# Značaj asocijativnih i endofitskih fiksatora dušika u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji

**Spasenić, Lora**

**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:204:366037

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**



*Repository / Repozitorij:*

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb








SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
**AGRONOMSKI FAKULTET**

# ZNAČAJ ASOCIJATIVNIH I ENDOFITSKIH FIKSATORA DUŠIKA U ODRŽIVOJ POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI

DIPLOMSKI RAD

Lora Spasenić

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
**AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:
Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

# ZNAČAJ ASOCIJATIVNIH I ENDOFITSKIH FIKSATORA DUŠIKA U ODRŽIVOJ POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI

DIPLOMSKI RAD

Lora Spasenić

Mentor: prof. dr. sc. Sanja Sikora

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
**AGRONOMSKI FAKULTET**

# IZJAVA STUDENTA
## O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Lora Spasenić**, JMBAG 0178090111, rođen/a dana 12. rujna 1992. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**ZNAČAJ ASOCIJATIVNIH I ENDOFITSKIH FIKSATORA DUŠIKA U ODRŽIVOJ POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI**

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 studentice **Lore Spasenić**, JMBAG 0178090111, naslova

**ZNAČAJ ASOCIJATIVNIH I ENDOFITSKIH FIKSATORA DUŠIKA U ODRŽIVOJ POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

| Povjerenstvo: | | | potpisi: |
|---|---|---|---|
| 1. | prof. dr. sc. Sanja Sikora | mentor | _____ |
| 2. | izv. prof. dr. sc. Željka Zgorelec | član | _____ |
| 3. | prof. dr.sc. Mihaela Britvec | član | _____ |

## SADRŽAJ


**1. UVOD ..... 1**

1.1. Cilj rada ..... 2

**2. RIZOSFERA ..... 3**

**3. ZNAČAJ ODRŽIVE POLJOPRIVREDE DANAS ..... 5**

**4. BAKTERIJE KOJE POSPJEŠUJU RAST BILJAKA (PGPR) ..... 7**

4.1. Direktni mehanizmi djelovanja PGPR bakterija ..... 11
4.1.1. PGPR i produkcija hormona rasta ..... 11
4.1.2. Biološka fiksacija dušika ..... 14
4.1.3. Otapanje fosfata ..... 14
4.1.4. Stvaranje hlapljivih organskih spojeva ..... 15
4.2. Indirektni mehanizmi djelovanja PGPR bakterija ..... 16
4.2.1. Proizvodnja siderofora ..... 16
4.2.2. Stvaranje antibiotika od PGPR bakterija ..... 17
4.2.3. Ponašanje PGPR bakterija pod uvjetima stresa ..... 18

**5. BIOLOŠKA FIKSACIJA DUŠIKA ..... 21**

5.1. Asocijativna fiksacija dušika ..... 22
5.1.1. Asocijativni fiksatori dušika ..... 22
5.1.1.1. Bakterije roda *Azotobacter* ..... 23
5.1.1.2. Bakterije roda *Azospirillum* ..... 24
5.2. Endofiti ..... 27
5.2.1. Rod *Rhizobium* ..... 29
5.2.2. Rod *Bradyrhizobium* ..... 30
5.3. Asimbiozna (slobodna) fiksacija dušika ..... 30

**6. ZAKLJUČAK ..... 32**

**7. LITERATURA ..... 34**

**8. ŽIVOTOPIS ..... 40**

# Sažetak

Uz dovoljne količine Sunčeve energije i vode u poljoprivrednoj proizvodnji, osnovni faktor postizanja optimalnih prinosa, te rasta i razvoja biljaka, je dušik. Najveće količine dušika nalaze se u atmosferi, gdje je pohranjen u molekularnom obliku koji nije dostupan za biljke. Procesom biološke fiksacije dušika, molekularni oblik dušika reducira se do spojeva koje biljke mogu usvajati i koristiti za svoje metaboličke potrebe. Biološka fiksacija dušika dijeli se na simbioznu, asocijativnu i asimbioznu fiksaciju. Najznačajnija od svih, simbiozna fiksacija dušika, nastaje kao rezultat simbioze između većine leguminoznih biljaka i rizobija. Asocijativna fiksacija dušika odvija se na površini korijena, a najpoznatiji rodovi bakterija koji vrše ovu fiksaciju su *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus* i *Klebsiella*. PGPR (*Plant growthpromoting rhizobacteria*) su bakterije koje žive slobodno u tlu, a pozitivno utječu na rast biljaka. Najčešće se karakteriziraju kao bakterije koje svojom metaboličkom aktivnošću pospješuju rast biljaka. Aktualna saznanja o popratnim negativnim posljedicama korištenja kemijskih sredstava u poljoprivredi, povećala su interes za bolje razumijevanje aktivnosti mikrobiološke populacije u rizosferi i njihove primjene u poljoprivredi. Aktivnost mikrobiološke populacije može se iskoristiti kao jeftina biotehnologija te predstavlja osnovu strategije koja pomaže razvoju održive poljoprivrede i zaštiti životne sredine. U razdoblju održive biljne proizvodnje, interakcije biljaka i mikroorganizama imaju sve veći značaj u transformaciji i mobilizaciji hranjiva iz ograničenih zaliha u tlu, a zatim u usvajanju tih hranjiva kako bi biljke ostvarile svoj maksimalni genetski potencijal.



**Ključne riječi**: biološka fiksacija dušika, dušik, fiksatori dušika, PGPR

## Summary

With sufficient amount of solar energy and water in agricultural production, main factor for achieving optimum yield and for growth and development of plants, is nitrogen. Largest stock of nitrogen is in the atmosphere, where the nitrogen is found in molecular form which is unavailable for plants. Through nitrogen fixation, molecular nitrogen is reduced to compounds which plants can uptake and use for their own metabolic needs. Nitrogen fixation can be divided on symbiotic, associative and asymbiotic fixation. The most important of all, symbiotic fixation, occurs as a result of symbiotic interaction between most of leguminous plants and rhizobia. Associative nitrogen fixation is active on the root surface, and the most important bacterial genera for this type of fixation are *Azotobacter*, *Azosirillum*, *Bacillus* i *Klebsiella.* PGPR (*Plant growth-promoting rhizobacteria*) are free living bacteria in the soil and they have a positive impact on the plant growth. They are characterized as bacteria that promote plant growth through their metabolic activity. Current knowledge about side effects of using different chemicals in agriculture, made a huge interest for better understanding of microbial activity in the rhizosphere and its use in agriculture. Activity of microbial population can be used as an economical biotechnology and it presents the base of strategy that helps developing sustainable agricutlure and protects the environment. In sustainable agriculture, interaction between plants and microorganisms has an increassing importance in transformation and mobilization of nutrients from limited supplies in the soil, and also in uptaking those nutrients for plants to achieve their maximum genetical potential.



**Keywords**: nitrogen fixation, nitrogen, symbiotic nitrogen fixing bacteria, PGPR

# 1. UVOD

Prehrana stanovništva danas predstavlja jedan od najvećih svjetskih problema. Ljudska populacija u naglom je porastu i pretpostavlja se da bi već 2020. godine mogla doseći broj od 8 milijardi ljudi. Ljudska egzistencija ovisna je o hrani koja danas postaje ograničeni resurs i temelj opstanka. Postavlja se pitanje na koji način osigurati dovoljno hrane za svjetsku populaciju i hoće li postojeće metode biti u mogućnosti zadovoljiti rastuće potrebe. Suvremena poljoprivredna proizvodnja trebala bi odgovoriti na to pitanje bazirajući se na održivim i ekološkim principima.

Upravo zato, znanstveni napredak u području agronomije, kemije i biologije ključan je segment koji će morati osigurati poboljšanje postojećih metoda, kao i omogućiti nastanak novih izvora hrane.

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

Dušik se općenito smatra esencijalnim biljnim hranjivom pa je dušična gnojidba nezamjenjiva agrotehnička mjera u svrhu postizanja visokih prinosa (Vukadinović i Lončarić, 1997.). Od svih mineralnih gnojiva koja se danas koriste, dušična gnojiva predstavljaju najveću opasnost za onečišćenje površinskih i podzemnih voda, posebno nitratni oblik ($NO_3^-$). Fiksatori dušika važan su čimbenik ekološke poljoprivredne proizvodnje te imaju višestruke pozitivne učinke kako na poboljšanje kvalitete tla, tako i na smanjenje onečišćenja podzemnih voda nitratima. Kao takvi, fiksatori dušika su od najvećeg značenja za poljoprivredu jer omogućuju obogaćivanje poljoprivrednih tala dušikom te značajno smanjuju potrebu za primjenom mineralnih dušičnih gnojiva.

Biološki fiksatori dušika procesom vezivanja atmosferskog dušika opskrbljuju biljku reduciranim dušikom, a od nje uzimaju tvari potrebne za svoj razvoj. Ako u tlu postoje dovoljne količine raspoloživog dušika, tako da su zadovoljene potrebe biljke domaćina i

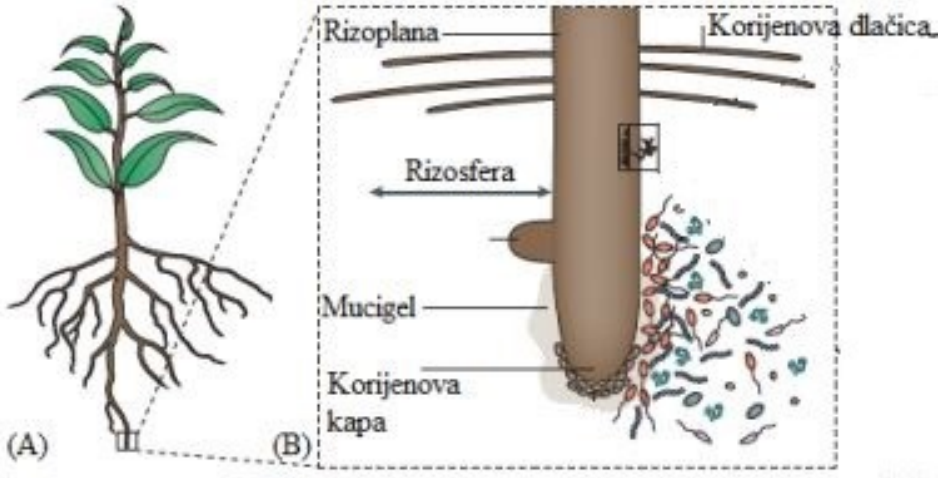
bakterija, rast kvržica se smanjuje uz opadanje njihovog broja (Vukadinović i Vukadinović, 2011.).

### 1.1. Cilj rada

Cilj rada je pregledno prikazati značaj nekih korisnih asocijacija biljaka i mikroorganizama u suvremenoj biljnoj proizvodnji i zaštiti okoliša. Pažnja će prvenstveno biti usmjerena na proces asocijativne fiksacije atmosferskog dušika i mogućnost većeg iskorištavanja ovog korisnog mikrobiološkog procesa u ishrani biljaka dušikom. Osim toga, prikazati će se i nove spoznaje o značaju različitih korisnih endofitskih bakterija koje mogu stimulativno djelovati na rast biljaka.

