Fenotipska karakterizacija autohtonih sojeva kvržičnih bakterija koje noduliraju soju

Skendrović, Nika

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:709057

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA AUTOHTONIH SOJEVA KVRŽIČNIH BAKTERIJA KOJE NODULIRAJU SOJU

DIPLOMSKI RAD

Nika Skendrović

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA AUTOHTONIH SOJEVA KVRŽIČNIH BAKTERIJA KOJE NODULIRAJU SOJU

DIPLOMSKI RAD

Nika Skendrović

Mentor: prof. dr. sc. Sanja Sikora

Neposredni voditelj: Sanja Kajić, mag. biol. mol.

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Nika Skendrović**, JMBAG 0178087114, rođen/a 13.08.1992. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA AUTOHTONIH SOJEVA KVRŽIČNIH BAKTERIJA KOJE NODULIRAJU SOJU

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Nike Skendrović**, JMBAG 0178087114, naslova

FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA AUTOHTONIH SOJEVA KVRŽIČNIH BAKTERIJA KOJE NODULIRAJU SOJU

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:		potpisi:
1. prof. dr. sc. Sanja Sikora	mentor	_____
Sanja Kajić, mag. biol. mol.	neposredni voditelj	_____
2. prof. dr. sc. Ana Pospišil	član	_____
3. doc. dr. sc. Aleksandra Perčin	član	_____

Zahvala

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Sanji Sikori na uloženom trudu i stručnoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se neposrednoj voditeljici, asistentici Sanji Kajić, mag.biol.mol., na velikom strpljenju, prenesenom znanju, podršci i velikoj pomoći tijekom istraživanja i pisanja rada.

Sažetak

Simbiozni odnos kvržičnih bakterija i mahunarki ima važnu ulogu u poljoprivrednoj proizvodnji. Veliku važnost ima odabir sojeva koji su otporni na stresne uvjete u tlu. Danas se sve više susrećemo s ekstremnim vremenskim uvjetima te je od velike važnosti selekcija visoko učinkovitih sojeva kvržičnih bakterija, kako bi predsjetvena bakterizacija sjemena mahunarki bila uspješna. Glavni cilj rada je utvrditi fenotipske karakteristike sojeva kvržičnih bakterija izoliranih iz kvržica soje u uvjetima koji su izvan optimalnih vrijednosti za njihov rast. Sposobnost rasta sojeva istražen je na različitim pH vrijednostima, temperaturama, koncentracijama soli, izvorima ugljikohidrata i testirana je osjetljivost na određene antibiotike. Provedena su oksidaza, ureaza, i katalaza testovi, ispitana je mobilnost fosfata, sposobnost korištenja citrata te hidroliza škroba. Istražene su morfološke karakteristike izolata, te otpornost na fitopatogene gljive iz roda *Phomopsis*. Uzorci tla za izolaciju sojeva su prikupljeni s područja Koprivničko – križevačke, Bjelovarsko – bilogorske i Vukovarsko – srijemske županije. Istraživanjem je obuhvaćeno 18 izolata simbioznih fiksatora dušika soje, te pet tipskih i jedan referenti soj. Utvrđeno je da su svi ispitani izolati gram negativne, štapićaste bakterije koje ne sadrže kapsule. Rezultati su pokazali da većina ispitanih izolata tolerira rast u lužnatim i kiselim sredinama te mogu rasti na temperaturi od 37 °C. Svi izolati pokazali su dobar rast na različitim izvorima ugljikohidrata (galaktoza, laktoza, dekstroza, saharoza, maltoza, rafinoza i fruktoza), dok su referentni sojevi većinom pokazali znatno slabiji rast. Izolati sa područja Koprivničko – križevačke županije jedini su pokazali mogućnost rasta na podlogama koje sadrže značajno povećani sadržaj soli (1 %, 2 % i 3 % NaCl-a). Oksidaza testom dokazano je da 40 % izolata posjeduje enzim citokromoksidazu. Sve bakterije koje posjeduju enzim citokromoksidazu koriste kisik kao terminalni akceptor elektrona u disanju. Sposobnost hidrolize škroba pokazalo je 60 % ispitanih izolata.

Jedan od osnovnih problema koji donosi povećanje površina i intenzivna proizvodnje soje svakako je problem bolesti i to prije svega bolesti uzrokovanih fitopatogenim gljivama na koje otpada oko 80 % svih bolesti soje. U istraživanju antagonističke aktivnosti izolata prema pojedinim gljivama 6 od 18 izolata pokazalo otpornost na fitopatogene gljive iz roda *Phomopsis*. Dobiveni rezultati ukazuju na značaj selekcije autohtonih sojeva.

Ključne riječi: soja (*Glycine max L.*), kvržične bakterije, fenotipska karakterizacija sojeva, biokemijski testovi

Summary

The symbiosis of nodule bacteria and legumes plays a very important role in agricultural production. It is essential that the highly effective strains that are resistant to various unfavorable conditions in the soil are chosen. Today we are increasingly faced with extreme weather, so the selection of highly efficient strains of rhizobia is of great importance to the success of legumes seed inoculation.

The aim of this study is to determine the phenotypic characteristics of nodule bacteria isolated from soybean nodules under conditions that are beyond the optimum value for their growth. The growth of the strains was studied at different pH values, temperatures, concentrations of salts, carbohydrate sources and resistance to antibiotics. The oxide, the urease, and catalase of test and of phosphate mobility were made. Furthermore, the ability to use citrate and starch hydrolysis was investigated. The resistance to phytopathogenic fungus isolates from genus *Phomopsis* and the morphologic characteristics were performed as well. The soil samples were collected from the counties Koprivničko – križevačka, Bjelovarsko – bilogorska and Vukovarsko – srijemska. Eighteen isolates of symbiotic soybean fixators, five types and one referent strain were included in the study.

It was found that all the tested isolates were gram negative, stinging bacteria that did not contain capsules. Most of the tested isolates tolerated alkaline and acidic environment and they can be grown at the temperature of 37 °C. Furthermore, all the isolates showed good growth on different sources of carbohydrates (galactose, lactose, dextrose, sucrose, maltose, raffinose and fructose), and on the other hand, the reference strains showed a much weaker growth. The isolates from the area of Koprivnica - Križevci County were the only ones that showed the possibility of growth on substrates containing significantly increased salt content (1 %, 2 % and 3 % NaCl). Forty percent of the tested isolates possess the cytochrome oxidase enzyme by examining the test oxidase. All bacteria that possess the cytochrome oxide enzyme use oxygen as the terminal electron acceptor in breathing. The ability of starch hydrolysis showed 60 % of the tested isolates.

One of the basic problems which occurs more intensive soybean production is definitely a disease problem. First of all, diseases were caused by phytopathogen funguses, causing about 80 % of all soybean disease. In the study of the antagonistic activity of isolates, according to individual funguses, 6 of all 18 isolates showed the resistance to the phytopathogen funguses *Phomopsis*. The obtained results indicate the importance of selection of autochthonous strains.

Keywords: soybean (*Glycine max L.*), nodule bacteria, phenotypic characteristics of strains, biochemical tests

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. PREGLED LITERATURE 3
2.1. Soja (Glycine max (L.) Merr.) 3
2.1.1. Morfološka svojstva 3
2.1.2. Agroekološki uvjeti za uzgoj soje 8
2.1.3. Proizvodnja soje u svijetu i Hrvatskoj 8
2.2. SIMBIOZNI FIKSATORI DUŠIKA 9
2.2.1. Kvržična bakterija Bradyrhizobium japonicum 11
2.2.2. Utjecaj ekoloških faktora na kvržične bakterije 11
3. CILJ ISTRAŽIVANJA 13
4. MATERIJALI I METODE 14
4.1. Pedološke analize 14
4.2. Izolacija autohtonih sojeva rizobija 18
4.3. Morfološka karakterizacija autohtonih sojeva 20
4.3.1. Bojanje po Gram-u 20
4.3.2. Bojenje vanjskih bakterijskih struktura 20
4.3.3. Izgled kolonija 21
4.4. Biokemijski testovi 21
4.4.1. Katalaza test 21
4.4.2. Ureaza test 21
4.4.3. Oksidaza test 22
4.4.4. Sposobnost korištenja citrata 22
4.4.5. Sposobnost bakterija da hidroliziraju škrob 23
4.5. utjecaj ekoloških faktora na rast kvržičnih bakterija 24
4.5.1. Rast sojeva na različitim temperaturama 24
4.5.2. Rast sojeva na različitim koncentracijama soli 24
4.5.3. Rast sojeva na različitim pH vrijednostima 24
4.5.4. Istraživanje osjetljivosti sojeva na antibiotike 24
4.5.5. Rast sojeva na različitim izvorima ugljikohidrata 25
4.6. PGP karakteristike izolata 25
4.6.1. Antagonistička aktivnost izolata prema pojedinim gljivama 25
4.6.2. Ispitivanje proizvodnje flourescentnog pigmenta 26
4.6.3. Razgradnja fosfora P – solubilizacijom 26
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I RASPRAVA 28
5.1. Analize tla 28
5.2. Morfološka karakterizacija 33
5.2.1. Bojanje po Gram-u 33
5.2.2. Postupak bojenja vanjskih bakterijskih struktura 33
5.2.3. Rast izolata na YMA podlozi 34
5.3. Biokemijski testovi 36
5.3.1. Katalaza test 36
5.3.2. Ureaza test 36
5.3.3. Oksidaza test 38
5.3.4. Sposobnost korištenja citrata 39

5.3.5. SPOSOBNOST BAKTERIJA DA HIDROLIZIRAJU ŠKROB 39
5.4. UTJECAJ EKOLOŠKIH FAKTORA NA RAST KVRŽIČNIH BAKTERIJA 41
5.4.1. RAST SOJEVA NA RAZLIČITIM TEMPERATURAMA 41
5.4.2. RAST SOJEVA NA RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA SOLI 42
5.4.3. RAST SOJEVA NA RAZLIČITIM PH VRIJEDNOSTIMA 43
5.4.4. ISTRAŽIVANJE OSJETLJIVOSTI SOJEVA NA ANTIBIOTIKE 45
5.4.5. RAST SOJEVA NA RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJIKOHIDRATA 47
5.5. PGP KARAKTERISTIKE IZOLATA 50
5.5.1. ANTAGONISTIČKA AKTIVNOST IZOLATA PREMA PARAZITSKIM GLJIVAMA RODOVA *DIAPORTHE SPP.* I *PHOMOPSIS SP.* 50
5.5.2. ISPITIVANJE PROIZVODNJE FLOURESCENTNOG PIGMENTA 51
5.5.3. RAZGRADNJA FOSFORA – P SOLUBILIZACIJA 51
6. ZAKLJUČCI 54
7. LITERATURA 57
8. ŽIVOTOPIS 61

1. UVOD

Soja, *Glycine max (L.)* Merr., je biljka koja pripada starim ratarskim kulturama koje se uzgajaju više od 4.000 godina. Jedna je od značajnijih kultura u svijetu koja ima široku primjenu u brojnim industrijama no prvenstveno se upotrebljava u ljudskoj prehrani. Iz sjemenke soje, proizvodi se ulje kao prehrambeni proizvod, dok u ishrani životinja predstavlja gotovo nezamjenjivu sirovinu biljnog podrijetla bogatu bjelančevinama (Vratarić i Sudarić, 2008.). U Hrvatskoj soja s vremenom postaje sve važnija kultura, ali njena proizvodnja još uvijek ne zadovoljava sve potrebe. Namjere su proizvesti sorte soje koje daju bolji prinos te povećati proizvodnju. Domaća poljoprivredna proizvodnja soje u procesu je prilagođavanja agrarnoj politici Europske unije, koja daje prednost intenzivnijem uzgoju soje u odnosu na tradicionalni uzgoj pšenice i kukuruza koji u Republici Hrvatskoj zauzimaju najveći dio poljoprivrednih površina. Većom zastupljenošću soje u strukturi domaće poljoprivredne proizvodnje utjecalo bi se, između ostalog, na intenzivniji razvoj ostalih industrijskih grana, među kojima je važno spomenuti proizvodnju jestivog ulja, vegetarijanskih proizvoda te stočarsku proizvodnju (Jukić i sur., 2007.). Poznato je kako je uz vodu dušik osnovni limitirajući čimbenik za uzgoj većine poljoprivrednih kultura, a jedan od glavnih izvora dušika u tlima je biološka fiksacija dušika (Redžepović i Sikora, 2006). Za poljoprivrednu proizvodnju najznačajnija je simbiozna fiksacija dušika koja nastaje kao rezultat simbioze između biljka iz porodice *Fabaceae* (mahunarke ili leguminoze) i kvržičnih bakterija iz rodova *Rhizobium, Bradyrhizobium, Sinorhizobium, Allorhizobium, Mesorhizobium* i *Azorhizobium* jer se putem ovih simbioznih odnosa fiksiraju najveće količine dušika (Vance, 2002). Preduvjet za uspješnu bakterizaciju mahunarki je primjena visoko kvalitetnih sojeva kvržičnih bakterija. Prirodne populacije kvržičnih bakterija značajno se razlikuju i u svojim fenotipskim karakteristikama te je ispitivanje navedenih svojstava također značajno za selekciju sojeva (Blažinkov i sur., 2010.). U svrhu toga utvrđuju se fenotipska svojstva kvržičnih bakterija. U tlima mogu prevladavati nepovoljni uvjeti koji mogu ograničiti uspjeh predsjetvene bakterizacije. Prema nekim predviđanjima poljoprivreda je sektor koji će pretrpjeti najveće štete od posljedica klimatskih promjena. Ekstremne vremenske pojave: suša, poplave, izrazito visoke ili niske temperature, tuča, vjetrovi i dr., uzrokuju velike gospodarske štete sektoru poljoprivrede te smanjuju njen proizvodni potencijal (Znaor, 2009.). Pojava bolesti na soji može utjecati na kvalitetu i količinu uroda. Različite vrste saprofitnih i parazitnih gljiva mogu se izolirati sa stabljika, mahuna i sjemena soje. Danas je poznato više od 50 vrsta patogenih gljiva koje parazitiraju soju i prezimljuju na žetvenim ostatcima, a njihov značaj pri uzgoju u širokoj proizvodnji različit je

(Vratarić i Sudarić, 2000.). Procjenjuje se da su gubitci od bolesti u prvih deset zemalja najvećih proizvođača soje oko 22%.

Nazočnost parazita na površini ili u unutrašnjosti sjemena može uzrokovati probleme prilikom klijanja i nicanja ili u kasnijim razvojnim fazama te u znatnoj mjeri utjecati na biološku vrijednost, kondiciju, vitalnost biljaka i prinos. Neki od uzročnika bolesti soje determinirani su i na korovima, koji u odsutnosti soje mogu biti kao alternativni domaćini (Heperrley i sur., 1980., Roy i sur., 1997., Vrandečić i sur., 2006.). Značajnija zaraza sjemena s *Diaporthe/Phomopsis* vrstama nastaje između početak zriobe i puna zrioba, a topla i vlažna ljeta pogodna su za širenje infekcije (Hepperly i Sinclair, 1980., McGee, 1986.).

Bakterije koje pospješuju rast biljaka kroz razne faktore nazivaju se PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) bakterije. Neki od tih faktora su; proizvodnja fitohormona, fiksacija dušika, regulacija proizvodnje etilena u korijenu, otapanje hranjiva (npr. fosfata), proizvodnja siderofora, te smanjenje toksičnosti teških metala. Koristi dodavanja PGPR bakterija su: povećana klijavost, rast korijena, veći prinos (sjeme, listovi), povećani sadržaj klorofila, magnezija, dušika i proteina, veća otpornost na sušu, veću masu izdanka i korijena i odgođeno starenje listova.

Identifikacija bakterija uključuje niz identifikacijskih postupaka u kojoj određivanje fenotipskih karakteristika spada u skupinu vrlo bitnih. Identifikacija se zasniva na tome da se bakterije međusobno razlikuju i da su fenotipske karakteristike pojedinih baterijskih vrsta uglavnom postojane. Premda su razlike u biokemijskim osobinama bakterija iznimno brojne, istražuju se one koje su što stalnije kod svih ii barem većine bakterija pripadnika iste vrste ili podvrste. Određivanje fenotipskih svojstava uključuje morfološka i biokemijska svojstva, utjecaj ekoloških faktora na rast kvržičnih bakterija i PGPR karakteristike izolata. Vrlo često veliki dio autohtonih sojeva pokazuje veću otpornost prema uvjetima vanjske sredine.

Pretpostavlja se da u različitim područjima Republike Hrvatske postoje autohtoni sojevi kvržičnih bakterija koji noduliraju soju a da se međusobno značajno razlikuju unutar prirodnih populacija kvržičnih bakterija.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Soja (Glycine max (L.) Merr.)

Soja, *Glycine max (L.)* Merr. je biljka koja pripada porodici mahunarki (*Fabaceae*). Sjeme soje može se koristiti za ishranu ljudi i stoke te u razne industrijske svrhe. Najvažnija je uljarica na svijetu, a od osam glavnih uljarica kojima se trguje na svjetskim tržištima, proizvodnja soje je dvostruko veća od bilo koje druge uljarice od 1970. godine (Keyser i Li, 1992.).

2.1.1. Morfološka svojstva

Sjeme soje je različitog oblika, veličine i boje što ovisi o sorti i načinu uzgoja. Kakvoća sojinog sjemena određuje važnost i značaj soje. Sjeme soje sadrži 35 – 50 % bjelančevina, 15 – 24 % ulja, 30 % i više ugljikohidrata i vitamina, što ovisi o uvjetima uzgoja te o sortnim osobinama. Sjeme može biti okruglog, ovalnog, jajastog oblika te na krajevima blago spljošteno. Veličina i krupnoća sjemena ovisi o sorti i agroekološkim pokazateljima. Sjeme je sastavljeno od embrija obavijenog sjemenskom opnom. Embrio se sastoji od dva kotiledona, plumule s dva primarna listića koji zatvaraju primordij prvog lista, epikotila, hipokotila i korjenčića (Vratarić i Sudarić, 2008.). Boja sjemenke je različita kod različitih sorata, može biti žute, zelene, smeđe i crne boje ili kombinacija navedenih boja (Slika 1.). Za preradu najpoželjnijom se smatra sjeme soje svijetložute boje.



