

Pristupi i metode istraživanja rizosfere

Erić, Daria

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:777509>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij: Ekološka poljoprivreda i agroturizam

Daria Erić

PRISTUPI I METODE ISTRAŽIVANJA RIZOSFERE

DIPLOMSKI RAD

Mentor: Doc. dr. sc. Željka Zgorelec

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je ocijenjen i obranjen dana _____

s ocjenom _____ pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Doc. dr. sc. Željka Zgorelec _____

2. Prof. dr. sc. Milan Poljak _____

3. Izv. prof. dr. sc. Marija Romić _____



Slika 1 Otključavanje tajni rizosfere (Brink, 2016).

Essentially all life depends upon the soil...There can be no life without soil and no soil without life; they have evolved together.

Charles E. Kellogg, USDA Yearbook of Agriculture, 1938.

ZAHVALA

Nijedan čovjek nije otok. Stoga koristim ovu priliku izraziti zahvalnost osobama koje su mi pomogle prilikom izrade diplomskog rada i općenito tijekom studija. Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Željki Zgorelec na susretljivosti, strpljenju i ustupljenim materijalima prilikom izrade rada. Cijenim njezino vrijeme, energiju, stručnost i duboko ukorijenjene analitičke sposobnosti koje je uložila u ovaj rad. Hvala. Najljepše zahvaljujem voditelju studija „Ekološka poljoprivreda i agroturizam“ prof.dr.sc. Ivici Kisiću na vodstvu, pristupačnosti i predanosti od početka do kraja studija. Svaka ideja naišla je na plodno tlo i ukorijenila se, što mi je uljepšalo i olakšalo studentske dane. Hvala. Moram odati priznanje roditeljima i bratu koji su mi omogućili slijeđenje različitih interesa, ne uvijek nužno vezanih uz školovanje. Hvala. Zahvaljujem B. Martin za dugotrajnu inspiraciju prije, za vrijeme, te nakon izrade diplomskog rada. Osobe G. i K. su vječni izvor optimizma i nikada ne razgovaramo o diplomskom radu, što mi je posljednjih mjeseci omogućilo očuvanje zdravog razuma, kao i podsjetnik da je u redu imati život i izvan studija. Hvala. Oni koji me poznaju znaju da izazove prihvaćam odgovorno, pošteno i s vizijom, te želim izraziti zahvalnost svima ostalima koji su se potrudili da to i vide. Hvala.

SAŽETAK

Rizosfera je biološki najaktivniji sloj tla koji se nalazi uz korijen i pod njegovim je izravnim utjecajem. Od okolnog tla se značajno razlikuje po kemijskim, fizikalnim i biološkim svojstvima. Rizosfera predstavlja iznimno složen i dinamičan okoliš u kojem se simultano odvijaju brojne interakcije između korijenja, otopljenih tvari, organskih spojeva, minerala, plinova i (mikro)organizama. Ti procesi utječu na rast i razvoj korijena, efikasnost primanja hranjiva i vode, te posljedično i na produktivnost biljaka. Poljoprivredna proizvodnja uvelike ovisi o razumijevanju procesa u rizosferi. Istraživanja rizosfere predstavljaju izazov u smislu eksperimentalnog dizajna i metodologije, prvenstveno zbog složenosti navedenih procesa koji se odvijaju na mikro razini. Pristup procesima i pojavama *in situ* je ograničen s obzirom da se odvijaju ispod površine. Usprkos ogromnom napretku u razvoju metoda u posljednjih nekoliko desetljeća pronalazak odgovarajućih eksperimentalnih postava za istraživanje rizosfernih procesa još uvijek predstavlja veliki izazov. Ovaj pregledni rad kritički procjenjuje dostupnu literaturu i raspravlja o pristupima i metodama istraživanja rizosfere, s naglaskom na tehnike vizualizacije rizosfernih procesa. U prvom dijelu rada predstavljen je pristup rizosferi i opis njezinih svojstava, prilikom čega su obuhvaćene metode uzorkovanja rizosfernog tla, sakupljanja eksudata korijena i otopine rizosfernog tla. Raspravljani su različiti eksperimentalni sustavi pogodni za upotrebu u poljskim i laboratorijskim uvjetima, sa navedenim pregledom prednosti i ograničenja pojedinih metoda. Praćenje rizosfernih procesa pomoću izotopa tema je drugog dijela rada, dok je treći dio posvećen tehnikama vizualizacije rizosfernih procesa. One uključuju prikaz najsuvremenijih metoda kemijskog i neinvazivnog snimanja, te snimanja pomoću izotopa i mikroorganizama. Trenutno je razumijevanje rizosfernih procesa nepotpuno, pa je naglašena potreba za korištenjem kombiniranih pristupa koji imaju potencijal razriješiti složene procese u rizosferi.

Ključne riječi: rizosferni procesi, eksudati korijena, otopina tla, tehnike vizualizacije.

ABSTRACT

The rhizosphere is the most biologically active volume of soil around plants roots that is influenced by their activities. Due to the influence of roots, the rhizosphere differs from bulk soil significantly in its chemical, physical, and biological characteristics. The rhizosphere represents an extremely complex and dynamic environment where numerous interactions occur simultaneously between roots, solutes, organic compounds, minerals, gases and (micro)organisms. These processes affect root growth and development, efficiency of nutrients and water uptake, and consequently the productivity of plants. Agricultural production heavily depends on understanding the rhizosphere processes. Rhizosphere research is a challenging task in terms of experimental design and methodology because of complexity of these processes occurring at a micro-scale. In particular, access to study these processes and phenomena *in situ* is limited as they occurring below-ground. Despite tremendous progress in method development in the past decades, finding suitable experimental setups to investigate rhizosphere processes still represents a major challenge. This review paper critically assesses available literature and discusses approaches and methods of rhizosphere research, with emphasis on visualization techniques of rhizosphere processes. In the first section access to rhizosphere and description of its properties is presented, covering methods for sampling rhizosphere soil and collection of root exudates and rhizosphere soil solution. Various experimental systems suitable for use under field and laboratory conditions are discussed, with an overview of main advantages and limitations of a certain method. Tracing rhizosphere processes with isotopes is the topic of the second section, while the third section is devoted to visualization techniques of rhizosphere processes. They include a presentation of cutting-edge methods of chemical, non-invasive, isotope and microbial imaging. Currently, the understanding of rhizosphere processes is incomplete, emphasising the need for using combinatorial approaches that have great potential to unravel complex rhizosphere processes.

Keywords: rhizosphere processes, root exudates, soil solution, visualization techniques.

SADRŽAJ

1	UVOD	1
2	MATERIJALI I METODE	4
3	REZULTATI I RASPRAVA	7
3.1	PRISTUP RIZOSFERI I OPIS NJEZINIH SVOJSTAVA	7
3.1.1	Uzorkovanje rizosfernog tla	9
3.1.1.1	Poljski uvjeti	9
3.1.1.2	Laboratorijski uvjeti	14
3.1.2	Sakupljanje eksudata korijena	30
3.1.3	Sakupljanje otopine rizosfernog tla	35
3.2	PRAĆENJE RIZOSFERNIH PROCESA POMOĆU IZOTOPA	40
3.3	TEHNIKE VIZUALIZACIJE RIZOSFERNIH PROCESA	43
3.3.1	Kemijsko snimanje	43
3.3.2	Neinvazivno snimanje	51
3.3.3	Snimanje pomoću mikroorganizama	54
3.3.4	Snimanje pomoću izotopa	57
4	ZAKLJUČAK	62
5	LITERATURA	64
	ŽIVOTOPIS	74

POPIS KRATICA

CARD-FISH	catalyzed reporter deposition combined with fluorescence <i>in situ</i> hybridization // katalizirana depozicija reportera u kombinaciji s fluorescentnom <i>in situ</i> hibridizacijom
CE	capillary electrophoresis // kapilarna elektroforeza
CLSM	confocal scanning laser microscopy // konfokalna laserska pretražna mikroskopija
CNR	cold neutron radiography // hladna neutronska radiografija
CT	computed tomography // kompjuterizirana tomografija
DGT	diffusive gradients in thin films // difuzijski gradijenti na tankom filmu
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridisation // fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija
FP	fluorescent protein // fluorescentni protein
GFP	green fluorescent protein // zeleni fluorescentni protein
HTS	high-throughput screening // metoda brzog probiranja
ICP	inductively coupled plasma // induktivno spregnuta plazma
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry // masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom
ICP-OES	inductively coupled plasma optical emission spectrometry // optička emisijska spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom
IRMS	isotope ratio mass spectrometry // masena spektrometrija izotopnih omjera
LA-ICP-MS	laser ablation inductively coupled plasma mass spectroscopy // laserska ablacija masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom
LED	light emitting diode // svjetleće diode
min.	minute // minuta
MSC	micro-suction cups // mikro usisne čašice
NanoSIMS	nanoscale resolution secondary ion mass spectrometry // masena spektrometrija sekundarnih iona
NR	neutron radiography // neutronska radiografija
PLFA	phospholipid derived fatty acids // fosfolipidi masnih kiselina
PLFA-SIP	phospholipid derived fatty acids-stable isotope probing // sondiranje fosfolipida masnih kiselina stabilnim izotopima
REC	root exudate collection // sakupljanje eksudata korijena
rRNA	ribosomal ribonucleic acid // ribosomalna ribonukleinsku kiselina
SEM	scanning electron microscope // skenirajući elektronski mikroskop
SiCSA	single cell sampling and analysis // analiza i uzorkovanje pojedine stanice
SIP	stable isotope probing // sondiranje stabilnim izotopima
SR-CT	synchrotron tomography // sinkrotron tomografija
X-ray μ CT	X-ray micro-computed tomography // rendgenska mikro kompjuterizirana tomografija

POPIS TABLICA

Tablica 1	Pregled pojedinih svima dostupnih baza podataka na internetu.....	5
Tablica 2	Vrste pretraživanja literature za diplomski rad.....	6
Tablica 3	Uzorkovanje rizosfernog tla rezanjem.....	25
Tablica 4	Glavna saznanja rizoboks i rizotest eksperimenta.....	29
Tablica 5	Prednosti i ograničenja metoda sakupljanja eksudata korijena	34
Tablica 6	Prednosti i ograničenja metoda za sakupljanje otopine rizosfernog tla	Error! Bookmark not defined.
Tablica 7	Glavne prednosti i ograničenja metoda za praćenje rizosfernih procesa pomoću izotopa	43
Tablica 8	Prednosti i ograničenja metoda kemijskog snimanja rizosfernih procesa.	51
Tablica 9	Prednosti i ograničenja neinvazivnih metoda snimanja rizosfernih procesa	54
Tablica 10	Prednosti i ograničenja metoda snimanja rizosfernih procesa pomoću mikroorganizama.....	56
Tablica 11	Prednosti i ograničenja metoda snimanja rizosfernih procesa pomoću izotopa	60
Tablica 12	Pregled obećavajućih kombinacija metoda za proučavanje rizosfernih procesa	61

POPIS SLIKA

Slika 1	Otključavanje tajni rizosfere.	3
Slika 2	Shematski prikaz rizosfere	8
Slika 3	Uzorkovanje rizosfernog tla u poljskim uvjetima	9
Slika 4	Postavljanje prozora za promatranje korijenja u polju krumpira.	11
Slika 5	Skica minirizotron sustava za promatranje korijena	11
Slika 6	Postavljanje minirizotrona.....	13
Slika 7	Rizoboks sustav u laboratoriju.	17
Slika 8	Promjene u distribuciji korijena uljane repice <i>Brassica napus</i> tijekom rizoboks eksperimenta.....	17
Slika 9	Shematski prikaz rizoboks sustava.....	17
Slika 10	Odjeljivanje slojeva tla.....	18
Slika 11	Eksperimentalni dizajn sustava razdvojenih kutija za praćenje rasta korijena graha <i>Phaseolus vulgaris</i> nakon inokulacije mikrozom u naftom onečišćenom tlu	19
Slika 12	Rizotron sustav razdvojenog korijenja	20
Slika 13	Rizotron sustav s akrilnim prozorom za promatranje dinamike rasta i razvoja korijena	21
Slika 14	Shematski prikaz rizotest sustava.....	22
Slika 15	Tijek rizoboks eksperimenta.	26
Slika 16	Tijek rizotest eksperimenta.	28
Slika 17	Neke od metoda za sakupljanje eksudata korijena.....	31
Slika 18	Sakupljanje eksudata korijena.....	32
Slika 19	Rizoboks sustav u kombinaciji s novim alatom za sakupljanje eksudata korijena.	32
Slika 20	Shematski prikaz i fotografija rizotrona s nizom postavljenih mikro usisnih čašica	36
Slika 21	Sakupljanje otopine tla u polju pomoću mikro usisnih čašica	36
Slika 22	Sakupljanje otopine tla u polju pomoću keramičkih mikro usisnih čašica.	36
Slika 23	Vremenske promjene koncentracije Ca i Al, te omjera Ca/Al u rizosferi presadnica korijenja hrasta <i>Quercus robur</i>	37
Slika 24	Rezultati praćenja flukseva dušika u tlu u visokoj prostornoj rezoluciji korištenjem mikrodijalize	38
Slika 25	Metoda mikrodijalize.	39
Slika 26	DGT uređaj.....	43
Slika 27	Istraživanje procjene učinkovitosti korištenja fosfora (P) u rizosferi 2 kultivara uljane repice pomoću DGT uređaja.....	44

Slika 28 Primjena DGT gela i senzora planarne optode u obliku folije na korijenov sustav biljke koja raste u rizotronu	46
Slika 29 Snimanje korijenovog sustava biljke koja raste u rizotronu sa senzorom planarne optode pomoću kamere	46
Slika 30 Vizualizacija dinamike pH i O ₂ u rizosferi <i>Juncus effusus</i> korištenjem pH i O ₂ optoda.....	47
Slika 31 Kemijske promjene u rizosferi.	48
Slika 32 Vizualizacija kemijskih promjena u rizosferi.....	50
Slika 33 Shematski prikaz principa rada rendgenske mikro kompjuterizirane tomografije.....	52
Slika 34 Neinvazivno snimanje	53
Slika 35 Mikrobna kolonizacija rizoplane i povezanih čestica tla pomoću konfokalne laserske pretražne mikroskopije	56
Slika 36 Priprema prozirnog tla za snimanje.....	56
Slika 37 Snimanje procesa u rizosferi pomoću izotopa.....	59
Slika 38 Neutron radiografska snimka korijena lupine tijekom i poslije navodnjavanja.	59
Slika 39 Hipotetska distribucija mucigela i vode u rizosferi tijekom ciklusa sušenja i vlaženja.	60

1 UVOD

Tlo je jedno od posljednjih velikih znanstvenih granica (Science, 2004) i najveći rezervoar bioraznolikosti na planeti Zemlji. Tlo je „skrivena“ polovica ekosustava. Polovicu te „skrivena“ polovice čini rizosfera koja predstavlja primarnu vezu između sustava tlo-biljka (Bowen and Roriva, 1991). Termin rizosfera potječe od grčke riječi *rhizo* koja označava korijen i riječi *sphaira* koja, u širem smislu, označava područje. Lorenz Hiltner, profesor agronomije na tehničkom fakultetu u Münchenu, 1904. godine prvi je upotrijebio termin rizosfera definirajući ju kao zonu tla gdje korijenje biljaka otpuštanjem eksudata može stimulirati, inhibirati ili nemati nikakvog utjecaja na mikroorganizme (Pinton et al., 2007). Nakon više od 100 godina tijekom kojih rizosfera zaokuplja pažnju mnogih znanstvenika iz različitih interdisciplinarnih područja prikladna definicija rizosfere je volumen tla koji se nalazi uz korijen biljke i pod utjecajem je aktivnosti rastućeg korijena (Darrah, 1993; Hinsinger, 1998). Hiltner (1904) je opisao rizosferu kao mjesto snažnog međusobnog djelovanja bioloških komponenti, što je u to vrijeme bila vizionarska misao. I doista, ne samo da se interakcije odvijaju između tla i korijenja biljaka ili između korijenja biljaka i mikroorganizama, one se također odvijaju između samih biljaka i samih mikroorganizama, kroz brojne složene procese. Takve složene interakcije imaju veliki utjecaj na ishranu i zdravlje biljaka (Dessaux et al., 2009).

Čitav niz aktivnosti korijena čini rizosferu jedinstvenim okolišem (Hinsinger et al., 2005). U literaturi je dobro dokumentirana sposobnost korijenja biljaka da aktivno mijenjaju biogeokemiju rizosfere (Hiltner, 1904; Hinsinger et al., 2009), pa se tako očekuje da praktički svaki korijen ima kemijski, biološki i fizikalno jedinstvenu rizosferu, tzv. jedinstveni rizosferni potpis. Ove osobine mijenjaju se s biljnom vrstom, strukturom biljne zajednice i tipa tla predstavljajući gotovo beskonačan broj ekotipova rizosfere (Jones and Hinsinger, 2008). Korijenov sustav, nazvan „skrivenom“ polovicom biljke (Böhm, 1979), u interakciji s tlom uzrokuje složene prostorne i vremenske razlike, npr. u sadržaju vode u tlu, pH vrijednosti, dostupnosti hranjivih tvari, te aktivnosti i strukturi mikrobne zajednice (Faget, 2013). Te složene razlike su neophodne zbog širokog raspona resursa koje biljka usvaja iz tla, zajedno s nizom drugih stresova kojima je izložena (npr. manjak vode ili hranjivih tvari, napad bolesti i štetnika). Biljke izložene nedostatku hranjivih tvari sposobne su aktivirati niz mehanizama koji dovode do povećane dostupnosti hranjivih tvari u rizosferi u odnosu na okolno tlo (engl. bulk soil) (Rengel and Marschner, 2005). Kako bi preživjela, biljka treba biti u interakciji s mnogo različitih članova mikrobne zajednice u tlu (Jones and Hinsinger, 2008).

Glavne funkcije korijena su transport vode i hranjivih tvari, te učvršćivanje biljke u tlu. Darwin je smatrao da korijenje djeluje kao mozak biljke integrirajući informacije iz više izvora (Darwin, 1880). Unatoč ovim ključnim funkcijama korijena, ekofiziologija i ekologija korijena predstavljala je područje istraživanja opterećeno naizgled nerješivim poteškoćama praćenja rasta korijena *in situ*. Sve do nedavno sustav tlo-korijen-rizosfera smatrao se „crnom kutijom“ do koje je teško doći i proučavati ju (Faget, 2013). Ali postavlja se pitanje zašto je važno istraživati svijet korijenja i trebamo li uopće mariti za to? Naime, nekoliko je studija pokazalo da globalnu proizvodnju usjeva treba udvostručiti do 2050. godine (Ray et al., 2013). Do sredine stoljeća predviđa se još 2 milijarde ljudi, što je ukupno više od 9 milijardi. No, rast stanovništva nije jedini razlog zbog kojeg će trebati proizvoditi više hrane. Širenje napretka i blagostanja diljem svijeta, osobito u Kini i Indiji, razlog je povećane potražnje za mesom, jajima i mliječnim proizvodima, te je povećan pritisak na proizvodnju kukuruza i soje za ishranu stoke. Ukoliko se trendovi projicirane promjene prehrane i povećane potrošnje biogoriva nastave morat će se udvostručiti i količina usjeva (Foley, 2014). Veliku prijetnju globalnoj sigurnosti hrane predstavlja progresivno smanjenje kvalitete tla diljem svijeta (Godfray et al., 2010). U drugoj polovici 20. stoljeća zelena revolucija željela je izbjeći sličnu krizu ciljanim oplemenjivanjem (nadzemnih svojstava) biljaka u kombinaciji s intenzivnom gnojdbom (Khush, 2001). Međutim, pokazalo se da ti principi ne daju zadovoljavajući odgovor na sveprisutna pitanja o sigurnosti hrane koja zahtijevaju više holistički pristup u smislu oplemenjivanja bilja (npr. razmatranje podzemnih svojstava biljke) i poboljšanja kvalitete tla (Ahmed et al., 2016). Za održavanje zdravlja planete i prehranu stanovništva kritično je bolje razumijevanje rizosfernih procesa (Morrissey et al., 2004). Pravi izazov u prenošenju fundamentalnih istraživanja rizosfere u praktičnu primjenu s ciljem rješavanja stvarnih problema u svijetu predstavlja složenost rizosfere (Wissuwa et al., 2009). Nedavni napredak u razumijevanju složenosti rizosfere u velikoj je mjeri potaknut tehnološkim inovacijama i razvojem analitičkih i bioinformatičkih alata (Jones and Hinsinger, 2008).

Istraživanja korijenja biljaka predstavljaju uzbudljivo i intrigantno područje znanosti. Korijenje je nastalo tijekom rane faze diverzifikacije biljaka na zemlji tijekom devonskog razdoblja prije nekih 363 milijuna do 409 milijuna godina (Kenrick, 2002). Svijet korijenja biljaka, rizosfera, nalazi se ispod površine tla. To zvuči kao fantastično carstvo puno tajni i zagonetki, te nije čudno da općinjava znanstvenike koji se bave pitanjima sigurnosti hrane i klimatskih promjena. Ipak, prilikom proučavanja tamnog, podzemnog okoliša kako zaista možemo znati što se događa ispod površine? U doba renesanse Leonardo da Vinci naveo je da „*Više znamo o gibanju nebeskih tijela nego o funkcioniranju tla pod našim nogama*“. Iako još

uvijek ima neke istine u toj tvrdnji, ostvaren je napredak u razumijevanju različitih aspekata sastava, strukture i funkcije rizosfere, kao i analitičkih i metodoloških pitanja, te brzog razvoja odgovarajućih tehnika za proučavanje rizosfere, osobito tijekom zadnjih 20 godina (Dessaux et al., 2009). Nove metode dopuštaju proučavanje rasta korijena i njegove interakcije s tlom i (mikro)organizmima, a saznanja o funkcioniranju rizosfere moguće je koristiti za manipulaciju rizosferom u našu korist.

Ključno pitanje je kako odvojiti, definirati ili identificirati rizosferu (Luster et al., 2009). Iz tog je razloga u prvom dijelu ovog rada predstavljen pristup rizosferi i njezina svojstva, prilikom čega su obuhvaćene tehnike i metode uzorkovanja rizosfernog tla, sakupljanja eksudata korijena i otopine rizosfernog tla. Raspravljani su različiti eksperimentalni sustavi pogodni za upotrebu u poljskim i laboratorijskim uvjetima, sa navedenim pregledom prednosti i ograničenja pojedinih metoda. Praćenje rizosfernih procesa pomoću izotopa, tema drugog dijela rada, važan je alat za razumijevanje utjecaja biljaka na svojstva tla. Treći dio rada posvećen je tehnikama vizualizacije rizosfernih procesa, što uključuje prikaz najsuvremenijih metoda kemijskog i neinvazivnog snimanja, te snimanja pomoću izotopa i mikroorganizama. Iako su pristupi i metode istraživanja rizosfere brojni i sveobuhvatni, u ovom radu nastojalo se objediniti najvažnije znanstvene spoznaje o metodama proučavanja rizosfere, te istaknuti obećavajuće pristupe koji se koriste za rješavanje brojnih izazova u razumijevanju funkcioniranja rizosfere. Dakako, s ciljem implementiranja novih saznanja u poljoprivrednu proizvodnju koja uvelike ovisi o razumijevanju rizosfernih procesa.

2 MATERIJALI I METODE

Svrha preglednog stručnog rada je dati pregled nekog problema ili područja istraživanja na osnovi već objavljenih radova, ali uz originalne analize, sinteze ili prijedloge za daljnja istraživanja. Objavljena otkrića, saznanja i rezultati znanstvenih i stručnih istraživanja iz područja rizosfere su obimna, tako da pronalazak određenih informacija nije nimalo jednostavan i zahtjeva vještinu snalaženja do koje se dolazi prethodnim upoznavanjem sa postupkom pretraživanja literature.

Treba naglasiti da nikada nije moguće prikupiti i pročitati svu literaturu koja odgovara zadanoj temi. Bitno je postaviti ograničenja, ali isto tako ne izostaviti najvažnije (najcitiranije) radove iako se do njih ponekad teško dolazi. Ovakvu vrstu informacija moguće je dobiti iz različitih vrsta literature; primarne (obuhvaća objavljene, originalne članke autora, odnosno rezultate njihovog istraživačkog rada), sekundarne (sadrži informacije koje se u skraćenom obliku izvode iz originalnih članaka primarne literature) i tercijarne (monografije i pregledna literatura).

Izvori podataka

Radi lakšeg i bržeg dobivanja željenih podataka korišteni su različiti alati za pretraživanje literature. Internetske tražilice poput *Googla* nude mnoštvo informacija, ali za razliku od publikacija u profesionalnim časopisima nisu recenzirane. Kako bi se dobili pouzdani izvori za znanstveni i stručni rad ključno je potvrditi kvalitetu tih informacija, odnosno evaluirati literaturu. Kao izvor podataka korištena je i znanstvena internetska tražilica *Google Scholar*.

Preko online baza podataka omogućen je mrežni pristup komercijalnim bibliografskim i citatnim bazama podataka te onima u slobodnom pristupu za sve članove znanstvene i akademske zajednice. Prilikom pretraživanja literature u najvećoj je mjeri korištena baza podataka *Scopus*. Ona predstavlja najveću citatnu bazu koja je na raspolaganju hrvatskim znanstvenicima i uključuje preko 18,000 časopisa od kojih je 16,500 sa recenzijom, nekoliko tisuća drugih vrsta publikacija, uključujući i "Articles-in-Press" iz preko 3000 časopisa. Proizvod je poznatog izdavača znanstvene, tehničke i medicinske literature Elsevier. Radi se o interdisciplinarnoj bazi podataka koja pokriva prirodne, tehničke, medicinske i društvene znanosti, kao i humanistiku te područje umjetnosti. Bolje pokriva europsku znanstvenu publicistiku nego npr. *Web of Science*. Putem baze podataka *Scopus* može se pratiti citiranost pojedinih autora, radova i dr. od 1996., a podaci o radovima dosežu sve do 1893., ovisno o časopisu. *Scopus* karakterizira jednostavno i intuitivno sučelje te poveznice s cjelovitim

tekstovima radova (ukoliko su preplaćene). Jedna od prednosti je i jednostavno učitavanje cjelovitog teksta rada (Document Download Manager) ili odabranih radova (Export) u programe za upravljanje referencama kao što je *Zotero*, *Mendeley*, *EndNote*, *RefWorks* i dr. Besplatni program *Zotero (Firefox) 4.0.29.8* korišten je u ovom radu za organizaciju i upravljanje prikupljenom literaturom, uz korištenje harvardskog sistema navođenja autora i datuma što je u skladu s uputama za oblikovanje diplomskog rada. Označavanje rezultata istraživanja drugih autora, odnosno citiranje, dio je dobre znanstvene prakse i regulirano je Zakonom o autorskom pravu i srodnim pravima (NN 167/03, 79/07, 80/11, 125/11, 141/13, 127/14). Prikupljanje citata o pojedinoj temi razvija bibliografiju koja pomaže drugim autorima koji rade na sličnoj temi u potrazi za literaturom.

Pristup bazi podataka *Scopus* omogućen je preko Centra za online baze podataka CARNet koristeći sustav *AAI@EduHr*. Tijekom studentske razmjene na Universität für Bodenkultur (ak. god. 2013./14., Beč, Austrija) korišteni su svi resursi knjižnice (online katalozi, e-knjige, e-časopisi, baze podataka od kojih velika većina pruža mogućnost uvida u cjeloviti tekst pojedinog rada, baza diplomskih i doktorskih radova). Pojedina sveučilišta, poput ETH-Zürich i Universität Hohenheim nude dizertacije sa cjelovitim tekstom u elektroničkom obliku. Ostali izvori uključuju i neke od svima dostupnih baza podataka na internetu (Tablica 1).

Tablica 1 Pregled pojedinih svima dostupnih baza podataka na internetu

Naziv baze podataka ili portala	Sadržaj	Internetska domena
AGRIS/FAO (International System for Agricultural Science and Technology)	Baza podataka sa više od 8 milijuna bibliografskih podataka vezanih uz istraživanja u agronomiji. Korisnicima je omogućen pristup cjelovitim tekstovima ukoliko su oni slobodno dostupni online.	agris.fao.org
CORDIS (Community Research and Development Information Service)	Portal Europske Komisije za objavu informacija vezanih uz istraživačke projekte i rezultate financirane od strane Europske unije.	cordis.europa.eu
HRČAK	Portal znanstvenih časopisa Republike Hrvatske koji omogućuje pregledavanje i pretraživanje sadržaja domaćih znanstvenih i stručnih časopisa koji su svoj sadržaj ponudili putem koncepta otvorenog pristupa.	hrcak.srce.hr
Hrvatska znanstvena bibliografija (CROSBİ)	Bibliografska baza podataka koja sadrži podatke o radovima (autor, naslov rada, sažetak) i istraživačkim projektima Hrvatske zaklade za znanost.	bib.irb.hr

Najveća svjetska internetska trgovina Amazon predstavlja možda najbolji izbor za vlasnike Kindle uređaja prilikom kupovine e-knjiga. Uz Kindle uređaj za PC 1.16.0 iskorištena je mogućnost iznajmljivanja pojedinih udžbenika i knjiga. Pored brojnih internetskih izvora, u potrazi za literaturom moguće je komunicirati sa stručnjacima i osobama uključenim u zadanu problematiku. Stoga su korištene bilješke nastale tijekom predavanja prof. Zed Rengela na temu „Exploring the world of roots“ održanog 4. srpnja 2016. na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Od velike su pomoći bile bilješke i materijali korišteni tijekom modula „Rhizosphere Processes and Application to Agriculture and Soil Protection“ (Wenzel W) i „Ecology and Management of the Rhizosphere in Ecological Engineering“ (Oburger E, Puschenreiter M). Pažljivim čitanjem relevantne literature došlo se do daljnjih važnih literaturnih referenci iz kojih se nastojao osigurati originalni rad.

Strategija pretraživanja

Elektronski katalozi i baze podataka ne mogu „misliti“ tako da prikupljeni pojmovi trebaju biti prevedeni na standardizirane pojmove. Jednostavnim pretraživanjem po osnovnim bibliografskim podacima moguće je naći pojedine radove u časopisima ili izabrati napredno pretraživanje koje pruža mnogo više mogućnosti za ciljano pretraživanje. Engleski jezik je danas preduvjet svakog uspješnog pretraživanja interneta i od velike je koristi ako osoba dobro vlada njime.

U pretraživanju je korištena pretraga prema ključnim riječima, autoru i naslovu (Tablica 2). Prilikom pretraživanja literature tema rada je podijeljena na pojedine dijelove kako bi se identificirali pojmovi za pretraživanje. Iz pojedinih dijelova teme izvedene su ključne riječi. Pretraženi su sinonimi ključnih riječi, kao i pojmovi sa užim i širim značenjem, te relevantni odnosi između pojmova. Odabrane ključne riječi kombinirane su uz Booleove operatore, tj. izraze „AND“, „OR“ i „NOT“ čime se proširilo odnosno suzilo pretraživanje.

