Primjena nitrofiksirajućih bakterija u cilju reduciranja mineralne dušične gnojidbe

Grgić, Filip

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josip Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:184048

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Filip Grgić, apsolvent

Sveučilišni diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer: Vinogradarstvo i vinarstvo

PRIMJENA NITROFIKSIRAJUĆIH BAKTERIJA U CILJU REDUCIRANJA MINERALNE DUŠIČNE GNOJIDBE

Diplomski rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Filip Grgić, apsolvent

Sveučilišni diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer: Vinogradarstvo i vinarstvo

PRIMJENA NITROFIKSIRAJUĆIH BAKTERIJA U CILJU REDUCIRANJA MINERALNE DUŠIČNE GNOJIDBE

Diplomski rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Filip Grgić, apsolvent

Sveučilišni diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer: Vinogradarstvo i vinarstvo

PRIMJENA NITROFIKSIRAJUĆIH BAKTERIJA U CILJU REDUCIRANJA MINERALNE DUŠIČNE GNOJIDBE

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Drago Bešlo, predsjednik
2. Prof. dr. sc. Suzana Kristek, mentor
3. Doc. dr. sc. Sanda Rašić, član

Osijek, 2016.

SADRŽAJ

1. Uvod.....1

2. Značaj dušika u ishrani bilja..... 3

3. Kruženje dušika u prirodi..... 6

3.1 Amonifikacija.....7

3.2 Nitrifikacija.....8

3.3 Denitrifikacija.....9

4. Nitrofiksacija.....10

4.1 Simbiotska nitrofiksacija.....11

4.2 Simbiotska nitrofiksacija s leguminoznim biljkama.....12

5. Rod *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* 13

5.1 Stvaranje korijenske kvržice.....13

5.2 Značaj simbiotskih nitrofiksatora roda *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* 15

6. Simbiotska nitrofiksacija s neleguminoznim biljkama.....19

7. Asimbiotska (slobodna) nitrofiksacija.....21

7.1 Anaerobna slobodna nitrofiksacija.....21

7.2 Aerobna slobodna nitrofiksacija 22

8. Rod *Azobacter* 23

8.1 Osnovne karakteristike.....23

8.2 Značaj asocijativnih nitrofiksatora roda *Azobacter* 24

9. Rod *Azospirillum* 25

9.1 Osnovne karaketeristike 25

9.2 Značaj asocijativnih nitrofiksatora roda *Azospirillum*.....26

10. Bakterizacija.....28

10.1 Značaj primjena biopesticida u ekološkoj proizvodnji.....29

10.2 Biopreparati 30

11. Zaključak.....32

12. LITERATURA.....33

13. SAŽETAK.....39

14. SUMMARY.....40

15. Popis slika i tablica.....41

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1. Uvod

Gnojidba je uz obradu i plodored oduvijek bila najvažniji poljoprivredni zahvat. Poznata je još iz doba starog Egipta. Već tada je bio cijenjen životinjski gnoj, a vrstu gnojidbe predstavljalo je i preplavljivanje njiva riječnim muljem kojeg je donosila Egipćanima sveta rijeka Nil (Znaor, 1996.).

Prema suvremenim znanstvenim definicijama gnojidba je agrotehnička mjera aplikacije gnojiva radi postizanja stabilnog visokog prinosa odgovarajuće kvalitete optimizacijom opskrbe usjeva hranivima održavanjem ili popravljanjem plodnosti tla bez štetnog utjecaja na okoliš (Lončarić, 2015.). Tri osnovna razloga neophodnosti gnojidbe koja možemo smatrati i osnovnim principima gnojidbe su :

- Održavanje ili popravak plodnosti tla kao supstrata ishrane bilja;
- Dodatak prirodno nedostatnoj opskrbi hranivima;
- Nadoknada hraniva iznesenih prinosom, ispranih ili izgubljenih iz tla nekim drugim procesima.

Kao preduvjet za poštivanje osnovnih principa gnojidbe potrebno je napraviti analizu tla na osnovu koje se može provesti optimalna gnojidba (Vukadinović i Bertić, 2013.).

Gnojiva su sve tvari anorganskog ili organskog podrijetla koje biljkama dodajemo posredno (tlo) ili izravno (folijarno) s ciljem opskrbljivanja biljke neophodnim hranivima. Prema podrijetlu gnojiva dijelimo na: organska, mineralna (anorganska) gnojiva, organsko-mineralna gnojiva i biognojiva (mikrobiološka gnojiva). Prema načinu proizvodnje sva se gnojiva dijele na prirodna i umjetna (sintetska). U prirodna gnojiva spadaju sva gnojiva nastala prirodnim, geološkim procesima te trošenjem, taloženjem i akumulacijom minerala, životinjskih izlučevina i organske tvari biljnog i životinjskog podrijetla. Umjetna ili sintetska gnojiva nastala su industrijskim procesima sinteze ili prerade sirovina. Česte su negativne predrasude zbog naziva "umjetna" ili "sintetska" pa se ova gnojiva češće nazivaju "mineralna"(Lončarić, 2015.).

Proizvodnja mineralnih dušičnih gnojiva i njihova primjena na poljoprivrednim tlima, ima raznovrsne negativne posljedice na okoliš, odnosno na prirodne ekosustave. Sam proces proizvodnje zahtijeva korištenje neobnovljivih izvora energije čije su količine u prirodi ograničene. Ovim procesima koriste se fosilna goriva kao što su prirodni ili zemni plin i

ugljen čijim korištenjem odnosno sagorijevanjem u industrijskim postrojenjima dolazi do stvaranja i oslobađanja ugljikovog dioksida. Ugljikov dioksid je jedan od najznačajnijih stakleničkih plinova i povećanje njegovih koncentracija u atmosferi dovodi do antropogenih klimatskih promjena.

S druge strane dugoročna primjena mineralnih dušičnih gnojiva na poljoprivrednim tlima uzrokuje degradaciju tla, odnosno narušavanje njegovih fizikalnih, kemijskih i bioloških svojstava, zagađenje podzemnih i nadzemnih voda te njihovu eutrofikaciju (Topol i Kanižai Šarić, 2013.).

Ekološka poljoprivredna proizvodnja za razliku od klasične konvencionalne poljoprivredne proizvodnje teži smanjenju negativnih posljedica na okoliš te očuvanju prirodnih bogatstava i prirode u cijelosti te u procesu gnojidbe daje prednost biognojivima (mikrobiološkim) kojima se u tlo ne dodaju hraniva već mikroorganizmi koji će u tlu pospješiti biološku aktivnost i povećati raspoloživost hraniva (Kristek, 2007.). Nitrofiksirajuće bakterije imaju sposobnost da omogućuju proces pretvorbe dušika iz biljkama nedostupnog oblika u dostupan oblik tako da ga biljka može uključiti u svoj metabolizam i iskoristiti za svoje potrebe. Time osiguravaju biljkama dovoljne količine dušičnog hraniva te udovoljavaju zahtjevima gospodarenja tlom kao što su: produktivnost, sigurnost, zaštita prirodnih resursa i ekonomičnost (Redžepović i sur., 2007.).

Cilj ovog rada je istražiti mogućnosti smanjenja mineralne dušične gnojidbe primjenom nitrofiksirajućih bakterija, koristeći suvremene tehnološke metode.



Slika 1. Eutrofikacija voda.

Izvor: http://hemijaunama.page.tl/Eutrofikacija.htm

2. Značaj dušika u ishrani bilja

Rast biljaka i tvorba prinosa najuže su povezani s usvajanjem mineralnih elemenata biljne ishrane, njihovim premještanjem i raspodjelom u biljci te ugradnjom u organsku tvar, ali i inim vanjskim (zemljišnim, klimatskim) i unutarnjim (biljnim) čimbenicima rasta i razvitka bilja.

Hranjive tvari ili elementi ishrane bilja mogu se podijeliti prema značaju za ishranu bilja u potrebne (esencijalne), korisne (beneficijalne), nekorisne i toksične elemente. Na temelju egzaktnih pokusa, smatra se kako je za život viših biljaka neophodno 17 kemijskih elemenata (Vukadinović i Vukadinović, 2011.).

Danas je opće prihvaćeno da se neophodnost kemijskih elemenata za život biljaka utvrđuje prema pravilima Arnona i Stouta (1939.):

- Element mora biti potreban tijekom cijelog životnog ciklusa biljaka;
- Mora imati posebnu funkciju koju ne može obavljati drugi element;
- Mora imati neposrednu ulogu u biljnom metabolizmu, mora biti potreban za obavljanje specifične fiziološke funkcije;
- Mora biti potreban za više od dvije biljne vrste.

Budući da biljke ne zahtijevaju jednake količine hranjivih elemenata, uobičajeno je da se dalje dijele na mikro i makroelemente. U makroelemente osim dušika ubrajamo: C, O, H, P, K, S, Ca, Mg, Fe i vjerojatno još Na i Si.

Dušik ima poseban položaj u grupi esencijalnih elemenata, podrijetlom je iz atmosfere (78%), ali se usvaja u mineralnom obliku i svrstava u grupu mineralnih elemenata. Sastavni je dio proteina, nukleinskih kiselina, fotosintetskih pigmenata, amina, amida, i drugih spojeva koji čine osnovu života pa se kemija ovog elementa opravdano smatra najvažnijim dijelom agrokemije, odnosno ishrane bilja (Škvorc i sur., 2014.).

Značaj dušika je to veći što ga samo mali broj organizama može koristiti iz atmosfere u plinovitom obliku (N_2). Za prevođenje molekularnog oblika dušika do amonijaka ili nitrata, u kojem ga obliku biljke usvajaju, potrebna je ogromna količina energije (946 kJ). S druge strane, dušik se lako vraća u molekularno stanje u kojem je i najstabilniji pa se lako gubi iz tla gdje se njegova količina procjenjuje na ukupno $4x10^{14}$. Dušik tla je u

obliku organskih i anorganskih spojeva. Organski dio predstavljen je humusom i nepotpuno razloženim biljnim i životinjskim ostatcima. Mineralni dio koji je potpuno raspoloživ za usvajanje, samo je mali dio ukupnog dušika tla, uglavnom u količini koja je nedovoljna za dobru ishranu poljoprivrednih biljnih vrsta.

U poljoprivrednim tlima ukupna količina dušika je najčešće 0,1% do 0,3% od čega je za ishranu bilja pristupačno tijekom jedne vegetacijske sezone svega 1% do 3%. Zbog toga je u suvremenoj poljoprivrednoj proizvodnji primjena dušika gnojidbom nezamjenjiva agrotehnička mjera jer su pristupačne količine dušika u tlu uglavnom nedovoljne za postizanje visokih prinosa. Ukupna količina dušika u tlu ovisi o nizu čimbenika kao što su klima, vegetacija, topografija terena, matični supstrat, starost tla itd. Opskrbljenost biljaka dušikom ima izuzetan značaj u tvorbi prinosa i njegove kakvoće. Dušik je izraziti "prinosotvorni " element (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Suvišak dušika na početku vegetacije može biti vrlo štetan jer se biljke tada plitko ukorjenjuju, a to u kasnijim fazama rasta posebice u sušnim uvjetima, može izazvati znatne probleme u opskrbljivanju biljaka svim hranivima i vodom. Različite biljne vrste, kultivari ili hibridi različito reagiraju na ishranu dušikom. Nedostatak raspoloživog dušika ima ozbiljne posljedice:

- Biljke formiraju manju asimilacijsku površinu, lišće je kraće, uže i blijedo zeleno zbog manjeg sadržaja klorofila što uzrokuje niži intenzitet fotosinteze, biljke brže stare i konačno prinos je smanjen;
- Žita slabo busaju, imaju sitan klas i šturo zrno;
- Šećerna repa ima smanjenu asimilacijsku površinu, korijen je mali uz višu koncentraciju saharoze, ali je ukupna količina šećera manja jer je prinos korijena niži.

Suvišak dušika rezultira intenzivnim porastom vegetacijskih organa uz modro zelenu boju lišća. Pojava " luksuzne " ishrane dušikom ima više negativnih posljedica. Strna žita jače busaju, stvaraju preveliku masu lišća pa, uslijed slabog mehaničkog tkiva i velike mase, lako poliježu uz kasnije sazrijevanje. Općenito, biljke postaju neotporne na bolesti i sušu dok su npr. šećerna repa i pivarski ječam osjetno slabije kakvoće.

Kod mnogih biljaka prvi simptom nedostatka dušika je kloroza starijih listova blizu baze biljke. Ti listovi mogu potpuno požutjeti i otpasti. Mladi listovi u početku ne pokazuju

simptome, jer se dušik može mobilizirati iz starijih listova. Ipak, takve biljke često imaju svijetlozelene gornje listove i žute ili žutosmeđe donje listove (Škvorc i sur., 2014.).

