

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**Izolacija i karakterizacija endofitskih bakterija
iz soje (*Glycine max* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Dora Krznarić

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**Izolacija i karakterizacija endofitskih bakterija
iz soje (*Glycine max* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Dora Krznarić

Mentor: Prof.dr.sc.Sanja Sikora
Neposredni voditelj: Sanja Kajić, mag.mol.biol.

Zagreb, rujan, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Dora Krznarić**, JMBAG 0178093727, rođen/a dana 03.10.1993. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA ENDOFITSKIH BAKTERIJA IZ SOJE
(GLYCINE MAX L.)**

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studenta/ice **Dora Krznarić**, JMBAG 0178093727, naslova

IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA ENDOFITSKIH BAKTERIJA IZ SOJE

(GLYCINE MAX L.)

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|------------------------------------|---------------------|-------|
| 1. | Prof.dr.sc. Sanja Sikora | mentor | _____ |
| 2. | Sanja Kajić, mag.biol.mol. | neposredni voditelj | _____ |
| 3. | Prof.dr.sc. Milan Poljak | član | _____ |
| 4. | Doc.dr.sc. Klaudija Carović-Stanko | član | _____ |

Zahvala

Želim se zahvaliti svojoj mentorici, prof.dr.sc Sanji Sikori na uloženom trudu, susretljivosti i strpljivosti pri izradi ovog diplomskog rada. Veliku zahvalnost dugujem neposrednoj voditeljici, asistentici Sanji Kajić, mag.biol.mol. na brojim savjetima, prenesenom znanju i stručnoj pomoći prilikom istraživanja i pisanja rada. Zahvaljujem se i cijelom osoblju Zavoda za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta. Hvala i svim prijateljima koji su mi vrijeme tijekom svih godina na fakultetu uljepšali svojim prisustvom. I na kraju upućujem velike zahvale svojoj obitelji koji su mi uvijek pružali bezuvjetnu podršku.

SAŽETAK

Diplomskog rada studentice **Dore Krznarić**, naslova

Izolacija i karakterizacija endofitskih bakterija iz soje (*Glycine max* L.)

Endofitske bakterije koloniziraju unutrašnjost biljnih tkiva, a pritom ne uzrokuju negativne posljedice. Glavni cilj ovih istraživanja je genotipska i fenotipska karakterizacija endofitskih bakterija izoliranih iz različitih sorti soje. Izolirano je ukupno 29 endofita iz tri različita tkiva – korijena, kvržica i stabljike. Genotipska karakterizacija uključila je primjenu sekvenciranja 16S rRNA (*rrs*) gena. Pomoću navedene molekularne metode identificirane su bakterijske vrste i utvrđena je genetska raznolikost unutar populacija endofitskih bakterija na soji. Identificirano je pet skupina bakterija različitih rodova: *Pseudomonas* spp., *Sphingomonas* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Rhizobium* spp. i *Agrobacterium* spp. Od 29 izolata, najveća pripadnost jednoj vrsti pripada skupini roda *Pseudomonas* spp. Svi izolati koji su identificirani kao *B. japonicum*, izolirani su iz korijena i kvržice biljke. Dokazana je uska povezanost rodova *Rhizobium* i *Agrobacterium*. Fenotipska karakterizacija sojeva prikazala je raznolikost i otpornost endofitskih bakterija. Većina izolata je Gram negativna, štapićastog oblika, bez mogućnosti stvaranja kapsule. Dokazana je varijabilnost fenotipskih karakteristika izolata, ali i otpornost prema nepovoljnim uvjetima poput povišene temperature, povećanog sadržaja soli te niske i visoke pH vrijednosti. Prilikom ispitivanja izolata za detekciju fluorescentnog pigmenta dokazano je kako samo bakterije vrste *Pseudomonas* produciraju pigment pod UV svjetlom. Većina sojeva pokazala je tolerantnost na istraživane antibiotike. Većina katalaza pozitivnih izolata pripadaju unutar rodova *Bradyrhizobium* ili *Rhizobium*, dok su katalaza negativni izolati identificirani kao *Pseudomonas*, *Sphingomonas* i *Agrobacterium* spp.. Dokazano je kako 85% ispitanih izolata ne reagira na enzim oksidazu, dok oni koji reagiraju pripadaju vrsti *Pseudomonas* spp. Potrebna je daljnja karakterizacija endofita kako bi se utvrdio njihov utjecaj na razvoj biljke.

Ključne riječi: endofitske bakterije, soja (*Glycine max* L.), sekvenciranje 16S rRNA gena, fenotipska karakterizacija

SUMMARY

Of the master's thesis - student Dora Krznaric, entitled

Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max* L.)

Endophytic bacteria colonize the inside of the tissue without causing any negative effects. The main aim of this study is the genotypic and phenotypic characterization of endophytic bacteria isolated from different soybean cultivar. A total of 29 endophytes were isolated from three different tissues – root, nodule and stem. Genotypic characterization includes using of sequencing 16S rRNA (*rrs*) genes. Bacterial species were identified by using this molecular method and genetic diversity was determined within the population of endophytic bacteria of the soybean. Five different genera of bacteria were identified: *Pseudomonas* spp., *Sphingomonas* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Rhizobium* spp., and *Agrobacterium* spp. From a total of 29 endophytes, most strains were identified as *Pseudomonas* spp. All isolates identified as *B. japonicum* were isolated from the roots and nodules of the plant. The close association between *Rhizobium* and *Agrobacterium* species is proven. The phenotypic characterization of strains shows diversity and resistance of endophytes. Most of the isolates are Gram negative, rod-shaped, without capability of capsule production. The variability of the phenotypic characteristics of isolates was demonstrated, as well as the resistance to adverse conditions such as elevated temperature, increased salt content, and low and high pH values. During the detection of fluorescent pigment, it has been shown that only *Pseudomonas* species produce pigment under UV light. Most strains showed tolerance to the specific antibiotics. Most of the catalase positive isolates belong to *Bradyrhizobium* or *Rhizobium* spp., while the catalase negative isolates belong to the *Pseudomonas*, *Sphingomonas* and *Agrobacterium* spp. It was shown that 85% of the tested isolates do not respond to the enzyme oxidase while those that react to the enzyme belongs to the *Pseudomonas* spp. Further characterization of endophytes is needed to determine their influence on plant development.

Keywords: endophytic bacteria, soybean (*Glycine max* L.), sequencing of 16S rRNA gene, phenotypic characterization

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. PREGLED LITERATURE | 3 |
| 2.1. Endofitske bakterije | 3 |
| 2.2. Dušik i njegovo kruženje u prirodi | 5 |
| 2.3. Biološka fiksacija dušika | 7 |
| 2.3.1. Proces i utjecaj simbiozne fiksacije dušika | 8 |
| 2.3.2. Uspostava simbioznog odnosa između biljke i bakterije..... | 9 |
| 2.4. Bakterije koje potiču biljni rast (PGPR) | 10 |
| 2.5. Opis rodova endofitskih bakterija | 12 |
| 2.5.1. Rod <i>Rhizobium</i> | 12 |
| 2.5.2. Rod <i>Agrobacterium</i> | 12 |
| 2.5.3. Rod <i>Bradyrhizobium</i> | 14 |
| 2.5.4. Rod <i>Pseudomonas</i> | 14 |
| 2.5.5. Rod <i>Sphingomonas</i> | 15 |
| 2.6. Soja (<i>Glycine max</i> L.) | 16 |
| 2.6.1. Proizvodnja soje u svijetu..... | 17 |
| 2.6.2. Proizvodnja soje u Hrvatskoj | 18 |
| 2.6.3. Ekološki uvjeti za proizvodnju soje..... | 19 |
| 2.6.4. Morfološka svojstva soje..... | 20 |
| 2.7. Primjena molekularnih metoda u identifikaciji bakterija | 21 |
| 3. CILJ ISTRAŽIVANJA | 26 |
| 4. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA | 27 |
| 4.1. Izolacija endofitskih bakterija iz biljnog materijala | 27 |
| 4.2. Identifikacija izolata pomoću molekularne metode | 28 |
| 4.2.1. Izolacija genomske DNA..... | 28 |
| 4.2.2. Određivanje koncentracije izolirane DNA..... | 29 |
| 4.2.3. Amplifikacija i sekvenciranje 16S rRNA (<i>rrs</i>) gena | 29 |
| 4.3. Morfološka karakterizacija izolata | 31 |
| 4.3.1. Bojanje po Gramu..... | 31 |
| 4.3.2. Formiranje kapsula | 32 |
| 4.3.3. Produkcija fluorescenskog pigmenta | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4. Otpornost na antibiotike | 33 |
| 4.5. Ekološka karakterizacija izolata | 35 |
| 4.5.1. Rast izolata na različitim pH vrijednostima | 35 |
| 4.5.2. Rast izolata na različitim koncentracijama soli | 35 |
| 4.5.3. Rast izolata na različitim temperaturama..... | 36 |
| 4.6. Biokemijska karakterizacija izolata..... | 36 |
| 4.6.1. Katalaza test | 36 |
| 4.6.2. Oksidaza test | 36 |
| 5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA | 38 |
| 5.1. Analiza sekvenciranja 16S rRNA (<i>rrs</i>) gena..... | 38 |
| 5.2. Fenotipska karakterizacija izolata | 42 |
| 5.2.1. Bojanje po Gramu..... | 42 |
| 5.2.2. Formiranje kapsula | 43 |
| 5.2.3. Produkcija fluorescenskog pigmenta | 44 |
| 5.3. Otpornost na antibiotike | 45 |
| 5.4. Ekološka karakterizacija izolata | 47 |
| 5.4.1. Rast izolata na različitim pH vrijednostima | 47 |
| 5.4.2. Rast izolata na različitim koncentracijama soli | 48 |
| 5.4.3. Rast izolata na različitim temperaturama..... | 50 |
| 5.5. Biokemijska karakterizacija izolata..... | 52 |
| 5.5.1. Katalaza test | 52 |
| 5.5.2. Oksidaza test | 54 |
| 6. ZAKLJUČAK: | 56 |
| 7. LITERATURA:..... | 58 |
| 8. PRILOG | 67 |

1. UVOD

Kao rezultat prekomjernog korištenja mineralnih gnojiva, kvaliteta tla se vremenom osiromašuje zbog zaslanjivanja, akumulacije teških metala i ispiranja nitrata u podzemne vode, a kao rezultat toga može doći do zagađenja tla i eutrofikacije. Osim što se uzrokuje smanjenje plodnosti tla, stvara se niz ekoloških i gospodarskih problema. Ostaci teških metala negativno utječu na mikrofloru tla, a osobito na nodulaciju leguminoza i na bakterije koje fiksiraju dušik koji igra ključnu ulogu u održivosti kvalitete tla. Iz navedenih razloga, u poljoprivredi se smanjuje upotreba kemijskih sredstava, a sve se više pažnje pridaje korištenju prirodnih resursa.

Glavne prednosti održive poljoprivrede su ekološka ravnoteža, povećanje broja korisnih mikroorganizama u tlu te stvaranje zdrave, kvalitetne hrane, bez pesticida i aditiva, koja nije štetna za ljudsko zdravlje (Bhatnagar i Patla 1996). Neadekvatna uporaba mineralnih gnojiva potaknula je sve veću primjenu predsjetvene bakterizacije u cilju korištenja vijabilnih bakterija u obliku mikrobiološkog preparata koji koloniziraju rizosferu kako bi se povećao prinos kultura na ekološki način (Deaker, 2004).

Soja je jedna od leguminoza najbogatijih bjelančevinama i drugim hranjivim sastojcima. Genetska raznolikost soje stvorena je zbog klimatskih i geografskih razlika (Saeki, 2011). Područje rasprostranjenosti uključuje tropske, subtropske, ali i kontinentalne i umjerene klime. Navedenoj leguminozi najbolje odgovaraju duboka, plodna tla, neutralne pH reakcije iako uspijeva i na siromašnijim tlima, ovisno o sortimentu.

Kvržice leguminoza nastaju pod utjecajem simbioznih kvržičnih bakterija koje fiksiraju dušik. Unutar kvržica i korijena nalaze se mnoge simbiotske i endofitske bakterije. Endofiti su bakterije koje vrše kolonizaciju biljaka pomoću bakterijskih ili gljivičnih mikroorganizama, a da pritom ne ugrožavaju biljku. Kod endofitskih bakterija prisutna je diferencijacija obzirom na kompatibilnost s biljkom domaćinom, učinkovitost same simbioze, konkurentnost s ostalim bakterijama u tlu i sposobnosti adaptacije na nepovoljne uvjete. O prisutnosti različitih vrsta endofitskih bakterija u soji ovisi tip uzrokovanog tkiva, starost biljke i vrijeme izolacije (Kuklinsky-Sobral et al. 2004).

Prirodne populacije endofitskih bakterija značajno se razlikuju u svojim fenotipskim karakteristikama stoga je ispitivanje navedenih svojstava također

značajno za selekciju sojeva. Iz navedenih razloga, određuju se razne ekološke karakteristike koje prikazuju podatke o prilagođenosti na razne vanjske čimbenike kao što su pH, temperatura, svjetlost, voda, kisik itd. Također se provode i razni biokemijski i fiziološki testovi koji uključuju testiranje osjetljivosti na antibiotike, bojanje kapsula, oksidaza i katalaza testovi te mnogi drugi.

Primjenom amplifikacije i sekvenciranja 16S rRNA (*rrs*) gena moguća je identifikacija i diferencijacija bakterijskih vrsta te utvrđivanje genetske raznolikosti unutar populacija endofitskih bakterija na soji. Identifikacija i izolacija prirodnih populacija endofita izrazito je važna kako bi se mogli pronaći sojevi otporni na stresne uvjete u tlu.

Pretpostavlja se da su endofitske bakterije genotipski i fenotipski različite te da na raznolikost utječu sorte (Ana i Gabriela) i mjesto izolacije iz različitih biljnih tkiva (korijen, kvržica i stabljika). Otpornost na biotičke i abiotičke čimbenike mogu varirati između različitih endofitskih bakterija uz mogućnost njihove prilagodbe na nepovoljne uvjete u okolišu.

Spoznaja o tome koliko endofitske bakterije imaju koristan učinak za kultivaciju soje izrazito je važna. Pomoću ovog istraživanja, ispitat će se raznolikost endofita u soji (*Glycine max* L.)

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Endofitske bakterije

Endofiti su bakterije koje provode cijeli svoj životni vijek kolonizirajući biljku domaćina, a da pritom ne ugrožavaju biljku. Također, utječu na suzbijanje bolesti biljke, degradaciju kontaminanata i promicanje rasta biljaka.

