

# Usporedba autohtonih izoliranih bakterija Pseudomonas spp. s čistim kulturama Pseudomonas spp. na učinkovitost usvajanja fosfora

---

Pimpi-Steiner, Dorothea

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:*

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /  
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:978166>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-26**



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](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dorothea Pimpi-Steiner

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

Modul Ishrana bilja i tloznanstvo

USPOREDBA AUTOHTONIH IZOLIRANIH BAKTERIJA *PSEUDOMONAS* SPP. S  
ČISTIM KULTURAMA *PSEUDOMONAS* SPP. NA UČINKOVITOST USVAJANJA  
FOSFORA

**Diplomski rad**

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dorothea Pimpi-Steiner

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

Modul Ishrana bilja i tloznanstvo

USPOREDBA AUTOHTONIH IZOLIRANIH BAKTERIJA *PSEUDOMONAS* SPP. S  
ČISTIM KULTURAMA *PSEUDOMONAS* SPP. NA UČINKOVITOST USVAJANJA  
FOSFORA

**Diplomski rad**

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Suzana Kristek, predsjednik
2. Doc. dr.sc. Jurica Jović, mentor
3. Prof. dr. sc. Brigita Popović, član

Osijek, 2024.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	3
2.1. Fosfor (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) .....	3
2.2. Nedostatak fosfora .....	4
2.3. Suvišak fosfora .....	4
2.4. Važnost mikroorganizama koji otapaju fosfor .....	5
2.5. Otapanje fosfora pomoću bakterija .....	5
2.6. Bakterije roda <i>Pseudomonas</i> spp. ....	6
2.7. Prednost korištenja bakterije roda <i>Pseudomonas</i> u poljoprivredi .....	8
2.8. Utjecaj bakterija roda <i>Pseudomonas</i> spp. u poljoprivrednoj proizvodnji .....	8
3. MATERIJALI I METODE .....	10
3.1. Korišteni mikroorganizmi.....	10
3.2. Priprema i odabir podloge .....	10
3.3. Postupak očitavanja rezultata.....	12
3.4. Statistička obrada podataka .....	13
4. REZULTATI.....	14
4.1. Rezultati učinkovitosti otapanja fosfora na različitim podlogama .....	14
4.2. Rezultati usporedbe učinkovitosti otapanja fosfora autohtonih bakterija i poznatih čistih kultura bakterija.....	16
5. RASPRAVA .....	19
6. ZAKLJUČAK .....	22
7. POPIS LITERATURE.....	23
8. SAŽETAK.....	28
9. SUMMARY.....	29
10. POPIS TABLICA .....	30
11. POPIS SLIKA .....	31
12. POPIS GRAFIKONA .....	32

## 1. UVOD

Usvajanje hraniva iz tla je proces na koji utječe površina korijena biljaka i njegova sposobnost apsorpcije elemenata ishrane pri njihovoj vrlo niskoj koncentraciji u vodenoj otopini tla. Na bioraspoloživost hraniva najviše utječu mikroorganizmi s obzirom na to da korijenov sustav biljaka i tlo, koje on prožima, čine jedinstven sustav, odnosno rizosferu, s jakim uzajamnim utjecajem (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). U tlu postoji nebrojeno mnogo mikroorganizama koji imaju različitu ulogu u složenom ekosustavu. Među njima ima rodova i vrsta koji su prepoznati kao korisni mikroorganizmi tla na koje se posvećuje sve više pažnje kako bi se prepoznala njihova benefitna uloga u poljoprivredi. Mikroorganizmi humificiraju organske ostatke pri čemu nastaje humus ili organska tvar tla. Danas ih koristimo kao sredstva biološke zaštite, poboljšivače tla i stimulatore rasta. Osim primarnog djelovanja, korisni mikroorganizmi svojom aktivnošću teža tla čine rahlijima, a u poroznijim i sušim tlama povećavaju sposobnost zadržavanja vode. Također, neutraliziraju kiselost ili lužnatost tla, te stvaraju pH tla neutralnim, što ima veliki utjecaj na usvajanje mikro i makro elemenata tla od strane korijena biljke (Elnahal i sur., 2022.). Fosfor je esencijalni makroelement važan za rast i razvoj biljaka. On je glavni element u nukleinskim kiselinama i staničnoj membrani. Unatoč bogatim rezervama fosfora u tlu on se nalazi većinom u nepristupačnom obliku za biljke. Nedostatak fosfora nepovoljno utječe ne samo na rast i razvoj biljaka već i na prinos i kvalitetu ploda. Zato fosfor pripada u skupinu hranjivih elemenata na koje sve više znanstvenika obraća pozornost u smislu istraživanja njegove iskoristivosti putem bakterija i drugih korisnih mikroorganizama. Među mnogobrojnim mikroorganizmima koji imaju mogućnost otapanja fosfora, nalaze se i bakterije iz roda *Pseudomonas* spp. (Khan i sur., 2007.). Simbioza biljaka i bakterija roda *Pseudomonas* spp. ima mnogo drugih benefitnih utjecaja. Bakterije uništavaju određene vrste toksina i zagađivača, proizvode siderofore kako bi povećale konkurentnost budući da te supstance imaju antibiotsko djelovanje i poboljšavaju hranidbenu vrijednost željeza za biljku, transformiraju organske oblike sumpora u anorganske te na taj način on postaje pristupačan za biljke. Nadalje, biljkama nedostupne anorganske fosfate prevode u njegov topivi oblik, povećavajući tako pristupačnost fosfora biljkama izlučivanjem organskih kiselina (Goswami i sur., 2016.). Održiva poljoprivredna proizvodnja je sustav upravljanja proizvodnjom hrane koji kombinira najbolje ekološke standarde, visoku razinu bioraznolikosti, očuvanje prirodnih resursa, uz upotrebu prirodnih tvari i procesa (Mirecki i sur., 2011.). Koncept

dugotrajnog unošenja korisnih mikroorganizama nastoji preventivno gospodariti tlom i omogućiti usjevu optimalan rast i razvoj (Alori i sur., 2017.). Može se reći da je ova tehnologija poljoprivrednog uzgoja holistička metoda koja bi trebala prevladati u budućnosti kao potencijalno rješenje u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji. Autohtone bakterije su one koje prirodno nastanjuju određeno tlo. One mogu pripadati različitim sojevima i prilagođene su specifičnim uvjetima tog područja (pH, sadržaj organske tvari, sadržaj fosfora i drugih elemenata u tlu). Stoga, njihova sposobnost otapanja fosfora može varirati između pojedinih sojeva unutar istoga roda. Usporedba autohtonih kultura bakterija roda *Pseudomonas* spp. s čistim kulturama *Pseudomonas* spp. poznatog porijekla može pokazati jesu li autohtone bakterije jednako učinkovite u istim uvjetima.

Cilj istraživanja možemo podijeliti na dva dijela. Prvi dio podrazumijevao je odabir pogodne hranjive podloge za određivanje učinkovitosti otapanja fosfora pomoću mikroorganizama, dok je drugi dio podrazumijevao određivanje učinkovitost autohtonih bakterija roda *Pseudomonas* spp. izoliranih iz tala Osječko-baranjske županije u odnosu na učinkovitost otapanja fosfora od strane čistih kultura bakterija roda *Pseudomonas* spp. (*P. putida* ATCC12633, *P. rhizosphaerae* DSM16299 i *P. fluorescens* ATCC13525).

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Fosfor ( $P_2O_5$ )

Fosfor je esencijalni makroelement koji je s poljoprivrednog stajališta izrazito bitan za rast i razvoj biljaka gdje ima ulogu u energetskim reakcijama, fotosintezi, respiraciji, ulazi u sastav nukleoproteida, fosfolipida, enzima i drugih (Lončarić i Vukadinović, 1999.). Fosfor se u prirodi, tlu i biljkama javlja u peterovalentnom obliku, a ukupna količina fosfora u tlu iznosi 0,03 – 0,20 % (Holford, 1997.) i nalazi se u 3 oblika. To su topivi fosfor, aktivni fosfor i vezani fosfor. Topivi fosfor je fosfor otopljen u vodenoj otopini tla i dostupan je biljkama za neposrednu apsorpciju korijenom. to je biljkama najdostupniji oblik fosfora u tlu, ali čini manje od 1% ukupnog fosfora u tlu. Topivi fosfor može biti lako ispran iz tla što dovodi do gubitka hranjivih tvari i potencijalne eutrofikacije. Aktivni fosfor je fosfor koji je vezan za površinu mineralnih čestica tla, poput gline, oksida željeza i aluminijska. ovaj oblik nije direktno topiv ali može postati dostupan biljkama mikrobiološkim i kemijskim procesima u tlu, npr. promjene u pH ili djelovanje organskih kiselina koje luče mikroorganizmi. Aktivni fosfor je prijelazni oblik između topivog i vezanog fosfora, stoga je važan biljkama kao izvor fosfora u dužem vremenskom periodu (Busman, i sur., 2002.). Vezani fosfor je fosfor koji je vezan u netopivim mineralnim kompleksima, kao to su kalcij-fosfat u alkalnim tlima ili aluminij-fosfat i željezo-fosfat u kiselim tlima. ovaj oblik je stabilan i teško dostupan biljkama, a čini najveći dio ukupnog fosfora u tlu (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Proces otapanja vezanog fosfora može trajati dugo i često zahtijeva mikrobiološku pomoć. Na primjer bakterija roda *Pseudomonas* spp. Ciklus P sastoji se iz razgradnje fosfornih spojeva u tlu, njihovog usvajanja biljkama i ponovnog nastanka minerala tla. Kada organska tvar sadrži <0,2 % fosfora u procesu mineralizacije, sav oslobođeni fosfor koriste mikroorganizmi za svoje potrebe. Pojava se označava kao biološka imobilizacija fosfora. U tlu ima 40 – 80% anorganski vezanog fosfora i 40 – 60 % organski vezanog fosfora. Biljke usvajaju fosfor isključivo u anionskom obliku i to kao  $H_2PO_4^-$  i  $HPO_4^{2-}$  (Mahdi i sur., 2011.). Koncentracija fosfora u biljkama prosječno iznosi 0,3 – 0,5 % suhe tvari. Najveće potrebe biljaka za fosforom su u intenzivnom razvoju korijenskog sustava i kod prijelaza iz vegetacije u reprodukciju fazu života biljaka (Vukadinović i Lončarić, 1998.).

