

# Utjecaj reakcije pH i temperature na razvoj populacije *Bradyrhizobium japonicum*

---

Prtenjača, Krešimir

Master's thesis / Diplomski rad

2020

*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:151:108972>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-09**



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 U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Krešimir Prtenjača

Diplomski sveučilišni studij Ekološka poljoprivreda

**UTJECAJ pH I TEMPERATURE NA RAST I RAZVOJ  
BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM**

**Diplomski rad**

Osijek, 2020.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA**  
**FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK**

Krešimir Prtenjača

Diplomski sveučilišni studij Ekološka poljoprivreda

**UTJECAJ pH I TEMPERATURE NA RAST I RAZVOJ**  
**BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM**

**Diplomski rad**

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Krešimir Prtenjača

Diplomski sveučilišni studij Ekološka poljoprivreda

**UTJECAJ pH I TEMPERATURE NA RAST I RAZVOJ  
BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM**

Diplomski rad

Povjerenstvo za obranu diplomskog rada:

Prof. dr. sc. Bojan Stipešević, predsjednik

Izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor

Izv. prof. dr. sc. Brigita Popović, član

Osijek, 2020.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	2
2.1 BIOLOŠKA FIKSACIJA DUŠIKA .....	2
2.1.1 Simbiotska fiksacija dušika .....	3
2.1.2 Infekcija .....	7
2.1.3 Nodulacija .....	11
2.1.4 Karakteristike kvržica .....	14
2.1.5 Asimbiotska fiksacija dušika .....	17
2.2. VAŽNOST PREDSJETVENE BAKTERIZACIJE SJEMENA LEGUMINOZA U EKOLOŠKOJ POLJOPRIVREDI.....	18
3. MATERIJAL I METODE.....	21
4. REZULTATI .....	23
5. RASPRAVA.....	25
6. ZAKLJUČAK.....	27
7. POPIS LITERATURE .....	28
8. SAŽETAK.....	32
9. SUMMARY .....	33
10. POPIS TABLICA .....	34
11. POPIS SLIKA.....	35
12. POPIS GRAFIKONA .....	36
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	
BASIC DOCUMENTATION CARD	

## 1. UVOD

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti utjecaj pH i temperature na rast i razvoj bakterije *Bradyrhizobium japonicum*. Osim gnojidbom, biljke mogu biti opskrbljene dušikom i putem fiksacije dušika. Taj proces se definira kao interakcija između biljke i mikroorganizama fiksatora dušika, koji u procesu simbioze obavljaju vezivanje dušika, koji u zemlju dolazi iz zraka (atmosfera). Na korijenu mahunarki razvijaju se kvržične bakterije koje koriste šećere, koje biljke proizvode procesom fotosinteze, i zauzvrat bakterije svog domaćina opskrbljuju amonijakovom formom dušika. Da bi fiksacija uspjela neophodan je poseban soj bakterije, što znači da nemaju sve bakterije sposobnost fiksacije dušika.

U ulozi fiksatora dušika mogu se naći samo pojedine specifične bakterije i cijanobakterije koje mogu biti asimbiotske i simbiotske. Njihov broj varira ovisno od soja bakterije i usjeva na kojem se razvijaju, a na to također utječu i drugi faktori: vlažnost, temperatura, pH vrijednost to jest kiselost zemljišta, fizičke i kemijske osobine, prisustvo kisika odnosno aeracija zemljišta. Stručnjaci tvrde da se djelovanjem fiksatora dušika prinos usjeva povećava za oko 20 % (Brockwell i sur., 1995). U prirodi, najveće količine dušika nalaze se u atmosferi u molekularnom obliku  $N_2$ , ali s obzirom na činjenicu da biljke dušik mogu usvajati u samo dva oblika (amonijačnom i nitratnom), one sav dušik iz atmosfere nisu u mogućnosti iskoristiti (Fouilleux, 1996).

Simbiotskim interakcijama, to jest, procesima biološke fiksacije dušika koji se odvijaju između porodice mahunarki i bakterija koje fiksiraju dušik se u kopnene ekosustave unosi najmanje 70 milijuna tona dušika godišnje (Brockwell i sur., 1995). Ove simbiozne interakcije su od isključive relevantnosti za poljoprivredu, jer pozitivno utječu na obogaćivanje poljoprivrednih tala dušikom dostupnim iz atmosfere.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1 BIOLOŠKA FIKSACIJA DUŠIKA

Biološka fiksacija dušika je veoma značajna u održivosti poljoprivrede i procjeni rizobne diferencijacije, ali i u podizanju biodiverziteta mikroflora tla. Biološka fiksacija atmosferskog dušika ima značajan utjecaj na plodnost poljoprivrednih tala. Godišnji prosjek povezivanja atmosferskog dušika svih za to sposobnih mikroorganizama iznosi oko 175 milijuna tona, a pozamašan postotak tog broja, čak 80 %, pripisuje se kopnenim mikroorganizmima tla (Horvat, 2014). Različite vrste mikroorganizama posjeduju mogućnost vezanja atmosferskog dušika. To su slobodno živuće heterotrofne bakterije, slobodno živuće fotoautotrofne bakterije i simbiotske bakterije. Od aerobnih, slobodno živućih fiksatora dušika poznati su *Azotobacter*, *Azospirillum* i *Beijerinckia* s više vrsta, a od anaerobnih *Clostridium pasteurianum* te fakultativno anaerobnih *Klebsiella* (Topol, 2012). Simbiotske bakterije uključuju rodove *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* i *Frankia* (Horvat, 2014). Elementarni dušik u tla ulazi biotskim ili abiotskim procesima fiksacije. Biotska fiksacija podrazumijeva djelovanje slobodnoživućih bakterija fiksatora dušika kao i kvržičnih bakterija (Tablica 1.) gore navedenih rodova koje žive u simbiozi s korijenom biljke, a na njemu formiraju kvržice koje fiksiraju dušik. Dakle, prema odnosima s biljkama, bakterije koje pospješuju rast biljaka se mogu podijeliti u dvije skupine: simbiotske bakterije i bakterije koje su slobodne u rizosferi (Horvat, 2014.).

Tablica 1. Razlika između simbiotske i asimbiotske fiksacije dušika (Izvor: <https://hr.betweenmates.com/difference-between-symbiotic>)

Simbiotska fiksacija dušika	Asimbiotska fiksacija dušika
Uvjetovana obostranom koristi između simbiotskih organizama	Proces vršen anaerobno ili aerobno od strane u tlu slobodnoživućih autotrofnih bakterija
Nastajanje amonijaka, aminokiselina i ureida	Nastajanje amonijaka, nitrita i nitrata
Simbiotske bakterije proizvode dušik za biljku domaćina	Asimbiotske bakterije oslobađaju dušik direktno u tlo
<i>Rhizobium meliloti</i> <i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Azotobacter spp.</i> <i>Beijerinckia</i> <i>Granulobacter</i>

Rod *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* obuhvaća razne vrste specifična za naša tla koje ovaj proces specificiraju za određene vrste leguminoza. Leguminozna biljka ovim procesima dobiva reducirani dušik u amonijačnom obliku, a mikroorganizmi fiksatori hranu potrebnu za daljnje napredovanje. Međutim, ako u nekom tlu postoji adekvatna količina reduciranog dušika koja zadovoljava potrebe obje strane ovih simbioznih zajednica, tada se očitava redukcija u rastu kvržica i njihovoj općenitoj brojnosti (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Sojevi ovih rodova su distinktivni vršenjem ovog procesa drukčijim intenzitetom (Vukadinović i Vukadinović, 2011.).

Fiksatori dušika se svrstavaju u veliku skupinu bakterija koje promoviraju rast biljaka (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria) odnosno označavaju se kao bakterije koje poboljšavaju rast biljaka koloniziranjem korijena istih. Alternativni naziv ovih bakterija jest i rizobakterije koje poboljšavaju zdravlje biljaka (PHPR, Plant Health Promoting Rhizobacteria) ili bakterije koje utječu na napredak formiranja kvržica (NPR, Nodule Promoting Rhizobacteria). U ovom kontekstu, naglasak se stavlja na korištenje bakterija koje pozitivno utječu na biljni rast i pronalasku potencijala i ekonomskih mogućnosti u razvoju održivih sustava agrarne produkcije.

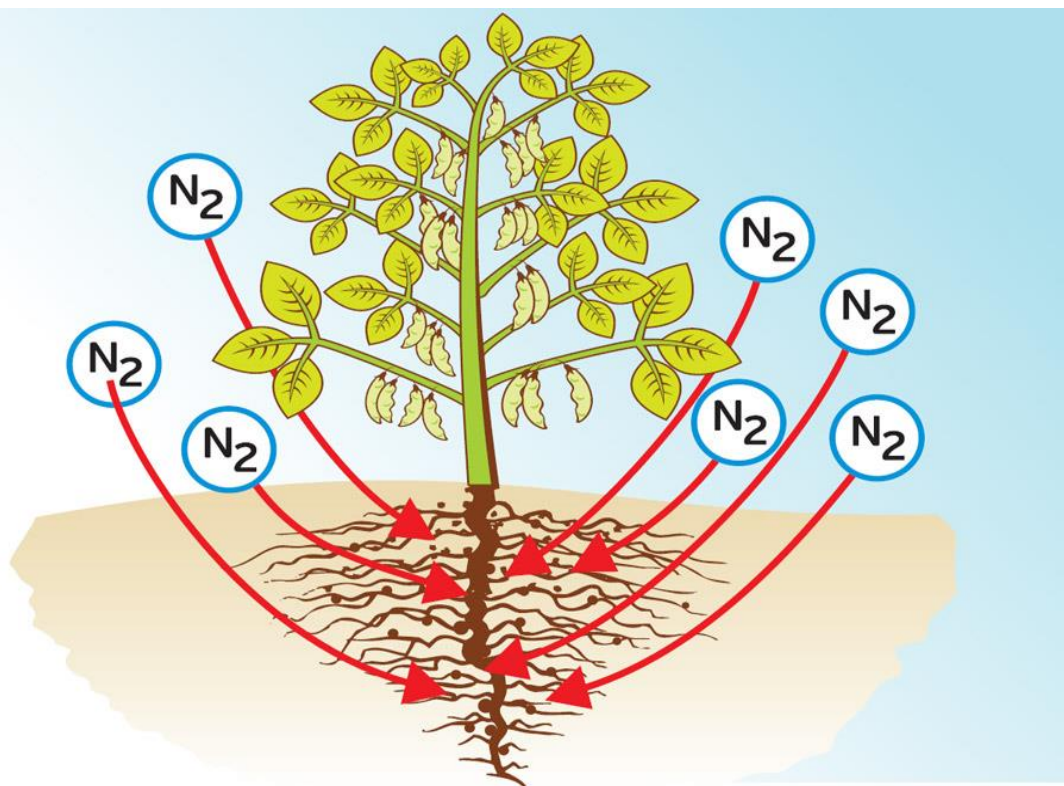
### **2.1.1 Simbiotska fiksacija dušika**