# 2. RIZOSFERA

Rizosfera je zona tla uz korijen biljke, a sastoji se od samog tkiva i površine oko korijena koja je pod njegovim konstantnim utjecajem (Slika 1.). Rizosfera, kao područje u kojem se neprekidno odvijaju razne interakcije između mikroorganizama, biljaka i tla, ima stimulativan utjecaj na mikroorganizme koji se naziva rizosferni efekt. Uloga mikroorganizama koji naseljavaju područje rizosfere jest sinteza biljnih asimilativa i razgradnja korijenskih eksudata. Jedni od najpoznatijih i najzastupljenijih rodova takvih mikroorganizama su bakterije iz rodova *Pseudomonas, Agrobacterium, Arthrobacter, Azospirillum* i *Rhizobium*. Složena mikroklima kojom odiše rizosfera omogućava osnivanje jedinstvenih zajednica. Zajednice korisnih bakterija i gljiva u interakciji s korijenom imaju velik potencijal za detoksikaciju štetnih organskih spojeva te za mnoge druge procese koji su od velike važnosti, primjerice fiksacija atmosferskog dušika. Zanimanje za mikroorganizme u tlu poraslo je krajem 19. stoljeća, kada je otkrivena simbioza između kvržičnih bakterija i leguminoza. Tada se uvodi pojam rizosfera – dio zemljišta koji je pod utjecajem biljnog korijena. Rizosfera je bogatija bakterijama od ostalih slojeva tla, a predstavlja zonu tla koja uključuje korjenov sustav. Rizosferni mikroorganizmi imaju koristi od izlučevina korjenovog sustava biljaka koje iskorištavaju kao hranjive tvari. Ovaj efekt je prouzrokovan činjenicom da su znatne količine fiksiranog ugljika ispuštene kroz eksudate korijena od strane biljke (5-21%). Rizosfera je zona tla u kojoj korijen utječe na biološke i kemijske značajke tla. Prilikom svog rasta kroz tlo, korijenje otpušta vodotopive spojeve kao što su aminokiseline, šećeri i organske kiseline koje služe kao rezerva hrane mikroorganizmima. Što su mikroorganizmi bliže korjenovom sustavu, to je mikrobiološka aktivnost veća zbog veće i bolje dostupnosti hranjiva. Zauzvrat, mikroorganizmi opskrbljuju biljke hranjivim tvarima. Neki mikroorganizmi, uključujući bakterije i mikorizne gljive tvore asocijacije s korijenom od kojih oba člana imaju korist dok neki nemaju potrebu zbog dovoljne količine hranjiva u tlu. Nadalje, postoje neki mikroorganizmi sa izraženom naklonošću prema specifičnim biljnim vrstama. Takve interakcije mogu biti patogene (mikroorganizmi napadaju i uništavaju korijen i biljku), simbiozne (potiču rast biljke), štetne (smanjuju rast biljke), saprofitne (žive na raspadnutom biljnom otpadu) i neutralne (nemaju utjecaja na biljku). Interakcije koje pozitivno utječu na poljoprivredu uključuju mikorize, nodulaciju leguminoza i stvaranje antimikrobnih spojeva koji sprječavaju rast patogena. Rizosferni mikroorganizmi produciraju vitamine, antibiotike i biljne hormone koje potiču rast biljaka (Pacôme i sur., 2016.).




**Slika 1.** (A) Shematski prikaz rizosfere; (B) Uvećani prikaz rizosfere kao uskog (1-2 mm) sloja tla koji okružuje korijen i pod njegovim je utjecajem (izvor: Erić, 2016. )

# 3. ZNAČAJ ODRŽIVE POLJOPRIVREDE DANAS

Koncept održive poljoprivrede podrazumijeva razradu brojnih načela i djelovanja koja su preduvjet osmišljene provedbe tog koncepta. Tlo je smjesa praškastih i čvrstih čestica, vode i zraka, koja, opskrbljena hranjivima, može biti nositelj vegetacije. Definira se kao rastresit sloj Zemljine kore sposoban da bude stanište biljkama, a s ekološkog aspekta tlo je sloj Zemljine kore koji nosi biljke. Temelj održive poljoprivrede predstavlja obiteljsko gospodarstvo, posjed ili farma čija je najvažnija sastavnica tlo kao jedan od glavnih preduvjeta prakticiranja održive poljoprivrede (Hajduković i sur., 2010.). Razni načini za alternativnu ili održivu poljoprivredu se često spominju u kontekstu očuvanja okoliša za suvremeni život (Tovey, 1997.).

U ekološkom smislu održivost se može definirati kao način po kojem biološki sustavi ostaju raznoliki i produktivni tijekom vremena. Ona je ljudima potencijal za dugoročno blagostanje koje ipak ovisi o blagostanju prirodnog svijeta i odgovornom korištenju prirodnih resursa, te se često koristi termin održivi razvoj. Održiva proizvodnja je sustav upravljanja proizvodnjom hrane koji kombinira najbolje ekološke standarde, visok nivo bioraznolikosti, očuvanje prirodnih resursa, uz upotrebu prirodnih tvari i procesa (Mirecki i sur., 2011.).

Koristi za društvo od ekološke poljoprivrede očituju se u nezagađivanju tla, vode i zraka te nezagađivanju hrane. Svaka održiva poljoprivreda nije i ekološka, nego samo jedna varijanta ekološke poljoprivrede. Ipak u kontekstu održivosti, ekološka se poljoprivreda drži konkretnom i velikom vizijom (Cifrić, 2003.).

Simbioza mikroorganizama i biljaka jedan je od najvažnijih načina za razvoj održive poljoprivrede i proizvodnju dovoljne količine hrane za ljude i životinje uz minimalnu štetu po okoliš. Mikrobiološke zajednice u simbiozi imaju najveći utjecaj na poljoprivredu i ekosustav i razvoj upravo takvih zajednica neupitno je osnova za održivu poljoprivredu.

Poljoprivreda je jedan od najstarijih ekonomskih sektora u svijetu koji prije svega ovisi o plodnosti tla i klimatskim uvjetima. Ima velik utjecaj na ekološku ravnotežu, kvalitetu vode i tla te na očuvanje biološke raznolikosti. Agrotehničke mjere i ekonomija uvelike su se mijenjale s vremenom, pa je nažalost poljoprivreda postala jedan od najvećih izvora zagađenja okoliša. Upravo iz tog razloga, danas se pokušava puno više okrenuti održivoj poljoprivredi i iskoristiti sve prednosti interakcije mikroorganizama i biljaka.

Biljne bolesti su razlog velikih gubitaka prinosa i nestabilnosti ekosustava. Zadnjih par desetljeća, korištenje kemijski sredstava, kako bi se zaštitili usjevi, povećano je

proporcionalno sa povećanjem poljoprivredne proizvodnje u svijetu. Korištenje mineralnih gnojiva povećalo je prinose u poljoprivredi, ali nije ekonomski isplativo, i ono puno važnije, šteti okolišu. Njihovo korištenje crpi neobnovljivu energiju uz negativne efekte poput ispiranja, zagađivanja podzemnih voda, uništavanja mikroorganizama tla i insekata. Sve to usjeve čini podložnijima za bolesti, smanjuje se plodnost samog tla i uzrokuje nepopravljivu štetu za cijeli ekosustav.

Kako bi se prehranila rastuća populacija u svijetu, poljoprivrednici se u velikoj mjeri oslanjaju na korištenje gnojiva, posebno dušičnih. Aplikacija dušičnih gnojiva ima puno negativnih posljedica poput zagađenja površinskih i podzemnih voda preko ispiranja i denitrifikacije, što vodi ka narušavanju zdravlja ljudi i životinja. Također, proizvodnja dušičnih gnojiva koristi nepovratne izvore energije poput prirodnog plina i ugljena i uzrokuje stvaranje stakleničkih plinova čime doprinosi globalnom zatopljenju (Bhattacharjee i sur., 2008.).

Stoga, krajnje je vrijeme za pronalazak alternative i okretanje održivoj poljoprivredi, koja nema negativnih posljedica. Također, korištenje bakterija koje pospješuju rast i prinos biljaka (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria- PGPR*) moglo bi biti potencijalno rješenje u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji.

# 4. BAKTERIJE KOJE POSPJEŠUJU RAST BILJAKA (PGPR)

PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) su bakterije koje žive slobodno u tlu, a pozitivno utječu na rast biljaka. Najčešće se karakteriziraju kao bakterije koje pospješuju rast biljaka kroz sposobnost koloniziranja korijena. Zona tla koja okružuje korjenov sustav biljke, pod utjecajem je njegovih izlučevina i važna je zona za interakciju biljaka i mikroorganizama, može se definirati kao rizosfera. Primjena PGPR bakterija za povećanje prinosa limitirana je varijabilnošću između rezultata dobivenih u različitim uvjetima (laboratorij, staklenik, polje). PGPR bakterije predstavljaju alternativu upotrebi kemijskih sredstava za poboljšanje rasta biljaka. Aktualna saznanja o popratnim negativnim posljedicama korištenja kemijskih sredstava u poljoprivredi, povećala su interes za bolje razumijevanje aktivnosti mikrobiološke populacije u rizosferi i njihove primjene u poljoprivredi. Aktivnost mikrobiološke populacije može se iskoristiti kao jeftina biotehnologija te predstavlja osnovu strategije koja pomaže razvoju održive poljoprivrede i zaštiti životne sredine. U razdoblju održive biljne proizvodnje, interakcije biljaka i mikroorganizama imaju sve veći značaj u transformaciji i mobilizaciji hranjiva iz ograničenih zaliha u tlu, a zatim u usvajanju tih hranjiva kako bi biljke ostvarile svoj maksimalni genetski potencijal. Korištenje PGPR bakterija pronašlo je potencijalnu ulogu u razvoju održivih sustava biljne proizvodnje i danas se koriste diljem svijeta. Ove bakterije dijele se u dvije skupine prema svojoj lokaciji: one koje formiraju kvržice i smještene su unutar biljnih stanica, te bakterije koje ne formiraju kvržice, a žive van biljne stanice, no ipak potiču rast biljke. S obzirom na mehanizme djelovanja, bakterije koje potiču rast biljaka možemo podijeliti na: biofertilizatore, biostimulatore i biopesticide (Bučar, 2015.) (Tablica 1.). Neki od rodova bakterija koje poboljšavaju rast biljaka su: *Pseudomonas, Azospirillum, Azotobacter, Klebsiella, Enterobacter, Alcaligenes, Arthrobacter, Burkholderia, Bacillus* i *Serratia*. (Saharan i Nehra, 2011.)

**Tablica 1.** Podjela PGPR-a prema mehanizmu djelovanja

| PGPR | DEFINICIJE | MEHANIZAM DJELOVANJA |
|---|---|---|
| **Biofertilizatori** | Sadrže žive mikroorganizme, koji kada se primjenjuju na sjeme biljaka, poboljšavaju rast biljaka kroz povećanu opskrbu primarnih hranjiva za biljku domaćina | Biološka fiksacija dušika<br><br>Fosfofikacija<br><br>Fosfomobilizacija |
| **Biostimulatori** | Tvari koje potpomažu rast i razvoj biljaka (jači i brži rast, bolji imunitet, veći prinos, kvalitetniji plodovi) | Poticanje fizioloških i biokemijskih procesa<br><br>Povećanje otpornosti na stresne uvjete |
| **Biopesticidi** | Mikroorganizmi za bolji rast biljaka, djeluju na patogene | Proizvodnja antibiotika<br><br>Proizvodnja enzima |

Mikrobiološka kolonizacija rizosfere također utječe na biljke. Kloepper i Schroth (1978.) predlažu termin „PGPR“ (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) za važnu ulogu bakterija koje imaju utjecaj na rast biljaka na način da koloniziraju korijen biljke. Utjecaj tih mikroorganizama potiče ranije klijanje sjemena, povećava otpornost, prinos i biomasu biljke, te pojačan rast korjenovog sustava. Raznolikost svojstava i specifičnih gena pridonosi procesu koloniziranja korijena, ali dosad ih je samo nekoliko otkriveno: pokretljivost, kemotaksija sjemena, eksudata korijena, proizvodnja specifičnih spojeva na površini stanica, mogućnost iskorištavanja specifičnih spojeva koje ispušta korijen i izlučivanje proteina. Neke rizosferne bakterije potiču rast biljaka stimulirajući rast sjemena, dok neke mikorizne gljive omogućuju pojačan razvoj biljaka u vegetaciji jačim usvajanjem biljnih hranjiva. PGPR bakterije pozitivno utječu na rast biljaka kroz razne faktore među kojima su najvažniji: proizvodnja fitohormona, fiksacija dušika, regulacija proizvodnje etilena u korijenu, otapanje hranjiva, proizvodnja siderofora, poboljšanje funkcije mikorize te smanjenje toksičnosti teških metala. Koristi dodavanja PGRP bakterija su: povećana klijavost, rast korijena, veći prinos (zrno, listovi), povećani sadržaj klorofila, magnezija, dušika i proteina, veća otpornost na sušu, veću masu izdanka i korijena i odgođeno starenje listova.