## 2.2. Nedostatak fosfora

Nedostatak fosfora je vrlo česta pojava. Slaba ishranjenost biljaka fosforom dovodi do smanjenog prinosa i kvalitete zrna što je uvjetovano nedovoljnom količinom fosfora u tlu koja je neophodna za usvajanje dušika od strane biljke (Schippers i sur., 2006.). Znakove nedostatka primijetimo po slabom rastu biljaka, cvjetanje i zrioba biljaka kasni, pojavljuje se tamnozeleno boja lišća, a u odmaklim fazama nedostatka fosfora listovi postaju crvenkasti do tamnopurpurni, pojavljuju se kloroze, te se korijenov sustav slabije razvija, odnosno korijen je kraći i manje razgranat. Nedostatak fosfora nepovoljno utječe ne samo na rast i razvoj biljaka već i na prinos i kvalitetu ploda. Na primjer, uzrokuje nakupljanje škroba u zrnju kod ječma. S obzirom na to da, unatoč bogatim rezervama fosfora u tlu, on nije dostupan biljkama (Kastori, 1983.) provodi se sve više istraživanja o mineralizaciji fosfora u biljci pristupačne oblike.

## 2.3. Suvišak fosfora

Iako je pojava suviška fosfora u biljci vrlo rijetka, do nje može doći prekomjernom gnojidbom fosforom gnojivima. Simptomi suviška fosfora su usporen rast, tamno mrke pjege na lišću koje se šire prema bazi lista i lišće konačno opada. Veće količine fosfora ubrzavaju metabolizam i dovode do skraćivanja vegetacije, prijevremenog cvjetanja i starenja biljaka. Kada se determinira suvišak fosfora kemijskom analizom potrebno je na određeno vrijeme zaustaviti primjenu fosfora ili pak jako smanjiti vraćajući u tlo samo odneseni fosfor (prinosom i žetvenim ostacima kad se oni odnose s parcele i ne zaoravaju) (Vukadinović, 2018.). Morfološke posljedice uočavaju se tek kada je sadržaj fosfora u biljkama povećan za pet do deset puta. Suvišak fosfora povezan je i s transportom drugih elemenata i to ponajprije željeza, čiji se transport u biljci smanjuje pri suvišku fosfora te dolazi do pojave kloroze (Kastori, 1983.).



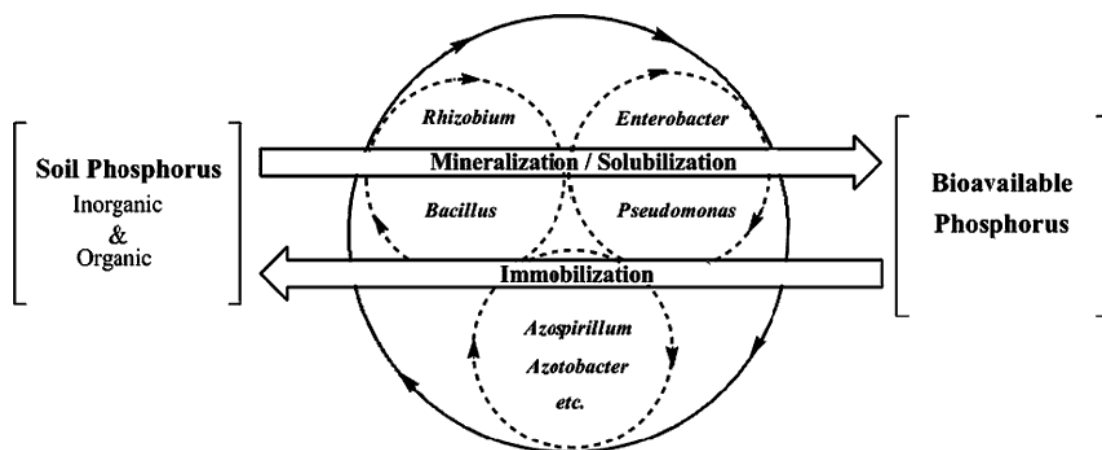
## 2.4. Važnost mikroorganizama koji otapaju fosfor

Redovitim unosom benefičnih mikroorganizama može se smanjiti potreba za dodavanjem umjetnih fosfornih gnojiva. U odnosu na druga gnojiva, svjetski resursi za proizvodnju fosfornih gnojiva su ograničeni i vrlo mali. Predviđanja su da će rezerve fosfata biti dostatne za narednih 50 do 100 godina (Vukadinović, 2020.). Danas su fosfati (fosforiti sedimentnog i apatiti magmatskog podrijetla) osnovna sirovina za proizvodnju fosfornih gnojiva. Glavna rudna ležišta fosfata su u SAD, Kini, Maroku i Rusiji (Alewell i sur 2020.). Prerada sirovih fosfata u fosfatna gnojiva sastoji se u kemijskom prevođenju netopljivih oblika u biljci pristupačne oblike fosfora, a prerada sirovine izvodi se na tri osnovna načina: elektrokemijsko dobivanje elementarnog fosfora i njegova prerada u soli, razlaganje sirovih fosfata jakim mineralnim kiselinama i termička prerada sirovih fosfata ili drugih ruda koje sadrže dovoljno fosfora (Vukadinović, 2020.). Rezultat ograničenih resursa sirovih fosfata je taj da se cijena topivih fosfornih gnojiva drastično povećava te tako raste interes za alternative. Stoga, pozornost je na mikroorganizmima koji otapaju fosfor kao alternativa za fosfatna gnojiva, te dugoročno pridonose zdravlju tla i stabilnosti ekosustava.

## 2.5. Otapanje fosfora pomoću bakterija

Pankhurst i Lynch (1995.) su utvrdili da je najvažniji mehanizam rizobakterija konverzija netopivog oblika fosfora u oblik koji je dostupan biljci. Ove bakterije čine anorganski fosfat dostupnim pomoću različitih mehanizama proizvodnjom organskih i anorganskih kiselina, otpuštanjem vodikovih iona te proizvodnjom keliranih tvari pomoću enzima fosfataze. Mikroorganizmi mineraliziraju organski fosfor u tlo procesima fosfomineralizacije i fosfomobilizacije pri čemu nastaju mineralni topivi fosfati dostupni biljkama. Primarni mehanizam otapanja fosfata temelji se na principu izlučivanja organske kiseline iz bakterija. Naime, organizmi koji obitavaju u rizosferi koriste šećer iz korijenovog eskudata i proizvode organske kiseline (Goswami i sur., 2014.). Proizvedene organske kiseline djeluju kao kelati za dvovalentni kation kalcij zajedno sa otpuštenom fosfatazom iz netopivih spojeva fosfora. Mnoge bakterije koje čine fosfor topivim snižavaju pH medija izlučivanjem organskih kiselina kao što su: octena, mliječna, oksalna, limunska i druge (Patel i sur., 2015.). Za ishranu biljaka od velike važnosti je dinamika odvijanja procesa mineralizacije i

imobilizacije, a koji su pod kontrolom mikroorganizama (Cross i Schlesinger, 1995.) (Slika 1). Fosfomobilizatori, u ovom slučaju *Pseudomonas* spp., koriste ortofosfate za svoj rast u uvjetima kada se mineralizira organska tvar sa malom količinom fosfora. Mikrobiološki fosfor podliježe mineralizaciji do oslobađanja ortofosfata (Hajnal i sur., 2004.).



Slika 1. Shematski dijagram mobilizacije i imobilizacije fosfora u tlu pomoću bakterija (Izvor: jabs\_1\_1\_6.pdf (uuar.edu.pk))

## 2.6. Bakterije roda *Pseudomonas* spp.

*Pseudomonas* spp. (Slika 2.) pripadaju u glavne predstavnike bakterija koje otapaju fosfate (Phosphate solubilizing bacteria – PSB) u tlu. Također, pripadaju asocijativnim rizosfernim bakterijama koje imaju pozitivan učinak na rast i razvoj biljaka, stoga se nazivaju rizobakterijama za promicanje rasta biljaka (engl. Plant Growth Promoting Rhizobacteria - PGPR) (Kloepper i Schroth, 1978.). Rod *Pseudomonas* obuhvaća skupinu sveprisutnih mikroorganizama koji se nalaze na različitim ekološkim staništima poput vode, tla, sedimenata i biljnih površina (Yahya i Azawi, 1998.).