Pojam “endofiti” (endon, unutar; phyton, biljka) prvi je spomenuo De Bary (1866). Petrotti je 1926. prepoznao rast endofita kao stupanj infekcije i kao blizak odnos s mutualističkom simbiozom. Perotti (1926) je prvi čovjek koji je spomenuo nepatogenu floru u tkivu korijena, dok su Henning i Villforth (1940) dokazali prisutnost bakterija u lišću, stabljici i korijenu potpuno zdrave biljke. Bacon i White (2000) definirali su endofitske bakterije kao mikroorganizme koji koloniziraju unutarnje tkivo biljke, a da pritom ne uzrokuju negativne direktne posljedice, ne uzrokuju štetu ili stjecanje koristi osim što si osiguravaju prebivalište. Ova definicija uključuje bakterije koje migriraju na površini, ali i unutar biljke tijekom njihove endofitske faze. Endofitske bakterije su sposobne ući unutar biljnih stanica kolonizirajući apoplast i intracelularne prostore biljke (Hallmann et al., 1997). Endofiti mogu aktivno ili pasivno kolonizirati biljku, ali i intercelularno ili ekstracelularno. Općenito u biljnom tkivu ima 10^2 do 10^4 živih endofita po gramu (Kobayashi i Palumbo 2000).

Nije poznato imaju li biljke više koristi od endofita u odnosu na kvržične bakterije, no prednosti koje donose endofiti, dobro su prepoznate. Povezanost endofita s biljkama omogućuje potencijalnu primjenu u zaštiti bilja i biološkoj kontroli. Endofitske bakterije se najčešće nalaze u tlu inficirajući biljku-domaćina i kolonizirajući pukotine formirane u čvorištu lateralnog korijenja gdje se brzo šire unutar intracelularnih prostora korijenja (Chi *et al.*, 2005). Postoje drugi ulasci endofita unutar biljke kao što su oštećenja uzrokovana fitopatogenim nematodama ili unutar otvorenih puči lišća (McCulley, 2011). Oštećenja na korijenu pokazala su se kao glavna pristupna točka za bakterijsku kolonizaciju. Formiraju se pri pojavi lateralnih korijenja ili na području elongacije i diferencijacije korijenja. Također, biljka domaćin se razlikuje u svojoj sposobnosti koloniziranja endofitskih bakterija što dodatno upućuje na aktivnu ulogu domaćina u procesu kolonizacije. Izolati endofitskih bakterija sposobni su u većem broju kolonizirati i prepoznati unutarnja

tkiva biljaka nego izolati s površine korijena (Van Peer et al., 1990; Rosenblueth i Martinez-Romero, 2004).

Mnogo mikroorganizama je nađeno unutar biljaka. Osim bakterija, endofitima se smatraju i razne vrste gljiva i aktinomiceta. Varijacije unutar zajednica endofitskih bakterija mogu se pripisati izvoru biljaka, dobi same biljke, vrsti tkiva, vremenu uzorkovanja i stanju okoliša (Kobayashi i Palumbo 2000). Također, varijacija u raznolikosti endofita prisutna je zbog djelovanja različitih faza sazrijevanja specifičnih za svaku biljku što utječe na različitu količinu korijenovih eksudata (Ferreira et al., 2008). Gustoća populacije endofita je vrlo promjenjiva, uglavnom ovisno o bakterijskim vrstama i genotipu domaćina ali također i o fazi razvoja domaćina, gustoći inokuluma i uvjetima okoline (Pillay i Nowak, 1997; Tan et al, 2003).

Otkriveno je kako određeni endofiti imaju koristan učinak na biljku-domaćina kao što je povećana rezistentnost na patogene i opskrba biljke dušikom. Kako bi primijenili korisne značajke koje nose endofitske bakterije, potrebno je provesti niz istraživanja pomoću molekularnih metoda te morfoloških i biokemijskih testova. Međutim, treba obratiti pozornost na činjenicu kako je poznavanje endofitskih bakterija još uvijek limitirano. Endofitske bakterije mogu imati simbiozno djelovanje, ali i mogu djelovati kao bakterije koje potiču biljni rast - PGPR (*plant-growth promoting rhizobacteria*).

Endofiti se značajno razlikuju u otpornosti na pH okoliša, ali i salinitet u tlu ili ekstremne temperature (Zahran, 1999). Jedan od najviše istraživanih čimbenika koji utječu na rast bakterija je pH. Veći broj leguminoza zahtijeva blago kiselo ili neutralnu pH reakciju tla (Bordeleau i Prevost, 1994). Iako kiselost može biti ograničavajući faktor, isto tako se i alkalna reakcija može negativno odraziti na rast i razvoj biljke. Također, nepovoljna temperatura može biti limitirajući faktor za pojedine endofitske bakterije. Na endofitsku populaciju utječe nekoliko čimbenika: stadij razvojne faze u kojoj se biljka uzima za izolaciju endofita, uvjeti okoliša i lokalitet biljke.

Prema istraživanju koje su proveli Almeida Lopes (2016), provedeno je sekvenciranje 16S rRNA gena u svrhu identifikacije endofitskih bakterija izoliranih iz korijena, stabljike i lišća soje. Otkriveno je kako od ukupno 54 izolata, većina njih pripada vrsti *Enterobacter ludwigii* i *Variovorax paradoxus*. U istraživanju provedenom u Kini, temeljem filogenije 16S rRNA gena, identificirano je šest

endofitskih bakterija koje pripadaju skupini unutar pet rodova: *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum* i *Bacillus* (Zhao 2017). Kulkarni i Dalal (2012) izolirali su 21 endofitsku bakteriju iz soje. Identificirano je 5 različitih rodova: *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Bacillus* i *Klebsiella* spp.

Mundt i Hikle (1976) objavili su kako postoji 46 različitih bakterijskih vrsta unutar 27 različitih biljaka. *Enterobacter* spp. je identificiran kao endofitska bakterija kod nekoliko biljaka među kojima su naranča, soja i druge poljoprivredne kulture (Araujo *et al.*, 2002). Prema Hung *et al.* (2007) izolirano je 35 endofitskih bakterija s površinskih i steriliziranih dijelova korijena, nodula i stabljike od kultiviranih i nekultiviranih biljaka soje. Korištene su dvije vrste soje, *Glycine max* L. i *Glycine soja* L. koja je nedomesticirana, divlja biljka soje. Među izoliranim endofitima izoliranih iz *Glycine max* L., genetska varijacija bila je viša nego kod *Glycine soja* L. Hung *et al.* (2007) je izolirao endofitske bakterije iz sojinih kultivara gdje je svih 65 bakterija prikazalo sposobnost proizvodnje enzima celulaze i pektinaze. Sedamnaest izolata od *Glycine max* L. i tri izolata od *G. soja* L. bili su pozitivni na hidrolizu koja se dokazala na pektin agaru. Prilikom rasta na agaru celuloze, 28 endofita iz *G. max* L. i 16 iz *G. soje* L. imali su mogućnost rasta koristeći C-izvor uz produkciju enzima celulaze, 33% izolata producirali su pektinazu, dok je 70% producirali celulazu.

2.2. Dušik i njegovo kruženje u prirodi

Početakom 80-tih godina prošlog stoljeća, otkriveno je kako endofitske bakterije aktiviraju fiksaciju dušika. Od tada se radi na istraživanju endofitskih bakterija koje imaju sposobnost biološke fiksacije dušika (Olivares *et al.*, 1996).

Opskrba dušikom ključna je za uzgoj usjeva i plodnost tla. Dušik jedan od hranjiva za kojim biljke imaju potrebu u najvećim količinama jer o njemu ovisi razvoj i rast biljke. Dušik se u atmosferi nalazi u elementarnom obliku, ali za biološku asimilaciju se ne može iskoristiti jer ga je potrebno reducirati u trovalentni aminooblik. Dušik u plinovitom obliku (N_2) dosta je stabilan i potrebna je velika količina energije – $946 \text{ kJ} = 226 \text{ Cal}$ (V. Vukadinović 1998), kako bi se oksidirao ili reducirao u druge oblike. Biljke za svoju ishranu mogu usvajati samo nitratni (NO_3^-) i amonijačni (NH_4^+) oblik dušika. No, dušik se lako može vratiti u molekularno stanje u kojem je najstabilniji stoga se lako gubi iz tla. U svim fazama prelaska dušika iz jednog oblika u drugi sudjeluju mikroorganizmi. U prirodnim uvjetima dušik ulazi u

tlo putem biološke fiksacije što izrazito povoljno utječe na rast biljke. U tlu, dušik se nalazi u obliku anorganskih i organskih spojeva. Organski dušik, pod koji spada 99% od ukupnog dušika u tlu, nalazi se u obliku humusa i svježe organske tvari što uključuje nepotpuno razložene biljne i životinjske ostatke.

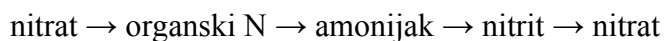
U suvremenoj poljoprivredi primjena dušika gnojidbom je glavna agrotehnička mjera zbog male količine u tlu, a velikih potreba u biljnoj ishrani. Ukupna količina dušika u tlu ovisi o matičnom supstratu, klimi, vegetaciji, topografiji terena. Na smanjenje količine dušika u tlu utječe obrada tla pa dolazi do pojačane oksidacije organske tvari dok se unesenim biljnim materijalom povećava sadržaj dušika.

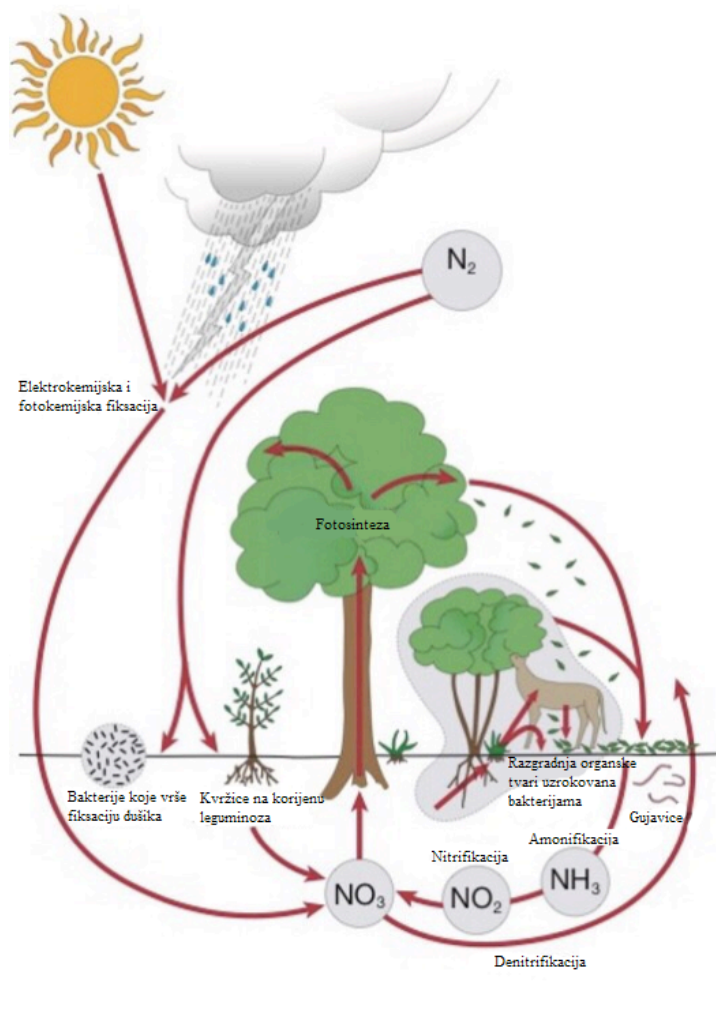
Mehanizam mikrobiološkog vezivanja dušika odvija se uz pomoć enzima nitrogenaze koja je zaslužna za aktivnost mikroorganizama. Enzim nitrogenaza omogućuje redukciju elementarnog dušika do amonijaka:



Ciklus dušika se sastoji od 5 odvojenih reakcija transformacije dušika.. Ciklus započinje asimilacijom dušika odnosno konverzijom NH_3 u organski dušik i biomasu. U kruženju dušika u prirodi, prisutan je i proces amonifikacije u kojem se razgrađuju proteini i ostale organske tvari tla te se izdvaja amonijak kao anorganski spoj. Nitrifikacija je proces biološke oksidacije amonijaka do nitrita (NO_2^-) i nitrata (NO_3^-). Može doći i do denitrifikacija tj. redukcija nitrata i nitrita do elementarnog, plinovitog dušika. Posljedni proces ciklusa dušika je njegova fiksacija.

Kvantitativno najznačajniji put protoka dušika slijedi ovaj ciklus:





Slika 1. Kruženje dušika u prirodi
 Izvor: (<https://montessoridigital.org/mecb21>)

2.3. Biološka fiksacija dušika

Vrlo važna sastavnica kruženja dušika u prirodi upravo je fiksacija dušika, a ujedno je i jedan od praktično primjenjivih i najistraživanijih procesa koji uključuju mikroorganizme. Nakon fotosinteze, biološka fiksacija dušika predstavlja veliki stupanj važnosti bioloških procesa na Zemlji (Graham i Vance, 1999). Biološkom fiksacijom dušika se u potpunosti udovoljava zahtjevima održivog gospodarenja tлом kao što su ekonomičnost, produktivnost, sigurnost i zaštita prirodnih resursa (Redžepović et al 2007). Cilj fiksacije dušika je porast prinosa raznih vrsta

leguminoza, povećanje plodnosti tla i ušteda prilikom potrošnje energije za proizvodnju mineralnih gnojiva.

Godišnje se putem biološke fiksacije veže oko 70% dušika, dok se industrijskom proizvodnjom proizvede tek oko 25% dušika. Poznata su dva tipa fiksacije dušika. Abiotička fiksacija odnosno fiksacija bez prisutnosti mikroorganizama koja se odvija u prirodnim uvjetima putem oborina ili umjetnim uvjetima u industrijskoj proizvodnji. Biološka fiksacija je proces u kojem određene skupine mikroorganizama prevode atmosferski dušik u amonijak koji je dostupan biljci. Mikroorganizmi koji žive slobodno u tlu i vodi te dobivaju energiju za fiksaciju dušika iz organske tvari tla (ugljikohidrati), vrše asimbioznu fiksaciju. Dušik vezan ovim fiksatorima na raspolaganju je svim biljkama, a odnos prema kisiku može biti aeroban i anaeroban. Na samoj površini korijena odvija se asocijativna fiksacija dušika, dok do simbiozne fiksacije dolazi u zajednici biljke i mikroorganizma. Asimbioznom fiksacijom usvaja se oko 50 kgN/ha, asocijativnom otprilike 20-100 kgN/ha, a najveća količina dušika se usvaja simbioznom fiksacijom, čak 100-200 kgN/ha (Sikora, 2014).