Tablica 2 Vrste pretraživanja literature za diplomski rad

Tema rada: „Pristupi i metode istraživanja rizosfere“	
Pretraživanje	Primjer
Prema ključnim riječima	Rhizosphere processes Exploring rhizosphere Rhizosphere design Methods, rhizosphere research Studying rhizosphere
Prema ključnim riječima i Booleovim operatorima	Rhizosphere AND review article Rhizosphere research OR tools Rhizosphere management NOT complexity
Prema autoru	Bravin M. Hinsinger P. Marschner P.
Prema naslovu	Rhizosphere: Biophysics, Biogeochemistry and Ecological Relevance

3 REZULTATI I RASPRAVA

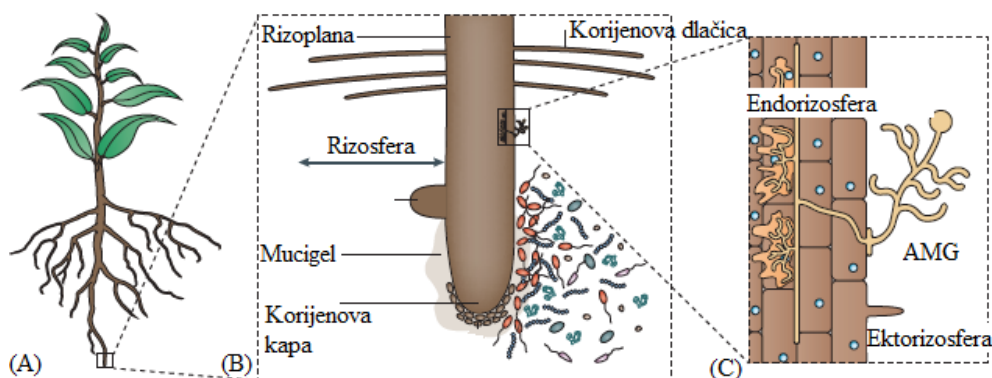
3.1 PRISTUP RIZOSFERI I OPIS NJEZINIH SVOJSTAVA

Termin rizosfera obično se koristi za opisivanje volumena tla pod utjecajem korijena, ali se može proširiti i na opis međuprostora između korijena i tla (engl. root-soil interface) koji se može razdvojiti na ektorizosferu (rizosferno tlo), rizoplanu (površina korijena) i endorizosferu (unutarnji dio korijena) (Slika 2). Važno je naglasiti da se rizosferom smatra samo volumen tla koji je pod utjecajem aktivnosti rastućeg, dakle živog, korijenja. Mogućnost razlikovanja živog i odumrlog korijenja preduvjet je definiranja rizosfere (Fitz et al., 2006). Ona predstavlja složeni i vrlo dinamični okoliš gdje se odvijaju brojne interakcije između korijenja, minerala, organskih spojeva, otopljenih tvari, plinova i (mikro)organizama koje utječu na biogeokemijsko kruženje elemenata, rast biljaka i njihovu toleranciju na abiotske i biotske stresove (Philippot et al., 2013).

Za razliku od nadzemnih organa, korijenje biljka je „skriveno“ u tlu i u svojem prirodnom okruženju dostupno je samo korištenjem specijalnih postupaka ili opreme. Primjena različitih metoda za istraživanje rizosfere zahtijeva posebne vještine. Mnoge analitičke metode koje se koriste nisu originalno razvijene za istraživanje rizosfere, već su preuzete iz drugih znanosti. Npr. endoskopija koja je prihvaćena u medicini danas se koristi za istraživanje korijenja u minirizotronima (vidi poglavlje 3.1.1.1). Okolišni uvjeti se razlikuju s obzirom na prostor i vrijeme, tako da eksperimentalni postavi i tretmani u poljskim uvjetima često mogu biti maskirani njihovim nepredvidivim promjenama. Stoga su za smislena istraživanja rizosfere u poljskim uvjetima potrebna dugoročna promatranja i veliki broj ponavljanja (Polomski and Kuhn, 2002). Međusobno povezana složenost rizosfernih procesa zahtijeva eksperimentalne dizajne i tehnike sposobne razriješiti procese koji se odvijaju u različitim mjerilima, od centimetra do nanometra. S obzirom na prostornu rezoluciju potrebnu za istraživanje dinamike rizosfere i nepredvidivost poljskih uvjeta, većina studija traži način simulacije poljskih uvjeta u polu-umjetnim eksperimentalnim postavima (Oburger and Schmidt, 2016). Proučavanjem procesa i reakcija rasta korijena u kontroliranim uvjetima u laboratoriju mogu se izbjeći ulaganja u sredstava za rad u poljskim uvjetima. Međutim, uvjeti za rast u laboratoriju rijetko predstavljaju prirodan okoliš. Stupanj kompromisa između istraživanja u poljskim i laboratorijskim uvjetima, kao i eksperimentalni dizajn i tehnike koje se koriste ovise o cilju pojedinog istraživanja (Polomski and Kuhn, 2002). U laboratorijskim uvjetima biljke se uzgajaju u odgovarajućim sustavima za rast koji omogućuju razvoj definirane rizosfere. Nakon toga moguće je uzorkovati rizosferno i nerizosferno (okolno) tlo kako bi se

procijenile karakteristike rizosfere. Neki eksperimentalni postavi, poput hidroponskih sustava, ne sadrže rizosferno tlo. Ipak, takvi sustavi su također bitni u istraživanju rizosfere, npr. za procjenu kvalitativnih i kvantitativnih obrazaca eksudacije korijena biljaka nakon ishrane različitim hranjivim otopinama (Neumann et al., 2009). Instrumentalne prepreke (npr. nepokretnost uređaja) često ograničavaju provođenje eksperimenata na laboratorijske uvjete.

Danas znanstvenici imaju na raspolaganju brojne pristupe i metode za proučavanje rizosfere, ali još uvijek postoje neka otvorena pitanja. Na koji način se mogu usporediti podaci o rizosfernim procesima dobiveni u laboratorijskim uvjetima s onima dobivenim u poljskim uvjetima? Kako se može optimizirati simulacija poljskih uvjeta u laboratoriju kako bi se poboljšala procjena rizosfernih procesa u biološki relevantnim mjerilima? Koji su najbolji pristupi za razotkrivanje svih aktivnih sudionika (ne nužno najbrojnijih) uključenih u kruženje hranjivih tvari u rizosferi (biljke, gljive, beskralješnjaci, archea¹, bakterije, protozoa²)? Kako se može poboljšati primjena metoda u poljskim uvjetima ili neporušenim uzorcima tla? (Oburger and Schmidt, 2016). Odgovori na ova pitanja izlaze iz okvira ovog rada, ali u sljedećim poglavljima može se naći pregled različitih pristupa i metoda koje se trenutno koriste u istraživanju rizosfere, pri čemu se razmatra i vrsta istraživanja za koje su one najpogodnije.



Slika 2 (A) Shematski prikaz rizosfere; (B) Uvećani prikaz rizosfere kao uskog (1-2 mm) sloja tla koji okružuje korijen i pod njegovim je utjecajem; (C) Neki autori razlikuju ektorizosferu, rizoplanu i endorizosferu; rizosfera sadrži saprofitske i simbiotske bakterije i gljive, uključujući i arbuskularne mikorizne gljive (AMG) (Philippot et al., 2013). Preuredila D. Erić, 2016.

¹ Mikroorganizmi koji su jednostanični prokarioti. Žive u ekstremnim uvjetima – u dubokim i hladnim oceanima, tlu i slatkoj vodi.

² Mikroorganizmi koji su jednostanični aerobni eukarioti. S obzirom na brojnost, biomasu i raznolikost čine najveću grupu organizama na svijetu.

3.1.1 Uzorkovanje rizosfernog tla

Ovisno o teksturi i strukturi tla, biljnoj vrsti i promatranom parametru, promjene nastale pod djelovanjem korijena mogu se promatrati do udaljenosti od nekoliko μm do otprilike 7 mm od površine aktivnog segmenta korijena ili tepiha korijenja (engl. root mat) (Jones et al., 2003). Tehnike uzorkovanja rizosfernog tla i otopine rizosfernog tla moraju se nositi s ovim zahtjevom prostorne rezolucije (Luster et al., 2009). Međutim, rizosferni učinci mogu izaći izvan okvira ovog raspona kada se razmatraju visoko mobilni spojevi poput vode ili CO_2 (Hinsinger et al., 2005).

3.1.1.1 Poljski uvjeti

Ovisno o cilju istraživanja postoji nekoliko metoda za procjenu rasta korijena u poljskim uvjetima. Jedna od mogućnosti je korištenje metoda koje se odnose na iskapanje. One obuhvaćaju: (i) iskapanje korijenovog sustava (Slika 3) i (ii) iskapanje neporušenih jezgri tla (sa ili bez umetaka) koje drže korijenov sustav u izvornom položaju tijekom ispiranja, ručnog uklanjanja čestica tla ili uklanjanja čestica tla pomoću tlaka zraka (Danjon and Reubens, 2008). Ove metode omogućuju pristup biomasi korijena i distribuciji duljine korijena, te opis morfologije korijena. Iskapanje u različitim vremenskim razdobljima tijekom rasta biljke može dati vremenske varijacije rasta korijena i posljedica izazvanih njegovim djelovanjem na mineralni sastav rizosfere i otopine tla. Iskapanje korijenja drveća korišteno je za proučavanje utjecaja zrelog korijenja američke duglazije *Pseudotsuga menziesii* na čvrstu fazu i otopinu rizosfernog tla, te praćenje vremenskih varijacija kemijskih karakteristika rizosfernog i okolnog tla (Turpault et al., 2007). Kao glavna ograničenja, tehnike temeljene na iskapanju su općenito destruktivne, vremenski zahtijevne, a sam proces uzorkovanja je povezan uz gubitke i štetu, osobito finih struktura korijena, te često ograničen na analizu gornjih slojeva tla (Danjon and Reubens, 2008).



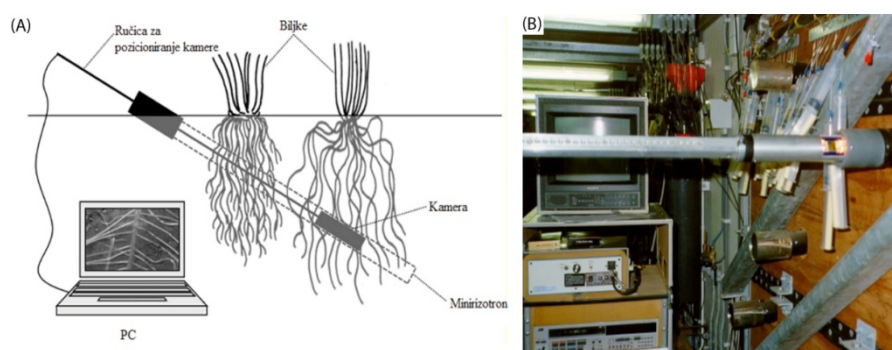
Slika 3 Uzorkovanje rizosfernog tla u poljskim uvjetima. (A) Ekperimentalni postav istraživanja kvalitete i kvantitete rizodepozicije različitih hibrida kukuruza *Zea mays*; (B) Iskapanje cijele biljke s korijenovim sustavom; (C) Ručno uklanjanje čestica tla tresenjem ili četkanjem (Cavani and Mimmo, 2007).

Izravno praćenje rasta korijena u poljskim uvjetima moguće je koristeći tehniku prozora za promatranje korijenja (engl. root window). Prozor je prozirno 6-8 mm debelo staklo ili pleksiglas ploča pritisnuta na profil tla i služi za istraživanje morfološkog razvoja korijenja i fenoloških promjena u životnom vijeku pojedinog korijenja. Princip ove tehnike temelji se na snimanju korijena *in situ*, nedestruktivno duž profila tla rezanog čeličnim noževima ispod biljaka od interesa kako bi se dobila ravnina za promatranje (Slika 4) (Neumann et al., 2009; Polomski and Kuhn, 2002). Tehnika prozora za promatranje korijenja nudi priliku za mjerenje prostorne i vremenske promjene usvajanja hranjivih tvari, kemijskih karakteristika rizosfere i rizosfernih mikrobnih populacija (Smit et al., 2000b).

Alternativno, moguće je korištenje rizotrona i minirizotrona (MR). Rizotroni su podzemni objekti opremljeni prozorima koji su naslonjeni na profil tla, dok se vrlo automatizirane modifikacije rizotrona nazivaju rizolaboratoriji (Slika 5B) (Polomski and Kuhn, 2002; Vamerali et al., 2012). MR su prevladali visoke troškove velikih podzemnih rizotrona (Böhm, 1979) i danas se intenzivno koriste. Minirizotron sustav dizajniran je da klizi prema dolje unutar prozirne cijevi u tlu i snima korijenje ispod površine tla. MR su prvi puta opisani 1937. kao staklene cijevi umetnute u tlo, zatvorene na dnu i zabrtvljene metalnim poklopcem na vrhu (Bates, 1937). U tom prvom istraživanju, pomoću zrcala i električne žarulje montirane na kraju metalnog štapa promatrano je korijenje engleskog ljulja *Lolium perenne*. Današnji MR sustavi obično se sastoje od prozirnih cijevi trajno umetnutih u tlo, optičkog sustava uvedenog u cijev (minijaturne video kamere koje se kreću na odabranim položajima duž cijevi) i video sustava za obradu, pohranu i analizu snimaka (Slika 5A) (Polomski and Kuhn, 2002; Vamerali et al., 2012). Takvi sustavi omogućuju promatranje rasta korijena kroz vrijeme i praćenje pojedinačnog korijenja u toku razvoja. Isti segmenti korijena mogu se izravno mjeriti više puta. Dakle, ova tehnika je osobito primjerena za procjenu elongacije i dugovječnosti korijena (Majdi, 1996). Analizom snimaka tla s odgovarajućim softverom moguće je dobiti kvantitativne podatke o stopi rasta i morfologiji korijena (Rewald and Ephrath, 2013). MR se upotrebljavaju za proučavanje interakcija između korijenja i brojnih organizmima u tlu; mikorize (Pritchard et al., 2008), nematoda (Smit and Vamerali, 1998), bakterija fiksatora dušika (Pritchard and Rogers, 2000) i faune tla (Steinaker and Wilson, 2008).



Slika 4 Postavljanje prozora za promatranje korijena u polju krumpira. (A) Otvaranje profila tla pomoću čelične ploče; (B) Zamjena čelične ploče prozorom za promatranje od pleksiglasa; (C) Fiksacija i izolacija prozora za promatranje; (D) Prozor za promatranje korijena u polju 3 tjedna nakon postavljanja s razvijenim novim korijenjem (Neumann et al., 2009).



Slika 5 (A) Skica minirizotron sustava za promatranje korijena; (B) Video sustav za snimanje u horizontalno postavljenim minirizotron cijevima u podzemnom hodniku rizolaboratorija u Wageningenu (Nizozemska) koji više nije u funkciji (Vamerli et al., 2012). Preuredila D. Erić, 2016.

Postavljanje MR cijevi u polju zahtijeva upotrebu ručnog svrdla (Kage et al., 2000) ili bušilice za tlo (Slika 6A-D) (Hummel et al., 1989; Vamerali et al., 2012). Može biti tehnički zahtijevno što ovisi o prirodi tla, npr. tla gdje prisutnost šljunka spriječava prodiranje, nedostatak kohezivnosti u pjeskovitim tlima ili vodom zasićenom tlu (Maeght et al., 2013). Usprkos tome, pojedini znanstvenici su uspješno postavili MR cijevi u kamenito tlo (Phillips et al., 2000), te u močvarnim područjima (Iversen et al., 2012). Dubina postavljanja MR cijevi rijetko prelazi prvi metar profila tla, zbog već spomenutih poteškoća tijekom postavljanja (Rewald and Ephrath, 2013). Nadalje, ograničenje za postavljanje cijevi na veću dubinu predstavlja i duljina komercijalno dostupnih prozirnih cijevi za promatranje (maks. duljina: cca. 3 m). Zbog velikog opsega posla pokušaji postavljanja dugačkih MR cijevi su rijetki. Kao iznimka navodi se primjer postavljanja MR cijevi u kanal dubine 8 m na plantaži eukaliptusa u Brazilu (Hinsinger et al., 2012).

U pojedinim slučajevima koriste se MR cijevi postavljene horizontalno, vertikalno ili pod kutem. Cijevi se uglavnom najčešće postavljaju pod kutem od 30°- 45° (Slika 6B) (Vamerali et al., 2012). Tako postavljene cijevi omogućuju samo jedno opažanje na određenoj dubini, ali bolje otkrivaju distribuciju finog korijenja u odnosu na vertikalno postavljene cijevi (Johnson et al., 2001). Postavljanje cijevi pod kutem je lakše nego horizontalno postavljanje zato što nije potrebno opsežno kopanje kanala. Precizno postavljanje cijevi pruža dobru procjenu elongacije korijena, npr. šećerne repe (Slika 6E-H) (Vamerali et al., 2012). Horizontalne cijevi mogu biti postavljene u podzemnim hodnicima (Smit and Groenwold, 2005), što omogućuje sakupljanje velikog broja snimaka s određene dubine čime se smanjuje broj ponavljanja potreban za statističke potrebe, ali cijevi moraju biti postavljene na različitim dubinama (Vamerali et al., 2012). Iskapanje tla radi postavljanja cijevi može stimulirati otpuštanje dušika i modificirati gustoću tla. U takvim slučajevima mora proći određeno vremensko razdoblje prije nego započne prikupljanje podataka kako bi se dinamika korijena vratila na inicijalno neporušeno stanje. Smatra se da nakon postavljanja treba proći vremenski period od 6-12 mjeseci (Johnson et al., 2001), ali su u literaturi zabilježeni i dulji vremenski odmaci (do 17 mjeseci) (Pritchard et al., 2008).



Slika 6 Postavljanje minirizotrona. (A) Platforma za bušenje tla; (B) Postavljanje minirizotrona pod kutem od 45° u blizini redova kukuruza; (C) Gornji krajevi minirizotrona u šećernoj repi prekriveni PVC kapicama i zabrtvljeni gumenim čepovima; (D) Mehanička ručica za pocizioniranje kamere; (E) Snimke korijena šećerne repe *Beta vulgaris* var. *saccharifera* nastale pomoću minirizotrona (600 dpi) na konstantnoj dubini (0,9 m) tijekom (E) 79 dana; (F) 92 dana; (G) 108 dana i (H) 176 dana nakon sjetve (Vamerali et al., 2012).

Problemi i ograničenja

Glavno ograničenje tehnike prozora za promatranje korijenja je činjenica da je on statičan i predstavlja ograničeni, dvodimenzionalni (2D) prostor koji ne daje podatke o ukupnom produljenju korijenova sustava. Iako je moguće neporušeno uzorkovanje duž pojedinog korijenja, eksperimentalni postav nužno ne predstavlja potpuno neporušen sustav jer se uvjeti duž 2D ravnine za promatranje (temperatura, svjetlo, raspodjela vlage, koncentracija otopljenih tvari, redoks uvjeti) mogu razlikovati od uvjeta u neporušenim tlima. Općenito, tehnike prozora za promatranje i MR su teško primjenjive na kamenitom tlu (Thorup-Kristensen, 2006). MR nisu pogodni za određivanje arhitekture korijena zbog ograničenog prostora za promatranje. MR studije u šumskim sustavima su još uvijek rijetke u odnosu na poljoprivredno tlo gdje je lakše postaviti cijevi. Za pouzdane i reprezentativne rezultate potrebno je postaviti veliki broj MR cijevi. Iako se analiza snimaka brzo razvija, još uvijek postoje problemi vizualnog odijeljivanja korijenja od suvišnih predmeta i pozadine tla (Helmisaari and Brunner, 2006). Uobičajeno ograničenje MR tehnike predstavljaju poteškoće prilikom osiguravanja dobrog kontakta između cijevi i tla (Johnson et al., 2001). U mnogim tipovima tala stvaraju se praznine na pojedinim mjestima duž cijevi, stvarajući umjetne uvjete za rast korijena. Ovaj problem se pogoršava sa povećanjem dubine bušenja i korištenjem strojnog bušenja. Uz već navedene poteškoće, najozbiljnije ograničenje MR tehnike su inicijalni hardverski i softverski troškovi, te vremenski odmak potreban da se dinamika korijena i tla vrati na stabilne uvjete nakon postavljanja cijevi. Dok su troškovi rada za postavljanje cijevi i snimanje relativno umjereni, sama analiza snimka može biti vrlo dugotrajna (Maeght et al., 2013).

3.1.1.2 Laboratorijski uvjeti

Studije u laboratorijskim uvjetima pružaju mogućnost za istraživanje karakteristika rasta korijena u kontroliranom okolišu. Za procjenu svojstava rizosfere biljke se trebaju uzgajati u odgovarajućim sustavima za rast, nakon čega se može uzorkovati rizosferno i okolno tlo te izmjeriti pojedine parametre. U laboratorijskim uvjetima često se koriste hidroponski ili aeroponski sustavi³ za rast biljaka jer se rast i morfologija korijena mogu pratiti bez pozadinske smetnje (Bucher, 2006). Međutim, u odsutnosti čvrstih supstrata rast i morfologija korijena mogu biti znatno promijenjeni (Neumann et al., 2009). Prilikom proučavanja učinaka nastalih pod djelovanjem korijena obično se susreću sustavi koji pojednostavljaju strukturu tla

³ Sustavi za uzgoj biljaka gdje se hranjive tvari dovode do korijenovog sustava u obliku fino raspršene maglice hranjive otopine.

i geometriju korijena. Ne postoji nomenklatura za takve sustave. Npr. rizotroni i rizoboksovi (vidi naredna poglavlja) se često koriste za slične vrste sustava plosnatog rasta u kojima biljke formiraju kvazi 2D korijenov sustav (Luster et al., 2009). Rizotron i rizoboks sustavi mogu se svrstati u grupu kontejnera (kutije i cijevi) koji se koriste za direktno promatranje rasta korijena u laboratorijskim uvjetima. Izrađeni su od stakla ili pleksiglasa (3-6 mm), različitih su dubina i promjera, te ispunjeni pogodnim supstratom za rast. Kontejneri mogu biti opremljeni mjernim instrumentima poput mikrosenzora za procjenu pH ili redoks potencijala (Slika 7C) (Polomski and Kuhn, 2002; Wenzel, 2014), mikro usisnih čašica za prikupljanje otopine tla, te reflektometrijskih senzora za mjerenje sadržaja vode u tlu (Fitz et al., 2006). U sljedećim poglavljima opisani su glavni dizajni kontejnera za rast koji omogućuju širok raspon istraživanja, a uključuju sustav lončanica, rizoboks i rizotron sustav, te rizotest.

Sustavi za rast gdje je korijenje u direktnom kontaktu s tlom

U ovu kategoriju pripadaju studije koje uključuju eksperimente s lončanicama (engl. pot) i stupcima (engl. column). Za odvajanje rizosfernog od okolnog tla predloženo je nekoliko postupaka temeljenih na tresenju ili ispiranju čestica tla koje se drže za korijen (Liu et al., 2004). Prvo se korijenov sustav, zajedno sa česticama tla koje se drže za korijen, pažljivo ukloni iz tla. Tresenjem korijenovog sustava 5 min. u vodi dobiva se rizosferno tlo (Naim, 1965). Turpault definira okolno tlo, rizosferno tlo (ono koje se spontano odvaja prilikom sušenja korijenovog sustava) i međuprostor rizosfere (onaj koji otpadne tresenjem osušenog korijenovog sustava) (Turpault, 2006). Drugi autori definiraju okolno tlo kao ono koje otpadne kada se protrese korijenov sustav, a rizosferno tlo je samo ono koje je naknadno uklonjeno četkanjem (Yanai et al., 2003).

Korištenje ovih konvencionalnih tehnika teška je zadaća i gotovo uvijek rezultira eksperimentalnim artefaktima od oštećenog i nepotpuno odvojenog korijenja te korijenovih dlačica, što može dovesti do grešaka u analizi rizosfernog tla (Norvell and Cary, 1992). Budući da tekstura tla i vlaga u tlu snažno utječu na količinu tla koje se drži za korijenov sustav prilikom vađenja iz tla, rezultate različitih eksperimenata treba usporediti s oprezom. Ovi parametri također imaju utjecaj na količinu tla koje otpadne prilikom tresenja korijenovog sustava kao i na količinu tla koja ostaje priljepljena za korijenje nakon postupka tresenja. Glavni nedostatak Turpault postupka je da se tresenjem osušenog korijenovog sustava ne može ukloniti svo tlo koje se pridržavalo za korijen. Stoga je, za razliku od postupka ispiranja, teško postići kvantitativne rezultate. S druge strane, ispiranje korijenovog sustava vodom mijenja kemijski i fizikalni status rizosfernog tla, tako da izbor najbolje tehnike uvelike ovisi

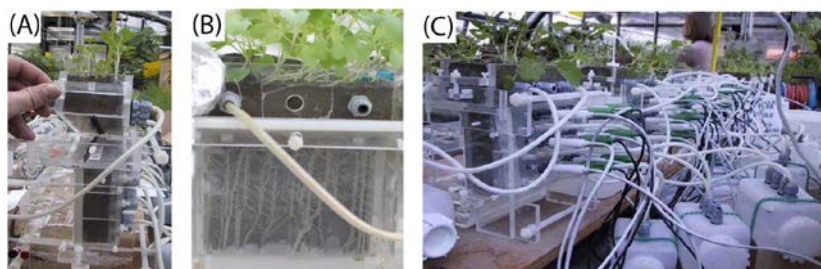
o cilju pojedinog eksperimenta (Göttlein, 2006). Općenito, u eksperimentima koji koriste lončanice ili stupce i tlo kao supstrat za rast biljke moguće je potpunije uklanjanje korijenovog sustava iz tla u odnosu na poljske uvjete, ali treba računati da su karakteristike rasta korijena pod utjecajem porušene strukture tla, razlika u temperaturi pojedinih zona korijena, distribucije vode u tlu, redoks potencijala i ograničenog volumena za zakorijenjivanje u lončanicama (Neumann et al., 2009). Ipak, eksperimenti kod kojih se koriste lončanice ili stupci pružaju najjednostavniju razliku između rizosfernog i okolnog tla (Oburger and Schmidt, 2016).

Sustavi za rast koji koriste membrane za razdvajanje odjeljaka

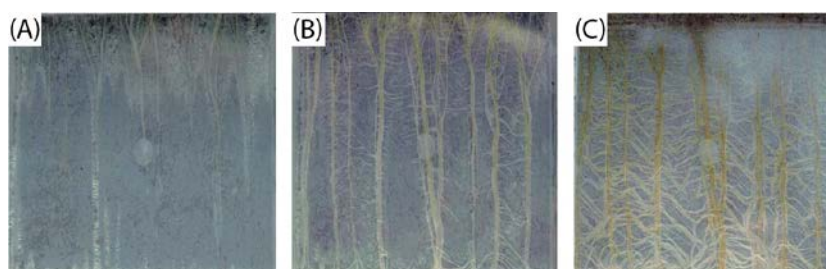
Nedestruktivna mjerenja rasta korijena u laboratorijskim uvjetima provode se u rizotronima ili rizoboksovima (Polomski and Kuhn, 2002). Osnovni rizoboks sustav izrađen je od PVC-a što omogućuje promatranje korijena. Ovisno o biljnoj vrsti i razvojnoj fazi koja se proučava, dostupne su različite veličine rizoboksova, od onih koji sadrže količine tla od nekoliko stotina grama pa sve do 80-100 kg (Neumann, 2006a). Razvoj korijena duž prozora za promatranje (Slika 8) može se pratiti pomoću kamere u redovitim vremenskim intervalima. Međutim, izravna digitalna analiza fotografskih snimaka korijena u tlu još uvijek je često komplicirana zbog nedovoljne sposobnosti digitalizacijskih softvera za eliminacijom pozadine. Stoga se rast korijena još uvijek najčešće mjeri pomoću crteža korijenovog sustava na prozirnim folijama nakon čega slijedi digitalizacija. Analizom snimaka pomoću prikladnog softvera moguće je generirati kvantitativne podatke o arhitekturi i dinamici rasta korijena (Neumann et al., 2009). Analizom video snimaka nedestruktivno su zabilježene morfološke karakteristike korijenja poput promjera finog korijenja, duljine i gustoće korijenovih dlačica (Haase et al., 2007b). Predmet rizoboks studija su uglavnom mlade biljke ili jednogodišnje biljne vrste. Npr. karakterizirana je arhitektura i rast korijena mladog atlantskog cedra *Cedrus atlantica* u rizoboksu kao funkcija ishrane dušikom i ektomikroiznom inokulacijom (Boukcim et al., 2006). U nekim slučajevima rizoboks studije provedene su i na starijim stablima, npr. prilikom procjene mikrobiološke aktivnosti u rizosferi voćnih vrsta (Aviani et al., 2006).

U literaturi su opisani rizoboks sustavi različitog dizajna, ali zajednička im je karakteristika korištenje poroznih mrežica ili membrana za odvajanje odjeljka u kojem se nalazi tlo i korijenje (ili samo korijenje) od odjeljka s rizosfernim tлом (Slika 9) (Gahoonia and Nielsen, 1991; Kuchenbuch and Jungk, 1982; Wenzel, 2014; Youssef and Chino, 1988). U rizoboks sustavima razvija se planarni tepih korijenja na površini membrane koja ograničava rast korijena te je moguće uzorkovati rizosferno tlo na točno određenoj udaljenosti

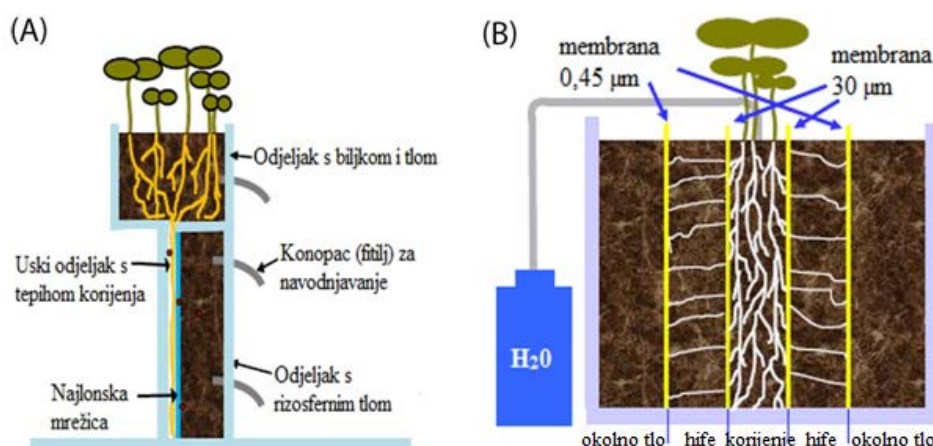
od korijena, u visokoj prostornoj rezoluciji. Neovisno o tome radi li se o horizontalnom (Wenzel et al., 2001) ili vertikalnom (Bravin et al., 2010; Chaignon et al., 2002) rizoboks sustavu korijenove dlačice mogu, ali i ne moraju prodrijeti u odjeljak s tlom što ovisi o veličini pora mrežice ili membrane. Naime, veličina pora od 20-30 μm dopušta prodiranje korijenovih dlačica i mikoriznih gljiva u susjedne odjeljke dok se veličina pora od 0,45 μm obično upotrebljava za ograničavanje rasta korijenovih dlačica i hifa gljiva (Li et al., 1991).



Slika 7 Rizoboks sustav u laboratoriju. (A) Uski otvor/odjeljak rizoboksa u koji prodire korijen; (B) Razvijeni korijen uljane repice *Brassica napus* u rizoboksu; (C) Rizoboks sustav sa senzorima za mjerenje pH i redoks potencijala (Wenzel, 2014).



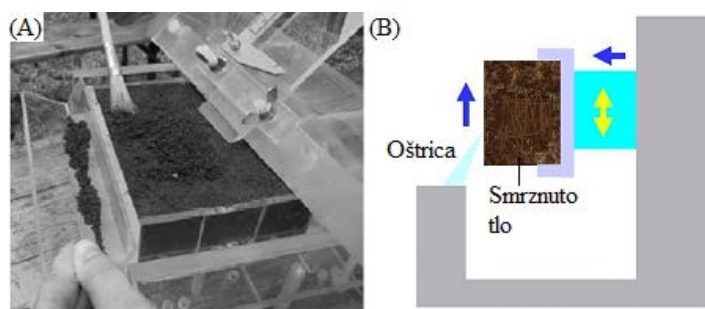
Slika 8 Promjene u distribuciji korijena uljane repice *Brassica napus* tijekom rizoboks eksperimenta. (A) Drugi dan; (B) Peti dan; (C) Osmi dan nakon prodiranja korijena u uski otvor/odjeljak (Wenzel et al., 2001).



Slika 9 (A) Shematski prikaz rizoboks sustava; (B) Shematski prikaz rizoboksa koji koristi membrane za odvajanje odjeljaka (Wenzel, 2014). Preuredila D. Erić, 2016.