Slika 2. Bakterije *Pseudomonas* sp. uzgojene na TSA-YE pri 28 °C tijekom 2 dana (Izvor: [Macroscopic colony characteristics of Pseudomonas sp. UCMA 17988 grown... | Download Scientific Diagram \(researchgate.net\)](#))

*Pseudomonas fluorescens* mogu se općenito vizualno razlikovati od ostalih rodova *Pseudomonas* po njihovoj sposobnosti da proizvode žuto zeleni fluorescentni pigment topiv u vodi. One su gram-negativne, kemoheterotrofne, pokretne bakterije u obliku štapića s polarnim flagelama. Žarišna zona u kojoj su pseudomonade povezane s korijenom je rizosfera gdje imaju obećavajuću ulogu kao upravitelji zdravlja bilja (Vazquez i sur., 2000.). Ove bakterije dobivaju određene hranjive tvari iz biljaka koje se nalaze u neposrednoj blizini, a za uzvrat, pomažu biljkama na nekoliko načina. Oni uništavaju određene vrste toksina i zagađivača, uključujući stiren, policikličke aromatske ugljikovodike i trinitrotoluen (TNT). Također mogu zaštititi biljke od uzročnika infekcija stvaranjem sekundarnih metabolita kao što su antibiotici i vodikov cijanid koji ubijaju druge bakterije i gljivice (Migula, 1894.).

*Pseudomonas putida* je saprofitna bakterija koja se nalazi u rizosferi te je poznata kao kolonizator tla. Zahvaljujući svojoj otpornosti na oksidativni stres, niskim prehranbenim zahtjevima te visokoj toleranciji na toksine, visoke temperature, ekstremne pH vrijednosti i otapala, ima kapacitet za korištenje u industriji za proizvodnju različitih spojeva u velikim količinama (Kim i Park, 2014.).

*Pseudomonas rhizosphaerae* je štapićasta gram-negativna bakterija koja ne stvara spore, a pokreće se s jednim polarnim flagelom (Peix i sur., 2003.).

## 2.7. Prednost korištenja bakterije roda *Pseudomonas* u poljoprivredi

U poljoprivredi se pažnja sve više usmjerava na korištenje mikrobioloških preparata koji sadrže mikroorganizme s mogućnošću otapanja fosfora. U ovom slučaju bakterija roda *Pseudomonas* spp.. Glavna razlika između mikrobioloških i ostalih organskih i mineralnih gnojiva je ta što su mikrobiološka gnojiva „živa“. Odnosno sadrže određene korisne sojeve mikroorganizama iz tla (Muthaura i sur., 2010.). Inokulacijom ovih gnojiva ne unosimo hraniva za ishranu biljke, već će ti mikroorganizmi koje unesemo pretvoriti nepristupačne spojeve elemenata u pristupačan oblik biljci, te na taj način poboljšavamo opskrbu biljke elementima koji su im potrebni za ostale procese u tlu i biljci, što znači da će gnojivo potaknuti rast korijenovog sustava (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Kako bi se izbjegla rezidualna toksičnost kemijskih gnojiva, primjena bio gnojiva, mikrobnih inokulanata koji mogu potaknuti rast i produktivnost biljaka prihvaćena je na globalnoj razini kao alternativni izvor ekoloških gnojiva. Također zbog problema sa ograničenim resursima za proizvodnju fosfatnih gnojiva. Stoga se inokuliranje sjemena, usjeva i tla mikroorganizmima koji tope fosfate (Phosphate solubilizing microorganisms - PSM) sve više predstavlja kao alternativna komponenta održivih poljoprivrednih sustava (Alori i sur., 2017.).

## 2.8. Utjecaj bakterija roda *Pseudomonas* spp. u poljoprivrednoj proizvodnji

Martinez, i sur. (2019) proveli su istraživanje o utjecaju mikrobiološkog gnojiva (*Pseudomonas fluorescens*) na proizvodnju dinje (*Cucumis melo* L.) u poljskim uvjetima. Rezultat istraživanja je taj da je primjena *P. fluorescens* značajno promovirala topivost soli ( $416$  i  $1128 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), dostupnu koncentraciju Cu ( $3,8$  i  $4,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ), dostupnost P ( $104$  i  $123 \text{ mg kg}^{-1}$ ) te mikrobnu C biomasu ( $56$  i  $93 \text{ mg C kg}^{-1}$ ) za kontrolnu i obrađenu površinu. Zaključili su da je, s obzirom da je *P. fluorescens* povećala veličinu i težinu ploda ( $3,0$  do  $3,8 \text{ kg}$ , odnosno  $3,3$  do  $4,3 \text{ kg}$  za kontrolne i obrađene), gnojidba ovom bakterijom održiva alternativa za povećanje prinosa i kakvoću plodova bez povećane uporabe mineralnih gnojiva i kemijskih pesticida. Također, Paulitz i sur. (1992.) navode kako su tretiranjem

sjemena bakterijom ostvarili povećanje prinosa graška za 19,38 % te soje za 16,43 %. Marek-Kozaczuk i Skorupska, 2001., izvijestili su da je u minimalnom mediju bakterija *Pseudomonas fluorescence* soja 267 proizvela veliku količinu niacina ( $0,92 \text{ mg ml}^{-1}$ ), pantotenske kiseline ( $0,75 \text{ mg ml}^{-1}$ ) i druge vitamine B kompleksa kao što su biotin, tiamin, kobalamin, piridoksin. Inokulacija te bakterije zajedno s rizobium vrstama stimulirala je rast i zajedničku fiksaciju dušika u lucerni (Marek-Kozaczuk i sur., 1996.). Vivekananthan i sur., 2004., istražili su da primjena *P. fluorescens* obogaćenog hitinom uzrokuje induciranje cvjetanja kod manga. Soj je zaštitio mango od patogena antraknoze *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. zahvaljujući obrambenim litičkim enzimima hitinazi i  $\beta$ -1,3-glukanazi. Budući da je hitin važan sastojak crijevne obloge insekata, *Pseudomonas fluorescens* bi mogao igrati značajnu ulogu pri suzbijanju insekata zbog svoje aktivnosti hitinaze (Harish i sur., 2009.). Rezultati istraživanja na kiselim tlima koja su proveli Winarso i sur. (2011.) ukazuju na to da je primjena tekućeg dijela komposta od rižine slame u kombinaciji s inokulacijom fosfor topivim bakterijama (*Pseudomonas putida*) dovela do povećanja pH vrijednosti tla te povećanja pristupačnog fosfora u tlu, a da je smanjen sadržaj kiselih kationa. Glick (2010.) navodi predstavnike roda *Pseudomonas* spp. kao najdominantniju i najučinkovitiju skupinu mikroorganizama u tlu koji obavljaju biodegradaciju složenih organskih spojeva. Međutim, navode kako je potrebno provesti još istraživanja kako bi se mikroorganizmi mogli uvesti u aktivnu poljoprivredu.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Korišteni mikroorganizmi

U istraživanja korištene su 3 čiste kulture bakterija iz roda *Pseudomonas* spp. (*P. putida* ATCC12633, *P. rhizosphaerae* DSM16299 i *P. fluorescens* ATCC13525) poznatog porijekla te 9 autohtonih bakterija roda *Pseudomonas* spp. izoliranih iz tala Osječko-baranjske i Vukovarsko-srijemske županije (Tenja, Osijek, Ernestinovo, Đakovo, Slakovci, Jarmina, Gaboš, Habjanovci). Izolacija je provedena iz svježe prikupljenih uzoraka tla, metodom razrjeđenja i pročišćavanja do čistih kultura. Dobivene čiste kulture bakterija dobile su laboratorijske oznake za daljnje korištenje u mikrobiološkom laboratoriju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti. Bakterije su umnažane i održavane na čvrstoj i u tekućoj King`s B podlozi (Slika 3.).



Slika 3. Čista kultura bakterija *Pseudomonas* (Izvor: Dorothea Pimpi-Steiner)

#### 3.2. Priprema i odabir podloge

Za potrebe istraživanja pripremljene su dvije podloge koje su se razlikovale koncentracijom fosfora u obliku triklaciji fosfata. Korištena je gotova podloga Pikovskaya`s agar (PIK) koja sadrži 5 g L<sup>-1</sup> fosfora u obliku trikalcij fosfata te pripravljena podloga za testiranje

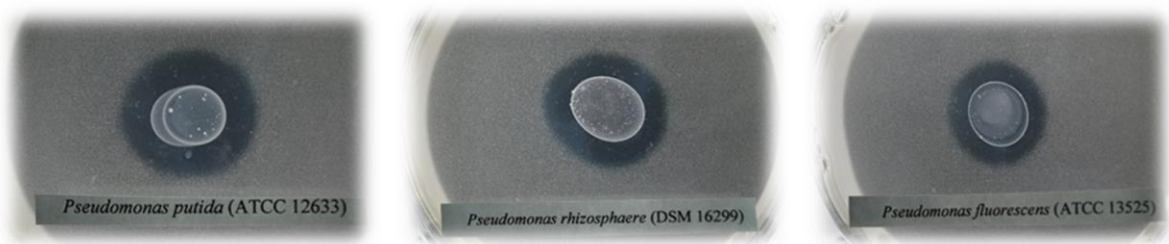
učinkovitosti otapanja fosfora (FOP) koja sadrži 2 g L<sup>-1</sup> fosfora u istom obliku. Nakon sterilizacije podloga, te izlijevanja istih u Petrijeve zdjelice, naciepljivane su bakterije roda *Pseudomonas* spp. poznatog porijekla kako bi ispitali pogodnost određene podloge za daljnje testiranje. Naciepljivanje je obavljeno pipetiranjem 20 µl uzorka na podlogu približno u središnjem dijelu Petrijeve zdjelice (Slika 4.).



