintuvėlius įpilta po 2,9 ml 4 – hidroksi-benzhidrazido tirpalo. Tuščiam mėginiui pagaminti įpilta 0,9 ml acetatinio buferio ir 2,9 ml 4 – hidroksi-benzhidrazido tirpalo be gliukozės. Gauti mišiniai kaitinti verdančio vandens vonelėje. Po kaitinimo mėgintuvėliai atvėsinti po šaltu tekančiu vandeniu. Atvėsinti mėginiai skiesti su distiliuotu vandeniu santykiu 1:9. Atlikus skiedimą, spektrofotometru esant 410 nm bangos ilgio spindulio sugertis išmatuota tiriamaisiais tirpalais. Atlikti trys pakartojimai.

Pirmiausia, invertazės aktyvumas buvo nustatytas: (i) mitybinėje terpėje su bakterijomis, (ii) grūdų, kurie buvo daiginti rulonėlių metodu ir (iii) grūdų, kurie buvo sudaiginti žemėse. Mitybinė terpė su bakterijomis buvo nucentrifuguota, kad bakterijų ląstelės nusėstų ant mėgintuvėlio dugno, su automatine pipete paimta 1 ml terpės su joje esančiais fermentais. Iš grūdų invertazė buvo išgauta išdžiovinus grūdus sumalus malūnu ir apdorojus 10 mM natrio ir 5 mM kalcio acetatiniais buferiais,

pH 7,5. Miltai stiklinėlėse su buferiu buvo laikyti 30 minučių, pamaišant kas kelias minutes. Praėjus laikui, 2 ml grūdų ir buferio mišinio buvo paimta ir nucentrifuguota. Tuščias mėginys paruoštas panaudojant 0,9 ml acetatinio buferio. Kontrolinis mėginys paruoštas iš 0,2 ml acetatinio buferio ir 0,8 ml sacharozės tirpalo. Tiriamasis mėginys paruoštas iš 0,1 ml acetatinio buferio, 0,8 ml sacharozės tirpalo. Kiekvienai bakterijai atlikti trys pakartojimai. Mėgintuvėlių turinys gerai išmaišytas, mėgintuvėliai perkelti į 55 °C vonelę ir buvo laikyti 10 minučių. Praėjus 10 minučių į tiriamuosius ir tuščią mėginį buvo pridėta po 0,1 ml fermento ir buferio tirpalo. Mėgintuvėlių turinys sumaišytas, mėgintuvėliai perkelti į 55 °C vonelę 30 minučių. Po kaitinimo iš kiekvieno mėgintuvėlio paimta po 0,1 ml mėginio ir sumaišyta su 2,9 ml 4 – hidroksi-benzhidrazido tirpalo. Gauti mišiniai buvo kaitinti 5 minutes verdančio vandens vonelėje. Po kaitinimo mėgintuvėliai atvėsinti po tekančiu čiaupo vandeniui. Gauti mėginiai skiesti su distiliuotu vandeniu santykiu 1:9. Spektrofotometru išmatuota 410 nm bangos ilgio spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais ir išvestas vidurkis. Fermento aktyvumas (AV/ml) apskaičiuotas pagal (2.2) formulę.

$$AV/ml = \frac{GEV \cdot PF}{30 \cdot 0,1 \cdot 2} \quad (2.2)$$

čia: GEV – gliukozės ekvivalento vertė gradavimo tiesėje;

PF – praskiedimų faktorius;

30 – fermentinės reakcijos trukmė;

0,1 – paimtas fermento kiekis, ml;

2 – perskaičiavimo koeficientas: 1 μmol sacharozės hidrolizuotas į gliukozę ir fruktozę [35].

2.10 Proteazinio aktyvumo nustatymas

Laboratorijoje proteazėms nustatyti yra naudojamas kazeinas, kuris atlieka substrato vaidmenį. Proteazės suskaido peptidinius ryšius, todėl yra gaunamas laisvas tirozinas, kitos amino rūgštys ir peptinidiniai fragmentai. Folin & Ciocalteus reagentas reaguoja su susidariusiu laisvu tirozinu ir susidaro mėlynos spalvos chromoforai, kuriuos kiekybiškai galima nustatyti naudojant spektrofotometrą. Kuo intensivesnė spalva, tuo daugiau laisvo tirozino yra išsiskyre, tuo aktyvesnis proteazės fermentas. Iš standartinės tiesės galima nustatyti proteazės bandinio aktyvumą išreikštą vienetais, kuris yra mikromoliai tirozino ekvivalento išlaisvinto iš kazeino per minutę.

Tirozino gradavimo tiesei sudaryti buvo naudotas 1.1 mM L – tirozino tirpalas, 0,5 M natrio karbonato tirpalas, 0,5 M Folin & Ciocalteus reagentas. Į 5 mėgintuvėlius įpilta atitinkamai 0,025, 0,05, 0,1, 0,2 ir 0,25 ml L – tirozino tirpalo. Į tuščią mėginį L – tirozino nepilta. Visų mėgintuvėlių tūris pristatytas prie 1 ml naudojant distiliuotą vandenį. Į visus 6 mėgintuvėlius buvo pridėta po 2,5 ml natrio karbonato ir iškart pridėta 0,5 ml Folin & Ciocalteus reagento. Atlikti du pakartojimai pa-

tikimiems rezultatams gauti. Gauti mišiniai šildomi 37 °C vandens vonelėje 30 minučių. Po šildymo, mėginiai buvo atvėsinti ir nucentrifuguoti. Mėgintuvėliai su didžiausia L – tirozino koncentracija tamsiausi. Spektrofotometru matuojama 660 nm bangos ilgio spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais ir išvedamas vidurkis.

Proteazės fermentas buvo išskirtas iš visų bandinių: terpės su bakterijomis, grūdų užaugintų rulonėlių metodu ir grūdų, kurie buvo pasėti į žemę. Proteazei išskirti iš terpės su bakterijomis naudoti 2 ml „ependorf“ mėgintuvėliai. Į mėgintuvėlius įpilta 2ml terpės su bakterijomis prieš tai ją gerai sumaišius. Mėgintuvėliai centrifuguoti esant 5000 aps/min 5 minutes, gautas centrifugatas su fermentu atskirtas nuo nusėdusių bakterijų ląstelių naudojant automatinę pipetę. Proteazė iš prieš tai sudaigintų ir sumaltų grūdų išskirta naudojant 10 mM natrio ir 5 mM kalcio acetatinius buferius, pH 7,5. Miltai stiklinėlėse buvo laikyti 30 minučių, pamaišant kas keletą minučių. 100 mililitrų 50 mM kalio fosfato tirpale, kurio pH 7,5, ištirpinta 0,65 gramo baltymo kazeino pakeliant temperatūrą iki 80 – 85 °C, gaunamas 0,65 % kazeino tirpalas. Į tiriamuosius mėgintuvėlius buvo įpilta po 2,5 ml 0,65 % kazeino tirpalo. Kazeino tirpalui leista sušilti iki 37 °C jį palaikant vandens vonelėje. Į sušilusį kazeino tirpalą pridėta po 0,5 ml fermento tirpalo, išmaišoma ir vandens vonelėje šildoma dar 10 minučių 37 °C temperatūroje, tuščias mėginys be fermento tirpalo. Po 10 minučių buvo pridėta po 2,5 ml 110 mM trichloracto rūgšties, kuri nutraukia reakciją. Į tuščią mėginį pridėta 0,5 ml fermento tirpalo. Fermento pridėta tam, kad visuose mėgintuvėliuose fermento absorbcija būtų viena. Visi mėgintuvėliai šildomi 37 °C vandens vonelėje 30 minučių. Po 30 minučių į visus mėgintuvėlius pridėta po 2,5 ml natrio karbonato ir iškart po pridėta po 0,5 ml Folin & Ciocalteus reagento. Mėgintuvėlių turinys išmaišytas ir šildytas 37 °C vandens vonelėje 30 minučių. Visiems mėginiams atlikti du pakartojimai. Spektrofotometru išmatuota 660 nm bangos ilgio spindulio sugertis tiriamaisiais tirpalais ir išvestas vidurkis. Fermento aktyvumo vienetais viename mililitre apskaičiuoti naudota (2.3) formulė

$$AV/ml = \frac{\text{Išskirto tirozino ekvivalentas } \mu\text{mol} \cdot 5,5}{0,5 \cdot 10 \cdot 1} \quad (2.3)$$

čia: 5,5 – bandinio tūris mėgintuvėlyje, ml;

10 – bandymo laikas, min;

0,5 – fermento tūris, naudotas bandyme, ml;

1 – tūris naudotas kolorimetrinei analizei, ml [36, 37].

2.11 Ureazinio aktyvumo nustatymas

Dekarboksilinant amino rūgštis yra gaunamas karbamidas. Hidrolizuojant karbamidą yra gaunamas amoniakas ir anglies dvideginis. Išsiskyręs amoniakas šarmina terpę, pH pokyčiai aptinkami fenolio raudonojo spalvos pokyčiu – šviesiai oranžinė terpės spalva tampa šviesiai rožine. Organizmai su dideliu ureaziniu aktyvumu terpės spalvą gali pakeisti per 24 valandas, mikroorganizmams, kurių ureazinis aktyvumas yra mažesnis gali prireikti ir savaitės pastebimiems spalvos pokyčiams.

2.3 lentelė. Reagentai naudojami ureazinio aktyvumo nustatymui.

Reagentas	g/l
Karbamidas	20
NaCl	5
KH ₂ PO ₄	2
Peptonas	1
Dekstrozė	1
Fenolio raudonasis	0,012
Agaras	15

Į sterilius mėgintuvėlius įpilta po 4 – 5 ml terpės. Mėgintuvėliai palikti laminare kol terpė tampa standi. Tada ant standžios terpės mėgintuvėliuose užlašintas lašas bakterijų kultūros, lašas buferio su maltais grūdais iš rulonėlio metodo, lašas buferio su maltais grūdais iš žemių. Iš viso gauti 21 mėgintuvėliai eksperimentui atlikti. Mėgintuvėliai inkubuoti termostate 37 °C temperatūroje 7 dienas. Po savaitės patikrinta ar šviesiai oranžinė terpės spalva pavirto į šviesiai rožinę [38].

2.12 Duomenų analizavimas

Eksperimentuose daigų skaičius buvo nuo 68 iki 93 vienetų. Duomenys buvo registruoti praėjus 9 dienoms po apdorotų grūdų susukimo į rulonėlius ir 10 dienų po pasėjimo į žemę. Matavimų metu buvo registruoti daigų ilgiai, ilgiausios šaknies ilgis ir šaknų skaičius. Po matavimų gautiems duomenims palyginti buvo naudotas Welch' s dvipusis t – testas, matavimams su galimai nevienodomis imtimis, Microsoft Excel programoje.