Primjenom većih doza dušika od potrebnih pored pada prinosa na lakim i propusnim tlima dolazi do ispiranja nitrata i onečišćavanja podzemnih voda.

A



B



C

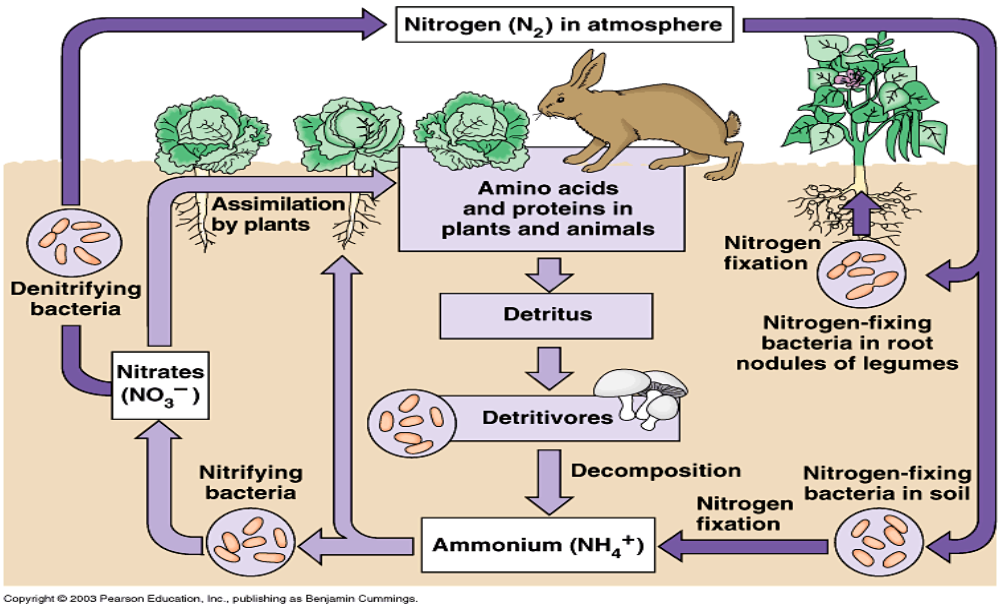


Slika 2. Fenotipski izgled običnoga bora (prikaz A), obične smreke (prikaz B), gorskog javora (prikaz C) nakon nedostatne (lijevo) i povoljne (desno) ishranjenosti s dušikom

Izvor: Interna skripta Ishrana bilja, Škvorc i sur., 2014.

3. Kruženje dušika u prirodi

Za kruženje dušika u prirodi neophodno je sudjelovanje mikroorganizama, koji svojom aktivnošću najprije razgrađuju molekule bjelančevina do aminokiselina, pa nadalje do amonijaka. To je biljkama pristupačan minerali oblik dušika, a sam proces naziva se amonifikacija. Amonijak koji mikroorganizmi i biljke ne iskoriste dalje podliježe oksidacijskom procesu, koji se zove nitrifikacija, pod utjecajem specifičnih mikroorganizama, te se najprije oksidira do nitirita - proces nitritacije, a zatim dalje do nitrata - nitratacije. Nitrati su najpovoljniji dušični spojevi za ishranu viših biljaka. Zbog toga ih biljke i pretvaraju ponovo u svoje bjelančevinaste tvari. Kada se nitrati nađu u anaerobnim uvjetima, dolazi do njihove redukcije - denitirifikacija, također radom određenih mikroorganizama, i do nastanka plinovitog oblika dušika koji odlazi u atmosferu i postaje nepristupačan biljkama. Međutim postoji posebna grupa mikroorganizama koja veže elementarni dušik iz zraka - nitrofiksacija i pretvara ga u oblike pristupačne biljkama (Kristek, 2007.). Prema tome osnovni procesi kruženja dušika su amonifikacija, nitrifikacija, denitrifikacija i nitrofiksacija, dok mikroorganizmima pripada glavna uloga jer oni omogućuju kruženje dušika, a time i održavanje života u prirodi (Fanuko, 2005.).



Slika 3. Ciklus dušika u prirodi

Izvor: htpp:// bioh. wikispaces.com/More + Elemental + Cycl

3. 1. Amonifikacija (stvaranje amonijaka u tlu)

Organski oblik dušika u tlu zauzima 99% od ukupnog dušika u tlu, a samo 1% otpada na anorganski oblik dušika koji biljke mogu koristiti. Humusne tvari su glavni nosioci organskog oblika dušika u tlu, ali dušične organske tvari nalaze se u zemljištu i u obliku svježe organske tvari. Dušik se nalazi u humusu najviše u obliku mikrobiološkog proteina, a u drugim oblicima u neznatnim količinama.

Razgradnja proteinskih tvari iz svježe organske tvari do aminokiselina i amonijaka odvija se uz pomoć mikroorganizama u procesu koji zovemo amonifikacija. Mikroorganizmi koji vode proces amonifikacije nazivaju se amonifikatori (Kristek, 2007.). Amonijak se izdvaja samo pod određenim uvjetima, naročito u pogledu organskog odnosa ugljika i dušika. Amonijak će se izdvajati tek ako je odnos C:N manji od 25:1, što znači prvenstveno kod humusnih tvari. Ako je taj odnos veći od 25:1 neće doći do izdvajanja amonijaka jer će sav dušik biti potrošen od strane mikroorganizama. Izdvojeni amonijak je pogodan mineralni oblik dušika za ishranu biljaka. U kiselim tlima, najveći dio amonijaka ostaje u amonijačnom obliku, jer se veže s kiselinama i na taj način je onemogućena njegova oksidacija u nitrate. U neutralnim i slabo alkalnim tipovima tala amonijak se brzo oksidira u nitrate (Kristek, 2007.).

U procesu amonifikacije razlikujemo dvije faze: degradaciju i dezaminaciju.

Degradacija proteina je hidrolitički proces u kome mikrorganizmi izdvajaju izvanstanične proteolitičke enzime – proteaze, koje u prisustvu vode hidrolizom razgrađuju molekule proteina sve do aminokiselina. Stvorene aminokiseline mikroorganizmi lako iskorištavaju za svoje potrebe, dok ih biljke ne koriste (Milaković, 2013.).

Dezaminacija aminokiselina je druga faza u transformaciji proteina. Mikrobi uz pomoć intracelularnih enzima dezaminaza transformiraju aminokiseline u svojoj citoplazmi do produkata mineralnog karaktera – amonijaka.

Amonifikacija ima i veliki higijenski značaj u čišćenju otpadnih kanalizacijskih voda, jer se mineralizacijom organskih oblika dušika prvenstveno proteinskog dušika, onemogućava daljnje razmnožavanje i život mnogih patogenih predstavnika mikroorganizama (Vukadinović i Vukadinović, 2011.).

3. 2. Nitrifikacija (stvaranje nitrita u tlu)

Mikrobiološki proces u kojem se amonijski spojevi oksidiraju do nitrata u tlu zove se nitrifikacija. Ovaj je proces nastavak amonifikacije pod određenim uvjetima, iako se ta dva procesa jako razlikuju. Nitrifikacija je specifičan proces vezan uz određene uvjete i specijalizirane mikroorganizme. Mikroorganizmi koji obavljaju proces nitrifikacije pripadaju grupi isključivo pravih bakterija i nazivaju se nitrifikatori. To su asporogene, neutrofilne bakterije, stanovnici samo mineralnih sredina. Optimalna temperatura za rast im je oko 30°C do 35°C, a za pojedine faze nitrifikacije postoje specifični oblici (Kristek, 2007.).

Stvoreni nitrati su najpovoljniji oblik dušičnih spojeva za ishranu viših biljaka. Zbog toga ovaj proces spada u red najvažnijih mikrobioloških procesa u tlu, a pogotovo kada se radi o poljoprivrednom zemljištu, a počinje odmah nakon mineralizacije humusa.

Proces nitrifikacije odvija se u dvije faze, koje stoje u metaboličkom odnosu: nitritacija i nitratacija.

Nitritacija obuhvaća reakcije u kojima amonijski spojevi oksidiraju do dušične kiseline, odnosno nitrita. Nitritacija je oksidoredukcijski proces, u kome su nitriti proizvod oksidacije, a organska tvar u tijelu mikroorganizama je proizvod redukcije. Ove dvije reakcije su međusobno povezane, jedna uvjetuje drugu (Milaković, 2013.). Iz prve oksidacijske reakcije egzotermnog karaktera izdvaja se energija koja se troši u drugoj endotermnoj reakciji, u sintezi organske tvari. Ovakva sinteza naziva se kemosinteza, jer se obavlja pomoću energije nastale ih oksidacije anorganskih spojeva.

Nitratacija obuhvaća reakcije u kojima se nitriti oksidiraju do nitrata, a dobivenu energiju mikroorganizmi koriste za sintezu soje organske tvari iz CO_2 ili bikarbonata, a dio dušika iz amonijaka za biosintezu proteina (Milaković, 2013.). Ovo je u potpunosti oksidoredukcijski proces, jer su nitriti proizvod oksidacije, a mikrobiološka supstanca je proizvod redukcije.

3. 3. Denitrifikacija (redukcija nitrata u tlu)

Budući da se nitrati lako ispiru u dublje slojeve tla, tamo nailaze na anaerobne uvjete te uz prisustvo odgovarajućih mikroorganizama i organske tvari podliježu redukciji, suprotnom procesu od procesa oksidacije u procesu nitrifikacije. Svaka redukcija nitrata nije istovremeno i prava denitrifikacija, stoga razlikujemo dva tipa denitrifikacije.

Denitrifikacija u širem smislu je svaka redukcija nitrata do nitrita ili amonijaka, pri čemu ne dolazi do većeg gubitka dušika iz tla. Uglavnom je to pretvaranje nitratnog dušika u organske dušične oblike prilikom asimilacije od strane raznovrsnih nespecifičnih mikroorganizama i viših biljaka. U ovom procesu pojavljuju se plinoviti produkti, obično se stvara alkalnija reakcija kao rezultat potrošnje iona NO_3 te zaostatka alkalnog kationa (Ca). Šteta je samo privremenog karaktera, jer će izumiranjem mikroorganizama i ponovnom humifikacijom i mineralizacijom, doći opet do stvaranja anorganskih spojeva dušika. Proces je koristan tamo gdje nema biljne vegetacije, jer zadržava nitrate od štetnog ispiranja iz tla (Milaković, 2013.).

Denitrifikacija u užem smislu je redukcija nitrata do pojave plinovitog dušika, koji odlazi u atmosferu. To je prava denitrifikacija, izuzetno štetan proces, koji zahtjeva anaerobne uvjete i uvijek se pojavljuje plinovit proizvod (nitratna fermentacija). Prema načinu obavljanja redukcije nitrata može biti direktna i indirektna denitrifikacija. Direktna nitrifikacija je redukcija nitrata do plinovitog dušika u kome mikroorganizmi neposredno sudjeluju od početka do kraja procesa. To je u potpunosti mikrobiološki proces. U anaerobnim uvjetima ovi većinom aerobni ili fakultativno anaerobni mikroorganizmi koriste kisik iz nitrata za oksidaciju energetske tvari u takvoj sredini, bilo da je tvar organskog ili anorganskog karaktera (Milaković, 2013.).

Indirektna denitrifikacija je proces redukcije nitrata do molekularnog dušika, ali u kome mikroorganizmi sudjeluju samo u prvoj fazi (denitratacije) do pojave nitrita, a dalje se oni reduciraju kemijskim putem pomoću amino spojeva. Stvaranje amino spojeva također je mikrobiološki proces, pa otud između jednih i drugih dolazi do kemijske reakcije, i to većinom u kiseloj sredini. Mikroorganizmi koji obavljaju proces denitrifikacije pripadaju pravim bakterijama, pa se nazivaju denitrifikacijske ili denitrifikatori. Ove bakterije odlikuju se time što su aerobne ili fakultativno anaerobne dok sam proces obavljaju pod anaerobnim uvjetima (Kristek, 2007.).

