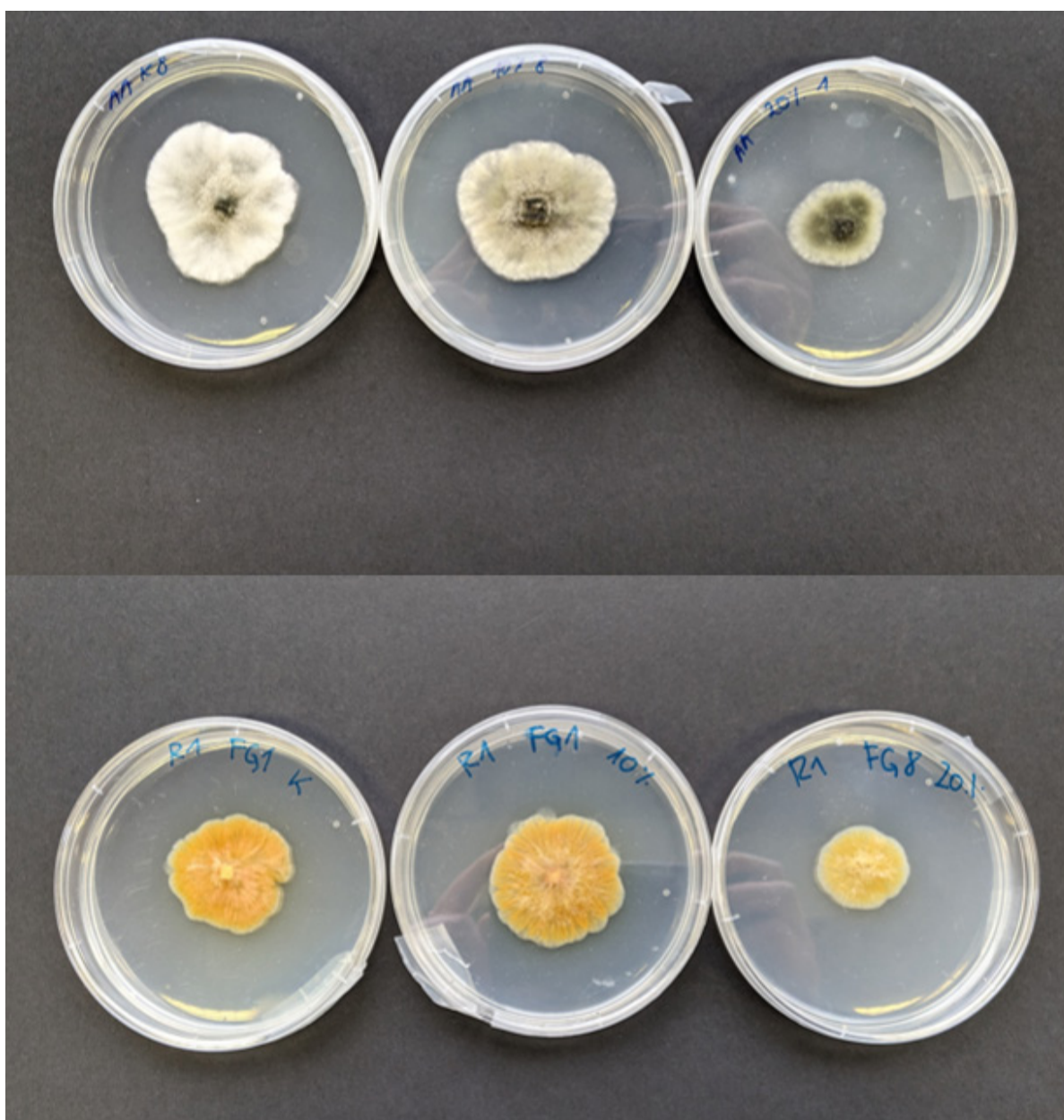


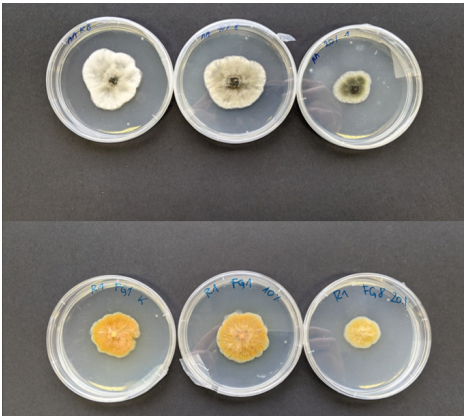
2024 Vol. 15 Št. 1

# C S P P

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum



# Zgodba iz naslovnice



**Slika:** Prikaz vpliva različnih koncentracij dodanega eteričnega olja rožmarina na rast izbranih patogenih gliv *Alternaria alternata* (zgoraj) in *Fusarium graminearum* (spodaj). Od leve proti desni: kontrola, plošči z dodanim 10 % in 20 % eteričnim oljem rožmarina. Avtorji: Eva Debevc, Vito Ham, Vesna Jurjevič, Vid Pograjc.

---

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum  
Zbornik študentov fiziologije rastlin

**Izdajata:** Katedra za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, UL

**Glavna in odgovorna urednica:** Marjana Regvar, marjana.regvar@bf.uni-lj.si

**Tehnični urednik:** Matevž Likar

**Uredniški odbor:**

Marjana Regvar

Matevž Likar

Katarina Vogel-Mikuš

Paula Pongrac

Jure Mravlje

**Naslov uredništva:**

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum,

Zbornik študentov fiziologije rastlin

Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

Izdano: 2024

ISSN 1854-4193 (online: <https://www.bf.uni-lj.si/sl/o-fakulteti/knjiznice-bf/publikacije/2021011412353830/collectanea-studentium-physiologiae-plantarum>)

## 5 The effect of thyme essential oil on the growth of selected pathogenic fungi isolated from buckwheat seeds

Leonor Gomes, Margot Dehaene, Marcos Rodríguez

## 10 Vpliv eteričnega olja poprove mete na rast izbranih patogenih gliv iz semen ajde

Neža Jeklin, Klemen Saje, Aleksander Sočič, Tina Živič

## 14 Vpliv eteričnega olja sivke na rast izbranih gliv izoliranih iz semen ajde

Larisa Ortl, Ana Plavec, Teodora Stojkowska, Kaja Tori

## 19 Vpliv italijanske biorazgradljive mikroplastike na rast in razvoj koruze

Ema Jelenc, Teja Koblar, Ema Konte

## 24 Vpliv biorazgradljive italijanske mikroplastike na rast in razvoj sončnice

Andraž Krnc, Larisa Ortl, Ana Plavec, Kaja Tori

## 30 Vpliv polietilenskih mikrododelcev na rast in razvoj

## koruze

Neža Jeklin, Alesia Mevlja, Aleksander Sočič

## 35 Vpliv polietilenske mikroplastike na rast in razvoj sončnic

Valentina Bojanec, Meta Ivanuša, Maja Peterlin, Mia Babič

## 40 Vpliv slovenske biorazgradljive mikroplastike na rast in razvoj koruze

Špela Bukovec, Lučka Mauko, Teodora Stojkowska, Sara Šuklje

## 45 Vpliv mikroplastike biorazgradljivih vrečk slovenskega proizvajalca na rast in razvoj sončnice

Drinovec Nika, Hauptman Pepelnjak Maj, Hrovat Jan in Mirtič Dolenc Domen

## 50 Vpliv eteričnega olja čajevca na rast izbranih patogenih gliv

Manca Čižman, Filip Derganc, Eva Gregorc, Adrian Samuel Stell Pičman

## 57 Vpliv eteričnega olja rožmarina na rast izbranih patogenih gliv

Eva Debevc, Vito Ham, Vesna Jurjevič, Vid Pograjc

## 63 Vpliv substrata na rast in razvoj navadnega fižola

Lia Kojič, Vid Terzer, Živa Trunkl, Ela Viher

## 68 Vpliv substrata na rast in razvoj koruze

Hana Suchy, Veronika Zala Štok, Tina Verhnjak, Eva Zajec, Anja Zupanc

## 75 Vpliv substrata na rast in razvoj ter fiziološke parametre pri sončnici

Zala Bačnik, Žana Sotelšek, Julija Šebjanič, Anamarija Tomić, Gašper Turk

# The effect of thyme essential oil on the growth of selected pathogenic fungi isolated from buckwheat seeds

Leonor Gomes, Margot Dehaene, Marcos Rodríguez

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

In this study, the antifungal efficacy of thyme essential oil (EO) against four pathogenic fungi known for mycotoxin production: *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi*, and *Fusarium graminearum*, was investigated. Buckwheat, a globally vital crop, faced yield challenges due to fungal contamination, which prompted a search for alternative methods beyond traditional pesticide use. When two concentrations (10% and 20%) of thyme EO were applied to potato dextrose agar plates, a significant inhibitory effect on fungal growth was observed, with the 20% concentration preventing fungal growth almost entirely.

**Keywords:** pathogenic species, fungal mycelium, antifungal, natural product

## Introduction

Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) is a plant from the Polygonaceae family which is used as traditional food, particularly in Asia and Eastern Europe, and is widely spread through the whole globe due to its rich nutritional content (Ikeda, 2002). In the year 2021, around 2 million tons were produced around the world, with Europe being the first producer. That situates this pseudocereal almost in the top 100 agricultural products (FAOSTAT, 2023). Regarding such an important matter, maintaining this crop's yield is very important for the global food supply. But this is becoming a challenge due to the vulnerability of buckwheat to contamination by fungi, commonly known as moulds, and their associated mycotoxins. Mycotoxins can be harmful to mammals, including humans, as they are capable of causing dermatitis and other diseases (Bhat and Reddy, 2017). Among the most common pathogenic mycotoxins present in food are aflatoxin, ochratoxins and trichothecenes, in most instances, mycotoxin-producing fungi are commonly associated with the genera *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Penicillium*. Fungal contamination in seeds typically arises during either pre-harvest or post-harvest conditions. In most cases, fungi may exist as endophytes, remaining invisible to the naked eye. This contamination can lead to a decrease in yields and high economic losses. In this regard, health protection agencies have imposed stringent regulations, especially for imported commodities (Bhat and Reddy, 2017).

Traditionally, to solve this problem, the use of pesticides has been globally embraced. However, these substances can be incorporated into different environments by leaching through the soil, running across the surface, being transported by gusts of wind or volatilizing (Tudi et al., 2021). As a result, non-targeted organisms are exposed to pesticides, which carries important risks to health. To exacerbate this, some of these compounds, such as synthetic fungicides, reduce the efficacy of the treatment as organisms like *Aspergillus fumigatus* develop resistance (Aktar, 2009).

Consequently, there is a big pressure coming from the public perception towards the use of pesticides, and consumers often harbour suspicions regarding chemical additives, leading to an increased demand for natural and socially more accepted preservatives. That is why last year's attention has arisen regarding the utilisation of essential oils (EO) for food preservation, with the objective of efficiently slowing down both fungal growth and mycotoxin production (Omidbeygi et al., 2007). EOs are volatile secondary metabolites of plants whose composition can vary depending on the species (Wińska et al., 2019).

With this experiment, we tried to quantify the antifungal properties of thyme EO against four different species of fungi from the genus *Fusarium* and *Alternaria*, which are well known for their mycotoxins production and to be found in agricultural plantations, both in the soil and in the plants, since they can be pathogenic, causing several plant disease (Andade Ochoa et al., 2023).

## Material and methods

To quantify the antifungal properties of thyme EO on the fungi, they had to be inoculated and grown first. The four pathogenic fungi inoculated in the lab were *Alternaria alternata*

(AA), *Alternaria infectoria* (AI), *Fusarium fujikuroi* (FF) and *Fusarium graminearum* (FG). After inoculating every species twice on a potato dextrose agar plate (PDA) with antibiotic chloramphenicol (50 mg L<sup>-1</sup>), they were left to grow in a room with a constant temperature of around 22 °C for one week. During the experiment, two different concentrations of EO were tested, one with 10% and one with 20% thyme EO and a control without EO. Each treatment had eight repetitions. In the end, there were 96 plates with 32 control treatments (8 for every species), 32 plates with 10% thyme EO and 32 plates with 20% thyme EO. The control treatment was only 10 % dimethylsulfoxide (DMSO) as it was used to make the dilutions with thyme EO. To make sure the EO and the DMSO mix evenly, a drop of surfactant, Tween 80, was added to every concentration, including the control solution. The stock solution of the 10% EO was done by mixing 180 µl of thyme EO and 1620 µl of 10% DMSO together with 2 microliters of Tween 80. For the 20% dilution, 360 µl of EO was put with 1440 µl of 10% DMSO and 2 µl of Tween 80. For the control, 100 µl of 10 % DMSO was added to every plate. For the 10% EO concentration also, 100 µl was added to each testing plate, and the same for the 20% EO solution. After adding the solution to the plate near the Bunsen burner, the solution was spread out with a Drigalski spatula. The inoculation of the fungi happened after each EO concentration or the control treatment were applied on each PDA plate. The plates were put in the dark in a room with a constant temperature of 22 °C. The next ten days their growth was followed by taking pictures of these fungi.

Pictures were taken every two days, and the growth of each fungus on each treatment was evaluated using the computer program ImageJ. Afterwards, these measurements were processed statistically by one-way ANOVA to see if there was a significant difference between the data. The p-value smaller than 0,05 was considered statistically significant. Additionally, Bonferonni-Holm post hoc test was done to determine which treatments have a significant difference.

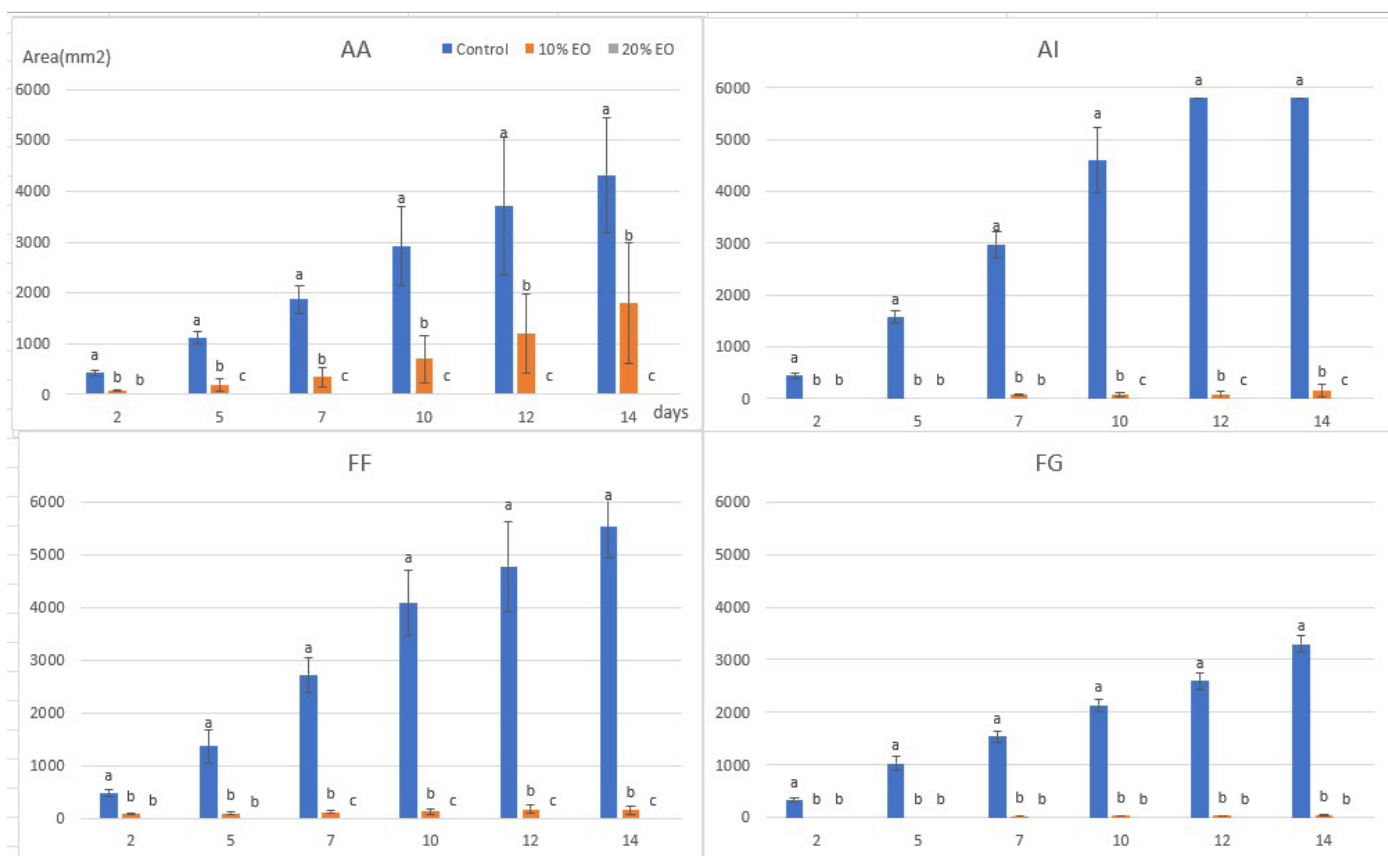
## Results

After two days, all the controls started growing at a similar rhythm, and for the fungi cultivated in 10% thyme EO, only AA and FF started to grow, but the area of the colonies were six times lower than the control. None of the tested fungal species grew on a 20% thyme EO plates the first two days and these results did not change for the whole experiment (Figure 1). On the fifth day of the experiment, AA cultivated on 10% EO became significantly different from the one in 20% EO and 5-times lower, approximately, of the control. The same happened with AI and FF on the 7th and 10th day, respectively. In the case of FG, no differences between fungi grown on 10% EO and 20% EO was observed during the course of the experiment (Figure 1).

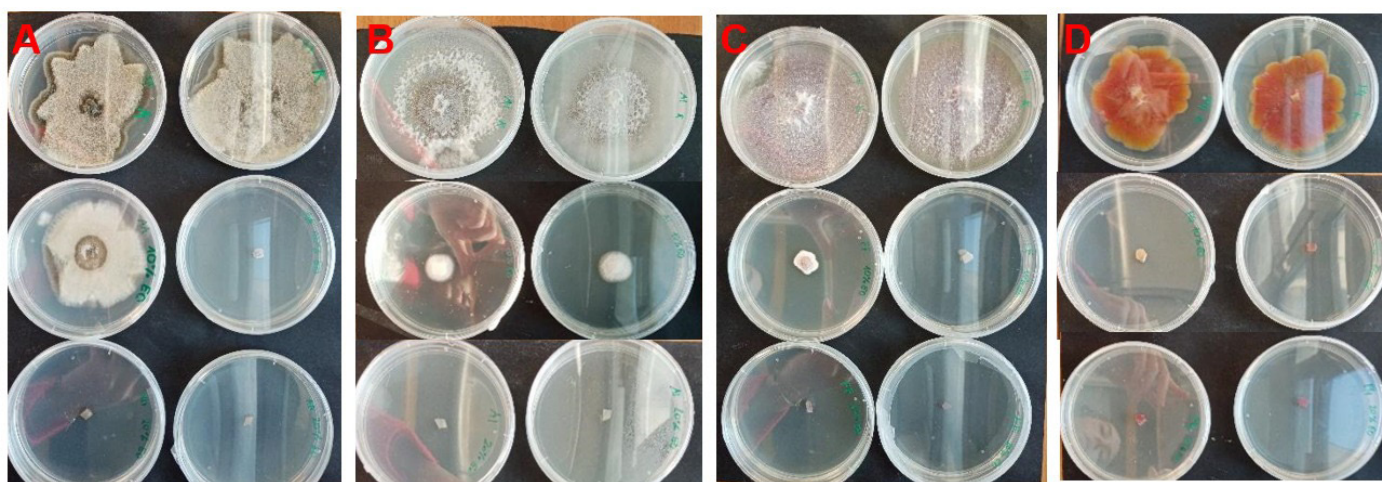
During the experiment, all the controls experienced almost linear growth, with AI being the fastest growing species, which reached the maximum growth on 12th day after the inoculation, and FG the slowest. AA grown on 10% EO showed more resistance compared to other fungi grown on 10% EO plates, which all showed a very slow growth compared to their controls (Figure 1).

By the end of the experiment, all the controls reached or almost reached the maximum size of the Petri dish, except





**Figure 1.** Growth of pathogenic fungal species *Alternaria alternata* (AA), *Alternaria infectoria* (AI), *Fusarium fujikuroi* (FF) and *Fusarium graminearum* (FG) cultivated with 0 % Thyme essential oil (blue) as control, 10% Thyme essential oil (orange) and 20% Thyme essential oil (grey). Data were obtained from medias of 6 samples  $\pm$  SD. Different letters indicate statistically significant differences between treatments on each day of observation (one-way ANOVA, Bonferonni-Holm post hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Figure 2.** In vitro cultures of *Alternaria alternata* (A), *Alternaria infectoria* (B), *Fusarium fujikuroi* (C) and *Fusarium graminearum* (FG) grown on control plates (first row), plates with 10% (second row) and plates with 20% (third row) Thyme essential oil.

for the FG, whose final growth was around 3335 mm<sup>2</sup>. Representative photographs of each fungal species grown on each testing plate are shown in Figure 2.

## Discussion

It is possible to highlight five main components of thyme EO: thymol, *p*-cymene, carvacrol,  $\beta$ -caryo-phyllene, linalool and  $\gamma$ -terpinene (Moghaddam and Mehdizadeh, 2020.; Al-Shahrani et al., 2017). Typically, the two compounds present in the largest quantity are *p*-cymene (36.5%) and thymol (33.0%)

(Al-Shahrani et al., 2017). Although, it has been shown that the composition and quality of EOs from particular herbs and spices can vary greatly depending upon factors such as geographical region, climatic conditions and some other factors (Moghaddam et al., 2020; Al-Shahrani et al., 2017). The antifungal properties of this oil are unique because of the presence of aromatic monoterpenes and phenols such as thymol and carvacrol (Moghaddam and Mehdizadeh, 2020). Their ability to form hydrogen bonds with the hydroxyl groups of phenolics in the oil enhances lipid peroxide concentrations,

including hydroxy, alkoxy, and alkoperoxy radicals, ultimately triggering cell death (Moghaddam and Mehdizadeh, 2020). Additionally, essential oils primarily target the cell cytoplasmic membrane, with monoterpenes disrupting cellular integrity by impeding microbial respiration. This process involves deactivating or inhibiting the synthesis of intracellular and extracellular enzymes (Moghaddam and Mehdizadeh, 2020). During the experiment, it was possible to identify that the inhibitory effect of the thyme EO on the mycelial growth of fungi varied among the fungal species which was also observed by Moghaddam and Mehdizadeh (2020). With the addition of 10 % Thyme EO, the growth of all tested fungi was already significantly inhibited. It completely ceased the growth of FG and almost completely inhibited the growth of AI and FF. However, it did not show as much effectiveness towards AA. In the case of AA, thyme EO was not considered the most efficient also in some previous research (Feng et al., 2011). That could explain why AA showed less differences compared with the control. The growth of the AA was shown to be dependent on Thyme EO concentration; the higher the increase in thyme oil concentration the more significant the decrease in the mycelial growth was (Feng et al., 2011). Some studies suggest that exposure time is also a critical parameter for the susceptibility activation of antifungal compounds (Feng et al., 2011). We showed complete growth inhibition of AA after the exposure to 20% Thyme EO.

The EO exhibited a significant impact on the growth of AI, as no growth of AI was observed at either of the concentrations tested. Previous studies have demonstrated the effectiveness of this oil (Anžlovar et al., 2014). Although, there might be multiple reasons why the AI controls did not show typical growth with a uniformly white mycelium, including contamination, suboptimal environmental conditions (inadequate temperature, humidity, light, or nutrient levels) and others (Semighini et al., 2008). As can be observed in the results, the EO significantly affects the growth of the fungus FG, as no growth was observed for both concentrations. Specifically, at a concentration of 10, this was the fungus that exhibited the least growth. This EO has already proven to be highly effective in previous studies (Harčárová et al., 2021). However, it has also been demonstrated that there are oils more effective against this type of fungus, like oregano oil, which exhibits the highest ability to inhibit the growth of this fungus. This efficacy is attributed to the presence of the phenolic compound carvacrol in oregano oil. Although, concerning the growth control for FG, the fungi probably could not reach its maximum growth potential due to exposure to the incorrect temperature (the optimum temperature range for these fungi is between 25 and 30 °C) or pH (5-7). The growth of FF was not completely inhibited with 10 % Thyme EO. Previous studies also demonstrated that different *Fusarium* spp presented a slight growth of colonies in similar concentrations. However, it is still important to highlight that this EO has showed a strong fungicidal activity against some *Fusarium* species (Zabka and Pavela, 2018).

In summary, the findings indicated that the current experiment established a high success rate for the antifungal effect of the Thyme EO, mirroring outcomes observed in prior studies (Al-Shahrani et al., 2017; Anžlovar et al., 2014; Feng et al., 2011).

## Conclusion

This research underscores the antifungal characteristics of the Thyme essential oil and demonstrates the antifungal effectiveness against four different fungal species: *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi* and *Fusarium graminearum*.

Our experimental results highlighted the variable resistance exhibited by fungi *Alternaria alternata* to thyme essential oil. This is probably attributed to their heightened resilience against thymol and carvacrol found in thyme, which otherwise triggers the cell death of the mycelial growth. This underlines the inter-species disparity in susceptibility to thyme essential oil's inhibitory effects. The other three tested fungi were more sensitive to thyme essential oil, already in lower concentrations. *Alternaria infectoria* is sensitive to thyme essential oil as it showed no significant growth in both tested concentrations. Also, for *Fusarium graminearum* no growth was detected, meaning the thyme essential oil has a fungicidal effect on the growth of these fungi. The control of *Fusarium graminearum* did not grow to its maximum potential because it probably was not exposed to its optimal growing temperature or pH. Lastly, the most immune fungi *Alternaria alternata* showed growth at the 10% concentration. Altogether, thyme essential oil can be considered effective in inhibiting the growth of all four fungi.

Beyond oil type, the concentration of the essential oil emerged as a potential determining factor. A higher concentration correlates with a lower growth of the fungal mycelium. Lastly, exposure duration can also be considered an important factor in the antifungal effect of thyme essential oil. More prolonged exposure of essential oil to the fungi can impact the activation of antifungal compounds such as thymol and carvacrol. For essential oils such as thyme to be used as an antifungal agent in practice, further comprehensive research should be conducted, especially exploring the biochemistry behind these processes. Nevertheless, it is concluded that essential oils hold substantial promise in supplanting synthetic chemical fungicides, offering a sustainable and eco-friendly alternative in fungicidal applications.

## References

1. Al-Shahrani MH, Mahfoud M, Anvarbatcha R, Athar MT, Al Asmari A, 2017. Evaluation of antifungal activity and cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil. *Pharmacognosy communications* 7(1), 34-40.
2. Anžlovar S, Baričević D, Ambrožič AJ, Dolenc Koče J, 2014. Essential oil of common thyme as a natural antimicrobial food additive. *Food Technology and Biotechnology* 52(2), 263-268.
3. Andrade-Ochoa S, Sánchez-Aldana D, Rodríguez-Valdez LM, Nevárez-Moorillón GV, 2023. In vitro and Quantitative and Structure Activity Relationship (QSAR) evaluation of the antifungal activity of terpenoid constituents of essential oils against *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud* 43(1), 156-169.
4. Aktar MW, Paramasivam M, Sengupta D, Purkait S, Ganguly M, Banerjee S, 2009. Impact assessment of pesticide residues in fish of Ganga river around Kolkata in West Bengal. *Environmental monitoring and assessment* 157(1-4), 97-104.
5. Billerbeck VG, de Roques CG, Bessiere JM, Fonvieille JL, Dargent R, 2001. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian journal of microbiology* 47(1), 9-17.
6. Bhat R, Reddy KR, 2017. Challenges and issues concerning



- mycotoxins contamination in oil seeds and their edible oils: Updates from last decade. *Food chemistry* 215, 425-437.
7. Feng W, Chen J, Zheng X, Liu Q, 2011. Thyme oil to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo as fumigant and contact treatments. *Food Control* 22(1), 78-81.
  8. Food And Agriculture Organization Of The United Nations, 2023 FOASTAT. <https://lccn.loc.gov/2005617801> (18. Nov 2023)
  9. Ikeda K, 2002. Buckwheat composition, chemistry, and processing. *Advances in Food and Nutrition research* 44, 395-434.
  10. Moghaddam M, Mehdizadeh L, 2020. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Thymus vulgaris* grown in Iran against some plant pathogenic fungi. *Journal of essential oil-bearing plants*, 23(5), 1072-1083.
  11. Omidbeygi M, Barzegar M, Hamidi Z, Naghdibadi H, 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food control* 18(12), 1518-1523.
  12. Semighini CP, Murray N, Harris SD, 2008. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol. *FEMS microbiology letters* 279(2):259-264.
  13. Tudi M, Ruan HD, Wang L, Lyu J, Sadler R, Connell D, Chu C, Phung DT, 2021. Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International journal of environmental research and public health* 18(3), 1-24.
  14. Wińska K, Mączka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A, 2019. Essential Oils as Antimicrobial Agents-Myth or Real Alternative? *Molecules* (Basel, Switzerland) 24(11), 2130.
  15. Zabka M, Pavela R, 2018. Review Chapter: *Fusarium* genus and essential oils. *Natural Antimicrobial Agents* 95-120.

# Vpliv eteričnega olja poprove mete na rast izbranih patogenih gliv iz semen ajde

Neža Jeklin, Klemen Saje, Aleksander Sočič, Tina Živič

Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- Glive danes predstavljajo velik problem v prehranski industriji. Saj so odgovorne za propad 30 % naših pridelkov in proizvajajo nevarne toksine, ki lahko škodijo zdravju. Zaradi rastočega prebivalstva potreba po hrani raste, kmetijske površine pa so omejene, zato je alternativna rešitev zmanjšanje izgub pridelka z učinkovitim zatiranjem rasti patogenih gliv.
- V našem eksperimentu smo preverjali vpliv eteričnega olja poprove mete na rast patogenih gliv, izoliranih iz široko uporabnega živila - ajde, saj bi to olje potencialno lahko zaviralo njihovo rast. Patogene glive smo na gojišču PDA izpostavili različnim koncentracijam eteričnega olja in opazovali zaviranje rasti. Izbrali smo štiri različne vrste gliv iz dveh rodov.
- Eksperiment je pri vseh vrstah pokazal statistično značilno zaviranje rasti ob dodatku 10 % ter 20 % eteričnega olja.
- Ugotovili smo, da eterično olje učinkuje v relativno majhnih koncentracijah, ima relativno širok spekter delovanja in zato potencial za tretiranje različnih žitaric z namenom preprečevanja okužb ali zmanjšanja izgube pridelka.

**Ključne besede:** fungicidi, zaviranje rasti, interakcije rastlin in gliv, mentol, *Alternaria*, *Fusarium*

## Uvod

Ajda za ljudi predstavlja kakovostno in pomembno živilo, saj ima visoko vsebnost flavonoidov in drugih polifenolnih snovi, beljakovin in vlaknin. Velik problem predstavljajo mikotoksini, ki jih lahko tvorijo glive v ajdinem zrnu, saj ogrožajo človekovo zdravje (Kreft s sod. 2023). Poleg tega so danes prav glive glavne povzročiteljice rastlinskih bolezni, ki so najpogostejši razlog velikih izgub pridelkov. Dodatno skrb predstavlja razvoj odpornosti gliv proti fungicidom, saj posledično učinkovitost le-teh upada. Raziskave kažejo, da bi lahko kot protiglivna sredstva uporabljali eterična olja, ki poleg protiglivnega delovanja kažejo številne prednosti, kot so naravni (rastlinski) izvor, ne ogrožajo varnosti hrane in so okolju prijazna (Wo s sod. 2023). Eno izmed eteričnih olj se pridobiva iz poprove mete, aromatične rastline iz družine Lamiaceae (James in Ikani 2023). Sestavljeno je iz kompleksne mešanice biološko aktivnih sekundarnih metabolitov, med katerimi so glavni mentol, neomentol in izomenton, ki izkazujejo protivnetne, protibakterijske, protivirusne, protiglivne, imunomodulatorne, protirakave, nevroprotektivne in antioksidativne lastnosti (Abd El-Hack s sod. 2023).

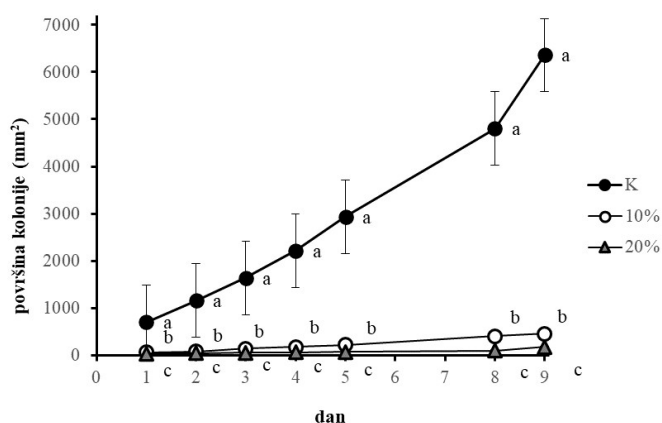
S poskusom smo želeli ugotoviti, ali eterično olje poprove mete zavira rast gliv. Izbrali smo glivo *Alternaria alternata*, katere občutljivost so uspešno preverjali že Franča s sod. (2018), in glivo *Fusarium graminearum*, na katero je bil prav tako učinek eteričnega olja poprove mete že dokazan (Tomescu s sod. 2015). Dodatno smo testirali tudi glivi *Alternaria infectoria* in *Fusarium fujikuroi*, za kateri v literaturi nismo našli podatkov o morebitni občutljivosti na eterično olje poprove mete. Gre torej za glive iz dveh različnih rodov, ki so bile izolirane iz ajde. Za glive iz rodu *Fusarium* je značilno, da rastlina po okužbi z njimi izgubi klorofil, se skrči ter dobi bel, rožnat ali svetlo rjav videz zaradi prekomernega razraščanja micelija. Te glive producirajo tudi mikotoksine, ki samim rastlinam povzročajo različne bolezni (Kumar s sod. 2016). Rod *Alternaria* je prav tako patogen, konkretno *Alternaria alternata* na ajdi povzroči klorozo listov, blede do svetlo rjave lezije in odpadanje listov (Li s sod. 2021).

Predvidevali smo, da bomo v vseh primerih zaznali zaviranje rasti, saj je bila ta za glivi *Alternaria alternata* in *Fusarium graminearum* že dokazana, *Alternaria infectoria* in *Fusarium fujikuroi* pa izhajata iz rodov, katerih predstavniki so predhodno pokazali občutljivost na eterično olje.

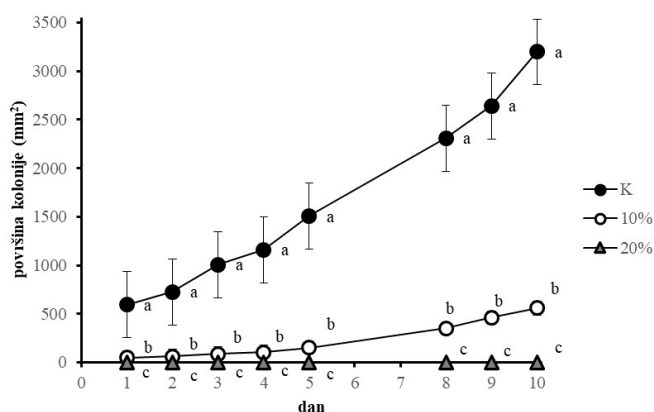
## Material in metode

Pripravili smo 2 % krompirjev dekstrozni agar (PDA) in mu dodali antibiotik kloramfenikol v koncentraciji 50 mg/L. Po površini plošč smo s spatulo razmazali 100 uL raztopine 10 % ali 20 % koncentriranega eteričnega olja poprove mete; kontrolne plošče eteričnega olja niso vsebovale, temveč smo nanje nanесли le 100 uL 10% raztopino dimetil sulfoksida (DMSO). Raztopini olja smo predhodno pripravili z 10% DMSO in detergentom Tween 80, ki je omogočil boljšo topnost eteričnega olja. Pred začetkom poskusa smo pripravili sveže enotedenske glivne kulture. Opazovali smo rast gliv *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi* in *Fusarium graminearum*, ki smo jih pridobili na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Glive smo nato nacepili na gojišča tako, da smo z robnega micelija s spatulo izrezali kvadrate v

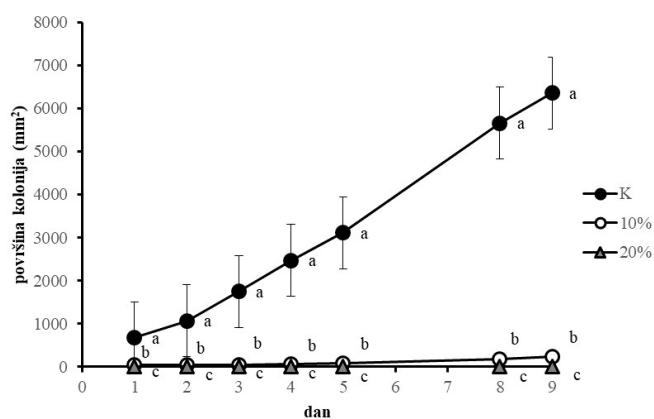
dimenzijah 5 mm x 5 mm in jih postavili na sredino testnih gojišč. Nacepljene plošče smo ovili s parafilmom in jih gojili 13 dni. Pri določenih glivah smo poskus zaključili predhodno – ko so glive v celoti prerasle kontrolne plošče. Gojenje je potekalo v rastnih komorah, v temi, kjer je bil sicer nastavljen dnevno-nočni cikel 16/8 h in temperatura 22 °C čez dan oziroma 18 °C ponoči. Vlažnost je bila med 60 in 70 %. Rast smo spremljali s fotografiranjem plošč z mobilnimi telefoni, pri čemer smo s fotografiranjem začeli 4. dan po inokulaciji. Za statistično analizo smo uporabili program MS Excel, funkcijo ANOVA (enosmerna analiza variance) in Bonferroni-Holm post-hoc test z Daniel's XL Toolbox vtičnikom. Kot statistično različne smo smatrali rezultate, kjer je bila p vrednost < 0,05. Za pridobivanje podatkov o površini zraslih gliv s fotografij smo



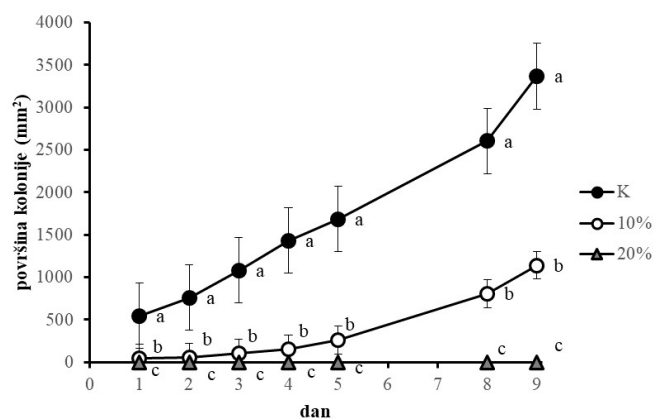
**Slika 1.** Povprečna površina kolonij glive *Fusarium fujikuroi* na kontrolnih ploščah, ploščah z 10 % eteričnim oljem poprove mete in ploščah z 20 % eteričnim oljem poprove mete tekom trajanja poskusa. Na grafu so prikazana povprečja s pripadajočimi standardnimi napakami (n = 8). Različne črke nad podatki pomenijo statistično značilne razlike v rasti gliv na različnih gojiščih na isti dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test, p < 0,05).



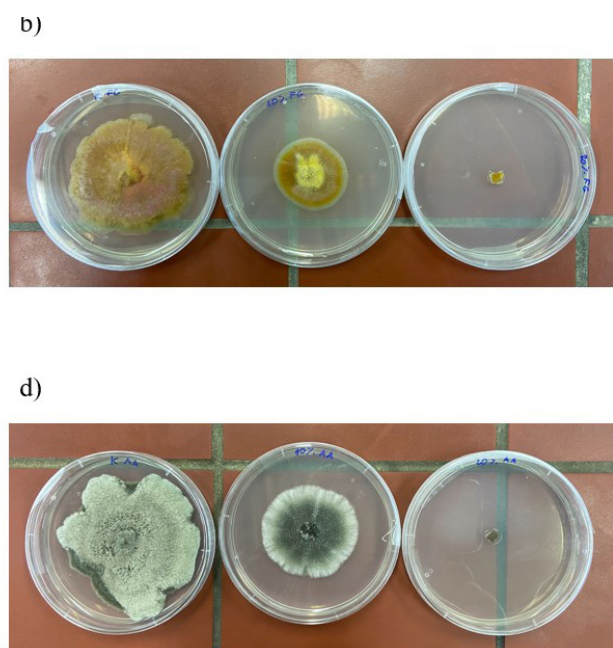
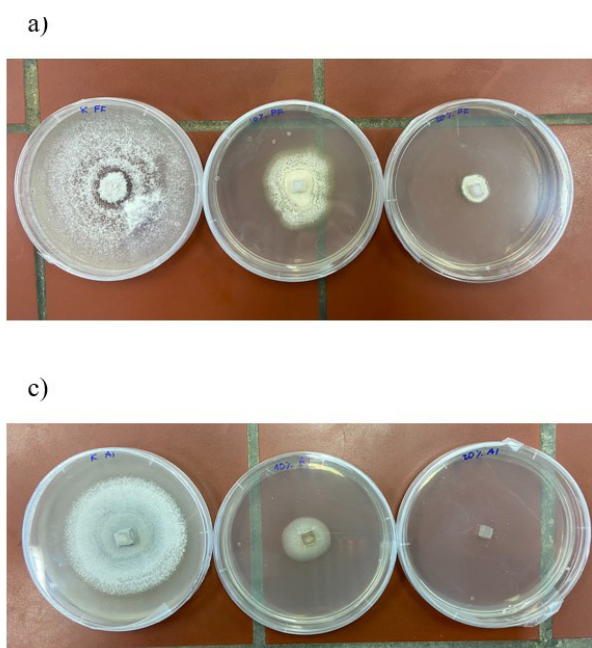
**Slika 2.** Povprečna površina kolonij glive *Fusarium graminearum* na kontrolnih ploščah, ploščah z 10 % eteričnim oljem poprove mete in ploščah z 20 % eteričnim oljem poprove mete tekom trajanja poskusa. Na grafu so prikazana povprečja s pripadajočimi standardnimi napakami (n = 8). Različne črke nad podatki pomenijo statistično značilne razlike v rasti gliv na različnih gojiščih na isti dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test, p < 0,05).



**Slika 3.** Povprečna površina kolonij glive *Alternaria infectoria* na kontrolnih ploščah, ploščah z 10 % eteričnim oljem poprove mete in ploščah z 20 % eteričnim oljem poprove mete tekom trajanja poskusa. Na grafu so prikazana povprečja s pripadajočimi standardnimi napakami ( $n = 8$ ). Različne črke nad podatki pomenijo statistično značilne razlike v rasti gliv na različnih gojiščih na isti dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 4.** Povprečna površina kolonij glive *Alternaria alternata* na kontrolnih ploščah, ploščah z 10 % eteričnim oljem poprove mete in ploščah z 20 % eteričnim oljem poprove mete tekom trajanja poskusa. Na grafu so prikazana povprečja s pripadajočimi standardnimi napakami ( $n = 8$ ). Različne črke nad podatki pomenijo statistično značilne razlike v rasti gliv na različnih gojiščih na isti dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 5.** Reprezentativne fotografije rasti gliv na kontrolni plošči (leva plošča na vsaki fotografiji) in pri obeh koncentracijah eteričnega olja poprove mete (sredinske plošče – 10 % koncentracija in desne plošče – 20 % koncentracija eteričnega olja) po desetih dneh inkubacije. a) *Fusarium fujikuroi*, b) *Fusarium graminearum*, c) *Alternaria infectoria*, d) *Alternaria alternata*.

uporabili program ImageJ.

## Rezultati

Gliva *Fusarium fujikuroi* je kontrolne plošče prerastla v devetih dneh. Ves čas poskusa smo opazili očitno razliko v rasti med kontrolo in ploščami, ki smo jim dodali eterično olje poprove mete. Po devetih dneh je bila rast na ploščah z 10 % eteričnim oljem poprove mete zavrta za približno 93 % in na ploščah z 20 % eteričnim oljem poprove mete za približno 97 % glede na kontrolo (Slika 1).

*Fusarium graminearum* je kontrolne plošče prerastla v desetih

dneh. Na Sliki 2 vidimo dinamiko rasti iz katere je razvidno, da je bila ob koncu poskusa rast ob prisotnosti 10 % eteričnega olja zavrta za približno 83 % v primerjavi s kontrolo. Rasti pri koncentraciji 20 % eteričnega olja poprove mete ni bilo opazne.

Pri glivi *Alternaria infectoria* je bila rast na koncu poskusa zavrta za približno 96 % ob prisotnosti 10 % eteričnega olja poprove mete, pri 20 % koncentraciji pa je bila rast povsem zavrta (Slika 3).

Gliva *Alternaria alternata* se je pri 10 % koncentraciji eteričnega olja poprove mete izkazala za najbolj tolerantno, saj smo zaznali le približno 66 % zavrtje rasti. Kot je razvidno na



Sliki 4, je bila rast pri 20 % koncentraciji eteričnega olja povsem zavrta, podobno kot pri ostalih vrstah.

Vse štiri vrste gliv so pokazale veliko občutljivost na eterično olje poprove mete (Slika 5). *Fusarium fujikuroi* se je izkazala za bolj tolerantno od ostalih, saj je bila edina, ki je rasla tudi pri izpostavljenosti 20 % eteričnemu olju, kar je razvidno iz slike 1 in slike 5a. Za ostale tri glive lahko trdimo, da 20 % koncentracija učinkovine nanje deluje fungicidno, vsaj v obdobju desetih dni, kolikor je trajalo naše spremljanje rasti.

## Diskusija

Vakili-Ghartavol s sod. (2022) so izvajali eksperiment, pri katerem so preverjali vpliv različnih koncentracij eteričnega olja poprove mete na rast številnih gliv, med drugim tudi na glivo *Alternaria alternata*. Razlika z našim poskusom je bila, da so eterično olje vmešali v gojišče PDA, ne pa razmazali po njem. Enako kot pri nas je bila velikost kolonij različna glede na dodano koncentracijo olja. V omenjeni raziskavi so pokazali, da pri koncentracijah, večjih od 500 µl/L (0,05 %), eterično olje statistično značilno vpliva na rast gliv. Naši rezultati so torej skladni ter smiselni glede na to raziskavo, saj smo mi uporabili bistveno večje koncentracije olja in je v obeh primerih prišlo do zavrtja rasti. Poleg *A. alternata* smo v našem poskusu uporabili še *Alternaria infectoria* in dobili podobne rezultate kot pri prvi. Na glivi *A. alternata* so raziskave delali tudi Franča s sod. (2015), ki so prav tako dodajali olje v agar, in sicer v koncentracijah od 0 % do 1 %. Dokazali so zmanjšano rast gliv pri vseh dodanih koncentracijah in izračunali, da bi popolna inhibicija rasti teoretično morala nastopiti pri 2,26 % koncentraciji olja v gojišču. Mi smo testirali mnogo višje koncentracije olja in razlika v primerjavi s kontrolo je bila opažena pri 10 % eteričnem olju, ki je bilo sicer razmazano zgolj na površini gojišča. Te rezultate sicer težko primerjamo, saj je problematično že samo primerjanje koncentracije dodanega eteričnega olja v celotnem gojišču ter koncentracije, ki je bila le razmazana po površini (kot v našem primeru) in se je verjetno le deloma vpila v gojišče. V vsakem primeru pa lahko trdimo, da je glede na naše rezultate, *A. alternata* bolj odporna na eterično olje poprove mete kot je poročano v omenjeni raziskavi (Franča s sod., 2015), zato bi bilo smiselno njeno odpornost na eterično olje poprove mete še dodatno proučiti.

Tomescu s sod. (2015) so izvedli podoben eksperiment našemu, pri čemer so glivo *Fusarium graminearum* gojili na trdnih gojiščih z dodatkom eteričnega olja poprove mete v koncentracijah od 1 mg/L (0,0001 %) do 20 mg/L (0,002 %). Ugotovili so, da je najmanjša koncentracija, ki nima vpliva na rast, 5 mg/L. Naše koncentracije so bile mnogo večje in so značilno vplivale na rast glive. Zaključimo lahko, da se naši rezultati za glivo *Fusarium graminearum* ujemajo z obstoječimi ugotovitvami. Za *Fusarium fujikuroi* podatkov o občutljivosti na eterično olje poprove mete nismo zasledili. Lahko pa sklepamo, ker gre za predstavnico istega rodu, da podobno velja tudi za njo.

Kar se ujema s prej omenjenimi raziskavami, kjer so raziskovali vpliv eteričnega olja poprove mete na več različnih rodov patogenih gliv, je tudi ugotovitev, da ima eterično olje poprove mete očitno širok spekter delovanja, saj uspešno zavira rast med saboj zelo različnih vrst gliv. Iscan s sod. (2002) so dokazali zaviralni učinek eteričnega olja poprove mete na sicer

drugo vrsto iz rodu *Fusarium* (*Fusarium solani*) ter več ostalih vrst patogenih gliv, tudi kvasovk, kot je *Candida albicans*.

Naša opazovana rodova *Alternaria* in *Fusarium* sta prav tako filogenetsko precej narazen, saj spadata v različne razrede (*Dothideomycetes* oziroma *Sordariomycetes*), kar prav tako potrjuje njegov širok spekter delovanja.

Zaključek

Obe koncentraciji eteričnega olja poprove mete sta pokazali značilne vpliva na rast izbranih gliv v primerjavi s kontrolo ter tudi med seboj. Eterično olje je izrazilo zaviralno rast vseh štirih gliv že pri 10 % koncentraciji, pri 20 % koncentraciji pa je bila popolnoma zavrta rast vseh testiranih gliv z izjemo *Fusarium fujikuroi*. S tem potrjujemo zastavljeno hipotezo. Za glivi *Alternaria alternata* in *Fusarium graminearum* so dobljeni rezultati skladni z literaturo. V predhodnih raziskavah je bilo sicer dokazano, da eterično olje poprove mete deluje učinkovito tudi v bistveno nižjih koncentracijah. Prav zaradi tega ima verjetno potencial za tretiranje različnih žitaric z namenom preprečevanja okužb ali zmanjšanja izgube pridelka. Da bi se razvil ustrezen postopek tretiranja žit in ostale hrane, ki jo okužujejo glive, pa je potrebnih še več raziskav, določanje minimalne inhibitorne koncentracije, predvsem pa eksperimentalno delo in vivo.

## Literatura

1. Abd El-Hack ME, Kamal M, Altaie HAA, Youssef IM, Algarni EH, Almohmadi NH, Abukhalil MH, Khafaga AF, Alqhtani AH, Swelum AAA, 2023. Peppermint essential oil and its nano-emulsion: Potential against aflatoxigenic fungus *Aspergillus flavus* in food and feed. *Toxicon* 234:107309.
2. Franča KRS, Silva TL, Cardoso TAL, Ugulino ALN, Rodrigues APM, Júnior AFdeM, 2018. In vitro Effect of Essential Oil of Peppermint (*Mentha x piperita* L.) on the Mycelial Growth of *Alternaria alternata*. *Journal of Experimental Agriculture International* 26:1-7.
3. Işcan G, Kirimer N, Kürkcüoğlu M, Başer KH, Demirci F, 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3943-3946.
4. James SA, Ikani PE, 2023. A review of the antifungal activities of mint plant extracts against fungal isolates. *Bio-Research* 21:2031-2057.
5. Kreft I, Golob A, Germ M, 2023. A Crop of High Nutritional Quality and Health Maintenance Value: The Importance of Tartary Buckwheat Breeding. *Agriculture* 13:1783.
6. Kumar P, Mishra S, Kumar A, Sharma AK, 2016. Antifungal efficacy of plant essential oils against stored grain fungi of *Fusarium* spp. *Journal of Food Science and Technology* 53:3725-3734.
7. Li S, Shen Q, Wang H, He F, Xiao Z, Peng X, Zhou M, Tang X, 2021. First Report of *Alternaria alternata* Causing Leaf Spot of Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) in China. *Plant disease* 105:3324-3735.
8. Tomescu A, Sumalan RM, Pop G, Alexa E, Poiana MA, Copolovici DM, Stroe Mihai CS, Negrea M, Galuscan A, 2015. Chemical Composition and Protective Antifungal Activity of *Mentha Piperita* L. and *Salvia Officinalis* L. Essential Oils Against *Fusarium Graminearum* Spp. *Revista de Chimie* 66:1027-1030.
9. Vakili-Ghartavol M, Arouiee H, Golmohammadzadeh S, Naseri M, 2020. Antifungal activity of *Mentha x Piperita* L. essential oil. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 21:143-152.
10. Wu TL, Zhang BQ, Luo XF, Li AP, Zhang SY, An JX, Zhang ZJ, Liu YQ, 2023. Antifungal efficacy of sixty essential oils and mechanism of oregano essential oil against *Rhizoctonia solani*. *Industrial Crops and Products* 191:115975.