Slika 1. Sjeme soje

(izvor: http://www.organiccentar.rs/baza-proizvoda/soja.html)

Soja je biljka koja ima jaki korijenski sustav koji se sastoji od jakog glavnog vretenastog korijena i velikog broja sekundarnog korijenja, rasprostranjenog u različitim dubinama tla. Na korijenu soje se formiraju kvržice koje sadrže bakterije iz roda *Bradyrhizobium japonicum*. Soja živa u simbioznom odnosu s baterijama u kojem soja osigurava bakterijama hranjive tvari, a bakterije vežu dušik iz zraka koji biljka koristi za svoj rast i razvoj. Na taj način se smanjuje potreba za dušičnim gnojivima, te se je stoga soja vrlo poželjna kultura u plodoredu (Pospišil, 2010). Korijen može biti dubine do 180 cm, glavni korijen nalazi se u gornjem sloju tla na dubini i širini do 30 cm, a ovisi o tipu tla i sorti gdje se apsorbiraju hranjiva i fiksira dušik u vrijeme rasta i razvoja. Značajka korijena je da raste dok raste i nadzemna stabljika. Dobro razvijeni korijen povećava broj zrna po biljci, lisnu masu i otpornost prema suši, te u konačnom urodu sjemena po jedinici površine (Vratarić i Sudarić, 2008.). Veličina i rasprostranjenost korijena i broj kvržica na njemu značajno utječe na konačni urod sjemena sojine biljke (Mitchell i Russel, 1971.).

U Hrvatskoj visina biljke soje iznosi 90-110 cm, a u odnosu na ukupni varijabilitet visine stabljike što se smatra srednjom visinom. Kultivari niže stabljike (do 60 cm) nisu poželjni za široku proizvodnju jer otežavaju žetvu i imaju niske urode u odnosu na kultivare srednje visine stabljike. Kultivari s izrazito visokom stabljikom (preko 120 cm) isto tako nisu poželjni za široku proizvodnju, jer su skloni polijeganju, često obolijevaju, što usporava sazrijevanje, otežava žetvu te dovodi do konačno nižih uroda (Sudarić i sur., 1997.).

Kvržice (nodule)

Stvaranje kvržica (nodula) na korjenu biljaka rezultat je udruživanja većine leguminoznih biljaka iz porodice *Fabaceae* i kvržičnih bakterija (rizobija) na temelju simbiozne fiksacije dušika. Kvržične bakterije su karakteristične bakterije tla koje imaju sposobnost inficiranja korjenovih dlačica leguminoza i stvaranja efikasnih kvržica (Slika 2.) gdje se odvija sama fiksacija. U ovom simbioznom odnosu biljke (makrosimbionti) svoje produkte fotosinteze daju bakterijama (mikrosimbiontima) koje šećere koriste kao izvor energije za proces biološke fiksacije dušika (Fox i sur., 2007). Dva do tri tjedna nakon infekcije korijena, bakterije počinju fiksirati dušik i sposobne su hraniti biljku dušikom. Četiri tjedna nakon infekcije najveći je promjer kvržica te je intenzivno fiksiranje dušika. Promjer kvržica je od 3 do 6 mm, a njihova aktivnost traje od 50 do 60 dana. Rastom i razvojem korjena biljke soje postupno se razvijaju i kvržice pa se na razvijenoj biljci mogu naći kvržice svih veličina i starosti. Najviše se razvijaju na glavnom korijenu i u plićem sloju (15-20 cm dubine) (Vratarić i Sudarić, 2008.). Količine

dušika koje mogu biti vezane pomoću kvržičnih bakterija kreću se od 100 – 300 kg od čega bakterije 75 % ostavljaju biljkama, a 25 % koriste za svoje potrebe.
Na aktivnost bakterija utječu fizikalna i kemijska svojstva tla posebno pH jer se bakterije slabo razvijaju u kiselim tlima, klimatski pokazatelji (temperatura i oborine), prozračnost tla, agrotehnika i gnojidba tla (posebice oblik gnojidbe dušikom).



Slika 2. Korijen soje sa kvržičnim bakterijama

(izvor:https://media.tumblr.com/49cf076ab5a75b756d5cadeadc8e9ee2/tumblr_inline_mqq04rWvgo1qz4rgp.jpg)

Kod soje razlikujemo dva habitusa rasta, indeterminirani ili nedovršeni i determinirani ili dovršeni. Prema novijoj podjeli razlikujemo još i poludeterminirani tip rasta. Cvatnja kod indetermiriranog tipa rasta počinje na petom-šestom nodiju. Biljka postepeno raste i cvijeta, rast prestaje tek pred fiziološku zriobu. Rodnost prema vrhu stabljike je slabija, dok je stabljika visoka sa velikim brojem nodija. Sorte determiniranog tipa rasta najprije narastu više od 80 % svoje visine, zatim procvjetaju na svim nodijima. Poslije početka cvatnje, nakon nekoliko dana prestaje rast biljke. Stabljike determiniranog tipa rasta su nešto niže od stabljika nedeterminiranog tipa rasta, ali imaju veću mogućnost ganjanja. Poludeterminirani tip rasta nalazi se između gore navedena dva tipa rasta. Prestanak vegetativnog rasta dolazi ranije nego kod indeterminiranog tipa, ima kraću stabljiku s manjim brojem nodija, ali su nodiji rodniji u završnom dijelu stabljike.

Razlikujemo četiri tipa sojinih listova: kotiledoni, jednostavni primarni listovi, troliske i zalisci. Primarni ili jednostavni listovi formirani su u sjemenci i dobro su razvijeni kada klijanac izbija na površinu. Primarni listovi su jednostavni, dužina peteljke iznosi od 1-2 centimetra a položeni su jedan nasuprot drugome na stabljici. Svi listovi kako na glavnoj

stabljici tako i na granama, su troliske i poredani su na naizmjenično na stabljici. Uglavnom su podjednake veličine, a broj im se kreće prosječno između 15 do 20 listova po biljci. Veličina im varira od 4 do 20 cm po duljini i 3 do 10 cm po širini. Oblik listova varira između širokolisnih i uskolisnih. Boja listova varira od blijedozelene do tamnozelene, prekrivenih dlačicama (Vratarić i Sudarić,2008.). U zriobi listovi postaju žuti, i otpadnu kod većine sorata. Listovi kod nekih kasnih sorata zadržavaju zelenu boju i ne otpadaju.

Cvijet soje veličine je od tri do osam milimetara, formira se na svakom pazušću lista na stabljici i granama. Boja cvjetova može biti ljubičasta, bijela ili kombinacija bijelo ljubičaste boje (Slika 3.). Soja stvara puno više cvjetova nego što se može razviti u mahune i opadanje cvjetova je normalna pojava kod soje. Postotak otpadanja cvjetova uvjetovan je genetskim i vanjskim čimbenicima. Pojava otpadanja cvjetova kod soje kreće se od 30 do 80 % (Vratarić, 1983). Cvjetovi soje su tipične građe za leguminoze, a sastavljeni su od čaške, vjenčića, prašnika i tučka. Čaška je cjevasta i završava s pet nejednakih lapova te ostaje neoštećena do stvaranja mahune. Vjenčić ili corolla sastoji se od odvojenih latica. Soja je samooplodna biljka s malim postotkom stranooplodnje (0,5-1%), cvjetovi se oprašuju uglavnom prije otvaranja. Otvaranje cvjetova je rano ujutro. Klimatski stresovi (hladno vrijeme, visoke temperature i dr.) mogu značajno djelovati na cvatnju i oplodnju soje.



Slika 3. Cvijet soje

(izvor: http://pinova.hr/hr_HR/baza-znanja/ratarstvo/soja/morfologija-soje)

Mahuna soje može biti srpastog, okruglog ili spljoštenog oblika. Plod značajno varira po veličini i na istoj biljci, kao i između sorata. Oblik mahune vezan je za broj i oblik sjemenki, što ima više sjemenki mahune su duže, ako je sjeme okruglo plod je tada okrugao. Plod sadrži

jedno do pet sjemena, ali većina sorata u prosjeku sadrži dva do tri sjemena mahuna. Mahune u sezoni rasta su zelene boje (Slika 4.), u zriobi boja varira od svijetlo slamnatožute do crne. Povećane oborine i vlažnost tla djeluje na smanjenje opadanja broja mahuna po biljci uz razlike po sorti.



Slika 4. Mahuna soje

(izvor: https://bc-institut.hr/soja/buga/)

2.1.2. Agroekološki uvjeti za uzgoj soje

Soja odlično uspijeva na dubokim i strukturnim tlima te prozračnim i dobro navodnjavanim tlima čija je pH vrijednost neutralna te u svim proizvodnim područjima dobrim za uzgoj kukuruza. Može uspijevati i na manje plodnim tlima lošije strukture no tada je primjena agrotehničkih mjera drugačija. Za normalan rast i razvoj biljke pogodna su područja s minimalnim godišnjim oborinama između 600 i 700 mm/m^2. Najkritičnije razdoblje za formiranje mahune i nalijevanje sjemena su srpanj i kolovoz tijekom kojih bi za dobar prinos trebalo pasti najmanje 50 mm/m^2 oborina. U ranoj fazi rasta može podnijeti relativno niske temperature (do - 4 °C) uz pojavu mraza, dok je optimalna temperatura za razvoj i rast između 21 - 27 °C (http://pinova.hr/hr_HR/baza-znanja/ratarstvo/soja). Na pretjerano zbijenim, kiselim i alkalnim tlima neće doći do formiranja kvržica, a time neće doći ni do fiksacije dušika. Aluvijalni tip tla, odnosno tlo dobre strukture i neutralne reakcije (pH 7) su najpovoljniji za

razvoj kvržičnih bakterija. Temperature iznad 40 °C i ispod 20 °C znatno ograničavaju rast. Optimalno vrijeme sjetve soje je druga polovica travnja.

2.1.3. Proizvodnja soje u svijetu i Hrvatskoj

Soja je proširena u cijelom svijetu i sije se u više od 60 zemalja diljem svijeta. Sve zemlje svijeta koje imaju uvjete za proizvodnju soje nastoje unaprijediti i proširiti njenu proizvodnju, tako da je soja danas važna ekonomska i politička kultura (Vratarić i Sudarić, 2008.)

Od ratarskih kultura, soja je najznačajnija uljarica, udio sojinog ulja u ukupnoj svjetskoj proizvodnji ulja iznosi 35% (Vratarić i sur. 2008.). Vodeći proizvođač soje u svijetu je SAD te zatim slijede Brazil, Argentina, Indija i dr. (tablica 1.).

Tablica 1. Površina i urod soje u svijetu (FAOSTAT 2016)

DRŽAVA	POVRŠINA (ha)	UROD ZRNA (kg/ha)
SAD	33 482 430	3500
Brazil	33 153 679	2904
Argentina	19 504 648	3014
Indija	11 500 000	1218
Kina	6 640 882	1801
Paragvaj	3 370 000	2719
Kanada	2 190 500	2660
Ukrajina	1 859 400	2300
Bolivija	1 336 399	2398
Urugvaj	1 140 000	1936

Na području Hrvatske soja se prvi puta pojavljuje između 1876. i 1878. godine. Austrijski biokemičar Friedrich Haberlandt je u vrijeme Austro-Ugarske provodio pokuse od najsjevernijeg dijela Češke do Dubrovnika (Vratarić i Sudarić, 2008.). Tijekom Drugog svjetskog rata na prostorima Jugoslavije, uključujući i Hrvatsku, soju se proizvodilo za potrebe Njemačke na 12 000 - 17000 ha, a postizani su urodi zrna 1 400 - 1 600kg/ha (Hrustić i sur., 1998.). U Hrvatskoj nakon Drugog svjetskog rata pokušavalo se proizvoditi soju na većim površinama što se spominje u statističkim podacima od 1947. i 1954. godine s prosječnim prinosom od 730 kg/ha. Treba navesti činjenicu da je početak značajnog povećanja površina

zasijanih sojom, kako u Republici Hrvatskoj tako i u bivšoj Jugoslaviji, bio povezan s izgradnjom tvornica za preradu soje u Zadru i Beču (Vratarić i Sudarić, 2008.). Soja je gotovo nestala s naših površina nakon 1967. godine prvenstveno zbog ekonomskih problema (niski urodi, neprofitabilna proizvodnja i jeftinija sojina sačma i sjeme iz uvoza). Stabilnija proizvodnja soje počinje 1987. godine. Prema podacima od Državnog zavoda za statistiku (tablica 2.) u razdoblju od 2013. do 2017. godine vidljiv je rast površina na kojima se uzgaja soja.

Tablica 2. Proizvodnja soje u Hrvatskoj (Državni zavod za statistiku, 2017.)

Godina	Površina (ha)	Prosječni prinos (t/ha)	Proizvodnja (t)
2013.	47 156	2,4	111 316
2014.	47 104	2,8	131 424
2015.	88 867	2,2	196 431
2016.	78 614	3,1	244 075
2017.	85 000	2,4	208 000

2.2. Simbiozni fiksatori dušika

U simbioznoj fiksaciji dušika sudjeluju mikroorganizmi koji žive u simbiozi s leguminozama – kvržične bakterije. Beijerinck je 1888. godine prvi pokazao da kvržice (noduli) na korijenu mahunarki sadrže bakterije koje fiksiraju atmosferski dušik. Za poljoprivredna tla najznačajnija je simbiozna fiksacija dušika koja nastaje kao rezultat simbioze između bakterija iz rodova *Rhizobium, Bradyrhizobium, Sinorhizobium, Azorhizobium* i *Mesorhizobium* s većinom biljaka iz porodice *Fabaceae* (Topol i Kanižai Šarić, 2013.). Za poljoprivrednu proizvodnju vrlo je značajna simbioza kvržičnih bakterija iz rodova *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* i mahunarki čime se biološki veže atmosferski dušik koji se odmah koristi za sintezu bjelančevina i na taj način sprječava opasnost od onečišćenja podzemnih voda nitratima koja se inače javljaju kod intenzivne primjene mineralnih dušičnih gnojiva (Friščić i sur., 2011).

Kvržične bakterije soje su rasprostranjene širom svijeta, a njihova genetska raznolikost je stvorena zbog geografskih i klimatskih razlika (Saeki, 2011.). Procjenjuje se da se godišnje biološkom fiksacijom dušika veže više od 175 milijuna tona dušika, što čini više od 70 % ukupne količine fiksiranog dušika od čega na simbioznu fiksaciju otpada 50 % tj. 80 milijuna

tona dušika godišnje. Na stvaranje kvržica može utjecati i tekstura tla, pH tla, salinitet, temperatura (6 – 28 °C), vlažnost, aeracija i drugo (Howieson i Ballard, 2014.).

Soju noduliraju spororastuće kvržične bakterije *B. japonicum, B. elkanii, B. liaoningense, B. yuanmingense* a moguća je nodulacija i brzorastućih bakterija *Sinorhizobium (Enisfer) fredii* i *Sinorhizobium (Enisfer) xinjiangense* (Youseif i sur., 2014.).

Predstavnici roda *Bradyrhizobium* su štapićaste, gram negativne bakterije, veličine od 0,5 - 0,9 x 1,2 – 3,0 μm (Brenner i Krieg, 2006.). Spororastuće kvržične bakterije koje noduliraju soju nekada su se nazivale *Rhizobium japonicum* , kasnije su odvojene u rod *Bradyrhizobium* zbog sporog rasta (Maheshwari, 2014.). Generacijsko vrijeme 9 - 18 sati zatim nastaju manje kolonije oko 1 mm na površini hranjive podloge nakon uzgoja u laboratoriju u trajanju od 7 dana. *Bradyrhizobium* su asporogene i aerobne bakterije, za svoju ishranu iskorištavaju široki raspon ugljikohidrata i soli organskih kiselina. Optimalna temperatura rasta za većinu sojeva je od 25 - 30 °C, maksimalna temperatura rasta od 33 – 35 °C. Sojevi tolerantni na kiselost mogu rasti pri pH 4.5. Više od 30 % sojeva može rasti pri pH 4.0 čak i nekoliko sojeva može rasti pri pH 3.5. Rast je inhibiran kada je pH iznad 9.0, te ne mogu rasti u okolišu koji sadrži 2 % NaCl-a (Brenner i Krieg, 2006.).

2.2.1. Kvržična bakterija *Bradyrhizobium japonicum*

B. japonicum je štapićasta, gram-negativna, aerobna, pokretna, spororastuća bakterija. Živi u simbiozi sa sojom i formira kvržice na korijenu. Može fiksirati i do 180 kg dušika po hektaru. Ovisno od sorte soje i bakterijskog soja može se formirati oko 10-50 kvržica. Na poljoprivrednim tlima naših područja brojnost bakterije *B. japonicum* je mala, pa se prilikom proizvodnje soje mora unositi u tlo u vidu preparata za bakterizaciju (inokulaciju) soje u svrhu selekcija visoko učinkovitih sojeva koji se mogu prilagoditi na određene uvjete u tlu. Uspostavljanjem učinkovitijih simbioznih odnosa rezultat je bolji porast biljke, veći sadržaj proteina u sjemenu i veći prinos. Na našim područjima predsjetvena bakterizacija sjemena soje biopreparatima kvržičnih bakterija *B. japonicum.* smatra uobičajenom agrotehničkom mjerom. Zahvaljujući tome soja veže od 60 – 160 kg atmosferskog dušika po hektaru. Na opstanak inokuluma, kao i na formiranje kvržica na biljci, veliki utjecaj imaju fizikalno – kemijska svojstva tla (pH tla, vlažnost, salinitet, količina dušika u tlu, interakcija metala) (Redžepović i sur., 1990.a; 1990.b;1991.). Utvrđeno je kako no-tillage način povoljnije utječe na sposobnost nodulacije simbiotskih fiksatora dušika u odnosu na standardnu obradu tla (Jug i sur., 2005.). Bakterija *B. japonicum* se najčešće koristi za pripremu preparata za predsjetvena bakterizaciju

soje. Soja inokulirana s bakterijom *B. japonicum* tvori visoko učinkovite kvržice i često povećava prinos soje, posebno u područjima gdje se soja po prvi puta uzgaja (Caldwell i Vest, 1970.).