4. Nitrofiksacija (vezanje atmosferskog dušika)

Proces vezanja slobodnog atmosferskog dušika u spojeve pristupačne biljkama i mnogim mikroorganizmima naziva se nitrofiksacija. Elementarni dušik iz zraka ne mogu koristiti biljke, životinje niti velik dio mikroorganizama. Transformacijom u mineralne spojeve dušik postaje pristupačan višim biljkama i većini mikroorganizama. U ekosustavima s ograničenim količinama dušika nitrofiksacija je proces kojim se uvodi znatna količina elementarnog dušika u biološko kruženje te on postaje dio biosfere, što je i najveći značaj ovog procesa (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Osim toga biološka fiksacija dušika igra glavnu ulogu u održivosti poljoprivrede i procjeni rizobne raznolikosti a također i doprinosi bioraznolikosti tla mikroorganizmima (Škvorc i sur., 2014.). Proces fiksacije dušika zahtijeva aktivnost enzima nitrogenaze koji djeluje kao katalizator u procesu redukcije molekule dušika i njegove promjene u amonijak i osigurava za to potrebnu energiju i elektrone (Postgate, 1982.). Uz to sposobnost nitrofiksatora za obavljanje procesa ovisi o C:N omjeru, te ostalim uvjetima iz okruženja uključujući temperaturu, vlagu i intenzitet svjetlosti. Ovaj proces zahtjeva veliku potrošnju energije pa prema izvorima energije razlikujemo dva tipa nitrofiksacije: abiotsku i biotsku.

Abiotska ili fizičko - kemijska nitrofiksacija se odvija bez prisustva mikroorganizama, a može biti prirodna i umjetna. Prirodna abiotska nitrofiksacija odvija se najviše uslijed električnih pražnjenja u atmosferi (munje), što dovodi do stvaranja dušikovih oksida, koji s vodenim talozima dospijevaju u tlo kao nitrati. Ovaj tip nitrofiksacije ima veći značaj u tropskim krajevima u kojima su česte ovakve pojave u atmosferi, dok kod nas donese 1 do 2 kg dušika po hektaru. Umjetna (tehnička) nitrofiksacija odvija se u tvorničkim postrojenjima na visokim temperaturama i tlakovima u prisustvu katalizatora, po metodama za dobivanje amonijaka (redukcijom), ili dobivanjem dušikovih oksida (oksidacijom) iz kojih se dalje dobivaju nitrati.

Biotska ili mikrobiotska nitrofiksacija je proces u kojem posebna grupa mikroorganizama obavlja vezanje atmosferskog dušika (koristeći sunčevu energiju akumuliranu u biljnim asimilativima ili organskim tvarima tla) i njegovu transformaciju u prilagođene spojeve koje biljke mogu koristiti za sebe. Više je tipova mikroorganizama koji mogu vezati dušik iz atmosfere. To su slobodno živuće heterotrofne bakterije, slobodnoživuće fotoautotrofne bakterije i simbiotske bakterije (Milaković, 2013.). Biološkom fiksacijom dušika na globalnoj razini osigurava se $175x10^6$ tona dušika, što iznosi preko 70% ukupno fiksiranog

dušika na zemlji svake godine (Friščić i sur., 2011.). Prema odnosu između nitrofiksatora i viših biljaka, biotska nitrofiksacija može biti slobodna, asocijativna i simbiotska nitrofiksacija. Kod slobodne nitrofiksacije mikroorganizmi nisu direktno, histološki povezani sa višim biljkama, već su slobodni u zemljištu i u vodi. Koristeći se energetskim tvarima u tim sredinama, ove bakterije vežu znatnu količinu dušika iz zraka, te ga u obliku spojeva ostavljaju u zemljištu ili vodi, gdje ga mogu koristiti ostali mikroorganizmi ili više biljke. Asocijativna fiksacija dušika odvija se uz pomoć mikroorganizama koji žive na samoj površini korijena ili u korijenu biljke. Usvojeni dušik direktno koristi biljka domaćina i to je najniži stupanj simbioze između biljke i mikroorganizama, jer se pri tome ne stvaraju posebne morfološke strukture. U simbiotskoj nitrofiksaciji kvržične bakterije koristeći energiju biljke domaćina fiksiraju elementarni dušik iz atmosfere i predaju ga simbiontu (Kristek, 2007.) .

4. 1. Simbiotska nitrofiksacija

U ovom tipu nitrofiksacije nitrofiksatori žive u simbiozi s višim biljkama, koristeći se energetskom hranom od biljaka, a da ih pri tome opskrbljuju vezanom količinom atmosferskog dušika (Mylona i sur., 1995.). Ove bakterije su slabije rasprostranjene u prirodi, ali je vezanje dušika intenzivno, te se ovim putem veže oko polovice ukupnog vezanog dušika mikrobiološkim putem u prirodi (Tate, 1995.). Biljke daju mikroorganizmima energetsku tvar i posebne biotske supstance (biokatalizatore), jer u čistim kulturama izvan simbioze mikroorganizmi vežu manju količinu dušika iz zraka tj. samo za svoje potrebe. Na dodirnom mjestu između nitrofiksatora i biljaka stvaraju se posebna zadebljanja različitih veličina i oblika koje se nazivaju kvržice ili noduli. Nitrofiksatori tako izazivaju nodulaciju na korijenu biljaka, a tokom vezanja dušika žive u tim zadebljanjima. Zbog toga se ovi nitrofiksatori i nazivaju simbiotski nitrofiksatori ili kvržični nitrofiksatori. Mehanizam vezanja dušika ide preko reakcije redukcije (hidrogenacije) uz potrošnju energije stvorene iz energetske tvari, a uz pomoć posebnih enzima što ih ovi mikroorganizmi stvaraju. Kao rezultat procesa javlja se amonijak. Prema biljkama s kojima nitrofiksatori žive u simbiozi postoje dvije vrste simbiotske nitrofiksacije: simbiotska nitrofiksacija s leguminoznim biljakama i simbiotska nitrofiksacija s neleguminoznim biljakama.

4. 2. Simbiotska nitrofiksacija s leguminoznim biljkama

Istraživanja biološke fiksacije dušika kroz povijest pokazala su da je interes uglavnom bio usmjeren na simbiotski sustav biljaka iz porodice leguminoza i rizobija zbog toga što ove asocijacije imaju najveći kvantitativni utjecaj na ciklus kruženja dušika u prirodi (Zahran, 1999.). Unosi u kopnene ekosustave od biološke fiksacije dušika odnosno od simbiotskog odnosa između biljaka iz porodice leguminoza i kvržičnih bakterija iznosi najmanje 70 milijuna tona dušika godišnje (Brockwell i sur., 1995.). Zbog toga se leguminozne biljke smatraju sakupljačima dušika. Leguminoze kroz produkte fotosinteze opskrbljuju bakterije ugljikom odnosno energijom, dok zauzvrat bakterije opskrbljuju legiminoze dušikom uglavnom u obliku amonijaka (Howard i sur., 1996.). Simbiotska fiksacija dušika se inicira i održava aktivnom izmjenom kemijskih signala između biljke domaćina i bakterija tla (Fox i sur., 2007.). Genetski faktori oba simbionta sudjeluju u stvaranju simbiotskog odnosa koji započinje međusobnim prepoznavanjem bakterije i biljke nakon čega slijedi infekcija biljaka bakterijama, što na kraju rezultira formiranjem kvržica na korijenovu sustavu biljaka unutar kojih će se odvijati procesi simbiotske fiksacije dušika (Topol i Kanižai Šarić, 2013.). Rezultat stvaranja nodula na korijenu leguminoznih biljaka je bolje uspijevanje, povećanje količine dušika u tlu te veća količina dušičnih tvari prvenstveno bjelančevina u biljkama. Nizozemski mikrobiolog Beijerinck je 1888. godine prvi uspio izdvojiti mikroorganizme iz kvržica u čiste kulture te se od tad čitav proces proučava kao isključivo mikrobiološka pojava. Za poljoprivrednu proizvodnju vrlo je značajna simbioza kvržičnih bakterija iz rodova *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* i mahunarki čime se biološki veže atmosferski dušik koji se odmah koristi za sintezu bjelančevina i na taj se način sprječava opasnost od onečišćenja podzemnih voda nitratima koja se inače javljaju kod intenzivne primjene mineralnih dušičnih gnojiva (Friščić i sur., 2011.).

5. Rod *Rhizobium* i *Bradyrhizobium*

Rhizobium (gr. rhiza-korijen, bios-život, tj. život na korijenju) su Gram-negativne bakterije štapićastog oblika, vrlo pokretljive. Prva poznata vrsta identificirana je 1889. god. pod nazivom *Rhizobium leguminosarum* (Milaković, 2013.). Ove bakterije žive slobodno u tlu i ne mogu samostalno fiksirati dušik nego im je potrebna biljka domaćin za simbiozu.



Slika 4. *Rhizobium*

Izvor:htpp://turirma.com/index.php/fertilizers/bio-fertilizer/turrima-rhizobuim-for-bean

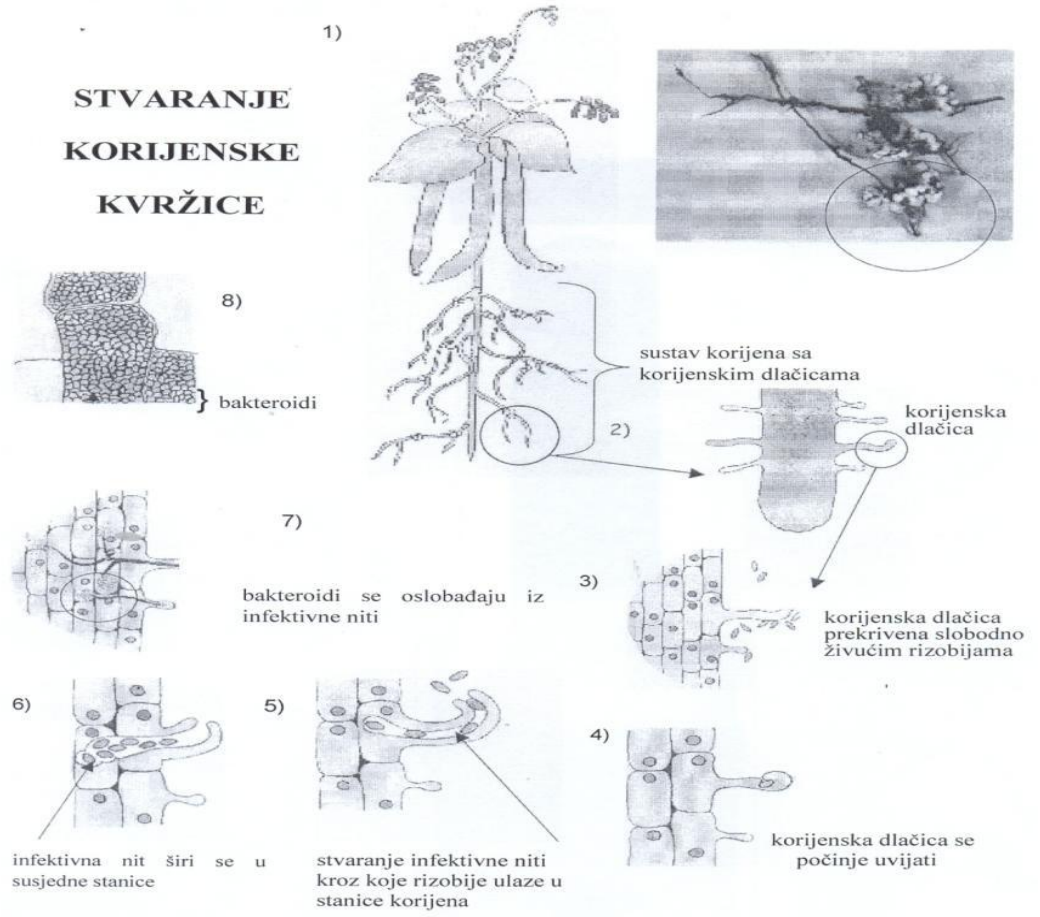
5. 1. Stvaranje korijenske kvržice

Simbioza između bakterija i biljaka iz porodice *Leguminosae* je manje ili više specifična, što znači da će pojedine vrste bakterija stvarati simbiotske odnose samo s jednom ili nekoliko vrsta leguminoza. Upravo zbog toga, proces prepoznavanja je osnova za stvaranje simbiotskih odnosa. Biljke leguminoze stvaraju fitokemijske signale u obliku jedinstvene mješavine flavonaida, koji se preko korijenovog sustava otpuštaju u rizosferu. Ti fitokemijski signali imaju dvostruku funkciju, da na površinu korijena privuku kompatibilne vrste bakterija, te da odbiju neodgovarajuće i nepovoljne vrste bakterija u tlu. Bakterije sadrže posebne skupine gena nazvanih nodulacijski geni odnosno nod geni koji su odgovorni za stvaranje bakterijskih signalnih molekula Nod faktora, koji imaju ključnu ulogu u međusobnom prepoznavanju točno određene vrste bakterija i leguminoza (Mylona i sur., 1995.). Bakterijske Nod faktore prepoznaju specijalizirani receptori na korijenu, što

na samom kraju rezultira iniciranjem razvoja kvržice na korijenovom sustavu biljeg domaćina (Spaink, 2000.).