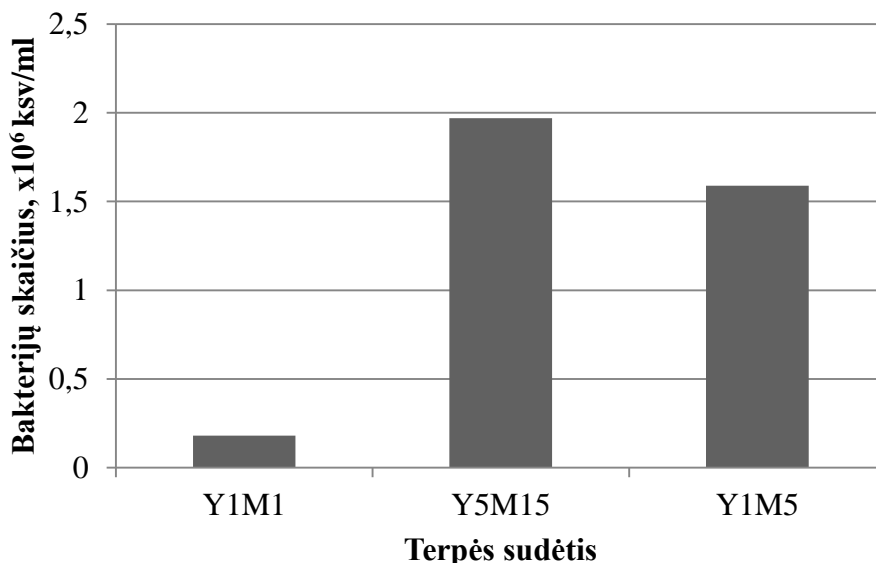
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Anglies šaltinio įtaka azotą fiksuojančių bakterijų gyvybingumui

Bandymo metu nustatyta ar iš tiesų rekomenduojama mitybinė terpė yra optimali bakterijų augimui. Bakterijos skystose terpėse termostate esant 26 °C temperatūrai ir 150 apsisukimų per minutę augo savaitę laiko, po to buvo persėtos į standžias terpes, praėjus savaitei po persėjimo ant standžių terpių, buvo skaičiuotas bakterijų skaičius.

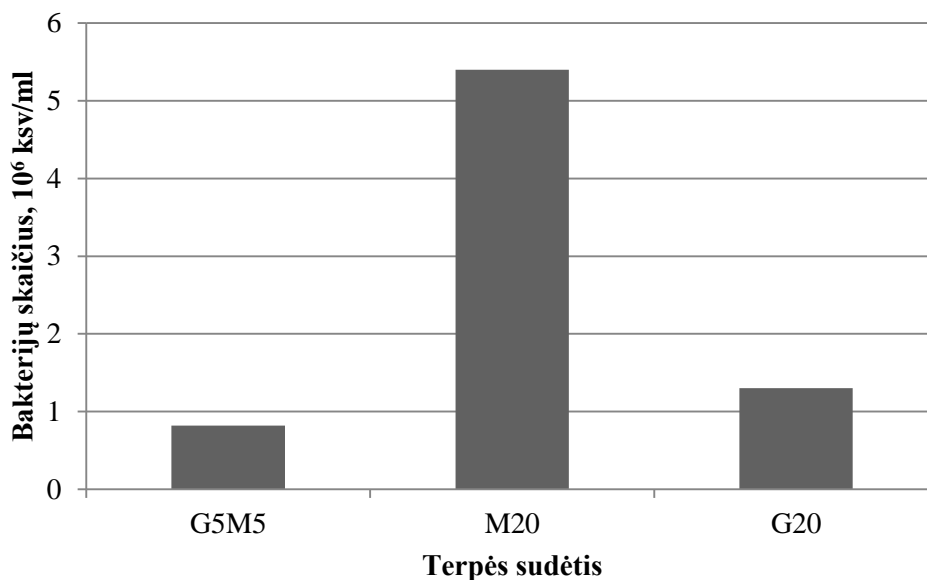
Azospirillum (lot. *Azospirillum lipoferum*) bakterijoms auginti buvo naudota DSMZ rekomenduojama terpė. Nustatyta, kad terpėje ruoštoje iš 5 g/l natrio malato, 0,05 g/l mielių ekstrakto ir 15 g/l agarų, praėjus savaitei po jų perkėlimo į buteliukus, *Azospirillum* bakterijų buvo $5,3 \times 10^7$ ksv/ml.

Terpės įtaka *Rhizobium* (lot. *Rhizobium leguminosarum*) bakterijų augimui pateikta 3.1 paveiksle. Daugiausiai kolonijas sudarančių vienetų – $1,97 \times 10^6$ ksv/ml buvo terpėje, kurioje manitolio įdėta 15 g/l, o mielių ekstrakto 5 g/l. DSMZ rekomenduojamoje *Rhizobium* bakterijų terpėje buvo $1,59 \times 10^6$ ksv/ml. Mažiausiai kolonijas sudarančių vienetų viename mililitre ($1,8 \times 10^5$) buvo modifikuotoje terpėje, kurioje mielių ekstrakto ir manitolio buvo po 1 g/l. Tolimesniems grūdų apdoravimo tyrimams pasirinkta naudoti modifikuota mitybinė terpė, kuri sudėtyje turi daugiau manitolio ir mielių ekstrakto (5 g/l mielių ir 15 g/l manitolio), nes šioje terpėje bakterijos augo geriau lyginant su rekomenduojama bakterijų terpe.



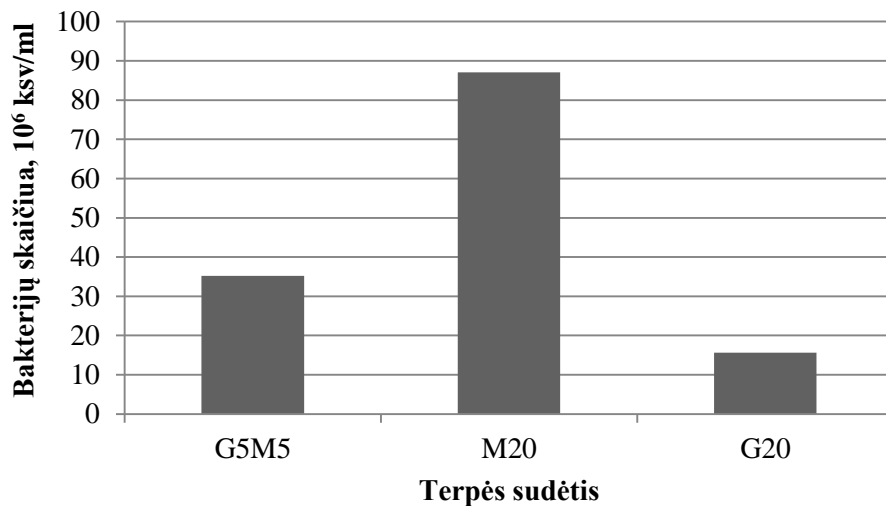
3.1 pav. *Rhizobium* bakterijų skaičius skirtingose terpėse: Y1M1 – po 1 g/l mielių ir manitolio, Y5M15 – 5 g/l mielių ekstrakto ir 15 g/l manitolio, Y1M5 – 1 g/l mielių ekstrakto ir 5 g/l manitolio.

Terpės įtaka *Azotobacter 3* (lot. *Azotobacter chroococcum*) bakterijų augimui pateikta 3.2 paveiksle. Daugiausia $5,4 \times 10^6$ *Azotobacter 3* kolonijas sudarančių vienetų buvo modifikuotoje terpėje, kurioje manitolio koncentracija 20 g/l. Rekomenduojamoje terpėje ir kitoje modifikuotoje terpėje, kurioje gliukozės koncentracija 20 g/l, kolonijas sudarančių vienetų skaičius panašus – rekomenduojamoje $8,2 \times 10^5$, o modifikuotoje $1,3 \times 10^6$ ksv/ml terpės. Tolimesniems tyrimams pasirinkta naudoti modifikuotą terpę, kurioje manitolio koncentracija yra 20 g/l, nes šioje terpėje bakterijos augo geriausiai.



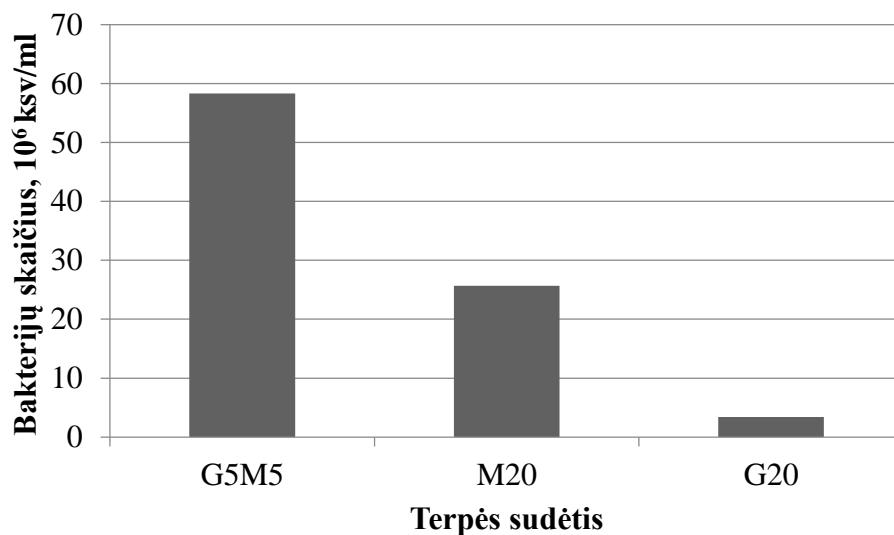
3.2 pav. *Azotobacter 3* bakterijų skaičius skirtingose terpėse: G5M5 – po 5 g/l gliukozės ir manitolio, M20 – 20 g/l manitolio, G20 – 20 g/l gliukozės.

Terpės įtaka *Azotobacter 1* (lot. *Azotobacter vinelandii*) bakterijų augimui pateikta 3.3 paveiksle. Daugiausia *Azotobacter 1* $8,7 \times 10^7$ ksv/ml buvo modifikuotoje terpėje, kurioje manitolio koncentracija 20 g/l. Beveik tris kartus mažiau $3,5 \times 10^7$ ksv/ml buvo rekomenduojamoje bakterijų terpėje, o mažiausiai kolonijas sudarančių vienetų $1,6 \times 10^7$ buvo terpėje, kurioje maisto šaltinis buvo tik gliukozė, gliukozės koncentracija 20 g/l. Toliau tyrimuose naudota modifikuota terpė, kurioje kaip maisto šaltinis naudojamas tik manitolis, o jo koncentracija siekia 20 g/l.



3.3 pav. *Azotobacter 1* bakterijų skaičius skirtingose terpėse: G5M5 – po 5 g/l gliukozės ir manitolio, M20 – 20 g/l manitolio, G20 – 20 g/l gliukozės.

Terpės įtaka *Azotobacter 4* (*Azotobacter vinelandii 1*) bakterijų augimui pateikta 3.4 paveiksle. Daugiausia *Azotobacter 4* bakterijų buvo gamintojo rekomenduojamoje terpėje (5 g/l gliukozės ir 5 g/l manitolio) – $5,8 \times 10^7$ ksv/ml. Du kartus mažiau $2,6 \times 10^7$ ksv/ml buvo modifikuotoje terpėje, kurioje manitolio koncentracija 20 g/l. Mažiausiai bakterijų užaugo terpėje, kurios sudėtyje buvo 20 g/l gliukozės – $3,4 \times 10^6$ ksv/ml. Tolimesniems tyrimams pasirinkta bakterijų terpė, kurioje *Azotobacter 4* skaičius buvo didžiausias.