Primjena herbicida utječe inhibitorno i na simbiozne bakterije *B. japonicum* pri čemu dolazi do smanjenja nodulacije od 5 – 21 % (Milošević i sur., 2000.).

2.2.2. Utjecaj ekoloških faktora na kvržične bakterije

Klimatske promjene predstavljaju glavne zapreke u poljoprivredi u vrijeme kada se povećava svjetska populacija s time i potreba za hranom (Vadez i sur., 2011.). Klimatske promjene rezultirati će povećanim stresom suše. Nestašica vode je abiotički stres koji ograničava proizvodnju usjeva. Na primjer, umjereni deficit vode može smanjiti produkciju soje do 40 % (Manavalan i sur., 2009.). Vodni stres negativno utječe na formiranje kvržica i simbioznu fiksaciju dušika što dovodi do manjeg broja kvržica i smanjenja njihove aktivnost. Reakcija korijena soje na vodni stres je sljedeća: razvoj korijena u dubinu do dostupne vode i veći broj bočnog korijena što u konačnici rezultira povećanjem volumena korjenovog sustava (Manavalan i sur., 2009.). Suša ima nepovoljni učinak na kvržične bakterije. U fazi razvoja sjemena, suša uzrokuje maksimalno smanjenje uroda. U vrijeme stvaranje mahuna soja je najosjetljivija na nedostatak vode. Nedostatak vode u tom periodu može dovesti do smanjenja uroda sjemena osjetljivijih sorata od 40 do 60 %. Nedostatak oborine djelomično se može nadoknaditi agrotehnikom i gnojidbom te izborom odgovarajućeg tla. Za uzgoj soje preferiraju se tla lakšeg mehaničkog sastava i dobre strukture dok, teška tla s malim sadržajem vode treba izbjegavati.

Stres na biljku može imati više učinaka. Na primjer salinitet može djelovati kao vodeni stres koji utječe na fotosintezu ili može imati izravan učinak na metabolizam kvržica. Za kvržične bakterije najproblematičnija okruženja su: površine s niskim oborinama, ekstremnim temperaturama, kisela tla i slaba hranjiva u tlu.

Prema Havlin i sur. (2005.) kiselost tla može ograničiti opstanak i rast sojeva kvržičnih bakterija u tlu te time utjecati na proces stvaranja kvržica i fiksaciju dušika. Na rast korijena i produktivnost mahunarki drastično može utjecati pH tla na vrijednostima nižima od 5.5 (Havalin i sur., 2005.). Različite vrste bakterija imaju i različitu tolerantnost na pH. Brzorastući sojevi kvržičnih bakterija smatraju se manje tolerantnima na kiseli pH nego spororastući sojevi

Bradyrhizobium, iako su i neki brzorastući sojevi (npr. *R. loti* i *R. tropici*), pokazali dobru tolerantnost (Zahran, 1999.).

Mahunarke su osjetljivije na soli i osmotski stres nego kvržične bakterije u njihovom simbioznom odnosu. Povećana zaslanjenost inhibira početak simbioze između kvržičnih bakterija i mahunarki. Korijen soje, prilikom inokulacije s *B. japonicum* u prisustvo većih količina NaCl-a, deformira se, a nodulacija je inhibirana. Kvržične bakterije rodova *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* pokazuju više tolerantnosti na soli od njihovih domaćina. Mnoge vrste rizobija mogu se prilagoditi slanim uvjetima unutarstaničnim nakupljanjem otopljenih organskih tvari male molekularne mase a nazivaju se osmoliti (Zahran, 1999.).

Soja se smatra osjetljivom na poplave (Bacanamwo i Purcell, 1998.). Poplave u trajanju od samo 2 dana mogu smanjiti prinos soje za 18 % u kasnom vegetativnom stadiju rasta, u ranoj reproduktivnoj fazi do 26 %. Nedostatak kisika glavni je problem povezan s poplavama, smanjenje rasta i gubitak prinosa tijekom i nakon poplave može također nastati iz bolesti truleži korjena, nedostatka dušika ili hranjivom neuravnoteženošću (VanToai i sur., 2001).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja je utvrditi fenotipska svojstva autohtonih sojeva *B. japonicum*, bakterije koju karakterizira sposobnost stvaranja učinkovitih simbioznih zajednica sa sojom kako bi se mogli izabrati sojevi koji pokazuju najveću otpornost na nepovoljne agroekološke uvjete koji su često prisutni u području uzgoja soje u našoj zemlji.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Pedološke analize

Uzorci tla za izolaciju autohtonih sojeva rizobija sakupljeni su s poljoprivrednih površina koji se koriste za uzgoj ratarskih kultura. Slike 5., 6., 7. i 8. prikazuju karte regija, područja i lokacija uzorkovanja tla za izolaciju autohtonih sojeva *B. japonicum*. Uzorci su uzeti iz oraničnog horizonta dubine 0-30 cm sa 17 različitih lokacija, u proljeće 2017. godine, koje se nalaze na području Koprivničko – križevačke, Bjelovarsko – bilogorske i Vukovarsko – srijemske županije (Tablica 3.).

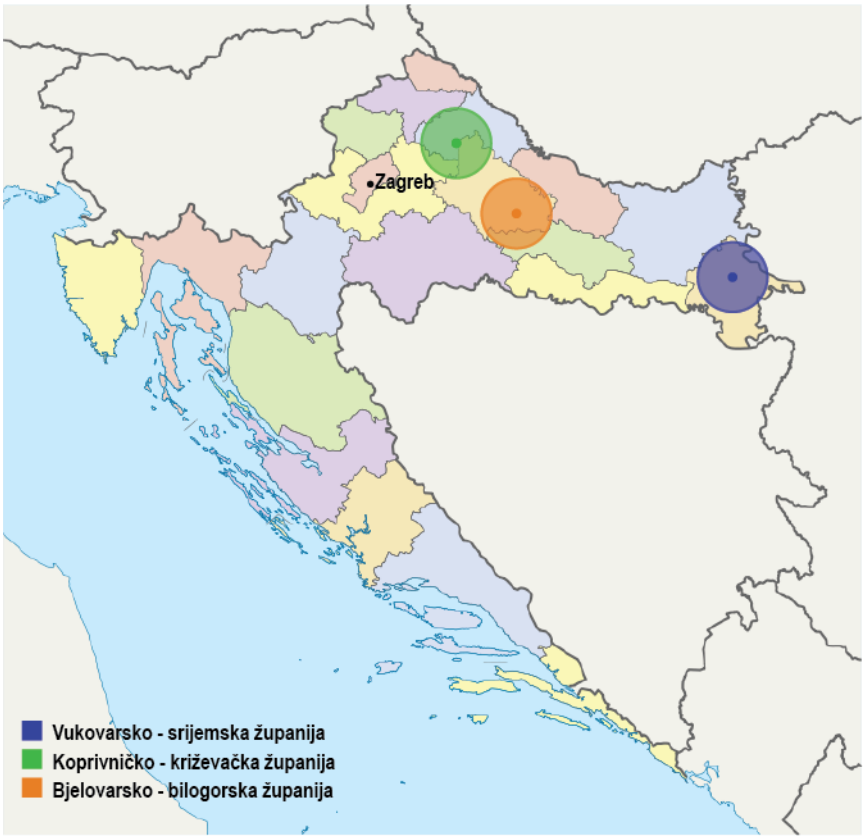
U Zavodu za pedologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu određene su fizikalno- kemijske karakteristike istraživanih tala te njihova sistematska pripadnost. Provedene analize obuhvatile su:

- priprema uzorka za fizikalno- kemijske analize prema HRN ISO 11464:2009.
- određivanja pH-vrijednosti tla u H_2O i 1M KCl-u (HRN ISO 10390:2005).
- određivanje količine humusa prema metodi po Tjurinu, JDPZ, 1966.
- određivanje fiziološki aktivnog P_2O_5 i K_2O (AL-metoda, JDZP, 1966.
- određivanje sadržaja ukupnog dušika suhim spaljivanjem, „elementarna analiza“ (HRN ISO 13878:2004).
- određivanje raspodjele veličine čestica (mehaničkog sastava) u mineralnom dijelu tla metodom prosijavanja i sedimentacije (modificirana HRN ISO 11277:2004).

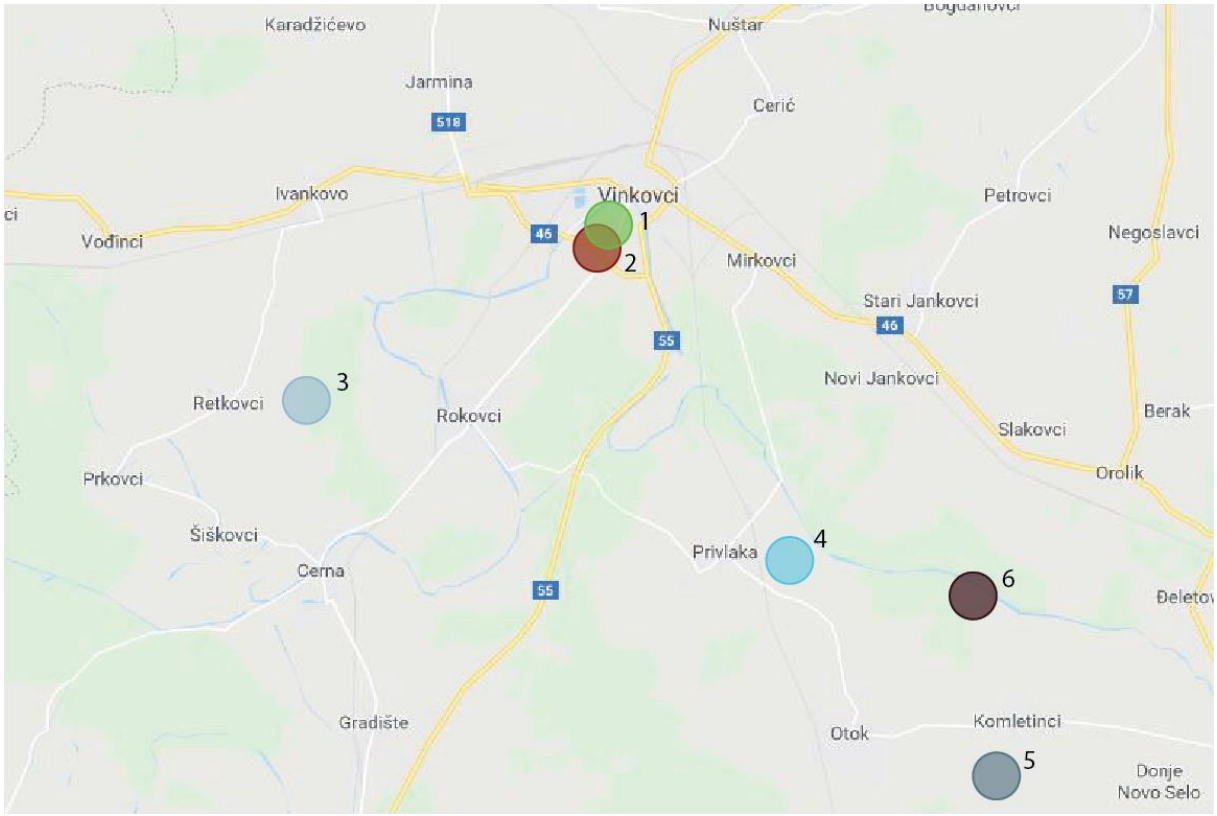
Tablica 3. Lokacije uzorkovanja tla

Regija, Grad/naselje, lokacija*	**Koordinate**		**Oznaka uzorka**
	N	E	
VSŽ, VK/Sopot	45,26139˚	18,78182˚	V1, V2
VSŽ, VK/Andrijaševci	45,26140˚	18,78182˚	V3, V4
VSŽ, VK/Retkovci	45,22684˚	18,67647˚	V5
VSŽ, VK/Privlaka	45,18797˚	18,86432˚	V6
KKŽ, KŽ	46,11458˚	16,54743˚	K1, K2
KKŽ, KŽ	46,02444˚	16,46458˚	K3, K4
KKŽ, KŽ	46,02273˚	16,45529˚	K5, K6
BBŽ, HE/Mlinski vinogradi	45,67260˚	16,92055˚	H1
BBŽ, HE/Mlinski vinogradi	45,67211˚	16,91911˚	H2, H3
BBŽ, HE/Mlinski vinogradi	45,67177˚	16,91843˚	H4
BBŽ, HE	45,66702˚	16,98906˚	H5, H6

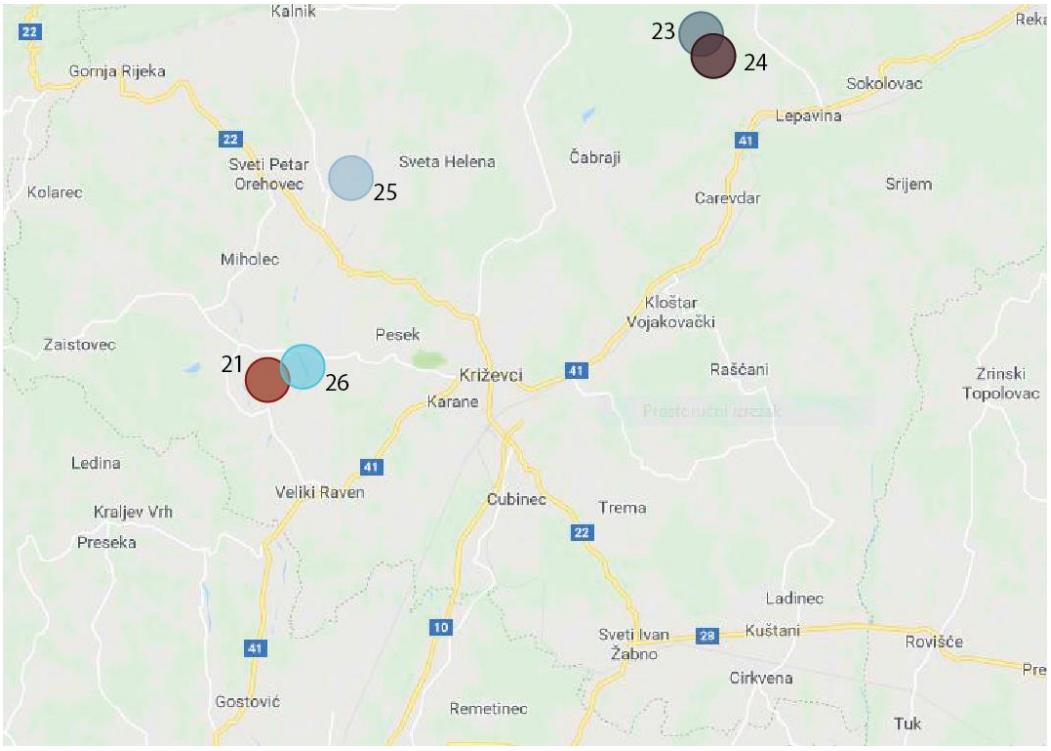
*VSŽ- Vukovarsko – srijemska županija, KKŽ- Koprivničko – križevačka županija, BBŽ- Bjelovarsko – bilogorska županija, VK- Vinkovci, KŽ- Križevci, HE- Hercegovac



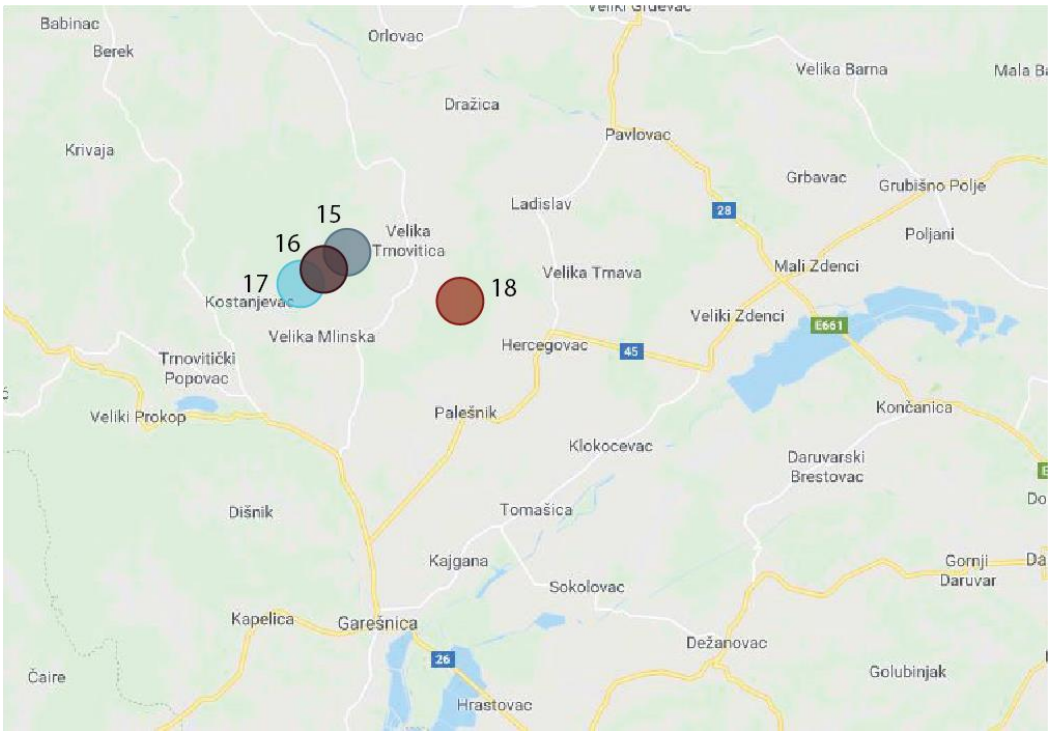
Slika 5. Regije uzorkovanja tla



Slika 6. Lokacije uzorkovanja tla na području Vinkovaca



Slika 7. Lokacije uzorkovanja tla na području Križevaca



Slika 8. Lokacije uzorkovanja tla na području Hercegovca

4.2. Izolacija autohtonih sojeva rizobija

Za izolaciju autohtonih sojeva rizobija, postavljen je pokus u plasteniku na Agronomskom fakultetu u Zagrebu (Zavod za povrćarstvo). Sjeme soje, sorta Lucija, površinski je sterilizirano i posijano u prethodno dezinficirane lonce s tlom. Kao supstrat za uzgoj soje korišteno je tlo prikupljeno sa različitih područja uzgoja soje u Republici Hrvatskoj. Pokus je postavljen u proljeće 2017. godine.

