

# Uloga Azospirillum spp. kao asocijativnog nitrofiksatora

---

**Bučar, Marina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:098002>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-26**



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  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Marina Bučar

Diplomski studij Povrčarstvo i cvjećarstvo

**ULOGA *AZOSPIRILLUM* SPP. KAO ASOCIJATIVNOG NITROFIKSATORA**

**Diplomski rad**

Osijek, 2015.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Marina Bučar

Diplomski studij Povrčarstvo i cvjećarstvo

**ULOGA *AZOSPIRILLUM* SPP. KAO ASOCIJATIVNOG NITROFIKSATORA**

**Diplomski rad**

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Marina Bučar

Diplomski studij Povrčarstvo i cvjećarstvo

**ULOGA *AZOSPIRILLUM* SPP. KAO ASOCIJATIVNOG NITROFIKSATORA**

**Diplomski rad**

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskoga rada:

1. Prof.dr.sc. Gordana Bukvić, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Suzana Kristek, mentor
3. Jurica Jović, mag.ing.agr., član

Osijek, 2015.

## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Korisni mikroorganizmi u tlu.....	2
3. Značaj dušika u ishrani bilja.....	4
4. Kruženje dušika u prirodi.....	6
5. Biološka fiksacija dušika.....	10
5.1. Simbiotska fiksacija dušika .....	11
5.2. Slobodna fiksacija dušika .....	12
5.3. Asocijativna fiksacija dušika .....	13
6. Asocijativni fiksatori dušika.....	13
6.1. Rod <i>Azotobacter</i> .....	14
7. Rod <i>Azospirillum</i> spp. ....	15
7.1. Osnovne karakteristike .....	15
7.2. Značaj asocijativnih nitrofikatora roda <i>Azospirillum</i> .....	16
8. Primjena korisnih bakterija u ekološkoj proizvodnji .....	25
9. Preparati u ekološkoj proizvodnji .....	27
10. Primjena korisnih bakterija u budućnosti .....	28
11. Zaključak .....	29
12. LITERATURA .....	31
13. SAŽETAK .....	33
14. SUMMARY .....	34
15. Popis slika i tablica.....	35

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

## 1. Uvod

Ovaj diplomski rad predstavlja ulogu *Azospirillum* spp. kao asocijativnog nitrofikatora. Pregledom zadane literature i proučavanjem raznih istraživanja navedene su sve beneficije ove izuzetno važne grupe nitrofikatora. Budući je cilj u poljoprivrednoj proizvodnji postići optimalne uvjete za rast i razvoj biljke, a time i visoke prinose proučavane su različite mogućnosti kako bismo navedeno dobili.

Tlo i biljke, odnosno njihov korijenov sustav, čine jedinstveno i nedjeljivu cjelinu koju nazivamo rizosfera. Prema tome korijen, biljka i tlo, kao supstrat biljne ishrane predstavljaju sustav u kojem dolazi do vrlo kompleksnih međusobnih interakcija uvjetovanih nizom vanjskih čimbenika (Škvorc i sur., 2014.). U toj sferi nalaze se mnoge organske tvari, koje izlučuju same biljke kao svoje otpatke, dok se s druge strane u njoj nalazi i najveća količina mineralnih biljnih asimilativa za potrebe viših biljaka. Najveća biogenost je oko korjenovih dlačica, oko kojih se stvara neka vrsta mikrobiološkog filtra kroz koji prolaze sve izlučevine korijena, koje potom mikroorganizmi koriste za svoje potrebe. Zahvaljujući rizosfernoj mikroflori biljke se mogu razvijati, jer bi se u suprotnom gušile u vlastitim izlučevinama. Tlo predstavlja ogroman životni prostor za kopnene mikroorganizme. Čine 0,1 do 3% cjelokupne organske tvari u tlu (Milaković, 2013.).

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

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

## 2. Korisni mikroorganizmi u tlu

Mikroorganizmi na plodnost zemljišta mogu utjecati direktno i indirektno. Direktno djelovanje uključuje procese izumiranja i mineralizacije mikroorganizama, pri čemu u zemljištu ostaju biljna hraniva. Indirektno djelovanje obuhvaća sudjelovanje mikroorganizama u mineralizaciji biljnih i životinjskih ostataka u tlu i razlaganju teže razgradivih minerala (Barea et al., 2005.). S obzirom da većina mikroorganizama koji žive u tlu za svoje potrebe zahtijeva organske izvore hranjivih tvari i energije, pravilo je da tla s većim sadržajem organske tvari sadrže i veći broj mikroorganizama (Bo et al., 2007.). Brojnost i mikrobiološka aktivnost u rizosferi ovise o količini i sastavu korijenskih izlučevina, habitusa i starosti korijena (Dobbelaere i sur., 2003.). Zastupljenost mikroorganizama u rizosferi je različita, najveći je broj amonifikatora, zatim celulolitičkih bakterija, gljiva i fiksatora dušika (Hu et al., 1999.).

Istraživanja pokazuju da pojedine vrste i/ili sojevi pospješuju toleranciju biljnih vrsta na abiotičke stresove, poput suše, saliniteta, nedostatka ili suviška hraniva (Yang et al. 2008.) i visok sadržaj teških metala (Rajapaksha et al. 2004.). Najznačajniji mehanizam mnogih bakterija koje direktno pospješuju rast biljaka je produkcija enzima 1-aminociklopropan-1-karboksilne kiseline (ACC). U stresnim uvjetima ovaj bakterijski enzim olakšava rast biljaka jer razlaže biljni ACC (etilenski prekursor u biljkama). Smanjivanjem nivoa etilena biljka je otpornija na stresne uvjete u životnoj sredini (Glik, 1999.). Veliki značaj u biljnoj proizvodnji imaju bakterije koje slobodno žive u tlu i imaju dobar interakcijski odnos sa biljkama. Toj grupi bakterija pripadaju rizobakterije koje mogu obavljati fiksaciju dušika, te vežu organske i anorganske tvari (Lucas et al., 2004.). S obzirom da najčešće koloniziraju korijen biljaka, produktima svog metabolizma stimuliraju rast biljaka i smanjuju ili štite biljke od bolesti pa se najčešće označavaju kao PGPR - Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Kloepper & Schroth, 1978.).

Osim toga što stimulatивно djeluju na rast i razvoj biljaka, stimuliraju razvoj korisne mikrobne populacije čime se povećava biogenost tla i stupanj organskih tvari tla (Burd et al., 2000.).

Khan (2005.) je bakterije koje potiču rast biljaka (PGPR) , prema njihovom odnosu s biljkama, podijelio na dvije grupe: simbiotske bakterije i one koje žive slobodno u rizosferi. Sayyed et al. (2010.) su korisne mikroorganizme u tlu nazvali bakterije koje povećavaju prinose (yield - increasing bacteria, YIB) ili PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Gray i Smith (2005.) ove bakterije dijele u dvije skupine prema mjestu gdje su smještene: one koje formiraju kvržice i smještene su unutar biljnih stanica, te bakterije koje ne formiraju kvržice, a žive van biljnih stanica, no ipak potiču rast biljaka.

S obzirom na mehanizme djelovanja, bakterije koje potiču rast biljaka možemo podijeliti na : biofertilizatore, biostimulatore i biopesticide (Spaepen et al., 2007.).

Tablica 1. Podjela PGPR s obzirom na mehanizme djelovanja

<b>PGPR</b>	<b>Definicija</b>	<b>Mehanizam djelovanja</b>
<b>Biofertilizatori</b>	sadrže žive mikroorganizme, koji kada se primjenjuju na sjeme biljaka, poboljšavaju rast biljaka kroz povećanu opskrbu primarnih hraniva za biljku domaćina	Biološka fiksacija dušika (Vessey, 2003.) Upotreba netopivog fosfora (Somers et al., 2004.)
<b>Fitostimulatori</b>	biljne aminokiseline i aktivatori prirodne otpornosti za bolji razvoj i prinos, te otpornost biljke	Proizvodnja fitohormona (Lugtenberg et al., 2002., Somers et al. , 2004.)
<b>Biopesticidi</b>	mikroorganizmi za bolji rast biljaka, djeluju na patogene	Proizvodnja antibiotika Siderofori (Vassey, 2003.) Proizvodnja enzima (Somers et al., 2004.)



### 3. Značaj dušika u ishrani bilja

U poljoprivrednoj proizvodnji dušik je važan element za ishranu bilja. Često je osnovni ograničavajući čimbenik rasta i razvoja biljaka te postizanja optimalnih prinosa. Odlikuje se posebnim položajem u grupi neophodnih elemenata biljne ishrane, uglavnom se usvaja u mineralnom obliku i svrstava se u grupu mineralnih elemenata. Sastavni je dio brojnih spojeva u biljnoj stanici, npr. nukleinskih kiselina, aminokiselina, proteina, amida, amina, fotosintetskih pigmenata i drugih spojeva koji čine osnovu života. Iz tog razloga kemija i metabolizam ovog elementa opravdano se smatraju najvažnijim dijelom ishrane bilja (Škvorc i sur., 2014.).

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

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

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

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

Nedostatak raspoloživog dušika ima vrlo ozbiljne posljedice na razvoj biljaka. Biljke formiraju manju asimilacijsku površinu, lišće je kraće, uže i blijedo zeleno zbog manjeg sadržaja klorofila što uzrokuje niži intenzitet fotosinteze te biljke brže stare, a urod sjemena im je smanjen.

Suvišak dušika rezultira intenzivnim porastom vegetacijskih organa uz modrozelenu boju lišća te luksuzna ishrana dušikom ima više negativnih posljedica, npr. stvaranje prevelike mase lišća i intenzivan visinski prirast, uz istovremenu smanjenu produkciju mehaničkog tkiva što rezultira kasnijim polijeganjem biljaka. Općenito, biljke postaju neotporne na bolesti, štetočine, niske temperature i sušu (Škvorec i sur., 2014.).