Za istraživanje biogeokemijskih gradijenata potrebno je uzorkovati (rizosferno) tlo iz rizoboks sustava, što se postiže tehnikama rezanja (engl. slicing techniques). Takve tehnike zahtijevaju sustav rasta poput rizoboksa koji omogućuje razvoj tepiha korijenja. Nakon prestanka eksperimenta odjeljak s tлом može se zamrznuti i narezati na tanke ($<0,5\text{--}1\text{ mm}$) slojeve paralelne s ravninom korijena koristeći mikrotom⁴ (Slika 10B). Svaki sloj odjeljka s tлом može se analizirati kao složeni uzorak ili se može podijeliti na poduzorke koji se razlikuju u udaljenosti od donjeg dijela odjeljka s tлом i korijenjem. To omogućuje usporedbu rizosfernog tla povezanog s korijenjem različite starosti i aktivnosti (Wenzel et al., 2001). Tlo se obično zamrzava koristeći tekući dušik, a zatim pomoću mikrotoma reže na različitim udaljenostima od tepiha korijenja (Gahoonia and Nielsen, 1991), čime se dobivaju tanki presjeci (isječci) smrznutog tla za analizu. Postupkom zamrzavanja tla izbjegava se razmazivanje tla tijekom rezanja mikrotomom. Tlo može izmijeniti svoja kemijska svojstva zbog zamrzavanja, pa je razvijen sustav koji omogućuje rezanje isječaka bez zamrzavanja tla (Slika 10A) (Fitz et al., 2003). Zamrzavanje tla ima prednosti kada se koriste mali sustavi za rast i tla s višim sadržajem gline, dok je sustav bez zamrzavanja tla praktičniji za upotrebu kod većih sustava za rast i pjeskovitih tala, čime se izbjegava moguća promjena kemijskih i bioloških svojstava tla (Göttlein, 2006).

Sustavi temeljeni na modularnom dizajnu mogu biti korisni jer omogućuju jednostavnu promjenu eksperimentalnog postava (Fitz et al., 2006). Rizoboks sustavi mogu se modificirati korištenjem mrežica ili membrana čime se dobiva više odjeljaka unutar sustava.

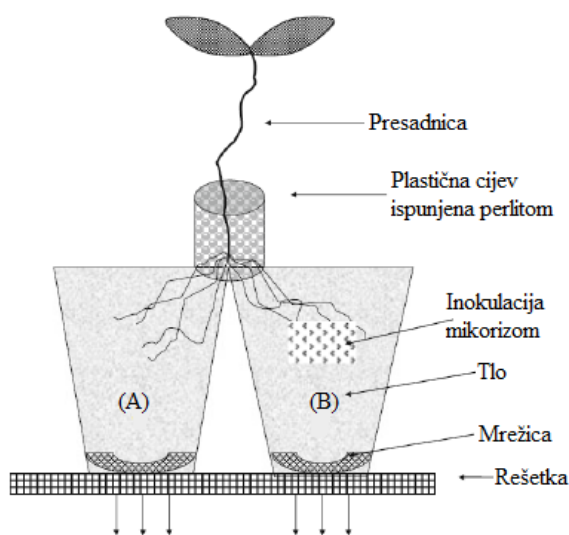


Slika 10 Odjeljivanje slojeva tla. (A) Sakupljanje slojeva nesmrznutog rizosfernog tla iz rizoboks sustava (Fitz et al., 2003); (B) Shematski prikaz rezanja smrznutog tla mikrotomom (Wenzel, 2014). Preuredila D. Erić, 2016.

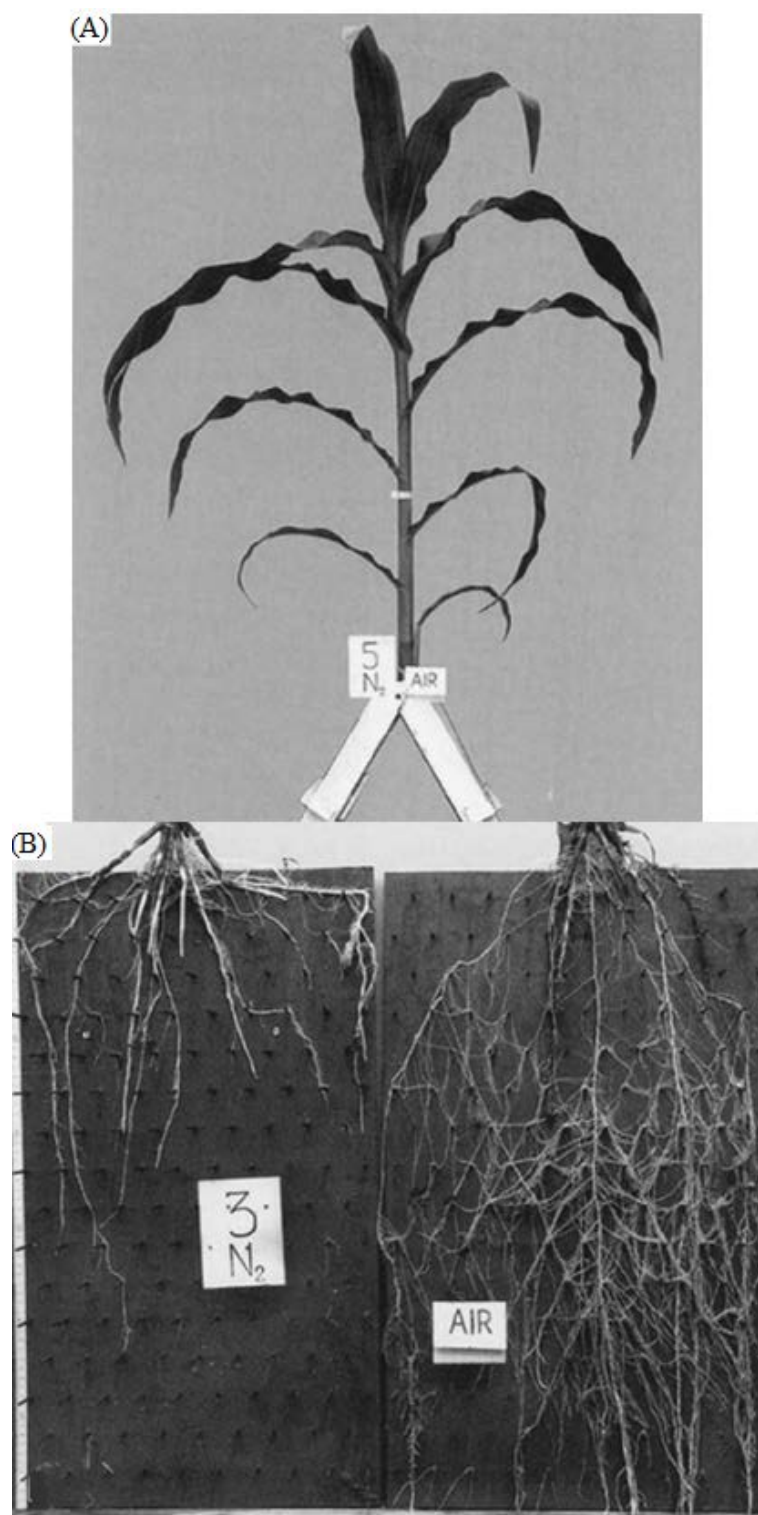
⁴ Uređaj pomoću kojega se dobivaju tanki (do $1\text{ }\mu\text{m}$) presjeci za istraživanje.

Na taj način mogu se proučavati učinci fitoremedijacije kadmija iz tla (Milas, 2012) ili učinci mikorizne kolonizacije na nabavljanje hranjiva (Hawkins and George, 1999).

Za pojedine eksperimentalne tretmane mogu se koristiti razdvojene kutije (engl. split boxes) u kojima se različiti dijelovi korijenovog sustava vode u odvojene zone. Takve zone mogu biti odvojene PVC-om, najlonskim mrežicama ili membranama odgovarajuće veličine pora. Cilj takvog razdvajanja je spriječiti rast korijena u druge odjeljke, ali omogućiti slobodan pristup za hife gljiva i sl. (Polomski and Kuhn, 2002). Sustav razdvojenih kutija obično se koristi za praćenje učinaka simbioze korijena na njegov razvoj, sa inokuliranim i neinokuliranim odjeljcima koji sadrže korijenje zajedničkog korijenovog sustava. Ovim pristupom proučavani su učinci inokulacije korijena soje *Glycine max* kvržičnim bakterijama (Hacin et al., 1997), rast i mikorizna kolonizacija korijena graha *Phaseolus vulgaris* u naftom onečišćenom tlu (Slika 11) (Langer et al., 2010), te korijen kukuruza *Zea mays* u anoksičnim i aeriranim uvjetima (Slika 12) (Smit et al., 2000a). Ipak, sustavi razdvojenih kutija nužno ne omogućuju neovisna promatranja u različitim odjeljcima s korijenom, budući da postupci u jednom odjeljku mogu utjecati na drugi odjeljak (Neumann et al., 2009).



Slika 11 Eksperimentalni dizajn sustava razdvojenih kutija za praćenje rasta korijena graha *Phaseolus vulgaris* nakon inokulacije mikorizom u naftom onečišćenom tlu (Langer et al., 2010). Preuredila D. Erić, 2016.



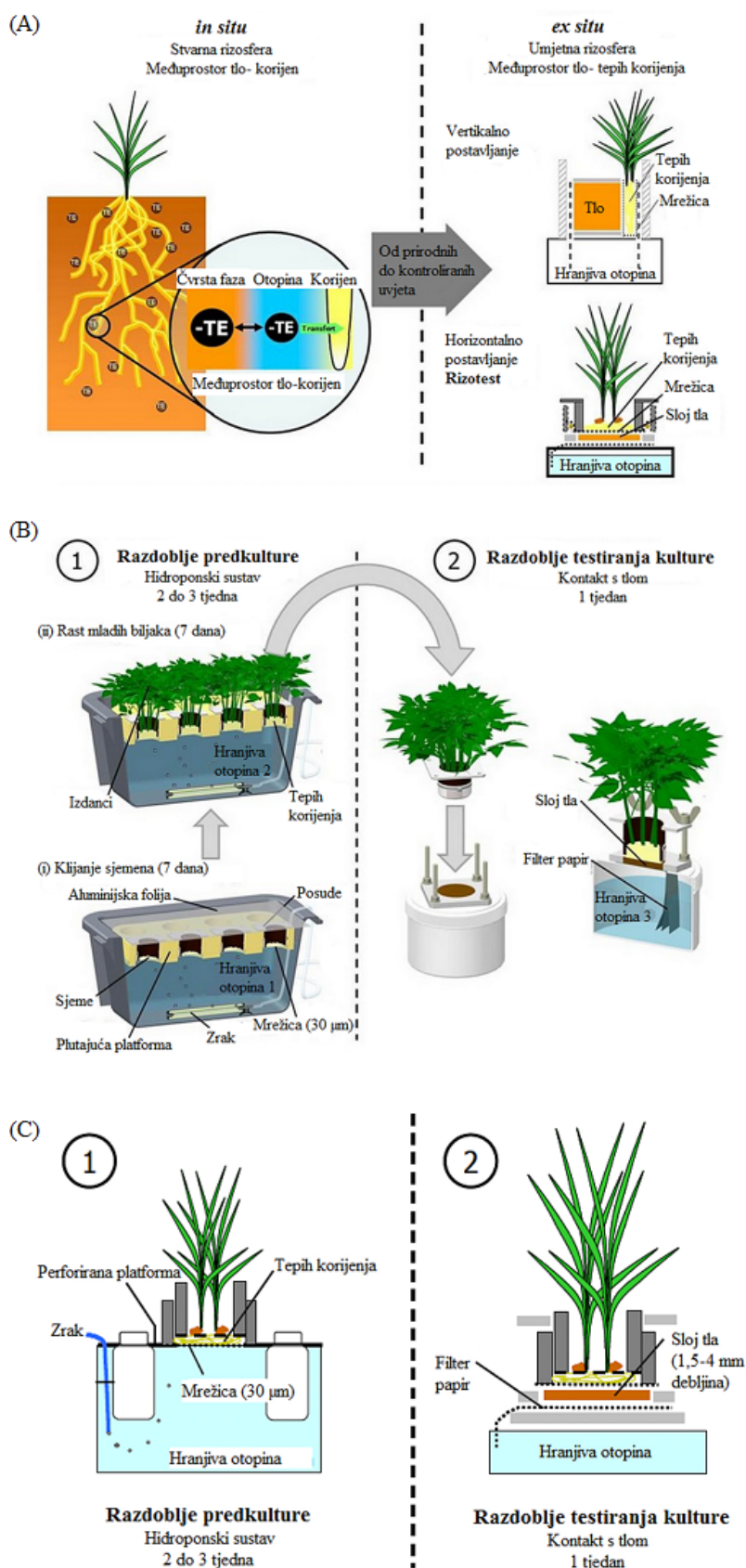
Slika 12 (A) Rizotron sustav razdvojenog korijenja; (B) polovice korijenovog sustava iste biljke kukuruza *Zea mays* rasle pod utjecajem zraka (aerirani uvjeti) i dušika (anoksični uvjeti) (Smit et al., 2000a).

Rizotroni su također sustavi za rast biljaka s akrilnim prozorom za promatranje dinamike rasta i razvoja korijena (Slika 13). Mnogo godina se uspješno koriste u istraživanju rizosfere. Velika prednost rizotrona je primjenjivost na razini pojedinog korijena. Rizotroni različite veličine postavljaju se pod kutem od 30°- 45° tijekom rasta biljke tako da se korijenov sustav formira duž donje ploče koja se može odvojiti od ostatka rizotrona (Neumann et al., 2009). Obično se upotrebljavaju kada se primjenjuju tehnike 2D snimanja (Oburger and Schmidt, 2016). Kao i kod rizoboks sustava, moguće je ukloniti prozor prilikom prikupljanja tla za analizu ili za primjenu indikatora koji koriste boje za vizualizaciju pH promjena nastalih pod djelovanjem korijena (Fitz et al., 2006).

Još jedan eksperimentalni pristup koji se zasniva na tehnici tepiha korijenja je rizotest (Bravin et al., 2010; Chaignon and Hinsinger, 2003). Tehnika tepiha korijenja prvi put je objavljena 1972. (Hsieh et al., 1972), razvijala se tijekom 1980-tih (Kuchenbuch and Jungk, 1982) i 1990-tih u smjeru osnovnih potreba istraživanja fizikalno-kemijskih procesa nastalih djelovanjem korijena i njegovog utjecaja na biodostupnost elemenata u tragovima. Rizotest se od početka 2000. godine koristi za procjenu rizika biodostupnosti elemenata u tragovima kod onečišćenih tala. Princip rada rizotesta sastoji se od odvajanja korijenja od tla upotrebom poliamidne mrežice sa porama promjera manjim od najfinijeg korijenja (nekoliko desetaka μm). Kako rastu, biljke razvijaju korijenov sustav u obliku tepiha na površini mrežice. Kontakt između tepiha korijenja i tla omogućuje izmjenu vode, hranjivih tvari i različitih molekula, tako da ovaj sustav nastoji, u određenoj mjeri, reproducirati interakcije koje se odvijaju u rizosferi (Slika 14A).



Slika 13 Rizotron sustav s akrilnim prozorom za promatranje dinamike rasta i razvoja korijena (Zgorelec, 2015).



Slika 14 Shematski prikaz rizotest sustava. (A) Rizotest sustav nastoji reproducirati interakcije koje se odvijaju u rizosferi; (B) Uzgojni ciklus sastoji se od 2 sukcesivne faze; (C) Princip rizotesta temelji se na stvaranju tepiha korijenja (CIRAD, 2014). Preuredila D. Erić, 2016.

Prednost ove tehnike je u jednostavnom i brzom sakupljanju rizosfernog tla i cijele biljke, a posebice cijelog korijenovog sustava, sa malo ili nimalo onečišćenja od čestica tla. Metodologija se sastoji od 2 sukcesivne faze rasta biljaka. Tijekom prve faze, tzv. razdoblja predkulture (engl. preculture period), biljke se od sjemena uzgajaju u hidroponskim uvjetima koji omogućuju adekvatan razvoj gustog planarnog tepiha korijenja i nadzemnih dijelova. U drugoj fazi, tzv. razdoblju testiranja kulture (engl. test culture period), biljke dolaze u kontakt sa tankim slojem tla (debljina 1-3 mm, masa 2-5 g) kroz otprilike tjedan dana (Slika 14B i C). S obzirom da se koristi tanki sloj tla, ono se već nakon nekoliko sati ili dana može smatrati rizosfernim tlom (Chaignon and Hinsinger, 2003). To je zanimljivo kada se upotrebljavaju radioizotopi jer količina kontaminiranog tla može biti svedena na minimum. Za opskrbu vodom i hranjivim tvarima tlo je preko filter papira povezano sa spremnikom hranjive otopine. Biljke (nadzemni dijelovi i korijen) se beru na kraju svake faze rasta. Dva parametra koja se koriste za procjenu biodostupnosti elemenata su njihova koncentracija i protok u nadzemnim dijelovima i korijenju (CIRAD, 2014). Ovom tehnikom koja koristi mali, jednostavni i jeftini uređaj moguće je lako procijeniti učinak mineralne ishrane biljaka mijenjanjem sastava hranjive otopine koja dolazi do tla i odjeljka s tepihom korijenja. Također je moguće procijeniti dostupnost hranjivih tvari na različitim tipovima tala i potencijal biljaka za nabavkom tih hranjivih tvari na način da se mjeri iscrpljivanje hranjivih tvari u rizosfernom sloju. Naravno, moguće je analizirati i učinke na mikrobne populacije u rizosferi (Neumann et al., 2009).

Iako je osnovni cilj rizotesta procjena biodostupnosti pojedinog elementa, npr. količine hranjiva koje biljka uzima iz tla, također mu je svrha omogućiti mjerenja utjecaja biljke na svojstva tla, posebice u blizini korijenja. Odvajanje korijenja od tla općenito predstavlja problem koji se ovdje nadilazi umetanjem pregrade u vidu membrane između tla i tepiha korijenja. Na taj način dolazi do fizičkog odvajanja (rizosfernog) tla i korijenja što omogućuje vrlo jednostavno sakupljanje korijenja na kraju eksperimenta. Glavna prednost rizotesta leži u njegovoj minijaturizaciji, tako da je moguće postaviti između 100 i 150 rizotest jedinica/ m² u komore za rast biljaka. Takvim pristupom može se testirati veliki broj različitih biljnih vrsta i tipova tla. Druga prednost rizotesta leži u relativno kratkom razdoblju rasta biljaka od 3 tjedna. Treća prednost odnosi se na mogućnost upotrebe rizotesta za veliki broj biljnih vrsta (testirano je oko 20 jednogodišnjih biljaka), te su provedena mjerenja 10-tak elemenata u tragovima, uključujući i neke radioizotope (Bravin, 2014). S obzirom na karakteristike rizotesta, on se može koristiti za rutinsku procjenu velikih setova uzoraka tla ili biljaka (CIRAD, 2014).

Problemi i ograničenja

Rizotron predstavlja jednostavan sustav koji omogućuje istraživanja na razini pojedinog korijena. Ovisno o cilju eksperimenta, to može predstavljati prednost, u usporedbi sa sustavima kod kojih se stvara tepih korijenja, jer se apikalne i bazalne zone korijena mogu odvojeno istraživati. Međutim, moguće je prikupiti samo ograničenu količinu rizosfernog tla što ograničava raspon parametara za kemijsku analizu. Također treba imati na umu da korijenje koje raste duž prozora za promatranje predstavlja 2D sustav u usporedbi s 3D rizosferom korijenja biljaka koje rastu u stvarnim poljskim uvjetima. Zapravo sve navedene metode pružaju pojednostavljenu geometriju rizosfere. Kod rizoboks i rizotest sustava rizosferno tlo je pod utjecajem gustog tepiha korijenja, stoga su izmjereni parametri rezultat apikalnih i bazalnih aktivnosti korijena, dok se prostorna varijabilnost duž osi korijena ne može mjeriti. Štoviše, visoka gustoća tepiha korijenja može dovesti do nerealistično visokih razina akumulacije eksudata korijena i povezanih kemijskih promjena rizosfernog tla i na taj način do precjenjivanja rizosfernih učinaka (Fitz et al., 2006). Zbog praktičnih razloga, metodologija je uglavnom ograničena na proučavanje brzorastućih vrsta koje brzo stvaraju tepihe aktivnog korijenja (Neumann, 2006a). Biljke se u rizotron ili rizoboks sustavima mogu uzgajati samo određeno vrijeme (Helmisaari and Brunner, 2006). Drugo ograničenje vezano je uz činjenicu da je tlo izravno povezano sa spremnikom u kojem se nalazi hranjiva otopina (ili voda), tako da je sadržaj vode u tlu iznad poljskog vodnog kapaciteta i blizu saturacije. Ovisno o cilju istraživanja rizosfere, izbor materijala sustava za rast može uvelike utjecati na rezultat. Dobro je poznato da akrilni materijal praktički ne adsorbira⁵ anorganske ione, dok vrlo brzo adsorbira i apsorbira⁶ organske polutante. Pokazalo se da najlonske mrežice i membrane koje se koriste za ograničavanje rasta korijena adsorbiraju zanemarive količine metala i značajne količine organskih spojeva (npr. fenola i proteina) (Fitz et al., 2006).

⁵ Proces vezanja čestica **na** površinu tijela.

⁶ Proces upijanja čestica jedne tvari **u** drugu.

Primjer iz vlastite prakse: rizoboks vs. rizotest eksperiment

Rizoboks i rizotest eksperiment, kao i analiza uzoraka, provedeni su na Zavodu za istraživanje tla, Universität für Bodenkultur u razdoblju od 2. listopada do 13. prosinca 2013. godine kao dio praktičnog modula „Ecology and Management of the Rhizosphere in Ecological Engineering“ (Wenzel W., Puschenreiter M., Oburger E.) s ciljem upoznavanja različitih eksperimentalnih pristupa koji se koriste za procjenu promjena nastalih u rizosferi. U oba eksperimenta kao testni biljni materijal korištena je uljana repica *Brassica napus*. Eksperimentalno tlo klasificirano kao černozem (Nestroy et al., 2011) sakupljeno je na Moravskom polju u blizini Beča.

Rizoboks eksperiment

Cilj je bio utvrditi promjene pH vrijednosti tla i biodostupnost kalija (K) i fosfora (P) u rizosferi uljane repice u visokoj prostornoj rezoluciji. Eksperimentalni dizajn uključivao je rizoboks sustav u kojem biljke rastu u odjeljku s tlom koji na dnu ima uski otvor. Takav dizajn omogućuje prodiranje korijena u posebni odjeljak. Za odvajanje rizosfernog od okolnog tla i tepiha korijenja postavljena je membrana (30 µm). Nakon 28 dana biljke su izvađene (nadzemni dio odrezan je škarama, dok je tepih korijenja formiran na membrani ispran ultra čistom vodom i stavljen na sušenje). Tlo je sakupljeno na različitim udaljenostima od tepiha korijenja (Tablica 3) koristeći metodu prema Fitz. et al (2003) (Slika 15).

Tablica 3 Uzorkovanje rizosfernog tla rezanjem

Sloj	Klasifikacija tla	Udaljenost od tepiha korijenja (mm)
1	Rizosferno	0-1
2	Rizosferno	1-2
3	Rizosferno	2-3
4	Rizosferno	3-4
5	Okolno	4 >



Slika 15 Tijek rizoboks eksperimenta. (A) Sastavljanje rizoboksa; (B) Sakupljanje slojeva tla na različitoj udaljenosti od korijenja; tepih korijenja ispran s membrane; (C) Rizoboksovi u stakleniku; pripreme za ekstrakciju tla i digestiju; (D) Postavljanje eksperimenta u 3 ponavljanja.

Rizotest eksperiment

Cilj je bio utvrditi na koji način opskrba biljaka različitim oblicima dušika (NH_4^+ vs. NO_3^-) utječe na promjene pH u rizosferi i dostupnost K i P. Sjeme uljane repice je sterilizirano i stavljeno izravno u cilindre na dnu zatvorene 30 μm mrežicom. Mrežica je predstavljala fizičku barijeru između korijenja i hidroponske otopine. Cilindri za rast su umetnuti u plutajuće platforme smještene u 2 spremnika s otopinom za klijanje. Spremnici su prekriveni aluminijskom folijom radi sprječavanja ulaska svjetla (2 dana) (Slika 16A). Nakon tjedan dana otopina za klijanje zamijenjena je hranjivom otopinom; u jednom spremniku nalazio se NH_4^+ kao izvor dušika, a u drugom NO_3^- (Slika 16B). Na početku eksperimenta tlo je inkubirano otopinom za inkubaciju koja sadrži NH_4^+ i NO_3^- , te saturirano do 70 % maksimalnog vodnog kapaciteta. Biljke su u hidroponskom sustavu ostale 2 tjedna nakon čega su stvorile dobro razvijeni tepih korijenja (razdoblje predkulture). Zatim su premještene na rizotest naprave gdje su došle u kontakt s tankim slojem tla (5 g tla po rizotest napravi) (Slika 16B i C). Postavljeno je 4 tretmana (NH_4^+ , NO_3^- , sa biljkama, bez biljaka - kontrola) uz 4 ponavljanja, ukupno 16 rizotest naprava. Nakon tjedan dana kontakta tlo je smatrano rizosferom (razdoblje test kulture). Kemijske promjene u rizosferi mjerene su u odnosu na kontrolno tlo (okolno tlo), inkubirano na isti način, ali bez biljaka (Slika 16D).



Slika 16 Tijek rizotest eksperimenta. (A) Sterilizacija sjemena, stavljanje sjemena u cilindre na dnu zatvorene mrežicom, spremnici prekriveni alufolijom do klijanja; (B) Cilindri sa biljkama u plutajućim platformama 2 spremnika ispunjenog hranjivom otopinom (NH_4^+ i NO_3^-), određivanje količine tla za rizoboks napravu, kontakt biljaka s tlom; (C) Razvijeni tepih korijenja, priprema biljnog materijala za analizu, rezultati ICP-OES analize i $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ mjerenja; (D) rizotest naprave i kontrola (bez biljaka).

Analiza

Digestija je korištena za određivanje koncentracije K i P u biljnom materijalu (nadzemni dio i korijenje). Ekstrakcijom tla ultra čistom vodom (omjer tlo:otopina=1:5) određene su K i P koncentracije u otopini tla, te $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ u eksperimentalnim uvjetima kod rizoboks eksperimenta. Kod rizotest eksperimenta tlo je ekstrahirano otopinom prethodno korištenom za inkubaciju tla ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ u slučaju NH_4^+ i $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ u slučaju NO_3^-). Za detekciju kalija korišten je ICP-OES, dok je analiza fosfora provedena na fotometru. Glavna saznanja proizašla iz rizoboks i rizotest eksperimenta nakon statističke analize podataka kratko su sažeta u Tablici 4.

Tablica 4 Glavna saznanja rizoboks i rizotest eksperimenta nakon statističke analize podataka u Excelu

Rizoboks saznanja	Rizotest saznanja
Nema značajne razlike u $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ vrijednosti rizosfernog (8,24 za 1. sloj) i okolnog tla (8,45).	Nema značajne razlike u $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ vrijednostima tla između biljaka koje su koristile NH_4^+ i onih koje su koristile NO_3^- .
Nije utvrđena jasna veza između $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ i dostupnosti K i P.	Nema značajne razlike u usvajanju kalija u oba tretmana.
Prosječna koncentracija K i P u biljnom materijalu bila je ispod referentnih vrijednosti. Radi li se o deficijenciji?	Veće koncentracije P u nadzemnim organima biljaka s NH_4^+ ishranom. Rezultati vezani uz biomasu ukazuje na jači odgovor biljaka na ishranu NO_3^- .

Nedostatak odgovarajuće interpretacije eksperimentalnih podataka posljedica je početničkih studentskih grešaka. One se odnose na nepouzdanosti u mjerenjima (problemi sa slijepim probama i referentnim materijalom), metodološka pitanja (analizirana dva od tri rizoboks sustava), te previše ruku prilikom sakupljanja slojeva tla. Ipak, neka saznanja dosljedna su očekivanjima. Na koji način oblik ishrane dušikom može utjecati na pH? Poznato je da je korijenje biljaka odgovorno za znatne promjene pH u rizosferi. One uglavnom proizlaze iz otpuštanja H^+ ili OH^-/HCO^- iona kao protuteže višku kationa ili aniona koji ulaze u korijen. U tom smislu dušik ima važnu ulogu jer ga većina biljnih vrsta usvaja u najvećoj mjeri, u obliku amonij ion-a (NH_4^+ , kation) ili nitrata (NO_3^- , anion). Očekuje se da biljke koje se u ishrani oslanjaju na nitratni oblik dušika otpuštaju OH^- i potaknu alkalizaciju rizosfere. S druge strane, biljke koje se oslanjaju na amonij ion otpuštaju H^+ i izazivaju zakiseljavanje (acidifikaciju) rizosfere (Hinsinger, 1998). Promjene pH vrijednosti utječu na topljivost pojedinih elemenata i njihovu biodostupnost. Zabilježeno je da uljana repica može zakiseliti

rizosferu, padom pH vrijednosti s 6,2 na 4,5 (Grinsted et al., 1982). Vrijednost pH u oba eksperimenta nije bila osobito pogođena aktivnostima korijena. Mala promjena pH ne označava odsutnost protona u rizosferi, već se tumači kao posljedica potrošnje protona za puferske reakcije u tlu. Eksperimentalno tlo klasificirano je kao černo zem, a prethodnim istraživanjima utvrđeno je da sadržaj karbonata iznosi 170 g kg^{-1} (Wenzel et al., 2001). Stoga se može zaključiti da je pH vrijednost ostala nepromijenjena zbog velikog puferskog kapaciteta tla.

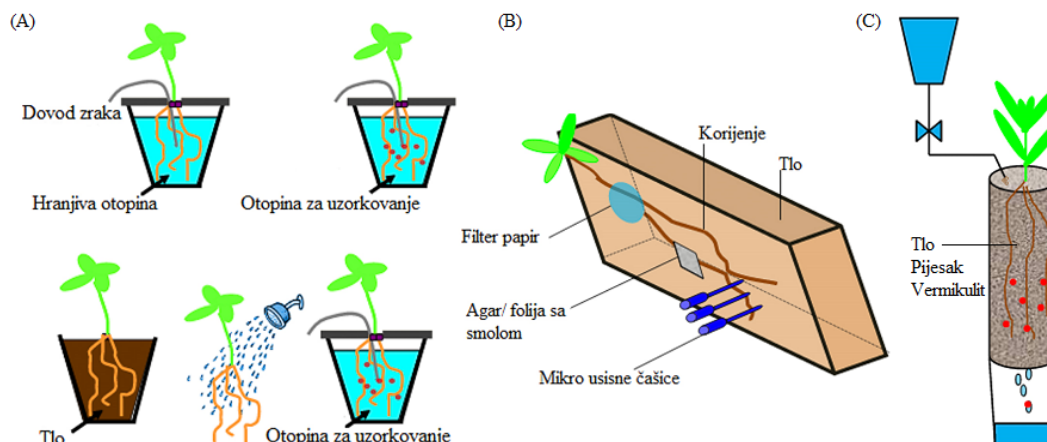
Zaključno, rizoboks je koristan alat za proučavanje rizosfere u visokoj prostornoj rezoluciji, uz jednostavno odvajanje svih komponenti (rizosferno tlo, okolno tlo, korijenje). Rizotest pak pruža standardizirane uvjete (kojima se jednostavno manipulira) rasta biljaka. Iako uljana repica brzo stvara gusti tepih korijenja, neke druge biljne vrste nisu tako dobro prilagođene, što se smatra ograničenjem. Rizotest uređaji su mali, pružaju brze rezultate, a korijenov sustav je lako dostupan. Međutim rizotest ne pruža istu prostornu rezoluciju koja se može postići korištenjem rizoboks sustava.

3.1.2 Sakupljanje eksudata korijena

Eksudati korijena definiraju se kao organski spojevi koje otpušta neoštećeno korijenje, za razliku od rizodepozicije gdje organske spojeve otpušta i oštećeno i neoštećeno korijenje (Neumann and Römhild, 2007). Sakupljanje eksudata korijena teška je zadaća zbog složene prirode organskih spojeva, ali je preduvjet za daljnje analize. Iz tog se razloga za sakupljanje često koriste pojednostavljeni pristupi poput hidroponskih sustava. Vjerovatno najlakši način sakupljanja eksudata korijena je ispiranje korijena otopinom za hvatanje eksudata. Cijeli proces se odvija u hidroponskim sustavima ili čvrstim supstratima za rast biljaka poput vermikulita, a samo u posebnim slučajevima u tlu. Tehnika se temelji na hvatanju eksudata korijena uranjanjem korijenovog sustava u otopinu koja hvata eksudate ili ispiranjem čvrstih supstrata istom otopinom (Slika 17A i C). Takav postupak u konačnici dovodi do razrijeđene otopine organskih spojeva koje je otpustilo korijenje tijekom razdoblja sakupljanja (Neumann, 2006b).