Kvržice (nodule) s korijena soje prikupljene su u fazi pune cvatnje. Izolacija autohtonih sojeva rizobija iz kvržica obavljena je prema standardnoj metodi (Vincent, 1970). Kvržice su površinski sterilizirane uranjanjem u 95%-tni etilni alkohol u vremenskom trajanju od 5-10 sekundi, te zatim u 3% natrijev hipoklorit (NaClO) u trajanju od 3 minute. Na kraju su višestruko isprane u sterilnoj fiziološkoj otopini. Kvržice se seciraju, odnosno razbijaju te je ezom uzet mliječni fluid i razmazan po površini hranjive podloge YMA (*Yeast Mannitol Agar*). Sastav hranjive podloge prikazan je u Tablici 4. U YMA hranjivu podlogu, zbog preciznijeg raspoznavanja kolonija kvržičnih bakterija dodaje se boja *Congo red*, s obzirom da indikator *Congo red* omogućuje uočavanje razlike između kontaminacija drugih bakterija i kvržičnih bakterija (kontaminacije – apsorbiraju crvenu boju, kvržične bakterije – ne).

Tablica 4. Sastav YMA hranjive podloge

Sastav	**Količina**
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4$	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10,0 g
Kvasni ekstrakt	0,4 g
Agar	15,0 g
$CaCO_3$ (samo za čuvanje)	3 g
Bromtinol	5 mL
Destilirana voda	1000 mL

Za potrebe ovog istraživanja korišteno je 18 sojeva kvržičnih bakterija koje noduliraju soju, po 6 izolata sa svakog područja (Tablica 5.). U istraživanju su korišteni referentni soj *B. japonicum ili* 344 i tipski sojevi: *B. japonicum* 2314 ili 6T (Finska, kolekcija HAMBI), *B.*

japonicum USDA 110, *Sinorhizobium fredii* 5851 (zbirka DSMZ), *B. elkanii* 11554 ili 76T i *B. liaoningense* 2298 (Finska) (Tablica 6.). Istraživanja su provedena u laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu.

Tablica 5. Oznake izoliranih sojeva i lokacije uzimanja uzoraka

Lokacija	Oznaka izolata
Vinkovci	V1,V2,V3,V4,V5,V6
Hercegovac	H1,H2,H3,H4,H5,H6
Križevci	K1,K2,K3,K4,K5,K6

Tablica 6. Referentni i tipski sojevi

Soj	Oznaka soja
B. japonicum	344
B. japonicum	2314
B. japonicum	USDA 110
B. liaoningense	2298
Bradyrhizobium elkanii	11554
Sinorhizobium fredii	5851

Sojevi su uzgajani na YMA hranjivoj podlozi (Yeast Manmitol Agar) sa dodatkom indikatora bromtimol plavo, u Tablici 4. naveden je sastav hranjive podloge.

Nakon pripreme hranjive podloge potrebno je podesiti koncentraciju pH (6,8) te staviti na sterilizaciju u autoklav 15 min, 121°C na 1 ATM, zatim je podloga razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Na ohlađenu hranjivu podlogu, nacijepljeni su navedeni sojevi (Tablica 5. i Tablica 6.) te ostavljeni na inkubaciji 7 dana na temperaturi od 30 °C.

4.3. Morfološka karakterizacija

4.3.1. Bojanje po Gram-u

Postupak bojenja po Gram-u koristi se za razlikovanje bakterija na temelju stanične stjenke u dvije skupine: Gram pozitivne (+) i Gram negativne (-). Bakterije koje imaju debelu staničnu stjenku su Gram pozitivne bakterije (G+) čija se stanična stjenka sastoji od 50-90 % peptidoglikana. Njihova stanična stjenka zadržava boju kristal violet unutar stjenke, pa stoga G+ bakterije ostaju obojene ljubičasto ili tamnoplavo. Gram negativne bakterije (G-) imaju tanku staničnu stjenku koja sadrži samo 10% peptidoglikana te posjeduju vanjsku membranu izgrađenu od lipida. Gram negativne bakterije su crvenog obojenja zbog kontrastne boje karbol fuksin, jer se kod njih boja kristal violet ispire alkoholom.

Postupak bojenja po Gramu započinje sa odmašćivanjem predmetnog stakalca provlačenjem kroz šušteći plamen. Nanosi se kapljica vode na sredinu predmetnog stakalca. Pomoću sterilne mikrobiološke eze uzima se uzorak te se nanosi u tankom sloju na predmetno stakalce te se fiksira na plamenu. Zatim se na preparat nanosi ljubičasta boja kristal violet koja se drži na preparatu 3 minute. Nakon boje kristal violet dodaje se lugol koji stoji 1-2 minute. Nakon dodavanja lugola bakterija ostaje obojena ljubičasto zbog toga što lugol fiksira boju unutar stanične stjenke. Primarno bojilo se ispire sa 96% etanolom. Primarno bojilo se ne može se isprati iz stjenke samo ako je mreža peptidoglikana dovoljno gusta tj. stjenka s debljim slojem peptidoglikana ostaje obojena dok će ona s tanjim slojem peptidoglikana biti isprana. Nakon ispiranja dodaje se karbol fuksin koji stoji 1 minutu te boji G- bakterije u crvenu ili ružičastu boju. Predmetno stakalce ispire se vodom te se suši pomoću filter papira. Gotovi preparati mikroskopiraju se pod najvećim povećanjem x1000 uz kap imerzijskog ulja.

4.3.2. Bojenje vanjskih bakterijskih struktura

Postupak bojenja kapsula koristi se zbog toga što neke bakterije formiraju kapsule. Glikokaliks ili kapsula predstavlja vanjski sloj koji izlučuje stanica i koji je pričvršćen na staničnu stjenku koji se sastoje od polisaharida i služe kao zaštita bakterijskoj stanici. Postupak bojenja kapsula započinje odmašćivanjem predmetnog stakalca na šuštećem plamenu. Nanosi se kapljica vode na sredinu predmetnog stakalca u kojoj se razmazuje uzorak uzet pomoću sterilne mikrobiološke eze. Preparat se suši na zraku. Zatim se dodaje primarna boja gentijana violet koja ostaje 5-7 minuta. S obzirom da kapsule nemaju naboj, primarno bojilo taloži se na njih bez stvaranja čvrstih kemijskih veza. Primarno bojilo obojiti će bakterijsku stanicu u

ljubičasto. Zatim se preparat ispire s 20% otopinom modre galice koja ima uloge agensa za odbojavanje i kontrasno bojilo. Kontrastno bojilo će se apsorbirati i obojiti kapsulu svijetloplavu boju. Kapsule su topive u vodi i zbog toga se preparat ne smije ispirati s vodom. Preparat ostaviti da se u potpunosti osuši na zraku te se mikroskopira pod najvećim povećanjem 1000x uz kap imerzijskog ulja. Bakterijska stanica je ljubičaste boje dok je kapsula svijetloplave.

4.3.3. Izgled kolonija

Pripremljena je YMA hranjiva podloga koja je sadržavala bromtimol kao indikator. Kada bakterija producira kiselinu podloga mijenja boju u zeleno-žutu ako bakterija producira lužinu podloga je plave boje.

Podloge su sterilizirane u autoklavu na 121°C, 15 min, 1ATM, ohlađene te nacijepljene uzorcima u laminariju. Nakon inkubacije na 30°C, 5 - 7 dana promatran je rast, konzistencija te boja podloge.

4.4. Biokemijski testovi

4.4.1. Katalaza test

Katalaza test koristi se za određivanje prisutnosti enzima katalaze u bakterijama. Katalaza razlaže toksični vodikov peroksid na molekule vode i kisika. Najveći broj aerobnih i fakultativno anaerobnih bakterija ima sposobnost sinteze enzima katalaze. Na predmetno stakalce nanijeti soj bakterije te dodati kap vodikovog peroksid. Ukoliko se stvore mjehurići dolazi do reakcije oslobađanja kisika što je pokazatelj da bakterija posjeduje enzim katalazu.

$H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$

4.4.2. Ureaza test

Urea koja se dodaje prilikom provođenja ureaza testa iznosi 2 % te, ukoliko bakterija posjeduje enzim ureazu dolazi do reakcije hidrolize uree i nastaje amonijak i CO_2. Kao indikator koristi se fenol red. Nastali amonijak alkalizira hranjivu podlogu te dolazi do promjene boje iz žute (pH= 6,8) u ružičastu (pH= 8,1).

$(NH_2)_2CO + 2H_2O \rightarrow CO_2 + H_20 + 2NH_3$

Sastav podloge za test ureaze:

- Urea 20g
- NaCl 5g
- KH_2PO4 2g
- Pepton 1g
- Dekstroza 1g
- Fenol red 0,012g - indikator
- Destilirana voda 1000mL

Hranjiva podloga (tekuća) sterilizirana je na 121°C, 15 min, 1 ATM te je nacijepljena sa različitim sojevima bakterija. Vrijeme inkubacije 7 dana na 30°C, te su očitani rezultati na temelju promjene boje hranjive podloge.

4.4.3. Oksidaza test

Oksidaza test koristi se za identifikaciju bakterija koje proizvode enzim citokromoksidazu, enzim bakterijskog elektronskog transportnog lanca. U prisustvu citokromoksidaze dolazi do oksidacije reagensa što rezultira promjenom boje u ljubičastu (pozitivan test). Kada enzim nije prisutan reagens ostaje bezbojan.

Sojevi bakterija razmazuju se na filter papir pomoću jednokratne eze te se dodaje kap oksidansa. Nakon nekog vremena dolazi do promjene boje, ljubičasta – pozitivno; bijelo – negativno(https://microbeonline.com/oxidase-test-principle-procedure-and-oxidase-positive-organisms/ **).**

4.4.4. Sposobnost korištenja citrata

Test se koristi u svrhu ispitivanja mogućnosti pojedinih bakterija da koriste Na-citrat kao jedini izvor ugljika. Na-citrat je sol limunske kiseline, jednostavan organski spoj koji je jedan od osnovnih metabolita u Krebsovom ciklusu.

Neke bakterije uzimaju energiju, korištenjem citrata kao jedinog izvora ugljika. Bakterije koje iskorištavaju citrate stvaraju natrijevu lužinu. Bakterije koje koriste dušik iz amonijevog fosfata stvaraju amonijevu lužinu. Lužine podižu pH iznad 6,8 što rezultira promjenom boje podloge iz zelenu u plavu boju.

Sastav Simmonsovog citrat agara:

- $MgSO_4$ 0,2 g
- $(NH_4)_3PO_4$ 1,0 g
- K_2HPO_4 1,0 g
- Na-citrat 2,0 g
- NaCl 5,0 g
- Agar 15 g
- Bromtimol blue 0,08 mL
- Destilirana voda 1000 mL

Bakterije se nacjepljuju na Simmonsov citratni agar, inkubacija traje 48 sati pri temperaturi od 35°C. Nakon inkubacije očitavaju se rezultati na temelju promjene boje podloge, plava podloga – pozitivno, zelena podloga- negativno.

4.4.5. Sposobnost bakterija da hidroliziraju škrob

Na pripremljenu i steriliziranu podlogu nacjepljivane su različiti sojevi bakterija. Inkubacija traje 7 dana na temperaturi od 38°C te se nakon toga na ploče nanosi otopina Lugola. U prisutnosti joda podloga mijenja boju u plavo jer je, Lugol jodna otopina. Kod bakterijskih sojeva koji imaju sposobnost hidrolize škroba došlo je do pojave žutih zona oko kolonija koje s vremenom postaju „čiste“- pozitivno.

Sastav škrobne podloge:

- Škrob 10g
- Mesni ekstrakt 3g
- Agar 12g
- Destilirana voda 1000 mL

4.5. Utjecaj ekoloških faktora na rast kvržičnih bakterija

4.5.1. Rast sojeva na različitim temperaturama

Optimalne temperature za rast kvržičnih bakterija su od 25-30 °C. Cilj ovog istraživanja je ispitati kako različite temperature utječu na rast ispitivanih sojeva. Rast izolata ispitan je na temperaturama od 37 °C i 42 °C.

Na pripremljenu i steriliziranu YMA hranjivu podlogu nacijepljeni su sojevi kvržičnih bakterija te su stavljeni na inkubaciju u termostate 7 dana na temperature od 37 °C i 42 °C.

4.5.2. Rast sojeva na različitim koncentracijama soli

Prema standardu hranjiva podloga koja se smatra optimalna za razvoj kvržičnih bakterija sadrži 0,01 % NaCl-a. Sojevi su uzgajani na YMA hranjivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl –a. Hranjive podloge sadržavale su koncentracije od 1 % ,2 % i 3 % NaCl-a.

Sojevi su nacijepljeni na pripremljene i sterilizirane hranjive podloge te su stavljene na inkubaciju od 7 dana na temperaturu od 30 °C.

4.5.3. Rast sojeva na različitim pH vrijednostima

Za kvržične bakterije optimalna pH sredina je oko neutralnog (pH 7). U ovom istraživanju ispitan je rast pri različitim pH vrijednostima: pH 4,5, pH 5,5, pH 9 i pH 11. Pripremljena je standardna YMA hranjiva podloga čija se pH vrijednost podešavala pomoću 1M NaOH i 1M HCl-a te digitalnog pH metra. Natrijev hidroksid korišten je za dobivanje alkalne reakcije dok je klorovodična kiselina korištena za dobivanje kisele reakcije.

Nakon regulacije pH hranjivih podloga na željene vrijednosti, podloge su stavljene na sterilizaciju u autoklav na 15 min, 121°C na 1 bar.

4.5.4. Istraživanje osjetljivosti sojeva na antibiotike

U ovom istraživanju provedeno je ispitivanje osjetljivosti kvržičnih bakterija na antibiotike disk-difuzijskom metodom. Na pripremljenu i steriliziranu YMA podlogu dodano je 0,1 mL bakterijske kulture koja se razmaže pomoću sterilnog L-štapića. Zatim su pomoću sterilne pincete dodani papirnati diskovi s određenim koncentracijama antibiotika.

Korištene su četiri različite vrste antibiotika: AM10 - ampicilin (10 μg), S10 - streptomicin (10 μg), E15 – eritromicin (15μg) i K30 – kanamicin (30μg).

Ako je ispitani soj osjetljiv na antibiotik, stvara se zona inhibicije odnosno neće doći do rasta, te se mjeri promjer od ruba diska do kraja kruga. Ako je ispitani soj rezistentan na antibiotik, dolazi do normalnog rasta.

4.5.5. Rast sojeva na različitim izvorima ugljikohidrata

Standardna podloga sadrži manitol kao izvor ugljikohidrata. Ispitani izvori ugljikohidrata za sojeve korištene u istraživanju su: galaktoza, laktoza, dekstroza, saharoza, maltoza, rafinoza i fruktoza.

Pri pripremi standardne YMA hranjive podloge umjesto manitola koristio se drugi ugljikohidrat. Nakon sterilizacije podloga nacijepljeni su izolati te stavljeni na inkubaciju 7 dana na temperaturu od 30°C. Nakon inkubacije očitavao se rast na različitim izvorima ugljikohidrata.

4.6. PGP karakteristike izolata

4.6.1. Antagonistička aktivnost izolata prema pojedinim gljivama

Mikrobnim antagonizmom smatra se svaki odnos među mikrobima pri kojem dolazi do usporavanja ili potpunog zaustavljanja razmnožavanja jednog mikroba djelovanjem drugog. Hranjiva podloga koja se koristila za ovo istraživanje je Czapek dox agar. Ta hranjiva podloga sadrži natrijev nitrat kao jedini izvor dušika, jedna je od najraširenijih krutih hranjivih podloga koje se koriste za uzgoj gljiva.

Nakon što je podloga pripremljena i sterilizirana (pH 6,8) nacijepljene su parazitske gljive i kvržične bakterije te je stavljeno na inkubaciju 7 dana na temperaturi od 30°C. Nakon inkubacije očitavala se otpornost te se mjerio promjer parazitske gljive.

Sastav Czapek dox agra:

- $NaNO_3$ 2,0 g
- KCl 0,5 g
- Magnezij glicerofosfat 0,5 g
- $FeSO_4$ 0,01 g
- K_2SO_4 0,35 g
- Saharoza 30 g

- Agar 12 g
- Destilirana voda 1000 mL

4.6.2. Ispitivanje proizvodnje flourescentnog pigmenta

Ovo istraživanje koristi se za ispitivanje produkcije flourescina koji je karakterističan za rod *Pseudomonas.* Na pripremljenu i steriliziranu hranjivu podlogu FLOAGAR nacjepljuju se istraživani sojevi kvržičnih bakterija. Nakon inkubacije u trajanju od 7 dana, florescencija se gleda pod UV svijetlom.

Sastav za Floagar:

- Pepton 20 g
- Bactomaltoza 10 g
- K_2HPO_4 1,5 g
- $MgSO_4$ 0,73 g
- Glicerol 10 mL
- Agar 15 g
- Destilirana voda 1000 mL

4.6.3. Razgradnja fosfora P – solubilizacijom

Poznato je da je fosfat jedno od glavnih biljnih hranjiva koji ograničavaju rast. Veliki dio anorganskog fosfata unosi se u tlo kao gnojivo, brzo se imobilizira i postaje nedostupno. Bakterije koje otapaju fosfate imaju mogućnost otapanja anorganskog (netopivog) oblika fosfora u pristupačan oblik koji je važan za dostupnost fosfora u tlu.
Za ovo istraživanje pripremljena i sterilizirana je Pikovskaya hranjiva podloga, mliječno-bijele boje. Zatim su nacijepljeni ispitani sojevi bakterija te stavljeni na inkubaciju od 7 dana na temperaturu od 30 °C. Bakterije koje otapaju fosfate rasti će na Pikovskaya hranjiva podloga i formirati čistu zonu oko kolonije (Slika 24.).
(https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x).