2.3.1. Proces i utjecaj simbiozne fiksacije dušika

Dokazano je kako endofitske bakterije aktiviraju fiksaciju dušika. Iz tog razloga, sve se više radi na istraživanju endofitskih bakterija koje imaju koristan učinak na biljku.

Uspostava simbioznog odnosa između leguminoza i kvržičnih bakterija poznata je još od 19. stoljeća. Kvržične bakterije osiguravaju korijenu atmosferski dušik, a zauzvrat iskorištavaju produkte fotosinteze biljke, za vlastiti metabolizam. Razumijevanje mehanizama koji omogućuju mikroorganizmima interakciju među biljkama bitni su za postizanje biotehnološkog potencijala u širokom nizu primjena. Simbioznim odnosom može se godišnje usvojiti i do 350 kg/ha dušika (Halliday J., 1985). Uzajamna korist simbioznog odnosa između leguminoza i rizobija temelji se na stvaranju kvržica (nodula) uglavnom na korijenu biljaka u kojem se odvija proces fiksacije dušika. U većini biljaka, korijen ima najveći broj rizobija u usporedbi s dijelovima biljke iznad površine zemlje (Rosenblueth i Martinez-Romero, 2004).



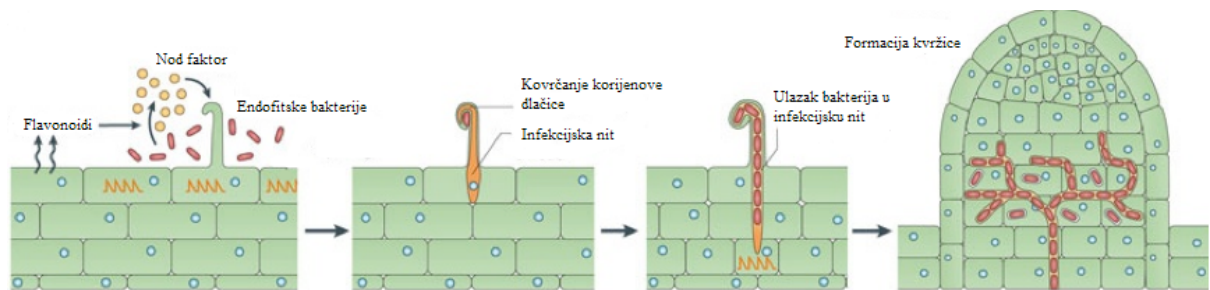
Slika 2. Noduli na korijenu soje (*Glycine max* L.)

Izvor: Fotografija dobivena fazno kontrastnim mikroskopom (Foto: S. Kajić, 2017)

2.3.2. Uspostava simbioznog odnosa između biljke i bakterije

Kako bi se simbiozni odnos ostvario vrlo su važni razni ekološki faktori kao što je voda, svjetlost i temperatura, ali veliku ulogu igra kompetitivnost i efektivnost bakterijske vrste kao i uporaba mineralnih gnojiva i pesticida. Početna faza uspostave simbioznog odnosa je prepoznavanje biljke domaćina i kvržičnih bakterija. Biljka domaćin stvara izlučevine flavonoida iz korijena, dok kvržične bakterije produciraju “nod” faktore. Flavonoidne tvari specifični za biljku soje nazivaju se genisteini i daidzeini, a njihova uloga je odbijanje neodgovarajuće bakterije i privlačenje odgovarajućih, kompatibilnih vrsta. U interakciji s flavonoidima, NodD geni aktiviraju ostale nod gene. Slijedeća faza uspostave simbioznog odnosa je infekcija tj. ulazak bakterija u korijen i formiranje infekcijske niti tijekom koje dolazi do aktiviranja nodulacijskih gena u biljkama. Nastaje kovrčanje korijenovih dlačica uz prisustvo bakterija, a biljka počinje lučiti lecitin koji ima ulogu u vezivanju bakterija za korijen. Aktivacija i ekspresija nodulacijskih gena je izrazito važna jer omogućuje pokretanje reakcija u biljci koje su neophodne za uspješnu infekciju, nodulaciju pa i samu simbioznu fiksaciju (Topol i Kanižai Šarić, 2013). Nakon formiranja, infekcijska nit prvo se širi kroz stanice korijenovih dlačica, prodire u druge stanice

korijena gdje se počinje širiti u svim smjerovima. Bakterije produciraju visoku koncentraciju Nod-faktora što dovodi do stvaranja primordijalne kvržice. Kada infekcijska nit dođe do primordijalne kvržice dolazi do grananja na male ogranke u cilju oslobađanja bakterijskih stanica unutar primordijalne kvržice. Dolazi do stvaranja bakterioda koji vrši fiksaciju dušika jer se kvržične bakterije i dalje intenzivno dijele pa dolazi do procesa nodulacije. Tijekom nastanka bakterioda, dolazi i do sinteze nitrogenaze i leghemoglobina. Primordijalne kvržice se formiraju u zrele kvržice. Učinkovite kvržice su crvene boje koju producira pigment leghemoglobin. Uglavnom su velike i sakupljene na primarnom i gornjem lateralnom korijenju, dok su neučinkovite kvržice iznutra bijele do blijedozelene boje, manje su i vrlo često raspoređene po cijelom korijenovom sustavu. Krajem cvatnje dostiže se maksimalan razvoj kvržice.



Slika 3. Proces infekcije biljke pomoću kvržičnih bakterija; A: prepoznavanje uz pomoć flavonoida i nod faktora; B: kovrčanje korijenove dlačice i stvaranje infekcijske niti; C: ulazak endofitskih bakterija u stanice korijena; D: razmnožavanje rizobija i stvaranje kvržice

Izvor: (<http://jonlieffmd.com/blog/vital-plant-communication-with-bacteria-and-fungus>)

2.4. Bakterije koje potiču biljni rast (PGPR)

Određene endofitske bakterije mogu imati simbiozno djelovanje, ali i mogu djelovati kao bakterije koje potiču biljni rast - PGPR (*plant-growth promoting rhizobacteria*). Endofiti mogu smanjiti ili spriječiti štetne učinke određenih patogenih organizama.

PGPR bakterije povećavaju rast biljaka cirkuliranjem hranjivih tvari i minerala kao što su dušik i fosfat. Također, omogućuju aktivnost solubilizacije fosfata, proizvodnju indol octene kiseline i proizvodnju siderofora (Costa i Loper, 1994). Endofiti također mogu opskrbiti biljku vitaminima i omogućiti proizvodnju fitohormona i biokontrole patogena u rizosferi (Sessitsch et al., 2002). Niz drugih korisnih djelovanja na rast biljaka koji se pripisuju endofitskim bakterijama su osmotska prilagodba, modifikacija morfologije korijena i pojačani unos minerala. Bakterije koje potiču biljni rast najčešće se koriste na području za regeneraciju šuma i za fitoremedijaciju onečišćenih tala.

Inokulacija biljaka pomoću endofitskih bakterija ima pozitivno djelovanje jer može smanjiti gljivične, bakterijske i virusne bolesti, a u nekim slučajevima čak i smanjiti pojavu štete uzrokovanu insektima i nematodama. PGPR bakterije sudjeluju u mehanizmu biokontrole na taj način da koloniziraju unutrašnje dijelove biljnih tkiva i suzbijaju invazivne patogene pomoću antibioze. Odnosno, stvara se odnos između različitih vrsta organizama, pri kojem jedni organizmi sprječavaju rast i razvoj drugih organizama. Učinkovitost endofita kao bioloških kontrolnih agensa ovisi o mnogim čimbenicima koji uključuju: specifičnost domaćina, dinamiku populacije i uzorak kolonizacije domaćina, sposobnost kretanja unutar tkiva domaćina i sposobnost izazivanja rezistencije.

PGPR utječe na rast biljaka izravnim ili neizravnim načinima. Izravni načini uključuju stimulatore rasta, povećanje iskorištavanja hranjivih tvari (oslobađanje fosfata i mikronutrijenata iz netopljivih izvora) i sniženje razine etilena u biljci. Neizravni načini djelovanja PGPR na rast biljaka su proizvodnja antibiotika, proizvodnja biokontrole i degradacija ksenobiotika (Qureshi, 2012).

Pseudomonas fluorescens se pokazao kao potencijalno najperspektivnija skupina PGPR bakterija jer proizvodi antibiotike i siderofore te vrši kompetitivnu kolonizaciju korijena biljaka (Yu et al., 2011).

Mnoge endofitske bakterije se nalaze u različitom biljnom tkivu i imaju naizgled neutralan utjecaj na zdravlje biljke (Surette et al., 2003). Međutim, nekoliko istraživanja je dokazalo kako endofiti nemaju neutralan utjecaj, nego su korisni za biljni rast i razvoj (Ait Barka et al., 2002).

2.5. Opis rodova endofitskih bakterija

2.5.1. Rod *Rhizobium*

U početku su se sve bakterije koje vrše fiksaciju dušika putem kvržičnih nazivale *Rhizobium* spp., i klasificirane su se kao vrste bazirane na konceptu unakrsne inokulacije (Subba Rao, 1993). Od 748 rodova i otprilike 19.000 vrsta mahunarki, gotovo 49% rodova i 16% vrsta su do sada ispitivane za nodulaciju, od kojih je 41% rodova i 14% vrsta pronađeno kako vrše fiksaciju dušika putem kvržičnih bakterija (Yadav i Mowade 2005). Smatraju se najboljim “hranjivima” obzirom na količinu dušika koji fiksiraju. Procijenjeno je kako je 40 do 250 kg N/ha godišnje fiksirano na različitim leguminoznim biljkama uz pomoć bakterija *Rhizobium* spp. Obzirom na ekologiju, vrste roda *Rhizobium* pojavljuju se širom svijeta (čak $10^6 - 10^7$ stanica kvržičnih bakterija/g tla). Sadrže sojeve koji induciraju rast kvržica sa ili bez simbiozne fiksacije dušika. Mnogi geni za nodulaciju (nod) i za fiksaciju (nif) su grupirani na mega plazmidima. Transfer plazmida između vrsta rezultira u ekspresiji i stabilnom nasljeđivanju određenih svojstava i to od vrste koja je donor plazmida.

Vrste roda *Rhizobium* spadaju u asporogene, Gram negativne bakterije. Optimalna temperatura za rast iznosi 25 – 30 °C, dok neki sojevi podnašaju temperaturu i do 40 °C. Optimalni pH za rast je 6 – 7, a raspon iznosi 4 – 10. Kolonije su obično bijele ili bezbojne, okrugle i sluzave, ne iskorištavaju celulozu i škrob. Kemoorganotrofi su što znači da koriste širok raspon ugljikohidrata i soli organskih kiselina kao jedini izvor ugljika bez stvaranja plina. Stvaraju kiselu reakciju na mediju s mineralnim solima koji sadrži manitol ili druge ugljikohidrate. Kao izvor N mogu služiti nitrati, nitriti, amonijeve soli i većina aminokiselina. Prirodni sojevi su često neučinkoviti u fiksaciji, ali mogu biti efikasni u infekciji i nodulaciji pa na taj način ograničavaju rast i razvoj biljke. Postoji uska povezanost rodova unutar porodice *Rhizobiaceae* kao što su *Agrobacterium*, *Rhizobium* i *Sinorhizobium*. Najučestalije vrste roda *Rhizobium* su *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. tropici*, *R. phaseoli*.

2.5.2. Rod *Agrobacterium*

Agrobacterium spp. je poznat po svojoj sposobnosti prijenosa DNA između biljaka. Dijagnostičke sposobnosti bakterije su istražene u biotehnologiji kao sredstvo umetanja stranih gena u biljke. Plazmidna T-DNA koja je prenesena u biljku široko se koristi u genetskom inženjerstvu (Leuzinger 2013). Vršiti se kloniranjem željenog slijeda gena u T-DNA koja će biti umetnuta u DNA domaćina. Taj je postupak izveden korištenjem gena luciferaze iz krijesnice za proizvodnju sjajnih biljaka. Također, luminiscencija se pokazala vrlo korisnom u proučavanju biljne funkcije kloroplasta (Shamloul 2014).

Bakterije roda *Agrobacterium* su štapićastog oblika, asporogeni i Gram negativne. Stvaraju kiselu reakciju na mediju s manitolom. Sojevi unutar navedene vrste mogu biti tumorogeni dok postoje i sojevi koji nisu patogeni i nemaju onkogene plazmide. Sojevi određenih vrsta mogu napadati vrat korijena preko ozljeda uzrokujući transformacije stanica u tumorozne stanice u prisutnosti plazmida koji inducira tumore (Ti- plazmid). Bolesti koje se pojavljuju su tumor vrata korijena ili dlakavost korijena, tumor trske te tumor vinove loze. Oni rijetko uništavaju biljke, ali smanjuju rast, a biljke su često zakržljale što može uzrokovati velik ekonomski gubitak. Tumori su samo-umnoživi i mogu biti preneseni cijepljenjem. Soj Agrocin 84 je komercijalni preparat koji sadrži netumorogeni plazmid pa djeluje protiv vrste *A. tumefaciens* odnosno selektivno inhibira patogene sojeve. *A. tumefaciens* sadrži Ti i Ri plazmide koji određuju patogenost sojeva. Ostale vrste roda *Agrobacterium*: *A. rhizogenes*, *A. vitis* te *A. rubi* kod kojeg se pojavljuju patogeni sojevi samo za biljke iz roda *Rubus* spp. Neki od ostalih sojeva kao npr. *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes* imaju širok spektar biljaka domaćina. *A. tumefaciens* je najčešće proučavana vrsta u ovom rodu.

Patogenost i simbiozna fiksacija dušika su kontrolirani pomoću plazmida stoga je predloženo da se rodovi *Agrobacterium* i *Rhizobium* mogu svrstati u jednu skupinu zbog njihove uske povezanosti (Velazquez et al, 2005). Mnoga mišljenja su podijeljena jer još uvijek postoji konfuzija koji naziv roda treba koristiti. Reklasifikacija je podržana od strane određenih znanstvenika koji se bave sistematikom bakterija, dok drugi (najčešće molekularni biolozi) preferiraju korištenje naziva *Agrobacterium* spp. s kojim su već od prije upoznati (Euzeby, 2013).