PGPR prirodni mikroorganizmi tla, odnosno rizosfere, imaju veliku ulogu u biološkoj kontroli biljnih patogena. Također pružaju i zaštitu od virusnih bolesti. Upotreba PGPR-a

rasprostranjena je u regijama diljem svijeta. Neke rizobakterije mogu se koristiti kao pesticidi u borbi protiv patogena. Red koji posjeduje veliki potencijal kao PGPR je *Pseudomonadales*. Rod *Pseudomonas* spp. je sveprisutan u poljoprivrednim tlima. Otkrivanje načina na koji se odvija proces kolonizacije korijena, biotičkih i abiotičkih faktora koji utječu na korijen i mehanizme za suzbijanje patogena preko roda *Pseudomonas*, uvelike je promijenilo način razumijevanja procesa. Neke od osobina ovih bakterija imaju dobar učinak na suzbijanje bolesti:

- brz rast i velika produkcija biomase u staklenicima
- brzo iskorištavanje eksudata iz sjemena i korijena
- koloniziranje i razmnožavanje u rizosferi i unutrašnjosti biljke
- produkcija širokog spektra biološki aktivnih metabolita (npr. antibiotika, siderofora, hlapljivih sastojaka i supstanci koje poboljšavaju rast biljke)
- kompeticija s drugim organizmima
- prilagodljivost na različite okolišne uvjete i stresove

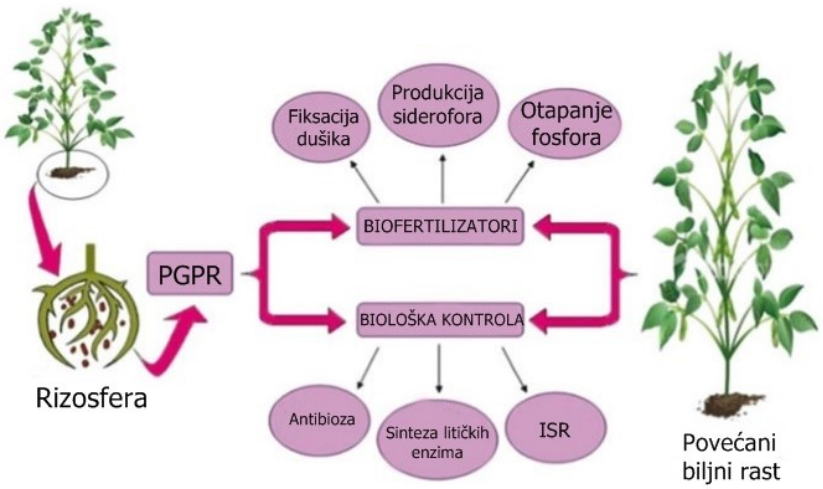
PGPR bakterije mogu poboljšati (indirektno i/ili direktno) rast biljaka, kao i kvalitetu biljaka na različite načine. One su ekološki prihvatljive, ekonomične i bezopasne. Također dobro utječu na kvalitetu i plodnost tla za održivu poljoprivrednu proizvodnju. Direktno djelovanje PGPR bakterija je sintetiziranje supstanci koje olakšavaju usvajanje određenih biljnih hranjiva iz okoliša. Indirektno djelovanje na rast biljaka događa se kada PGPR bakterije sprječavaju djelovanje fitopatogenih mikroorganizama. Točni mehanizmi kojima PGPR potiče rast biljaka nisu potpuno razjašnjeni, ali se smatra da uključuju: sposobnost proizvodnje ili promjene koncentracije regulatora rasta (auksin, giberelin, citokinin i etilen), asimbiotska fiksaciju dušika, antagonizam fitopatogenih mikroorganizama proizvodnjom siderofora, antibiotika i cijanida, otapanje mineralnih fosfata i drugih hranjivih tvari. Bakterijske vrste koje potiču rast biljaka moraju biti sposobne preživjeti i kolonizirati područje rizosfere. Interakcija između asocijativnih PGPR bakterija i biljaka može biti nestabilna. Dobri rezultati dobiveni in vitro ne mogu se uvijek pouzdano reproducirati u terenskim uvjetima. Varijabilnost učinka PGPR bakterija može biti posljedica različitih okolišnih čimbenika koji mogu utjecati na njihov rast i utjecaj na biljku. Okolišni čimbenici uključuju klimu, vremenske uvjete, karakteristike tla i sastav ili aktivnost autohtone mikrobne flore samog tla. Kako bi se postigla maksimalna interakcija između PGPR bakterija i biljaka,

važno je otkriti kako rizobakterije djeluju na biljke i jesu li učinci promijenjeni utjecajem različitih okolišnih čimbenika. Stoga je potrebno razviti što kvalitetnije sojeve bakterija. Kako se povećava razumijevanje rizosfere i mehanizama djelovanja PGPR bakterija, možemo očekivati da će novi PGPR proizvodi postati dostupniji. Uspjeh tih proizvoda ovisiti će o našoj sposobnosti upravljanja rizosferom kako bi se poboljšao opstanak i konkurentnost korisnih mikroorganizama.

Genetsko proučavanje PGPR sojeva u svrhu poboljšanja kolonizacije i učinkovitosti može uključivati dodavanje jednog ili više svojstava koji će biti povezani s boljim rastom biljaka. PGPR nudi ekološki održiv pristup povećanju proizvodnje i kvaliteti usjeva. Primjena molekularnih metoda povećava našu sposobnost razumijevanja i upravljanja rizosferom što dovodi do novih proizvoda s poboljšanim učinkom (Saharan i sur., 2011.).

- **MEHANIZMI DJELOVANJA PGPR BAKTERIJA**

Područje rizosfere je vrlo složen mehanizam. Za postizanje maksimalnog doprinosa interakcije između biljaka i mikroorganizama, potrebno je razumjeti mehanizme djelovanja PGPR-a u rizosferi. Mehanizmi djelovanja PGPR-a mogu se podijeliti u dvije skupine, direktne i indirektne mehanizme. U slučaju indirektnih mehanizama, djelovanje se događa izvan biljke, a direktni mehanizmi su oni koji se javljaju unutar biljke i izravno utječu na njen metabolizam. Ipak, razlike između ove dvije vrste mehanizama nisu uvijek vidljive. Shematski prikaz važnih mehanizama PGPR-a prikazan je na Slici 2.




**Slika 2.** Shematski prikaz važnih mehanizama PGPR bakterija (izvor: Kumar i sur., 2017)

U širem smislu, direktni mehanizmi uključuju proizvodnju stimulativnih bakterijskih hlapljivih tvari i fitohormona, snižavanje razine etilena u biljci, bolja hranjiva svojstva (oslobađanje fosfata i mikrohranjiva iz netopljivih izvora, asocijativna fiksacija dušika) i povećavanje otpornosti. Indirektni mehanizam PGPR-a djeluje kao biološki kontrolor koji povećava otpornost na bolesti, stimulira druge poželjne simbioze i štiti biljke od utjecaja ksenobiotika u kontaminiranim tlima. Dobro su proučeni PGPR vrste kao što su *Pseudomonas flourescens* i *Bacillus subtilis* (Deka i sur., 2015.).

### 4.1. Direktni mehanizmi djelovanja PGPR bakterija

Direktni mehanizam PGPR-a uključuje proizvodnju stimulativnih bakterijskih hlapljivih tvari i fitohormona, snižavanje razine etilena u biljci, bolja nutritivna svojstva (oslobađanje fosfata i mikronutrijenata iz netopljivih izvora, asimbiozna fiksacija dušika) i stimuliranje rezistentnosti na bolesti. Popis direktnih mehanizama prikazan je u Tablici 2. gdje se naglasak stavlja na proizvodnju fitohormona i njihovog reguliranja (etilen), hlapljivih organskih spojeva i njihovih stimulacijskih učinaka (Deka i sur., 2015.).

**Tablica 2.** Direktni mehanizmi PGPR-a

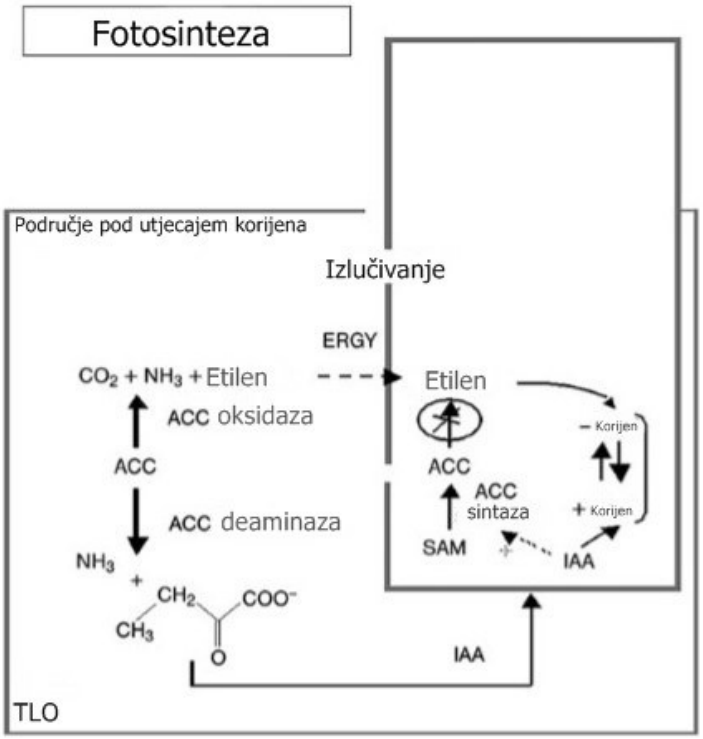
| **MEHANIZMI** | **POSLJEDICE** |
|---|---|
| Produkti PGPR bakterija | Biomasa (okolni dijelovi i korijen) |
| Inhibicija sinteze etilena | Dužina korijena |
| Otpornost | Vitalnost biljke |
| Povećanje permeabilnosti korijena | Biomasa i veće usvajanje hranjivih tvari |
| Mineralizacija organskih tvari (P,S,N) | Biomasa i hranjivi sadržaj |
| Asocijacija mikoriznih gljiva | Biomasa i pristupačnost fosfora |
| Kontrola insekata | Vitalnost biljke |

#### 4.1.1. PGPR i produkcija hormona rasta

Navedeno je da su PGPR bakterije povezane s proizvodnjom regulatora rasta biljaka. Regulatori rasta biljaka su tvari koje reguliraju rast, razvoj i fiziologiju biljaka. Glavni regulatori rasta biljaka su auksini, giberelini, etilen, citokinini i apscisinska kiselina. Od navedenih najznačajnija je sinteza hormona rasta. Slično tome, proizvodnja giberelina je utvrđena u nekoliko PGPR bakterija koje pripadaju rodovima *Achromobacter*, *Bacillus* spp., *Herbaspirillum* i *Gluconobacter*. Dokazano je da je inokulacija bakterijom *Azospirillum*

*brasilense* povećala sadržaj apscizinske kiseline kod biljke roda *Arabidopsis*, posebno kada se uzgaja pod osmotskim stresom (Hayat i sur., 2010). Prema procjeni, oko 80 % bakterija izoliranih iz rizosfere može proizvesti indol octenu kiselinu. Proizvodnja citokinina pomoću PGPR bakterija također je povezana s rastom biljaka. Nedavno izvješće daje važne informacije o ulozi koju imaju receptori citokinina u poticanju rasta biljaka kod bakterije *Bacillus megaterium*. Inokulacijom s bakterijom *B. megaterium*, soj izoliran iz rizosfere graha (*Phaseolus vulgaris L.*), utvrđeno je da potiče proizvodnju biomase talijinog uročka (*Arabidopsis thaliana)* i graha kako u laboratoriju, tako i u polju (Ortiz-Castro, Lopez-Bucio i sur. 2007). Učinak je bio povezan s promijenjenom građom korjenovog sustava u inokuliranim biljkama. Nadalje, učinci bakterijske inokulacije na rast i razvoj biljaka utvrđeni su neovisno o signalizaciji auksina i etilena, te neuspjeh aktiviranja ekspresije auksin-reporter markera. Proizvodnja giberelina ograničena je na nekoliko vrsta bakterija roda *Bacillus*.