Primjenom većih doza dušika od potrebnih, opada prinos, lošija je kakvoća proizvoda, a na lakim i propusnim tlima dolazi do ispiranja nitrata i onečišćavanja podzemnih voda (Vukadinović i Vukadinović, 2011.).

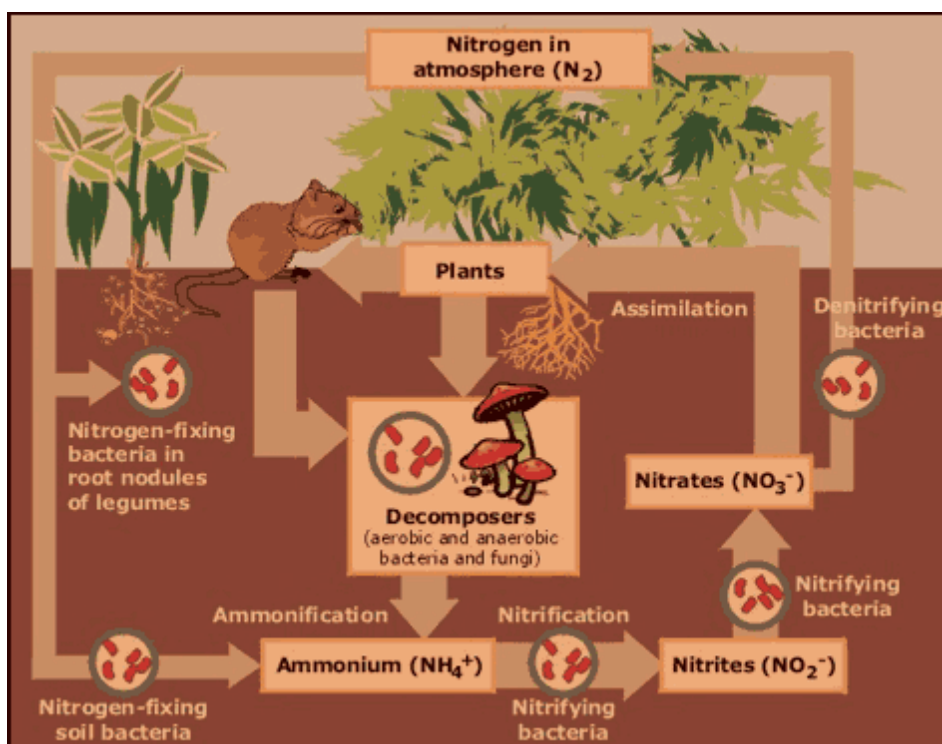
Zemljišni mikroorganizmi vrše pretvorbu organskih oblika dušika u anorganske oblike (amonijačni, nitrati) koje mogu koristiti biljke i mikroorganizmi. Nedostupan dušik iz atmosfere se kroz proces fiksacije veže u nove spojeve te na taj način postaje dostupan mikroorganizmima i biljkama da ih iskoriste za svoje metaboličke potrebe.

Organizmima je dušik potreban za sintezu bitnih spojeva kao što su aminokiseline, proteini i nukleinske kiseline (DNA i RNA). Iako plinoviti dušik ( $N_2$ ) čini 79% atmosfere, u tom elementarnom obliku neupotrebljiv je za najveći broj živih organizama, osim vrlo malog broja mikroorganizama – bioloških fiksatora elementarnog dušika – nitrofixatora. To isto vrijedi i za ogromne njegove rezerve u tlu u organskom obliku, koji su također nepristupačni za više biljke prije negoli ih mikroorganizmi prevedu u pristupačne oblike za biljke – u anorganske spojeve dušika, poznatih kao amonijak i nitrati. Ovih anorganskih spojeva dušika u tlu ima svega 1%, dok se sav ostali dušik u tlu nalazi se u organskom obliku, 99% od ukupnog dušika u tlu - u obliku svježije organske tvari i u sastavu humusa (Milaković, 2013.).

#### 4. Kruženje dušika u prirodi

Za kruženje dušika u prirodi neophodno je sudjelovanje mikroorganizama, koji svojom aktivnošću najprije razgrađuju molekule bjelančevina do aminokiselina, pa nadalje do amonijaka. To je biljkama pristupačan mineralni oblik dušika, a sam proces naziva se amonifikacija. Amonijak koji mikroorganizmi i biljke ne iskoriste, dalje podliježe oksidacijskom procesu, koji se zove nitrifikacija, pod utjecajem specifičnih mikroorganizama, te se najprije oksidira do nitrita – proces nitratacije, a zatim dalje do nitrata – nitratacija.

Nitrati su najpovoljniji dušični spojevi za ishranu viših biljaka. Zbog toga ih biljke i pretvaraju ponovo u svoje bjelančevinaste tvari. Kada se nitrati nađu u anaerobnim uvjetima, dolazi do njihove redukcije – denitrifikacija, također radom određenih mikroorganizama, do plinovitog oblika dušika koji odlazi u atmosferu i postaje nepristupačan biljkama. Međutim, postoji posebna grupa mikroorganizama koja veže elementarni dušik iz zraka – nitrofikacija i pretvara ga u oblike pristupačne biljkama.



Slika 1. Kruženje dušika u prirodi

[http://en.academic.ru/pictures/enwiki/78/Nitrogen\\_Cycle.jpg](http://en.academic.ru/pictures/enwiki/78/Nitrogen_Cycle.jpg)

Očito je da kruženje dušika u prirodi vode mikroorganizmi procesima amonifikacije, nitrifikacije, denitrifikacije i nitrofikacije

### **Amonifikacija**

Proces kojim mikroorganizmi razgrađuju molekule bjelančevina do aminokiselina, pa nadalje do amonijaka. Međutim, amonijak se izdvaja samo u određenim uvjetima koje se odnose na odnos organskog ugljika i dušika u sredini (Kristek, 2007.)

U ovom procesu razlikujemo dvije faze: degradacija i dezaminacija.

Degradacija proteina je hidrolitički proces u komu mikroorganizmi izdvajaju izvanstanične proteolitičke enzime – proteaze, koji u prisustvu vode hidrolizom razgrađuju molekulu proteina preko čitavog niza prijelaznih proizvoda do peptida i koje razgrađuju peptide do aminokiselina. Stvorene aminokiseline ne koriste biljke, a mikroorganizmi ih lako iskorištavaju za svoje potrebe.

Dezaminacija aminokiselina je druga faza u transformaciji proteina. Enzimi u ovoj fazi su dezaminaze, intracelularni, pošto su aminokiseline već rastvorljive u vodi i mikrobi ih dalje transformiraju u svojoj citoplazmi do produkata mineralnog karaktera - amonijaka. Mikroorganizmi stvoreni amonijak izdvajati će u okoliš samo u određenim uvjetima, a to ovisi o odnosu C : N, tj. ugljika prema dušiku u okolišu (Milaković, 2013.).

Ako je taj odnos širi od 25:1, neće doći do izdvajanja amonijaka jer će sav dušik biti potrošen od strane mikroorganizama. Amonijak će se izdvajati samo pod uvjetom da je C:N odnos manji od 25:1, što znači prvenstveno kod humusnih materija, odnosno mineralizacijom humusa. Izdvojeni amonijak je pogodan mineralni oblik dušika za ishranu biljaka. U kiselim tlima, najveći dio amonijaka ostaje u amonijačnom obliku, jer se veže s kiselinama i na taj način je onemogućava njegova oksidacija u nitrate. U neutralnim i slabo alkalnim tipovima tala amonijak se brzo oksidira u nitrate. Mikroorganizmi koji vode proces amonifikacije nazivaju se amonifikatori (Kristek, 2007.).

## **Nitrifikacija**

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

Proces nitrifikacije odvija se u dvije faze:

1. Nitritacija – obuhvaća reakcije u kojima se amonijevi spojevi oksidiraju do nitrita
2. Nitratacija – obuhvaća daljnje reakcije oksidacije do nitrata

Mikroorganizmi koji obavljaju proces nitrifikacije pripadaju grupi isključivo pravih bakterija i nazivaju se nitrifikatori. Radi se o asporogenim, neutrofilnim bakterijama (Kristek, 2007.). Energija koja se oslobađa u ovim procesima mikroorganizmi koriste za sintezu svoje organske tvari iz CO<sub>2</sub> i vode, a dio dušika iz amonijaka za biosintezu proteina (Milaković, 2013.).

## **Denitrifikacija**

Denitrifikacija je redukcija nitrata u tlu. Kako se nitrati lako ispiru u dublje slojeve tla, nailaze tamo na anaerobne uvjete, te u prisustvu odgovarajućih mikroorganizama potpadaju procesu redukcije. Ovdje se nitrati reduciraju do pojave plinovitog dušika, koji odlazi u atmosferu. Možemo reći da se radi o štetnom procesu jer dolazi do gubitka dušika iz tla. Mikroorganizmi koji vrše ovaj proces nazivaju se denitrifikatori (Kristek, 2007.). Denitrifikacija se odvija u potpunosti ako su ispunjeni određeni uvjeti za umnožavanje mikroorganizama denitrifikatora. Ti uvjeti su: visok sadržaj lako razgradivih organskih tvari, dovoljno lako pristupačnih nitrata, odgovarajuća vlaga, temperatura, pH i anaerobni uvjeti. Ispiranje nitrata uzrokovano kišama ili navodnjavanjem uzrokuje onečišćenje okoliša (Milaković, 2013.)

## Nitrofikacija

Nitrofikacija je vezivanje atmosferskog slobodnog dušika u spojeve koje mogu koristiti biljke i većina mikroorganizama. Proces nitrofikacije zahtjeva veliki utrošak energije jer se radi o izrazito endotermnom procesu, pa s obzirom na izvore energije razlikujemo abiotsku i biotsku nitrofikaciju.