Nakon procesa prepoznavanja, koji je omogućio prve interakcije i međusobno prepoznavanje odgovarajućih vrsta bakterija i leguminoza, slijedi proces infekcije (slika 5.). Bakterije koloniziraju korijenov sustav leguminoza, te se pričvršćuju na njegovoj površini. Kada se bakterije pričvrste na vrh korijenovih dlačica, dolazi do uvijanja njihovih vrhova, te na taj način bakterijske stanice ostaju zarobljene u tom dijelu. Na tom mjestu dolazi do razgradnje stanične stijenke biljne stanice, i do uvijanja plazma membrane i nakupljanja i ugradnje novih materijala u membranu. Ovo rezultira formiranjem potpuno nove strukture, takozvane infekcijske niti, pomoću koje bakterije ulaze u biljku (Mylona i sur., 1995.). Infekcijsku nit ne stvaraju bakterije nego stanice korijena leguminoza kao reakciju na infekciju bakterijama. Infekcijska nit se prvo razvija i širi kroz stanice korijenovih dlačica nakon čega prodire u druge stanice korijena gdje se počinje granati u svim smjerovima. Širenjem i grananjem infekcijske niti koja sadrži bakterije dolazi do širenja infekcije kroz tkiva korijena. Bakterije unutar infekcijske niti intenzivno se dijele i neprestano stvaraju Nod faktore. Ti Nod faktori potiču diobu stanica unutar korijena te na taj način dolazi do stvaranja novih struktura, kvržica na korijenovu sustavu leguminoza unutar kojih se odvija proces fiksacije atmosferskog dušika (Mylona i sur., 1995.). Biljnim provodnim tkivima bakterijama dolaze energetske tvari (ugljikohidrati), a biljkama se dovode dušične tvari koje nastaju vezanjem dušika iz atmosfere. Time se uspostavlja odnos prave simbioze.

Kvržice se razlikuju u morfološkom i fiziološkom pogledu. One se nalaze gusto zbijene na glavnim žilama bliže centralnoj žili (lupinus - tip) što je rjeđi slučaj ili su razbacane po sitnijim i krupnijim žilama kao što je slučaj kod većine leguminoza (robina – tip). Mogu biti različita oblika (okrugle, jajaste, štapićaste, u obliku koralja) i boja (ako dominiraju bijele, sive ili zelene kvržice fiksacija dušika je slaba, dok su kvržice koje dobro fiksiraju dušik na presjeku ružičaste ili crvene boje). U fiziološkom pogledu mogu biti aktivne i neaktivne kvržice. Aktivne kvržice su krupnije, u manjem broju i obično su smještene u gornjim etažama korijena oko stabljike, dok su neaktivne kvržice sitnije, brojnije od aktivnih i obično razbacane po donjim etažama korijenovog sustava (Lindeman i Glover , 2003.). Krajem vegetacije korijen i nodule se raspadaju a bakterije dolaze u tlo, te lučeći poliuronide popravljaju strukturu tla (Milaković, 2013.).



Slika 5. Stvaranje korijenske kvržice

Izvor: Interna skripta Mikrobiologija, Milaković 2013.

5. 2. Značaj simbiotskih nitrofiksatora roda *Rhizobium* i *Bradyrhizobium*

Za naša tla važna je vrsta *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*) koja živi u simbiozi sa lucernom. Lucerna je višegodišnja biljka pa se proces biološke fiksacije dušika odvija neprekidno, zbog čega su velike i količine fiksiranog dušika, oko 290 kg po hektaru godišnje. *Rhizobium meliloti* je osjetljiv na pH tako da je u tlima sa pH ispod 6 malobrojna, a ispod pH 5,5 je nema (Milaković, 2013.). Kvržice su elipsoidne ili koraljne, raspoređene

po cijelom korijenu. Kod starijih biljaka više ih ima na bočnim mlađim korijenjima, dok na centralnom korijenu dolazi do njihovog propadanja.



Slika 6. *Sinorhizobium meliloti*

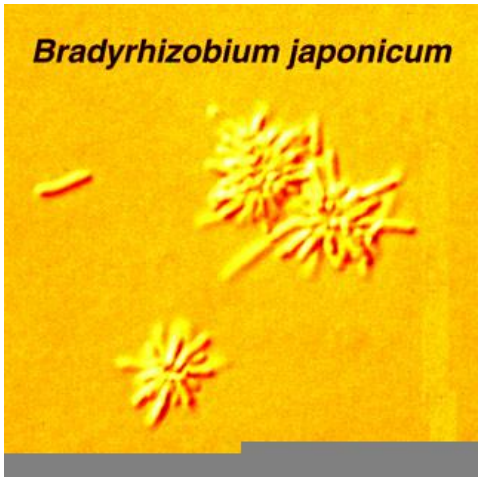
Izvor:http://www.genomenewsnetwork.org/articles/0801/symbiosis.shtml

Kanižai i sur. (2007.) su u dvogodišnjim poljskim pokusima komparacije parametara u neinokulirane i inokulirane lucerne s efektivnim sojem *Sinorhizobium meliloti* u ekološkom uzgoju zaključili da je prinos zelene mase, prinos suhe tvari, koncentracija N (% ST) i prinos bjelančevina značajno veći u inokulirane lucerne nego li u lucerne koja nije inokulirana s visoko efektivnim sojem kvržičnih bakterija. Istraživači su zaključili kako je predsjetvena inokulacija sjemena lucerne s efektivnim sojem *Sinorhizobium meliloti* neophodna u ostvarivanju većih, održivijih prinosa, a osim toga dušik fiksiran kroz korijenske nodule leguminoznih biljaka je jeftiniji, prirodniji i učinkovitiji u iskorištavanju od strane biljke domaćina.

Bradyrhizobium vrste su Gram - negativni bacili s jednim subpolarnim ili polarnim bičem (Saharan i Nehra, 2011.). Ove bakterije imaju sposobnost fiksacije atmosferskog dušika i prevođenja u pristupačni oblik koji je dostupan korištenju i za druge organizme. *Bradyrhizobium* vrste pripadaju sporo rastućim sojevima za razliku od *Rhizobium* vrsta, koje se smatraju brzo rastućim sojevima (Saharan i Nehra, 2011.). Generacijsko vrijeme kod *Bradyrhizobium spp*. je preko 6 sati, a zatim nastaju manje kolonije oko 1 mm na površini hranjive podloge nakon 7 dana uzgoja u labaratoriju. *Rhizobium* vrste imaju

generacijsko vrijeme od 2 do 4 sata i nastaju velike kolonije promjera 2 do 4 mm na površini agara nakon 3 do 5 dana uzgoja u labaratoriju (Saharan i Nehra, 2011.).

Bradyrhizobium japonicum je sporo rastuća vrsta koja u simbiozi sa sojom živi i formira kvržice. Ona fiksira i do 80 kg N/ha, a proizvodi i tvari rasta kao što su giberelini i indoli. Na jednoj biljci u ovisnosti od sorte i bakterijskog soja može se formirati oko 10 do 50 kvržica. Efektivni sojevi formiraju krupne, ovalne kvržice na centralnom korijenu koje su na presjeku crvene, zbog sadržaja leghemoglobina. U našim poljoprivrednim tlima brojnost *Bradyrhizobium japonicum* je mala pa se prilikom proizvodnje soje mora unositi u tlo u vidu bakterioloških preparata. Uspostavljanjem efektivnih simbiotskih odnosa dobiva se bolji porast biljaka, veći sadržaj proteina u zrnu i veći prinos. Stoga se *Bradyrhizobium japonicum* vrlo često koristi u mikrobiološkim istraživanjima. Predsjetvena bakterizacija sjemena soje biopreparatima kvržičnih bakterija *Bradyrhizobium japonicum* kod nas je uobičajena agrotehnička mjera. Zahvaljujući njoj soja veže 10 do 160 kg atmosferskog dušika po hektaru.



Slika 7. *Bradyrhrizobium japonicum*

Izvor: web.mst.edu/-djwesten/Bj.html

Prema Redžepoviću i sur. (1990.) na opstanak inokuluma, kao i na formiranje kvržica na biljci, veliki utjecaj imaju fizikalno - kemijska svojstva tla i to: pH tla, vlažnost, salinitet, količina dušika u tlu, interakcija metala.

Primjena herbicida utječe inhibitorno i na simbiozne bakterije *Bradyrhizobium japonicum* pri čemu je smanjena nodulacija od 5% do 21% (Milošević i sur., 2000.). Nodulacija korijena soje je pokazatelj uspješnosti simbioze između biljke i *Bradyrhizobium japonicum.* Poznato je da se različiti sojevi *Bradyrhizobium japonicum* međusobno znatno razlikuju po svojoj simbioznoj učinkovitosti, stoga je selekcija visoko učinkovitih sojeva od presudnog značaja u proizvodnji preparata za bakterizaciju (Sikora i Redžepović, 2000.).

Milaković i suradnici (2012.) su ispitivali djelotvornost različitih adhezivnih tvari na nodulacijsku sposobnost i komponente prinosa soje. Najbolji učinak na ispitane parametre utvrđen je primjenom šećera i meda dok s karboksimetil celulozom nije zabilježen ovakav utjecaj. U istraživanjima je korišten mikrobiološki preparat Osječkog poljoprivrednog fakulteta nitrobakterin koji sadrži više autohtonih visoko učinkovitih sojeva *Bradyrhizobium japonicum* na sterilnom tresetu. Preparat sadrži $10x10^{9}$ CFU/g treseta, a sojevi su izolirani na području Osječko-baranje županije. Primjenom šećera i meda kao adheziva u sklopu predsjetvene bakterizacije sjemena soje povećava se broj i masa suhe tvari kvržica po biljci stoga se njihovom primjenom povećava broj mahuna, masa 1000 zrna, a samim time i prinos soje (Milaković i sur., 2012.).

6. Simbiotska nitrofiksacija s neleguminoznim biljkama

Postoji velik broj biljaka koje žive u simbiozi s pojedinim grupama mikroorganizama. Takve zajednice također doprinose vezanju atmosferskog dušika, ali ta nitrofiksacija nikako se ne može mjeriti po aktivnosti i jačini sa simbioznom kod leguminoznih biljaka. Ukoliko takva nitrofiksacija postoji ona snabdijeva samo biljke koje sudjeluju u simbiozi, a nikako i samo zemljište vezanim dušičnim spojevima. Prema mjestu na kojem biljka uspostavlja direktnu vezu s mikroorganizmima, razlikuju se dva tipa: simbioza na korijenju i simbioza na lišću ovih biljaka.

Simbioza na korijenju: simbiozna zajednica ovakvog tipa na korijenju osobito šumskog bilja mogu stvarati ili bakterije ili gljive. Prva zajednica naziva se bakteriodomacije, druga mikorize.

Bakteriodomacije (bakteriorize) su zadebljana mjesta na korijenu neleguminoznih biljaka, u kojima žive određeni predstavnici bakterija. Ta zadebljanja mogu biti različitog izgleda, pa često podsjećaju na kvržice kod leguminoznih biljaka. Poznate su i pod nazivom "rizotamnije ".

Bakteriorize su posebno proučavane kod crne johe (anlus glutinoza), koja na svom korijenu ima tvorevine oblika korala, zapravo cijelo zadebljanje odrveni i tako ostaje više godina. Iz takvih zadebljanja mikrobiolozi su izdvojili predstavnike najviših bakterija (aktinomiceta) te su nazvane *Proactinomyces alni*, za koje se smatra da vežu dušik iz zraka, iako samo za potrebe biljke koja sudjeluje u simbiozi. Pokusi s johom u vodenim kulturama su pokazali da se ona ovim putem može snabdijevati dovoljnom količinom dušika, iako sama bakterija na umjetnoj podlozi veže neznatne količine atmosferskog dušika. Smatra se da kod navedenih mikroorganizama nije izražena nikakva specifičnost prema pojedinim vrstama johe odnosno ove bakterije nemaju biotipove. Slična zadebljanja, koja podsjećaju na kvržice kod leguminoznih biljaka zapažaju se i kod nekih trava (Milaković, 2013.).



Slika 8. Simbioza *Proactinomyces alni* sa anlus glutinoza

Izvor: htpps://de.wikipedia.org/wiki/Frankia_alni

Tako se na korijenu livadnog repka (*alppecurus pratensis*) nalaze zadebljanja u kojima se razvijaju sporogene bakterije *Bacillus alopecuri* i u izvjesnoj manjoj količini fiksiraju atmosferski dušik za svoje potrebe i potrebe biljke domaćina.