Slika 4. Pipetiranje i naciepljivanje uzorka (Izvor: Dorothea Pimpi-Steiner)

Na osnovi navedenog postupka, odabrana je podloga Pikovskaya`s agar (PIK) kao pogodna podloga za daljnje testiranje. Podloga je mutno bijele boje, a nakon inkubacijskog perioda (5 dana pri temperaturi od 30 °C) dolazi do pojave prozirne površine podloge uslijed sposobnosti bakterija da metaboliziraju fosfor iz podloge (Slika 5.).

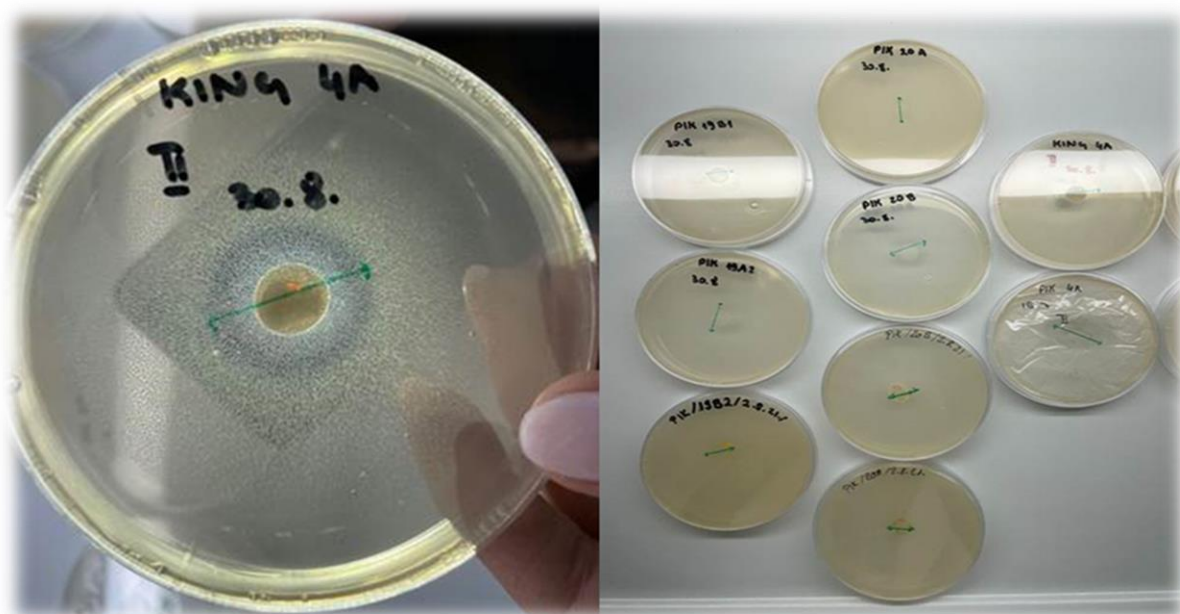
Učinkovitost pojedinih sojeva bakterija za otapanje fosfora ustanovljena je mjerenjem promjera prozirne površine podloge, a dobivena vrijednost (mm) korištena je u svrhu usporedbe učinkovitosti otapanja fosfora između "poznatih" vrsta bakterija roda *Pseudomonas* spp. koje su služile kao kontrolni uzorci te autohtonih vrsta roda *Pseudomonas* spp izoliranih iz tala Osječko-baranjske i Vukovarsko-srijemske županije.



Slika 5. Prozirne površine uslijed otapanja fosfora (Izvor: Dorothea Pimpi-Steiner)

### 3.3. Postupak očitavanja rezultata

Nakon inkubacije podloge promatramo koristeći izvor svjetlosti, u našem slučaju pomoću izvora svjetlosti na brojaču kolonija. Nakon što odredimo prozirnu površinu (pretežito pravilno okruglog oblika) koja je nastala uslijed otapanja fosfora, markerom označimo promjer tako što povučemo crtu od ruba do ruba. Dužinu crte (mm), odnosno promjer prozirne površine koristimo za uspoređivanje učinkovitosti otapanja fosfora između pojedinih sojeva (Slika 6.).



Slika 6. Određivanje prozirne površine i označavanje promjera (Izvor: Dorothea Pimpi-Steiner)



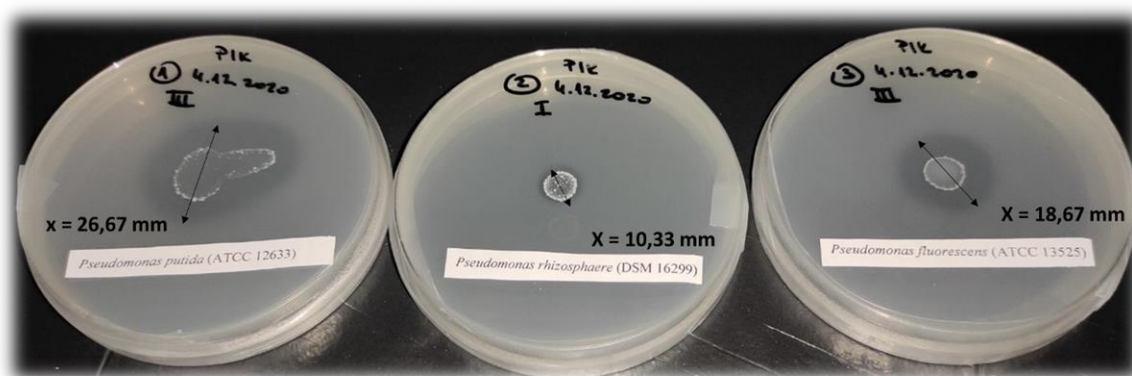
### 3.4. Statistička obrada podataka

Analiza podataka uključivala je procjenu parametara deskriptivne statistike, a svi podatci obrađeni su u programu SAS Enterprise Guide 7.1. Statistički značajne razlike između promatranih parametara utvrđene su F testom.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati učinkovitosti otapanja fosfora na različitim podlogama

Prosječna vrijednost učinkovitosti otapanja fosfora na Pikovskaya's Agar (PIK) podlozi pomoću bakterija *P. putida* ATCC12633, *P. rhizosphaerae* DSM16299 i *P. fluorescens* ATCC13525 iznosila je 18,56 mm, dok su najmanja i najveće vrijednost iznosile 10,33 mm, odnosno 26,67 mm (Slika 7.).



Slika 7. Učinkovitost otapanja fosfora na PIK podlozi (Izvor: Dorothea Pimpi-Steiner)

*Pseudomonas putida* ostvarila je najveću učinkovitost otapanja fosfora koja je iznosila 26,67 mm, a ta vrijednost bila je za 43,70 % veća u odnosu na prosječnu vrijednost. Također, utvrđene su statistički značajne razlike između učinkovitost svih korištenih sojeva bakterija na otapanje fosfora (Tablica 1.).

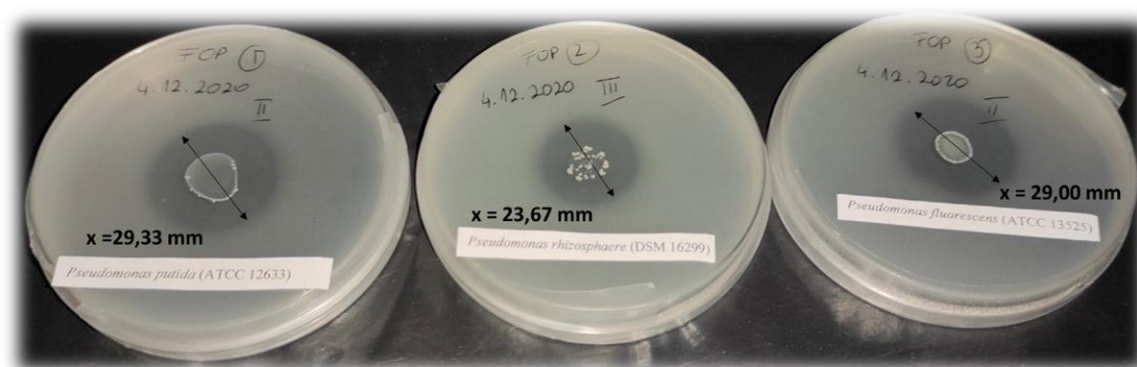
Na pripremljenoj hranjivoj (FOP) podlozi prosječna vrijednost učinkovitosti otapanja fosfora pomoću bakterija *P. putida* ATCC12633, *P. rhizosphaerae* DSM16299 i *P. fluorescens* ATCC13525 iznosila je 27,33 mm. *Pseudomonas putida* je i na ovoj podlozi ostvarila najveću učinkovitost otapanja fosfora koja je iznosila 29,33 mm. Također, bakterija *P. fluorescens* ukazuje na vrlo visoku učinkovitost otapanja fosfora te je ostvaren vrijednost iznosila 29,0 mm (Slika 8.)

