Uloga nitrofiksirajućih bakterija Azotobacter spp. i Azospirillum spp. u biljnoj proizvodnji

Ravnjak, Boris

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:151:833404

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 SROSSMAYERA

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Boris Ravnjak

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo,

Smjer Biljna proizvodnja

ULOGA NITROFIKSIRAJUĆIH BAKTERIJA *AZOTOBACTER* SPP. I *AZOSPIRILLUM* SPP. U BILJNOJ PROIZVDONJI

Diplomski rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA SROSSMAYERA

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Boris Ravnjak

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo.

Smjer Biljna proizvodnja

ULOGA NITROFIKSIRAJUĆIH BAKTERIJA *AZOTOBACTER* SPP. I *AZOSPIRILLUM* SPP. U BILJNOJ PROIZVDONJI

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Sanda Rašić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Suzana Kristek, mentor
3. izv. prof. dr. sc . Drago Bešlo član
4. prof. dr. sc. Gordana Bukvić, zamjenski član

Osijek, 2016.

SADRŽAJ

1.UVOD**……...…1**

2.PREGLED LITERATURE**……..……..…2**

2.1. Karakteristike bakterija **……...2**

2.2. *Azospirillium spp***…….…..…3**

2.3.*Azotobacter spp*. **……...……4**

3.ZNAČAJ DUŠIKA U ISHRANI BILJA **……..…...…7**

3.1.Kruženje dušika u prirod**i……8**

3.2.Amonifikacija **……...10**

3.3. Nitrifikacija**……..…….10**

3.4. Denitrifikacija **……...……11**

3.5. Nitrofiksacija**……..11**

4. ZNAČAJ BAKTERIJA RODA *AZOTOBACTER*……**12**

5. ZNAČAJ BAKTERIJA RODA *AZOSPIRILLIUM*……..…**14**

6.REZULTATI**……..16**

6.1. Utjecaj nitrofiksirajućih bakterija na elemente prinosa i kvalitete soje**…..…...…16**

6.2.Utjecaj određenih vrsta asocijativnih fiksatora dušika u proizvodnji kukuruza, pšenice i soje**……..…21**

7.ZAKLJUČAK**…….…...……24**

8.LITERATURA**……..……25**

9.SAŽETAK**…….……28**

10.SUMMARY**……..…29**

11.POPIS SLIKA **……....……30**

12.POPIS TABLICA **……..……..…31**

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1.UVOD

U ovom diplomskom radu opisuje se uloga nitrofiksirajućih bakterija *Azotobacter* spp. i *Azospiirillium* spp. u biljnoj proizvodnji. Proučavanjem raznih istraživanja navedene su sve beneficije ove izuzetno važne grupe nitrofiksirajućih bakterija. Glavni cilj poljoprivredne proizvodnje je postići optimalne uvjete za rast i razvoj biljke, a time i visoke prinose.

Mikroorganizmi koji imaju pozitivan utjecaj na biljke svrstavamo u korisnu mikrobnu populaciju rizosfere, a jedan od najznačajniji mikroorganizama su biološki fiksatori dušika.

Biološki fiksatori dušika procesom vezivanja atmosferskog dušika opskrbljuju biljku reduciranim dušikom, a od nje uzimaju tvari potrebne za svoj razvoj. Ako u tlu postoje dovoljne količine raspoloživog dušika, tako da su zadovoljene potrebe biljke domaćina i bakterija, rast kvržica se smanjuje uz opadanje njihovog broja (Vukadinović, 2011.).
Biološkom fiksacijom dušika se osigurava biljkama dovoljna količina dušičnog hranjiva.

Više je tipova organizama koji mogu vezati dušik iz atmosfere. To su slobodne živuće heterotrofne bakterije, slobodno živuće fotoautotrofne bakterije i simbiotske bakterije. Od aerobnih, slobodno živućih fiksatora dušika poznati su *Azotobacter, Azospirilum i Beijerinkia* s više vrsta (Vukadinović, 2011.).

Osnovna uloga mikroorganizama je mineralizacija organske tvari koja omogućava održavanje životnog svijeta u prirodi, naročito ishranu bilja, sudjeluju u kruženju tvari i energije u prirodi, a imaju osobine koje koristi čovjek. Glavna uloga mikroorganizama u tlu je transformacija organske tvari i stvaranje humusa, odnosno humifikacija, zatim mineralizacija humusa, odnosno dehumifikacija, što dovodi do stvaranja biljnih asimilativa. U procesima humifikacije i dehumifikacije najveća uloga pripada bakterijama i gljivama heterotrofne prirode, oni su odgovorni za biorazgradnju i kruženje tvari (Milaković, 2013.).

Na raspored mikroorganizama najviše utječu ekološki čimbenici, kao što su temperatura, vlaga i organska tvar. Najveća im je brojnost i aktivnost u sloju tla na dubini 0 - 30 cm (Milaković, 2013.).

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Karakteristike bakterija

Bakterije su mali jednostanični organizmi koje je moguće vidjeti pomoću svjetlosnog i elektronskog mikroskopa. U prirodi ih ima u velikom broju, a pokazuju veliku raznolikost oblika i prilagođene su različitim okolišnim uvjetima. Nastanjuju sve vrste staništa pa čak i one sa ekstremnim uvjetima (prekomjerno zračenje, tlak, slanost itd.).

Stanična struktura bakterija je vrlo jednostavna. Čini ju prstenasta dvolančana molekula DNA (nukleoid), ribosomi, plazmatska membrana, stanična stijenka (ali ne celulozna kao u biljaka) te u nekih bakterija polisaharidna kapsula.

Vrlo su pogodni organizmi za genetička istraživanja: jednostavna građa, kratak životni ciklus (dijele se svakih 30-40 minuta), jednostavan uzgoj u laboratoriju, raznolikost fenotipa (u smislu funkcije).
Bakteriju *Escherichia coli*, najpopularniji objekt genetičkih istraživanja, otkrio je 1885. Theodor Escherich.

Oblik bakterijske stanice može biti sferičan (koki), štapićast (bacili) ili spiralan (spirili). Neke vrste bakterija poput aktinomiceta nalikuju micelijima gljiva, a nitastog oblika su oblika. Oblik, boja i veličina bakterijske kolonije važna su svojstva (fenotip) vidljiva na krutoj hranjivoj podlozi (agarskoj ploči).



Slika 1. Bakterije

(Izvor:http://svet-biologije.com/wp-content/uploads/2013/11/Bacteria-illustration-800x600.jpg)

Kolonija na agarnoj ploči predstavlja mnoštvo genetički istovjetnih stanica (klon**)** koje su nastale iz jedne stanice binarnom diobom. U nekih vrsta bakterija stanice su obavijene polisaharidnom kapsulom što kolonije čini glatkima (S-smooth) za razliku od hrapavih (R-rough) kolonija koje stvaraju bakterije bez polisaharidne kapsule. Vidljivo fenotipsko svojstvo je i prisutnost ili odsutnost bičeva na površini stanice (ako su stanice pokretne, kolonije na agarskoj ploči izgledaju rašireno; ako su stanice nepokretne kolonije su točkaste).

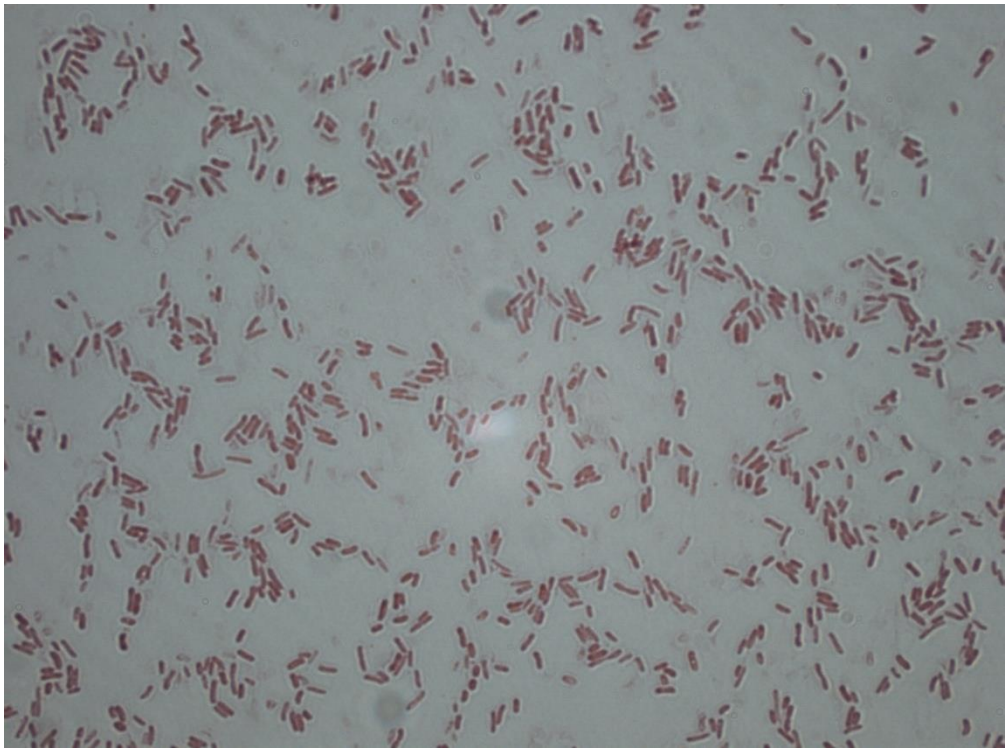
Najčešća svojstva koja istražuju bakterijski genetičari uključuju mutacije gena čiji produkti, enzimi, kontroliraju biosintetske putove (biokemijske mutacije) pri čemu dolazi do promjena biokemijskih svojstava poput otpornosti na antibiotike, fage, faktore iz okoliša i drugo (Pavlica i Pavković 2007.).