7. Asimibiotska (slobodna) nitrofiksacija

Kod ovog tipa nitrofiksacije mikroorganizmi ne žive ni u kakvoj direktnoj povezanosti s višim biljkama, već su slobodni u tlu i vodi. Nalaze se u blizini korijenovog sustava različitih biljaka te tako tvari koje izlučuje biljno korijenje predstavljaju povoljan energetski materijal za ove nitrofiksatore. Koristeći se energetskim materijalom u tim sredinama, ove bakterije vežu dušik iz zraka u obliku spojeva (najviše amonijaka), ostavljaju ga u tlu i vodi, gdje ga mogu koristiti ostali mikroorganizmi ili više biljke. Ovo je najizraženiji tip nitrofiksacije mikrobiološkim putem, jer su ovi mikroorganizmi dobili tu sposobnost izvan direktnog utjecaja samih biljaka, zbog toga je i veći njihov značaj u obogaćivanju zemljišta ili vode dušikom (Milaković, 2013.). Zastupljenost slobodnih fiksatora dušika ovisi o tipu tla i njegovim fizikalno - kemijskim karakteristikama, dok na njihovu brojnost i aktivnost utječe niz ekoloških faktora, kao što su pH, temperatura, količina kisika, sadržaj vode, sadržaj organske tvari, mineralni oblici dušika i mikroelementi (Milaković, 2013.). Slobodna fiksacija dušika u tlu uglavnom se javlja kao rezultat aktivnosti saprofitskih bakterija iz roda *Azotobacter* i *Clostriduim*, ali i nekoliko drugih rodova slobodno živućih bakterija i cijanobakterija. Neki od njih su aerobni, neki anaerobni, a neki fakultativni organizmi. Aerobni mikroorganizmi mogu različitim mehanizmima stvoriti anaerobne uvjete potrebne za fiksaciju dušika. Organizmi koji mogu živjeti i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima fiksiraju dušik samo u anaerobnim uvjetima (Topol i Kanižai Šaric, 2013.).

Prema kisiku iz zraka u određenim sredinama možemo razlikovati dvije vrste slobodne nitrofiksacije: anaerobna slobodna nitrofiksacija i aerobna slobodna nitrofiksacija.

7.1 Anaerobna slobodna nitrofiksacija

Anaerobne nitrofiksacijske bakterije prvi je otkrio Winogradsky (1883.), što je ujedno i prvo otkriće slobodnog tipa nitrofiksacije dušika u prirodi (Zavarin, 2006.). Te bakterije pripadaju grupi buternih bakterija, a odlikuju se po tome što u bez dušičnim sredinama vežu dušik iz zraka (*Clostridium butyricum*). To su krupniji anaerobni, gram pozitivni polimorfni štapići, koji stvaraju spore tipa klostridija, s karakterističnom granuloznom reakcijom. Kao energetski materijal koriste uglavnom monosaharide po tipu buteren fermentacije, i oslobođeni vodik koji odlazi za redukciju dušika iz zraka u amonijak (Milaković, 2013.). Ovakve vrste bakterija mogu se očekivati u tipovima tala s kiselim humusom, gdje je usred nerazložene i nagomilane svježe organske tvari otežan pristup

kisika i zraka, kisela reakcija i širi odnos između kisika i dušika, što sve ide u prilog jačoj zastupljenosti ovog tipa slobodne nitrofiksacije u takvim tlima. Vjerojatno ovim putem dolazi i do apsolutnog povećanja količine dušika u tlu, koje različiti humifikatori koriste za svoje sinteze (osobito gljive) da bi na kraju izumiranjem doprinijeli stvaranju boljih tipova humusa u crnim tlima. Za poljoprivredna tla je ipak rjeđi ovaj tip nitrofiksacije, uslijed obrade i prevrtanja gornjih slojeva dolazi do prozračivanja tla i stvaranja aerobnih uvjeta. Ove bakterije podnose kiseliju reakciju, stoga ima više uvjeta za njihov snažniji razvoj u šumskim tlima, tamo gdje je otežan rad aerobnim slobodnim nitrofiksatorima. Zbog toga se ovaj tip nitrofiksacije smatra karakterističnijim za šumska kisela tla, iako se nalazi i u poljoprivrednim tlima (Škvorc, 2014.). Praktički ove bakterije vežu manje dušika nego aerobni nitrofiksatori (2 do 3 puta), ali su energičnije, jer im stoji na raspolaganju slabiji anaerobni tip dobivanja energije (buterna fermentacija) dok se aerobni nitrofiksatori koriste aerobnim oksidacijskim procesom s više energije.

7. 2. Aerobna slobodna nitrofiksacija

Ovaj tip nitrofiksacije ostvaren je svuda gdje ne postoje ozbiljne prepreke za pristup kisika iz zraka. Ovo je pretežno tip nitrofiksacije u poljoprivrednim tlima, koja se obrađuju i stalno provjetravaju kao i u vodenim sredinama. Da bi nitrofiksacija bila intenzivnija moraju se ispuniti određeni ekološki uvjeti u tlu (temperatura, reakcija sredine, vlažnost, aeracija, prisustvo fosfora i drugih elemenata). Od najvećeg utjecaja je reakcija (pH) u tlu, jer se pokazalo da je neutralna do slabo alkalna reakcija najpovoljnija za intenzivan razvoj ovih nitrofiksatora i obavljanje nitrofiksacije, iako je nešto slabija i u kiseloj sredini pa i u kiselim tlima (Milaković, 2013.). Bijernick (1901.) je prvi izdvojio aerobni slobodni nitrofiksator i uvrstio ga u novi rod azotobacterium. Sve osobine nitrofiksirajućih bakterija potječu vjerojatno od njihove sposobnosti da vežu atmosferski dušik. Da bi to mogli ostvariti moraju koristiti raznovrstan energetski materijal, najčešće monosaharide ili proizvode njihovih transformacija (alkoholi, soli, organske kiseline). One fiksiraju znatne količine dušika i u čistim kulturama na umjetnim, bezdušičnim podlogama. U tlu djeluju mnogo intenzivnije, fiksiraju i do 15 puta veću količinu dušika u odnosu na čiste kulture na umjetnim podlogama. *Azobacterium* se koristi za pripremanje i unošenje u tlo kao mikrobiološki preparat azotobacterin (pripremljen iz čistih kultura ovih bakterija).

8. Rod *Azobacter*

Dva su roda bakterija u obitelji *Azotobacteraceae* koja su nitrofiksirajuća i slobodna i žive u aerobnim uvjetima a to su : *Azotobacter* i *Azomonas*. Osnovna razlika između ova dva roda je da su *Azetobacter* ciste otporne na sušu, a *Azomonas* ne. Osim razlike u stvaranju cisti ova dva roda su prilično slična. Obje su velike Gram-negativne bakterije, pokretljive bičevima i mogu biti ovalne ili u obliku koka. Oba roda proizvode katalaze.

8.1. Osnovne karakateristike

Postoji sedam vrsta *Azobactera* i tri vrste *Azomonasa* (Salhia, 2010). Diferencijacija se temelji prvenstveno na prisutnosti ili odsutnosti pokretljivosti, tipa vodotopivog pigmenta a time i uporabe izvora ugljika. Rod *Azobacter* sa sastoji od sedam vrsta: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. bijerinckii*, *A. paspali*, *A. armeniacus*, *A. nigricans*, i *A. salinestri*. Njihova glavna zadaća je sposobnost da nesimbiotski fiksiraju dušik s genomskim sadržajem G-C od 63 mol% -67,5 mol% i distribuiraju u tlu, vodi i sedimentima. Agronomski značaj ovih bakterija je i sposobnost sinteze antibiotika, promocija tvari za rast biljaka, vitamina, ekopolisaharida i prozvodnju pigmenta te antagonističko djelovanje protiv patogena. Oni također imaju sposobnost otapanja fosfata u vodenim sustavima, tj. sudjeluju u proizvodnji vermikokomposta. Osim fiksacije dušika, *Azobacter* također proizvodi tiamin, riboflavin, indol octenu kiselinu i giberline čime kontrolira biljne bolesti. Kad se *Azobacter* primjeni na sjeme, klijavost sjemena se u velikoj mjeri poboljšava.

Azobacter su heterotrofne i aerobne bakterije koje se nalaze na alkalnim i neutralnim tlima (Kumar i sur. 2007.). Stanice su velike i ovalne 1,5 do 2 μm u promjeru. Javljaju se pojedinačno, u parovima ili nepravilnim oblicima, a ponekad i u lancima različitih duljina. Raspon pH za rast ovih bakterija je 4,8 do 8,5. Istraživanja pokazuju da je *Azobacter* najosjetljivija grupa mikroba na primjenu herbicida, te može biti pouzdan bioindikator biogenosti tla jer burno reagira na promjenu bilo kojeg faktora u zemljištu kao ekosustavu (Milošević i sur., 2011.).



Slika 9. *Azobacter*

Izvor: https://www.jic.ac.uk/SCIENCE/molmicro/Azot.html

8. 2. Značaj slobodnih nitrofiksatora iz roda *Azobacter*

Pri inokulaciji pšenice sa nesimbiotskim fiksatorima (*Azobacter chroococcum*) i aktinomicetama uz dodatak mineralnog dušikovog gnojiva, Jarak i sur. (2006.) su zabilježili povećanje prinosa (8% do 11%) kod inokuliranih biljaka pšenice. Također u istom istraživanju u rizosferi inokuliranih biljaka broj *Azobactera,* aktinomiceta i dehidrogenazna aktivnost su bili značajno povećani.

U istraživanjima Govedarice i sur. (1997.) utvrđeno je da je inokulacija s *Azobacter chroococcum* utjecala na povećanje prinosa zrna kukuruza i da je efekt ovisio od soja hibrida i primjenjenih količina NPK gnojiva. Također je utvrđen utjecaj bakterizacije na prinos zrna po hektaru. Ovi rezultati pokazuju mogućnost zamjene određene količine mineralnih dušikovih gnojiva s biofertilizatorima koji bi sadržavali visoko efektivne proizvodne sojeve diazotrofa (Govedarica i sur., 2002.). Bakterizacijom kukuruza sa sojevima *Azobacter chroococcum, Azobacter vinelandii, Azospirillum lipoferum, Bacillus megatherium, Bacillus suptilis* i drugi u ovisnosti od količine primjenjenog mineralnog dušika dobiveno je povećanje ukupnog broja mikroorganizama, broja azobaktera i bakterija iz ciklusa kruženja fosfora kao i prinosa zrna kukuruza (Cvijanović i sur., 2007.).

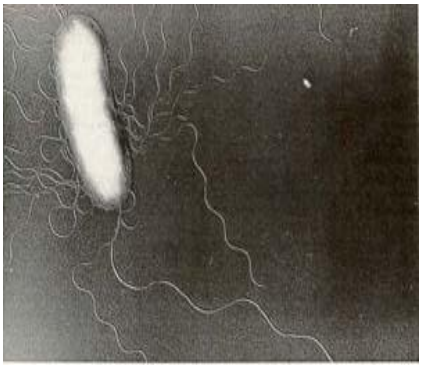
Jarak i sur. (2011.) su u svojim istraživanjima utvrdili da se inokulacijom sa sojevima *Azobacter* može utjecati na povećanje prinosa kukuruza za više od 10%, kao da se povećala ukupna mikrobiološka aktivnost.

9. Rod *Azospirillum*

9. 1. Osnovne karakteristike

Rod *Azospirillum* su aerobne, vrlo pokretne bakterije iz reda *Rhodospirallales*. To su Gram-negativne bakterije, štapićastog oblika, promjera 1 μm, a dužine 2,1-3,8 μm, često sa šiljastim krajevima. U tekućem mediju pokreću se uz pomoć jednog biča, dok se u čvrstom mediju, pri temperaturi od 30°C formiraju bočni bičevi. Optimalne temperature za bakterije ovog roda kreću se od 35°C do 37° C (Milošević, 2013.).