Abiotska nitrofikacija se odvija bez prisustva mikroorganizama, a može biti prirodna ili umjetno inicirana. Prirodna abiotska nitrofikacija odvija se prilikom električnih pražnjenja u atmosferi, što dovodi do stvaranja dušikovih oksida, koji s vodenim talozima dolaze u tlo kao nitrati. Umjetna ili tehnička nitrofikacija odvija se u tvorničkim postrojenjima na visokim temperaturama i pritiscima, te prisustvu katalizatora, pri čemu se najprije dobivaju amonijak ili dušični oksidi, a potom nitrati. Biotska nitrofikacija odvija se uz prisustvo posebne grupe mikroorganizama- nitrofikatora, koje čini samo nekoliko rodova prokariotskih mikroorganizama sa genetskom informacijom za sintezu enzima nitrogenaze. Nitrofikatori usvajaju slobodni atmosferski dušik koristeći sunčevu energiju akumuliranu u biljnim asimilativima ili organskim tvarima tla. Pri odnosu mikroorganizmi – biljke, biotska nitrofikacija može biti slobodna, asocijativna i simbiotska. Kod slobodne nitrofikacije mikroorganizmi nisu direktno, histološki povezani sa višim biljkama, već su slobodni u zemljištu i vodi. Koristeći se energetske tvari u tim sredinama, ove bakterije vežu znatnu količinu dušika iz zraka, te ga u obliku spojeva ostavljaju u zemljištu ili vodi, gdje ga mogu koristiti ostali mikroorganizmi ili više biljke. Asocijativna fiksacija dušika odvija se uz pomoć mikroorganizama koji žive na samoj površini korijena ili u korijenu biljke. Usvojeni dušik direktno koristi biljka domaćina i to je najniži stupanj simbioze između biljke i mikroorganizama, jer se pri tome ne stvaraju posebne morfološke strukture. Simbiotska nitrofikacija je simbioza između kvržičnih bakterija iz rodova *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* i leguminoznih biljaka. Kvržične bakterije koristeći energiju biljke domaćina fiksiraju elementarni dušik iz atmosfere i predaju ga simbiontu (Kristek, 2007.)

## 5. Biološka fiksacija dušika

Biološka fiksacija dušika je proces u kojem posebne skupine mikroorganizama usvajaju elementarni dušik iz atmosfere i preko enzima nitrogenaze ga reduciraju do amonijaka koji se koristi za sintezu proteina

Biološki fiksatori dušika procesom vezanja atmosferskog dušika opskrbljuju biljku reduciranim dušikom, a od nje uzimaju tvari potrebne za svoj razvoj (Milaković, 2013.). Ako u tlu postoji dovoljna količina raspoloživog dušika, tako da su zadovoljene potrebe biljke domaćina i bakterija, rast kvržica se smanjuje uz opadanje njihovog broja (Vukadinović i Vukadinović, 2011.).

Pregled povijesti istraživanja biološke fiksacije dušika pokazuje da je interes uglavnom bio usmjeren na simbiotski sustav biljaka iz porodice leguminoza i rizobija zbog toga što ove asocijacije imaju najveći kvantitativni utjecaj na ciklus kruženja dušika u prirodi (Zahran, 1999.). Unosi u kopnene ekosustave od biološke fiksacije dušika odnosno od simbiotskog odnosa između biljaka iz porodice leguminoza i kvržičnih bakterija iznose najmanje 70 milijuna tona dušika godišnje (Brockwell et al., 1995.). Upravo zbog toga, ovi simbiotski odnosi su od najvećeg značenja za poljoprivredu, jer omogućuju obogaćivanje poljoprivrednih tala dušikom. Učinkovita simbiotska fiksacija dušika može značajno smanjiti potrebu za umjetnim dušičnim gnojivima.

Uzimajući u obzir da je najveći raspoloživi potencijal dušika u atmosferi i da se u prosjeku godišnje fiksira oko 140 kg N/ha u biološkoj nitrofikсации, značaj ovog procesa za dušični balans je velik. U biološkoj nitrofikсации se koristi samo "besplatna" energija sunca ili organske tvari tla dok se u industrijskoj proizvodnji dušičnih mineralnih gnojiva troši skupa energija fosilnih goriva.

Za mnoge biljne vrste, zahvaljujući biološkim fiksatorima, nije ni potrebno unositi dušična mineralna gnojiva, dok se za neke, biološkom fiksacijom osigurava i do 50% potrebnog dušika.

Pored poboljšanja i održavanja dušičnog bilansa tla, biološki fiksatori su producenti vitamina i tvari rasta koji utječu povoljno na biljku (Milaković, 2013.).

Sposobnost usvajanja elementarnog dušika iz zraka je ograničena na samo nekoliko rodova prokariotskih mikroorganizama (bakterije i cijanobakterije), koji žive:

- Slobodno u tlu i vodama (slobodni mikroorganizmi)
- Na samoj površini korijena (asocijativni mikroorganizmi)
- U zajednici sa određenim eukariotskim organizmima (simbiozni mikroorganizmi)

Biološkom fiksacijom atmosferskog dušika godišnje se usvoji 175 milijuna tona, što je više od 70% ukupne količine fiksiranog dušika na Zemlji svake godine (Milaković, 2013.)

### 5.1. Simbiotska fiksacija dušika

Malobrojni su organizmi koji mogu vezati molekularni dušik iz atmosfere. Za to je potreban enzimski sustav nitrogenaze, prisutan u nekih slobodno živućih heterotrofnih bakterija, kako aerobnih tako i anaerobnih, u slobodno živućih autotrofnih bakterija, cijanobakterija te vrsta roda *Rhizobium* u gomoljčićima korijena mahunarki i aktinomiceta u gomoljčićima korijena nekih drugih vrsta kritosjemenjača (Škvorc i sur., 2014.)

Nedostatak mineralnog oblika dušika u tlu vrlo često ograničava rast biljaka, pa su se upravo zbog toga razvili simbiotski odnosi između biljaka i raznovrsnih organizama sa sposobnošću fiksiranja dušika (Freiberg et al., 1997.). Upravo najučinkovitiji fiksatori dušika uspostavljaju simbiozu s višim biljkama (Mylona et al., 1995.). Postoje različiti tipovi simbiotske fiksacije dušika koji se međusobno razlikuju prema pojedinim članovima simbiotskih odnosa, jer različite vrste bakterija stvaraju simbiotsku interakciju s različitim vrstama biljaka.

Proces fiksacije dušika zahtijeva aktivnost enzima nitrogenaze koji djeluje kao katalizator u procesu redukcije molekule dušika i njegove promjene u amonijak i osigurava za to potrebnu energiju i elektrone (Postgate, 1982.). Simbiotski odnos temelji se na uzajamnoj koristi oba člana simbioze. Leguminoze kroz produkte fotosinteze opskrbljuju bakterije ugljikom odnosno energijom, dok zauzvrat bakterije opskrbljuju leguminoze dušikom uglavnom u obliku amonijaka (Howard i Rees, 1996.).



Proces fiksacije dušika može se odvijati isključivo u anaerobnim uvjetima (enzime uključene u fiksaciju dušika ireverzibilno inaktivira kisik). Neki mikroorganizmi koji žive u aerobnim uvjetima mogu stvoriti interne anaerobne uvjete, zahvaljujući svojim specijaliziranim stanicama, heterocistama, koje imaju debelu stjenku - nitaste cijanobakterije (Škvorc i sur., 2014.).

S druge strane, bakterije roda *Azotobacter* smanjuju sadržaj kisika visokom stopom respiracije, a vrste roda *Gloeotheca* razvijaju kisik fotosintezom danju, a dušik fiksiraju noću. To znači da mikroorganizmi koji mogu živjeti i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima fiksiraju dušik samo u anaerobnim uvjetima (Škvorc i sur., 2014.).

U simbiotskoj fiksaciji dušika sadržaj slobodnog kisika se reducira visokim stopama respiracije simbionta i prisutnosti hem proteina Iemhemoglobina koji veže kisik i olakšava njegovu difuziju te na taj način održava nisku koncentraciju slobodnog kisika u nodulima (Škvorc i sur., 2014.).

## **5.2. Slobodna fiksacija dušika**

Kod slobodne fiksacije dušika fiksatori žive u tlu i vodi, te su sposobni fiksirati elementarni dušik bez izravnog utjecaja biljke ili drugih mikroorganizama. Energiju za fiksaciju dušika dobivaju iz organske tvari tla. Dušik vezan ovim fiksatorima na raspolaganju je svim biljaka.

Zastupljenost slobodnih fiksatora dušika ovisi o tipu tla i njegovim fizikalno kemijskim karakteristikama, dok na njihovu brojnost i aktivnost utječe niz ekoloških faktora, kao što su pH, temperatura, količina kisika, sadržaj vode, sadržaj organske tvari, mineralni oblici dušika i mikroelementi (Milaković, 2013.).

Slobodna fiksacija dušika u tlu uglavnom se javlja kao rezultat aktivnosti saprofitskih bakterija iz roda *Azotobacter* i *Clostridium*, ali i nekoliko drugih rodova slobodno živućih bakterija i cijanobakterija. Neki od njih su aerobni, neki anaerobni, a neki fakultativni organizmi. Aerobni mikroorganizmi mogu različitim mehanizmima stvoriti anaerobne uvjete potrebne za fiksaciju dušika. Organizmi koji mogu živjeti i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima fiksiraju dušik samo u anaerobnim uvjetima (Tupol i Kanižaj Šarić, 2013.).

Slobodna fiksacija dušika u odnosu prema kisiku može biti aerobna i anaerobna. Aerobna slobodna fiksacija dušika prisutna je u svakom tlu pri povoljnim uvjetima. Anaerobna slobodna fiksacija prisutna je u tlima sa anaerobnim uvjetima, a vezanje atmosferskog dušika vrše bakterije iz roda *Clostridium*. Količina ovako fiksiranog dušika je 5-10 kg N/ha (Milaković, 2013.).