2.5.3. Rod *Bradyrhizobium*

Nomenklatura *Rhizobium* vrsta je prvi puta modificirana kada je Jordan (1982) opisao novi rod *Bradyrhizobium* koji je uključivao sve bakterije za fiksiranje dušika u cilju simbiozne fiksacije s biljkama soje. Nomenklatura se još uvijek temelji na fiziološkim osobinama koje se razlikuju od drugih kvržičnih bakterija. Gibson i Harper (1985) pokazali su da različiti sojevi *B. japonicum* imaju različitu toleranciju na primjenu dušika u pogledu nodulacije i fiksacije dušika. Neki sojevi *B. japonicum* pripadaju rijetkim sojevima u prirodi koji uz enzim nitogenazu posjeduju i hidrogenazu pa je fiksacija dušika više učinkovita te mogu oksidirati oslobođeni vodik. Bakterije u simbiozi s leguminoznim biljkama smanjuju emisiju stakleničkih plinova jer zamjenjuje mineralnu gnojidbu za koju je potrebna velika količina CO₂ (Boddey et al. 2009). Bakterije iz roda *Bradyrhizobium* spadaju pod najčešće bakterije koje noduliraju soju. Soja je poželjna kultura u plodoredu jer s bakterijama *B. japonicum* obogaćuje tlo dušikom u iznosu od 40 do 60 kg/ha (Vratarić, Sudarić 2008). Većina bakterija se nalazi u lišću, korijenu, stabljici, sjemenu ili plodovima biljaka koji ne djeluju štetno na biljku.

Štapićastog su oblika, asporogeni, Gram negativni te stvaraju okrugle, neprozirne kolonije na hranjivim podlogama. Podnašaju temperature između 25 i 30 °C, ali mogu rasti i do 35 °C. Optimalan pH iznosi 6 –7, ali toleriraju i kisela tla. Stvaraju alkalnu reakciju na mediju s manitolom. Sojevi ne mogu apsorbirati Congo red boju iz YMA hranjive podloge pa su kolonije bezbojne ili svjetlo roze boje. Također, ne rastu na podlozi s 2% NaCl. Ostvaruju simbiozne odnose sa sljedećim rodovima biljaka: *Glycine*, *Vigna*, *Lotus*. Osim *B. japonicum*, među najpoznatije spadaju vrste *B. elkanii* i *B. liaoningense*.

2.5.4. Rod *Pseudomonas*

Određene vrste *Pseudomonas* bakterija mogu biti asimbiozni i asocijativni fiksatori dušika. U rizosferi imaju stimulativni utjecaj na rast biljaka jer inhibiraju biljne patogene, dok se neke vrste *Pseudomonas* bakterija karakteriziraju kao patogeni.

Bakterije roda *Pseudomonas* su široko rasprostranjene u prirodi, aerobni, štapićastog oblika. Vrste roda *Pseudomonas* mogu biti amonifikatori i dentrifikatori.

U procesu anaerobne respiracije pretvaraju nitratne okside u plinoviti dušik koji se potom vraća u atmosferu (Williams i Wilkins, 2005). Općenito *Pseudomonas* spp. ima brzo generacijsko vrijeme i metabolizira veliki broj supstrata uključujući aromatske ugljikovodike te otrovne organske kemikalije. Stanište im se nalazi u vodi, tlu i unutar biljaka, a često su povezni s kontaminacijom hrane. Vrlo su otporni stoga im odgovara bilo koje stanište s rasponom temperature od 4 do 42 °C. Toleriraju kisela, neutralna i alkalna staništa stoga je optimalan pH za njihov rast između 4 i 8. Uvjeti pod kojima *Pseudomonas* vrste preživljavaju u tlu su također povoljni za rast aerobnih aktinomiceta iz roda *Streptomyces* kao i mnoge druge vrste bakterija. *Pseudomonas* vrste rastu u asocijaciji s navedenim aktinomicetama koji im pružaju izvore ugljika za rast.

Bakterije koje proizvode fluorescentni pigment, uz prisutnost enzima arginin dihidrolaze, a da su ujedno saprofiti su: *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. putida*, *P. aeruginosa* (Buchanan i Gibbons 1975). Vrsta *P. fluorescens* sadrži toplivi zeleni fluorescentni pigment. Neki spojevi su izolirani iz oboljelih biljaka, ali su često izolirani iz kliničkih uzoraka. *P. fluorescens* proizvodi sekundarne metabolite koji poboljšavaju ishranu biljaka i pogoduju razvoju korijena pa se zbog navedene karakteristike može doprinijeti smanjenju uporabe mineralnih gnojiva. Potencijalna korisna primjena *P. fluorescens* je dokazana kod biljnih patogena jer sprečava razvoj spora patogenih gljiva *Alternaria cajani* i *Curvularia lunata* koje rastu na površini biljaka (Srivastava et al, 2009). *P. chlororaphis* producira fluorescentni pigment chlororaphin (Buchanan i Gibbons 1975). Optimalna temperatura za rast iznosi 30 °C, no mogu rasti i na temp 4 °C.

Najrasprostranjenije vrste roda *Pseudomonas* su: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* i *P. putida* koja ima sposobnost bioremedijacije.

2.5.5. Rod *Sphingomonas*

Sphingomonas je bakterija definirana 1990. godine, a do 2001. godine rod je uključivao više od 20 vrsta koje su bile vrlo različite u smislu njihovih filogenetskih, ekoloških i fizioloških svojstava. Oni se zajedničkim imenom nazivaju sphingomonadi. Sphingomonadi su široko rasprostranjeni u prirodi, budući da su izolirani iz mnogih različitih staništa zemlje i vode, kao i od korijenskih sustava biljaka, kliničkih uzoraka i drugih izvora. Imaju visoke sposobnosti za preživljavanje

u niskim koncentracijama hranjivih tvari, kao i sposobnost da metaboliziraju široku lepezu izvora ugljika. Brojni sojevi izolirani su iz okoliša onečišćenih toksičnim spojevima gdje pokazuju sposobnost korištenja kontaminanata kao hranjivih tvari. Zbog njihovih biorazgradivnih i biosintetskih sposobnosti, korišteni su za širok raspon biotehnoloških primjena, od bioremedijacije onečišćivača okoliša do proizvodnje ekstracelularnih polimera koji se široko koriste u hrani i ostalim industrije (Yabuuchi E. Bergyjev prirucnik, 2015).

Stanice bakterija su Gram negativne, okruglog i ovalnog oblika. Striktni su aerobi, katalaza pozitivni, a oksidaza mogu biti i pozitivni i negativni. Mogu preživjeti na vrlo širokom rasponu temperatura, dok im je optimum od 15 do 28 °C. Bakterijama odgovara lagano lužnati pH s optimum između 7 i 8. Samo jedan soj vršio je fiksaciju dušika – *S. azotifigenis*.

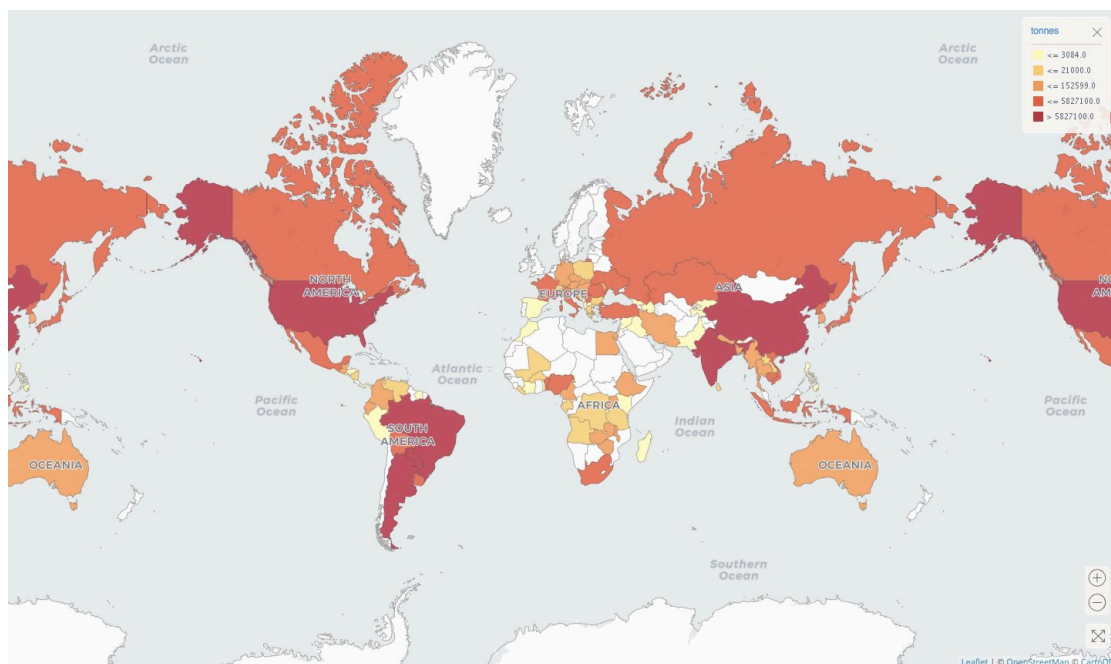
2.6. Soja (*Glycine max* L.)

Soja pripada porodici leguminoza i spada pod vodeću uljnu i bjelančevinastu kulturu jer sadrži 35-50% bjelančevina i 18-24% ulja (Vratarić i Sudarić, 2008). Ima značajnu ulogu u industriji za proizvodnju ulja, ljudskoj prehrani, a najveći dio soje koristi se u hranidbi domaćih životinja. Međutim, u zadnje vrijeme soja se koristi za izravnu ljudsku ishranu, kao što su: sir tofu, sojino mlijeko ili kruh. Soja sadrži bjelančevine najbližnje onima iz životinjskog porijekla, što im daje visoku biološku vrijednost. Agrotehnički značaj soje je u njenom simbioznom odnosu s efektivnim sojevima nitrogenih kvržičnih bakterija *B. japonicum* koje kroz prirodni proces fiksiraju anorganski dušik iz zraka i pretvaraju ga u amonijačni oblik koje biljke mogu usvojiti, a zauzvrat od biljaka crpe ugljikohidrate (Drenjančević, 2016).

Genetska raznolikost soje stvorena je zbog klimatskih i geografskih razlika (Saeki, 2011). Među fiksatorima dušika koji noduliraju soju važno je spomenuti brzorastuće bakterije *Sinorhizobium* (Ensifer): *S. fredii* i *S. xinjiangense*, ali i već poznate spororastuće kvržične bakterije roda *Bradyrhizobium*, najčešćih vrsta *B. japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense* (Youseif i sur., 2014).

2.6.1. Proizvodnja soje u svijetu

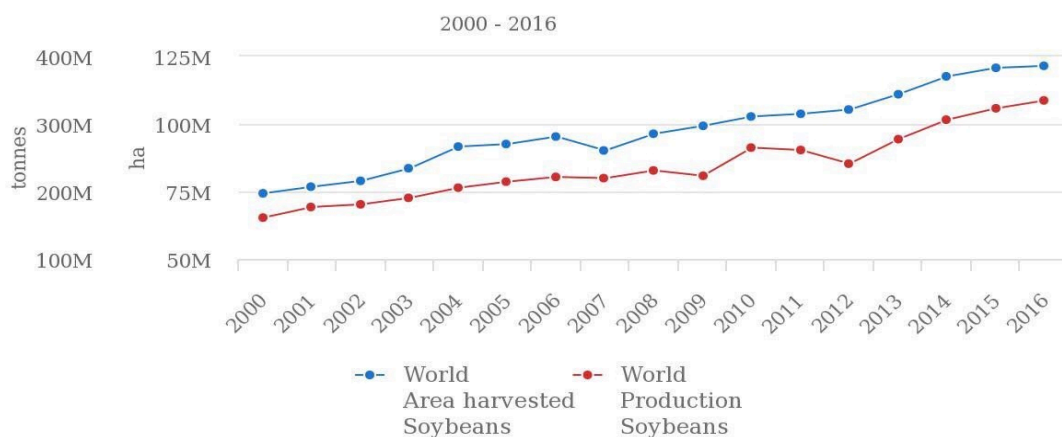
Podrijetlom je iz istočne Azije, gdje se zbog svoje izuzetne hranjive vrijednosti već stoljećima koristi dok se u Europi počinje proizvoditi tek u 19. stoljeću. Sjedinjene Američke Države u zadnjih 60 godina su glavni proizvođač soje u svijetu. Iza SAD-a po površinama proizvodnje soje slijedi: Brazil, Argentina, Kina, Indija i drugi. Spada u ratarsku kulturu koja preradom može biti iskorištena 100% i može se prilagoditi različitim agroekološkim uvjetima te se zbog toga nalazi u velikom broju zemalja. Sve zemlje svijeta koje imaju uvjete za proizvodnju soje nastoje unaprijediti i proširiti njenu proizvodnju, tako da je soja danas važna ekološka i politička kultura (Vratarčić i Sudarić, 2008). Na slici 4 može se primijetiti kako prinos soje ima tendenciju rasta iz godine u godinu.



Slika 4. Proizvodne količine soje na svjetskoj razini 2016. godine: Sjeverna i Južna

Amerika 87,6%, Azija 8,6%, Europa 3,1%, Afrika 0,6%

Izvor: (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>)



Slika 5. Proizvodnja soje u razdoblju od 2000. do 2016. godine

Izvor: (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>)

2.6.2. Proizvodnja soje u Hrvatskoj

Soja se prvi puta na području Hrvatske pojavljuje između 1876 i 1878. godine, a donio ju je austrijski biokemičar Friedrich Haberlant (Vratarić i Sudarić, 2008). Iz toga razdoblja potječu i prva uputstva za proizvodnju soje u Hrvatskoj. Unatoč tome što je soja sijana po privatnim vrtovima i gospodarstvima još od 1910. godine, prema Gutschyju (1950) pokušaji proširenja soje na našem području poduzeti su nakon izgradnje Zagrebačke tvornice ulja 1934. godine. U par navrata dolazilo je do pokušaja značajnijeg povećanja proizvodnje soje u Hrvatskoj, ali su uglavnom završavali neuspješno. Trebalo je dugo vremena kako bi se shvatilo da imamo potencijala za kvalitetnu proizvodnju soje u smislu pogodnih klimatskih i zemljišnih uvjeta. U zadnjih 40 godina, prirast soje je u kontinuitetu iako dosta faktora ovisi o potpori vlade i o samom urodu. Od 1998. godine dogodili su se pozitivni ishodi proizvodnje soje u Hrvatskoj jer su se povećale površine njenog uzgoja. Višegodišnjim oplemenjivačkim radom na soji na Agronomskom fakultetu u Zagrebu i Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku ostvaren je domaći sortiment za proizvodna područja soje. Dakle stvara se genetska osnova za domaće okolišne uvjete jer se sorta najbolje prilagođava u lokalnim uvjetima te iz tog razloga, njen genetski potencijal dolazi do izražaja. Neke od sorata koje imaju najveći urod zrna te visok postotak bjelančevina i ulja su: Korana, Ika, Anica, Zora. U ovom istraživanju korištene su sorte Ana i Gabriela.