# Vpliv eteričnega olja sivke na rast izbranih gliv izoliranih iz semen ajde

Larisa Ortl, Ana Plavec, Teodora Stojkowska, Kaja Tori

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Namen dela je bil ugotoviti vpliv eteričnega olje sivke na rast štirih patogenih gliv: *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi* in *Fusarium graminearum*.
- Rast gliv smo spremljali z rednim fotografiranjem gojišč, na katere smo predhodno nacepili glive v prisotnosti različnih koncentracij eteričnega olja, ter analizo površin rasti gliv ovrednotili s programom ImageJ. S pomočjo MS Excela smo statistično obdelali podatke.
- Prisotnost eteričnega olja zaviralno deluje na rast treh izmed štirih testiranih gliv in sicer *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria* in *Fusarium fujikuroi*. Višja kot je koncentracija eteričnega olja, slabša je bila rast glive.

**Ključne besede:** protiglivi učinek, zaviranje rasti, patogene glive, *Alternaria* sp., *Fusarium* sp.

## Uvod

Eterična olja so aromatični rastlinski izvlečki, ki jih uvrščamo med sekundarne metabolite rastlin. So hlapni, dišeči in pri sobni temperaturi običajno tekoči z oljnato konsistenco, nekatera pa so tudi trdna ali smolnata. Mnogi izmed njih so splošno uporabni v različne industrijske namene kot npr. v farmaciji, prehranski, kozmetični ter parfumski industriji (Bakkali s sod. 2008; Bassole in Juliani 2012).

Eterična olja sestavljajo kompleksne mešanice hlapnih spojin, ki jih sintetizirajo rastline. Glavne so terpeni in terpenoidi sestavljajo pa jih tudi druge alifatske in aromatske spojine, kot so aldehidi, alkoholi, fenoli idr. (Bakkali s sod. 2008). Zaradi mešanice teh spojin imajo eterična olja protimikrobno, med drugim tudi protiglavno delovanje. Velik del te aktivnosti se pripisuje oksidiranim terpenoidom ter interakcijam med različnimi snovmi, ki sestavljajo eterično olje (Bassole in Juliani 2012).

Eterična olja v naravi služijo zaščiti rastline pred stresom, ki ga predstavljajo okužbe s patogenimi mikroorganizmi, med katere uvrščamo tudi nekatere glive. Eterična olja kažejo dobro protiglavno delovanje predvsem preko poškodb celičnih sten micelijev in inhibicije nastajanja celične stene, nekatera eterična olja pa vplivajo tudi na glivne mitohondrije in na protonsko ATP-azo ter tako omejujejo njihovo rast (Nazzaro s sod. 2017).

Glive iz rodu *Alternaria* so ene najpogostejših gliv, ki napadajo zelenjavo in druge pridelke, zaradi česar lahko pride do ogromnih izgub pridelka (Chrpačienė s sod. 2022). Glive iz rodu *Fusarium* pa okužujejo predvsem različna žita. Njihova patogenost se odraža z izločanjem nekaterih mikotoksinov (sekundarnih metabolitov), ki lahko tako prehajajo tudi v krmo živali. Na žitih so pogoste fuzarioze, najbolj znana je fuzarijska pegavost pšeničnih in rženih klasov, ki lahko povzroči ogromne ekonomske izgube in izgube pridelka (Mielniczuk in Skwaryło-Bednarz, 2020).

Te bolezni morajo kmetje nadzorovati z različnimi protiglavnimi pripravki, a je v zadnjem času vedno večji poudarek na zmanjšanju uporabe kemičnih fungicidov in uporabi naravnih rešitev, pri čemer bi lahko za zajezitev glivnih okužb lahko uporabljali eterična olja iz rastlin (Chrpačienė s sod. 2022). Namen raziskave je bil ugotoviti ali ima eterično olje sivke protiglavno aktivnost in tako zavira rast štirih patogenih gliv *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi* in *Fusarium graminearum*.

Hipoteze:

- Eterična olja sivke imajo protiglavno aktivnost, saj zaviralno deluje na rast patogenih gliv.
- Višja koncentracija eteričnega olja bolj zavira rast patogenih gliv.
- Eterično olje bo imelo različen vpliv na rast glede na vrsto patogene glive.

## Materiali in metode

### Glivni material

Glive smo pridobili iz zbirke gliv na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Glive, ki smo jih v eksperimentu uporabljali, so bile: *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi* in *Fusarium graminearum*, ki so bile

predhodno izolirane iz zrnja ajde.

### Eterično olje

Uporabili smo komercialno kupljeno eterično olje sivke Eteris, ki ga proizvaja podjetje Favni d.o.o.

### Sestava gojišča PDA

Uporabljali smo gojišče PDA, ki smo ga pripravili tako, da smo zamešali:

- 15 g PDA (potato dextrose agar)
- 35 mg kloramfenikola (koncentracija 50 mg L-1)
- 2 žlički agarja
- 700 mL destilirane vode

Tako pripravljeno gojišče smo avtoklavirali in razlili v sterilne plastične petrijevke s premerom 90 mm.

### Izvedba poskusa

Najprej smo nacepili glive pridobljene iz glivne zbirke na sveže gojišče PDA in pustili rasti 7 dni, da smo pridobili svežo enotedensko kulturo glive. Pripravili smo redčitve eteričnega olja v 10 % dimetil sulfoksidu (DMSO), tako da smo imeli 10 % in 20 % eterično olje. Za kontrolo smo uporabili 10 % DMSO. V kontrolo in redčitvi smo dodali detergent Tween 80, da smo dosegli boljše mešanje eteričnega olja in DMSO. Za vsako glivo smo imeli 8 kontrolnih plošč, 8 plošč z dodanim 10 % eteričnim oljem in 8 plošč z 20 % eteričnim oljem, tako da smo na gojišče v petrijevkah nanесли 100 µL ustrezne raztopine in jo razmazali z drigalsko spatulo. Za vsako ploščo smo s spatulo izrezali kvadratni košček gojišča z aktivno rastočim micelijem (velikosti 0,5 x 0,5 cm oz. površine 0,25 cm<sup>2</sup>) in ga položili na sredino plošče. Plošče smo inkubirali v rastni komori v temi pri temperaturi 22 °C. Četrty dan smo pričeli s fotografiranjem posameznih plošč, ki smo jih nato fotografirali vsakih 24 ur. Rast smo spremljali 13 dni. Fotografije smo analizirali s pomočjo računalniškega programa ImageJ, tako da smo izmerili površino zraslega micelija.

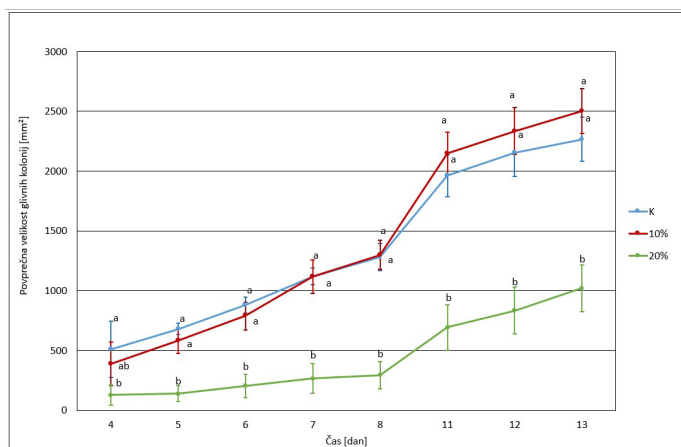
### Statistična analiza

Rezultate pridobljene s programom ImageJ smo prenesli v MS Excel, kjer smo jih analizirali s pomočjo orodja XL\_toolbox. Na naših podatkih smo izvedli enosmerno analizo variance (ANOVA) in Bonferroni-Holm post-hoc test. Kot statistično pomembno različne smo smatrali rezultate, kjer je bila p-vrednost < 0,05. S programom MS Excel smo pripravili tudi grafični prikaz podatkov.

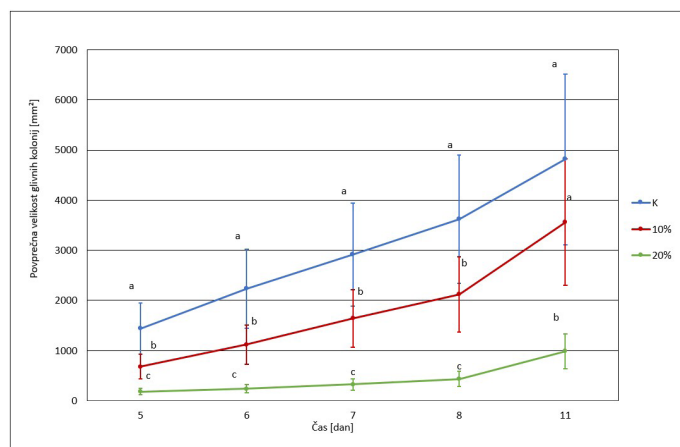
### Rezultati

Slika 1 prikazuje rast glive *Alternaria alternata*, pri kateri je bila na četrty dan rast glive na gojišču z 20 % koncentracijo eteričnega olja manjša kot pri kontrolni skupini. Med glivami v kontrolni skupini in glivami, ki so rastle na 10 % koncentracijo eteričnega olja, ni bilo pomembnih razlik v rasti in tak trend se je ohranil do konca poskusa. S petim dnevom se opazi razlika med glivami na 10 % koncentraciji in na 20 % koncentraciji eteričnega olja. Razvidno je, da je 20 % koncentracija eteričnega olja delovala zaviralno, medtem ko pri glivah na 10 % koncentraciji tega učinka ni bilo opaziti.

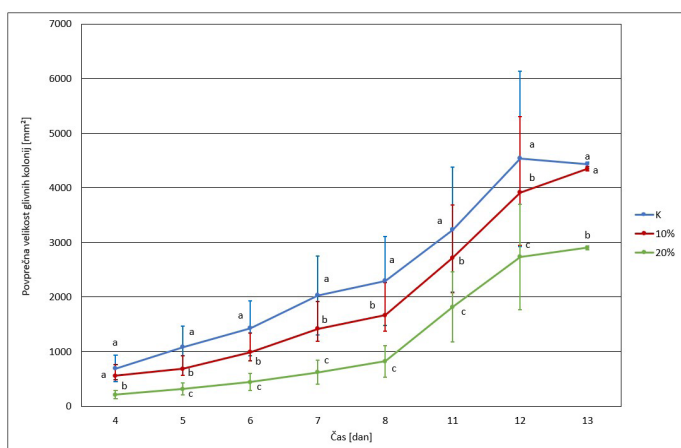
Iz Slike 2 je razvidno, da smo pri glivi *Alternaria infectoria* od petega dneva naprej opazili razliko v rasti med glivami v



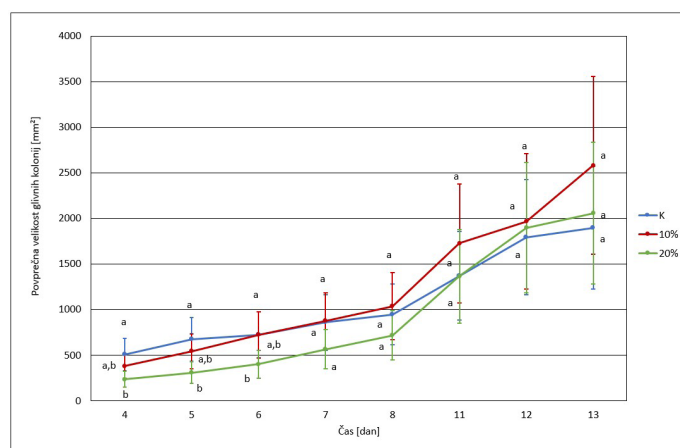
**Slika 1.** Grafični prikaz rasti glive *Alternaria alternata* v obdobju trinajstih dni. Modri niz prikazuje rast glive na kontrolnem gojišču, rdeči niz rast glive na gojišču z 10 % koncentracijo sivkinega eteričnega olja, zeleni niz pa prikazuje rast glive na gojišču z 20 % koncentracijo eteričnega olja. Graf prikazuje povprečne vrednosti površine glivne kolonije za posamezni dan in standardne napake (n = 8). Različne črke na grafu pomenijo statistično značilne razlike v rasti gliv na gojiščih z različnimi koncentracijami eteričnega olja na posamezen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 2.** Grafični prikaz rasti glive *Alternaria infectoria* v obdobju trinajstih dni. Modri niz prikazuje rast glive na kontrolnem gojišču, rdeči niz rast glive na gojišču z 10 % koncentracijo sivkinega eteričnega olja, zeleni niz pa prikazuje rast glive na gojišču z 20 % koncentracijo eteričnega olja. Graf prikazuje povprečne vrednosti površine glivne kolonije za posamezni dan in standardne napake (n = 8). Različne črke na grafu pomenijo statistično značilne razlike v rasti gliv na gojiščih z različnimi koncentracijami eteričnega olja na posamezen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 3.** Grafični prikaz rasti glive *Fusarium fujikuro* v obdobju trinajstih dni. Modri niz prikazuje rast glive na kontrolnem gojišču, rdeči niz rast glive na gojišču z 10 % koncentracijo sivkinega eteričnega olja, zeleni niz pa prikazuje rast glive na gojišču z 20 % koncentracijo eteričnega olja. Graf prikazuje povprečne vrednosti površine glivne kolonije za posamezni dan in standardne napake (n = 8). Različne črke na grafu pomenijo statistično značilne razlike v rasti gliv na gojiščih z različnimi koncentracijami eteričnega olja na posamezen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 4.** Grafični prikaz rasti glive *Fusarium graminearum* v obdobju trinajstih dni. Modri niz prikazuje rast glive na kontrolnem gojišču, rdeči niz rast glive na gojišču z 10 % koncentracijo sivkinega eteričnega olja, zeleni niz pa prikazuje rast glive na gojišču z 20 % koncentracijo eteričnega olja. Graf prikazuje povprečne vrednosti površine glivne kolonije za posamezni dan in standardne napake (n = 8). Različne črke na grafu pomenijo statistično značilne razlike v rasti gliv na gojiščih z različnimi koncentracijami eteričnega olja na posamezen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

kontrolni skupini in glivami, ki so rastle na 10 % koncentraciji eteričnega olja, ter med glivami v kontrolni skupini in glivami na 20 % koncentraciji eteričnega olja. Prav tako je razvidna razlika med glivami, ki so rastle na 10 % in 20 % koncentraciji eteričnega olja. Glive so najbolj rastle v kontrolni skupini, nekoliko slabše so rastle glive na 10 % koncentraciji eteričnega olja, glive, ki so rastle na 20 % koncentraciji eteričnega olja, pa so rastle najslabše. Po enajstem dnevu smo poskus zaključili,

saj so glive v kontrolni skupini prerasle petrijevko in posledično rezultati niso bili več primerljivi.

Rast glive *Fusarium fujikuro* prikazuje Slika 3. Na četrti dan je opazna razlika v rasti med glivami, ki so rastle na gojišču z 20 % koncentracijo eteričnega olja in glivami v kontrolni skupini. Rast gliv na 10 % koncentraciji eteričnega olja je bila večja kot rast gliv na 20 % koncentraciji eteričnega olja, medtem ko pri primerjavi gliv, ki so rastle na 10 % koncentracije eteričnega



olja, z glivami v kontrolni skupini, ni bilo razlike. Od petega dneva naprej so vidne razlike v rasti med glivami v kontrolni skupini in glivami, ki so rastle na 10 % koncentraciji eteričnega olja, med glivami, ki so rastle na 20 % koncentraciji eteričnega olja, in kontrolni skupini ter med obema koncentracijama eteričnega olja. Glive v kontrolni skupini so rastle najbolje, nekoliko slabše so rastle glive na 10 % koncentraciji eteričnega olja, najslabše pa glive na 20 % koncentraciji eteričnega olja. Enajsti dan so kontrolne glive prerasle ploščo, zato smo ta dan poskus zaključili, ker razlik v rasti ne moremo pripisati prisotnosti eteričnega olja ampak omejitvi površine petrijevke. Slika 4 prikazuje rast glive *Fusarium graminearum*, pri čemer opazimo med četrtim in šestim dnevom razliko v rasti med glivami v kontrolni skupini in glivami, ki so rastle na 20 % koncentraciji eteričnega olja, slednje so rastle slabše od kontrolne skupine. Glive, ki so rastle na 10 % koncentraciji eteričnega olja, pa ne kažejo statistično značilne razlike glede na glive v kontrolni skupini ali glive pri 20 % koncentraciji eteričnega olja. Po sedmem dnevu se rast glive, ne glede na koncentracijo eteričnega olja, ni razlikovala glede na glive v kontrolni skupini.

## Diskusija

Med 13-dnevnim opazovanjem se je rast glive *Alternaria alternata* zmanjšala za približno 76 % v prisotnosti 20 % koncentracije eteričnega olja sivke v primerjavi z glivami v kontrolni skupini, medtem ko pri glivah, ki so rastle na 10 % koncentraciji eteričnega olja, nismo opazili vpliva na rast. Ti rezultati podpirajo našo hipotezo, da višja koncentracija eteričnega olja bolj učinkovito zavira rast patogenih gliv. Z našim poskusom lahko potrdimo, da ima eterično olje sivke protiglivni učinek na glivo *Alternaria infectoria*, saj se je njena rast po šestih dneh od inokulacije zmanjšala za 49,85 % v prisotnosti 10 % koncentracije eteričnega olja sivke v primerjavi s kontrolo ter za 78,90 % v prisotnosti 20 % koncentracije eteričnega olja sivke v primerjavi s kontrolo. Anžlovar s sod. (2020) so prav tako potrdili, da imajo nekatera druga eterična olja protiglivni učinek na to glivo. V njihovi raziskavi so eterična olja pridobljena iz ekstraktov japonskega dresnika kazala 64,3 % zaviralni učinek na rast glive. Chrapačiene s sod. (2021) pa so potrdili, da se zaviralni učinek na rast te glive poveča z višjo koncentracijo eteričnega olja sivke.

Čprav eterično olje sivke zmanjša rast preiskovanih gliv iz rodu *Alternaria*, obstajajo opazne razlike v koncentraciji, pri kateri olje negativno vpliva na rast gliv, glede na doseženo stopnjo zaviranja. Pri 10 % koncentraciji eterično olje ni zaviralo rasti glive *A. alternata*. Na drugi strani se je pri drugi glivi iz istega rodu, *A. infectoria*, pri 10 % koncentraciji eteričnega olja rast glive v primerjavi s kontrolno skupino znatno zmanjšala do osmega dneva opazovanja. Razlike v koncentraciji, pri kateri začne olje kazati protiglivne lastnosti med dvema glivama znotraj istega rodu, verjetno kažejo na odvisnost protiglivnega učinka od obrambnih mehanizmov glive. V prejšnjih študijah (Andersen in Thrane, 1996) so bile ugotovljene bistvene metabolne razlike med *A. alternata* in *A. infectoria*.

Glede na rezultate eksperimenta lahko potrdimo protiglivni učinek eteričnega olja sivke na rast glive *Fusarium fujikuroi*. Vidna je namreč slabša rast glive pri 10 % koncentraciji eteričnega olja glede na glive v kontrolni skupini in še bolj zavrta rast glive pri 20 % koncentraciji eteričnega olja glede

na glive v kontrolni skupini. To potrjuje hipotezo, da ima višja koncentracija eteričnega olja večji vpliv na inhibicijo rasti glive. Rezultati raziskav navajajo, da imajo različna rastlinska eterična olja, kot so eterična olja žajblja, rožmarina, janeža, kvinoje in šatraja, protiglivno aktivnost in zavirajo rast gliv iz rodu *Fusarium*. Žajbljevo olje je imelo s 36-77 % učinkovitostjo zaviranja rasti glive iz rodu *Fusarium* (natančneje glive *F. oxysporum*) manjši protiglivni učinek, medtem ko je olje šatraja povzročilo kar 100 % zavrtje rasti omenjene glive (Ferdes s sod., 2017). V drugi študiji so Dhaouadi s sod. (2018) določali protiglivni učinek eteričnega olja sivke in majarona na podlagi stopnje zaviranja rasti micelija izolatov *F. oxysporum* f. sp. *melonis* in izolatov *F. solani* v primerjavi s kontrolo. Tako eterično olje majarona kot eterično olje sivke sta statistično značilno vplivala na rast micelija omenjenih gliv, pri čemer je eterično olje majarona povzročilo večjo zaviranje rasti kot eterično olje sivke. Na eterično olje sivke so bili občutljivi vsi izolati gliv *F. oxysporum* in *F. solani* (Dhaouadi s sod., 2018), kar lahko povežemo z našim eksperimentom, kjer je bila ob prisotnosti eteričnega olja sivke v gojišču zavrta rast glive *Fusarium fujikuroi*. Tako lahko glede na rezultate naše in drugih raziskav sklepamo na občutljivost nekaterih vrst gliv rodu *Fusarium* na prisotnost eteričnega olja sivke in s tem možnost uporabe le-tega kot alternativnega protiglivnega sredstva proti nekaterim vrstam iz rodu *Fusarium*.

Vendar natančni razlogi za različne odzive na eterično olje ostajajo področje za nadaljnje raziskave. Pri glivni vrsti *Fusarium graminearum* glede na naše rezultate ne moremo trditi, da je prišlo do kakršnega koli vpliva eteričnega olja na njeno rast, z izjemo obdobja med četrtim in šestim dnevom, ko smo opazili zaviralni učinek 20 % koncentracije eteričnega olja sivke na rast glive v primerjavi s kontrolno skupino. Kasneje pa ni bilo več opaznih razlik v rasti te glive glede na prisotnost eteričnega olja.

Rezultati nekaterih avtorjev dokazujejo, da eterično olje lahko vpliva na rast *Fusarium graminearum*, a je to zelo odvisno od rastlinske vrste, iz katere je eterično olje pridobljeno. Nekoliko večjo učinkovitost pri zaviranju rasti te glive kažejo eterična olja pelargonije, palisandra, cimeto ve skorje in palmarose (Krzyško-Łupicka s sod., 2019; Gwiazdowska s sod., 2022). Na drugi strani pa so nekatera druga olja, ki so pokazala nekoliko manjšo učinkovitost pri zaviranju rasti te glive. Kot je pokazala raziskava, ki so jo izvedli Čosič s sod. (2010), mednje spada tudi eterično olje sivke, ki smo ga tudi mi uporabljali v našem poskusu.

Rezultati našega poskusa nam nakazujejo, da lahko potrdimo prvi dve hipotezi s tremi od štirih navedenih gliv (*Alternaria infectoria*, *Alternaria alternata* in *Fusarium fujikuroi*), saj je pri njih opazno vsaj delno zaviranje rasti gliv ob prisotnosti eteričnega olja, zaviranje pa je večje pri višji koncentraciji eteričnega olja. Rezultati, ki smo jih dobili s primerjanjem rasti vseh štirih gliv, nam nakazujejo, da lahko potrdimo tudi zadnjo hipotezo, saj se vpliv eteričnega olja sivke razlikuje glede na vrsto glive.

## Zaključki

Občutljivost gliv na eterično olje sivke se razlikuje glede na rod, iz katerega prihaja sama gliva. Iz poskusov lahko tolmačimo, da so v splošnem bolj občutljive glive iz rodu *Alternaria* (med testiranimi glivami je najbolj občutljiva *Alternaria infectoria* potem *Alternaria alternata*). Glive iz rodu *Fusarium*

so se izkazale za manj občutljive na prisotnost eteričnega olja (občutljiva je *Fusarium fujikuroi*, medtem ko *Fusarium graminearum* ni kazala občutljivosti). Iz rezultatov lahko tudi sklepamo, da višje koncentracije eteričnega olja sivke bolj učinkovito zavirajo rast preučevanih patogenih gliv.

## Literatura

1. Andersen B in Thrane U, 1996. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles, and cultural characteristics. *Canadian Journal of Microbiology* 42(7): 685-689.
2. Anžlovar S, Janeš D, Dolenc-Koce J, 2020. The effect of extracts and essential oil from invasive *Solidago* spp. and *Fallopia japonica* on crop-borne fungi and wheat germination. *Food Technology and Biotechnology* 53(3): 273-283.
3. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M, 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology* 46: 446-475.
4. Chrapačienė S, Rasiukevičiūtė N, Valiuškaitė A, 2021. Biocontrol of carrot disease-causing pathogens using essential oils. *Plants* 10(11), 2231.
5. Chrapačienė S, Rasiukevičiūtė N, Valiuškaitė A, 2022. Control of seed-borne fungi by selected essential oils. *Horticulturae* 8(3), 220.
6. Ćosić J, Vrandečić K, Poštić J, Jurković D, Ravlić M, 2010. In vitro antifungal activity of essential oils on growth of phytopathogenic fungi. *Poljoprivreda* 16(2): 25-28.
7. Dhaouadi S, Rouissi W, Mougou-Hamdane A, Hannachi I, Nasraoui B, 2018. Antifungal Activity of Essential Oils of *Origanum majorana* and Lavender *angustifolia* against *Fusarium Wilt* and Root Rot Disease of Melon Plants. *Tunisian Journal of Plant Protection* 13(1): 39-55.
8. Ferdes M, Al Juhaimi F, Özcan MM, Ghafoor K, 2017. Inhibitory effect of some plant essential oils on growth of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor pusillus* and *Fusarium oxysporum*. *South African Journal of Botany* 113: 457-460.
9. Gwiazdowska D, Marchwińska K, Juś K, Uwineza PA, Gwiazdowski R, Waśkiewicz A, Kierzek R, 2022. The concentration-dependent effects of essential oils on the growth of *Fusarium graminearum* and mycotoxins biosynthesis in wheat and maize grain. *Applied Sciences* 12(1), 473.
10. Krzyśko-Łupicka T, Walkowiak W, Białoń M, 2019. Comparison of the fungistatic activity of selected essential oils relative to *Fusarium graminearum* isolates. *Molecules*, 24(2), 311.
11. Mielniczuk E, Skwaryło-Bednarz B, 2020. *Fusarium* head blight, mycotoxins and strategies for their reduction. *Agronomy* 10(4), 509.
12. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, De Feo V, 2017. Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals* 10(4), 86.

# Vpliv italijanske biorazgradljive mikroplastike na rast in razvoj koruze

Ema Jelenc, Teja Koblar, Ema Konte

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Z raziskavo smo želeli ugotoviti vpliv dodane mikroplastike v zemljo na rast koruze, njeno fotokemično aktivnost in transpiracijo.
- Sadike koruze smo posadili v zemljo z različno koncentracijo mikroplastike in merili višino rastlin tekom poskusa. Po koncu poskusa smo rastline očistili, ter jim izmerili dolžino poganjkov in korenin, ter svežo in suho maso.
- Med poganjki in koreninami kontrolnih rastlin in rastlin v substratu z dodano mikroplastiko ni bilo prisotnih statistično značilnih razlik. Fotokemična aktivnost in transpiracija prav tako nista pokazali statistično značilnih razlik med kontrolnimi rastlinami in rastlinami v substratu z različnimi koncentracijami mikroplastike.
- Ugotovili smo, da pri večini merjenih parametrov dodana mikroplastika v substratu ni imela statistično značilnega vpliva. Edina statistično značilna razlika je bila prisotna pri meritvah sveže mase korenin, in sicer je bila pri 0,5 % izpostavitvi delcev statistično značilno večja kakor pri 0,05 % izpostavitvi delcem mikroplastike v substratu.

**Ključne besede:** enokaličnice, onesnaženost tal, fotokemična učinkovitost, inhibicija rasti

## Uvod

Ko je plastika odvržena v okolje, je podvržena razgradnji preko mehanskih sil, žarkov UV, oksidacije in biološke razgradnje. Pri tem razpade na manjše delce, ki so v primeru velikosti manjše od 5 mm definirani kot mikroplastika (MP), njihova prisotnost kot onesnažilo pa je bila zaznana v številnih različnih okoljih, med katerimi je bila opažena večja vsebnost v prsti napram morskim sistemom (Qin s sod., 2021).

Biorazgradljiva plastika je predstavljena kot alternativa nerazgradljivi plastiki in je ob vedno strožji regulaciji uporabe nerazgradljive plastike to nadomestila na mnogih področjih. Sestavljena je iz visoko-molekularnih polimerov in ima potencial razgradnje do končnih produktov ogljikovega dioksida, vode, metana in biomase. Razgradi se preko mineralizacije s strani naravno prisotnih mikroorganizmov in njihove encimske aktivnosti, kar pa je odvisno od abiotičnih in biotičnih pogojev, kot so prisotnost kisika, temperatura, vlažnost in prisotnost specifičnih mikroorganizmov. To predstavlja možnosti za nove načine upravljanja s plastičnimi odpadki, kot sta anaerobna razgradnja in kompostiranje, ki je tudi preferenčna oblika ravnanja s temi odpadki, saj lahko poteka pod kontroliranimi pogoji, prilagojenimi biološki transformaciji v industrijskem obratu za kompostiranje. Tako kontrolirana razgradnja v naravnem okolju ni mogoča zaradi same narave biorazgradljive plastike, ki je bolj občutljiva na razgradnjo kot konvencionalna plastika. Slednja najverjetneje rezultira v več MP, ki se lahko v okolju zadržuje dolgo časa (Fan s sod., 2022; Qin s sod., 2021).

Zaradi nedavnega pojava MP trenutno ni na voljo dovolj študij, ki bi preiskovale vpliv te oblike MP na značilnosti prsti in ekosistemov (Fan s sod., 2022). Največji delež trga biorazgradljive plastike predstavljajo materiali PLA (plastika iz polimlečne kisline), PHA (plastika iz polihidroksialkanoatov) in materiali, ki temeljijo na škrobu, uporabljajo pa se tudi materiali mešanih polimerov za doseganje zelenih lastnosti. Ti materiali so si po lastnostih in značilnostih razgradnje različni, velikokrat pa se srečamo s težavo pri razgradnji, ki redko poteče do prej omenjenih končnih produktov. Največkrat poteče fragmentacija, pri čemer se sprosti MP (topni hidrolizni produkti – monomeri in oligomeri) in aditivi. Sama razgradnja je v veliki meri odvisna od značilnosti in sestave polimera, od mikrobne združbe ali prisotnosti različnih encimov, ter dodatkov, ki so plastiki dodani tekom samega proizvodnega procesa. Dodani so na primer antioksidanti ali dodatki, ki prispevajo k bolj uspešni razgradnji materialov (Qin s sod., 2021; Wei s sod., 2022).

MP ima lahko različne vplive na okolje in organizme v njem. V prsti so bile opažene spremembe gostote, poroznosti in hidroloških lastnosti. Naključna razporeditev MP v prsti tvori vodoodporne ovire, maši pore in spreminja tok vode, čeprav lahko v nekaterih primerih zaradi nižje gostote prispeva k lažjemu prodiranju korenin v tla. Opisane so bile tudi spremembe pH, električne prevodnosti in razmerja C/N. Eden izmed takih primerov je razgradnja PLA, ki zaradi sproščanja mlečne kisline zniža pH vrednost prsti (Qin s sod., 2021; Zhou s sod., 2021a).

Med drugimi opaženimi vplivi na prst in talne ekosisteme pa je bilo zaznati tudi povečanje mikrobne biomase v tleh, zvišano encimsko aktivnost, prav tako pa gojenju v prisotnosti MP lahko sledijo spremembe v sestavi mikrobne združbe in zastopanosti posameznih skupin mikroorganizmov (Mazzon

s sod., 2022; Wang s sod., 2020; Zhou s sod., 2021a). Sun s sod. (2022) so po gojenju v prsti z dodano biorazgradljivo MP opazili statistično značilno zmanjšanje prisotnosti nekaterih debel mikroorganizmov, medtem ko se je zastopanost drugih povečala. Pri tem so opazili tudi različne vplive med tipi biorazgradljive MP, pri katerih so opazili večjo ekološko stabilnost mikrobne združbe v primerjavi s konvencionalno MP. Zaradi povečane uporabe biorazgradljive plastike v kmetijstvu, so potrebne raziskave glede vpliva tega tipa MP na kmetijske rastline, saj so v tleh zaradi akumulacije prisotne vedno večje količine le te. Raziskave na tem področju so trenutno omejene, predstavljajo pa pomemben vpogled v možne posledice.

V naši raziskavi smo se osredotočili na vpliv biorazgradljive MP na rast in razvoj koruze (*Zea mays* L.). V predhodnih študijah so bili opaženi številni negativni vplivi na rast in razvoj koruze v prisotnosti biorazgradljive MP v tleh. V študiji raziskovalcev Yu s sod. (2023) so se ti odrazili v zmanjšani celotni površini, dolžini, volumnu in biomasi korenin koruze, zmanjšani encimski aktivnosti pretvorbe ogljika in dušika v prsti rizosfere v fazi metličjenja pri višjih koncentracijah MP. Akumulacija biorazgradljive MP glede na rezultate deluje pozitivno na aktivnost mikroorganizmov, pri čemer se zviša njihov privzem hranil v rizosferi, kar predstavlja kompeticijo za rastlino in posledično zavira rast korenin. Poleg tega so zabeležili nižje encimske aktivnosti pretvorbe ogljika in dušika v prsti izven rizosfere, kar lahko negativno vpliva na kroženje hranil v prsti in prispeva k zavrtju rasti korenin. Raziskovalci Wang s sod. (2020) so odkrili tudi povezavo med višjimi koncentracijami biorazgradljive MP in zavrtjem rasti koruze ter zmanjšano vsebnostjo klorofila v listih.

Hipoteze:

- Višanje vsebnosti MP v substratu bo negativno vplivalo na rast poganjkov.
- Višanje vsebnosti MP v substratu bo negativno vplivalo na rast korenin.
- Z višanjem vsebnosti MP v zemlji bo zmanjšana fotokemična učinkovitost fotosistema II in transpiracijska aktivnost.

## Materiali in metode

Na koruzi smo tekom petih tednov izvedli lončni poskus, kjer smo spremljali rast rastlin pri različnih koncentracijah MP v substratu. Za rastline smo pripravili štiri različne izpostavitve, kontrolnega in tri z različnimi masnimi koncentracijami biorazgradljive MP (0,05 %, 0,5 % in 1 % m/m) italijanskega proizvajalca. Masne koncentracije predstavljajo teže plastike, ki smo jo dodali glede na težo substrata, zato bomo v nadaljevanju govorili o enotah m / m (masa mikroplastike / masa substrata). Za vsako izpostavitev smo posadili po 5 tehničnih ponovitev, torej 5 rastlin približno enake velikosti, vsako v svoj lonček.

### Priprava substrata

Za pripravo substrata smo uporabili zemljo znamke LUFA Speyer. Za vsako skupino smo pripravili 5 lončkov s 320 g zemlje s 60 % kapaciteto zadrževanja vode (WHC; ang. water holding capacity) na lonček.

Za pripravo kontrolnega substrata smo za 5 lončkov 1350 g nesušene zemlje dodali 250 g (ml) destilirane vode. Za pripravo substrata z 0,05 % koncentracijo MP smo zmešali 1350 g



nesušene zemlje z 0,63 g MP in 250 g (ml) destilirane vode. Za pripravo substrata z 0,5 % koncentracijo MP smo 1350 g nesušene zemlje dodali 6,3 g MP in 250 g (ml) destilirane vode. Za pripravo substrata z 1 % MP koncentracijo smo zmešali 1350 g nesušene zemlje z 12,6 g MP in 250 g (ml) destilirane vode. Zemljo smo dobro premešali v plastičnih posodah in jo razdelili na 5 enakih delov za vsak lonček (po 320 g na lonček).

## Priprava rastlin

Uporabili smo sadike koruze (*Zea mays* sp.), stare približno 2 tedna, s po tremi pravimi listi, katerim smo najprej sprali korenine v čaši z vodo, da smo odstranili substrat, v katerem so rasle, in jim nato izmerili začetno dolžino korenin in poganjkov.

## Sajenje in zalivanje rastlin

Pripravili smo 20 lončkov, v katere smo najprej vstavili mrežo, ki bo zadrževala substrat in korenine v lončku in jih nato označili z zaporedno številko od 1 do 5 za vsako izpostavitve. V lončke smo najprej dali približno 3 cm zemlje, nato rastlino in nazadnje še preostalo zemljo, ki smo jo rahlo poteptali in s tem stabilizirali rastlino v zemlji. V vsakem lončku je bilo 320 g navlažene zemlje s 60 % vlažnostjo. Vse lončke smo nato zalili še z 20 ml destilirane vode in s tem dosegli 75 % vlažnost zemlje.

Rastline smo gojili pod stalnimi pogoji v rastnih komorah s 16/8 h dnevno/nočno fotoperiodo, pri temperaturi 22/18 °C, in približno 60 % relativni zračni vlažnosti. Rastline smo nato spremljali 5 tednov. Dvakrat tedensko smo jih zalivali z destilirano vodo; najprej po 20 ml prvi in drugi teden, nato s 40 ml tretji teden ter s po 60 ml destilirane vode zadnja 2 tedna. Tekom zalivanja smo zemljo tudi nekoliko razrahljali.

## Spremljanje rasti rastlin in meritve

1x tedensko smo merili dolžino poganjkov. Za določanje fotokemične učinkovitosti fotosistema II smo opravili meritve potencialne učinkovitosti v temi in meritve dejanske učinkovitosti na svetlobi. Pri vsaki skupini rastlin smo pri štirih rastlinah na istem listu opravili meritve s fluorometrom PAM 2500 (Heinz Walz GmbH). Transpiracijo rastlin smo merili s porometrom Leaf porometer (Team Medical & Scientific Sdn. Bhd.) na istih listih, kjer smo merili fotokemično učinkovitost. Po petih tednih smo poskus podrli. Rastline smo odstranili iz substrata in jim ponovno sprali korenine, da smo odstranili odvečno zemljo. Izmerili smo dolžine poganjkov in korenin. Nato smo ločili poganjke od korenin in vsakemu delu posebej stehali svežo biomaso. Poganjke in korenine smo nato zavili v aluminijasto folijo in jih sušili v liofilizatorju 72 ur ter jim nato

določili še suho biomaso.

Statistična analiza podatkov

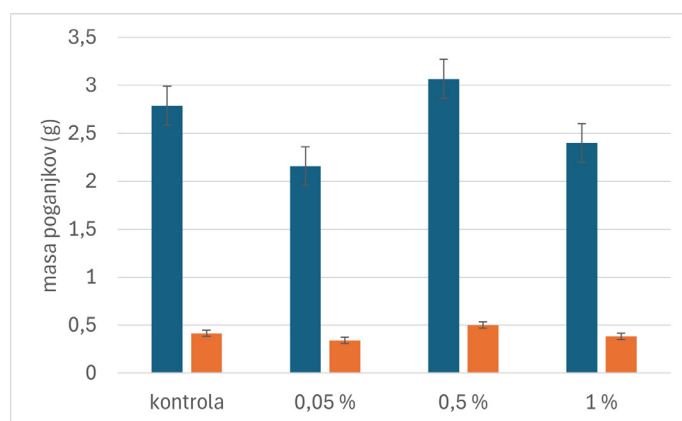
Izmerjene podatke smo statistično analizirali v MS Excelu z uporabo XL-toolbox-a z uporabo enosmerne analize variance (ANOVA) in Holm-Sidak post-hoc testom. Kot statistično pomembno razliko smo privzeli p-vrednost < 0,05.

## Rezultati

Zaradi odmrtnosti ene rastline pri 0,05 % izpostavitvi MP, ki smo ga zabeležili tretji teden poteka poskusa, smo to rastlino izključili iz vseh nadaljnjih analiz in prikazanih podatkov.

## Vpliv biorazgradljive MP na rast poganjkov

Za merjenje vpliva različnih koncentracij biorazgradljive MP na rast poganjkov smo enkrat tedensko izvedli meritve poganjkov vseh rastlin (Tabela 1), na koncu poskusa pa smo izmerili tudi svežo in suho maso poganjkov (Slika 1). Pri meritvah dolžin poganjkov na noben teden opazovanja nismo opazili statistično značilnih razlik med skupinami izpostavljenimi različnim koncentracijam MP. Podobno tudi nismo zaznali razlik v sveži in suhi biomasi poganjkov ob koncu poskusa.



**Slika 1.** Povprečna sveža (modri stolpci) in suha masa (oranžni stolpci) poganjkov koruze s standardno napako ob koncu poskusa pri štirih skupinah z različnimi koncentracijami biorazgradljive MP (n = 4 – 5). Kontrola; 0,05 % – 0,05 % izpostavitve delcem MP v substratu, 0,5 % – 0,5 % izpostavitve delcem MP v substratu; 1 % – 1 % izpostavitve delcem MP v substratu. Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test, p < 0,05).

**Tabela 1.** Povprečna dolžina poganjkov koruze s standardnimi napakami tekom trajanja poskusa (n = 4 – 5). K – kontrola; 0,05 % – 0,05 % izpostavitve delcem MP v substratu, 0,5 % – 0,5 % izpostavitve delcem MP v substratu; 1 % – 1 % izpostavitve delcem MP v substratu. Statističnih razlik med posameznimi skupinami ni bilo na noben teden opazovanja.

Datum meritev / skupina	22.2.2024	29.2.2024	7.3.2024	14.3.2024	21.3.2024	28.3.2024
K	18,2 ± 2,9	19,7 ± 4,0	16,6 ± 4,7	26,1 ± 3,4	26,0 ± 6,0	31,6 ± 6,7
0,05 %	18,6 ± 2,3	18,5 ± 3,0	21,3 ± 3,0	24,0 ± 4,3	25,9 ± 4,9	31,5 ± 4,7
0,5 %	18,3 ± 2,6	22,2 ± 3,5	23,8 ± 2,2	27,6 ± 5,6	31,5 ± 5,5	33,1 ± 4,8
1 %	16,8 ± 1,8	19,4 ± 3,9	21,5 ± 3,2	23,5 ± 3,8	28,8 ± 5,1	28,5 ± 5,2

**Tabela 2.** Povprečna dolžina korenin koruze s standardnimi napakami ob začetku poskusa in ob podiranju poskusa ( $n = 4 - 5$ ). K – kontrola; 0,05 % – 0,05 % izpostavitve delcem MP v substratu, 0,5 % – 0,5 % izpostavitve delcem MP v substratu; 1 % – 1 % izpostavitve delcem MP v substratu. Statističnih razlik med posameznimi skupinami ni bilo na noben termin.

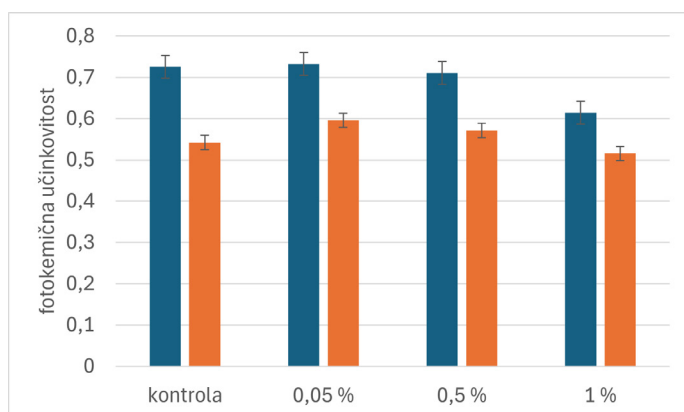
Skupina	Dolžina korenin na začetku poskusa (cm)	Dolžina korenin na koncu poskusa (cm)
K	25,3 ± 6,1	28,1 ± 8,1
0,05 %	25,3 ± 6,1	28,1 ± 8,1
0,5 %	26,2 ± 5,0	29,8 ± 5,3
1 %	31,6 ± 1,1	24,9 ± 5,7

### Vpliv biorazgradljive MP na rast korenin

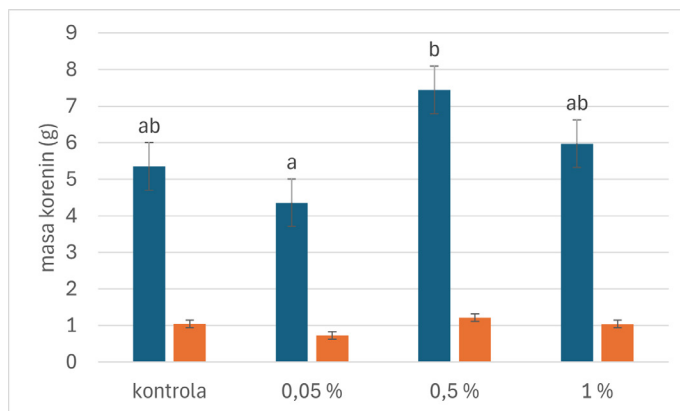
Meritve dolžin korenin ob začetku in na koncu poskusa so prikazane v Tabeli 2. Prav tako smo po koncu poskusa izmerili tudi svežo in suho maso korenin (Slika 2). Statistično značilne razlike smo opazili le med svežo maso korenin pri skupini izpostavljeni 0,5 % MP v substratu in rastlinami, izpostavljenimi 0,05 % koncentraciji biorazgradljive MP. V nasprotju pa pri meritvah suhe mase korenin med tema istima skupinama ni bilo statistično značilnih razlik. Prav tako nismo opazili razlik med skupinami v dolžini korenin.

### Vpliv biorazgradljive MP na fotokemično učinkovitost fotosistema II in transpiracijo

Meritve fotokemične učinkovitosti fotosistema II (Slika 3) in transpiracije (Slika 4) smo izvedli 4. teden poskusa (21. 3. 2024). Pri nobenem od merjenih parametrov, torej potencialni in dejanski fotokemični učinkovitosti, kakor tudi pri transpiraciji, nismo opazili statističnih razlik med skupinami.



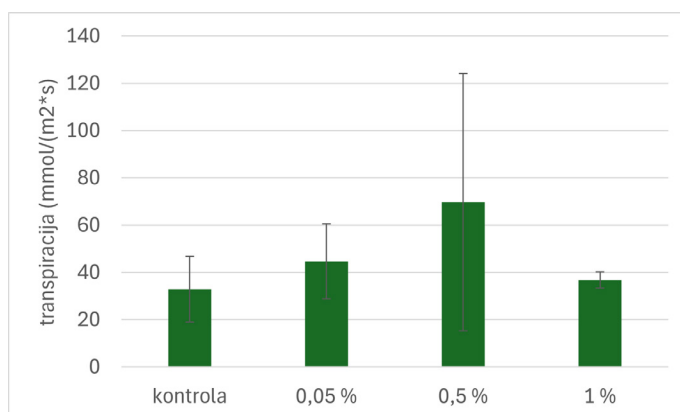
**Slika 3.** Povprečna potencialna fotokemična učinkovitost (modri stolpci) in dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema II (oranžni stolpci) s standardnimi napakami pri štirih skupinah koruze z različnimi koncentracijami biorazgradljive MP ( $n = 4 - 5$ ). Kontrola; 0,05 % – 0,05 % izpostavitve delcem MP v substratu, 0,5 % – 0,5 % izpostavitve delcem MP v substratu; 1 % – 1 % izpostavitve delcem MP v substratu. Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 2:** Povprečna sveža (modri stolpci) in suha masa (oranžni stolpci) korenin koruze s standardno napako ob koncu poskusa pri štirih skupinah z različnimi koncentracijami biorazgradljive MP ( $n = 4 - 5$ ). Kontrola; 0,05 % – 0,05 % izpostavitve delcem MP v substratu, 0,5 % – 0,5 % izpostavitve delcem MP v substratu; 1 % – 1 % izpostavitve delcem MP v substratu. Sveža masa korenin pri 0,5 % izpostavitvi delcev je bila statistično značilno večja, kakor pri 0,05 % izpostavitvi delcem MP v substratu. Med ostalimi skupinami ni bilo statistično značilnih razlik (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

### Diskusija

V raziskavi smo preverjali vpliv MP na rast sadik koruze. Pričakovali smo, da bo MP negativno vplivala na rast koruze z višanjem vsebnosti MP v substratu. Raziskava je pokazala, da ni bilo statistično značilnih razlik med kontrolno skupino rastlin in rastlinami, ki jim je bila v substrat dodana MP. Študije poročajo, da so že 1 % koncentracije biorazgradljive MP PLA relevantne za primerjavo z območji v tistih okoljih z visoko stopnjo človeške aktivnosti (Sun s sod., 2022). Zato smo predvidevali, da je taka koncentracija primerna za



**Slika 4.** Povprečna transpiracija s standardnimi napakami pri štirih skupinah koruze z različnimi koncentracijami biorazgradljive MP ( $n = 4 - 5$ ). Kontrola; 0,05 % – 0,05 % izpostavitve delcem MP v substratu, 0,5 % – 0,5 % izpostavitve delcem MP v substratu; 1 % – 1 % izpostavitve delcem MP v substratu. Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

najvišjo izpostavljenost rastlin mikroplastiki in naj bi pokazala možne vplive na rast rastlin v njeni prisotnosti. Yu s sod. (2023) so na primer opazili statistično značilno zmanjševanje biomase korenin z zviševanjem koncentracije, pri čemer so uporabili koncentracije 0,1 %, 0,2 %, 0,5 % in 1 % plastike PBAT (polibutilen alifat tetraftalat). Prav tako so opazili statistično značilno zmanjšanje dolžine korenin pri 0,5 % in 1 % koncentraciji PBAT v fazi metličanja in pri vseh koncentracijah v fazi zrele koruze. Glede na njihove rezultate smo predvidevali, da smo rastline gojili premalo časa za spremljanje vpliva MP na rastline koruze. V raziskavi Wang s sod. (2020) so rastline koruze pred odvzemom vzorcev gojili le en mesec po setvi, pri čemer so statistično značilen vpliv PLA na biomaso korenin in poganjkov zabeležili šele pri koncentraciji 10 %, pri nižjih koncentracijah pa tega niso zabeležili. Najvišja koncentracija MP, ki so ji bile izpostavljene naše rastline, je bila 1 %, kar je mogoče za naš časovni okvir poskusa prenizka koncentracija za doseganje statistično značilnih razlik med kontrolo in izpostavitvami z MP. Isti raziskovalci pa so zaznali statistično značilen vpliv na vsebnost klorofila tudi že pri koncentraciji 1 %, kar pa ne sovпада z našimi rezultati, saj v našem primeru pri fotokemični učinkovitosti fotosistema II nismo opazili statistično značilnih razlik.

Čeprav so raziskovalci v podobnih študijah na koruzi (Sun s sod., 2022; Wang s sod., 2020; Yu s sod., 2023) uporabili od 3 do 6 tehničnih ponovitev, predvidevamo, da bi bilo za pridobivanje bolj zanesljivih podatkov potrebno uporabiti več tehničnih ponovitev kot smo jih imeli v tem poskusu in kot že prej omenjeno, uporabiti tudi substrate z višjimi koncentracijami MP ali podaljšati trajanje poskusa. Prav tako bi bilo zanimivo dodati analizo razvejanosti korenin, saj nekateri viri navajajo, da MP pozitivno vpliva na prodiranje korenin v zemljo (Zhou s sod., 2021b).