Ova skupina obuhvaća 10 vrsta, a svaka je klasificirana prema biokemijskim i molekularnim karakteristikama: *A. lipoferum, A. brazilense, A. amazonense, A. halopraeferens, A. irakense, A. largimobile, A. doebereinerae, A. oryzae, A. melinis i A. canadensis* (Milošević, 2013.). Ubrajamo je u skupinu asocijativnih nitrofiksatora, a u mogućnosti je da formira bliska udruženja s nekoliko pripadnika *Poaceae* (trava), uključujući i agronomski važne žitarice kao što su riža, pšenica, kukuruz, zob, ječam. Direktne koristi koje biljka ima od benefitnih bakterija roda *Azospirillum* su: poboljšanje u razvoju korijena, povećanje usvajanja vode i mineralnih hraniva, biološka fiksacija dušika, dislociranje patogenih gljiva i bakterija iz rizosfere korijena. Također utječu na brojnost populacije korisnih mikroba, te pravce mikrobioloških procesa u tlu, a time i na njegovu plodnost. Njihovom primjenom smanjuje se upotreba dušičnih gnojiva, čime se čuva i povećava organska tvar tla, odnosno njegova kvaliteta (Cvijanović i sur., 2007.). Od navedenih vrsta najznačajnije i najčešće istraživane su *A. lipoferum i A. brasiliense.*



Slika 10. *Azospirillum brasiliense*

Izvor:http://web.mst.edu/~microbio/bio221_1999/A_brasilense.html

9. 2. Značaj nitrofiksatora roda *Azospirillum*

Azospirillum brasilense fiksira atmosferski dušik u zoni korijena, obogaćujući tlo dušikom. Također producira hormone rasta auksine i citokinine koji utječu na morfologiju korijena, a time i poboljšavaju unos hranjivih tvari iz tla. Poboljšava klijavost, povećava imunitet biljke i prinos (El- Katatny, 2009.).

U radu El - Katatny (2009.) ispitan je utjecaj rizosferne bakterije *Azospirillum brasilense* koja potiče rast biljaka, te plijesni *Trichoderma harzianum* T 24, na proizvodnju enzima, fiksaciju dušika te njihovu ulogu u stimulaciju rasta mladica rajčice. Mikroorganizmi su inokulirani u obliku slobodnih ili imobiliziranih zrna. Sva su svježe pripremljena zrna imala veću sposobnost enkapsulacije od suhih zrna, a enkapsulacija nije znatno utjecala na proizvodnju enzima. Zrna sa stanicama bakterija ili plijesni uspješno su korištena u tri uzastopna ciklusa rasta u svježoj sterilnoj podlozi, pri čemu se poboljšala proizvodnja enzima. Zajedničkim je uzgojem *A. brasilense* i *T. harzianum* (slobodnih ili imobiliziranih), na polučvrstoj podlozi bez dušika, omogućena fiksacija dušika i nakon dodavanja pektina, hitina ili karboksimetil celuloze. Dodatkom ovih izvora ugljika u sterilnu zemlju povećala se fiksacija dušika, bilo uporabom suhih enkapsuliranih zrna *A. brasilense*, bilo primjenom *A. brasilense* uz plijesan *Trichoderma*. Primjenom svih vrsta inokuluma povećan je rast mlade rajčice, a prisutnost *A. brasilense* ubrzala je razvoj korijenja. Koinokulacija bakterije *Azospirillum* sa drugim mikroorganizmima ima veliku mogućnost primjene u obogaćivanju tla i pospješivanju rasta biljaka (El- Katatny, 2009.).

Kristek i sur. (2015.) proučavali su utjecaj nitrofiksirajucih bakterija na elemente prinosa i kvalitete soje. Dvogodišnji pokusi provedeni su na dva tipa tla (humoglej i eutirično smeđe tlo) tijekom 2012. i 2013. godine. Istraživan je utjecaj simbiotskih, asocijativnih i slobodnih nitrofiksirajućih bakterija na prinos i kvalitetu zrna soje sorte Ika. Pokus je postavljen po randomiziranom blok rasporedu u 4 ponavljanja i 6 varijanti (A1 – kontrola; A2 – sjeme tretirano bakterijom *B. japonicum*; A3 – sjeme tretirano bakterijama *B. japonicum, A. brasilienese* i *A. chroococcum*; B1 – mineralna gnojidba dušikom na osnovi analize tla; B2 – reducirana mineralna gnojidba za 30%; B3 – reducirana mineralna gnojidba za 60%). Najbolji rezultati na homogleju ostvareni su varijantom A3B3, a na euteričnom smeđem tlu varijantom A3B2.

Na temelju dobivenih rezultata istraživanja (prinos zrna soje, prosječni sadržaj bjelančevina u zrnu) možemo reći da je kod obje varijante primjene nitrofiksirajucih bakterija dobiven bolji rezultat ispitivanih parametara, u obje godine istraživanja i na oba tipa tla.

Kombinirana inokulacija sjemena soje bakterijama *B. japonicum, A. brasiliense* i *A. chroococcum* u svim istraživanim varijantama ostvarila je značajno više vrijednosti istraživanih parametara u odnosu na kontrolnu varijantu i varijantu u kojoj je sjeme tretirano isključivo simbiotskim bakterijama *B. japonicum* (Kristek i sur., 2015).

10. Bakterizacija

Bakterizacija predstavlja vrlo učinkovitu metodu kojom se efikasni sojevi kvržičnih bakterija uvode u tlo, odnosno u rizosferu (Deaker i sur., 2004.).

Cilj bakterizacije je osigurati dovoljan broj učinkovitih kvržičnih bakterija koje bi omogućile brzu kolonizaciju rizosfere omogućavajući da infekcija i nodulacija započnu čim prije nakon klijanja i nicanja, što u konačnici rezultira ostvarivanjem optimalnih prinosa. Potreba za bakterizacijom visokim brojem učinkovitih bakterija postoji kako bi se na taj način nadmašila kompeticija s populacijama ne učinkovitih sojeva bakterija u tlu ili kako bi se povećala populacija učinkovitih bakterija na tlima čiji su uvjeti limitirali njihov opstanak (Deaker i sur. 2004.). Počeci razvoja bakterizacije vezani su s otkrićima da se proces fiksacije dušika odvija u korijenovim kvržicama. Znanstvenici su nakon toga prepoznali mnogo više specifičnu vezu između određenih sojeva bakterija i određenih vrsta leguminoza u kontekstu infektivnosti (mogućnosti infekcije i noduliranja) i efektivnosti (sposobnosti fiksiranja atmosferskog N_2) (Deaker i sur 2004.).

Daljnji pravci istraživanja usmjereni su na proučavanje prirodnih populacija simbioznih fiksatora dušika kao i na identifikaciju i selekciju najučinkovitijih sojeva (Redžepović i sur., 1991.). Identifikacija i selekcija najučinkovitijih sojeva važna je zbog njihovog iskorištavanja u pripremi komercijalnog preparata za bakterizaciju jer uvođenjem najučinkovitijih sojeva, koji su istovremeno prilagođeni uvjetima određenog proizvodnog područja moći će se poboljšati kvalitet inokuluma što ima za posljedicu veće iskorištavanje procesa simbiotske fiksacije dušika (Sikora i Redžepović, 2000.). Maksimalnim iskorištavanjem prirodnog procesa simbiotske fiksacije dušika povećala bi se proizvodnja proteina u zrnu leguminoza, smanjili troškovi proizvodnje, a potrošaču ponudili jeftiniji i s gledišta prehrane, biološki vredniji proizvod (Sikora i Redžepović, 2000.).

Istraživanja su bila usmjerena i na razvoj različitih metoda primjene preparata za bakterizaciju putem bakterizacije sjemena zaprašivanjem, peletiranjem, impregniranjem ili bakterizacije tla putem tekućih ili granuliranih sredstava (Deaker i sur., 2004.). Komercijalni preparati za bakterizaciju kao nosač bakterijskih stanica najčešće upotrebljavaju treset zbog visokog sadržaja organske tvari, optimalnog kemijskog sastava i dobrog kapaciteta zadržavanja vode (Stephens i Rask, 2000.). Međutim ispituju se svojstva i drugih nosača kao što su mineralna tla, glina, kompostirani biljni materijal, perlit i dr. U nekim državama su uspostavljene službe za kontrolu preparata za bakterizaciju, poduprte

zakonom i propisima (Deaker i sur., 2004.). Mnogobrojna poboljšanja samih preparata osigurala su optimiziranje uvjeta proizvodnje i održavanje kvalitete proizvoda. No zbog manjka kontrole postotka bakterizacije, unatoč uvijek prisutnim preporukama proizvođača koji se odnose na čuvanje i aplikaciju preparata za bakterizaciju, puni potencijal proizvoda visoke kvalitete nije uvijek postignut (Deaker i sur., 2004.).

U Republici Hrvatskoj predsjetvena bakterizacija sjemena soje visoko učinkovitim sojevima *B. japonicum* je preporučena redovna mjera u proizvodnji ove leguminoze (Sikora i Redžepović, 2000.). Nadalje istraživanja Kanižai i sur. (2007.) su potvrdila kako predsjetvena bakterizacija sjemena lucerne u ekološkom uzgoju utječe na veći prinos zelene mase, suhe tvari i bjelančevina u odnosu na nebakteriziranu varijantu. Ista skupina autora (2007.) je utvrdila kako djelotvornost simbioze između krmne galege (*Galega orijentalis Lam.*) i *R. galegae* u ekološkom uzgoju značajno utječe na težinu i dinamiku rasta nadzemnih dijelova biljke i akumulaciju esencijalnih makroelemenata u biljci, prouzročene bakterizacijom. Također, utvrđeno je kako primjena selekcioniranih sojeva *B. japonicum* i biostimulatora značajno utječe na povećanje sadržaja dušika u cijeloj biljci i stabljici soje (Redžepović i sur., 2007.). Djelotvornost pripravaka za predsjetvenu bakterizaciju sjemena može se poboljšati dodatkom različitih adhezivnih sredstava. Primjenom lako pristupačnih tvari koje imaju svojstva adheziva, poput šećera u sklopu predsjetvene bakterizacije sjemena soje povećava se broj i masa suhe tvari kvržica po biljci, broj mahuna, masa 1000 zrna, a samim time i prinos soje (Milaković i sur., 2012.).

10. 1. Značaj primjene biopreparata u ekološkoj prozvodnji

Biopreparat je tvar koja sadrži živuće mikroorganizme koji, kada se primjenjuju na sjeme, površinu biljke ili tla koloniziraju rizosferu ili unutrašnjost biljke i time potiču rast povećanjem opskrbe ili dostupnosti primarnih hranjivih tvari za domaćina biljke.

Biognojiva dodaju hranive tvari kroz prirodne procese fiksacije dušika, otapanja fosfora, te poticanja biljka na rast kroz sintezu tvari. Uporabom biopreparata može se očekivati smanjenje upotrebe kemijskih gnojiva i pesticida. Biopreparati pružaju ekološki prihvatljive, organske poljoprivredne proizvode i isplativiji su od kemijskih gnojiva. Dok su biopreparati tehnički živi simbiozom se povezuju s korijenjem biljaka. Sadržani mikroorganizmi lako mogu pretvoriti složene organske tvari u jednostavne spojeve, koje biljke lako uzimaju. Time se održava stanište - tlo. Upotreba biopreparata povećava prinos usjeva za 20% -30%, zamjenjuje kemijski dušik i fosfor za 25%, a i potiče rast biljaka.

Također mogu pružiti i zaštitu protiv suše i nekih bolesti u tlu (Vukadinović i Vukadinović, 2013.).

Amutha i sur. (2011.) izdali su rad o izolaciji i masovnoj proizvodnji biopreparata (*Azotobacter* i *Phosphobacter*). Za identifikaciju *Azotobactera* i *Phosphobactera* su se koristili Bergeyisovim priručnikom za sistematsku bakteriologiju (Williams and Wilkins, 1989.). Kao medij za izolaciju su koristili Pikovskayaís mediji i Asbhyís agar. Uzorci tla prikupljeni su iz različitih područja. Organizmi su izolirani analizama za karakterizaciju prema morfološkim i biokemijskim karakteristikama različitim biokemijskim testovima iskoristivosti citrata, katalaze, ureaze, indola, metil crvenog, H_2S-a i nitratne redukcije. Pomoću specifičnih medija (Pikovskayaís medija za *Phosphobacter* i Asbhyís agara za *Azotobacter*) uzgajali su organizme za masovnu proizvodnju.

Zaključili su da mikroorganizmi ostaju u zemlji duže vrijeme i obogaćuju tlo. Ovisnost o kemijskim gnojiva za daljnji rast poljoprivredne donijelo bi daljnji gubitak plodnosti tla i onečišćenja voda.

To je prirodna metoda, bez stvaranja povratnih problema kao što su salinitet, lužnatost, erozija tla itd. U golemim područjima gdje je malo ulaganje u poljoprivredu, kao u kulture poput šećerne trske ovi proizvodi će biti od velike koristi kako bi se održala proizvodnja. Biopreparati se upijaju i drže otopljene hranjive tvari, tako da korijen ima više vremena da ih prihvati. Biopreparatima se dodaju male količina cinka, bakra, bora i drugih hranjivih tvari u tlu i za zaštitu kvalitete vode.