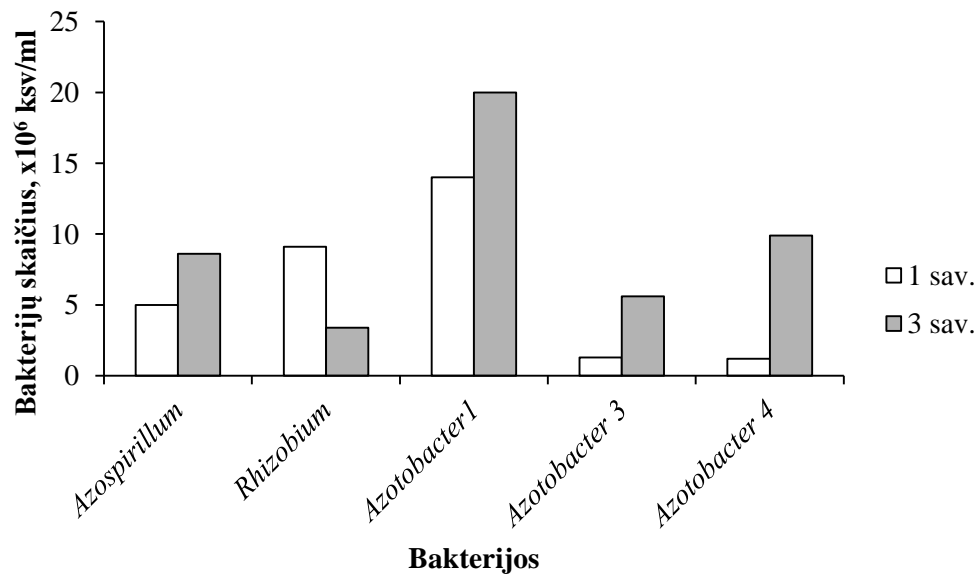


3.4 pav. *Azotobacter 4* bakterijų skaičius skirtingose terpėse: G5M5 – po 5 g/l gliukozės ir manitolio, M20 – 20 g/l manitolio, G20 – 20 g/l gliukozės.

3.2 Auginimo trukmės įtaka azotą fiksuojančių bakterijų gyvybingumui

Bandymo metu buvo nustatyta auginimo trukmės įtaka azotą fiksuojančių bakterijų gyvybingumui auginant 26 °C temperatūroje prie 150 aps./minutę termostate – purtylėje. Tyrimui atlikti buvo naudotos tos terpės, kuriose ankstesnio tyrimo metu bakterijų skaičius buvo didžiausias. *Azospirillum* naudota DSMZ rekomenduojama terpė, *Rhizobium* modifikuota terpė, kurios sudėtyje yra 15 g/l manitolio ir 5 g/l mielių ekstrakto, *Azotobacter 1* ir *Azotobacter 3* naudota modifikuota terpė su 20 g/l manitolio, *Azotobacter 4* naudota DSMZ rekomenduojama bakterijų terpė. Gyvybingumui nustatyti bakterijos į *Petri* lėkštes su standžiomis terpėmis buvo persėtos praėjus savaitei ir trim savaitėms po jų pasėjimo į buteliukus. Bakterijos ant standžios terpės buvo augintos savaitę esant 26 °C temperatūrai, dėl lėto bakterijų augimo ant standžios terpės.

Auginimo trukmės įtaka azotą fiksuojančių bakterijų gyvybingumui pateikta 3.5 paveiksle. *Azospirillum*, *Azotobacter 1*, *Azotobacter 3* ir *Azotobacter 4* skaičius praėjus trim savaitėms po jų perkėlimo į buteliukus buvo ženkliai didesnis lyginant su bakterijų skaičiumi praėjus savaitei po pasėjimo į buteliukus. *Azospirillum* skaičius praėjus savaitei po persėjimo buvo 5×10^6 ksv/ml, o po trijų savaičių auginimo buvo $8,6 \times 10^6$ KSV/ml. Po 3 savaičių bakterijų skaičius padidėjo 1,72 karto lyginant su vienos savaitės auginimu. *Azotobacter 1* skaičius po savaitės siekė $1,4 \times 10^7$ ksv/ml, praėjus trim savaitėms 2×10^7 ksv/ml, o tai 1,42 karto daugiau nei po savaitės. *Azotobacter 3* skaičius po savaitės siekė $1,3 \times 10^6$ ksv/ml, praėjus trim savaitėms $5,6 \times 10^6$ ksv/ml, o tai 4,3 karto daugiau nei praėjus savaitei po persėjimo į buteliukus. *Azotobacter 4* skaičius po savaitės siekė $1,2 \times 10^6$ ksv/ml, po trijų savaičių bakterijų skaičius $9,9 \times 10^6$ ksv/ml, o tai 8,25 karto daugiau nei praėjus savaitei po perkėlimo į buteliuką. Vienintelės *Rhizobium* bakterijos buvo jautresnės laiko poveikiui ir gyvybingiausios buvo praėjus savaitei po jų persėjimo į buteliukus su skysta mitybine terpe. *Rhizobium* bakterijų skaičius praėjus savaitei po persėjimo į buteliukus siekė $9,1 \times 10^6$ ksv/ml, o praėjus trim savaitėms bakterijų skaičius sumažėjo ir siekė $3,4 \times 10^6$ ksv/ml, o tai 2,6 karto mažiau nei praėjus savaitei po bakterijų persėjimo į buteliuką. Toliau tyrimams atlikti buvo naudotos bakterijos su didžiausiu gyvybingumu ir didžiausiu skaičiumi – *Rhizobium* bakterijos buteliukuose buvo auginamos savaitę, o *Azospirillum*, *Azotobacter 1*, *Azotobacter 3* ir *Azotobacter 4* bakterijos buteliukuose buvo auginamos po tris savaites.



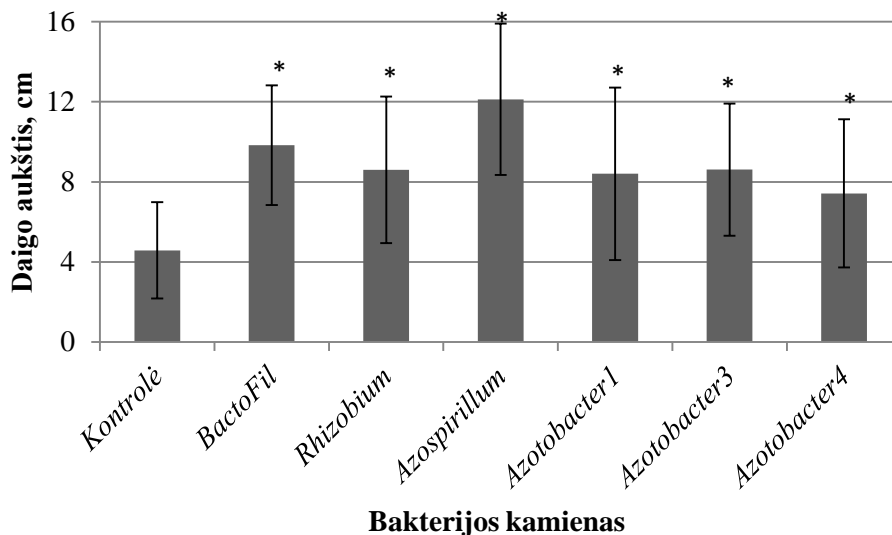
3.5 pav. Auginimo trukmės įtaka azotą fiksuojančių bakterijų gyvybingumui.

3.3 Azotą fiksuojančių bakterijų įtaka kviečių augimui vertinant rulonų metodu

Tyrimui atlikti buvo naudojami vasariniai kviečiai, kurie buvo apdoroti bakteriniais preparatais, kviečio grūdus 30 minučių palaikant bakteriniame preparate. Bakterijos užaugintos joms optimalioje terpėje, *Azospirillum*, *Azotobacter 1*, *Azotobacter 3* ir *Azotobacter 4* augintos po tris savaites iki apdoravimo grūdais, *Rhizobium* bakterijos augintos savaitę iki apdoravimo grūdais. Tyrimo metu nustatyta, kaip bakteriniai preparatai įtakoja kviečių šaknų skaičių, šaknų ilgį ir daigo ilgį. Papildomai vertinta komercinio preparato *BactoFil* įtaka kviečių šaknų skaičiui, šaknų ir daigų ilgiui. Kiekviena imtis sudaryta iš 100 kviečių.

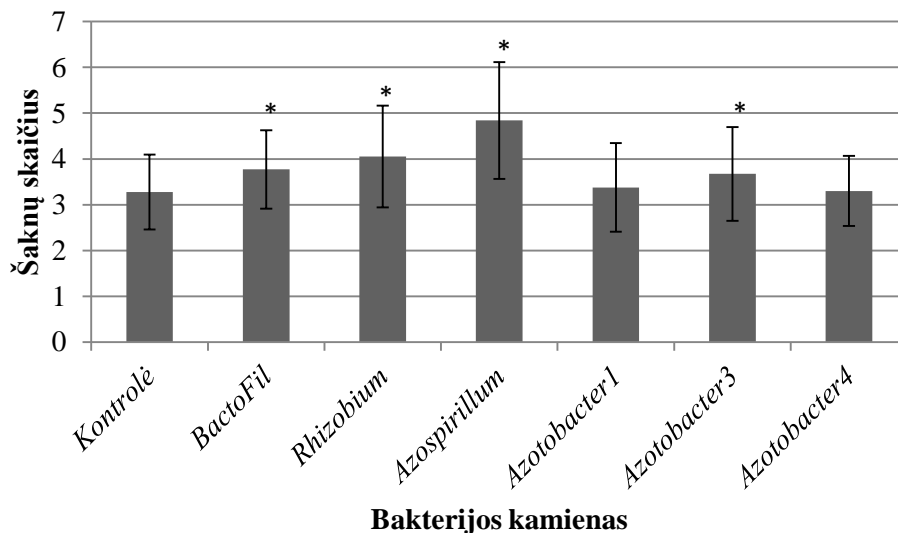
Daigų ilgio priklausomybė nuo naudotų bakterijų, o taip pat komercinio preparato *BactoFil* įtaka kviečių daigų ilgiui pateikta 3.6 paveiksle. Visos naudotos bakterijos ir komercinis preparatas *BactoFil* turėjo teigiamos įtakos kviečio daigų ilgiui. Kontrolinių kviečio grūdų vidutinis daigų ilgis praėjus savaitei po apdoravimo buvo 4,58 cm. Komerciniu bakterijų preparatu apdorotų grūdų daigų vidutinis ilgis buvo 9,83 cm, o tai 2,14 karto ilgesni daigai nei kontroliniai. *Rhizobium* bakterijomis apdorotų grūdų daigų ilgis siekė 8,61 cm, o daigai buvo 1,88 karto ilgesni. *Azospirillum* bakterijos tyrimų metu rodė geriausias rezultatus, vidutinis daigų ilgis siekė 12,12 cm, o daigai buvo ilgesni net 2,64 karto lyginant su kontroliniais daigais. *Azotobacter 1* bakterijomis apdorotų grūdų daigų vidutinis ilgis siekė 8,4 cm, o tai 1,83 karto ilgesni daigai nei kontroliniai. *Azotobacter 3* bakterijomis apdorotų grūdų daigų vidutinis ilgis panašus į *Rhizobium* ir *Azotobacter 1* apdorotų grūdų daigų vidutinį ilgį – 8,61 cm, o tai 1,88 karto ilgesni daigai lyginant su kontrole. Iš visų naudotų bakterijų

mažiausiai vidutiniam daigų ilgiui įtakos turėjo *Azotobacter 4* bakterijos. Šiomis bakterijomis apdorotų grūdų daigų vidutinis ilgis buvo 7,43 cm, o daigai 1,62 karto ilgesni lyginant su kontroliniais daigais.



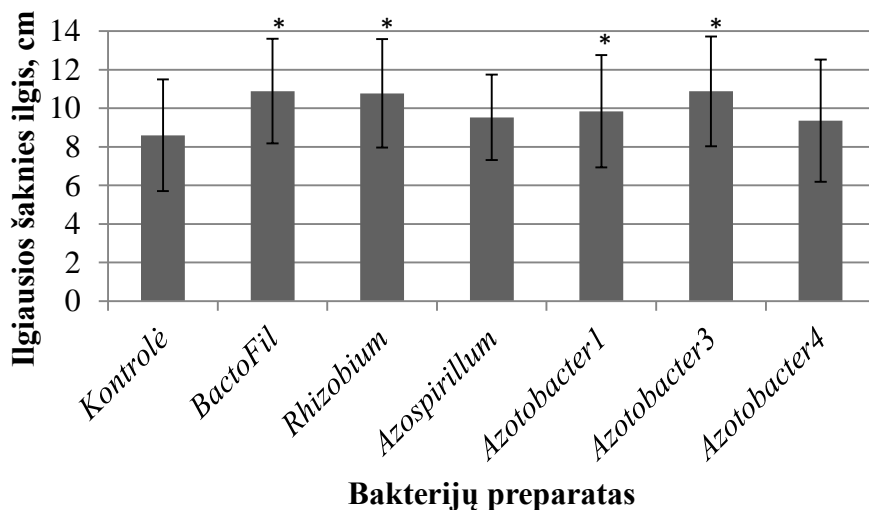
3.6 pav. Bakterinių preparatų įtaka kviečių daigų aukščiui. * žymi patikimą skirtumą tarp bakterijomis apdorotų ir kontrolinių daigų ($p < 0,05$).