Pikovskaya hranjiva podloga:

- Glukoza 10 g
- $Ca(PO_4)_2$ 5 g
- $(NH_4)_2SO_4$ 0,500 g
- NaCl 0,2 g
- $MgSO_4 + 7H_2O$ 0,100 g
- KCl 0,2 g
- Kvasni ektrakt 0,5 g
- $MnSO_4 \times H_2O$ 0,0002 g
- $FeSO_4 \times 7H_2O$ 0,0002 g
- Agar 15 g
- H_2O 1000 mL

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I RASPRAVA

5.1. Analize tla

Za uzorkovanje tla odabrane su razne poljoprivredne površine iz Vukovarsko – srijemske, Koprivničko – križevačke i Bjelovarsko – bilogorske županije. Određivanje glavnih fizikalnih i kemijskih svojstava tla provedeno je u Zavodu za pedologiju na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Sveukupno je analizirano 18 uzoraka tala, 6 uzoraka sa svake lokacije. Dobiveni rezultati pokazuju da istraživana tla (Tablice 7., 8., 9.), prema klasifikaciji Husnjak (2014), uzorci su sistematizirani unutar 3 tipa tla: Koprivničko – križevačkoj županiji pripada eutričnom smeđem tlo, pseudoglejlni tip tla pripada području Bjelovarsko – bilogorske županije dok černozemnom tipu tla pripada područje Virovitičko – srijemske županije. (Slika 9.).



Slika 9. a - eutrično smeđe tlo; **b** - černozem; **c** - pseudoglejno tlo

- **Eutrično smeđe tlo**

Ovaj tip tla pripada razredu kambičnih tala. Za formiranje kambičnog horizonta potrebni su uvjeti veće vlažnosti i dobre prirodne drenaže. Izraženo je kemijsko i biološko trošenje stijena iz kojeg se sekundarno tvori glinaarilogeneza. Zaostali željezni oksidi daju karakterističnu žućkastu, smeđastu ili crvenkastu nijansu kambičnog horizonta. Pojavljuje se (B) horizont, a procesi koji nastaju nazivaju se posmeđivanje ili braunizacija. Eutrično smeđe tlo nastaje na supstratima bogatim bazama, na bazičnim i neutralnim eruptivnim stijenama, na lesu i lesolikim sedimentima te laporima. Uvjeti aridne, semiaridne i humidne klime. Vegetacija je kserofitna, bjelogorične šume iskrčene u gajeve. Reljef valovit, 100 – 500 m n.v. tlo je dobro drenirano, površinski blago zakiseljeno. pH veći od 5,5, dok stupanj zasićenosti bazama je iznad 50 % (Husnjak, 2014).

- **Pseudoglej**

Ovaj tip tla vlaži se suficitom oborinske vode. Reljef je blago valovit i zaravnjen do 500 m n.v. Klima je semihumidna ili humidna, a matični supstrat su pleistocenske ilovine, gline, glinoviti sedimenti. Kod pseudooglejavanja dolazi do izmjene suhe i mokre faze. Pseudoglej nastaje iz lesiviranog tla gdje u mokroj fazi uslijed nedostatka kisika dolazi do redukcijskih procesa. Viševaletni spojevi željeza i mangana prelaze u dvovaletni oblik i postaju topivi. Tako se pojavljuju izbljeđene zone. Prelaskom u suhu fazu prevladavaju procesi oksidacije i reducirani spojevi željeza i mangana prelaze u viševaletni oblik. Na pedološkom profilu to se manifestira kroz rđe, mrlje, mazotine, konkrecije. Profil dobiva mramorirani izgled (Husnjak, 2014).

- **Černozem**

Ovaj tip tla nastaje na rastresitim karbonatnim supstratima, lesu i lesolikim sedimentima, u aridnom i semiaridnom, stepskom području (Amo-horizont). U profilu se nalaze krtičnjaci i pseudomiceliji kao specifični znakovi. Lesni platoi, ravnog reljefa, nadmorske visine 70-120 m. Ovakav tip tla nalazimo u istočnom dijelu Republike Hrvatske te su najkvalitetnija poljoprivredna tla (Husnjak, 2014).

Tablica 7. Fizikalna svojstva tla (sadržaj mehaničkih čestica, teksturna oznaka)

Analitički Broj	Područje*	Sadržaj mehaničkih čestica tla (%)					Teksturna oznaka **
		Krupni pijesak 2,0-0,2 mm	Sitni pijesak 0,2-0,063 mm	Krupni prah 0,063-0,02 mm	Sitni prah 0,02-0,002 mm	Glina <0,002 Mm	
V1, V2	VK	1,0	3,8	35,8	32,9	26,5	PrI
V3, V4	VK	0,6	2,6	32,7	34,2	29,9	PrGI
V5	VK	0,3	0,9	34,4	34,8	29,6	PrGI
V6	VK	0,5	0,9	38,4	35,7	24,5	PrI
H1	HE	0,4	2,8	48,0	29,9	18,9	PrI
H2, H3	HE	0,5	3,7	50,4	29,3	16,1	PrI
H4	HE	0,3	3,9	50,0	26,9	18,9	PrI
H5, H6	HE	1,1	3,8	50,8	27,5	16,8	PrI
K1, K2	KŽ	1,4	3,3	46,2	32,9	16,2	PrI
K3, K4	KŽ	1,2	3,4	28,7	48,7	18,0	PrI
K5, K6	KŽ	0,4	3,7	52,1	29,5	14,3	PrI

* VK - Vinkovci, KŽ - Križevci, HE - Hercegovac

**PrI - praškasta ilovača, Pr- prah, PrGI - praškasta glinasta ilovača

Tablica 8. Kemijska svojstva tla (pH, sadržaj humusa)

Analitički broj	Područje*	Sadržaj humusa		pH (reakcija tla)		
		%	interpretacija	H_2O	KCl	interpretacija
V1, V2	VK	2,17	slabo	6,93	5,62	slabo kiselo
V3, V4	VK	2,38	slabo	7,11	6,02	slabo kiselo
V5	VK	2,33	slabo	6,41	4,80	kiselo
V6	VK	1,9	slabo	6,77	5,55	slabo kiselo
H1	HE	2,17	slabo	5,10	3,98	jako kiselo
H2, H3	HE	2,51	slabo	6,00	4,64	kiselo
H4	HE	1,81	slabo	5,55	4,26	jako kiselo
H5, H6	HE	1,68	slabo	5,77	4,38	jako kiselo
K1, K2	KŽ	2,38	slabo	6,33	5,09	kiselo
K3, K4	KŽ	3,67	dosta	7,91	7,24	alkalično
K5, K6	KŽ	2,15	slabo	5,93	4,75	kiselo

* VK – Vukovarsko – srijemska županija, KŽ -Koprivničko – križevačka županija, HE – Bjelovarsko – bilogorska županija

Tablica 9. Kemijska svojstva tla (sadržaj ukupnog dušika, sadržaj fiziološki aktivnog fosfora i kalija)

Analitički Broj	Područje*	Sadržaj ukupnog dušika		Sadržaj P_2O_5		Sadržaj K_2O	
		%	**Interpretacija opskrbljenosti**	**mg/100g tla**	**Interpretacija opskrbljenosti**	**mg/100g tla**	**Interpretacija opskrbljenosti**
V1, V2	VK	0,12	dobro	23,9	dobro	21,0	dobro
V3, V4	VK	0,13	dobro	26,0	bogato	26,5	bogato
V5	VK	0,14	dobro	24,9	dobro	24,0	dobro
V6	VK	0,11	dobro	22,9	dobro	22,0	dobro
H1	HE	0,14	dobro	17,4	dobro	23,5	dobro
H2, H3	HE	0,14	dobro	19,4	dobro	30,0	bogato
H4	HE	0,11	dobro	27,6	bogato	26,0	bogato
H5, H6	HE	0,10	umjereno	27,6	bogato	21,0	dobro
K1, K2	KŽ	0,15	dobro	56,9	vrlo bogato	18,4	dobro
K3, K4	KŽ	0,22	bogato	4,5	vrlo slabo	13,5	slabo
K5, K6	KŽ	0,12	dobro	50,6	vrlo bogato	27,5	bogato

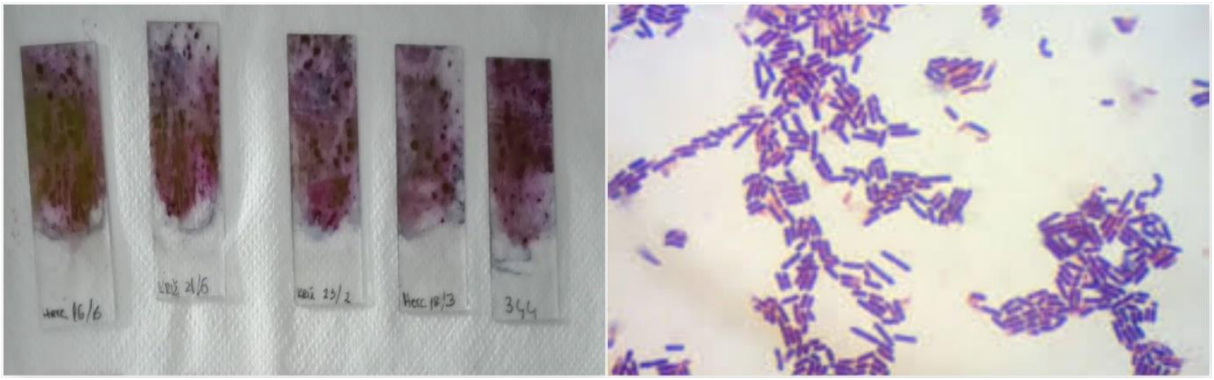
* VK – Vukovarsko – srijemska županija, KŽ – Koprivničko – križevačka županija, HE – Bjelovarsko – bilogorska županija

5.2. Morfološka karakterizacija

5.2.1. Bojanje po Gram-u

Nakon korištenja tehnike bojanja po Gram-u (Slika 10. lijevo), preparati su mikroskopirani. Za sve istraživane sojeve utvrđena su osnovna morfološka svojstva stanice. Na temelju rezultata utvrđeno je da su svi izolati Gram negativne bakterije štapićastog oblika (Slika 10. desno).

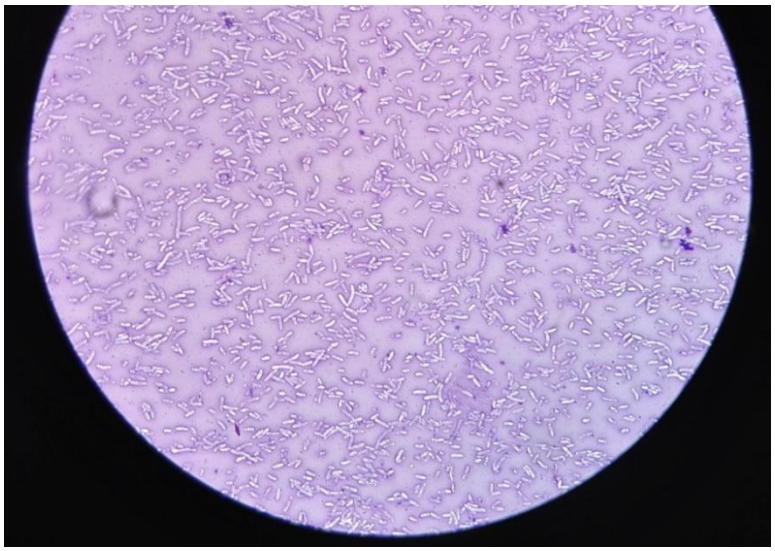
Preparati su mikroskopirani pod imerzijskim uljem i povećanjem x1000, utvrđena je razlika u veličini štapića između izolata.



Slika 10. Lijevo – prikaz obojanih preparata po Gramm-u; Desno - prikaz štapićastih oblika bakterija pod mikroskopom

5.2.2. Postupak bojenja vanjskih bakterijskih struktura

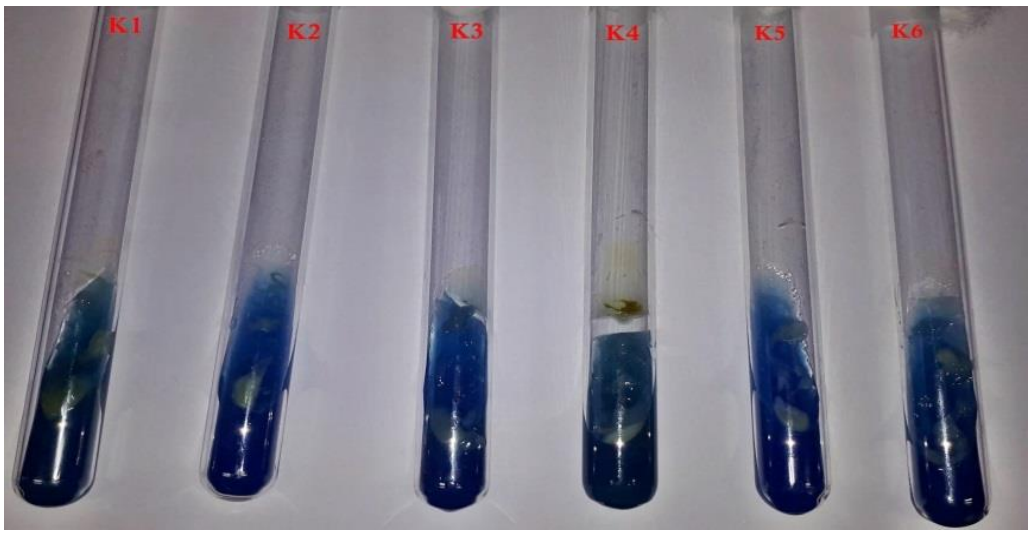
Postupkom bojenja vanjskih bakterijskih struktura cilj istraživanja je ispitati da li ispitane bakterije posjeduju glikokalis ili kapsulu. Nakon postupka bojenja preparati su mikroskopirani pod imerzijskih uljem i povećanjem x 1000. Rezultati su pokazali da ispitane bakterije ne posjeduju kapsulu (Slika 11.).



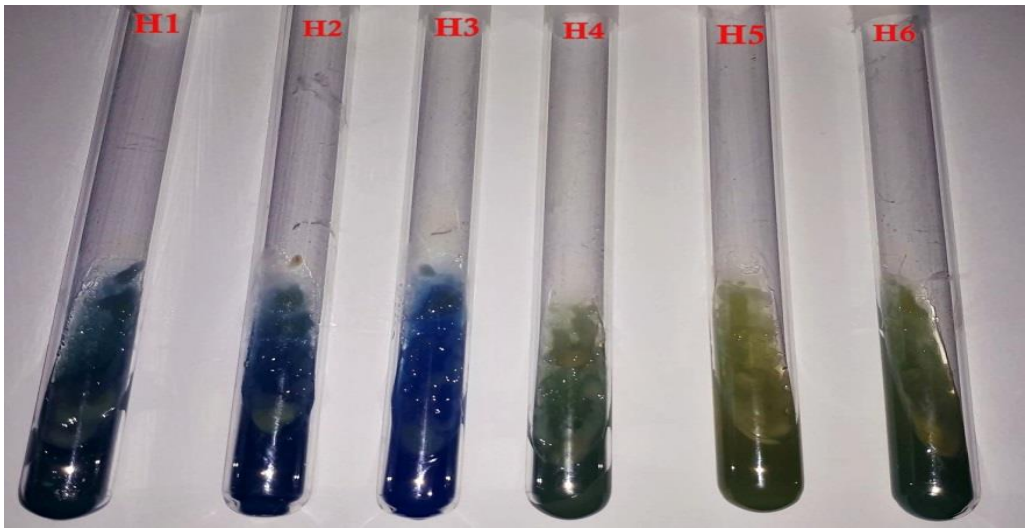
Slika 11. Prikaz bakterija bez kapsule

5.2.3. Rast izolata na YMA hranjivoj podlozi

Prema rastu većina izolata bila je sluzave konzistencije, mliječno-bijele boje. Sojevi su rasli na hranjivoj podlozi YMA uz dodatak bromtimol plavo kao indikatora koji detektira promjenu reakcije (pH). Kod 54% izolata ispitanih sojeva podloga je plave boje zbog stvaranja alkalne reakcije, dok ostalih 46 % stvaraju kiselu reakciju i dovode do promjene podloge u žutu boju (Slike 12., 13., 14.).

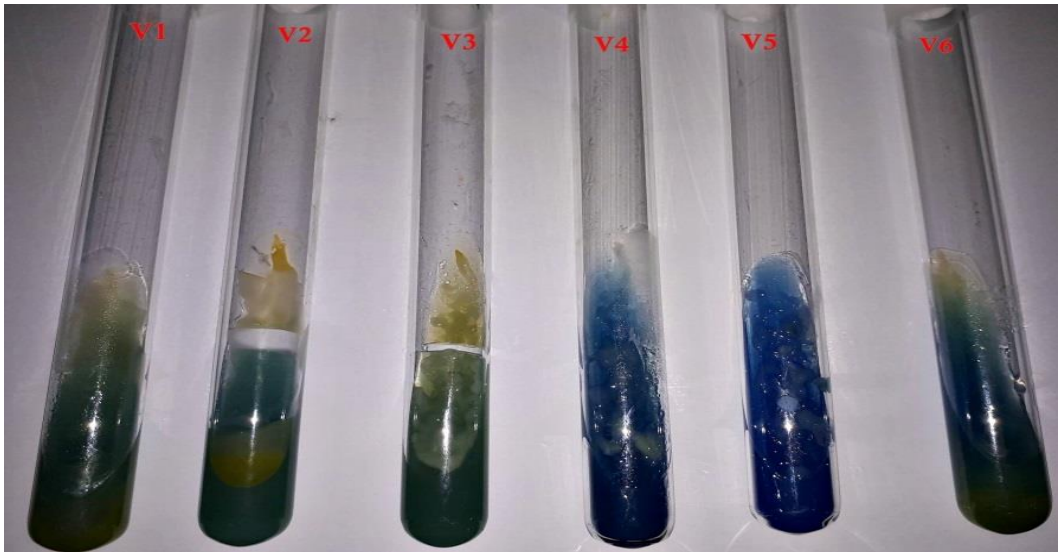


Slika 12. Rast autohtonih sojeva rizobija izoliranih sa područja Koprivničko – križevačke županije na YMA hranjivoj podlozi



.