Tablica 1. Učinkovitost otapanja fosfora na Pikovskaya's Agar (PIK) podlozi pomoću bakterija *P. putida* ATCC12633, *P. rhizosphaerae* DSM16299 i *P. fluorescens* ATCC13525

Hranjiva podloga	Naziv čiste kulture bakterija	Učinkovitost otapanja fosfora (mm)
Pikovskaya's Agar (PIK), gotova podloga koja sadrži 5 g L <sup>-1</sup> fosfora u obliku trikalcij fosfata	<i>Pseudomonas putida</i>	26,67 A
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	18,67 B
	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	10,33 C
Prosjek		18,56
Minimum		10,33
Maksimum		26,67
LSD <sub>(0,05)</sub>		7,738

Između vrijednosti učinkovitosti otapanja fosfora koje su označene istim slovima nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Najmanju vrijednost ostvarila je *P. rhizosphaerae*, a ta vrijednost iznosila je 23,67 mm i bila je za 13,4 % manja u odnosu na prosječnu vrijednost. Utvrđene su statistički značajne razlike između bakterija *P. putida* i *P. rhizosphaerae* te *P. fluorescens* i *P. rhizosphaerae*, dok između učinkovitosti otapanja fosfora pomoću bakterija *P. putida* i *P. fluorescens* nisu utvrđene statistički značajne razlike (Tablica 2.).



Slika 8. Učinkovitost otapanja fosfora na FOP podlozi (Izvor: Dorothea Pimpi-Steiner)

Najveće vrijednosti otapanja fosfora ostvarila je bakterija *P. putida* na obje podloge, a najmanje vrijednosti na obje podloge ostvarila je bakterija *P. rhizosphaerae*. Prosječna vrijednost učinkovitosti na PIK podlozi bila je za 47,25 % manja u odnosu na prosječnu vrijednost ostvarenu na FOP podlozi. Međutim, razlike između pojedinih vrijednosti su bile

veće na PIK podlozi pa je *P. putida* imala za 8 mm veću učinkovitost u odnosu na *P. fluorescens*, odnosno za 16,34 mm veću učinkovitost u odnosu na *P. rhizosphaerae*, dok su iste razlike na FOP podlozi iznosile 0,33 mm, odnosno 5,66 mm. Na osnovi dobivenih rezultata ustanovljeno je kako se za daljnja istraživanja preporuča korištenje podloge PIK koja sadrži veću koncentraciju fosfora u obliku trikalcij fosfata. (Tablica 1. i 2.).

Tablica 2. Učinkovitost otapanja fosfora na pripremljenoj hranjivoj (FOP) podlozi pomoću bakterija *P. putida* ATCC12633, *P. rhizosphaerae* DSM16299 i *P. fluorescens* ATCC13525

Hranjiva podloga	Naziv čiste kulture bakterija	Učinkovitost otapanja fosfora (mm)
Pripremljena podloga za otapanje fosfora (FOP) koja sadrži 2 g L <sup>-1</sup> fosfora u obliku trikalcij fosfata	<i>Pseudomonas putida</i>	29,33 A
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	29,00 A
	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	23,67 B
Prosjek		27,33
Minimum		23,67
Maksimum		29,33
LSD <sub>(0,05)</sub>		2,978

Između vrijednosti učinkovitosti otapanja fosfora koje su označene istim slovima nisu utvrđene statistički značajne razlike.

#### 4.2. Rezultati usporedbe učinkovitosti otapanja fosfora autohtonih bakterija i poznatih čistih kultura bakterija

Prosječna vrijednost učinkovitosti otapanja fosfora na Pikovskaya's Agar (PIK) podlozi pomoću bakterija *P. putida* ATCC12633, *P. rhizosphaerae* DSM16299 *P. fluorescens* ATCC13525 te autohtonih čistih kultura izoliranih iz tala Osječko-baranjske i Vukovarsko-srijemske županije iznosila je 21,72mm (Tablica 3.). Najveću vrijednost (29,33 mm) ostvarila je bakterija pod oznakom "U-10-BR", dok je najmanju vrijednosti ostvarila bakterija *P. rhizosphaerae*, a vrijendost je iznosila 10,33 mm.

Ostvarena vrijednost otapanja fosfora pomoću autohtone bakterije pod oznakom "U-10-BR" bila je za 9,97 % veća u odnosu na vrijednost ostvarenu pomoću *P. putida* (ATCC12633), 57,10 % veća u odnosu na vrijednost ostvarenu pomoću *P. fluorescens* (ATCC13525),

odnosno za 183,93 % veća u odnosu na vrijednost ostvarenu pomoću *P. rhizosphaerae* (DSM16299) (Tablica 3.).

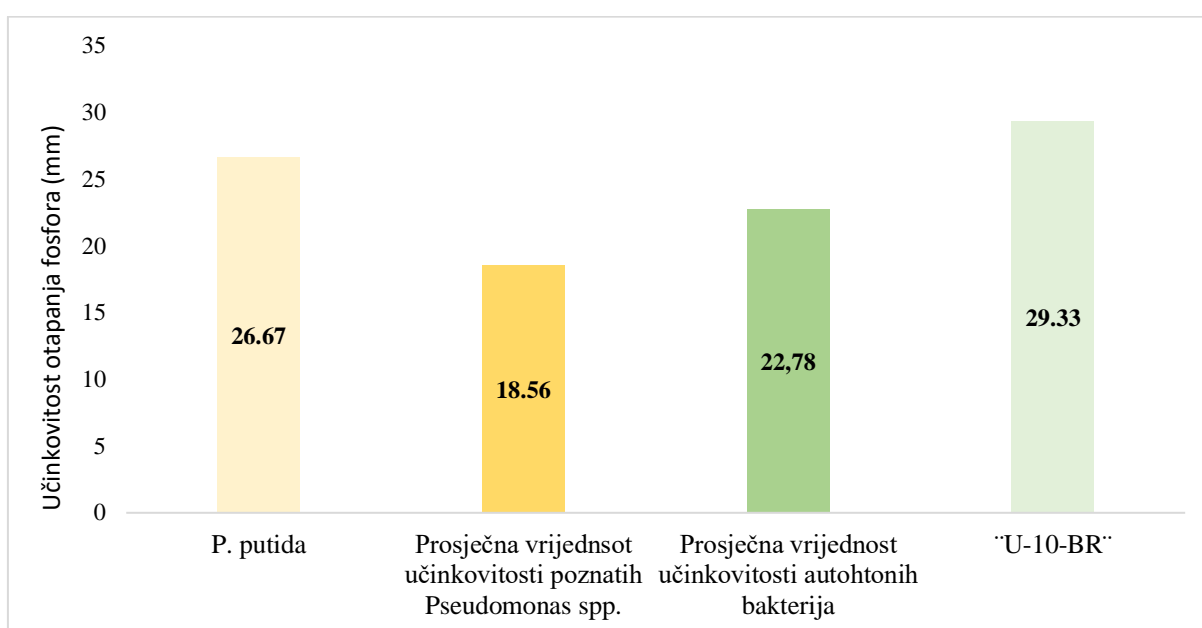
Tablica 3. Usporedba otapanja fosfora na Pikovskaya's Agar (PIK) podlozi pomoću čistih kultura *P. putida* ATCC12633, *P. rhizosphaerae* DSM16299, *P. fluorescens* ATCC13525 te autohtonih čistih kultura

Naziv čiste kulture bakterija		Učinkovitost otapanja fosfora (mm)
Poznate čiste kulture	<i>Pseudomonas putida</i>	26,67 ab
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	18,67 cd
	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	10,33 f
Autohtone kulture izolirane iz tala Osječko-baranjske županije	U-10-BR	29,33 a
	U-1-ZP	26 ab
	U-4-T	25,33 ab
	U-2-O	24 b
	U-17-J-P	23,33 b
	U-14-S-P	22,67 bc
	U-7-E	22,67 bc
	U-20-H-J	17,33 de
	U-19-K-SU	14,33 ef
Prosjek		21,72
Minimum		10,33
Maksimum		29,33
LSD <sub>(0,05)</sub>		4,250

Između vrijednosti učinkovitosti otapanja fosfora koje su označene istim slovima nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Utvrđene su statistički značajne razlike između učinkovitosti bakterije pod oznakom "U-10-BR" i bakterija pod oznakama "U-2-O", "U-17-J-P", "U-17-S-P", "U-7-E", "U-20-H-J", "U-19-K-SU", *P. fluorescens* i *P. rhizosphaerae* (Tablica 3.). Najviše predstavnika autohtonih bakterija, njih 6 pod oznakama "U-1-ZP", "U-4-T", "U-2-O", "U-17-J-P", "U-17-S-P" i "U-7-E" ostvarili su vrijednost učinkovitosti otapanja fosfora koja je bila na razini vrijednosti ostvarene od strane bakterije *P. putida* što znači da između njih nisu ustanovljene statistički značajne razlike.

Prosječna vrijednost učinkovitosti koju su ostvarili svi autohtoni sojevi bakterija izolirani iz tala Osječko-baranjske i Vukovarsko-srijemske županije iznosila je 22,78 mm te je bila veća za 4,22 mm, odnosno 22,74 %, u odnosu na prosječnu vrijednost ostvarenu od strane skupine "poznatih" čistih kultura *Pseudomonas* spp., a koja je iznosila 18,56 mm. Također, najučinkovitiji predstavnik autohtonih sojeva ("U-10-BR") ostvario je vrijednost za 10,77 mm (58,03 %) veću od prosječne vrijednosti ostvarene od strane skupine "poznatih" čistih kultura *Pseudomonas* spp., dok je najučinkovitiji predstavnik "poznatih" bakterija iz roda *Pseudomonas* spp. ostvario za 4,11 mm, odnosno 17,08 %, veću vrijednost u odnosu na ostvarenu prosječnu vrijednost autohtonih predstavnika (Grafikon 1.).