Bakterinių preparatų, o taip pat komercinio preparato *BactoFil* įtaka kviečių šaknų skaičiui pateikta 3.7 paveiksle. Komercinis bakterinis preparatas *BactoFil* ir trys tiriamosios bakterijos turėjo teigiamos įtakos apdorotų grūdų šaknų skaičiui. Kontroliniai kviečiai, kurie buvo apdoroti tik vandeniui, vidutiniškai turėjo po 3,28 šaknies. Komerciniu bakteriniu preparatu *BactoFil*, *Azotobacter 3* ir *Rhizobium* bakterijomis apdoroti grūdai atitinkamai suformavo 3,8, 3,7 ir 4,1 šaknies. Lyginant su kontroline kviečių grupe, komerciniu bakteriniu preparatu apdoroti kviečiai suformavo 1,1 karto, *Azotobacter 3* 1,1 karto ir *Rhizobium* 1,2 karto daugiau šaknų nei kontrolinė kviečių grupė. Daugiausia šaknų suformavo kviečiai, kurie buvo apdoroti *Azospirillum* bakterijomis, suformuotų šaknų skaičius siekė 4,84 šaknies, o tai 1,5 karto daugiau šaknų, nei kontrolinėje grupėje. *Azotobacter 1* ir *Azotobacter 3* reikšmingos įtakos kviečių šaknų skaičiui neturėjo. *Azotobacter 1* bakterijomis apdorotų kviečių vidutinis šaknų skaičius siekė 3,4, o *Azotobacter 4* bakterijomis apdorotų kviečių vidutinis šaknų skaičius 3,3 šaknies.



3.7 pav. Bakterinių preparatų įtaka kviečių šaknų skaičiui. * žymi patikimą skirtumą tarp bakterijomis apdorotų ir kontrolinių daigų ($p < 0,05$).

Bakterinių preparatų įtaka kviečių šaknų ilgiui pateikta 3.8 paveiksle. Komercinis bakterinis preparatas *BactoFil* ir dar trys bakterijos – *Rhizobium*, *Azotobacter 1* ir *Azotobacter 3* turėjo teigiamą poveikį grūdų šaknų ilgiui. Kontrolinių kviečių vidutinis šaknų ilgis siekė 8,6 cm. Komerciniu bakteriniu preparatu ir *Azotobacter 3* apdorotų kviečių vidutiniai šaknų ilgiai sutampa – 10,88 cm. Lyginant su kontroline grupe, komerciniu bakteriniu preparatu ir *Azotobacter 3* apdorotų kviečių šaknys buvo 1,26 karto ilgesnės. *Rhizobium* bakterijomis apdorotų kviečių vidutinis šaknų ilgis siekė 10,77 cm, o šaknys 1,25 karto ilgesnės nei kontrolinių kviečių šaknys. Priešingai nei kituose kviečio dalių (šaknų) matavimuose, *Azospirillum* bakterijos patikimo šaknų ilgio skirtumo neturėjo. *Azospirillum* apdorotų kviečių šaknų ilgis siekė 9,53 cm, o šiomis bakterijomis apdorotų šaknų ilgis tik 1,1 karto ilgesnės nei kontrolinių kviečių. *Azotobacter 4* bakterijomis apdorotų kviečių šaknų vidutinis ilgis buvo artimiausias kontrolinei grupei ir siekė 9,36 cm, o šaknys buvo ilgesnės tik 1,08 karto.



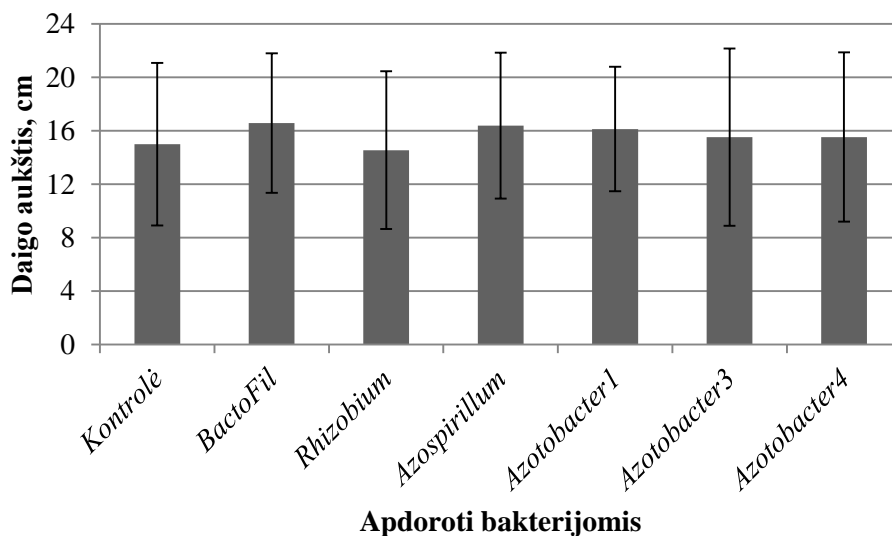
3.8 pav. Bakterinių preparatų įtaka kviečių šaknų ilgiui. * žymi patikimą skirtumą tarp bakterijomis apdorotų ir kontrolinių daigų ($p < 0,05$).

3.4 Kviečių daiginimas žemėse

Tyrimui atlikti buvo naudojami vasariniai kviečiai, kurie buvo apdoroti komerciniu bakteriniu preparatu ir penkiomis skirtingomis azotą fiksuojančiomis bakterijomis. Bakterijos buvo užaugintos parinktoje joms optimalioje terpėje. 10 gramų kviečių grūdų buvo laikyta 100 ml terpės su bakterijomis 30 minučių. Praėjus laikui, terpė buvo nupilta, o grūdai eilėmis išdėlioti ant žemių. Gautos eilės vėliau buvo užbarstomos žemėmis ir naudojant rankinį purkštuvą apipurkštos 250 ml vandens. Kiekviena imtis sudaryta iš 100 daigų.

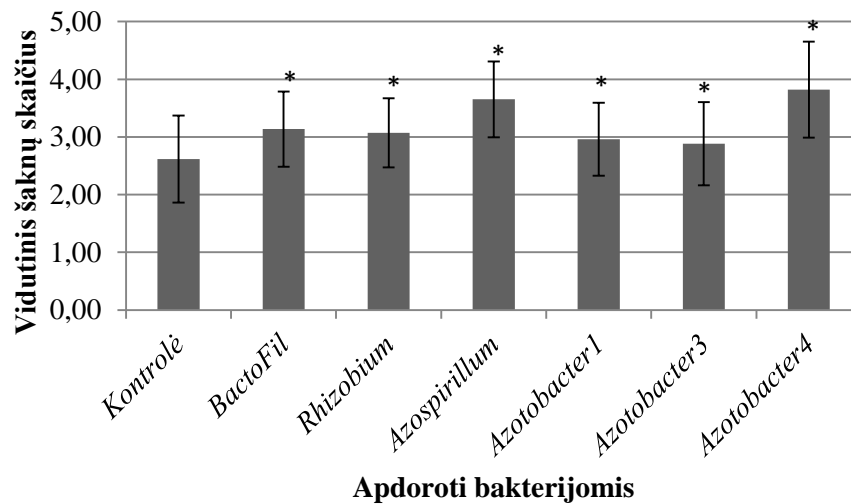
Bakterinių preparatų įtaka kviečių daigų aukščiui pateikta 3.9 paveiksle. Nei komercinis bakterinis preparatas *Bactofil*, nei tiriamosios bakterijos patikimos ir reikšmingos įtakos apdorotų grūdų daigų aukščiui neturėjo. Tiek bakterijų preparatais apdorotų, tiek kontrolinių kviečių daigų aukščiai buvo panašūs – kontrolinių daigų vidutinis aukštis siekė 14,99 cm, o komerciniu bakteriniu preparatu ir bakterijomis apdorotų daigų vidutinis aukštis buvo nuo 14,55 cm iki 16,57 cm. Mažiausi daigai buvo imtyje, kuri buvo apdorota *Rhizobium* bakterijomis, didžiausi daigai buvo komerciniu bakteriniu preparatu ir *Azospirillum* bakterijomis apdorotų daigų. Literatūros šaltiniuose nurodoma, kad *Azotobacter* bakterijomis apdorotų kviečių daigai, augę žemėje, buvo aukštesni, varpos ilgesnės, o grūdų išeiğa didesnė, palyginus su kontroline grupe [39]. Nustatyta, kad *Azospirillum lipoferum* pasižymi dideliais fitohormonų išskiriamais kiekiais, kurie reikšmingai padidina augalo augimą, tačiau tik maža dalis fiksuoto azoto yra perduodama iš bakterijų kviečiams [40]. Taip pat nustatyta, kad

Rhizobium bakterijomis apdoroti kviečiai neženkliai duoda didesnę derlių, tačiau žymiai padidėja šiaudų išeiga [41].



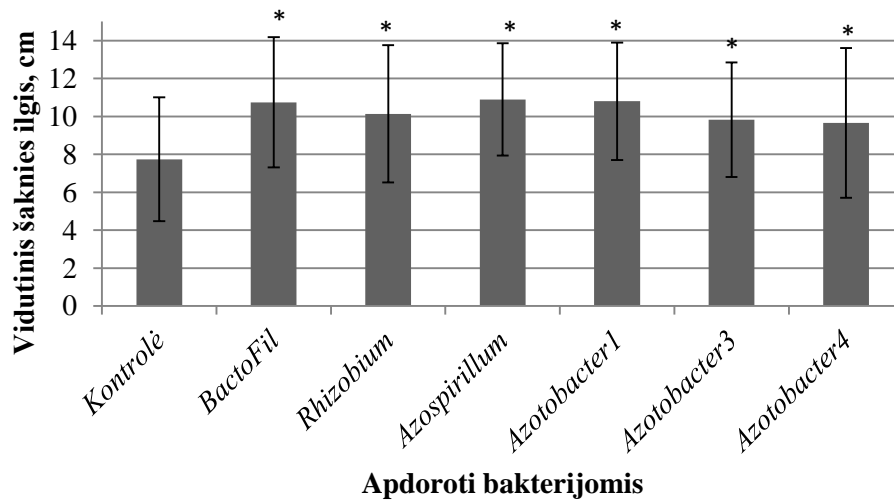
3.9 pav. Bakterinių preparatų įtaka kviečių daigų aukščiui.