### **5.3. Asocijativna fiksacija dušika**

Asocijativna fiksacija dušika predstavlja prijelaz između simbiozne i slobodne (asimbiozne) fiksacije dušika. Asocijativni fiksatori aktivni su na površini korijena, te na njoj formiraju finu i tanku ovojnici (Milaković, 2013.)

Asocijativnom fiksacijom fiksira se veća količina dušika nego kod slobodnih fiksatora. Tako se fiksira oko 130 kg N/ha. Količina fiksiranog dušika ovisi o biljci, ekološkim uvjetima i vrsti bakterije. Na samu brojnost i aktivnost asocijativnih fiksatora dušika u zoni korijena utječe biljka svojim eksudatima, tako što fiksatori od nje dobivaju potrebnu energiju, a biljku potom opskrbljuju amonijskim dušikom nastalim u procesu fiksacije (Milaković, 2013.).

## **6. Asocijativni fiksatori dušika**

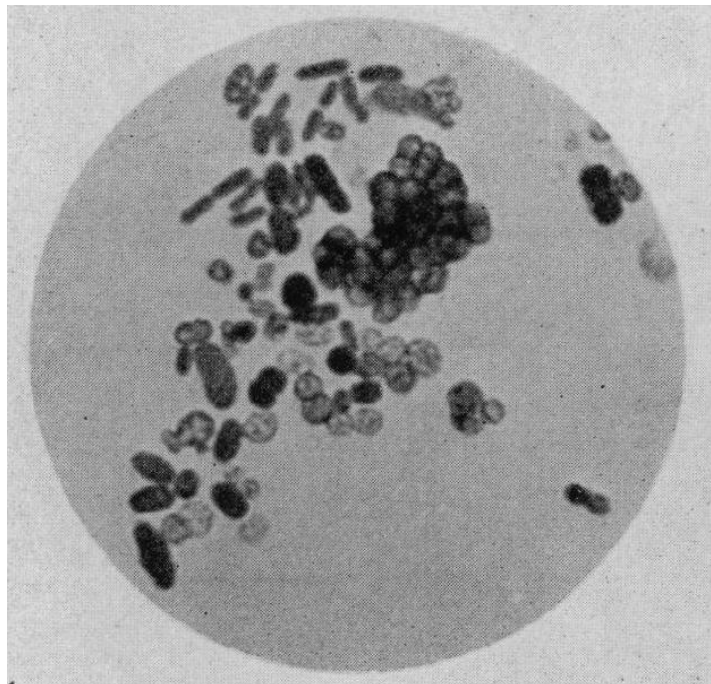
Asocijativnim fiksatorima pripadaju bakterije roda *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella*. Koriste se za inokulaciju neleguminoznih biljaka kao što su kukuruz, pšenica, krumpir, šećerna repa i suncokret (Milošević i Govedarica, 2001.). Sposobni su fiksirati atmosferski dušik te ga ostavljaju u tlu ili vodi gdje ga koriste biljke i drugi mikroorganizmi za svoj rast (Milaković, 2013.).

Inokulacijom sa ovim fiksatorima dušika moguće je povećanje prinosa ratarskih biljaka (Milošević i Govedarica, 2001.). Istraživanja primjene nesimbiotskih fiksatora (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* i dr.) kao biofertilizatora u proizvodnji pšenice, kukuruza i šećerne repe pokazuju da, u ovisnosti od soja, postoji mogućnost zamjene mineralnog dušika od 20-60 kg/ha (Milošević i sur., 2003.).

## 6.1. Rod *Azotobacter*

Važnost korisnih bakterija roda *Azotobacter* koje promiču rast biljaka u poljoprivrednoj proizvodnji je sposobnost sintetiziranja antibiotika, vitamina, te proizvodnje pigmenata.

Prisutni su u neutralnim i slabo kiselim tlima. Unatoč hladnoj klimi i relativno niskoj pH vrijednosti njihova prisutnost može se utvrditi i na Arktiku i Antarktiku. U suhim tlima *Azotobacter* u obliku cista može preživjeti i do 24 godine. Rod *Azotobacter* otkrio je 1901. godine Beijerick.



Slika 2. *Azotobacter*

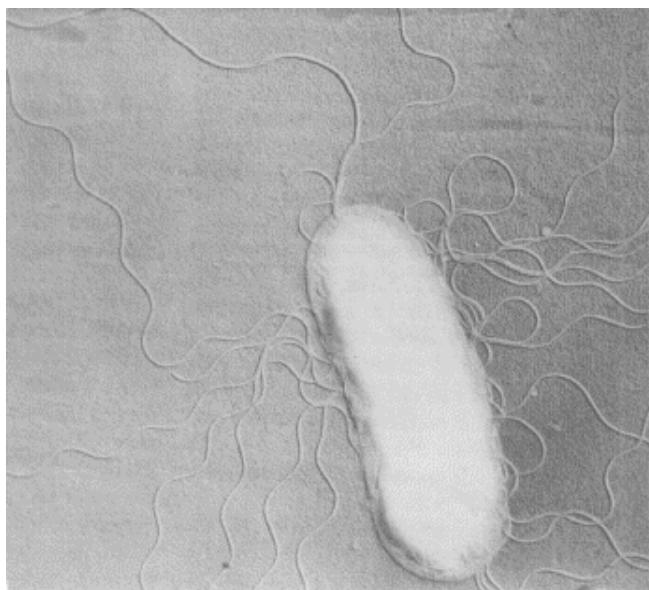
[spp.http://en.wikipedia.org/wiki/Azotobacter#/media/File:Azotobacter\\_cells.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/Azotobacter#/media/File:Azotobacter_cells.jpg)

## 7. Rod *Azospirillum* spp.

### 7.1. Osnovne karakteristike

Bakterije roda *Azospirillum* su aerobne, vrlo pokretne bakterije, Gram-negativne, štapićastog oblika, promjera 1  $\mu\text{m}$ , a dužine 2,1-3,8  $\mu\text{m}$ , često sa šiljastim krajevima. Pripadaju redu *Rhodospirillales*. Pokreću se bičevima. U tekućem mediju pokreću se uz pomoć jednog bića, dok se u čvrstom mediju, pri temperaturi od 30° C formiraju bočni bičevi. Optimalne temperature za bakterije ovog roda kreću se od 35° do 37° C (Tarrand et al., 1978.)

Ovi asocijativni fiksatori dušika imaju sposobnost usvojiti dušik iz atmosfere, a aktivne su na samoj površini korijena biljke. Svojom aktivnošću potiču rast biljaka, a time i povećanje prinosa (Bashan and Levanony, 1990.; Bashan, 1993.; Okon and Labandera-Gonzales, 1994.; Bashan and Holguin, 1995.). Znatno povećanje prinosa postiže se kombinacijom inokulanata *Azospirillum* i *Rhizobium* (Singh and Subba Rao, 1979.). Mogu se koristiti kod većine poljoprivrednih kultura, kao i u različitim područjima i klimatskim regijama. Obitavaju u područjima umjerenog klimata, kao i u tropskim područjima. Otkrio ih je nizozemski mikrobiolog i botaničar Martinus Beijerinck 1922. godine, koji je također jedan od osnivača mikrobiologije okoliša. *Azospirillum* predstavlja jedne od najbolje karakterizirane slobodno živeće diazotrofe koji povoljno djeluju na biljke (Bashan and Holguin, 1997.).



Slika 3. *Azospirillum brasilense*

<http://dosselaere.be/pictures/azospirillum.gif>

## 7.2. Značaj asocijativnih nitrofikatora roda *Azospirillum*

Direktne koristi koje biljka ima od benefitnih bakterija rodova *Azotobacter* i *Azospirillum* (Brown, 1974.; Okon and Itzigsohn, 1995.) su :

- poboljšanja u razvoju korijena
- povećanje usvajanja vode i mineralnih hraniva
- biološka fiksacija dušika
- dislociranje patogenih gljiva i bakterija iz rizosfere korijena

Također utječu na brojnost populacije korisnih mikroba, te pravce mikrobioloških procesa u tlu, a time na njegovu plodnost. Njihovom primjenom smanjuje se upotreba dušičnih gnojiva, čime se čuva i povećava organska tvar tla, odnosno njegova kvaliteta (Cvijanović i sur., 2007.).

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

- *Azospirillum lipoferum*
- *Azospirillum brasilense*

Kroz daljnja istraživanja utvrđeno je još 8 vrsta:

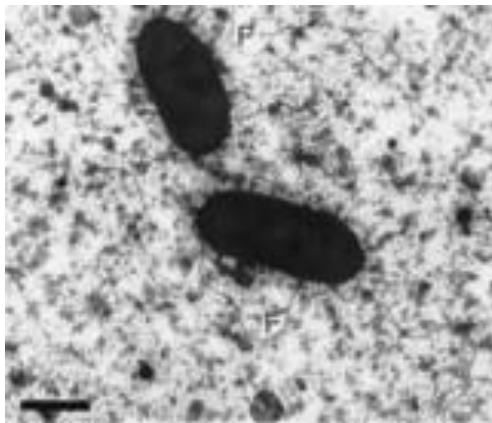
- *A. amazonense* (Magalhaesi i sur., 1983.)
- *A. halopraeferens* (Reinhold i sur., 1987.)
- *A. irakense* (Khammas i sur., 1989.)
- *A. largimobile* (Dekhil i sur., 1997.)
- *A. doebereineriae* (Eckert i sur., 2001.)
- *A. oryzae* (Xie i sur., 2005.)
- *A. melinis* (Peng i sur., 2006.)
- *A. canadensis* (Mehnaz i sur., 2007.)

Od navedenih vrsta najznačajnije i najčešće istraživane su *A. lipoferum* i *A. brasilense*. *Azospirillum* spp. je jedan od najčešćih diazotrofa u rizosferi i koristi se kao inokulant u proizvodnji kukuruza. U istraživanjima Mrkovači i sur. (2012.) dokazano je da koristeći *A. lipoferum* i *A. indigena* kao inokulant, oni utječu na povećanje prinosa kukuruza.