PGPR bakterije imaju važnu ulogu u smanjenju koncentracije etilena koji se smatra biljnim hormonom i važnim dijelom mehanizma kontrole rasta i razvoja biljaka. Istraživanja pokazuju da pojedine vrste i/ili sojevi pospješuju toleranciju biljnih vrsta na abiotičke stresove, poput suše, saliniteta, nedostatka ili suviška hranjiva i visokog sadržaja teških metala. Najznačajniji mehanizam mnogih bakterija koje direktno pospješuju rast biljaka je produkcija enzima 1-aminociklopropan-1-karboksilne kiseline (ACC). U stresnim uvjetima ovaj bakterijski enzim olakšava rast biljaka jer razlaže biljni ACC (etilenski prekursor u biljkama). Smanjivanjem razine etilena biljka je otpornija na stresne uvjete u životnoj sredini. PGPR ima sposobnost preusmjeravanja biosinteze etilena, osobito u korjenovom sustavu, upotrebom aktivnosti amino-ciklopropankarboksilne kiseline (ACC) deaminaze. Razgradnja ovog spoja proizvodi gradijent koncentracije ACC između unutrašnjeg i vanjskog dijela biljke, omogućuje njegovo izlučivanje, što uzrokuje smanjenje unutarnje razine etilena. Prethodno navedeno u kombinaciji s auksinom koji može biti proizveden od strane istog mikroorganizma, uzrokuje značajan utjecaj na važne fiziološke procese kao što je razvoj korijenskog sustava (Slika 3.). Bakterijska ACC deaminaza konkurentna je ACC oksidaciji biljke. Ovaj enzim je izoliran i identificiran u nekoliko PGPR, koji imaju sposobnost korištenja ACC kao jedinog izvora dušika (Deka i sur., 2015.)




**Slika 3.** Regulacija etilena PGPR bakterija (izvor: Saraf i sur., 2010)

Neke PGPR bakterije sintetiziraju indol-3-octenu kiselinu (IAA). Auksin kontrolira nekoliko faza rasta i razvoja biljaka, kao što su elongacija stanica, stanična dioba, diferencijacija tkiva. Oko 80 % bakterija u rizosferi proizvodi IAA, pa se njihovom primjenom poboljšavaju koncentracije auksina koji ima značajan utjecaj na rast biljke. IAA koji su oslobodile rizobakterije uglavnom utječe na korijenski sustav povećanjem njegove veličine, težine, površine, a utječe i na sposobnost grananja. Sve ove promjene dovode do boljeg prodiranja korijena u tlo pa samim time i na bolje usvajanje hranjiva. Različite PGPR bakterije koriste različite načine za sintezu IAA.

Citokinini predstavljaju drugu skupinu fitohormona koje proizvede neki mikroorganizmi. Slično kao i IAA, citokinin poboljšava podjelu stanica, razvoj korijena, oblikovanje korjenovih dlačica i inhibira elongaciju korijena. Ostali procesi kao što su formiranje vaskularnog embrija, proširenje listova, razgranatost, proizvodnja klorofila, rast korijena, poticanje klijavosti sjemena također su jako pod utjecajem citokinina. Zabilježeni su različiti bakterijski rodovi (*Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* i *Xanthomonas*) koji posjeduju sposobnost proizvodnje citokinini (Dweipayan i sur., 2016.).

Giberelini su velika skupina fitohormona koji čine 136 različitih strukturnih molekula. To je skupina fitohormona koji utječu na mnoge razvojne procese u višim biljkama, uključujući

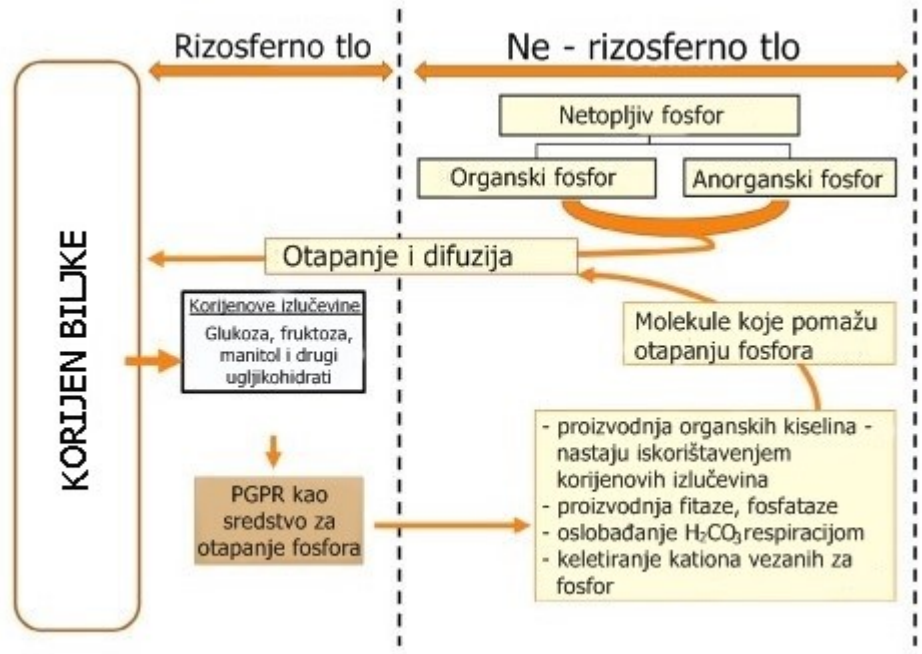
klijavost sjemena i staničnu elongaciju. Djelovanje PGPR bakterija kod biljaka koje proizvode giberelin nije točno poznat, već se takve bakterije koriste za klijavost sjemena. Gljive koje proizvode giberelin mogu biti fitopatogene (Dweipayan i sur., 2016.).

### 4.1.2. Biološka fiksacija dušika

Bakterijski sojevi koji imaju svojstvo vezanja dušika klasificiraju se u dvije kategorije. Prva kategorija uključuje simbiozne bakterije povezane s korijenjem tj. leguminozne simbiotske bakterije koje imaju sposobnost inficiranja korijena i stvaranja kvržica, npr. rod *Rhizobium*. Druga skupina bakterija su tzv. asocijativni fiksatori dušika koji nemaju specifičnost za biljke. Primjeri takvih asocijativnih fiksatora dušika uključuju bakterije iz rodova *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* i *Bacillus*. Iako asocijativni fiksatori dušika ne prodiru u biljna tkiva, žive u blizini korijena biljke tako da atmosferski dušik fiksiran od strane bakterija, koji ne koriste za vlastitu korist, biljci omogućava bolju apsorpciju dušika. Vrste koje pripadaju rodu *Azotobacter* i *Azospirillum* najčešće su korišteni u poljoprivrednim pokusima. Nekoliko sojeva tih rodova stekli su važnost u fiksaciji dušika, proizvodnji fitohormona (giberelin, citokinin, indol-3-octena kiselina) te poboljšavaju rast biljke. Stoga se fiksacija dušika smatra važnom osobinom PGPR bakterija zbog izravnog osiguravanja biljke dušikom (Oberson i sur.,2013.)

### 4.1.3. Otapanje fosfata

Nakon dušika, fosfor je najvažnije biljno hranjivo. Unatoč velikim zalihama, fosfor nije dostupan u oblicima pogodnim za biljku. Biljke su u mogućnosti apsorbirati fosfor samo u anionskom obliku kao $H_2PO_4^-$ i $HPO_4^{2-}$ . Mikroorganizmi mineraliziraju organski fosfor u tlu otapanjem kompleksnih fosfata u anorganski oblik koji biljka može usvojiti (Slika 4.). Ove fosfomobilizirajuće bakterije koriste različite mehanizme kako bi otopile netopive oblike fosfata. Primarni mehanizam otapanja fosfata temelji se na izlučevinama mikroorganizama zbog metabolizma šećera. Organizmi koji žive u rizosferi koriste šećere iz eksudata korijena i metaboliziraju ga kako bi se dobile organske kiseline. Mikroorganizmi oslobađaju te kiseline koje djeluju kao dobri kelatori $Ca^{2+}$ kationa za oslobađanje fosfora iz netopivog oblika. Mnogi mikroorganizmi koji se otapaju fosfate smanjuju pH medija lučenjem organskih kiselina kao što su octena, mliječna, jabučna, sukcinska, vinska, glukonska, 2-ketoglukonska, oksalna i limunska kiselina.(Dweipayan i sur., 2016.)




**Slika 4.** Shematski prikaz otapanja fosfora pomoću PGPR bakterija (izvor: Goswami i sur., 2016)

### 4.1.4. Stvaranje hlapljivih organskih spojeva

Hlapljivi organski spojevi koje proizvode neke PGPR bakterije također imaju važnu ulogu u rastu biljaka. Hlapljivi organski spojevi definiraju se kao spojevi koji imaju dovoljno visok tlak pare u normalnim uvjetima kako bi mogli ispariti u atmosferu. Emisija hlapljivih organskih spojeva ima važnu ulogu u većini mehanizama koje PGPR bakterije koriste u interakciji s biljkama. Mehanizam koji je dobio najveću pažnju u posljednjem desetljeću jest uloga hlapljivih organskih spojeva na antibiozu i biološku kontrolu biljnih patogena. Otkriće rizobakterija koje proizvode hlapljive organske spojeve predstavlja važan mehanizam za induciranje rasta biljaka pomoću rizobakterija. Proizvodnja bioaktivnih hlapljivih organskih spojeva PGPR bakterijama je specifični fenomen. Na primjer, PGPR sojevi, *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* i *Enterobacter cloacae* oslobađaju mješavinu hlapljivih sastojaka, osobito 2,3-butandiola i acetoina, za koje je potvrđeno da stimuliraju rast biljke talijin uročnjak (*Arabidopsis thaliana)*. Danas je utvrđeno da proizvodnja hlapljivih organskih spojeva od rizobakterijskih sojeva može djelovati kao signalna molekula u interakciji biljaka i mikroorganizama. To je moguće zato što se hlapljive tvari dobivene kolonizacijom korijena PGPR bakterijama proizvode pri dovoljnim koncentracijama kako bi potaknuli reakciju

biljaka. Način signalizacije hlapljivih organskih spojeva i njihovo sudjelovanje u otpornosti biljke na bolesti još uvijek je nepoznat (Deka i sur., 2015.).

### 4.2. Indirektni mehanizmi djelovanja PGPR bakterija

Indirektni mehanizmi PGPR bakterija nisu u potpunosti razjašnjeni. Stoga, vrlo je teško imati cjelokupan pogled na indirektne mehanizme djelovanja PGPR bakterija. Indirektni mehanizmi povezani su s biokontrolom, uključujući proizvodnju antibiotika, keliranje raspoloživog Fe u rizosferi, sintezu ekstracelularnih enzima koji hidroliziraju staničnu stjenku gljiva i konkurenciju za niše unutar rizosfere. Spomenuti su neki važni indirektni mehanizmi hormonalnog djelovanja zajedno s pridruženim PGPR bakterijama (Tablica 3.) (Deka i sur., 2015).

**Tablica 3.** Neki od indirektnih mehanizama PGPR bakterija

| **MEHANIZMI** | **PGPR** |
|---|---|
| **Produkti siderofora** | *Rhizobium meliloti*<br>*Pseudomonas sp.*<br>*Pseudomonas fluorescens* |
| **Fosfomobilizatori** | *Azospirillum spp.*<br>*Azotobacter*<br>*Bacillus*<br>*Burholderia*<br>*Enterobacter*<br>*Erwinia*<br>*Pseudomonas*<br>*Rhizobium spp.* |
| **Patogeni** | *Pseudomonas solanacearum*<br>*Pseudomonas cepacia* |

#### 4.2.1. Proizvodnja siderofora

Željezo je važan mikroelement za biljke. Djeluje kao kofaktor u brojnim enzimima koji su bitni za važne fiziološke procese kao što su disanje, fotosinteza i fiksacija dušika.

Željezo se nalazi u velikim količinama u tlu, ali često u nedostupnom obliku za biljke ili mikroorganizme tla. $Fe^{3+}$ je oksidirani oblik koji reagira na stvaranje netopivih oksida i hidroksida koji su nedostupni biljkama i mikroorganizmima. Biljke su razvile dvije strategije za učinkovitu apsorpciju željeza. Prvi je oslobađanje organskih spojeva sposobnih za kelatiranje željeza, kojim se prevodi u topivi oblik, difundira do biljke, reducira i apsorbira pomoću enzimskog sustava prisutnog u staničnoj membrani biljke. Druga strategija sastoji se od apsorpcijskog kompleksa kojeg čine organski spojevi i $Fe^{3+}$, gdje se željezo reducira unutar biljke i lako apsorbira.