Tablica 1: Žetvena površina, ukupna proizvodnja i prirod po hektaru oraničnih usjeva soje u Hrvatskoj od 2013. do 2017. godine

| Godina | Žetvena površina (ha) | Proizvodnja (t) | Prirod (t/ha) |
|--------------|-----------------------|-----------------|---------------|
| 2013. | 47 156 | 111 316 | 2,4 |
| 2014. | 47 104 | 131 424 | 2,8 |
| 2015. | 88 867 | 196 431 | 2,2 |
| 2016. | 78 614 | 244 075 | 3,1 |
| 2017. | 85 133 | 207 765 | 2,4 |

Izvor: Državni zavod za statistiku (<https://www.dzs.hr/>)

2.6.3. Ekološki uvjeti za proizvodnju soje

Navedenoj leguminozi najbolje odgovaraju duboka, plodna tla, neutralne pH reakcije, no uspijeva i na siromašnijim tlima, ovisno. Važnost količine svjetlosti za soju je velika jer o njoj ovise veličina i efikasnost kvržica koje fiksiraju dušik. Prilikom smanjenja svjetlosti kod soje za 50% od uobičajenog, značajno se reducira broj mahuna, grana i najvažnije, kvržica stoga su urodi zrna reducirani do 60% kako navode Kan i Oshima (1952, po Hicksu, 1978). Količina vode je izrazito važna jer sudjeluje u prenošenju hranjivih tvari i izmjeni elemenata iz organa i tkiva u druge, ali i sudjeluje u izmjeni enzimatskih procesa. Za vrijeme klijanja, soja treba apsorbirati 50% više vode od svoje mase kako bi ostvarila rast i razvoj (Vratarić i Sudarić, 2008). S druge strane, višak vode je štetan jer blokira zrak pa dolazi do usporenog rasta. Voda potiče održavanje turgora, što je važan činitelj koji određuje produkciju fotosinteze i rast listova. Kako navodi autor Sunj Sin Dun (1958), soja zahtjeva različite temperature obzirom na stadij razvoja u kojem se nalazi. Minimalne temperature za klijanje iznose 6 – 7 °C, dovoljne 12 – 14 °C, dok su optimalne temperature između 15 i 25 °C. Tokom intenzivnog rasta, soja zahtjeva visoku temperaturu koja iznosi 20 – 25 °C. Cvjetovi i mahune izloženi temperaturi ispod 0 °C zamrzavaju se i oštećuju.

2.6.4. Morfološka svojstva soje

Sadrži čvrst korijenov sustav visoke adsorpcijske sposobnosti, a sastoji se od jakog glavnog vretenastog korijena i velikog broja sekundarnog korijenja koji sežu u dubinu do 180 cm (Vratarić, Sudarić, 2008). No, glavni dio korijenovog sustava se nalazi u rizosfernom gornjem sloju unutar 30 cm gdje apsorbira hranjivu tvar i fiksira dušik u vrijeme rasta i razvoja. Na konačan urod soje utječe rasprostranjenost i veličina korijena, ali i broj korijenovih kvržica unutar kojih se odvija fiksacija dušika. Prema tipu nadzemnih dijelova soje razlikujemo nedovršeni (indeterminirani) i dovršeni (determinirani) tip rasta. Kod indeterminiranog tipa rasta cvatnja počinje na petom nodiju, te biljka dalje postupno raste i cvijeta. Sorte nedovršenog tipa su uglavnom višljeg rasta u odnosu na sorte dovršenog tipa rasta, a rodnost se smanjuje prema vrhu biljke. Kod sorti determinantnog tipa biljke narastu više od 80% pa tek onda procvjetaju na svim nodijima, a poslije početka cvatnje, za svega nekoliko dana, prestaje svaki rast biljke.

Postoje četiri tipa lista koje soja posjeduje: jednostavni primarni listovi, kotiledoni, zalisci, dok većina sorata soje sadrži listove s tri liske. Cvjetovi koje soja sadrži sastavljeni su od čaške, vjenčića, prašnika i tučka te mogu poprimiti bijelu ili ljubičastu boju. Cvjetovi imaju tipičnu građu za mahunarke s karakteristikama da formiraju puno više cvjetova nego što ih mogu razviti u mahune, a kao posljedica tijekom vegetacije opadaju. Mahuna soje može sadržavati najmanje jedno i najviše pet zrna (Vratarić, Sudarić, 2008). Boja mahuna je zelena u sezoni rasta, ali u zriobi varira do crne do svijetlo žute boje. Mahune mogu biti spljoštenog, srpastog ili okruglog oblika. Jako variraju po veličini zbog velikog utjecaja vanjskih činitelja, no na konačni broj mahuna u biljci najviše utječu vlažnost tla.



Slika 6. *Glycine max* L.

Izvor: (<https://www.flickr.com/photos/iita-media-library/6892779038>)

2.7. Primjena molekularnih metoda u identifikaciji bakterija

Raznolikost bakterija prije molekularnih metoda proučavala se tradicionalnim metodama kao što su ispitivanje otpornosti na antibiotike, analizu staničnih proteina te morfoloških i biokemijskih karakteristika. Zbog nemogućnosti razlikovanja vrlo srodnih bakterijskih vrsta i velikog utroška vremena, tradicionalne metode su upotunjene raznim molekularnim metodama jer omogućuju preciznu i bržu identifikaciju. Suvremene molekularne metode se temelje na proučavanju nukleinskih kiselina bakterija stoga nam omogućuju visoku preciznost, brzinu i efikasnost. Dolazi i do mogućnosti otkrića novih, preciznijih metoda jer se svakodnevno izmjenjuju i nadopunjuju.

Razvoj molekularne biologije značajno se unaprijedio proteklih godina zbog inovacije koja je izmijenila biološku znanost, a to je PCR ili lančana reakcija polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction*). PCR omogućuje stvaranje velikog broja kopija DNA sekvence u kratkom vremenskom periodu, koristeći specifični DNA odsječak vrlo male početne koncentracije. Karakteristike kao što su jednostavnost, brzina i visoka točnost učinile su PCR najsvestranijom metodom 21.

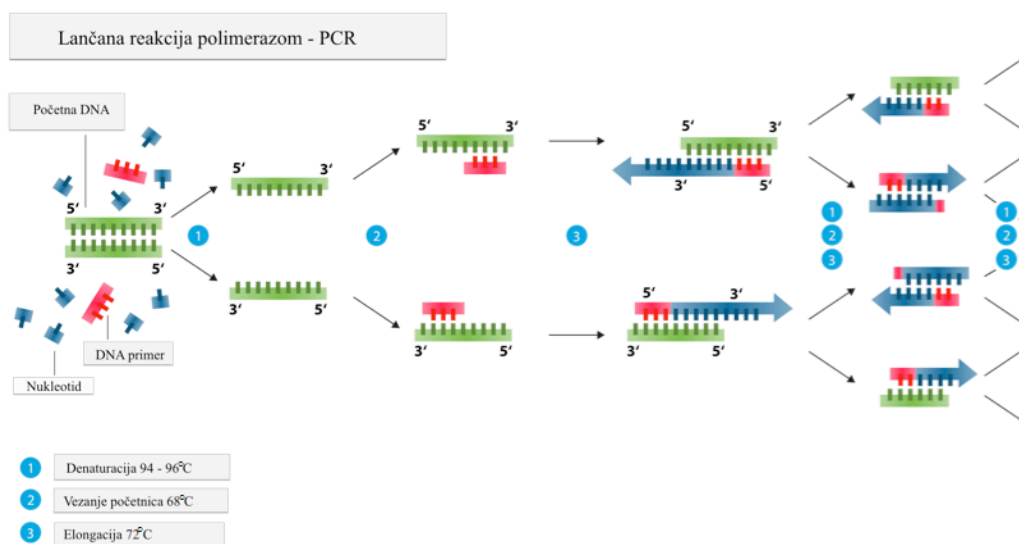
stoljeća. Revolucionarna metoda je otkrivena istraživanjem dr. Kary Mullisa 1986. godine za što je 1993. dobio Nobelovu nagradu (Ambrović Ristov et al, 2007).

Metoda funkcionira odabirom početnih oligonuklotidnih DNA odsječaka koji se nazivaju početnice s graničnim dijelovima početne DNA. Početnice se vežu s nasuprotnim lancima poznate DNA pri određenoj temperaturi, a sinteza nove DNA odvija se u regiji između njih, uz pomoć Taq polimeraze koja je izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus* zbog svoje učinkovitosti na vrlo visokim temperaturama. Svaka DNA molekula sadrži specifičan slijed parova baza (pb) u cilju točnijeg klasificiranja bakterija i opisivanje nekih novih vrsta koje nisu nikada uspješno kultivirane. Duljina i slijed početnica su izrazito važni, a najčešće se koriste početnice od 18 do 24 parova baza. Ako je koncentracija početnica prevelika, veća je vjerojatnost nespecifičnog vezanja početnica na neželjene sekvence kalupa DNA ili međusobno vezivanje početnica. Magnezij je kofaktor ključan za aktivnost Taq DNA polimeraze jer djeluje kao katalizator sparivanja A – T i G – C parova baza. U nedostatku magnezija Taq polimeraza je neaktivna što uzrokuje slab ili nikakav produkt PCR reakcije. Kalup DNA zahtjeva visoku kvalitetu čistoće te su potrebne male količine željenog odsječaka za reakciju.

Kako bi se PCR reakcija mogla odvijati potrebne su određene supstance: reakcijski pufer, magnezijeve soli, smjesa deoksinukleotida u jednakom omjeru (dNTP, dATP, dTTP, dGTP, dCTP), jedan par početnica, Taq polimeraza, DNA kalup (odsječak koji želimo umnožiti) i voda. Mješavina svih sastojaka naziva se reakcijska smjesa odnosno engl. *mastermix*.

Treba obratiti pažnju na razne inhibitore koji usporavaju i zaustavljaju PCR reakcije kao što su: etanol, hemoglobin, urea, natrijev klorid itd. Ukupna DNA nalazi se unutar genoma koji sadrži razne gene s određenim funkcijama. Izrazito su bitni i ribosomi koji se nalaze unutar stanica bakterija jer sadrže rRNA za koju kodiraju rDNA geni. Ribosomi su građeni od male i velike podjedinice veličine 70S (Svedberg). Za prevođenje genetske upute do proteina služi nam mala podjedinica, a sastoji se od 16S RNA podjedinice. Za navedenu regiju kodiraju se 16S rDNA geni koji su važni u procesima identifikacije prokariota. Pomoću 16S rDNA sekvenci, moguća je identifikacija bakterija na razini vrste jer sadrži varijabilne regije specifične za vrstu bakterija. Za amplifikaciju gena koriste se univerzalne PCR početnice koje su specifične za određenu vrstu ili rod.

Ciklus se sastoji od tri različite faze: denaturacija DNA, nakon čega slijedi spajanje početnica te na kraju se odvija faza elongacije odnosa dolazi do sinteze novog dijela DNA. Svakim slijedećim ciklusom DNA se udvostručuje (Ambrović Ristov et al, 2007). Umnoži se i do nekoliko bilijuna kopija stoga se PCR smatra kao metoda eksponencijalnog umnažanja željenog odsječka DNA.



Slika 7. Shematiski prikaz polimerazne lančane reakcije – PCR

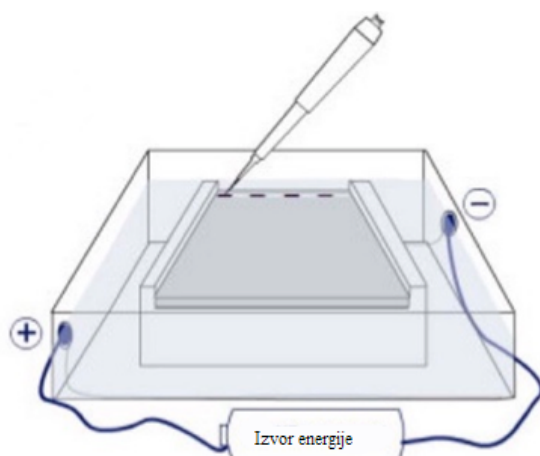
Izvor: (http://www.brainkart.com/article/Polymerase-Chain-Reaction--PCR----Biotechnology-in-Forensic-Sciences_14717/)

Količina umnožene DNA eksponencijalno raste svakim ciklusom. Na kraju pomoću gel elektroforeze provjeravamo uspješnost reakcije u agaroznom ili poliakrilamidnom gelu.

Elektroforeza je migracija električni nabijenih nukleinskih kiselina kroz otopinu (pufer) zbog djelovanja pod električnim poljem. Omogućuje separaciju tj. odvajanje nabijenih čestica radi razlike u brzini putovanja pojedine vrste čestica. Zbog svoje jednostavnosti nalazi široku primjenu jer osim razdvajanja omogućuje i pročišćavanje velikih molekula kao što su molekule proteina i nukleinskih kiselina, ali i molekula šećera, peptida, aminokiselina i jednostavnih iona (Piljac, 2005).

Za elektroforezu koriste se razni gelovi kao npr. poliakrilamidni, agarozni gelovi ili gelovi od škroba no oni se koriste vrlo rijetko. Pomoću mikropipete, uzorak (analit) se unosi unutar jažica koje su otisnute u gelu. Pod utjecajem električnog polja, ioni iz

otopine uzorka će se kretati kroz gel različitim brzinama i kao rezultat vremenom će se razdvajati.



Slika 8. Prikaz izgleda aplikacije analita u jažice prije procesa elektroforeze

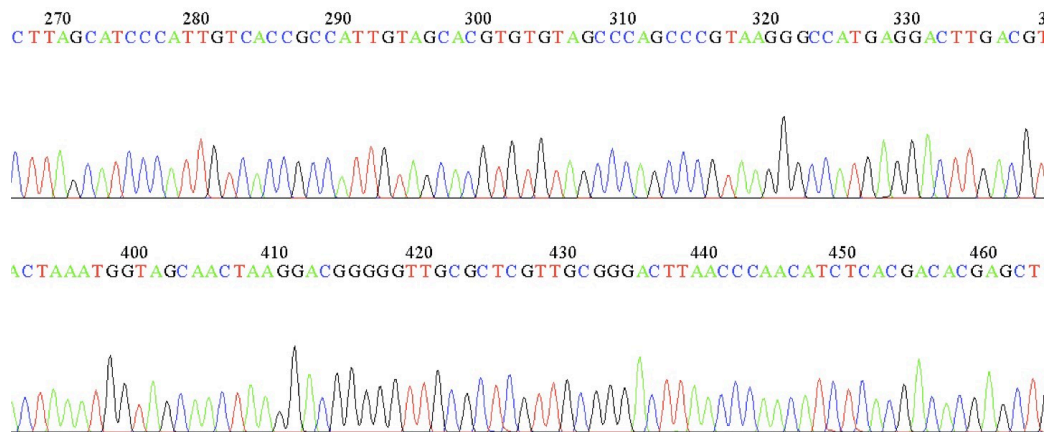
Izvor: (<http://projekti.gimvic.org/2013/2f/forenzika/page3.html>)

Nakon elektroforeze slijedi bojanje gela. Etidij bromid (EtBr) je najpoznatije i najčešće korišteno bojilo jer se snažno veže na nukleinske kiseline tako što se umeće među parove nukleobaza. No treba biti oprezan jer on spada u prilično opasne tvari jer je mutagen i kancerogen u vrlo malim količinama.