Grafikon 1. Prosječne vrijednosti učinkovitosti otapanja fosfora skupine "poznatih" *Pseudomonas* spp. i autohtonih bakterija te njihovog najučinkovitijeg predstavnika skupine

## 5. RASPRAVA

Dobiveni rezultati, odnosno činjenica da su nastale prozirne površine ispod bakterijskih kultura, odgovaraju navodima brojnih autora (Fliessbach i sur., 2009. Kumar i Singh, 2001., Rodriguez i Fraga, 1999., Troxler i sur., 1997.) da bakterije roda *Pseudomonas*, svojim eksudatima koji su proizvodi njihovog metabolizma, otapaju netopive oblike fosfora u tlu i prevode ih u biljkama pristupačne oblike.

Nadalje, ovisno o koncentraciji fosfora u hranjivoj podlozi promjer prozirne površine je veći ili manji. Stoga su na podlozi s manjom koncentracijom fosfora promjeri prozirnih površina veći u odnosu na promjere prozirnih površina na podlogama s većim koncentracijama fosfora, a veće razlike učinkovitosti između pojedinih sojeva bakterija nastaju tek pri većim koncentracijama fosfora.

Dobiveni rezultati, odnosno mogućnost povećane mineralizacije fosfora pomoću bakterija iz roda *Pseudomonas* spp. ukazuje na potencijalnu mogućnost smanjenja mineralnih fosfornih gnojiva, a što se podudara s navodima Park i sur. (2008.) da tretiranjem tla vrstama roda *Pseudomonas* možemo reducirati gnojidbu fosforom, jer zahvaljujući navedenim mikroorganizmima biljka ih koristi iz prirodnih resursa, odnosno tla. Nadalje, osim što otapaju netopive fosfate, mikroorganizmi proizvode supstance i enzime koji pospešuju rast biljaka, kao što su indoloctena kiselina, siderofori, vodikov cijanid te enzime pektinazu, lipazu i proteazu (Geetha i sur., 2012.).

Izolirani sojevi bakterija iz tala s područja Osječko-baranjske i Vukovarsko-srijemske županije potvrđuju navode brojnih autora da su tla bogata autohtonim populacijama rizobakterija koje su se optimalno prilagodile uvjetima sredine te da predstavljaju neizostavnog sudionika prilikom uzgoja usjeva načinima održive poljoprivrede. Također, brojni autori navode da je *Pseudomonas* spp. prisutan u svim tlima, a njihov broj zavisi o klimatskim uvjetima i svojstvima tla (Deubelet i sur., 2000., Di Simine i sur., 1998., Fliessbach i sur., 2009., Kumar i Singh, 2001.).

Mogućnost i učinkovitost otapanja fosfora pomoću bakterije *Pseudomonas fluorescens* potvrđuju i navodi autora Amri M. i sur. (2023.) koji su napravili istraživanje u 5 regija u Tunisu. Dobiveno je 28 sojeva bakterija koje otapaju fosfor. Na temelju rezultata halo metode, odabrani su sojevi svake vrste koji su pokazali viši indeks otapanja fosfata za procjenu otapanja fosfata kolorimetrijskom metodom, a najviše vrijednosti je proizveo *P. fluorescens* dobiven iz šumskog tla sjevernog Tunisa.

Također, da bakterija *Pseudomonas putida* pripada među vrlo učinkovite i značajne predstavnike bakterija koje otapaju fosfor, navode i Haiyang i sur. (2022.) koji su proveli istraživanje nad autohtonim sojevima bakterija koje otapaju fosfor na području Shouguang u centru za poljoprivredu Kineske akademije znanosti. Soj *Pseudomonas putida* postigao je najbolje otapanje fosfora,  $258,07 \pm 0,74 \text{ mg L}^{-1}$  topivog fosfora iz  $5 \text{ g L}^{-1} \text{ Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  u periodu od 48 sati.

Učinkovitost autohtonih sojeva i njihovu prisutnost u tlu navode Adibe i sur. (2022.) koji su proveli istraživanje s ciljem izolacije i analize bakterija koje otapaju fosfor sa rizosfernog tla u Wambi, Doma, Awe, Lafia, Akwanga, Obi i Nasarawa-Eggon u saveznoj državi Nasarawa. Izolirani *Pseudomonas* spp. se pokazao najproduktivniji u otapanju anorganskog fosfora,  $2,25 \text{ cm}$  i  $0,764 \text{ mg L}^{-1}$ . Inokulacija sa *Pseudomonas* spp. dala je najbolji rast biljaka u usporedbi sa drugim sojevima. Ovo istraživanje je, također, pokazalo da je korištenje bakterija koje otapaju fosfor ekološki prihvatljiva i efikasna strategija za poboljšanje produktivnosti.

Provedena istraživanja ukazuju na vrlo značajnu ulogu mikroorganizama u kruženju hranjiva u tlu, posebice kad je riječ o biljci pristupačnom fosforu koji pripada među najznačajnije limitirajuće faktore poljoprivredne proizvodnje. Nadalje, mogućnost korištenja fosfornih zaliha u tlu pomoću mikroorganizama koji otapaju fosfor, dovelo bi do smanjenja uporabe mineralnih fosfornih gnojiva.

Također, navedeni rezultati otvaraju mnogobrojna pitanja za daljnja istraživanja. Tako se nameće pitanje postoji li mogućnost višestruke koristi primjene mikroorganizama u poljoprivrednoj proizvodnji, a za što postoje navodi brojnih autora. Tako Glick (2012.) navodi kako je sinteza niza različitih antibiotika karakteristika PGPR (bakterija koje potiču rast biljaka) koja je najčešće povezana s sposobnošću bakterija da spriječe širenje biljnih patogena (obično gljiva).

Nadalje, Gómez-Lama Cabanás C. i sur. (2018.) izdvojili su autohtone sojeve *Pseudomonas* spp. iz rizosfere masline (*Olea europaea* L.) kao učinkovite preparate za biološku kontrolu protiv *Verticillium dahliae*. Procijenjena je sposobnost kolonizacije korijena tih rizobakterija masline, pružajući vrijedne informacije za budući razvoj formulacija temeljenih na tim sojevima. Predloženo je da se autohtone rizobakterije dalje istraže kao potencijalni agenti biološke kontrole za održive i ekološki prihvatljive alternative u borbi protiv biljnih patogena.



Kako fluorescentne vrste roda *Pseudomonas* pokazuju insekticidno te mikrobicidno djelovanje na fitopatogene mikroorganizme navode brojni autori (Couillerot i sur., 2009., Haas i Defago, 2005., Péchy-Tarr, 2008., Ruffner i sur., 2012.)

Stoga, bilo bi poželjno kad bi se provela dodatna istraživanja koja bi išla u smjeru izolacije autohtonih sojeva mikroorganizama sve do čistih kultura, a nakon čega bi uslijedila determinacija izoliranih mikroorganizama, njihovo umnažanje i korištenje u poljoprivrednoj proizvodnji.

## 6. ZAKLJUČAK

Provedenom usporedbom hranjivih podloga u prvom dijelu istraživanja utvrdili smo kako je za ovakvu vrstu istraživanja pogodnije koristiti podlogu s većom koncentracijom fosfora iz razloga što veća koncentracija predstavlja ujedno i veći izazov za mikroorganizme te se njihova efikasnost znatno razlikuje na takvim podloga te su utvrđene statistički značajne razlike između pojedinih sojeva bakterija. Na podlogama s nižim koncentracijama fosfora razlike između pojedinih sojeva bakterija nisu bile statistički značajne.

Nadalje, na osnovi provedenog istraživanja te dobivenih rezultata možemo zaključiti kako su izolirani sojevi bakterija uspješno otapali fosfor iz hranjivih podloga te da je njihova učinkovitost otapanja fosfora na razini „poznatih“ čistih kultura bakterija iz roda *Pseudomonas* spp. Pojedini autohtoni sojevi imali su čak i veću učinkovitost od navedenih bakterija.

Potrebna su dodatna istraživanja kako u laboratoriju tako i u polju kako bi ustanovili sve mogućnosti i benefite korištenja mikroorganizama u poljoprivrednoj proizvodnji.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Adibe O., Eneyi Ebah E., Vandelun Ado B., Onyeberechiya Osuagwu S., Kolawole Fadayomi V. (2022.): Microbial Activity of Phosphate Solubilizing Organisms Isolated from Rhizosphere Soil on the Growth of Sorghum Plant (Bicolor sorghum). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 11 (07): 222-236.
2. Alewell, C., Ringeval, B., Ballabio, C., Robinson, D.A., Panagos, P., Borrelli, P. (2020.): Global phosphorus shortage will be aggravated by soil erosion. *Nature Communications*. 11, 4546.
3. Alori, E.T., Glick, B.R., Babalola, O.O. (2017.): Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*. 8: 971.
4. Amri M, Rjeibi MR, Gatrouni M, Mateus DMR, Asses N, Pinho HJO, Abbes C. (2023.): Isolation, Identification, and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Tunisian Soils.
5. Brady, N.C., Weil, R.R. (2004.): *Elements of the Nature and Properties of Soils* 2nd ed. Pearson Education Ltd., New Jersey
6. Braz. J. (2019.): Impact of phosphate solubilizing bacteria on wheat (*Triticum aestivum*) in the presence of pesticides
7. Busman i sur. (2002): *The nature of phosphorus in soils*. University of Minnesota, Minneapolis, SAD
8. Couillerot, O., Prigent-Combaret, C., Caballero-Mellado, J., Moëgne-Loccoz, Y. (2009.): *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agetns of soil-borne phytopathogens. *Letter in Applied Microbiology*. 48: 505-512.
9. Cross, A.F. and Schlesinger, W.H. (1995): A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biogeochemical cycle of phosphorus in natural ecosystems. *Geoderma*, 64, 197-214.
10. Deubelet, A., Gransee, A., Merbach, W. (2000.): Transformation of organic rhizodepositions by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. *Journal of Plant Nutrition Soil Science*. 163: 387–392.
11. Di Simine, C.D., Sayer, J.A., Gadd, G.M. (1998.): Solubilization of zinc phosphate by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from a forest soil. *Biology and Fertility of Soils*. 28: 87– 94.