## Zaključki

S poskusom smo želeli ugotoviti, kako različne koncentracije MP v substratu vplivajo na rast koruze, tako korenin kot poganjkov, na fotokemično učinkovitost fotosistema II in na transpiracijo. Rezultati nakazujejo, da prisotnost MP ne vpliva na rast poganjkov, saj nismo beležili statistično značilnih razlik med različnimi izpostavitvami MP in kontrolno skupino, niti pri meritvah dolžin poganjkov, niti pri določanju sveže in suhe biomase. Tako smo našo prvo hipotezo o negativnem vplivu MP na rast poganjkov ovrgli.

Pri določanju vpliva različnih koncentracij MP na rast korenin prav tako nismo beležili statistično značilnih razlik med različnimi izpostavitvami MP in kontrolno skupino. Izjema so

bile le meritve sveže mase korenin, ki so pokazale statistično značilne razlike med 0,5 % in 0,05 % izpostavitvijo MP v substratu. S tem smo ovrgli tudi drugo hipotezo.

Prav tako smo ovrgli našo tretjo hipotezo o zmanjšani fotokemični učinkovitosti fotosistema II in transpiraciji z višanjem koncentracije prisotne MP v substratu, saj med skupinami ni bilo zaznanih statistično značilnih razlik pri nobenem od merjenih parametrov. Rezultati poskusa nakazujejo, da prisotnost različnih koncentracij MP v substratu ne vpliva na rast koruze. Za boljšo oceno vpliva prisotnosti MP na rast koruze bi bile potrebne nadaljnje raziskave z več tehničnimi ponovitvami.

## Literatura

1. Fan P, Yu H, Xi B, Tan W, 2022. A review on the occurrence and influence of biodegradable microplastics in soil ecosystems: Are biodegradable plastics substitute or threat? *Environment International* 163:107244.
2. Mazzon M, Gioacchini P, Montecchio D, Rapisarda S, Ciavatta C, Marzadori C, 2022. Biodegradable plastics: Effects on functionality and fertility of two different soils. *Applied Soil Ecology* 169:104216.
3. Qin M, Chen C, Song B, Shen M, Cao W, Yang H, Zeng G, Gong J, 2021. A review of biodegradable plastics to biodegradable microplastics: Another ecological threat to soil environments? *Journal of Cleaner Production* 312:127816.
4. Sun Y, Li X, Cao N, Duan C, Ding C, Huang Y, Wang J, 2022. Biodegradable microplastics enhance soil microbial network complexity and ecological stochasticity. *Journal of Hazardous Materials* 439:129610.
5. Wang F, Zhang X, Zhang S, Zhang S, Sun Y, 2020. Interactions of microplastics and cadmium on plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal communities in an agricultural soil. *Chemosphere* 254:126791.
6. Wei XF, Capezza AJ, Cui Y, Li L, Hakonen A, Liu B, Hedenqvist MS, 2022. Millions of microplastics released from a biodegradable polymer during biodegradation/enzymatic hydrolysis. *Water Research* 211:118068.
7. Yu Y, Chen Y, Wang Y, Xue S, Liu M, Tang DWS, Yang X, Geissen V, 2023. Response of soybean and maize roots and soil enzyme activities to biodegradable microplastics contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 262:115129.
8. Zhou J, Gui H, Banfield CC, Wen Y, Zang H, Dippold MA, Charlton A, Jones DL, 2021a. The microplastisphere: Biodegradable microplastics addition alters soil microbial community structure and function. *Soil Biology and Biochemistry* 156:108211.
9. Zhou J, Wen Y, Marshall MR, Zhao J, Gui H, Yang Y, Zeng Z, Jones DL, Zang H, 2021b. Microplastics as an emerging threat to plant and soil health in agroecosystems. *Science of The Total Environment* 787:147444.

# Vpliv biorazgradljive italijanske mikroplastike na rast in razvoj sončnice

Andraž Krnc, Larisa Ortl, Ana Plavec, Kaja Tori

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Plastika predstavlja vedno večji delež odpadkov in lahko negativno vpliva na ekosisteme, zato se je začela uporabljati biorazgradljiva plastika, njen vpliv na rastline pa še ni povsem pojasnjen.
- Namen dela je bil ugotoviti vpliv različnih koncentracij biorazgradljive italijanske mikroplastike v substratu na rast in razvoj sončnice (*Helianthus annuus*).
- Sončnice smo posadili v zemljo z različnimi koncentracijami biorazgradljive italijanske mikroplastike. Rast sončnic smo spremljali z merjenjem višine poganjkov enkrat tedensko. Fotokemično učinkovitost smo izmerili s fluorometrom, transpiracijo pa s porometrom v četrtem tednu poskusa. Po zaključku poskusa smo izmerili končne dolžine poganjkov in korenin, jih ločeno stehtali ter tako določili svežo biomaso. Po petdnevnem liofiliziranju vzorcev smo določili še suho biomaso.
- Ugotovili smo, da 0,5 % koncentracija mikroplastike vpliva na suho biomaso korenin, 0,05 % in 0,5 % koncentracija mikroplastike pa vpliva na razmerje med svežo biomaso korenin in poganjkov.

**Ključne besede:** dolžina poganjkov, dolžina korenin, biomaso, transpiracija, fotokemična učinkovitost, inhibicija



## Uvod

Mikroplastika (MP) je pojem, ki označuje delce plastike s premerom med 0,1  $\mu\text{m}$  in 5 mm. S povečano produkcijo plastike se veča tudi vsebnost MP v ekosistemih, kjer vpliva tako na različne živali kot tudi mikrobne združbe v tleh in vodah. Pogosto se nahaja tudi na pridelovalnih površinah, kjer se zadržuje različno dolgo in počasi razpada (Liu s sod. 2022; Wang s sod. 2022).

Ker je onesnaženje s plastiko velik problem, namesto konvencionalne plastike v uporabo vse bolj prihaja t.i. biorazgradljiva plastika, ki se v procesu biološke razgradnje v tleh razgradi. Glavna razlika med konvencionalno in biorazgradljivo plastiko je v uporabljenih materialih. Vrečke, narejene iz konvencionalne plastike, temeljijo na materialih naftnega izvora, in sicer polietilenu (PE), polipropilenu (PP) in polietilenu visoke gostote (HDPE). Vrečke iz bioplastike pa temeljijo na polimerih bioloških molekul, kot sta mlečna kislina ali škrob. Polimeriziran material se v primerjavi s konvencionalno plastiko hitreje razgradi, zato je recikliranje lažje. Hkrati je tudi bolj zanimiv za vključevanje v koncept krožnega gospodarstva (Anstey s sod. 2014; Balestri s sod. 2019; Celletti s sod. 2023).

Dosedanje raziskave kažejo, da MP lahko negativno vpliva na rast in razvoj nekaterih rastlin. To se kaže predvsem preko oksidativnega stresa, pa tudi v velikosti poganjkov in številu listov. Ugotovili so, da se vpliv razlikuje tudi v odvisnosti od vrste MP in načina izpostavljenosti - akutna ali kronična izpostavljenost. Ker rastline ljudem predstavljajo pomemben vir hrane, ob tem pa tudi proizvajajo kisik in sodelujejo pri kroženju snovi v naravi, je pomembno poznati vpliv MP v tleh, na rast in razvoj rastlin (Pignattelli s sod., 2020; Chen s sod., 2022; Wang s sod. 2022).

Raziskave na tem področju pogosto kažejo nasprotujoče si rezultate, saj v nekaterih primerih vpliv biorazgradljive plastike na rast rastlin ni bil dokazan (Huerta-Lwanga s sod. 2021; Abe s sod. 2022; Liwarska-Bizukojc, 2023), spet v drugih primerih pa je ta na rast rastline delovala zaviralno. Rastline, ki so jih izpostavili najbolj razširjeni biorazgradljivi plastiki, proizvedeni iz škroba, so izkazovale manjšo biomaso poganjkov, višino in število listov, poleg tega pa so opazili tudi zmanjšano vsebnost klorofila, proteinov in glukoze, prisotni pa so bili tudi znaki oksidativnega stresa (Liwarska-Bizukojc, 2021; Celletti s sod. 2023).

Vpliv MP je torej zelo odvisen tako od vrste rastline kot tudi vrste MP, ki ji je bila rastlina izpostavljena, zato je njen vpliv potrebno določiti za vsak posamezen primer. Namen naše raziskave je bil ugotoviti, kakšen vpliv ima biorazgradljiva italijanska MP na rast in razvoj sončnic (*Helianthus annuus*). Predpostavili smo, da se bo z naraščajočo koncentracijo plastike v tleh upočasnila rast korenin in poganjkov, ki bodo zato posledično krajši, imeli manjšo biomaso ter nižjo stopnjo transpiracije in fotokemične učinkovitosti.

## Materiali in metode

### Rastlinski material

Uporabili smo sončnice (*Helianthus annuus*), vzgojene na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin. Sadike sončnic so bile stare 2 tedna in vzgojene v vermikulitu. Biorazgradljiva mikroplastika (MP)

Delce MP smo pridobili z mletjem biorazgradljivih plastičnih vrečk italijanskega proizvajalca.

### Izvedba poskusa

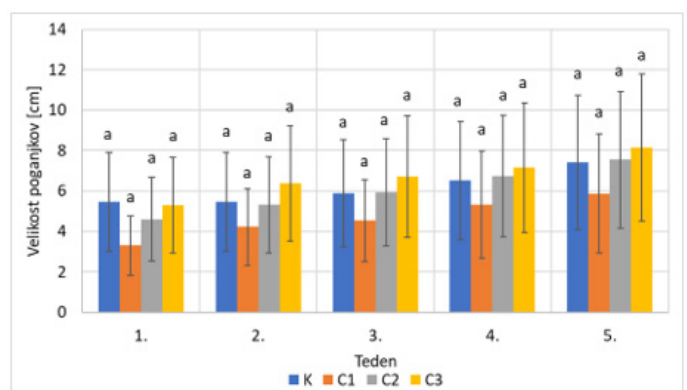
Sadice sončnic smo očistili in jim s spiranjem v vodi iz korenin odstranili ostanke substrata. Izmerili smo začetno dolžino korenin. Za sajenje sadik smo pripravili 4 mešanice zemlje (proizvajalec LUFA Speyer) in MP. Kot kontrolo smo uporabili zemljo brez dodane MP. Za izpostavitve rastlin MP smo uporabili 3 različne mešanice zemlje in MP s koncentracijo 0,05 %, 0,5 % in 1 % m/m. Zemljo smo navlažili do 60 % WHC (ang. water holding capacity oz. zadrževalna kapaciteta vode). Posamezen lonček je vseboval 320 g ustrezne mešanice. Ko smo v lonček posadili sončnico, smo vsak lonček zalili še z 20 mL destilirane vode, da smo dosegli končno 75 % WHC. Za vsako mešanico smo pripravili po 5 ponovitev (tj. 5 rastlin na izpostavitve). Sadikam smo nato izmerili dolžino poganjkov (od ravnine zemlje do najvišje točke poganjka). Rastline smo gojili v rastni komori s 16/8 h dnevno/nočno fotoperiodo in temperaturno 22/18 °C ter 60 % relativno vlažnostjo. Dvakrat tedensko smo vsak lonček najprej dva tedna zalivali z 20 mL destilirane vode, nato en teden 40 mL in zadnja dva tedna 60 mL. Enkrat tedensko smo izmerili tudi dolžino poganjkov.

### Transpiracija in fotokemična učinkovitost

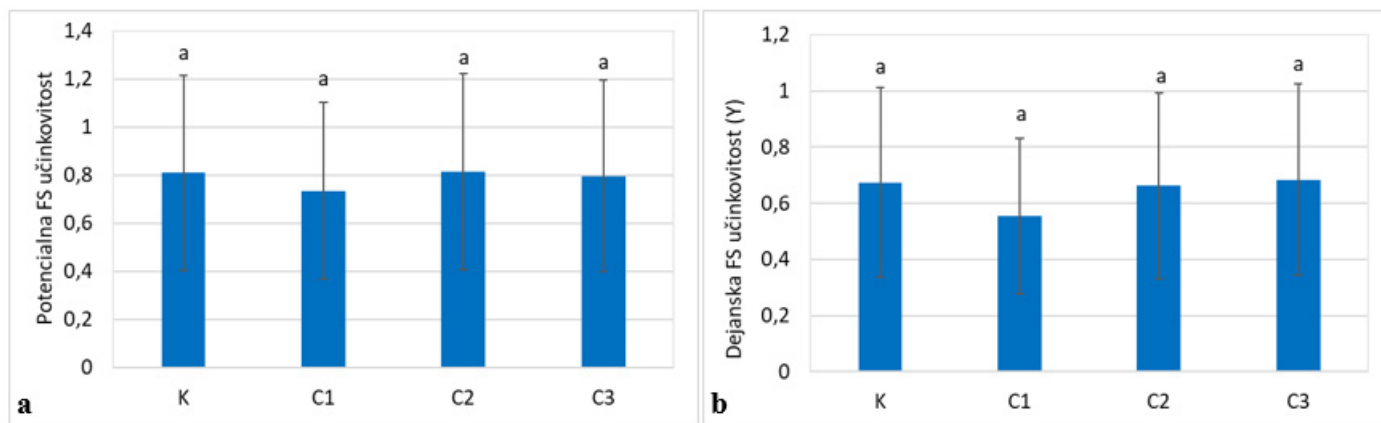
Po štirih tednih od začetka poskusa smo s fluorometrom (PAM-2500) merili fotokemično učinkovitost. Na listih, ki so bili 15 minut zatemnjeni, smo izmerili potencialno fotokemično učinkovitost ( $F_v/F_m$ ), nato pa na osvetljenih listih izmerili še dejansko fotokemično učinkovitost ( $Y$ ). Za meritev transpiracije smo uporabili porometer (Leaf Porometer) in na prvem pravem listu posamezne sončnice izmerili stopnjo transpiracije.

### Tehtanje sveže in suhe biomase

Po petih tednih smo poskus zaključili. Izmerili smo končne



Slika 1. Grafični prikaz povprečne vrednosti višine poganjkov v posameznem tednu in standardne napake ( $n = 5$ ) v obdobju petih tednov. K prikazuje rast sončnic v odsotnosti mikroplastike (kontrola), C1 rast sončnic v zemlji z 0,05 % koncentracijo mikroplastike, C2 rast sončnic v zemlji z 0,5 % koncentracijo mikroplastike, C3 pa rast sončnic v zemlji z 1 % koncentracijo mikroplastike. Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami na posamezen teden opazovanja (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



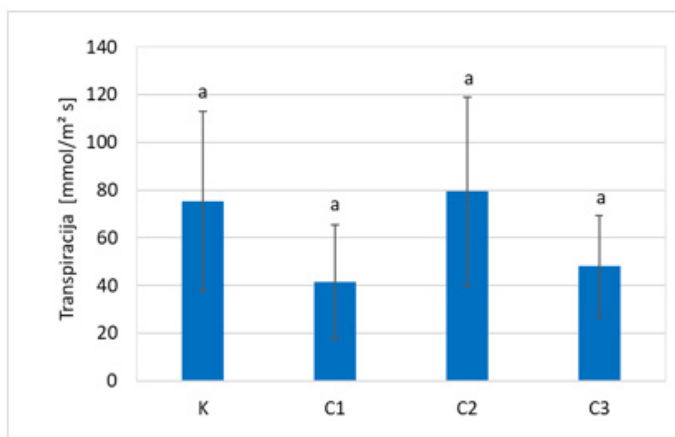
Slika 2. Grafični prikaz povprečne vrednosti in standardne napake potencialne fotokemične učinkovitosti (a) in dejanske fotokemične učinkovitosti (b) sončnic ( $n = 4$ ) glede na različne koncentracije MP v zemlji.

K prikazuje rast sončnic v odsotnosti mikroplastike (kontrola), C1 rast sončnic v zemlji z 0,05 % koncentracijo mikroplastike, C2 rast sončnic v zemlji z 0,5 % koncentracijo mikroplastike, C3 pa rast sončnic v zemlji z 1 % koncentracijo mikroplastike. Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

dolžine poganjkov in rastline ločili od substrata. Da bi odstranili zemljo še iz korenin, smo sončnice spirali v vodi, nato pa smo jim izmerili dolžino korenin. Poganjke in korenine posameznih rastlin smo stehali, da smo določili svežo biomaso. Vzorce smo nato posušili v liofilizatorju (5 dni), zatem pa določili še suho biomaso.

### Statistična analiza

Rezultate smo vnesli v MS Excel, kjer smo jih analizirali s pomočjo orodja XL\_toolbox. Na naših podatkih smo izvedli enosmerno analizo variance (ANOVA) ter Bonferroni-Holm ali Holm-Šidák post-hoc test. Kot statistično pomembno različne smo smatrali rezultate, kjer je bila  $p$ -vrednost  $< 0,05$ . S programom MS Excel smo pripravili tudi grafični prikaz podatkov.



Slika 3. Grafični prikaz povprečne vrednosti transpiracije sončnic in standardne napake ( $n = 4$ ) glede na različne koncentracije MP v zemlji. K prikazuje rast sončnic v odsotnosti mikroplastike (kontrola), C1 rast sončnic v zemlji z 0,05 % koncentracijo mikroplastike, C2 rast sončnic v zemlji z 0,5 % koncentracijo mikroplastike, C3 pa rast sončnic v zemlji z 1 % koncentracijo mikroplastike. Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

## Rezultati

### Dolžina poganjkov

Rezultati, pridobljeni z merjenjem višine poganjkov tekom eksperimenta, niso pokazali razlik v rasti poganjkov sončnic med posameznimi skupinami z različnimi koncentracijami MP v zemlji, kar prikazuje Slika 1. V povprečju se je dolžina poganjkov največ povečala med 4. in 5. tednom.

### Učinkovitost fotosistema II

Meritve potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti, ki so prikazane na Sliki 2a in Sliki 2b, niso kazale razlik med sončnicami, ki so rasle v različnih koncentracijah MP, je pa potencialna fotokemična učinkovitost nekoliko višja od dejanske, kar je pričakovano.

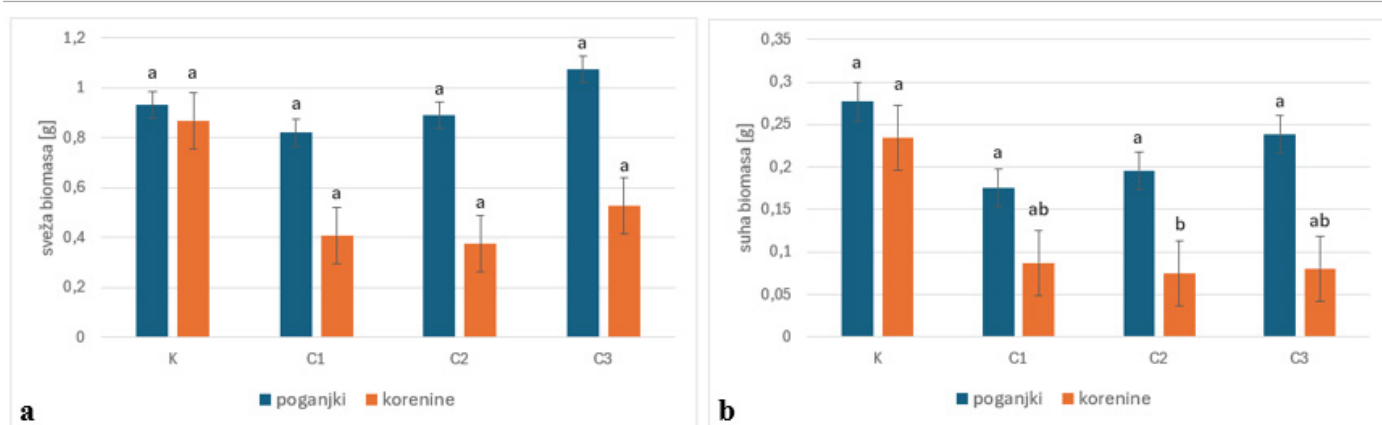
### Transpiracija

Slika 3 prikazuje rezultate meritev transpiracije, pri katerih nismo dobili statistično značilnih razlik med različnimi skupinami sončnic, ki so rastle izpostavljene različnim koncentracijam MP.

### Sveža in suha biomasa

Tudi pri merjenju sveže biomase korenin in poganjkov, prikazanih na Sliki 4a, smo s statistično analizo ugotovili, da razlike med posameznimi vzorci pri svežih masah korenin in poganjkov sončnic po 5 tednih niso bile statistično značilne. Iz rezultatov meritev suhe biomase korenin na Sliki 4b pa vidimo, da je prišlo do statistično značilnih razlik med suho biomaso korenin kontrolnih rastlin in rastlin, izpostavljenih 0,5 % koncentraciji MP. Med ostalimi vzorci rastlin in suhimi biomasami poganjkov ni prišlo do statistično značilnih razlik.

Slika 5 prikazuje razmerje med maso poganjkov in korenin za svežo in suho biomaso. Iz izračunanih razmerij vidimo, da je pri sveži biomasii prišlo do statistično značilnih razlik med razmerjema kontrolnih rastlin in rastlin, izpostavljenih 0,05 % koncentraciji MP, ter kontrolnih rastlin in rastlin, izpostavljenih



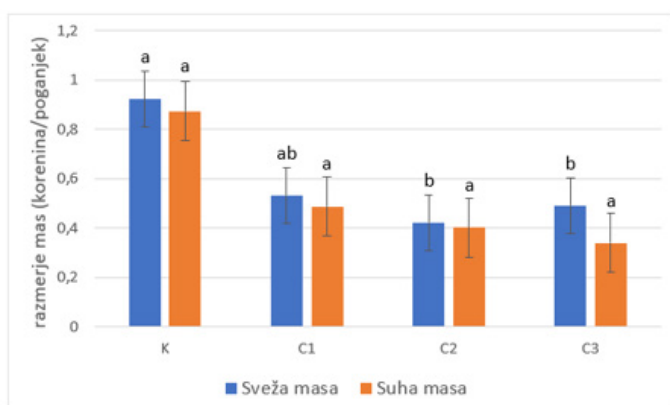
Slika 4. Grafični prikaz povprečnih svežih biomasa korenin in poganjkov sončnic (a) in standardne napake ( $n = 5$ ) in suhe biomase korenin in poganjkov sončnic (b) in standardne napake ( $n = 5$ ) glede na prisotnost MP v zemlji, v kateri sončnice rastejo. K prikazuje rast sončnic v odsotnosti mikroplastike (kontrola), C1 rast sončnic v zemlji z 0,05 % koncentracijo mikroplastike, C2 rast sončnic v zemlji z 0,5 % koncentracijo mikroplastike, C3 pa rast sončnic v zemlji z 1 % koncentracijo mikroplastike. Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami (enosmerna ANOVA, Holm-Šidák post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

0,5 % MP. Med razmerji poganjkov in korenin pri meritvah suhe biomase statistično značilnih razlik ni bilo.

## Diskusija

### Višina poganjkov in dolžina korenin

Tunali s sod. (2022) v svoji raziskavi navajajo, da so parametri rasti rastlin tisti, ki nam dajo končno oceno vpliva MP na rastline. Pri našem sprotne merjenju višine poganjkov sončnic tekom petih tednov nismo opazili statistično značilnih razlik v rasti med skupinami sončnic izpostavljenimi različnim koncentracijam MP v tleh, kar kaže na to, da MP ni imela vpliva na rast rastlin. Podobne rezultate so v svoji raziskavi dobili tudi Zhang s sod. (2023), ki navajajo, da izpostavitve kumar delcem MP ni imelo pomembnega vpliva na njihovo višino in dolžino korenin.



Slika 5: Grafični prikaz povprečnih vrednosti razmerja med maso poganjkov in korenin pri meritvah sveže in suhe biomase ( $n = 5$ ) glede na različne koncentracije MP v zemlji. K prikazuje rast sončnic v odsotnosti mikroplastike (kontrola), C1 rast sončnic v zemlji z 0,05 % koncentracijo mikroplastike, C2 rast sončnic v zemlji z 0,5 % koncentracijo mikroplastike, C3 pa rast sončnic v zemlji z 1 % koncentracijo mikroplastike. Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

MP poveča poroznost zemlje, kar omogoči boljšo rast korenin in poganjkov, to pa pomeni več rastlinske biomase, tako v poganjkih kot tudi v koreninah (Tunali s sod. 2022). Rezultat našega eksperimenta lahko tako povežemo z morebitnim predhodnim povečanjem poroznosti zemlje in s tem omogočeno dobro rastjo rastlin, koncentracije MP pa niso bile tako visoke, da bi zavrle rast rastlin.

V nasprotju z našimi rezultati pa Liu s sod. (2022) navajajo, da ima lahko biorazgradljiva MP bolj škodljive učinke kot polietilen. V tem primeru je imel 2 % PBAT-MP (polibutilen adipat-ko-tereftalat) pri navadnem repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana*) večji zaviralni učinek na rast in fotosintetski sistem (zmanjšala se je ekspresija genov iz Lhc supergenske družine) kot polietilen. Wang s sod. (2024) so v svoji raziskavi uporabili tudi solato (*Lactuca sativa* L.), pri kateri so se glede na odmerek tako biorazgradljive kot konvencionalne MP rastni parametri zmanjšali. Zmanjšano svežo in suho maso poganjkov in manjše število listov sta povzročili že 0,1 % in 1 % PBAT-MP. MP je namreč vplivala na manjšo razpoložljivost makrohranil, manjši vnos hranil in povečano kopičenje ROS, kar je povzročilo slabšo rast rastlin (Wang s sod., 2024).

Celletti s sod. (2023) so baziliko (*Ocimum basilicum*) tretirali z višjo koncentracijo bioplastike, narejene na osnovi koruznega škroba (2,4 %), in opazili za 68 % manjše višine poganjkov. Rast je bila upočasnjena, obrambni odziv oslabiljen in v nadzemnem delu rastlin bazilike je bil prisoten oksidativni stres (Celletti s sod. 2024). Nasprotno rezultate pa so dobili Liu s sod. (2024), ki so kumarice izpostavili polistirenu in so bile, v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, v povprečju višje za 22 %.

### Učinkovitost fotosistema II

Najpomembnejši proces, ki običajno korelira z abiotičnim stresom, je potencialna fotokemična učinkovitost fotosistema II (FS II) (Zhang s sod. 2023). Pri merjenju fotosintetske učinkovitosti FS II bi pričakovali padec učinkovitosti, saj običajno rastline zaradi omejenega vnosa vode in zmanjšane stopnje asimilacije CO<sub>2</sub> zmanjšajo učinkovitost fotosinteze. S tem se izognejo velikemu neravnovesju med zmogljivostjo pridobivanja svetlobe in izrabo energije, posledično pa nastanejo ROS. V skladu z našimi rezultati so tudi Ceccanti s

sod. (2024), ki so jagode izpostavili različnim koncentracijam MP (0,02 %, 0,2 % in 2 %) poročali, da izpostavljenost MP ni vplivala na fotokemijo FS II rastlin.

Podobno kot pri višini poganjkov so Celletti s sod. (2023) pri baziliki opazili značilen padec koncentracije klorofila v listih, Zhang s sod. (2023) pa navajajo, da je zmanjšanje največje fotokemične učinkovitosti pri višjih koncentracijah MP posledica inaktivacije nekaterih reakcijskih centrov FS II zaradi fotoinhibicije in tako povzroči manjšo fotokemično učinkovitost FS II. To negativno vpliva na rast rastlin, saj se več svetlobe razprši kot toplota namesto da bi se uporabila v fotosintezi za prenos elektronov. Zaključili so, da imajo zaradi kompleksnih interakcij med onesnažili in fotosistemi ti v različnih okoljih in različnih rastlinah različno občutljivost, zato metoda spremljanja fotokemične učinkovitosti ni najbolj primerna metoda za primerjavo med različnimi rastlinami in izpostavljenostmi (Zhang s sod. 2023).

## Transpiracija

Pri merjenju transpiracije sončnic prav tako nismo dobili razlik med posameznimi skupinami. Zmanjšanje transpiracije ima za posledico zmanjšanje neto asimilacije CO<sub>2</sub>, saj zapiranje listnih rež predstavlja enega prvih odzivov na zmanjšano razpoložljivost vode. Ceccanti s sod. (2024) so izmerili zmanjšanje transpiracije pri jagodah (*Fragaria x ananassa*) izpostavljenih delcem MP v primerjavi s kontrolnimi jagodami. Zmanjšanje neto asimilacije CO<sub>2</sub> ni vplivalo na razvoj vegetativnega dela rastline pri izpostavitvi MP, je pa vplivalo na končno velikost plodov. Rong s sod. (2024) so kot testno rastlino uporabili oljno ogrščico (*Brassica napus* L.). Dobili so statistične razlike v stopnji transpiracije med kontrolo in oljno ogrščico gojeno pri višji koncentraciji polistirena v fazi cvetenja, v vegetativni fazi pa statistično značilnih razlik med skupinami, prav tako kot mi, niso dobili.

## Sveža biomasa

Pri meritvah sveže biomase poganjkov in korenin statistično značilnih razlik med skupinami nismo dobili. Celletti s sod. (2023) so pri izpostavitvi bazilike MP dobili velik padec sveže biomase, in sicer za kar 82 %. Trdijo, da ima bioplastika podoben vpliv na fiziologijo rastlin kot konvencionalna plastika. Biorazgradljiva plastika na osnovi škroba namreč poleg zaviranja višine rastline vpliva tudi na zmanjšanje biomase v fazi rasti, kar je posledica sproščanja strupene hlapne organske spojine dodekanaldehyda. Prav tako biorazgradljiva plastika, proizvedena iz polimlečne kisline (PLA), vpliva na znatno zmanjšanje koreninske biomase (Fan s sod. 2022). Liu s sod. (2024) so kumare (*Cucumis sativus*) izpostavili polistirenu, pri tem pa so imele izpostavljene kumare večjo biomaso kot kontrolne. Učinek MP na rastlinsko biomaso kumar je lahko povezan z metodami gojenja, predvsem tal in hranilno raztopino. Trdijo, da na biomaso vpliva tudi velikost delcev MP polistirena. Poleg velikosti delcev MP ter njihove koncentracije pa na biomaso vpliva tudi prisotnost drugih delcev, npr. mineralov ZnO. Yang s sod. (2021) so ugotovili, da izpostavljenost rastlin hkrati ZnO in 0,1 % ali 1 % PLA spodbuja večjo biomaso koruze (*Zea mays* L. var. Wannuoyihao), medtem ko pri 10 % koncentraciji PLA vseeno pride do zaviranja rasti poganjka in korenine.

## Suha biomasa

Liu s sod. (2024) so podobno kot mi opazili določene statistično značilne razlike v suhi biomasi korenin. Analizirali so suho biomaso invazivnih in avtohtonim vrst zlate rozge (*Solidago canadensis* in *Solidago decurrens*). Potrdili so, da na suho biomaso vpliva tako koncentracija kot oblika MP ter vrsta rastline, saj so invazivne vrste imele večjo toleranco na MP kot avtohtone vrste (Liu s sod. 2024).

Z našo raziskavo smo ugotovili, da tako pri suhi kot sveži masi poganjkov kakor tudi korenin ni prišlo do statistično značilnih razlik, razen med suho biomaso kontrolnih rastlin in rastlin, izpostavljenim

0,5 % koncentraciji MP. Prav tako tudi Ceccanti s sod. (2024) niso opazili razlik v suhi biomasi njihovih poganjkov in korenin jagod. Predpostavljajo, da je to zaradi agregacije polietilena na površini korenin, kar so dokazali z barvanjem z barvilom Nile red ter njegov selektivno fluorescenco. Poleg tega je imele plod jagod slabšo kakovost ter zmanjšano rast in težo.

Kumare, ki so jih Liu s sod. (2024) izpostavili polistirenu, so kazale značilno nižjo suho biomaso pri vzorcih, izpostavljenih nižji koncentraciji, v primerjavi z vzorci, ki so bili izpostavljeni višji koncentraciji polistirena.

Rezultati našega poskusa nakazujejo, da naše hipoteze ne moremo potrditi. Z naraščajočo koncentracijo plastike se namreč rast korenin in poganjkov ni zmanjšala, prav tako se niso zmanjšali transpiracija, fotokemična učinkovitost in sveža biomasa. Pri meritvah suhe biomase pa smo opazili zmanjšanje povprečne suhe biomase korenin pri sončnicah izpostavljenih 0,5 % koncentraciji MP v primerjavi s kontrolo. V splošnem bi verjetno lahko tovrstne rezultate pripisali tudi slabi rasti rastlin v vseh skupinah, saj so tudi kontrolne rastline rastle zelo slabo in dosegle nižjo rast od pričakovane, tako da bi bilo smiselno eksperiment ponoviti, morda z uporabo drugačne zemlje.

## Zaključki

V naši raziskavi smo opazili občutljivost sončnic na prisotnost biorazgradljive italijanske MP v zemlji le pri 0,5 % koncentraciji MP, kjer je bila izmerjena manjša povprečna suha biomasa korenin v primerjavi s kontrolo, ter 0,05 % in 0,5 % koncentraciji MP, kjer se je v primerjavi s kontrolo zmanjšalo razmerje sveže biomase med koreninami in poganjki. Iz rezultatov sklepamo, da ima tovrstna MP v koncentracijah do 1 % omejen vpliv na rast sončnic. Iz rezultatov drugih raziskav pa lahko sklepamo, da ima biorazgradljiva MP različne učinke glede na vrsto rastline, velikost MP delcev in njihovo koncentracijo ter metodami gojenja. Koncentracije, uporabljene v našem poskusu, so najverjetneje dovolj nizke, da sončnicam niso povzročile stresa in s tem negativnega vpliva na rast in razvoj rastlin.

## Literatura

1. Abe MM, Branciforti MC, Montagnolli RN, Marin Morales MA, Jacobus AP, Brienzo M, 2022. Production and assessment of the biodegradation and ecotoxicity of xylan-and starch-based bioplastics. *Chemosphere* 287 (Pt 3): 132290.
2. Anstey A, Muniyasamy S, Reddy MM, Misra M, Mohanty A, 2014. Processability and biodegradability evaluation of composites from poly (butylene succinate)(PBS) bioplastic and biofuel co-products from Ontario. *Journal of Polymers and the Environment* 22: 209-



- 218.
3. Balestri E, Manicagli V, Ligorini V, Fulignati S, Raspolli Galletti AM, Lardicci C, 2019. Phytotoxicity assessment of conventional and biodegradable plastic bags using seed germination test. *Ecological Indicators* 102: 569-580.
  4. Ceccanti C, Davini A, Lo Piccolo E, Lauria G, Rossi V, Castiglione MR, Spano C, Bottega S, Guidi L, Landi M, 2024. Polyethylene microplastics alter root functionality and affect strawberry plant physiology and fruit quality traits. *Journal of Hazardous Materials* 470: 134164.
  5. Celletti S, Fedeli R, Ghorbani M, Loppi S, 2023. Impact of starch-based bioplastic on growth and biochemical parameters of basil plants. *Science of The Total Environment* 856: 159163.
  6. Chen G, Li Y, Liu S, Junaid M, Wang J, 2022. Effects of micro(nano) plastics on higher plants and the rhizosphere environment. *The Science of the Total Environment* 807 (Pt 1): 150841.
  7. Fan P, Yu H, Xi B, Tan W, 2022. A review on the occurrence and influence of biodegradable microplastics in soil ecosystems: Are biodegradable plastics substitute or threat?. *Environmental International*, 163: 107244.
  8. Li G, Tang Y, Lou J, Wang Y, Yin S, Li L, Iqbal B, Lozano YM, Zhao T, Du D, 2024. The promoting effects of soil microplastics on alien plant invasion depend on microplastic shape and concentration. *Science of the Total Environment* 926: 172089.
  9. Huerta-Lwanga E, Mendoza-Vega J, Ribeiro O, Gertsen H, Peters P, Geissen V, 2021. Is the polylactic acid fiber in green compost a risk for *Lumbricus terrestris* and *Triticum aestivum*?. *Polymers* 13: 13050703.
  10. Liu B, Li R, Zhuang H, Lin Z, Li Z, 2024. Effects of polystyrene microplastics on the phenylpropane metabolic pathway in cucumber plants. *Environmental and Experimental Botany* 220: 105671.
  11. Liu H, Wang X, Shi Q, Liu Y, Lei H, Chen Y, 2022. Microplastics in arid soils: Impact of different cropping systems (Altay, Xinjiang). *Environmental Pollution* 303: 119162.
  12. Liu J, Wang P, Wang Y, Zhang Y, Xu T, Zhang Y, Xi J, Hou L, Li L, Zhang Z, Lin Y, 2022. Negative effects of poly(butylene adipate-co-terephthalate) microplastics on *Arabidopsis* and its root-associated microbiome. *Journal of Hazardous Materials* 437: 129294.
  13. Liwarska-Bizukojc E, 2021. Effect of (bio) plastics on soil environment: A review. *Science of the Total Environment* 795: 148889.
  14. Liwarska-Bizukojc E, 2023. Effect of innovative bio-based plastics on early growth of higher plants. *Polymers* 15: 15020438.
  15. Pignattelli S, Broccoli A, Renzi M, 2020. Physiological responses of garden cress (*L. sativum*) to different types of microplastics. *Science of the Total Environment* 727: 138609.
  16. Rong S, Wang S, Liu H, Li Y, Huang J, Wang W, Han B, Su S, Liu W, 2024. Evidence for the transportation of aggregated microplastics in the symplast pathway of oilseed rape roots and their impact on plant growth. *Science of the Total Environment* 912: 169419.
  17. Tunali MM, Tunali M, Güven B, Yenigün O, 2022. Effect of soil microplastics on seed germination of *Helianthus Annuus* L. and *Sorghum Bicolor* L. V: Proceedings of the 4th IWA Regional Conference on Diffuse Pollution & Eutrophication. Kazezyilmaz-Alhan CM, Copty N (ur.). Istanbul: 430-433.
  18. Yang W, Cheng P, Adams CA, Zhang S, Sun Y, Yu H, Wang F, 2021. Effects of microplastics on plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal communities in a soil spiked with ZnO nanoparticles. *Soil Biology and Biochemistry* 155: 108179.
  19. Wang W, Do ATN, Kwon JH, 2022. Ecotoxicological effects of micro- and nanoplastics on terrestrial food web from plants to human beings. *Science of the Total Environment* 834: 155333.
  20. Wang W, Xie Y, Li H, Dong H, Li B, Guo Y, Wang Y, Guo X, Yin T, Liu X, Zhou W, 2024. Responses of lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth and soil properties to conventional non-biodegradable and new biodegradable microplastics. *Environmental Pollution* 341: :122897.
  21. Zhang YF, Huang ZY, Li YF, Lu XL, Li GR, Qi SS, Khan IU, Li GL, Dai ZC, Du DL, 2023. The Degradability of Microplastics May Not Necessarily Equate to Environmental Friendliness: A Case Study of Cucumber Seedling with Disturbed Photosynthesis. *Agriculture* 14: 14010053

# Vpliv polietilenskih mikrododelcev na rast in razvoj koruze

Neža Jeklin, Alesia Mevlja, Aleksander Sočič

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- S povečevanjem proizvodnje plastike in kopičenjem odpadkov v okolju mikroplastika predstavlja porajajoč problem kopenskim ekosistemom, pri čemer njeni vplivi na organizme še niso ustrezno raziskani.
- Znano je, da mikroplastika neposredno in posredno lahko vpliva na rast in razvoj rastlin ter njihov odgovor na stres, zato smo želeli preveriti, kakšne posledice imajo različne koncentracije polietilenskih (PE) mikrododelcev v zemlji na rastline koruze.
- Merili smo višino poganjkov, dolžino korenin, svežo in suho maso, fotokemično učinkovitost ter transpiracijo rastlin, gojenih v zemlji s PE delci.
- Pri nobenem izmed merjenih parametrov nismo zaznali razlik med kontrolno skupino ter različnimi koncentracijami PE mikroplastike, razen v vsebnosti vode v koreninah, ki je bila večja pri koruzi, izpostavljeni največji koncentraciji PE.
- V našem poskusu PE mikroplastika ni negativno vplivala na rast in razvoj koruze.

**Ključne besede:** mikroplastika, onesnaževanje, bioakumulacija, rastlinski stres, *Zea mays*

## Uvod

Plastika in plastični odpadki predstavljajo velik problem z vidika onesnaženja planeta, saj je leta 2018 svetovna proizvodnja plastike preseгла 320 milijonov ton letno. Od tega se reciklira le 6-26 %, kar pomeni, da večina plastike konča na odlagališčih ali pa se na različne načine sprosti v okolje (Alimi s sod., 2018). Plastični odpadki v naravi razpadejo na manjše delce različnih velikosti. Tako ločimo nanoplastiko (<100 nm), mikroplastiko (100 nm do 5 mm), mezoplastiko (5-25 mm) in makroplastiko (>25 mm). Prisotnost mikroplastike v okolju je bila dolgo časa spregledana, vendar se zaradi čedalje večje količine odpadkov število študij povečuje tudi na tem področju (Alimi s sod., 2018; Huang s sod., 2022). Mikroplastiko delimo na primarno in sekundarno. Primarna mikroplastika izvira iz tekstilne industrije, medicinskih izdelkov in izdelkov za osebno nego, prav tako v ta tip mikroplastike spadajo industrijski peleti za proizvodnjo surovin in plastike. Sekundarna mikroplastika pa nastane z razgradnjo večjih kosov plastičnih odpadkov. Razgradnjo teh odpadkov povzročajo UV sevanje, valovi, veter, mikroorganizmi ter temperatura. Najpogosteje zznane vrste polimernih delcev so polipropilen (PP), polietilen (PE), polivinilklorid (PVC), polistiren (PS) in politetrafluoroetilen (PTFE) (Xu s sod., 2020). Veliko raziskav se je do sedaj ukvarjalo predvsem z mikroplastiko v vodnih okoljih, kjer je glavni problem predvsem akumulacija mikroplastike v organizmih skozi prehranjevalno verigo (Chen s sod., 2021). So pa velike količine mikroplastike prisotne tudi v kopenskih ekosistemih. Ekosistemi tal so zelo kompleksni, prav tako pa primanjkuje metod za zaznavanje mikroplastike v tleh. Zato so študije o onesnaženju tal z mikroplastiko zelo omejene (Huang s sod., 2022).

Z našim poskusom smo želeli preveriti, kako različne koncentracije delcev polietilenske (PE) mikroplastike vplivajo na rast in razvoj korusze. Mikroplastika namreč po vstopu v tla vpliva neposredno na rast in razvoj rastline ter njen odgovor na stres ali pa posredno vpliva na njeno rast (Huang s sod., 2022). Neposredno ovira seme pri kalitvi, saj mu zamaši pore, ter omejuje možnost vpivanja vode in hranil skozi korenine. Rastlini škoduje tudi z agregacijo in akumulacijo v koreninah, poganjkih ter listih. Posredno mikroplastika spreminja fizikalno-kemijske lastnosti tal ter lastnosti mikrobne združbe v tleh, kar vpliva na sestavo rastlinskih združb, na njihovo primarno produkcijo in potencialno lahko povzroča nižji donos rastlin. Še dodaten problem za rastline predstavlja plastika, ki sama po sebi vsebuje ali nase veže različna druga onesnažila. Ta se preko plastike prenesejo v tla, se tam zadržijo in so lahko strupena za rastline ali talne organizme. Izvedene so bile tudi raziskave o vplivih mikroplastike na temperaturo tal. Plastika je namreč sposobna absorbirati, odsevati in transmitirati svetlobo na tak način, da se okoli nje spremeni temperatura, ki poveča aktivnost mikroorganizmov, dostopnost hranil in pospeši kalitev in rast. Ta efekt je pozitiven le v hladnejših območjih, sicer pa povzroča večje izhlapevanje vode iz tal, kar negativno vpliva na rastline (Khalid s sod., 2020).

Glede na literaturo ter vse do sedaj poznane negativne vplive mikroplastike smo predvidevali, da bosta rast in razvoj korusze pri vseh koncentracijah mikroplastike v tleh zavrta v primerjavi s kontrolo, in da bo učinek PE delcev na rastline večji pri višjih koncentracijah. Pričakovali smo torej, da se bodo višina poganjkov, dolžina korenin, sveža in suha biomasa zmanjšale z večjo koncentracijo PE in da bosta transpiracija ter fotosintezna

učinkovitost nižji pri višjih koncentracijah.

## Materiali in metode

### Rastlinski material

V poskusu smo uporabili koruszo (*Zea mays*), katere semena so bila predhodno vzklita v koritu z mešanico zemlje in vertikulita. Za poskus smo uporabili dvotedenske sadike korusze. Za izvedbo poskusa smo potrebovali skupno 20 rastlin, pri čemer smo za vsako skupino uporabili po 5 rastlin. Poskušali smo izbrati rastline čim bolj primerljive velikosti, da bi bili začetni pogoji za vse skupine čim bolj primerljivi.

### Priprava substrata za rast

Pri poskusu smo uporabili zemljo komercialnega proizvajalca Lufa, ki smo ji dodali različne koncentracije zmlete polietilenske mikroplastike. Uporabili smo koncentracije 0,05 %, 0,5 % in 1 %. Kot kontrolno skupino smo uporabili zemljo brez dodane mikroplastike. Za vsak lonček smo potrebovali 320 g navlažene namešane zemlje. Pri pripravi rastnega substrata smo zmešali 1350 gramov nesušene zemlje in ji dodali ustrezno koncentracijo mikroplastike ter ustrezno količino vode. Mešanico smo nato razdelili med 5 lončkov, tako da je bilo v vsakem lončku 320 g substrata. Pripravili smo naslednje mešanice:

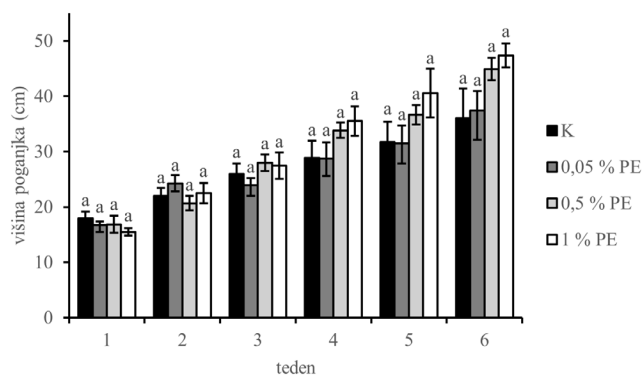
- Kontrola: 1350 g (nesušene) zemlje + 250 g (ml) dH<sub>2</sub>O
- K1: 1350 g (nesušene) zemlje + 0,63 g polietilena + 250 g (ml) dH<sub>2</sub>O
- K2: 1350 g (nesušene) zemlje + 6,3 g polietilena + 250 g (ml) dH<sub>2</sub>O
- K3: 1350 g (nesušene) zemlje + 12,6 g polietilena + 250 g (ml) dH<sub>2</sub>O

### Nastavitev poskusa

Za vsako koncentracijo mikroplastike smo naredili 5 ponovitev. Pred sajenjem smo vsaki rastlini izmerili začetno dolžino korenin in dolžino poganjkov. Sadike smo posadili v lončke tako, da smo v vsak lonček natehtali 320 g predhodno namešane zemlje. Na dno lončka smo najprej dodali del zemlje, nato smo v lonček postavili izbrano rastlino ter dopolnili lonček s preostalo zemljo. Po sajenju smo vse rastline zalili še z 20 ml vode. Rastline smo gojili v rastni komori, kjer smo vzdrževali dnevno-nočni svetlobni in temperaturni cikel. Dnevni cikel je trajal 16 ur pri temperaturi 22 °C, nočni cikel pa 8 ur pri temperaturi 18 °C. Rastline smo pri teh pogojih gojili 5 tednov. Med poskusom smo rastline redno spremljali. Zalivali smo jih 2-krat na teden, in sicer vsak ponedeljek in četrtek. V prvih dveh tednih smo jih zalivali z 20 ml vode, nato dva tedna s 40 ml vode, po četrtem tednu pa s 60 ml vode. Vsak četrtek smo rastlinam izmerili dolžino poganjkov.

### Merjenje fotokemične učinkovitosti in transpiracije

Merjenje fotokemične učinkovitosti smo izvedli z uporabo fluorometra PAM-2500 v 4. tednu. Naprava omogoča merjenje fluorescence klorofila a. Najprej smo izvedli meritve na zatemnjenih listih, da bi ocenili potencialno fotokemično učinkovitost (Fv/Fm). Na vsaki rastlini smo si izbrali en polno razvit list. Nato smo meritve izvedli še na osvetljenih listih, da bi ocenili dejansko fotokemično učinkovitost (Y). Meritve smo

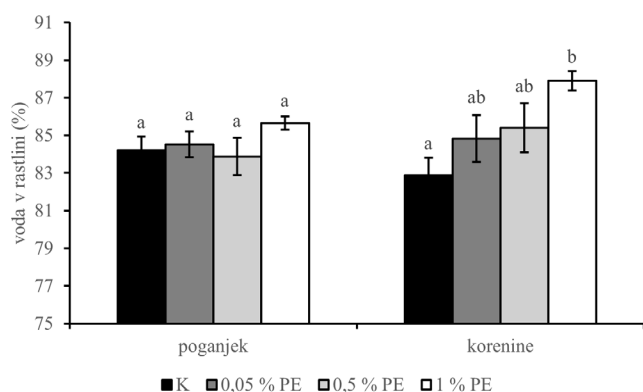


Slika 1. Povprečna višina poganjka korusa, ki je rastla v zemlji z dodanimi delci polietilena v koncentracijah 0 % (K), 0,05 %, 0,5 % in 1 % tekom trajanja poskusa. Na grafu so prikazana povprečja s pripadajočimi standardnimi napakami ( $n=5$ ). Črke nad podatki označujejo statistično značilne razlike v višini poganjka med skupinami z dodanimi različnimi koncentracijami PE delcev v zemlji v posameznem tednu (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

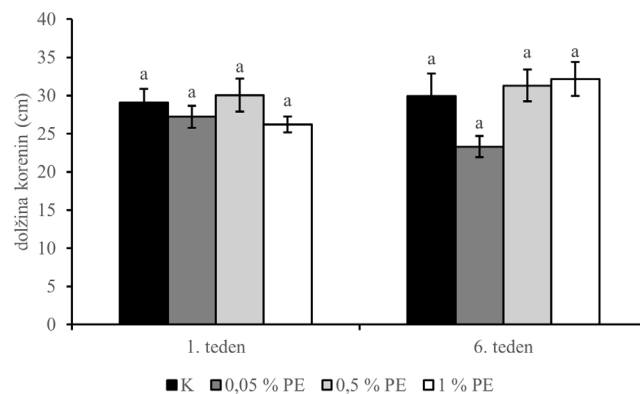
opravili na štirih izmed petih rastlin iz posamezne skupine. Za merjenje transpiracije smo uporabili porometer Leaf Porometer. Naprava nam poda oceno prevodnosti listnih rež, in sicer v enotah  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Tudi v tem primeru smo meritve opravili na štirih rastlinah vsake skupine. Porometer smo namestili na površino lista, in pazili, da ga nismo namestili na glavno žilo. Naprava nam poda stopnjo transpiracije kot količino molekul vode v  $\text{mmol}$ , ki jo rastlina izgubi na enoto površine v sekundi.

### Podiranje poskusov

Po 6. tednih smo poskuse podrli. Rastline smo previdno dali iz lončkov. Korenine smo sprali z vodo, da smo odstranili zemljo, ter jih nato osušili. Izmerili smo dolžino korenin in dolžino



Slika 3. Povprečna vsebnost vode v poganjkih in koreninah korusa, ki je rastla v zemlji z dodanimi delci polietilena v koncentracijah 0 % (K), 0,05 %, 0,5 % in 1 %. Podatki se nanašajo na zadnji teden poskusa. Na grafu so prikazana povprečja s pripadajočimi standardnimi napakami ( $n=5$ ). Črke nad podatki označujejo statistično značilne razlike v vsebnosti vode med skupinami z dodanimi različnimi koncentracijami PE delcev v zemlji (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



Slika 2. Povprečna dolžina korenin korusa, ki je rastla v zemlji z dodanimi delci polietilena v koncentracijah 0 % (K), 0,05 %, 0,5 % in 1 %. Podatki se nanašajo na prvi in zadnji teden poskusa. Na grafu so prikazana povprečja s pripadajočimi standardnimi napakami ( $n=5$ ). Črke nad podatki označujejo statistično značilne razlike v dolžini korenin med skupinami z dodanimi različnimi koncentracijami PE delcev v zemlji v posameznem tednu (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

poganjka. Prav tako smo tudi stekali svežo biomaso korenin in poganjka. Za vsako rastlino smo nato njene korenine in poganjke zapakirali v ločene aluminijaste folije, jih označili in jih dali liofilizirati. Po enem tednu smo določili še suho biomaso posameznih poganjka oz. korenin

### Statistična analiza

Za analizo podatkov smo uporabili program Excel, s katerim smo izračunali povprečne vrednosti in standardne deviacije. Za statistično analizo podatkov smo uporabili orodje XL Toolbox, s katerim smo izvedli enosmerno ANOVO (analiza variance) za primerjavo več skupin in Bonferroni-Holm post-hoc test za nadaljnje določanje statistično značilnih razlik med posameznimi skupinami. Vse podatke smo predstavili v obliki tabel in slik.