Slika 13. Rast autohtonih sojeva rizobija izoliranih sa područja Bjelovarsko - bilogorske županije na YMA hranjivoj podlozi



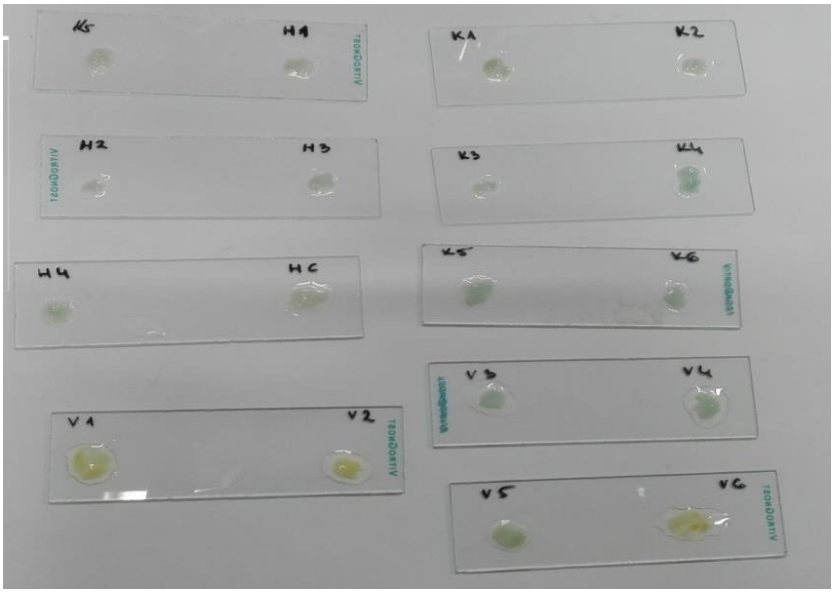
Slika 14. Rast autohtonih sojeva rizobija izoliranih sa područja Vukovarsko - srijemske županije na YMA hranjivoj podlozi

5.3. Biokemijski testovi

Rezultati provedenih testova na ispitanim autohtonim sojevima kvržičnih bakterija prikazani su tablično. Oznaka „++“ označava dobar rast sojeva, oznaka „+“ označava rast dok oznaka „-„ označava izostanak rasta bakterijskih sojeva.

5.3.1. Katalaza test

Nakon provedbe katalaza testa utvrđeno je da su svi izolati katalaza negativni. Ukoliko bakterija posjeduje enzim katalazu dodatkom vodikovog peroksida stvaraju se mjehurići kisika. Rezultati pokazuju da ispitani bakterijski sojevi ne posjeduju katalazu. Fotografija prikazuje provođenje katalaza testa (Slika 15.).



Slika 15. Provođenje katalaza testa

5.3.2. Ureaza test

Provedenim ispitivanjem utvrđeno je da većina ispitanih sojeva nema sposobnost razgradnje uree te zbog toga dolazi do produkcije amonijaka i CO_2 pri čemu dolazi do promjene pH. Kod pozitivne reakcije na ureaza test dolazi do promjene boje iz žute u ružičastu (Slika 16.). Rezultati su prikazani u Tablici 10.



Slika 16. Prikaz pozitivne (lijevo) i negativne (desno) reakcije na razgradnju uree

Tablica 10. Rezultati ureaze testa

Lokacija / oznaka izolata	Ureaza*
Vukovarsko – srijemska županija	
V1	-
V2	-
V3	+
V4	-
V5	+
V6	-
Bjelovarsko – bilogorska županija	
H1	+
H2	-
H3	-
H4	-
H5	-
H6	-
Koprivničko – križevačka županija	
K1	-
K2	+
K3	-
K4	-
K5	+
K6	-
Referentni soj	
344	+
2314^T	-
$USDA110^T$	-
11554^T	-
5851^T	+
2298^T	-

*pozitivno „+“; negativno „-“

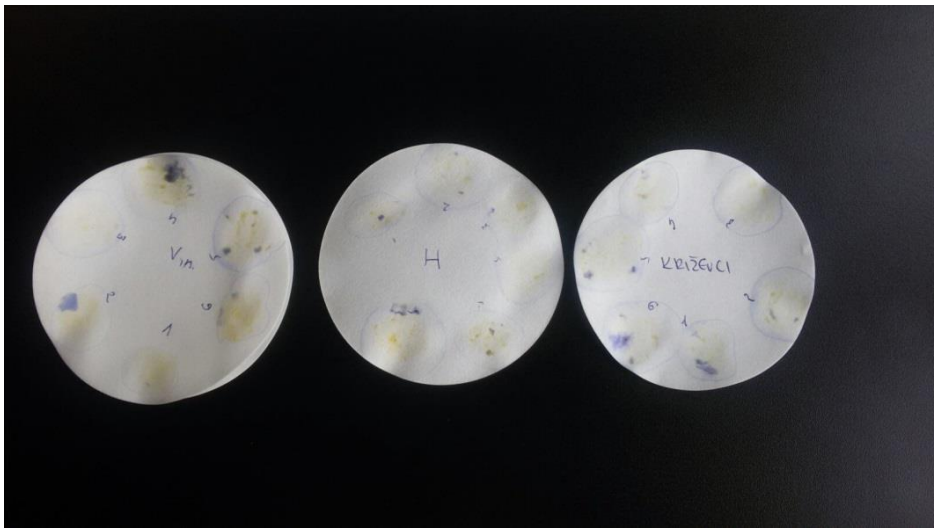
5.3.3. Oksidaza test

Provedeno istraživanje pokazalo je da oko 40% ispitanih sojeva bakterija posjeduje enzim citokromoksidazu. Pri pozitivnoj reakciji prisutni enzim citokromoksidaza oksidira reagens, što rezultira promjenom boje u ljubičastu (Slika 17.). Kod ostalih sojeva nije došlo do promjene boje, što ukazuje na negativan rezultat prilikom provođenja oksidaza testa. Sve bakterije koje su pozitivne u oksidaza testu mogu koristiti kisik kao terminalni akceptor elektrona u disanju. Sojevi koje su negativne u provedenom testu mogu biti aerobi, anaerobi ili fakultativni, negativan rezultat ukazuje samo da te bakterije nemaju citokromoksidazu, oni mogu disati pomoću drugih oksidaza u transportnom lancu. Rezultati su prikazani u Tablici 11.

Tablica 11. Rezultati oksidaza testa

Lokacija / oznaka izolata	Oksidaza*
Vukovarsko – srijemska županija	
V1	-
V2	+
V3	-
V4	+
V5	+
V6	-
Bjelovarsko – bilogorska županija	
H1	+
H2	-
H3	-
H4	-
H5	-
H6	-
Koprivničko – križevačka županija	
K1	+
K2	+
K3	-
K4	-
K5	+
K6	+

*pozitivno „+“; negativno „-“



Slika 17. Prikaz provedbe oksidaza testa na filter papiru

5.3.4. Sposobnost korištenja citrata

Test se provodi u svrhu ispitivanja mogućnosti pojedinih bakterija da koriste Na-citrat kao jedini izvor ugljika. Bakterije koje iskorištavanju citrate stvaraju natrijevu lužinu, dok bakterije korištenjem dušika iz amonijev-fosfata stvaraju amonijevu lužinu. Lužine podižu pH iznad 6,7 što rezultira promjenom boje podloge iz zelene (pozitivna reakcija) u plavu(negativna reakcija).

Pozitivan rezultat imali su izolati: V1, V3, i H1, dok su svi ostali izolati pokazale negativan rezultat.

5.3.5. Sposobnost bakterija da hidroliziraju škrob

Nakon prelijevanja ploča s otopinom Lugola, u prisutnosti škroba dolazi do promjene boje u plavu zbog joda koji dolazi iz Lugola (jodna otopina). Kod bakterija koje imaju sposobnost hidrolize škroba dolazi do pojave žutih zona oko kolonija koje s vremenom postaju čiste (Slika 18.). Bakterija koje nemaju sposobnost hidrolize škroba podloga ostaje plava. Sposobnost hidrolize škroba pokazalo je 60 % bakterija. Rezultati su prikazani u Tablici 12.



Slika 18. Prikaz V2 uzorka koji ima sposobnost hidrolize škroba

Tablica 12. Prikaz rezultata sposobnosti sojeva da hidroliziraju škrob

Lokacija / oznaka izolata	Hidroliza škroba*
Vukovarsko – srijemska županija	
V1	-
V2	+
V3	-
V4	-
V5	+
V6	+
Bjelovarsko – bilogorska županija	
H1	-
H2	+
H3	-
H4	+
H5	+
H6	+
Koprivničko – križevačka županija	
K1	+
K2	+
K3	-
K4	+
K5	+
K6	-

*pozitivno „+“; negativno „-“

5.4. UTJECAJ EKOLOŠKIH FAKTORA NA RAST KVRŽIČNIH BAKTERIJA

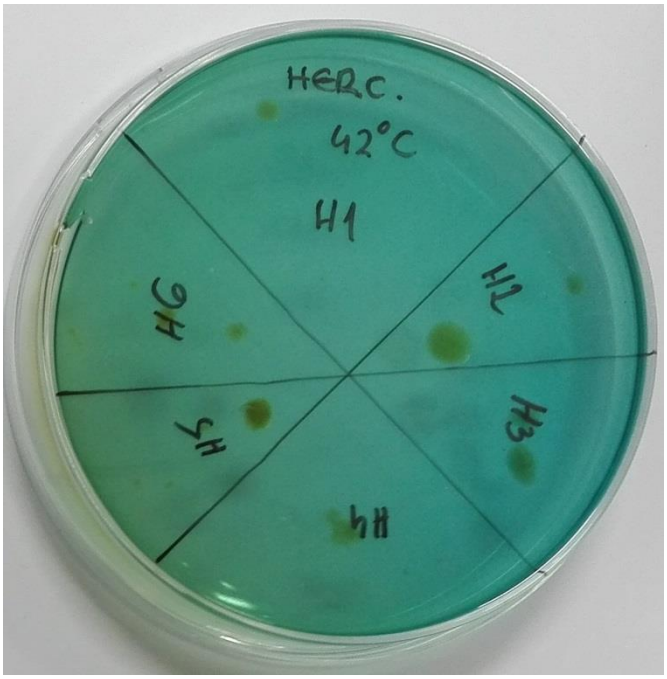
5.4.1. Rast sojeva na različitim temperaturama

Rast izolata ispitan je na temperaturi od 37 °C i 42 °C (Tablica 13.). Nakon inkubacije u trajanju od 7 dana pri temperaturi od 37 °C i 42 °C. Svi ispitani sojevi pokazali su pozitivan rast (dobar rast „+“ i umjeren rast „+/-„) pri temperaturi od 37 °C. Rast je izostao kod izolati koji su bili na inkubaciji pri temperaturi od 42 °C (Slika 19.). Svi referentni sojevi pokazali su dobar rast na temperaturi od 37 °C.

Tablica 13. Rast sojeva na različitim temperaturama

Lokacija / oznaka izolata	37°C *	42°C *
Vukovarsko – srijemska županija		
V1	+	-
V2	+	-
V3	+	-
V4	+/-	-
V5	+/-	-
V6	+	-
Bjelovarsko – bilogorska županija		
H1	+/-	-
H2	+	-
H3	+	-
H4	+	-
H5	+/-	-
H6	+	-
Koprivničko – križevačka županija		
K1	+/-	-
K2	+	-
K3	+	-
K4	+/-	-
K5	+/-	-
K6	+	-
344	+	+/-
2314^T	+/-	+/-
$USDA110^T$	+/-	+/-
11554^T	+/-	+/-
5851^T	+/-	+/-
2298^T	+/-	+/-

*dobar rast „+“; rast „+/-“; izostanak rasta „-“



Slika 19. Rast autohtonih sojeva rizobija izoliranih sa područja Bjelovarsko – bilogorske županije na temperaturi od 42 °C.

5.4.2. Rast sojeva na različitim koncentracijama soli

Hranjive podloge sadržavale su različite koncentracije 1 %, 2 % i 3 % soli. Prema podacima iz literature postoje značajne razlike između različitih vrsta rizobija u pogledu tolerantnosti na povišene koncentracije soli u tlu. Moschetti i sur (2005) navode kako su sojevi vrste *R. leguminosarum* vrlo osjetljivi na povišene koncentracije soli , te da je većina sojeva rasla samo na koncentracijama NaCl od 0,1 %. Yan i sur (2000) tvrde da sojevi *S. meliloti* nisu osjetljivi na sadržaj soli, te da toleriraju koncentraciju od 1 – 3 % NaCl-a. Brzorastuće vrste simbioznih fiksatora dušika znatno su otpornije na antibiotike i uvećane koncentracije soli od spororastućih vrsta (Odee i sur. 1997.).

Na hranjivoj podlozi koja je sadržavala 1 % NaCl 56 % ispitanih sojeva pokazuje toleranciju. Na koncentraciji od 2 % NaCl rast je pokazalo samo 27 % sojeva. Sojevi K2 i K3 jedini su pokazali mogućnost rasta na sve tri ispitivane koncentracije soli. Rezultati su prikazani u Tablici 14.

Tablica 14. Rast sojeva na različitim koncentracijama soli

Lokacija/oznaka izolata	1% NaCl *	2% NaCl *	3% NaCl *
Vukovarsko – srijemska županija			
V1	-	-	-
V2	+	-	-
V3	-	-	-
V4	+	-	-
V5	+	-	-
V6	-	-	-
Bjelovarsko – bilogorska županija			
H1	+	+/-	-
H2	+	-	-
H3	+	-	-
H4	+	-	-
H5	-	-	-
H6	-	-	-
Koprivničko – križevačka županija			
K1	+	+	-
K2	+	+	+/-
K3	+	+	+/-
K4	+	+	-
K5	-	-	-
K6	-	-	-
2314 ^{t}	+	+	+
USDA110^{t}	+	+	+
11554^{t}	+	+	+
5851^{t}	+	+	+
2298^{t}	+	+	+
344	+	+	-

*dobar rast „+“; rast „+/-“; izostanak rasta „-“

5.4.3. Rast sojeva na različitim pH vrijednostima

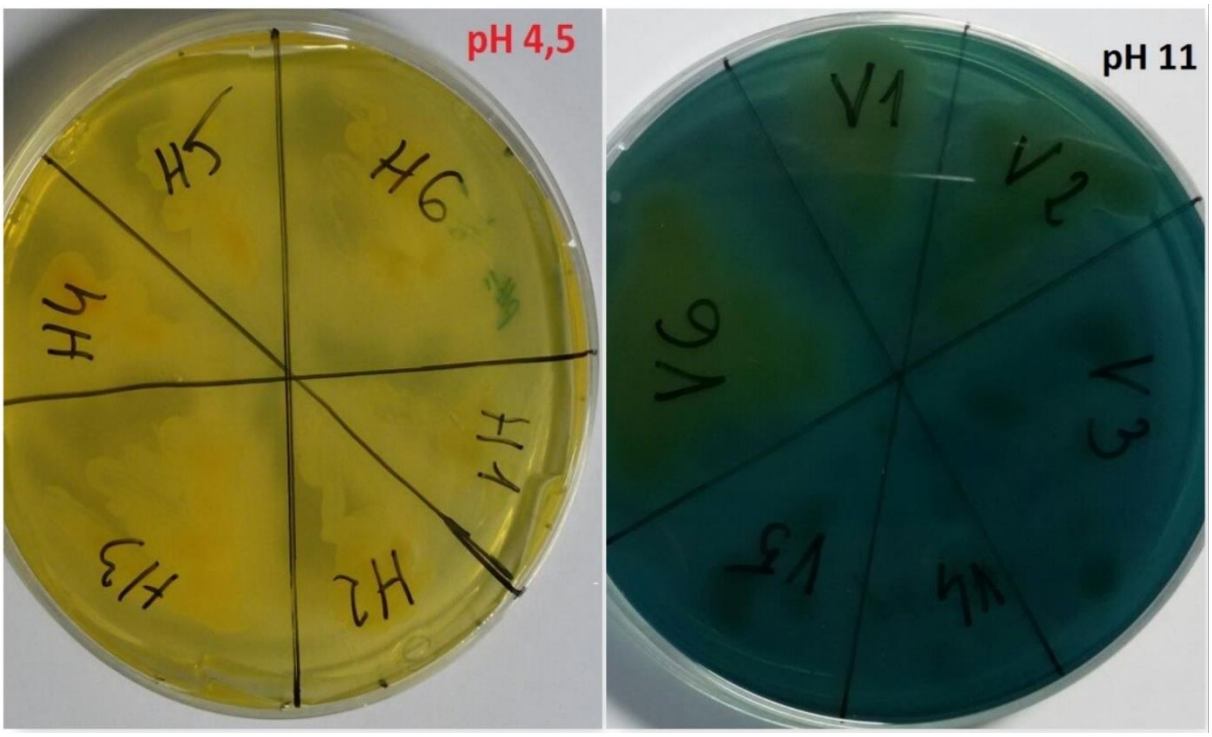
Hranjive podloge YMA sa lužnatom pH vrijednosti plave su boje, dok su podloge sa kiselom pH vrijednosti žute boje (Slika 20.). Belal i sur. (2013) zabilježili su rast sojeva *R. leguminosarum bv. Viciae,* u kiselom i alkalnom mediju odnosno u rasponu pH od 4 do 9. Prema Angelini J. i sur. (2005.) roda *Bradyrhizobium* pokazuju bolji rast u kiselom rasponu pH, dok rod *Shizorhizobium* pokazuje bolji rast u pH rasponu od neutralnog do lužnatog.