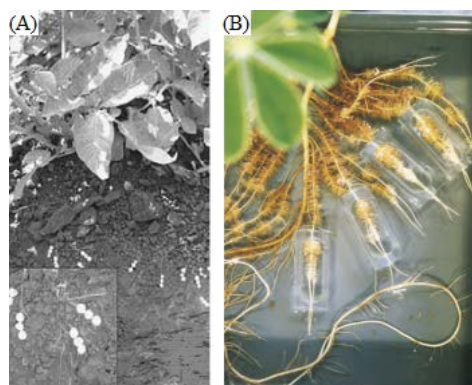
Međutim, u mnogim slučajevima, eksudati nisu homogeno raspodjeljeni duž korijena. Tehnike temeljene na ispiranju korijena ili perkolaciji sa otopinama koje hvataju eksudate mogu dati samo ograničene informacije o rizosfernim procesima koji često ovise o lokalnim koncentracijama eksudata korijena u rizosferi određene zone korijena (npr. apikalna zona

korijena, korijenove dlačice, proteidno korijenje). Spomenute tehnike pogodne su za laboratorijska istraživanja ukoliko nije potrebna prostorna rezolucija, npr. za demonstraciju

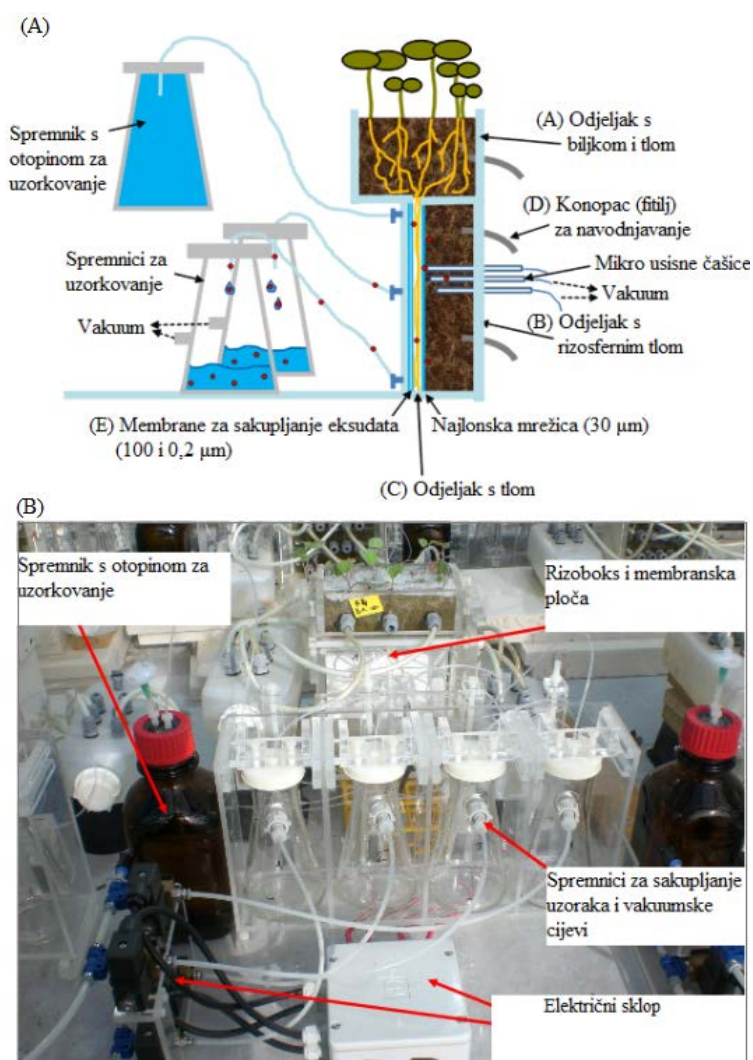


Slika 17 Neke od metoda za sakupljanje eksudata korijena. (A) Sakupljanje eksudata u hidroponskom sustavu i tlu metodom ispiranja (B) Rizoboks sustav u kombinaciji s mikroskopijom ili medijima za sorpciju (filter papir, agar, folije sa smolom) postavljenim na površinu korijena; (C) Metoda ispiranja kolumne ispunjene tlom, pijeskom ili vermikulitom radi sakupljanja eksudata (Oburger, 2014). Prilagodila D. Erić, 2016.

osnovnih fizioloških reakcija povezanih s promjenama u eksudaciji korijena ili za kvantifikaciju ukupnog toka ugljika označavanjem pomoću izotopa. Za detaljnija istraživanja nužne su lokalizirane tehnike sakupljanja. One koriste različite medije za sorpciju (npr. agar, specijalne smole, staklena vlakna, filter papir, membranski filter ili folija) koji se postavljaju na površinu pojedinog korijenja ili zona korijena biljaka uzgajanih u rizoboksovima (Slika 17B), hidroponima ili čak prozorima za promatranje korijena u poljskim uvjetima (Slika 18A). Ove tehnike omogućuju ponavljajuća i nedestruktivna mjerenja s visokom prostornom rezolucijom tijekom duljeg vremenskog razdoblja (Neumann, 2006b). Nova metoda koja također omogućuje ponavljajuće i nedestruktivno sakupljanje nepromijenjenih eksudata koristi rizoboksove u kombinaciji s alatom za sakupljanje eksudata korijena (engl. root exudate collecting, REC) u vidu posebnih membrana za sakupljanje eksudata (Slika 19) (Oburger et al., 2013, 2014). U studijama eksudacije korijena kao biljka model često se koristi bijela lupina *Lupinus albus* zbog svoje sposobnosti otpuštanja ogromnih količina organskih kiselina i flavonoida čije je sakupljanje moguće pomoću kiveta (Slika 18B) (Phillips et al., 2008; Zhu, 2005). Nove alate za proučavanje lokaliziranog otpuštanja pojedinih eksudata u visokoj prostornoj rezoluciji nudi upotreba transgeničnih bakterija sa genima koji ukazuju na prisutnost specifičnih spojeva npr. svjetlosnim reakcijama ili reakcijama u boji (Darwent et al., 2003).



Slika 18 Sakupljanje eksudata korijena. (A) Primjena medija za sorpciju na površini korijenja prozora za promatranje korijenja u poljskim uvjetima (Neumann et al., 2009); (B) Sakupljanje eksudata proteidnog korijenja bijele lupine *Lupinus albus* rasle u uvjetima nedostatka fosfora korištenjem kivete (Zhu, 2005).



Slika 19 Rizoboks sustav u kombinaciji s novim alatom za sakupljanje eksudata korijena. (A) Shematski prikaz; (B) Eksperimentalni postav u laboratoriju (Oburger, 2014). Prilagodila D. Erić, 2016.

U literaturi je opisano i postavljanje mikro usisnih čašica (engl. micro-suction cups, MSC) (Slika 17B) koje se obično koriste za sakupljanje otopine tla (vidi poglavlje 3.1.3) (Shen and Hoffland, 2007), ali nisu pogodne za sakupljanje eksudata korijena budući da se organski spojevi lako raspadaju djelovanjem mikroorganizama zbog relativno dugog razdoblja sakupljanja. Ipak, uz određene mjere opreza, moguće je izbjeći mikrobnu degradaciju eksudiranih spojeva. Za lako razgradive organske spojeve (npr. šećeri i organske kiseline) utvrđeno je vrijeme poluraspada od nekoliko sati, pa se kratkim razdobljem sakupljanja (1-2 h) može umanjiti rizik od mikrobne degradacije (Neumann, 2006b).

Osim brze mikrobne razgradnje eksudiranih spojeva u otopini tla, glavni problem ovih tehnika predstavlja selektivna i brza adsorpcija pojedinih spojeva (npr. karboksilata, fenola, proteina) na matriks tla i površinu korijena (Neumann and Römheld, 2007). Hidroponski sustav uzgoja dopušta (relativno) jednostavno sakupljanje eksudata korijena, ali relevantnost dobivenih rezultata ostaje upitna u odnosu na poljske uvjete (Oburger and Schmidt, 2016). Kod biljaka koje se uzgajaju duže vremena često nije moguće održati sterilne uvjete te prisutnost mikroorganizama može utjecati na intenzitet eksudacije korijena (Kuijken et al., 2015). Struktura tla i sadržaj vode u tlu su odrednice obnavljanja eksudata i teško je razlikovati eksudate od drugih produkata rizosfere u otopini tla. Kratkotrajno označavanje izotopima može pomoći razlikovati eksudate korijena i mikrobne metabolite (Haase et al., 2007a). Sakupljanje eksudata korijena korištenjem tehnika ispiranja korijenovog sustava dobivaju se visoko razrijeđene otopine eksudata koje zahtijevaju određene korake koncentracije prije direktne analize. S druge strane, sakupljanje eksudata korijena korištenjem lokaliziranih tehnika obično rezultira malim volumenom uzorka što predstavlja ograničavajući faktor za daljnju analizu. Lokalizirano sakupljanje također može biti ograničeno niskom razinom vlage u tlu ili finim korijenjem (Neumann, 2006b). Tehnike i ograničenja sakupljanja eksudata korijena sažeto su prikazani u Tablici 5.

Tablica 5 Prednosti i ograničenja metoda sakupljanja eksudata korijena (Neumann et al., 2009; Oburger and Schmidt, 2016).

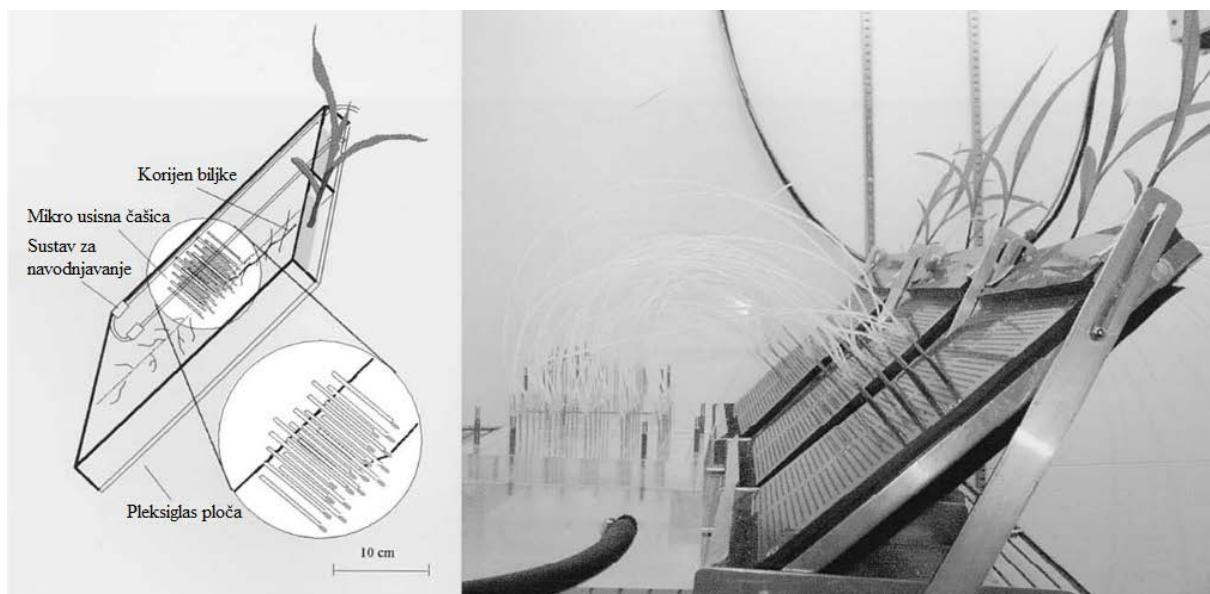
Metode	Mjerilo	Prednosti	Ograničenja	Primjenjivost na uzorke ^a	Primjenjivost u poljskim uvjetima
Rast i sakupljanje u hidroponskom sustavu	Pojedni segment korijena – korijenov sustav	Kontrolirani uvjeti kojima se lako maipulira (npr. dostupnost hranjiva/polutanata, mikrobna dekompozicija); bez interakcije s matriksom tla.	Umjetni ivjeti rasta; upitna usporedba s uvjetima u tlu.	Ne	Ne
Rast u tlu i sakupljanje u hidroponskom sustavu	Pojedni segment korijena – korijenov sustav	Biljke rasle u tlu u kombinaciji sa jednostavnom tehnikom sakupljanja eksudata korijena.	Potencijalni artefakti zbog oštećenja korijena tijekom iskapanja i pranja.	Da	Da
Rast u tlu i sakupljanje pomoću REC	Korijenov sustav	Rast biljaka u tlu uz nedestruktivno i višekratno uzorkovanje.	Polu-prirodni uvjeti rasta; složeno postavljanje.	Ne	Ne
Mediji za sorpciju	Korijenov sustav	Primjenjivost u poljskim uvjetima, hidroponskim i rizoboks sustavima.	Mali volumen uzorka, potencijalna adsorpcija eksudata na supstrat.	Da	Da
Reporterski marker geni	Korijenov sustav	Primjenjivost u poljskim uvjetima, hidroponskim i rizoboks sustavima.	Ograničenost na detekciju specifičnih spojeva, potencijalna adsorpcija eksudata na supstrat.	Da	Da

^a sonde za uzorkovanje s neporušenim tlom (sa ili bez korijenja)

Kratice: REC, root exudate collection.

3.1.3 Sakupljanje otopine rizosfernog tla

Korijenje biljaka utječe na kemijske karakteristike otopine rizosfernog tla usvajanjem iona i aktivnostima korijena poput eksudacije organskih kiselina (Marschner, 2011). Sustav za sakupljanje otopine tla na mikro razini su mikro usisne čašice. One predstavljaju moćan alat za istraživanje biogeokemijskih promjena u otopini rizosfernog tla u visokoj prostornoj rezoluciji ($\mu\text{L}/\text{mm}$) (Dessureault-Rompré et al., 2006; Oburger et al., 2013; Puschenreiter et al., 2005). Izrađene su od keramičkih kapilara različitog promjera (Göttlein et al., 1996), npr. usisne čašice promjera 3 mm pogodne su za prikupljanje otopine tla na određenim udaljenostima od korijena (Puschenreiter et al., 2005). Mikro usisne čašice se mogu postaviti na rizoboksove ili rizotrone (Slika 20), te u polje (Slika 21 i 22) nakon bušenja rupa na željenim pozicijama čime je omogućeno praćenje promjena kemijskih karakteristika otopine tla (Dieffenbach et al., 1997). Sustav mikro usisnih čašica uspješno se koristi za procjenu rizosfernih gradijenata (Slika 23) (Göttlein et al., 1999), posebice za velike anorganske katione i anione (Wang et al., 2001), anione organskih kiselina (Dessureault-Rompré et al., 2006) i metale u tragovima (Shen and Hoffland, 2007). Područje primjene usredotočeno je na proučavanje utjecaja korijenja drveća na glavne anorganske sastojke otopine tla na kiselim šumskim tlima. Međutim, nema očitog razloga zašto ova tehnika ne bi funkcionirala i na alkalnim tlima ili s biljkama koje nisu drveće (Göttlein, 2006).



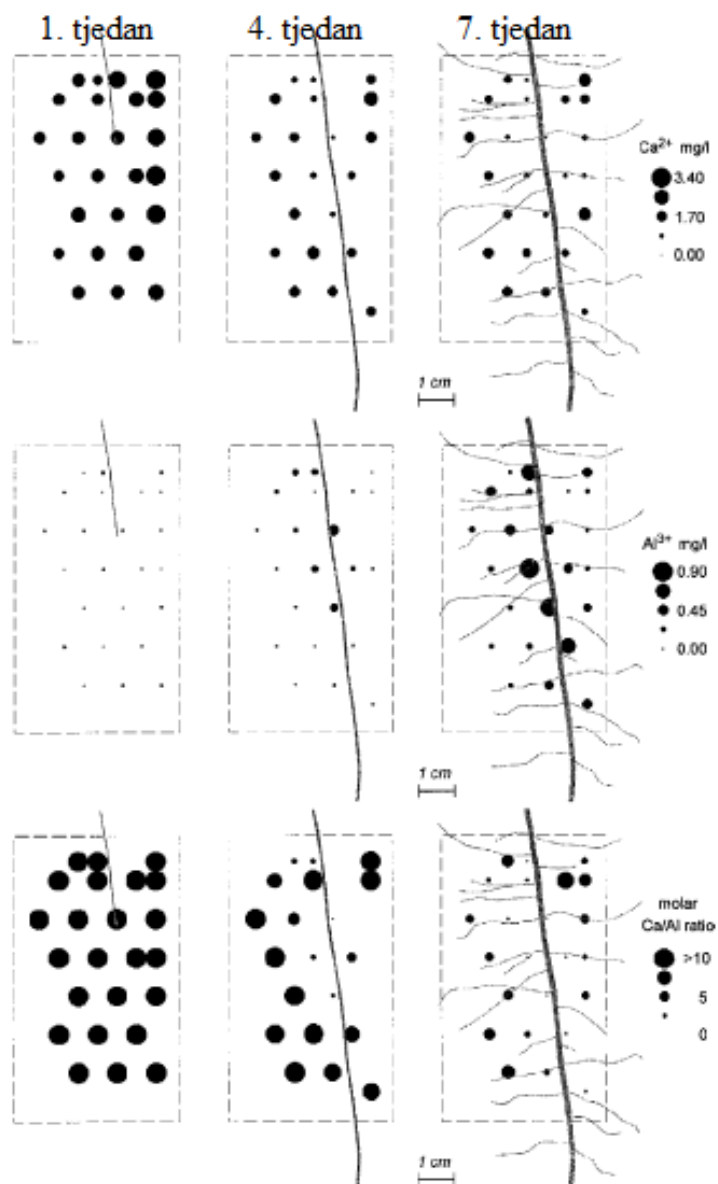
Slika 20 Shematski prikaz i fotografija rizotrona s nizom postavljenih mikro usisnih čašica (Wang et al., 2004). Preuredila D. Erić, 2016.



Slika 21 Sakupljanje otopine tla u polju pomoću mikro usisnih čašica, odnosno sustava za uzorkovanje koji se sastoji od keramičke porozne sonde smještene u tlo na željenoj lokaciji i dubini (Čidić et al., 2008).



Slika 22 Sakupljanje otopine tla u polju pomoću keramičkih mikro usisnih čašica pogodnih za sakupljanje iona poput nitrata, klorida, sulfata, natrija, bromida (Zgorelec, 2007).

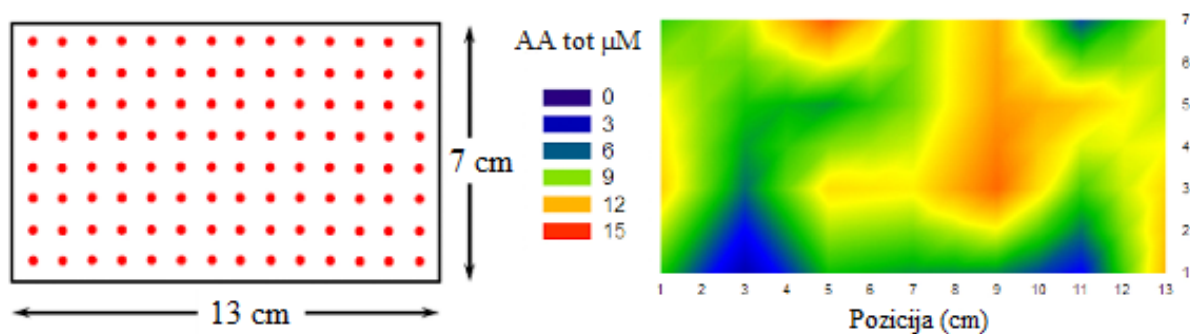


Slika 23 Vremenske promjene koncentracije Ca i Al, te omjera Ca/Al u rizosferi presadnica korijenja hrasta *Quercus robur*. Otopina tla sakupljana je u trodnevnim intervalima pomoću mikro usisnih čašica postavljenih na rizotron u obliku koordinatne mreže i analizirana kapilarnom elektroforezom (Göttlein et al., 1999). Preuredila D. Erić, 2016.

Sakupljanje otopine tla pomoću mikro usisnih čašica uvjetovano je kontaktom s matriksom tla, teksturom tla i vlagom u tlu. Ograničenje predstavlja sorpcija ili otpuštanje analita od strane sustava za sakupljanje otopine tla (Rais et al., 2006). Na pjeskovitim tlima sakupljanje otopine često je problem zbog niskog kapaciteta zadržavanja vode prilikom čega se javlja loš kontakt mikro usisne čašice s tlom. Kod zalijevanja odozgo sadržaj vode u tlu previše fluktuirá i stoga utječe na koncentraciju mjerenih organskih kiselina (Göttlein, 2006). Isto tako, filter materijal usisnih čašica može značajno promijeniti koncentraciju pojedinih elementata sakupljene otopine. Između različitih materijala koji se koriste za izradu usisnih čašica, najlonske membrane su pokazale najmanji utjecaj na koncentraciju teških metala i

arsena (Wenzel et al., 1997), dok su stakleni materijali superiorniji kada je riječ o organskim spojevima (Wessel-Bothe et al., 2000).

Otopina tla može se uhvatiti primjenom filter papira ili upijajuće membrane, što je metoda koja se uglavnom koristi za sakupljanje eksudata korijena ili enzima koje izlučuje korijen (Neumann, 2006b). U novom pristupu, uspješno su korištene mikrokapilare zajedno sa kapilarnom elektroforezom⁷ (engl. capillary electrophoresis, CE) i masenom spektrometrijom s induktivno spregnutom plazmom (engl. inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) za praćenje učinaka organskih kiselina na osiromašeni uranij u rizosferi bijele lupine *Lupinus albus* u mjerilu nL/μm. Bijela lupina poznata je po proteidnom korijenju koje izlučuje velike količine citrata u rizosferu kako bi se nosila sa nedostatkom fosfora (Dinkelaker et al., 1995), a pristup koji koristi staklene mikrokapilare μm dimenzija za uzorkovanje otopine izravno s površine filma individualnih čestica tla poznat je pod nazivom SiCSA (engl. single-cell sampling and analysis) (Tandy et al., 2013). Nedavno je mikrodijaliza uvedena kao nova metoda za uzorkovanje flukseva difuzije metala (Miró et al., 2010) i praćenje dušikovih spojeva u tlu (Slika 24 i 25) (Inselsbacher et al., 2011; Shaw et al., 2014). Prednost ove metode je minijturni dizajn koji omogućuje postavljanje s minimalnim smetnjama i vrlo lokalizirano sakupljanje pogodno za dimenzije rizosfere. Nedostatak je pak zahtjevna kalibracija uređaja i interpretacija rezultata (Tablica 6) (Shaw et al., 2014).



Slika 24 Rezultati praćenja flukseva dušika u tlu u visokoj prostornoj rezoluciji korištenjem mikrodijalize. Jasno je vidljiva različita koncentracija dušika među pojedinim pozicijama (Inselsbacher et al., 2011). Preuredila D. Erić, 2016.

⁷Separacijska analitička metoda gdje se komponente uzorka odvajaju zbog različite brzine putovanja u električnom polju u kapilari submilimetarskog promjera. CE pruža mogućnost analize uzoraka veličine kapljice i mogućnost detektiranja potencijalno fitotoksičnog Al³⁺ iona, što je posebno interesantno za studije na kiselim tlima (Göttlein, 1998).



Slika 25 Metoda mikrodijalize. (A) Dijelovi uređaja: pumpa, sonde i autosampler; (B) *In situ* praćenje flukseva dušika u tlu (Inselsbacher et al., 2011).

Tablica 6 Prednosti i ograničenja metoda za sakupljanje otopine rizosfernog tla (Oburger and Schmidt, 2016).

Metoda	Mjerilo	Prednosti	Ograničenja	Primjenjivost na uzorke ^a	Primjenjivost u poljskim uvjetima
Mikro usisne čašice	μL do mL	Uzorkovanje koncentracija <i>in situ</i> ; širok raspon volumena uzorka ovisno o veličini usisne čašice.	Koncentracija i volumen uzorka ovisni o sadržaju vode u tlu; teško precizno postavljanje, artefakti zbog materijala usisne čašice.	Da	Da
SiCSA	nL do μLl	Vrlo lokalizirano uzorkovanje; uzorkovanje u nl rasponu.	Spora propusnost; prikazivanje i postupno povećanje ovisno o broju ponavljanja.	Da	Ne
Mikrodijaliza	μL do mL	Lokalizirano uzorkovanje; minimalne smetnje tijekom postavljanja <i>in situ</i> .	Poteškoće u kalibraciji uređaja i interpretaciji rezultata.	Da	Da

^a sonde za uzorkovanje s neporušenim tlom (sa ili bez korijenja)

Kratice: SiCSA, single-cell sampling and analysis.

3.2 PRAĆENJE RIZOSFERNIH PROCESA POMOĆU IZOTOPA

Izotopi su atomi istog elementa koji imaju jednaki broj protona i različiti broj neutrona u jezgri, odnosno imaju jednaki atomski broj, ali se razlikuju po masenom broju. Izotopi mogu biti stabilni ili radioaktivni. I stabilni i radioaktivni izotopi predstavljaju iznimno dobre markere za praćenje usvajanja i oslobađanja ugljika (C), hranjiva i polutanata, njihovog skladištenja i procesa prijenosa između biljaka, tla i mikroorganizama. Upotreba radioaktivnih izotopa u kombinaciji s novim metodama zbog sigurnosnih je razloga uglavnom ograničena, ali poboljšani analitički instrumenti danas omogućuju široku primjenu i kombinaciju stabilnih izotopa s naprednim tehnikama (Oburger and Schmidt, 2016). Tradicionalni eksperimenti sa stabilnim izotopima zahtijevaju supstrat ili atmosferu obogaćenu stabilnim izotopom, najčešće ^{13}C ili ^{15}N , koji se uvodi u sustav tlo-biljka kako bi se pratila njegova sudbina (Yoshida and Yoneyama, 1980).

Spojevi izgrađeni od elemenata poput ugljika, vodika, dušika i kisika u pravilu sadrže različite postotke svakog elementa izotopa. Specifični odnosi diktiraju uvjete povezane s formiranjem spoja, uključujući i biokemijske procese specifične za vrstu te zemljopisno podrijetlo koji daju jedinstven „otisak prsta“. Uređaj koji može mjeriti i kvantificirati stabilne omjere izotopa s velikom preciznošću može "pročitati" biokemijske procese kodirane u uzorku. Vodeća kromatografska metoda za mjerenje omjera stabilnih izotopa je masena spektrometrija izotopnih omjera (engl. isotope ratio mass spectrometry, IRMS) gdje se određuju omjeri težeg i lakšeg izotopa u plinovima. Rezultati mjerenja omjera stabilnih izotopa izražavaju se pomoću δ -vrijednosti koja predstavlja relativnu razliku omjera izotopa u uzorku i primarnom standardu (Mance, 2014).

Razlike u masi atomskih jezgri izotopa za posljedicu imaju razliku u brzinama molekula koje sadrže različite izotope. Teže molekule imaju manju brzinu difuzije i manju frekvenciju sudara u odnosu na lakše molekule. Takvo ponašanje naziva se izotopna frakcionacija (odvajanje) i predstavlja razliku u zastupljenosti stabilnih izotopa na početku i na kraju fizikalne, kemijske ili biološke reakcije. Npr., biokemijski procesi uzrokuju kolebanja u količini omjera izotopa ugljika ugrađenog u živa bića. Razlika između prave količine C i količine u biljci poznata je kao izotopna frakcionacija (Tablica 7). Unutar biljnog tkiva i/ili tla izotopna frakcionacija može se koristiti za praćenje fiksacije i asimilacije dušika (N) (Wanek and Arndt, 2002), za razlikovanje različitih mehanizama usvajanja željeza (Fe) i cinka (Zn) (Arnold et al., 2010; Guelke and von Blanckenburg, 2007) i kao pomoć prilikom dešifriranja transformacije fosfata koristeći $\delta^{18}\text{O}$ u sustavu tlo-biljka (Tamburini et al., 2014).

Sudbina asimiliranih supstrata analizirana je u uzorcima tla i biljnog materijala pomoću IRMS-a (Apostel et al., 2013; Tamburini et al., 2012), te kod mikroorganizama povezanih s rizosferom pomoću sondiranja stabilnim izotopima (engl. stable isotope probing, SIP) (Tablica 7) (Balasooriya et al., 2014; Hannula et al., 2012). SIP tehnika koristi spojeve označene izotopima za otkrivanje i kvantificiranje procesa biodegradacije te karakterizaciju mikroorganizama odgovornih za te aktivnosti. Naime, svi živi organizmi izgrađeni su od 4 ključne biomolekule koje sadržavaju ugljik (ugljikohidrati, bjelančevine, masti i nukleinske kiseline). Mikroorganizmi sintetiziraju te biomolekule od jednostavnih metabolita koje stvaraju tijekom kemijske razgradnje prisutne u okolišu. Kada mikroorganizam raste i dijeli se, izotopni sastav biomolekula u novim stanicama odražava izotopni sastav kemijskih spojeva na kojima su mikroorganizmi rasli. Npr., ukoliko mikroorganizam raste na šećerima koji se u cjelosti sastoje od ^{12}C (najzastupljeniji stabilni oblik ugljika), svaki atom ugljika u svakoj biomolekuli u novonastaloj stanici je ^{12}C . Međutim, ukoliko mikroorganizam raste na šećerima obogaćenim ^{13}C (drugi, ali rjeđi stabilni izotop ugljika), nove biomolekule su značajno obogaćene sa ^{13}C . Ovaj efekt je iskorišten kod SIP-a i shodno tome svi SIP pristupi uključuju izlaganje uzoraka izotopski obogaćenim kontaminantima. Nakon određenog vremena iz uzorka se ekstrahiraju i analiziraju svi oblici istraživanih biomolekula. Ukoliko je došlo do biodegradacije izotopski obogaćenog kontaminanta, neke od ekstrahiranih molekula sadržavat će povišene razine stabilnog izotopa originalno prisutnog u kontaminantu. S obzirom da ne postoje značajni alternativni pravci koji stabilnim izotopima omogućuju migraciju iz kontaminanta do biomolekula, otkrivanje povišenih razina stabilnih izotopa u biomolekulama pruža uvjerljive dokaze za biodegradaciju. Većina SIP studija koristi spojeve označene sa ^{13}C , iako se mogu koristiti i spojevi obogaćeni dušikom (^{15}N) i kisikom (^{18}O). Najčešće korišten i komercijalno dostupan oblik SIP-a uključuje analizu masnih kiselina mikrobnih fosfolipida. Ova tehnika, poznata kao PLFA-SIP (engl. phospholipid derived fatty acids-stable isotope probing), koristi kontaminante sa relativno niskom razinom izotopskog obogaćivanja (npr. 10 % ^{13}C). Nakon izlaganja uzoraka kontaminantu označenim sa ^{13}C , svi oblici fosfolipida (označeni i neoznačeni) ekstrahiraju se pomoću otapala. Kasnija analiza fosfolipida ekstrahiranih otapalom koristeći IRMS može odrediti količinu ukupne ugradnje ^{13}C u PLFA. Ovim mjerenjem može se utvrditi da li je došlo do biodegradacije i može se procijeniti količina kontaminanta koji je razgrađen. Daljnja identifikacija pojedinih PLFA s povišenom razinom ^{13}C može pomoći u prepoznavanju većih skupina mikroorganizama odgovornih za proces biodegradacije. Analiza ^{13}C uključenog u PLFA također se može

dopuniti podacima koji pokazuju otkrivanje povišenih razina ^{13}C kod krajnjih metabolita poput CO_2 i CH_4 (Mueller, 2011).

Osim u fosfolipide masnih kiselina, ugradnja supstrata obilježenog ^{13}C moguća je i u stanične markere poput nukleinskih kiselina (Rasche et al., 2009). Cilj novih kombinacija SIP-a s mikrobiološkim metodama je detaljna analiza metabolički aktivnih mikroorganizama pomoću mRNA-SIP-a (Haichar et al., 2012) ili protein-SIP-a (Jehmlich et al., 2010). Ovi oblici SIP-a mogu pružiti precizne informacije o tome koja vrsta mikroorganizama je odgovorna za biodegradaciju te čak otkriti specifične enzime i puteve uključene u proces što je vrlo korisno kada se malo zna ili o mikroorganizmima ili putevima uključenim u određeni proces biodegradacije (Mueller, 2011).