U simbiotskoj biološkoj fiksaciji atmosferskog dušika (Slika 1.), važnu ulogu imaju mikroorganizmi koji formiraju simbiotske zajednice s mahunarkama - kvržične bakterije. Beijerinck je 1888. godine prvi ustanovio da kvržice na korijenu leguminoznih biljaka inkorporiraju bakterije fiksatore elementarnog dušika. Od najveće relevantnosti za poljoprivredu jest vrsta simbiotske fiksacije koja svoj začetak pronalazi u posljedici simbiotskog odnosa između bakterija roda *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* i *Mesorhizobium* s određenim biljkama porodice *Leguminosae* (Topol i Kanižai Šarić, 2013.). Biološkom fiksacijom dušika, biljkama se omogućuje adekvatna koncentracija reduciranog dušika, a u cijelosti se podilazi zahtjevima gospodarenja tlom poput produktivnosti, sigurnosti,



zaštite prirodnih resursa i na kraju, ekonomičnosti (Jukić, 2013.). Genetski čimbenici oba simbiotska organizma igraju ulogu u formiranju simbiotske zajednice, koja se inicira međusobnim prepoznavanjem bakterije i biljke što vodi k infekciji korijena biljaka, rezultirajući nodulama na korijenovom sustavu biljke, unutar kojih se na kraju odvija simbiotska fiksacija elementarnog dušičnog hranjiva (Topol i Kanižai Šarić, 2013). U ovom procesu je od izrazite važnosti enzim nitrogenaza, koji ima ulogu katalizatora i reducira elementarni dušik u amonijačni oblik, osiguravajući za to adekvatnu energiju i broj elektrona (Postgate, 1982.). Interakcija kvržičnih bakterija s korijenom viših biljaka je primaran uvjet za početak nodulacije, jer iste nemaju mogućnost samostalnog vezanja atmosferskog dušika. U nodulama se uz aktivnost nitrogenaze obavlja usvajanje elementarnog oblika dušika i pretvorba u amonijačni oblik, kojeg viši mikroorganizmi i biljke mogu prihvatiti (Horvat, 2014.). Posljedično, postojanje i dostupnost amonijačnog oblika dušika nastalog u tlu pospješuje rast biljaka, što na kraju objašnjava razvoj brojnih i specifičnih simbiotskih interakcija biljaka i organizama koji imaju moć fiksacije dušika (Topol, 2012.). Najefikasniji fiksatori dušika upravo iz tih razloga uspostavljaju simbiotsku interakciju s višim biljkama. Različite vrste simbiotske fiksacije dušika su međusobno distinktivne ovisno o članovima simbioze, zbog toga što određena vrsta bakterije kreira simbiotski odnos s određenom vrstom biljke. Stoga, ovaj proces ima potencijal reducirati primjenu komercijalnih mineralnih dušičnih gnojiva, i pozitivan učinak s aspekta ekološke svijesti (Fox i sur., 2007.). Negativne posljedice se očitavaju iz proizvodnje i primjene navedenih gnojiva. Proizvodnja mineralnih dušičnih gnojiva ima za posljedicu trošenje neobnovljivih prirodnih resursa, a podrazumijeva procese u kojima se koriste fosilna goriva (prirodni, zemni plin ili ugljen) čijim sagorijevanjem u industrijskim postrojenjima dolazi do oslobađanja ugljikovog dioksida, koji je jedan od najpraćenijih stakleničkih plinova. Porastom koncentracije ugljikovog dioksida u atmosferi dolazi do izraženih antropogenih klimatskih promjena. Nadalje, primjenom ovih umjetnih gnojiva, uzrokuje se propadanje i eutrofikacija tala, podzemnih i nadzemnih voda, narušavanjem njihovih bioloških i kemijskih karakteristika. Fox i sur. (2007.) karakterizirali su proizvodnju i primjenu dušičnih gnojiva kao ekonomski, ekološki i energetske vrlo zahtjevnju jer u mnogim slučajevima vodi do značajnog problema degradacije prirodnih ekosustava. Simbiotska fiksacija predstavlja efikasniju i jeftiniju agronomsku praksu pri osiguravanju dostatne količine dušika za proizvodnju usjeva i pašnjaka baziranih na mahunarkama, za razliku od primjene mineralnih dušičnih gnojiva. Žetva

leguminoza osigurava sličnu koncentraciju dušika u tlu kao i primjena 30 do 80 kg dušičnih gnojiva  $\text{ha}^{-1}$  (Topol, 2012.). Sve ovo daje potporu biološkoj simbiotskoj fiksaciji (Slika 1.) kao i načinu osiguravanja dovoljnih količina hranjiva biljkama i pridržavanju dobre agronomske prakse s ekološkim kontekstom na umu, bez dugoročnih posljedica apliciranja mineralnih gnojiva.



Slika 1. Simbiotska fiksacija dušika na korijenu leguminoza

Izvor: <https://biofixin-s.com/>

Aplikacija simbiotskih fiksatora iz gore navedenih rodova u obliku bakterizacijskog sredstva kreira dostupan dušik kao biološko i ekološko prihvatljivo gnojivo u ratarskoj i povrtlarskoj proizvodnji, te ispunjava temeljne principe u sustavu integralne poljoprivrede, kontroliranja fertiliteta tla, a sve s pogleda jeftinije i ekološki prihvatljivije poljoprivredne proizvodnje. Saharan i Nehra (2011) *Bradyrhizobium* vrste klasificiraju kao sporo rastuće

sojeve, a *Rhizobium* vrste brzo rastućim sojevima. Generacijsko vrijeme *Bradyrhizobium* vrste je preko 6 sati gdje se razvijaju manje kolonije promjera oko 1 mm na površini hranjive podloge nakon 7 dana uzgoja u laboratoriju, dok je kod *Rhizobium* vrste generacijsko vrijeme od 2 do 4 sata i nastaju veće kolonije, promjera 2 - 4 mm na površini agara nakon tri do pet dana uzgoja u laboratoriju (Topol, 2012.). *B. japonicum* živi u simbiotskoj interakciji sa sojom i stvara nodule, gdje fiksira i do 180 kg N ha<sup>-1</sup>, a svojim djelovanjem stvara i giberine i indole, spojeve koji se smatraju korisnima za rast i razvoj biljke, a broj kvržica na korijenu biljke kreće se od 10 do 50 (Topol, 2012.). Efektivni sojevi stvaraju veće ovalne nodule na središnjem korijenu koje su zbog sadržaja leghemoglobina na presjeku crvene. Formacija efektivnih simbiotskih interakcija pozitivno utječe na rast biljaka, sadržaj proteina u zrnu i prinos (Jukić, 2013.). Prema tome, za *B. japonicum* (Slika 2.) i druge simbiotske fiksatore poželjno je provoditi mikrobiološka istraživanja u svrhu otkrivanja najboljih uvjeta za preživljavanje. Predsjetvena bakterizacija sjemena soje biološkim sredstvima u ovim krajevima smatra se poželjnom i obvezatnom agrotehničkom mjerom, jer se upražnjavanjem ove prakse podiže količina elementarnog dušika (do 180 kg N ha<sup>-1</sup>) kojeg fiksatori mogu prevesti biljci soje i koja žetvom dalje prelazi u tlo. Navodi raznih autora (Redžepović i sur. 1990.; Silva e Franca i sur. 2013.; Graham i sur. 1994.) opisuju kako na preživljavanje inokuluma i nodulaciju na korijenu biljke, najviše utječu opće karakteristike tla, a primarno koncentracija dostupnog dušika, pH i humidnost tla. Primjerice, Tate (1995.) zaključuje da je niska vlažnost stvorila stresnu sredinu u kojoj je detekcija između simbionata moguća, no formirani broj nodula je bio znatno manji u odnosu na optimalne uvjete tla.



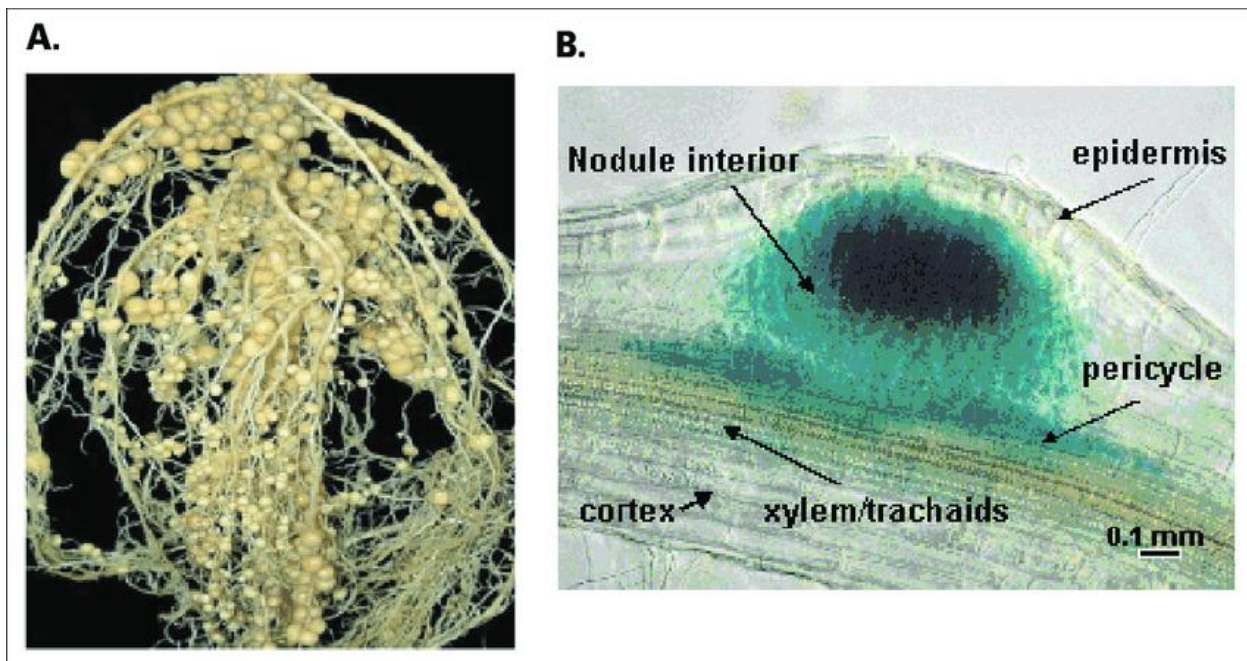
Slika 2: Bakterija *Bradyrhizobium japonicum*