2.2. *Azospirillum spp*.

Bakterije *Azospirillum* su vrlo pokretljive bakterije, Gram-negativne, aerobne, pretežno štapićastog oblika, promjera 1 μm, a dužine 2,1-3,8 μm, sa šiljastim krajevima. Pripadaju redu *Rhodospirillales*. Pokreću se bičevima, a u tekućem mediju pokreću se uz pomoć jednog bića, dok se u čvrstom mediju, pri temperaturi od oko 30° C formiraju bočni bičevi. Otkrio ih je nizozemski mikrobiolog i botaničar Martinus Beijernick 1922. godine.

Optimalne temperature za bakterije ovog roda kreću se od 35° do 37° C (Tarrand et al., 1978.) Ovi asocijativni fiksatori dušika imaju sposobnost usvojiti dušik iz atmosfere, a aktivne su na samoj površini korijena biljke. Svojom aktivnošću potiču rast biljaka, a time i povećanje prinosa (Bashan and Levanony, 1990.; Bashan, 1993.; Okon and Labandera Gonzales, 1994.; Bashan and Holguin, 1995.). Znatno povećanje prinosa postiže se kombinacijom inokulanata *Azospirillum i Rhizobium* (Singh and Subba Rao, 1979.). Nalaze se u područjima umjerenog klimata, kao i u tropskim područjima.

Rod *Azospirillum* predstavlja jedne od najbolje karakteriziranih slobodno živućih diazotrofa koji povoljno djeluju na biljke (Bashan and Holguin, 1997.).



Slika 2**.** *Azospirillum brasilense*
(Izvor:http://retina.usal.es/albums/biologia/bacterias/azospirillum-brasilense/fotografia-4.-a.-brasilense-cepa-sp245-gram.jpg)

Prema znanstvenicima Tarrand i sur. (1978.) rod *Azospirillum* je u početku podijeljen na dvije vrste:

- *Azospirillum lipoferum*

- *Azospirillum brasilense*

Kroz daljnja istraživanja utvrđeno je još 8 vrsta: o *A. amazonense* (Magalhaesi i sur., 1983.)

- *A. halopraeferens* (Reinhold i sur., 1987.)

-*A. irakense* (Khammas i sur., 1989.)

-*A. largimobile* (Dekhil i sur., 1997.) o A. doebereinerae (Eckert i sur., 2001.)

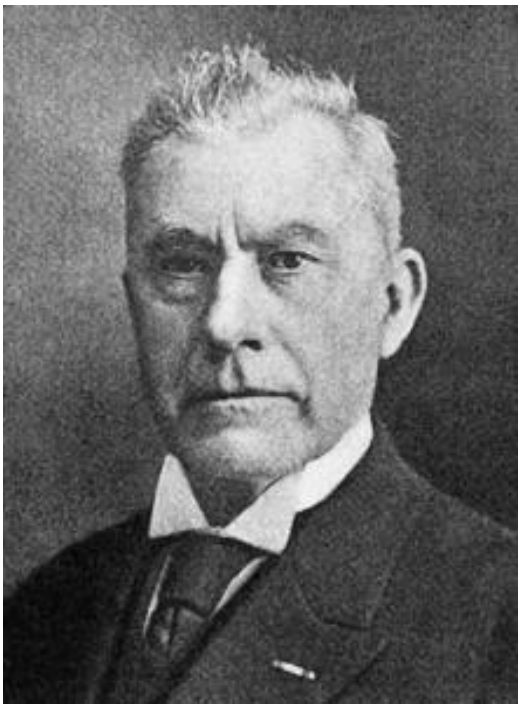
- *A.oryzae* (Xie i sur., 2005.)

- *A. melinis* (Peng i sur., 2006.)

- *A. canadensis* (Mehnaz i sur., 2007.)

2.3. *Azotobacter* spp.

*Azotobacte*r je rod korisnih bakterija koje se nalaze u neutralnim do lužnatim tlima, u vodenim sredinama, a i na nekim biljkama. Unatoč hladnoj klimi i relativno niskoj pH vrijednosti njihova prisutnost može se utvrditi i na Antartiku. U suhim tlima vrsta roda *Azotobacter* u obliku cista mogu preživjeti i do 24 godine. Rod *Azotobacter* otkrio je 1901. godine Martinus Beijerick. Ona ima nekoliko metaboličkih mogućnosti, uključujući i atmosfersku fiksaciju dušika konverzijom u amonijak.



Slika 3. Martinus Beijerick

(Izvor:https:// wikimedia. org/wikipedia/ commons/thumb/5/ 51/Martinus_Willem_ Beijerinck.png/220px-Martinus_Willem_Beijerinck.png)

Azotobacter spp. imaju najveću stopu metabolizma svih organizama. Azotobakterije , zanimljivo, sadrže više DNK od većine drugih bakterija, ali njihova veličina genoma je tipično za većinu prokariota. Razlog za tome što količina DNA iznad prosjeka nije poznat, ali to je vjerojatno zbog toga što su stanice *Azotobacter* spp. veće nego kod drugih bakterija.

Azotobacter spp. je sposobna za proizvodnju proteina koji ju štiti nitrogenaze od naglog stresa izazvanog kisikom. Druga individualistička osobina *Azotobacter* je njihova

sposobnost sintetizirati ne samo jedan, nego tri nitrogenaze. *Azotobacter* bakterije mogu biti različitih oblika. Mogu biti:

- uspavane stanice zvane ciste okrugla oblika, metabolički neaktivne (Winogradski, 1938.).

- u obliku kratkih tupih štapića veličine 2 × 4 μm (Winogradski, 1938.);

- okrugle stanice promjera 2-3 μm koje se pojavljuju u nakupinama ili lancima;

- sitni tupi štapići ili okrugle stanice manje od 1μm, a često se pojavljuju u parovima, (Winogradski, 1930.);

- veće stanice nepravilna vlaknasta oblika (Winogradski, 1938.);

Organizmi kao što su *Azotobacter* igraju vitalnu ulogu u svakom ekosustavu, koji rade da bi dušik bio dostupan svim organizmima. Bakterije roda *Azotobakte*r i slične bakterije mogu pretvoriti dušiku amonijak kroz proces fiksacija dušika, nakon čega se amonijak pretvara u proteine.



Slika 4. Bakterija *Azotobacter chroococcum* u stadiju ciste

(izvor: https://microbewiki.kenyon.edu/images/thumb/5/5e/Zdrs0309.jpg/400px-Zdrs0309.jpg)

3. ZNAČAJ DUŠIKA U ISHARNI BILJA

Dušik je važan element u poljoprivrednoj proizvodnji za ishranu bilja. Često je najvažniji ograničavajući čimbenik za rast i razvoj biljaka te postizanja optimalnih prinosa. Svrstava se u poseban položaj u grupi neophodnih elemenata za ishranu biljaka, uglavnom se usvaja u mineralnom obliku i svrstava se u grupu mineralnih elemenata. Sastavni je dio brojnih spojeva u biljnoj stanici, npr. nukleinskih kiselina, aminokiselina, amida, proteina, amina, fotosintetskih pigmenata i drugih spojeva koji čine osnovu života (Škvorc i sur., 2014.).

Dušik u tlu pohranjen je u anorganskim i organskim spojevima. Najveća količina dušika u tlu nalazi se u humusu i nepotpuno razloženim biljnim i životinjskim ostacima. Mineralni dio dušika koji je potpuno raspoloživ za usvajanje od strane biljaka samo je mali dio ukupnog dušika u tlu. U prirodi postoji kružni tok dušika gdje je atmosfera izvor dušika kojega u tlo transformiraju mikroorganizmi prilikom procesa koji se naziva fiksacija dušika. Osim na taj način dušik u tlo može dospjeti antropogenim djelovanjem - mineralnom gnojidbom, (Vukadinović i Vukadinović, 2011.).

Atmosfera sadrži oko 78 vol.% molekularnog dušika (N_2), koji je većini biljaka nedostupan, jer je potrebno kidanje vrlo stabilne trostruke veze između dva atoma dušika, a više biljke nemaju mogućnost za takvu reakciju. Uz to, za prevođenje molekularnoga dušika do amonijaka ili nitrata (oblici dušika u tlu koji su dostupni biljkama) potrebna je ogromna količina energije. S druge strane, dušik se lako vraća u molekularno stanje u kojem je i najstabilniji pa se lako gubi iz tla. S obzirom da je dušik biljkama izuzetno nužan, njegov nedostatak često ograničava rast (Škvorc i sur., 2014.).

Tijekom evolucije kopnenih biljaka razvio se sustav za čuvanje i recikliranje dušika, što je rezultiralo uspostavljanjem kružnog toka dušika. Većina biljaka prima dušik u obliku nitratnih (NO_3^-) ili amonijevih (NH_4^+) iona iz okoliša, a neki specijalizirani oblici mogu koristiti i dušik iz atmosfere. Hranjenje životinja biljkama omogućava daljnji put dušika u hranidbenom lancu, a u tlo se dušik vraća razgradnjom tijela uginulih biljaka i životinja. Ti su procesi dio ciklusa dušika. Pretvorba molekularnog dušika u druge oblike (NH_3^+ ili NO_3^-) može se zbivati prirodnim i industrijskim procesima.