Uz osnovnu PCR metodu, razvile su se i one modificirane pomoću kojih je moguća identifikacija vrsta, ali i sojeva. Neke od njih su: 16S rDNA PCR – RFLP, RAPD – PCR, ERIC – PCR, Real Time PCR, DGGE i mnoge druge.

U cilju određivanja točnog poretka nukleotida u molekuli DNA ili RNA, koristi se sekvenciranje. Razvoj metoda sekvenciranja započeo je Frederick Sanger tijekom 1975. godine. Maxam i Gilbert su tijekom 1977. godine predstavili novu metodu sekvenciranja DNA sekvence gdje su DNA fragmenti obilježeni specifičnim bazama i razdvojeni gel elektroforezom što je potaknulo izradu prvog DNA automatiziranog sekvencera (Pareek i Smoczynski, 2011). Kod bjelančevina utvrđuje se redoslijed aminokiselina. Pomoću sekvenciranja moguće je određivanje razlike u sljedovima unutar jedne vrste koje predstavljaju temelj biološke varijabilnosti. To je metoda koja je omogućila identifikaciju mnogih rodova i vrsta te dovela do značajnih promjena u klasifikaciji bakterija. Takva metoda omogućila je brz napredak u polju molekularnih znanosti i u medicinskoj dijagnostici. Uz pomoć analize dobiva se velika količina kratkih sekvenci veličine 30 – 40 parova baza po jednoj analizi što

zahtijeva algoritme koji bi mogli osigurati visok stupanj točnosti (Li et al, 2008). U zadnjih 10 godina dolazi do razvoja ultra brzih sekvenciranja DNA. Neke od tih metoda su sekvenciranje hibridizacijom sekvenciranje nanoporama ili sintezom (Gvozdanić K. et al 2015). Smještaj 16S rRNA gena se nalazi na kromosomima prokariota te ih ubrajamo u konstitutivne gene. Oni kodiraju proteine uključene u održavanju fizioloških funkcija prokariota (Dresler-Nurmi et al 2009). *Rhizobium tropici* je prva vrsta u čijem je opisu korišteno sekvenciranje 16S rRNA gena (Martinez-Romero et al 1991).



Slika 9. Prikaz DNA sekvenci i njihovih signala (engl. *peaks*)

Izvor: Macrogen, Nizozemska (<http://dna.macrogen.com/eng/>)

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovih istraživanja je genotipska i fenotipska karakterizacija endofitskih bakterija izoliranih iz različitih sorti soje (*Glycine max* L). Endofiti su izolirani iz tri različita tkiva – korijena, kvržica i stabljike.

Pod njihovom karakterizacijom, podrazumijeva se izolacija i identifikacija endofitskih bakterija. Na taj način, pokazat će se što pouzdaniji podaci o taksonomskom statusu pojedinih izolata. Također, utvrdit će se razna morfološka, ekološka i biokemijska svojstva kako bi se dobili podaci o prikladnosti sojeva za određeni tip tla i u kojim uvjetima mogu biti maksimalno produktivni s ciljem osiguravanja rasta i razvoja. Identifikacija bakterija izuzetno je potrebna kako bi se mogla detektirati raznolikost endofita unutar biljke.

4. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Izolacija endofitskih bakterija iz biljnog materijala

Izolacija endofitskih bakterija je provedena iz stabljike, korijena i kvržica koje noduliraju soju. Za istraživanje uzeto je sjeme sorte Ana i Gabriela.

Prije sjetve obavljena je površinska sterilizacija sjemena. Sterilizacija započinje korištenjem 96% etanola gdje su sjemenke uronjene trenutno, nakon čega su smještene u Na-hipoklorit u periodu od tri minute. Sjemenke su spremne za sjetvu nakon višekratnog ispiranja sa sterilnom vodom. Sjeme je posijano u inertni supstrat (mješavina vermikulita i pijeska) u kontroliranim uvjetima komore rasta na Zavodu za ishranu bilja na Agronomskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. U završnoj fazi rasta, biljke su izvađene iz lonca i pregledane kako bi se utvrdila veličina, tekstura i boja kvržica, gustoća korijena i debljina stabljike. Neoštećene kvržice, korijen i stabljike su izdvojene nakon čega je obavljena njihova sterilizacija.

Postupak površinske sterilizacije biljnog tkiva je sljedeći: korijen i kvržice ispiru se u destiliranoj vodi, zatim slijedi trenutno umakanje u 96% alkoholu, a nakon toga namakanje u 3% natrijevom hipokloritu u periodu od 3 minute. Kod stabljike proveden je isti postupak, ali stabljika se u 3% natrijevom hipokloritu držala 5 min zbog debljine vlakana. Zatim je slijedilo višekratno ispiranje biljnog materijala u šest serija sterilne vode. Površinska sterilizacija biljnog materijala odvijala se po standardnoj metodi opisanoj u priručniku za proučavanje kvržičnih bakterija (Vincent, 1970).

Slijedi postupak seciranja kvržica, korijena i stabljike uz pomoć L-štapića i nanošenje bakterija po površini hranjive podloge unutar Petrijeve zdjelice. Korištena je YMA hranjiva podloga (Tablica 2) uz dodatak Congo red indikatora.

Nakon dobivanja pojedinačnih kolonija slijedi njihovo precjepljivanje na YMA podloge s bromtimol plavim indikatorom. Zatim je slijedio proces inkubacije na temperaturi 28 °C nakon čega su kolonije za daljnju obradu nasumično odabrane. Iz svakog uzorka odabrane su kolonije na temelju njihovih morfoloških karakteristika kao što su veličina, tekstura, boja ili oblik. Kolonije odabrane za daljnju analizu su pročišćene metodom iscrpljenja u svrhu dobivanja čistih kultura.

Uzorci su čuvani na YMA hranjivim podlogama uz dodatak Brom timol plavog indikatora pri temperaturi od 4 °C dok su za dugotrajno čuvanje bili pohranjeni na temperaturi – 20 °C uz dodatak sterilne otopine glicerola.

Istraživanja su provedena u laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju na Agronomskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 2. Sastav krute hranjive YMA podloge uz dodatak bromtimol plavog indikatora

| Sastav | Količina |
|-------------------------------------|----------|
| K₂HPO₄ | 0,5 g |
| NaCl | 0,1 g |
| MgSO₄ | 0,2 g |
| Manitol | 10 g |
| Agar | 15 g |
| Bromtimol plavi indikator | 5 ml |
| Kvasni ekstrakt | 0,4 g |
| Destilirana voda | 1000 ml |

4.2. Identifikacija izolata pomoću molekularne metode

4.2.1. Izolacija genomske DNA

Pomoću DNeasy® Blood&Tissue kita (QIAGEN, 2006, USA) izolirana je ukupna genomska DNA, a protokol je opisan u nastavku.

Tekuća bakterijska kultura u količini od 1,5 ml centrifugira se 10 minuta na 7500 rpm nakon čega na dnu tubice ostaje talog, a supernatant se izbacuje. Navedeni postupak se ponavlja nakon čega slijedi priprema za liziranje uzoraka. Dobiveni talog koji je ostao u tubici se resuspendira s 180 µl ATL pufera i dodaje se 20 µl enzima proteinaza K. Promiješana suspenzija lagano se inkubira u vodenoj kupelji sat i pol na 56 °C. Nakon inkubacije, sadržaj se vorteksira 15 sekundi, a u suspenziju se dodaje 200 µl AL pufera pa se nakon ponovnog vorteksiranja dodaje 200 µl etanola (96-100%). Slijedi proces pipetiranja cijelog sadržaja u DNeasy Mini Spin – kolonu s membranom na kojoj se zadržava DNA. Zatim slijedi centrifugiranje jednu minutu na

8000 rpm nakon čega se izbacuje supernatant koji je prošao kroz membranu odnosno membrana se prebacuje na drugu, novu kolekcijsku tubicu.

Sljedeći je proces ispiranja membrane koji se odvija u dvije faze. U prvoj fazi membrana se ispire s 500 µl AW1 pufera i centrifugira jednu minutu na 8000 rpm, izbacuje se talog koji je prošao kroz membranu, a DNeasy Mini – kolona stavlja se u novu kolekcijsku tubicu. Slijedi druga faza ispiranja dodatkom 500 µl AW2 pufera i ponovno centrifugiranje tri minute na 14 000 rpm, nakon čega se odbacuje talog.

U posljednjem koraku izolacije genomske DNA, DNeasy Mini – kolona stavlja se u novu kolekcijsku tubicu. Dodaje se 200 µl AE pufera direktno na DNeasy – membranu te se nakon jedne minute inkubacije na sobnoj temperaturi uzorci centrifugiraju pri 8000 o/min u trajanju od jedne minute, pri čemu se u konačnici dobije čista DNA uzoraka unutar tubice.

4.2.2. Određivanje koncentracije izolirane DNA

Koncentracija i čistoća DNA određena je nakon izolacije genomske DNA. Utvrđena je pomoću spektrofotometra pri valnim duljinama od 260 i 280 nm na spektrofotometru Lambda 12 (Perkin Elmer, SAD).

Za svaki pojedini uzorak izračunava se koncentracija DNA prema sljedećoj formuli:

$$C \text{ DNA } (\mu\text{g} / \text{ml}) = \text{faktor apsorbancije (A}_{260}) \times \text{faktor razrijeđenja} \times 50$$

4.2.3. Amplifikacija i sekvenciranje 16S rRNA (*rrs*) gena

U svrhu amplifikacije *rrs* gena korišten je GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) kit prema uputama proizvođača u cilju umnažanja jedne definirane DNA sekvence. Unutar molekule DNA za amplifikaciju specifičnih regija korištene su oligonukleotidne početnice fD1 i rD1. Svojstva odabranih početnica su navedena u Tablici 3.

Tablica 3. Svojstva početnica korištenih za amplifikaciju *rrs* gena

| Oznaka početnice | Sekvenca | Broj nukleotida |
|------------------|---|-----------------|
| fD ₁ | 5 – CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3 | 37 |
| rD ₁ | 5 – CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC – 3 | 33 |

Ukupan volumen uzorka za amplifikaciju iznosio je 25 µl, a reakcijska smjesa za jedan uzorak sadržavala je sljedeće komponente: 2,5 µl pufera (10x pufer), 1 µl 50 mM MgCl₂, 2 µl 10 mM dNTP, 0.125 µl 0.1 mM fD₁ i rD₁ oligonukleotidnih početnica, 0.2 µl Taq polimeraze, 16.05 µl duplo destilirane H₂O, 4 µl 20 ng DNA.

Amplifikacija je provedena u PCR termocycleru (GeneAmp, PCR System 2700, Applied Biosystems) prema temperaturnim profilima navedenim u Tablici 4.

Tablica 4. Temperaturni profili korišteni za amplifikaciju *rrs* gena

| Faza | Temperatura | Vrijeme | Broj ciklusa |
|---------------------------------------|-------------|---------|--------------|
| Početna denaturacija DNA | 95 °C | 3 min | 1 |
| Denaturacija DNA | 94 °C | 1 min | |
| Sparivanje početnice s kalupom | 57 °C | 1 min | 30 |
| Sinteza komplementarnih lanaca | 72 °C | 1,5 min | |
| Završno produljenje lanaca | 72 °C | 10 min | 1 |

Slijedi proces horizontalne gel elektroforeze na 1 % agaroznom gelu u TBE puferu (100 mM Tris, 83 mM borne kiseline, 1 mM EDTA, pH 8.5) kako bi se provjerila uspješnost amplifikacije. Na svaki gel nanoseno je 5 µl PCR produkta i molekularni marker od 1 kb DNA ladder za određivanje veličine amplificiranih fragmenata.

Elektroforeza je provedena pri 90 V/400 mA u trajanju od 30 minuta, nakon čega je gel bojan etidij-bromidom u vremenu od 30 minuta te isto toliko odbojavan sredstvom za odbojavanje (DST solution; Elchrom Scientific AG, Cham, Švicarska) u svrhu detektiranja amplificiranih fragmenta. Gel je vizualiziran na UV transiluminatoru (Clix Science Instruments, China) te slikan digitalnom kamerom (Canon, PowerShot, A640).

Uzorci su označeni i spremni za sekvenciranje koje je provedeno u Nizozemskoj (Macrogen). Dobivene sekvence (otprilike 600 sekvenci za svaki izolat) su provedene kroz BLAST program i na temelju rezultata odabrane su vrste koje imaju najveću sličnost s 29 izolata u ovom istraživanju. Korišten je i program T-Rex (Tree and Reticulogram Reconstruction), web poslužitelj namijenjen analizi i vizualizaciji filogenetskih stabala i mreža (www.trex.uqam.ca). Za vizualizaciju dendograma mora se osigurati poravnanje u FASTA i PHYLIP formatu.

4.3. Morfološka karakterizacija izolata

4.3.1. Bojanje po Gramu

Bojanje po Gramu i mikroskopski pregled čistih kultura služi kako bi se utvrdila diferencijacija endofitskih bakterija i svrstavanje u dvije skupine na temelju građe stanične stjenke: Gram pozitivne bakterije i Gram negativne bakterije.

Osnovna građevna jedinica stanične stjenke je murein koji je obložen nizom dodatnih tvari i ima zaštitnu funkciju pomoću koje se može razlikovati kojoj skupini pripadaju bakterije te kakva je građa staničnih stjenki određenih bakterija. Gram pozitivne bakterije građene su od nekoliko slojeva peptidoglikana mureina unutar kojih se nalazi teihonska kiselina, imaju deblju staničnu stjenku i vrlo mali periplazmatski prostor. Gram negativne bakterije imaju manji broj slojeva peptidoglikana i ne sadrže teihonsku kiselinu no sastavljene su od složenije građe jer sadrže dvije membrane – unutarnju koja je građena od fosfolipida i vanjsku koja uz

fosfolipide sadrži i lipopolisaharide. Periplazmatski prostor je veći i sadrži enzime koji su ključni za ishranu. Niz značajki Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija su povezane s njihovim reakcijama na obojenje (kemijski sastav, osjetljivost na penicilin i relativna debljina stanične stjenke).