Izvor: <https://microbewiki.kenyon.edu/>

### 2.1.2 Infekcija

Infekcija korijena nastupa nakon prvih interakcija, to jest, prepoznavanja simbiotskog fiksatora dušika i leguminozne biljke. Kemizam ove reakcije očituje se u kompliciranoj komunikaciji između određenih simbionata, gdje se bakterije reproduciraju i stvaraju populaciju na korijenu kolonizacijom, što čini prvu fazu infekcije. Biljke aktiviraju skupinu gena koji se nazivaju nodulacijski geni a mikroorganizmi koji su kolonizirali korijen stvaraju Nod faktore, regulatore svih faza infekcije i nodulacije, neizostavne i ključne za valjano odvijanje simbiotske fiksacije (Nap i Bisseling, 2002.; Gage, 2004.). Aktivacijom ovih gena pokreću se ekstremno važne reakcije i interakcije u biljci i na korijenu koje garantiraju pravilnu infekciju, formiranje kvržica kao novih organa korijena i na dalje reguliraju samu pretvorbu dušika. Nodulacijski geni biljke mogu biti rani i kasni. Rani nodulacijski geni kodiraju proizvode koji se pokazuju prije samog početka procesa fiksacije dušika, te su oni uključeni u procese infekcije i nodulacije, dok su proizvodi kasnih nodulacijskih gena uključeni u stvaranje interakcije s endosimbiontom i metaboličkoj specijalizaciji kvržica (Nap i Bisseling, 2002.). Nodulacijski geni kodiraju cijeli niz različitih proizvoda nazvanih nodulini koji mogu imati i strukturnu i

metaboličku funkciju. Nodule nije moguće pronaći u nikakvoj drugoj vrsti fiksacije jer su isključivi za dva organizma koji su u simbiotskom odnosu i imaju obostranu korist, kombiniranim djelovanjem Nod faktora I nodulativnih gena (Gage, 2004.). Bakterije prodiru u korijenski sustav, kolonizirajući korijenove dlačice, što za posljedicu ima uvijanje, kao prvu naznaku formiranja infekcijske niti (Mylona i sur., 1995.). Uvijanje označava početak degradacije stanične stijenke biljne stanice, te dolazi do uvijanja plazma membrane i nakupljanja i ugradnje novih materijala u membranu (Jukić, 2013.). Na kraju ovog kompliciranog procesa stvara se potpuno novi organ koji se naziva infekcijska nit, koja omogućava bakterijama ulazak u sustav biljke i početak fiksacije (Mylona i sur., 1995.). Bitno je naglasiti da stvaranje ovog bitnog organa nije uzrokovano bakterijama, već se uzima kao odgovor biljke na samo prodiranje bakterija u sustav kroz korijen. Primaran put širenja infekcijske niti je prvo kroz stanice korijenovih dlačica, a zatim se grana i prelazi na sve dijelove korijena. Stanice korijena zatim prolaze kroz određene modifikacije kao što su pregrada citoskeleta, premještanje jezgre i formacija citoplazmatskih mostova, gdje se na kraju stvara preinfekcijska nit (Van Brussel i sur., 1992.). Pomakom i širenjem infekcijske niti kroz dijelove korijena se proporcionalno razmnožavaju i mikroorganizmi koji uz sve ovo neprestano kreiraju Nod faktore. Ti Nod faktori pospješuju dijeljenje stanica u korijenskom sustavu, što označava i početak formiranja prvih nodula (Slika 3.). Bakterije u infekcijskoj niti izlaze u citoplazmu biljne stanice i obavijaju se peribakteroidnom membranom koju formira biljna stanica (Mylona i sur., 1995.). Bakterije se daljnjim dijeljenjem i povećanjem broja pretvaraju u bakterioide, i tek u ovom obliku dobivaju sposobnost fiksacije dušika. Ti su bakteroidi obično pleiomorfni, izgubili su velik dio svog staničnog zida i manje su elektronski gusti od slobodno živućih bakterija. Amonijak koji nastaje od strane bakteroida prelazi u okolnu biljnu citoplazmu gdje se asimilira u aminokiseline. Zajedništvo bakteroida i peribakteroidne membrane se naziva simbiosom (Mylona i sur., 1995.).



Slika 3. Stvaranje nodula kao novog organa korijena

Izvor: <https://www.researchgate.net/>

Podjela biljnih stanica pokreće se naizgled različitim podražajima koji mogu djelovati kroz zajednički put transdukcije signala kako bi generirali različite organe. Budući da se nodule i bočni korijenski meristemi razlikuju u svojoj ontogeniji, specifični receptori za nod signale mogu biti uključeni u iniciranje meristemske aktivnosti kvržica. Izolacija bakterijskih ili biljnih mutanata blokiranih u putu rane signalne transdukcije za pokretanje meristema kvržica pomoći će u razjašnjenju mehanizma koji kontrolira bočne meristeme korijena i kvržica (Verma, 1992). Mnogo trenutno dostupnih bakterijskih mutanata koji utječu na proces infekcije treba analizirati zbog njihove sposobnosti induciranja gena staničnog ciklusa u biljci domaćinu. Kvržica osigurava okruženje s malom koncentracijom kisika i dostupnost hranjivih sastojaka pogodnih za fiksiranje dušika (Wan i sur., 2005.). Formacija infektivnih niti u korijenovom sustavu soje uključuje razgradnju materijala mucigela i lokalizirano narušavanje vanjskog sloja presavijene stijenke dlake jednom ili više zarobljenih bakterija. Na mjestu prodiranja, rizobije se odvojene od citoplazme domaćina plazmalemom domaćina i slojem zidnog materijala koji je izgledom

identičan normalnom unutarnjem sloju stijenke stanične dlake. Reprodukcijska bakterija rezultira nepravilnom vrećicom koja je zidnim materijalom vezana u blizini mjesta prodiranja (Turgeon i Bauer, 1985.). Cjevaste niti infekcije, ograničene zidnim materijalom, koji je istog izgleda kao i onaj koji okružuje vrećicu, izlaze iz vrećice dokako bi prenijele bakterije u stanicu dlake. Rastuća područja infekcijske vrećice ili niti okružena su citoplazmom domaćina s visokim koncentracijama organela povezanim sa sintezom i taloženjem membrane i materijala staničnog zida. Niti slijede vrlo nepravilan put prema dnu stanice dlačice. Niti se obično protežu duž dna stanice dlake na određenoj udaljenosti, a mogu se granati i prodrijeti u susjedne kortikalne stanice u nekoliko točaka na način analogan početnom prodiranju u korijenovu dlaku (Turgeon i Bauer, 1985.). Endocitoza bakterija unutar stanice domaćina bez izazivanja obrambenih reakcija domaćina najvažniji je, ali najmanje razumljiv aspekt asocijacije mahunarki i rizobija. Stvaranje substaničnog odjeljka u kojem se nalaze bakterije unutar zaražene stanice završna je faza uspješne infekcije (Verma, 1992.). Neuspjeh u formiranju ovog membranskog odjeljka ili njegovo raspadanje čini povezanost patogenom. Poznati su mnogi rizobijalni mutanti (uključujući egzo i lipo polisaharidne mutante) kod kojih se ne dolazi do ulaska bakterija, već morfogeneza kvržica prelazi u različite faze. Međutim, specifične interakcije ovih mutanata s domaćinom nisu poznate (Verma, 1992.). Peribakteroidna membrana ima svojstva i tonoplasta i plazmatske membrane, a njezina biogeneza nije dovoljno izražena. Proliferacija peribakteroidne membrane započinje istodobno s oslobađanjem bakterija iz infektivne niti. Taj proces zahtijeva preusmjeravanje nekih bjelančevina plazmatske membrane i svih PBM nodulina na ovu novonastalu podstaničnu organelu. U kvržicama induciranim sojem *B. japonicum* koji je oštećen u fazi endocitoze, utvrđeno je da se veliki broj membranskih vezikula stapa na vrhu infekcijske niti (Fortin i sur., 1985.). Verma (1992.) navodi da je precizna razmjena molekularnih signala između rizobije i biljke domaćina kroz prostor i vrijeme ključna za razvoj učinkovite korijenske kvržice. Važna je i rana razmjena signala koja uključuje izlučivanje biljnih fenolnih spojeva, flavona i izoflavona. Ovi signalni spojevi često se izlučuju dijelom korijena s nadolazećim korijenovim dlačicama, u regiji koja je vrlo osjetljiva na zarazu rizobijama. Ti spojevi aktiviraju ekspresiju nod gena u rizobiji, stimulirajući proizvodnju bakterijskih nod faktora (Verma, 1992.).

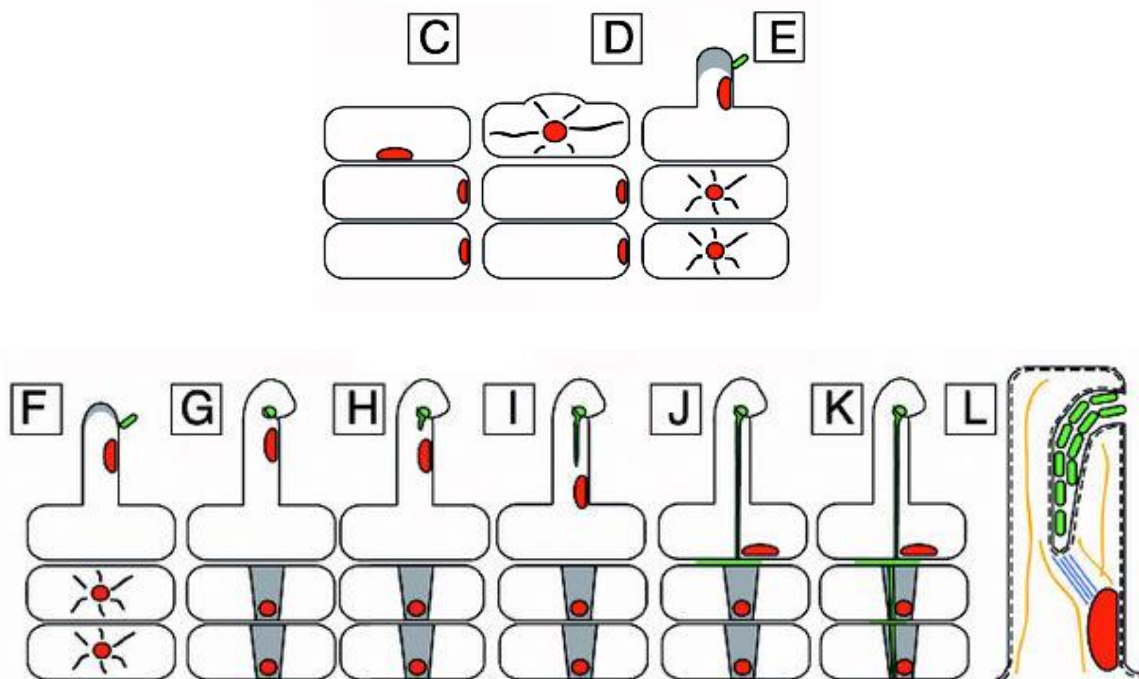
### 2.1.3 Nodulacija

Faze (Tablica 2.) u kojima se korijenove kvržice (Slika 4.) stvaraju su imenovane i opisane kako bi se bolje razumio kompleksan proces interakcije *Bradyrhizobium* vrsta sa leguminoznim kulturama.