### Rezultati

Pri vseh štirih skupinah se je povprečna višina poganjka iz tedna v teden relativno enakomerno povečevala, tako da nikjer ne moremo govoriti o negativnem vplivu mikroplastike na rast, kar je razvidno iz slike 1. Vidimo sicer nekakšen trend, da se razlike v povprečjih med kontrolno skupino (K) in skupino z 0,05 % PE mikroplastike ter na drugi strani med skupinama z 0,5 % in 1 % PE mikroplastiko proti koncu poskusa vedno bolj povečujejo, a ne dovolj, da bi govorili o statistično značilnih razlikah.

Na sliki 2 vidimo, da pri dolžini korenin niso vidne razlike znotraj posameznega tedna med skupinami, ki so rasle v prisotnosti različnih koncentracij polietilenske mikroplastike v tleh.

Same sveže ter suhe mase poganjka, prikazane v preglednici 1, ne kažejo nobenih statistično značilnih razlik med korusami iz substratov z različnimi koncentracijami plastike. Enako velja tudi za korenine. Iz svežih in suhih mas izračunan delež vode, prikazan na sliki 3, pa ni bil povsod enak. Pri poganjkih ne moremo govoriti o statistično značilnih razlikah, pri koreninah pa opazimo, da so korenine korusa, ki je rastla v zemlji z

Tabela 1. Povprečna sveža in suha masa poganjkov ter korenin koruze, ki je rasla v zemlji z dodanimi različnimi koncentracijami delcev polietilena. Podatki se nanašajo na šesti teden poskusa. V preglednici so prikazana povprečja s pripadajočimi standardnimi napakami (n=5). Črke nad podatki označujejo statistično značilne razlike med skupinami z dodanimi različnimi koncentracijami PE delcev v zemlji (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

koncentracija polietilenskih delcev v zemlji	poganjki - sveža masa (g)	poganjki - suha masa (g)	korenine - sveža masa (g)	korenine - suha masa (g)
0 %	3,08 ± 0,62 a	0,49 ± 0,11 a	4,52 ± 1,00 a	0,79 ± 0,21 a
0,05 %	3,20 ± 0,54 a	0,49 ± 0,08 a	5,55 ± 1,25 a	0,84 ± 0,21 a
0,5 %	4,36 ± 0,51 a	0,69 ± 0,07 a	9,63 ± 1,36 a	1,39 ± 0,19 a
1 %	4,88 ± 0,50 a	0,7 ± 0,08 a	8,32 ± 0,97 a	1,00 ± 0,11 a

največjo koncentracijo plastike, vsebovale več vode kot korenine koruze, ki je rasla v zemlji brez plastike. Med ostalimi koncentracijami razlik ni.

Pri meritvah transpiracije, potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti nismo zaznali nobenih statistično značilnih razlik med kontrolo ter rastlinami, ki so rasle v prisotnosti različnih koncentracij PE v tleh. Rezultati so prikazani v preglednici 2.

## Diskusija

V naši raziskavi nismo zaznali vplivov mikroplastike na višine poganjkov in dolžine korenin, kar se le deloma sklada z obstoječo literaturo. Urbina s sod. (2020) na primer niso opazili statistično značilnih učinkov na rast koruze pri nizkih koncentracijah PE mikroplastike (0,0125 mg PE L<sup>-1</sup>) v hidroponski raztopini, a pri višji koncentraciji (100 mg PE L<sup>-1</sup>) pa so opazili kar 50 % zmanjšanje višine ter vpliv na razvoj korenin. Koncentracija 100 mg PE L<sup>-1</sup> pomeni približno 0,01 %, kar je celo manj od naše najnižje vsebnosti. Pri kontrolnih rastlinah so se razvile kompleksne korenine z zelo razvejanim koreninskim sistemom, pri koruzah izpostavljenih PE mikroplastiki, pa so se korenine slabše razvile. Prav tako so imele izpostavljene koruze skoraj za polovico krajše korenine v primerjavi s kontrolo. Martín s sod. (2023) so PE vključili v rastni medij v koncentraciji 0,4 mg mL<sup>-1</sup>, kar znaša približno 0,04 %. Testirali so moder in bel polietilen ter pri razvoju listov koruze izračunali 33 % zaviranje rasti v primeru modre plastike, pri beli pa so bile razlike zanemarljive. Pri koreninah vpliva na rast niso zaznali v nobenem primeru. Vidimo lahko, da si že obstoječe raziskave rahlo nasprotujejo in da se naši rezultati za rast poganjkov delno skladajo z raziskavo iz leta 2023, medtem ko nasprotujejo raziskavi leta 2020. Rezultati za rast korenin so po drugi strani skladni s študijo iz leta 2023, s tisto iz leta 2020 pa ne. Izpostaviti moramo, da obstajajo razlike med

omenjenima in našim poskusom, saj so Urbina s sod. (2020) gojili korožo v hidroponskem mediju, Martín s sod. (2023) pa v MS (Murashige in Skoog) gojišču. Sami smo poskus izvajali v zemlji in ravno izbor medija lahko znatno vpliva na rastne pogoje. Lahko bi rekli, da smo z našim poskusom želeli doseči stanje, bolj podobno naravnemu. Moramo pa na podlagi svojih rezultatov ovreči hipotezo o negativnem vplivu PE delcev na rast poganjkov in korenin koruze.

Vpliva PE delcev na fotokemično učinkovitost ter stopnjo transpiracije v našem poskusu nismo opazili, so pa razlike v transpiraciji opazili Urbina s sod. (2020). V njihovem primeru je pri rastlinah, izpostavljenih 100 mg PE L<sup>-1</sup>, transpiracija padla na 0,84 ml H<sub>2</sub>O na dan v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, kjer je bila ta 2,98 ml H<sub>2</sub>O na dan. Šlo je torej za več kot trikratni upad. Po drugi strani pa Sun s sod. (2023) niso zaznali vpliva mikroplastike na transpiracijo. Uporabili so celo 10 % koncentracijo PE v zemlji, kar je znatno več kot pri našem poskusu. Ta eksperiment je bolj podoben našemu ravno v smislu uporabe zemlje in ne hidroponskega medija, zato so naši podatki glede na to smiselni. Vseeno velja omeniti, da smo že znotraj posamezne skupine rastlin izmerili velika odstopanja in so bile posledično standardne napake velike. Hipotezo, da mikroplastika poslabša transpiracijo rastlin, smo glede na naše rezultate prav tako zavrgli. Zhou s sod. (2023) prav tako kot mi niso opazili vpliva mikroplastike na fotosintezno aktivnost. Testirali so poliestersko (PES) in polipropilensko (PP) mikroplastiko, ki nista povzročili nobenih razlik v fotosintezni aktivnosti rastlin koruze. Šlo je za koncentracijo 0,4 %, raziskavo pa so izvajali na polju. Glede uporabe zemlje je omenjeni eksperiment blizu našemu, gre pa za drugo vrsto mikroplastike, ki sicer izvira iz fosilnih materialov in ni biorazgradljiva, prav tako kot polietilen. Naši rezultati glede fotosintezne aktivnosti so torej v skladu z nekaterimi obstoječimi raziskavami, svojo

Tabela 2. Povprečni potencialna in dejanska fotokemična učinkovitost ter transpiracija, izmerjene na listih koruze, ki je rasla v zemlji z dodanimi delci polietilena. Podatki se nanašajo na peti teden poskusa. V preglednici so prikazana povprečja s pripadajočimi standardnimi napakami (n=4). Črke nad podatki označujejo statistično značilne razlike med skupinami z dodanimi različnimi koncentracijami PE delcev v zemlji (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

koncentracija polietilenskih delcev v zemlji	potencialna fotokemična učinkovitost	dejanska fotokemična učinkovitost	transpiracija (mmol/m2s)
0 %	0,735 ± 0,006 a	0,586 ± 0,015 a	59,38 ± 17,97 a
0,05 %	0,754 ± 0,013 a	0,604 ± 0,014 a	40,48 ± 7,84 a
0,5 %	0,719 ± 0,014 a	0,562 ± 0,054 a	77,75 ± 17,44 a
1 %	0,710 ± 0,014 a	0,560 ± 0,022 a	66,85 ± 9,11 a



hipotezo o negativnem vplivu PE mikroplastike na fotokemično aktivnost pa smo ovrgli.

V omenjenem poskusu (Zhou s sod., 2023) so merili tudi suho biomaso poganjkov ter korenin rastlin in pri tem zaznali statistično značilen negativen vpliv mikroplastike. Pri tem je pomembno vedeti, da se v različnih razvojnih fazah rastline vpliv mikroplastike razlikuje. V tem poskusu so opazili statistično značilno zmanjšanje celotne biomase po enem, dveh in treh mesecih rasti ob izpostavljenosti PP in PES mikroplastiki. Ob meritvi suhe biomase so naše rastline že presegle starost enega meseca, a razlik v suhi biomasi nismo zaznali, ne pri koreninah in niti poganjkih. Podatki se torej razlikujejo od naših rezultatov, vzrok pa bi bil poleg drugačne vrste mikroplastike lahko bil tudi to, da smo sami rastline izpostavili mikroplastiki šele po kalitvi in razvoju prvih listov. Urbina s sod. (2023) so dokazali tudi vpliv PE mikroplastike na suho biomaso, ki se je ob izpostavitvi 100 mg PE L<sup>-1</sup> zmanjšala celo za 50 %. V tem primeru se spet pojavi razlika v rastnem mediju, ki vpliva na rastne pogoje. Za naše pogoje torej hipoteze ne moremo potrditi, drugače pa bi morda bilo, če bi izpostavili mikroplastiki že sama semena rastline, torej takoj ob začetku razvoja.

Iz dobljenih svežih in suhih mas smo izračunali tudi deleže vode v koreninah in poganjkih, pri čemer smo zaznali statistično značilno povečanje vsebnosti vode v koreninah koruze, ki je rastla v 1 % PE, v primerjavi s kontrolno koruzo. Sklepamo, da so rastline v zemlji s PE lahko privzele več vode kot kontrolne rastline, saj nismo med koreninami opazili nobenih drugih razlik v masi, velikosti ali izgledu. Večji privzem vode se nam zdi smiseln, saj mikroplastika spreminja fizikalno-kemijske lastnosti zemlje. Pride do zmanjšanja zbitosti zemlje in povečane zračnosti zemlje, kar pripomore k boljši penetraciji korenin v substrat. Hkrati se zaradi mikroplastike ustvarijo pore, ki vodijo vodo v globlje plasti zemlje (Wan s sod., 2019). Po drugi strani naj bi na tvorbo agregatov in posledično poroznost zemlje zelo vplivala vrsta mikroplastike in tip zemlje. Četudi se torej zdi, da bi prisotnost mikroplastike lahko povzročila boljši privzem vode v korenine, Boots s sod. (2019) tega niso zaznali. Opazili so zmanjšano rast korenin pri vrsti *Lolium perenne*, ki je bila izpostavljena LDPE (polietilen nizke gostote) mikroplastiki. Gre za drugačno rastlino in drug tip mikroplastike, kot smo jo uporabili sami.

## Zaključek

Polietilenska mikroplastika v našem poskusu ni statistično značilno vplivala na rast in razvoj rastlin koruze. Izjema je bil vpliv 1 % PE mikroplastike, ki je povzročil povečanje deleža vode v koreninah koruze. Naši podatki se razlikujejo od nekaterih obstoječih študij, z drugimi pa se ujemajo. Kot razlago, da pri večini meritev nismo opazili razlik, vidimo dve

možnosti. Lahko mikroplastika dejansko ni imela nobenega vpliva na rastline, ker smo jih le-tej izpostavili šele po kalitvi in razvoju prvih korenin ter listov. Lahko pa je imela tako negativne kot pozitivne vplive, ki so se izničili. Velik vpliv na poskus ima lahko sama vrsta mikroplastike ter rastni pogoji. Za konec želimo poudariti, da naši rezultati ne pomenijo nujno, da mikroplastika v okolju oziroma na polju nima vpliva na rast in razvoj koruze, temveč da so zato potrebne natančnejše in bolj poglobljene študije.

## Literatura

1. Alimi OS, Farner Budarz J, Hernandez LM, Tufenkji N. 2018. Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments: Aggregation, Deposition, and Enhanced Contaminant Transport. *Environmental science & technology* 52(4):1704–1724.
2. Boots B, Russell CW, Green DS, 2019. Effects of Microplastics in Soil Ecosystems: Above and Below Ground. *Environmental science & technology* 53(19):11496–11506.
3. Carmen M, Michela P, Carmen F, Gonzalo C, Sebastián S-F, Mar N, Gerardo M, Margarita M, 2023. Transcriptomic and physiological effects of polyethylene microplastics on *Zea mays* seedlings and their role as a vector for organic pollutants. *Chemosphere* 322:138167.
4. Chen G, Li Y, Wang J, 2021. Occurrence and ecological impact of microplastics in aquaculture ecosystems. *Chemosphere* 274:129989.
5. Huang D, Wang X, Yin L, Chen S, Tao J, Zhou W, Chen H, Zhang G, Xiao R, 2022. Research progress of microplastics in soil-plant system: Ecological effects and potential risks. *Science of the total environment* 812: 151487.
6. Khalid N, Aqeel M, Noman A, 2020. Microplastics could be a threat to plants in terrestrial systems directly or indirectly. *Environmental Pollution* 267:115653.
7. Sun H, Shi Y, Zhao P, Long G, Li C, Wang J, Qiu D, Lu C, Ding Y, Liu L, He S, 2023. Effects of polyethylene and biodegradable microplastics on photosynthesis, antioxidant defense systems, and arsenic accumulation in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown in arsenic-contaminated soils. *Science of the total environment* 868:161557.
8. Urbina MA, Correa F, Aburto F, Ferrio JP, 2020. Adsorption of polyethylene microbeads and physiological effects on hydroponic maize. *Science of The Total Environment* 741:140216.
9. Wan Y, Wu C, Xue Q, Hui X, 2019. Effects of plastic contamination on water evaporation and desiccation cracking in soil. *The Science of the total environment* 654:576–582.
10. Xu S, Ma J, Ji R, Pan K, Miao AJ, 2020. Microplastics in aquatic environments: Occurrence, accumulation, and biological effects. *The Science of the total environment* 703:134699.
11. Zhou W, Wang Q, Wei Z, Jiang J, Deng J, 2023. Effects of microplastic type on growth and physiology of soil crops: Implications for farmland yield and food quality. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 326:121512.

# Vpliv polietilenske mikroplastike na rast in razvoj sončnic

Valentina Bojanec, Meta Ivanuša, Maja Peterlin, Mia Babič

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Mikroplastika je en najbolj zaskrbljujočih antropogenih onesnaževalcev, kopiči se tudi na kmetijskih površinah
- Namen raziskave je bil preveriti vpliv mikroplastike na rast sončnic
- Sončnice so bile posajene v substrate z dodatkom različnih koncentracij mikroplastike, spremljali smo njihovo rast in razvoj, učinkovitost fotosinteze in transpiracije tekom petih tednov
- Sončnice v substratu z dodatkom PE so uspevale primerljivo s kontrolno skupino, saj niso kazale slabše rasti, če so rastle v zemlji z dodano mikroplastiko

**Ključne besede:** polietilen (PE), *Helianthus annuus*, onesnažila v zemlji, razvoj rastline

## Uvod

Vplivi mikroplastike (MP) na rastline so kompleksni in raznoliki. Rastline so sposobne absorpcije različnih nanodelcev preko korenin v apoplast preko celične membrane z mehanizmom endocitoze, ter nato transporta dalje preko simplasta in po ksilemu v druge dele rastline (Bendmann s sod., 2012, Tripadhi s sod., 2017). Tudi MP se lahko pod pravimi pogoji prenese po ksilemu v nadzemne dele rastlin ter se akumulira v koreninah, steblih in listih rastlin (Yu s sod., 2024). Delci MP, ki jih rastlina absorbira, lahko povzročajo veliko negativnih vplivov na rastlino, med njimi so slabša rast, manjša količina biomase, oviranje kalitve semen, oksidativne poškodbe, spreminjanje značilnosti korenin, interferenca s fotosintezo in genotoksičnost. Testi vpliva plastike na rastline so bili izvedeni z uporabo mikro in nano-sferičnih delcev polistirenske plastike (Bosker s sod., 2019, Giorgetti s sod., 2020, Zhou s sod., 2021). Na učinkovitost absorpcije MP vplivajo njena velikost, površinski naboj in fibriliranost (Yu s sod., 2024). Delci MP z negativnim površinskim nabojem se lažje absorbirajo in prenesejo v nadzemne dele rastline, medtem ko se delci s pozitivnim površinskim nabojem zadržijo le v koreninskih vršičkih, vendar povzročijo večjo akumulacijo prostih kisikovih radikalov in s tem zaviranje rasti (Sun s sod., 2020). Na delce MP se lahko adsorbirajo težke kovine ali antibiotiki, ki se nato skupaj z njimi prenesejo v rastline, kjer se lahko akumulirajo in še dodatno negativno vplivajo na fiziološko stanje rastlin (Jędruchiewicz s sod., 2023, Bao s sod. 2022).

MP lahko vpliva na rastline tudi posredno, preko spreminjanja lastnosti prsti in rizosfere. Raziskave kažejo, da prisotnost MP povzroči povečano evapotranspiracijo, zmanjšuje prisotnost vodno stabilnih agregatov prsti, v splošnem zmanjšuje gostoto prsti, v rizosferi pa gostoto prsti zvišuje (de Souza Machado s sod., 2019). Poleg spreminjanja lastnosti prsti, MP s svojo prisotnostjo tudi "razredči" dostopen organski ogljik v prsti, kar povzroči večjo tekmovanje med mikroorganizmi. Na tak način lahko MP vpliva tudi na mikrobne združbe in kroženje hranil v tleh (Han s sod., 2024).

V tem članku smo želele preveriti, ali fino zmleti polietilenski (PE) delci plastike vplivajo na rast in razvoj ter fiziološke parametre pri sončnici. Predpostavile smo, da bodo korenine in poganjki pri rastlinah, ki so rastle v tleh z večjo koncentracijo PE MP manjši. Predvidevale smo, da se bo zemlja z večjo vsebnostjo MP hitreje izsuševala, kar bi negativno vplivalo na rast rastline.

## Materiali in metode

Poskus smo izvedle na dvotedenskih kalicah sončnic (*Helianthus annuus*). Posadile smo jih v substrat z dodano PE MP v koncentracijah 0,05, 0,5 in 1 % m/m, ter v substrat brez dodane MP, ki je služil za kontrolo. MP smo pridobili z mletjem vrečk v mlinu. Za vsako koncentracijo MP vključno s kontrolo smo naredile 5 tehničnih ponovitev. Sončnice smo v rastni komori gojile 35 dni. Dnevna fotoperioda je znašala 16/8 h. Dnevna temperatura je znašala 22°C, nočna 18 °C, relativna zračna vlaga je znašala 60 %. Zalivale smo jih 2x tedensko: Sprva z 20 mL destilirane vode, po 14. dneh smo odmere povečale na 40 mL. Po 21 dneh od začetka poskusa pa odmere zvišale na 60 mL. Ob sajenju in nato vsakih 7 dni smo merile višino poganjkov. Tako pred sajenjem kot ob zaključku poskusa smo poleg višine poganjkov izmerile še

dolžino korenin. Na 28. dan po začetku poskusa smo izmerile učinkovitost fotosinteze preko merjenja potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti s fluorometrom (PAM-2500), ter učinkovitost transpiracije s porometrom (Leaf Porometer). Zatem smo poskuse podrli, izmerili končne dolžine poganjkov in korenin ter stekali njihovo svežo biomaso. Rastlinski material smo nato en teden sušile v liofilizatorju ter nato določile še suho biomaso.

Statistično obdelavo podatkov smo izvedle v programu Microsoft Excel. Izračunale smo povprečja, standardne odklone, standardne napake in z orodjem ANOVA ugotavljale statistično različnost meritev izvedenih na rastlinah gojenih pri različnih koncentracijah MP. Izvedle smo Bonferroni-Holmov pos-hoc test za določitev razlik med posameznimi skupinami..

## Rezultati

### Dolžina in biomasa poganjkov/korenin

Na sliki 1 sta prikazani sveža in suha biomasa posameznih delov rastlin, ki smo ju merili po končanem eksperimentu. Tako pri sveži kakor suhi biomasi poganjkov in korenin nismo opazili statistično značilnih razlik med posameznimi skupinami.

Na sliki 2 so prikazane dolžine korenin, ko smo jih sadili in ob koncu poskusa (po petih tednih). Razlike v dolžini korenin smo zaznali le pred začetkom poskusa, kar je zgolj posledica naključja pri izboru sejank sončnic. Ob koncu poskusa razlik v dolžini korenin med posameznimi skupinami ni bilo.

Slika 3 prikazuje rast oziroma dolžine poganjkov tekom trajanja poskusa. Tudi pri dolžini poganjkov med skupinami niso opazili nobenih razlik z izjemo 3. tedna opazovanja, ko so bile v povprečju največje sončnice izpostavljene 0,05 % PE MP, najkrajše pa tiste pri 1 % PE MP.

Slika 4 prikazuje razmerje med dolžino korenin in dolžino poganjkov ob koncu eksperimenta. Med skupinami tretiranimi z različno koncentracijo PE MP nismo opazili statističnih razlik v razmerju med dolžino korenin in poganjkov.

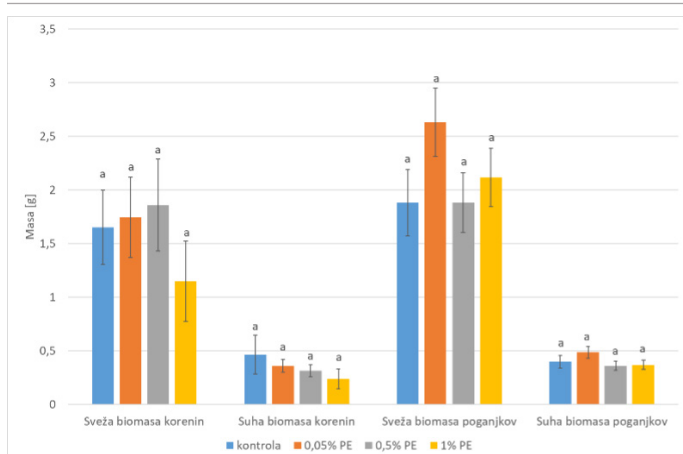
### Transpiracija in fotokemična učinkovitost

Najvišjo stopnjo transpiracije oziroma stomatalne prevodnosti smo zabeležili pri skupini, ki je bila izpostavljena 0,05 % PE MP, znašala je 108,95 mmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, kar lahko razumemo kot pojav hormoneze, med ostalimi skupinami ni bilo statistično značilnih razlik (slika 5).

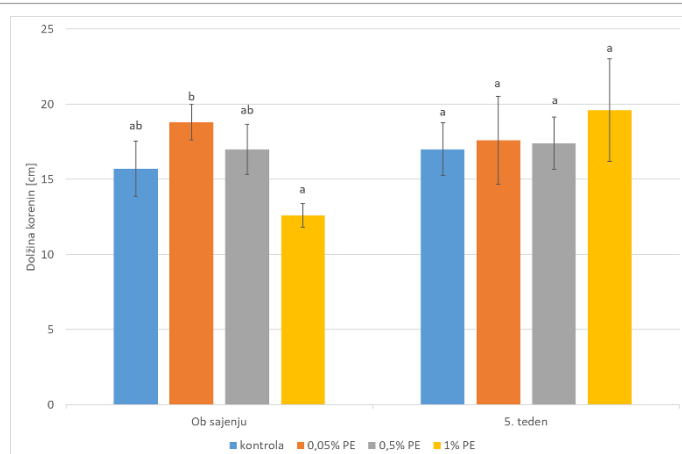
Prav tako nismo zaznali razlik med kontrolno skupino in sončnicami izpostavljenimi različnim koncentracijam PE MP pri meritvah potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti (slika 6).

## Diskusija

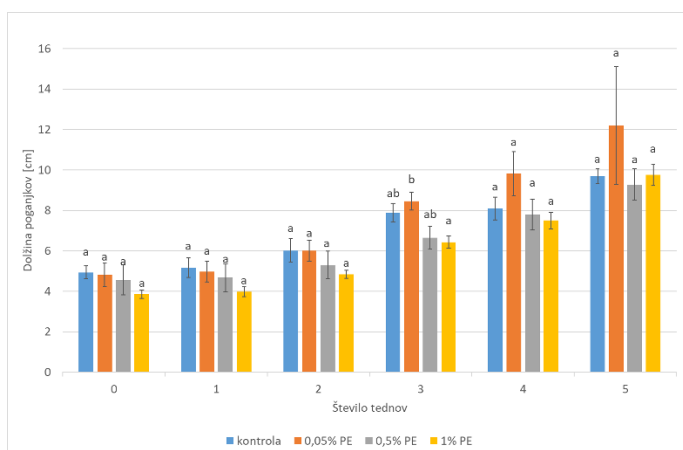
Namen naše raziskave je bil preveriti, če MP negativno vpliva na rast sončnic. Naša ugotovitev, da PE MP v koncentracijah do 1 % m/m nima pomembnega vpliva na sončnice, se razlikuje od nekaterih prejšnjih raziskav, ki so pokazale negativne učinke MP na rastline (Sun s sod., 2020, Zhou in sod., 2021) V našem poskusu pri večini opazovanih parametrov nismo zaznali statističnih razlik med skupinami, razen v primeru 3. tedna dolžine poganjkov (najdaljši poganjki pri 0,05 % in najkrajši pri 1 % PE). Razlike v dolžini korenin smo sicer zaznali le pred začetkom poskusa, kar je zgolj posledica naključja pri izboru



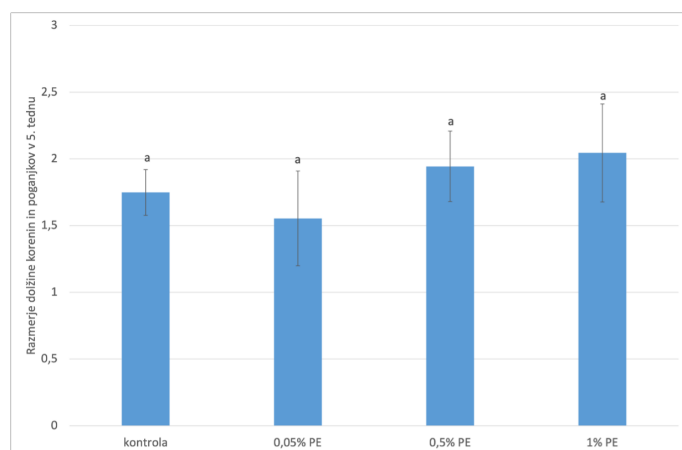
Slika 1. Slika prikazuje svežo in suho biomaso korenin ter poganjkov ob zaključenem eksperimentu (n=5). Kontrola, 0,05 % PE – skupina z dodane 0,05 % polietilensko mikroplastiko v substratu, 0,5 % PE – skupina z dodano 0,5 % polietilensko mikroplastiko v substratu in 1 % PE – skupina z dodano 1 % polietilensko mikroplastiko v substratu. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med skupinami z dodanimi različnimi koncentracijami PE MP v substratu (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



Slika 2. Slika prikazuje dolžino korenin (cm) ob posaditvi in ob zaključenem eksperimentu (n=5). Kontrola, 0,05 % PE – skupina z 0,05 % polietilensko mikroplastiko v substratu, 0,5 % PE – skupina z 0,5 % polietilensko mikroplastiko v substratu in 1 % PE – skupina z 1 % polietilensko mikroplastiko v substratu. Različne črke označujejo značilne razlike med skupinami (npr. ob posaditvi) z dodanimi različnimi koncentracijami PE delcev v substratu (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



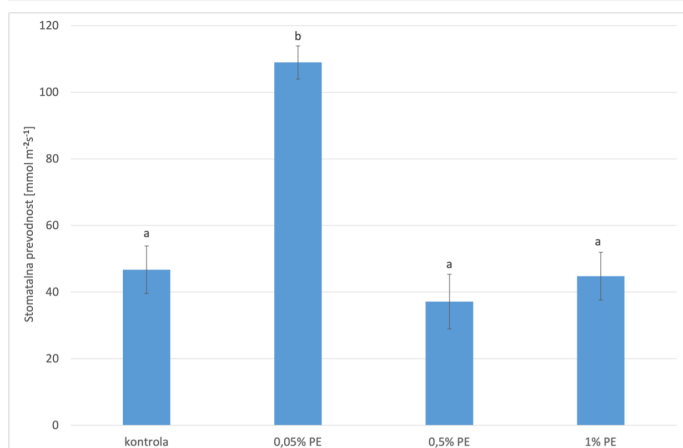
Slika 3. Slika prikazuje dolžino poganjkov (cm) od tedna 0 (ob posaditvi) do tedna 5 (konec eksperimenta) (n=5). Kontrola, 0,05 % PE – skupina z 0,05 % polietilensko mikroplastiko v substratu, 0,5 % PE – skupina z 0,5 % polietilensko mikroplastiko v substratu in 1 % PE – skupina z 1 % polietilensko mikroplastiko v substratu. Različne črke označujejo značilne razlike med skupinami (npr. teden 0) z dodanimi različnimi koncentracijami PE delcev v substratu (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



Slika 4. Slika prikazuje razmerje med dolžino korenin in dolžino poganjkov po 5. tednu, ob koncu eksperimenta (n=5). Kontrola, 0,05 % PE – skupina z 0,05 % polietilensko mikroplastiko v substratu, 0,5 % PE – skupina z 0,5 % polietilensko mikroplastiko v substratu in 1 % PE – skupina z 1 % polietilensko mikroplastiko v substratu. Različne črke označujejo značilne razlike med skupinami z dodanimi različnimi koncentracijami PE delcev v substratu (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

sejank sončnic. Predhodne raziskave so pokazale, da delci MP, ki ji rastlina absorbira, lahko poleg slabe rasti povzročijo tudi manjšo količino biomase in slabo fiziološko stanje (Yu in sod., 2024, Sun in sod., 2020). V naši študiji teh učinkov nismo zaznali, kar bi lahko bilo povezano z različnimi vrstami MP ali drugo rastlinsko vrsto ali pa zgolj kot posledica drugačnih eksperimentalnih pogojev. Študija Zhou in sod. (2021) je prav tako pokazala, da MP lahko povzroči zmanjšano biomaso in slabšo rast korenin. Ena možna razlaga za odsotnost takih učinkov v naši študiji bi lahko bila različna kemijska sestava in fizične lastnosti PE; namreč v naši študiji smo uporabili polietilensko MP, v njihovi študiji pa je bila uporabljena polistirenska MP. Poleg te razlike so oni v raziskavi uporabili

tudi višje koncentracije plastike: 1% , 5% in 10%. Morda so bile naše koncentracije MP prenizke, da bi povzročile opazne spremembe, kot jih opisujejo druge študije. De Souza Machado in sod. (2019) v svoji študiji omenjajo, da MP v tleh spremeni fizikalne lastnosti tal, kot so gostota in stabilnost agregatov. V naši študiji nismo opazili hitrejšega izsuševanja tal pri višjih koncentracijah MP. V primeru hitrejšega izsuševanja, bi lahko to vplivalo na dostopnost vode in hranil za rastline. Tekom poskusa smo vseeno zvišali količino vode za zalivanje, zaradi vse večjega poganjka, ki potrebuje vse več vode. Kljub temu to ni povzročilo statistično značilnih razlik v velikosti rastlin, kar lahko kaže na prilagodljivost sončnic na take stresne pogoje. Prisotnost MP v tleh lahko vpliva tudi na mikrobne

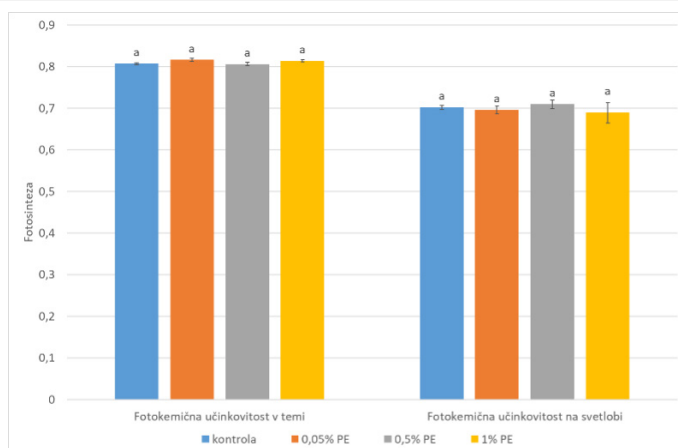


Slika 5. Slika prikazuje stomatalno prevodnost ( $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) na 28. dan trajanja eksperimenta. Kontrola, 0,05 % PE – skupina z 0,05 % polietilensko mikroplastiko v substratu, 0,5 % PE – skupina z 0,5 % polietilensko mikroplastiko v substratu in 1 % PE – skupina z 1 % polietilensko mikroplastiko v substratu. Različne črke označujejo značilne razlike med skupinami z dodanimi različnimi koncentracijami PE delcev v substratu (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

združbe in kroženje hranil, kot so dokazali Han in sod. (2024). MP lahko "razredči" dostopen organski ogljik in s tem poveča tekmovanje med mikroorganizmi. To lahko vpliva na dostopnost hranil za rastline, kar v daljšem časovnem obdobju lahko povzroči spremembe v rastnih pogojih in zdravju rastlin. Vendar pa v naši študiji nismo analizirali mikrobioloških parametrov, zato to ostaja področje za nadaljnjo raziskovanje. Ena od omejitev naše študije je relativno kratko trajanje eksperimenta (35 dni) in uporaba le treh koncentracij MP. Po našem mnenju bi morale nadaljnje raziskave usmeriti v dve področji: raziskovanje drugih vrst ter koncentracij MP in pa vpliv MP z drugimi onesnažili na rastlino. Dolgotrajnejši poskusi z večjim naborom koncentracij in različnimi vrstami MP bi lahko dali bolj celovit vpogled na vplive MP na rastline. Prav tako bi bilo koristno preučiti vpliv MP na različne pridelke in divje rastline, da bi ugotovili, ali so nekatere vrste bolj občutljive na MP kot druge. Drugo področje raziskav bi moralo vključevati tudi preučevanje interakcij med MP in drugimi onesnažili, kot so težke kovine in antibiotiki, ki se lahko adsorbirajo na MP in skupaj prenesejo v rastline (Jędruchniewicz in sod, 2023, Bao in sod., 2022). Takšne interakcije bi lahko imele še dodatne negativne vplive na rast in zdravje rastlin.

## Zaključek

Našo hipotezo, da bodo korenine in poganjki krajši pri rastlinah, ki so bile posajene v zemljo z dodatkom MP, smo zavrgle. Naša raziskava je pokazala, da fino zmleti PE delci mikroplastike v koncentracijah do 1 % m/m v tleh niso imeli statistično značilnega vpliva na rast in biomaso sončnic. Na splošno rastline tudi niso kazale bistveno slabšega fiziološkega stanja (fotosintetska učinkovitost in transpiracija), če so rastle v zemlji z dodatkom MP. Kljub temu so potrebne nadaljnje raziskave, da se bolje razume dolgotrajne učinke in potencialne interakcije MP z rastlinami.



Slika 6. Slika prikazuje fotokemično učinkovitost na 28. dan trajanja eksperimenta. Izmerili smo učinkovitost v temi in na svetlobi. Kontrola, 0,05 % PE – skupina z 0,05 % polietilensko mikroplastiko v substratu, 0,5 % PE – skupina z 0,5 % polietilensko mikroplastiko v substratu in 1 % PE – skupina z 1 % polietilensko mikroplastiko v substratu. Različne črke označujejo značilne razlike med skupinami z dodanimi različnimi koncentracijami PE delcev v substratu (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

## Literatura

- Bao Y, Pan C, Li D, Guo A, Dai F, 2022. Stress response to oxytetracycline and microplastic-polyethylene in wheat (*Triticum aestivum* L.) during seed germination and seedling growth stages. *Science of the total environment* 804: 150553.
- Bandmann V, Müller J D, Köhler T, Homann U, 2012. Uptake of fluorescent nano beads into BY2-cells involves clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis. *FEBS Letters* 20, 586: 3539-3766.
- Bosker T, Bouwman L, Brun N, Bahreens P, Vijver M G, 2019. Microplastics accumulate on pores in seed capsule and delay germination and root growth of the terrestrial vascular plant *Lepidium sativum*. *Chemosphere* 226: 774-781.
- de Souza Machado A A, Lau C W, Kloas W, Bergmann J, Bachelier J B, Faltin E, Becker R, Görlich A S, Rilling M C, 2019. Microplastics Can Change Soil Properties and Affect Plant Performance. *Environmental science and technology* 53: 6044-6052.
- Giorgetti L, Spanò C, Muccifora S, Bottega S, Barbieri F, Bellani L, Castiglione M R, 2020. Exploring the interaction between polystyrene nanoplastics and *Allium cepa* during germination: Internalization in root cells, induction of toxicity and oxidative stress. *Plant physiology and biochemistry* 149: 170-177.
- Han L, Chen L, Feng Y, Kuzyakov Y, Chen Q, Zhang S, Chao L, Cai Y, Ma C, Sun K, Rilling M C, 2024. Microplastics alter soil structure and microbial community composition. *Environmental international* 185: 108508.
- Jędruchniewicz K., Bogusz A., Chańko M., Bank M. S., Alessi D. S., Ok Y. S., Oleszczuk P. 2023. Extractability and phytotoxicity of heavy metals and essential elements from plastics in soil solutions and root exudates, 905: 166100.
- Sun X, Yuan X, Jia Y, Feng L, Zhu F, Dong S, Liu J, Kong X, Tian H, Duan J, Ding Z, Wang S, Xing B, 2020. Differentially charged nanoplastics demonstrate distinct accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat nanotechnol* 15: 755-760.
- Tripathi D K, Shweta, Singh S, Singh S, Pandey R, Singh V P, Sharma N C, Prasad S M, Dubey N K, Chauhan D K, 2017. An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry* 110: 2-12.



- 
10. Yu Z, Xu X, Guo L, Jin R, Lu Y, 2024. Uptake and transport of micro/nanoplastics in terrestrial plants: Detection, mechanisms, and influencing factors. *Science of the Total Environment* 907: 168155.
11. Zhou C, Lu C, Mai L, Bao L, Liu L, Zeng E, 2021. Response of rice (*Oryza sativa* L.) roots to nanoplastic treatment at seedling stage. *Journal of hazardous materials* 401: 123412.

# Vpliv slovenske biorazgradljive mikroplastike na rast in razvoj koruze

Špela Bukovec, Lučka Mauko, Teodora Stojkowska, Sara Šuklje

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Današnja svetovna proizvodnja in množična uporaba plastike vpliva na kvaliteto življenja številnih organizmov, kar je povezano tudi z dolgim razpadnim časom plastike v naravnem okolju. Iskanje boljših alternativ standardni plastiki je vodilo v razvoj biorazgradljive plastike, vendar tudi ta vrsta plastike najverjetneje ni povsem primerna za trajnostno uporabo.
- Namen tega poskusa je bil raziskati vpliv biorazgradljivih mikroplastičnih delcev slovenskega proizvajalca na rast in razvoj koruze.
- Izvedli smo lončni poskus v kontroliranem okolju, kjer smo spremljali višine poganjkov, dolžine korenin, fotokemično učinkovitost fotosistema II, stopnjo transpiracije ter svežo in suho biomaso rastlin v prisotnosti različnih koncentracij biorazgradljive mikroplastike slovenskega proizvajalca v substratu.
- Rezultati dokazujejo vpliv biorazgradljivih mikroplastičnih delcev na rast poganjkov, vpliv na rast korenin pa je nejasen. Rezultati našega poskusa ne kažejo na vpliv biorazgradljive mikroplastike na fotokemično učinkovitost in transpiracijo rastlin koruze.

**Ključne besede:** onesnaževanje, plastika, rastline, odziv, stres, okolje

## Uvod

Mikroplastika (MP) so drobni delci plastike, običajno manjši od 5 mm (Zhu s sod. 2024). Prvič so jih opazili v oceanih v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja, od takrat pa je bila njihova prisotnost zaznana v različnih ekosistemih, vključno z oceani, tlemi, zrakom in celo pitno vodo (Zheng s sod. 2024). Široka razširjenost MP poudarja nujnost razumevanja posledic mikroplastičnega onesnaženja za okolje in zdravje ljudi (Winiarskas s sod. 2024).

Povpraševanje po okolju prijaznejših alternativah tradicionalne plastike je spodbudilo razvoj biorazgradljive plastike (Shmid s sod. 2021). Te vrste plastike so izdelane iz polimerov, ki so kombinirani z drugimi naravno razgradljivimi materiali, kot sta celuloza ali škrob (Flury s sod. 2021). Bistvo biorazgradljive plastike je, da se v naravnem okolju razgradi s pomočjo mikroorganizmov, pri čemer nastanejo okolju prijaznejše snovi (Shen s sod. 2020). Čeprav je biorazgradljiva plastika pogosto predstavljena kot okolju prijaznejša alternativa, se v strokovnih krogih vse bolj razpravlja o njenih morebitnih pomanjkljivostih in vprašanju, ali je resnično primernejša od konvencionalnih oblik plastik, če bi se uporabljala v enakem obsegu (Moshood s sod. 2022). Biorazgradljiva plastika namreč potrebuje za pravilno razgradnjo ustrezne pogoje, v nasprotnem primeru lahko predstavlja tveganje za dodatno onesnaževanje okolja (Sidiqi 2024). Prav tako prinaša nove težave, kot sta prekomerna proizvodnja metana (Jayakummar s sod. 2023) in tekmovanje za zemljišča, saj proizvodnja bioplastike iz rastlin zahteva spremembo namembnosti zemljišč za proizvodnjo plastike, namesto za izpolnjevanje potreb po hrani. (Atiwesh s sod. 2021).

Posebno pomemben je vpliv MP na rastline, ki imajo v ekosistemih vlogo primarnih producentov. Izpostavljenost MP neposredno ovira rast korenin zaradi lepljenja na koreninske laske, v listih pa povzroča oksidativni stres, kar posledično zmanjša rast listov in fotosintezo (Li s sod. 2023). Po nakopičenju delcev MP v koreninah lahko ti vstopijo v prevodno tkivo in po apoplastni poti preidejo v liste (Li s sod. 2019), kjer se začnejo kopičiti (Xu s sod. 2022).

Koruza (*Zea Mays* L.) je široko kultivirana poljščina z velikim gospodarskim in kmetijskim pomenom (Ranum s sod. 2014). Sun s sod. (2023) so ugotovili, da je imela biorazgradljiva MP bistveno večje fitotoksične učinke na koruzo v primerjavi z navadno plastiko pri primerljivih koncentracijah. Prav tako je imela biorazgradljiva MP bolj negativen vpliv na rast koruze v primerjavi s konvencionalno plastiko.

Pri našem poskusu nas je zanimalo, ali biorazgradljivi plastični mikrodenci slovenskega proizvajalca vplivajo na rast in razvoj koruze. Zastavili smo si naslednje hipoteze:

- Koruza izpostavljena MP bo rasla počasneje v primerjavi s kontrolno skupino.
- Koruza izpostavljena MP bo imela nižjo stopnjo transpiracije in manjšo fotokemično učinkovitost.
- Učinek MP bo odvisen od koncentracije; pri višji koncentraciji MP v tleh bo rast rastlin bolj zavrta.

## Materiali in metode

### Postavitev poskusa

Za namen testiranja vpliva biorazgradljivih plastičnih vrečk

slovenskega proizvajalca, smo te najprej zmelili, da smo pridobili delce mikroplastike. Dvajset mladih (dvoletenskih) sadik koruz smo razdelili v štiri poskusne skupine s po petimi rastlinami. Posadili smo jih v substrat, ki je bil pripravljen iz zemlje LUFA 2.2 (LUFA Speyer), kateremu smo dodali različne količine slovenske biorazgradljive MP. Kontrolna skupina ni vsebovala delcev MP, v ostalih tleh pa je delež MP v substratu predstavljal 0,05 %, 0,5 % oz. 1 % m/m. Skupna masa MP ter zemlje je v posameznem lončku znašala približno 320 gramov. Substrat smo prepojili z vodo, tako da je ta imel 60 % kapaciteto zadrževanja vode. Ko so bile rastline posajene v lončkih, smo te še dodatno zalili z 20 mL destilirane vode, tako da je bila končna zadrževalna kapaciteta vode v substratu 75 %.

### Gojenje rastlin v rastni komori

Gojenje rastlin v rastni komori je potekalo 5 tednov s 16/8 urno dnevno/nočno ritmiko pri temperaturi 22/18 °C, relativna vlažnost zraka je znašala 60 %. Rastline smo zalivali dvakrat tedensko. Prva dva tedna z 20 mL dH<sub>2</sub>O, nato en teden s 40 mL ter nato zadnja dva tedna poskusa s 60 mL dH<sub>2</sub>O na lonček. Merjenje fotokemične učinkovitosti in transpiracije Po štirih tednih gojenja rastlin v rastni komori smo izmerili potencialno in dejansko fotokemično učinkovitost fotosistema II ter stopnjo transpiracije. Za merjenje fotokemične učinkovitosti smo uporabili fluorometer (PAM-2100), za merjenje transpiracije pa smo uporabili porometer (SC-1 Porometer listov). Vse meritve pri posamezni rastlini smo izvedli na istem, najbolj vitalnem in polno razvitem listu.

### Spremljanje rasti in tehtanje biomase

Tekom poskusa smo spremljali rast poganjkov. Dolžine korenin smo izmerili pred posaditvijo in po končanem poskusu po preteklih petih tednih, dolžine poganjkov pa smo merili tedensko tekom celotnega časa trajanja poskusa. Po zaključku poskusa smo stehali še svežo in suho biomaso korenin in poganjkov.

### Statistična analiza podatkov

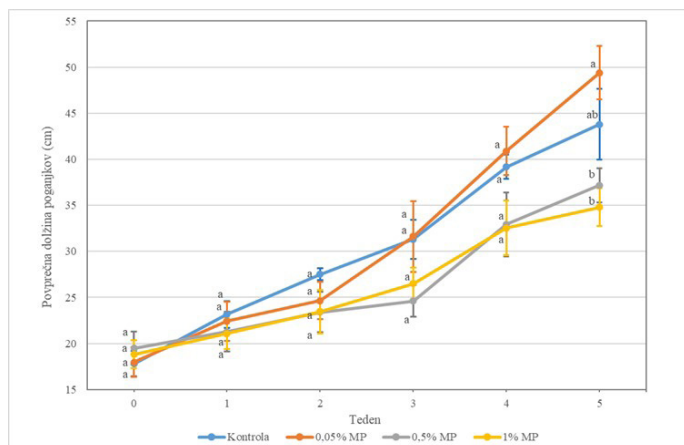
Statistično analizo smo izvedli v programu Microsoft Excel z uporabo orodja XL-toolbox, in sicer smo izvedli enosmerno analizo variance (ANOVA) ter Holm-Sidak post-hoc test. Kot statistično značilno različne smo smatrali rezultate, kjer je bila p-vrednost < 0,05.

## Rezultati

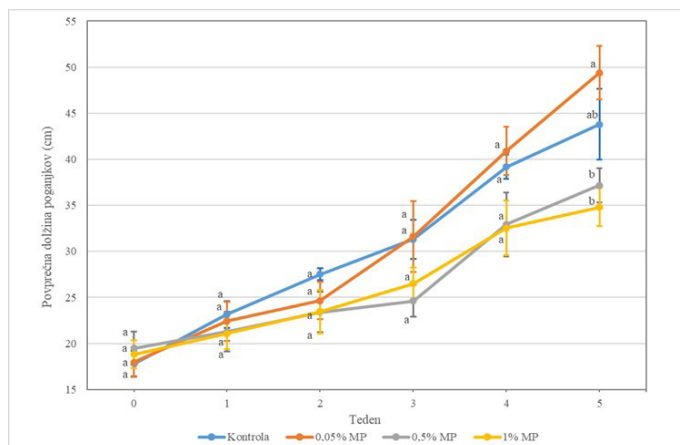
### Rast poganjkov in korenin

S tedenskim spremljanjem poskusnih rastlin smo opazili, da so se povprečne višine poganjkov v vseh poskusnih skupinah povečevale. Kljub temu se je ena od petih rastlin v substratu z 0,05 % MP posušila.

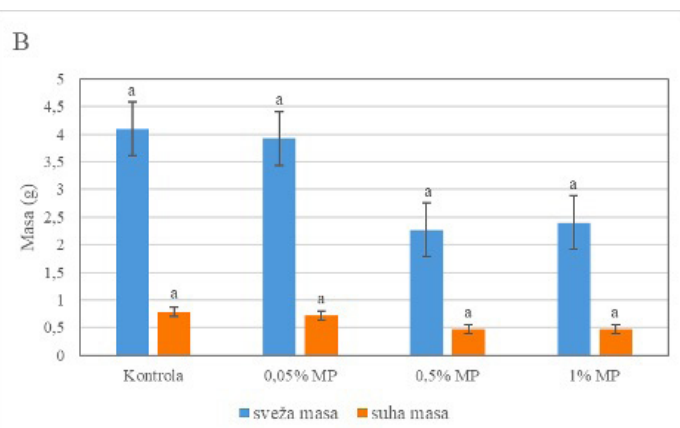
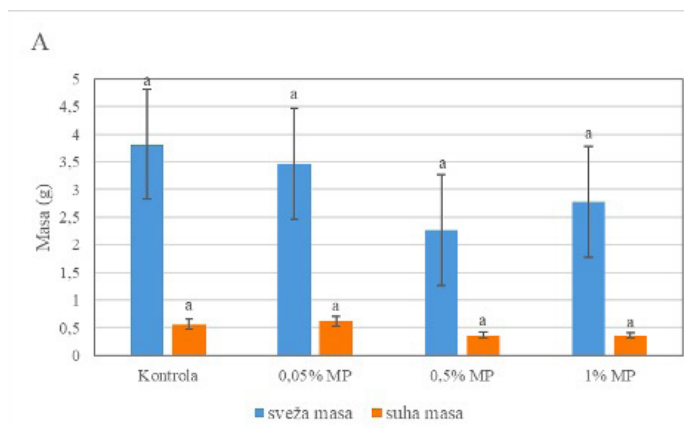
Na začetku poskusa je bila hitrost rasti poganjkov razmeroma enakomerna v vseh skupinah, vendar so se v kasnejših tednih med skupinami začele pojavljati razlike v povprečnih dolžinah poganjkov (Slika 1). V zadnjem tednu poskusa smo opazili statistično značilne razlike med skupinami z višjimi koncentracijami MP (0,5 % in 1 %) in skupino z nižjo koncentracijo MP (0,05 %). Povprečne višine poganjkov so bile največje v skupini z 0,05 % MP (49,4 ± 5,8 cm), medtem ko so



Slika 1. Grafični prikaz rasti koruze ob izpostavljenosti različnim koncentracijam MP v tleh v obdobju petih tednov. Graf prikazuje povprečne vrednosti dolžine poganjkov za posamezni teden in standardne napake ( $n = 5$ ). Kontrolna skupina; 0,05 % MP – skupina z dodane 0,05 % mikroplastike v substratu; 0,5 % MP – skupina z dodane 0,5 % mikroplastike v substratu; 01 % MP – skupina z dodanim 1 % mikroplastike v substratu. Različne črke na grafu prikazujejo statistično značilne razlike v rasti koruze v tleh z različnimi koncentracijami MP za vsak teden opazovanja (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



Slika 2. Grafični prikaz dolžine korenin na začetku poskusa (ob sajenju) in njihov razvoj do konca poskusa (5. teden). Graf prikazuje povprečne vrednosti dolžine korenin za posamezen teden in standardne napake ( $n = 5$ ). Kontrolna skupina; 0,05 % MP – skupina z dodane 0,05 % mikroplastike v substratu; 0,5 % MP – skupina z dodane 0,5 % mikroplastike v substratu; 01 % MP – skupina z dodanim 1 % mikroplastike v substratu. Različne črke na grafu prikazujejo statistično značilne razlike v dolžini korenin med skupinami za vsak teden opazovanja (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



Slika 3. Grafični prikaz povprečnih vrednosti svežih in suhih mas poganjkov (A) ter svežih in suhih mas korenin (B), izmerjenih po končanem poskusu. Graf prikazuje povprečne vrednosti mas in standardne napake ( $n = 5$ ). Kontrolna skupina; 0,05 % MP – skupina z dodane 0,05 % mikroplastike v substratu; 0,5 % MP – skupina z dodane 0,5 % mikroplastike v substratu; 01 % MP – skupina z dodanim 1 % mikroplastike v substratu. Različne črke na grafu označujejo statistično značilne razlike v masi med različnimi skupinami (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

bile najmanjše v skupini z 0,5 % MP ( $37,2 \pm 4,2$  cm) in skupini z 1 % MP ( $34,8 \pm 4,6$  cm).