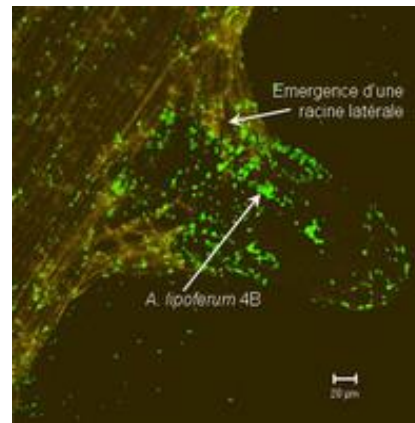
Inokulacija *A. brasilense* i vezikularno - arbuskularne mikorize (VAM) pokazalo je značajan rast korijena, apsorpcije fosfora kod prosa, kao i povećanje prinosa kod ječma (Subba Rao i sur., 1985.). *Azospirillum lipoferum* je prvi put izoliran na polju riže 1982.

Dobra hranjiva podloga joj je glukoza i fruktoza. Optimalna temperatura za razvoj *A. lipoferum* je 30°-41°C (Okon, 2000.). *Azospirillum* je primarni komercijalni fitostimulator za inkoulaciju žitarica u svijetu. Primjerice, u Meksiku je veliki broj usjeva kukuruza uspješno inokulirano ovim bakterijama.

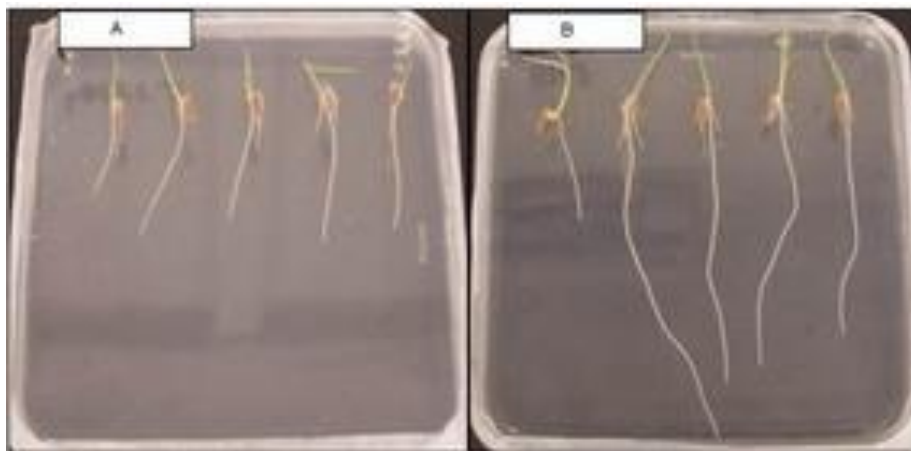
Proučavana je sposobnost fiksacije dušika, te utjecaj na rast i razvoj korijena riže. Na slici 6. je prikazan rezultat inokulacije korijena riže. Slika 6. lijevo prikazuje biljke koje nisu inokulirane, dok je na slici 6. desno prikazan rezultat inokulacije riže sa bakterijom *A. lipoferum*. Vidljiv je značajan porast korijena koji je inokuliran bakterijom u odnosu na biljke koje nisu inokulirane. Ovim istraživanjem dokazan je povoljan utjecaj bakterije *A. lipoferum* na rast korijena, a time i bolju opskrbu vodom i mineralima (<http://www.genoscope.cns.fr/spip/-Azospirillum-lipoferum-.html>).



Slika 4. Prijenos elektrona *A. lipoferum* uzgajanoj na tekućoj podlozi



Slika 5. Kolonizacija korijena riže *A. lipoferum*



Slika 6. Utjecaj inokulacije *A. lipoferum* na rast korijena riže

<http://www.genoscope.cns.fr/spip/-Azospirillum-lipoferum-.html>

Cvijanović i sur. istraživali su utjecaj određenih vrsta asocijativnih fiksatora dušika u proizvodnji kukuruza i pšenice, kao i simbiotske i asocijativne fiksatore dušika u proizvodnji soje na osnovne elemente biogenosti zemljišta pri različitim dozama mineralnog dušika. Sjeme pšenice inokulirano je smjesom iste količine različitih asocijativnih fiksatora vrste *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum lipoferum*, *Brijerinckia Derox*, *Klebsiella planticola*. Kod soje inokulacija sjemena obavljena je smjesom navedenih asocijativnih sa simbioznih bakterija roda *Bradyrhizobium japonicum*. Sjeme kukuruza inokulirano je smjesom slijedećih vrsta: *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandi*, *Azospirillum lipoferum*, *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*. Uz sve agrotehničke mjere, obavljene kvalitetno i u optimalnim rokovima, gnojidbom je dodano: za pšenicu 80, 120, 160 kg N/ha, soju 40, 60, 80 kg N/ha, te kukuruz 60, 90, 120, 150 kg N/ha.

Rezultati dobiveni istraživanjem pokazali su da je primjena rizobakterija koje fiksiraju atmosferski dušik u ratarskoj i povrtlarskoj kulturi pogodna. Rizobakterije koje žive na korijenu leguminoza ili na korijenu neleguminoznih biljaka utječu stimulatивно na rast biljaka, te produkciju bioloških tvari (vitamini, hormoni, giberelini i auksini).

Kod kukuruza najveću brojnost i postotak povećanja ispitivanih parametara utvrđen je pri gnojidbi od 90 kgN/ha, dok je najveći intenzitet disanja tla utvrđen pri dozi od 60 kgN/ha. S povećanjem doza mineralnog dušika vrijednosti parametara biogenosti tla bile su niže.

Kod pšenice pri dozi gnojiva sa 80 kg N/ha, utvrđena je najveća brojnost azotobaktera i intenzitet ukupne enzimatske aktivnosti, odnosno disanje tla.

Brojnost azotobaktera se koristi kao indikator biogenosti tla, jer burno reagira na promjenu bilo kojeg faktora u tlu kao ekosustavu. Na osnovu dinamike oksidoredukcijskih procesa u tlu može se utvrditi intenzitet razlaganja svježije organske tvari, kao i procesa humifikacije, što utječe na visinu prinosa i kvalitetu zrna pšenice (Cvijanović et al., 2007.).

Rezultati kod soje pokazali su najveće vrijednosti ispitivanih parametara pri primjeni 40 kg N/ha što upravo dokazuje da je potrebno pri proizvodnji soje obaviti gnojidbu sa količinom mineralnog dušika do 40 kg/ha, kao startno gnojivo.

Ove vrste rizobakterija u biofertilizaciji mogu se primijeniti kao pojedinačni sojevi određene vrste ili kao smjesa sojeva jedne ili više vrsta u različitim formama. Najčešće se primjenjuju nanošenjem na sjeme (inokulacija sjemena) neposredno pred sjetvu, putem navodnjavanja sustavom kap po kap, ili aplikacijom u tlo. Moraju imati dobru sposobnost preživljavanja u novoj sredini, dobre kompetitivne odnose sa biljkom domaćinom i autohtonom mikrobnom populacijom u tlu. Zato se vrši njihova selekcija u laboratorijama na osnovu dugogodišnjih istraživanja u zatvorenim i otvorenim prostorima.

Tablica 2. Utjecaj asocijativnih nitrofixatora i mineralnog dušika na elemente biogenosti tla kod kukuruza (Cvijanović, 2007.)

Količina gnojiva kg N/ha	Ukupan broj mikroorganizama		Brojnost azotobaktera		Dehidrogenazna aktivnost	
	$10^7 \cdot g^{-1} \text{soil}$	Indeksni nivo	$10^1 \cdot g^{-1} \text{soil}$	Indeksni nivo	$\mu g \text{TPF} \cdot g^{-1} \text{soil}$	Indeksni nivo
60	355	100	174	100	526	100
90	412	116.05	180	103.45	438	83.27
120	302	85.07	98	56.32	440	83.65
150	158	44.50	57	32.75	113	21.78
Prosjek N 60-150	291	81.87	112	64.17	330	62.80

Tablica 3. Utjecaj asocijativnih nitrofixatora i mineralnog dušika na elemente biogenosti tla kod pšenice (Cvijanović, 2007.)

Količina gnojiva kg N/ha	Ukupan broj mikroorganizama		Brojnost azotobaktera		Dehidrogenazna aktivnost	
	$10^7 \cdot g^{-1} \text{soil}$	Indeksni nivo	$10^1 \cdot g^{-1} \text{soil}$	Indeksni nivo	$\mu g \text{TPF} \cdot g^{-1} \text{soil}$	Indeksni nivo
0	239	100	265	100	553	100
80	254	106	352	132	589	106
120	350	146	272	103	471	85
160	273	114	237	89	553	100
Prosjek N 0-160	292	122	287	108	537	97



Tablica 4. Utjecaj primjene smjese asocijativnih i simbioznih nitrofikatora i mineralnog dušika na elemente biogenosti tla kod soje (Cvijanović, 2007.)

Količina gnojiva kg N/ha	Ukupan broj mikroorganizama		Brojnost azotobaktera		Dehidrogenazna aktivnost	
	$10^7 \cdot g^{-1} \text{soil}$	Indeksni nivo	$10^1 \cdot g^{-1} \text{soil}$	Indeksni nivo	$\mu g \text{TPF} \cdot g^{-1} \text{soil}$	Indeksni nivo
0	218	100	378	100	505	100
40	251	115	346	93	549	109
60	180	82	331	87	608	120
80	179	82	266	70	589	117
Prosjek N 0-80	203	92	314	83	582	115

Na osnovu dobivenih rezultata navodi se da je biogenosti tla bila veća primjenom inokulata sa različitim rizobakterijama pri nižim dozama mineralnog dušika. Rezultati parametara biogenosti tla su u korelaciji sa rezultatima prinosa uzgojenih biljaka.