**Tablica 2.** Faze procesa nodulacije (Gage, 2004.)

<b>roc</b>	dijeljenje <i>Rhizobium</i> bakterija u blizini ili na površini korijena
<b>roa</b>	adhezija <i>Rhizobium</i> bakterija na površinu korijenovih dlačica
<b>hab i hac</b>	grananje korijenovih dlačica i zavijanje korijena
<b>inf</b>	stvaranje infekcijske niti
<b>noi</b>	Inicijacija kvržica: stvaranje kvržičnog meristema, razvoj i diferencijacija kvržica
<b>bar</b>	otpuštanje bakterija iz infekcijske niti
<b>bad</b>	diferencijacija bakterija
<b>nif</b>	nastupanje fiksacije dušika
<b>cof</b>	biokemijske i fiziološke funkcije vezane za fiksaciju dušika
<b>nop</b>	održavanje funkcije kvržica





Slika 4. Dijagram nodulacije

(Izvor: *Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing Rhizobia during nodulation of temperate legumes*, Gage, 2004)

C) epidermalna stanica s jezgrom nasuprot mjesta na kojem će se stvoriti nova korijenova dlačica i dvije kortikalne stanice ispod, D) epidermalna stanica pri početku rasta korijenove dlačice, E) vezanje *Rhizobium* bakterije na korijenovu dlačicu i aktivacija dviju kortikalnih stanica kao odgovor na Nod faktor (nodulativni gen), F) daljnji rast korijenove dlačice, G) zavijanje korijenove dlačice zbog Nod faktora (kortikalne stanice se polariziraju i stvaraju citoplazmatske mostove što se predstavlja sivom bojom), H) početak rasta infekcijske niti (pomak jezgre kroz infekcijsku nit do njezine prednje stranje), I) spajanje infekcijske niti s površinom epidermalne stanice (*Rhizobium* bakterija urasta u međustanični prostor epidermalne i kortikalne stanice), J) daljnji rast infekcijske niti i kortikalne stanice, L) povećani prikaz korijenove dlačice u koraku I).

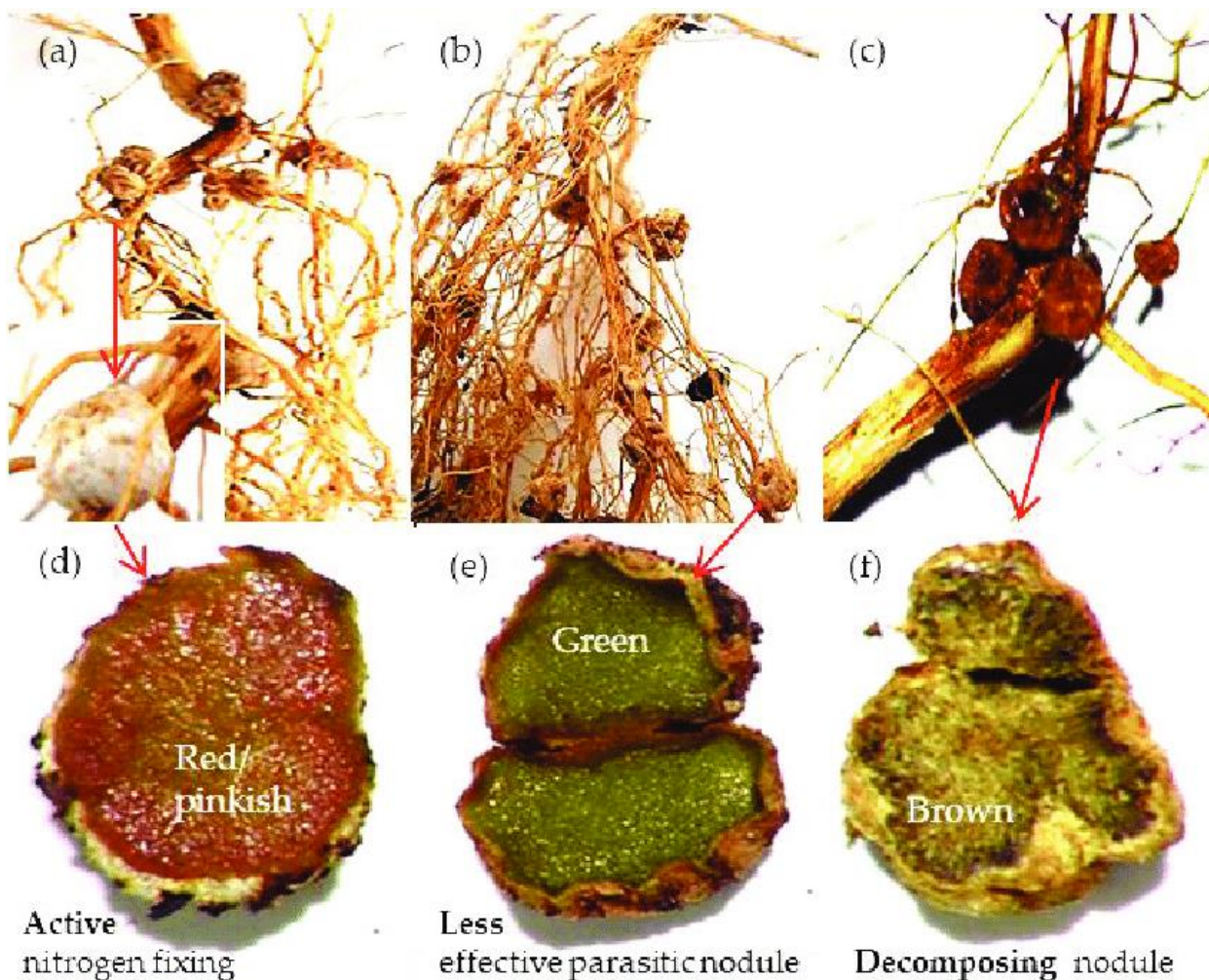
Bakterije iz ovih rodova sadrže posebne skupine gena nazvani nodulacijski geni, odnosno Nod geni koji su odgovorni za stvaranje bakterijskih signalnih molekula Nod faktora, koji imaju ključnu ulogu u međusobnom prepoznavanju točno određene vrste bakterija i

leguminoza. Ti geni se izražavaju samo kod bakterija koje će stvoriti simbiotski odnos s leguminozom, dok kod slobodno živućih bakterija neće doći do njihove ekspresije. Iznimka tome je jedino NodD koji se ekspresionira konstitutivno odnosno prirodno. NodD ima sposobnost vezanja na specifične flavonoide koje izlučuje korijen biljke domaćina. Nakon vezanja na flavonoide postaje transkripcijski aktivator drugih Nod gena, koji kodiraju enzime koji su uključeni u sintezi Nod faktora. Nod faktor djeluje kao začetnik formiranja kvržica jer pokreće cijeli niz procesa za razvitak nodula i ulazak *Rhizobium* bakterija u korijen biljke (Gage, 2004.). Upravo to predstavlja vrlo važnu odrednicu specifičnosti domaćina (Topol, 2012.). Prilikom procesa prepoznavanja bakterija i leguminoza, upravo Nod faktori određuju specifičnost simbioze. Većina bakterija stvara samo nekoliko različitih Nod faktora, koji im omogućuju sposobnost stvaranja simbiotskih odnosa s ograničenim brojem vrsta leguminoza. No, neke bakterije roda *Rhizobium* kao npr. *Rhizobium* NGR234 imaju nešto slobodniju prirodu. Ova vrsta *Rhizobium* može nodulirati različite tropske leguminoze jer izlučuje čak 18 različitih Nod faktora. Ova produkcija različitih Nod faktora smatra se osnovom za njegov širok raspon domaćina (Topol, 2012.). Budući da su rizobije inkapsulirane unutar peribakteroidne membrane, prostor između bakterija i peribakteroidne membrane, koji je poznat kao peribakteroidni prostor, mora biti uravnotežen s određenim metabolitima, uključujući dikarboksilne kiseline (koje bakteroidi koriste kao izvor ugljika) i tako eliminirati gradijent koncentracije između domaćina i rizobije. U određenom smislu, ovo internalizira organizam i dovodi ga u najbližu moguću vezu s domaćinom. Izjednačavanje prostora peribakteroida očito se postiže otvaranjem određenih kanala u membrani, gdje se ističe Nodulin - 26. Ovaj nodulin ima homologiju sa skupinom proteina sačuvanih od bakterija do sisavaca (Verma, 1992.). Raznolikost signala koji mogu pokrenuti organogenezu kvržica i njihov način djelovanja bi također mogli omogućiti pojašnjenje programa transdukcije signala na osnovu bočne organogeneze korijena jer ova dva organa imaju mnogo sličnosti (Gage, 2004.). Budući da se meristemi nodula i bočnih korijena razlikuju u svojim ontogenijama, specifični receptori za nod signale mogu biti uključeni u pokretanje meristemske aktivnosti kvržica. Izolacija bakterijskih ili biljnih mutanata blokiranih u putu rane signalne transdukcije za pokretanje meristema kvržica mogla bi dalje razjasniti mehanizam koji kontrolira bočne meristeme korijena i kvržica (Verma, 1992.).

#### 2.1.4 Karakteristike kvržica

Na kraju procesa nodulacije formiraju se kvržice na korijenu leguminozne biljke, koje tada imaju sposobnost vezivanja atmosferskog dušika, a formacija istih se može vidjeti 2 - 3 tjedna nakon sjetve, ovisno o fizikalno – kemijskim uvjetima tla (Lindemann i Glover, 2003.). Sivobijela boja na početku indicira da se u tim novonastalim organima još ne odvija proces fiksacije dušika. Kroz određeno vrijeme, kvržice počinju rasti, a promjena boje u ružičastocrvenu indicira postojanje leghemoglobina i početak fiksacije (Gage, 2004.). Generalna podjela leguminoznih biljaka jest na jednogodišnje i višegodišnje, stoga je izražena distinkcija između nodula jednogodišnjih i višegodišnjih biljaka. Karakteristike kvržica višegodišnjih leguminoza se sastoje u tome da su one manjeg i asimetričnog oblika, a iste će fiksirati dušik tokom cijelog procesa rasta biljke, dok postoje zadovoljeni uvjeti za to, i živjeti duže od kvržica jednogodišnjih leguminoza. Tom analogijom je utvrđeno da su nodule jednogodišnjih leguminoza veće i obimom i pravilnijeg oblika, a formiraju se na cijelom korijenu biljke, izmjenjivajući se tokom cijele sezone rasta leguminoze (Lindemann i Glover, 2003.). Prestankom fiksacije, neaktivne nodule mijenjaju boju u smeđe – zelenkastu, a mogu biti i odbačene od strane biljke jer tada ih ona smatra parazitima. Sredina sezone rasta kolonizirane biljke bi se trebala očitavati u nodulama kao najaktivnija faza, nodule su ružičasto crvene boje, a fiksacija je u tom periodu najintenzivnija (Slika 5.). Lindemann i Glover, (2003.) utvrdili su da dominacijom bijelih, sivih ili zelenih nodula znatno smanjuje fiksiran količina dušika, što je posljedica korištenja neefikasnog soja, nedovoljne prihrane biljke i slabog razvoja ploda (mahune) ili raznih drugih stresnih faktora tla. Kod zrelih kvržica od osnovne važnosti je njihova građa jer je upravo ona odgovorna za osiguravanje točno određenih uvjeta koji omogućuju nesmetano odvijanje procesa fiksacije elementarnog, molekularnog dušika. Mylona i sur. (1995) konstatirali su da se kod leguminoza, u svakoj zreloj noduli nalazi se peribakteroidna membrana stvorena od strane biljke koja okružuje unutarstaničnog mikrosimbionta, odnosno bakterioide koji u stanicama nodula fiksiraju atmosferski dušik. Ova membrana nastaje od plazma membrane domaćina odnosno biljke leguminoze (Verma, 1992.). Peribakteroidna membrana kvržica mahuna inkorporira fosfolipide i proteine u drukčijim formacijama nego kod plazma membrane, a uz to je moguća prisutnost raznih nodulina biljaka i bakterijskih proteina (Fouilleux, 1996.), pa se sukladno tome pretpostavlja da im takva