Od 18 ispitanih sojeva 17 ih pokazuje dobar rast na pH 4,5. Svih 18 ispitanih izolata imalo je pozitivan rast na pH 5,5 i 9, dok na pH 11 samo su V1,V2 i V6 pokazivali dobar rast. Kod referentnih sojeva *B. japonicum* 344, *B. elkanii* 11554 i *B. japonicum* USDA 110 pokazuju dobar rast na pH 4,5, 5,5 i 9 te slab rast na pH 11. Referentni sojevi *B. japonicum* 2314 pokazuje dobar rast samo na pH 5,5 dok na ostalim ispitanim pH vrijednostima pokazuje slab rast. Kod referentnog soja *S. fredii* 5851 nema rasta na pH 4,5, dok je dobar rast prisutan na pH 9 i 11 što potvrđuje rezultate prema autorima Angelini J. i sur. Uzorak 2298 nema rasta na pH vrijednostima 4,5 i 5,5 dok u alkalnoj sredini pokazuje slabi rast. Rezultati su prikazani u Tablici 15.

Tablica 15. Rast sojeva na različitim pH vrijednostima

Lokacija/oznaka izolata	pH 4,5 *	pH 5,5 *	pH 9 *	pH 11 *
Vukovarsko – srijemska županija				
V1	+/-	+	+	+
V2	+	+	+	+
V3	+	+	+/-	+/-
V4	+	+	+	+/-
V5	+	+	+	+/-
V6	+	+	+	+
Bjelovarsko – bilogorska županija				
H1	+	+	-	+/-
H2	+	+	-	+/-
H3	+	+	-	+/-
H4	+	+	+	+/-
H5	+	+	+	+/-
H6	+	+	+	+/-
Koprivničko – križevačka županija				
K1	+	+	+	+/-
K2	+	+	+	+/-
K3	+	+	+	+/-
K4	+	+	+	+/-
K5	+	+	+	+/-
K6	+	+	+	+/-
Referentni sojevi				
B. japonicum ili 344	+	+	+	+/-
B. elkanii ili 11554^T	+	+	+	+/-
B. japonicum ili 2314^T	+/-	+	+/-	+/-
S. fredii ili 5851^T	-	+/-	+	+
B. liaoningense ili 2298^T	-	-	+/-	+/-
B. japonicum ili USDA 110^T	+	+	+	+/-

*dobar rast „+“; rast „+/-“; izostanak rasta „-“



Slika 20. Rast autohtonih sojeva rizobija na različitim pH vrijednostima izoliranih sa područja Bjelovarsko – bilogorske i Vukovarsko – srijemske županije

5.4.4. Istraživanje osjetljivosti sojeva na antibiotike

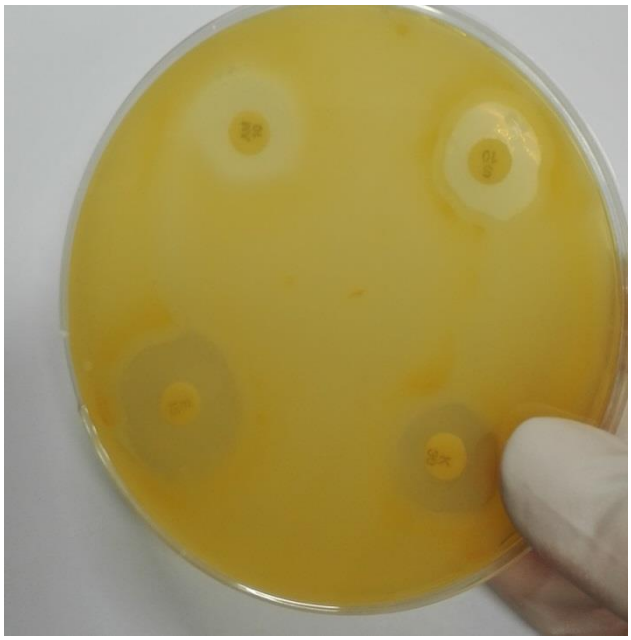
Rezultati su očitani ovisno o promjeru zone oko diska (Slika 21.). Rast izolata oko diska ukazuje na otpornost ispitanog izolata na testiranu dozu antibiotika, dok zona inhibicije ukazuje na osjetljivost izolata na ispitani antibiotik te izostaje rast ispitanog izolata.

Najveći broj ispitanih izolata pokazuje rezistentnost na antibiotik ampicilin (10 µg/disk). Najveća osjetljivost većine ispitanih sojeva uočena je na antibioticima eritromicin (15 µg/disk) i kanamicin (30 µg/disk). Rezistentnost na kanamicin (30 µg/disk) pokazala su samo 2 izolata sa područja Hercegovca. Rezultati su prikazani u Tablici 16.

Tablica 16. Osjetljivost autohtonih sojeva rizobija na antibiotike

Lokacija/oznaka izolata	Streptomicin (cm*)	Eritromicin (cm*)	Kanamicin (cm*)	Ampicilin (cm*)
Vukovarsko – srijemska županija				
V1	0,5	0,8	1	0,5
V2	0,3	0,7	0,9	0,6
V3	0,5	**rezistentno**	1,2	**rezistentno**
V4	0,5	**rezistentno**	1	**rezistentno**
V5	0,6	0,2	1	**rezistentno**
V6	0,3	0,7	0,5	0,5
Bjelovarsko – bilogorska županija				
H1	0,5	**rezistentno**	0,7	**rezistentno**
H2	0,5	1,2	1	**rezistentno**
H3	0,4	1,2	1	**rezistentno**
H4	0,6	1	0,8	**rezistentno**
H5	0,3	0,3	**rezistentno**	**rezistentno**
H6	0,5	1,2	**rezistentno**	0,1
Koprivničko – križevačka županija				
K1	0,4	1,3	1	**rezistentno**
K2	0,4	1	0,7	**rezistentno**
K3	0,5	1,4	1	**rezistentno**
K4	0,2	**rezistentno**	0,8	**rezistentno**
K5	0,5	0,3	1	**rezistentno**
K6	0,7	**rezistentno**	1	**rezistentno**

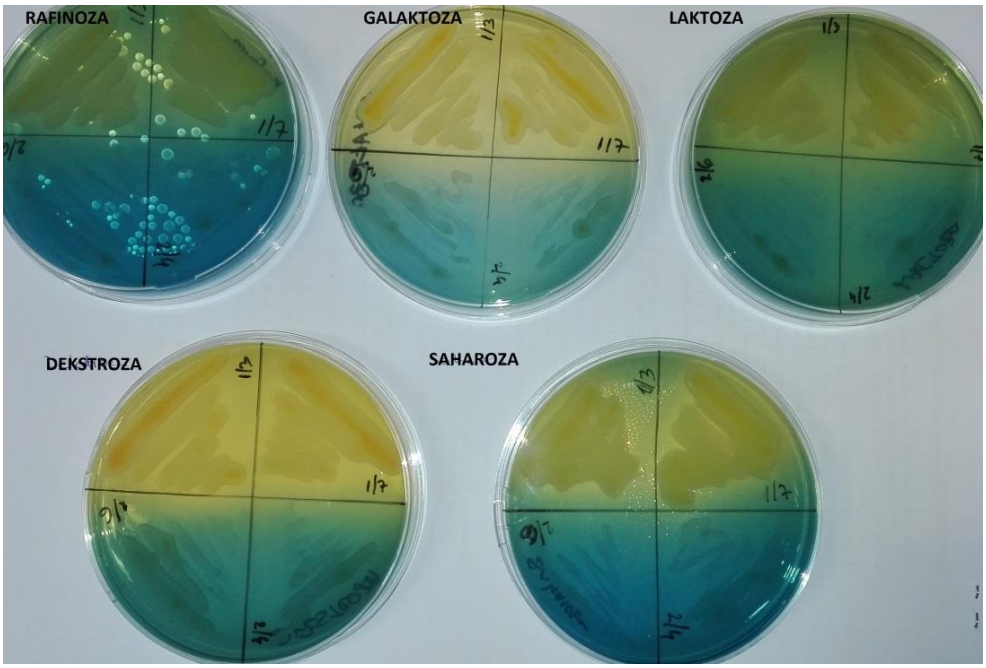
* u centimetrima je izražen promjer zone oko diska



Slika 21. Prikaz zone oko antibiotika

5.4.5. Rast sojeva na različitim izvorima ugljikohidrata

U ovom istraživanju dokazano je da sojevi za rast mogu iskorištavati i druge šećere (Slika 22.) osim manitola koji je sastavni dio YMA hranjive podloge. Dobar rast na laktozi pokazalo je 50 %, na saharozi 42 %, maltozi 71 %, rafinozi 50 %, galaktozi 46 %, fruktozi 33 % te dekstrozi 21% ispitanih sojeva. Poznato je kako sojevi simbioznih fiksatora dušika, brzorastuće vrste preferiraju monosaharide dok spororastuće vrste simbioznih fiksatora dušika koriste disaharide (Grossman i sur., 2005.). Kod svih referentnih sojeva bio je prisutan djelomični rast na galaktozi i dekstrozi, osim soja *B. elkanii* 11554 koji je pokazao dobar rast na galaktozi. Kod soja *S. fredii* 5851 rast nije bio prisutan na fruktozi, dok je soj *B. liaoningense* 2298 imamo najbolji rast na fruktozi. Sojevi *B. japonicum* 2314 i *B. japonicum* USDA 110 nisu imali rast na laktozi, saharozi, maltozi i rafinozi. Soj *B. japonicum* 344 na svim ispitanih ugljikohidratima pokazao djelomičan rast. Organizmi koji iskorištavaju široki raspon ugljikohidrata i soli organskih kiselina kao izvor ugljika nazivaju se kemoorganotrofi. Rezultati su prikazani u Tablici 17.



Slika 22. Prikaz rasta autohtonih sojeva kvržičnih bakterija na različitim izvorima ugljikohidrata

Tablica 17. Rast sojeva na različitim izvorima ugljikohidrata

Lokacija/ oznaka izolata	Laktoza *	Saharoza *	Maltoza *	Rafinoza *	Galaktoza *	Fruktoza *	Dekstroza *
Vukovarsko – srijemska županija							
V1	++	++	++	++	++	+	++
V2	++	++	++	++	++	+	++
V3	++	++	++	++	+	+	++
V4	+	+	++	+	+	+	++
V5	+	+	+	+	+	++	+
V6	+	++	++	++	+	-	++
Bjelovarsko – bilogorska županija							
H1	++	++	++	++	++	++	+
H2	++	++	++	++	++	++	+
H3	+	+	+	+	++	++	+
H4	++	++	+	++	+	++	+
H5	++	++	++	++	+	++	+
H6	++	++	++	++	++	+	+
Koprivničko – križevačka županija							
K1	++	++	++	++	++	+	+
K2	++	++	++	++	++	++	+
K3	+	+	++	+	++	++	+
K4	+	+	++	+	++	++	+
K5	+	+	++	+	++	+	+
K6	+	+	++	+	+	+	+
Referentni							
USDA110^{T}	-	-	-	-	+	+	+
11554^{T}	-	-	-	-	-	-	+
344	+	+	+	+	+	+	+
2314^{T}	-	-	-	-	-	-	+
2298^{T}	-	-	-	-	++	++	+
5851^{T}	++	++	++	++	-	-	+

*dobar rast „++“; djelomičan rast „+“; izostanak rasta „-“

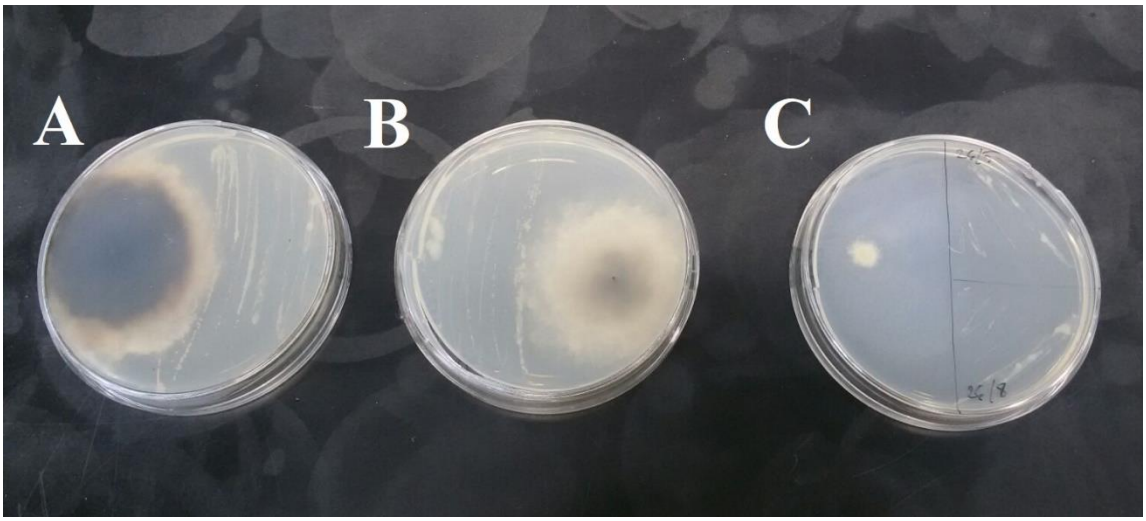
5.5. PGP karakteristike izolata

5.5.1. Antagonistička aktivnost izolata prema parazitskim gljivama rodova *Diaporthe spp.* i *Phomopsis sp.*

Nakon inkubacije u trajanju od 2 tjedna na temperaturi od 30˚C izmjeren je promjer gljiva rodova *Diaporthe spp*. i *Phomopsis sp* (Slika 23.). na Czapek dox agar hranjivoj podlozi. Izolati su pokazali veću otpornost na parazitsku gljivu roda *Diaporthe spp.* Rezultati su prikazani u Tablici 18.

Tablica 18. Otpornost izolata prema parazitskim gljivama

Lokacija/ oznaka izolata	**Parazitske gljive**	
	Diaporthe spp.	***Phomopsis sp.***
Vukovarsko – srijemska županija		
V1	rezistentna	3 cm
V2	rezistentna	2,3 cm
V3	0,5 cm	2 cm
V4	0,5 cm	3 cm
V5	0,3 cm	3,1 cm
V6	0,3 cm	1,9 cm
Bjelovarsko – bilogorska županija		
H1	0,4 cm	1,8 cm
H2	0,4 cm	1,5 cm
H3	0,3 cm	1,7 cm
H4	0,3 cm	3,3 cm
H5	rezistentna	3,2 cm
H6	rezistentna	1,8 cm
Koprivničko – križevačka županija		
K1	0,3 cm	3 cm
K2	0,3 cm	2 cm
K3	0,2 cm	2,5 cm
K4	0,2 cm	1,7 cm
K5	rezistentna	3 cm
K6	rezistentna	2 cm



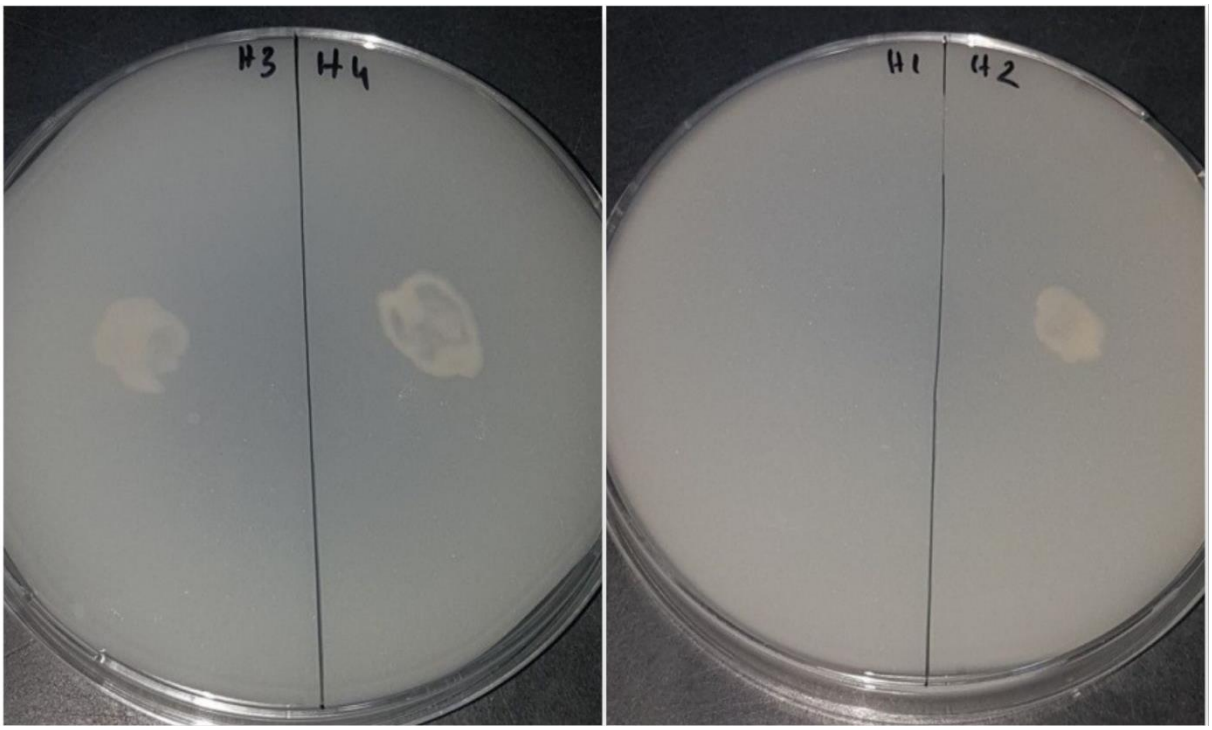
Slika 23. A,B – nisu otporne; C – otporne

5.5.2. Ispitivanje proizvodnje flourescentnog pigmenta

Ovo istraživanje koristi se za ispitivanje produkcije flourescentnog pigmenta florescina koji je karakterističan za rod *Pseudomonas.* Nakon inkubacije od 7 dana, gleda se fluorescencija pod UV svijetlom valne duljine 280 – 315 nm. Svi ispitani izolati bili su negativni što znači da među ispitanim izolatima nije prisutan rod *Pseudomonas*.