Siderofori su spojevi niske molekularne mase, koji sadrže funkcionalne skupine koje mogu vezati željezo na reverzibilan način. Bakterije koje proizvode siderofore najčešće pripadaju rodu *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas aeruginosa*). Bakterije rizosfere oslobađaju ove spojeve kako bi povećale konkurentnost budući da te supstance imaju antibiotsko djelovanje i poboljšavaju hranidbenu vrijednost željeza za biljku. Također sprječavaju rast patogena (gljivica) ograničavanjem njima dostupnog željeza (Dweipayan i sur., 2016.).

### 4.2.2. Stvaranje antibiotika od PGPR bakterija

U suzbijanju patogena važnu ulogu imaju PGPR bakterije koje pripadaju vrstama iz rodova *Bacillus* i *Pseudomonas*. Ovi bakterijski antagonisti potiču inhibiciju biljnih patogena izlučivanjem izvanstaničnih metabolita koji su inhibitori čak i pri niskim koncentracijama. Bakterije koje pripadaju rodu *Bacillus* i *Pseudomonas* (*P. fluorescens* i *P. aeruginosa*) proizvode razne antibakterijske i antifungalne antibiotike. Antibiotici posjeduju antivirusne, antimikrobne, insekticidne, fitotoksične, antioksidanske, citotoksične, antitumorske i PGP sposobnosti. Osim spomenutih svojstava PGPR bakterija, funkcije koje provode ti organizmi u rizosferi su prikazane na Slici 5. PGPR bakterije mijenjaju eksudate korijena (direktno ili indirektno) preko drugih korisnih mikroorganizama kao što su arbuskularne mikorizne gljive (AM), čime se olakšava kolonizacija korijena. PGPR bakterije mogu degradirati toksine proizvedene putem korijena ili patogena (Dweipayan i sur., 2016.)




**Slika 5.** Interakcije između korijena biljke, patogena, PGPR bakterija i drugih korisnih mikroorganizama u rizosferi (izvor: Goswami i sur., 2016)

### 4.2.3. Ponašanje PGPR bakterija pod uvjetima stresa

Poljoprivredni usjevi su izloženi mnogim stresovima koji su izazvani različitim biotičkim i abiotičkim faktorima. Stresovi smanjuju prinos i usjeve te limitiraju izbor kultura za uzgoj na određenom području. Različiti biološki faktori i karakteristike same kulture utječu na brojnost i aktivnost mikroorganizama u tlu. Abiotički stres uključuje: visoke i niske temperature, salinitet tla, sušu, poplave, UV zračenje, zračna zagađivala i teške metale. Utjecaj abiotičkih stresova može uzrokovati smanjenje prinosa od 50 % do 82 % ovisno o usjevu. U mnogim semi-aridnim i aridnim područjima, prinos usjeva je ograničen povećanjem saliniteta navodnjavanjem što uzrokuje smanjen rast listova zbog otežanog usvajanja hranjiva te smanjenje učinka fotosinteze. Biljka na sušu i salinitet reagira različitim metaboličkim i fiziološkim promjenama te se dodavanjem PGPR sojeva može umanjiti utjecaj stresa.

Salinitet je jedan od najtežih čimbenika koji ograničavaju nodulaciju, prinos i fiziološku reakciju kod soje (Hu, 2005.). Porast saliniteta u tlu izaziva fiziološku reakciju ili poremećaja kod salate. Sinteza i aktivnost nitrogenaze *Azospirillum brasilense* inhibirana je povećanim salinitetom. Kod *Azospirillum sp*., akumulacija kompatibilnih otopljenih tvari kao što su glutamat, prolin, glicin betain i trehaloza odgovorna je za salinitet / osmolarnost. Prolin ima važnu ulogu u osmoregulaciji. Njegovim povećanjem, osmotski stres potiče prijenos dominantnih osmolita iz glutamata na prolin u *A. brasilense*. Inokulacijom s bakterijom

*Azospirillum*, sirak ima veći sadržaj vode i veći potencijal za vodu. Dakle, sirak koji je inokuliran bolje podnosi sušu nego neinokulirani (Tripathi i sur., 2002.).

PGPR sadrže ACC deaminaze koje su prisutne u različitim tlima. Koriste se kao bakterijski inokulum za poboljšani rast biljaka, posebno u nepovoljnim uvjetima okoline (teški metali, poplave, fitopatogeni, suša i visoka koncentracija soli).

Etilen je važan fitohormon, tijekom njegove sinteze pod stresnim uvjetima može doći do smanjenog rasta biljaka ili uvenuća. Proizvodnja mikrobnih metabolita rezultira smanjenje pH vrijednosti tla, što ima važnu ulogu u otapanju. Odnos između pH i fosfatnih otapala primjećeni su kod vrsta: *Arthrobacter ureafaciens*, *Phyllobacterium myrsinacearum*, *Rhodococcus erythropolis* i *Delftia* sp. One se po prvi put koriste kao bakterije koje provode proces fosfomobilizacije nakon što je potvrđena njihova sposobnost da otapaju znatnu količinu trikalcij fosfata u mediju izlučivanjem organskih kiselina i smanjenjem pH tla. Inokulacija nekih mikroorganizama koji otapaju netopive fosfate, u neplodnim jezerskim područjima značajno pospješuje rast biljaka.

Savane su prirodni ekosustavi koji prevladavaju u tropskim krajevima. Ovi sustavi obično imaju kisela tla sa smanjenom plodnošću u kojima su hranjive tvari rijetke, osobito fosfor.

PGPR bakterije otporne na metale mogu se učinkovito iskoristiti u izdvajanju metala i kao bioinokulant za poticanje rasta u tlima bogatim metalima. Štetan utjecaj teških metala na biljke može biti smanjen korištenjem PGPR bakterija ili mikoriznih gljiva. Važnu ulogu u fitoremedijaciji ima mikrobiološka populacija, PGPR, bakterije koje otapaju fosfor, arbuskularne mikorizne gljive u rizosferi biljaka koje rastu u tlima kontaminiranim s tragovima metala. Fitoremedijacija je jeftina, energetski efikasna detoksikacijska metoda koja omogućuje biljci da usvaja teške metale iz tla i na taj način ih akumulira u izdanke. Lučenjem kiselina, proteina, fitoantibiotika i drugih kemikalija, mikroorganizmi ublažuju toksični utjecaj teških metala na biljke. Rizobakterije imaju značajnu ulogu u fitoremedijaciji kontaminiranih teških metala u tlu. Kadmij u tlu uzrokuje biljni stres biosintezom etilena i vjerojatno doprinosi akumulaciji ACC u korijenu koje smanjuju proizvodnju etilena. PGPR bakterije štite biljke od inhibicijskih efekata kadmija. ACC deaminaze smanjuju proizvodnju etilena u uvjetima povećane koncentracije kadmija kod pšenice. PGPR bakterija, *Kluyvera ascorbata* smanjuje toksičnost nikla u sadnicama i njena prisutnost stimulira rast biljke i štiti ju od teških metala, ima mali utjecaj na koncentraciju metala u biljnom tkivu, ali proizvodi puno veću nadzemnu biomasu i uzrokuje oscilacije u pristupačnosti metala u tlu. Bakterija *Pseudomonas putida* je također tolerantna na mnoge teške metale u visokim koncentracijama. Ove karakteristike čine ju poželjnom za unošenje u kontaminiranim tlima. *P. fluorescens*

može preživjeti u uvjetima suše i u hiperosmolarnosti. PGPR imaju pozitivan utjecaj na energiju i produktivnost, posebno u stresnim uvjetima. Sjeme ljekovite šparoge, inokulirano PGPR bakterijama, pokazuje pozitivno djelovanje na rast biljke u sušnim uvjetima. Mikroorganizmi koji otapaju fosfor mogu pozitivno utjecati na rast kao i na usvajanje fosfora kod kukuruza, što vodi ka boljoj toleranciji biljke na nedostatak vode u tlu. MPPS (multi-process phytoremediation system) koristi interakciju između biljaka i PGPR bakterija ublažava učinak stresa, povećava prinos, osobito u području rizosfere (Saharan i sur., 2011.).

# 5. BIOLOŠKA FIKSACIJA DUŠIKA

Biološka fiksacija dušika je proces poznat kao izuzetno značajan u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji koja se temelji na smanjenju primjene dušičnih gnojiva i sredstava za zaštitu bilja, s naglaskom na iskorištavanje prirodnih resursa i obnovljivih izvora energije (Komesarović i sur., 2007.).

Organizmi koji mogu fiksirati dušik odnosno prevesti stabilan plinoviti dušik atmosfere u biološki iskoristiv oblik, svi pripadaju biološkoj skupini organizama poznati kao prokarioti (Zahran, 1999.). Prokarioti su jednostanični organizmi jednostavnije stanične građe, vrlo velike raznolikosti i brojnosti u prirodi. Imaju sposobnost preživljavanja u najrazličitijim životnim sredinama pa se zbog toga i smatraju najrasprostranjenijim organizmima u prirodi. Na osnovu klasifikacije mogu se podijeliti na *Eubacteria* ili *Bacteria* (eubakterije ili prave bakterije) i *Archaebacteria* ili *Archaea* (arheobakterije ili bakterije). Velika raznolikost fiksatora dušika osigurava da će većina ekoloških niša sadržavati barem jedan ili dva predstavnika od ovih vrsta organizama te da će se uz pomoć njih izgubljeni dušik uvijek moći nadoknaditi (Zahran, 1999.).

Pregled povijesti istraživanja biološke fiksacije dušika pokazuje da je interes uglavnom bio usmjeren na simbiotski sustav leguminoznih biljaka i rizobija zbog toga što ove asocijacije imaju najveći kvantitativni utjecaj na ciklus kruženja dušika u prirodi (Zahran, 1999.). Unosi u kopnene sustave od biološke fiksacije dušika odnosno od simbiotskog odnosa između leguminoznih biljaka i rizobija iznose najmanje 70 milijuna tona dušika godišnje (Brockwell i sur, 1995.). Upravo iz ovog razloga, ti simbiozni odnosi imaju najveći značaj za poljoprivredu, budući da omogućavaju da se poljoprivredna tla obogate dušikom. Učinkovita simbiozna fiksacija dušika može znatno smanjiti upotrebu umjetnih dušičnih gnojiva u poljoprivrednoj proizvodnji. Zahvaliti se može biološkim fiksatorima dušika što za mnoge biljne vrste nije potrebno unositi dušična mineralna gnojiva, dok se za neke procesom fiksacije dušika osigurava i do 50 % potrebnog dušika.

U svijetu, mnoga tla su degradirana i krajnje je vrijeme da se zaustavi destruktivno korištenje tla te pokrene remedijacija tla (Burris, 1994.). Ključnu ulogu u tome mogla bi imati biološka fiksacija dušika.

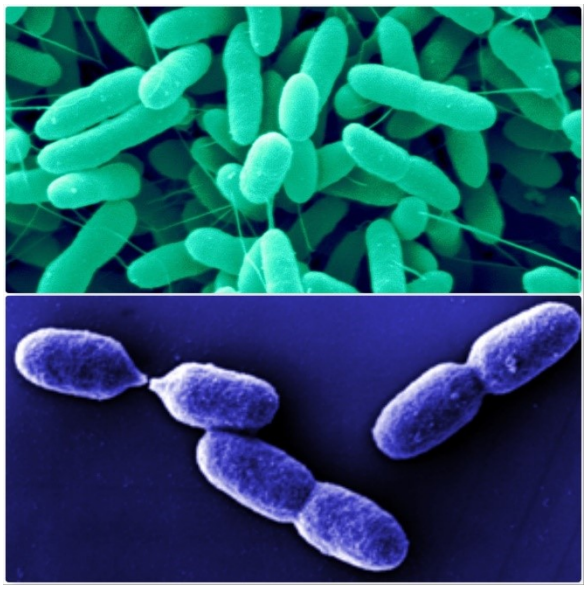
### 5.1. Asocijativna fiksacija dušika

Asocijativna fiksacija dušika predstavlja prijelaz između simbiozne i asimbiozne (slobodne) fiksacije dušika. Asocijativni fiksatori aktivni su na površini korijena, te na njoj formiraju finu i tanku ovojnicu. Ove bakterije pokazuju stupanj specifičnosti prema pojedinim vrstama jer će određeni sojevi bakterija nastaniti i biti aktivni na korijenu samo nekih određenih vrsta biljaka. Kod ovog oblika fiksacije, također oba člana imaju pogodnosti koje su rezultat ovog zanimljivog odnosa. Bakterije većinom kao izvor energije koriste razne biljne eksudate koji se otpuštaju u tlo, dok biljke mogu koristiti fiksirani dušik iz atmosfere kojim se obogaćuje rizosfera oko njihovog korijena. Asocijativnom fiksacijom fiksira se veća količina dušika nego kod slobodnih fiksatora. Tako se fiksira oko 130 kg N/ha. Količina fiksiranog dušika ovisi o uvjetima i vrsti bakterije. Na samu brojnost i aktivnost asocijativnih fiksatora dušika u zoni korijena utječe biljka svojim eksudatima, tako što fiksatori od nje dobivaju potrebnu energiju, a biljku potom opskrbljuju amonijskim dušikom nastalim u procesu fiksacije (Milaković, 2013.).