Bakterinių preparatų, o taip pat komercinio preparato *BactoFil* įtaka kviečių šaknų skaičiui pateikta 3.10 paveiksle. Kontrolinė grupė vidutiniškai formavo 2,62 šaknies. Daugiausia šaknų suformavo grūdai apdoroti *Azospirillum* ir *Azotobacter 4* bakterijomis. *Azospirillum* bakterijomis apdoroti grūdai vidutiniškai suformavo 3,65 šaknies, o *Azotobacter 4* bakterijomis apdoroti grūdai suformavo 3,82 šaknies, tai atitinkamai 1,4 karto ir 1,45 karto daugiau šaknų nei kontrolinėje kviečių grupėje. Vidutiniškai 3,14 ir 3,07 šaknies suformavo grūdai apdoroti komerciniu bakteriniu preparatu ir *Rhizobium* bakterijomis. Komerciniu bakteriniu preparatu apdoroti grūdai suformavo 1,2 karto daugiau šaknų, o *Rhizobium* bakterijomis apdoroti grūdai 1,17 karto daugiau šaknų. Mažiausiai šaknų suformavo *Azotobacter 1* ir *Azotobacter 3* bakterijomis apdoroti grūdai. *Azotobacter 1* bakterijomis apdoroti grūdai suformavo 2,96 šaknies, *Azotobacter 3* bakterijomis apdoroti grūdai 2,88 šaknies. *Azotobacter 1* ir *Azotobacter 3* bakterijomis apdoroti grūdai atitinkamai suformavo 1,12 karto ir 1,1 karto daugiau šaknų lyginant su kontroline grupe.



3.10 pav. Bakterinių preparatų įtaka kviečių šaknų skaičiui. * žymi patikimą skirtumą tarp bakterijomis apdorotų ir kontrolinių daigų ($p < 0,05$).

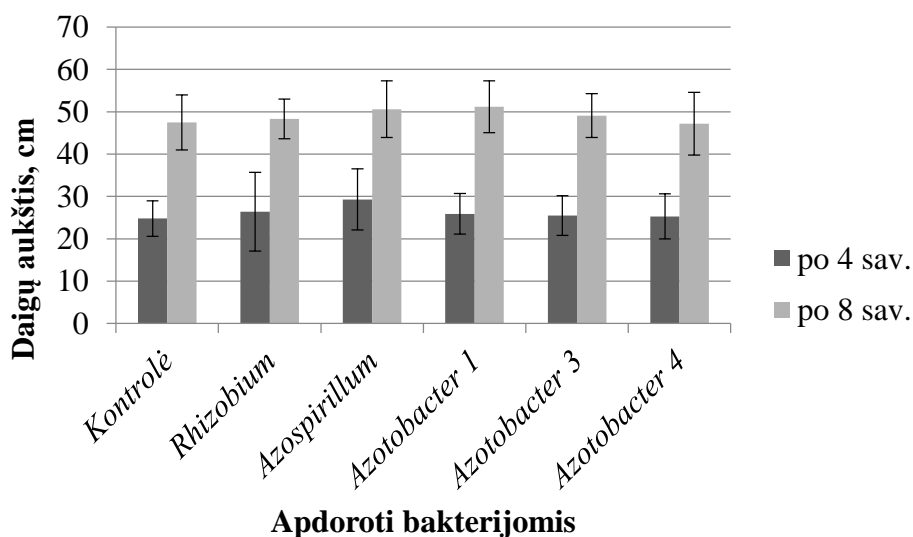
Bakterinių preparatų, o taip pat komercinio preparato *BactoFil* įtaka kviečių šaknų ilgiui pateikta 3.11 paveiksle. Kontrolinės grupės vidutinis šaknų ilgis siekė 7,74 cm. Ilgiausias šaknis turėjo *Azospirillum*, *Azotobacter 1* bakterijomis ir komerciniu bakteriniu preparatu apdoroti kviečio grūdai. *Azospirillum*, *Azotobacter 1* ir komerciniu bakteriniu preparatu apdorotų grūdų vidutinis šaknies ilgis siekė atitinkamai 10,89, 10,8 ir 10,74, o tai 1,4 karto, 1,39 karto ir 1,38 karto ilgesnės šaknys nei kontrolinėje grupėje. *Rhizobium* ir *Azotobacter 3* bakterijomis apdorotų grūdų vidutiniai šaknų ilgiai siekė 10,14 cm ir 9,82 cm, o tai atitinkamai 1,3 karto ir 1,27 karto ilgesnės šaknys nei kontrolinės grupės kviečių. Iš bakterijomis apdorotų grūdų mažiausias šaknis turėjo *Azotobacter 4* bakterijomis apdoroti grūdai, vidutinis šaknų ilgis 9,66 cm, o tai 1,25 karto daugiau nei kontrolinės grupės kviečių. Literatūroje šaltiniuose teigiama, kad *Azotobacter* bakterijomis apdorotų grūdų šaknys taip pat buvo pastebimai ilgesnės nei kontrolinių kviečių [39].



3.11 pav. Bakterinių preparatų įtaka kviečių šaknų ilgiui. * žymi patikimą skirtumą tarp bakterijomis apdorotų ir kontrolinių daigų ($p < 0,05$).

3.5 Lauko matavimai

Bakteriniais preparatais apdoroti kviečių grūdai buvo pasėti į žemę 3 centimetrų gylyje. Kviečių daigų aukštis išmatuotas praėjus mėnesiui po sudygimo, po matavimų kviečiai pakartotinai apipurkšti bakteriniais preparatais. Kviečiai vėl išmatuoti praėjus mėnesiui po to, kai buvo apipurkšti. Iš viso tyrimas truko du mėnesius. Bakterinių preparatų įtaka kviečių daigų aukščiui pateikta 3.12 paveiksle. Patikimų skirtumų tarp imčių nenustatyta. Kontrolinėje grupėje vidutinis kviečių aukštis po 4 savaičių buvo 24,8 cm, po 8 savaičių 47,5 cm. Bakteriniais preparatais apdorotų kviečių aukštis praėjus 4 savaitėms po to, kai jie buvo apdoroti, aukštis kito nuo 25,3 cm iki 29,3 cm. Po keturių savaičių aukščiausi buvo *Azospirillum* bakterijomis apdoroti kviečiai – 29,3 cm. Pakartotinai apipurkštų kviečių aukštis po 8 savaičių kito nuo 47,2 cm iki 51,2 cm. Aukščiausi kviečiai buvo apdoroti *Azotobacter 1* bakterijomis – 51,2 cm. Gauti rezultatai yra panašūs, todėl negalima teigti, kad kažkuris bakterinis preparatas buvo pranašesnis už kitus. Įtakos tyrimo rezultatams galėjo turėti nepalankios oro sąlygos.



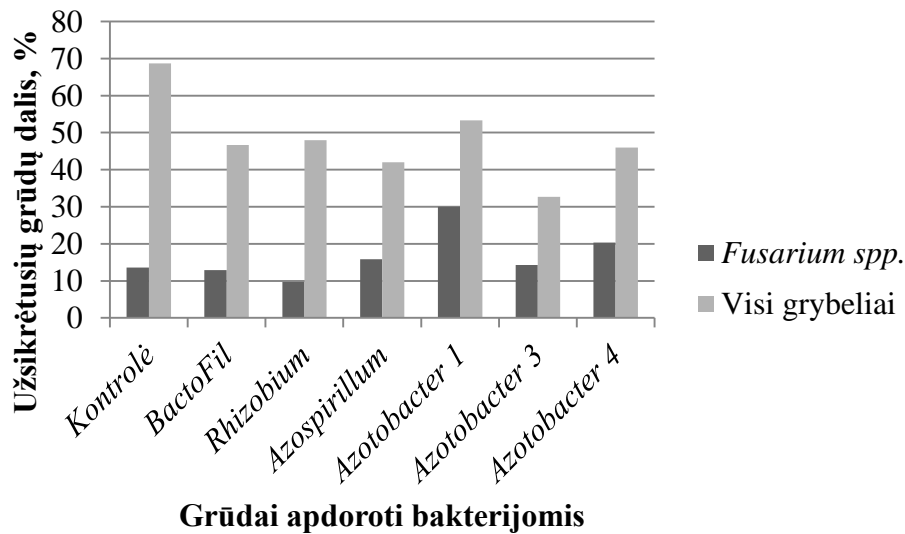
3.12 pav. Bakterinių preparatų įtaka kviečių daigų aukščiui.

3.6 Bakterijų antimikrobinis aktyvumas

Antimikrobiniam aktyvumui nustatyti buvo naudoti vasariniai kviečiai, kurie kaip ir ankstesniuose tyrimuose buvo apdoroti komerciniu bakteriniu preparatu *BactoFil* ir bakterijų kultūromis. Kiekvienoje imtyje po 150 grūdų. Grūdai 100 ml stiklinėlėse su bakterijomis buvo laikomi po 30 minučių pamaišant kas keletą minučių. Bakterijomis apdoroti grūdai pincetu išdėlioti ant Petri lėkštelių ir laikyti termostate 23 °C temperatūroje 2 dienas. Praėjus dviem dienoms suskaičiuojami grybeliu užsikrėtę grūdai, Petri lėkštelės termostate laikytos dar tris dienas, kad būtų galima fenotipiškai nustatyti grybelius.

Bakterinių preparatų ir komercinio bakterinio preparato *BactoFil* įtaka kviečio mikroskopiniams grybeliams pateikta 3.13 paveiksle. Kontrolinėje grupėje grybeliu užsikrėtė 68,6 % visų grūdų. Iš visų grybeliu užsikrėtusių grūdų pavyko identifikuoti *Fusarium spp.* Kontrolinėje grupėje *Fusarium spp.* grybeliu buvo užsikrėtę 13,59 % grūdų. Mažiausiai grybeliu buvo užsikrėtę grūdai, kurie buvo apdoroti *Azotobacter 3* bakterijomis, užsikrėtusių grūdų dalis sudarė 32,7 %, o *Fusarium spp.* 14,29 % nuo visų užsikrėtusių grūdų. Kiek daugiau grybeliu buvo užsikrėtę grūdai apdoroti *Azospirillum* bakterijomis, užsikrėtusių grūdų dalis 42 %, o *Fusarium spp.* užsikrėtė 15,87 % nuo užsikrėtusių grūdų. Grybeliu užsikrėtusių grūdų procentinė dalis komerciniu bakteriniu preparatu, *Rhizobium* ir *Azotobacter 4* bakterijomis apdorotuose bandiniuose panaši, atitinkamai užsikrėtė 46,7 %, 48 % ir 46 % visų grūdų. *Fusarium spp.* atitinkamai buvo užsikrėtę 12,86 %, 9,72 % ir 20,29 % nuo grybeliu užsikrėtusių grūdų. Tyrimo metu iš naudotų bakterijų mažiausią antimikrobinį akty-

vumą turėjo *Azotobacter 1*, o grybeliu buvo užsikrėtę 53,3 % visų grūdų. *Fusarium spp.* grybelių šioje imtyje rasta 30 % nuo visų užsikrėtusių grūdų.

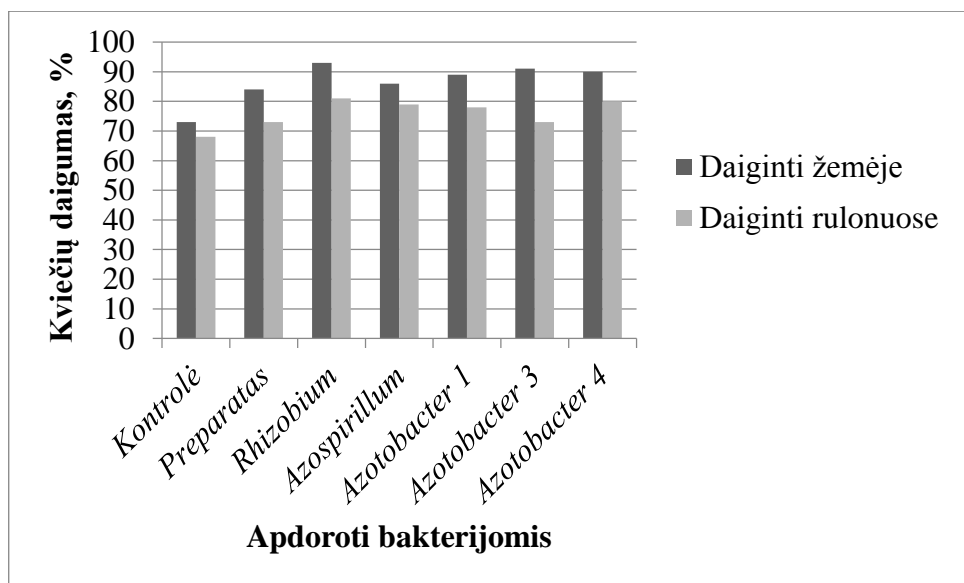


3.13 pav. Grybeliais užsikrėtusių grūdų skaičiaus priklausomybė nuo apdoravimo bakterijomis.