10. 2. Biopreparati

Biopreparati su preparati koji sadrže zemljišne bakterije koje vezivanjem dušika iz zraka i mobilizacijom fosfora i kalija iz tla osiguravaju uzgajanim biljkama oko 80 kg dušika iz zraka, 35 kg fosfora i 40 kg kalija iz tla što je dovoljno za najmanje prosječne prinose pa se gnojidba umjetnim (NPK) gnojivima može izostaviti. Nadalje ubrzano razgrađuju i kompostiraju biljne ostatke (slama, kukuruzovina i ostatci stabljika drugih kultura).

Bactofil A10 sadrži *Azospirillum brasilense, Azobacter vinelandi, Bacillus megaterium, Bacillus polymyxa, Pseudomonas flourescens, Streptomyces albus* varijacije, makro i mikro elemente, pomoću mikroorganizama sintetizirane enzime i druge djelatne tvari (stimulatori rasta, biljni hormoni, vitamini). Koristi se za uskolisne biljke, npr. pšenicu, ječam, raž, zob, sve vrste trava, kukuruz i proso.

Bactofil B10 sadrži *Azospirillum brasiliense, Azobacter vinelandii, Bacillus megaterium, Bacillus circulans, Bacillus suptilis, Pseudomonas fluorescens, Mikrococcus roseus* varijacije, makro i mikro elemente, te pomoću mikroorganizama sintetizirane enzime i druge djelatne tvari. Koristi se za širokolisne biljke, npr. grah, suncokret, repu, djetelinu, te u povrćarstvu, cvjećarstvu, voćarstvu te vinogradarstvu.

Kristek i suradnici tijekom 2007. i 2008. proveli su istraživanje utjecaja primjene mikrobiološkog preparata BactoFil na prinos i kvalitet šećerne repe. Istraživanja su provedena na dva tipa tla: eutirično smeđe (smeđe tlo T-1) i močvarno glejno djelomično hidromeliorirano tlo (T-2). Pokus je postavljen po split blok metodi u 6 različitih varijanti i 4 ponavljanja. Korišteni hibrid u sjetvi bila je Severina (KWS). Uz kontrolu, bez primjene BactoFil-a varijante su se razlikovale prema apliciranoj količini BactoFil-a i vremenu njegove primjene.

Najbolji rezultati prinosa korijena repe (t ha^{-1}), sadržaja šećera u repi (%) i prinosa čistog šećera (t ha^{-1}) kod tla T-1 dobiveni su u varijanti 2 kod primjene 0,5 l ha^{-1} BactoFil-a u jesen +1,0 l ha^{-1} BactoFil-a u proljeće (Kristek i sur. 2010.). Varijanta 4 (primjena 1,0 ha^{-1} BactoFil-a u jesen +0,5 l ha^{-1} BactoFil-a u proljeće) je kod tla T-2 dala najbolje rezultate, međutim nije bilo statistički značajnih razlika ($p > 0,01$) između navedene varijante 4 i varijante 5 (1,5 l ha^{-1} BactoFil-a u jesen) (Kristek i sur. 2010.).

Mikro- vital

Mikro-vital je mikrobiološko bakterijsko gnojivo koje u svom sastavu sadrži dušične, fosforne i celulozne bakterije. Dušične bakterije vežu iz zraka 50-60 kg/ha efektivnog dušika (N) što odgovara 300 do 600 kg mineralnog gnojiva ovisno o postotku dušika kojeg sadrži. Fosforne bakterije oslobađaju 20-40 kg/ha aktivnog fosfora (P). Celulozne bakterije razgrađuju biljne ostatke (slamu, kukuruzovinu) za 4 do 8 tjedana te tako pospješuju mineralizaciju tla za nadolazeću kulturu.

11. ZAKLJUČAK

Ekološka poljoprivredna proizvodnja temelji se na nekoliko osnovnih načela kojima se nastoji minimalizirati negativan utjecaj poljoprivredne proizvodnje na okoliš te potaknuti njegovo očuvanje.

U tome važnu ulogu imaju mikrobiološka bakterijska gnojiva koja sadrže nitrofiksirajuće bakterije koje vežu atmosferski dušik, koji se odmah koristi za sintezu bjelančevina, a time se sprječava i opasnost od onečišćenja podzemnih voda nitratima koji se inače javljaju kod intenzivne primjene mineralnih dušičnih gnojiva. Tlo se obogaćuje organskom tvari što ima višestruke pozitivne učinke na održanje povoljnih fizikalnih, kemijskih i bioloških svojstava tla.

Sjetvom leguminoznih usjeva održava se plodnost tla i omogućuje kulturama koje slijede u plodoredu korištenje biološki vezanog atmosferskog dušika. Time se smanjuje i količina mineralnih dušičnih gnojiva koje u pravilu treba aplicirati samo u manjim količinama na početku vegetacije za početni rast i razvoj dok one ne formiraju korijenove kvržice i dok ne počne proces fiksacije dušika. Prilikom uzgoja leguminoza primjenom bakterizacije možemo povećati učinkovitost procesa simbiotske fiksacije dušika te na taj način povećati i količinu fiksiranog dušika što na samom kraju rezultira i povećanjem njihovog prinosa.

Cilj ekološke poljoprivrede u budućnosti bio bi razvoj vrhunskih sorti leguminoza, poboljšanje postojeće poljoprivredne prakse i povećanje efikasnosti samog procesa fiksiranja dušika boljim upravljanjem simbiotskih odnosa između biljaka i bakterija.

12. LITERATURA

Časopisi

1. Amutha, R., Karunakaran, S., Dhanasekaran, K., Hemalatha, R., Monika, P., Shanmugaprya, T. (2014.): Isolation and mass production of biofertilizer (Azobacter and Phosphobacter). International Journal of Latest Research in Science and Technology 3 (1): 79-81.

2. Arnon, D. I., Stout, P. R. (1939.): The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper plant. Physiology 14 (2): 371-375.

3. Beijerinck, M.W. (1901.): Ueber oligonitrophile Mikroben. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt II 7: 561-582.

4. Brockwell, J., Bottomley, P. J., Thies, J. E. (1995.): Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: Acritical assessment. Plant Soil 174: 143-180.

5. Cvijanović, G., Milošević, N., Tintor, B., Dozet, G., Ivić, M. (2011.): Značaj primene rizobakterija u biljnoj proizvodnji. International Scientific Symposium of Agriculture "Agrosym Jahorina 2011.", Jahorina 139-146.

6. Deaker, R., Roughley, R. J., Kennedy, I. R. (2004.): Legume seed inoculation technology- a review. Soil biology & Biochemistry 36:1275-1288.

7. El-Katatny, M. H. (2010.): Enzyime production and nitrogen fixation by free, immobilzet and koimmobilizet inoculants of Trichoderma harzianum and Azospirillum brasilense and their possible rule in growth promotion of tomato, Food Technol. Biotechnolo. 48 (2): 161-174.

8. Fox, J. E., Gulledge, J., Engelhaukt, E., Burow, M. E., McLachlan, J. A. (2007.): Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen- fixing rhizobia and host plants. Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America 104:10282-10287.

9. Friščić, O., Uher, D., Abramović- Friščić, K. (2011.): Utjecaj bakterizacije na gospodarska svojstva novih kultura ozimog graška. Sjemenarstvo 28: 1-2.

10. Govedarica, M., Milošević, N. Jarak, M. (1997.): Teški metali i mikroorganizmi zemljišta. U (Kastori R. ured.). Teški metali u životnoj sredini, Naučni institut za ratarstvo i povrtlarstvo Novi Sad, 153-194.

11. Howard, J. B., Ress, D. C. (1996.): Structural basis of biological nitrogen fixation. Chem. Rev. 96:2965-2982.

12. Jarak, M., Đurić, S., Jeličić, Z., Kuzevski, J., Mrkovački, N. (2011.): The use of azobacter in maize production: The effect on microbiological activity of soil, early plant growth and grain yield. Suvremena poljoprivreda: časopis za pitanja poljoprivrede ISSN: 0350-1205 SG= П II Vol. 60 (1/2): 80-85.

13. Kanižai, G., Milaković, Z., Šeput, M., Bukvić, Ž., Kralik, D. (2007.): Effect of lucerne seed bacterization (Medicago sativa L.) on yield components in ecological cultivation. Cerel Research Communications 35: 577-580.

14. Kristek, S., Kristek, A., Pintar, I., Tetkić, J., Kocevski, D. (2010.): Utjecaj primjene mikrobiološkog preparata Bactofil-a na prinos i kvalitet šećerne repe. 45. hrvatski i 5. međunarodni simpozij agronoma. Opatija, 90-94.

15. Kristek, S., Kristek, A., Kraljičak, Ž., Jović, J., Antinac, I., Greger, Ž. (2015.): Utjecaj nitrofiksirajućih bakterija na elemente prinosa i kvalitete soje. 50. hrvatski i međunarodni simpozij agronoma. Opatija, 84-88.

16. Kumar, R., Dubey, N. K., Tiwari, O. P. (2007.): Evaluation of some essential oils as botanical funghi toxicants for the protection of stored food commodities from fungal infestation. S. Sci. Food Agric. 87: 1737-1742

17. Lindemann, W. C., Glover, C. R. (2003.): Nitrogen fixation by legumes, Guide A-129. College of Agriculture and Home Economics.

18. Milaković, Z., Kanižai Šarić, G., Veselovac, I., Kalajžić, I. J. (2012.): Djelotvornost adhezivnih sredstava u predsjetvenoj bakterizaciji sjemena soje. Poljoprivreda 18 (1): 19-23.

19. Milošević, N., Govedarica, M., Jarak, M. (2000.): Mikrobiološka svojstva zemljišta oglednog polja Rimski Šančevi. Zb. Radova, naučni institut za ratarstvo i povrtlarstvo, Novi Sad, 33:13-20.

20. Milošević, N., Marinković, J. (2011.): Uloga mikroorganizama u adaptaciji poljoprivrednih biljnih vrsta na abiotičke stresove. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtlarstvo Novi Sad 155-162.

21. Mylona, P., Pawlowski, K., Bisseling, T. (1995.): Simbiotic nitrogen fixation. The Plant Cell. Vol. 7: 869-885. American Society of Plant Physiologists.

22. Postgate, J. R. (1982.): Biological nitrogen fixation: fundamentals. Philos. Trans. R. Soc. B 296: 375- 387.

23. Redžepović, S., Sikora, S., Sertić, Đ., Manitašević, J., Šoškić, M., Klaić, Ž. (1991.): Utjecaj fungicida i gnojidbe mineralnim dušikom na bakterizaciju i prinos soje. Znan. Prak. Poljop. Tehnol. 21:43-49.

24. Redžepović, S., Čolo, J., Blažinkov, M., Sikora, S., Peana, M., Duraković, L. (2007.): Utjecaj biostimulatora rasta i fungicida za tretiranje sjemena soje na učinkovitost simbiozne fiksacije dušika. Sjemenarstvo 24:169-176.

25. Saharan, B. S,, Nehra V. (2011.): Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. Life Sci Med Res. 21.

26. Salhia, B. M. (2010.): The effect of Azobacter chrococcum as nitrogen biofertilizer on the growth and yield Cucumis Sativus. Thesis Master of Biological Sciences Botany. University of the Islamic, Gaza.

27. Sikora, S., Redžepović, S. (2000.): Identification of indigenous Bradyrhizobium japonicum strains isolated from different soil types in Wester Slavonia. Agriculturae Conspectus Scientificus 65 (4): 229-236.

28. Spaink, H. P. (2000.): Rott nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 54: 257-288.

29. Stephens, J. H. G., Rask, H. M. (2000.): Inoculant production and formulation. Field Crops Research 65:249- 258.

30. Topol, J., Kanižai Šarić, G. (2013.): Simbiotska fiksacija dušika u ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji. Agronomski glasnik 2-3.

31. Zahran, H. (1999.): Rhizobium- Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate, Microbiology and molecular biology reviews, 63:968-989.

32. Zavarin, G. A. (2006.): Winogradsky and modern microbiology. Microbiology 75 (5) 501-511.

Knjige

1. Fanuko, N. (2005.): Ekologija, Veleučilište u Rijeci, Poreč- Rijeka.
2. Lončarić, Z. (2015.): Mineralna gnojiva i gnojidba ratarskih usjeva, Poljoprivredni fakultet Osijek
3. Milaković, Z. (2013.): Opća mikrobiologija, Interna skripta, Poljoprivredni fakultet Osijek.
4. Kristek, S. (2007.): Agroekologija, Interna skripta, Poljoprivredni fakultet Osijek
5. Škvorc, Ž., Čošić, T., Sever, K. (2014.): Ishrana bilja, Interna skripta, Šumarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
6. Tate, R. L. (1995.): Soil microbiology. Symbiotic nitrogen fxsation, 307-333. John Wiley & Sons, Inc; New York
7. Vukadinović, V., Vukadinović, V. (2011.): Ishrana bilja, Poljoprivredni fakultet Osijek.
8. Vukadinović, V., Bertić, B. (2013.): Filozofija gnojidbe, autorska naklada Osijek.
9. Znaor, D. (1996.): Ekološka poljoprivreda, Nakladni zavod Globus Zagreb.