Općenito, metoda brzog probiranja (engl. high-throughput screening, HTS) koristi automatizaciju i obradu velikog skupa podataka za brzo određivanje, odnosno testiranje bioloških ili biokemijskih aktivnosti velikog broja spojeva, proteina ili gena. Nedavna pojava HTS-a ekstrahiranih i frakcioniranih DNA/RNA uzoraka omogućuje dubinsku analizu metabolički aktivnih stanica koje su usvojile obogaćene izotope, kao što je pokazano za bakterije koje se hrane eksudatima korijena u endosferi i rizosferi riže (Hernández et al., 2015). Dodatno, označavanje specifičnog položaja (engl. position specific labeling) (Apostel et al., 2013) i pristupi dvojnog označavanja (engl. dual-labeling) (Mau et al., 2015) se primjenjuju za daljnje rasvjetljavanje dinamike prometa organskog ugljika u tlu. Označavanje specifičnog položaja predstavlja novi alat za praćenje sudbine C u tlu pomoću kojeg se analizira sudbina pojedinih C atoma u molekulama pri čemu je moguće razjasniti razlike između sudbine početnog spoja i njegovih metabolita za razliku od klasičnog pristupa u kojem su svi C atomi u molekuli označeni sa ^{13}C ili ^{14}C te se ne može zaključiti da li su označeni spojevi uključeni u procese kao početni spojevi ili su transformirani u metabolite, te su istraživani metaboliti, a ne početni spojevi. Dvojno označavanje (^{15}N i ^{14}C) korišteno je, npr., za dokazivanje korištenja uree kao izvora energije i izvora ugljika (Marsh et al., 2005).

Tablica 7 Glavne prednosti i ograničenja metoda za praćenje rizosfernih procesa pomoću izotopa (Oburger and Schmidt, 2016).

Metode	Mjerilo	Prednosti	Ograničenja	Primjenjivost na uzorke ^a	Primjenjivost u poljskim uvjetima
Frakcionacija stabilnih izotopa	Biljke, tlo, mikrobna zajednica	Nije potreban supstrat obogaćen teškim izotopom; procjena važnosti fizioloških i biogeokemijskih reakcija.	Detekcija minimalnih promjena u omjeru izotopa, zahtijeva vrhunsku završnu analizu.	Da	Ne
Sondiranje stabilnim izotopima (SIP)	Odabrane grupe – cijela zajednica	Identifikacija i kvantifikacija aktivnih mikroorganizama sa određenim funkcijama.	Potreban susprtat obogaćen teškim izotopom i visoka razina obogaćivanja, zahtijeva vrhunsku završnu analizu.	Da	Ne

^a sonde za uzorkovanje s neporušenim tlom (sa ili bez korijenja)

Kratice: SIP, stable isotope probing.

3.3 TEHNIKE VIZUALIZACIJE RIZOSFERNIH PROCESA

3.3.1 Kemijsko snimanje

Tehnika difuzijskog gradijenta na tankom filmu (engl. diffusive gradients in thin films, DGT) originalno je razvijena za *in situ* mjerenja labilnih kompleksa metala u tragovima u vodenom okolišu (Davison and Zhang, 1994). Zbog svoje jednostavnosti i širokog područja primjene ova tehnika se od 1994. godine koristi za mjerenje koncentracija elemenata u vodama (Zhang and Davison, 1995), sedimentima (Widerlund and Davison, 2007; Zhang and Davison, 1995), tlu (Zhang et al., 2001), te za određivanje dostupnosti hranjiva i polutanata u tlu (Degryse et al., 2009; Santner et al., 2015b). DGT je jednostavan, ali precizan uređaj koji akumulira otopljene tvari na kontrolirani način. Plastičan uređaj sadrži membranski filter, difuzni sloj i sloj za povezivanje, odnosno smolu (Slika 26).

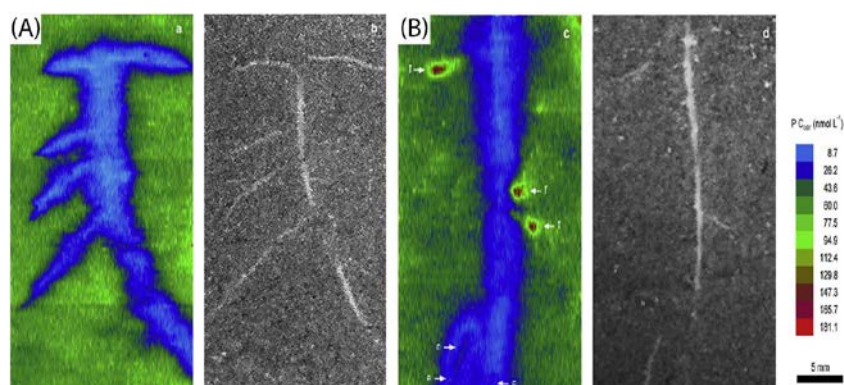


Slika 26 DGT uređaj. (A) Shematski prikaz mjerenja prikazuje uređaj postavljen na vlažno tlo kroz određeni vremenski period (obično 20-24h) (Wenzel, 2014); (B) Komponente uključuju vezajući sloj (narandžasto) i prozirni difuzni gel. Membranski filter, koji ovdje nije prikazan, smješten je na vrhu (Mason, 2016). Preuredila D. Erić, 2016.

Princip rada je da kompleksi metala difundiraju iz otopine kroz difuzni gel i vežu se na kompleksirajuću smolu. Stoga se razvija koncentracijski gradijent u difuzijskom sloju. Korištenjem Chelex-100 gela kao kompleksirajuće smole, DGT uređaji se mogu koristiti za određivanje 24 metala važna u okolišu (Garmo et al., 2003).

U novije vrijeme, DGT je prilagođen za dvodimenzionalno (2D) snimanje raspodjele labilnih kemijskih elemenata u rizosferi. DGT uređaj postavljen na korijenje biljaka koje su rasle u rizotronima ispunjenim tlom, te analiziran pomoću laserske ablacije masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (engl. laser ablation inductively coupled plasma mass spectroscopy, LA-ICP-MS) pokazuje da ova tehnika predstavlja obećavajući alat za vizualizaciju gradijenata više otopljenih tvari duž osi korijena. LA-ICP-MS je relativno nova mikroanalitička tehnika za određivanje tragova elemenata u čvrstim uzorcima gdje se izbjegava postupak otapanja čvrstog uzorka. Naime, uzorak se izravno analizira ablacijom s pulsirajućom laserskom zrakom, te se stvara aerosol koji se uvodi u induktivno spregnutu plazmu (ICP). Ona se koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija se vrši masenom spektrometrijom. Kombinacijom DGT-a i LA-ICP-MS-a postiže se bolja rezolucija u odnosu na starije tehnike (Santner et al., 2012a).

Primjeri uspješne primjene DGT snimanja uključuju usporedbu dva kultivara uljane repice *Brassica napus* u učinkovitosti korištenja fosfora (P) (Slika 27) (Santner et al., 2012a), te istraživanje mobilizacije otopljenih tvari oko proteoidnog korijenja bijele lupine *Lupinus albus* (Valentinuzzi et al., 2015). DGT omogućava relativnu usporedbu koncentracija, odnosno flukseva unutar i između snimaka sa tipičnom prostornom rezolucijom od 300 x 300 μm i uzorkom veličine nekoliko cm^2 (Santner et al., 2015a).



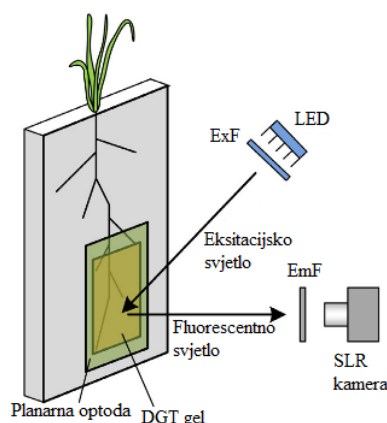
Slika 27 Istraživanje procjene učinkovitosti korištenja fosfora (P) u rizosferi 2 kultivara uljane repice *B. napus* cv. *Caracas* (A) i *B. napus* cv. *CR 1886* (B) pomoću DGT uređaja. Studija predstavlja prvo izravno promatranje otpuštanja P pod djelovanjem korijena biljaka raslih u tlu. Promatranja upućuju na učinkovitije usvajanje P i veće proširenje rizosfere kod *Caracas* kultivara. Ta saznanja mogu pomoći u oplemenjivanju i selekciji kultivara s ciljem veće učinkovitosti usvajanja hranjivih tvari (Santner et al., 2012b).

Druga obećavajuća tehnika kemijskog snimanja uključuje optičke senzore. Optički senzori u 2D varijanti nazivaju se planarne optode. Planarne optode mjere promjene u koncentraciji analita temeljene na fotoluminiscenciji (Santner et al., 2015a), a dobivene snimke prikazuju raspodjelu analita u stvarnom vremenu i visoke su prostorne rezolucije (μm) (Glud et al., 1996). Fotoluminiscencija je zajednički naziv za pojave emisije elektromagnetskog zračenja atoma ili molekula kao posljedica prijelaza elektrona iz pobuđenog u niže energetska stanja u kojem se pojava svjetljenja odvija bez zračenja topline, a izazvana je svjetlošću (Generalić, 2015). Planarne optode sastoje se od luminofera (odgovornih za luminescentna svojstva) imobiliziranih u, za analit propusan, matriks koji je presvučen odgovarajućim materijalom, npr. plastičnom folijom i sistema za snimanje temeljenog na kameri. Senzori se obično postavljaju na unutarnji zid prozirne posude, npr. rizotona (Slika 28). Dva su glavna principa mjerenja pomoću planarnih optoda: (1) mjerenje intenziteta fluorescencije i (2) mjerenje trajanja fosforescencije (Santner et al., 2015a). Naime, luminescencija se s obzirom na trajanje sekundarnog zračenja dijeli na fluorescenciju koja traje samo dok djeluje pobuda i fosforescenciju koja traje i nakon prestanka pobude, odnosno ukidanja izvora energije. Znači, fluorescencija označava vrstu luminiscencije u kojoj se elektron vraća u svoje osnovno stanje gotovo trenutno (za manje od 10^{-8} sekundi) i u kojoj emisija svjetla prestaje kada se ukloni izvor pobude. Za razliku od fluorescencije, fosforescencija zahtijeva dodatnu energiju za povratak u osnovno stanje, što može trajati od nekoliko milisekundi pa do nekoliko dana ili godina, ovisno o okolnostima (Generalić, 2015). Iako se većina senzora važnih za istraživanje tla temelji na fluorescenciji (Santner et al., 2015a), planarne optode oslanjaju se na svjetlo predano pomoću svjetleće diode (engl. light emitting diode, LED) (Kessler et al., 2012; Larsen et al., 2011), halogenskih ili ksenonskih lampi (Hakonen et al., 2010; Zhu et al., 2006). U današnje vrijeme poželjnija je upotreba LED rasvjete zbog dobrog odnosa snage naspram veličine, uskog emisijskog spektra i niskih troškova (Santner et al., 2015a). Prilikom snimanja pomoću planarnih optoda intenzitet ili trajanje luminiscencije snima se digitalnim kamerama (Slika 29) visoke prostorne rezolucije koristeći CCD (engl. charged coupled device) ili CMOS (engl. complementary metal oxide semiconductors) tehnologiju. Sustavi temeljeni na bilježenju trajanja luminiscencije zbog visoke cijene (50 000-100 000 €) nisu komercijalno dostupni, ali se sustavi temeljeni na intenzitetu mogu nabaviti sa svim komponentama za manje od 1000 € (Staal et al., 2011). Korištenjem jeftinijih digitalnih kamera (engl. digital single-lens reflex, DSLR) trošak se može dodatno smanjiti (Haas et al., 2013).

Planarne optode, ovisno o kemijskoj stabilnosti senzora (od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci), pružaju jedinstvenu priliku za praćenje dinamičkih promjena pojedinog analita u

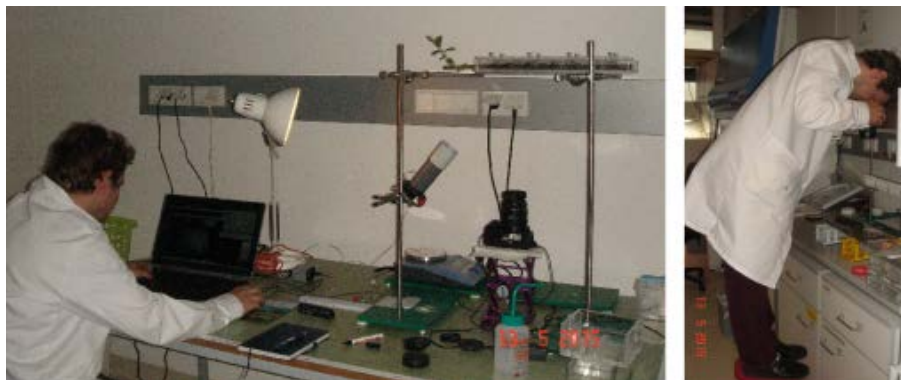
blizini korijenja tijekom rasta biljke *in situ*. Lista senzora koji se upotrebljavaju u istraživanju rizosfere do sada uključuju O_2 (Slika 30) (Blossfeld et al., 2011; Hoefler et al., 2015; Larsen et al., 2015; Rudolph et al., 2012), pH (Blossfeld et al., 2010; Faget et al., 2013; Rudolph et al., 2013; Schreiber et al., 2012) pCO_2 (Blossfeld et al., 2013) i NH_4 (Strömberg, 2008).

Različite studije su promatrale prostorne i vremenske (sati do dani) varijacije rapodjele pH u rizosferi. Engleski ljulj *Lolium perenne* i poljska čestika *Thlaspi arvense* alkalinizirali su rizosferu za do 1,7 pH jedinica, dok je kukuruz *Zea Mays* zakiselio svoju rizosferu za do -0,7 pH jedinica (Blossfeld et al., 2010). Primjena pCO_2 optoda pokazala je značajno povećanje koncentracije pCO_2 u blizini korijena *Viminaria juncea* koje je raslo na poplavljenom tlu kao rezultat respiracije korijena i povećane mikrobiološke aktivnosti (Slika 31B) (Blossfeld et al., 2013). Koristeći pH i O_2 optode istraživana je tolerancija na vodni stres kod biljaka iz porodice trava, *Arundinella anomala* i *Alternanthera philoxeroides*, pokazujući da je korijenov sustav ostao potpuno funkcionalan prije i tijekom poplave (Schreiber et al., 2012).



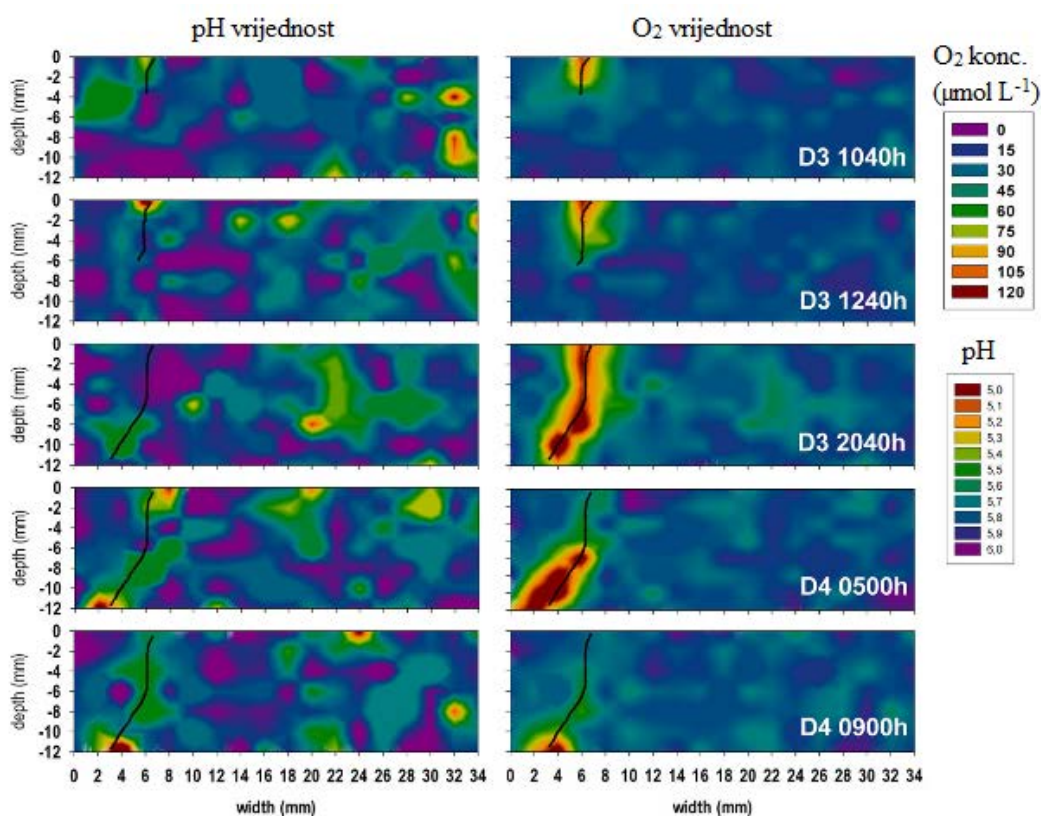
Slika 28 Primjena DGT gela i senzora planarne optode u obliku folije na korijenov sustav biljke koja raste u rizotronu (Santner et al., 2015a). Preuredila D. Erić, 2016.

Kratice: ExF, filter za eksitacijsko svjetlo; EmF, filter za emisijsko svjetlo.

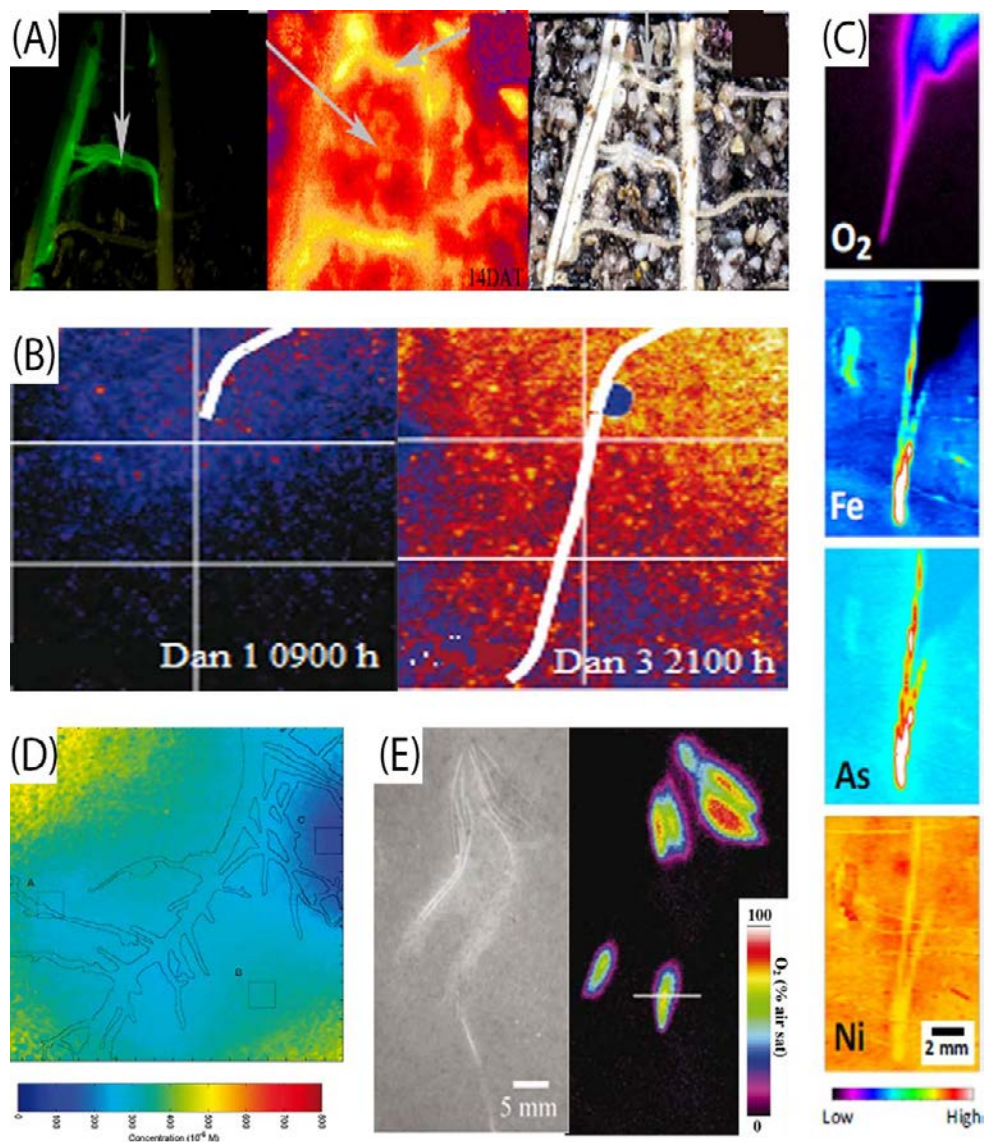


Slika 29 Snimanje korijenovog sustava biljke koja raste u rizotronu sa senzorom planarne optode pomoću kamere (Zgorelec, 2015).

Istraživanje dinamike pH i O₂ u rizosferi tri *Juncus* vrste (iz porodice sitova *Juncaceae*) od kojih su sve pokazale otpuštanje O₂ duž korijenja, ali s različitim posljedicama na pH rizosfere. Dvije vrste dovele su do acidifikacije ili alkalizacije rizosfere, dok treća biljka nije imala učinak na pH vrijednost rizosfere (Slika 30) (Blossfeld et al., 2011). Planarne optode s O₂ također su korištene za istraživanje radijalnog otpuštanja kisika kod korijenja morske sviline *Zostera marina* (iz roda morskih trava) za koju se prije pretpostavljalo da se otpuštanje kisika javlja kod svih dijelova korijena, dok istraživanje nije pokazalo da je otpuštanje O₂ ograničeno samo na vrh korijenja (Slika 31E) (Ingemann Jensen et al., 2005). Planarne optode s NH₄⁺ korištene u istraživanju prometa NH₄⁺ oko korijenja rajčice *Solanum lycopersicum* dokumentirale su usvajanje NH₄⁺ preko cijele strukture korijena i pokazale da je usvajanje putem tankog perifernog korijenja dvostruko učinkovitije u odnosu na usvajanje putem glavnog korijenja (Slika 31D) (Strömberg, 2008).



Slika 30 Vizualizacija dinamike pH i O₂ u rizosferi *Juncus effusus* korištenjem pH i O₂ optoda. Prikazane su snimke vremenske serije trećeg (D3) i četvrtog (D4) dana eksperimenta. Boje pokazuju različite pH i O₂ vrijednosti. Crne linije označavaju položaj korijena (Blossfeld et al., 2011). Preuredila D. Erić, 2016.

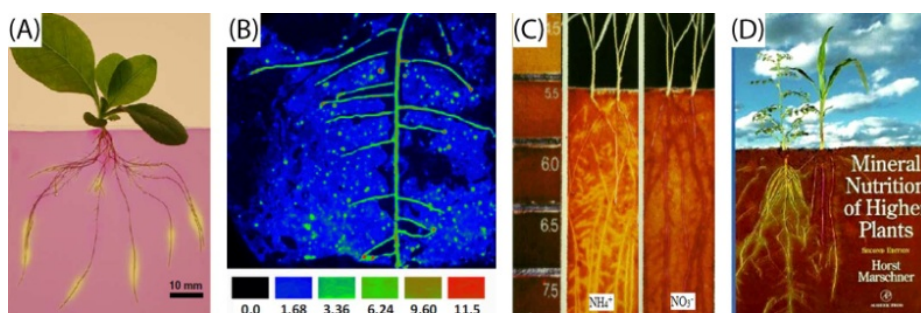


Slika 31 Kemijske promjene u rizosferi. (A) Potencijal kombinacije planarnih optoda s pH senzorom i FP tehnike. Identifikacija korijena kukuruza upotrebom plave svjetlosti koja se koristi za ekspresiju FP (lijevo); mapa pH vrijednosti rizosfere kukuruza i graha, pri čemu je korijen kukuruza lijevo, a graha desno (sredina); konvencionalna snimka gdje je vidljivo korijenje kukuruza i graha (desno) (Faget et al., 2013); (B) Raspodjela CO₂ oko kratkog segmenta korijena *Viminaria juncea* nakon 2,5 dana rasta korijena (lijevo); koncentracija CO₂ povećava se s elongacijom korijena kao posljedica respiracije korijena (desno). Bijela linija označava položaj korijena (Blossfeld et al., 2013); (C) Vizualizacija O₂, Fe, As i Ni u rizosferi močvarne riže kombinacijom planarnih optoda i DGT senzora. Relativno visoke koncentracije O₂ (ružičasto) u korelaciji su s visokim fluksevima Fe i As uglavnom oko vrha korijena (bijelo), dok su koncentracije Ni iscrpljene u neposrednoj blizini korijena (žuto) (Williams et al., 2014); (D) Distribucija NH₄⁺ oko korijena rajčice *Solanum lycopersicum* primjenom planarnih optoda s NH₄⁺ senzorom. Iscrpljivanje NH₄⁺ iz zone korijena ukazuje na asimilaciju od strane korijena. Položaj korijena prikazan je crnim linijama (Strömberg, 2008); (E) Fotografija korijenovog sustava *Zostera marina* (lijevo); snimka distribucije O₂ nastala pomoću planarnih optoda prikazuje O₂ okružuju vrh korijena te tako štite tkivo korijena od štetnih i reduciranih kemijskih spojeva poput H₂S i Fe⁺ (desno) (Ingemann Jensen et al., 2005).

Prilikom izbora senzora treba biti pažljiv jer su indikatori optoda osjetljivi na promjene u temperaturi i pH (Santner et al., 2015a). Istovremena primjena senzora višestrukih optoda (Blossfeld et al., 2011), kao i kombinacija planarnih optoda s DGT-om (Slika 31C) (Hoefer et al., 2015) neutron radiografijom (engl. neutron radiography, NR) ili tehnikom fluorescentnih proteina (engl. fluorescent protein, FP) (Faget et al., 2013) značajno su se poboljšala shvaćanja o interakcijama između biljaka i tla te međusobno između biljaka u rizosferi. NR je nedestruktivna tehnika koja koristi neutrone prilikom ispitivanja uzoraka. Osim u industriji, biologiji, geologiji i fizici (Kardjilov et al., 2005) koristi se i prilikom istraživanja razvoja korijena u tlu. Naime, NR je osjetljiva na vodik i materijale koji sadrže vodik. Upravo ta dominantna osjetljivost na vodik u sustavu tla ima za posljedicu dobru vizualizaciju vode i korijenja, koje se uglavnom sastoji od vode (Moradi et al., 2009a). Visoka prostorna i vremenska rezolucija NR dozvoljava vizualizaciju promjena na granici tla i korijenja bez ometanja gradijenata. Kombinacijom planarnih optoda i NR moguće je odrediti raspodjelu vode u tlu (Rudolph et al., 2012) koja omogućava direktnu povezanost dinamike O₂ s respiracijom korijena, transpiracijom biljke i raspodjelom vode u tlu (Santner et al., 2015a). Tehnika fluorescentnog proteina oslanja se na korištenje fluorescentnog korijenja genetski modificiranih biljaka koje pod određenim valnim duljinama mogu učiniti vidljivim fluorescentni protein. Kombinacijom planarnih optoda s pH senzorom i FP tehnike omogućena je identifikacija korijena u situacijama gdje korijenje dviju vrsta raste zajedno, pokazujući da su pH učinci u rizosferi snažnije izraženi kada korijenje graha *Phaseolus vulgaris* i kukuruza *Zea mays* raste pojedinačno u odnosu na njihov rast u neposrednoj blizini (Slika 31A) (Faget et al., 2013).

Relativno nedavno, planarne optode u kombinaciji s DGT-om, tzv. „sendvič senzori“ s dvostrukim slojem (engl. dual layer sandwich sensors) primjenjene su za istovremeno snimanje metala u tragovima i pH/O₂ (Williams et al., 2014). Difuzijski gradijenti na tankom filmu, DGT, tu služe kao difuzni sloj koji prekriva senzor optode (Slika 28). Kako bi se smanjilo zamućenje slike potrebni su vrlo tanki DGT gelovi ($\leq 100 \mu\text{m}$) (Stahl et al., 2012). Ova metoda korištena je za vizualizaciju O₂, Fe, As i Ni u rizosferi močvarne riže (Slika 31C) (Williams et al., 2014) i istraživanje topivosti metala u rizosferi akumulatorske biljke metala *Salix smithiana* nakon primjene sumpora (Hoefer et al., 2015). S obzirom da obje studije jasno pokazuju da istraživanje složenih biogeokemijskih procesa zahtijeva istovremenu analizu više otopljenih tvari duž njihove prostorne raspodjele očekuje se da „sendvič senzori“ postanu važan alat u snimanju otopljenih tvari (Santner et al., 2015a).

Princip korištenja agaroznog gela ili filter papira u kombinaciji s bojama kao indikatorima za mapiranje svojstava rizosfere datira iz 1980-tih i 1990-tih (Slika 32A,C,D) (Dinkelaker et al., 1993; Marschner and Römheld, 1983). Tijekom proteklih desetljeća princip je prilagođen i poboljšan, a nedavno je predstavljena metoda cimografije (Slika 32B). Općenito, cimografija je elektroforezna tehnika kod koje se supstrat za detekciju enzimske aktivnosti (npr. želatina) umiješa u pufer. U kontekstu istraživanja tla označava tehniku za snimanje enzimske aktivnosti u tlu. Sastoji se od agaroznog gela debljine 1 mm u kojem je imobiliziran supstrat za određivanje aktivnosti enzima. Gelovi se izlažu matriksu tla u vremenu od 40 min. do 18 h, što omogućuje enzimatsku reakciju i dovodi do smanjenja koncentracije supstrata u gelu. Gelovi se naposljetku vade, preostali supstrat boja i snima koristeći plošni skener (Spohn et al., 2013). Korištenjem ove tehnike pokazano je da je visoka aktivnost kisele fosfataze usko povezana s područjem oko korijenja, dok su na većoj udaljenosti od korijenja nađena mjesta sa visokom aktivnošću lužnate fosfataze. Ovo snažno ukazuje da su kisele fosfataze uglavnom produkt izlučivanja korijenja biljaka i mikroorganizama povezanih s rizosferom, dok su lužnate fosfataze uglavnom proizvod mikroorganizama koji nastanjuju nerizosferna područja tla. Prostorna diferencijacija ovih mikroorganizama tumači se kao strategija za izbjegavanje kompeticije za supstrat s organskim P (Spohn and Kuzyakov, 2013).



Slika 32 Vizualizacija kemijskih promjena u rizosferi. (A) Promjena pH vrijednosti u rizosferi duhana *Nicotiana tabacum* uzgajanog u uvjetima manjka željeza. Korijenje je ugrađeno u agarozni gel koji sadrži boju bromokrezol ljubičasto⁸ (engl. bromocresol purple, BCP) kao indikator za otkrivanje pH (Hinsinger et al., 2009); (B) Cimogram prikazuje aktivnost enzima hitinaze pri čemu su visoke razine hitinaze (crveno) lokalno ograničene na lateralne vrhove korijena (Spohn and Kuzyakov, 2013); (C) Modifikacije pH u rizosferi pšenice *Triticum aestivum* nastale kao posljedica ishrane biljke različitim oblicima dušika prikazane korištenjem boje (bromokrezol ljubičasto) (Römheld, 1986); (D) Naslovnica knjige „Mineralna ishrana viših biljaka“ prikazuje pH promjene u rizosferi slanutka *Cicer arietinum* i kukuruza *Zea mays* gnojnih nitratom vizualizirane pomoću agaroznog gela s bojom (Marschner, 1995).

⁸pH indikator kiselog tipa koji mijenja boju u pH području od 5,2 -6,8. BCP je žute boje u kiselom mediju, a u lužnatom ljubičaste. Topljiv je u alkoholu, a slabo topljiv u vodi.