Litertatūroje nurodoma, kad atlikus bandymus su *Azotobacte spp.* bakterijomis, nustatytas šių bakterijų antimikrobinis aktyvumas. Nustatyta, kad bakterijos gamina antimikrobines medžiagas, teigiamai veikiančias prieš *Fusarium*, *Alternaria* ir *Trichoderma* patogenus [39].

3.7 Bakterinių preparatų įtaka kviečių daigumui

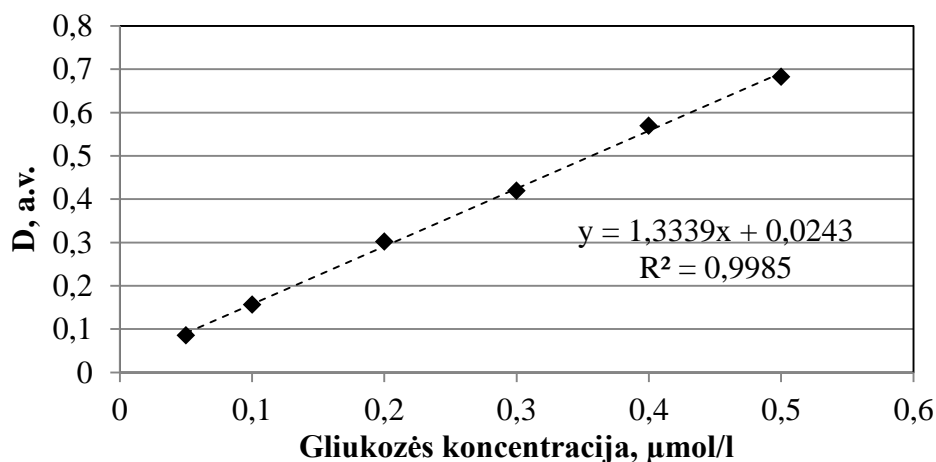
Atlikus kiekvieną matavimą, buvo suskaičiuojama, kiek iš visų pasėtų sėklų buvo daigios. Bakterinių preparatų įtaka kviečių daigumui pateikta 3.14 paveiksle. Kontrolinėse kviečių grupėse, kurios buvo pasėtos į žemę ir suvyniotos į rulonėlius, kviečių daigumas atitinkamai buvo 73 % ir 68 %. Didžiausias daigumas nustatytas imtyje, kuri buvo apdorota *Rhizobium* bakterijomis ir pasėta į žemę, daigumas siekė 93 %. Tomis pačiomis bakterijomis apdorotų kviečių ir suvyniotų į rulonėlius daigumas siekė 81 %. *Azotobacter 1*, *Azotobacter 3* ir *Azotobacter 4* bakterijomis apdorotų kviečių grūdų daigumas žemėje buvo panašus, atitinkamai 89 %, 91 % ir 90 %. Tomis pačiomis bakterijomis apdorotų ir į rulonėlius suvyniotų kviečių grūdų daigumas skyrėsi labiau ir atitinkamai buvo 78 %, 73 % ir 80 %. *Azospirillum* bakterijomis apdorotų ir į žemę pasėtų kviečių daigumas buvo 86 %, o į rulonėlius suvyniotų grūdų daigumas buvo 79 %. Komercinius bakteriniu preparatu apdorotų ir į žemę pasėtų kviečių daigumas buvo 84 %, o į rulonėlius suvyniotų grūdų daigumas 73 %. Iš visų naudotų bakterinių preparatų kviečiai prasčiausiai dygo naudojant komercinį bakterinį preparatą *BactoFil*, tačiau daigumas buvo didesnis nei kontrolinės grupės.



3.14 pav. Bakterinių preparatų įtaka kviečių grūdų daigumui.

3.8 Bakterijų invertazinis aktyvumas

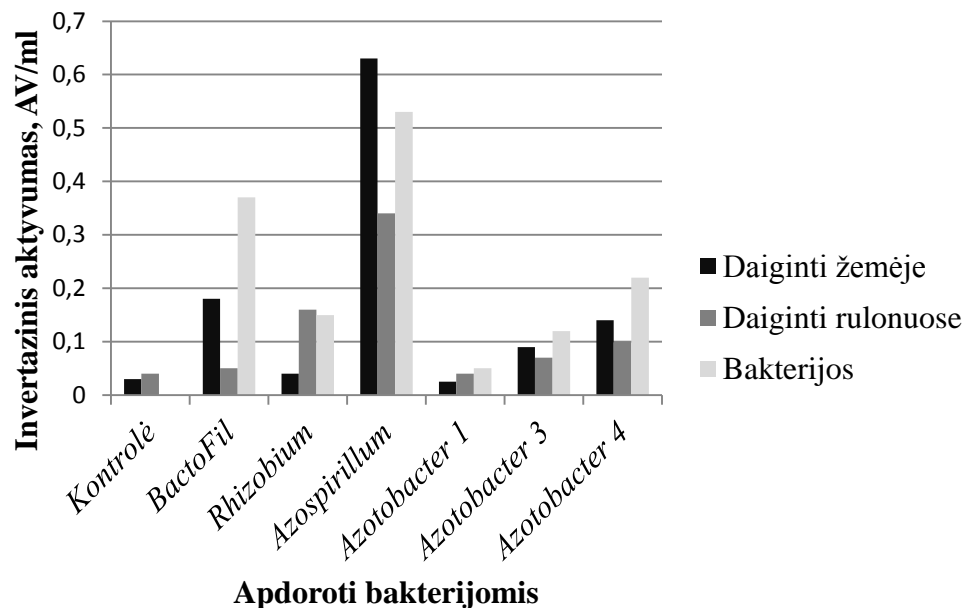
Tyrimo metu buvo nustatytas bakterijų esančių mitybinėje terpėje, grūdų apdorotų su bakterijomis ir pasėtų į žemę, ir grūdų apdorotų bakterijomis ir suvyniotų į rulus invertazinis aktyvumas. Tyrimui *Rhizobium* bakterijos buvo auginamos savaitę laiko, o kitos bakterijos (*Azospirillum*, *Azotobacter 1*, *Azotobacter 3* ir *Azotobacter 4*) tris savaites. Grūdai žemėje auginami 10 dienų, o rulonėliuose 9 dienas. Po auginimo grūdai surinkti (atskirti nuo šaknų ir daigų), išdžiovinti krosnelėje ir sumalti malūnu. Taip paruošti grūdų bandiniai buvo skiesti ir naudoti invertaziniam aktyvumui nustatyti. Invertazinis aktyvumas nustatytas pagal susidariusius reakcijos produktus – gliukozės ir fruktozės mišinį. Pirmiausia sudaryta gradavimo tiesė gliukozės ekvivalentui (3.15 pav.).



3.15 pav. Gradavimo tiesė gliukozės ekvivalentui.

Gauta gradavimo tiesės lygtis ($y = 1.3339 x + 0.0243$, $R^2 = 0.9985$) toliau naudota skaičiavimuose.

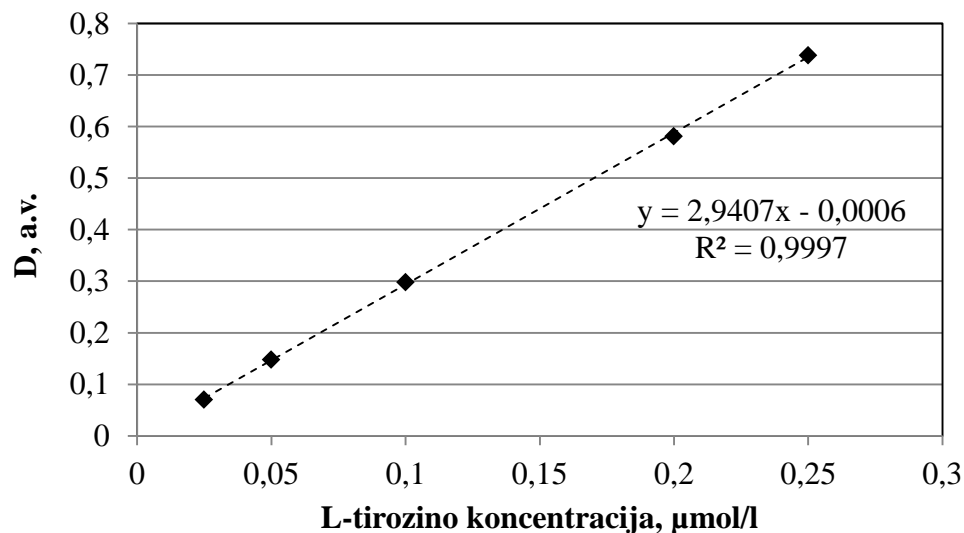
Bakterinių preparatų ir kviečių grūdų apdorotų bakteriniais preparatais invertazinis aktyvumas pateiktas 3.16 paveiksle. Didžiausią invertazinį aktyvumą turėjo *Azospirillum* bandiniai. *Azospirillum* bandiniuose didžiausią invertazinį aktyvumą turėjo grūdai, kurie buvo daiginti žemėje – 0,63 AV/ml. *Azospirillum* bakterijų invertazinis aktyvumas 0,53 AV/ml, grūdų sudaigintų rulonėliuose invertazinis aktyvumas 0,34 AV/ml. *Rhizobium* bakterijų ir *Rhizobium* bakterijomis apdorotuose bandiniuose (grūdai žemėje ir grūdai rulonuose) invertazinis aktyvumas atitinkamai buvo 0,15 AV/ml, 0,04 AV/ml ir 0,16 AV/ml. Komerčiniu biologiniu preparato *BactoFil* ir preparatu apdorotų grūdų žemėje ir rulonuose invertazinis aktyvumas atitinkamai buvo 0,37 AV/ml, 0,18 AV/ml ir 0,05 AV/ml. Panašus invertazinis aktyvumas nustatytas tarp *Azotobacter 3* ir *Azotobacter 4*. Bakterijomis apdorotų grūdų žemėje ir rulonuose aktyvumas atitinkamai buvo: *Azotobacter 3* – 0,09 AV/ml, 0,1 AV/ml ir 0,12 AV/ml, *Azotobacter 4* – 0,14 AV/ml, 0,1 AV/ml ir 0,22 AV/ml. Kontrolinio bandinio ir *Azotobacter 1* invertazinis aktyvumas mažiausias: bakterijomis neapdorotų žemėje ir rulonėliuose sudaigintų grūdų invertazinis aktyvumas 0,03 AV/ml ir 0,04 AV/ml, *Azotobacter 1* bakterijų ir bakterijomis apdorotų grūdų žemėje ir rulonėliuose invertazinis aktyvumas atitinkamai siekė 0,025 AV/ml, 0,04 AV/ml ir 0,05 AV/ml.