Najveći prinos kod kukuruza ostvaren je pri dozi mineralnog dušika od 60 kg N/ha, kod pšenice sa dozom od 120 kg N/ha, a kod soje pri dozi od 40 kg N/ha. U prosjeku veće doze mineralnog dušika su negativno utjecale na visinu prinosa uzgajanih biljaka (osim kod pšenice), pa je navedeno da su velike količine mineralnog dušika pri inokulaciji ekološki štetne i ekonomski neisplative (Cvijanović, 2007.).

Tablica 5. Utjecaj inokulanata na prinos kukuruza, pšenice i soje

Kukuruz			Pšenica			Soja		
kg N/ha	t/ha	Indeksni nivo	kg N/ha	t/ha	Indeksni nivo	kg N/ha	t/ha	Indeksni nivo
60	12.39	100	0	2.74	100	0	2.93	100
90	12.28	99.11	80	2.90	105.83	40	3.01	102.7
120	9.21	74.30	120	3.05	112.96	60	2.94	100.34
150	11.25	90.79	160	2.66	97.08	80	2.54	86.01
Prosjek N 60-150	10.91	88.07	Prosjek N 0-160	2.87	104.74	Prosjek N 0-80	2.85	97.26

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

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

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

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

*Azospirillum brasilense* fiksira atmosferski dušik u zoni korijena, obogaćujući tlo dušikom. Također producira hormone rasta auksine i citokinine koji utječu na morfologiju korijena, a time i poboljšavaju unos hranjivih tvari iz tla (Barea i sur., 2005.). Poboljšava klijavost, povećava imunitet biljke i prinos (El-Katatny, 2009.).

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

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

Mikroorganizmi su inokulirani u obliku slobodnih ili imobiliziranih zrna. Sva su svježe pripremljena zrna imala veću sposobnost enkapsulacije (EC % od suhih zrna), a enkapsulacija nije znatno utjecala na proizvodnju enzima.

Zrna sa stanicama bakterija ili plijesni uspješno su korištena u tri uzastopna ciklusa rasta u svježoj sterilnoj podlozi, pri čemu se poboljšala proizvodnja enzima. Zajedničkim je uzgojem *A. brasilense* i *T. harzianum* (slobodnih ili imobiliziranih), u polučvrstoj podlozi bez dušika, omogućena fiksacija dušika i nakon dodavanja pektina, hitina ili karboksimetil celuloze. Dodatkom ovih izvora ugljika u sterilnu zemlju povećavala se fiksacija dušika, bilo uporabom suhih enkapsuliranih zrna *A. brasilense*, bilo primjenom *A. brasilense* uz plijesan *Trichoderma* (El-Katatny, 2009.).

Tablica 6. Utjecaj inokulacije pojedinih mikroorganizama, te smjese na rast rajčice kod suhog zrna, te kod zrna nakon vlaženja (El-Katatny, 2009.)

	Visina stabljike (cm)	Širina (mm)	Duljina korijena (cm)	Masa suhog/g		Masa vlažnog/g	
	Visina stabljike (cm)	Širina (mm)	Duljina korijena (cm)	Stabljika	Korijen	Stabljika	Korijen
Suho sjeme				Stabljika	Korijen	Stabljika	Korijen
Bez inokulacije	06.0±0.7	0.8±0.2	2.0±0.4	0.20±0.07	0.05±0.01	0.02±0.01	0.005±0.002
<i>T. harzianum</i> T24	06.5±0.9	1.5±0.4	2.5±0.2	0.38±0.10	0.07±0.02	0.02±0.01	0.008±0.002
<i>A. brasilense</i> Az	13.0±1.1	2.2±0.7	8.5±1.2	0.90±0.20	0.20±0.06	0.05±0.01	0.060±0.010
T24+Az	09.0±0.8	1.1±0.2	4.0±0.8	0.32±0.10	0.08±0.03	0.02±0.01	0.020±0.007
Vlažno sjeme							
Bez inokulacije	6.0±0.6	0.8±0.2	2.0±0.4	0.25±0.07	0.06±0.01	0.02±0.01	0.005±0.002
<i>T. harzianum</i> T24	9.0±0.9	1.5±0.3	3.0±0.5	0.37±0.07	0.11±0.02	0.03±0.01	0.020±0.002
<i>A. brasilense</i> Az	8.5±0.9	1.5±0.3	4.5±0.8	0.35±0.08	0.10±0.05	0.03±0.01	0.030±0.010
T24+Az	10.0±1.4	2.0±0.4	5.0±0.8	0.60±0.10	0.11±0.04	0.04±0.01	0.031±0.010

Primjenom svih vrsta inokuluma povećan je rast mladica rajčice, a prisutnost *A. brasilense* ubrzala je razvoj korijenja. Koinokulacija bakterije *Azospirillum* s drugim mikroorganizmima ima veliku mogućnost primjene u obogaćivanju tla i pospješivanju rasta biljaka (El-Katatny, 2009.).

Kristek i sur. (2012., 2013.) proučavali su utjecaj nitrofiksirajućih bakterija na elemente prinosa i kvalitete soje.

Pokusi su provedeni na dva tipa tla: humoglej i eutrično smeđe tlo tijekom 2012. i 2013. godine. Istraživan je utjecaj simbiotskih, asocijativnih i slobodnih nitrofiksirajućih bakterija na prinos i kvalitetu zrna soje sorte Ika. Pokus je postavljen po randomiziranom blok rasporedu u 4 ponavljanja i 6 varijanti (A1 – kontrola; A2 – sjeme tretirano bakterijom *B. japonicum*; A3 – sjeme tretirano bakterijama *B. japonicum*, *A. brasilense* i *A. chroococcum*; B1 – mineralna gnojidba dušikom na osnovi analiza tla: B2 – reducirana mineralna gnojidba za 30%; B3 – reducirana mineralna gnojidba za 60%). Najbolji rezultati na humogleju ostvareni su varijantom A3B3, a na eutričnom smeđem tlu varijantom A3B2.

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

Kombinirana inokulacija sjemena soje bakterijama *B. japonicum*, *A. brasilense* i *A. chroococcum* u svim istraživanim varijantama ostvarila je značajno više vrijednosti istraživanih parametara u odnosu na kontrolnu varijantu i varijantu u kojoj je sjeme tretirano isključivo simbiotskim bakterijama *B. japonicum* (Kristek i sur., 2012., 2013.).

## 8. Primjena korisnih bakterija u ekološkoj proizvodnji

Primjenom zaštitnih sredstava i umjetnih gnojiva značajno se narušavaju prirodna svojstva tla. Tla nam se zakiseljavaju, postaju teže obradiva i osiromašena sa florom i faunom. Treba znati da na jednom hektaru površine u tlu postoji 20-30 t živih organizama, od toga oko 5 t bakterija koji nadopunjuju i vežu se za međusobni život i rad. Njihov život i opstanak isključivo ovisi o proizvođaču koji gospodari površinom (<http://zki.hr/?task=group&gid=19>). Smatra se da će razvoj poljoprivrede u ovom vijeku biti zasnovan na konceptima koje predviđaju značajne primjene u tehnologiji uzgoja usjeva i oplemenjivanju biljaka koji bi doprinijeli boljem uspostavljanju ekološke ravnoteže i stabilnosti prirodnih resursa u agroekosustavu. Takav način uzgoja biljaka mora biti zasnovan na ekonomsko efektivnoj osnovi. U taj koncept se u potpunosti uklapa biofertilizacija. Ona predstavlja unošenje živih mikroorganizama u zemljište sa ciljem poboljšanja opskrbe biljaka neophodnim nutritijentima. Na ovaj način može se poboljšati opskrba biljaka dušikom, fosforom, kalijem, željezom, sumporom, ali i stimulirati rast korijena.

Unošenjem ovih bakterija u rizosferu biljaka ubrzavaju se procesi transformacije organske tvari i biljci se omogućuju potrebna hraniva. Pored dušika rast biljaka direktno zavisi od fosfora, a on je najčešće prisutan u zemljištu u formama koje su nepristupačne biljkama. Bakterije iz roda *Bacillus* i *Azotobacter* mogu sintetizirati organske kiseline i fosfataze koje će nepristupačan fosfor prevesti u biljkama pristupačnu formu. Kalij koji je u zemljištu "zarobljen" u obliku alumosilikata, zahvaljujući aktivnosti bakterijama iz roda *Bacillus*, postaje pristupačan biljkama. Neke bakterije zahvaljujući prisustvu siderofora doprinose snabdjevanje biljaka željezom. Također je poznato da bakterije iz roda *Pseudomonas* mogu transformirati organske forme sumpora u neorganski i na taj način ga učiniti pristupačnim za biljke.

Mikrobiološka gnojiva spadaju u tzv. bio-gnojiva. Sadrže izabrane i ispitane vrste mikroorganizama iz tla – bakterije, gljive ili modro-zelene alge. Ti korisni mikroorganizmi su „uzeti iz prirode“, ali su proizvedeni kao čiste kulture u laboratorijskim uvjetima za mikrobiološka gnojiva ([www.pinova.hr](http://www.pinova.hr))

Sve ovo ukazuje da se primjenom mikrobioloških gnojiva koja u sebi sadrže miješane populacije mikroorganizama može poboljšati opskrbu biljaka neophodnim hranivima uz istovremeno očuvanje životne sredine i proizvodnju zdravstveno neophodne hrane. Pored toga ove bakterije imaju sposobnost sinteze biljnih hormona kao što su giberalina, auksina, čime se dodatno stimulira biljni rast i utječe na otpornost biljaka.