Dok se planarne optode koriste za višekratno snimanje kroz nekoliko dana, odnosno tjedana, DGT i cimografija pružaju samo integriranu snimku eksperimentalnih uvjeta tijekom implementacije (Tablica 8).

Tablica 8 Prednosti i ograničenja metoda kemijskog snimanja rizosfernih procesa (Oburger and Schmidt, 2016).

Metode	Mjerilo	Prednosti	Ograničenja	Primjenjivost na uzorke ^a	Primjenjivost u poljskim uvjetima
DGT	mm - cm	Uzorkovanje temeljeno na difuziji; prostorna raspodjela labilnih otopljenih tvari; mapiranje više elemenata.	Uzorkovana koncentracija izravno ne odgovara koncentraciji otopine tla.	(Da) ako*	(Da) ako*
Planarne optode	mm - dm	Očitavanje se temelji na difuziji; prostorna raspodjela koncentracije analita; ponavljajuće mjerenje tijekom vremena.	Ograničen broj simultano mjerenih analita (max. 2-3).	(Da) ako*	(Da) ako*
Cimografija	mm- dm	Uzorkovanje temeljeno na difuziji; prostorna raspodjela enzimatske aktivnosti.	Ograničen broj simultano mjerenih ciljanih enzima; potencijalno zamućenje slike; cilja samo enzime u otopini tla.	(Da) ako*	(Da) ako*

*Potreban je dovoljno homogen kontakt s tlom i određen sadržaj vode.

^a sonde za uzorkovanje s neporušenim tlom (sa ili bez korijenja)

Kratice: DGT, diffusive gradients in thin films.

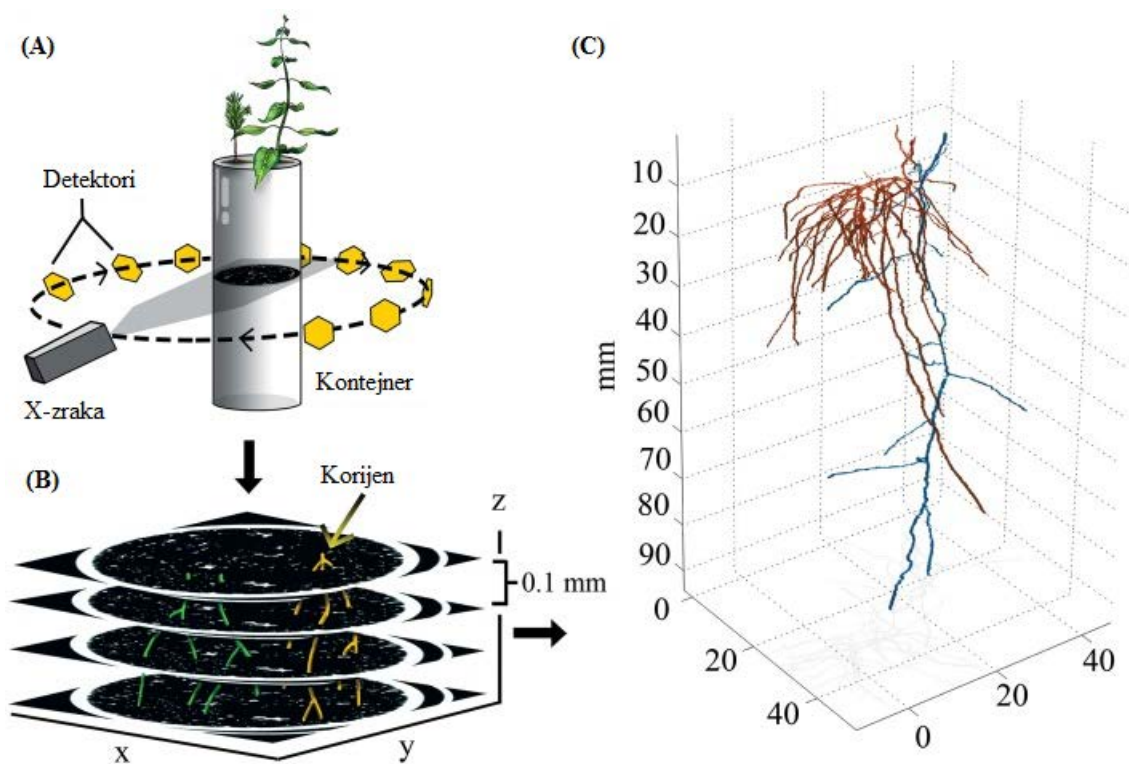
3.3.2 Neinvazivno snimanje

U središtu pozornosti istraživanja rizosfere trenutno se nalaze tehnike temeljene na zračenju, poput rendgenske mikro kompjuterizirane tomografije (engl. X-ray micro-computed tomography, X-ray μ CT) ili sinkrotron tomografije (engl. synchrotron tomography, SR-CT) zbog njihovog potencijala prilikom karakterizacije arhitekture korijenovog sustava i interakcija između biljke i tla u 3D obliku i odgovarajućem mjerilu (μ m). Tomografsko snimanje može koristiti nekoliko izvora energije, ali su za ispitivanje interakcija između korijenja i tla općenito prihvaćene rendgenske zrake kao izvor energije (Mooney et al., 2012). U suštini, tomografsko snimanje temelji se na usmjeravanju (rendgenskih) zraka prema predmetu iz više orijentacija (kutova) i mjerenju smanjenja intenziteta (atenuacije⁹) emitiranih zraka. Kompjuterizirana tomografija (CT) koristi kompjuter za rekonstrukciju slike od ravnine poprečnog presjeka (engl. slice) kroz predmet. CT umjesto dvodimenzionalnih elemenata, piksela (slikovni elementi), sadrži voksele (volumni elementi) koji opisuju trodimenzionalnost

⁹ Prigušenje ili slabljenje.

dobivene slike (Guldborg et al., 2004). CT uređaji dobivaju prefiks s obzirom na razinu razlučivosti. Sinkrotronski skeneri koriste elektromagnetsko zračenje koje emitiraju elektroni iz magnetskog polja akceleratora čestica (Wildenschild et al., 2002). Kako bi se dobili podaci o rizosferi, biljke se uzgajaju u kontejnerima različitih promjera (mm-dm) ispunjenim tlom, zatim se uvode u skenirajući uređaj, te izlažu zračenju od nekoliko minuta do nekoliko sati (Slika 33A). O veličini uzorka ovisi prostorna rezolucija, odnosno analiza struktura μm veličine zahtijeva relativno mali uzorak (približno $\varnothing 1\text{ cm}$) (Oburger and Schmidt, 2016).

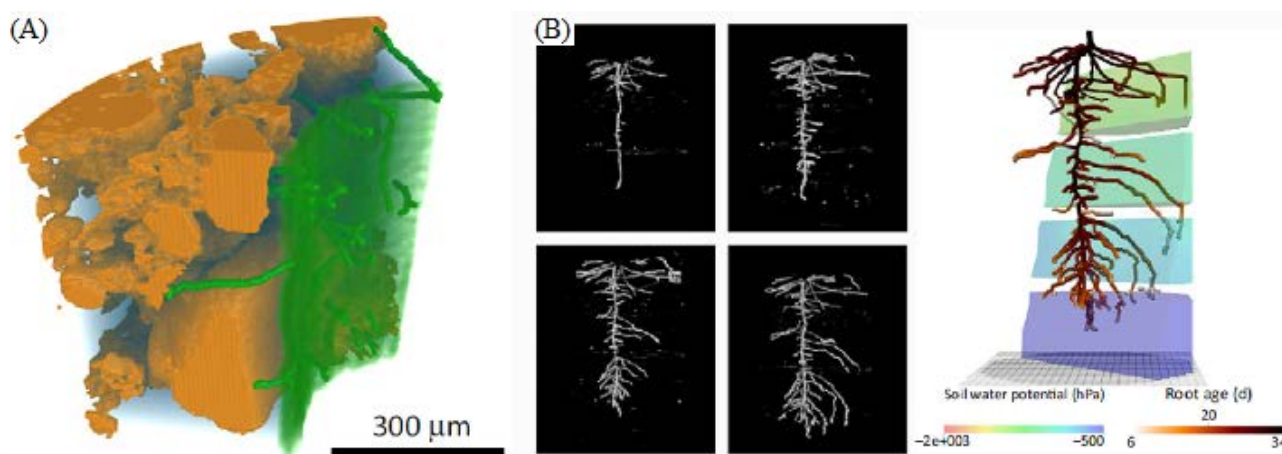
Prvi rezultati nastali korištenjem mikrotomografije su 3D snimke vremenske serije rasta korijena sjemena pšenice *Triticum aestivum* dobivene uz voksel rezoluciju od $100\text{ }\mu\text{m}$ (Jenneson et al., 1999). Mikrotomografija je korištena i za vizualizaciju korijenja pšenice *Triticum aestivum* i uljane repice *Brassica napus* raslih u pjeskovitoj ilovači (Gregory et al., 2003), te vizualizaciju promjena u arhitekturi korijena pšenice nastalih pod utjecajem aluminija (Lazarević et al., 2016). Upotrebom sinkrotron tehnologije u nedavnoj su studiji



Slika 33 Shematski prikaz principa rada rendgenske mikro kompjuterizirane tomografije. (A) Rendgenske zrake su usmjerene na kontejner, a atenuacijski signal rendgenske zrake uhvaćen pomoću detektora postavljenih u obliku prstena koji integriraju signalne informacije u poprečni presjek izrađen od vokseli ($0.05 \times 0.05 \times 0.1\text{ mm}$); (B) Korijenje koje se može poistovjetiti kodirano je bojom i rekonstruirano u 3D; (C) 3D rekonstrukcija uparenog korijenovog sustava topole *Populus tremuloides* (crveno) i smreke *Picea abies* (plavo) (Paya et al., 2015). Preuredila D. Erić, 2016.

uspješno vizualizirane fine korijenove dlačice pšenice *Triticum aestivum* koje naseljavaju makropore *in situ* (Slika 34A) (Keyes et al., 2013). Iako se SR-CT smatra superiornim u odnosu na komercijalno dostupne μ CT uređaje sa stajališta prostorne rezolucije i vremena potrebnog za skeniranje (Tablica 9) (Lombi and Susini, 2009), bolja dostupnost i niži troškovi čine μ CT uređaje češće primjenjenim instrumentima prilikom istraživanja rizosfernih procesa. Iz tih je razloga μ CT nedavno korišten za monitoring rasta zrelih korijenovih sustava (Slika 34B) (Ahmed et al., 2016; Koebernick et al., 2015), istraživanje interakcija između korijena i tla te korijena jedne i korijena druge biljne vrste (Slika 33B i C) (Paya et al., 2015), i dobivanje uvida u hidraulična svojstva rizosfere (Daly et al., 2015).

Niske doze zračenja koje se primjenjuju tijekom snimanja ne utječu na rast korijena (Zappala et al., 2013), broj stanica mikroorganizama, strukturu zajednice ili njihovu potencijalnu aktivnost (Schmidt et al., 2015). Prema tome, X-ray μ CT primjeren je za istraživanja u rizosfernoj ekologiji. Nedavno je snimkama visoke prostorne rezolucije po prvi puta *in situ* vizualizirana interakcija pšenice *Triticum aestivum* i uljane repice *Brassica napus* s fitopatogenom gljivicom *Rhizoctonia solani*, čime je dokazan potencijal ovog pristupa (Sturrock et al., 2015). Ipak, u zadnjih 20 godina objavljeno je manje od 30 radova u kojima je korišten μ CT za vizualizaciju korijenja u tlu (Mooney et al., 2012). Ova ograničena primjena rezultat je poteškoća u rješavanju signala korijena i tla, uz vrlo zahtjevno ručno segmentiranje snimaka (Ong et al., 2015).



Slika 34 Neinvazivno snimanje. (A) Snimke rizosfere pšenice visoke rezolucije nastale pomoću sinkrotronske tomografije prikazuju rizoplanu s korijenovim dlačicama (zeleno), povezano rizosferno tlo (smeđe) i pore ispunjene vodom (plavo) (Keyes et al., 2013); (B) Neinvazivno praćenje i rekonstrukcija razvoja arhitekture korijenovog sustava graha pomoću X-ray μ CT. Raspodjela zrelog korijenja (tamno crveno) na površini tla u korelaciji je s najnižim simuliranim vodnim potencijalima tla (svijetlo zeleno) (Koebernick et al., 2015).

Tablica 9 Prednosti i ograničenja neinvazivnih metoda snimanja rizosfernih procesa (Oburger and Schmidt, 2016).

Metode	Mjerilo	Prednosti	Ograničenja	Primjenjivost na uzorke ^a	Primjenjivost u poljskim uvjetima
X-ray μ CT	nm - dm	Vizualizacija svojstava tla i korijena <i>in situ</i> ; varijabilna veličina uzorka (sve do velikih kontejnera s tlom).	Ograničen broj uzoraka; dugo vrijeme skeniranja utječe na organizme u tlu.	Da	Ne
Sinkrotron tomografija	nm - cm	Vizualizacija svojstava tla i korijena <i>in situ</i> ; kratko vrijeme skeniranja; visoka prostorna rezolucija.	Ograničena veličina i broj uzoraka; skupo; ograničena dostupnost.	Da	Ne

^a sonde za uzorkovanje s neporušenim tlom (sa ili bez korijenja)

Kratice: X-ray μ CT, X-ray micro-computed tomography.

3.3.3 Snimanje pomoću mikroorganizama

Mnoge molekularne metode koriste se za identifikaciju zajednica mikroorganizama u tlu (Ranjard et al., 2000), ali većina ih ne pruža uvid u njihov prostorni raspored (Downie et al., 2014). Nasuprot tome, primjena fluorescentne *in situ* hibridizacije (engl. fluorescence *in situ* hybridisation, FISH) pokazala se uspješnom za analizu prostornih raspodjela mikroorganizama u tlu, iako nije prikladna za proučavanje dinamičkih procesa jer uzorci prije snimanja trebaju biti fiksirani (Downie et al., 2014). FISH tehnika pomaže da se pomoću specifičnih fluorescentno označenih sonde koje sadrže ribosomalnu ribonukleinsku kiselinu (rRNA)¹⁰ identificiraju i kvantificiraju različiti mikroorganizmi. Specifične fluorescentno označene rRNA sonde su zapravo fluorescentni oligonukleotidi¹¹ komplementarni baznim sekvencama 16S rRNA¹². Oligonukleotidne sonde mogu biti dizajnirane uz specifičnosti koje se kreću od razine vrsta preko razine roda do razine taksonomske domene¹³. Sonde dospijevaju u stanice i hibridiziraju sa rRNA nakon čega se dobiva jasan fluorescentni signal po pojedinoj mikrobnjoj stanici. Iako se iz intenziteta signala ne može izvesti zaključak o mikrobiološkoj aktivnosti (Wagner et al., 2003), *in situ* detekcija mikrobne kolonizacije na površini korijena od bitne je važnosti za shvaćanje interakcija između korijenja i mikroorganizama. Do nedavno, kao nedostatak ove tehnike navodio se slabi signal i visoka pozadinska fluorescencija tkiva korijena (Tablica 10), čineći iznimno teškom zadoćom *in situ*

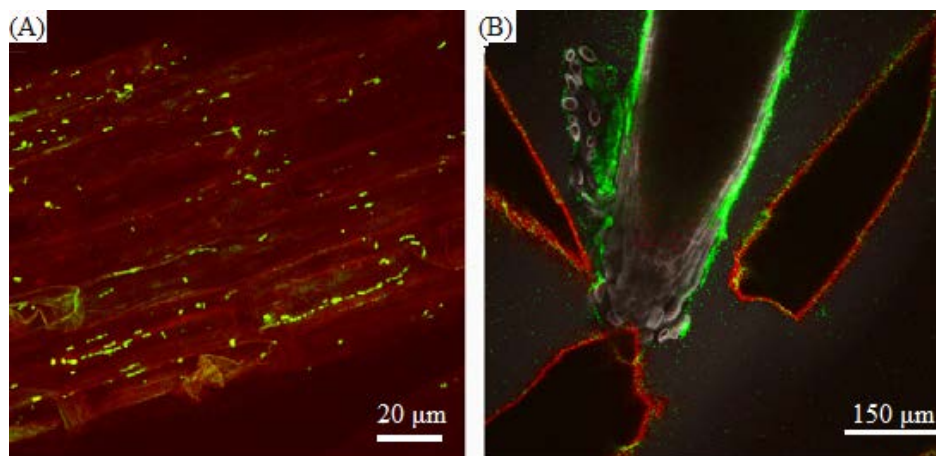
¹⁰ Sastavni dio ribosoma.

¹¹ Kratke RNA molekule.

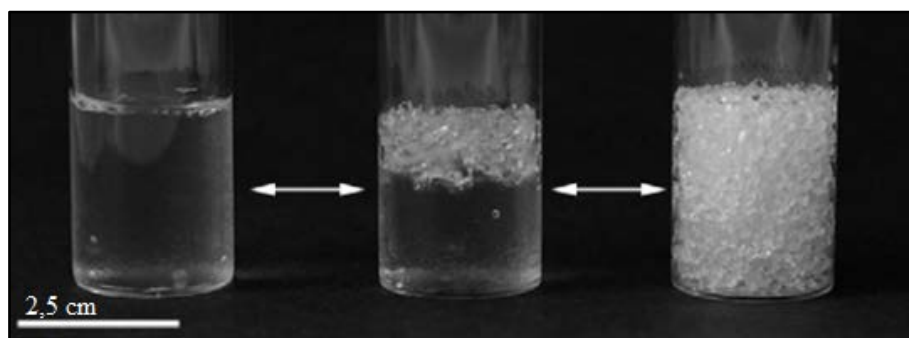
¹² Određena vrsta rRNA.

¹³ Sistem podjele živih bića na bakterije, archaea i eukariote. Bakterije i archaee su jednostanični organizmi bez stanične jezgre, a eukarioti živa bića čije stanice imaju jezgru.

lokalizaciju pojedinih stanica povezanih s rizoplanom (Briones et al., 2002). Za prevladavanje tih ograničenja uvedena je FISH modifikacija koja drastično povećava intenzitet signala i naziva se CARD-FISH (engl. catalyzed reporter deposition combined with fluorescence *in situ* hybridization) (Schönhuber et al., 1997). Uvođenje CARD-FISH tehnike u istraživanje rizosfere omogućilo je preciznu lokalizaciju prirodnih filogenetskih grupa archaea i bakterija na rizoplani riže i povezanog rizosfernog tla (Slika 35A) (Schmidt and Eickhorst, 2014). Iako je broj primjena još ograničen, CARD-FISH može biti od pomoći prilikom praćenja prisutnosti mikroba (Edwards et al., 2015) i strategija kolonizacije rizoplane i endrizosfere (Bao et al., 2014). Dodatno, pristup temeljen na CARD-u koristi zlatne nanočestice (Gold-FISH) (Schmidt et al., 2012) čime je omogućena *in situ* identifikacija i lokalizacija stanica *Rhizobium leguminosarum* na korijenju riže pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (engl. scanning electron microscope, SEM). U još jednom novom pristupu, kombinirana je tradicionalna inokulacija bakterijama obilježenim zelenim fluorescentnim proteinom (engl. green fluorescent protein, GFP) s umjetnim supstratom pod nazivom Nafion. GFP je jedan je od najznačajnijih alata u suvremenoj znanosti za iluminaciju života na staničnoj i molekulskoj razini. Znanstvenici Osamu Shimomura, Martin Chalfie i Roger Y. Tsien nagrađeni su Nobelovom nagradom za kemiju 2008. godine za otkriće i razvoj GFP-a. Eksitiran plavim ili UV-svjetlom ovaj protein fluorescira u zelenom dijelu spektra. Budući da je GFP uglavnom netoksičan za stanice, te se može eksprimirati u raznim organizmima, njegova upotreba omogućuje praćenje biokemijskih i bioloških procesa u gotovo svim živim stanicama i organizmima (Biljan and Pravdić, 2008). Nafion je sintetički polimer otkriven još 60-tih godina, ali je tek mješanjem s otopinom na vodenoj bazi razvijenoj od strane britanskih znanstvenika postao proziran (Slika 36) (Downie et al., 2012). Kombinacijom GFP-a i Nafiona prevladava se neprozirnost tla i izbjegava destruktivno uzorkovanje i kemijska fiksacija mikrobnih stanica potrebnih za FISH (Tablica 10). Stoga je pomoću fluorescentne mikroskopije prostorna interakcija *Pseudomonas fluorescens* sa korijenjem i česticama „tla“ promatrana nedestruktivno, *in situ* i *in vivo* (Slika 35B) (Downie et al., 2014).



Slika 35 Mikrobna kolonizacija rizoplane i povezanih čestica tla pomoću konfokalne laserske pretražne mikroskopije¹⁴ (engl. confocal scanning laser microscopy, CLSM). (A) *In situ* vizualizacija prirodnih bakterija (zeleno) na rizoplani riže (crveno) pomoću CARD-FISH tehnike (Schmidt and Eickhorst, 2014). (B) *In vivo* detekcija *Pseudomonas fluorescens* stanica inokuliranih zelenim fluorescentnim proteinom (GFP) na površini korijena salate (sivo) i čestice Nafiona (crveno); mjerilo, 150 μm (Downie et al., 2014).



Slika 36 Priprema prozirnog tla za snimanje. Za postizanje prozirnosti koristi se otopina s odgovarajućim optičkim svojstvima (Downie et al., 2012).

Tablica 10 Prednosti i ograničenja metoda snimanja rizosfernih procesa pomoću mikroorganizama (Oburger and Schmidt, 2016).

Metode	Mjerilo	Prednosti	Ograničenja	Primjenjivost na uzorke ^a	Primjenjivost u poljskim uvjetima
FISH	Pojedina mikrobna stanica	Identifikacija, kvantifikacija i vizualizacija stanica <i>in situ</i>	Fiksacija (npr. ubijanje) mikrobnih stanica.	Da	Ne
Nafion-GFP	Pojedina mikrobna stanica	Nedestruktivna detekcija i vizualizacija stanica <i>in situ</i> i <i>in vivo</i> .	Potrebna inokulacija genetski modificiranih mikrobnih stanica; umjetni supstrat.	Ne	Ne

^a sonde za uzorkovanje s neporušenim tlom (sa ili bez korijenja)

Kratice: FISH, fluorescence *in situ* hybridisation; GFP, green fluorescent protein.

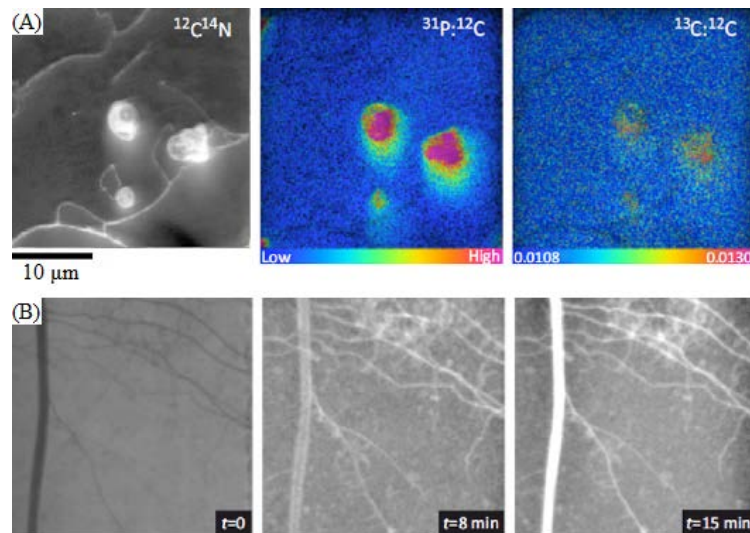
¹⁴ Metoda svjetlosne mikroskopije pomoću koje je moguće detektirati svjetlost emitiranu iz vrlo tankog sloja u uzorku.

3.3.4 Snimanje pomoću izotopa

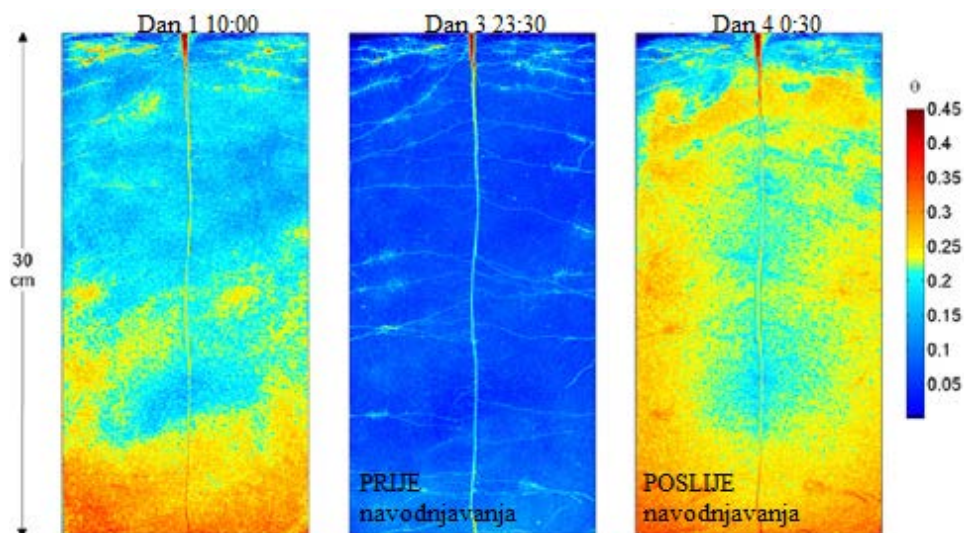
Mjerenja stabilnih izotopa kod destruktivno uzorkovanog tla i korijenja imaju ograničenu prostornu rezoluciju i ne mogu prepoznati procese *in situ* koji se odvijaju u biološki relevantnim mjerilima (Clode et al., 2009). Nova tehnologija, masena spektrometrija sekundarnih iona (engl. nanoscale resolution secondary ion mass spectrometry, NanoSIMS) uvedena je u istraživanja rizosfere čime je omogućeno snimanje raspodjele izotopa u rezoluciji višoj od veličine pojedine stanice (50-100 nm) (Hoppe et al., 2013). Nano označava stupanj rezolucije, a sama SIMS tehnologija se temelji na detekciji iona (sekundarnih iona) izbijenih s površine uzorka za vrijeme bombardiranja površine energetskim ionima (primarnim ionima). Primarni ioni erodiraju površinu, a mali postotak izbačenih atoma ili molekula je ioniziran (sekundarni ioni). Kao izvor primarnih iona uređaj koristi Cs^+ ili O^- ione koji se usmjeravaju na uzorke tla ili korijena, dolazi do erodiranja elementa od interesa, te se proizvode sekundarni ioni koji se prikupljaju prema atomskoj masi. S obzirom na široki raspon elemenata koji se mogu mapirati u visokoj rezoluciji (H, C, N, O, P, Si, S, Fe, i drugi) NanoSIMS predstavlja neophodni instrument za razjašnjavanje interakcija između biljaka i mikroorganizama u rizosferi na nanometarskoj razini. Pulse-labeling je tehnika identifikacije prisustva ciljane molekule „pulsiranjem“ uzorka, odnosno označavanjem uzorka radioaktivnim spojem. Na taj način koriste se radioizotopi za mjerenje stope sinteze spojeva unutar živih stanica. Pulse-labeling eksperimenti u kombinaciji s NanoSIMS-om dopuštaju praćenje usvajanja, pohrane i translokacije stabilnih izotopa, kao i praćenje kompeticije za resursima između biljke i mikroorganizama (Jones et al., 2013). Npr., prijenos hranjivih tvari između arbuskularnih mikoriznih gljiva i biljaka domaćina vizualiziran je *in situ* koristeći NanoSIMS (Slika 37A) (Kaiser et al., 2015; Nuccio et al., 2013). Kombinacijom NanoSIMS-a s mikrobiološkim tehnikama pokazano je da su hranjive tvari translocirane od strane arbuskularnih mikoriznih gljiva imale snažan utjecaj na strukturu bakterijske zajednice i korištenje supstrata. Nedavno su prikazani rezultati istraživanja koje je pokazalo da eksudati korijena ubrzavaju mineralizaciju ugljika u rizosferi odvajanjem kationa iz organometalnih spojeva (Keiluweit et al., 2015). Nadalje, NanoSIMS istraživanja otkrila su da bakterije iste vrste pokazuju iznenađujuću heterogenost kada je u pitanju brzina metabolizma (Musat et al., 2008), što je otkriće koje ima utjecaj na sve aspekte kruženja elemenata u rizosferi. Usprkos velikom potencijalu, primjena NanoSIMS-a je ograničena zbog malog broja uređaja širom svijeta (35 ± 5) (Oburger and Schmidt, 2016).

Još jedna nova metodologija je primjena hladne neutronske radiografije (engl. cold neutron radiography ili low energy neutron radiography, CNR) u kombinaciji s teškom vodom (D_2O) radi određivanja protoka vode u korijenju i rizosfernom tlu. Općenito, neutronska radiografija (NR) je neinvazivna tehnika koja se temelji na registriranju neutrona nakon prolaska kroz ispitivani objekt, te se uz pomoć odgovarajućeg zaslona može proizvesti slika. NR se sastoji od izvora neutrona i sustava za detekciju neutrona koji registrira transmisiju snimku ispitivanog objekta. Princip rada oslanja se na zrake neutrona koji prolaze kroz uzorke, a intenzitet/atenuacija detektirana pomoću neutron detektora pretvara se pomoću CCD kamere u snimke u sivoj skali boja (Esser et al., 2010). NR koja koristi niskoenergetske neutrone¹⁵ naziva se hladna neutronska radiografija (CNR). Korištenje niskoenergetskih neutrona rezultira većom osjetljivošću na vodu (H_2O) sadržanu u biljnom materijalu. Elementi poput vodika, koji je sastavni dio biljaka, relativno dobro apsorbiraju neutrone, imaju veliki atenuacijski koeficijent, te stoga proizvode snimke s velikim kontrastom, čak i za vrlo male količine vode (Matsushima et al., 2009). Zbog sličnosti s vodom, D_2O se odavno koristi za istraživanje protoka vode u biljkama kao kontrast. Za razliku od normalne vode, D_2O ima znatno niži atenuacijski koeficijent neutrona, čime se lako razlikuje u neutron radiogramima (Matsushima et al., 2012). Prilikom usporedbe različitih medija za rast biljaka utvrđeno je da CNR ima najbolju izvedbu u pijesku. Razlog leži u niskoj koncentraciji elemenata koji apsorbiraju neutrone u pijesku. Ustanovljena je i minimalna debljina korijena za detekciju od 0,2 mm (Moradi et al., 2009b). Ograničenje NR predstavlja ili visoki ili niski sadržaj vode u tlu kao rezultat povišenog raspršenja (engl. scattering) neutrona i dehidracije korijena. Primjene NR uz D_2O otkrile su nejednoliko usvajanje vode duž korijenovog sustava, pri čemu se javljaju veći radijalni protoci na proksimalnim nego na distalnim segmentima korijena (Slika 37B) (Zarebanadkouki et al., 2013). Nadalje, koristeći NR u više je navrata pokazano da, za razliku od prethodnih pretpostavki, sadržaj vode u tlu u blizini korijenja tijekom perioda sušenja ostaje viši, te da rizosfera tijekom ponovnog vlaženja ispoljava nejednoliko hidrofobnost duž korijenja (Slika 38 i 39) (Carminati, 2013; Zarebanadkouki and Carminati, 2014). Autoradiografija tla (snimanje pomoću radioizotopa), iako nije nova tehnika, nedavno je zamijenila tradicionalne rendgenske filmove s filmovima s fosforom koji se temelje na fotoinduciranoj kemiluminiscenciji i otprilike su dva reda veličine osjetljiviji na β - i γ -zrake. Takve snimke korištene su za vizualizaciju alokacije fotoasimilata u korijenje i pripadajuće rizosferno tlo (Pausch and Kuzyakov, 2011).