Opskrbljenost biljaka dovoljnom količinom dušika ima izuzetan značaj za njezin vegetativni i generativni razvoj. U kontekstu poljoprivredne proizvodnje dušik se smatra

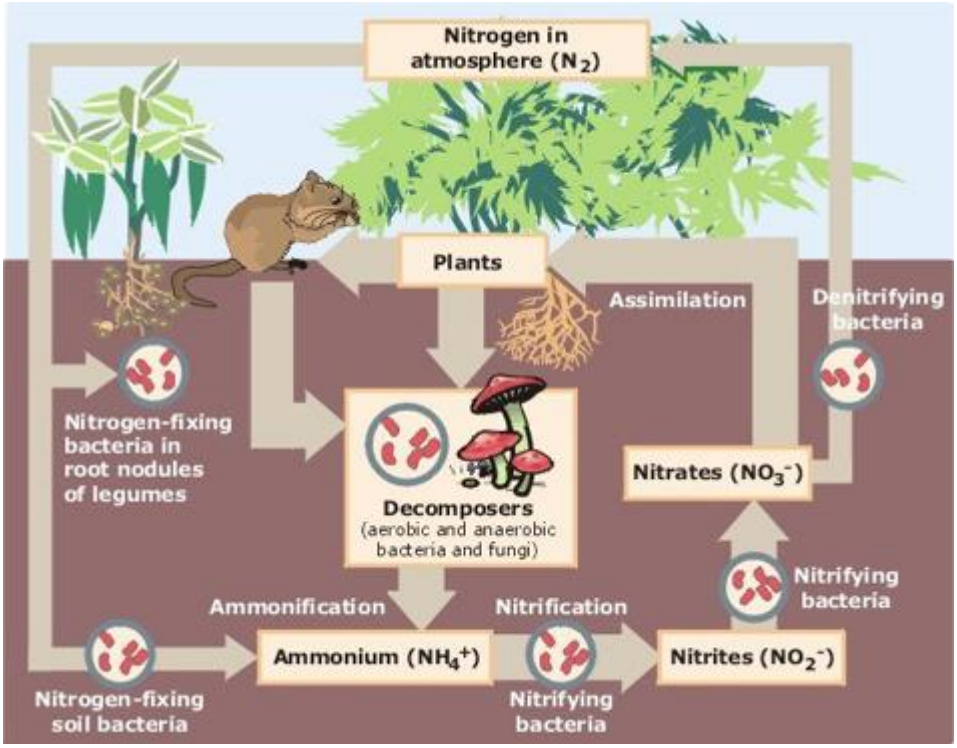
izrazitim prinosotvornim elementom. Nedostatak raspoloživog dušika ima vrlo ozbiljne posljedice na razvoj biljaka. Biljke formiraju manju asimilacijsku površinu, lišće je kraće, uže i blijedozeleno zbog manjeg sadržaja klorofila što uzrokuje niži intenzitet fotosinteze te biljke brže stare, a urod sjemena im je smanjen. Suvišak dušika rezultira intenzivnim porastom vegetacijskih organa uz modrozelenu boju lišća te prekomjerna ishrana dušikom ima više negativnih posljedica, npr. stvaranje prevelike mase lišća i intenzivan visinski prirast, uz istovremenu smanjenu produkciju mehaničkog tkiva što rezultira kasnijim polijeganjem biljaka. Općenito, biljke postaju neotporne na bolesti, štetočine, niske temperature i sušu (Škvorc i sur., 2014.).

Zemljišni mikroorganizmi vrše pretvorbu organskih oblika dušika u anorganske oblike (amonijačni, nitratni) koje mogu koristiti biljke i mikroorganizmi. Nedostupan dušik iz atmosfere se kroz proces fiksacije veže u nove spojeve te na taj način postaje dostupan mikroorganizmima i biljkama da ih iskoriste za svoje metaboličke potrebe. Organizmima je dušik potreban za sintezu bitnih spojeva kao što su aminokiseline, proteini i nukleinske kiseline (DNA i RNA). Iako plinoviti dušik (N_2) čini 79% atmosfere, u tom elementarnom obliku neupotrebljiv je za najveći broj živih organizama, osim vrlo malog broja mikroorganizama – bioloških fiksatora elementarnog dušika – nitrofiksatora. To isto vrijedi i za ogromne njegove rezerve u tlu u organskom obliku, koji su također nepristupačni za više biljke prije negoli ih mikroorganizmi prevedu u pristupačne oblike za biljke – u anorganske spojeve dušika, poznatih kao amonijak i nitrati. Ovih anorganskih spojeva dušika u tlu ima svega 1%, dok se sav ostali dušik u tlu nalazi se u organskom obliku, 99% od ukupnog dušika u tlu - u obliku svježe organske tvari i u sastavu humusa (Milaković, 2013.).

3.1.Kruženje dušika u prirodi

Za proces kruženje dušika u prirodi izrazito je potrebno sudjelovanje mikroorganizama, koji svojom aktivnošću prvo razgrađuju molekule bjelančevina do aminokiselina, pa nadalje do amonijaka. To je biljkama pristupačan mineralni 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 nitrita – proces nitratacije, a zatim dalje do nitrata – nitratacija. 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 – denitrifikacija, također radom određenih mikroorganizama, do plinovitog oblika dušika koji odlazi u atmosferu i postaje nepristupačan biljkama. Međutim, postoji posebna grupa mikroorganizama koja veže elementarni dušik iz zraka – nitrofiksatori, te ga u procesu nitrofiksacije i pretvaraju u oblike pristupačne biljkama. Kruženje dušika u prirodi vode mikroorganizmi procesima amonifikacije, nitrifikacije,denitrifikacije i nitrofiksacije.



Slika 5. Kruženje dušika u prirodi

Izvor: (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/de/Nitrogen_Cycle.jpg)

3.2. Amonifikacija

Proces kojim mikroorganizmi razgrađuju molekule bjelančevina do aminokiselina, pa nadalje do amonijaka. Međutim, amonijak se izdvaja samo u određenim uvjetima, a što ovisi od odnosa organskog ugljika i dušika u sredini (Kristek, 2007.). U ovom procesu razlikujemo dvije faze: degradacija i dezaminacija. Degradacija proteina je hidrolitički proces u komu mikroorganizmi izdvajaju izvanstanične proteolitičke enzime – proteaze, koji u prisustvu vode hidrolizom razgrađuju molekulu proteina preko čitavog niza prijelaznih proizvoda do peptida i koje razgrađuju peptide do aminokiselina. Stvorene aminokiseline ne koriste biljke, a mikroorganizmi ih lako iskorištavaju za svoje potrebe. Dezaminacija aminokiselina je druga faza u transformaciji proteina. Enzimi u ovoj fazi su dezaminaze, intracelularni su, pošto su aminokiseline već rastvorljive u vodi i mikrobi ih dalje transformiraju u svojoj citoplazmi do produkata mineralnog karaktera - amonijaka. Mikroorganizmi stvoreni amonijak izdvajati će u okoliš samo u određenim uvjetima, a to ovisi o odnosu C : N, tj. ugljika prema dušiku u okolišu (Milaković, 2013.). Ako je taj odnos širi od 25:1, neće doći do izdvajanja amonijaka jer će sav dušik biti potrošen od strane mikroorganizama. Amonijak će se izdvajati samo pod uvjetom da je C:N odnos manji od 25:1, što znači prvenstveno kod humusnih tvari, odnosno mineralizacijom humusa. Izdvojeni amonijak je pogodan mineralni oblik dušika za ishranu biljaka. U kiselim tlima, najveći dio dušika ostaje u amonijačnom obliku, jer se veže s kiselinama i na taj način je onemogućana njegova oksidacija u nitrate. U neutralnim i slabo alkalnim tipovima tala amonijak se brzo oksidira u nitrate. Mikroorganizmi koji vode proces amonifikacije nazivaju se amonifikatori (Kristek, 2007.).

3.3. Nitrifikacija

Mikrobiološki proces u kojem se amonijačni oblik dušika oksidira do nitrata. Nitrate smatramo najpovoljnijem oblikom dušika za ishranu viših biljaka. To je jedan od najvažnijih mikrobioloških proces u tlu, a počinje odmah nakon mineralizacije humusa. Proces nitrifikacije odvija se u dvije faze:

1. Nitritacija – obuhvaća reakcije u kojima se amonijevi spojevi oksidiraju do nitrita;

2. Nitratacija – obuhvaća daljnje reakcije oksidacije do nitrata

Mikroorganizmi koji obavljaju proces nitrifikacije pripadaju grupi isključivo pravih bakterija i nazivaju se nitrifikatori. Radi se o asporogenim, neutrofilnim bakterijama (Kristek, 2007.). Energija koja se oslobađa u ovim procesima mikroorganizmi koriste za sintezu svoje

organske tvari iz CO_2 i vode, a dio dušika iz amonijaka za biosintezu proteina (Milaković, 2013.). Denitrifikacija je redukcija nitrata u tlu. Kako se nitrati lako ispiru u dublje slojeve tla, nailaze na anaerobne uvjete, te u prisustvu odgovarajućih mikroorganizama potpadaju procesu redukcije. Ovdje se nitrati reduciraju do pojave plinovitog dušika, koji odlazi u atmosferu. Možemo reći da se radi o štetnom procesu jer dolazi do gubitka dušika iz tla. Mikroorganizmi koji vrše ovaj proces nazivaju se denitrifikatori (Kristek, 2007.).