4.3.2. Formiranje kapsula

Bojanje kapsula odnosi se na korištenje kiselih i bazičnih boja u svrhu obojenja podloge i bakterijskih stanica. Na taj način, kapsula se može bolje vizualizirati. Kapsula se sintetizira u citoplazmi i izlučuje izvan stanice kako bi okružila bakterijsku stanicu. Većina kapsuliranih bakterija sadrži kapsulu koja ima polisaharidni dio, ali neke bakterije imaju kapsule od polipeptida ili glikoproteina.

Bakterijske kapsule nisu ionskog oblika stoga kiselo ili bazično obojenje ne prijanja na njihovu površinu nego se samo nataloži, bez povezivanja čvrstim kemijskim vezama, za razliku od ostalog dijela stanice. Kapsule su topive u vodi pa se iz tog razloga ispiru kontrastnim bojilom koje se apsorbira i oboji kapsule (u svijetlo plavu boju). Najbolja metoda za vizualizaciju kapsula je obojenjem pozadine pomoću boje u kiselom obliku (npr. Congo red) i obojenjem stanice koristeći bazično obojenje (npr. šafranin, kristal violet, metilensko modrilo). Dostupne su različite metode za vizualizaciju kapsula. Rezultati ovise o vrsti korištene metode – obojenje stanica, pozadine i kapsula.

Postupak bojanja kapsula (čahura) bakterija

- Postavljanje bakterijske kulture na predmetnom stakalcu u kapi vode, nakon čega slijedi sušenje na zraku (ne fiksira se na plamenu kako toplina ne bi otopila kapsulu)
- Dodavanje primarne boje kristal violet 5 do 7 min
- Ispiranje s 20% otopinom $\text{Cu SO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ koja služi kao agens za odbojavanje i kontrastno bojilo
- Sušenje na zraku (ne filter papiru kako se bakterijske stanice ne bi deformirale)
- Mikroskopiranje pod najvećim povećalom uz kap uljno – imerzione tekućine (anisol)

Otopina bakrovog sulfata dekolorizira kapsulu ispiranjem primarne boje kristal violet, a pritom ne dekolorizira samu stanicu. Kao rezultati dobivene su svijetlo plave (ljubičaste) kapsule s tamno ljubičasto obojenim bakterijskim stanicama.

4.3.3. Produkcija fluorescenskog pigmenta

Ispitivani izolati su naciepljeni na King's B hranjivu podlogu (Tablica 5) u svrhu detekcije prisutnosti bakterije *Pseudomonas* spp. Izolati su inkubirani na 35 °C, a hranjive podloge su izložene UV svjetlu kako bi se ispitala sposobnost fluorescencije 24 sata nakon inkubacije. Rezultat je pozitivan ukoliko se pod UV svjetlom prikaže svijetlo zeleno/žuta boja. *Pseudomonas* spp. produciraju fikocijanin koji stvara fluorescein, organski spoj koji ima široku primjenu kao sintetsko sredstvo za bojenje.

Tablica 5. Sastav hranjive podloge King's B agar

| Sastav | Količina |
|-------------------------------------|----------|
| K₂HPO₄ | 1,5 g |
| Peptonske smjese | 20 g |
| MgSO₄ | 1,5 g |
| Agar | 15 g |
| Destilirana voda | 1000 ml |

4.4. Otpornost na antibiotike

U svrhu ispitivanja otpornosti izolata na određene antibiotike, korišteni su test diskovi BD Sensi – Disc™ (Becton Dickinson GmbH). Bakterije su uzgajane u 5ml tekuće YMB hranjive podloge (Tablica 6) na temperaturi 28 °C u razdoblju od 5 dana. Zatim je preneseno 100 µl kulture svakog uzorka na YMA hranjivu podlogu (Tablica 2) i razmazano L – štapićem nakon čega su dodani diskovi s različitim antibioticima.

Istraživanje je provedeno na četiri različita antibiotika u različitim koncentracijama.:

- Ampilicin (10 μg /disku)
- Eritromicin (15 μg /disku)
- Kanamicin (30 μg /disku)
- Streptomycin (10 μg /disku)

Vidljive zone inhibicije oko diska mjerene su u mm. Osjetljivost se očituje u zonama inhibicije koje tvore prsten oko diska što pokazuje da bakterije tamo ne rastu. Rast oko diska označava otpornost izolata na ispitivanu dozu antibiotika. Raspon djelovanja antibiotika prikazan je od strane proizvođača (Eaglesham, 1987). Rezultati su vidljivi ovisno o polumjeru zone oko diska. Izolati tretirani ampilicinom, eritromicinom i streptomycinom sadrže zone manje od 4 mm, djelomično otporni sojevi prikazuju zonu između 5 i 8 mm i osjetljivi prikazuju zone veće od 8 mm. Za kanamicin otporni sojevi imali su zonu veličine do 6 mm, djelomično otporni 7-10 mm i zone veće od 10 mm odnose se na osjetljive sojeve.

Tablica 6. Sastav tekuće hranjive podloge YMB uz dodatak bromtimol plavog indikatora

| Sastav | Količina |
|-------------------------------------|----------|
| K₂HPO₄ | 0,5 g |
| NaCl | 0,1 g |
| MgSO₄ | 0,2 g |
| Bromtimol plavi indikator | 5 ml |
| Manitol | 10 g |
| Kvasni ekstrakt | 0,4 g |
| Destilirana voda | 1000 ml |

4.5. Ekološka karakterizacija izolata

4.5.1. Rast izolata na različitim pH vrijednostima

U ovom istraživanju ispitan je rast na ukupno četiri različite pH vrijednosti. Korištena je standardna YMA podloga koja je uz pomoć pH metra postavljena na željenu pH vrijednost. Koncentracija kiselosti i bazičnosti regulirane su pomoću natrijevog hidroksida (NaOH) za dobivanje alkalne reakcije i klorovodične kiseline (HCl) za dobivanje kisele reakcije. Kulture su nanese na hranjive podloge, a rezultati su očitani 6 dana nakon inkubacije na 28 °C.

U istraživanju ispitan je rast bakterija na četiri različitim pH vrijednostima:

- pH 4,5
- pH 5,5
- pH 8
- pH 9

4.5.2. Rast izolata na različitim koncentracijama soli

Sol je limitirajući faktor te ima značajan učinak za rast endofitskih bakterija. Ispitan je rast bakterija koje su uzgajane na hranjivim podlogama s različitim količinom soli. Bakterije su nanese na YMA hranjive podloge i stavljene u inkubator na 28 °C. Bakterijski rast je zabilježen nakon 6 dana.

U istraživanju ispitan je rast bakterija na četiri različitim koncentracijama soli:

- NaCl 1%
- NaCl 2%
- NaCl 3%
- NaCl 4%

4.5.3. Rast izolata na različitim temperaturama

Ispitivanje tolerantnosti uzorka provođeno je na temperaturama 37 °C i 45 °C kako bi se utvrdio utjecaj temperature na rast bakterija. Endofitske bakterije su naciepljene na YMA hranjivu podlogu, a njihov rast je očitao 7 dana nakon inkubacije.

4.6. Biokemijska karakterizacija izolata

4.6.1. Katalaza test

Pomoću katalaza testa određuje se prisutnost enzima katalaze u bakterijama. Važan je čimbenik u antioksidacijskoj zaštiti organizama i spada u slobodne radikale kisika. Osnovna uloga katalaze je razlaganje toksičnog vodikovog peroksida na molekulu kisika i vodu:



U ovom istraživanju ispituje se reakcija izolata s vodikovim peroksidom. Potrebno je kapnuti jednu kap vodikovog peroksida na predmetno stakalce i pomoću eze dodati i izmiješati bakterijsku kulturu nakon čega se čeka reakcija. Ukoliko je reakcija pozitivna dolazi do oslobađanja kisika i do stvaranja mjehurića.

4.6.2. Oksidaza test

Oksidaza test se koristi za identifikaciju bakterija koje produciraju citokrom c oksidazu što je ujedno i posljednji multienzimski kompleks koji čini lanac prijenosa elektrona u oksidacijskoj fosforilaciji odnosno to je enzim elektronskog bakterijskog transportnog lanca. Također, koristi se i za prikazivanje razlika između pojedinih *Pseudomonas* vrsta. Postupak provođenja testa započinje pripremom filter papira te dodavanjem nekoliko kapi reagensa za ispitivanje oksidaze. Pomoću mikrobiološke eze potrebno je zahvatiti bakterijsku kulturu i nanijeti na papir zasićen reagensom. Kada je prisutan, citokrom c oksidaza oksidira redoks boju što rezultira promjenom

boje od žute do tamno ljubičaste unutar 30 sekundi. U slučaju da enzim nije prisutan, reagens ostaje bezbojan.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

U svrhu istraživanja različitih sorti – Ana i Gabriela, endofitske bakterije su izolirane iz stabljike, korijena i kvržica, a istraživano je ukupno 29 izolata.

5.1. Analiza sekvenciranja 16S rRNA (*rrs*) gena

Pomoću amplifikacija *rss* gena dobivene su kopije DNA sekvenci koje služe za identifikaciju izolata pomoću sekvenciranja. Sekvence dobivene nakon sekvenciranja provedene su kroz BLAST program i na temelju rezultata odabrane su vrste koje imaju najveću sličnost s vrstama unutar programa.

Naziv oznake izolata predstavlja ime sorte (G – Gabriela, A – Ana) i biljno tkivo iz kojeg su izolirani endofiti (N – nodul tj. kvržica, S – stabljika i K – korijen).

Tablica 7. Identifikacija endofitskih bakterija primjenom sekvenciranja 16S rRNA gena

| Oznaka izolata | Rod / vrsta endofita |
|----------------|----------------------------------|
| GN1 | <i>Pseudomonas sp.</i> |
| GN2 | <i>Pseudomonas sp.</i> |
| GN3 | <i>Pseudomonas sp.</i> |
| GN4 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> |
| GN5 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> |
| GN6 | <i>Sphingomonas sanguinis</i> |
| GN7 | <i>Sphingomonas sanguinis</i> |
| GN8 | <i>Sphingomonas sanguinis</i> |
| GN9 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> |
| GS1 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> |
| GS2 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| GS3 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| GS4 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> |
| GS5 | <i>Pseudomonas sp.</i> |
| GS7 | <i>Sphingomonas sp.</i> |
| GS11 | <i>Rhizobium sp.</i> |
| GK1 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> |
| AN2 | <i>Pseudomonas sp.</i> |
| AN3 | <i>Pseudomonas chlororaphis</i> |
| AN4 | <i>Pseudomonas sp.</i> |
| AN7 | <i>Agrobacterium rubi</i> |
| AN11 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> |
| AS1 | <i>Sphingomonas sp.</i> |
| AS2 | <i>Rhizobium nepotum</i> |
| AS4 | <i>Rhizobium sp.</i> |
| AS5 | <i>Sphingomonas sanguinis</i> |
| AK1 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| AK2 | <i>Pseudomonas chlororaphis</i> |
| AK3 | <i>Pseudomonas sp.</i> |

Analiza 29 izolata iz ovog istraživanja pokazuje njihovu značajnu raznolikost. Dobiveni rezultati pokazuju kako postoji pet skupina bakterija različitih rodova: *Pseudomonas spp.*, *Sphingomonas spp.*, *Bradyrhizobium spp.*, *Rhizobium spp.* i *Agrobacterium spp.* Za većinu sojeva dobivena je 100 % sličnost sekvenci sa vrstama *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Sphingomonas sanguinis*, *Agrobacterium tumefaciens*, dok je za ostale sojeve ta vrijednosti bila 99 %.

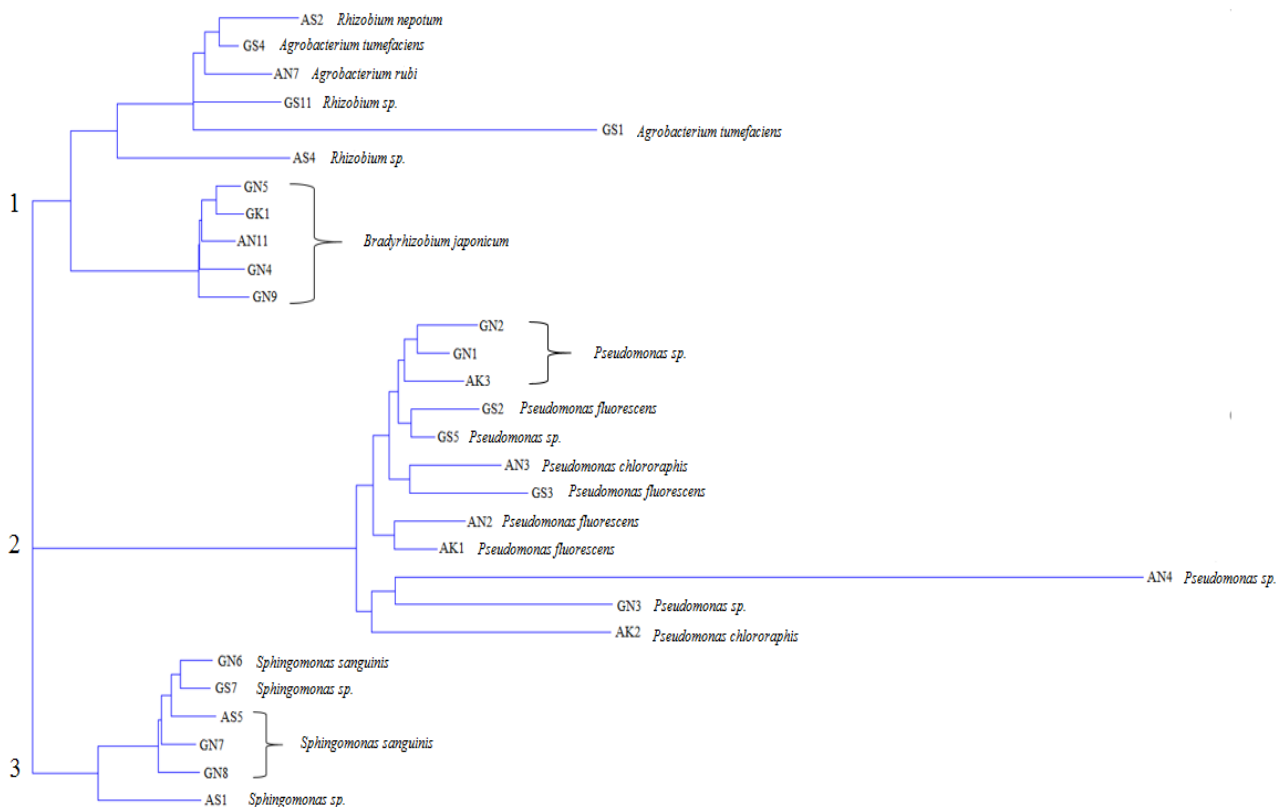
Najvećoj skupini koja se sastoji od čak 40% izolata izoliranih iz različitih dijelova biljke (kvržice, korijen i stabljika) pripada skupini roda *Pseudomonas spp.* s

ukupno 12 sojeva što je ujedno najveća pripadnost jednoj vrsti u ovom istraživanju. Od toga, tri izolata identificirano je kao *P. fluorescens*, a dva kao *P. chlororaphis*. Sljedeća grupa pripada rodu *Sphingomonas* spp. s ukupno šest izolata gdje su četiri izolata identificirana pod vrstu *S. sanguinis*. Pet izolata pripada rodu *Bradyrhizobium* spp. gdje su svi identificirani pod vrstu *B. japonicum*. Četiri od pet bakterija koje pripadaju toj vrsti izolirane su iz kvržica, dok je jedna izolirana iz korijena i to većina iz sorte Gabriela. Svi izolati koji pripadaju rodu *Rhizobium* (GS11, AS2 i AS4) izolirani su iz stabljike. Tri izolata pripadaju rodu *Agrobacterium* spp. od kojih dva spadaju pod *A. tumefaciens*, a jedan pod *A. rubi*.