#### 5.1.1. Asocijativni fiksatori dušika

Asocijativnim fiksatorima dušika pripadaju bakterije roda *Azotobacter, Azospirillum, Bacillus, Klebsiella* (Slika 6.). Koriste se za inokulaciju neleguminoznih biljaka kao što su kukuruz, pšenica, krumpir, šećerna repa i suncokret (Milošević i Govedarica, 2001.). Sposobni su fiksirati atmosferski dušik te ga ostavljaju u tlu ili vodi gdje ga koriste biljke i drugi mikroorganizmi za svoj rast (Milaković, 2013.).

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



**Slika 6.** gore: bakterije roda *Azospirillum*; dolje: bakterije roda *Azotobacter*

(izvor: https://www.jic.ac.uk/SCIENCE/molmicro/Azot.html )

#### 5.1.1.1. Bakterije roda *Azotobacter*

Važnost korisnih bakterija roda *Azotobacter* koje promiču rast biljaka u poljoprivrednoj proizvodnji je, uz sposobnost fiksacije dušika, sposobnost sintetiziranja antibiotika, vitamina, te proizvodnje pigmenata. Kao primjer može se navesti *Azotobacter chroococcum* koji proizvodi tamno smeđi, vodotopivi pigment melanin, u procesu fiksacije dušika da bi zaštitio enzim nitrogenazu od utjecaja kisika.

*Azotobacter* kao PGPR također sintetizira hormone rasta kao što su auksini, citokinini i giberelini. Ovi hormoni potječu s površine korijena i utječu na rast biljaka. Također, pospješuju otapanje fosfata, povećavaju aktivnost fosfataze što utječe na usvajanje hranjiva, povećavaju usvanje minerala i vode (Vikhe, 2014.).

Ove bakterije prisutne su u slabo kiselim i neutralnim tlima. Bez obzira na hladnu klimu i relativno nisku pH vrijednost, može ih se pronaći i na Arktiku i na Antarktiku. *Azotobacter* u suhim tlima može preživjeti u obliku cista i do 24 godine. Rod *Azotobacter* je otkrio Martinus Beijerick, 1901. godine. Bakterije roda *Azotobacter* posjeduju nekoliko metaboličkih mogućnosti, uključujući i atmosfersku fiksaciju dušika konverzijom u amonijak.

*Azotobacter* spp. sadrže više DNK od većine ostalih bakterija, ali zato je veličina njihovog genoma tipična za većinu prokariota. Razlog takve količine DNK nije poznat, vjerojatno zbog toga što su stanice *Azotobacter* spp. veće nego kod ostalih bakterija.

*Azotobacter* spp. ima sposobnost proizvodnje proteina koji će štititi nitrogenazu od stresa koji bio mogao biti izazvan kisikom. Druga posebna osobina *Azotobacter* je njihova sposobnost da sintetiziraju više, odnosno ne jednu nego tri nitrogenaze. *Azotobacter* bakterije mogu imati različite oblike:

- uspavane stanice (ciste) okruglog oblika koje su metabolički neaktivne
- kratki tupi štapići veličine 2 x 4 μm
- okrugle stanice promjera 2-3 μm koje se pojavljuju u lancima ili nakupinama
- sitni tupi štapići ili okrugle stanice manje od 1μm, a najčešće dolaze u parovima
- veće stanice nepravilnog i vlaknastog oblika

Organizmi poput *Azotobacter* bakterija igraju važnu vitalnu ulogu u svakom ekosustavu, jer omogućavaju dostupnost dušika drugim organizmima. Bakterije roda *Azotobacter* i slične bakterije mogu prevesti dušik do amonijaka kroz proces fiksacije dušika, nakon čega se naposljetku amonijak pretvara u proteine.

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

*Azotobacter chrococcum* luči biljne faktore rasta kao što su: giberelini, citokinini, indol octena kiselina itd. (Narula, 2000.). Fitohormoni ili biljni hormoni su regulatori procesa rasta i razvitka, a dijele se u 5 grupa: auksini, giberelini, citokinini, apscizinska kiselina (ABA) i etilen.

Osim navedenih svojstava, bakterije ovog roda imaju sposobnost:

- biološke razgradnje pesticida (lindana), fenolnih spojeva i sl.
- otapanja fosfata
- proizvodnje enzima
- proizvodnje vitamina B12 i C vitamina

#### 5.1.1.2. Bakterije roda *Azospirillum*

Bakterije roda *Azospirillum* su mikroaerofilne, vrlo pokretne bakterije, Gram-negativne, štapićastog oblika, promjera 1 μm, a dužine 2,1-3,8 μm, često sa šiljastim krajevima. Pripadaju redu *Rhodospirillales*. Pokreću se bičevima. U tekućem mediju pokreću

se uz pomoć jednog biča, dok se u čvrstom mediju, pri temperaturi od 30 °C ( Tarrand i sur., 1978.).

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

Direktne koristi koje biljka ima od korisnih bakterija rodova *Azotobacter* i *Azospirillum* su :

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

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

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

- *Azospirillum lipoferum*
- *Azospirillum brasilense*

Kroz daljnja istraživanja utvrđeno je još 8 vrsta:

- *A. amazonense*
- *A. halopraeferens*
- *A. irakense*
- *A. largimobile*
- *A. doebereinerae*
- *A. oryzae*

- *A. melinis*
- *A. canadensis*

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

*A. lipoferum* je prvi put izoliran na polju riže 1982. godine. Dobra hranjiva podloga je glukoza i fruktoza. Optimalna tepmeratura za razvoj *A. lipoferum* je 30°- 41°C (Okon, 2000.). *Azospirillum* je primarni komercijalni fitostimulator za inokulaciju žitarica u svijetu. Primjerice, u Meksiku je velik broj usjeva kukuruza uspješno inokulirano ovim bakterijama.

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

Nadalje, vrste roda *Azospirillum* poboljšavaju usvajanje P i/ili K kod kukuruza, pšenice, sirka i riže, te utječu na promjenu ravnoteže makro i mikro hranjiva kod pšenice i soje. Međutim, takvi učinci na mineralnu ishranu mogu značajno varirati između različitih kombinacija sorata biljaka i bakterijskih sojeva (Murty i Ladha, 1988.; Bashan i sur., 1990.)

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

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

*Azospirillum brasilense* fiksira atmosferski dušik u zoni korijena, obogaćujući tlo dušikom. Također producira hormone rasta auksine i citokinine koji utječu na morfologiju korijena, a time i poboljšavaju unos hranjivih tvari iz tla (Barea i sur., 2005.). Ova vrsta ima

pozitivan utjecaj na klijavost, povećava imunitet biljke i povećava prinos (El-Katatny, 2010.).

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

### 5.2. Endofiti

Pojam "endofit" (grč.endon, unutar; phyton, biljka) prvi je uveo De Bary (De Bary, 1866.). Endofiti su mikroorganizmi (bakterije ili gljive) koji cijeli ili samo dio života provedu unutar biljke, kolonizirajući njeno zdravo tkivo. Pri tome ne uzrokuju nikakve negativne posljedice niti bolesti biljke.

Brazilski znanstvenici, 1986. godine otkrili su prisutnost endofitske bakterije, kao fiksatora dušika, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* u stabljici šećerne trske. Njihovo otkriće je kasnije potvrđeno od strane drugih znanstvenika iz SAD-a, Njemačke i Ujedinjenog Kraljevstva. To je dovelo do otkrića još dvije vrste endofitskih fiksatora dušika, *Herbaspirillum seropedicae* i *Herbaspirillum rubrisubalbicans*.

Kada se govori o lokaciji na biljci na kojoj se odvija kolonizacija putem korijena, bakterije se dijele u dvije skupine: asocijativne i endofitske. Asocijativne bakterije se nalaze ili na samoj površini korijena biljke ili u blizini korijena, što uključuje i dio rizosfere, dok se endofitske bakterije nalaze unutar biljke domaćina. Pojam endofitske bakterije, odnosi se na one bakterije koje ulaze i koloniziraju unutarnje dijelove biljke (korijen, stabljika, sjeme), bez ikakvog negativnog efekta za biljku (Hallmann i sur., 1997.).

Te bakterije imaju pozitivan učinak na prinos i rast biljaka time što potiču nicanje, povećavaju biomasu, utječu na sadržaj klorofila, dušika i proteina te na dužinu korijena i izdanaka. Također povećavaju toleranciju biljaka na abiotičke stresove poput poplava, suše i povećanog saliniteta. Bitno je spomenuti da endofitske bakterije također pozitivno utječu na regulaciju osmotskog tlaka, morfologiju korijena, usvajanje minerala i dušika (Compant i sur., 2005.).

PAB (Plant Associated Bacteria), mogu imati direktan utjecaj na rast biljaka kroz proces biološke fiksacije dušika te kroz niz drugih procesa kao što su: proizvodnja fitohormona, solubilizacija fosfata, inducirana tolerancija na stresove putem inhibicije sinteze

etilena, itd. Indirektan utjecaj na rast je također prisutan, a najviše se očituje kroz povećanu rezistenciju na patogene.

PAB (Plant Associated Bacteria) su klasificirane kao bakterije koje potiču rast biljaka pomoću osnovnih mehanizama biljaka kroz koje se rast povećava na jednak način kao što to rade PGPR (Plant Growth Promoting Bacteria) (Bhattacharya i Jha, 2012.).
Dakle, asocijativne i endofitske bakterije su klasificirane kao bakterije koje potiču rast biljaka, odnosno kao PGPR.

Endofitske bakterije, koje obitavaju u unutrašnjosti biljke gotovo kroz cijeli život biljke (Bacon i Hinton, 2007.), koriste se za biološku kontrolu bolesti, te također za povećanje tolerancije na sušu i bolje usvajanje dušika. One uključuju aerobne i anaerobne vrste, hrane se nutrijentima i nisu patogene (Surette i sur., 2003.). Među njima se nalaze vrste koje stvaraju nodule (*Rhizobium*) na korijenju biljaka, ali i one koje ih ne stvaraju (npr. *Azospirillum*). Budući da su izolirane iz biljaka velike međusobne raznolikosti (Rosenblueth i Martinez-Romero, 2006.), pojavljuju se u manjem broju nego rizosferne bakterije ili patogene bakterije (Long i sur., 2003.).

Endofitske bakterije dijele se na one potpuno ovisne o životu unutar biljke domaćina (obligatni endofiti), i vrste koje određeni period života provedu izvan biljke domaćina (fakultativni endofiti) (Hardoim i sur., 2008.). Velika većina tih bakterija su upravo fakultativni endofiti, odnosno bakterije koje potječu iz tla, pa kroz pukotine na lateralnom korijenju ulaze u biljku i koloniziraju je. Ako se usporedi kolonizacija endofitima i kolonizacija rizobijima, radi se o vrlo sličnom načinu kolonizacije, pogotovo u inicijalnom dijelu procesa koje započinje na samom korijenu.

Neke vrste rizobakterija također su pronađene i u unutarnjim dijelovima biljke, a pripradaju rodovima *Pseudomonas*, *Azospirillum* i *Bacillus* (Pedraza i sur., 2007.; Mano i Morisaki, 2008.).