3.4. Dentrifikacija

Denitrifikacija se odvija u potpunosti ako su ispunjeni određeni uvjeti za umnožavanje mikroorganizama denitrifikatora. Ti uvjeti su: visok sadržaj lako razgradivih organskih tvari, dovoljno lako pristupačnih nitrata, odgovarajuća vlaga, temperatura, pH i anaerobni uvjeti. Ispiranje nitrata uzrokovano kišama ili navodnjavanjem uzrokuje onečišćenje okoliša (Milaković, 2013.).

3.5. Nitrofiksacija

Nitrofiksacija je vezivanje atmosferskog slobodnog dušika u spojeve koje mogu koristiti biljke i većina mikroorganizama. Proces nitrofiksacije zahtjeva veliki utrošak energije jer se radi o izrazito endotermnom procesu, pa s obzirom na izvore energije razlikujemo abiotsku i biotsku nitrofiksaciju. Abiotska nitrofiksacija se odvija bez prisustva mikroorganizama, a može biti prirodna ili umjetno inicirana. Prirodna abiotska nitrofiksacija odvija se prilikom električnih pražnjenja u atmosferi, što dovodi do stvaranja dušikovih oksida, koji s vodenim talozima dolaze u tlo kao nitrati. Umjetna ili tehnička nitrofiksacija odvija se u tvorničkim postrojenjima na visokim temperaturama i pritiscima, te prisustvu katalizatora, pri čemu se najprije dobivaju amonijak ili dušični oksidi, a potom nitrati. Biotska nitrofiksacija odvija se uz prisustvo posebne grupe mikroorganizama- nitrofiksatora, koje čini samo nekoliko rodova prokariotskih mikroorganizama sa genetskom informacijom za sintezu enzima nitrogenaze. Nitrofiksatori usvajaju slobodni atmosferski dušik koristeći sunčevu energiju akumuliranu u biljnim asimilativima ili organskim tvarima tla. Pri odnosu mikroorgnaizmi – biljke, biotska nitrofiksacija može biti slobodna, asocijativna i simbiotska. Kod slobodne nitrofiksacije mikroorganizmi nisu direktno, histološki povezani sa višim biljkama, već su slobodni u zemljištu i 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. Simbiotska nitrofiksacija je simbioza između kvržičnih bakterija iz rodova Rhizobium i Bradyrhizobium i leguminoznih biljaka. Kvržične bakterije koristeći energiju biljke domaćina fiksiraju elementarni dušik iz atmosfere i predaju ga simbiontu (Kristek, 2007.).

4. ZNAČAJ BAKTERIJA RODA *AZOTOBACTER*

Bakterije roda *Azotobacter* koristani se zemljišni mikroorganizmi koji imaju pozitivan utjecaj na rast i razvoj biljaka. Njihova prisutnost u zemlji označava plodnu i obrađivanu zemlju. U šumskom zemljištu gotovo da je i nema,u neobrađenom i toksičnom zemljištu također nije prisutna. Njezin broj u obrađivanom zemljištu se kreće od nekoliko tisuća do nekoliko desetaka tisuća u gramu zemljišta (Narula, 2000.).

U klimi umjerenog pojasa mikroorganizmi u jednoj godini vežu 20-40 kg dušika iz zraka po hektaru. Izračunato je da se na čitavoj površini Zemlje za godinu dana veže oko 1011 kg dušika iz zraka Najveći dio vezanog dušika dostupan je biljkama tek nakon uginuća i liziranja stanica bakterija. Mnogi autori pokušali su praktično primijeniti to svojstvo vezanja dušika iz zraka putem *Azotobacter chroococcum*, te njen vrlo važan pozitivan učinak u proizvodnji koji ističe Narula, (2000.).

Azotobacter chroococcum luči biljne faktore rasta kao što su: giberalini, citokinoni, indol octena kiselina itd. (Narula, 2000.). Fiziološki aktivne tvari su one koje u određenim uvjetima imaju isti stimulacijski ili inhibicijski učinak na fiziološke i biokemijske procese u biljci, a što rezultira 17 metabolitskim i morfološkim promjenama. Fitohormoni ili biljni hormoni su regulatori procesa rasta i razvitka, a dijele se u 5 grupa: auksini, giberelini, citokinini, apsicinska kiselina (ABA) i etilen.

Zemljišne gljive, najčešći nametnici na zrnu ječma (*Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Helminthosporium* spp. itd.) izazivaju lošu humifikaciju, tj stvaraju nepovoljne oblike kao što su: krenska i apokrenska kiselina, čime pojačavaju kiselost zemljišta što se nepovoljno odražava na rast azotofiksacijskih i nitrifikacijskih bakterija. Antagonističko djelovanje bakterije *Azotobacter chroococcum* na fitopatogene gljive proučavali su mnogi ali nije razjašnjeno uzrokuju li to siderofore ili antibiotici. Bakterija *Azotobacter chroococcum* ima i fungistatično djelovanje. Naime, ona promovira rast biljke u početnom stadiju time što

inhibira razvoj *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. i *Penicillium* sp. koji su vrlo često prisutni na sjemenu i sintetiziraju brojne toksične sastojke (Narula, 2000.).

Siderofore su spojevi niske molekularne mase koje nastaju pri nestašici željeza, a služe kao prenosioci Fe (III) u mikrobnim stanicama. U dodatku izvornog željeza za proizvodnju stanica siderofore mogu djelovati kao faktori rasta i u nekim slučajevima kao potencijalni antibiotici. Željezo je četvrti po važnosti element zemljine kore i prijeko je potrebno za rast svih živih bića. Također je važan sastojak enzima kao što su peroksidaze, katalaze, hidrogenaze i ključnih elemenata u vezanju dušika, hidrogenaza i dinitrogenaza reduktaze (Narula, 2000.).

Bakterije iz roda *Azotobacter* imaju još jednu pozitivnu osobinu. One stvaraju ekstracelularnu tvar sluzave ili želatinozne prirode. Ta tvar može stajati čvrsto priljubljena kao sloj oko stanice i naziva se kapsula ili se može slobodno odijeliti od stanice pa se naziva sluz ili gumasta masa i služi kao sirovina za proizvodnju biološki razgradivih plastičnih masa. Optimalna temperatura za stvaranje alginata je 12-18 °C. Dodatak metalnih kationa, saharoze i n-butanola u hranjivu podlogu, može izazvati stvaranje cista. (Narula, 2000.).

Mikoriza je uzajamna ovisnost fotoautotrofnih biljaka i gljiva i predstavlja jednu od najvažnijih ali još nedovoljno razjašnjenih bioloških zajednica koja regulira, a time i omogućuje pravilno funkcioniranje ekosistema. Mikoriza je simbiotska zajednica gljiva i viših biljaka u kojoj su hife gljiva invadirane u korijen biljke i potpomažu usvajanje vode i hranjiva. Mikoriza može biti: - infektivna (endomikoriza i ektomikoriza) - neinfektivna (Vukadinović i Lončarević, 1997.). Mikorizne gljive opskrbljuju bakterije roda *Azotobacter* fosforom, a zauzvrat uzimaju vezani dušik (Brown i Carr, 1984.). Ishac i sur. (1986), tvrde da dvojna inokulacija pšenice s azotobakterijama i mikoriznim gljivama pojačava aktivnost nitrogenaze u svim stadijima rasta pšenice u usporedbi s pojedinačnom inokulacijom. (Narula, 2000.).

Osim navedenih svojstava, bakterije iz roda *Azotobacte*r imaju sposobnost:

- biološke razgradnje pesticida (lindana), fenolnih spojeva i sl. (Gupta i Narula, 1996.);

- otapanja fosfata (Kumar, 1998.); - proizvodnje enzima (Narula, 2000.);

- proizvodnje vitamina B12 i C vitamina (Sankaram i Sundara,1962.);

- primjene u ribnjacima za hranidbu riba (Narula, 2000.);

- povećavanja sadržaja planktona u vodi (Narula, 2000.).

5. ZNAČAJ BAKTERIJA RODA *AZOSPIRILLIUM*

Pozitivni učinci kombinirane inokulacije leguminoza s bakterijama roda *Rhizobium* i rodova *Azotobacter* i/ili *Azospirillum* imaju pozitivan učinak na težinu i broj kvržica, te na količinu usvojenog dušika (Burns et al., 1981.; Yahalom et al., 1987.; Rodelas et al., 1996.). Nadalje, vrste roda *Azospirillum* poboljšavaju usvajanje P i/ili K kod kukuruza, pšenice, sirka i riže, te utječu na promjenu ravnoteže makro i mikro hraniva kod pšenice i soje. Međutim, takvi učinci na mineralnu ishranu mogu značajno varirati između različitih kombinacija sorata biljaka i bakterijskih sojeva (Murty and Ladha, 1988.; Bashan et al., 1990.; Rodelas et al., 1999.).

Kombinirana inokulacija sjemena (Dobbelaere and Okon, 2007.) pospješuje usvajanje mineralnih hraniva, što direktno utječe na povećanje dužine korijena. To dovodi do boljeg usvajanja molibdena, fosfora i željeza koji su od iznimne važnosti za formiranje kvržica i usvajanje atmosferskog dušika (Burdman et al., 1998.).