Unošenjem mikrobioloških gnojiva u zemljište utječe se na tok i usmjeravanje mikrobioloških procesa u zemljištu što će uticati na rast, razvoj biljaka, ali i na zemljište. Neki od mikroorganizama koji su uneseni u zemljište odlikuju se mogućnosti sinteze sluzavih materija koje igraju značajnu ulogu u sljepljivanju mikroagregata što doprinosi formiranju fine strukture zemljišta. Nakon izumiranja mikroorganizama unesenih u zemljište povećava se ukupna biomasa, a efekti će se odraziti u slijedećoj vegetaciji. Povećanjem organske biomase dovesti će do povećanja plodnosti zemljišta i stvaranje biljkama neophodnih mineralnih nutritijenata. Stoga primjena mikrobioloških gnojiva ima svoje mjesto u suvremenoj konvencionalnoj, ali i organskoj poljoprivrednoj proizvodnji.

Rezultati mnogobrojnih znanstvenih istraživanja pokazali su da se gnojiva kemijskog porijekla zbog sadržaj toksičnih tvari mogu dovesti u vezu sa neželjenim efektima koje djeluju na zdravlje ljudi, reprodukciju, probleme sa krvlju i jetrom kao i na pojavu hiperaktivnosti djece. Ne smije se zanemariti negativan utjecaj koji prekomjerna upotreba ovih gnojiva ima na životnu sredinu.

Upravo je to razlog zbog kojeg znanstvenici svoju pažnju usmjeravaju prema prirodnim alternativama, biofertilizatorima. Osnovu biofertilizatora čine bakterije koje direktnim ili indirektnim djelovanjem pozitivno utječu na rast biljke i porast usjeva, a vrlo se jednostavno nanose na površinu biljke, sjemena ili zemlje. Biofertilizatori su organskog porijekla i unapređuju primarnu poljoprivrednu proizvodnju popravljanjem fizičkih svojstava zemljišta na koje se koriste, njegovu plodnost i produktivnost. Činjenica da se njihovom upotrebom smanjuje količina kemikalija u poljoprivrednoj proizvodnji.

## 9. Preparati u ekološkoj proizvodnji

### Bactofil (A 10 i B 10)

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

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

Bactofil B10 sadrži *Azospirillum brasilense*, *Azobacter vinelandi*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus roseus* varijacije, makro i mikro elemente, te pomoću mikroorganizama sintetizirane enzime i druge djelatne tvari. Koristi se za širokolisne biljke, npr. grah, suncokret, repa, djeteline, u povrćarstvu, cvjećarstvu, voćarstvu, te vinogradarstvu.

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

Najbolji rezultati prinosa korijena repe ( $t\ ha^{-1}$ ), sadržaja šećera u repi (%) i prinosa čistog šećera ( $t\ ha^{-1}$ ) kod tla T-1 dobiveni su u varijanti 2, kod primjene  $0,5\ l\ ha^{-1}$  BactoFil-a u jesen +  $1,0\ l\ ha^{-1}$  BactoFil-a u proljeće (Kristek i sur., 2007., 2008.).

Varijanta 4, primjena  $1,0\ l\ ha^{-1}$  BactoFil-a u jesen +  $0,5\ l\ ha^{-1}$  BactoFil-a u proljeće je kod tla T-2 dala najbolje rezultate, međutim nije bilo statistički značajnih razlika



( $p > 0,01$ ) između navedene varijante 4 i varijante 5 ( $1,5 \text{ l ha}^{-1}$  BactoFil-a u jesen) (Kristek i sur., 2007., 2008.)

## Mikro-Vital

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

## 10. Primjena korisnih bakterija u budućnosti

Budući se u zadnjim desetljećima intenzivno prihranjivalo samo umjetnim gnojivima, što je dovelo do drastičnog pada broja bakterija i drugih mikroorganizama u tlu, ponegdje je palo samo na 1/10 od normalnog broja. Novi hibridi u ratarskim kulturama su većeg i snažnijeg nadzemnog i podzemnog dijela kako bi osigurali mogućnost većeg prinosa. Tako se javlja veća biomasa koju je potrebno razgraditi. Međutim zbog nedostatka i osiromašene mikroflore (bakterija i gljivica) ti biljni ostaci humificiraju se kroz 2-4 godine (kukuruzovina, stabljika suncokreta). Takvo stanje za sobom povlači negativne posljedice jer svi ti nerazgrađeni biljni ostaci su samo izvor hrane za patogene gljive i bakterije koje iz godine u godinu pospješuju i pridonose bolestima i ujedno gubicima u proizvodnji što za samog proizvođača može značiti veliki gubitak pa čak i propadanje (<http://zki.hr/?task=group&gid=19>). Budući je raznim istraživanjima dugi niz godina utvrđeno djelovanje korisnih bakterija, odnosno bakterija koje potiču rast biljaka (PGPR), poljoprivrednim proizvođačima pruža se obećavajuće rješenje za održivu i ekološki prihvatljivu poljoprivredu. Primjene ovih bakterija kao biofertilizatora smanjuje se potencijalan negativan utjecaj na okoliš, hranu, a time i zdravlje ljudi (Denton, 2007.). Primjena PGPR na biljkama daje obećavajuće rezultate u budućnosti (Ali and Hj, 2010.). Jasno je da PGPR sojevi promiču rast biljaka djelovanjem različitih mehanizama, koji još nisu detaljno istraženi, ali se nastoje utvrditi u bliskoj budućnosti.

## 11. Zaključak

Tlo predstavlja ogroman životni prostor za kopnene mikroorganizme, koji čine 0,1 do 3% cjelokupne organske tvari u tlu. Osnovna uloga mikroorganizama je mineralizacija organske tvari, sudjeluju u kruženju tvari i energije u prirodi, transformacija organske tvari i stvaranje humusa, a zatim mineralizacija humusa. Veliki značaj u biljnoj proizvodnji imaju bakterije koje slobodno žive u tlu i imaju dobar interakcijski odnos sa biljkama. Toj grupi bakterija pripadaju rizobakterije koje mogu obavljati fiksaciju dušika, te vežu organske i anorganske tvari. Dušik je važan element u ishrani biljaka. Biljke ga mogu usvojiti u nitratnom i amonijskom obliku. U prirodi postoji kružni tok dušika gdje je atmosfera izvor dušika kojega u tlo transformiraju mikroorganizmi prilikom procesa koji se naziva fiksacija dušika. Zemljišni mikroorganizmi vrše pretvorbu organskih oblika dušika u anorganske oblike koje mogu koristiti biljke i mikroorganizmi. Nedostupan dušik iz atmosfere se kroz proces fiksacije veže u nove spojeve te na taj način postaje dostupan mikroorganizmima i biljkama da ih iskoriste za svoje metaboličke potrebe.

Biološka fiksacija dušika je proces u kojem posebne skupine mikroorganizama usvajaju elementarni dušik iz atmosfere i preko enzima nitrogenaze ga reduciraju do amonijaka. Biološki fiksatori dušika procesom vezanja atmosferskog dušika opskrbljuju biljku reduciranim dušikom, a od nje uzimaju tvari potrebne za svoj razvoj. Sposobnost usvajanja elementarnog dušika iz zraka ima nekoliko rodova mikroorganizama (bakterije i cijanobakterije), a dijele se na simbiozne, asimbiozne i asocijativne. Asocijativna fiksacija dušika predstavlja prijelaz između simbiozne i slobodne fiksacije dušika. Asocijativni fiksatori aktivni su na površini korijena, a ovim fiksatorima pripadaju bakterije roda *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella*. Bakterije roda *Azospirillum* imaju važnu ulogu kao nitrofikatori.

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

- svojom aktivnošću potiču rast biljaka, a time i povećanje prinosa
- mogu se koristiti kod većine poljoprivrednih kultura, kao i u različitim područjima i klimatskim regijama
- poboljšavaju rast i razvoj korijena
- povećavaju usvajanja vode i mineralnih hraniva

- utječu na brojnost populacije korisnih mikroba
- utječu na mikrobiološke procese u tlu
- u smjesi sa drugim korisnim bakterijama daju dobre rezultate na rast korijena biljaka
- pozitivni učinci na prinos utvrđeni su kod ratarskih i povrtlarskih kultura
- kombinirane inokulacije leguminoza s bakterijama roda *Rhizobium* i rodova *Azotobacter* i/ili *Azospirillum* imaju pozitivan učinak na težinu i broj kvržica, te na količinu usvojenog dušika
- poboljšavaju usvajanje P i/ili K kod kukuruza, pšenice, sirka i riže, te utječu na promjenu ravnoteže makro i mikrohraniva kod pšenice i soje
- utječu stimulatивно na rast biljaka, te produkciju bioloških tvari (vitamini, hormoni, gibberelini i auksini)

Primjenom bakterija roda *Azospirillum* spp. u poljoprivrednoj proizvodnji omogućava se opskrba biljaka potrebnim hranivima, posebno dušikom. Također se pospješuje rast korijena, a time i razvoj biljke, što za rezultat ima zadovoljavajuće prinose, te proizvode visoke kvalitete.