formacija dozvoljava specijalizirane funkcije i svojstva (Mylona i sur. 1995.). Specifična interakcija bakterija koje inficiraju sa stanicom domaćina opažena je u kvržicama stvorenim od mutanta Tn5 *B. japonicum* (Fortin i sur., 1985.). Kad bakterije ovog soja zaraze biljke domaćina, infekcija i diferencijacija kvržica odvijaju se normalno. Međutim, bakterije se ne oslobađaju iz infektivne niti, a proliferacija bakterija zaustavlja se u fazi endocitoze. Dobivene kvržice izgledaju identično normalnima, ali u velikoj mjeri ne sadrže bakterije (Verma, 1992.). Strukture nalik na kvržice inducirane nod faktorima ili bakterijskim mutantima koji ne uspiju ući u stanicu domaćina visoko su diferencirane, sastojeći se od povećanih stanica (koje bi obično sadržavale bakterije) i malih intersticijskih stanica koje sadrže više škroba. Diferencijacija kvržica bez ulaska bakterija sugerira da je razvoj kvržica u velikoj mjeri pod kontrolom programa organogeneze koji je pokrenut nod faktorima. Prodiranje bakterija i njihovo oslobađanje iz infektivne niti dovršava postupak diferencijacije i započinje proces fiksacije dušika (Fortin i sur., 1985.).



Slika 5. Boja kvržica kao indikator efikasnosti nodulacije

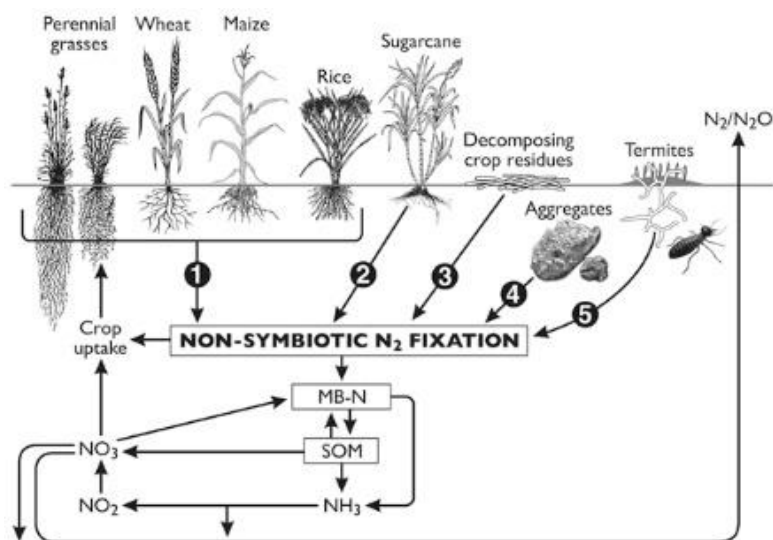
Izvor: <https://www.researchgate.net/>

Odgovornost stvaranja uvjeta u kvržicama, koji su optimalni za odvijanje procesa fiksacije dušika se pripisuje peribakteroidnim membranama koje ujedno zaustavljaju obrambeni impuls biljke na postojanje bakterija u unutrašnjosti stanica i stvaraju zid, to jest, poveznicu koja propušta signale i metabolite između članova simbioze (Gage, 2004). Prema Myloni i sur. (1995) peribakteroidne membrane sudjeluju u stvaranju anaerobnih uvjeta odnosno uvjeta bez

prisutnosti kisika u unutrašnjosti nodula koji su neophodni za proces fiksacije dušika. Za posljedicu ovoga prije spomenuti enzim nitrogenaza u takvim uvjetima može obavljati svoju funkciju, jer se u sredini s kisikom nepovratno inaktivira. Ovakva vrsta simbiozne koegzistencije je moguća isključivo zato što peribakteroidne membrane sudjeluju u zaustavljanju nastanka obrambenih impulsa domaćina na postojanje bakterija u stanicama kvržica korijenovog sustava i kontroliraju izmjenu metabolita bitnih za održavanje svih sustava u funkciji (Mylona i sur., 1995.). Kraljnja obostrana korist između ova dva simbiotska organizma se očitava u tome što biljka proizvodnjom primarnih šećera iz skupine ugljikohidrata (točnije, glukoze) i dikarboksilnih kiselina opskrbljava bakterioide potrebnom energijom za pretvaranje nitrarnog oblika dušika u amonijačni, koji je biljci potreban za daljnji rast, a biva transportiran iz nodula u biljni sustav (Gage, 2004.).

## **2.15 Asimbiotska fiksacija dušika**

Za razliku od simbiotske, asimbiotska fiksacija (Slika 6.) uključuje razne mikroorganizme koji ne stvaraju odnos s biljkom domaćinom, već za svoje procese nutrijente i energiju pronalaze u organskoj tvari tla, koristeći najviše monosaharidne spojeve iz skupine ugljikohidrata. Topol, (2012.) navodi kako su asimbiotski fiksatori dušika vrlo široko rasprostranjeni a njihova zastupljenost u tlu ovisi o karakteristikama, odnosno fizikalnim i kemijskim svojstvima tla. Na razvoj i aktivnost populacije utječu sljedeći ekološki faktori: pH reakcija životne sredine (optimalna je neutralna pH reakcija), temperatura (optimalna temperatura je između 15 °C i 25° C), količina kisika (različite vrste mikroorganizama imaju različite zahtjeve prema kisiku), sadržaj vode (također može biti limitirajući čimbenik jer su određene vrste osjetljive na sadržaj vode u tlu), sadržaj organske tvari (obzirom da asimbiotski fiksatori dušika kao izvor energije za fiksaciju dušika iz atmosfere koriste organsku tvar tla, sadržaj ugljikohidrata, osobito monosaharida u tlu značajno će utjecati na njihovu brojnost i aktivnost), te sadržaj mikroelemenata (za njihov metabolizam osobito je važna prisutnost različitih mikroelemenata). Asimbiotsku fiksaciju dušika s obzirom na zahtjeve mikroorganizama prema kisiku dijelimo na aerobnu, fakultativno anaerobnu i anaerobnu fiksaciju dušika (Topol, 2012.).



Slika 6. Proces asimbiotske fiksacije dušika

Izvor: <https://benthamopen.com/>

## 2.2. VAŽNOST PREDJETVENE BAKTERIZACIJE SJEMENA LEGUMINOZA U EKOLOŠKOJ POLJOPRIVREDI

U današnje vrijeme moderne poljoprivrede, poželjno je unaprijed isplanirati kvalitetan plodored i u istog inkorporirati leguminozne usjeve. Jedinstveno obilježje leguminoznih usjeva je u tome što stvaraju simbiotske odnose s fiksatorima dušika što je već prethodno opisano. Identificirani su mnogi superiorni sojevi kvržičnih bakterija koji fiksiraju dušik i upotreba ovih sojeva može imati velik utjecaj na poljsku proizvodnju mahunarki. Međutim, implementacija ovih sojeva u sustave poljske proizvodnje je težak zadatak. Jedna od glavnih zapreka iskorištavanju superiornih sojeva simbiotskih fiksatora dušika je brza smrt bakterija kada se nanose na sjeme ili na tlo (Streeter, 2007.).

Prirodno je da je stres uzrokovan isušivanjem predviđeni uzrok smrti bakterija na sjemenu, a zabilježena su i mnoga laboratorijska ispitivanja stresa i podnošljivosti isušivanja u rizobijama u posljednjih 40 godina (Streeter, 2007.). Međutim, vrlo je malo ovih istraživanja uključivalo analizu preživljavanja na sjemenu, a umjesto toga se istraživalo primjerice, preživljavanje na filtrima raznih vrsta, na pijesku ili na staklenim kuglicama. U mnogim od ovih studija također je ispitan dodatak različitih materijala tijekom primjene tekućih kultura (glina,

treset, šećeri), ali su postignuta samo relativno mala ili nedosljedna poboljšanja, a dopune su ili imale ograničenu vrijednost ili bile nepraktične. U studiji Roughley i sur., (1993.) se istražilo da propadanje *Bradyrhizobium* vrsta primijenjenih na sjeme lupine u inokulantu treseta iznosi 95% za nekoliko sati i 99% za 22 sata. Bakterijski inokulant je formulacija koja sadrži jedan ili više korisnih sojeva ili vrsta bakterija u lakom za upotrebu i ekonomičnom mediju. Inokulant je sredstvo za transport živih bakterija i njihovo unošenje na žive biljke, kako bi mogle proizvesti željene učinke na rast biljaka. Rizobijalne inokulante drži se na nosačima kako bi se omogućila dugoročnost i korištenje po potrebi (Albareda i sur., 2008.). Materijal koji se koristi kao nosač trebao bi omogućiti opstanak rizobija i očuvati njihovu sposobnost kreiranja nodula i fiksiranja N<sub>2</sub>. Visokokvalitetne nosače moraju karakterizirati svojstva poput visokog zadržavanja vlage i stabilnog pH, a trebali bi biti ekonomični, konstitutivni, neotrovni za soj ili okoliš i jednostavni za sterilizaciju. Treset je najčešće korišten medij za industriji inokulanata, jer ima ekonomična svojstva kao što su veliki kapacitet zadržavanja vode, velika površina podržavanja rasta mikroba i preživljavanje rizobija vrsta u većim brojevima.