U radu Dalla Santa et al. (2004.) ispitan je utjecaj inokulacije sjemena pšenice, ječma i zobi bakterijom *Azospirillum* spp. RAM7 na prinos i sadržaj dušika. U pšenici i ječmu je uočeno značajno povećanje prinosa, dok kod zobi nije bilo porasta u odnosu na sjeme kod kojeg nije bilo inokulacije bakterijom *Azospirillum* spp. RAM7.

El-Komy (2004.) je u svom radu proučavao učinkovitost vrsta *Pseudomonas flourescens, Bacillus megaterium i Azospirillum lipoferum* kod otapanja kalcijevog fosfata. Sojevi *Pseudomonas flourescens i Bacillus megaterium* najviše su otapali fosfate na pločama Fikovskaja (PVK) i u tekućem mediju. Na PVK pločama vrste *Azospirillum lipoferum* pokazali su najslabiju zonu otapanja. Otapanje fosfata testiranim organizmima popraćeno je snižavanjem pH u podlozi. Maksimalno snižavanje pH iznosilo je za Pseudomonas *flourescens* 2,8, za *Bacillus megaterium* 1,2, a za vrstu *Azospirillum lipoferum* 0,5 jedinica. Koimobilizacija ispitivanih bakterija *A. lipoferum* i *Bacillus megaterium* bitno je povećala otapanje fosfora.

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 (Barea i sur., 2005.). Poboljšava klijavost, povećava imunitet biljke i prinos (El-Katatny, 2009.).

Ispitan je utjecaj šest vrsta bakterija koje potiču rast biljaka na klijanje, rast i prinos biljaka kukuruza. Sve vrste izuzev *Azospirillum lipoferum* povećale su klijavost sjemena za 18,5% u odnosu na kontrolu. Poljski i laboratorijski pokusi su pokazali da diazotrofi značajno utječu na povećanje kvalitete zrna, biomasu, sadržaj dušika u zemljištu i na prinos (Gholami i sur., 2009.).

El-Katatny (2009.) ispitivao je utjecaj rizosferne bakterije *Azospirillum brasilense* i plijesni *Trichoderma harzianum* T24 na proizvodnju enzima, fiksaciju dušika te njihovu ulogu u stimulaciji rasta mladica rajčice.

Mikroorganizmi su inokulirani u obliku slobodnih ili imobiliziranih zrna. Sva su svježe pripremljena zrna imala veću sposobnost enkapsulacije (EC % 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), u polučvrstoj podlozi bez dušika, omogućena fiksacija dušika i nakon dodavanja pektina, hitina ili karboksimetil celuloze. Dodatkom ovih izvora ugljika u sterilnu zemlju povećavala se fiksacija dušika, bilo uporabom suhih enkapsuliranih zrna *A. brasilense*, bilo primjenom *A. brasilense* uz plijesan Trichoderma (El-Katatny, 2009.).

6. REZULTATI

6.1. Utjecaj nitrofiksirajućih bakterija na elemente prinosa i kvalitete soje

Dvogodišnji pokusi provedeni su na dva tipa tla: humoglej i eutrično 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. brasilense* i *A. chroococcum*;.

Današnja poljoprivredna proizvodnja nastoji smanjiti troškove proizvodnje korištenjem prirodnih izvora energije, što uključuje i redukciju onečišćenja okoliša, a posebno kada se radi o mineralnom dušiku - smanjenje eutrofikacije podzemnih voda. Da bi nitrofiksacija bila efikasna, kada se radi o simbiotskim nitrofiksirajućim bakterijama, važno je da tlo sadrži dovoljno molibdena, te da postoji kompatibilnost između sorte soje i soja *B. japonicum* (Triplett and Sadowsky, 1992. Mrkovački et al., 1992. Hungria and Bihrer, 2000. Kristek, 2001. Milić et al., 2002.). Bakterije iz roda *Azotobacter i Azospirillum* su slobodno živući organizmi koji usvajaju dušik iz atmosfere, ali su u uskoj vezi s korjenjem biljaka. Pod odgovarajućim uvjetima, ove bakterije mogu unaprijediti razvoj biljaka i promicati prinos kod većine poljoprivrednih kultura u različitim tlima i klimatskim regijama (Becking, 1992. Okon and Labandera-Gonzalez, 1994). Direktne koristi koje biljka ima od benefitnih bakterija rodova *Azotobacter i Azospirillum* su poboljšanja u razvoju korijena, povećanje usvajanja vode i mineralnih hraniva, biološka fiksacija dušika te dislociranje patogenih gljiva i bakterija iz rizosfere korijena (Brown, 1974. Okon and Itzigsohn, 1995). Pozitivni učinci kombinirane inokulacije leguminoza s bakterijama roda *Rhizobium* i rodova *Azotobacter* i/ ili *Azospirillum* imaju pozitivan učinak na težinu i broj kvržica, te na količinu usvojenog dušika (Burns et al., 1981. Yahalom et al., 1987. Rodelas et al., 1996). Nadalje, sojevi roda *Azospirillum* poboljšavaju usvajanje P i/ ili K kod kukuruza, pšenice, sirka i riže, te utječu na promjenu ravnoteže makro i mikrohraniva kod pšenice i soje. Međutim, takvi učinci na mineralnu ishranu mogu značajno varirati između različitih kombinacija sorata biljaka i bakterijskih sojeva (Murty and Ladha, 1988. Bashan et al., 1990; Rodelas et al., 1999.). Kombinirana inokulacija sjemena (Dobbelaere and Okon, 2007.) pospješuje usvajanje mineralnih hraniva, što direktno utječe na povećanje dužine korijena. To dovodi do boljeg usvajanja molibdena, fosfora i željeza koji su od iznimne važnosti za formiranje kvržica i usvajanje atmosferskog dušika (Burdman et al., 1998.).

Pokusi su provedeni tijekom 2012. i 2013. godine na dva različita tipa tla (Tablica 1.), koja su se razlikovala po kemijskim i mikrobiološkim značajkama. Pokus je postavljen po randomiziranom blok rasporedu u 4 ponavljanja i 6 varijanti: A1 – kontrola; A2 – sjeme tretirano sa bakterijom *B. japonicum*; A3 – sjeme tretirano bakterijama *B. japonicum, A. brasilense i A. chroococcum*; B1 – mineralna gnojidba dušikom na osnovi analiza tla; B2 – reducirana mineralna gnojidba za 30%; B3 – reducirana mineralna gnojidba za 60%. U

pokusu je korištena sorta Ika (Poljoprivredni institut u Osijeku). Gustoća sjetve iznosila je 600.000 biljaka po hektaru uz međuredni razmak od 50 cm. U obje godine istraživanja ozima pšenica je bila predusjev. Osnovna gnojidba provedena je u trećoj dekadi rujna, dok je predsjetvena gnojidba provedena sredinom travnja.

Tablica 1. Kemijska svojstva tla

KEMIJSKA SVOJSTVA TLA	TIP TLA	
0-30 CM	HUMOGLEJ	EUTRIČNO SMEĐE TLO
pH(H_20)	7,57	6,98
pH(KCL)	6,74	6,17
HUMUS %	2,43	1,92
P_2O_5 (mg/100 g tla)	25,40	20,38
K_2O(mg/100 g tla)	23,56	18,86

Tablica 2. Gnojidba prema varijantama istraživanja

GNOJIDBA DUŠIKOM	TIP TLA											
	HUMOGLEJ						EUTRIČNO SMEĐE TLO					
	OSNOVNA GNOJIDBA			PREDSJETVENA GNOJIDBA			OSNOVNA GNOJIDBA			PREDSJETVENA GNOJIDBA		
	N_2	P_2O_5	K_20	N_2	P_2O_5	K_20	N_2	P_2O_5	K_20	N_2	P_2O_5	K_20
B1	40	52	100	46	-	-	45	100	150	49	-	-
B2	28	52	100	32,2	-	-	31,5	52	100	34,3	-	-
B3	16	52	100	18,4	-	-	18	52	100	19,6	-	-

B1 – mineralna gnojidba dušikom na osnovi analiza tla; B2 – reducirana mineralna gnojidba za 30%; B3 – reducirana mineralna gnojidba za 60%

Inokulacija sjemena provedena je neposredno prije sjetve sljedećim bakterijskim sojevima: *Bradyrhizobium japonicum* (DSM No. 30131), *Azospirillum brasilense* (DSM No. 1690) i *Azotobacter chroococcum* (DSM No. Section 1 . Agroecology, Ecological Agriculture and Environment Protection 85 Utjecaj nitrofiksirajućih bakterija na elemente prinosa i kvalitete soje 2286). *B. japonicum* kultiviran je na selektivnoj podlozi za rizobium na 26 ºC.