Dolžine korenin smo izmerili na začetku in na koncu poskusa. Iz slike 2 je razvidno, da nismo zaznali razlik v povprečni dolžini korenin rastlin v substratih z različnimi koncentracijami dodane MP. V primeru kontrolne skupine in skupine z dodano 1 % MP v substratu celo opazimo, da je bila povprečna dolžina korenin po koncu poskusa nekoliko krajša kot na začetku poskusa, kar je verjetno posledica tega, da smo korenine med podiranjem poskusa preveč poškodovali.

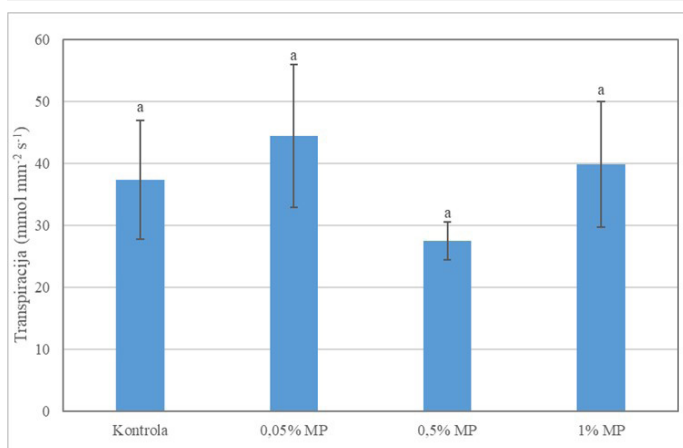
## Biomasa

Pri analizi sveže in suhe biomase poganjkov nismo ugotovili

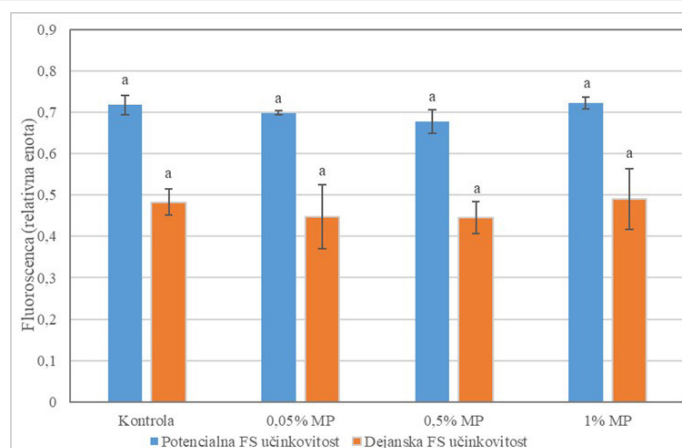
nobnih statistično značilnih razlik (Slika 3A). Sicer se nakazuje trend, da bi višja koncentracija MP v tleh lahko bila povezana z manjšo povprečno biomaso poganjkov, vendar pa razlike med skupinami niso bile statistično značilno različne, verjetno zaradi velike variabilnosti med posameznimi rastlinami. Podobne trende smo opazili tudi pri meritvah sveže in suhe mase korenin, vendar razlike med skupinami niso bile statistično značilne (Slika 3B).

## Transpiracija in fotokemična učinkovitost

Rastline v raziskavi prav tako niso izkazovale statistično značilnih razlik v stopnji transpiracije (Slika 4) ali fotokemični učinkovitosti (Slika 5). Povprečna stopnja transpiracije pri naših



Slika 4. Grafični prikaz povprečne stopnje transpiracije koruz, izpostavljenih različnim koncentracijam mikroplastike. Graf prikazuje povprečne vrednosti transpiracije za vsako opazovano skupino in standardne napake ( $n = 4$ ). Kontrolna skupina; 0,05 % MP – skupina z dodane 0,05 % mikroplastike v substratu; 0,5 % MP – skupina z dodane 0,5 % mikroplastike v substratu; 01 % MP – skupina z dodanim 1 % mikroplastike v substratu. Različne črke na grafu označujejo statistično značilne razlike v stopnji transpiracije med različnimi skupinami (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



Slika 5. Grafični prikaz potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti rastlin, izmerjene na četrty teden izpostavljenosti različnim koncentracijam mikroplastike v substratu. Graf prikazuje povprečne vrednosti fotokemične učinkovitosti in standardne napake ( $n = 4$ ). Kontrolna skupina; 0,05 % MP – skupina z dodane 0,05 % mikroplastike v substratu; 0,5 % MP – skupina z dodane 0,5 % mikroplastike v substratu; 01 % MP – skupina z dodanim 1 % mikroplastike v substratu. Različne črke na grafu označujejo statistično značilne razlike v fotokemični učinkovitosti med različnimi skupinami (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

rastlinah je znašala  $37,29 \text{ mmol mm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . V vseh poskusnih skupinah je bila potencialna fotokemična učinkovitost pričakovano višja od dejanske. Povprečna potencialna fotokemična učinkovitost je bila okoli 0,70, medtem ko je bila povprečna dejanska fotokemična učinkovitost 0,46 (Slika 5).

## Diskusija

Ugotovili smo, da je biorazgradljiva MP vplivala na slabšo rast poganjkov koruze, in sicer je bil njen vpliv odvisen od koncentracije. Pri najvišji koncentraciji MP (1 %) v substratu je bila rast poganjkov najpočasnejša, pri koncentraciji MP 0,05 % pa je bila zabeležena rast poganjkov največja, vendar se ni statistično značilno razlikovala od kontrolne skupine. Vendar pa razlike v povprečnih višinah poganjkov niso izkazale tudi kot razlike v povprečni biomasi poganjkov. Liu s sodelavci (2023) so ugotovili, da so koncentracije biorazgradljive MP v vrednostih od 10 do 1 % vplivale na zmanjšanje biomase poganjkov koruze, pri čemer je bilo zmanjšanje biomase odvisno od koncentracije, 0,1 % koncentracija MP pa ni imela vpliva na biomaso poganjkov koruze. Testirane koncentracije MP so bile v tej raziskavi večje kot naše uporabljene koncentracije, pri katerih se sicer nakazuje trend negativne korelacije koncentracije MP v tleh s povprečno biomaso poganjkov, vendar pa razlike med skupinami niso bile statistično značilne. Negativen vpliv biorazgradljive MP na rast poganjkov pri koruzi so opazili tudi pri drugih študijah (Brown s sod. 2023, Zhang s sod. 2024), prav tako pa je bil vpliv opažen pri drugih rastlinskih vrstah, npr. pri rižu (Yang in Gao 2022, Song s sod. 2023) in pšenici (Qi s sod. 2018).

Nasprotno nismo opazili jasnega vpliva biorazgradljive MP na rast korenin. V primeru kontrolne skupine in skupine gojene pri 0,5 % MP v substratu smo opazili celo nekoliko manjšo povprečno dolžino korenin ob koncu poskusa. Predvidevamo,

da to ni rezultat vpliva biorazgradljive MP v substratu, temveč je to posledica morebitnega nepravilnega ravnanja z materialom, napačnega izvajanja meritev dolžin korenin ali napak pri beleženju in vpisovanju podatkov. Rezultati študij si nekoliko nasprotujejo, saj Liu s sodelavci (2023) poročajo o negativnem vplivu biorazgradljive MP na rast korenin, medtem ko so Yu s sodelavci (2023) ugotovili, da biorazgradljiva MP ni imela učinka na rast korenin koruze med vegetativno stopnjo rasti. Rezultati naše raziskave se skladajo s slednjo, saj nismo opazili statistično značilnih razlik med skupinami niti v dolžini, niti v biomasi korenin.

Pri merjenju fotokemične učinkovitosti in transpiracije med skupinami nismo opazili statistično pomembnih razlik, kar nakazuje, da delci biorazgradljive MP niso bistveno vplivali na samo fiziološko stanje rastlin. Vendar pa rezultati številnih študij nakazujejo na negativen vpliv biorazgradljive MP na fotosintezo. Yang in Gao (2022) sta ugotovila vpliv biorazgradljive MP na zmanjšano neto fotosintetsko učinkovitost ter vsebnost klorofila (vrednost SPAD) v listih riža, o zmanjšanju vsebnosti klorofila v listih koruze zaradi vpliva biorazgradljive MP pa poročajo tudi Liu s sodelavci (2023) ter Sun s sodelavci (2023).

## Zaključek

Številne študije so že dokazale vpliv biorazgradljive MP na rast in razvoj rastlin. Z našim poskusom smo delno potrdili rezultate študij, kjer so ugotovili negativen vpliv biorazgradljive MP na rast poganjkov oz. višino rastlin, vpliva na rast korenin pa z našimi rezultati ne moremo komentirati. Zastavljeno hipotezo, da bo koruza izpostavljena MP rasla počasneje kot tista v kontrolni skupini, lahko le delno potrdimo. Pri minimalni oz. najmanjši izpostavljenosti biorazgradljivi MP rast poganjkov ni bila počasnejša v primerjavi s kontrolo, prav tako se rastline



izpostavljene najvišji koncentraciji MP niso razlikovale od kontrole. Potrdimo pa lahko hipotezo, da je učinek MP odvisen od koncentracije, saj je bila rast rastlin, ki so bile izpostavljene najvišji koncentraciji biorazgradljive MP na koncu poskusa najmanjša, tiste, ki so pa bile izpostavljene najmanjši koncentraciji, pa so imele opaženo najvišjo rast. Hipotezo, da bo izpostavljenost rastlin biorazgradljivi MP zmanjšala fotokemično učinkovitost in transpiracijo, moramo zavrniti, saj nismo opazili statistično pomembnih razlik med skupinami. Rezultati našega poskusa torej le delno podpirajo rezultate drugih študij. Menimo, da bi bilo potrebno ponoviti poskus z večjim številom rastlin ter daljšim časom izpostavitve MP v tleh, višjimi koncentracijami MP, smiselno pa bi bilo tudi izboljšati postopek meritve dolžine korenin, po možnosti izvesti poskus v zunanjih pogojih ter poskus izvesti z rastlinami v še nižjih razvojnih stadijih, torej že od kalitve semena naprej.

## Literatura

- Atiweh G, Mikhael A, Parrish CC, Banoub J, Le T-AT, 2021. Environmental impact of bioplastic use: A review. *Heliyon* 7(9):e07918.
- Carpenter EJ, Smith KL Jr, 1972. Plastics on the Sargasso Sea Surface. *Science* 175(4027):1240-1241.
- Flury M, Narayan R, 2021. Biodegradable plastic as an integral part of the solution to plastic waste pollution of the environment. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 30:100490.
- Lian J, Liu W, Meng L, Wu J, Chao L, Zeb A, Sun Y, 2021. Foliar-applied polystyrene nanoplastics (PSNPs) reduce the growth and nutritional quality of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Environmental Pollution* 280:116978.
- Li J, Liu L, Zhang Y, Fu W, Liu X, Wang Q, Tanveer M, Huang L, 2023. Microplastic stress in plants: effects on plant growth and their remediations. *Frontiers in Plant Science* 14:1226484.
- Liu R, Liang J, Yang Y, Jiang H, Tian X, 2023. Effect of polylactic acid microplastics on soil properties, soil microbials and plant growth. *Chemosphere* 329:138504.
- Moshood TD, Nawanir G, Mahmud F, Mohamad F, Ahmad MH, AbdulGhani A, 2022. Sustainability of biodegradable plastics: New problem or solution to solve the global plastic pollution? *Current Research in Green and Sustainable Chemistry* 5:100273.
- Qi Y, Yang X, Pelaez AM, Lwanga EH, Beriot N, Gertsen H, Garbeva P, Geissen V, 2018. Macro- and micro- plastics in soil-plant system: Effects of plastic mulch film residues on wheat (*Triticum aestivum*) growth. *Science of The Total Environment* 645:1048-1056.
- Ranum P, Peña-Rosas JP, Garcia-Casal MN, 2014. Global maize production, utilization, and consumption. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1312:105-112.
- Schmid C, Cozzarini L, Zambello E, 2021. Microplastic's story. *Marine Pollution Bulletin* 162: 111820.
- Shen M, Song B, Zeng G, Zhang Y, Huang W, Wen X, Tang W, 2020. Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution? *Environmental Pollution* 263(Part A):114469.
- Siddiqui SA, Yang X, Deshmukh RK, Gaikwad KK, Bahmid NA, Castro-Muñoz R, 2024. Recent advances in reinforced bioplastics for food packaging – A critical review. *International Journal of Biological Macromolecules* 263(Part 2):130399.
- Song B, Shang S, Cai FM, Liu Z, Fang J, Li N, Adams JM, Razavi BS, 2023. Microbial resistance in rhizosphere hotspots under biodegradable and conventional microplastic amendment: Community and functional sensitivity. *Soil Biology and Biochemistry* 180:108989.
- Sun H, Shi Y, Zhao P, Long G, Li C, Wang J, Qiu D, Lu C., Ding Y, Liu L., He S, 2023. Effects of polyethylene and biodegradable microplastics on photosynthesis, antioxidant defense systems, and arsenic accumulation in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown in arsenic-contaminated soils. *Science of The Total Environment* 868:161557.
- Xu Z, Zhang Y, Lin L, Wang L, Sun W, Liu C, Yu G, Yu J, Lv Y, Chen J, Chen X, Fu L, Wang Y, 2022. Toxic effects of microplastics in plants depend more by their surface functional groups than just accumulation contents. *Science of the Total Environment* 833:155097.
- Yang C in Gao X, 2022. Impact of microplastics from polyethylene and biodegradable mulch films on rice (*Oryza sativa* L.). *Science of the Total Environment* 828:154579.
- Yu Y, Chen Y, Wang Y, Xue S, Liu M, Tang DWS, Yang X, Geissen V, 2023. Response of soybean and maize roots and soil enzyme activities to biodegradable microplastics contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 262:115129.
- Zhang L, Zhao W, Yan R, Yu X, Barceló D, Sui Q, 2024. Microplastics in different municipal solid waste treatment and disposal systems: Do they pose environmental risks? *Water Research* 255:121443.
- Zhang Y, Song M, Zhu Y, Li H, Zhang Y, Wang G, Chen X, Zhang W, Wang H, Wang Y, Shao R, Guo J, Yang Q, 2024. Impact of microplastic particle size on physiological and biochemical properties and rhizosphere metabolism of *Zea mays* L.: Comparison in different soil types. *Science of the Total Environment* 908:168219.

# Vpliv mikroplastike biorazgradljivih vrečk slovenskega proizvajalca na rast in razvoj sončnice

Drinovec Nika, Hauptman Pepelnjak Maj, Hrovat Jan in Mirtič Dolenc Domen

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Mikroplastika je vse večji svetovni problem, saj vpliva na vse žive organizme na našem planetu, med drugim tudi na pomembne kmetijske rastline, kot je sončnica (*Helianthus annuus*). Zanimal nas je vpliv različnih koncentracij mikroplastike na rast in razvoj te rastline.
- Poskus smo nastavili tako, da smo imeli kontrolno skupino rastlin in rastline s tremi različnimi koncentracijami mikroplastike biorazgradljivih vrečk slovenskega proizvajalca. Prst smo predhodno navlažili in to vzdrževali z zalivanjem. Tedensko smo spremljali rast in razvoj poganjkov in opazovali kako se sončnice razlikujejo med seboj glede na dodano koncentracijo mikroplastike. Preverjali smo tudi fotokemično učinkovitost in transpiracijo rastlin.
- Po obdelavi rezultatov, smo ugotovili, da med kontrolo in različnimi koncentracijami mikroplastike v zemlji ni bilo statistično značilnih razlik v nobenem od merjenih parametrov.
- Mikroplastika v koncentraciji do 1 % v tleh torej nima vpliva na rast in razvoj sončnic.

**Ključne besede:** poganjki, korenine, stres, transpiracija, fotokemična učinkovitost

## Uvod

Sončnica (*Helianthus annuus*) je pomembna poljščina, ki se goji po vsem svetu zaradi svojih oljnatih semen, ki so bogat vir olja in hranil (Adeleke in Babalola, 2020). Kljub temu, da je sončnica izredno prilagodljiva in robustna rastlina, je izpostavljena številnim okoljskim izzivom, med katerimi je v zadnjem času tudi onesnaženje s plastiko. Plastika se v naravi ne razgradi, temveč le razpade na manjše delce imenovane mikroplastika (Zhang s sod., 2021).

Mikroplastika (MP) predstavlja vse večji svetovni problem, saj močno vpliva na okolje, ekosisteme in zdravje ljudi. Definira se kot drobni delci plastike, ki so manjši od 5 mm in nastanejo pri razpadanju plastike ali pa so namerno ustvarjeni v izdelkih, kot so MP v kozmetiki ali mikrovlakna v oblačilih (Horton in sod., 2017). Težava MP je, da nase veže organska onesnažila in sprošča razne aditive, ki škodujejo okolju in organizmom. Ljudje največ MP zaužijemo preko živali, saj lahko MP prehaja iz krme v meso preko prebavil. Poleg organskih onesnažil, se lahko na MP vežejo razne bakterije, ki tvorijo biofilme, kateri povzročajo okužbe pri živalih in ljudeh (Udovicki s sod., 2022). V naši študiji smo želeli preveriti vpliv MP na rast in razvoj sončnice. Vir MP so bile v našem primeru biorazgradljive vrečke slovenskega proizvajalca. MP naj bi v tleh spreminjala pogoje za rast in razvoj rastline, saj vpliva na poroznost in strukturo tal, privzem vode in encimsko aktivnost, kar lahko podre ravnovesje hranil in mikroorganizmov v prsti (Sajjad s sod., 2022).

Pred poskusom smo postavili naslednje hipoteze:

- Domnevali smo, da bodo sončnice v zemlji z višjo koncentracijo MP rastle slabše kot sončnice v zemlji z nižjo koncentracijo MP.
- Pričakovali smo, da bodo sončnice v zemlji z višjo koncentracijo MP imele slabšo fotokemično učinkovitost kot sončnice v zemlji z nižjo koncentracijo MP.
- Domnevali smo, da bodo sončnice v zemlji z nižjo koncentracijo MP imele višjo stopnjo transpiracije kot sončnice v zemlji z višjo koncentracijo MP.

## Materiali in metode

Poskus smo izvajali 5 tednov na 20 sončnicah, 5 sončnic, ki so predstavljale kontrolo (K), je rastle v zemlji brez MP, 5 sončnic je bilo posajenih v zemlji s koncentracijo MP 0,05 % (MP 0,05 %), 5 sončnic v zemlji s koncentracijo MP 0,5 % (MP 0,5 %) in 5 sončnic v zemlji s koncentracijo MP 1 % (MP 1 %). V vsakem lončku je bilo 320 g navlažene zemlje s 75 % kapaciteto zadrževanja vode (ang. water holding capacity, WTC) z dodano ustrežno količino MP (m/m). Uporabili smo zemljo proizvajalca Lufa Speyer, MP pa smo pridobili z mletjem slovenskih biorazgradljivih vrečk. Sončnice smo imeli postavljene v rastni komori s fotoperiodo 16 ur na svetlobi pri 22 °C in 8 ur v temi pri temperaturi 18 °C. Sončnice smo zalivali dvakrat na teden, prvi teden smo zalivali z 20 mL vode, drugi teden s 40 mL, tretji in četrti teden pa s 60 mL vode. Pri vsakem zalivanju (2x tedensko) smo zemljo razrahljali z vilico, da le-ta ni bila zbita in je voda zajela cel substrat. Pladenj, na katerem so bili lončki s posajenimi sončnicami, smo pri vsakem zalivanju tudi obrnili, da smo izničili možnost razlik zaradi pozicije rastline pod lučjo.

## Merjenje višine poganjkov in dolžine korenin ter biomase poganjkov in korenin

Dolžino korenin smo z ravnilom izmerili dvakrat, na začetku pred saditvijo v lonček in na koncu po odstranitvi zemlje. Poganjke smo izmerili šestkrat, in sicer na začetku pred saditvijo, pri vsakem drugem zalivanju (1x na teden) in na koncu pri podiranju poskusa. Merili smo od točke, kjer je poganjek rasel iz zemlje do najvišje ležečega lista v naravni poziciji. Na koncu smo poganjke tudi stehali in jim določili maso. Ta masa je predstavljala svežo biomaso, torej je rastlinski material še vseboval vodo oziroma vlago. Poganjke in korenine smo nato še posušili s postopkom liofilizacije (5 dni) in jim določili še suho maso, torej masa brez vsebnosti vode.

## Fotokemična učinkovitost

Fotokemično učinkovitost smo izmerili četrti teden poskusa s fluorometrom PAM2500, in sicer smo merili fluorescenco klorofila a na zatemnjenih in osvetljenih listih. Fluorescenca na zatemnjenih listih izraža potencialno fotokemično učinkovitost, fluorescenca osvetljenih listov pa dejansko fotokemično učinkovitost. Potencialna fotokemična učinkovitost zdrave rastline znaša 0,8. Če je vrednost nižja, to nakazuje, da je rastlina pod stresom.

## Transpiracija

Transpiracijo smo izmerili četrti teden s porometrom SC-1, ki poda vrednost stomatalne prevodnosti v enotah mmol/m<sup>2</sup>s. Večja kot je vrednost, večja je stopnja transpiracije, kar odraža boljšo vitalnost rastline.

## Statistična analiza

Podatke meritev smo redno zapisovali v skupno Excel datoteko. Po končanem poskusu smo podatke smiselno uredili in naredili statistično analizo. Analizo smo izvedli z enosmerno analizo variance (ANOVA) in Holm-Šidák post-hoc testom. Kot statistično značilne razlike smo smatrali tiste, kjer je bila p-vrednost < 0,05.

## Rezultati

### Masa in dolžina korenin sončnic

Pri vsaki testirani skupini sončnic smo imeli 5 ponovitev. Med različnimi skupinami pri dolžini korenin, kakor tudi sveži in suhi biomasi, nismo opazili statistično značilnih razlik (Tabela 1). Nekatere končne dolžine so krajše od začetnih, kar je verjetno posledica lomljenja in trganja korenin med podiranjem poskusa.

### Masa in dolžina poganjkov sončnic

Analizirali smo poganjke istih rastlin, kot so bile uporabljene za analizo korenin. Med različnimi skupinami pri masi svežih in suhih poganjkov (Tabela 2) ter prav tako tudi pri višini poganjkov (Slika 1) nismo opazili statistično značilnih razlik. Na Slika 1 lahko vidimo rast poganjkov sončnic tekom trajanja poskusa, na Slika 2 pa reprezentativne primerke rastlin iz različnih skupin v rastni komori v četrtem tednu poskusa.

### Merjenje transpiracije in fotokemične učinkovitosti

Potencialna fotokemična učinkovitost vseh rastlin je bila pod vrednostjo 0,8, kar pomeni, da so bile vse rastline pod stresom.

Tabela 1. Dolžina in biomasa korenin testiranih skupin sončnic. N: število vzorcev, SV: srednja vrednost, SN: standardna napaka. K – kontrolna skupina, MP 0,05 % – korenine sončnic v zemlji z 0,05 % MP, MP 0,5 % – korenine sončnic v zemlji z 0,5 % MP, MP 1 % – korenine sončnic v zemlji z 1 % MP. Črke označujejo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Holm-Šidák post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

	N	Začetna dolžina korenine (cm)		Končna dolžina korenine (cm)		Masa sveže korenine (g)		Masa suhe korenine (g)	
		SV	SN	SV	SN	SV	SN	SV	SN
K	5	16,8a	4,7	17,4 a	7,1	1,59 a	1,50	0,22 a	0,24
MP 0,05 %	5	21,9a	0,2	15,9 a	1,6	2,01 a	0,19	0,23 a	0,06
MP 0,5 %	5	15,8a	2,6	17,5 a	2,5	1,34 a	0,72	0,13 a	0,06
MP 1,0 %	5	18,1a	4,7	17,5 a	2,7	1,26 a	0,52	0,15 a	0,06

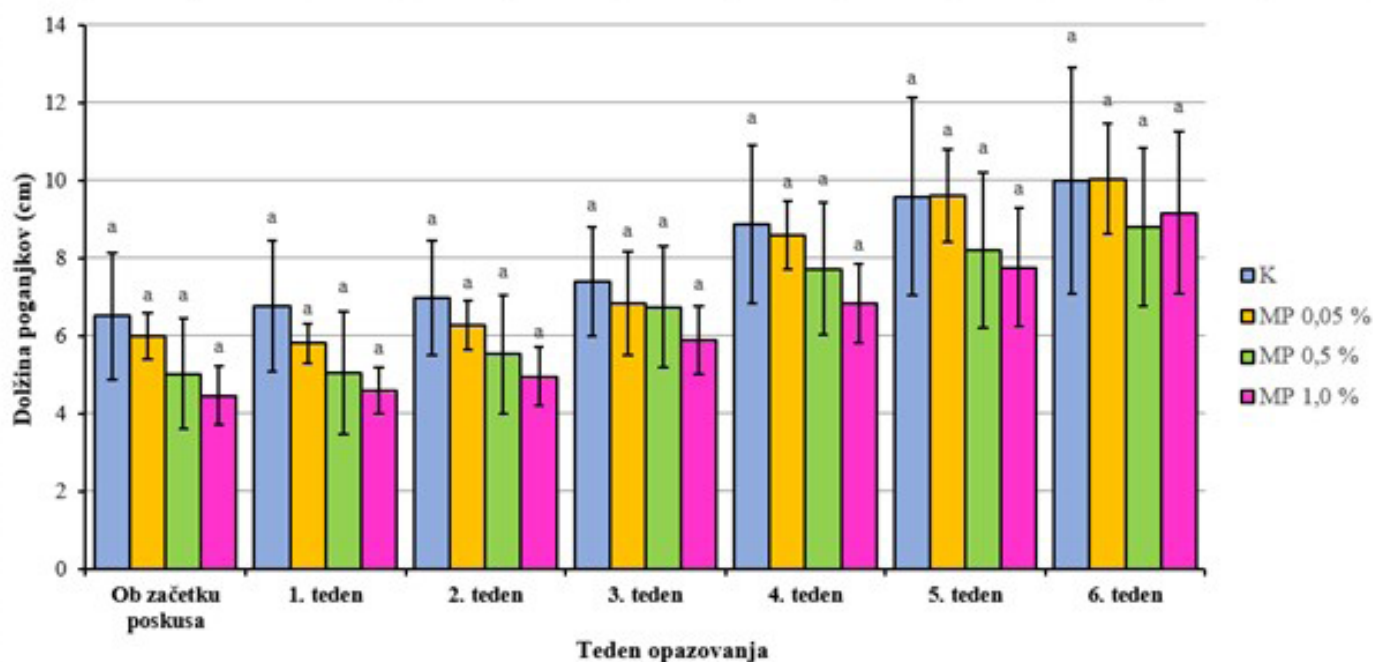
Tabela 2: Sveža biomasa ter suha biomasa poganjkov testiranih skupin sončnic. N: število vzorcev, SV: srednja vrednost, SN: standardna napaka. K – kontrolna skupina, MP 0,05 % – korenine sončnic v zemlji z 0,05 % MP, MP 0,5 % – korenine sončnic v zemlji z 0,5 % MP, MP 1 % – korenine sončnic v zemlji z 1 % MP. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Holm-Šidák post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

	N	Sveža biomasa poganjkov (g)		Suha biomasa poganjkov (g)	
		SV	SN	SV	SN
K	5	2,37 a	1,48	0,42 a	0,26
MP 0,05 %	5	1,88 a	0,41	0,42 a	0,08
MP 0,5 %	5	1,42 a	0,41	0,39 a	0,14
MP 1,0 %	5	1,55 a	0,51	0,30 a	0,09

Statistično značilnih razlik med posameznimi skupinami nismo opazili.

## Diskusija

Poznavanje vpliva MP na rast in razvoj rastlin postaja zaradi vse večjega onesnaženja čedalje pomembnejše. Naš poskus nakazuje, da različne koncentracije MP nimajo pomembnega vpliva na sončnice. Ne glede na to pa smo opazili, da visoka koncentracija MP v prsti spreminja lastnosti le-te. Prst z več MP je bila bolj rahla in se je hitreje izsuševala. Na drugi strani rastline v kontrolni skupini niso rasle najbolj optimalno, saj smo pri njih opazili, da je bila zemlja še posebej zbita, kar smo sproti reševali z rahljanjem 2x tedensko, kot opisano v poglavju materiali in metode. Vpliv MP na strukturo prsti so opazili tudi de Souza Machado in sod. (2019). Pri opazovanju korenin smo ugotovili, da so bile po koncu poskusa pri kontroli in 0,5 % izpostavljenosti MP v tleh daljše kot na začetku, pri 0,05 % in 1 % izpostavljenosti MP v tleh pa



Slika 1: Povprečna višina poganjkov sončnic posameznih testiranih skupin v posameznem tednu rasti. K – kontrolna skupina, MP 0,05 % – poganjki sončnic v zemlji z 0,05 % MP, MP 0,5 % – poganjki sončnic v zemlji z 0,5 % MP, MP 1 % – poganjki sončnic v zemlji z 1 % MP. Črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Holm-Šidák post-hoc test,  $p < 0,05$ ).





Slika 2. Rastline sončnic v zemljah z dodanimi različnimi koncentracijami MP v četrtem tednu poskusa. Od leve proti desni: kontrola, MP 0,05 %, MP 0,5 % in MP 1 %.

celo nekoliko krajše. Statističnih razlik med skupinami ni bilo. Nekatere rastline so torej rastle in razvijale koreninski sistem, pri drugih pa je bil razvoj slednjega zavrt. Koncentracija MP pri tem očitno ni imela vpliva. Razlike lahko torej pripišemo naključju ali pa kakemu drugemu dejavniku, kot na primer dejstvu, da smo med podiranjem poskusa lahko korenine poškodovali.

Podobno lahko ugotovimo tudi glede analize mase korenin. Stehtali smo svežo in suho biomaso korenin. V obeh primerih nismo opazili statistično značilnih razlik med skupinami. Pri vseh analizah korenin je bil verjetno zelo velik vpliv našega rokovanja z njimi. Rastlinske korenine so namreč krhke in med delom jih lahko močno poškodujemo, kar vpliva na izmerjeno maso in dolžino. Na maso lahko vpliva še količina prsti in vode, ujete med koreninami. Zaradi vseh možnih napak so podatki, pridobljeni na podlagi analize korenin, dokaj nezanesljiv vir za zaključke o vplivu MP na razvoj rastlin.

Tudi pri poganjkih smo opravili enake analize kot pri koreninah, merili pa smo še višino poganjkov tekom trajanja poskusa. Ugotovitve so podobne. Statističnih razlik med skupinami ni in

Tabela 3. Rezultati merjenj transpiracije in potencialne fotokemične učinkovitosti testiranih skupin sončnic. N: število vzorcev, SV: srednja vrednost, SN: standardna napaka. K – kontrolna skupina, MP 0,05 % – poganjki sončnic v zemlji z 0,05 % MP, MP 0,5 % – poganjki sončnic v zemlji z 0,5 % MP, MP 1 % – poganjki sončnic v zemlji z 1 % MP. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Holm-Šidák post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

	Potencialna fotokemična učinkovitost			Transpiracija (mmol/m <sup>2</sup> s)		
	N	SV	SN	N	SV	SN
K	5	0,6945a	0,015	4	119,4a	47,6
MP 0,05 %	5	0,6895a	0,020	4	89,2a	15,4
MP 0,5 %	4	0,7063a	0,017	4	155,6a	38,7
MP 1,0 %	4	0,6983a	0,044	4	122,6a	50,9

zaključimo lahko, da prisotnost MP ne vpliva na rast poganjkov. Rezultati so razvidni iz grafičnega prikaza na Slika 1, iz katere je tudi razvidno, da je bil trend rasti pri vseh skupinah enak. Med poskusom so se na listih nekaterih rastlin v vseh skupinah pojavile nekroze, predvsem na konicah, ki se niso bistveno razširile.

Študije drugih avtorjev poročajo, da naj bi različne vrste plastike sicer različno prizadele razvoj poganjkov pri bučah, polietilen pa naj bi imel najmanjši vpliv (Colzi in sod., 2022), zato je možno, da so naši rezultati takšni tudi zaradi uporabe biorazgradljive plastike.

Meritve fotokemične učinkovitosti in transpiracije se skladajo z našimi ostalimi rezultati. Fotokemična učinkovitost v optimalnih razmerah znaša okoli 0,8, mi pa smo pri vseh skupinah izmerili nižjo. Vse rastline so bile torej v podobni stresni situaciji, ne glede na količino MP v substratu. Podobne zaključke lahko naredimo tudi za meritve transpiracije, kjer so bile pri vseh skupinah velike standardne napake. Pri merjenju fotokemične aktivnosti ter pri merjenju transpiracije nismo vključili vseh rastlin, kot sicer. Razlog je v tem, da so imele nekatere rastline (predvsem v skupinah izpostavljeni 0,05 % in 0,5% MP v substratu) premajhne liste in meritev ni bilo moč izvesti. Naše ugotovitve glede fotokemične učinkovitosti se ne skladajo z rezultati Colzi in sod. (2022), ki so pri bučah ugotovili, da različne vrste MP znižajo fotokemično učinkovitost.

Če bi se ponovno lotili podobnega poskusa, bi uporabili drugo zemljo, ki se ne sprijema v velike kose ali na rob lončka. Če bi dodali še kompost, rahljanje morda ne bi bilo potrebno in z njim ne bi potrgali manjših korenin, ki smo jih morebiti uničili z rahljanjem, ki je bilo neizogibno. Ugotovili smo, da je bila za rastline tudi začetna presaditev šok, zato bi lahko semena direktno sejali po enega v lonček in ob začetku poskusa izbrali najbolj uniformne osebkke (lončke) ali pa bi sejali več semen v en lonček in ob začetku izbrali najbolj primerljive. Mogoče MP pomembno vpliva tudi na samo kalitev semen, če že na rast sadik ne, kar bi bilo zanimivo raziskati.

## Zaključek

Na osnovi našega poskusa nismo opazili nobenih statistično značilnih razlik v dolžini korenin ali v njihovi suhi masi pri rastlinah, ki so rasle v zemlji z različnimi koncentracijami MP. Čeprav je bil pri parametru dolžine poganjkov viden trend upadajoče rasti v višjih koncentracijah MP, te razlike niso bile dovolj velike, da bi bile statistično značilno različne. Tudi suha masa poganjkov je odražala podoben trend pri višjih koncentracijah, a razlike ponovno niso bile statistično značilne. Ugotovili smo, da so bile skupine sončnic vseh koncentracij MP verjetno pod stresom zaradi neustreznega substrata, kar so odražale tudi meritve fotokemične učinkovitosti. Tudi rezultati transpiracije niso pokazali razlik med skupinami. Vse tri hipoteze smo zato ovrgli.

Čeprav takšnih rezultatov nismo pričakovali, lahko zaključimo, da na podlagi več parametrov MP iz slovenske bioplastike v zemlji, kljub mnogim dokazanim negativnim vplivom na okolje, v koncentracijah do 1 % statistično značilno ne vpliva na rast sončnice (*Helianthus annuus*).

## Literatura

1. Adeleke BS, Babalola OO, 2020. Oilseed crop sunflower (*Helianthus*

- annuus*) as a source of food: Nutritional and health benefits. Food science and nutrition, 8, 9: 4666-4684. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1783>
2. Colzi I, Renna L, Bianchi E, Castellani MB, Cappi A, Pignattelli S, Loppi S, Gonnelli C, 2022. Impact of microplastics on growth, photosynthesis and essential elements in *Cucurbita pepo* L. Journal of hazardous materials, 423: 127238. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127238>
  3. de Souza Machado AA, Lau CW, Kloas W, Bergmann J, Bachelier JB, Faltin E, Becker R, Görlich AS, Rillig MC, 2019. Microplastics Can Change Soil Properties and Affect Plant Performance. Environmental science technology, 53, 10: 6044-6052. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01339>
  4. Horton AA, Walton A, Spurgeon DJ, Lahive E, Svendsen C, 2017. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. Science of The Total Environment, 586: 127-141. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.190>
  5. Li J, Yu S, Yu Y, Xu M, 2022. Effects of Microplastics on Higher Plants: A Review. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 109, 241–265. <https://doi.org/10.1007/s00128-022-03566-8> Sajjad M, Huang Q, Khan S, Khan MA, Lin Y, Wang J, Lian F, Wang Q, Guo G, 2022. Microplastics in the soil environment: A critical review. Environmental technology & innovation, 27: 102408. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102408>
  6. Udovicki B, Andjelkovic M, Cirkovic-Velickovic T, Rajkovic A, 2022. Microplastics in food: scoping review on health effects, occurrence, and human exposure. International journal of Food contamination, 9, 7. <https://doi.org/10.1186/s40550-022-00093-6>
  7. Zhang K, Hamidian AH, Tubić A, Zhang Y, Fang JKH, Wu C, Lam PKS, 2021. Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review. Environmental Pollution, 274: 116554. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116554>

# Vpliv eteričnega olja čajevca na rast izbranih patogenih gliv

Manca Čižman, Filip Derganc, Eva Gregorc, Adrian Samuel Stell Pičman

Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Namen poskusa je določiti in vitro vpliv 10 % in 20 % eteričnega olja čajevca, proti glivam *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi* in *Fusarium graminearum*.
- Metode: Glive smo gojili 10 dni in nato s pomočjo programa ImageJ izmerili površino posameznih gliv. Podatke smo analizirali s programskim jezikom R, pri čemer smo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami in kontrolo določili z enosmerno analizo variance (ANOVA) in s post hoc testom po Tukey-ju.
- Rezultati kažejo, da so vse štiri testirane vrste glive občutljive za eterično olja čajevca. V splošnem lahko rečemo, da se z višanjem koncentracije eteričnega olja povečuje zaviralni učinek na rast gliv.
- Zaključimo lahko, da bi višje koncentracije omenjenega eteričnega olja lahko uporabili kot protiglivo sredstvo v boju proti vsem štirim testiranim glivam.

**Ključne besede:** inhibicija rasti, *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium graminearum*

## Uvod

Ljudje se proti kvarljivcem hrane, katerih pomemben predstavnik so tudi plesni, borimo na različne načine (Pitt in Hocking, 2009). V zadnjem času uporabljamo številne fungicide, ki pa predstavljajo tveganje za zdravje ljudi (Tsalidis, 2022). Zato se vedno bolj obračamo proti naravnim učinkovinam s protiglavnim delovanjem, kot so eterična olja. Primer je eterično olje (EO) čajevca za katerega je dokazano, da ima protimikrobne učinke – tako baktericidne kot tudi fungicidne (Cox s sod. 2000). Mehanizem delovanja EO čajevca naj bi vključeval rušenje membranske integritete in s tem sproščanje znotrajceličnine. Inhibira tudi celično dihanje, kar vodi do porušanja homeostaze in morfoloških sprememb celic. Glavne protimikrobne komponente so terpinen-4-ol,  $\gamma$ -terpinen (23 %),  $\alpha$ -terpinen in 1,8-cineol. Te molekule delujejo fungicidno tako na človeške (in živalske) patogene, kot tudi na rastlinske (Terzi s sod. 2007).

*Alternaria alternata* je ena izmed najpogosteje zastopanih vrst plesni iz rodu *Alternaria*. Čeprav gre za saprofitsko glivo, katere spore najdemo v tleh, ji pripisujemo vedno več odgovornosti za različne zdravstvene težave ljudi. Je pomemben alergen in vpliva na razvoj in poslabšanje stanja astme (Kustrzeba-Wójcicka s sod. 2014). Poleg vrste *A. alternata* je za številne bolezni odgovorna tudi *Alternaria infectoria*. Le ta med drugim povzroča invazivne rinosinusitise (Paccoud s sod. 2022). V zadnjem času se vedno bolj raziskuje tudi različne vrste plesni iz rodu *Fusarium*. Med njimi so pogosti rastlinski in človeški patogeni, s katerimi v stik pridemo preko kontaminirane hrane. *Fusarium fujikuroi* je rastlinski patogen, ki ga hkrati s pridom izkoriščamo za industrijsko proizvodnjo giberelinov. To so obsežno uporabljeni rastlinski hormoni, ki spodbujajo rast in razvoj rastlin (Cen s sod. 2020). Med pomembne fitopatogene spada tudi *Fusarium graminearum*, ki povzroča ožig klasa žit. Ta rastlinska bolezen vodi v velike izgube pridelka, predvsem pšenice, ovesa in drugih žit. Poleg tega proizvaja tudi mikotoksine, ki so škodljivi ljudem in živalim. Spore omenjene plesni lahko preživijo leta v tleh kot saprofiti (Leplat s sod. 2013).

V našem poskusu smo želeli ugotoviti vpliv različnih koncentracij EO čajevca (*Melaleuca alternifolia* [Maiden & Betche] Cheel) na rast izbranih patogenih oziroma endofitskih gliv izoliranih iz zrnja ajde. Določali smo vpliv 10 % in 20 % EO čajevca, dodanega na gojišča, proti glivam *A. alternata*, *A. infectoria*, *F. fujikuroi* in *F. graminearum*. Predpostavljamo, da bo rezultat pri vseh vrstah gliv podoben in sicer močnejše zavrtje rasti na gojiščih z višjo koncentracijo EO.

## Material in metode

### Priprava suspenzije eteričnega olja

Suspenzijo eteričnega olja čajevca smo pripravili z 10 % dimetilsulfoksidom (DMSO), pri tem pa smo dodali še detergent Tween 80 (TW80) (cca. 0,1 %), s čimer smo poskrbeli za boljše mešanje eteričnega olja v hidrofilnem DMSO. Pripravili smo mešanico EO v dveh razmerjih: 90 % DMSO in 10 % eteričnega olja ter 80 % DMSO in 20 % eteričnega olja. Za kontrolo pa smo uporabili le 10 % DMSO z dodanim detergentom TW80.

## Sevi gliv

Pri našem poskusu smo uporabili štiri različne seve gliv: *Alternaria alternata* (NA007), *Alternaria infectoria* (TA001), *Fusarium fujikuroi* SC (NA030) in *Fusarium graminearum* (NAX03). Vse štiri seve smo pridobili iz glivne banke Laboratorija za fiziologijo rastlin na Oddelku za biologijo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Glive so bile predhodno identificirane na podlagi njihove morfologije ter z uporabo molekularnih metod (Kovačec s sod. 2016, Mravlje s sod. 2021).

### Testiranje protiglavnosti učinkovitosti eteričnega olja čajevca

Predhodno smo pripravili petrijevke z 2 % krompirjevim dekstroznim agarjem (ang. »potato dextrose agar«, PDA), ki smo mu dodali antibiotik kloramfenikol (50 mg/L). Na osem pripravljenih agarnih plošč smo v aseptičnih pogojih s spatulo po Drigalskem nanесли 100  $\mu$ L 10 % suspenzije eteričnega olja, na osem agarnih plošč 100  $\mu$ L 20 % suspenzije eteričnega olja, osem plošč pa je bilo za kontrolo in nanje nismo nanašali suspenzije eteričnega olja, ampak le mešanico 10 % DMSO in detergenta TW80. Tako smo za vsak sev glive imeli pripravljenih 24 plošč. Glive smo precepili iz primarne glivne kulture in sicer tako, da smo iz roba približno enotedenskega glivnega micelij, izrezali košček v velikosti 5  $\times$  5 mm (25 mm<sup>2</sup>). Na vsako pripravljeno agrarno ploščo smo na sredino postavili odrezek primarne glivne kulture. Inkubacija gliv je trajala deset dni. V tem času smo spremljali rast gliv in fotografirali petrijevke na tretji, peti, sedmi in deseti dan opazovanja.

### Analiza podatkov

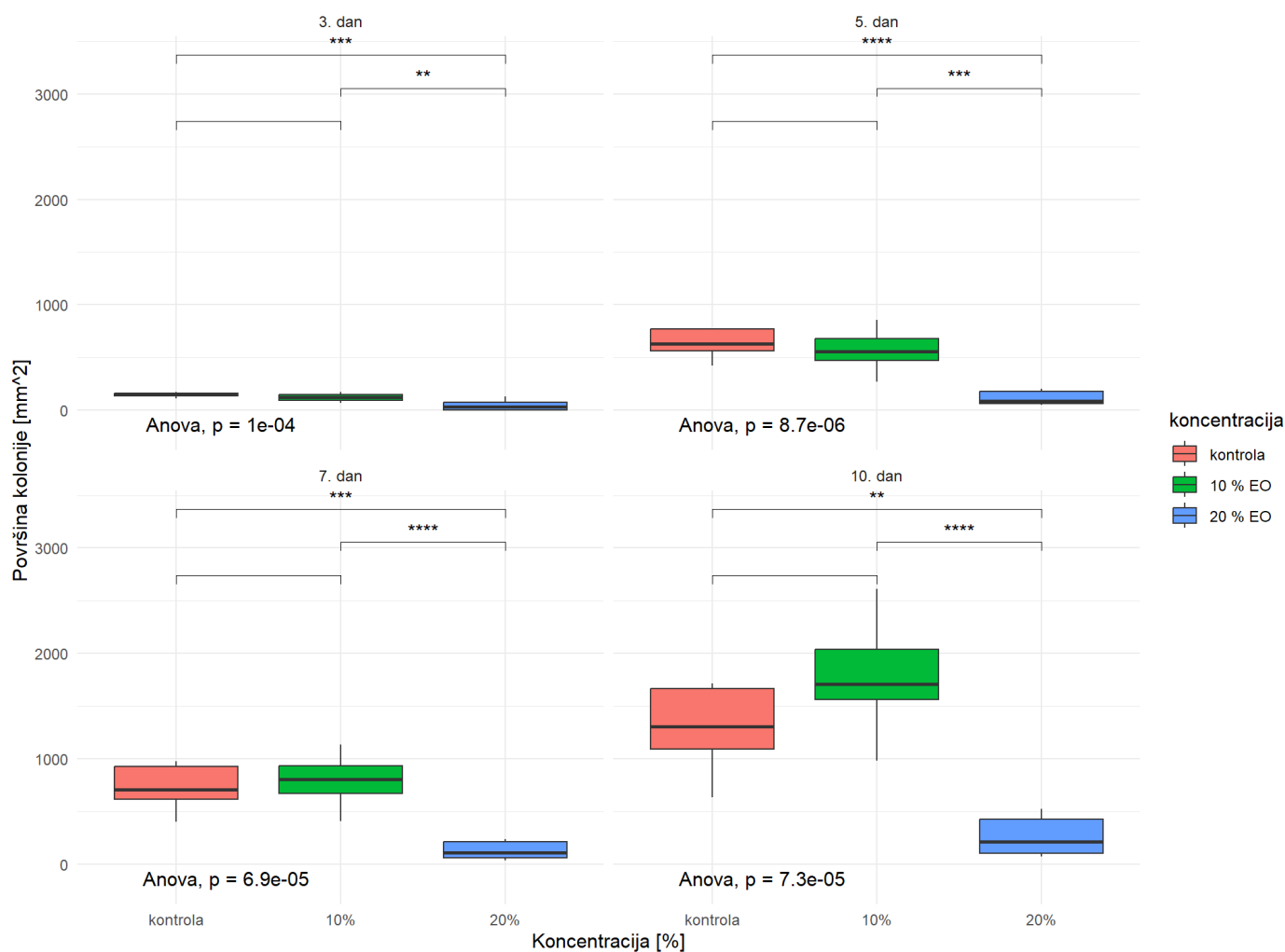
Fotografije plošč z glivami smo analizirali v programu ImageJ (Schindelin s sod. 2012), pri čemer smo pridobili podatek o premeru in površini razrasti glivnega micelija. Podatki so izraženi kot povprečna vrednost za osem ponovitev (N = 8), v nekaterih primerih pa tudi manj, če je prišlo do napak pri nacepljanju gliv ali pa so se te tekom poskusa okužile. To je tudi izrecno napisano v rezultatih.

Pridobljene podatke smo analizirali s programskim jezikom R (R Core Team 2021). Statistično značilne razlike med posameznimi testnimi skupinami in kontrolo smo določili z enosmerno analizo variance (ANOVA) in post hoc testom po Tukey-ju. Za statistično pomembno različne rezultate smo smatrali tiste, pri katerih je vrednost p manjša od 0,05. Porazdelitev podatkov po dnevih smo uprizorili z diagrami "boxplot" (škatla z brki). Diagrame smo opremili z izpisom rezultata enosmerne ANOVE, ki pove, ali je razlika v varianci med skupinami na določen dan statistično značilna, ter dodali še grafični prikaz rezultatov post hoc testov.

## Rezultati

V nadaljevanju so opisani rezultati raziskave, v kateri smo primerjali površine kolonij gliv oz. njihovo razrast ob dodatku različnih koncentracij EO čajevca.

Pri glivi *Alternaria alternata* (Slika 1) smo tekom celotnega trajanja poskusa opazili statistično značilno zmanjšanje rasti pri skupini z dodano 20 % koncentracijo EO v primerjavi s kontrolo in 10 % koncentracijo EO, med kontrolo in skupino z dodanim 10 % EO pa nismo opazili statistično značilne razlike. Ob koncu



Slika 1: Diagrami boxplot, ki prikazujejo rast gliv vrste *Alternaria alternata* po dnevih. Porazdelitev podatkov v vsaki skupini je podana za osem ponovitev (N = 8). Z zvezdicami so ovrednotene statistično pomembne razlike med posameznimi skupinami z dodanimi različnimi koncentracijami eteričnega olja čajevca oz. kontrolo; p-vrednost < 0,05 (\*), p-vrednost < 0,01 (\*\*), p-vrednost < 0,001 (\*\*\*), p-vrednost < 0,0001 (\*\*\*\*). V levem spodnjem kotu vsakega diagrama je prikazan rezultat enosmerne ANOVE.

poskusa (10. dan) je bila rast glive na gojišču z dodanim 20 % EO čajevca za 84 – 88 % manjša v primerjavi s kontrolo oziroma s skupino z dodanim 10 % EO čajevca.

Pri glivi *Alternaria infectoria* (Slika 2) smo opazili močnejše razlike v rasti gliv, še zlasti na zadnji dan meritev. Iz grafov je razvidno, da smo na vse dni opazovanja zaznali statistično značilno manjšo rast z naraščajočo koncentracijo EO čajevca, z izjemo prvega dneva meritev, kjer med skupino z 10 % koncentracijo EO in skupino z 20 % koncentracijo EO ni opazne statistično značilne razlike. V tem primeru je bila rast pri obeh skupinah še zelo majhna in je bilo posledično zelo težko zaznati razlike v rasti med površinami kolonij obeh skupin. Zadnji dan poskusa (10. dan) je 10 % koncentracija EO v povprečju povzročila 49 % zmanjšanje rasti v primerjavi s kontrolo, medtem ko je 20 % koncentracija EO povzročila kar 95 % zmanjšanje rasti v primerjavi s kontrolo.