Zanimljivo je spomenuti da su endofiti, koji se koriste kao biološka kontrola za mnoge biljne bolesti, zapravo na neki način zaštićeni od drugih bakterija u tlu i svega što se nalazi u samoj blizini korijena biljke domaćina. Ponekad se razvijaju u istim biljnim tkivima u kojima su otkriveni patogeni (Bulgari i sur., 2009.). Istraživanja su zasada pokazala pozitivan učinak endofita na rast rajčice, riže i krumpira, te povećanu otpornost na stresove (Surette i sur., 2003.).

Najproučavanije i najdominantnije vrste endofita spadaju u tri velika reda bakterija, a to su *Actinobacteria*, *Proteobacteria* i *Firmicutes*. Rodovi koji sadrže najviše endofitskih vrsta bakterija su *Azoarcus, Acetobacter, Enterobacter, Bacillus, Serratia, Herbaspirillum,*

*Burkholderia* i *Streptomyces* (Pedrosa i sur., 2011.). Vrste ovih rodova rasprostranjene su u tlu i rizosferi koji predstavljaju glavni izvor endofita (Hallmann, 2010.).

Mikrobiološke zajednice u tlu imaju jedinstvenu i važnu ulogu u ekosustavu i jedne su od najsloženijih, najraznolikijih i najvažnijih u biosferi. Razna istraživanja tvrde da su endofiti sveprisutni u gotovo svim višim biljkama, te se u jednoj biljci domaćina može pronaći više različitih rodova i vrsta endofitskih bakterija ( Ryan i sur., 2008.).

Još uvijek nije u potpunosti jasno imaju li biljke više koristi od simbioznog odnosa sa rizobijima ili sa endofitskim bakterijama. Svakako, utvrđen je pozitivan učinak endofitskih bakterija (Surette i sur., 2003.).

### 5.2.1. Rod *Rhizobium*

*Rhizobium* (grč. *rhiza*- korijen, *bios*- život, tj. život na korijenu) su gram negativne štapićaste bakterije koje ne mogu samostalno fiksirati dušik. Vrlo su pokretljive, brzorastuće bakterije koje žive slobodno u tlu. Njihovo generacijsko vrijeme je od 2 do 4 sata i nastaju velike kolonije promjera 2-4 mm na površini agara nakon tri do pet dana uzgoja u laboratoriju (Saharan i Nehra, 2011.). Godine 1889. identificirana je prva vrsta *Rhizobium leguminosarum.* Klasifikacija ovog roda se mijenjala tijekom godina zbog napredovanja metoda analize. *Rhizobium* bakterije ne fiksiraju dušik samostalno, te im je za to potrebno ostvariti simbiozu sa biljkom domaćinom. Simbiozni odnos se uspostavlja sa leguminoznim biljkama iz umjerenog područja pri čemu se na korijenu leguminoza stvaraju kvržice kao produkt infekcije. U nodulama se uz pomoć enzima nitrogenaze vrši usvajanje atmosferskog dušika i prevođenje u oblike pristupačne biljkama i višim mikroorganizmima.
U Tablici 4. su navedene neke od najznačajnijih bakterija roda *Rhizobium* i vrste leguminoza koje noduliraju.

**Tablica 4.** Neke od najznačajnijih vrsta kvržičnih bakterija iz roda *Rhizobium* i leguminoze koje noduliraju

| VRSTA RHIZOBIUM | BILJKA DOMAĆIN |
|---|---|
| ***R. leguminosarum*** | grašak, bijela djetelina, grah |
| ***R. phaseoli*** | grah, bijela djetelina |
| ***R. pisi*** | grašak, bijela djetelina, grah |
| ***R. tropici, R. etli, R. lusitanum*** | Grah |
| ***R. fabae*** | Bob |

### 5.2.2. Rod *Bradyrhizobium*

Predstavnici roda *Bradyrhizobium* su gram negativne bakterije štapićastog oblika, veličine (0,5 – 0,9) x (1,2 – 3,0) µm (Brenner i Krieg, 2006.). To su bakterije s jednim subpolarnim ili polarnim bičem. Spororastuće kvržične bakterije koje noduliraju soju su prvotno nazvane *Rhizobium* japonicum ali su se kasnije odvojile u rod *Bradyrhizobium* zbog svog sporog rasta (Maheshwari, 2014.). Generacijsko vrijeme ovog roda je preko 6 sati. Nakon 7 dana uzgoja u laboratoriju nastaju male kolonije promjera 1 mm na površini hranjive podloge.

*Bradyrhizobium* bakterije su asporogene i aerobne, a za ishranu iskorištavaju široki raspon ugljikohidrata i soli organskih kiselina, optimalna temperatura rasta za većinu sojeva je od 25 do 30 °C dok je maksimalna temperatura rasta od 33 do 35 °C. Sojevi tolerantni na kiselost će većinom rasti kada je pH 4,5. Preko 30 % sojeva će rasti kada je pH 4,0 i samo nekoliko sojeva može rasti kada je pH 3,5. Rast je inhibiran kada je pH iznad 9,0. Sojevi *Bradyrhizobium* ne mogu rasti u okolišu koji sadrži 2 % NaCl-a (Brenner i Krieg, 2006.).
U Tablici 5. su navedene najvažnije vrste roda *Bradyrhizobium* i vrste leguminoza koje noduliraju.

**Tablica 5.** Vrste roda *Bradyrhizobium* i leguminoza koju noduliraju

| VRSTA BRADYRHIZOBIUM | BILJKA DOMAĆIN |
|---|---|
| ***B. japonicum*** | soja |
| ***B. elkanii*** | |
| ***B. liaoningense*** | |

### 5.3. Asimbiozna (slobodna) fiksacija dušika

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

Zastupljenost slobodnih fiksatora dušika ovisi o tipu tla i njegovim fizikalno kemijskim karakteristikama, dok na njihovu brojnost utječe niz ekoloških faktora, kao što su

pH, temperatura, količina kisika, sadržaj vode, sadržaj organske tvari, mineralni oblici dušika i mikroelementi (Milaković, 2013.).

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

# 6. ZAKLJUČAK

Prirodna svojstva tla uvelike se narušavaju korištenjem zaštitnih sredstava i mineralnih umjetnih gnojiva. Flora i fauna tla se osiromašuju, tla postaju kiselija i teže obradiva. Važno je znati da je na jednom hektaru površine u tlu oko 20-30 t živih organizama, a od toga je oko 5 t bakterija, čiji život i opstanak isključivo ovisi o proizvođaču koji gospodari površinom. Razvoj poljoprivrede u ovom stoljeću biti će zasnovan na konceptima koje predviđaju značajne promjene u tehnologiji uzgajanja usjeva i oplemenjivanja bilja koji bi pridonijeli uspostavljanju ravnoteže i stabilnosti prirodnih resursa u agroekosustavu. Ovakav način uzgoja trebao bi biti zasnovan na ekonomsko efektivnoj osnovi. Biofertilizacija je vrlo bitna stavka u tom konceptu, a ona predstavlja unošenje živih mikroorganizama u tlo sa ciljem poboljšanja opskrbe biljaka hranjivima koji su im neophodni. To je način na koji se može poboljšati opskrba biljaka dušikom, fosforom, sumporom, kalijem, željezom, ali i stimulirati rast korijena.

Prilikom unošenja ovih bakterija u rizosferu, procesi transformacije organske tvari se ubrzavaju i biljkama se omogućuju potrebna hranjiva. Pored dušika, vrlo bitan element je i fosfor koji je također najčešće prisutan u nedostupnim oblicima. Bakterije koje sintetiziranjem organskih kiselina i fosfataza mogu prevesti fosfor iz nepristupačnog oblika u oblik pristupačan biljkama pripadaju rodu *Bacillus i Azotobacter*. Također, kalij, koji je u tlu zarobljen u obliku alumosilikata, zahvaljujući bakterijama roda *Bacillus* postaje pristupačan biljkama. Opskrba biljaka željezom odvija se zahvaljujući prisustvu siderofora u nekim bakterijama. Bakterija iz roda *Pseudomonas* transformiraju organske forme sumpora u anorganski i na taj način on postaje pristupačan.

Ovo sve ukazuje da se opskrba biljaka neophodnim hranjivima uz istovremeno očuvanje životne sredine i proizvodnju zdravstveno neophodne hrane, može poboljšati primjenom mikrobioloških gnojiva koja u sebi sadrže miješane populacije mikroorganizama. Ove bakterije također, uz sve ostalo, imaju sposobnost sinteze biljnih hormona kao što su giberelini i auksini, što dodatno potiče biljni rast i utječe na otpornost biljaka.

Korištenje mikrobioloških gnojiva ima utjecaj na usmjeravanje i tok mikrobioloških procesa u tlu, što utječe na rast i razvoj biljaka ali i na samo tlo. Određeni mikroorganizmi koji se unose u tlo imaju sposobnost sintetizirati sluzave materijale koji imaju važnu ulogu u sljepljivanju mikroagregata, a to dovodi do formiranja fine strukture zemljišta. Nakon odumiranja tih mikroorganizama stvara se i povećava ukupna biomasa, a posljedice su pozitivne za narednu vegetaciju. Povećanje organske biomase pridonosi povećanju plodnosti

tla i stvaranju neophodnih biljnih hranjiva. Upravo iz tog razloga, mikrobiološka gnojiva imaju svoje mjesto u suvremenoj konvencionalnoj, ali i ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji.

Mnoga istraživanja pokazala su da korištenje mineralnih gnojiva može dovesti do različitih negativnih posljedica zbog sadržaja toksičnih tvari, koje djeluju na zdravlje ljudi, reprodukciju, probleme s krvotokom i jetrom. Isto tako, ne smije se zaboraviti koliko je negativan utjecaj na životnu sredinu prilikom prekomjernog korištenja ovih gnojiva.

Upravo to je razlog zašto se sve više stavlja naglasak na korištenje prirodnih alternativa i biofertilizatora. Bakterije koje pozitivno utječu na rast biljke i porast usjeva svojim direktnim ili indirektnim djelovanjem, a vrlo se jednostavno nanose na površinu biljke, sjemena ili tla, čine osnovu biofertilizatora. Organsko porijeklo biofertilizatora doprinosi primarnoj poljoprivrednoj proizvodnji, popravlja plodnost, produktivnost i fizička svojstva tla na kojem se biofertilizatori koriste. Upotrebom biofertilizatora smanjuje se količina kemikalija u poljoprivrednoj proizvodnji.

U zadnjim desetljećima intenzivno se prihranjivalo samo mineralnim gnojivima, a to je dovelo do drastičnog pada broja bakterija i drugih mikroorganizama u tlu, na nekim mjestima je broj pao na čak samo 1/10 od normalnog broja. Kako bi se osigurala mogućnost većeg prinosa, novi hibridi u ratarskim kulturama su većeg i snažnijeg nadzemnog i podzemnog dijela. Time se dobiva i veća biomasa koju je potrebno razgraditi. Međutim, ti biljni ostaci se mogu humificirati kroz 2-4 godine zbog nedostatka i osiromašene mikroflore (bakterije, gljivice). Ovakva situacija za sobom povlači negativan utjecaj jer svi nerazgrađeni ostaci predstavljaju izvor hrane za patogene gljive i bakterije koje pospješuju i pridonose bolestima pa samim time i gubicima u proizvodnji. To za proizvođača može značiti veliki gubitak pa čak i propadanje.

Budući da je raznim istraživanjima dugi niz godina utvrđeno djelovanje korisnih bakterija, odnosno bakterija koje potiču rast biljaka (PGPR), poljoprivrednim proizvođačima pruža se obećavajuće rješenje za održivu i ekološki prihvatljivu poljoprivredu. Primjenom ovih bakterija kao biofertilizatora smanjuje se potencijalan negativan utjecaj na okoliš, hranu, a time i zdravlje ljudi (Denton, 2007.). Primjena PGPR na biljkama daje obećavajuće rezultate u budućnosti (Ali i Hj, 2010.). Vrlo je jasno da PGPR sojevi pospješuju rast biljaka kroz različite mehanizme, koji nisu još sasvim detaljno istraženi, ali se to očekuje u bliskoj budućnosti.