A. brasilense na mediju za *Azospirilum* na 30 ºC, a *A. chroococcum* na mediju za *Azotobacter* na temperaturi od 30 ºC. Bakterijski sojevi su nanešeni na sterilizirani treset. Vlaga mikrobiološkog pripravka iznosila je 55%. Sadržaj *B. japonicum* iznosio je 9 x 1010 CFU po gramu treseta, odnosno po 3 x 1010 CFU po gramu treseta svake bakterijske vrste (*B. japonicum, A. brasilense, A. chroococcum*) kod kombinirane primjene. Potvrđena je pozitivna sinergija između bakterijskih sojeva u laboratorijskim uvjetima. Također, tijekom prethodne dvije godine istraživanja dokazana je kompatibilnost između primjenjene sorte soje i soja *B. japonicum*. Nakon žetve soje određen je prinos zrna te prosječan broj mahuna po biljci. Sadržaj proteina u zrnu određen je metodom po Kjeldahlu. Veličina uzorka bila je 10 biljaka. Dobiveni rezultati obrađeni su primjenom statističkih metoda (analiza varijance, F-testa, LSD test).

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

Značajno viši prosječni prinos zrna soje (t ha-1), kao i prosječni sadržaj bjelančevina u zrnu (%) ostvaren je 2013. godine, jer su vremenski uvjeti 2012. godine bili loši zbog nedostatka oborina uz visoke temperature tijekom srpnja i kolovoza. Kombinirana inokulacija sjemena soje bakterijama *B. japonicum, A. brasilense 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*. Na tipu tla - eutrično smeđe tlo, bolji rezultati su ostvareni višom razinom gnojidbe dušikom, što je bilo i za očekivati, jer je tlo općenito lošijih kemijskih svojstava (niži pH, niži sadržaj organske tvari).

Tablica 3. Prinos zrna soje (t ha-1) na humogleju i eutričnom smeđem tlu u 2012. i 2013. Godini.

TIP TLA									
			HUMOGLEJ			EUTRIČNO SMEĐE TLO			
VARIJANTA			2012	2013	PROSJEK	2012	2013	PROSJEK	**PROSJEK**
KONTROLA (A1)			3,19	3,40	3,30	3,01	3,21	3,11	3,21
B1	TRETIRANJE SJEMENA	A2	3,22	3,77	3,50	3,09	3,28	3,19	3,35
		A3	3,69	3,86	3,78	3,15	3,49	3,32	3,55
B2		A2	3,80	3,79	3,80	3,43	3,40	3,42	3,61
		A3	4,18	4,31	4,25	3,89	3,99	3,94	4,10
B3		A2	3,84	3,60	3,72	3,39	3,37	3,38	3,55
		A3	4,66	4,82	4,74	3,76	3,80	3,78	4,26
		LSD 0,05	0,16	0,193	0,180	0,140	0,160	0,158	1,702
		LSD 0,01	0,30	0,356	0,340	0,256	0,283	0,271	0,301

B1 – mineralna gnojidba dušikom na osnovi analiza tla; B2 – reducirana mineralna gnojidba za 30%; B3 – reducirana mineralna gnojidba za 60%; A1 – kontrola; A2 – sjeme tretirano sa bakterijom *B. japonicum*; A3 – sjeme terirano sa bakterijama *B. japonicum, A. brasilense i A. chroococcum*

ZAKLJUČAK

Najbolji prosječni rezultati ispitivanih parametara na oba tipa tla dobiveni su kombiniranom inokulacijom sjemena soje nitrofiksirajućim bakterijama *B. japonicum, A. brasilense i A. chroococcum*. Na tipu tla humoglej bolji rezultati dobiveni su varijantom u kojoj je reducirana mineralna gnojidba dušikom za 60%, dok su na tipu tla - eutrično smeđe tlo bolji rezultati ispitivanih parametara dobiveni uz redukciju mineralnog dušika za 30%.

6.2. Utjecaj određenih vrsta asocijativnih fiksatora dušika u proizvodnji kukuruza, pšenice i soje

Cvijanović i sur. istraživali su utjecaj određenih vrsta asocijativnih fiksatora dušika u proizvodnji kukuruza i pšenice, kao i simbiotske i asocijativne fiksatore dušika u proizvodnji soje na osnovne elemente biogenosti zemljišta pri različitim dozama mineralnog dušika. Sjeme pšenice inokulirano je smjesom iste količine različitih asocijativnih fiksatora vrste *Azotobacter chroococcum, Azospirillum lipoferum, Brijerinckia Derx, Klebsiella planticola.* Kod soje inokulacija sjemena obavljena je smjesom navedenih asocijativnih sa simbioznih bakterija roda *Bradyrhizobium japonicum*. Sjeme kukuruza inokulirano je smjesom slijedećih vrsta: *Azotobacter chroococcum, Azotobacter vinelandi, Azospirillum lipoferum, Pseudomonas, Bacillus subtillis*. Uz sve agrotehničke mjere, obavljene kvalitetno i u optimalnim rokovima, gnojidbom je dodano: za pšenicu 80, 120, 160 kg N/ha, soju 40, 60, 80 kg N/ha, te kukuruz 60, 90, 120, 150 kg N/ha. Rezultati dobiveni istraživanjem pokazali su da je primjena rizobakterija koje fiksiraju atmosferski dušik u ratarskoj i povrtlarskoj kulturi pogodna. Rizobakterije koje žive na korijenu leguminoza ili na korijenu neleguminoznih biljaka utječu stimulativno na rast biljaka, te produkciju bioloških tvari (vitamini, hormoni, giberelini i auksini). Kod kukuruza najveću brojnost i postotak povećanja ispitivanih parametara utvrđen je pri gnojidbi od 90 kgN/ha, dok je najveći intenzitet disanja tla utvrđen pri dozi od 60 kgN/ha. S povećanjem doza mineralnog dušika vrijednosti parametara biogenosti tla bile su niže. Kod pšenice pri dozi gnojiva sa 80 kg N/ha, utvrđena je najveća brojnost azotobaktera i intezitet ukupne enzimatske aktivnosti, odnosno disanje tla. Brojnost azotobaktera se koristi kao indikator biogenosti tla, jer burno reagira na promjenu bilo kojeg faktora u tlu kao ekosustavu. Na osnovu dinamike oksidoredukcijskih procesa u tlu može se utvrditi intenzitet razlaganja svježe organske tvari, kao i procesa humifikacije, što utječe na visinu prinosa i kvalitetu zrna pšenice (Cvijanović et al., 2007.). Rezultati kod soje pokazali su najveće vrijednosti ispitivanih parametara pri primjeni 40 kg N/ha što upravo dokazuje da je potrebno pri proizvodnji soje obaviti gnojidbu sa količinom mineralnog dušika do 40 kg/ha, kao startno gnojivo. Ove vrste rizobakterija u biofertilizaciji mogu se primijeniti kao pojedinačni sojevi određene vrste ili kao smjesa sojeva jedne ili više vrsta u različitim formama. Najčešće se primjenjuju nanošenjem na sjeme (inokulacija sjemena) neposredno pred sjetvu, putem navodnjavanja sustavom kap po kap, ili aplikacijom u tlo. Moraju imati dobru sposobnost preživljavanja u novoj sredini, dobre kompetitivne odnose sa biljkom

domaćinom i autohtonom mikrobnom populacijom u tlu. Zato se vrši njihova selekcija u laboratorijama na osnovu dugogodišnjih istraživanja u zatvorenim i otvorenim prostorima.

Tablica 4. Utjecaj asocijativnih nitrofiksatora i mineralnog dušika na elemente biogenosti tla kod kukuruza.

KOLIČINA GNOJIVA KG N/HA	UKUPAN BROJ MIKROORGANIZAMA		BROJNOST AZOBAKTERA		DEHIDROGENAZNA AKTIVNOST	
	10^7.g $^{-1}$ soil	Indeksni nivo	10^1.g $^{-1}$ soil	Indeksni nivo	µgTPF.g-1 soil	Indeksni nivo
60	355	100	174	100	526	100
90	412	116,05	180	103,45	438	83,27
120	302	85,07	98	56,32	440	83,65
150	158	44,50	57	32,75	113	21,78
PROSJEK	291	81,87	112	64,17	330	62,80

Izvor: Cvijanović, G.; Milošević, N.; Branislava T.; Dozet, G; Ivić, M. (2007.): Značaj primene rizobakterija u biljnoj proizvodnji

Tablica 5. Utjecaj asocijativnih nitrofiksatora i mineralnog dušika na elemente biogenosti tla kod pšenice (Cvijanović, 2007.).

KOLIČINA GNOJIVA KG N/HA	UKUPAN BROJ MIKROORGANIZAMA		BROJNOST AZOBAKTERA		DEHIDROGENAZNA AKTIVNOST	
	10^7.g $^{-1}$ soil	Indeksni nivo	10^1.g $^{-1}$ soil	Indeksni nivo	µgTPF.g-1 soil	Indeksni nivo
0	239	100	265	100	553	100
80	254	106	352	132	589	106
120	350	146	272	103	471	85
160	273	114	237	89	553	100
PROSJEK	292	122	287	108	537	97

Izvor: Cvijanović, G.; Milošević, N.; Branislava T.; Dozet, G; Ivić, M. (2007.): Značaj primene rizobakterija u biljnoj proizvodnji

Tablica 6. Utjecaj primjene smjese asocijativnih i simbioznih nitrofiksatora i mineralnog dušika na elemente biogenosti tla kod soje (Cvijanović, 2007.).