## 12. LITERATURA

1. Arora, N.K. (2001.): Plant microbes Symbiosis: Applied Facets, Department of Environmental Microbiology, Babasaheb Bhimrao Ambedkar University: 2-25
2. Bhattacharyya, P. N.; Jha, D. K. (2011.): Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture, *World J Microbiol Biotechnol* (2012.) 28:1327–1350
3. Creus, C. M.; Graziano, M.; Casanovas, E. M., Pereyra, M.A.; Simontacchi, M.; Puntarulo, S.; Barassi, C. A.; Lamattina, L. (2005.) : Nitric Oxide is Involved in the *Azospirillum brasilense*-induced Lateral Root Formation in Tomato ; *Planta* (2005.) 221: 297–303
4. Cvijanović, G.; Milošević, N.; Branislava T.; Dozet, G; Ivić, M. (2007.): Značaj primene rizobakterija u biljnoj proizvodnji
5. Dalla Santa, R. O.; Fernández Hernández, R.; Michelena Alvarez, G.L.; Ronzelli Junior, P.; Socol, C. R. (2004.): *Azospirillum* sp . inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments; *Laboratório de Processos Biotecnológicos; Universidade Federal do Paraná, Braz. arch. Biol. technol. vol.47 no.6 Curitiba Nov. 2004.*
6. Eckert, B.; Baller Weber, O.; Kirchof, G.; Halbritter, A.; Stoffels, M.; Hartmann, A.: *Azospirillum doebereinae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2001.), 51, 17–26
7. El-Katany, M. H.(2010.): Enzyme Production and Nitrogen Fixation by Free, Immobilized and Coimmobilized Inoculants of *Trichoderma harzianum* and *Azospirillum brasilense* and Their Possible Role in Growth Promotion of Tomato, *Food Technol. Biotechnol.* 48 (2) 161–174 (2010)
8. El-Komy, H.M.A (2004.): Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for Successful Phosphorus and Nitrogen Nutrition of Wheat Plants, *Food Technol. Biotechnol.* 43 (1) 19–27 (2005.)
9. Holguin, G.; Bashan, Y. (1996.): Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Stafilococcus* sp.): *Soil Biol. Biochem.* Vol. 28, No. 12, pp. 1651-1660, 1996.
10. Kristek, S.; Kristek, A.; Kraljićak, Ž.; Jović, J.; Antinac, I. ; Greger, Ž.(2012.-2013.): Utjecaj nitrofikirajućih bakterija na elemente prinosa i kvalitete soje, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku
11. Kristek, S.; Kristek, A.; Pintar, I.; Tetkić, J.; Kocevski, D. (2007.- 2008.): Utjecaj primjene mikrobiološkog preparata BactoFil-a na prinos i kvalitet šećerne repe, Poljoprivredni fakultet u Osijeku
12. Lugtenberg, B.; Kamilova, F. (2009.): *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria* (2009.), Leiden University, Institute of Biology (2009.)
13. Milošević, N.; Marinković, J.: Uloga mikroorganizama u adaptaciji poljoprivrednih biljnih vrsta na abiotičke stresove, Institut za ratarstvo i povrtlarstvo Novi Sad
14. Okon, Y. (1994.): *Azospirillum/plant associations*, CRC press, str. 16.
15. Tupol, J. i Kanižaj Šarić, G. (2013.): Simbiotska fiksacija dušika u ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji; *Agronomski glasnik*, 2-3/2013.

## Knjige

1. Kristek, S. (2007.): Agroekologija, Interna skripta, Poljoprivredni fakultet Osijek.
2. Milaković, Z. (2013.): Opća mikrobiologija, Interna skripta, Poljoprivredni fakultet Osijek.
3. Vukadinović, V. i Vukadinović, V. (2011.): Ishrana bilja, Poljoprivredni fakultet Osijek.
4. Škvorc, Ž.; Ćosić, T.; Sever, K. (2014.): Ishrana bilja, Interna skripta, Šumarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
5. Škvorc, Ž.; Sever, K.; Franjić, J. (2013.): Fiziologija šumskog drveća, Interna skripta, Šumarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

## Web izvori:

<http://www.asunion.rs/yu/biofertilizacija.php>

<http://www.genoscope.cns.fr/spip/-Azospirillum-lipoferum-.html>

<http://web2.uwindsor.ca/courses/biology/fackrell/Microbes/2150.htm>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Azotobacter>

<http://www.agroeko.net/index.php/agro-teme-clanci/288-biotehnologijom-zasnovanom-na-ekoloskim-principima-ka-postizanju-visokih-prinosa>

[http://pinova.hr/hr\\_HR/aktualno/mikrobioloska-gnojiva](http://pinova.hr/hr_HR/aktualno/mikrobioloska-gnojiva)

<http://zki.hr/?task=group&gid=19>

### 13. SAŽETAK

Rizobakterije stimulatивно djeluju na rast biljaka, te smanjuju ili štite biljke od bolesti, a najčešće se označavaju kao PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). U prirodi postoji kružni tok dušika gdje je atmosfera izvor dušika kojega u tlo transformiraju mikroorganizmi prilikom procesa koji se naziva fiksacija dušika. Biološka fiksacija dušika je proces u kojem posebne skupine mikroorganizama usvajaju elementarni dušik iz atmosfere i reduciraju do amonijaka. Asocijativni fiksatori aktivni su na površini korijena, a ovim fiksatorima pripadaju bakterije roda *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella*. Bakterije roda *Azospirillum* imaju važnu ulogu kao nitrofikatori. Svojom aktivnošću potiču rast biljaka, poboljšavaju rast i razvoj korijena, povećavaju usvajanje vode i mineralnih hraniva, utječu na mikrobiološke procese u tlu. Također utječu na produkciju bioloških tvari.

## 14. SUMMARY

Rhizobacteria stimulate plant growth, and reduce or protect plants from disease, most often referred as PGPR ( Plant Growth Promoting Rhizobacteria ). In nature there is a roundabout where the nitrogen source is a nitrogen atmosphere in which the microorganisms in the soil transform process called nitrogen fixation. Biological nitrogen fixation is a process in which specific groups of microorganisms adopt elemental nitrogen from the atmosphere and reduced to ammonia. Associative fixators are active on the surface of the root, and the fixators belong to bacteria of the genus *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella*. Bacteria of the genus *Azospirillum* play an important role as nitrofixing. Its activities stimulate the growth of plants, enhance the growth and development of roots, increasing the adoption of water and mineral nutrients, affect the microbiological processes in soil. Also affect the production of biological substances.

## 15. Popis slika i tablica

Slika 1. Kruženje dušika u prirodi, str. 6.

Slika 2. *Azotobacter*, str. 14.

Slika 3. *Azospirillum brasilense*, str. 15.

Slika 4. Prijenos elektrona *A. lipoferum* uzgajanoj na tekućoj podlozi, str. 17.

Slika 5. Kolonizacija korijena riže *A. lipoferum*, str. 17.

Slika 6. Utjecaj inokulacije *A. lipoferum* na rast korijena riže, str. 17.

Tablica 1. Podjela PGPR s obzirom na mehanizme djelovanja, str. 3.

Tablica 2. Utjecaj asocijativnih nitrofixatora i mineralnog dušika na elemente biogenosti tla kod kukuruza, str. 19.

Tablica 3. Utjecaj asocijativnih nitrofixatora i mineralnog dušika na elemente biogenosti tla kod pšenice, str. 19.

Tablica 4. Utjecaj primjene smjese asocijativnih i simbioznih nitrofixatora i mineralnog dušika na elemente biogenosti tla kod soje, str. 20.

Tablica 5. Utjecaj inokulanata na prinos kukuruza, pšenice i soje, str. 20.

Tablica 6. Utjecaj inokulacije pojedinih mikroorganizama te smjese na rast rajčice kod suhog zrna, te kod zrna nakon vlaženja, str. 23.



**Uloga *Azospirillum* spp. kao asocijativnog nitrofikatora**

Marina Bučar

**Sažetak:**

Rizobakterije stimulatивно djeluju na rast biljaka, te smanjuju ili štite biljke od bolesti, a najčešće se označavaju kao PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). U prirodi postoji kružni tok dušika gdje je atmosfera izvor dušika kojega u tlo transformiraju mikroorganizmi prilikom procesa koji se naziva fiksacija dušika. Biološka fiksacija dušika je proces u kojem posebne skupine mikroorganizama usvajaju elementarni dušik iz atmosfere i reduciraju do amonijaka. Asocijativni fiksatori aktivni su na površini korijena, a ovim fiksatorima pripadaju bakterije roda *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella*. Bakterije roda *Azospirillum* imaju važnu ulogu kao nitrofikatori. Svojom aktivnošću potiču rast biljaka, poboljšavaju rast i razvoj korijena, povećavaju usvajanje vode i mineralnih hraniva, utječu na mikrobiološke procese u tlu. Također utječu na produkciju bioloških tvari.

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

**Mentor:** Prof.dr.sc. Suzana Kristek

**Broj stranica:** 35

**Broj grafikona i slika:** 6

**Broj tablica:** 6

**Broj literaturnih navoda:** 27

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** rizobakterije, fiksacija dušika, asocijativni fiksatori, *Azospirillum* spp.

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Prof.dr.sc. Gordana Bukvić, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Suzana Kristek, mentor
3. Jurica Jović, mag.ing.agr., član

**Rad je pohranjen u:** Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilište u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d.

**BASIC DOCUMENTATION CARD****Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Graduate thesis****Faculty of Agriculture Osijek****University Graduate Studies, course Vegetables and flower production****The role of *Azospirillum* spp. like nitrogen fixing associative bacteria**

Marina Bučar

**Abstract:**

Rhizobacteria stimulate plant growth, and reduce or protect plants from disease, most often referred as PGPR ( Plant Growth Promoting Rhizobacteria ). In nature there is a roundabout where the nitrogen source is a nitrogen atmosphere in which the microorganisms in the soil transform process called nitrogen fixation. Biological nitrogen fixation is a process in which specific groups of microorganisms adopt elemental nitrogen from the atmosphere and reduced to ammonia. Associative fixators are active on the surface of the root, and the fixators belong to bacteria of the genus *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella*. Bacteria of the genus *Azospirillum* play an important role as nitrogen fixing. Its activities stimulate the growth of plants, enhance the growth and development of roots, increasing the adoption of water and mineral nutrients, affect the microbiological processes in soil. Also affect the production of biological substances.

**Thesis performed at:** Faculty of Agriculture in Osijek**Mentor:** Prof.dr.sc. Suzana Kristek**Number of pages:** 35**Number of figures:** 6**Number of tables:** 6**Number of references:** 27**Number of appendices:** 0**Original in:** Croatian**Key words:** rhizobacteria, nitrogen fixation, associative fixators, *Azospirillum* spp.**Thesis defended on date:****Reviewers:**

1. Prof.dr.sc. Gordana Bukvić, president
2. Prof.dr.sc. Suzana Kristek, supervisor
3. Jurica Jović, mag.ing.agr., member

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