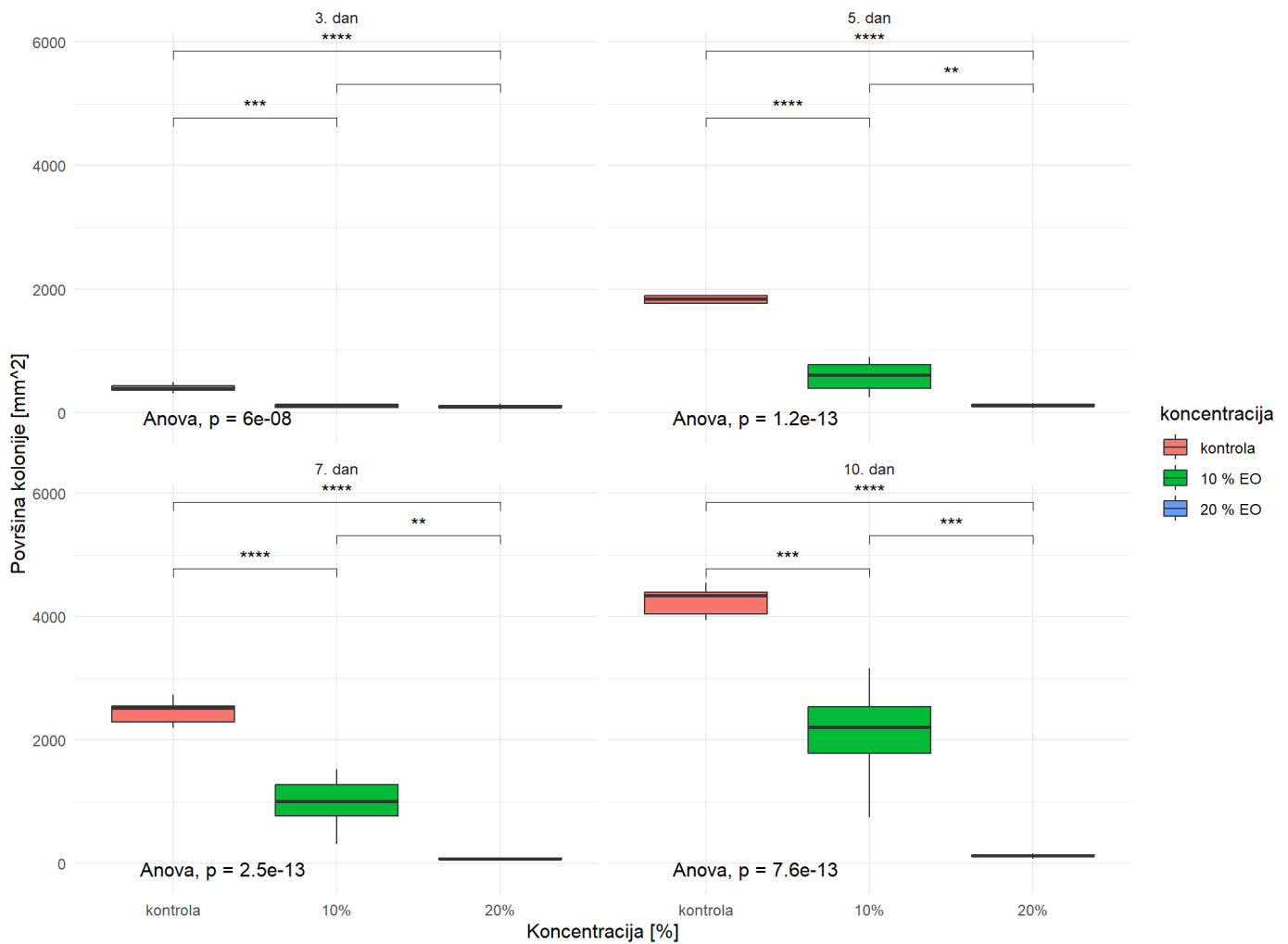
Na rast glive *Fusarium fujikuroi* (Slika 3) EO prav tako močno vpliva. Podobno kot pri vrsti *A. infectoria*, z izjemo tretjega dneva opazovanja, smo opazili statistično pomembne razlike v rasti med vsemi tremi skupinami na vsak dan opazovanja. Od vključno petega dneva naprej je bil zelo izrazit zaviralni učinek z naraščajočo koncentracijo EO. Ob koncu poskusa (10. dan) je 10 % koncentracija EO v povprečju povzročila 40 % zmanjšanje

rasti v primerjavi s kontrolo, medtem ko je 20 % koncentracija EO povzročila 80 % zmanjšanje rasti v primerjavi s kontrolo. Pri glivi *Fusarium graminearum* (Slika 4) podobno kot pri ostalih glivah zaznamo močno zmanjšanje rasti ob dodatku EO čajevca. Statistično značilne razlike so opazne med vsemi skupinami na vsak dan opazovanja. Največja razlika med skupinami je bila opažena na zadnji dan meritev (10. dan), ko je 10 % koncentracija EO v povprečju povzročila 13 % zmanjšanje rasti v primerjavi s kontrolo, medtem ko je 20 % koncentracija EO povzročila kar 96 % zmanjšanje rasti v primerjavi s kontrolo.

## Diskusija

V naši raziskavi smo ugotavljali protiglivi vpliv EO čajevca v dveh različnih koncentracijah: 10 % in 20 % na štiri različne vrste gliv: *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi* in *Fusarium graminearum*. Dokazali smo, da na vse štiri vrste gliv eterično olje čajevca deluje zaviralno na razrast micelija in sicer bolj zaviralno pri večji koncentraciji (20 %). Glede na to, da smo testirali samo dve koncentraciji EO pri štirih vrstah gliv, lahko zanesljivo rečemo, da je prišlo do zaviranja rasti, vendar ne moremo ugotoviti, kakšen je odnos

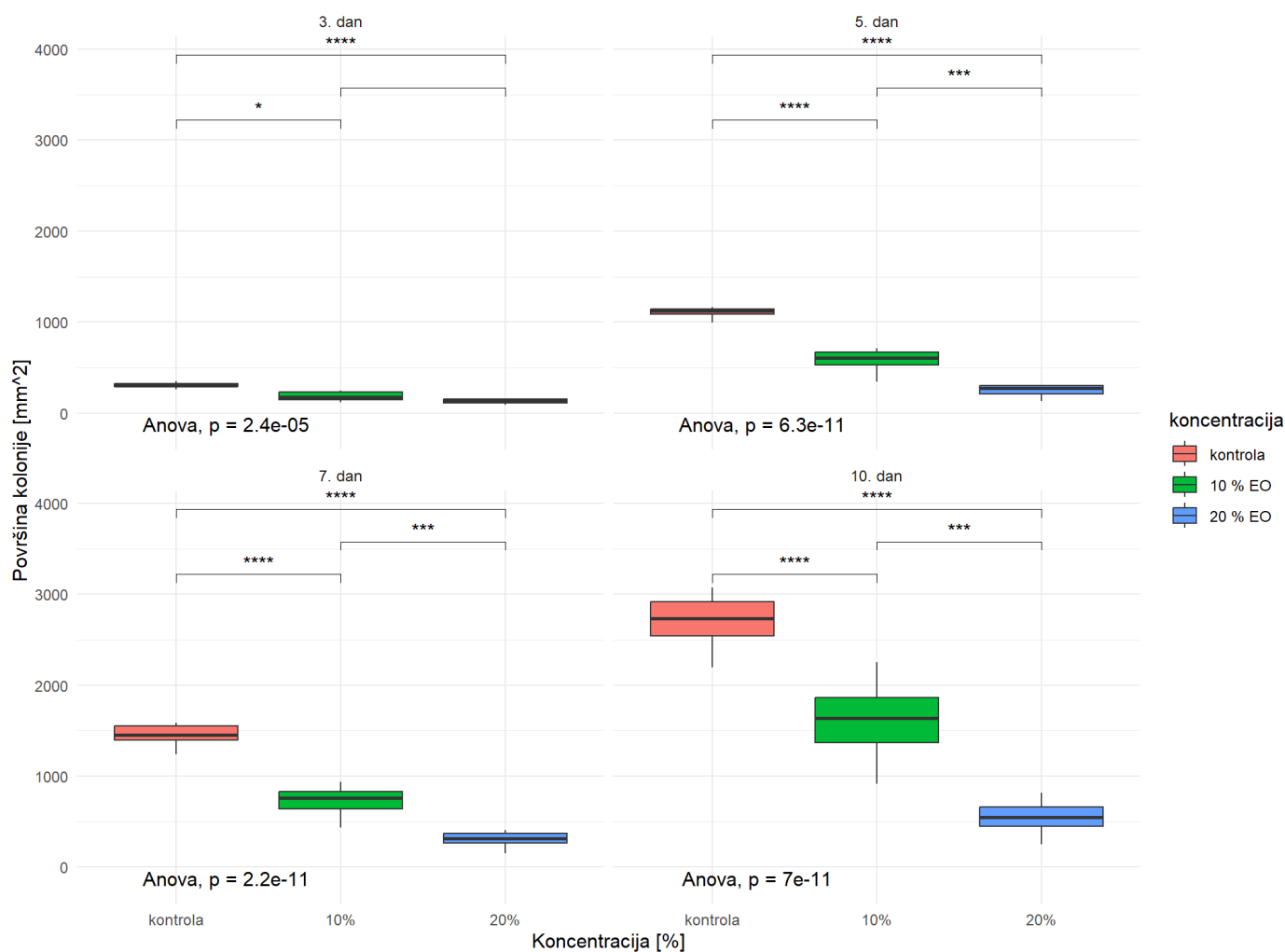




Slika 2. Diagrami boxplot, ki prikazujejo rast gliv vrste *Alternaria infectoria* po dnevih. Porazdelitev podatkov v vsaki skupini je podana za osem ponovitev (N = 8), razen pri skupini z 10 % koncentracijo EO čajevca, ki vsebuje le 7 ponovitev (N = 7), ker je prišlo do napake pri nacepljanju gliv. Z zvezdicami so ovrednotene statistično pomembne razlike med posameznimi skupinami z dodanimi različnimi koncentracijami eteričnega olja čajevca oz. kontrolo; p-vrednost < 0,05 (\*), p-vrednost < 0,01 (\*\*), p-vrednost < 0,001 (\*\*\*), p-vrednost < 0,0001 (\*\*\*\*). V levem spodnjem kotu vsakega diagrama je prikazan rezultat enosmerne ANOVE.

med rastjo kolonije in koncentracijo EO. Za to bi bilo potrebno merjenje pri večjem številu različnih koncentracij, da bi lahko ugotovili, katere glive so bolj odporne na vpliv EO, oziroma pri katerih koncentracijah se začne opazovati učinek inhibicije. Največjo stopnjo zavrtja rasti micelija, smo opazili pri glivi *A. infectoria*, najmanjšo pa pri glivi *A. alternata*. Iz naših podatkov lahko vidimo, da je gliva *A. alternata* verjetno bolj odporna na EO čajevca kot ostale testirane glive, saj pri *A. alternata* nismo zaznali statistično pomembnih razlike med kontrolo in 10 % koncentracijo EO, medtem ko je bila pri vseh ostalih treh testiranih vrstah ta precej opazna. Vendar pa težko zanesljivo trdimo, da je *A. alternata* res najbolj odporna, saj obstaja možnost statističnega artefakta, ker je bilo število ponovitev za vsako skupino le osem ali celo manj. Da bi lahko naše trditve potrdili ali ovrgli, bi bile potrebne nadaljnje raziskave z večjim številom različnih koncentracij EO in večjim številom ponovitev. Rastline so tekom evolucije razvile različne biološko aktivne komponente, med katere sodijo tudi EO. Ta imajo potencial zaviranja rasti mikroorganizmov, tudi gliv. Na podlagi tega lahko EO uporabimo v agronomiji kot alternativo sintetičnim fungicidom za zaviranje tako kontaminacije z glivnimi spori (Anžlovar s sod. 2017) kot tudi zmanjševanje proizvodnje

mikotoksinov (Morcia s sod. 2017). EO so sekundarni metaboliti rastlin v tekočem agregatnem stanju in aromatičnih vonjev, vsebujejo veliko monoterpenov, ki imajo majhno molekularno maso in so zaradi tega zelo hlapljive. Vseeno pa ugotavljajo, da je kontaktna metoda, kakršno smo uporabili tudi v naši raziskavi, uspešnejša pri zaviranju glivne razrasti, kot če so miceliji izpostavljeni zgolj hlapnim komponentam EO (Zimmermann s sod. 2023). Kakovost in zastopanost teh snovi variira glede na klimatske razmere, v katerih rastlina raste, podlage, na kateri rastlina raste, dela rastline, iz katere je bilo EO estrahirano, starosti rastline, genetske variabilnosti, abiotskega in biotskega stresa pa tudi metod same ekstrakcije EO (Zimmermann s sod. 2023, povzeto po Kalagatur s sod. 2015, Mutlu-Ingok s sod. 2020, Alonso-Gato s sod. 2021) Glavne učinkovine EO čajevca so terpinen-4-ol,  $\gamma$ -terpinen in  $\alpha$ -terpinen (Zimmermann s sod. 2023, Terzi s sod. 2007). Zimmermann s sod. (2023) tudi ugotavljajo, da ima EO čajevca največji fungicidni potencial (več kot 90 %) na glivne micelije nekaterih drugih sevov gliv, med katerimi pa so testirali tudi sev *F. graminearum*, ki smo ga uporabili tudi v naši raziskavi. Ugotavljali so minimalno inhibitorno koncentracijo in srednjo inhibitorno koncentracijo, pri čemer so uporabili naslednje



Slika 3. Diagrami boxplot, ki prikazujejo rast gliv vrste *Fusarium fujikuroi* po dnevih. Porazdelitev podatkov v vsaki skupini je podana za osem ponovitev (N = 8). Z zvezdicami so ovrednotene statistično pomembne razlike med posameznimi skupinami z dodanimi različnimi koncentracijami eteričnega olja čajevca oz. kontrolo; p-vrednost < 0,05 (\*), p-vrednost < 0,01 (\*\*), p-vrednost < 0,001 (\*\*\*), p-vrednost < 0,0001 (\*\*\*\*). V levem spodnjem kotu vsakega diagrama je prikazan rezultat enosmerne ANOVE.

koncentracije EO čajevca 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75 in 2,0 %. Opazili so 92 % zavrtje rasti in določili, da je minimalna inhibitorna koncentracija EO čajevca za *F. graminearum* 1,0 % in srednja inhibitorna koncentracija 0,52 % (Zimmermann s sod. 2023), kar sta znatno manjši koncentraciji EO, kot smo testirali v naši raziskavi, zavrtje razrasti glivnega micelija pa je bilo večje. To lahko pripišemo drugačnemu postopku gojenja gliv, saj so Zimmermann s sod. (2023) glive gojili v vodnem mediju (RPMI 1640) in ne na agarnih ploščah kot v našem primeru. Pri minimalni inhibitorni koncentraciji EO vplivajo na encimsko aktivnost gliv, s čimer zavrejo njihovo rast. Pri večjih koncentracijah pa komponente EO poškodujejo glivne proteine in posledično povzročijo smrt glive (Rahman in Sarker 2020).

## Zaključki

V naši raziskavi smo želeli ugotoviti, kako različne koncentracije eteričnega olja čajevca vplivajo na rast patogenih oziroma endofitskih gliv *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi* in *Fusarium graminearum*. Za testiranje smo uporabili koncentraciji 10 % in 20 % eteričnega olja. Predpostavljali smo, da bo višja koncentracija eteričnega olja bolj zavirala rast gliv kot nižja. Rezultati so potrdili našo

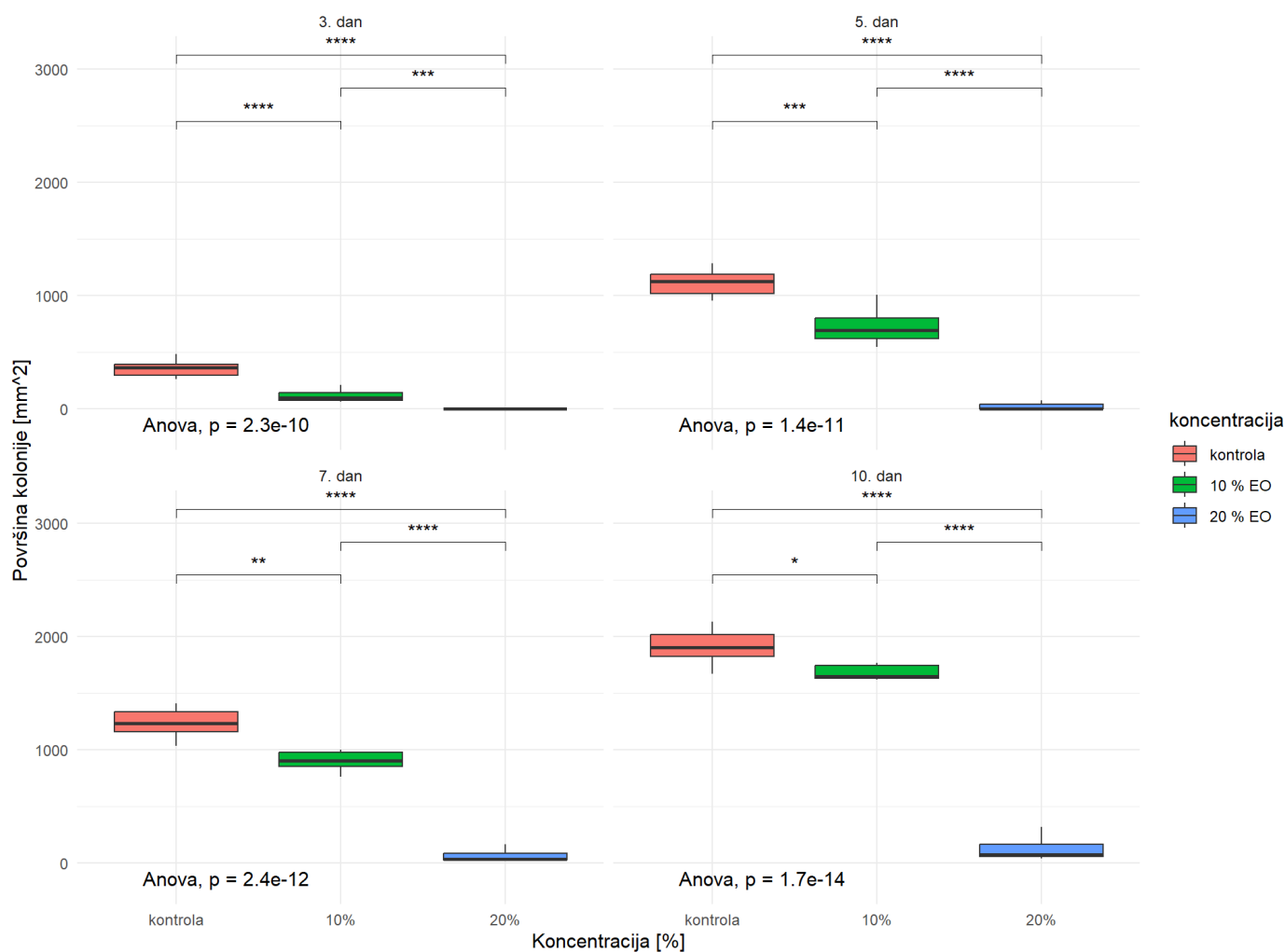
predpostavko in pokazali statistično značilno razliko med rastjo gliv, ki so bile izpostavljene 0 % (kontrolna skupina), 10 % in 20 % EO čajevca.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko z gotovostjo trdimo, da prihaja do zaviralnega učinka na rast gliv s povečevanjem koncentracije EO čajevca. Na podlagi tega tudi predlagamo uporabo EO čajevca v agronomiji in pri skladiščenju živil, saj višje koncentracije EO čajevca lahko uporabimo kot protiglavno sredstvo pri glivah *A. alternata*, *A. infectoria*, *F. fujikuroi* in *F. graminearum*.

Da bi bolje razumeli ta odnos so potrebne nadaljnje raziskave. Predlagamo, da se opravi več poskusov z več različnimi koncentracijami EO. Tako bi lahko ugotovili ne samo, ali se rast gliv zmanjšuje s povečevanjem koncentracije EO, ampak tudi pri katerih koncentracijah opazimo minimalni inhibitorni učinek in popolno zavrtje rasti glivnega micelija. Poleg tega bi lahko primerjali različne glive med seboj in ugotovili, katere so bolj odporne na učinek EO čajevca.

## Literatura

- Alonso-Gato M, Astray G, Mejuto JC, Simal-Gandara J, 2021. Essential oils as antimicrobials in crop protection. Antibiotics,



Slika 4. Diagrami boxplot, ki prikazujejo rast gliv vrste *Fusarium graminearum* po dnevih. Porazdelitev podatkov v vsaki skupini je podana za osem ponovitev (N = 8), razen pri skupini z 20 % koncentracijo EO čajevca, ki vsebuje le 7 ponovitev (N = 7), ker je prišlo do napake pri nacepljanju gliv. Z zvezdicami so ovrednotene statistično pomembne razlike med posameznimi skupinami z dodanimi različnimi koncentracijami eteričnega olja čajevca oz. kontrolo; p-vrednost < 0,05 (\*), p-vrednost < 0,01 (\*\*), p-vrednost < 0,001 (\*\*\*), p-vrednost < 0,0001 (\*\*\*\*). V levem spodnjem kotu vsakega diagrama je prikazan rezultat enosmerne ANOVE.

- 10:1–12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010034>
- Anžlovar S, Likar M, Koce JD, 2017. Antifungal potential of thyme essential oil as a preservative for storage of wheat seeds. *Acta Bot Croat*, 76:64–71. <https://doi.org/10.1515/botcro-2016-0044>
  - Cen YK, Lin JG, Wang YL, Wang JY, Liu ZQ, Zheng YG, 2020. The Gibberellin Producer *Fusarium fujikuroi*: Methods and Technologies in the Current Toolkit. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology Frontiers Media S.A.*
  - Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG, Li YL, 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*
  - Kalagatur NK, Mudili V, Siddaiah C, Gupta VK, Natarajan G, Sreepathi MH, Vardhan BH, Putcha VL, 2015. Antagonistic activity of *Ocimum sanctum* L. essential oil on growth and zearalenone production by *Fusarium graminearum* in maize grains. *Front Microbiol* 6:1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00892>
  - Kustrzeba-Wójcicka I, Siwak E, Terlecki G, Wolańczyk-Mędrala A, Mędrala W, 2014. *Alternaria alternata* and Its Allergens: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology Humana Press Inc.*
  - Leplat J, Friberg H, Abid M, Steinberg C, 2013. Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of *Fusarium* head blight. A review. *Agronomy for Sustainable Development*
  - Morcia C, Malnati M, Terzi V, 2012. In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Addit Contam Part A* 1–8. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.643458>
  - Mutlu-Ingok A, Devcioglu D, Dikmetas DN, Karbancioglu-Guler F, Capanoglu E, 2020. Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: an updated review. *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25204711>
  - Paccoud O, Vignier N, Boui M, Migaud M, Vironneau P, Kania R, Méchaï F, Brun S, Alanio A, Tauziède-Espariat A, Adle-Biassette H, Ouedraogo E, Bustamante J, Bouchaud O, Casanova JL, Puel A, Lanternier F, 2022. Invasive Rhinosinusitis Caused by *Alternaria infectoria* in a Patient with Autosomal Recessive CARD9 Deficiency and a Review of the Literature. *Journal of Fungi*, 8, 5
  - Pitt JI, Hocking AD, 2009. *Fungi and Food Spoilage*. New York, Springer New York
  - R Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/> (22. 12. 2023)
  - Rahman M, Sarker SD, 2020. Antimicrobial natural products. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 55, 77–113. <https://doi.org/10.1016/bs.armc.2020.06.001>
  - Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J,

- White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A, 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
15. Terzi V, Morcia C, Faccioli P, Valè G, Tacconi G, Malnati M. 2007. In vitro antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 6: 613–618
16. Tsalidis GA, 2022. Human Health and Ecosystem Quality Benefits with Life Cycle Assessment Due to Fungicides Elimination in Agriculture. Sustainability (Switzerland) MDPI
17. Zimmermann RC, Poitevin CG, da Luz TS, Mazarotto EJ, Furuie JL, Martins CEN, do Amaral W, Cipriano RR, da Rosa JM, Pimentel IC, Zawadneak MAC, 2023. Antifungal activity of essential oils and their combinations against storage fungi. *Environmental Science and Pollution Research International*, 30(16), 48559–48570. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25772-5>

# Vpliv eteričnega olja rožmarina na rast izbranih patogenih gliv

Eva Debevc, Vito Ham, Vesna Jurjevič, Vid Pograjc

Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Eterična olja predstavljajo alternativo sintetičnim sredstvom na marsikaterem področju, vključno s preprečevanjem glivnih okužb semen. So splošno dostopna, ob načrtovani uporabi imajo nizko stopnjo toksičnosti in predstavljajo enega od okolju prijaznih in trajnostnih sredstev za dekontaminacijo žitnih zrn.
- V raziskavi smo preverili protiglivno aktivnost eteričnega olja rožmarina na rast glivnih vrst *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi* in *Fusarium graminearum*.
- Na rast vseh štirih testiranih vrste gliv je 20% koncentracija eteričnega olja rožmarina vplivala zaviralno, pri vrstama *A. infectoria* in *F. fujikuroi* pa tudi že 10 % koncentracija..
- Rezultati poskusa kažejo, da ima eterično olje rožmarina ob ustrezni koncentraciji zaviralno delovanje na rast gliv, kar se sklada s podatki iz literature. Za popolno razumevanje učinka eteričnih olj na glivične patogene so potrebne nadaljnje raziskave.

**Ključne besede:** *Rosmarinus officinalis*, fungicidi, fitopatogene okužbe rastlin, biopesticidi



## Uvod

Z rastjo svetovne populacije se veča tudi potreba po hrani. Ključen izziv modernega sveta predstavlja proizvodnja zadostnih količin kmetijskih proizvodov, s čim manjšimi izgubami tekom same pridelave. Med njimi so žitna zrna najpomembnejši pridelek na svetovni ravni. Povišana incidenca okužb tekom pridelave ali skladiščenja, ki jih med drugim povzročajo tudi fitopatogene glive, vodi v večjo uporabo pesticidov. Ti imajo negativen vpliv na zdravje ljudi in negativno vplivajo tudi na okolje. Zaradi omenjenega se pojavlja vedno večja potreba po okolju prijaznih in trajnostnih pristopih za pridobivanje in skladiščenje varne hrane, pri čemer nam lahko pomagajo rastlinski produkti (Mravlje s sod. 2022). Značilnosti mikotoksinov fitopatogenih gliv različnih rodov, kot so *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* in *Penicillium*, so akutna toksičnost, genotoksičnost, mutagenost in kancerogenost (Mravlje s sod. 2022). Znotraj rodu *Alternaria* najdemo mnoge vrste, ki povzročajo bolezni žita na polju in gnitje med skladiščenjem po žetvi. Okužba z glivo *Alternaria alternata* se na primer kaže v bolezni "črnih pik" (angl. black point), ki prizadane žitna zrna. Proizvaja mnogo sekundarnih metabolitov, ki na številne druge organizme delujejo kot mikotoksini in predstavljajo tveganje pri pridelavi hrane. Strupeni so tudi za testne živali in človeške celične kulture. Pri miših imajo teratogen in fetotoksičen učinek ter mutageno delujejo v raznih mikrobnih in celičnih sistemih. Pri človeku nekateri sevi povzročajo onkogenezo fetalnega epitelija in njegovo nenadzorovano povečevanje v tkivu sapnika (Feng-Quin in sod. 2001). Rod *Fusarium* na žitu povzroča tako imenovane fuzarioze klasa, ki se med drugim odražajo v bledenju žitnih klasov ter imajo največji vpliv na kakovost in količino pridelane pšenice (Bayer AG 2023). Eden najbolj razširjenih predstavnikov v Evropi, ZDA in Kanadi je vrsta *Fusarium graminearum*. Ta proizvaja širok nabor mikotoksinov, med katerimi je najbolj problematičen deoksinivaenol (DON). Kljub temu, da fuzarioze na žitu vplivajo na manjšo težo zrnja, so zdravstvene posledice okužb še bolj zaskrbljujoče. DON je močan inhibitor biosinteze proteinov in v zadostni količini vpliva na delovanje prebavnega sistema ter drugih glavnih organskih sistemov pri človeku in živalih. Njegova dovoljena količina v hrani je zato strogo regulirana (Trail 2009). Kot že omenjeno, ti problemi terjajo uporabo sintetičnih pesticidov, ki predstavljajo dolgoročno grožnjo za zdravje ljudi, ki prihajajo v stik z njimi vzdolž celotnega procesa pridelave in predelave hrane. Do sedaj zabeležene posledice izpostavljenosti so med drugim problemi z endokrinim, imunskim in nevrološkim delovanjem ter karcinogeneza in prezgodnja rojstva. Poleg tega je sinteza novih fungicidov problematična zaradi podobnosti med glivnimi in sesalskimi celicami, kot so na primer biosintezne poti in organizacija kromatina. Hkrati imajo pesticidi številne kompleksne posledice za celotne ekosisteme (Brauer in sod. 2019). Njihova prekomerna uporaba med drugim povzroča nastanek odpornih mikrobnih vrst, med katerimi so opazili tudi nekatere fitopatogene glive vrste *Alternaria alternata* (Hmiri s sod. 2015).

Rožmarin je zimezelni grm iz sredozemske regije, s širokim spektrom uporabe v moderni medicini z namenom podpore zdravljenju različnih bolezni, kot so nespečnost, depresija in protin. Zaradi svoje kemijske sestave je ena izmed bolj preučevanih rastlin, ki ima dokazano številne ugodne učinke, tako protimikrobne (protiglivne), kot tudi hepatoprotektivne

in antitumorgene. Eterična olja (EO) so sekundarni metaboliti aromatičnih in zdravilnih rastlin, ki se odlikujejo z izredno pestro kemijsko sestavo. Najpomembnejše sestavine EO rožmarina so fenolne kisline, bolj točno kavna kislina in njeni derivati, kot na primer rožmarinska kislina, predvsem zaradi njihovih antioksidativnih učinkov. Protimikrobni mehanizmi delovanja EO se razlikujejo glede na tip EO in vrsto mikroorganizma. Kemijska sestava aktivnih molekul v EO določa protiglivne učinke. Trenutno je predlaganih več mehanizmov protimikrobnega delovanja, kot so kopičenje EO v celici, motnje v delovanju membran in spremembe v morfologiji, ki posledično vodijo v celično smrt. Med drugim so ugotovili tudi, da EO prodira skozi celične stene, čemur sledijo poškodbe citoplazemskih in mitohondrijskih membran (Omar in Kordali 2019). Iz tega vidika predstavljajo naraven vir molekul, ki jih lahko uporabimo kot alternativo sintetičnim sredstvom za zatiranje rastlinskih patogenov, med drugim gliv. S tem namenom smo preverili zaviralne vplive EO rožmarina na izbrane 4 glivne vrste: *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi* in *Fusarium graminearum*. Predpostavili smo, da bo EO rožmarina zaviralno vplival na rast gliv. Zaviranje rasti bo večje pri višji koncentraciji EO.

## Materiali in metode

### Eterično olje

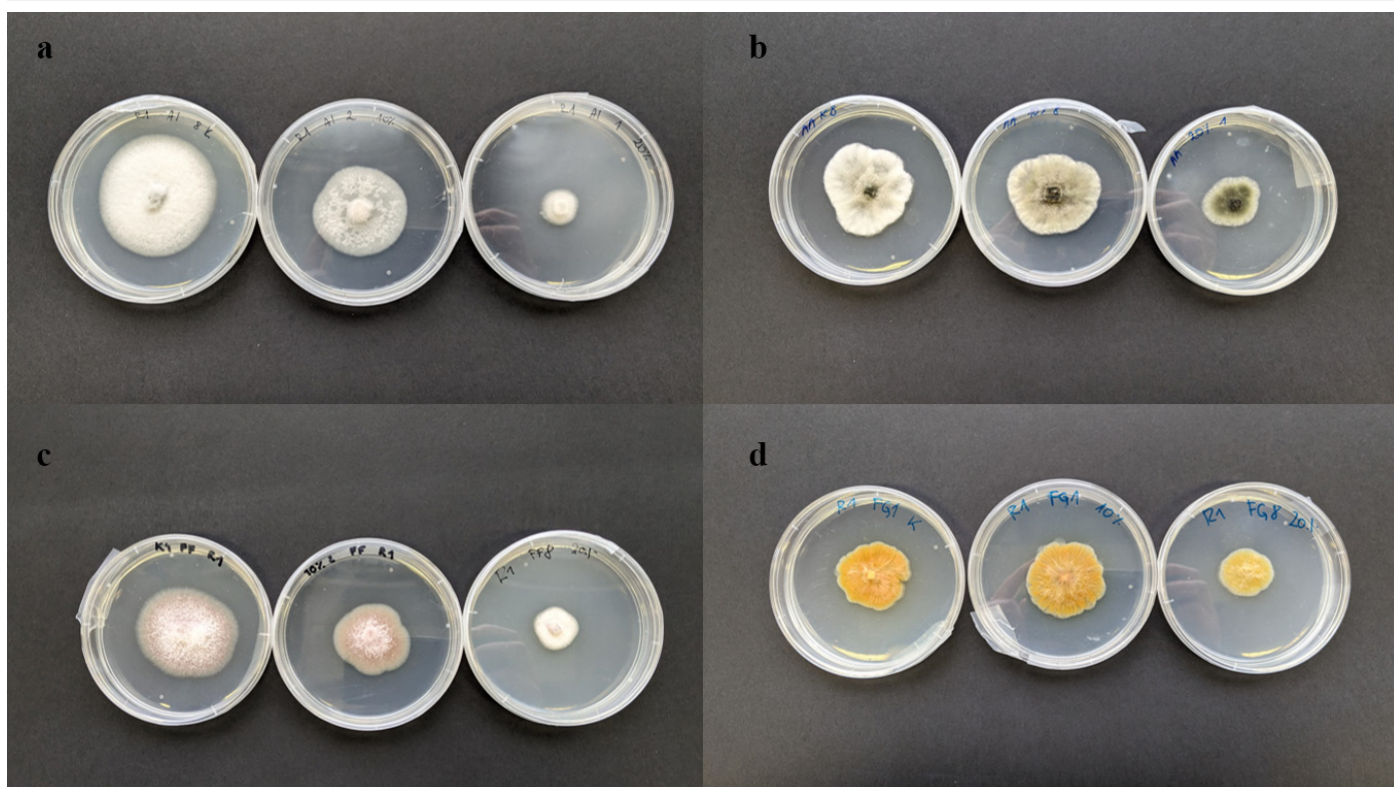
Pripravili smo 10 in 20 % raztopini eteričnega olja rožmarina (*Rosmarinus officinalis*) z dodatkom dimetilsulfoksida (DMSO) v razmerju 9:1 oz. 8:2. Ker se hidrofilni DMSO slabo meša z EO rožmarina, smo raztopini dodali še 0.1 % detergenta Tween80 (TW80). Detergent emulgira raztopini EO in DMSO, s čimer omogoča boljše mešanje in homogenizacijo olj ter polarnih topil kot je DMSO. Kontrolni vzorci so vsebovali 10 % DMSO in 0.1 % detergent TW80.

### Vzgoja glivnih sevov

V raziskavi smo testirali učinek EO rožmarina na rast štirih različnih glivnih vrst: *Alternaria alternata* (NA007), *Alternaria infectoria* (TA001), *Fusarium fujikuroi* (NA030) ter *Fusarium graminearum* (NAX03). Sevi so bili pridobljeni iz glivne banke Laboratorija za fiziologijo rastlin na Oddelku za biologijo (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija).

### Protiglivna aktivnost

Protiglivno aktivnost smo testirali na gojišču 2 % krompirjevega dekstroznega agarja (PDA), ki smo mu dodali antibiotik kloramfenikol (50 mg/L). Za vsako glivno vrsto smo pripravili serijo osmih kontrolnih gojišč, serijo osmih plošč z dodano 10 % raztopino EO in serijo osmih plošč z 20 % raztopino EO. Ta gojišča smo pripravili tako, da smo na vsako gojišče dodali po 100 µL izbrane raztopine EO ter jo konfluentno razmazali s spatulo po Drigalskem. Na kontrolna gojišča smo dodali po 100 µL 10 % DMSO. Glive smo na testna gojišča nacepili tako, da smo izrezali košček glivnega micelija z roba 7 dni starih izvornih kultur gliv v obliki kvadratkov, v velikosti 5x5 mm (25 mm<sup>2</sup>). Kvadratke smo postavili na sredino gojišča za čim bolj enakomerno rast. Inkubirali smo jih v rastni komori v temi, pri dnevni temperaturi 22 °C (16 ur) in pri nočni temperaturi 18 °C (8 ur) in sicer 10 dni. Rastoče glivne micelije smo fotografirali tretji, šesti, sedmi, osmi, deveti in deseti dan inkubacije z



Slika 1. Reprezentativne fotografije rasti gliv *Alternaria infectoria* (a), *Alternaria alternata* (b), *Fusarium fujikuroi* (c), *Fusarium graminearum* (d). Od leve proti desni: kontrola, plošči z dodanim 10 % in 20 % EO rožmarina. Slike so zajete sedmi dan po začetku poskusa.

mobilnimi telefoni pri dnevni svetlobi.

### Meritev površine

Površino gliv smo določili z uporabo programa ImageJ (Schneider, 2012). V programu smo s pomočjo orodja "freehand selections" označili rob micelija na slikah gojišč ter uporabili ROI manager za izračun površine. Za kalibracijo digitalnega merilca smo se zanesli na umeritev premera petrijevk na zajetih slikah.

### Statistična obdelava

Pridobljene podatke o površinah gliv smo z uporabo dodatka XL Toolbox NG, verzija 7.3.4 (Kraus, 2014), v programu Microsoft Excel (2018) statistično obdelali z enosmerno analizo variance (ANOVA). Prav tako smo z uporabo omenjenega dodatka izvedli Bonferroni-Holm post-hoc test. Za statistično značilno različne smo smatrali rezultate, kjer je bila p-vrednost  $< 0,05$ . Pridobljene rezultate smo grafično prikazali s histogrami.

### Rezultati

Spremembe v rasti gliv smo spremljali po 3, 6, 7, 8, 9 in 10. dneh od začetka poskusa. Poskus smo ustavili, ko je micelij kontrolne skupine zrasel do roba gojišča (večinoma se je to zgodilo po 7. dneh inkubacije, oziroma 10. dan poskusa). Zaradi kontaminacij so bile določene plošče izključene iz nadaljnje analize.

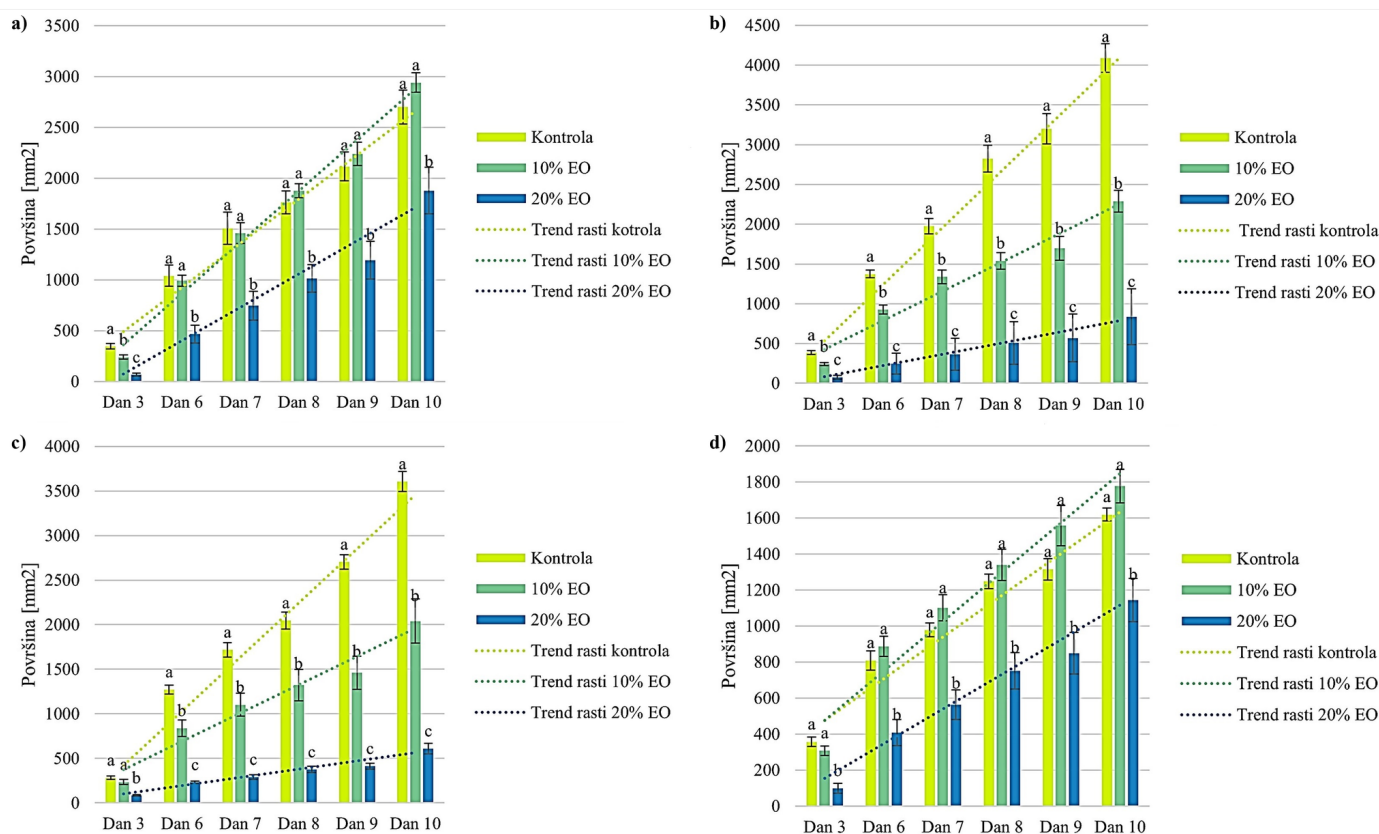
Učinek dodanega EO rožmarina v 10 in 20 % koncentracijah nakazuje na zaviralno delovanje olja na rast micelija gliv kot je razvidno na sliki 1. Na zaviralno delovanje sklepamo zaradi

počasnejšega razraščanja micelija po gojišču v primerjavi s kontrolno. Fotografirane glive na sliki 1 so bile izbrane kot reprezentativne za vsak tretma.

Različne koncentracije EO imajo različen vpliv na rast različnih vrst gliv, razvidno iz slike 2. Dodatek 10 % raztopine EO rožmarina pri glivah *Alternaria alternata* ter *Fusarium graminearum* ni imela statistično značilnega učinka na rast gliv, medtem ko je ista koncentracija olja pri vrstama *Alternaria infectoria* ter *Fusarium fujikuroi* na rast gliv vplivala zaviralno. Nasprotno pa je 20 % koncentracija EO rožmarina pri vseh vrstah gliv zavirala rast. Relativna inhibicija rasti glede na kontrolno je najbolj očitna pri glivah *A. infectoria* ter *F. fujikuroi*, kjer je povprečna površina micelija že na gojišču z dodanim 10 % EO skoraj za 50 % nižja od povprečne površine kontrolnih kolonij. Pri dodani 20 % koncentraciji EO pa je bila ta celo 80 oziroma 85 %. Nasprotno pa smo pri vrstah *A. alternata* in *F. graminearum* ob dodatku 10 % eteričnega olja rožmarina po 10. dneh opazili le za približno 30 do 35 % zaviranje rasti v primerjavi s kontrolno.

Poleg površine micelija glede na dan eksperimenta, smo izračunali tudi povprečno hitrost rasti gliv, kar prikazuje tabela 1. Vrsta *A. alternata* je pri 10 % raztopini eteričnega olja rasla približno 1,4-krat počasneje od kontrole, pri 20 % raztopini eteričnega olja rožmarina pa 6,8-krat počasneje od kontrole. Podobna hitrost rasti je bila tudi pri vrsti *A. infectoria*, kjer je gliva pri dodani 10 % raztopini eteričnega olja rožmarina rasla 1,2-krat počasneje od kontrole, pri 20 % raztopini pa 6,4-krat počasneje. Vrsta *F. fujikuroi* je pri 10 % raztopini eteričnega olja rasla približno 1,1-krat počasneje od kontrole, pri 20 % raztopini eteričnega olja rožmarina pa 4,2-krat počasneje od kontrole. Vrsta *F. graminearum* je pri 10 % raztopini eteričnega olja rasla približno enako hitro kot kontrola, pri 20 % raztopini





Slika 2: Histogrami ponazarjajo povprečno površino  $\pm$  standardne napake velikosti micelija gliv v kontrolni skupini in ob dodatku 10 % oz. 20 % koncentracije eteričnega olja rožmarina ( $n = 8$ ). Vsak graf ponazarja posamezno glivo: *Alternaria alternata* (a), *Alternaria infectoria* (b), *Fusarium fujikuroi* (c), *Fusarium graminearum* (d). Podatki so podani v kvadratnih milimetrih [ $\text{mm}^2$ ] ter izmerjeni po 3, 6, 7, 8, 9 ter 10. dnevih od začetka poskusa. Črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

eteričnega olja rožmarina pa 3-krat počasneje od kontrole.

## Diskusija

Rožmarin v divjini raste predvsem na mediteranskem področju. Eterično olje (EO) pridobivajo iz njegovih cvetočih poganjkov, stebel in listov, s postopkom parne destilacije. Rastlina vsebuje povprečno 1 % EO, kar velja za relativno veliko količino (Ozcan in Chalchat 2008). Značilnosti EO rožmarina se razlikujejo glede na geografsko lego in druge okoljske pogoje, kot je na primer pH prsti, v kateri raste rastlina. Biokemijske skupine molekul, ki so jih Angioni s sod. (2004) zasledili v EO rožmarina so monoterpeni, alkoholi, ketoni, fenoli, estri in seskviterpeni. Za rožmarinovo EO karakteristične molekule so 1,8-cineol, a-pinen, b-pinen, kamfor, linalol, limonen, borneol, mircen,

Tabela 1. Povprečna hitrost rasti gliv: *Alternaria alternata* (AA), *Alternaria infectoria* (AI), *Fusarium fujikuroi* (FF), *Fusarium graminearum* (FG), glede na raztopino eteričnega olja rožmarina (EO). Podatki so podani v kvadratnih milimetrih na dan [ $\text{mm}^2/\text{dan}$ ].

	AA	AI	FF	FG
Kontrola	489,3	533,2	419,9	475,5
10 % EO	361,8	427,6	372,0	476,2
20 % EO	71,8	82,2	100,9	154,1

terpineol in kariofilen (Ozcan in Chalchat 2008). Glede na okoljske razmere rasti rastline se razlikujejo predvsem njihova razmerja in koncentracije (Angioni s sod. 2004). V splošnem najdemo dva različna tipa rožmarinovega EO glede na zastopanost nekaterih najpogostejših, zgoraj omenjenih učinkovin: olje z več kot 40 % 1,8-cineola (iz Maroka, Tunizije, Grčije, Slovenije, Hrvaške, Italije in Francije) ter olja s približno enakim razmerjem (20-30 %) 1,8-cineola, a-pinena in kamforja (iz Francije, Španije, Italije, Grčije in Bolgarije) (Ozcan in Chalchat 2008). EO, ki smo ga uporabili v naši raziskavi sodi v prvo kategorijo, z 41 % vsebnostjo 1,8-cineola (Favn d.o.o. 2023). Kljub temu, da je monoterpen 1,8-cineol prevladujoča komponenta EO rožmarina, ki smo ga uporabljali, lahko iz pregledane literature razberemo, da ni edini ključni dejavnik za protiglavno aktivnost EO. V študiji, ki so jo izvedli Hmiri s sod. (2015), sta imela EO rožmarina in mirte različno zaviralno aktivnost na rast micelija, kljub temu da je prevladajoča komponenta obeh olj 1,8-cineol v podobni koncentraciji. Zasledimo tudi, da ima 1,8-cineol sam po sebi nizko protiglavno aktivnost, kar pomeni, da so sinergistični efekti drugih sekundarnih metabolitov ključni pri protiglavnem potencialu EO. Visoko protiglavno aktivnost pri večini EO izkazujejo zgoraj naštetih molekule: 1,8-cineol, a-pinen, b-pinen, kamfor, linalol, limonen, borneol, mircen, terpineol in kariofilen (Hmiri s sod. 2015).

Zaviralni učinek EO rožmarina smo zaznali pri vseh testiranih vrstah gliv, vsaj pri višji koncentraciji EO. Zaviralni učinek je bil večji pri vrstah *A. infectoria* in *F. fujikuroi* kot pri *A. alternata*

in *F. graminearum*, kar je razvidno iz deležev inhibicije tekom celotnega spremljanja rasti pri testnih skupinah, v primerjavi s kontrolnimi. Slednje je jasno tudi iz naklonov trendnih linij rasti, iz katerih razberemo, da je bila rast vrst *A. infectoria* in *F. fujikuroi* bolj upočasnjena pri isti, 20 % koncentraciji dodanega EO, kot pri drugih dveh glivnih vrstah. Zaviralno učinkovanje v našem primeru torej ni sovpadalo s taksonomsko bližino testiranih izolatov in se je razlikovalo znotraj rodov. Delovanje EO rožmarina je torej precej vrstno specifično. Kjer je bil zaznan manjši zavirani učinek, torej pri *A. alternata* in *F. graminearum* tudi ni bilo opažene razlike v rasti med kontrolno skupino in glivami, ki so rastle na 10 % EO. Razlika v rasti je bila opazna šele pri 20 % dodanega EO. Po drugi strani smo pri glivah *A. infectoria* in *F. fujikuroi* razliko v rasti opazili že pri 10 % dodanega EO, v primerjavi s kontrolo. Iz zgoraj opisanega lahko zaključimo, da je za zaviranje rasti micelija pri *A. alternata* in *F. graminearum* potrebna večja koncentracija EO, kot pri *A. infectoria* in *F. fujikuroi*. Z višanjem koncentracije EO se večja tudi zaviralni učinek pri vseh testiranih vrstah. Zaviralni učinek EO rožmarina na rast glive *A. alternata* so potrdili tudi Himri s sod. (2015), kjer se je zaviralni učinek pokazal pri koncentraciji 800 µl/l, torej pri 0,08 %, kar je občutno manjša koncentracija kot v našem primeru. Poleg omenjenega, so zasledili tudi zaviralno delovanje EO mirte (*Myrtus communis*) na isto glivno vrsto, ki je imelo večji učinek od rožmarinovega. Podobne rezultate so poročali tudi Đorđević s sod. (2012), ki so preučevali izključno hlapne učinkovine EO rožmarina in nekaterih drugih rastlinskih vrst (*Mentha sp.*, *Eucalyptus sp.*). V drugi študiji (Ozcan in Chalchat 2008) so opazili celo stimulacijo rasti *A. alternata* pri nižjih koncentracijah (10 ppm, torej 0,001%) EO rožmarina, medtem ko je imelo olje zaviralen učinek pri nekoliko višji koncentraciji (40 ppm, torej 0,004%). Potrebno je omeniti, da so bile koncentracije olja, uporabljene v tej študiji, precej manjše kot pri našem eksperimentu. Rezultati, predstavljeni v naši študiji se razlikujejo tudi od tistih, poročanih v raziskavi vpliva 5, 10 in 15 % hidrolata rožmarina na glivno rast, ki so jo izvedli Mravlje s sod. (2022). Raziskovalci so opazili stimulacijo rasti *A. alternata* pri vseh koncentracijah hidrolata in precej nizko stopnjo zaviranja (glede na ostale glivne vrste, ki so jih preučevali) rasti glive *A. infectoria* pri 10 in 15 % koncentraciji. Višja stopnja zaviranja je bila opažena pri vrstah *F. fujikuroi* in *F. graminearum* pri vseh testiranih koncentracijah, pri čemer je bil zaviralni učinek največji pri zadnji glivi. Razlike v vplivih na ta dva rodova bi lahko bila posledica vpliva vodotopnih molekul, ki se nahajajo v hidrolatu, ki so ga uporabljali v omenjeni raziskavi Mravlje s sod. (2022), in nevodotopnih molekul, ki so prisotne v oljih, katerih učinek je preiskovala naša ekipa. Hidrolati imajo namreč v primerjavi z EO bistveno manjšo koncentracijo aktivnih učinkovin s protiglivi delovanjem (Mravlje s sod. 2022). Romoli s sod. (2021) so opazili, da EO rožmarina, timijana in kurkume zaviralno vplivajo na sintezo dveh mikotoksinov (zearalenona in deoksinivalenola) prisotnih pri vrsti *F. graminearum*. Rožmarinovo EO je zopet pokazalo najmanj inhibitorne aktivnosti v primerjavi z ostalima. Dodatnih študij, ki bi natančneje preučevale učinek rožmarinovega EO na rast gliv *A. infectoria* ter *F. fujikuroi* nismo zasledili. Obstaja pa veliko študij, ki so preučevale učinke EO drugih rastlinskih vrst na omenjene glive. Goudjil s sod. (2020) so na primer pokazali, da ima timijanovo EO

fungicidni vpliv na vrsto *A. infectoria*, ki je delovalo popolnoma zavirano pri koncentracijah od 0,025 do 0,75 %. V drugi študiji so Kalboush in Hassan (2019) preučevali zaviralno vlogo EO petih različnih rastlinskih vrst na glivo *F. fujikuroi*, in ugotovili največji učinek EO vrste Ammi visnaga (iz družine kobulnic), z najučinkovitejšim delovanjem pri 0,05 % koncentraciji, pri kateri je rast glive popolnoma zavrta. Mourni s sod. (2021) pa so v svoji raziskavi med drugim zasledili zaviranje rasti vrste *F. fujikuroi*, ki je bilo najbolj izrazito pri tretiranju z EO limonske trave in sivke z 0,5 % koncentracijo.