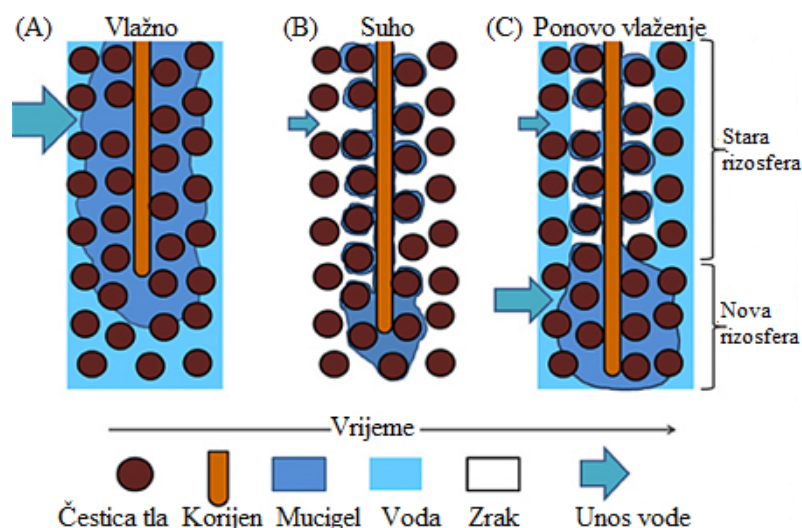
¹⁵ Tzv. neutrone spore energije.



Slika 37 Snimanje procesa u rizosferi pomoću izotopa. (A) NanoSIMS snimke otkrivaju usvajanje fotoasimiliranog ^{13}C u hife arbuskularne mikroizne gljive koja naseljava korteks korijena pšenice *Triticum aestivum*; $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ snimka u sivoj skali boja i odgovarajuće $^{31}\text{P}:$ ^{12}C i $^{13}\text{C}:$ ^{12}C snimke prikazane u HSV (hue, saturation, value) modelu boja pokazuju lokaciju i obogaćivanje (plavo:nisko; ružičasto:visoko) prirodno brojnih (^{31}P) i ekperimentalno obogaćenih (^{13}C) stabilnih izotopa (Kaiser et al., 2015); (B) Vremenska serija neutronske radiografije prikazuje protok teške vode (D_2O) u proksimalne dijelove korijena lupine tijekom noći. Svjetlije boje u bočnom korijenju (npr. veći omjer $\text{D}_2\text{O}:$ H_2O) vidljive 15 min. nakon obilježavanja pokazuju da je radijalni transport D_2O u glavni korijen značajno sporiji nego u bočno korijenje (Zarebanadkouki et al., 2013).



Slika 38 Neutron radiografska snimka korijena lupine tijekom i poslije navodnjavanja. Prvi dan zabilježen je viši sadržaj vode oko gornjeg dijela korijena. Poslije navodnjavanja (dan 4) rizosfera gornjeg dijela korijena i proksimalnih dijelova donjeg korijena je ostala suha. Vidljivo je područje s višim sadržajem vode oko vrha korijena i vlaženje rizosfere uz niže dijelove korijena (Carminati, 2013). Preuredila D. Erić, 2016.



Slika 39 Hipotetska distribucija mucigela i vode u rizosferi tijekom ciklusa sušenja i vlaženja. (A) Eksudirani mucigel s vrha korijena difundira kroz matriks tla; (B) Unošenjem vode u korijen tlo postaje suho, mucigel dehidrira i stisne se oko korijena i čestica tla u blizini korijena (rizosfera). Sušenjem tla mucigel stari, postaje krut i odbija vodu; (C) Poslije navodnjavanja, stari mucigel ponovo se sporo navlaži i rizosfera privremeno ostane suha, ograničavajući lokalno usvajanje vode. Svježe eksudirani mucigel koji prekriva vrh korijena brzo se ponovo navlaži što može povećati usvajanje vode oko vrha korijena (Carminati, 2013). Preuredila D. Erić, 2016.

Prednosti i ograničenja metoda snimanja rizosfernih procesa pomoću izotopa kao i pregled opisanih obećavajućih kombinacija metoda nalaze se u Tablici 11 i 12.

Tablica 11 Prednosti i ograničenja metoda snimanja rizosfernih procesa pomoću izotopa (Oburger and Schmidt, 2016).

Metode	Mjerilo	Prednosti	Ograničenja	Primjenjivost na uzorke ^a	Primjenjivost u poljskim uvjetima
NanoSIMS	nm	Osjetljivo mjerenje raspodjele izotopa; visoka rezolucija.	Skupo; ograničena dostupnost.	Da	Ne
Neutronska radiografija	mm - dm	Neinvazivna i ponavljajuća kvantifikacija tokova vode.	Točnost ovisna o sadržaju vode u tlu i teksturi tla.	Da	Ne
Autoradiografija (fosfor)	cm - dm	Praćenje i vizualizacija hranjivih tvari/ polutanata i spojeva nastalih fotosintezom.	Laboratorij pogodan za rukovanje s radioizotopima ili potrebna dozvola za rad na terenu; zamućenje slike sa izotopima visoke aktivnosti.	Da	Da

^asonde za uzorkovanje s neporušenim tlom (sa ili bez korijenja)

Kratice: NanoSIMS, nanoscale resolution secondary ion mass spectrometry.

Tablica 12 Pregled obećavajućih kombinacija metoda za proučavanje rizosfernih procesa (Oburger and Schmidt, 2016).

Kombinirane metode	Glavna saznanja	Potencijal za buduća istraživanja rizosfere	Referenca
Planarne optode i DGT	Otpuštanje kisika i acidifikacija pod djelovanjem korijena riže povećali su topljivost Fe(II), Pb i As.	Simultano praćenje aktivnosti korijena (pH, O ₂ , kationi) i njegovog utjecaja na prostornu (i) mobilizaciju hranjivih tvari i polutanata u rizosferi.	(Williams et al., 2014)
Planarne optode i NR	Dinamika i iscrpljivanje kisika u rizosferi bijele lupine su vrlo osjetljivi na raspodjelu sadržaja vode.	Istraživanje učinaka promjena sadržaja vode u tlu pod utjecajem korijena na koncentracije O ₂ u tlu.	(Rudolph et al., 2012)
Planarne optode i GFP	Stupanj promjene pH u rizosferi kukuruza i graha manje je izražen kada je korijenje obiju vrsta u interakciji nego kada korijenje ne raste u međusobnoj blizini.	Rasvjetljavanje interakcija između korijenja i njihovog učinka na kemiju rizosfere.	(Faget et al., 2013)
Cimografija i FISH	U rizosferi ječma prostorno su odvojene brojnost bakterija i aktivnosti fosfataze.	Potvrditi ili odbaciti korelaciju o mikrobnoj i enzimatskoj prostornoj raspodjeli na granici između korijena i tla.	(Spohn and Kuzyakov, 2013)
DNA-SIP i HTS	Kontinuirano dodavanje labilnog ugljika u tlo stimulira gubitak prirodnog C i povećava bakterijsku raznolikost tla.	Dobivanje jasnih filogenetskih informacija o u praksi metabolički aktivnim mikroorganizmima.	(Mau et al., 2015)
X-ray μ CT i qPCR*	Akumulacija patogene DNA u tlu uzrokuje smanjenje broja korijenja, volumen i površinu kod pšenice i uljane repice.	Detekcija i vizualizacija učinka patogena i PGPR na zdravlje korijena <i>in situ</i> .	(Sturrock et al., 2015)

* PCR dijagnostika uključuje identificiranje znakove infekcije patogena DNA u biološkom materijalu.

Kratice: DGT, diffusive gradient in thin films; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; GFP, green fluorescent protein; HTS, high-throughput sequencing; SIP, stable isotope probing; PGPR, plant growth promoting rhizobacteria; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; X-ray μ CT, X-ray micro-computed tomography.

4 ZAKLJUČAK

Korijenje je skriveno u tlu i ne može se izravno promatrati. Tijekom posljednja dva desetljeća postignut je ogroman napredak u razvoju metoda i tehnika za uzorkovanje rizosfere. Napredak se odnosi na minijaturizaciju tehnika uzorkovanja, te uvođenje biosenzora i tehnika snimanja za otkrivanje pH i redoks promjena u rizosferi, enzimatske aktivnosti ili sastava elemenata i dostupnosti hranjivih tvari. Međutim, većina saznanja potječe od eksperimenata provedenih u laboratorijskim uvjetima. Iako se broj studija koje koriste tlo kao supstrat za uzgoj biljaka značajno povećao tijekom proteklog desetljeća, rijetka su istraživanja u stvarnim poljskim uvjetima. Razlog vjerovatno leži u činjenici da mnoge analitičke alate koji se uspješno primjenjuju za proučavanje rizosfere u laboratorijskim uvjetima nije lako primjeniti u poljskim uvjetima. Rad u poljskim uvjetima zahtijeva robusne rutinske metode za obradu velikog broja uzoraka koje u obzir uzimaju heterogenost i varijabilnost pojedinih položaja u tlu. Drugi ograničavajući faktor proizlazi iz samog postupka uzorkovanja. Npr. rizoboks sustavi ili prozori za promatranje korijena koji se koriste za *in situ* tehnike uzorkovanja ne mogu se nužno smatrati identičnim u odnosu na prirodne uvjete rasta biljaka (Neumann et al., 2009). Iako mnoge od predstavljenih metoda nisu direktno primjenjive u poljskim uvjetima, mogu se koristiti za analizu (strukturno netaknutih) uzoraka uzetih u polju (npr. tehnike pomoću izotopa ili mikroorganizama) s ciljem boljeg razumijevanja potencijalnih razlika i podudarnosti rizosfernih procesa između kontroliranih laboratorijskih ili stakleničkih uvjeta i poljskih uvjeta. Borba s nehomeogenim površinama tla *in situ* sputava točnu primjenu tehnika vizualizacije rizosfernih procesa u poljskim uvjetima, što se posebno odnosi na tehnike kemijskog snimanja. Ipak, napredne tehnike za identifikaciju, praćenje i vizualizaciju promjena u rizosferi znatno su pridonijele razumijevanju složenih interakcija između korijenja i tla. Unatoč ogromnom potencijalu predstavljenih metoda, prikupljanje podataka često je vremenski zahtijevno i skupo, te stoga ograničeno na samo nekoliko analiza u određenom vremenskom razdoblju. Shodno tome, nužna je kritička interpretacija dobivenih rezultata. Također postoji snažna potreba za poboljšanjem analize snimaka, uključujući odgovarajuću statistiku, kako bi se omogućila i dala podrška kvantitativnim zaključcima (Oburger and Schmidt, 2016).

Mnogi znanstvenici slažu se s izjavom da razvoj metoda je i ostaje glavni preduvjet za unaprijeđenje znanosti o rizosferi. Ne postoji idealna metoda za odgovor na sva pitanja. Izbor najbolje metode ovisi o cilju istraživanja. Općenito, što je metoda točnija, to je i mukotrpnija. Često je poželjno i potrebno koristiti dvije metode istovremeno (Helmisaari and Brunner,

2006). Kombinirano korištenje različitih metodoloških pristupa najviše obećava kada je riječ o rasvjetljavanju velikog broja još neotkrivenih procesa na granici između sustava korijen-tlo-mikroorganizmi (Oburger and Schmidt, 2016). To je važno jer tlo predstavlja jednu od posljednjih velikih znanstvenih granica (Science, 2004), dok je rizosfera najaktivniji dio te granice u kojoj biogeokemijski procesi utječu na procese globalnih razmjera (McNear, 2013).

5 LITERATURA

- Ahmed, S., Klassen, T.N., Keyes, S., Daly, M., Jones, D.L., Mavrogordato, M., Sinclair, I., Roose, T., 2016. Imaging the interaction of roots and phosphate fertiliser granules using 4D X-ray tomography. *Plant Soil* 401, 125–134. doi:10.1007/s11104-015-2425-5
- Apostel, C., Dippold, M., Glaser, B., Kuzyakov, Y., 2013. Biochemical pathways of amino acids in soil: Assessment by position-specific labeling and ¹³C-PLFA analysis. *Soil Biol. Biochem.* 67, 31–40. doi:10.1016/j.soilbio.2013.08.005
- Arnold, T., Kirk, G.J.D., Wissuwa, M., Frei, M., Zhao, F.-J., Mason, T.F.D., Weiss, D.J., 2010. Evidence for the mechanisms of zinc uptake by rice using isotope fractionation. *Plant Cell Environ.* 33, 370–381. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02085.x
- Aviani, I., Laor, Y., Raviv, M., 2006. Limitations and Potential of in situ Rhizobox Sampling for Assessing Microbial Activity in Fruit Tree Rhizosphere. *Plant Soil* 279, 327–332. doi:10.1007/s11104-005-2189-4
- Balasoorya, W.K., Denef, K., Huygens, D., Boeckx, P., 2014. Translocation and turnover of rhizodeposit carbon within soil microbial communities of an extensive grassland ecosystem. *Plant Soil* 376, 61–73. doi:10.1007/s11104-012-1343-z
- Bao, Z., Okubo, T., Kubota, K., Kasahara, Y., Tsurumaru, H., Anda, M., Ikeda, S., Minamisawa, K., 2014. Metaproteomic Identification of Diazotrophic Methanotrophs and Their Localization in Root Tissues of Field-Grown Rice Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5043–5052. doi:10.1128/AEM.00969-14
- Bates, G.H., 1937. A Device for the Observation of Root Growth in the Soil [WWW Document]. URL <http://www.nature.com/nature/journal/v139/n3527/abs/139966b0.html> (accessed 9.12.16).
- Biljan, T., Pravdić, V., 2008. Prikazi knjiga: Uvod u infracrvenu spektroskopiju/Helmut Günzler i Hans-Ulrich Gremlich Ecological Economics and Sustainable Development/Herman E. Daly. *Kem. U Ind.* 57, 565–568.
- Blossfeld, S., Gansert, D., Thiele, B., Kuhn, A.J., Lösch, R., 2011. The dynamics of oxygen concentration, pH value, and organic acids in the rhizosphere of *Juncus* spp. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1186–1197. doi:10.1016/j.soilbio.2011.02.007
- Blossfeld, S., Perriguet, J., Sterckeman, T., Morel, J.-L., Lösch, R., 2010. Rhizosphere pH dynamics in trace-metal-contaminated soils, monitored with planar pH optodes. *Plant Soil* 330, 173–184. doi:10.1007/s11104-009-0190-z
- Blossfeld, S., Schreiber, C.M., Liebsch, G., Kuhn, A.J., Hinsinger, P., 2013. Quantitative imaging of rhizosphere pH and CO₂ dynamics with planar optodes. *Ann. Bot.* 112, 267. doi:10.1093/aob/mct047
- Böhm, D.W., 1979. Root Ecology and Root Physiology, in: *Methods of Studying Root Systems, Ecological Studies*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–1. doi:10.1007/978-3-642-67282-8_1
- Boukcim, H., Pagès, L., Mousain, D., 2006. Local NO₃⁻ or NH₄⁺ supply modifies the root system architecture of *Cedrus atlantica* seedlings grown in a split-root device. *J. Plant Physiol.* 163, 1293–1304. doi:10.1016/j.jplph.2005.08.011
- Bowen, G.D., Roriva, A.D., 1991. The Rhizosphere. The Hidden Half of the Hidden Half, in: Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. (Eds.), *Plant Roots: The Hidden Half*. Marcel Dekker, New York, pp. 641–669.
- Bravin, M., 2014. Le RHIZOtest - YouTube [WWW Document]. URL <https://www.youtube.com/watch?v=EmcbkTUaKKM> (accessed 2.10.16).
- Bravin, M.N., Michaud, A.M., Larabi, B., Hinsinger, P., 2010. RHIZOtest: A plant-based biotest to account for rhizosphere processes when assessing copper bioavailability. *Environ. Pollut.* 158, 3330–3337. doi:10.1016/j.envpol.2010.07.029
- Brink, S.C., 2016. Unlocking the Secrets of the Rhizosphere. *Trends Plant Sci.* 21, 169–170. doi:10.1016/j.tplants.2016.01.020
- Briones, A.M., Okabe, S., Umekiya, Y., Ramsing, N.-B., Reichardt, W., Okuyama, H., 2002. Influence of Different Cultivars on Populations of Ammonia-Oxidizing Bacteria in the Root Environment of Rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3067–3075. doi:10.1128/AEM.68.6.3067-3075.2002
- Bucher, M., 2006. Aeroponic culture, in: Luster, J., Finlay, R. (Eds.), *Handbook of Methods Used in Rhizosphere Research*. Swiss Federal Research Institute WSL, Birmensdorf, pp. 119–120.
- Carminati, A., 2013. Rhizosphere wettability decreases with root age: a problem or a strategy to increase water uptake of young roots? *Front. Plant Sci.* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00298
- Cavani, L., Mimmo, T., 2007. Rhizodeposition of *Zea mays* L. as affected by heterosis. *Arch. Agron. Soil Sci.* 53, 593–604. doi:10.1080/03650340701630912
- Chaignon, V., Di Malta, D., Hinsinger, P., 2002. Fe-deficiency increases Cu acquisition by wheat cropped in a Cu-contaminated vineyard soil. *New Phytol.* 154, 121–130.
- Chaignon, V., Hinsinger, P., 2003. A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 32, 824–833.

- Čidić, A., Kisić, I., Klaić, D., Komesarović, B., Mesić, H., Mesić, M., Pernar, N., Vuković, I. (Eds.), 2008. Projekt "Izrada programa trajnog motrenja tala Hrvatske s pilot projektom". LIFE05 TCY/CRO/000105. Pregled provedbe pilot projekta motrenja poljoprivrednih, šumskih i onečišćenih tala. Agencija za zaštitu okoliša, Zagreb.
- CIRAD, 2014. The RHIZOtest - Rhizotest [WWW Document]. URL <http://rhizotest.cirad.fr/en/the-rhizotest> (accessed 9.19.16).
- Clode, P.L., Kilburn, M.R., Jones, D.L., Stockdale, E.A., Cliff, J.B., Herrmann, A.M., Murphy, D.V., 2009. In Situ Mapping of Nutrient Uptake in the Rhizosphere Using Nanoscale Secondary Ion Mass Spectrometry. *PLANT Physiol.* 151, 1751–1757. doi:10.1104/pp.109.141499
- Daly, K.R., Mooney, S.J., Bennett, M.J., Crout, N.M.J., Roose, T., Tracy, S.R., 2015. Assessing the influence of the rhizosphere on soil hydraulic properties using X-ray computed tomography and numerical modelling. *J. Exp. Bot.* 66, 2305–2314. doi:10.1093/jxb/eru509
- Danjon, F., Reubens, B., 2008. Assessing and analyzing 3D architecture of woody root systems, a review of methods and applications in tree and soil stability, resource acquisition and allocation. *Plant Soil* 303, 1–34. doi:10.1007/s11104-007-9470-7
- Darrah, P.R., 1993. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant Soil* 155–156, 1–20. doi:10.1007/BF00024980
- Darwent, M.J., Paterson, E., McDonald, A.J.S., Tomos, A.D., 2003. Biosensor reporting of root exudation from *Hordeum vulgare* in relation to shoot nitrate concentration. *J. Exp. Bot.* 54, 325–334. doi:10.1093/jxb/erg017
- Darwin, C.R., 1880. *The Power of Movements in Plants*. John Murray, London.
- Davison, W., Zhang, H., 1994. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Publ. Online* 10 Febr. 1994 Doi101038367546a0 367, 546–548. doi:10.1038/367546a0
- Degryse, F., Smolders, E., Zhang, H., Davison, W., 2009. Predicting availability of mineral elements to plants with the DGT technique: a review of experimental data and interpretation by modelling. *Environ. Chem.* 6, 198. doi:10.1071/EN09010
- Dessaux, Y., Hinsinger, P., Lemanceau, P., 2009. Rhizosphere: so many achievements and even more challenges. *Plant Soil* 321, 1–3. doi:10.1007/s11104-009-0063-5
- Dessureault-Rompré, J., Nowack, B., Schulin, R., Luster, J., 2006. Modified micro suction cup/rhizobox approach for the in-situ detection of organic acids in rhizosphere soil solution. *Plant Soil* 286, 99–107. doi:10.1007/s11104-006-9029-z
- Dieffenbach, A., Göttlein, A., Matzner, E., 1997. In-situ soil solution chemistry in an acid forest soil as influenced by growing roots of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Plant Soil* 192, 57–61. doi:10.1023/A:1004283508101
- Dinkelaker, B., Hahn, G., Römhild, V., Wolf, G.A., Marschner, H., 1993. Non-destructive methods for demonstrating chemical changes in the rhizosphere I. Description of methods. *Plant Soil* 155, 67–70. doi:10.1007/BF00024985
- Dinkelaker, B., Hengeler, C., Marschner, H., 1995. Distribution and Function of Proteoid Roots and other Root Clusters. *Bot. Acta* 108, 183–200. doi:10.1111/j.1438-8677.1995.tb00850.x
- Downie, H., Holden, N., Otten, W., Spiers, A.J., Valentine, T.A., Dupuy, L.X., 2012. Transparent soil for imaging the rhizosphere. *PLoS One* 7, e44276.
- Downie, H.F., Valentine, T.A., Otten, W., Spiers, A.J., Dupuy, L.X., 2014. Transparent soil microcosms allow 3D spatial quantification of soil microbiological processes *in vivo*. *Plant Signal. Behav.* 9, e970421. doi:10.4161/15592316.2014.970421
- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N.K., Bhatnagar, S., Eisen, J.A., Sundaresan, V., 2015. Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E911–E920. doi:10.1073/pnas.1414592112
- Esser, H.G., Carminati, A., Vontobel, P., Lehmann, E.H., Oswald, S.E., 2010. Neutron radiography and tomography of water distribution in the root zone. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 173, 757–764. doi:10.1002/jpln.200900188
- Faget, M., 2013. Disentangling who is who during rhizosphere acidification in root interactions: combining fluorescence with optode techniques. *Front. Plant Sci.* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00392
- Faget, M., Blossfeld, S., Gillhaussen, P. von, Schurr, U., Temperton, V.M., 2013. Disentangling who is who during rhizosphere acidification in root interactions: combining fluorescence with optode techniques. *Front. Plant Sci.* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00392
- Fitz, W.J., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., 2006. Growth systems, in: Luster, J., Finlay, R. (Eds.), *Handbook of Methods Used in Rhizosphere Research*. Swiss Federal Res. Inst. WSL, Birmensdorf, pp. 9–15.
- Fitz, W.J., Wenzel, W.W., Wieshammer, G., Istenič, B., 2003. Microtome sectioning causes artifacts in rhizobox experiments. *Plant Soil* 256, 455–462.

- Foley, J., 2014. Feeding the World [WWW Document]. Feed. 9 Billion - Natl. Geogr. URL <http://www.nationalgeographic.com/foodfeatures/feeding-9-billion/> (accessed 9.29.16).
- Gahoonia, T.S., Nielsen, N.E., 1991. A method to study rhizosphere processes in thin soil layers of different proximity to roots. *Plant Soil* 135, 143–146. doi:10.1007/BF00014787
- Garmo, Ø.A., Røyset, O., Steinnes, E., Flaten, T.P., 2003. Performance Study of Diffusive Gradients in Thin Films for 55 Elements. *Anal. Chem.* 75, 3573–3580. doi:10.1021/ac026374n
- Generalić, E., 2015. “Fluorescencija”. Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar. [WWW Document]. URL <http://glossary.periodni.com/rjecnik.php?hr=fluorescencija> (accessed 8.21.16).
- Glud, R.N., Ramsing, N.B., Gundersen, J.K., Klimant, I., 1996. Planar optodes: a new tool for fine scale measurements of two-dimensional O₂ distribution in benthic communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 140, 217–226.
- Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., Toulmin, C., 2010. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science* 327, 812. doi:10.1126/science.1185383
- Göttlein, A., 2006. Sampling of Rhizosphere Soil and Collection of Rhizosphere Soil Solution, in: Luster, J., Finlay, R. (Eds.), *Handbook of Methods Used in Rhizosphere Research*. Swiss Federal Research Institute WSL, Birmensdorf, pp. 25–29.
- Göttlein, A., 1998. Determination of free Al³⁺ in soil solutions by capillary electrophoresis. *Eur. J. Soil Sci.* 49, 107–112. doi:10.1046/j.1365-2389.1998.00133.x
- Göttlein, A., Heim, A., Matzner, E., 1999. Mobilization of aluminium in the rhizosphere soil solution of growing tree roots in an acidic soil. *Plant Soil* 211, 41–49. doi:10.1023/A:1004332916188
- Göttlein, A., Hell, U., Blasek, R., 1996. A system for microscale tensiometry and lysimetry. *Geoderma* 69, 147–156. doi:10.1016/0016-7061(95)00059-3
- Gregory, P.J., Hutchison, D.J., Read, D.B., Jenneson, P.M., Gilboy, W.B., Morton, E.J., 2003. Non-invasive imaging of roots with high resolution X-ray micro-tomography. *Plant Soil* 255, 351–359. doi:10.1023/A:1026179919689
- Grinstead, M.J., Hedley, M.J., White, R.E., Nye, P.H., 1982. Plant-induced changes in the rhizosphere of rape (*Brassica napus* var. Emerald) seedlings. *New Phytol.* 91, 19–29.
- Guelke, M., von Blanckenburg, F., 2007. Fractionation of Stable Iron Isotopes in Higher Plants. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1896–1901. doi:10.1021/es062288j
- Guldborg, R.E., Lin, A.S.P., Coleman, R., Robertson, G., Duvall, C., 2004. Microcomputed tomography imaging of skeletal development and growth. *ResearchGate* 72, 250–9. doi:10.1002/bdrc.20016
- Haas, A.F., Gregg, A.K., Smith, J.E., Abieri, M.L., Hatay, M., Rohwer, F., 2013. Visualization of oxygen distribution patterns caused by coral and algae. *PeerJ* 1, e106. doi:10.7717/peerj.106
- Haase, S., Neumann, G., Kania, A., Kuzyakov, Y., Römhild, V., Kandeler, E., 2007a. Elevation of atmospheric CO₂ and N-nutritional status modify nodulation, nodule-carbon supply, and root exudation of *Phaseolus vulgaris* L. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2208–2221. doi:10.1016/j.soilbio.2007.03.014
- Haase, S., Ruess, L., Neumann, G., Marhan, S., Kandeler, E., 2007b. Low-level herbivory by root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) modifies root hair morphology and rhizodeposition in host plants (*Hordeum vulgare*). *Plant Soil* 301, 151–164. doi:10.1007/s11104-007-9431-1
- Hacin, J.I., BOHLOOL, B., Singleton, P.W., 1997. Partitioning of ¹⁴C-labelled photosynthate to developing nodules and roots of soybean (*Glycine max*). *New Phytol.* 137, 257–265.
- Haichar, F. el Z., Roncato, M.-A., Achouak, W., 2012. Stable isotope probing of bacterial community structure and gene expression in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 291–302. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01345.x
- Hakonen, A., Hulth, S., Dufour, S., 2010. Analytical performance during ratiometric long-term imaging of pH in bioturbated sediments. *Talanta* 81, 1393–1401. doi:10.1016/j.talanta.2010.02.041
- Hannula, S.E., Boschker, H.T.S., de Boer, W., van Veen, J.A., 2012. ¹³C pulse-labeling assessment of the community structure of active fungi in the rhizosphere of a genetically starch-modified potato (*Solanum tuberosum*) cultivar and its parental isolate. *New Phytol.* 194, 784–799. doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04089.x
- Hawkins, H.-J., George, E., 1999. Effect of plant nitrogen status on the contribution of arbuscular mycorrhizal hyphae to plant nitrogen uptake. *Physiol. Plant.* 105, 694–700. doi:10.1034/j.1399-3054.1999.105414.x
- Helmisaari, H.S., Brunner, I., 2006. Root Growth and Morphology, in: Luster, J., Finlay, R. (Eds.), *Handbook of Methods Used in Rhizosphere Research*. Swiss Federal Res. Inst. WSL, Birmensdorf, pp. 16–24.
- Hernández, M., Dumont, M.G., Yuan, Q., Conrad, R., 2015. Different Bacterial Populations Associated with the Roots and Rhizosphere of Rice Incorporate Plant-Derived Carbon. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2244–2253. doi:10.1128/AEM.03209-14
- Hiltner, L., 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grunddüngung und Brache. *Arb Dtsch Landw* 98, 59–78.