Ruiz – Valdiviezo i sur. (2015.) testirali su bagase od šećerne trske i perlit kao nosače za soj *B.japonicum* CB1809, i ustanovili da se čuvanje inokulanta na šest mjeseci pri 4 °C, vijabilnost bakterijskog inokulanta se pokazuje stabilnom, a uz to je održavana i gustoća od 10<sup>9</sup> stanica po g<sup>-1</sup>. Smjese karboksimetil celuloze i škroba održavale su stabilnu staničnu koncentraciju soja *B. japonicum* BR3267 kada su se 180 dana čuvale na 20- 26 °C (Fernandes - Júnior i sur., t, 2009.). Stabilna populacija bakterije *Sinorhizobium fredii* SMH12 također je dobivena kada su se stanice držale u ekstraktu kvasca manitol dopunjenim 1% manitolom na 25 °C tijekom 100 dana (Albareda i sur., 2008.). Primjena većih količina inokulanta neekonomična je i tehnički zahtjevna, iako se smatra da se veći broj održivih rizobija po sjemenu može postići poboljšanjem preživljavanja tijekom inokulacije sjemena. Unatoč prepoznavanju čimbenika koji utječu na preživljavanje rizobija na sjemenu i značajnoj potražnji za komercijalno unaprijed cijepljenim sjemenom mahunarki, loše preživljavanje i dalje predstavlja glavnu zabrinutost (Deaker i sur, 2004.).

Inokulacija sjemena mahunarki učinkovit je i prikladan način unošenja efikasnih rizobija u tlo, a potom i u rizosferu leguminoza. Međutim, puni potencijal ovog procesa još nije ostvaren. Minimalni standardi za broj rizobija po sjemenu postavljeni su nakon razmatranja



nekoliko čimbenika, uključujući veličinu sjemena i gubitak održivosti tijekom cijepjenja. Unatoč preporukama proizvođača za skladištenje i primjenu inokulanata, postoji izražen nedostatak kontrole nad postupkom cijepjenja, stoga se puni potencijal visokokvalitetnih proizvoda ne mora uvijek postići (Deaker i sur., 2004.).

S obzirom na osjetljivost *B. japonicum* na abiotske uvjete okoliša cilj ovog rada bio je utvrditi preživljavanje stanica *B. japonicum* pri različitim reakcijama sredine i različitim temperaturama *in vitro*.

### 3. MATERIJAL I METODE

U istraživanju je korišten soj *B. japonicum* DSM 1982. Čista kultura ispitivanog soja je umnožena na krutoj kvasac - manitol podlozi (Vincent, 1970.) i inkubirana 7 dana na 28 °C. Porasle kolonije predstavljale su inokulum za uzgoj u tekućoj aeriranoj kvasac – manitol podlozi (Slika 7.) . Inokulum je iznosio 10 ml koji je sadržavao  $3 \times 10^9$  stanica po ml i određen je po McFarland standardu. Navedena tekuća podloga prilagođena je na četiri pH ranga: 4, 5, 6 i najoptimalniji 7. Nakon 5 dana inkubacije provedena je mikrobiološka analiza utvrđivanja broj bakterija pri čemu se prvo uzorak razrijedio metodom razrjeđenja (Slika 8. i 9.) a potom je korištena metoda prelijevanja u dva ponavljanja. Nakon inkubacije određen je broj prema cfu (colony forming units) metodi. Uzorci su pohranjeni na dvije temperature: 4 °C i 25 °C. Nakon mjesec dana izvršena je mikrobiološka analiza kako bi se utvrdio broj vijabilnih stanica *B. japonicum* prema navedenoj metodologiji dok je prosječna brojnost stanica izražena kao log 10 cfu po mililitru podloge. Svi su postupci rađeni poštujući pravila sterilnosti.



Slika 7. Uzgoj bakterija u tekućoj aeriranoj kvasac – manitol podlozi s podešenim pH

(Izvor: Autor)



Slika 8. Određivanje broja bakterija korištenjem metode razrjeđenja u sterilnim uvjetima

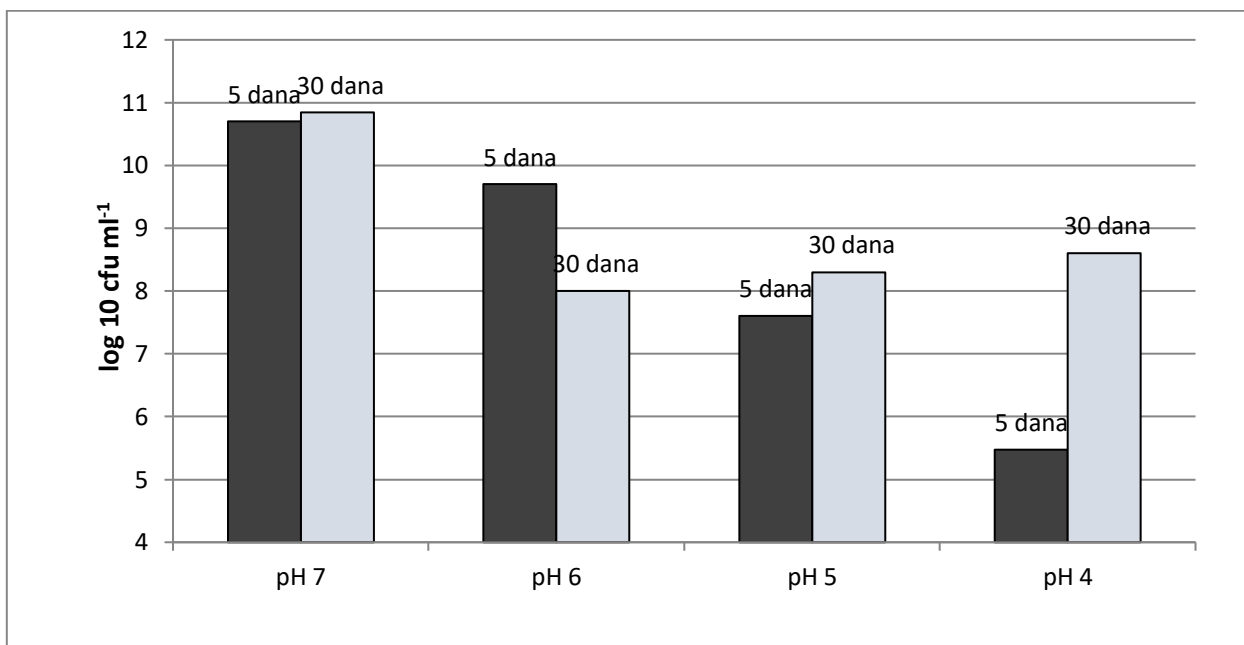
(Izvor: Autor)



Slika 9. Priprema razrjeđenja za mikrobiološku analizu prebrojavanja

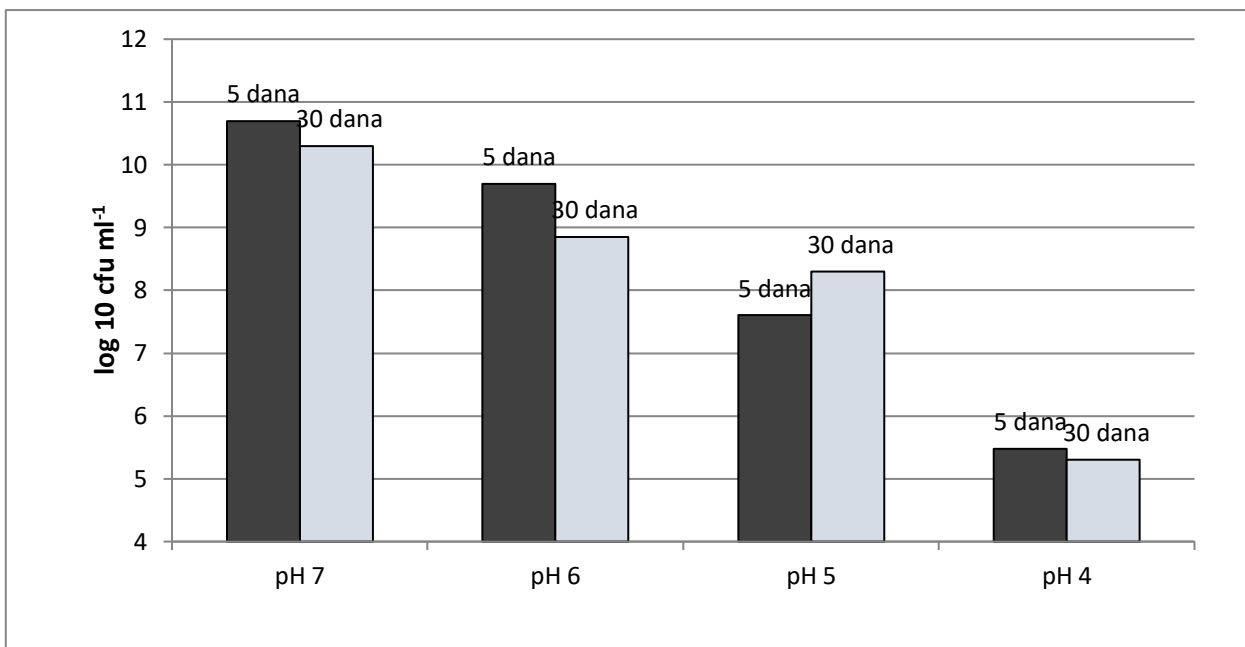
(Izvor: Autor)

#### 4. REZULTATI



Grafikon 1. Broj bakterija na 5°C ovisno o vremenu skladištenja i pH medija

U Grafikonu 1. prikazani su rezultati mikrobiološke analize vijabilnosti stanica *B. japonicum* uzgojenih u tekućoj podlozi s različitim pH vrijednostima pohranjenim na temperaturu od 5 °C. Mikrobiološka analiza broja stanica *B. japonicum* je provedena nakon 5 i 30 dana uzgoja. Najoptimalniji pH je neutralan što je potvrđeno i ovim eksperimentalnim pokusom i nakon 30 dana broj vijabilnih stanica se povećao. Najmanji broj stanica *B. japonicum*, očekivano, utvrđen je i na najkiselijim pH vrijednostima podloge.



Grafikon 2. Broj bakterija na 25°C ovisno o vremenu skladištenja i pH medija

U Grafikonu 2. prikazani su rezultati mikrobiološke analize vijabilnosti stanica *B. japonicum* uzgojenih u tekućoj podlozi s različitim pH vrijednostima pohranjenim na temperaturu od 25°C. Mikrobiološka analiza broja stanica *B. japonicum* je provedena nakon 5 i 30 dana uzgoja. Broj vijabilnih stanica *B. japonicum* nakon 30 dana uzgoja pri 25°C pri neutralnoj pH vrijednosti neznatno je pao dok je najmanji broj stanica utvrđen na pH 4.