# 7. LITERATURA


1. Ali, K., Hj, S. Z. (2010): Phytoremediation of heavy metals with several efficiency enhancer methods. Afr J Biotechnol 9:3689–3698
2. Bacon, C. W., Hinton, D. M. (2007). Isolation, in planta detection, and uses of endophytic bacteria for plant protection. In "Manual of environmental microbiology" ed. By C.J. Hurst et al. ASM Press Washington D.C.
3. Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcón, R., Azcón-Aguilar, C. (2005): Microbial cooperation in the rhizosphere. Journal of experimental botany, Vol.56, pp.1761-1778
4. Bashan, Y., Holguin, G. (1996.): Nitrofen-fixation by Azospirillum brasilense cd is promoted when co-cultured with a mangrowe rhizosphere bacterium (Stafilococcus sp.): Soil Biol. Biochem . Vol. 28, No. 12, pp. 1651-1660, 1996.
5. Bashan, Y., Holguin, J. (1997): Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: Biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. Soil Biology and Biochemistry 30(8):1225-1228
6. Bashan, Y., Levanony, H., Whitmoyer, R. E. (1990): Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic Azospirillum brasilense Cd. Journal of General Microbiology, 137, 187-196.
7. Bhattacharjee, R. B., Singh, A. i Mukhopadhyay, S. N. (2008). Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80: 199–209.
8. Bhattacharya, P. N. i Jha, D. K. (2012): Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World J. Microbiol. Biotechnol, 28:1327–1350
9. Brenner, D. J., Krieg N. R. (2006.): Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria. Springer Science Business Media.
10. Brockwell, J., Bottomle, P. J., Thies, J. E. (1995): Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. Plant Soil 174:143–180.
11. Bulgari, D., Casati, P., Brusetti, L., Quaglino, F., Brasca, M., Daffonchio, D., Bianco, P. A.(2009): Endophytic bacterial diversity in grapevine (Vitis vinifera L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR.Journal of microbiology (Seoul,Korea), Vol.47, pp.393-401

12. Burris, R. H. (1994): Biological nitrogen fixation—past and future, p. 1–11. In Hegazi, N. A., Fayez, M., Monib, M. (ed.), Nitrogen fixation with nonlegumes. The American University in Cairo Press, Cairo, Egypt.
13. Cifrid, I. (2003). Značaj iskustva seljačke poljoprivrede za ekološku poljoprivredu.Sociologija i prostor, 41(1/2): 353–429.
14. Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E.A., 2005a. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology 71, 4951e4959.
15. Cvijanović, G., Milošević, N., Branislava, T., Dozet, G., Ivić, G. (2007.): Značaj primjene rizobakterija u biljnoj proizvodnji.
16. Dalla Santa, R. O., Fernández Hernández, R., Michelena Alvarez, G. L., Ronzelli Junior, P., Soccol, C. R. (2004.): *Azospirillum sp.* inoculation in wheat, barely and oats seeds greenhouse experiments; Laboratório de Processos Biotecnológicos; Universidade Federal do Paraná, Braz. arch. Biol. technol. vol.47 no.6 Curitiba Nov. 2004.
17. De Bary, A. (1866). Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten. Hofmeister's Handbook of physiological Botany, Vol. 2, Leipzig
18. Deka, H., Deka, S., Baruah, C.K. :“ Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Value Addition: Mechanism of Action“, Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants, 2015.,str. 305-321.
19. Denton, B. (2007): Advances in phytoremediation of heavy metals using plant growth promoting bacteria and fungi. MMG 445 Basic Biotechnol 3:1–5
20. Dobbelaere, S., Okon,Y. (2007): The Plant Growth-Promoting Effect and Plant Responses. Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations (pp.145-170)
21. El-Katatny, M. H. (2010.): Enzyme Production and Nitrogen Fixation by Free, Immobilized and Coimmobilized Inoculants of Trichoderma harzianum and Azospirillum brasilense and Their Possible Role in Growth Promotion of Tomato, Food Technol. Biotechnol. 48 (2) 161–174
22. Erić, D. (2016): Pristupi i metode istraživanja rizosfere. Diplomski rad. Agronomski fakultet, Zagreb.

23. Gholami, A., Shahsavani, S., Nezart, S. (2009): The effect of plant growth promotinh rhizobacteria (PGPR) on germinatin seedling growth and yield of maize. International Journal of Life Sciences, 3 (1), 9-14.
24. Goswami, D.,Thakker, J. N., Dhandhukia, P. C. (2016): Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. Cogent Food & Agriculture, 2: 1127500
25. Hajduković I., Radid Lakoš T. (2010). Održiva poljoprivredna proizvodnja kao
26. Hallmann, J. (2010): Plant interactions with endophytic bacteria. In: Jeger MJ, Spence NJ (eds) Biotic interactions in plant-pathogen associations. CABI, Wallingford, UK, pp 87–119
27. Hallmann, J., Quadt- Hallmann, Q. A., Mahaffee W. F., Kloepper J. W. (1997): Bacterial endophytes in agricultural crops.Can J Microbiol. 43:895–914
28. Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Elsas, J.D., 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends in Microbiology 16,463e471.
29. Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Ann Microbiol 60:579–598 https://bib.irb.hr/datoteka/579904.Hajdukovi-Radi_Lako.pdf
30. Hu C, 2005. Induction of growth promotion and stress tolerance in Arabidopsis and tomato by plant growth promoting rhizobacteria. Dissertation. http://hdl.handle.net/10415/769
31. Kloepper, J. W., Schroth, M. N. (1978): Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria. Gilbert-Clarey, Tours, pp 879–882
32. Komesarović, B., Redžepović, S., Blažinkov, M., Sudarić, A., Uher, D., Sikora, S. (2007): Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva Bradyrhizobium japonicum. Mlijekarstvo 57 (4) 289-302.
33. Kumar, A., Prakash, A., Narain Johri, B. (2017): Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem. Department of Biotechnology and Bioinformatics Centre, Barkatullah University, Bhopal 462026, Madhya Pradesh, India
34. Long HH, Furuya N, Kurose D, Takeshita M, Takanami Y. Isolation of endophytic bacteria from Solanum sp and their antibacterial activity against plant pathogenic bacteria. Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University. 2003;48:21–28.
35. Maheshwari, D. K. (2014): Bacterial Diversity in Sustainable Agriculture. Springer.

36. Mano, H., Morisaki, H. (2008): Endophytic Bacteria in the Rice Plant. Microbes and Environments, 23, 109-117.
37. Milaković, Z. (2013.): Opća mikrobiologija, Interna skripta, Poljoprivredni fakultet Osijek.
38. Milošević, N., Govedarica, M. (2001): Mogućnost primene biofertilizatora u proizvodnji ratarskih neleguminoznih biljaka. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, br. 35, str. 53-65
39. Mirecki N., Wehinger T., Repič T. (2011). Priručnik za organsku proizvodnju zaosoblje savjetodavne službe, Podgorica: Biotehnički fakultet Podgorica.
40. Mrkovački, N., Jarak, M., Đalović, I., Jocković, Đ. (2012.): Značaj i efekat primene PGPR na mikrobiološku aktivnost u rizosferi kukuruza. Ratar. Povrt. / Field Veg. Crop Res. 49, 3,335–344.
41. Murty, M. G., Ladha, J. K. (1988): Influence of Azospirillum inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. Plant and Soil, Volume 108, Issue 2, pp 281–285
42. Narula, N. (2000.): Azotobacter in Suistainable Agriculture; Vedams; Academic Books from India, New Delhi.
43. Oberson, A., Frossard, E., Bühlmann, C., Mayer, J., Mäder, P., Lüscher, A. (2013.): Nitrogen fixation and transfer in grassclover leys under organic and conventional cropping systems. Plant and Soil, 371: 237–255.

odgovor na degradaciju tala, Zbornik radova Veleučilišta u Šibeniku. Dostupno na:

44. Okon, Y. (2000.): Azospirillum/plant associations, CRC press, str. 16.
45. Okon, Y., Labandera-Gonzalez, A.C. (1994): Agronomic applications of azospirillum: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biology and Biochemistry, Volume 26, Issue 12, December 1994, Pg 1591-1601
46. Ortiz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macas-Rodriguez L, Lopez-Bucio J (2007) The role of microbial signals in plant growth and development. Plant Signal Behav 4:701–712
47. Pacôme, A.N., Nadège, A.A.,Baba-Moussa,F., Adjanohoun A., Baba-Moussa L. :“ Plant growth promoting rhizobacteria: Beneficial effects for healthy and sustainable agriculture“, African Journal of Biotechnology, 2016., Vol. 15(27), 2016.,str. 1452-1463.

48. Pedraza, R. O., Motok, J., Tortora, M. L., Salazar, S. M., Dı´az-Ricci, J. C. (2007): Natural occurrence of Azospirillum brasilense in strawberryplants. Plant Soil 295:169–178
49. Pedrosa, F. O., Pedrosa, R. A., Monteiro, R. Wassem, L. M., Cruz, R. A. (2011): Genome of Herbaspirillum seropedicae strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses
50. Rosenblueth M, Martinez-Romero E (2006) Bacterial Endophytes and their interactions with hosts. Mol Plant Microb Interact 19(8):827-837
51. Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., Dowling, D. N. (2008): Bacterial endophytes: recent developments and applications FEMS Microbiol. Lett., 278, pp.1-9
52. Saharan, B. S., Nehra, V. (2011.): Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review, Life Science and Medicine Research, volume 2011., stranica 21.
53. Saraf, M., Jha, C. K., Patel, D. (2010): The role of ACC deaminase producing PGPR in sustainable agriculture. Plant Growth and Health Promoting Bacteria, pp.365-385
54. Singh, C. S., Subba Rao, N. S. (1979): Associative effect of Azospirilium brasilense with Rhizobium japonicum on nodulation and yield of soybean ( Glycine max ). Plant and Soil 53(3):387-392.
55. Surette, M. A., Sturz, A.V., Lada, R. R., Nowak, J. (2003): Bacterial endophytes in processing carrots (Daucus carota L. var. sativus): their localization, population density,biodiversity and their effects on plant growth. Plant and Soil, Vol.253, pp.381-390
56. Tarrand, J. J., Krieg, N. R., Dobereiner, J. (1978): A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group, with descriptions of a new genus, Azospirillum gen. nov. and two species, Azospirillum lipoferum (Beijerinck) comb. nov. and Azospirillum brasilense sp. nov. Can. J. Microbiol. 24: 967-980.
57. Topol, J. i Kanižaj Šarić, G. (2013.): Simbiotska fiksacija dušika u ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji; Agronomski glasnik, 2-3/2013.
58. Tovey H. (1997). Food, Environmentalism and Rural Sociology: On the OrganicFarming Movement in Ireland, European Society for Rural Sociology. Sociologia Ruralis Volume 37(1): 93–104.
59. Tripathi AK, Nagarajan T, Verma SC, Le Rudulier D, 2002. Inhibition of biosynthesis and activity of nitrogenase in Azospirillum brasilense Sp7 under salinity stress. Current Microbiology, 44 (Suppl 5): 363–367.

60. Vikhe, P. S. (2014): *Azotobacter* species as a Natural Plant Hormone Synthesizer. Department of Botany, P.V.P. College of Arts Science and Commerce, Pravaranagar (Loni), Arts Science and Commerce College Kolhar. Vol. 3(IVC-2014), 59-63 (2014)
61. Vukadinović, V. i Vukadinović, V. (2011.): Ishrana bilja, Poljoprivredni fakultet Osijek.
62. Vukadinović, V., Lončarić, Z. (1997): Ishrana bilja. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet Osijek. Drugo izmijenjeno i dopunjeno izdanje.
63. 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.

# 8. ŽIVOTOPIS

Lora Spasenić rođena je 12. rujna 1992. godine u Zagrebu. Osnovnu školu Gustava Krkleca u Zagrebu završava 2007. godine. Srednju školu opće gimnazije završava 2011. godine također u Zagreb. Iste godine upisuje preddiplomski stručni studij agroekologije na Agronomskom fakultetu u Zagrebu koji završava 2015. godine obranom završnog rada te stječe akademski naziv sveučilišni prvostupni inženjer agronomije (univ. bacc. ing. agr.). Završni rad pod naslovom „Udio alohtonih vrsta riba u ribičkom ulovu Hrvatske“ 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.