## Zaključki

Alternativna sredstva za zatiranje glivnih okužb, kot so EO rastlin, imajo velik potencial za reševanje problema glivnih okužb, saj izkazujejo zaviralne učinke na rast številnih glivnih patogenov. V naši raziskavi smo potrdili zaviralno delovanje EO rožmarina na vse štiri izbrane vrste gliv. Intenzivnost zaviranja se je razlikovala med glivnimi vrstami, prav tako tudi koncentracijska odvisnost med EO in stopnjo zaviranja. Kljub temu EO rožmarina, v koncentracijah kot smo jih uporabili v naši študiji, ni delovalo popolnoma fungicidno na nobeno izmed štirih gliv. Smiselno bi bilo preizkusiti učinkovitost EO nekaterih drugih rastlin (npr. mirte ali timijana) na preučevane glivne vrste, saj glede na izsledke drugih avtorjev pričakujemo, da bo le ta večja. Glede na široko variabilnost učinka EO na rast glivnih patogenov, ki je vrstno in koncentracijsko specifična ter odvisna od specifične kemijske sestave posameznega EO, je za razumevanje dinamike njihovega vpliva na rast gliv potrebnega še veliko raziskovanja. Potencial vidimo v mešanici različnih vrst EO, pri čemer moramo biti pozorni tudi na morebitne sinergistične učinke.

## Literatura

- Angioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson J.D., Arlorio M., Dessi S., Coroneo V., Cabras P. 2004. Chemical Composition, Plant Genetic Differences, Antimicrobial and Antifungal Activity Investigation of the Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 11: 3530–3535
- Brauer V.S., Rezende C.P., Pessonni A.M., De Paula R.G., Rangappa K.S., Nayaka S.C., Gupta V.K., Almeida F. 2019. Antifungal Agents in Agriculture: Friends and Foes of Public Health. Biomolecules, 9, 10: 521
- Đorđević, M., Šević, M., Mijatović, M., Todorović, G., Kostić, M. 2012. In vitro effectiveness of different essential oils in control of *Alternaria Alternata*. Plant protection. 62. 159-168.
- Favn d.o.o., 2023. Rožmarin bio - analizni certifikat. <https://www.favn.si/naravna-etericna-olja/rozmarin-rosmarinus-officinalis> (21. dec. 2023)
- Goudjil M.B., Zighmi S., Hamada D., Mahcene Z., Bencheikh S.E., Ladjel S. 2020. Biological activities of essential oils extracted from *Thymus capitatus* (Lamiaceae). South African Journal of Botany, 128: 274–282
- Hmiri, S., Hicham, H., Mohamed, R. 2015. Antifungal activity of essential oils of two plants containing 1,8-cineole as major component: *Myrtus communis* and *Rosmarinus officinalis*. Journal of Materials and Environmental Science. 6. 2967-2974.
- Kalboush Z., Hassan A.A. 2019. Antifungal Potential and Characterization of Plant Extracts against *Fusarium fujikuroi* on Rice. Journal of Plant Protection and Pathology, 10, 7: 369–376
- Kraus D. 2014. Consolidated data analysis and presentation using an open-source add-in for the Microsoft Excel® spreadsheet software. Medical Writing, 23, 1: 25–28
- Li F.-Q., Toyazaki N., Yoshizawa T. 2001. Production of *Alternaria*

- Mycotoxins by *Alternaria alternata* Isolated from Weather-Damaged Wheat. *Journal of Food Protection*, 64, 4: 567–571
10. Microsoft Cooperation. Microsoft Excel <https://office.microsoft.com/excel> (19. dec. 2023)
11. Moumni M., Allagui M.B., Mezrioui K., Ben Amara H., Romanazzi G. 2021. Evaluation of Seven Essential Oils as Seed Treatments against Seedborne Fungal Pathogens of *Cucurbita maxima*. *Molecules*, 26, 8: 2354
12. Mravlje J., Kopač E., Kosovel H., Leskošek J., Regvar M. 2022. Potential of rosemary hydrosol for effective growth inhibition of fungi isolated from buckwheat grains. *Acta Biologica Slovenica*, 65, 1: 70–79
13. Omar, M., Kordali, S. 2019. Review of Essential Oils as Antifungal Agents for Plant Fungal Diseases. 294-301.
14. Özcan M.M., Chalchat J.-C. 2008. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59, 7–8: 691–698
15. Romoli J.C.Z., Silva M.V., Pante G.C., Hoeltgebaum D., Castro J.C., Oliveira da Rocha G.H., Capoci I.R.G., Nerilo S.B., Mossini S.A.G., Micotti da Gloria E., Svidzinski T.I.E., Graton Mikcha J.M., Machinski M. 2022. Anti-mycotoxigenic and antifungal activity of ginger, turmeric, thyme and rosemary essential oils in deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEA) producing *Fusarium graminearum*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 39, 2: 362–372
16. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 7: 671–675
17. Trail F. 2009. For Blighted Waves of Grain: *Fusarium graminearum* in the Postgenomics Era. *Plant Physiology*, 149, 1: 103–110



# Vpliv substrata na rast in razvoj navadnega fižola

Lia Kojič, Vid Terzer, Živa Trunkl, Ela Viher

Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Namen poskusa je raziskati vpliv različnih substratov na rast in razvoj navadnega fižola in sicer: zemlje za rože, glinene zemlje, peščene zemlje, vermikulita in kokosovih vlaken.
- V kontroliranih pogojih smo v vsakem substratu v treh lončkih gojili po tri sadike fižola. Vpliv substratov smo preverjali z opazovanjem rastlin, meritvami dolžine poganjkov in korenin, meritvami dejanske in potencialne fotokemične učinkovitosti, transpiracije ter meritvami sveže in suhe biomase poganjkov in korenin.
- Zaključimo lahko, da je zemlja za rože najbolj primeren substrat za uspevanje navadnega fižola zaradi večje vsebnosti hranil in ugodnih lastnosti zadrževanja vode. Manj primerni substrati za rast in razvoj so glinena zemlja, kokosova vlakna in vermikulit.

**Ključne besede:** biomasa, hranila, rastline, prst, poganjki, korenine

## Uvod

Navadni fižol (*Phaseolus vulgaris* L.) je enoletna kulturna rastlina, ki sicer izhaja iz Amerike, a jo že stoletja gojijo po celem svetu. Pogoji pod katerimi raste so zelo raznoliki, zato ni čudno, da se je razvilo veliko število sort (Graham in Ranalli 1997). Avtohtonih sort fižola se je v Sloveniji zaradi podnebne in reliefne pestrosti razvilo precej, do leta 2018 je bilo zabeleženih kar 20, med drugim: Prepeličar, Ribničan, Mandalon, Rjavi koks, Lišček idr. (Meglič s sod. 2018).

Navadni fižol je zelo pomembna kulturna rastlina. Ima visoko prehransko vrednost zaradi velike vsebnosti proteinov, vlaknin, vitaminov in mineralov. Ta stročnica je bogata s kalcijem, železom in cinkom, zato jo pogosto srečamo v vegetarijanski in veganski dieti, kjer teh hranil primanjkuje (Uebersax s sod. 2022). Potreba po pridelavi hrane zaradi vedno večje populacije ljudi raste, hkrati pa zaradi uporabe škodljivih kemičnih gnojil, slabše rodovitnosti prsti, onesnaženosti zraka ter bio-akumulacije (npr. kopičenja težkih kovin), količina pridelka pada (Bhattacharjee in Uppaluri 2023). Pridelava fižola je v primerjavi z ostalimi kulturnimi rastlinami veliko bolj trajnostna zaradi nižjega ogljičnega odtisa in simbiotske povezave z bakterijami rodu *Rhizobium*, ki so sposobne fiksacije dušika in posledično zmanjšane uporabe umetnih gnojil (Uebersax s sod. 2022).

Testiranje lastnosti tal, uravnateženo gnojenje, ustrezno namakanje ter pravilno upravljanje s tlemi so ključni dejavniki za zagotavljanje optimalne rasti in zdravja rastlin. Splošno velja, da rastline najbolje uspevajo v tleh z uravnateženo hranilno vsebnostjo, primerno strukturo, optimalno pH vrednostjo ter zadostno razpoložljivostjo vode (Brady in Weil 2016). Fizične lastnosti tal kot sta tekstura in poroznost, prav tako pomembno vplivajo na rast rastlin z zagotavljanjem razpoložljivosti vode in ustvarjanjem ugodnih pogojev za prodiranje korenin. Tla z dobro prezračeno in rahlo strukturo spodbujajo rast korenin ter omogočajo učinkovito vsrkavanje hranil. Nasprotno pa zbita tla z nizko stopnjo poroznosti omejujejo dostop do vode in hranil, kar lahko negativno vpliva na rast rastlin (Passioura 1991).

Glinena tla imajo visoko zadrževalno sposobnost, vendar so nagnjena k zastajanju vode, kar lahko ovira rast korenin in povzroči stres pri rastlinah. Nasprotno imajo peščena tla nizko zadrževalno sposobnost vode, kar lahko povzroči stres zaradi suše (Brady in Weil 2016). Vermikulit ima kot naravni mineral gline visoko kapaciteto za kationsko izmenjavo. Učinkovit je pri prevzemanju onesnaževalcev kot so težke kovine in tako prepreči, da bi le te prevzela rastlina (Malandrino s sod. 2011). Prav tako ima sposobnost vezave kalija, zato je rastlini dlje časa na voljo za prevzem (Alexiades in Jackson 1965). Kokosova vlakna se pogosto uporabljajo kot dodatek k substratu, saj le tega stabilizirajo (Ayininuola in Oladotun 2016). So rahlo kislja, porozna in ne vsebujejo veliko nutrientov, sploh magnezija, kalcija in dušika (Noguera s sod. 1997). Zemlja za rože je mešanica različnih materialov, ki jo prodajajo v trgovinah in je namenjena čim boljši rasti in razvoju rastlin. Natančne sestave naše zemlje za rože nismo pogledali.

Namen raziskave je bil preveriti, kako različni substrati vplivajo na rast in razvoj navadnega fižola. Substrati se med seboj razlikujejo v vsebnosti hranil, poroznosti in strukturi. Predpostavljamo, da fižol uspeva bolje v substratih, ki so bogatejši s hranili. Predpostavljamo, da bo fižol najbolj uspeval v zemlji za rože, najmanj pa v glineni zemlji.

## Materiali in metode

### Sajenje rastlin v različne substrate

Tri tedne stare sadike fižola, ki so predhodno kalile v vermikulitu, smo presadili v različne substrate. Uporabili smo kokosova vlakna, peščeno zemljo, glineno zemljo, vermikulit in običajno komercialno zemljo za rože. Za vsak substrat smo izvedli tri ponovitve, kar pomeni, da smo z vsakim izbranim substratom napolnili tri ločene lončke in v vsakem zasadili tri sadike fižola. Pri tem smo pazili, da so bile rastline v čim bolj primerljive po velikosti in vitalnosti. V začetni fazi poskusa smo dobro zalili vse skupine, dokler nismo substrata popolno nasičili z vodo.

### Potek poskusa in spremljanje rasti rastlin

Rast rastlin smo redno spremljali v rastni komori, kjer smo vse lončke izpostavili enakim pogojem - vlagi, temperaturi, svetlobi in količini vode. Temperatura v komori je bila čez dan 22 °C, ponoči pa 18 °C. Vlažnost je bila 60 %. Svetlobni cikel je bil nastavljen na 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Vse rastline smo zalivali z destilirano vodo, pri čemer smo upoštevali tedenski urnik z 50 mL vode dvakrat na teden. Edina spremenljivka, ki naj bi vplivala na rast, je bil substrat, v katerega smo posadili fižol. Višino rastlin smo merili od zemlje do vrha poganjka in kasneje cveta, pri tistih, ki so zacvetele. Višino smo zabeležili enkrat tedensko v obdobju enega meseca rasti.

### Meritve fotokemične učinkovitosti

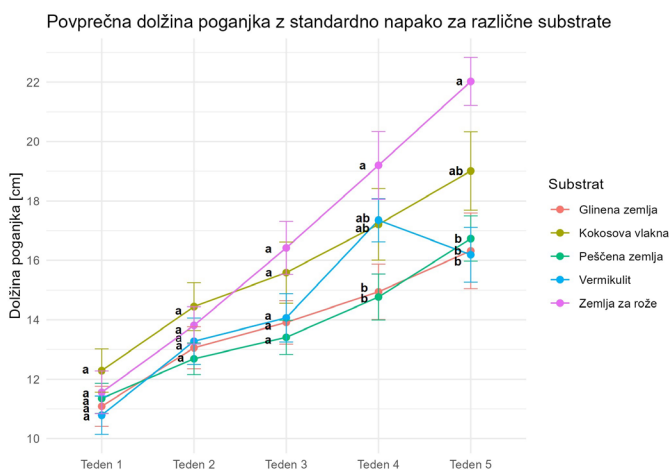
V 4. tednu poskusa smo na petih listih rastlin vsakega substrata izmerili fotokemično aktivnost s pomočjo fluorometra PAM-2500. Izmerili smo potencialno in za tem še dejansko fotokemično učinkovitost. Potencialno fotokemično učinkovitost smo izmerili tako, da smo najprej za 15 minut z zatemnitvenimi sponkami prekrili del lista, kjer ni bilo glavne žile in nato izmerili. Pri merjenju dejanske fotokemične učinkovitosti smo zatemnitveni del izpustili. Meritve smo za vsak substrat izvedli na petih rastlinah pri tem smo gledali, da je bila v vsakem lončku izvedena vsaj ena meritev. Ekstremni vrednosti smo izključili.

### Meritve transpiracije

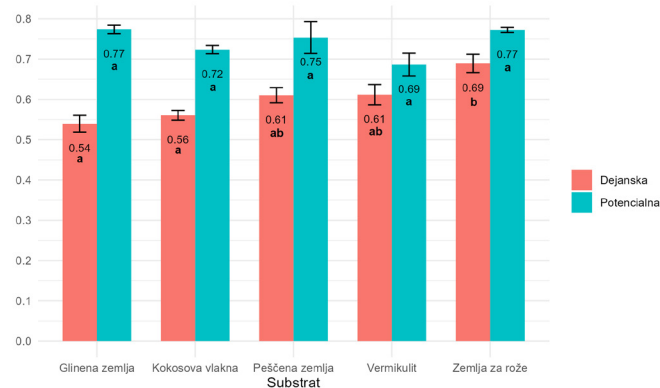
V 4. tednu poskusa smo na petih listih rastlin vsakega substrata izmerili transpiracijo s pomočjo porometra (SC-1 porometer, Decagon Devices, Inc.). Ekstremni vrednosti vsakega substrata smo izločili. Izbrana je bila vsaj rastlina iz vsakega lončka, izbrali pa smo najmlajše docela razvite liste.

### Analiza sveže in suhe biomase

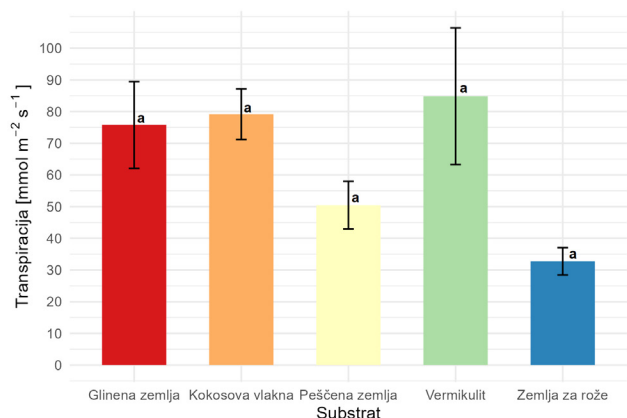
Po štirih tednih smo poskus razdrli, rastline smo odstranili iz lončkov, jih očistili ostankov substrata in izmerili dolžino poganjkov ter korenin. S škarjami smo ločili poganjke od korenin in vsak del vsake rastline stehali ter tako določili svežo biomaso rastlin. Vse poganjke in korenine smo posebej zavili v aluminijasto folijo in jih tri dni sušili v sušilniku na 60 °C ter nato postopek tehtanja ponovili. Tako smo določili še suho biomaso rastlin.



Slika 1: Povprečna dolžina poganjkov fižola skozi 5 tednov (v cm) s standardno napako v različnih substratih (n=9). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med posameznimi substrati znotraj posameznega tedna opazovanja (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak posthoc test,  $p < 0,05$ ).



Slika 2: Povprečna vrednost dejanske in potencialne fotokemične učinkovitosti s standardno napako za posamezne substrate (n=5). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med posameznimi substrati (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak posthoc test,  $p < 0,05$ ).



Slika 3: Povprečna transpiracija navadnega fižola s pripadajočo standardno napako (n=3), v različnih substratih. Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med posameznimi substrati (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak posthoc test,  $p < 0,05$ ).

Tabela 1: Povprečne vrednosti dolžine korenin (v cm) s standardno napako v različnih substratih (n=9). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami/substrati (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak posthoc test,  $p < 0,05$ ).

Substrat	Povprečje [cm]	Standardna napaka [cm]
Zemlja za rože	24,5a	3,4
Glinena zemlja	22,4a	1,3
Kokosova vlakna	23,4a	1,6
Peščena zemlja	23,8a	2,2
Vermikulit	29,8a	1,5

## Statistična analiza

Podatke smo zabeležili v excelovo tabelo in v programu R-studio (Posit team, 2023) izvedli enosmerno analizo variance (ANOVA) s Holm-Sidak posthoc testom. Kot statistično značilno različne smo smatrali vrednosti  $p < 0,05$ .

## Rezultati

### Dolžina poganjkov

Razvoj fižola smo spremljali z merjenjem poganjkov sadik (Slika 1). Rast poganjkov je bila od četrtega tedna dalje v peščeni zemlji (PZ) in glineni zemlji (GZ) počasnejša kot v zemlji za rože (ZR). Na koncu poskusa je bila razlika med rastlinami z najdaljšimi poganjki (ZR) in rastlinami z najkrajšimi poganjki (PZ, GZ in vermikulit (VE)) približno 5 cm. Najkrajši poganjki na koncu poskusa so v VE, kjer se je višina poganjkov v enem tednu zmanjšala. Rastline, ki so rastle v kokosovih vlaknih (KV) se ves čas rasti niso razlikovale niti od tistih, ki so rastle v ZR, niti od ostalih substratov, kjer so rastline rastle slabše. Nenavaden padec povprečne dolžine poganjkov med 4. in 5. tednom pri skupini, ki je rastle v VE, je posledica lomljenja poganjkov, s čemer smo imeli težave ob zadnjem merjenju višine.

### Dolžina korenin

Po končanem poskusu smo izmerili tudi dolžine korenin (Tabela 1), vendar razlik med njimi nismo opazili.

### Fotokemična učinkovitost

Uspešnost razvoja rastlin smo ovrednotili tudi z meritvami fotokemične učinkovitosti (Slika 2). Sadike v različnih substratih se v potencialni fotokemični učinkovitosti niso statistično značilno razlikovale. Smo pa zaznali razlike v dejanski fotokemični učinkovitosti, ki je bila najvišja pri fižolah, ki so rastle v ZR, najnižja pa pri tistih v GZ in KV.

## Transpiracija

Pri rastlinah v različnih substratih smo izmerili tudi transpiracijo (Slika 3). Vrednosti so se gibale od 25,9 do 111,8 mmol/m<sup>2</sup>s, vendar pa zaradi velike variabilnosti meritev nismo zaznali statistično značilnih razlik med skupinami.

## Biomasa

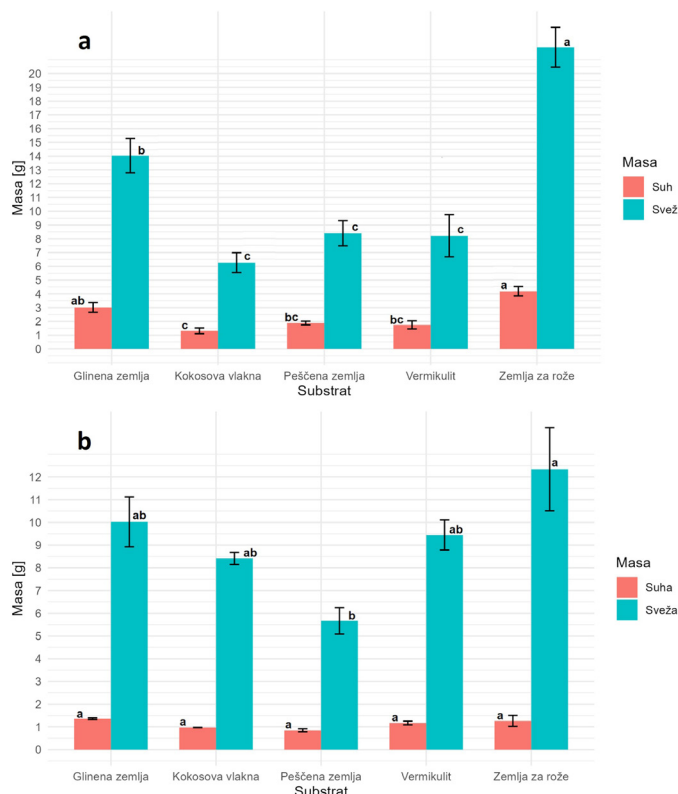
Med različnimi substrati smo primerjali svežo in suho biomaso poganjkov ter korenin (Slika 4). Rastline, ki so rasle v ZR so imele najvišjo povprečno svežo biomaso poganjkov, sledile so tiste v GZ, najmanjšo svežo biomaso pa so imeli poganjki v KV, PZ in VE (Slika 4a). Razlike v suhi biomasi poganjkov so bile manj izrazite, najvišjo so imeli poganjki v ZR, najnižjo pa poganjki v KV. Podoben vzorec se pojavi pri sveži masi korenin rastlin (Slika 4b), vendar je pri njih statistično večja samo masa korenin gojenih v ZR od tistih gojenih v PZ. Statističnih razlik med masami suhih korenin ni bilo.

Ob koncu poskusa lahko na listih vseh substratov opazimo razbarvanje (Slika 5). Najbolj rumene liste opazimo pri fižolih, ki so rasli v KV in VE, medtem ko pri GZ, ZR in PZ opazimo svetlo razbarvanje listov (kloroza) samo pri spodnjih listih in na mestih, kjer se nahajajo žile.

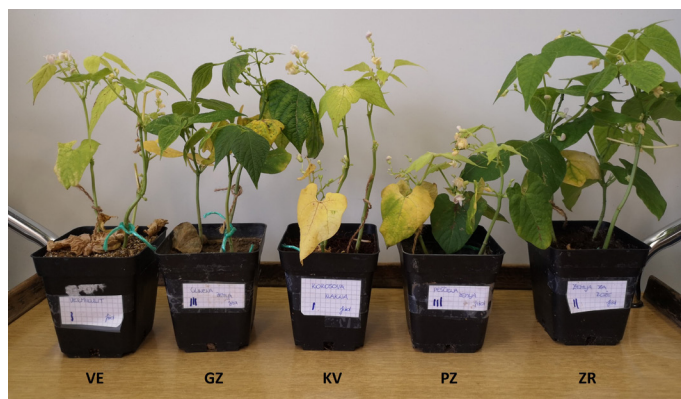
## Diskusija

Večja prisotnost hranil v substratu običajno pomeni večjo rast in razvoj sadik navadnega fižola. Še posebej omejujoča elementa za rast poganjkov in korenin navadnega fižola sta dušik in fosfor (Henriksen s sod. 2002). Glede na rezultate, dobljene v poskusu, lahko sklepamo, da je največ primernih hranil imela ZR. V ZR smo opazili boljšo rast poganjkov. Slabše pa so rastle predvsem sadike v PZ, GZ in VE. Nenavaden padec povprečne velikosti sadik v VE je posledica lomljenja zgornjih delov poganjkov s čemer smo ob zadnjem merjenju imeli težave. Da je bilo v ZR največ hranil, potrjuje tudi največja sveža biomasa poganjkov v primerjavi z ostalimi substrati ter suha biomasa poganjkov, ki je bila večja od vseh ostalih substratov, z izjemo glinene zemlje, v kateri suha biomasa ni bila statistično značilno različna od ZR. V biomasi korenin razlik med substrati, z izjemo sveže biomase korenin med ZR in PZ, nismo zaznali. Razlika v biomasi svežih korenin ZR in PZ bi lahko bila posledica razlike v dostopnosti hranil v teh substratih saj ZR vsebuje bistveno več hranil kot PZ. Visoka poroznost vode v PZ bi tudi lahko bila razlog za manjšo svežo biomaso korenin v tem substratu.

Pomanjkanje potrebnih hranil v substratu vodi do povečanja transpiracije rastlin (Cramer s sod. 2008). Prisotnost majhne količine dušika v substratu bližnje okolice korenin povzroči uravnavanje pretoka vode po rastlini z masnim tokom s pomočjo transpiracije. Ko je masni tok povečan, pritegne večje količine raztopljenih spojin h koreninam, da omogoči zadostno oskrbo rastline s hranili (Naku s sod. 2019). Manjšo transpiracijo bi tako pričakovali v substratih, kjer je dušika in ostalih elementov dovolj. Med meritvami transpiracije navadnega fižola v našem poskusu ni prišlo do nobenih statističnih razlik, zato bi na podlagi tega lahko sklepali, da je količina dušika v vseh substratih približno enaka. Na najboljše rezultate meritev fotokemične učinkovitosti. Pri potencialni razlik sicer nismo zaznali, v primeru dejanske fotokemične učinkovitosti, pa je bila ta značilno boljše v primeru ZR kot pa



Slika 4: Povprečna sveža in suha masa poganjkov (a) ter korenin (b) navadnega fižola v gramih s pripadajočo standardno napako (n=3), v različnih substratih. Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med posameznimi substrati (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak posthoc test,  $p < 0,05$ ). Izgled rastlin



Slika 5: Rastline navadnega fižola v različnih substratih ob koncu poskusa. Od leve proti desni: VE – vermikulit; GZ – glinena zemlja, KV – kokosova vlakna, PZ – peščena zemlja in ZR – zemlja za rože.

pri GZ in KV. Nižja vrednost fotokemične učinkovitosti lahko kaže na prisotnost stresnih dejavnikov (Chen s sod. 2022). Ko korenine rastlin naletijo na del substrata, kjer je hranil več, lahko opazimo predvsem lateralno razvejanost koreninskega sistema. Nadaljnja rast v dolžino bi tako lahko nakazovala nadaljnje iskanje hranil (Hodge 2004). Na rast korenin vplivajo tudi drugi dejavniki: zbitost substrata, njegova poroznost in agregiranje. Glineni delci skupaj s humusom (organsko-mineralni skupki) delujejo kot glavni vezivni elementi, ki zbijajo substrat. Podoben vpliv imajo prosti železovi in aluminijevi



oksidi, ki jih najdemo v substratih z manj organske snovi (Kodešová s sod. 2009). Zaradi zbitosti GZ bi lahko v tem substratu pričakovali slabšo rast korenin. Ravno obratno bi najdaljše korenine pričakovali v VE zaradi poroznosti substrata, ki bi omogočil lažjo rast korenin pri iskanju hranil, ki jih je v VE malo. Razlik v dolžini korenin med različnimi substrati v naši raziskavi ni bilo. Prav tako je potrebno omeniti, da smo pri razdiranju poskusa naleteli na težave, saj so bile korenine močno prepletene in so se trgale, ko smo poskušali odstraniti čim več substrata.

Glede na izgled rastlin preden smo poskus razdrli, bi rekli, da so substrati VE, KV in PZ najmanj primerni za rast navadnega fižola. Na večini njihovih listov opazimo znake kloroze: porumenelost celotne površine listov ali le dela in bledenje stebel. Kloroza je posledica pomanjkanja hranil, ki so nujna za proces fotosinteze (McCauley s sod. 2009). Prav tako pri sadikah v teh substratih opazimo manjše število listov, saj jih je veliko odpadlo. V GZ in ZR tudi opazimo znake kloroze, vendar samo na posameznih starejših listih. Simptomi, ki se najprej pojavijo v spodnjem delu rastlin, torej v starejših listih, so posledica pomanjkanja mobilnih hranil kot so dušik (N), fosfor (P), kalij (K), klor (Cl) in magnezij (Mg). Nasprotno delujejo nemobilna hranila kot so bor (B), kalcij (Ca), baker (Cu), železo (Fe), mangan (Mn), nikelj (Ni) in žveplo (S) (McCauley s sod. 2009). Na privzem mobilnih hranil kot sta P in N vpliva substrat. Manj kot je substrat zbit in agregiran, bolj razvejan je koreninski sistem in več hranil lahko rastlina privzame (Wiersum 1962). Ker je agregacija substrata v GZ velika, je kloroza v starejših listih najverjetneje posledica pomanjkanja P in N. Razlog za izgled sadik v VE, KV in PZ bi lahko pripisali splošnemu pomanjkanju hranil v teh substratih skozi daljše časovno obdobje večih tednov. Problem peščenih substratov pa je predvsem, da ne zadržujejo vode in hranil (Osman 2018). Glede na večino merjenih znakov (z izjemo biomase) bi lahko zaključili, da v splošnem najslabši substrat za rast in razvoj navadnega fižola predstavlja GZ.

## Zaključek

V naši raziskavi smo ugotovili, da je najboljši substrat za gojenje navadnega fižola, zemlja za rože. V tem substratu so rastline najboljše rastle in se razvijale, kar potrjujejo vsi statistično značilni rezultati. Našo prvo hipotezo smo tako potrdili. Sklepali smo, da bo rastlina najslabše uspevala v glineni zemlji, kar so naše meritve delno pokazale, vendar zaradi neskladnosti različnih meritev tega ne moremo potrditi. Za več zaključkov bi bilo potrebno poskus spremeniti in izvesti dodatne raziskave. Smiselno bi bilo povečati število rastlin, spremeniti pogoje v katerih so rastline rastle ter nasploh podaljšati čas poskusa. Rast skozi daljše časovno obdobje bi pomenilo razlikovanje v večih parametrih, ki bi jih lahko spremljali, kot tudi večje razlike v posameznem parametru. Prav tako bi bilo smiselno izvesti dodatne analize kot je analiza mikrobioma tal, analiza fotosintetskih pigmentov in kemičnih lastnosti ter vsebnosti organskih snovi posameznega substrata.

## Literatura

- Ayininuola G, Oladotun P, 2016. Geotechnical Properties of Coconut Coir Fiber Soil Mixture. *Journal of Civil Engineering Research* 6, 79-85
- Alexiades C, Jackson M, 1965. Quantitative Determination of Vermiculite in Soils. *Soil Science Soc of Amer J* 29, 522–527.
- Bhattacharjee U, Uppaluri RVS, 2023. Growth and Nutritional Characteristics of *Phaseolus Vulgaris* and Jeevamrutha Bio-Fertilizer-Vermicompost System. *Bioresource Technology Reports* 22 (Junij): 101416.
- Brady WRR, Nyle C, Weil RR. 2016. *The Nature and Properties of Soils*. Fifteenth edition. Pearson. London. Velika Britanija
- Chen Z, Liu Z, Han S, Jiang H, Xu S, Zhao H, Ren S, 2022. Using the diurnal variation characteristics of effective quantum yield of PSII photochemistry for drought stress detection in maize. *Ecological Indicators* 138, 108842.
- Cramer MD, Hoffmann V, Verboom GA, 2008. Nutrient availability moderates transpiration in *Ehrharta calycina*. *New Phytologist* 179, 1048–1057.
- Graham PH, Ranalli P, 1997. Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Field Crops Research* 53, 131–46.
- Henriksen I, Michelsen A, Schlönvoigt A, 2002. Tree species selection and soil tillage in alley cropping systems with *Phaseolus vulgaris* L. in a humid premontane climate: biomass production, nutrient cycling and crop responses. *Plant and Soil* 240, 145–159.
- Hodge A, 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* 162, 9–24.
- Kodešová R, Vignozzi N, Rohošková M, Hájková T, Kočárek M, Pagliai M, Kozák J, Šimůnek J, 2009. Impact of varying soil structure on transport processes in different diagnostic horizons of three soil types. *Journal of Contaminant Hydrology* 104, 107–125.
- Malandrino M, Abollino O, Buoso S, Giacomino A, La Gioia C, Mentasti E, 2011. Accumulation of heavy metals from contaminated soil to plants and evaluation of soil remediation by vermiculite. *Chemosphere* 82, 169–178.
- McCauley A, Jones C, Jacobsen J. 2009. *Plant Nutrient Functions and Deficiency and Toxicity Symptoms*. [https://mtvernon.wsu.edu/path\\_team/Plant-Nutrient-Functions-and-Deficiency-and-Toxicity-Symptoms-MSU-2013.pdf](https://mtvernon.wsu.edu/path_team/Plant-Nutrient-Functions-and-Deficiency-and-Toxicity-Symptoms-MSU-2013.pdf) (4.1.2024)
- Meglič V, Sinkovič E, Pipan B, Sinkovič L, 2018. Naš fižol: zbirka navadnega (*Phaseolus vulgaris* L.) in turškega fižola (*Phaseolus coccineus* L.) v Sloveniji. Ljubljana: Kmetijski inštitut Slovenije. Slovenija
- Meisl T, Dubský M, Šrámek F, Nečas T, 2013. The effect of clay amendment on substrate properties and growth of woody plants. *Acta Univ. Agric. Silv. Mendelianae Brun.* 60, 163–170.
- Naku M, Kambizi L, Matimati I, 2019. Functional roles of ammonium (NH<sup>4+</sup>) and nitrate (NO<sup>3-</sup>) in regulation of day- and night-time transpiration in *Phaseolus vulgaris*. *Functional Plant Biol.* 46, 806.
- Noguera P, Abad M, Puchades R, Noguera V, Maquieira A, Martinez J, 1997. Physical and chemical properties of coir waste and their relation to plant growth. *Acta Hort.* 450, 365–374.
- Osman K, 2018. *Sandy Soils, Management of Soil Problems*. Springer International Publishing, Cham. Basel. Švica
- Passioura JB, 1991. *Soil Structure and Plant Growth*. *Soil Research*. 29, 717.
- Posit team, 2023. *RStudio: Integrated Development Environment for R*.
- Tanaka A, Fujita K, 1979. Growth, Photosynthesis and Yield Components in Relation to Grain Yield of the Field Bean. *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University* 59, 145–238.
- Uebersax, Mark A, Cichy KA, Gomez FE, Porch TG, Heitholt J, Osorno JM, Kamfwa K, Snapp SS, Bales S, 2023. Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a Vital Component of Sustainable Agriculture and Food Security—A Review. *Legume Science* 5 (1): e155
- Wiersum L, 1962. Uptake of nitrogen and phosphorus in relation to soil structure and nutrient mobility. *Plant Soil* 16, 62–70



# Vpliv substrata na rast in razvoj koruze

Hana Suchy, Veronika Zala Štok, Tina Verhnjak, Eva Zajec, Anja Zupanc

Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Namen raziskave je bil ugotoviti, kako različne vrste substratov vplivajo na rast in razvoj poganjkov in korenin koruze ter kako vplivajo na stopnjo fotokemične učinkovitosti in transpiracijo le-teh.
- Sadike koruze smo posadili v pet različnih substratov in z meritvami dolžin poganjkov pet nadaljnjih tednov spremljali njihovo rast ter spremembe v obarvanosti in strukturi listov. Po treh tednih od začetka poskusa smo rastlinam izmerili fotokemično učinkovitost in stopnjo transpiracije listov ter po petem tednu še svežo in suho biomaso poganjkov ter korenin.
- Po izmerjeni višini poganjkov ter suhi in sveži masi poganjkov in korenin so prednjačile rastline, posajene v zemlji za rože, medtem ko smo pri rastlinah, posajenih v glineni zemlji, izmerili najučinkovitejšo transpiracijo. Najboljšo fotokemično učinkovitost so imele rastline, posajene v zemlji za rože in v glineni zemlji. Poganjki rastlin, ki so rasli v vermikulitu in kokosovih vlaknih, so poleg slabše rasti in manjše transpiracije z vijolično obarvanostjo listov izkazali tudi simptome mineralnega pomanjkanja.
- Kot najugodnejša substrata za rast in razvoj rastlin sta se izkazala zemlja za rože ter glinena zemlja, saj sta oba substrata humusno bogata in dobro zadržujeta vodo. Kot manj ugodni substrati za rast koruze so se izkazali kokosova vlakna, vermikulit in peščena zemlja.

**Ključne besede:** mineralna prehrana, zadrževanje vode, biomasa, transpiracija, fotokemična učinkovitost

## Uvod

Koruza (*Zea mays* L.) izvira iz Mehike ter poleg pšenice in riža predstavlja eno izmed treh svetovno najpomembnejših poljščin, saj služi kot hrana za ljudi in krma za živali, pomembna pa je tudi v farmacevtski in industrijski proizvodnji (Huang s sod. 2006). Zemlja kot primarni vir hranil rastlinam zagotavlja fizično podporo, zadostno količino anorganskih hranil in vode ter ustrezno okolje za razvoj koreninskega sistema, zato je razumevanje kemijskih in fizikalnih lastnosti različnih vrst zemlje ključnega pomena za načrtovanje pridelave poljščin (Raven 2005).

Pomembne kemijske in fizikalno-kemijske lastnosti zemlje so njen pH, hitrost razgradnje organske snovi, pufrska in izmenjevalna kapaciteta, sposobnost zadrževanja hranil in vsebnost soli. Pomembni fizikalni lastnosti pa sta dostopnost vode in količina ter razporeditev zraka v predelu korenin (Verdonck 1982). Rastlina iz zraka in vode dobi ogljik, kisik in vodik, ki so nemineralna esencialna hranila, medtem ko esencialna makrohranila, kot so dušik, fosfor, kalij, kalcij, magnezij, žveplo, bor, klor, baker, železo, mangan, molibden in cink, rastlina dobi iz mineralov in organskih snovi iz zemlje (Uchida 2000).

Glina je naravni material, večinoma sestavljen iz mineralov. Trdni delci so grobi, v velikosti nekaj milimetrov in vsebujejo organske in mineralne snovi, poleg teh delcev pa so v glineni zemlji še koloidni delci s premerom, manjšim od enega mikrona. Organski koloidni delci so v večini humusni. Glavne značilnosti glinene zemlje so velika kationska izmenjevalna sposobnost, sposobnost spremembe stanja glede na vsebnost vode, katalitske sposobnosti in nizka prepustnost (Al-saeedi 2022).

Za razliko od glinene ima peščena zemlja visoko prepustnost vode in plinov, nizko koncentracijo organskega ogljika in nizko kationsko izmenjevalno kapaciteto. Za vzdrževanje produktivnosti pridelkov v peščenih zemljah je običajno potrebna uporaba organskih in anorganskih gnojil ter namakanje (Kraft s sod. 2012).

Vermikulit je naravni mineral gline (Abollino s sod. 2007) in spada med neorganske rastne medije (Verdonck 1982). Zaradi svoje plastovite strukture ima dobro absorpcijsko kapaciteto in kapaciteto za izmenjavo kationov (Rama s sod. 2019). Prisotnost vermikulita v tleh je pomembna, ker začasno veže kalij in upočasni njegovo izpiranje ter s tem rastlinam zagotavlja zalogo dostopnega kalija (Alexiades in Jackson 1965).

Kokosova vlakna se že dolgo časa povsod po svetu uporabljajo kot nadomestek šote za gojenje rastlin v loncih (Meerow 1994). So lahka in imajo visoko poroznost ter rahlo kisel pH. Vsebujejo veliko zraka, sposobnost zadrževanja vode pa je nizka (Noguera 1997).

Pogosto se za gojenje rastlin v loncih uporabljajo substrati oziroma t.i. »zemlja za rože«, ki je sestavljena iz mešanice organskih materialov, kot je šota ali borovo lubje in iz anorganskih snovi kot je perlit, vermikulit ali pesek (Havis 1981).

Namen naše raziskave je bil testirati vpliv različnih substratov (vermikulita, glinene zemlje, peščene zemlje, kokosovih vlaken in zemlje za rože) na rast in razvoj ter fiziološke parametre pri koruzi.

Glede na zastavljeno raziskavo sta bili hipotezi sledeči:

- Rastline bodo najbolj rasle in se razvijale v zemlji za rože

in najslabše v kokosovih vlaknih.

- Med posameznimi substrati bodo razlike v rasti in razvoju rastlin.

## Materiali in metode

Sajenje rastlin v različne substrate

Spremljali smo rast in razvoj rastlin koruze v odvisnosti od različnih substratov. Uporabili smo pet različnih substratov: zemljo za rože (ZR), vermikulit (V), peščeno zemljo (PZ), glineno zemljo (GZ) in kokosova vlakna (KV). Za vsak substrat smo uporabili tri cvetlične lonce, v vsak lonec pa smo presadili tri sadike koruze, ki so bile predhodno tri tedne kaljene na 16/8-urnem dnevno-nočnem ciklu in temperaturi 22 °C (podnevi) in 18 °C (ponoči) pri 60 % zračni vlagi.

## Zalivanje

Takoj po presaditvi smo sadike zalili tako, da smo substrat prepojili z vodo, dokler ni ta začela odtekati iz lonca. Nadaljnjih pet tednov smo rastline zalivali na 3 do 4 dni, vsak lonec s 100 mL destilirane vode. Rastline so bile ves čas poskusa v rastni komori pri zgoraj navedenih pogojih.

Spremljanje rasti in razvoja rastlin, simptomov pomanjkanja Višine poganjkov posameznih rastlin smo prvič izmerili po 7 dneh po zasaditvi, nato pa na vsakih 7 dni prihodnjih pet tednov. Ob vsakem merjenju smo si zabeležili tudi barve in morebitna suha področja listov koruze, ki lahko nakazujejo na pomanjkanje mineralov.

## Meritve fotokemične učinkovitosti

Po treh tednih od začetka poskusa smo izmerili fotokemično učinkovitost petih rastlin iz vsakega substrata. Z zatemnitvenimi zaponkami smo prekrili del lista, preko katerega ni potekala glavna žila, in po 15 minutah s fluorometrom (PAM2500) po navodilih proizvajalca (Walz 2020) izmerili potencialno fotokemično učinkovitost (Fv/Fm). Nato smo z isto napravo po navodilih proizvajalca izmerili še dejansko fotokemično učinkovitost (Y) listov na svetlobi. Za vsakega izmed substratov smo opravili pet meritev.

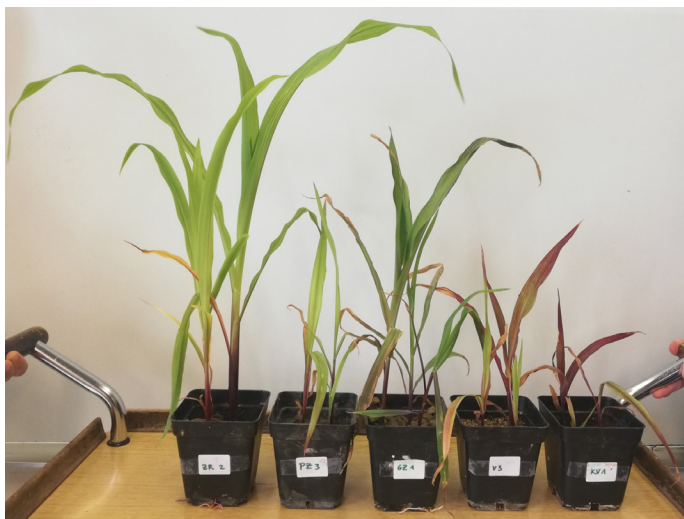
## Meritve stopnje transpiracije

Prav tako smo po treh tednih od začetka poskusa na spodnji strani listov, kjer se nahajajo listne reže, s porometrom (SC-1 Leaf Porometer) po navodilih proizvajalca (Meter Group 2016) izmerili stopnjo transpiracije treh rastlin iz vsakega substrata.

## Merjenje dolžin in tehtanje sveže mase in suhe biomase poganjkov in korenin

Ob koncu poskusa smo vse tri rastline koruze iz posameznega lonca previdno ločili od zemlje in izmerili dolžine poganjkov ter dolžine iztegnjenih najdaljših korenin. Nato smo svežo biomaso korenin in poganjkov rastlin iz posameznega lonca tudi tehtali. Po končanih meritvah smo vse poganjke in korenine narahlo zavili v aluminijasto folijo in jih tri dni sušili v sušilniku na 60 °C, da smo pridobili posušene rastline iz vsakega lonca, ki smo jim tehtali še suho biomaso korenin in poganjkov.

Statistična analiza in vizualizacija podatkov  
Meritve smo vnesli v program Microsoft Excel (različica 2312 build 16.0.17126.20132) (Microsoft Corporation 2018), nato pa tabele s podatki uvozili v program R (4.3.2) (R Core Team



Slika 1. Rastline koruze (*Zea mays* L.) po petih tednih rasti v različnih substratih. Z leve proti desni si sledijo: ZR – zemlja za rože, PZ – peščena zemlja, GZ – glinena zemlja, V – vermikulit ter KV – kokosova vlakna. Številke označujejo številke loncev posameznega substrata (za namene fotografiranja je bil izbran le po 1 lonec na skupino).

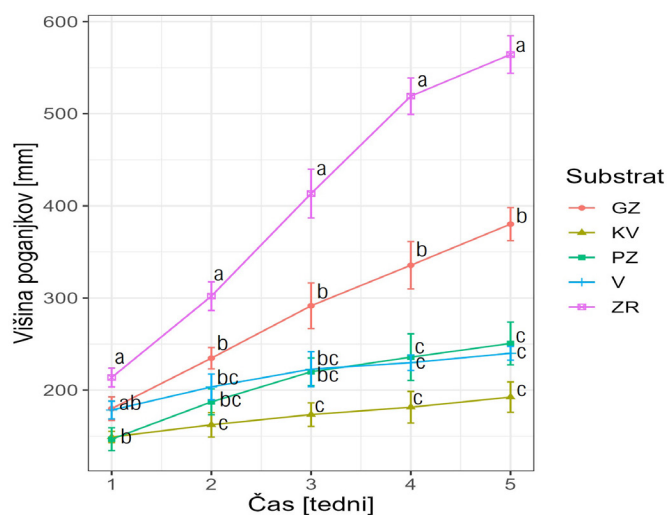
2018) oz. RStudio (23.09.1) (RStudio Team 2020). V R-u smo podatke najprej obdelali tako, da smo pri višini poganjkov, dolžini korenin in masi izračunali povprečno vrednost vsakega lonca, nato pa smo naprej računali z dobljenimi povprečnimi vrednostmi; pri meritvah fotokemične učinkovitosti smo izločili ekstremni meritvi vsake skupine (minimum in maksimum). Nato smo za vsako vrsto meritev izvedli enosmerno analizo variance oz. ANOVA pri  $p$ -vrednosti  $< 0,05$  in v primeru, da je ANOVA potrdila razlike med skupinami, še Tukeyev post-hoc test. Podatke smo vizualizirali z orodjem ggplot2 (3.4.4) (Wickham 2016).

## Rezultati

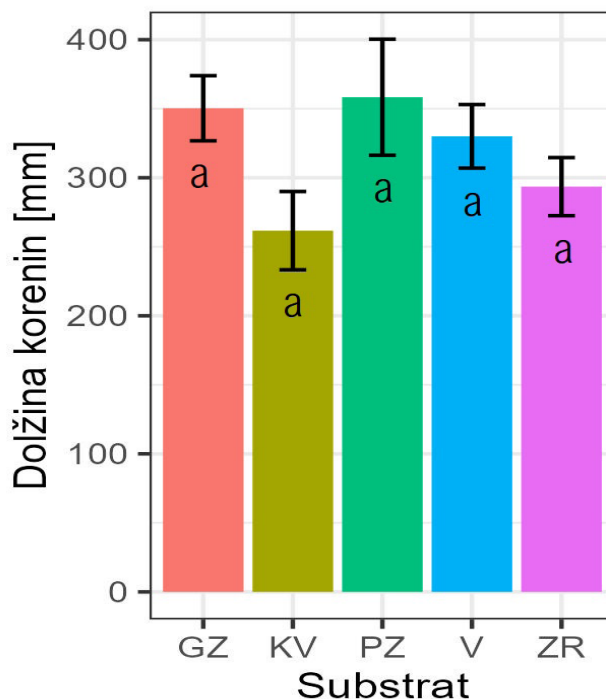
Pri rastlinah, rastočih v kokosovih vlaknih, smo po petih tednih rasti opazili izrazito škrlatno obarvanost listov oz. celotnih poganjkov (Slika 1). Škrlatna barva listov je bila opazna tudi pri rastlinah, rastočih v vermikulitu, a je bila obarvanost manj intenzivna kot pri tistih v kokosovih vlaknih. Rdečkaste odtenke je bilo redkeje opaziti na rastlinah, ki so rasle v zemlji za rože, peščeni ali glineni zemlji. Opazili smo korelacijo med škrlatno obarvanostjo rastlin in velikostjo poganjkov; več kot je bilo rdečkastih odtenkov, nižji so bili poganjki.

Najvišje poganjke smo ob koncu poskusa izmerili pri rastlinah posajenih v zemlji za rože, najmanjše pa v kokosovih vlaknih, vermikulitu in peščeni zemlji, med katerimi ni bilo statistično pomembnih razlik (Slika 2). Rastline so v zemlji za rože sicer že od samega začetka poskusa rasle najboljše in se razlikovale od ostalih skupin. Med ostalimi substrati v prvih tednih opazovanja ni bilo opaznejših razlik, od 3. tedna dalje pa so rastline v glineni zemlji rasle bolje od preostalih substratov (peščena zemlja, vermikulit in kokosova vlakna), v katerih so rastline rasle najslabše.