- Hinsinger, P., 1998. How Do Plant Roots Acquire Mineral Nutrients? Chemical Processes Involved in the Rhizosphere, in: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp. 225–265.
- Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D., Young, I.M., 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant Soil* 321, 117–152. doi:10.1007/s11104-008-9885-9
- Hinsinger, P., Cloutier-Hurteau, B., Jourdan, C., Laclau, J.P., 2012. The roots of our soils. Presented at the Roots to the Future 8th Symposium of the International Society of Root Research, Dundee.
- Hinsinger, P., Gobran, G.R., Gregory, P.J., Wenzel, W.W., 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes: Research review. *New Phytol.* 168, 293–303. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01512.x
- Hofer, C., Santner, J., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., 2015. Localized Metal Solubilization in the Rhizosphere of *Salix smithiana* upon Sulfur Application. *Environ. Sci. Technol.* 49, 4522. doi:10.1021/es505758j
- Hoppe, P., Cohen, S., Meibom, A., 2013. NanoSIMS: Technical Aspects and Applications in Cosmochemistry and Biological Geochemistry. *Geostand. Geoanalytical Res.* 37, 111–154. doi:10.1111/j.1751-908X.2013.00239.x
- Hsieh, J.J.C., Gardner, W.H., Campbell, G.S., 1972. Experimental control of soil water content in the vicinity of root hairs. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 36, 418–421.
- Hummel, J.W., Levan, M.A., Sudduth, K.A., 1989. Minirhizotron Installation in Heavy Soils 32. doi:10.13031/2013.31067
- Ingemann Jensen, S., Kühl, M., Glud, R.N., Jørgensen, L.B., Priemé, A., 2005. Oxidic microzones and radial oxygen loss from roots of *Zostera marina*. *Mar. Ecol.-Prog. Ser. Online* 293, 49–58.
- Inselsbacher, E., Öhlund, J., Jämtgård, S., Huss-Danell, K., Näsholm, T., 2011. The potential of microdialysis to monitor organic and inorganic nitrogen compounds in soil. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1321–1332. doi:10.1016/j.soilbio.2011.03.003
- Iversen, C.M., Murphy, M.T., Allen, M.F., Childs, J., Eissenstat, D.M., Lilleskov, E.A., Sarjala, T.M., Sloan, V.L., Sullivan, P.F., 2012. Advancing the use of minirhizotrons in wetlands. *Plant Soil* 352, 23–39. doi:10.1007/s11104-011-0953-1
- Jehmlich, N., Schmidt, F., Taubert, M., Seifert, J., Bastida, F., von Bergen, M., Richnow, H.-H., Vogt, C., 2010. Protein-based stable isotope probing. *Nat Protoc.* 5, 1957–1966. doi:10.1038/nprot.2010.166
- Jennesson, P.M., Gilboy, W.B., Morton, E.J., Luggar, R.D., Gregory, P.J., Hutchinson, D., 1999. Optimisation of X-ray micro-tomography for the in situ study of the development of plant roots, in: 1999 IEEE Nuclear Science Symposium, 1999. Conference Record. Presented at the 1999 IEEE Nuclear Science Symposium, 1999. Conference Record, pp. 429–432 vol.1. doi:10.1109/NSSMIC.1999.842521
- Johnson, M.G., Tingey, D.T., Phillips, D.L., Storm, M.J., 2001. Advancing fine root research with minirhizotrons. *Environ. Exp. Bot.* 45, 263–289. doi:10.1016/S0098-8472(01)00077-6
- Jones, D.L., Clode, P.L., Kilburn, M.R., Stockdale, E.A., Murphy, D.V., 2013. Competition between plant and bacterial cells at the microscale regulates the dynamics of nitrogen acquisition in wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytol.* 200, 796. doi:10.1111/nph.12405
- Jones, D.L., Dennis, P.G., Owen, A.G., van Hees, P.A.W., 2003. Organic acid behavior in soils – misconceptions and knowledge gaps. *Plant Soil* 248, 31–41. doi:10.1023/A:1022304332313
- Jones, D.L., Hinsinger, P., 2008. The rhizosphere: complex by design. *Plant Soil* 312, 1–6. doi:10.1007/s11104-008-9774-2
- Kage, H., Kochler, M., Stützel, H., 2000. Root growth of cauliflower (*Brassica oleracea* L. botrytis) under unstressed conditions: Measurement and modelling. *Plant Soil* 223, 133–147. doi:10.1023/A:1004866823128
- Kaiser, C., Kilburn, M.R., Clode, P.L., Fuchslueger, L., Koranda, M., Cliff, J.B., Solaiman, Z.M., Murphy, D.V., 2015. Exploring the transfer of recent plant photosynthates to soil microbes: mycorrhizal pathway vs direct root exudation. *New Phytol.* 205, 1537. doi:10.1111/nph.13138
- Kardjilov, N., Hilger, A., Manke, I., Strobl, M., Treimer, W., Banhart, J., 2005. Industrial applications at the new cold neutron radiography and tomography facility of the HMI. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. Accel. Spectrometers Detect. Assoc. Equip.* 542, 16–21. doi:10.1016/j.nima.2005.01.005
- Keiluweit, M., Bougoure, J.J., Nico, P.S., Pett-Ridge, J., Weber, P.K., Kleber, M., 2015. Mineral protection of soil carbon counteracted by root exudates. *Nat. Clim Change* 5, 588–595.
- Kenrick, P., 2002. The Origin of Roots, in: Waisel, Y., Eshel, A., Beeckman, T., Kafkafi, U. (Eds.), *Plant Roots: The Hidden Half*. CRC Press.
- Kessler, A.J., Glud, R.N., Cardenas, M.B., Larsen, M., Bourke, M.F., Cook, P.L.M., 2012. Quantifying denitrification in rippled permeable sands through combined flume experiments and modeling. *Limnol. Oceanogr.* 57, 1217–1232. doi:10.4319/lo.2012.57.4.1217

- Keyes, S.D., Daly, K.R., Gostling, N.J., Jones, D.L., Talboys, P., Pinzer, B.R., Boardman, R., Sinclair, I., Marchant, A., Roose, T., 2013. High resolution synchrotron imaging of wheat root hairs growing in soil and image based modelling of phosphate uptake. *New Phytol.* 198, 1023–1029. doi:10.1111/nph.12294
- Khush, G.S., 2001. Green revolution: the way forward. *Nat. Rev. Genet.* 2, 815–822. doi:10.1038/35093585
- Koebernick, N., Huber, K., Kerkhofs, E., Vanderborght, J., Javaux, M., Vereecken, H., Vetterlein, D., 2015. Unraveling the hydrodynamics of split root water uptake experiments using CT scanned root architectures and three dimensional flow simulations. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00370
- Kuchenbuch, R., Jungk, A., 1982. A method for determining concentration profiles at the soil-root interface by thin slicing rhizospheric soil. *Plant Soil* 68, 391–394. doi:10.1007/BF02197944
- Kuijken, R.C.P., Snel, J.F.H., Heddes, M.M., Bouwmeester, H.J., Marcelis, L.F.M., 2015. The importance of a sterile rhizosphere when phenotyping for root exudation. *Plant Soil* 387, 131–142. doi:10.1007/s11104-014-2283-6
- Langer, I., Syafruddin, S., Steinkellner, S., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., 2010. Plant growth and root morphology of *Phaseolus vulgaris* L. grown in a split-root system is affected by heterogeneity of crude oil pollution and mycorrhizal colonization. *Plant Soil* 332, 339–355. doi:10.1007/s11104-010-0300-y
- Larsen, M., Borisov, S.M., Grunwald, B., Klimant, I., Glud, R.N., 2011. A simple and inexpensive high resolution color ratiometric planar optode imaging approach: application to oxygen and pH sensing. *Limnol. Oceanogr. Methods* 9, 348–360.
- Larsen, M., Santner, J., Oburger, E., Wenzel, W.W., Glud, R.N., 2015. O₂ dynamics in the rhizosphere of young rice plants (*Oryza sativa* L.) as studied by planar optodes. *Plant Soil* 390, 279. doi:10.1007/s11104-015-2382-z
- Lazarević, B., Sturrock, C.J., Poljak, M., Mooney, S.J., 2016. Quantification of Aluminum-Induced Changes in Wheat Root Architecture by X-ray Microcomputed Tomography. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 47, 263–274. doi:10.1080/00103624.2015.1122800
- Li, X.-L., George, E., Marschner, H., 1991. Phosphorus depletion and pH decrease at the root–soil and hyphae–soil interfaces of VA mycorrhizal white clover fertilized with ammonium. *New Phytol.* 119, 397–404.
- Liu, Q., Loganathan, P., Hedley, M.J., Skinner, M.F., 2004. The mobilisation and fate of soil and rock phosphate in the rhizosphere of ectomycorrhizal *Pinus radiata* seedlings in an Allophanic soil. *Plant Soil* 264, 219–229. doi:10.1023/B:PLSO.0000047758.77661.57
- Lombi, E., Susini, J., 2009. Synchrotron-based techniques for plant and soil science: opportunities, challenges and future perspectives. *Plant Soil* 320, 1–35. doi:10.1007/s11104-008-9876-x
- Luster, J., Göttlein, A., Nowack, B., Sarret, G., 2009. Sampling, defining, characterising and modeling the rhizosphere—the soil science tool box. *Plant Soil* 321, 457–482. doi:10.1007/s11104-008-9781-3
- Maeght, J.-L., Rewald, B., Pierret, A., 2013. How to study deep roots—and why it matters. *Front. Plant Sci.* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00299
- Majdi, H., 1996. Root sampling methods - applications and limitations of the minirhizotron technique. *Plant Soil* 185, 255–258. doi:10.1007/BF02257530
- Mance, D., 2014. Characterization of a karst aquifer based on the spatial and temporal variations of hydrogen and oxygen stable isotopes. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Doktorski rad.
- Marschner, H., 2011. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, 3rd Edition | Horst Marschner | ISBN 9780123849052 [WWW Document]. URL <http://store.elsevier.com/Marschners-Mineral-Nutrition-of-Higher-Plants/Horst-Marschner/isbn-9780123849052/> (accessed 2.10.16).
- Marschner, H., 1995. Preface to First Edition, in: *Mineral Nutrition of Higher Plants* (Second Edition). Academic Press, London, pp. v–vi.
- Marschner, H., Römheld, V., 1983. In vivo Measurement of Root-induced pH Changes at the Soil-Root Interface: Effect of Plant Species and Nitrogen Source. *Z. Für Pflanzenphysiol.* 111, 241–251. doi:10.1016/S0044-328X(83)80083-X
- Marsh, K.L., Sims, G.K., Mulvaney, R.L., 2005. Availability of urea to autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as related to the fate of ¹⁴C- and ¹⁵N-labeled urea added to soil. *Biol. Fertil. Soils* 42, 137–145. doi:10.1007/s00374-005-0004-2
- Mason, S., 2016. Soil Phosphorus Availability by DGT | Fact Sheets [WWW Document]. URL <http://soilquality.org.au/factsheets/dgt-phosphorus> (accessed 10.4.16).
- Matsushima, U., Kardjilov, N., Hilger, A., Graf, W., Herppich, W.B., 2012. Application potential of cold neutron radiography in plant science research. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 82, 90–98.
- Matsushima, U., Kardjilov, N., Hilger, A., Lehmann, E.H., Kaestner, A., Herppich, W.B., 2009. Cold neutron radiography for non-destructive analysis of food water status. CIGR Sect. VI Int. Symp. Food Process. Monit. Technol. Bioprocesses Food Qual. Manag. Potsdam Ger.
- Mau, R.L., Liu, C.M., Aziz, M., Schwartz, E., Dijkstra, P., Marks, J.C., Price, L.B., Keim, P., Hungate, B.A., 2015. Linking soil bacterial biodiversity and soil carbon stability. *ISME J.* 9, 1477–1480. doi:10.1038/ismej.2014.205

- McNear, D.H., 2013. The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between [WWW Document]. Nat. Educ. Knowl. Proj. URL <http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-rhizosphere-roots-soil-and-67500617> (accessed 1.31.16).
- Milas, P., 2012. Fitoremedijacija kadmija iz tla upotrebom hiperakumulatorske biljke *Thlaspi caerulescens*. Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Diplomski rad.
- Miró, M., Fitz, W.J., Swoboda, S., Wenzel, W.W., 2010. In-situ sampling of soil pore water: Evaluation of linear-type microdialysis probes and suction cups at varied moisture contents. ResearchGate 7. doi:10.1071/EN09084
- Mooney, S.J., Pridmore, T.P., Helliwell, J., Bennett, M.J., 2012. Developing X-ray Computed Tomography to non-invasively image 3-D root systems architecture in soil. Plant Soil 352, 1–22. doi:10.1007/s11104-011-1039-9
- Moradi, A.B., Conesa, H.M., Robinson, B., Lehmann, E., Kuehne, G., Kaestner, A., Oswald, S., Schulin, R., 2009a. Neutron radiography as a tool for revealing root development in soil: capabilities and limitations. Plant Soil 318, 243–255. doi:10.1007/s11104-008-9834-7
- Moradi, A.B., Conesa, H.M., Robinson, B., Lehmann, E., Kuehne, G., Kaestner, A., Oswald, S., Schulin, R., 2009b. Neutron radiography as a tool for revealing root development in soil: capabilities and limitations. Plant Soil 318, 243–255. doi:10.1007/s11104-008-9834-7
- Morrissey, J.P., Dow, J.M., Mark, G.L., O’Gara, F., 2004. Are microbes at the root of a solution to world food production? EMBO Rep. 5, 922. doi:10.1038/sj.embor.7400263
- Mueller, R., 2011. EMD Team Fact Sheet on Stable Isotope Probing http://www.itrcweb.org/documents/team_emd/SIP_Fact_Sheet.pdf.
- Musat, N., Halm, H., Winterholler, B., Hoppe, P., Peduzzi, S., Hillion, F., Horreard, F., Amann, R., Jørgensen, B.B., Kuypers, M.M., 2008. A single-cell view on the ecophysiology of anaerobic phototrophic bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 17861–17866.
- Naim, M.S., 1965. Development of rhizosphere and rhizoplane microflora of *Aristida coerulescens* in the Libyan desert. Arch. Für Mikrobiol. 50, 321–325. doi:10.1007/BF00509573
- Nestroy, O., Aust, G., Blum, W.E.H., Englisch, M., Hager, H., Herzberger, E., Kilian, W., Nelhiebel, P., Ortner, G., Pecina, E., others, 2011. Systematische Gliederung der Böden Österreichs: (Österreichische Bodensystematik 2000 in der revidierten Fassung von 2011). Österr. Bodenkundl. Ges.
- Neumann, G., 2006a. Construction and setup of rhizoboxes, in: Luster, J., Finlay, R. (Eds.), Handbook of Methods Used in Rhizosphere Research. Swiss Federal Research Institute WSL, Birmensdorf, pp. 143–144.
- Neumann, G., 2006b. Collection of root exudates and rhizosphere soil solution from soil-grown plants, in: Luster, J., Finlay, R. (Eds.), Handbook of Methods Used in Rhizosphere Research. Swiss Federal Research Institute WSL, Birmensdorf, pp. 317–318.
- Neumann, G., George, T.S., Plassard, C., 2009. Strategies and methods for studying the rhizosphere—the plant science toolbox. Plant Soil 321, 431–456. doi:10.1007/s11104-009-9953-9
- Neumann, G., Römheld, V., 2007. The release of root exudates as affected by the plant physiological status, in: Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. (Eds.), The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 23–72.
- NN, Narodne novine. Zakon o autorskom pravu i srodnim pravima (167/03, 79/07, 80/11, 125/11, 141/13, 127/14). Zagreb: Narodne novine.
- Norvell, W.A., Cary, E.E., 1992. Potential errors caused by roots in analyses of rhizosphere soil. Plant Soil 143, 223–231. doi:10.1007/BF00007877
- Nuccio, E.E., Hodge, A., Pett-Ridge, J., Herman, D.J., Weber, P.K., Firestone, M.K., 2013. An arbuscular mycorrhizal fungus significantly modifies the soil bacterial community and nitrogen cycling during litter decomposition: AMF alters soil bacterial community and N cycling. Environ. Microbiol. 15, 1870–1881. doi:10.1111/1462-2920.12081
- Oburger, E., 2014. Root exudates affecting P phytoavailability in soils - biogeochemical mechanisms and experimental approaches. Presentation. http://oebg.boku.ac.at/files/n1_2014_09_gb_tagung_p_phytoavailability_oburger.pdf
- Oburger, E., Dell’mour, M., Hann, S., Wieshammer, G., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., 2013. Evaluation of a novel tool for sampling root exudates from soil-grown plants compared to conventional techniques. Environ. Exp. Bot. 87, 235–247. doi:10.1016/j.envexpbot.2012.11.007
- Oburger, E., Gruber, B., Schindlegger, Y., Schenkeveld, W.D.C., Hann, S., Kraemer, S.M., Wenzel, W.W., Puschenreiter, M., 2014. Root exudation of phytosiderophores from soil-grown wheat. New Phytol. 203, 1161–1174. doi:10.1111/nph.12868
- Oburger, E., Schmidt, H., 2016. New Methods To Unravel Rhizosphere Processes. Trends Plant Sci. 21, 243–255. doi:10.1016/j.tplants.2015.12.005

- Ong, C.K., Black, C.R., Wilson, J. (Eds.), 2015. *Tree-Crop Interactions: Agroforestry in a Changing Climate*, 2 edition. ed. CABI, Wallingford, Oxfordshire. UK ; Boston, MA, USA.
- Pausch, J., Kuzyakov, Y., 2011. Photoassimilate allocation and dynamics of hotspots in roots visualized by ¹⁴C phosphor imaging. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174, 12–19. doi:10.1002/jpln.200900271
- Paya, A.M., Silverberg, J.L., Padgett, J., Bauerle, T.L., 2015. X-ray computed tomography uncovers root–root interactions: quantifying spatial relationships between interacting root systems in three dimensions. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00274
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., van der Putten, W.H., 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Micro* 11, 789–799.
- Phillips, D.L., Johnson, M.G., Tingey, D.T., Biggart, C., Nowak, R.S., Newsom, J.C., 2000. Minirhizotron installation in sandy, rocky soils with minimal soil disturbance. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 761–764. doi:10.2136/sssaj2000.642761x
- Phillips, R.P., Erlitz, Y., Bier, R., Bernhardt, E.S., 2008. New approach for capturing soluble root exudates in forest soils. *Funct. Ecol.* 22, 990–999. doi:10.1111/j.1365-2435.2008.01495.x
- Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P., 2007. *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, Second Edition. CRC Press.
- Polomski, J., Kuhn, N., 2002. Root research methods, in: Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. (Eds.), *Plant Roots: The Hidden Half*. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 295–321.
- Pritchard, S.G., Rogers, H.H., 2000. Spatial and temporal deployment of crop roots in CO₂-enriched environments. *New Phytol.* 147, 55–71.
- Pritchard, S.G., Strand, A.E., McCormack, M.L., Davis, M.A., Oren, R., 2008. Mycorrhizal and rhizomorph dynamics in a loblolly pine forest during 5 years of free-air-CO₂-enrichment. *Glob. Change Biol.* 14, 1252–1264. doi:10.1111/j.1365-2486.2008.01567.x
- Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., Wieshammer, G., Fitz, W.J., Wiczorek, S., Kanitsar, K., Köllensperger, G., 2005. Novel micro-suction-cup design for sampling soil solution at defined distances from roots. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168, 386–391. doi:10.1002/jpln.200421681
- Rais, D., Nowack, B., Schulin, R., Luster, J., 2006. Sorption of Trace Metals by Standard and Micro Suction Cups in the Absence and Presence of Dissolved Organic Carbon. *J. Environ. Qual.* 35, 50–60. doi:10.2134/jeq2005.0040
- Ranjard, L., Poly, F., Nazaret, S., 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res. Microbiol.* 151, 167–177. doi:10.1016/S0923-2508(00)00136-4
- Rasche, F., Lueders, T., Schlöter, M., Schaefer, S., Buegger, F., Gatterer, A., Hood-Nowotny, R.C., Sessitsch, A., 2009. DNA-based stable isotope probing enables the identification of active bacterial endophytes in potatoes: Rapid report. *New Phytol.* 181, 802–807. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02744.x
- Ray, D.K., Mueller, N.D., West, P.C., Foley, J.A., 2013. Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLOS ONE* 8, e66428. doi:10.1371/journal.pone.0066428
- Rengel, Z., Marschner, P., 2005. Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences: Research review. *New Phytol.* 168, 305–312. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01558.x
- Rewald, B., Ephrath, J.E., 2013. Minirhizotron techniques, in: Eshel, A., Beeckman, T. (Eds.), *Plant Roots: The Hidden Half*. CRC Press, New York, p. 42.1-42.15.
- Römheld, V., 1986. pH changes in the rhizosphere of various crop plants in relation to the supply of plant nutrients. *Potash Rev.* 1–12.
- Rudolph, N., Esser, H.G., Carminati, A., Moradi, A.B., Hilger, A., Kardjilov, N., Nagl, S., Oswald, S.E., 2012. Dynamic oxygen mapping in the root zone by fluorescence dye imaging combined with neutron radiography. *J. Soils Sediments* 12, 63–74. doi:10.1007/s11368-011-0407-7
- Rudolph, N., Voss, S., Moradi, A.B., Nagl, S., Oswald, S.E., 2013. Spatio-temporal mapping of local soil pH changes induced by roots of lupin and soft-rush. *Plant Soil* 369, 669–680. doi:10.1007/s11104-013-1775-0
- Santner, J., Larsen, M., Kreuzeder, A., Glud, R.N., 2015a. Two decades of chemical imaging of solutes in sediments and soils – a review. *Anal. Chim. Acta* 878, 9–42. doi:10.1016/j.aca.2015.02.006
- Santner, J., Mannel, M., Burrell, L.D., Hofer, C., Kreuzeder, A., Wenzel, W.W., 2015b. Phosphorus uptake by *Zea mays* L. is quantitatively predicted by infinite sink extraction of soil P. *Plant Soil* 386, 371. doi:10.1007/s11104-014-2271-x
- Santner, J., Zhang, H., Leitner, D., Schnepf, A., Prohaska, T., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., 2012a. High-resolution chemical imaging of labile phosphorus in the rhizosphere of *Brassica napus* L. cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 77, 219–226. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.11.026
- Santner, J., Zhang, H., Leitner, D., Schnepf, A., Prohaska, T., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., 2012b. High-resolution chemical imaging of labile phosphorus in the rhizosphere of *Brassica napus* L. cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 77, 219–226. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.11.026

- Schmidt, H., Eickhorst, T., 2014. Detection and quantification of native microbial populations on soil-grown rice roots by catalyzed reporter deposition-fluorescence *in situ* hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 390–402. doi:10.1111/1574-6941.12232
- Schmidt, H., Eickhorst, T., 2013. Spatio-temporal variability of microbial abundance and community structure in the puddled layer of a paddy soil cultivated with wetland rice (*Oryza sativa* L.). *Appl. Soil Ecol.* 72, 93–102. doi:10.1016/j.apsoil.2013.06.002
- Schmidt, H., Eickhorst, T., Mußmann, M., 2012. Gold-FISH: A new approach for the *in situ* detection of single microbial cells combining fluorescence and scanning electron microscopy. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 518–525. doi:10.1016/j.syapm.2012.04.006
- Schmidt, H., Vetterlein, D., Koehne, J.M., Eickhorst, T., 2015. Negligible effect of X-ray μ -CT scanning on archaea and bacteria in an agricultural soil. *Soil Biol. Biochem.* 84, 21–27.
- Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S., Amann, R., 1997. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3268–3273.
- Schreiber, C.M., Zeng, B., Blossfeld, S., Rascher, U., Kazda, M., Schurr, U., Höltkemeier, A., Kuhn, A.J., 2012. Monitoring rhizospheric pH, oxygen, and organic acid dynamics in two short-time flooded plant species. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 175, 761–768. doi:10.1002/jpln.201000427
- Science, 2004. Soils - The Final Frontier. *Science* 304.
- Shaw, R., Williams, A.P., Jones, D.L., 2014. Assessing Soil Nitrogen Availability using Microdialysis-Derived Diffusive Flux Measurements. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 78, 1797. doi:10.2136/sssaj2014.04.0128n
- Shen, J., Hoffland, E., 2007. *In situ* sampling of small volumes of soil solution using modified micro-suction cups. *Plant Soil* 292, 161–169. doi:10.1007/s11104-007-9212-x
- Smit, A.L., Bengough, A.G., Engels, C., Noordwijk, M. van, Pellerin, S., Geijn, S.C. van de (Eds.), 2000a. *Root Methods: A Handbook*, 2000 edition. ed. Springer, Berlin ; New York.
- Smit, A.L., George, E., Groenwold, J., 2000b. Root observations and measurements at (transparent) interfaces with soil, in: Smit, A.L., Bengough, A.G., Engels, C., Van Noordwijk, M., Pellerin, S., Van de Geijn, S.C. (Eds.), *Root Methods. A Handbook*. Springer, Heidelberg, Germany, pp. 236–271.
- Smit, A.L., Groenwold, J., 2005. Root characteristics of selected field crops: Data from the Wageningen Rhizolab (1990–2002). *Plant Soil* 272, 365–384. doi:10.1007/s11104-004-5979-1
- Smit, A.L., Vamerali, T., 1998. The influence of potato cyst nematodes (*Globodera pallida*) and drought on rooting dynamics of potato (*Solanum tuberosum* L.). *ResearchGate* 9. doi:10.1016/S1161-0301(98)00033-1
- Spohn, M., Carminati, A., Kuzyakov, Y., 2013. Soil zymography – A novel *in situ* method for mapping distribution of enzyme activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 58, 275–280. doi:10.1016/j.soilbio.2012.12.004
- Spohn, M., Kuzyakov, Y., 2013. Distribution of microbial- and root-derived phosphatase activities in the rhizosphere depending on P availability and C allocation – Coupling soil zymography with ^{14}C imaging. *Soil Biol. Biochem.* 67, 106–113. doi:10.1016/j.soilbio.2013.08.015
- Staal, M., Prest, E.I., Vrouwenvelder, J.S., Rickelt, L.F., Kühn, M., 2011. A simple optode based method for imaging O_2 distribution and dynamics in tap water biofilms. *Water Res.* 45, 5027–5037. doi:10.1016/j.watres.2011.07.007
- Stahl, H., Warnken, K.W., Sochaczewski, L., Glud, R.N., Davison, W., Zhang, H., 2012. A combined sensor for simultaneous high resolution 2-D imaging of oxygen and trace metals fluxes: Sandwich sensor manuscript. *Limnol. Oceanogr. Methods* 10, 389–401. doi:10.4319/lom.2012.10.389
- Steinaker, D.F., Wilson, S.D., 2008. Scale and density dependent relationships among roots, mycorrhizal fungi and collembola in grassland and forest. *Oikos* 117, 703–710. doi:10.1111/j.0030-1299.2008.16452.x
- Strömberg, N., 2008. Determination of Ammonium Turnover and Flow Patterns Close to Roots Using Imaging Optodes. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1630–1637. doi:10.1021/es071400q
- Sturrock, C.J., Woodhall, J., Brown, M., Walker, C., Mooney, S.J., Ray, R.V., 2015. Effects of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2-1 on roots of wheat and oil seed rape quantified using X-ray Computed Tomography and real-time PCR. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00461
- Tamburini, F., Pfahler, V., Bünemann, E.K., Guelland, K., Bernasconi, S.M., Frossard, E., 2012. Oxygen Isotopes Unravel the Role of Microorganisms in Phosphate Cycling in Soils. *Environ. Sci. Technol.* 46, 5956–5962. doi:10.1021/es300311h
- Tamburini, F., Pfahler, V., von Sperber, C., Frossard, E., Bernasconi, S.M., 2014. Oxygen Isotopes for Unraveling Phosphorus Transformations in the Soil–Plant System: A Review. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 78, 38. doi:10.2136/sssaj2013.05.0186dgs

- Tandy, S., Brittain, S.R., Grail, B.M., Mcleod, C.W., Paterson, E., Tomos, A.D., 2013. Fine scale measurement and mapping of uranium in soil solution in soil and plant-soil microcosms, with special reference to depleted uranium. *Plant Soil* 368, 471–482. doi:10.1007/s11104-012-1526-7
- Thorup-Kristensen, K., 2006. Root density and rooting depth, root turnover, short term root growth responses, in: Luster, J., Finlay, R. (Eds.), *Handbook of Methods Used in Rhizosphere Research*. Swiss Federal Research Institute WSL, Birmensdorf, pp. 177–178.
- Turpault, M.-P., 2006. Sampling of rhizosphere soil for physicochemical and mineralogical analyses by physical separation based on drying and shaking, in: Luster, J., Finlay, R. (Eds.), *Handbook of Methods Used in Rhizosphere Research*. Swiss Federal Research Institute WSL, Birmensdorf, pp. 196–197.
- Turpault, M.-P., Gobran, G.R., Bonnaud, P., 2007. Temporal variations of rhizosphere and bulk soil chemistry in a Douglas fir stand. *Geoderma* 137, 490–496. doi:10.1016/j.geoderma.2006.10.005
- Valentinuzzi, F., Mimmo, T., Cesco, S., Al Mamun, S., Santner, J., Hoefer, C., Oburger, E., Robinson, B., Lehto, N., 2015. The effect of lime on the rhizosphere processes and elemental uptake of white lupin. *Environ. Exp. Bot.* 118, 85–94. doi:10.1016/j.envexpbot.2015.06.010
- Vamerali, T., Bandiera, M., Mosca, G., 2012. Minirhizotrons in Modern Root Studies, in: Mancuso, S. (Ed.), *Measuring Roots*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 341–361.
- Wagner, M., Horn, M., Daims, H., 2003. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 302–309. doi:10.1016/S1369-5274(03)00054-7
- Wanek, W., Arndt, S.K., 2002. Difference in $\delta^{15}\text{N}$ signatures between nodulated roots and shoots of soybean is indicative of the contribution of symbiotic N_2 fixation to plant N. *J. Exp. Bot.* 53, 1109–1118. doi:10.1093/jexbot/53.371.1109
- Wang, Z., Göttlein, A., Bartonek, G., 2001. Effects of growing roots of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) and European beech (*Fagus sylvatica* L.) on rhizosphere soil solution chemistry. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164, 35–41. doi:10.1002/1522-2624(200102)164:1<35::AID-JPLN35>3.0.CO;2-M
- Wang, Z.Y., Kelly, J.M., Kovar, J.L., 2004. In situ dynamics of phosphorus in the rhizosphere solution of five species. *J. Environ. Qual.* 33, 1387–1392.
- Wenzel, W.W., 2014. *Rhizosphere Processes and Application to Agriculture and Soil Protection*. Beč, Austrija.
- Wenzel, W.W., Sletten, R.S., Brandstetter, A., Wieshammer, G., Stinger, G., 1997. Adsorption of trace metals by tension lysimeters: nylon membrane vs. porous ceramic cup. *J. Environ. Qual. USA*.
- Wenzel, W.W., Wieshammer, G., Fitz, W.J., Puschenreiter, M., 2001. Novel rhizobox design to assess rhizosphere characteristics at high spatial resolution. *Plant Soil* 237, 37–45.
- Wessel-Bothe, S., Pätzold, S., Klein, C., Behre, G., Welp, G., 2000. Adsorption von Pflanzenschutzmitteln und DOC an Saugkerzen aus Glas und Keramik. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163, 53–56. doi:10.1002/(SICI)1522-2624(200002)163:1<53::AID-JPLN53>3.0.CO;2-W
- Widerlund, A., Davison, W., 2007. Size and Density Distribution of Sulfide-Producing Microniches in Lake Sediments. *Environ. Sci. Technol.* 41, 8044–8049. doi:10.1021/es071510x
- Wildenschild, D., Vaz, C.M., Rivers, M.L., Rikard, D., Christensen, B.S.B., 2002. Using X-ray computed tomography in hydrology: systems, resolutions, and limitations. *J. Hydrol.* 267, 285–297. doi:10.1016/S0022-1694(02)00157-9
- Williams, P.N., Santner, J., Larsen, M., Lehto, N.J., Oburger, E., Wenzel, W., Glud, R.N., Davison, W., Zhang, H., 2014. Localized Flux Maxima of Arsenic, Lead, and Iron around Root Apices in Flooded Lowland Rice. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8498–8506. doi:10.1021/es501127k
- Wissuwa, M., Mazzola, M., Picard, C., 2009. Novel approaches in plant breeding for rhizosphere-related traits. *Plant Soil* 321, 409–430. doi:10.1007/s11104-008-9693-2
- Yanai, R.D., Majdi, H., Park, B.B., 2003. Measured and modelled differences in nutrient concentrations between rhizosphere and bulk soil in a Norway spruce stand. *Plant Soil* 257, 133–142. doi:10.1023/A:1026257508033
- Yoshida, T., Yoneyama, T., 1980. Atmospheric dinitrogen fixation in the flooded rice rhizosphere as determined by the N-15 isotope technique. *Soil Sci. Plant Nutr.* 26, 551–559. doi:10.1080/00380768.1980.10431242
- Youssef, R.A., Chino, M., 1988. Development of a new rhizobox system to study the nutrient status in the rhizosphere. *Soil Sci. Plant Nutr.* 34, 461–465. doi:10.1080/00380768.1988.10415701
- Zappala, S., Helliwell, J.R., Tracy, S.R., Mairhofer, S., Sturrock, C.J., Pridmore, T., Bennett, M., Mooney, S.J., 2013. Effects of X-Ray Dose On Rhizosphere Studies Using X-Ray Computed Tomography. *PLoS ONE* 8, e67250. doi:10.1371/journal.pone.0067250
- Zarebanadkouki, M., Carminati, A., 2014. Reduced root water uptake after drying and rewetting. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 177, 227–236. doi:10.1002/jpln.201300249

- Zarebanadkouki, M., Kim, Y.X., Carminati, A., 2013. Where do roots take up water? Neutron radiography of water flow into the roots of transpiring plants growing in soil. *New Phytol.* 199, 1034–1044. doi:10.1111/nph.12330
- Zgorelec, Ž., 2015. Fotografije nastale u sklopu Erasmus⁺ programa mobilnosti, Universität für Bodenkultur. Beč, Austrija.
- Zgorelec, Ž., 2007. Fotografije nastale u sklopu izrade magistarskog rada na ekoinženjerstvu. Kalinovac (Molve), Hrvatska.
- Zhang, H., Davison, W., 1995. Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in Situ Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution. *Anal. Chem.* 67, 3391–3400. doi:10.1021/ac00115a005
- Zhang, H., Zhao, F.-J., Sun, B., Davison, W., Mcgrath, S.P., 2001. A New Method to Measure Effective Soil Solution Concentration Predicts Copper Availability to Plants. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2602–2607. doi:10.1021/es000268q
- Zhu, Q., Aller, R.C., Fan, Y., 2006. A new ratiometric, planar fluorosensor for measuring high resolution, two-dimensional pCO₂ distributions in marine sediments. *Mar. Chem.* 101, 40–53. doi:10.1016/j.marchem.2006.01.002
- Zhu, Y., 2005. A Link Between Citrate and Proton Release by Proteoid Roots of White Lupin (*Lupinus albus* L.) Grown Under Phosphorus-deficient Conditions? *Plant Cell Physiol.* 46, 892–901. doi:10.1093/pcp/pci094

ŽIVOTOPIS

Daria Erić rođena je 14.08.1981. godine u Zagrebu. Nakon završetka osnovne i srednje škole, gimnazije Tituša Brezovačkog, upisuje Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek. Preddiplomski studij na Agronomskom fakultetu, smjer Ekološka poljoprivreda, upisuje 2009. godine. Nakon završetka preddiplomskog studija nastavlja obrazovanje na diplomskom studiju u sklopu kojega provodi dva zimska semestra na studentskoj razmjeni u Beču na Universität für Bodenkultur zahvaljujući Erasmus (2013./14.) i Ceepus (2014./15.) programu mobilnosti. Studentsku praksu obavlja na gospodarstvima u Francuskoj (2011.), Hrvatskoj (2012.) i Velikoj Britaniji (2014.). Tijekom diplomskog studija sudjeluje na dvotjednom Erasmus intenzivnom tečaju (2013.) s ciljem izrade permakulturnog projekta za Neusiedl am See, Austrija. Kao odličan student dobitnik je stipendije za izvrsnost Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH (2009.-2012.), stipendije iz Fonda za darovite studente Sveučilišta u Zagrebu (2012./13.) i „Verein der Freunde der Universität für Bodenkultur“ stipendije (2013./14.). Služi se engleskim, njemačkim i francuskim jezikom. Tijekom obrazovanja bavila se jahanjem, turno skijanjem, speleologijom, te sudjelovala na utrkama u brdskom biciklizmu i trekingu.