12. Elnahal, A., El-Saadony, M., Saad, A., Desoky, E., Eltahan, A., Rady, M., AbuQamar, S., El-Tarabily, K. (2022.): The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture, VL - 162, European Journal of Plant Pathology Gamalero.
13. Fliessbach, A., Winkler, M., Lutz, M.P., Oberholzer, H.R., Mader, P. (2009.): Soil amendment with *Pseudomonas fluorescens* CHA0: lasting effects on soil biological properties in soils low in microbial biomass and activity. *Microbial Ecology*. 57: 611–623.
14. Geetha, M., Saranraj, P., Mahalakshmi, S., Reetha, D. (2012.): Screening of pectinase producing bacteria and fungi for its pectinolytic activity using fruit wastes. *International Journal of Biochemistry and Biotechnology Sciences*. 1: 30-42.
15. Glick BR. (2012): Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica (Cairo)* 2012. doi: 10.6064/2012/963401.
16. Glick, B.R. (2010.): Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances* 28: 367- 374.
17. Gómez-Lama Cabanás C, Legarda G, Ruano-Rosa D, Pizarro-Tobías P, Valverde-Corredor A, Niqui JL, Triviño JC, Roca A, Mercado-Blanco J., (2018.): Indigenous *Pseudomonas* spp. Strains from the Olive (*Olea europaea* L.) Rhizosphere as Effective Biocontrol Agents against *Verticillium dahliae*: From the Host Roots to the Bacterial Genomes. doi: 10.3389/fmicb.2018.00277. PMID: 29527195; PMCID: PMC5829093.
18. Goswami, D., Dhandhukia, P., Patel, P., Thakker, J. N. (2014.): Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiological Research*, 169: 66–75.
19. Goswami, D., Thakker, J. N., Dhandhukia, P. C. (2016): Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2: 1127500.
20. Haas, D., Defago, G. (2005.): Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 307-319.
21. Haiyang Y. , Xiaoqing W. , Guangzhi Z. , Fangyuan Z. , R. Harvey P., Wang L., Fan S., Xueying X., Li F., Zhou H., Zhao X., Zhang X., (2022.): Identification of the Phosphorus-Solubilizing Bacteria Strain JP233 and Its Effects on Soil Phosphorus Leaching Loss and Crop Growth

22. Hajnal, T., Jeličić, Z., Jarak, M. (2004.): Mikroorganizmi iz ciklusa azota i fosfora u proizvodnji kukuruza. Zbornik naučnih radova, Vol. 10 br. 1 43-53.
23. Harish, S., M. Kavino, N. Kumar, Ponnuswami M., Samiyappan R. (2009.): Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting entophytic bacteria against Banana bunchy top virus. *Biological Control - Journal* 51: 16-25.
24. Holford, I.C.R. (1997.): Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Aust J Soil Res*, 35:227–239.
25. Kastori, R. (1983): Uloga elemenata u ishrani biljaka. Matica srpska, Novi Sad.
26. Khan, M.S., Zaidi, A, Wani, P. (2007.): Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. *Agronomy for Sustainable Development*. 27: 29-43.
27. Kim, Jisun, Park, Woojun, (2014.): Oxidative stress response in *Pseudomonas putida*, vl 98.
28. Kloepper, J. W., Schroth, M. N. (1978.): Plant growthpromoting rhizobacteria on radishes. In *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Angers, 2: 879–882.
29. Kumar, V., Singh, K.P. (2001.): Enriching vermicompost by nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Bioresource Technology*. 76: 173–175.
30. Mahdi, S.S., Hassan, G.I., Hussain, A., Rasool, F. (2011.): Phosphorus availability issue: Its fixation and role of phosphate solubilizing bacteria in phosphate solubilization – Case study. *Research Journal of Agricultural Sciences*. 2: 174-179.
31. Marek-Kozaczuk, M., Deryło, M., Skorupska, A. (1996.): Tn5 insertion mutants of *Pseudomonas* sp. 267 defective in siderophore production and their effect on clover (*Trifolium pratense*) nodulated with *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Plant Soil*, 179: 269–274.
32. Marek-Kozaczuk, M., Skorupska, A. (2001.): Production of B-group vitamins by plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* strain 267 and the importance of vitamins in the colonization and nodulation of red clover. *Biology and Fertility of Soils*, 33:146–151.
33. Martínez, J., Gómez-Garrido, M., Gómez-López, M.D., Faz, Á., Martínez-Martínez, S., Acosta, J., (2019.): *Pseudomonas fluorescens* affects nutrient dynamics in plant-soil system for melon production, vl 79, *Chilean journal of agricultural research*
34. Migula, Š. (1894.): Uber Ein Neues sustav der Bakterien. *Arb. Bakteriol. Inst. Karlsruhe* 1: 235-238.

35. Mirecki N., Wehinger T., Repič T. (2011.): Priručnik za organsku proizvodnju za osoblje savjetodavne službe, Podgorica: Biotehnički fakultet Podgorica.
36. Muthaura, C., Musyimi, D.M., Ogur, J.A., Okello, S.V. (2010.): Effective microorganisms and their influence on growth and yield of pigweed (*Amaranthus dubians*). *ARNP Journal of Agricultural and Biological Science*. 5(1): 17-22.
37. Pankhurst, C.E., Lynch, J.M. (1995.): The role of soil microbiology in sustainable intensive agriculture, CSIRO, Division of Soils, Glen Osmond, South Australia, 5064, Australia School of Biological Sciences, University of Surrey, Guildford, Surrey, UK.
38. Park, K.H., Park, G.T., Kim, S.M., Lee, C.Y., Son, H.J. (2008.): Conditions for soluble phosphate production by environment-friendly biofertilizer resources *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Environmental Science*. 17: 1033–1037.
39. Patel, K., Goswami, D., Dhandhukia, P., Thakker, J. (2015.): Techniques to study microbial phytohormones. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem*. Springer International, 1–27.
40. Paulitz, T.C., Anas, O., Fernando, D.G. (1992.): Biological control of *Pythium* damping-off by seed-treatment with *Pseudomonas putida*: Relationship with ethanol production by pea and soybean seeds. *Biocontrol Science and Technology*. 2(3): 193-201.
41. Péchy-Tarr, M., Bruck, D.J., Maurhofer, M., Fischer, E., Vogne, C., Henkels, M.D., Donahue, K.M., Grunder, J., Loper, J.E., Keel, C. (2008.): Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Environmental Microbiology*. 10: 2368-2386.
42. Peix, A., Rivas R., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Rodríguez-Barrueco C., Velázquez E. (2003.): *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate *in vitro*.
43. Rodriguez, H., Fraga, R. (1999.): Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 17: 319-339.
44. Ruffner, B., Péchy-Tarr, M., Ryffel, F., Hoegger, P., Obrist, C., Rindlisbacher, A., Keel, C., Maurhofer, M. (2012.): Oral insecticidal activity of plant-associated *Pseudomonads*. *Environmental Microbiology*. 15(3): 58-69.
45. Schippers, P., Weerd, H.V.D., Klein, J.D., Jong, B.D. (2006.): Scheffer. Impacts of agricultural phosphorous use in catchments on shallow lake water quality: Abouts buffers, time delays and equilibria. *Sci. Total Environ*. 369, 280-294.
46. Troxler, J., Zala, M., Moënne-Loccoz, Y., Keel, C., Défago, G. (1997.): Predominance of non-culturable cells of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the

- surface horizon of large outdoor lysimeters. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3776–3782.
47. Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M., Cortes A. E., Bashan, Y. (2000.): Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi arid coastal lagoon. *Biol. Fert. Soils* 30: 460-468.
  48. Vivekananthan, R., M. Ravi, A. S., Ramanathan and Samiyappan R. (2004.): Lytic enzymes induced by *Pseudomonas fluorescens* and other biocontrol organisms mediate defense against the anthracnose pathogen in Mango. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 235-244
  49. Vukadinović, V. (2018.): Značaj fosfora u gnojidbi bilja.
  50. Vukadinović, V. (2020.): Prijeti li u skoroj budućnosti nestašica fosfornih gnojiva?
  51. Vukadinović, V., Lončarić, Z. (1998.): Ishrana bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
  52. Vukadinović, V., Vukadinović, V. (2011): Ishrana bilja. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Poljoprivredni fakultet u Osijeku. 442.
  53. Vukadinović, V., Vukadinović, V. (2011.): Ishrana Bilja. 3. izmijenjeno i dopunjeno izdanje. Osijek. Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
  54. Winarso, S., Sulistyanto, D., Handayanto, E. (2011.): Effects of humic compounds and phosphate-solubilizing bacteria on phosphorus availability in an acid soil. *Journal of Ecology and the Natural Environment*. 3(7): 232-240.
  55. Yahya, A., Azawi, S. K. A. (1998.): Occurrence of phosphate solubilizing bacteria in some Iranian soils. *Plant Soil* 117: 135-141.