3.16 pav. Invertazinis aktyvumas bandiniuose

3.9 Bakterijų proteazinis aktyvumas

Tyrimo metu buvo nustatyti bakterijų po auginimo mitybinėje terpėje, grūdų apdorotų su bakterijomis ir pasėtų į žemę, ir grūdų apdorotų bakterijomis ir suvyniotų į rulonus proteazinis aktyvumas. Tyrimui *Rhizobium* bakterijos buvo auginamos savaitę laiko, o kitos bakterijos (*Azospirillum*, *Azotobacter 1*, *Azotobacter 3* ir *Azotobacter 4*) tris savaites. Grūdai žemėje auginti 10 dienų, o rulonėliuose 9 dienas. Po auginimo grūdai surinkti (atskirti nuo šaknų ir daigų) išdžiovinti krosnelėje ir sumalti malūnu. Taip paruošti grūdų bandiniai buvo skiedžiami ir naudojami proteaziniam aktyvumui nustatyti. Proteazės suskaido kazeino peptidinius ryšius, todėl yra gaunamas laisvas tirozinas, kitos amino rūgštys ir peptinidiniai fragmentai. Folin & Ciocalteus reagentas reaguoja su susidariusiu laisvu tirozinu ir susidaro mėlynos spalvos chromoforai, kuriuos kiekybiškai galima nustatyti naudojant spektrofotometrą. Pirmiausia sudaryta gradavimo tiesė L – tirozino ekvivalentui (3.17 pav.).

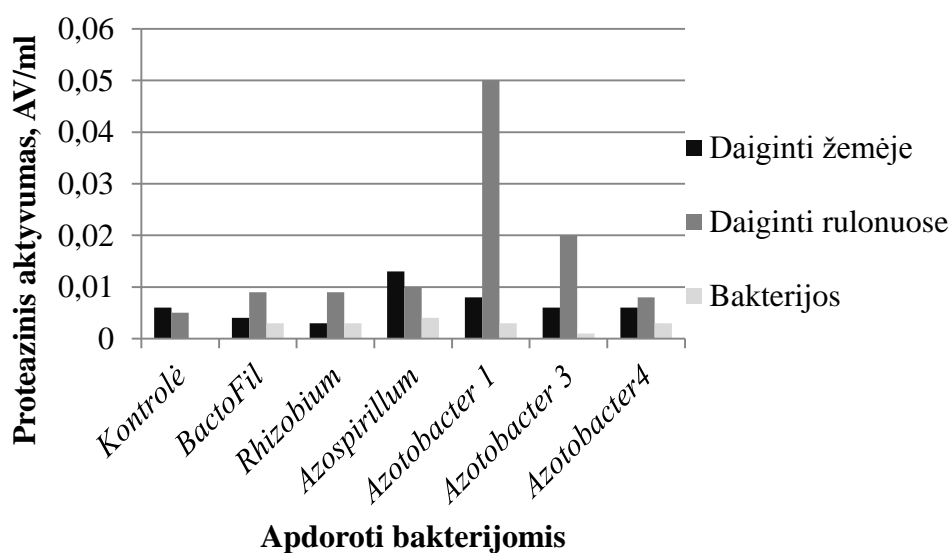


3.17 pav. Gradavimo tiesė L – tirozino ekvivalentui.

Gauta gradavimo tiesės lygtis ($y = 2.9407 x - 0.0006$, $R^2 = 0.9997$) toliau naudojama skaičiavimuose proteazinio aktyvumo nustatymui. Iš tiesės lygties paskaičiuojama kiek mikromolių tirozino ekvivalentų išlaisvinama iš kazeino per vieną minutę.

Bakterinių preparatų ir kviečių, apdorotų bakteriniais preparatais, proteazinis aktyvumas yra pateiktas 3.18 paveiksle. Mažiausias proteazinis aktyvumas buvo žemėje pasėtų ir į rulonėlius suvyniotų grūdų. Kontrolinių kviečių užaugintų žemėje proteazinis aktyvumas siekė 0,006 AV/ml, užaugintų rulonėliuose – 0,005 AV/ml. Komerciniu biologiniu preparatu ir *Rhizobium* bakterijomis apdo-

rotų kviečių ir bakterijų proteazinis aktyvumas labai panašus. Kviečių užaugintų žemėje ir apdorotų komerciniu bakteriniu preparatu proteazinis aktyvumas – 0,004 AV/ml, *Rhizobium* bakterijomis apdorotų kviečių proteazinis aktyvumas – 0,003 AV/ml. Komerciniu bakteriniu preparatu *BactoFil* apdorotų kviečių ir sudaigintų rulonėliuose aktyvumas toks pat kaip ir *Rhizobium* bakterijomis apdorotų, ir rulonėliuose sudaigintų kviečių – 0,009 AV/ml. Komercinio biologinio preparato ir *Rhizobium* bakterijų proteazinis aktyvumas taip pat sutampa – 0,003 AV/ml. Didžiausią proteazinį aktyvumą iš žemėje sudaigintų kviečių turėjo *Azospirillum* apdoroti kviečiai, o aktyvumas siekė 0,013 AV/ml. *Azotobacter 1*, *Azotobacter 3* ir *Azotobacter 4* bakterijomis apdorotų kviečių sudaigintų žemėje proteazinis aktyvumas atitinkamai buvo 0,008 AV/ml, 0,006 AV/ml ir 0,006 AV/ml. Didžiausią proteazinį aktyvumą iš rulonėliuose sudaigintų kviečių turėjo *Azotobacter 1* bakterijomis apdoroti kviečiai – 0,05 AV/ml, 2,5 karto mažesnę aktyvumą turėjo *Azotobacter 3* bakterijomis apdoroti kviečiai – 0,02 AV/ml. *Azospirillum* bakterijomis ir *Azotobacter 4* bakterijomis apdorotų ir rulonėliuose sudaigintų kviečių proteazinis aktyvumas atitinkamai buvo 0,01 AV/ml ir 0,008 AV/ml. Tirtų bakterijų proteazinis aktyvumas buvo labai panašus ir svyravo nuo 0,001 AV/ml iki 0,004 AV/ml.



3.18 pav. Proteazinis aktyvumas bandiniuose.

3.10 Bakterijų ureazinis aktyvumas

Tyrimo metu buvo nustatytas bakterijų, grūdų apdorotų bakterijomis ir sudaigintų žemėje, ir grūdų apdorotų bakterijomis ir sudaigintų rulonėliuose ureazinis aktyvumas. *Rhizobium* bakterijos augintos savaitę laiko, o *Azospirillum*, *Azotobacter 1*, *Azotobacter 3* ir *Azotobacter 4* augintos skystoje terpėje po tris savaites prieš jomis apdorojant kviečio grūdus. Bakterijoms hidrolizuojant kar-

bamidą yra gaunamas amoniakas ir anglies dvideginis. Dėl išsiskyrusio amoniako karbamido hidrolizės metu, terpė tampa labiau šarminė, o pH pokyčiai pastebimi fenolio raudonojo spalvos pokyčiu – šviesiai oranžinė terpės spalva tampa šviesiai rožine.

3.1 lentelė. Ureazinį aktyvumą turintys bandiniai.

Bandiniai	Kontrolė	<i>BactoFil</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter 1</i>	<i>Azotobacter 3</i>	<i>Azotobacter 4</i>
Bakterijos mitybinėje terpėje	-	+	-	+	+	+	+
Po daiginimo žemėje	-	-	-	+	-	-	+
Po daiginimo rulonuose	-	-	-	-	-	-	+

+ – turi ureazinį aktyvumą, - – ureazinio aktyvumo neturi.

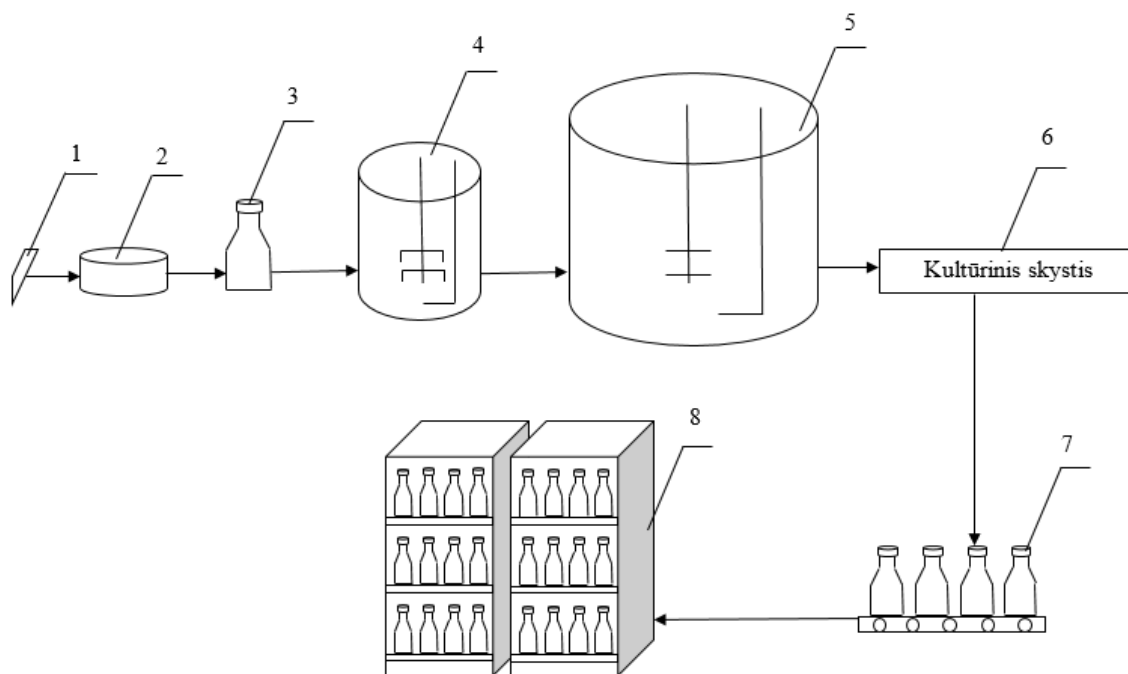
3.1 lentelėje matoma, kad ureazinį aktyvumą turėjo komercinis bakterinis preparatas *BactoFil*, *Azospirillum*, *Azotobacter 1*, *Azotobacter 3* ir *Azotobacter 4* bakterijos, kurios buvo užneštos ant standžios terpės ir šviesiai oranžinę terpės spalvą pakeitė į šviesiai rožinę. *Rhizobium* bakterijos ureazinio poveikio neturėjo, taip galėjo atsitikti dėl to, kad bakterijų gyvybingumas jau buvo sumažėjęs. Iš bandinių, kurie buvo sudaiginti žemėje po apdoravimo bakterijomis ureaziniu aktyvumu pasižymėjo *Azospirillum* ir *Azotobacter 4* bandiniai. Iš bandinių, kurie buvo sudaiginti rulonėliuose po apdoravimo bakterijomis, ureaziniu aktyvumu pasižymėjo tik *Azotobacter 4* bandinys.

4. REKOMENDACIJOS

Ateityje reikėtų pakartoti lauko tyrimus, kurių metu kviečiai po sudygimo būtų nupurkšti bakteriniais preparatais periodiškai. Paskutinio matavimo metu reikėtų išmatuoti ir kviečių šaknų ilgį, suskaičiuoti kiek iš viso buvo šaknų.

Atlikus tyrimą nustatyta, kad azotą fiksuojančios bakterijos daro teigiamą įtaką kviečių daigų ir šaknų ilgiui, bei šaknų skaičiui, kviečių grūdų daigumui, bakteriniais preparatais apdorota kviečių sėkla pasižymi antimikrobinu ir fermentiniais aktyvumais.