KOLIČINA GNOJIVA KG N/HA	UKUPAN BROJ MIKROORGANIZAMA		BROJNOST AZOBAKTERA		DEHIDROGENAZNA AKTIVNOST	
	10^7.g $^{-1}$ soil	Indeksni nivo	10^1.g $^{-1}$ soil	Indeksni nivo	µgTPF.g-1 soil	Indeksni nivo
0	218	100	378	100	505	100
40	251	115	346	93	549	109
60	180	82	331	87	608	120
80	179	82	266	70	589	117
PROSJEK	203	92	314	83	582	115

Izvor: Cvijanović, G.; Milošević, N.; Branislava T.; Dozet, G; Ivić, M. (2007.): Značaj primene rizobakterija u biljnoj proizvodnji

Na osnovu dobivenih rezultata navodi se da je biogenosti tla bila veća primjenom inokulata sa različitim rizobakterijama pri nižim dozama mineralnog dušika. Rezultati parametara biogenosti tla su u korelaciji sa rezultatima prinosa uzgojenih biljaka. Najveći prinos kod kukuruza ostvaren je pri dozi mineralnog dušika od 60 kg N/ha , kod pšenice sa dozom od 120 kg N/ha, a kod soje pri dozi od 40 kg N/ha. U prosjeku veće doze mineralnog dušika su negativno utjecale na visinu prinosa uzgajanih biljaka (osim kod pšenice), pa je navedeno da su velike količine mineralnog dušika pri inokulaciji ekološki štetne i ekonomski neisplative (Cvijanović, 2007.).

Tablica 7. Utjecaj inokulanata na prinos kukuruza, pšenice i soje.

KUKURUZ			PŠENICA			SOJA		
Kg N/ha	t/ha	Indeksni nivo	Kg N/ha	t/ha	Indeksni nivo	Kg N/ha	t/ha	Indeksni nivo
60	12,39	100	0	2,74	100	0	2,93	100
90	12,28	99,11	80	2,90	105,83	40	3,01	102,7
120	9,21	74,30	120	3,05	112,96	60	2,94	100,34
150	11,25	90,79	160	2,66	97,08	80	2,54	86,01
PROSJEK	10,91	88,07	PROSJEK	2,87	104,74	PROSJEK	2,85	97,26

Izvor: Cvijanović, G.; Milošević, N.; Branislava T.; Dozet, G; Ivić, M. (2007.): Značaj primene rizobakterija u biljnoj proizvodnji

7.ZAKLJUČAK

Osnovna uloga mikroorganizama je mineralizacija organske tvari, sudjeluju u kruženju tvari i energije u prirodi, transformacija organske tvari i stvaranje humusa, a zatim mineralizacija humusa.

Mikroorganizmi koji imaju pozitivan efekt na biljke ubrajamo u korisnu mikrobnu populaciju rizosfere, a jedan od najznačajnih mikroorganizama su biološki fiksatori. Biološka fiksacija dušika je proces u kojem posebne skupine mikroorganizama usvajaju elementarni dušik iz atmosfere i preko enzima nitrogenaze ga reduciaraju do amonijaka. Biološki fiksatori dušika procesom vezanja atmosferskog dušika opskrbljuju biljku reduciranim dušikom, a od nje uzimaju tvari potrebne za svoj razvoj. Asocijativni fiksatori aktivni su na površini korijena, a ovim fiksatorima pripadaju bakterije roda *Azotobacter, Azospirillum, Bacillus, Klebsiella*. Bakterije roda *Azospirillum* i *Azotobacter* imaju važnu ulogu kao nitrofiksatori.

Brojnim istraživanjima doneseni su zaključci da bakterije roda *Azospirillum* spp. i *Azotobacte*r spp. imaju veliki značaj i ulogu u poljoprivrednoj proizvodnji:

-Svojom aktivnošću potiču rast biljaka, a time i povećanje prinosa;

-Povećavaju usvajanja vode i mineralnih hraniva;

-Utječu na brojnost populacije korisnih mikroba;

-Kombinirane inokulacije leguminoza s bakterijama roda *Rhizobium* i rodova *Azotobacter* i/ili *Azospirillum* imaju pozitivan učinak na težinu i broj kvržica, te na količinu usvojenog dušika;

- Proizvodnje siderofora;

- Pogubnog djelovanja na fitopatogene gljive;

- Proizvodi vitamine i enzime;

- Raste dobro uz prisutnost mikoriznih gljiva;

- Stimulira rast i razvoj biljaka;

- Sposobnosti otapanja fosfata u zemlji;

-Utječu na mikrobiološke procese u tlu

8.LITERATURA

1. Bhattacharyya, P. N.; Jha, D. K. (2011.): Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR):emergence in agriculture. World J Microbiol Biotechnol 28:1327–1350.

2. Cvijanović, G.,Milošević, N., Branislava T., Dozet, G., Ivić, M. (2007.): Značaj primene rizobakterija u biljnoj proizvodnji.

3. Creus, C. M., Graziano, M., Casanovas, E. M., Pereyra, M.A., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Barassi, C. A., Lamattina, L. (2005.) : Nitric Oxide is Involved in the *Azospirillum brasilense*-induced Lateral Root Formation in Tomato ; Planta (2005.) 221: 297–303

4. Beijerinck, M.W. (1908.); Fixation of Free Atmospheric Nitrogen by Azotobacter in pure culture.

5. Dalla Santa, R. O., Fernández Hernández, R., Michelena Alvarez, G.L.,Ronzelli Junior, P., Soccol, C. R. (2004.): *Azospirillum* spp. inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. Laboratório de Processos Biotecnológicos; Universidade Federal do Paraná, Braz. arch. Biol. technol. vol.47. no.

6. Eckert, B., Baller Weber, O., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M., Hartmann, A.(2001.): *Azospirillum doebereinerae* spp. a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4 - grass Miscanthus. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 17–26.

7. El-Katatny, M. H. (2010.): Enzyme Production and Nitrogen Fixation by Free, Immobilized and Coimmobilized Inoculants of *Trichoderma harzianum* and *Azospirillum brasilense* and Their Possible Role in Growth Promotion of Tomato, Food Technol. Biotechnol. 48 (2) 161–174.

8. El-Komy, H.M.A (2004.): Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for Successful Phosphorus and Nitrogen Nutrition of Wheat Plants, Food Technol. Biotechnol. 43 (1): 19–27.

9. Greene, R. A. (1932.): The effect of temperature upon the nitrogen fixation by *Azotobacter* . Soil Sci., 33, 153-161.

10. Kristek, S., Kristek, A., Kraljičak, Ž., Jović, J., Antinac, I., Greger, Ž. Utjecaj nitrofiksirajućih bakterija na elemente prinosa i kvalitete soje. Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku. Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

11. Kristek, S., Kristek , A., Pintar, I., Tetkić, J., Kocevski, D.: Utjecaj primjene mikrobiološkog preparata BactoFil-a na prinos i kvalitet šećerne repe. Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

12. Lugtenberg, B.; Kamilova, F. (2009.): Plant-Growth-Promocting *Rhizobacteria*. Leiden University, Institute of Biology.

13. Milošević, N., Marinković, J. (2000.): Uloga mikroorganizama u adaptaciji poljoprivrednih biljnih vrsta na abiotičke stresove. Institut za ratarstvo i povrtlarstvo Novi Sad.

14. Dobereiner, J. (1988.): Isolation and identification of root associated diazotrophs. Plant and soil. 110-207.

15. Mrkovački, N., Milić, V. (2001): Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially usefull inagricultural application. Annals of Microbiology 51(2):145-159.

16. Redžepović, S., Varga, B., Sikora, S., Heneberg, R. (1990.): Utjecaj tretiranja sjemena mikroelementima i različitim sojevima *Bradyrhizobium japonicum* na prinos zrna soje. Znanstvena praksa u poljoprivrednoj tehnologiji 20: 41-47.

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

18. Redžepović S., Čolo, J., Blaţinkov, M., Sikora, S., Pecina, M., Duraković, L. (2007.) :Utjecaj biostimulatora rasta i fungicida za tretiranje sjemena soje na učinkovitost simbiozne fiksacije dušika, Sjemenarstvo, 24: 3-4.

19. Siddiqui Z. (2006.): PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. PGPR: Biocontrol and Biofertilization, 111-142. 34. Topol, J. i Kaniţai Šarić, G. (2013.): Simbiotska fiksacija dušika u ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji, Agronomski glasnik, Vol 75, No. 2-3.

20. Wandersmn, C. and Delepelaie, P. (2004.) : Bacterial iron sources from siderophores to hemophores. Annu Rev. Microbiol 58, 611-647.

21. Siddiqui Z. (2006.): PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. PGPR: Biocontrol and Biofertilization, 111-142.

Knjige

1. Kristek, S. (2007.): Agroekologija. Interna skripta. Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

2. Milaković, Z. (2013.): Opća mikrobiologija. Interna skripta, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

3. Vukadinović, V. i Vukadinović, V. (2011.): Ishrana bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

4. Škvorc, Ž., Ćosić, T., Sever, K. (2014.): Ishrana bilja. Interna skripta. Šumarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

5. Smith, S. E., Read, D. J. (2008.): Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London

6. Vukadinović, V., Lončarić, Z. (1997.): Ishrana bilja, Sveučilište J.J.Strosmayer u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

9.SAŽETAK

U prirodi postoji kružni tok dušika. Iz atmosfera ga usvajaju mikroorganizmi tijekom procesa koji se naziva fiksacija dušika. Biološka fiksacija dušika je proces u kojem posebne skupine mikroorganizama usvajaju plinoviti dušik iz atmosfere i preko enzima nitrogenaze ga reduciaraju do amonijaka. Nesimbiotski fiksatori dušika pripadnici su roda *Azotobacter, Azospirillum, Bacillus, Klebsiella*. Bakterije roda *Azotobacter* i *Azospirillum* imaju važnu ulogu kao nitrofiksatori opskrbljujući biljke dušikom, poboljšavaju rast i razvoj korijena, svojom aktivnošću potiču rast biljaka, povećavaju prinos, proizvode vitamine i enzime, povećavaju usvajanje vode i mineralnih hraniva, utječu na brojnost populacije korisnih mikroba, a i negativno djeluju na fitopatogene gljive. Sadržaj bakterija rodova Azotobacter i Azospirillum, uz celulolitičke mikroorganizme u tlu, predstavlja indikator plodnosti tla. Dobar mikrobiološki sastav tla ne samo da je preduvjet za visoke prinose, nego i za reduciranje mineralne gnojidbe i kemijskih pesticida, a što je s ekonomskog i ekološkog gledišta od iznimnog značaja.