## 8. SAŽETAK

Fosfor je esencijalan makroelement za rast biljaka, no često je nedostupan zbog svog oblika u tlu. Mikroorganizmi, posebno bakterije roda *Pseudomonas* spp., mogu otapati fosfor i činiti ga dostupnim biljkama. Provedeno istraživanje je bilo usredotočeno na usporedbu učinkovitosti autohtonih bakterija roda *Pseudomonas* spp. iz Osječko-baranjske županije u odnosu na čiste kulture bakterija. Korištene su tri čiste kulture bakterija (*P. putida* ATCC12633, *P. rhizosphaerae* DSM16299, *P. fluorescens* ATCC13525) te devet autohtonih sojeva izoliranih iz tla Osječko-baranjske i Vukovarsko-srijemske županije. Kulture su testirane na dvije vrste podloga s različitim koncentracijama fosfora: Pikovskaya's agar (PIK) s 5 g L<sup>-1</sup> i pripravak za testiranje otapanja fosfora (FOP) s 2 g L<sup>-1</sup>. Rezultati su pokazali da su bakterije roda *Pseudomonas* spp. uspješno otapale fosfor, što je potvrđeno pojavom prozirnih površina ispod bakterijskih kultura. Utvrđene su statistički značajne razlike između određenih sojeva bakterija.

Ključne riječi: *Pseudomonas* spp., otapanje fosfora, čiste kulture bakterija, hranjive podloge



## 9. SUMMARY

Phosphorus is an essential macronutrient for plant growth but is often unavailable due to its form in the soil. Microorganisms, particularly *Pseudomonas* spp. bacteria, can solubilize phosphorus, making it accessible to plants. This study focused on comparing the effectiveness of indigenous *Pseudomonas* spp. bacteria from Osijek-Baranja County with pure bacterial cultures. Three pure bacterial cultures (*P. putida* ATCC12633, *P. rhizosphaerae* DSM16299, *P. fluorescens* ATCC13525) and nine indigenous strains isolated from soils in Osijek-Baranja and Vukovar-Srijem counties were used. The cultures were tested on two types of media with different phosphorus concentrations: Pikovskaya's agar (PIK) with 5 g L<sup>-1</sup> and a preparation for phosphorus solubilization testing (FOP) with 2 g L<sup>-1</sup>. The results indicated that *Pseudomonas* spp. bacteria effectively solubilized phosphorus, as evidenced by the formation of transparent zones beneath the bacterial cultures. Significant differences between some of the bacteria strains were observed.

Keywords: *Pseudomonas* spp. phosphorus solubilization, pure cultures of bacteria, growing media

## 10. POPIS TABLICA

Redni broj:	Sadržaj:	Stranica:
Tablica 1.	Učinkovitost otapanja fosfora na Pikovskaya's Agar (PIK) podlozi pomoću bakterija <i>P. putida</i> ATCC12633, <i>P. rhizosphaerae</i> DSM16299 i <i>P. fluorescens</i> ATCC13525	15.
Tablica 2.	Učinkovitost otapanja fosfora na pripremljenoj hranjivoj (FOP) podlozi pomoću bakterija <i>P. putida</i> ATCC12633, <i>P. rhizosphaerae</i> DSM16299 i <i>P. fluorescens</i> ATCC13525	16.
Tablica 3.	Usporedba otapanja fosfora na Pikovskaya's Agar (PIK) podlozi pomoću čistih kultura <i>P. putida</i> ATCC12633, <i>P. rhizosphaerae</i> DSM16299, <i>P. fluorescens</i> ATCC13525 te autohtonih čistih kultura	17.

## 11. POPIS SLIKA

Redni broj:	Sadržaj:	Stranica:
Slika 1.	Shematski dijagram mobilizacije i imobilizacije fosfora u tlu pomoću bakterija	6.
Slika 2.	Bakterije <i>Pseudomonas</i> sp. uzgojene na TSA-YE pri 28 °C tijekom 2 dana	7.
Slika 3.	Čista kultura bakterija <i>Pseudomonas</i>	10.
Slika 4.	Pipetiranje i nacijepljivanje uzorka	11.
Slika 5.	Prozirne površine uslijed otapanja fosfora	12.
Slika 6.	Određivanje prozirne površine i označavanje promjera	12.
Slika 7.	Učinkovitost otapanja fosfora na PIK podlozi	14.
Slika 8.	Učinkovitost otapanja fosfora na FOP podlozi	15.

## 12. POPIS GRAFIKONA

Redni broj:	Sadržaj:	Stranica:
Grafikon 1.	Prosječne vrijednosti učinkovitosti otapanja fosfora skupine "poznatih" <i>Pseudomonas</i> spp. i autohtonih bakterija te njihovog najučinkovitijeg predstavnika skupine	18.

**USPOREDBA AUTOHTONIH IZOLIRANIH BAKTERIJA *PSEUDOMONAS* SPP. S ČISTIM  
KULTURAMA *PSEUDOMONAS* SPP. NA UČINKOVITOST USVAJANJA FOSFORA**

**Dorothea Pimpi-Steiner**

**Sažetak:**

Fosfor je esencijalan makroelement za rast biljaka, no često je nedostupan zbog svog oblika u tlu. Mikroorganizmi, posebno bakterije roda *Pseudomonas* spp., mogu otapati fosfor i činiti ga dostupnim biljkama. Provedeno istraživanje je bilo usredotočeno na usporedbu učinkovitosti autohtonih bakterija roda *Pseudomonas* spp. iz Osječko-baranjske županije u odnosu na čiste kulture bakterija. Korištene su tri čiste kulture bakterija (*P. putida* ATCC12633, *P. rhizosphaerae* DSM16299, *P. fluorescens* ATCC13525) te devet autohtonih sojeva izoliranih iz tla Osječko-baranjske i Vukovarsko-srijemske županije. Kulture su testirane na dvije vrste podloga s različitim koncentracijama fosfora: Pikovskaya's agar (PIK) s 5 g L<sup>-1</sup> i pripravak za testiranje otapanja fosfora (FOP) s 2 g L<sup>-1</sup>. Rezultati su pokazali da su bakterije roda *Pseudomonas* spp. uspješno otapale fosfor, što je potvrđeno pojavom prozirnih površina ispod bakterijskih kultura. Utvrđene su statistički značajne razlike između određenih sojeva bakterija.

**Rad je izrađen pri:** Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

**Mentor:** doc. dr. sc. Jurica Jović

**Broj stranica:** 32

**Broj grafikona i slika:** 11

**Broj tablica:** 3

**Broj literaturnih navoda:** 55

**Broj priloga:**

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** *Pseudomonas* spp., otapanje fosfora, čiste kulture bakterija, hranjive podloge

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. prof.dr.sc. Suzana Kristek, predsjednik
2. doc.dr.sc. Jurica Jović, mentor
3. prof.dr.sc. Brigita Popović, član

**Rad je pohranjen u:** Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Vladimira Preloga 1

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Graduate thesis**

**Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek**

**University Graduate Studies, Plant production, course Plant nutrition and Soil Science**

### **COMPARISON OF AUTOCHTHONOUS ISOLATED BACTERIA *PSEUDOMONAS* SPP. WITH PURE CULTURES OF *PSEUDOMONAS* SPP. ON PHOSPHORUS UPTAKE EFFICIENCY**

**Dorothea Pimpi-Steiner**

#### **Summary:**

Phosphorus is an essential macronutrient for plant growth but is often unavailable due to its form in the soil. Microorganisms, particularly *Pseudomonas* spp. bacteria, can solubilize phosphorus, making it accessible to plants. This study focused on comparing the effectiveness of indigenous *Pseudomonas* spp. bacteria from Osijek-Baranja County with pure bacterial cultures. Three pure bacterial cultures (*P. putida* ATCC12633, *P. rhizosphaerae* DSM16299, *P. fluorescens* ATCC13525) and nine indigenous strains isolated from soils in Osijek-Baranja and Vukovar-Srijem counties were used. The cultures were tested on two types of media with different phosphorus concentrations: Pikovskaya's agar (PIK) with 5 g L<sup>-1</sup> and a preparation for phosphorus solubilization testing (FOP) with 2 g L<sup>-1</sup>. The results indicated that *Pseudomonas* spp. bacteria effectively solubilized phosphorus, as evidenced by the formation of transparent zones beneath the bacterial cultures. Significant differences between some of the bacteria strains were observed.

**Thesis performed at:** Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

**Mentor:** PhD Jurica Jović

**Number of pages:** 32

**Number of figures:** 11

**Number of tables:** 3

**Number of references:** 55

**Number of appendices:**

**Original in:** Croatian

**Key words:** *Pseudomonas* spp. phosphorus solubilization, pure cultures of bacteria, growing media

**Thesis defended on date:**

#### **Reviewers:**

1. PhD Suzana Kristek, chair
2. PhD Jurica Jović, mentor
3. PhD Brigita Popović, member

**Thesis deposited at:** Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1