Remiantis mokslinėmis žiniomis nubraižyta principinė bakterinių preparatų gamybos aparatūrinė schema (4.1 pav.). Pirmiausia gryna bakterinė kultūra persėjama į Petri lėkštelę su standžia terpe kultūros patikrinimui. Iš Petri lėkštelės paimama viena gryna kolonija ir perkeliama į kultivavimo kolbą, kur bakterijos prisitaiko prie terpės ir yra pagausinamos. Kultūrai užaugus kultivavimo kolboje, ji yra perkeliama į mažo tūrio fermentatorių iš jo, kultūra yra perkeliama į gamybinį fermentatorių, kurio talpa yra didelė. Kultūrai sunaudojus maistines medžiagas ji yra paimama siurblių ir išpilstoma į buteliukus. Buteliukai sandėliuojami ir paruošiami pardavimui.



4.1 pav. Principinė bakterinių preparatų gamybos aparatūrinė schema. 1 – gryna bakterinė kultūra, 2 – kultūros persėjimas į Petri lėkštelės kultūros patikrinimui, 3 – kultivavimo kolba, 4 – fermentatorius inokuliantui, 5 – biomasės auginimo fermentatorius, 6 – iš fermentatoriaus paimtas skystis, 7 – padaugintos kultūros buteliavimas. 8 – paruošto produkto sandėliavimas.

IŠVADOS

1. *Rhizobium leguminosarum* tinkamiausia mitybinė terpė buvo su 5 g/l mielių ekstrakto ir 15 g/l manitolio. *Azotobacter vinelandii* tinkamiausia mitybinė terpė buvo su 20 g/l manitolio. *Azotobacter chroococcum* tinkamiausia mitybinė terpė buvo su 20 g/l manitolio. *Azotobacter vinelandii* 1 tinkamiausia mitybinė terpė buvo su 5 g/l gliukozės ir 5 g/l manitolio.

2. Bakterinių preparatų ir bakteriniais preparatais apdorotų kviečių grūdų invertazinis aktyvumas žemeje, rulonėliuose atitinkamai buvo: 0,05 – 0,53 AV/ml, 0,04 – 0,63 AV/ml ir 0,04 – 0,34 AV/ml. Bakterinių preparatų ir bakteriniais preparatais apdorotų kviečių grūdų proteazinis aktyvumas žemeje, rulonėliuose atitinkamai buvo: 0,001 – 0,004 AV/ml, 0,004 – 0,013 AV/ml ir 0,008 – 0,05 AV/ml. Ureaziniu aktyvumu pasižymėjo visi bakteriniai preparatai išskyrus *Rhizobium leguminosarum* bakterijas. Ureazinį aktyvumą turėjo *Azotobacter vinelandii* 1 apdoroti bandiniai pasėti į žemės bei suvynioti į rulonėlius. *Azospirillum lipoferum* bakterijomis apdoroti kviečiai ir suvynioti į rulonėlius taip pat turėjo invertazinį aktyvumą. Iš kontrolinės grupės mikroskopiniais grybeliais užsikrėtė 68,7 %, o bakteriniais preparatais apdorotų grupių užsikrėtimas grybliu kito nuo 32,7 % iki 53,3 %.

3. Bakteriniais preparatais apdorotų kviečių daigumas žemeje buvo geresnis 11 – 20 % lyginant su kontroline grupe. Bakteriniais preparatais apdorotų kviečių daigumas rulonėliuose buvo geresnis 5 – 13 %. Bakteriniais preparatais apdorotų ir į rulonėlius suvyniotų kviečių daigai buvo 1,6 – 2,6 karto ilgesni, šaknys 1,1 – 1,26 karto ilgesnės ir formavo iki 1,5 karto daugiau šaknų nei kontrolinė kviečių grupė. Bakteriniais preparatais apdorotų ir į žemę pasėtų kviečių daigai buvo 1,1 karto ilgesni, šaknys 1,2 – 1,4 karto ilgesnės ir formavo iki 1,45 karto daugiau šaknų.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. VALANT V. *Wheat*. College Seminar 253 Food for Thought: The Science, Culture, & Politics of Food. 2008.
2. ACEVEDO E., SILVA P., SILVA H. Growth and Wheat Physiology. *Development*. 2006.
3. WHITE J., EDWARDS J. *Wheat growth & development*. NSW Department of Primary Industries. 2008. ISBN 978 0 7347 1894 5.
4. WISE K., JOHNSON B., MANSFIEL C., KRUPKE C. *Managing Wheat by Growth Stage*. Purdue University. JAV. 2011.
5. MILLER T., D. *Growth Stages of Wheat: Identification and Understanding Improve Crop Management*. Texas Agricultural Extension Service. Teksasas. 1992.
6. WOLF D., E., SHROYER P., J., OLSON B. *Wheat Disease Identification*. Kansas State University. 2011.
7. DUVEILLER E., P., K., SINGH M., MEZZALAMA R., P., SINGH, A. *Wheat Diseases and Pests: A Guide for Field Identification (2nd Edition)*. Meksika. 2012.
8. BRENNAN R., F., BOLLAND M., D., A. Comparing the Nitrogen and Potassium Requirements of Canola and Wheat for Yield and Grain Quality. *Journal of Plant Nutrition*. 2009. doi: 10.1080/01904160903308127
9. ČEREKOVIC N., MARKOVIC S. Nitrogen and Wheat. International congress of ecologists “*Ecological Spectrum*”. 2012.
10. DAS S., K., VARMA A. *Role of Enzymes in Maintaining Soil Health (Chapter 2)*. Berlynas. 2011. doi 10.1007/978-3-642-14225-3_2.
11. TRASAR-CEPEDA C., LEIRO’S M., C., GIL-SOTRES F. Hydrolytic enzyme activities in agricultural and forest soils. Some implications for their use as indicators of soil quality. *Soil Biology and Biochemistry*. 2008.
12. EI-RAMADY H. R., ALSHAAL T., A., AMER M., DOMOKOS-SZABOLCSY É., ELHAWAT N., PROKISCH J., FÁRI M. Soil Quality and Plant Nutrition. *Sustainable Agriculture Reviews 14: Agroecology and Global Change*. 2014. doi 10.1007/978-3-319-06016-3_11.
13. MAKOI J., H., J., R., NDAKIDEMI P., A. Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystems. *African Journal of Biotechnology*. 2008. doi: 10.5897/AJB07.590.
14. FRANKENBERGER Jr. W., T., JOHANSON J., B. Factors affecting invertase activity in soils. *Plant and Soil* 74. 1983.

15. ZALIDIS G., STAMATIADIS S., TAKAVAKOGLU V., ESKRIDGE K., MISO-POLINOS N. Impacts of agricultural practices on soil and water quality in the Mediterranean region and proposed assessment methodology. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2002, 88, 137 – 146.
16. LAISHRAM J., SAXENA K., G., MAIKHURI R., K., RAO K., S. Soil Quality and Soil Health: A review. *International Journal of Ecology and Environmental Sciences*. 2012.
17. AMUNDSON, R.; BERHE, A., A.; HOPMANS, J., W.; OLSON, C.; SZTEIN, A., E.; SPARKS, D., L. Soil and human security in the 21st century. *Science*. 2015, 348. doi:10.1126/science.1261071.
18. LAL R. Restoring Soil Quality to Mitigate Soil Degradation. *Sustainability*. 2015. Doi:10.3390/su7055875
19. ROSENBLUETH M., MARTINEZ-ROMERO E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2006, 19(8), 827 – 837.
20. NAIR D., N., PADMAVATHY S. Impact of Endophytic Microorganisms on Plants. *Environment and Humans. Scientific World Journal*. 2014, 1–11.
21. ROSENBLUETH M., MARTINEZ-ROMERO E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2006, 19(8), 827 – 837.
22. BATOOL F., REHMAN Y., HASNAIN S. Phylloplane associated plant bacteria of commercially superior wheat varieties exhibit superior plant growth promoting abilities. *Frontiers in Life Science*. 2016, 9:4, 313 – 322. doi: 10.1080/21553769.2016.1256842.
23. SANTI C., BOGUSZ D., FRANCHE C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*. 2013, 111(5). 743–767.
24. SHRIDHAR B., S. Review: Nitrogen Fixing Microorganisms. *International Journal of Microbiological Research*. 2012, 3 (1): 46 – 52. DOI: 10.5829/idosi.ijmr.2012.3.1.61103.
25. WAGNER S., C. Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge*. 2011, 3(10):15.
26. SURA-DE JONG M., REYNOLDS R., J., B., RICHTEROVA K., MUSILOVA L., STAICU L., C., CHOCHOLATA I., ir kiti. Selenium hyperaccumulators harbor a diverse endophytic bacterial community characterized by high selenium resistance and plant growth promoting properties. *Frontiers in Plant Science*. 2015, 6(113). 1 – 17.
27. SHWETA S., HIMA BINDU J., RAGHU J., SUMA H., K., MANJUANATHA B., L., MOHANA KUMARA P., RAVIKANTH G., ir kiti. Isolation of endophytic bacteria producing

the anti-cancer alkaloid camptothecine from *Miquelia dentata* Bedd. (*Icacinaceae*). *Phytomedicine*. 2013, 20. 913 – 917.

28. ZENGIN H., BAYSAL A., H. Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Terpenes against Pathogenic and Spoilage-Forming Bacteria and Cell Structure-Activity Relationships Evaluated by SEM Microscopy. *Molecules* 2014. doi:10.3390/molecules191117773

29. DIMKPA C., WEINAND T., ASCH F. Plant – rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment*. 2009. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x

30. WEBSTER G., GOUGH C., VASSE J., BATCHELOR C.A., O'CALLAGHAN K.J., KOTHARI S.L., DAVEY M.R., D'ENARI'E J., COCKING E.C. Interactions of rhizobia with rice and wheat. *Plant and Soil*. 1997.

31. ARZANESH M., H., ALIKHANI H., A., KHAVAZI K., RAHIMIAN H., A., MIRANSARI M. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. Under drought stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2011. DOI 10.1007/s11274-010-0444-1.

32. ADNAN M., SHAH Z., ARIF M., KHAN M., J., MIAN I. A. ir kiti. Impact of rhizobial inoculum and inorganic fertilizers on nutrients (NPK) availability and uptake in wheat crop. *NRC Research Press*. 2016. dx.doi.org/10.1139/cjss-2016-0012

33. RAMADOS D., LAKKINENI V., K., BOSE P., ALI S., ANNAPURNA K. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *Springer Open Journal*. 2013.

34. CHAUDHARY D., NARULA N., SINDHU S., S. BEHL R., K. Plant growth stimulation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by inoculation of salinity tolerant *Azotobacter* strains. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2013. DOI 10.1007/s12298-013-0178-2.

35. ČIŽEIKIENĖ D., MICKEVIČIUS V. Enzimologijos laboratoriniai darbai. Kaunas. 2017. DOI 10.5755/e01.9786090214176

36. ANSON M., L. Protease Activity Assay. *The Journal of General Physiology*. 1938, 22 79 – 89.

37. FOLIN O., CIOCALTEAU V. Protease Activity Assay. *The Journal of Biological Chemistry*. 1929, 73, 627.

38. BRINK B. Urease test protocol. *American Society for Microbiology*. 2010.

39. KADER M., A., MIAN M., H., HOQUE, M., S. Effects of Azotobacter Inoculant on the Yield and Nitrogen Uptake by Wheat. *Journal of Biological Sciences*. 2002, 2(4). DOI: 10.3923/jbs.2002.259.261
40. KARPATI E., KISS P., PONYI T., FENDRIK I., DE ZAMAROCZY M., OROSZ L. Interaction of *Azospirillum lipoferum* with Wheat Germ Agglutinin Stimulates Nitrogen Fixation. *Journal of Bacteriology*. 1999, 181(13), 3949 – 3955.
41. Kavimandan S., K. Influence of Rhizobial inoculation on yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Soil*. 1986, 95(2) 297 – 300. ISSN 1573-5036.

PADĒKOS

Dēkoju dr. Daliai Čižeikienei už parūpintus bakterinius preparatus, idējas, pastabas ir suteiktas konsultācijas rašant darbu.