10.SUMMARY

There is a circular flow of nitrogen in nature. During a process called nitrogen fixation micro-organisms digest it from the atmosphere. Biological nitrogen fixation is a process in which specific groups of microorganisms adopt gaseous nitrogen from the atmosphere and through the enzyme nitrogenase reduce it to ammonia. Non-symbiotic nitrogen fixation are members of the *Azotobacter, Azospirillum, Bacillus, Klebsiella* genus. Bacterias of the genus*Azotobacter* and *Azospirillum* play an important role as nitrofiksators supplying the plants with nitrogen, improving growth and development of the root and with its activities stimulating plant growth, increasing yield, producing vitamins and enzymes, increasing the adoption of water and mineral nutrients, affecting the population count of beneficial microbes and the negative affect on phytopathogenic fungi. The content of bacterial genus *Azotobacter* and *Azospirillum*, with cellulolytic microorganisms in the soil, represents an indicator of soil fertility. Good microbiological composition of the soil is not only a prerequisite for high yields, but also for the reduction of mineral fertilizers and chemical pesticides, what is of the great importance from the economic and environmental point of view.

11.POPIS SLIKA

Redni broj	Naziv	Izvor	Stranica
1.	Bakterije	http://svet-biologije.com/wp-content/uploads/2013/11/Bacteria-illustration-800x600.jpg	2
2.	*Azospirillum brasilense*	http://retina.usal.es/albums/biologia/bacterias/azospirillum-brasilense/fotografia-4.-a.-brasilense-cepa-sp245-gram.jpg)	4
3.	Martinus Beijerick	https:// wikimedia. org/wikipedia/ commons/thumb/5/ 51/Martinus_Willem_ Beijerinck.png/220px-Martinus_Willem_Beijerinck.png	5
4.	Bakterija *Azotobacter chroococcum* u stadiju ciste	https://microbewiki.kenyon.edu/images/thumb/5/5e/Zdrs0309.jpg/400px-Zdrs0309.jpg	6
5.	Kruženje dušika u prirodi	https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/de/Nitrogen_Cycle.jpg	9

12.POPIS TABLICA

Redni broj	Naziv	Izvor	Stranica
1.	Kemijska svojstva tla	KRISTEK, S.; KRISTEK, A.; KRALJIČAK, Ž.; JOVIĆ, J.; ANTINAC,I.; GREGER, Ž.: Utjecaj nitrofiksirajućih bakterija na elemente prinosa i kvalitete soje	18
2.	Gnojidba prema varijantama istraživanja	KRISTEK, S.; KRISTEK, A.; KRALJIČAK, Ž.; JOVIĆ, J.; ANTINAC,I.; GREGER, Ž.: Utjecaj nitrofiksirajućih bakterija na elemente prinosa i kvalitete soje	18
3.	Prinos zrna soje (t ha-1) na humogleju i eutričnom smeđem tlu u 2012. i 2013. Godini	KRISTEK, S.; KRISTEK, A.; KRALJIČAK, Ž.; JOVIĆ, J.; ANTINAC,I.; GREGER, Ž.: Utjecaj nitrofiksirajućih bakterija na elemente prinosa i kvalitete soje	20
4.	Utjecaj asocijativnih nitrofiksatora i mineralnog dušika na elemente biogenosti tla kod kukuruza	Cvijanović, G.; Milošević, N.; Branislava T.; Dozet, G; Ivić, M. (2007.): Značaj primene rizobakterija u biljnoj proizvodnji	22
5.	Utjecaj asocijativnih nitrofiksatora i mineralnog dušika na elemente biogenosti tla kod pšenice (Cvijanović, 2007.)	Cvijanović, G.; Milošević, N.; Branislava T.; Dozet, G; Ivić, M. (2007.): Značaj primene rizobakterija u biljnoj proizvodnji	22
6.	Utjecaj primjene smjese asocijativnih i simbioznih nitrofiksatora i mineralnog dušika na elemente biogenosti tla kod soje (Cvijanović, 2007.)	Cvijanović, G.; Milošević, N.; Branislava T.; Dozet, G; Ivić, M. (2007.): Značaj primene rizobakterija u biljnoj proizvodnji	23
7.	Utjecaj inokulanata na prinos kukuruza, pšenice i soje	Cvijanović, G.; Milošević, N.; Branislava T.; Dozet, G; Ivić, M. (2007.): Značaj primene rizobakterija u biljnoj proizvodnji	23

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
Poljoprivredni fakultet u Osijeku **Diplomski rad**
Sveučilišni diplomski studij, smjer Biljna proizvodnja

Uloga nitrofiksirajućih bakterija *Azotobacter* spp. i *Azospirillum* spp. u biljnoj proizvodnji

Boris Ravnjak

Sažetak: U prirodi postoji kružni tok dušika. Iz atmosfera ga usvajaju mikroorganizmi tijekom procesa koji se naziva fiksacija dušika. Biološka fiksacija dušika je proces u kojem posebne skupine mikroorganizama usvajaju plinoviti dušik iz atmosfere i preko enzima nitrogenaze ga reduciaraju do amonijaka. Nesimbiotski fiksatori dušika pripadnici su roda *Azotobacter, Azospirillum, Bacillus, Klebsiella*. Bakterije roda *Azotobacter* i *Azospirillum* imaju važnu ulogu kao nitrofiksatori opskrbljujući biljke dušikom, poboljšavaju rast i razvoj korijena, svojom aktivnošću potiču rast biljaka, povećavaju prinos, proizvode vitamine i enzime, povećavaju usvajanje vode i mineralnih hraniva, utječu na brojnost populacije korisnih mikroba, a i negativno djeluju na fitopatogene gljive. Sadržaj bakterija rodova Azotobacter i Azospirillum, uz celulolitičke mikroorganizme u tlu, predstavlja indikator plodnosti tla. Dobar mikrobiološki sastav tla ne samo da je preduvjet za visoke prinose, nego i za reduciranje mineralne gnojidbe i kemijskih pesticida, a što je s ekonomskog i ekološkog gledišta od iznimnog značaja.

.**Rad je izrađen pri:** Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Mentor: prof. dr. sc. Suzana Kristek

Broj stranica: 33
Broj grafikona i slika: 5
Broj tablica: 7
Broj literaturnih navoda: 27

Ključne riječi: bakterije,fiksacija dušika, asocijativni fiksatori, *Azospirillum, Azotobacter*

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Doc. dr. sc. Sanda Rašić, predsjednik
2. Prof. dr. sc. Suzana Kristek, mentor
3. Izv. prof. dr. sc. Drago Bešlo, član
4. Prof. dr. sc. Gordana Bukvić , zamjenski član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d

BASIC DOCUMENTATION CARD
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agriculture in Osijek **Graduate thesis**
University Graduate Studies, plant production

The role of nitrofixing bakterija Azotobacter spp. i *Azospirillium* spp. in plant production
Boris Ravnjak

Abstract: There is a circular flow of nitrogen in nature. During a process called nitrogen fixation micro-organisms digest it from the atmosphere. Biological nitrogen fixation is a process in which specific groups of microorganisms adopt gaseous nitrogen from the atmosphere and through the enzyme nitrogenase reduce it to ammonia. Non-symbiotic nitrogen fixation are members of the *Azotobacter, Azospirillum, Bacillus, Klebsiella* genus. Bacterias of the genus*Azotobacter* and *Azospirillum* play an important role as nitrofiksators supplying the plants with nitrogen, improving growth and development of the root and with its activities stimulating plant growth, increasing yield, producing vitamins and enzymes, increasing the adoption of water and mineral nutrients, affecting the population count of beneficial microbes and the negative affect on phytopathogenic fungi. The content of bacterial genus *Azotobacter* and*Azospirillum*, with cellulolytic microorganisms in the soil, represents an indicator of soil fertility. Good microbiological composition of the soil is not only a prerequisite for high yields, but also for the reduction of mineral fertilizers and chemical pesticides, what is of the great importance from the economic and environmental point of view.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek

Mentor: prof. dr. sc. Suzana Kristek

Number of pages: 33
Number of figures: 5
Number of tables: 7
Number of references: 27

Keywords: bacteria, nitrogen fixation, associative fixators, *Azospirillum*, *Azotobacter*

Thesis defended on date:

Reviewers:
1. doc. dr. sc. Sanda Rašić,assistant professor - president
2. prof. dr. sc. Suzana Kristek, full professor - mentor
3. Izv. prof. dr. sc. Drago Bešlo, associate professor – member
4. Prof. dr. sc. Gordana Bukvić, full professor-member

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