## 5. RASPRAVA

Iz navedenih rezultata može se vidjeti kako se smanjenjem pH proporcionalno, u pravilu, smanjuje i broj nastalih kolonija bakterija *B. japonicum*, kako je prikazano Grafikonom 1. Pri temperaturi 5 °C i vremenu skladištenja 5 dana, rezultati prve mikrobiološke analize imaju trend pada sukladno prilagodbi pH. Ovakav trend je i očekivan s obzirom na činjenicu kako je optimalan pH za *B. japonicum* neutralan. Rezultati nakon 30 dana pri pH 7 su se povećali s  $6 \times 10^{10}$  na  $8 \times 10^{10}$  stanica po ml podloge što je i očekivano. Smanjenjem pH medija na pH 6 nakon mjesec dana skladištenja broj vijabilnih stanica se smanjio za čak 17 %. Pri pH 5 se uočava prilagodba stanica *B. japonicum* na kisele uvjete sredine, iako dolazi do pada vijabilnosti (nakon 5 dana  $10^7$ ) u drugoj analizi taj broj se popeo na  $10^8$ . Najneočekivaniji rezultat dobiven je nakon 30 dana skladištenja koji iznosi  $10^8$  stanica po ml podloge) pri pH 4 što indicira da bakterije *Bradyrhizobium japonicum* imaju određenu toleranciju na kisele medije, a prema tome, s aspekta poljoprivredne proizvodnje i na kiselija tla. Taj neobičan uzorak bi valjalo istražiti detaljnije kroz duži vremenski period, kako bi se ustvrdila tolerancija na kisele medij. Činjenica ostaje, da su rizobije u velikoj mjeri netolerantne na niski pH tla, a Indrasumunar i sur. (2012.) navode kako samo rizobije tolerantne na kiselost rastu moderativno na pH od 3,8 do 4,5, i to isključivo na Keyser – Munnsom mediju.

S druge strane, promjenom temperature skladištenja na 25 °C, iz Grafikona 2. se naslućuje pravilniji pad u porastu broja kolonija bakterija *B. japonicum* u ovisnosti sa smanjenjem pH i vremenskim periodom skladištenja, pri oba ponavljanja istraživanja. Broj vijabilnih stanica *B. japonicum* nakon 30 dana uzgoja pri 25 °C pri neutralnoj pH vrijednosti neznatno je pao s  $8 \times 10^{10}$  na  $2 \times 10^{10}$  stanica po ml. Inicijalan broj stanica pri pH 6 je bio  $10^9$  a nakon 30 dana je pao za 9 %. Najkiselije vrijednosti podloge 4 i 5 pokazuju i najmanji broj vijabilnih stanica i inicijalno iznose  $10^5$  i  $10^7$  nakon 30 dana. Uočljivo je povećanje broja stanica *B. japonicum* pri pH 5 koji se povećao za 9% nakon 30 dana inkubacije što navodi na zaključak kako je došlo do prilagodbe stanica na ovakvu kiselost je rezultiralo i povećanjem njihove vijabilnosti. U svojem istraživanju Kanižai Šarić i sur. (2019.) utvrdili su veću vijabilnost pojedinačnih sojeva prilikom skladištenja na 4 °C koja se kreće u prosjeku od  $1 \times 10^9$  do  $3 \times 10^9$  u prvih 150 dana nakon inkubacije. Također je utvrđen veći broj rizobija mješavine ispitivanih sojeva nacijspljenih na sterilan treset i uskladištenih na 4 i 25 °C koji raste i do  $10^{10} \text{ g}^{-1}$ . Autori

su zaključili kako je neophodan je daljnji kontinuiran rad u kontroli kvalitete sredstava za bakterizaciju kako bi se postigao optimalan i uniforman broj rizobne populacije, a s ciljem zadovoljenja potreba tržišta.

Graham i sur. (1994.) su zaključili da su *Bradyrhizobium* vrste tolerantne na kisele medije barem kao bakterija *Rhizobium tropici*, te da se rezultati testova poklapaju s prijašnjim istraživanjima o ovoj karakteristici, no vrijedi naglasiti da su ta istraživanja pokazala i da puferi imaju određenu ulogu u formiranju tolerancije na kiselost, gdje se dodatkom pufera poboljšala granica rasta obje navedene vrste pri vrijednostima pH od 4.00 do 4.25. S aspekta dugoročne iskoristivosti inokulanta, Franca i sur. (2013.) ustanovili su da se efikasnost simbiotskog djelovanja *Bradyrhizobium* vrsta smanjuje dužim vremenskim periodom skladištenja, što bi dodatkom u standardizirane mikrobiološke metode omogućilo jeftiniju i lakšu proizvodnju i korištenje inokulanta u kontekstu terenskih istraživanja. Indrasumunar i sur. (2012.) su zaključili kako se dodatkom različitih faktora stresa kiselosti poput tolerancije na aluminij i mangan, znatno poboljšala mogućnost preživljavanja 16 različitih sojeva *Bradyrhizobium* vrsta u tlima s niskim pH. U tom istraživanju je također navedeno kako se nije uspostavila poveznica između simbiotske učinkovitosti i tolerancije na kiselost, jer je jedan soj koji je bio tolerantan na kiselost imao isti efekt kao komercijani inokulant CB1809.

Razvoj odgovarajućih metoda za održavanje vijabilnosti kultura u stabilnom genetskom obliku je ključno. Dakle, glavni cilj bilo kojeg načina očuvanja je zadržati vijabilnost bez prisutnosti kontaminacija što je duže moguće, uzimajući u obzir minimiziranje pojave mutacija ili varijabilnosti i činjenicu mogućnosti, dostupnosti i cijene proizvodnje (Franca, 2013). Djelotvornost i konačna ekonomska korist inokulacije, primjerice soje, zahtijeva optimizaciju tri čimbenika: učinkovite inokulantne populacije *B.japonicum* u stabilnoj formulaciji, metode za dostavljanje formulacije sjemenu ili blizu njega s minimalnim gubitkom bakterija, te dovoljnog održavanja vijabilne populacije rizobija u tlu kako bi tada mogle nodulirati korijen klijajućeg sjemena (Fouilleux, 1996.).

## 6. ZAKLJUČAK

Iz ovog istraživanja može se prvobitno zaključiti kako vrijedi pretpostavka da će se smanjenjem pH smanjiti i broj poraslih kolonija bakterije *B.japonicum*, ali također vrijedi naglasiti da, u usporedbi s radovima i rezultatima navedenih autora u raspravi postoje uvjeti u kojima bi te bakterije, iako ne favoriziraju kiselu sredinu, moderativno dobro razvijale kolonije, što bi se na kraju valjalo još detaljnije istražiti kako bi se sprovelo u relativnu korist u obliku inokulanta za određene leguminoze na kiselim tlima. Zanimljiva je i činjenica da se pri prvom ponavljanju pojavio i neočekivan rezultat gdje se kroz duže vremensko razdoblje i na višoj temperaturi skladištenja trebao pokazati pad broja kolonija, a dogodilo se upravo suprotno, izražen je blagi porast.

Vrijedi istaknuti sljedeće:

- *B. japonicum* pokazuje najbolji porast pri neutralnom pH i nižim temperaturama skladištenja
- Poželjno je iskoristiti inokulant u kraćem vremenskom periodu jer se tako zaobilazi utjecaj dugoročnog skladištenja
- Poželjno je detaljnije istražiti mogućnost postojanja vijabilnijih sojeva koji bi imali neovisnost o vremenu skladištenja
- Temperatura skladištenja značajan je faktor za preživljavanje rizobija



## 7. POPIS LITERATURE

1. Albareda M., Rodriguez - Navarro D. N., Camacho M. (2008.): Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2771 - 2779.
2. Brockwell J., Bottomley P. J., Thies J. E. (1995.): Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant and Soil*, 174: 144 - 177.
3. Deaker, R., Roughley, R. J., Kennedy, I. R. (2004.): Legume seed inoculation technology - a review, *Soil Biology and Biochemistry*. 36: 1275-1288.
4. Fernandes - Junior P. I., da Silva Junior E. B., da Silva Junior S., Silva e Santos, C. E. R., de Oliveira, P. J., Rumjanek, N. G., Martins, L. M. V., Xavier, G. R. (2009.) Performance of polymer compositions as carrier to cowpea rhizobial inoculant formulations: Survival of rhizobia in pre-inoculated seeds and field efficiency. *African Journal of Biotechnology* 11: 2945 - 2951.
5. Fortin M. G., Zechelowska M., Verma, D. P. S. (1985.): Specific targeting of membrane nodulins to the bacteroid-enclosing compartment in soybean nodules. *The EMBO Journal*, 4: 3041-3046.
6. Fouilleux, G., Revellin, C., Hartmann, A., Catroux, G. (1996.): Increase of *Bradyrhizobium japonicum* numbers in soils and enhanced nodulation of soybean (*Glycine max* L merr.) using granular inoculants amended with nutrients. *Federation of European Microbiological Societies*, 20: 173- 183.
7. Fox J. E., Gullede J., Engelhaupt E., Burow M. E., McLachlan J. A. (2007): Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 104(24): 10282-10287.
8. Gage, D. J. (2004.): Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen - fixing Rhizobia during nodulation of temperate legumes, *Microbiology and Molecular Biology*, 8: 285–300.
9. Graham, P. H., Draeger, K. J., Ferrey, M. L. (1994.): Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici*. *Canadian Journal of Microbiology*, 40: 198-207.

10. Horvat, M. (2014.): Pregled korisne mikrobne populacije rizosfere. izdavač
11. Indrasumunar, A., Menzies N. W., Dart., P. J. (2012.): Laboratory prescreening of *Bradyrhizobium japonicum* for low pH, Al and Mn tolerance can be used to predict their survival in acid soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 48: 135-141.
12. Jukić, A. (2013): Kontrola kvalitete inokulanta za predstjetvenu bakterizaciju sjemena soje. Repozitorij radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:242082>
13. Kanižai Šarić, G., Majić, I., Brozović, B., Prtenjača, K. (2019.); Preživljavanje soja *Bradyrhizobium japonicum* u tekućem mediju, Osijek: Proceedings and abstract of the 11th International Scientific/Professional Conference Agriculture in Nature and Environment Protection, 237.
14. Lindemann, W. C., Glover, C. R. (2003.): Nitrogen Fixation by Legumes, Guide A - 129, College of Agriculture and Home Economics.
15. Mylona, P., Pawlowski, K., Bisseling, T. (1995): Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 7: 870-883.
16. Nap, J. P., Bisseling, T. (1990.): Developmental biology of a plantprokaryote symbiosis: The legume root nodule. *Science*, 250: 948 - 954.
17. Postgate J. R. (1982): Biological nitrogen fixation: fundamentals. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences*, 296: 387 - 375.
18. Roughley, R.J., Gemell, J.G., Thompson, J.A., Brockwell, J. (1993.) The number of *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) applied to seed and its effect on rhizosphere colonization, nodulation and yield of *Lupinus*. *Soil Biology and Biochemistry* 25:1453– 1458.
19. Ruiz-Valdiviezo, V. M., Canseco, L. M. C. V., Suarez, L. A. C., Gutierrez - Miceli, F. A., Dendooven, L., Rincon - Rosales, R. (2015). Symbiotic potential and survival of native rhizobia kept on different carriers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3): 735-742.
20. Saharan, B., Nehra, V. (2011.): Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review, *Life Sciences and Medicine Research*, 21: 1 - 30
21. Streeter, J. G., (2007.): Factors affecting the survival of *Bradyrhizobium* applied in liquid cultures to soya bean [*Glycine max* (L.) Merr.] seeds. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1282-1290