5.5.3. Razgradnja fosfora – P solubilizacija

Provođenjem testa mobilnosti fosfata, ispitani izolati koji imaju sposobnost proizvodnje organske kiseline, stvarali su bijele zone na hranjivoj podlozi (Slika 24.). Dobiveni rezultati pokazuju da autohtoni sojevi kvržičnih bakterija H1 i V6 nemaju mogućnost mobilizacije fosfata. Od referentnih sojeva nemogućnost mobilizacije fosfata imaju *S. fredii* 5851 i *B. japonicum* 2314. Svi ostali izolati imaju mogućnost mobilizacije. Rezultati su prikazani u Tablici 19.



Slika 24. Autohtoni sojevi kvržičnih bakterija koji imaju sposobnost proizvodnje organske kiseline; izolat H1 – nema sposobnost

Tablica 19. Razgradnja fosfata autohtonih i referentnih sojeva kvržičnih bakterija

Lokacija / oznaka izolata	Mobilnost fosfata*
Vukovarsko – srijemska županija	
V1	+
V2	+
V3	+
V4	+
V5	+
V6	-
Bjelovarsko – bilogorska županija	
H1	-
H2	+
H3	+
H4	+
H5	+
H6	+
Koprivničko – križevačka županija	
K1	+
K2	+
K3	+
K4	+
K5	+
K6	+
Referentni:	
USDA 110 ^{T}	+
11554 ^{T}	+
344	+
2314 ^{T}	-
2298 ^{T}	+
5851^{T}	-

*pozitivno „+“; negativno „-“

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti da se sojevi kvržičnih bakterija, uzeti s tri različite lokacije koji su izolirani s korijena soje, razlikuju u svojim fenotipskim karakteristikama.

- utvrđeno je da su svi izolati Gram negativne bakterije štapićastog oblika.

- Sojevi su rasli na hranjivoj podlozi YMA bromtimol plavo, 54% izolata stvaralo je alkalnu reakciju na podlozi (plava boja), dok je kod ostalih 46% izolata ispitanih sojeva došlo do promjene podloge u žutu zbog stvaranja kisele reakcije.

- Postupkom bojenja vanjskih bakterijskih struktura utvrđeno je da ispitani sojevi kvržičnih bakterija ne posjeduju glikokalis.

- Provedbom katalaza testa utvrđeno je da su svi ispitani sojevi pokazali negativan rezultat.

- Kod većine sojeva nije dokazana prisutnost ureaze provedenim ureaza testom.

- Oksidaza test pokazuje da 40% ispitanih sojeva bakterija posjeduje enzim citokromoksidazu. Kod ostalih sojeva nije došlo do promjene boje što ukazuje na negativan rezultat prilikom provođenja oksidaza testa.

- Kod provedbe testa za sposobnost korištenja citrata pozitivan rezultat imali su izolati: V1, V3, i H1, dok su svi ostali izolati pokazali negativan rezultat.

- Sposobnost bakterija da hidroliziraju škrob pokazalo je oko 60 % ispitanih sojeva bakterija.

- Svi ispitani sojevi pokazali su pozitivan rast pri temperaturi od 37 °C. Kod izolata koji su bili na inkubaciji 7 dana pri temperaturi od 42 °C, rast je izostao.

- Jedna od prednosti koje populacije kvržičnih bakterija mogu imati je otpornost na povišene koncentracije soli u tlu. Na hranjivoj podlozi koja je sadržavala 1 % NaCl,

56% ispitanih sojeva pokazuje toleranciju. Na koncentraciji od 2 % NaCl rast je pokazalo samo 27 % sojeva. Sojevi sa područja Koprivničko – križevačke županije (K2 i K3) jedini su pokazali mogućnost rasta na sve tri ispitivane koncentracije soli.

- Od 18 ispitanih sojeva 17 ih pokazuje dobar rast na pH 4,5. Svih 18 ispitanih izolata imalo je pozitivan rast na pH 5,5 i 9, dok na pH 11 samo su V1,V2 i V6 pokazivali dobar rast. Referentni sojevi *B. japonicum* 344, *B. elkanii* 1554 i *B. japonicum* USDA110 pokazuju dobar rast na pH 4,5, 5,5 i 9 te slab rast na pH 11. Referentni soj *B. japonicum* 2314 pokazuje dobar rast samo na pH 5,5 dok na ostalim ispitanim pH vrijednostima prikazuje slab rast. Kod referentnog soja *S.fredii* 5851 nema rasta na pH 4,5, dok je dobar rast prisutan na pH 9 i 11. Referentni soj *B. liaoningense* 2298 nema rasta na pH vrijednostima 4,5 i 5,5 dok u alkalnoj sredini pokazuje slabi rast.

- Najveći broj ispitanih izolata pokazuje rezistentnost na antibiotik ampicilin (10 µg/disk). Najveća osjetljivost većine ispitanih sojeva uočena je na antibioticima eritromicin (15 µg/disk) i kanamicin (30 µg/disk). Rezistentnost na kanamicin (30 µg/disk) pokazala su samo 2 izolata sa područja Hercegovca.

- Sojevi za rast mogu iskorištavati i druge šećere osim manitola koji je sastavni dio YMA hranjive podloge. Dobar rast na laktozi pokazalo je 50 %, na saharozi 42 %, maltozi 71 %, rafinozi 50 %, galaktozi 46 %, fruktozi 33 % te dekstrozi 21% ispitanih sojeva. Kod svih referentnih uzoraka bio je prisutan djelomični rast na galaktozi i dekstrozi, osim soja 11554 koji je pokazao dobar rast na galaktozi. Kod referentnog soja *S. fredii* 5851 rast nije bio prisutan na fruktozi, dok je soj 2298 imamo najbolji rast na fruktozi. Sojevi 2314 i USDA 110 nisu imali rast na laktozi, saharozi, maltozi i rafinozi. Soj 344 na svim ispitanih ugljikohidratima pokazao djelomičan rast.

- Kod ispitivanja proizvodnje flourecentnog pigmenta kod različitih sojeva kvržičnih bakterija, svi ispitani izolati bili su negativni što znači da među ispitanim izolatima nije prisutan rod *Pseudomonas.*
- Provođenjem testa mobilnosti fosfata izolati H1 i V6 nisu pokazali mogućnost mobilizacije fosfata. Od referentnih izolata nemogućnost mobilizacije fosfata imaju izolati 5851^T i 2314^T. Svi ostali izolati pokazivali su mogućnost mobilizacije.

- Provođenjem ispitivanja antagonističke aktivnosti izolata prema pojedinim gljivama izolati sa sve tri lokacije uzgajani s gljivama roda *Phomopsis sp*. nakon inkubacije imali su izmjeren veći promjer gljive nego izolati koji su uzgajani s gljivom *Diaporthe spp*. Otpornost na gljive roda *Diaporthe spp*. pokazuju izolati V1, V2, H5,H6, K5 i K6. Jedan od osnovnih problema koji donosi povećanje površina i intenziviranje proizvodnje soje svakako je problem bolesti i to prije svega bolesti uzrokovanih fitopatogenim gljivama na koje otpada oko 80% svih bolesti soje, dok preostalih 20% uzrokuju bakterije i virusi.

- Ovo je preliminarno istraživanje kojim je obuhvaćen mali broj izolata. Utvrđeno je da se autohtoni sojevi rizobija koji noduliraju soju međusobno razlikuju po svojim svojstvima. Što se tiče morfoloških karakteristika svi ispitani izolati imaju glavne morfološke karakteristike roda *Bradyrhizobium.* Kod ispitanih izolata, utvrđene su razlike u njihovim biokemijskim svojstvima. Uočena je razlika u abiotskim svojstvima što ima važnu ulogu u njihovoj potencijalnoj primjeni u pripremi preparata za inokulaciju.

- Preporuča i upotreba molekularnih metoda koje se najčešće baziraju na proučavanju nukleinskih kiselina te omogućavaju klasifikaciju i identifikaciju pojedinih izolata na razini roda, vrste i sojeva neovisno o fazi i uvjetima rasta mikroorganizama.

7. LITERATURA

1. Bacanamwo M. i Purcell L.C. (1998): Soybean dry matter and N accumulaation responses to flooding stres, N sources and hypoxia. University of Arkansas, Altheimer Lab., Department of Agronomy
2. Belal E. B., Hassan M. M. i El-Ramady H. R. (2013). Phylogenetic and characterization of salz – tolerant rhizobial strain nodulating faba bean plants. Afican Journal of Bioechnology Vol. 12(27) . 4324 – 4337
3. Blažinkov M., Vrbanac D., Huić Babić K., Sikora S. (2010.) Fenotipska karakterizacija autohtonih sojeva Sinorhizobium meliloti. Agronomski glasnik. 4-5/2010.
4. Angelini, J. T. Taurian, C. Morgante, F. Ibanez, S. Castro and A. Fabra (2005) Peanut nodulation kinetics in response to low pH, Plant Physiol. Biochem, 43; 754-759
5. Brenner, D.J., Krieg N.R. (2006.): Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria. Springer Science & Business Media.
6. Caldwell, B. E., and Vest, G. (1970.): Effects of Rhizobium japonicum strains on soybean yields. Crop. Sci. 10: 19-21.
7. Carlson, J.B. (1973.): Morphology. P. 17-95. In B.E. Caldwell, (ed.) Soybeans: improvement, production and users. Agronomy Mono.16. ASA, Madison, WI USA
8. Fox, J. E., Gulledge, J., Engelhaupt, E.,Burow, M. E., McLachlan, J. A. (2007): Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America 104: 10282-10287.
9. Friščić, O., Uher, D., Abramović- Friščić, K. (2011.): Utjecaj bakterizacije na gospodarska svojstva novih kultura ozimog graška. Sjemenarstvo 28: 1-2.
10. Grossman, J.M., Sheaffer, C., Wyse, D., Graham, P.H. (2005.): Characterization of slow-growing root nodule bacteria from Inga oerstediana in organic coffee agroecosystems in Chiapas, Mexico. Applied Soil Ecology 29: 236-251.
11. Havlin, J.L., Beaton, J. D., Tisdale, S. L. and W. L Nelson. (2005.): Soil Fertility and Fertilizers: An Introduction to Nutrient Management. 7th edition, Prentice Hall publishers, pp 102 -107.

12. Hepperly, P.R., Sinclair J.B. (1980.): Associations of plant symptoms and pod position with Phomopsis soyae seed infection and damage in soybean. Crop science 20: 379-381.
13. Husnjak S. (2014): Sistematika tala Hrvatske. Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb.
14. Jug, D., Blaţinkov, M., Redţepović, S., Jug, I., Stipešević, B. (2005.): Utjecaj različitih varijanata obrade tla na nodulaciju i prinos soje. Poljoprivreda 11 (2): 38-43
15. Jukić G, Guberac V, Marić S, Dunković D (2007.): Ekonomski aspekti proizvodnje soje u Istočnoj Hrvatskoj. Poljoprivreda znanstveno-stručni časopis. 13, 2; 23-28.
16. Kaspar, T.C. (1988.): Growth and development of soybean root systems. P. 841-847. In R. Shibles (ed.) Proceedings of WSRC III. Ames. lowa, USA.
17. Keyser H.H., Li F. (1992.): Potential for increasing biological nitrogen fixation in soybean. Plant and Soil 141: 119-135
18. Komesarović, B., Redžepović, S., Blažinkov, M., Sudarić, A., Uher, D., Sikora, S. (2007): Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva *Bradyrhizobium japonicum*. Mlijekarstvo 57 (4) 289-302
19. Maheshwari, D.K. (2014.): Bacterial Diversity in Sustainable Agriculture. Springer.
20. Manavalan L.P., Guttikonda S.K., Tran L.S.P., Nguyen H.T. Physiological and molec (2009.): ular approaches to improve drought resistance in soybean. Plant and Cell Physiology ;50(7) 1260-1276.
21. McGee, D.C. (1986.): Prediction of Phomopsis Seed Decay by measuring soybean pod infection. Plant Disease 70: 329-333.
22. Milošević, N., Govedarica, M., Jarak, M. (2000.): Mikrobiološka svojstva zemljišta oglednog polja Rimski šančevi. Zb. Radova, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 33: 13-20.
23. Mitchell, R. L., Russell, W. J. (1971.): Root development and rooting patterns of soybean (Glycine max (L.) Merr.) evatuated under field conditions, Agron. J. 63: 13-316.
24. Molnar, I. (1998): Odnos soje prema spoljnim činiocima. U: Soja. Hrustić M., Vidić M. I Jocković Đ (ur.). Novi Sad, 16:41-52.
25. Moschetti, G., Peluso, A., Protopapa, A., Anastasio, M., Pepe., Defez, R. (2005.): Use of nodulation pattern, stress tolerance,nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP-16S rDNA analysis to descriminate genotypes of Rhizobium leguminosarum biovar viciae. Systematic and Applied Microbiology 28: 619-631.
26. Pospišil A. (2010): Ratarstvo I. dio, Zrinski d.d. Čakovec

27. Redţepović, S., Sikora, S., Sertić, Đ., Manitašević, J., Šoškić, M., Klaić, Ţ. (1991.): Utjecaj fungicida i gnojidbe mineralnim dušikom na bakterizaciju i prinos soje. Znan. Prak. Poljop. Tehnol. 21:43-49.
28. Redžepović, S., Varga, B., Sikora, S., Heneberg, R. (1990.a): Utjecaj tretiranja sjemena mikroelementima i različitim sojevima Bradyrhizobium japonicum na prinos zrna soje. Znanstvena praksa u poljoprivrednoj tehnologiji 20: 41.-47.
29. Roughley, R. J. (1970.): The influence of root temperature, Rhizobium strain and host selection on the structure and nitrogen-fixing efficiency of the root nodules of Trifolium subterraneum. Ann. Bot. 34:631-646.
30. Saeki Y. (2011.): Characterization of Soybean-Nodulating Rhizobium Communities and Diversity. CC BY NC-SA 3.0 Licence. DOI: 10.5772/14417
31. Sudarić, A., Vratarić, M., Volenik, S., Duvnjak, T. (1997.): Parameters for the estimation of genetic gain in soybean breeding program at the Osijek Agricultural Institute. *Eurosoya* 11: 16-22.
32. Topol, J. i Kaniţai Šarić, G. (2013.): Simbiotska fiksacija dušika u ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji, Agronomski glasnik, Vol 75, No. 22-3.
33. Vadez V, Berger JD, Warkentin T, Asseng S, Ratnakumar P, Rao KPC, Gaur PM, Munier-Jolain N, Larmure A, Voisin AS, Sharma HC, Pande S, Sharma M, Krishnamurthy L, Zaman MA (2011.): Adaptation of grain legumes to climate change: a review. Agron Sustain Dev 32:31–44. doi:10.1007/s13593-011-0020-6.
34. Van Toai T., Martin S., Chase K., Boru G., Schnipke V., Schmitthenner F., Lark K., (2001.): Identification of a QTL Associates with Tolerance of Soybean to Soil Waterlogging. Crop Sci. 41:1247-1252
35. Vance C. P. (2002): Root-bacteria interactions; symbiotic nitrogen fixation. Plant Roots: The Hidden Half (Waisel, Y., Eahel, A., Kafkati U., eds), Marcel Dekker Publishers, New York, 839 – 867.
36. Vince, J. M., (1970): A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. International Biological Programme Handbook No. 15, London.
37. Vratarić, M. (1983.): Utjecaj ekoloških faktora na oplodnju i zametanje mahuna kod nekih sorata soje u odnosu na komponente prinosa na području Osijeka. (Dizertacija) Znanost i prak. Poljop. Tehnol. (Poseban broj) Osijek. 1-239
38. Vratarić, M., Sudarić, A. (2008): Soja Glicine max. Merr., Poljoprivredni institut Osijek.

39. Zahran, H. H. (1999.): Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate, Microbiology and molecular biology reviews, p. 968–989, Vol. 63, No. 4.
40. Znaor D. (2009.) Hrvatska poljoprivreda ususret i nasuprot klimatskim promjenama. Prilog za okrugli stol „Sigurnost proizvodnje i opskrbe hranom u post-Kyoto periodu“ u organizaciji Heinrich Boll Stiftung-a 15.prosinca 2009. u Zagrebu.

Internetski izvori

http://pinova.hr/hr_HR/baza-znanja/ratarstvo/soja (pristupljeno: 17.4.2018.)
https://microbeonline.com/oxidase-test-principle-procedure-and-oxidase-positive-organisms/ (pristupljeno: 17.4.2018.)
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3904044/ (pristupljeno: 19.4.2018.)
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3904044/ (pristupljeno: 19.4.2018.)
http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0097&org=74&c=UK&lang=EN (pristupljeno: 19.4.2018.)
https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x (pristupljeno: 19.4.20018.)
https://books.google.hr/books?id=ZYWzwbdJRbMC&pg=PA13&lpg=PA13&dq=fluorescein+microbiology&source=bl&ots=uiA4MwfpO3&sig=J8LCk7dSaKz0ZFzyvvu4IG_sfMo&hl=hr&sa=X#v=onepage&q=fluorescein%20microbiology&f=false (pristupljeno: 19.4.2018.)

8. ŽIVOTOPIS

Nika Skendrović rođena 13. Kolovoza 1992. godine u Zagrebu. Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga, smjer ekološki tehničar završava 2011. godine u Zagrebu. Iste godine upisuje preddiplomski stručni studij agroekologije na Agronomskom fakultetu u Zagrebu kojeg završava 2015. godine obranom završnog rada te stječe akademski naziv sveučilišni prvostupni inženjer agronomije (univ. bacc. ing. agr.). Završni rad pod naslovom „Razlozi drastičnog smanjenja populacije europske jegulje (*Anguilla anguilla*)“ izradila je na Zavodu za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju. Također, 2015. godine upisuje diplomski sveučilišni studij na istom fakultetu, smjer agroekologija, usmjerenje mikrobna biotehnologija u poljoprivredi. Tijekom školovanja završava tečaj za trenera sinkroniziranog plivanja i suca. Od 2017. godine je glavni trener juniorske i mlađe juniorske reprezentacije sinkroniziranog plivanja s kojom sudjeluje na brojnim europskim i svjetskih natjecanjima.