Ostale Internet stranice

1. http://hemijaunama.page.tl/Eutrofikacija.htm

2. htpp:// bioh. wikispaces.com/More + Elemental + Cycl

3. htpp://turirma.com/index.php/fertilizers/bio- fertilizer/turrima-rhizobuim-for-bean

4. http://www.genomenewsnetwork.org/articles/0801/symbiosis.shtml

5. web.mst.edu/-djwesten/Bj.html

6. htpps://de.wikipedia.org/wiki/Frankia_alni

7. https://www.jic.ac.uk/SCIENCE/molmicro/Azot.html

8. http://web.mst.edu/~microbio/bio221_1999/A_brasilense.html

13. SAŽETAK

Cilj ovog rada je istražiti mogućnost smanjenja mineralne dušične gnojidbe primjenom nitrofiksirajućih bakterija koristeći suvremene tehnološke metode.

U poljoprivrednoj proizvodnji dušik je važan element za rast i razvoj biljaka a time i za postizanje optimalnih prinosa. Najveće zalihe ovog elementa nalaze se u atmosferi, gdje je dušik u molekularnom obliku kojeg biljke nisu u mogućnosti usvojiti i iskoristiti.

Biološka fiksacija dušika je proces u kojem posebne skupine mikroorganizama (nitrofiksirajuće bakterije) usvajaju elementarni dušik iz atmosfere i preko enzima nitrogenaze ga reduciraju do amonijaka čime dušik postaje raspoloživ biljkama za potrebe njihovog metabolizma. Prema odnosu mikroorganizama i viših biljaka nitrofiksacija može biti slobodna, asocijativna i simbiotska.

Kod slobodne nitrofiksacije mikroorganizmi nisu direktno, histološki povezani sa višim biljkama, već su slobodni u zemljištu ili vodi, dok se asocijativna fiksacija dušika odvija uz pomoć mikroorganizama koji žive na samoj površini korijena ili u korijenu biljke.

Najznačajniji tip simbiotske fiksacije dušika za poljoprivredna tla je fiksacija dušika koja nastaje kao rezultat simbioze između bakterija iz rodova *Rhizobuim, Bradyrhizobuim, Sinorhizobuim* i biljaka većinom iz porodice *Leguminosae*. Slobodna fiksacija dušika u tlu uglavnom se javlja kao rezultat aktivnosti saprofitskih bakterija iz roda *Azotobacter* i *Clostriduim,* ali i nekoliko drugih rodova slobodno živućih bakterija i cijanobakterija, dok su najznačajniji asocijativni nitrofiksatori bakterije iz roda *Azospirillum*.

Biološkom fiksacijom dušika se osigurava biljkama dovoljna količina dušičnog hraniva, a u potpunosti se udovoljava zahtjevima gospodarenja tlom kao što su: produktivnost, sigurnost, zaštita prirodnih resursa i ekonomičnost.

Većom uporabom biopreparata koji sadrže efikasne sojeve nitrofiksirajućih bakterija, kao i razvojem vrhunskih sorti legimnoza može se u budućnosti očekivati smanjenje upotrebe kemijskih gnojiva i pesticida i povećenje učinkovitosti poljoprivredne proizvodnje.

Ključne riječi: nitrofiksirajuće bakterije, biološka fiksacija dušika, bakterizacija, biopreparati

14. SUMMARY

The aim of this paper is to investigate the possibility of reducing mineral nitrogen fertilizers with the application of nitrogen-fixing bacteria, using modern technological methods.

In agricultural production, nitrogen is an important element for the growth and development of plants and, thus it helps achieve optimal yields. The largest reserves of this element can be found in the atmosphere, where the nitrogen exists in its molecular form, which plants are not able to take and utilize.

Biological nitrogen fixation is a process in which specific groups of micro-organisms (nitrogen-fixing bacteria) take elemental nitrogen from the atmosphere and with the nitrogenase enzyme reduce it to ammonia, which becomes available to plants for their metabolism. According to the relation of microorganisms and higher plants, nitrogen fixation can be free, associative and symbiotic.

At free nitrogen fixation microorganisms are not directly, histologically connected to higher plants, but they are free in soil or water, while the associative nitrogen fixation takes place with the help of micro-organisms living on the surface of the root or in the root of the plant.

The most important type of symbiotic nitrogen fixation for agricultural soils is the nitrogen fixation that occurs as a result of the symbiosis between the bacteria of the genera *Rhizobuim*, *Bradyrhizobuim*, *Sinorhizobuim* and the plants, mostly of the family *Leguminosae*. The free nitrogen fixation in the soil mainly occurs as a result of saprophytic bacteria of the genus *Azotobacter* and *Clostriduim*, but also several other genera of free-living bacteria and cyanobacteria, while the most important associative nitrogen-fixing bacteria are those of the genus *Azospirillum*.

Biological nitrogen fixation ensures a sufficient amount of nitrogen nutrients for the plants, and fully meets the requirements of land management, such as productivity, safety, protection of natural resources and economy.

With the increased use of biopreparations containing effective strains of nitrogen-fixing bacteria, as well as with the development of the top-quality varieties of leguminosae it can be expected that in the future we will reduce the use of chemical fertilizers and pesticides and that we will increase the efficiency of agricultural production.

Key words: nitrogen-fixing bacteria, biological nitrogen fixation, bacterization, biopreparations

15.Popis slika

Slika 1. Eutrofikacija.....2

Slika 2. Fenotipski izgled običnoga bora (prikaz A), obične smreke (prikaz B) gorskog javora (prikaz C) nakon nedostatne (lijevo) i povoljne (desno) ishranjenosti s dušikom.....5

Slika 3. Ciklus dušika u prirodi.....6

Slika 4. *Rhizobium*.....13

Slika 5. Stvaranje korijenske kvržice..... 15

Slika 6. *Sinorhizobium meliloti*.....16

Slika 7. *Bradyrhrizobium japonicum*.....17

Slika 8. Simbioza *Proactinomyces alni* s *anlus glutinoza*.....20

Slika 9. *Azobacter* 24

Slika 10. *Azospirillum brasiliense*.....26

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Diplomski rad

Sveučilišni diplomski studij, smjer: Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Primjena nitrofiksirajućih bakterija u cilju reduciranja mineralne dušične gnojidbe

Filip Grgić

Sažetak: Primjena nitrofiksirajućih bakterija u cilju reduciranja mineralne dušične gnojidbe

Cilj ovog rada je istražiti mogućnost smanjenja mineralne dušične gnojidbe primjenom nitrofiksirajućih bakterija koristeći suvremene tehnološke metode. U poljoprivrednoj proizvodnji dušik je važan element za rast i razvoj biljaka a time i za postizanje optimalnih prinosa. Najveće zalihe ovog elementa nalaze se u atmosferi, gdje je dušik u molekularnom obliku kojeg biljke nisu u mogućnosti usvojiti i iskoristiti. Biološka fiksacija dušika je proces u kojem posebne skupine mikroorganizama (nitrofiksirajuće bakterije) usvajaju elementarni dušik iz atmosfere i preko enzima nitrogenaze ga reduciraju do amonijaka čime dušik postaje raspoloživ biljkama za potrebe njihovog metabolizma. Prema odnosu mikroorganizama i viših biljaka nitrofiksacija može biti slobodna, asocijativna i simbiotska. Kod slobodne nitrofiksacije mikroorganizmi nisu direktno, histološki povezani sa višim biljkama, već su slobodni u zemljištu ili vodi, dok se asocijativna fiksacija dušika odvija uz pomoć mikroorganizama koji žive na samoj površini korijena ili u korijenu biljke. Najznačajniji tip simbiotske fiksacije dušika za poljoprivredna tla je fiksacija dušika koja nastaje kao rezultat simbioze između bakterija iz rodova *Rhizobuim, Bradyrhizobuim, Sinorhizobium* i biljaka većinom iz porodice *Leguminosae*. Slobodna fiksacija dušika u tlu uglavnom se javlja kao rezultat aktivnosti saprofitskih bakterija iz roda *Azotobacter* i *Clostriduim*, ali i nekoliko drugih rodova slobodno živućih bakterija i cijanobakterija, dok su najznačajniji asocijativni nitrofiksatori bakterije iz roda *Azospirillum*. Biološkom fiksacijom dušika se osigurava biljkama dovoljna količina dušičnog hraniva, a u potpunosti se udovoljava zahtjevima gospodarenja tlom kao što su: produktivnost, sigurnost, zaštita prirodnih resursa i ekonomičnost. Većom uporabom biopreparata koji sadrže efikasne sojeve nitrofiksirajućih bakterija, kao i razvojem vrhunskih sorti legimnoza može se u budućnosti očekivati smanjenje upotrebe kemijskih gnojiva i pesticida i povećanje učinkovitosti poljoprivredne proizvodnje.

Ključne riječi: nitrofiksirajuće bakterije, biološka fiksacija dušika, bakterizacija, biopreparati

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Broj stranica: 41

Broj grafikona i slika: 10 (slika)

Broj tablica: 0

Broj literaturnih navoda: 49

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: nitrofiksirajuće bakterije, biološka fiksacija dušika, bakterizacija, biopreparati

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Izv. prof. dr. sc. Drago Bešlo, predsjednik**
2. **Prof. dr. sc. Suzana Kristek, mentor**
3. **Doc. dr. sc. Sanda Rašić, član**

Rad je pohranjen: knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Faculty of Agriculture

Graduate thesis

University Graduate Studies, course: Fruit growing, Viticulture and Winemaking

Application of nitrofixing bacteria in order to reduce mineral nitrogen fertilization

Filip Grgić

Abstract: Application of nitrofixing bacteria in order to reduce mineral nitrogen fertilization

The aim of this paper is to investigate the possibility of reducing mineral nitrogen fertilizers with the application of nitrogen-fixing bacteria, using modern technological methods. In agricultural production, nitrogen is an important element for the growth and development of plants and, thus it helps achieve optimal yields. The largest reserves of this element can be found in the atmosphere, where the nitrogen exists in its molecular form, which plants are not able to take and utilize. Biological nitrogen fixation is a process in which specific groups of micro-organisms (nitrogen-fixing bacteria) take elemental nitrogen from the atmosphere and with the nitrogenase enzyme reduce it to ammonia, which becomes available to plants for their metabolism. According to the relation of microorganisms and higher plants, nitrogen fixation can be free, associative and symbiotic. At free nitrogen fixation microorganisms are not directly, histologically connected to higher plants, but they are free in soil or water, while the associative nitrogen fixation takes place with the help of micro-organisms living on the surface of the root or in the root of the plant. The most important type of symbiotic nitrogen fixation for agricultural soils is the nitrogen fixation that occurs as a result of the symbiosis between the bacteria of the genera *Rhizobuim*, *Bradyrhizobuim*, *Sinorhizobium* and the plants, mostly of the family *Leguminosae*. The free nitrogen fixation in the soil mainly occurs as a result of saprophytic bacteria of the genus *Azotobacter* and *Clostriduim*, but also several other genera of free-living bacteria and cyanobacteria, while the most important associative nitrogen-fixing bacteria are those of the genus *Azospirillum*. Biological nitrogen fixation ensures a sufficient amount of nitrogen nutrients for the plants, and fully meets the requirements of land management, such as productivity, safety, protection of natural resources and economy. With the increased use of biopreparations containing effective strains of nitrogen-fixing bacteria, as well as with the development of the top-quality varieties of leguminosae it can be expected that in the future we will reduce the use of chemical fertilizers and pesticides and that we will increase the efficiency of agricultural production.

Key words: nitrogen-fixing bacteria, biological nitrogen fixation, bacterization, biopreparations

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek

Mentor: Prof. dr. sc. Suzana Kristek

Number of pages: 41

Number of figures: 10 (pictures)

Number of tables: 0

Number of references: 49

Number of appendices: 0

Original in: Croatian

Key words: nitrogen-fixing bacteria, biological nitrogen fixation, bacterization, biopreparations

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. **Izv. prof. dr. sc. Drago Bešlo, president**
2. **Prof. dr. sc. Suzana Kristek, mentor**
3. **Doc. dr. sc. Sanda Rašić, member**

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kralja Petra Svačića 1d