22. Silva e Franca, C. R. R., Junior, M. A. L., Figueiredo, M. V. B., Stamford, N. P., Alves e Silva, G. (2013.): Feasibility of rhizobia conservation by liquid conditioners, *Revista Ciencia Agronomica*, 668(44): 661 - 668.
23. Tate, R. L. (1995.): *Soil microbiology. Symbiotic nitrogen fixation*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 307-333.
24. Topol, J. (2012.): Značaj simbiotske fiksacije dušika u ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji. Repozitorij radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:637841>.
25. Topol, J. i Kanižai Šarić, G. (2013). Simbiotska fiksacija dušika u ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji. *Agronomski glasnik*, 75(2-3), 117 - 134. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/112685>.
26. Turgeon, B. G., Bauer, W. D. (1985.): Ultrastructure of infection-thread development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta*, 163: 328–349.
27. Van Brussel, A. A. N., Bakhuizen, R., Van Spronsen, P. C., Spaink, H. P., Tak, T., Lugtenberg, B. J. J., Kijne, J. W. (1992.): Induction of preinfection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipooligosaccharides of *Rhizobium*. *Science*, 257: 70-72.
28. Verma D. P. S. (1992.): Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell*, 4: 373 - 382.
29. Vincent, J. M. (1970.): *A manual for the practical study of root - nodule bacteria*, Oxford: Blackwell Scientific. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15).
30. Vukadinović V., Vukadinović, V. (2011.): *Ishrana bilja*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet Osijek.
31. Wan, J., Torres, M., Ganapathy, A., Thelen, J., DaGue, B. B., Mooney, B., Xu, D., Stacey, G. (2005.): Proteomic Analysis of Soybean Root Hairs After Infection by *Bradyrhizobium japonicum*, *International Society for Molecular Plant – Microbe Interactions*, 18(5): 458–467.

Web – izvori:

1. <https://hr.betweenmates.com/difference-between-symbiotic> (2. 9. 2020.)
2. <https://biofixin-s.com/simbiozna-fiksacija-dusika/> (7. 9. 2020.)
3. <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bradyrhizobium> (26. 8. 2019.)
4. <https://benthamopen.com/FULLTEXT/TOASJ-10-7> (3. 9. 2020.)
5. [https://www.researchgate.net/figure/Nodulation-as-new-organ-outgrowth-from-roots-A-root-system-of-a-nodulated-soybean\\_fig1\\_43443801](https://www.researchgate.net/figure/Nodulation-as-new-organ-outgrowth-from-roots-A-root-system-of-a-nodulated-soybean_fig1_43443801) (13. 5. 2019)
6. [https://www.researchgate.net/figure/Soybean-plants-with-nodulated-roots-a-Healthy-nodules-on-soybean-control-plants-b\\_fig6\\_325314764](https://www.researchgate.net/figure/Soybean-plants-with-nodulated-roots-a-Healthy-nodules-on-soybean-control-plants-b_fig6_325314764) (10. 5. 2019.)
7. [http://www.dalynn.com/dyn/ck\\_assets/files/tech/TM53.pdf](http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf) (10. 9. 2020.)

## 8. SAŽETAK

Bakterizacija tla i leguminoznih biljaka fiksatorima dušika u današnje je vrijeme neizostavan dio poljoprivredne proizvodnje. Simbiotska interakcija između kvržičnih bakterija i biljke omogućava fiksaciju inače nedostupnog, atmosferskog dušika, što je dovelo do formacija raznih inokulanata kao alternative mineralnim gnojivima koja imaju negativan učinak na tlo. Najveći problem se očituje u preživljavanju sojeva simbiotskih bakterija koje ovise o raznim fizikalno – kemijskim uvjetima okoliša. Isključivi čimbenici za njihov razvoj su vlažnost, temperatura i pH sredine. Svrha ovog istraživačkog rada bila je odrediti vijabilnost stanica *Bradyrhizobium japonicum* pri različitim temperaturama i prilagođenom pH medija *in vitro*. Rezultati su pokazali najbolju vijabilnost stanica pri neutralnom pH i pri 5 °C. Dokazana je i hipoteza da će se pri različitoj temperaturi skladištenja i smanjenjem pH proporcionalno smanjiti i broj poraslih kolonija bakterije. Rezultati ukazuju kako su temperatura skladištenja i pH ključni faktori za preživljavanje rizobija.

**Ključne riječi:** *Bradyrhizobium japonicum*, temperatura, pH, skladištenje.

## 9. SUMMARY

Bacterization of the soil and leguminous plants with nitrogen fixing bacteria is nowadays an indispensable part of agricultural production. The symbiotic interaction between nodulating bacteria and plants allows the fixation of otherwise inaccessible, atmospheric nitrogen, which has led to the formation of various inoculants as an alternative to mineral fertilizers that have a negative effect on the soil. The issue of utmost importance is the survival of strains of symbiotic bacteria that depend on various physico - chemical conditions of the environment. Exclusive factors for their development are humidity, temperature and pH of the environment. The purpose of this study was to determine the viability of *Bradyrhizobium japonicum* cells at different temperatures and adjusted pH of the medium in vitro. The results showed the best cell viability at neutral pH and at 5 ° C. The hypothesis that the number of grown colonies of the bacterium will proportionally decrease at different storage temperature and decrease in pH has also been proven. The results indicate that storage temperature and pH are key factors for rhizobia survival.

**Key words:** *Bradyrhizobium japonicum*, temperature, pH, storage.

## **10. POPIS TABLICA**

Tablica 1: Razlika između simbiotske i asimbiotske fiksacije dušika

Tablica 2: Faze procesa nodulacije

## 11. POPIS SLIKA

Slika 1: Simbiotska fiksacija dušika na korijenu leguminoza

Slika 2: Bakterija *Bradyrhizobium japonicum*

Slika 3. Proces asimbiotske fiksacije dušika

Slika 4. Stvaranje nodule kao novog organa korijena

Slika 5. Dijagram nodulacije

Slika 6. Boja kvržica kao indikator efikasnosti nodulacije

Slika 7. Uzgoj bakterija u tekućoj aeriranoj kvasac – manitol podlozi s podešenim pH

Slika 8. Određivanje broja bakterija korištenjem metode razrjeđenja u sterilnim uvjetima

Slika 9. Priprema razrjeđenja za presađivanje u Petrijeve zdjelice u svrhu prebrojavanja



## **12. POPIS GRAFIKONA**

Grafikon 1. Broj bakterija na 5°C ovisno o vremenu skladištenja i pH medija

Grafikon 2. Broj bakterija na 25°C ovisno o vremenu skladištenja i pH medija

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski rad

Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

Sveučilišni diplomski studij Ekološka poljoprivreda

Utjecaj pH i temperature na rast i razvoj *Bradyrhizobium japonicum*

Krešimir Prtenjača

**Sažetak:** Bakterizacija tla i leguminoznih biljaka fiksatorima dušika u današnje je vrijeme neizostavan dio poljoprivredne proizvodnje. Simbiotska interakcija između kvržičnih bakterija i biljke omogućava fiksaciju inače nedostupnog, atmosferskog dušika, što je dovelo do formacija raznih inokulanata kao alternative mineralnim gnojivima koja imaju negativan učinak na tlo. Najveći problem se očituje u preživljavanju sojeva simbiotskih bakterija koje ovise o raznim fizikalno – kemijskim uvjetima okoliša. Isključivi čimbenici za njihov razvoj su vlažnost, temperatura i pH sredine. Svrha ovog istraživačkog rada bila je odrediti vijabilnost stanica *Bradyrhizobium japonicum* pri različitim temperaturama i prilagođenom pH medija *in vitro*. Rezultati su pokazali najbolju vijabilnost stanica pri neutralnom pH i pri 5 °C. Dokazana je i hipoteza da će se pri različitoj temperaturi skladištenja i smanjenjem pH proporcionalno smanjiti i broj poraslih kolonija bakterije. Rezultati ukazuju kako su temperatura skladištenja i pH ključni faktori za preživljavanje rizobija.

## Ključne riječi:

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

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić

**Broj stranica:** 38

**Broj grafikona i slika:** 11

**Broj tablica:** 2

**Broj literaturnih navoda:** 38

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** *Bradyrhizobium japonicum*, temperatura, pH, skladištenje.

## Datum obrane:

### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Bojan Stipešević, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor
3. izv. prof. dr. sc. Brigita Popović, član

**Rad je pohranjen u:** Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayer u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Vladimira Preloga 1.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer Faculty of Osijek**

**Graduate thesis**

**Faculty of agrobiotechnical sciences of Osijek**

**University graduate studies, course: Ecologic Agriculture**

Influence of pH and temperature on the growth and development of *Bradyrhizobium japonicum*

Krešimir Prtenjača

**Summary:** Bacterization of the soil and leguminous plants with nitrogen fixing bacteria is nowadays an indispensable part of agricultural production. The symbiotic interaction between nodulating bacteria and plants allows the fixation of otherwise inaccessible, atmospheric nitrogen, which has led to the formation of various inoculants as an alternative to mineral fertilizers that have a negative effect on the soil. The issue of utmost importance is the survival of strains of symbiotic bacteria that depend on various physico - chemical conditions of the environment. Exclusive factors for their development are humidity, temperature and pH of the environment. The purpose of this study was to determine the viability of *Bradyrhizobium japonicum* cells at different temperatures and adjusted pH of the medium in vitro. The results showed the best cell viability at neutral pH and at 5 ° C. The hypothesis that the number of grown colonies of the bacterium will proportionally decrease at different storage temperature and decrease in pH has also been proven. The results indicate that storage temperature and pH are key factors for rhizobia survival.

**Thesis performed at:** Faculty of agrobiotechnical sciences of Osijek

**Mentor:** Full professor, Gabriella Kanižai Šarić

**Number of pages:** 38

**Number of figures:** 11

**Number of tables:** 2

**Number of references:** 38

**Number of appendices:** 0

**Original in:** Croatian

**Key words:** *Bradyrhizobium japonicum*, temperature, pH, storage.

**Thesis defended on date:**

**Reviewers:**

1. Full professor, Bojan Stipešević. president
2. Full professor, Gabriella Kanižai Šarić, mentor
3. Full professor, Brigita Popović, member

**Thesis deposited at:** Library, Faculty of agrobiotechnical sciences in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and digital repository of final papers and graduate thesis' of Faculty of agrobiotechnical sciences of Osijek, Vladimira Preloga 1.