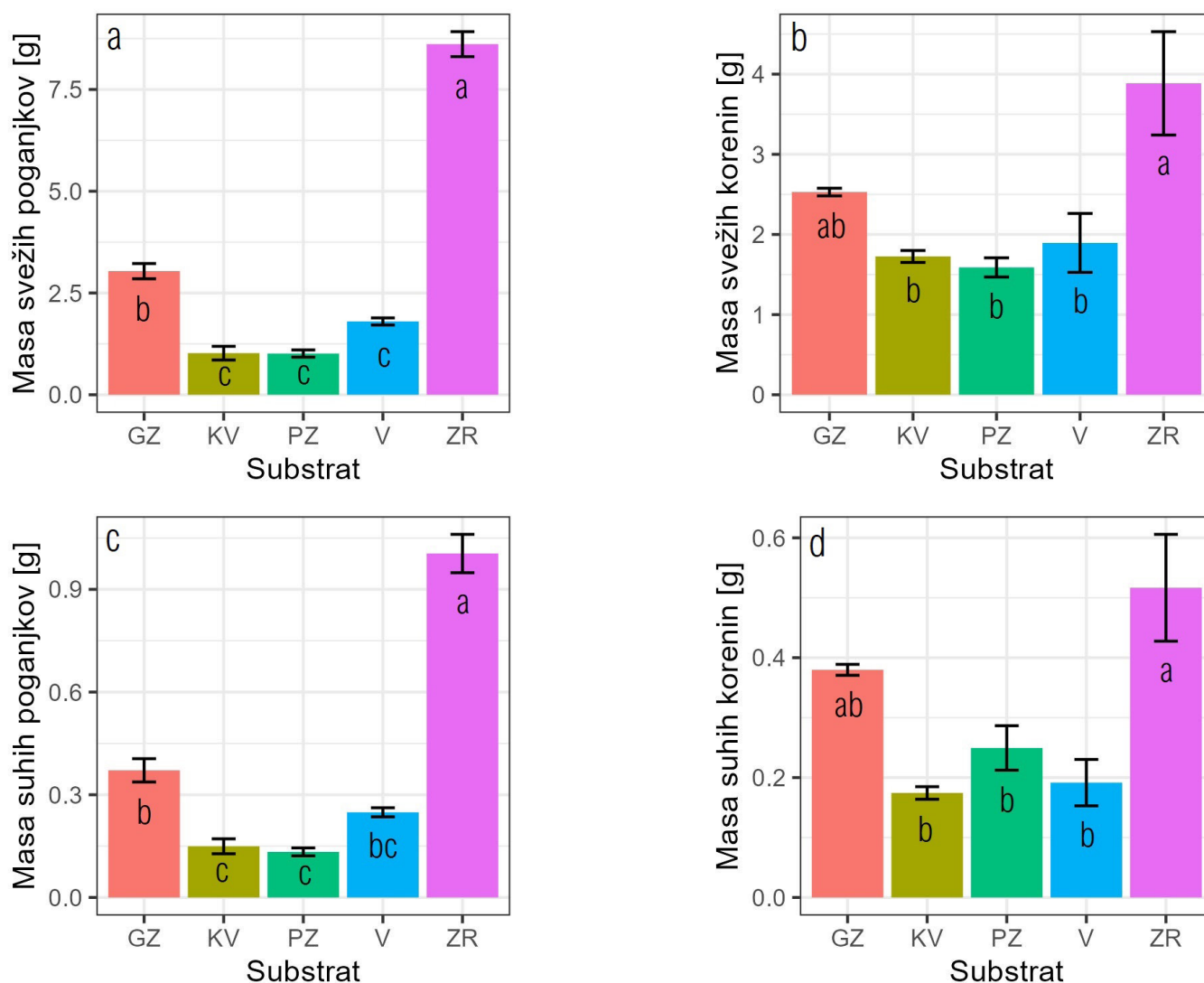
Ob koncu poskusa nismo zaznali statistično pomembnih razlik v dolžini korenin med posameznimi skupinami ( $p = 0,169$ ) (Slika



Slika 2. Višina poganjkov koruze glede na vrsto substrata skozi čas. Točke na grafu predstavljajo povprečje višin poganjkov znotraj posameznega substrata, označena je tudi standardna napaka ( $N = 15$ ). GZ – glinena zemlja, KV – kokosova vlakna, PZ – peščena zemlja, V – vermikulit, ZR – zemlja za rože. Male tiskane črke ob posameznih točkah na grafu označujejo skupine, med katerimi so se v določenem tednu izkazale statistično pomembne razlike (enosmerna ANOVA, Tukeyev post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



Slika 3. Dolžina korenin koruze glede na vrsto substrata. Višina stolpcev predstavlja povprečje dolžin korenin iz posameznega substrata, označena je tudi standardna napaka ( $N = 15$ ). GZ – glinena zemlja, KV – kokosova vlakna, PZ – peščena zemlja, V – vermikulit, ZR – zemlja za rože. Male tiskane črke na grafu označujejo skupine, med katerimi so statistično pomembne razlike (enosmerna ANOVA, Tukeyev post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



Slika 4. Masa svežih poganjkov (a) in korenin (b) ter suhih poganjkov (c) in korenin (d) koruze glede na vrsto substrata. Višina stolpcev predstavlja povprečno maso posameznega poganjka oz. korenine iz posameznega substrata, označena je tudi standardna napaka (N = 15). GZ – glinena zemlja, KV – kokosova vlakna, PZ – peščena zemlja, V – vermikulit, ZR – zemlja za rože. Male tiskane črke na grafu označujejo skupine, med katerimi so statistično pomembne razlike (enosmerna ANOVA, Tukeyev post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

3). Največjo svežo maso poganjkov smo izmerili pri rastlinah, ki so rasle v zemlji za rože (Slika 4a). Najmanjšo svežo maso pa so imele rastline, ki so rasle v vermikulitu, peščeni zemlji in v glineni zemlji, med katerimi ni bilo statistično pomembnih razlik. Tudi pri meritvah suhe mase poganjkov smo opazili podobne trende – največjo maso smo zabeležili pri rastlinah, ki so rasle v zemlji za rože, ostali substrati pa so izkazali bistveno nižjo suho maso poganjkov (Slika 4c). Zelo podobna situacija je bila tudi pri sveži in suhi masi korenin (Slika 4b in 4d). V obeh primerih smo opazili statistično pomembne razlike med rastlinami, ki so rasle v zemlji za rože, in med rastlinami, ki so rasle v kokosovih vlaknih, peščeni zemlji in vermikulitu, saj so imele prve bistveno večjo tako svežo kot suho maso korenin. Med rastlinami, ki so rasle v zemlji za rože in glineni zemlji, ni bilo statistično pomembnih razlik niti v sveži niti v suhi masi korenin, kar je verjetno posledica velike variabilnosti mase korenin pri rastlinah, ki so rasle v zemlji za rože. Statistično pomembne razlike v stopnji transpiracije smo zaznali med rastlinami, rastočimi v glineni zemlji, ki so

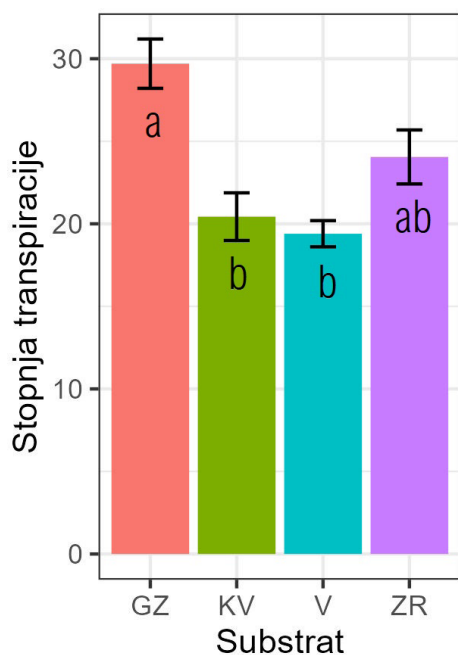
izkazovale višjo stopnjo transpiracije od rastlin, rastočih v vermikulitu in v kokosovih vlaknih (Slika 5). Rastline, ki so rasle v zemlji za rože, se niso razlikovale od ostalih skupin. Stopnje transpiracije rastlin iz peščene zemlje ni bilo mogoče izmeriti, zato podatki niso prikazani na grafu.

Razlike v dejanski fotokemični učinkovitosti smo zaznali le med rastlinami, ki so rasle v zemlji za rože, in rastlinami, ki so rasle v vermikulitu, saj so imele slednje bistveno nižjo stopnjo fotokemične učinkovitosti od prvih (Slika 6). Med ostalimi substrati nismo zaznali razlik v dejanski fotokemični učinkovitosti. Potencialna fotokemična učinkovitost je bila največja pri rastlinah, ki so rasle v zemlji za rože, glineni in peščeni zemlji, najmanjša pa pri tistih, ki so rasle v kokosovih vlaknih in vermikulitu.

## Diskusija

### Dolžina poganjkov in korenin

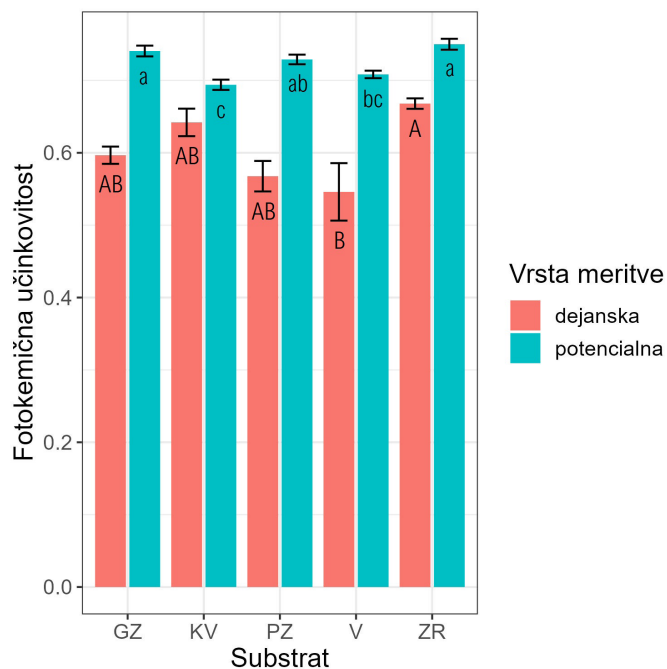
Zemlja za rože je sestavljena iz mešanice organskih hranil in



Slika 5. Stopnja transpiracije glede na vrsto substrata. Višina stolpcev predstavlja povprečje transpiracije znotraj posameznega substrata, označena je tudi standardna napaka (N = 13). GZ – glinena zemlja, KV – kokosova vlakna, PZ – peščena zemlja, V – vermikulit, ZR – zemlja za rože. Male tiskane črke na grafu označujejo skupine, med katerimi so statistično pomembne razlike (enosmerna ANOVA, Tukeyev post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

vsebuje za rastline primerno razmerje dušika, fosforja, kalija ter drugih makrohranil, zato je za rast poganjkov v primerjavi z ostalimi substrati primernejša, kar smo potrdili tudi z meritvami dolžin poganjkov. Kokosova vlakna so osiromašena z minerali in slabše zadržujejo vodo, zaradi česar je bila tudi rast poganjkov slabša. Za peščeno zemljo je značilno primanjkanje elementov, kot so bor, baker, cink, mangan ali železo (Taiz 2006), ki so potrebni za rast in razvoj rastlin. Na listih rastlin koruze, ki so rasle v substratu kokosovih vlaken, smo opazili škrlatno obarvanost in kloroze. Rdeča barva in kloroze so bile v manjši meri prisotne tudi pri rastlinah iz glinene zemlje in vermikulita. Kloroze so značilni znak pomanjkanja nekaterih makrohranil, kot so magnezij, železo, dušik in kalij, škrlatna obarvanost pa nakazuje na pomanjkanje fosforja. Magnezij in dušik sta pomembni komponenti molekul klorofila, kalij pa ima pomembno vlogo v odpiranju in zapiranju listnih rež (Raven s sod. 2005).

V nasprotju s pričakovanji in dolžinah korenin med rastlinami, ki so rasle v različnih substratih, ni bilo statistično pomembnih razlik, čeprav se substrati med seboj razlikujejo po vsebnosti mineralnih hranil (kar se je izrazilo v statistično pomembnih razlikah pri dolžini poganjkov) kot tudi po sposobnosti zadrževanja vode. Na splošno velja, da je rast korenin počasna, če je rizosfera revna s hranili ali presuha, in da je za rast korenin ugodnejša rahlo kislja zemlja, s pH vrednostjo med 5,5 in 6,5 (Taiz 2006). Hkrati velja, da se pri rastlinah, ki so izpostavljene sušnemu stresu, korenine običajno



Slika 6. Dejanska in potencialna fotokemična učinkovitost koruze glede na vrsto substrata. Višina stolpcev predstavlja povprečje dejanske (rdeče) oz. potencialne (modro) fotokemične učinkovitosti znotraj posameznega substrata, označena je tudi standardna napaka (N = 15). GZ – glinena zemlja, KV – kokosova vlakna, PZ – peščena zemlja, V – vermikulit, ZR – zemlja za rože. Velike oziroma male tiskane črke na grafu označujejo skupine, med katerimi so statistično pomembne razlike (v dejanski oziroma potencialni fotokemični učinkovitosti) (enosmerna ANOVA, Tukeyev post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

podaljšajo pod vplivom abscizinske kisline, saj daljše korenine sežejo v globlje profile tal in tako povečajo izrabo vode. V naravi imajo od tega korist tudi druge rastline, ki mejijo na rastlino z globokimi koreninami, saj sistem globokih korenin pripomore k transportu vode iz nižjih delov zemlje v višje in bolj izsušene dele, tovrsten ekološki pojav pa imenujemo hidravlični dvig vode (Huang 2000). Dejstvo, da pri dolžinah korenin med rastlinami ni bilo statistično pomembnih razlik, bi bilo lahko tudi posledica opisanih dejavnikov. Rastline ob pomanjkanju vode korenine poženejo globlje, vendar je zaradi neoptimalnih pogojev njihova rast počasna. Morda bi bile razlike drugačne, če bi sadike posadili v večje lonce, saj je tudi prostornina lonca omejujoč dejavnik za razrast korenin. Ker je prostorska omejitev med drugim povzročala močno medsebojno prepletanje šopastih korenin koruze, smo kljub previdnosti ob ločevanju korenin od zemlje najverjetneje potrgali dele njihovih korenin in tako vplivali na končne razlike med skupinami. Poleg tega bi ob skromnejšem in redkejšem zalivanju različne stopnje poroznosti substratov prišle bolj do izraza, kar bi se prav tako lahko odrazilo v različni dolžini korenin med skupinami.

### Sveža in suha biomasa

Večja masa korenin in poganjkov nakazuje na to, da je imela rastlina za rast in razvoj na voljo ustrezno količino vode in hranilnih snovi (Younis s sod. 2015). Komercialni substrati za sajenje rož omogočajo optimalno dostopnost vode, hranilnih



snovi ter kisika in so posledično ugoden medij za rast in razvoj rastlin, kar lahko potrdimo glede na izmerjene vrednosti sveže in suhe biomase poganjkov, ki sta bili v obeh primerih najvišji v zemlji za rože. Najmanjše biomase poganjkov smo izmerili pri rastlinah, ki so rasle v vermikulitu, kokosovih vlaknih in peščeni zemlji, med katerimi ni bilo statistično pomembnih razlik. Podobne trende smo opazili tudi v primeru sveže in suhe biomase korenin, le da se rastline, ki so rasle v glineni zemlji, niso statistično pomembno razlikovale od nobenega drugega substrata, torej niti od tistih, ki so rasle v zemlji za rože, poleg tega so imele višjo svežo in suho biomaso od tistih, ki so rasle v kokosovih vlaknih, peščeni zemlji in vermikulitu. Kot že omenjeno, bi to lahko bila posledica dejstva, da so bile korenine po petih tednih poskusa močno prepletene in smo ob podiranju poskusa verjetno številne poškodovali.

## Transpiracija

Vzroki za razlike v stopnji transpiracije med rastlinami v različnih substratih so fizikalne lastnosti substratov, predvsem velikost in število zračnih por. Glinena zemlja, v kateri smo izmerili najvišjo stopnjo transpiracije, ima na splošno manjše, a številne pore, ki se napolnijo z vodo, zato lahko takšna tla zadržijo veliko večje količine vode (Gardner 1988) v primerjavi z ostalimi testiranimi substrati. Pri rastlinah, posajenih v kokosovih vlaknih in v vermikulitu, smo izmerili najnižjo stopnjo transpiracije, zaradi česar lahko sklepamo, da ti substrati slabše zadržujejo vodo. Ko je dostopne vode v tleh manj, so listne reže manj odprte oziroma jih rastline zapirajo, posledično pa je tudi stopnja transpiracije nižja (Taiz in Zeiger 2006). S porometrom nismo mogli izmeriti učinkovitosti transpiracije za rastline v peščeni zemlji – meritve smo poskusili izvesti večkrat, a vedno znova nismo presegli praga, ki bi omogočal izvedbo meritve. Predvidevamo, da je bil vzrok v prenizki stopnji transpiracije (Rais in Rashed 2016), ki je bila pod zaznavno vrednostjo porometra. Slednje bi lahko pojasnili z visoko prepustnostjo peščene zemlje za vodo, zaradi česar se voda hitro odcedi in zemlja osuši. Zaradi sušnih razmer v rizosferi so rastline koroze, ki so rasle v peščeni zemlji, verjetno zaprle listne reže in tako zmanjšale stopnjo transpiracije pod zaznavno mejo porometra.

## Fotokemična učinkovitost

Fotosinteza zajema niz kemijskih reakcij, na katere imajo vpliv različni dejavniki, kot so intenziteta svetlobe, temperatura, dostopnost vode, koncentracija CO<sub>2</sub>, koncentracija hranil ter drugi dejavniki stresa (Wang s sod. 2022). Kadar je jakost svetlobnega sevanja previsoka, lahko pride do poškodb rastlinskih celic. V izogib temu so se razvili različni mehanizmi odvajanja energije. S svetlobo vzbujeni klorofil lahko odda energijo preko oddajanja fluorescence, toplote ali preko fotokemičnega dela. Preko merjenja fluorescence klorofila a lahko sklepamo o fotokemični učinkovitosti fotosistema II. Kadar je rastlina pod vplivom stresnih dejavnikov, pride do motenj na fotosinteznem aparatu, kar zaznamo kot nihanje fluorescence (Vodnik 2004).

Potencialna fotokemična učinkovitost (FU) je sorazmerna fotosintezi, izrazimo pa jo kot razmerje med variabilno fluorescenco (Fv) ter maksimalno fluorescenco osenčenega vzorca (Fm). Preko potencialne FU lahko ocenimo, ali stresni dejavniki v odsotnosti svetlobe vplivajo na fotosistem II. Pri vitalnih rastlinah so pričakovane vrednosti potencialne FU

višje od 0,8, v stresnih razmerah pa se te vrednosti zmanjšajo (Schreiber s sod. 1995). V našem poskusu smo največjo potencialno FU izmerili pri rastlinah, ki so rasle v zemlji za rože, peščeni in glineni zemlji. Te vrednosti so znašale med 0,73 in 0,75. Najmanjšo potencialno FU pa smo izmerili pri rastlinah, ki so rasle v kokosovih vlaknih (Fv/Fm = 0,69). Glede na podatke iz literature naše meritve potencialne FU pri vseh rastlinah nakazujejo, da so bile rastline izpostavljene stresu (Schreiber s sod. 1995). Pričakovali smo, da rastline, ki so rasle v zemlji za rože, niso bile izpostavljene stresnim dejavnikom, saj naj bi imele optimalne pogoje za rast, česar pa rezultati naših meritev potencialne FU niso potrdili. Za bolj zanesljive zaključke bi morali meritve ponoviti večkrat tekom poskusa.

Dejansko fotokemično učinkovitost (Y) smo izmerili na osvetljenih listih. Statistično značilna razlika je bila le med rastlinami, ki so rasle v zemlji za rože, in tistimi, ki so rasle v vermikulitu. Pri rastlinah, posajenih v vermikulitu, smo izmerili najnižjo vrednost dejanske fotokemične učinkovitosti. Vzrok za izmerjene nižje vrednosti dejanske FU bi lahko bil v tem, da vermikulit med drugim vsebuje manj magnezija, ki je sestavni del klorofila, kar potencialno za rastline lahko predstavlja stresni dejavnik (Wilson 1984), ki vpliva na nižjo stopnjo fotosinteze.

Glede na obarvanost listov oz. prej omenjene simptome pomanjkanja bi pričakovali slabšo FU ter transpiracijo pri koruzi, ki je rasla v vermikulitu, glineni zemlji in kokosovih vlaknih, vendar pa glede na naše rezultate tega ne moremo potrditi.

## Zaključki

Na začetku poskusa smo si postavili dve hipotezi. Predvidevali smo, da bodo rastline najbolj rasle in se razvijale v zemlji za rože, najslabše pa v kokosovih vlaknih. Glede na rezultate lahko potrdimo prvi del hipoteze, saj so rastline koroze v splošnem res najbolj uspevale v zemlji za rože, drugega dela hipoteze pa ne moremo potrditi, saj pri večini merjenih parametrov ni bilo statistično značilnih razlik med rastlinami, rastočimi v kokosovih vlaknih, peščeni zemlji in vermikulitu. Predvidevali smo tudi, da bodo med posameznimi substrati razlike v rasti in razvoju rastlin, kar lahko potrdimo le delno. Glede na večino merjenih parametrov so v povprečju najbolj uspevale koroze, ki so rasle v zemlji za rože, sledile so tiste v glineni zemlji, nato pa koroze v ostalih substratih, ki se večinoma med seboj niso razlikovale. Naš poskus bi lahko izboljšali z izbiro večjih cvetličnih loncev ter manj pogostim zalivanjem, saj bi v tem primeru prepustnost za vodo določenih substratov prišla bolj do izraza. Za natančnejše rezultate bi lahko tekom poskusa merili tudi fizikalne in kemijske lastnosti substratov, ki lahko pomembno vplivajo na rast in razvoj rastlin.

## Literatura

1. Abollino O, Giacomino A, Malandrino M, Mentasti E, 2006. The Efficiency of Vermiculite as Natural Sorbent for Heavy Metals. Application to a Contaminated Soil. *Water Air Soil Pollut* 181:149-160.
2. Alexiades CA, Jackson ML, 1965. Quantitative Determination of Vermiculite in Soils. *Soil Science Society of America Journal* 29(5): 522-527.
3. Al-Saeedi AA, 2022. Clay basics and their physical and chemical properties: Review Paper. *IAETSD Journal for Advanced Research in Applied Sciences* 10(8):13-18.

4. Gardner WH, 1979. How water moves in the soil. Five pages of photographs reveal the great diversity in one of the most commonplace phenomena in agriculture. American Society of Agronomy.
5. Havis JR, Hamilton WW, 1981. Physical properties of container media. *Ornamentals Northwest Archives* 5(3):7-8.
6. Huang B, 2000. Role of root morphological and physiological characteristics in drought resistance of plants. V: Wilkinson (ur). *Plant-Environment Interactions*, Second edition. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
7. Huang R, Birch CJ, George DL, 2006. Water Use Efficiency in Maize Production – the Challenge and Improvement Strategies. 6th Triennial Conference 2006, Maize Association of Australia.
8. Kraft GJ., Clancy K, Mechenich DJ, Haucke J, 2012. Irrigation effects in the northern lake states: Wisconsin central sands revisited. *Groundwater* 50(2):308-318.
9. Meerow AW, 1994. Growth of Two Subtropical Ornamentals Using Coir (Coconut Mesocarp Pith) as a Peat Substitute. *American Society for Horticultural Science* 29(12):1484-1486.
10. Meter group Inc., 2016. SC-1 Leaf Porometer Manual. Washington, ZDA. <https://edaphic.com.au/wp-content/uploads/2023/08/SC-1-Leaf-Porometer-Manual-December-2021.pdf> (25. jan. 2024)
11. Microsoft Corporation, 2018. Microsoft Excel. Washington, ZDA. <https://office.microsoft.com/excel> (25. jan. 2024)
12. Noguera P, Abad M, Puchades R, Noguera V, Maquieira A, Martinez J, 1997. Physical and Chemical Properties of Coir Waste and their Relation to Plant Growth. *Acta Horticulturae* 450(45):365-374.
13. R Core Team, 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Dunaj, Avstrija. <https://www.R-project.org/> (25. jan. 2024)
14. Rama M, Laiho T, Eklund O, Wärnå J, 2019. An evaluation of the capability of nanomodified vermiculite to in situ ammonium removal from landfill leachate. *Environmental Technology & Innovation* 14.
15. Rashed MRU, 2016. Substrate Effects on Plant Transpiration Rate under Several Vapour Pressure Deficit (VPD) Levels. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 7.
16. Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE, 2005. *Biology of Plants*, Seventh Edition. W.H. Freeman and Company Publishers, New York, US.
17. RStudio Team, 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, ZDA. <http://www.rstudio.com/> (25. jan. 2024)
18. Schreiber U, Bilger W, Neubauer C, 1995. Chlorophyll Fluorescence as a Noninvasive Indicator for Rapid Assessment of In Vivo Photosynthesis. *Ecophysiology of Photosynthesis* 100:49-70.
19. Taiz L, Zeiger E, 2006. *Plant Physiology*, 4th Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, UK.
20. Uchida R, 2000. Essential Nutrients for Plant Growth: Nutrient Functions and Deficiency Symptoms. V: Silva JA, Uchida R (ur) *Plant Nutrient Management in Hawaii's Soils, Approaches for Tropical and Subtropical Agriculture*. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa.
21. Verdonck O, De Vleeschauwer D, De Boodt M, 1981. The Influence of the Substrate to Plant Growth. *Acta Horticulturae* 126:251-258.
22. Vodnik D, 2004. Meritve fotosinteze sadnih rastlin. Zbornik referatov 1. slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo 1:119-123.
23. Walz, 2020. PAM-2500 Portable Chlorophyll Fluorometer Handbook of Operation. Efeltrich, Nemčija. [https://www.walz.com/files/downloads/manuals/pam-2500/PAM\\_2500\\_07-2.pdf](https://www.walz.com/files/downloads/manuals/pam-2500/PAM_2500_07-2.pdf) (25. jan. 2024)
24. Wang C, Gu Q, Zhao L, Li C, Ren J, Zhang J, 2022. Photochemical Efficiency of Photosystem II in Inverted Leaves of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Affected by Elevated Temperature and High Light. *Frontiers in Plant Science* 12:1-15.
25. Wickham H, 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag. New York, ZDA. <https://ggplot2.tidyverse.org/> (25. jan. 2024)
26. Wilson GCS, 1984. Use of Vermiculite as a Growth Medium for Tomatoes. *Acta Horticulturae* 150:283-288.
27. Younis A, Riaz A, Javaid F, Ahsan M, Tariq U, Aslam S, Majeed N, 2015. Influence of various growing substrates on growth and flowering of potted miniature rose cultivar "Baby Boomer". *Current Science Perspectives* 1:16-21.

# Vpliv substrata na rast in razvoj ter fiziološke parametre pri sončnici

Zala Bačnik, Žana Sotelšek, Julija Šebjanič, Anamarija Tomić, Gašper Turk

Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Namen raziskave je bil preučiti vpliv različnih substratov na rast, razvoj in fiziološke parametre sončnic (*Helianthus annuus* L.).
- Rastline smo posadili v lončke z različnimi substrati, jih 2x tedensko zalivali in izvajali meritve dolžin poganjkov. Kasneje smo izvedli še meritve fotokemične učinkovitosti, transpiracije in meritve korenin ter tehtanje sveže in suhe biomase rastlin.
- Najboljšo rast smo zabeležili pri rastlinah posajenih v zemlji za rože, najslabšo pa pri rastlinah posajenih v glineni zemlji, kar potrjujejo rezultati višine rastlin, dolžine korenin ter masa sveže in suhe biomase. Pri meritvah dejanske fotokemične učinkovitosti in meritvah transpiracije nismo opazili statistično značilnih razlik med skupinami.
- Z raziskavo smo potrdili, da je najboljši substrat za gojenje sončnic zemlja za rože.

**Ključne besede:** poganjki, korenine, transpiracija, fotokemična učinkovitost, struktura tal, biomasa

## Uvod

Sončnico (*Helianthus annuus* L.) uvrščamo v družino košarnic (Asteraceae). Izvira iz južnega dela Severne Amerike. V Evropi so jo najprej uporabljali kot okrasno rastlino, danes pa jo gojijo po vsem svetu predvsem za namene živilsko predelovalne industrije za prehrano ljudi ali kot krmno poljščino (KGZ, 2017). Prilagajanje sončnic na različne podnebne in talne razmere je omogočilo njeno razširitev in gojenje po vsem svetu. Za rast sončnic so potrebna rodovitna tla, zmerne padavine, viabilna semena in primerna temperatura. Sončnica ima dobro razvit in globok koreninski sistem. Vretenaste in razvejane korenine s katerimi privzemajo vodo in hranilne snovi večinoma segajo do globine 30 cm, lahko pa zrastejo tudi do 2 m globoko. Višina sončnic se razlikuje od sorte do sorte. Pri oljnih sortah so rastline visoke od 1 do 2 m, medtem ko krmne sorte zrastejo tudi do 6 m v višino (KGZ, 2017). Struktura tal vpliva na rast rastlin na več načinov. Korenine najhitreje rastejo v zelo drobljivih tleh, vendar je njihov vnos vode in hranil lahko omejen zaradi neustreznega stika s trdno in tekočo fazo tal. V trdih tleh je ta stik veliko tesnejši, vendar je rast korenin močno ovirana, zato je njihova sposobnost črpanja hranil slaba, rastlini pa lahko sčasoma zmanjka vode ali hranil. Vendar pa mnoga tla, čeprav so trda, vsebujejo neprekinjene makropore, ki koreninam zagotavljajo prostor za rast (Passioura, 1991). V makroporah so prisotni tudi mikroorganizmi, tako simbiotični kot patogeni, zato se lahko odziv korenin na različne načine obdelave tal že zaradi tega močno razlikuje. Če je struktura tal neugodna korenine oddajajo hormonske signale, ki upočasnijo rast poganjka, čeprav so trenutno sposobne sprejemati dovolj vode in hranil (Passioura, 1991). Za peščena tla je značilno, da imajo nizko sposobnost zadrževanja vode, medtem ko so glinena tla nagnjena k zastajanju vode (Brady in Weil, 2016). V raziskavi smo preučevali vpliv različnih substratov (vermikulit, glinena zemlja, peščena zemlja, kokosova vlakna ter zemlja za rože) na rast in razvoj sončnic.

Hipoteze:

- H1: Sončnice bodo najbolj uspevale (imele največjo biomaso in višino) v zemlji za rože, saj vsebuje več hranil kot preostali substrati.
- H2: Sončnice bodo najslabše uspevale v glineni zemlji zaradi zastajanja vode.
- H3: Najvišjo fotokemično učinkovitost in stopnjo transpiracije bomo izmerili pri rastlinah, ki so rastle v zemlji za rože in najnižjo pri tistih, ki so rastle v glini.

## Material in metode

Tri tedne stare poganjke rastlin sončnice (*Helianthus annuus* L.), ki so bile nakaljene v vermikulitu, smo presadili v lončke s petimi različnimi substrati. Za vsak substrat smo pripravili po tri lončke in sicer z: vermikulitom, glineno zemljo, peščeno zemljo, kokosovimi vlakni in zemljo za rože. V vsak lonček smo posadili po štiri poganjke sončnic. Prvi dan smo vse lončke dobro zalili z destilirano vodo, tako da smo substrat popolnoma prepojili (dokler ni voda začela odtekati). Nato smo rastline pet tednov, dvakrat tedensko, rastline zalivali s po 100 mL destilirane vode. Rastline smo gojili v rastni komori, kjer so bile izpostavljene 16/8h dnevno-nočnemu ciklu pri temperaturi 22 °C podnevi in 18 °C ponoči ter 60% RH.

## Analiza rastlinskega materiala

Dolžine poganjkov smo merili enkrat na teden. V četrtem tednu poskusa smo na popolnoma razvitih listih izmerili fotokemično učinkovitost fotosistema II. Meritve smo opravili s fluorometrom PAM-2500, s katerim smo izmerili fluorescenco klorofila a na zatemnjenih in osvetljenih listih. Za vsak lonček smo naredili po tri ponovitve meritev. Izvedli smo tudi meritve transpiracije s porometrom (SC-1 porometer, Decagon Devices, Inc.). Ponovno smo za vsak lonček naredili tri ponovitve. Ob koncu poskusa smo vse rastline ločili od substrata, jim izmerili končno dolžino poganjka ter dolžino korenin. Svežo biomaso poganjkov in korenin iz posameznega lončka smo nato stehali in dali v sušilnik na 60°C za en teden. Po enem tednu smo stehali še suho biomaso poganjkov in korenin.

## Statistična analiza

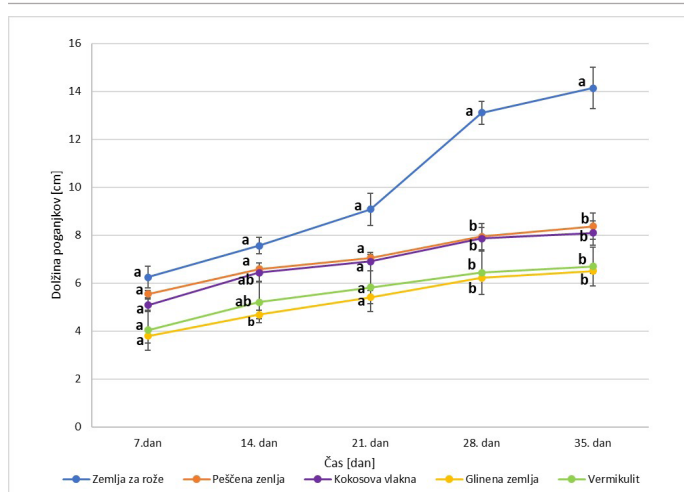
Meritve smo sproti beležili v tabelo v programu MS Excel. Izračunali smo povprečne vrednosti in standardno napako. Za obdelavo podatkov smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA) in Holm-Šidak post-hoc test. Kot statistično značilno različne smo smatrali rezultate, kjer je bila p-vrednost < 0,05. Statistično obdelavo in vizualizacijo podatkov smo izvedli v programu MS Excel z dodatkom XL\_toobox.

## Rezultati

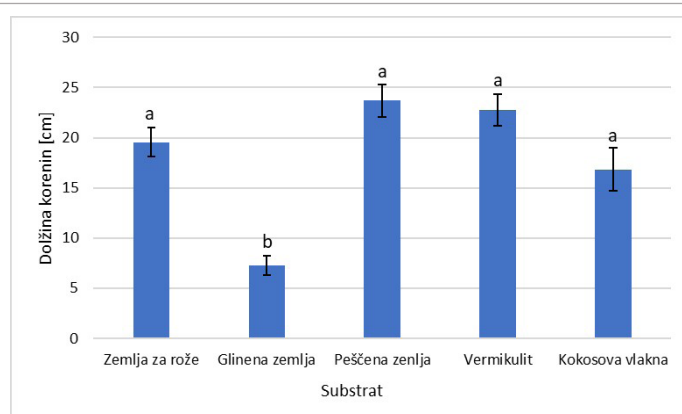
Na sliki 1 so prikazane sončnice ob koncu poskusa, ki so rastle v različnih substratih. Listi rastlin so bili ob koncu poskusa porumeneli, ne glede na vrsto substrata. Prav tako lahko na določenih poganjkih opazimo odmrle, posušene liste. Opazimo tudi bistveno nižjo rast rastlin posajenih v glini, peščeni zemlji, kokosovih vlaknih in vermikulitu v primerjavi z zemljo za rože. Iz rezultatov lahko opazimo različno uspešnost rasti rastlin v odvisnosti od substrata (Slika 2). Pri vseh substratih, z izjemo zemlje za rože, lahko opazimo relativno enakomeren vzorec rasti. V prvem tednu nismo zaznali razlik v rasti, že v drugem tednu pa so rastline v zemlji za rože in peščeni zemlji rastle nekoliko bolje od rastlin v glineni zemlji. Od četrtega tedna dalje je bila izrazita razlika v rasti rastlin, ki so rastle v zemlji za rože od ostalih substratov, kjer so rastline rastle bistveno slabše. Med ostalimi substrati nismo zaznali statistično značilnih razlik v rasti rastlin od tretjega tedna dalje. Ob koncu poskusa smo izmerili dolžino korenin. Rast korenin je bila med seboj primerljiva v vseh substratih, razen v glini,



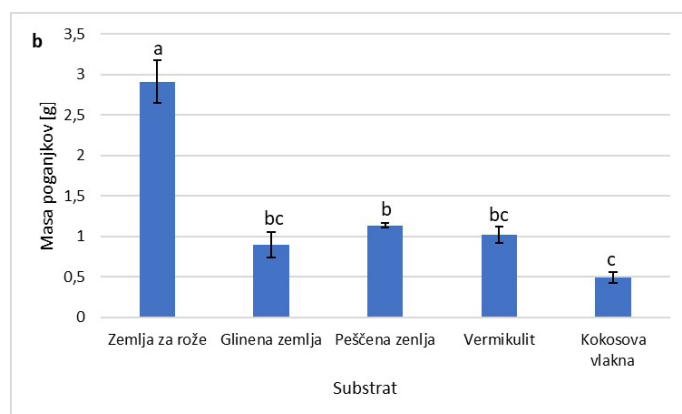
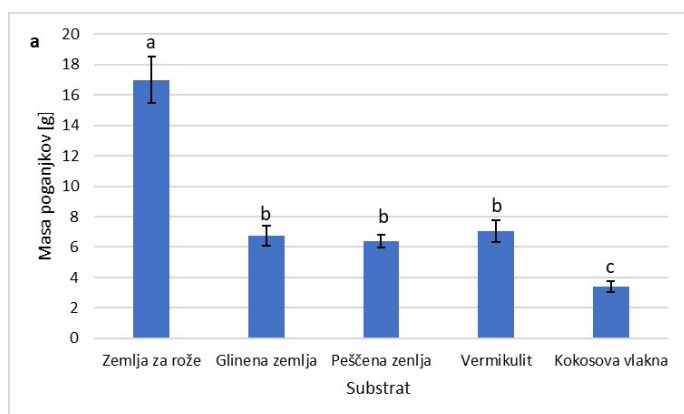
Slika 1. Poganjki sončnic posajenih v različnih substratih: zemlja za rože, glinena zemlja, peščena zemlja, kokosova vlakna in vermikulit (od leve proti desni) na koncu poskusa.



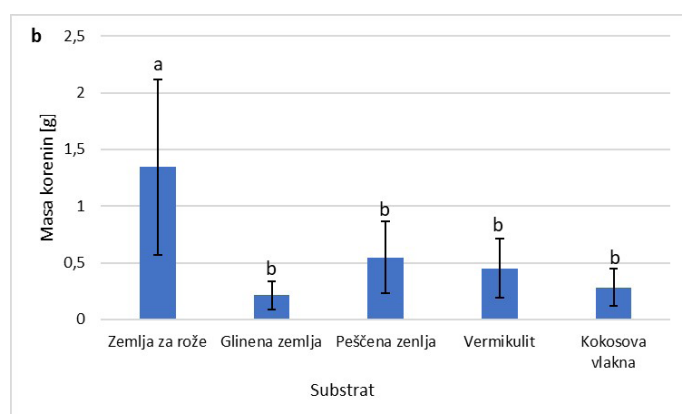
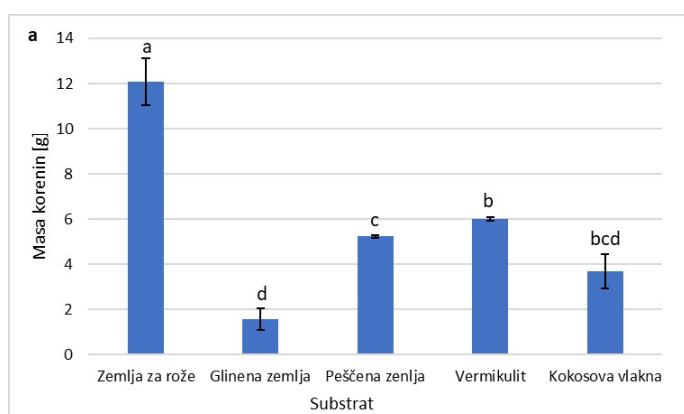
Slika 2. Povprečna dolžina poganjkov sončnic in standardna napaka na različnih substratih v času petih tednov (n=12). Različne črke na grafu prikazujejo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami (substrati) na posamezen teden opazovanja (enosmerna ANOVA, Holm-Šidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



Slika 3. Povprečna dolžina korenin sončnic s pripadajočo standardno napako v različnih substratih (n=12). Različne črke na grafu prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami (enosmerna ANOVA, Holm-Šidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



Slika 4. Povprečna masa svežih poganjkov (a) in povprečna masa suhih poganjkov sončnic (b) s standardno napako v različnih substratih (n=12). Različne črke na grafih prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami (enosmerna ANOVA, Holm-Šidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



Slika 5: Povprečna masa svežih korenin (a) in povprečna masa suhih korenin sončnic (b) s standardno napako v različnih substratih (n=12). Različne črke na grafih prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami (enosmerna ANOVA, Holm-Šidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

kjer smo opazili statistično značilno manjšo rast koreninskega sistema (Slika 3). Meritve mase svežih poganjkov so pokazale, da so sončnice

imele največjo svežo maso v zemlji za rože, najmanjšo pa pri kokosovih vlaknih (Slika 4a). V glini, vermikulitu in peščeni zemlji pa so bile mase primerljive. Z meritvami mase suhih



Tabela 1: Povprečne vrednosti transpiracije, dejanske in potencialne fotokemične učinkovitosti (FU) s standardno napako izmerjene v različnih substratih (n=3). Različne črke v tabeli predstavljajo statistično značilne razlike med skupinami (enosmerna ANOVA, Holm-Šidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

	Zemlja za rože	Glinena zemlja	Peščena zemlja	Vermikulit	Kokosova vlakna
Transpiracija	83,03 ± 2,85	102,80 ± 6,16	158,07 ± 55, 24	124,60 ± 8,28	95,17 ± 15,72
Dejanska FU	0,72 ± 0,02	0,75 ± 0,01	0,74 ± 0,01	0,76 ± 0,01	0,75 ± 0,00
Potencialna FU	0,81ab ± 0,01	0,83a ± 0,00	0,81ab ± 0,01	0,82a ± 0,00	0,79b ± 0,00

poganjkov smo prišli do podobnih rezultatov (Slika 4b). Med maso poganjkov rastlin, ki so rasle v glineni, peščeni zemlji in vermikulitu nismo opazili statistično značilnih razlik, prav tako nismo opazili statistično značilnih razlik med maso rastlin, ki so rasle v glineni zemlji, vermikulitu in kokosovih vlaknih. Zagotovo pa lahko rečemo, da so imeli poganjki rastlin, ki so rastle v zemlji za rože največjo maso.

Meritve sveže in suhe biomase korenin so podobne meritvam dolžine poganjkov. Povprečna masa svežih korenin je bila največja pri poganjkih, ki so rastle v zemlji za rože (Slika 5a). Masa korenin rastlin, ki so rasle v kokosovih vlaknih se statistično značilno ne razlikuje od mase korenin, ki so rasle v glineni zemlji, pesku ali vermikulitu. Se pa statistično značilno razlikuje od mase tistih korenin, ki so rasle v zemlji za rože. Meritve suhe mase korenin so prav tako pokazale, največjo maso pri poganjkih, ki so rastle v zemlji za rože v primerjavi s preostalimi skupinami, med katerimi pa ni statistično značilnih razlik (Slika 5b).

Pri meritvah dejanske fotokemične učinkovitosti nismo opazili statistično značilnih razlik, opazimo pa, da imajo sončnice boljše potencialno fotokemično učinkovitost pri rasti v glineni zemlji in vermikulitu kot tiste, ki so rasle v kokosovih vlaknih. Tudi pri meritvah transpiracije nismo opazili statistično značilnih razlik med skupinami (Tabela 1).

## Diskusija

Naši rezultati so pokazali, da različni substrati, ki sončnicam nudijo oporo ter prostor za rast korenin, pomembno vplivajo na njihovo rast, razvoj in fiziološke parametre. V poskusih smo uporabili različne substrate, ki so se razlikovali predvsem v vsebnosti skupne organske snovi, teksturi delcev in pH vrednosti. Zaradi razlik v lastnostih uporabljenih substratov smo želeli določiti njihov vpliv na rast sončnic. Znano je, da na privzem hranil vplivajo, poleg lastnosti rastlin in lastnosti topljencev, tudi lastnosti substrata. Struktura substrata, koloidni delci, pH, kationska izmenjevalna kapaciteta in biološka aktivnost lahko neposredno vplivajo na vezavo ali sproščanje mineralov (Marschner in Rengel, 2012). Ugotovili smo, da je bila zemlja za rože, ki verjetno vsebuje več hranil kot preostali substrati in ima rahlo strukturo, najbolj optimalna za rast in razvoj sončnic. Boljšo rast sončnic, ki so rasle v zemlji za rože smo opazili že vizualno po koncu poskusa. Poganjki so bili vidno močnejši, biomasa in listi pa največji. Več zdravih in večjih listov omogoča večjo stopnjo transpiracije (Li in sod., 2020). Transpiracija je načeloma tudi linearno odvisna od vsebnosti vode v substratu (Martin, 1940). Pričakovali smo višje vrednosti transpiracije pri rastlinah, ki so rasle v zemlji za rože, ki verjetno vsebuje več organskih snovi v primerjavi z drugimi substrati. Hkrati pa nižje vrednosti transpiracije v substratih kot je peščena zemlja, saj je zanjo značilno hitrejšo

odtekanje vode iz substrata (Martin, 1940). V naših meritvah statistično značilnih razlik med skupinami nismo opazili. To se je lahko zgodilo zaradi napake v merjenju ali slabše dostopnosti vode iz substrata. Posledica strukture substrata se je pokazala tudi v vodo-zadrževalnih lastnostih. Saturacija odraža vsebnost vode, pri kateri so vse pore v tleh zapolnjene z vodo; posredno predstavlja torej informacijo o poroznosti tal. Večja poroznost substrata (večje število por) je lahko za rast rastlin ugodnejše, saj je substrat bolj prezračjen in posledično zmanjšuje tveganje, da bi prišlo do neugodnih anoksičnih pogojev (Shikov in sod., 2020). Prav tako je smiselno omenjati še druge parametre, ki bi lahko vplivali na meritve transpiracije, kot so na primer pomankanje hranil, biomasa listov in indeks listne površine. Možno je tudi, da so se rastline rastoče v bolj suhih pogojih, ki jih povzročajo odcedni substrati, prilagodile na sušo, s strategijo kot je na primer zmanjšana gostota listnih rež (Dusza in sod., 2017). Sončnice v glineni zemlji niso imele velikih listov, verjetno kot posledica slabo razvitega koreninskega sistema, saj korenine nimajo prostora za rast, pride pa tudi do hipoksije tal zaradi zastajanja vode, kar dodatno poškoduje korenine. Vermikulit je zelo porozen in vpojen mineralni substrat, zato dobro zadržuje vodo. Zaradi teh lastnosti je potencialno dober substrat za rastline, vendar pa lahko hitro zadržuje preveč vode, kar povzroči gnitje korenin in posledično slabšo rast rastlin. Tudi iz naše raziskave je razvidno, da so korenine sončnic, ki so rasle v vermikulitu imele manjšo maso in prav tako dolžino v primerjavi s tistimi, ki so rasle v zemlji za rože. Podobno velja za substrat iz kokosovih vlaken (Urh, 2007). Z raziskavo smo želeli ugotoviti tudi, ali vrsta substrata vpliva na potencialno oz. dejansko kemično učinkovitost rastlin. Znano je, da substrati z večjo dostopnostjo hranil vplivajo na večjo stopnjo fotosinteze. Z meritvami fotokemične učinkovitosti dobimo informacije o stanju fotosinteznega aparata. Običajno imajo rastline, ki rastejo v organsko bogatem substratu višjo fotokemično učinkovitost, vendar pa se to pogosto ne odraža v samih meritvah, kar se je izkazalo tudi v našem primeru, saj se vrednosti med substrati med seboj niso razlikovale. Ob tem se je pomembno zavedati, da so fotokemične meritve občutljive in med izvajanjem le teh lahko pride do napak (Rozman, 2016). Če naše rezultate primerjamo s podobnimi študijami, kjer so preučevali vpliv različnih substratov na rast sončnic opazimo primerljive rezultate, saj so sončnice najbolj uspevale v zemlji za rože, v primerjavi s preostalimi substrati. Zaradi novih, vse bolj razširjenih tehnik in metod gojenja rastlin, ki temeljijo na pridelavi brez zemlje (npr. akvapaponika in hidroponika), pa je še toliko bolj pomembno, da poznamo potencial ostalih substratov (Yerima in sod., 2015).

## Zaključki

Z raziskavo smo ugotovili, da izbira substrata vpliva na rast,

razvoj in fiziološke parametre sončnic. Na podlagi rezultatov lahko potrdimo prvo hipotezo, ki pravi, da bodo sončnice najbolj uspevale v zemlji za rože, najmanj pa v glini. Ne moremo pa potrditi druge hipoteze, ki pravi, da bodo rastline ki so rastle v zemlji za rože imele najvišjo fotokemično učinkovitost, najnižjo pa tiste, ki so rastle v glini, saj pri meritvah dejanske fotokemične učinkovitosti statistično značilnih razlik med skupinami ne opazimo. Pri meritvah potencialne fotokemične učinkovitosti pa lahko rečemo le, da imajo boljšo potencialno fotokemično učinkovitost tiste rastline, ki so rastle v glineni zemlji in vermikulitu kot tiste, ki so rastle v kokosovih vlaknih. Prav tako ne moremo potrditi tretje hipoteze, ki predpostavlja, da bo transpiracija najvišja pri rastlinah ki so rastle v zemlji, saj statistično značilnih razlik med skupinami nismo opazili. Za bolj jasen zaključek bi bilo del raziskave o fotokemični učinkovitosti ter transpiraciji rastlin smiselno ponoviti.

## Literatura

1. Adeleke BS, Babalola OO, 2020. Oilseed crop sunflower (*Helianthus annuus*) as a source of food: Nutritional and health benefits. *Food Science and Nutrition* 8, 9: 4666–4684.
2. Dusza Y, Sébastien B, Kraepiel Y, Lata JC, Abbadie L, Xavier R, 2017. Multifunctionality is affected by interactions between green roof plant species, substrate depth, and substrate type. *Ecology and Evolution* 7: 2357.
3. Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije (KGZ), 2017. Tehnologija pridelave sončnice. 2017. <https://lj.kgzs.si/Portals/1/2017%20-%20novice/TN%20soncnica%2010%2004%2017.pdf> (13.12.2023)
4. Li L, Chen S, Yang C, Meng F, Sigrimis N, 2020. Prediction of plant transpiration from environmental parameters and relative leaf area index using the random forest regression algorithm. *Journal of Cleaner Production* 261: 121136.
5. Marschner P, 2011. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition*, Academic Press, Massachusetts, US.
6. Martin EV, 1940. Effect of Soil Moisture on Growth and Transpiration in *Helianthus Annuus*. *Plant Physiology* 15, 3: 449.
7. Passioura JB, 1991. Soil structure and plant growth. *Soil Research* 29, 6:717–728.
8. Rozman N, 2016. Vpliv dodajanja kock in kosmičev mineralne volne v substrat na rast in razvoj izbranih rastlin. [http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/biotehnologija/du2\\_rozman\\_neva.pdf](http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/biotehnologija/du2_rozman_neva.pdf) (13.12.2023)
9. Shikov AE, Chirkova TV, Yemelyanov VV, 2020. Post-Anoxia in Plants: Reasons, Consequences, and Possible Mechanisms. *Russian Journal of Plant Physiology* 67, 1:45–59.
10. Urh S, 2007. Vpliv različnih substratov na rast in pridelek solate (*Lactuca sativa* L.), gojenje na hidroponskem tankoplastnem sistemu. <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=129178&lang=slv> (8.1.2024)
11. Weil RR, Brady NC, 2016. *The nature and properties of soils: 15th Edition*, Pearson Education, Columbus, US.
12. Yerima BPK, Tiamgne YA, Fokou L, Tziemi TCMA, Van Ranst E, 2015. Effect of Substrates on Germination and Seedling Emergence of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) at the Yongka Western Highlands Research/Garden Park, Bamenda Cameroon. *Tropicultura* 33:91-100.