Od ukupno pet izolata koji pripadaju vrsti *B. japonicum*, čak četiri vrste su izolirane iz nodula sorti Ana i Gabriela. *Pseudomonas* spp. je izoliran iz svih biljnih tkiva iz sorte Ana i Gabriela što dokazuje njihovu široku rasprostranjenost. Nekoliko endofitskih bakterija je izolirano iz korijena limuna (*Citrus jambhiri*) gdje je identificiran *Pseudomonas* spp. koji ima antipatogeno djelovanje (Araujo et al 2002). *S. sanguinis* izoliran je iz kvržica i stabljike obje sorte soje. *A. tumefaciens* je nađen samo u dva izolata koji su izolirani iz stabljike sorte Gabriela. Iz korijena sorte Gabriela izoliran je *B. japonicum* koji je poznat po nodulaciji kvržica, dok su iz korijena sorte Ana izolirane *Pseudomonas* vrste. Prema istraživanju koje su proveli Bai i suradnici (2002), tri od 14 endofita poboljšali su nodulaciju soje kada su inokulirani s *B. japonicum*.

Woese i suradnici (1984) predložili su da se 16S rRNA (rrs) gen koristi kao univerzalan marker za klasifikaciju i identifikaciju bakterija. Navedeni gen je prihvaćen i kao osnova za klasifikaciju kvržičnih bakterija iz porodice Rhizobiaceae koja uključuje rodove *Rhizobium* i *Agrobacterium* (Kuykendall, 2005) koji su identificirani u ovom istraživanju.

Konstruiran je konačni dendrogram na osnovi dobivenih sekvenci, a korišten je za diferencijaciju sojeva i proučavanje genetske varijabilnosti.



Slika 10. Dendrogram izolata endofitskih bakterija dobiveni sekvenciranjem *rrs* gena
 Izvor: Edgar, Robert C. (2004), MUSCLE., Nucleic Acids Research 32(5), 1792-97

Na slici 10. prikazan je dendrogram iz kojega je vidljiva podjela sojeva u tri glavne grupe i dvije podgrupe. Od svih istraživanih sojeva, najviše se razlikuje soj AN4 koji pripada rodu *Pseudomonas*.

Prva glavna grupa uključuje izolate unutar tri roda – *Rhizobium* spp., *Agrobacterium* spp. i *Bradyrhizobium* spp. U prvu podgrupu prikazani su sojevi roda *Rhizobium* spp. i *Agrobacterium* spp. u koju spada izolat GS1 koji je pokazao najveću različitost u usporedbi s ostalim sojevima iz navedene podgrupe. Pomoću dendograma dokazana je sličnost između rodova *Rhizobium* spp. i *Agrobacterium* spp. pa se otvara pitanje treba li navedene rodove smjestiti u jednu skupinu bakterija po uzoru na autora Velazqueza et al (2005). Najveću sličnost su pokazali izolati GN5, GK1, AN11, GN4 i GN9 koji se nalaze u drugoj podgrupi. Svi su izolirani iz kvržica ili korijena i dokazuju kako spadaju u vrstu *B. japonicum*.

Druga glavna grupa obuhvaća 12 izolata koji pripadaju rodu *Pseudomonas* spp. Najveću sličnost dijele sojevi GN2 i AK3 koji su identificirani pod rod *Pseudomonas* spp., zatim sojevi GS2 i AN2 gdje je soj GS2 identificiran u vrstu

Pseudomonas fluorescens što bi značilo da postoji velika vjerojatnost kako i soj AN2 pripada istoj vrsti. Također, mogu se uočiti dva identična soja – GN3 i AK2 gdje je soj AK2 identificiran kao *Pseudomonas chlororaphis*. Najveću različitost unutar vrste *Pseudomonas* spp. pokazuje soj AN4. Kao najperspektivnija skupina PGPR bakterija, pokazao se *P. fluorescens* jer vrši kompetativnu kolonizaciju korijena biljaka (Yu et al., 2011). Navedena tvrdnja je dokazana identifikacijom izolata u ovom istraživanju jer je 40% izolata identificirano unutar roda *Pseudomonas*, izoliranih iz korijena, ali i kvržica i stabljike.

U trećoj grupi se nalaze izolati koji spadaju unutar roda *Sphingomonas* spp. Od ukupno šest izolata, njih četiri spada pod vrstu *S. sanguinis*. Najveću različitost unutar podgrupe pokazao je soj AS1.

Razlog diferencijacije endofitskih bakterija uključenih u ovo istraživanje je ta što soja pokazuje iznimnu raznolikost zbog svoje dugogodišnje povijesti uzgoja i selekcije u raznim klimatskim sredinama na zemljopisno različitim područjima. Na endofitske bakterije značajno utječe genotip i kultivar biljke, budući da biljka-domaćin prirodno odabire svoju endofitsku populaciju

5.2. Fenotipska karakterizacija izolata

5.2.1. Bojanje po Gramu

Tehnikom bojanja po Gramu utvrđeno je kako je većina bakterija Gram negativna i ima štapićast oblik. Dokazano je kako se Gram pozitivne bakterije nalaze u kvržicama, stabljikama i korijenu odnosno u svim dijelovima biljke. Najviše se izdvajaju izolati GN5 i GS3 koji su jedini Gram pozitivni i imaju štapićasti oblik uz izolat GK1 koji je također Gram pozitivan, ali ima okrugli oblik. Od ukupno 29 izolata, njih 5 sadrži okrugli oblik (GN7, GN9, GK1, AS1, AS2).

Tablica 8. Prikaz rezultata metode bojanja po Gramu

| Naziv izolata | Gram pozitivni (+) ili negativni (-) | Oblik |
|---------------|--------------------------------------|------------|
| GN1 | – | štapičasti |
| GN2 | – | štapičasti |
| GN3 | – | štapičasti |
| GN4 | – | štapičasti |
| GN5 | + | štapičasti |
| GN6 | – | štapičasti |
| GN7 | – | okrugli |
| GN8 | – | štapičasti |
| GN9 | – | okrugli |
| GS1 | – | štapičasti |
| GS2 | – | štapičasti |
| GS3 | + | štapičasti |
| GS4 | – | štapičasti |
| GS5 | – | štapičasti |
| GS7 | – | štapičasti |
| GS11 | – | štapičasti |
| GK1 | + | okrugli |
| AN2 | – | štapičasti |
| AN3 | – | štapičasti |
| AN4 | – | štapičasti |
| AN7 | – | štapičasti |
| AN11 | – | štapičasti |
| AS1 | – | okrugli |
| AS2 | – | štapičasti |
| AS4 | – | okrugli |
| AS5 | – | štapičasti |
| AK1 | – | štapičasti |
| AK2 | – | štapičasti |
| AK3 | – | štapičasti |

5.2.2. Formiranje kapsula

Rezultati prikazuju kako niti jedan izolat nije formirao kapsulu.

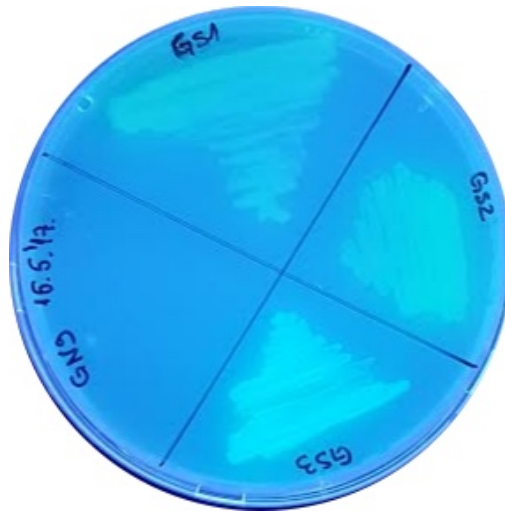
5.2.3. Produkcija fluorescenskog pigmenta

Od ukupno 29 izolata, njih 9 pokazuje produkciju fluorescenskog pigmenta odnosno dokazano je kako navedeni izolati pripadaju u *Pseudomonas* spp.

Tablica 9. Prikaz rezultata ispitivanja produkcije fluorescentnog pigmenta

| Naziv izolata | Fluorescentni pigment |
|---------------|-----------------------|
| GN1 | + |
| GN2 | + |
| GN3 | + |
| GN4 | - |
| GN5 | - |
| GN6 | - |
| GN7 | - |
| GN8 | - |
| GN9 | - |
| GS1 | - |
| GS2 | + |
| GS3 | + |
| GS4 | - |
| GS5 | + |
| GS7 | - |
| GS11 | - |
| GK1 | - |
| AN2 | - |
| AN3 | - |
| AN4 | - |
| AN7 | - |
| AN11 | - |
| AS1 | - |
| AS2 | - |
| AS4 | - |
| AS5 | - |
| AK1 | + |
| AK2 | + |
| AK3 | + |

rast (+), nema rasta (-), djelomičan rast (+/-)



Slika 11. Prikaz rasta izolata GS1, GS2 i GS3 na King's B agaru

Izvor: Zavod za mikrobiologiju, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu (Foto: D. Krznarić, 2017)

5.3. Otpornost na antibiotike

Izolati naciyepljeni na podlogu i testirani na osjetljivost na antibiotike dokazali su različite reakcije. Pomoću navedenog testa dobiva se uvid u heterogenost populacije. Prema istraživanju koje je proveo Zahran, (1999) bakterije različitih vrsta bile su osjetljive na tetraciklin, kanamicin i streptomycin, a znanstvenici zaključuju i da je streptomycin imao najštetniji učinak na endofitske bakterije.

Prema rezultatima prikazanim u tablici, vidljiva je najveća otpornost izolata na antibiotik amplicin gdje je svih 29 izolata raslo u njegovom prisustvu s minimalnim zonama oko diskova. Jedini izolati na kojima nije pokazana rezistentnost pod utjecajem eritromicina su GN7 i GS7, ali su prikazivali otpornost na ostale antibiotike. Navedeni izolati pripadaju rodu *Sphingomonas sp.* Sedam izolata imalo je djelomičnu rezistentnost na antibiotik kanamicin koji ima za pojedinačni izolat najveće zone oko diskova, dok je šest izolata prikazalo djelomičnu rezistentnost na streptomycin. Ukupno 17 izolata je pokazalo rast pod utjecajem svih antibiotika. Obzirom na veličinu zona oko diskova, ispitivani sojevi su najmanje osjetljivi na amplicin, nešto manja otpornost je prikazana za eritromicin (iako dva jedina izolata GN7 i GS7 uopće nisu pokazala rezistentnost), slijedi streptomycin, a izolati su pokazali najveću osjetljivost na kanamicin.

Tablica 10. Prikaz rezultata ispitivanja otpornosti na antibiotike

| Naziv izolata | Ampilicin | | Eritromicin | | Kanamicin | | Streptomicin | |
|---------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|
| | Otpornost izolata | Zone oko diskova (mm) | Otpornost izolata | Zone oko diskova (mm) | Otpornost izolata | Zone oko diskova (mm) | Otpornost izolata | Zone oko diskova (mm) |
| GN1 | + | 0 | + | 0 | + | 5 | + | 4 |
| GN2 | + | 0 | + | 0 | + | 5 | + | 4 |
| GN3 | + | 0 | + | 0 | + | 5 | + | 4 |
| GN4 | + | 0 | + | 0 | +/- | 8 | +/- | 8 |
| GN5 | + | 0 | + | 0 | + | 6 | +/- | 6 |
| GN6 | + | 0 | +/- | 7 | + | 6 | + | 0 |
| GN7 | + | 0 | - | 9 | + | 6 | + | 0 |
| GN8 | + | 0 | +/- | 8 | + | 6 | + | 0 |
| GN9 | + | 0 | + | 0 | +/- | 8 | +/- | 5 |
| GS1 | + | 0 | + | 0 | + | 5 | + | 4 |
| GS2 | + | 0 | + | 0 | + | 5 | + | 4 |
| GS3 | + | 0 | + | 0 | + | 4 | + | 3 |
| GS4 | + | 2 | + | 1 | + | 4 | + | 3 |
| GS5 | + | 0 | + | 0 | + | 5 | + | 4 |
| GS7 | + | 0 | - | 9 | +/- | 7 | + | 0 |
| GS11 | + | 0 | + | 0 | +/- | 8 | +/- | 7 |
| GK1 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 |
| AN2 | + | 0 | + | 0 | + | 3 | + | 4 |
| AN3 | + | 0 | + | 0 | + | 3 | + | 3 |
| AN4 | + | 0 | + | 0 | +/- | 10 | + | 3 |
| AN7 | + | 1 | + | 3 | + | 5 | +/- | 5 |
| AN11 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 |
| AS1 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 |
| AS2 | + | 2 | + | 3 | + | 4 | + | 1 |
| AS4 | + | 0 | + | 3 | +/- | 8 | +/- | 7 |
| AS5 | + | 0 | +/- | 5 | + | 4 | + | 0 |
| AK1 | + | 0 | + | 0 | + | 3 | + | 3 |
| AK2 | + | 0 | + | 0 | +/- | 10 | + | 4 |
| AK3 | + | 0 | + | 0 | + | 3 | + | 3 |

otporni (+), neotporni (-), djelomično otporni (+/-)

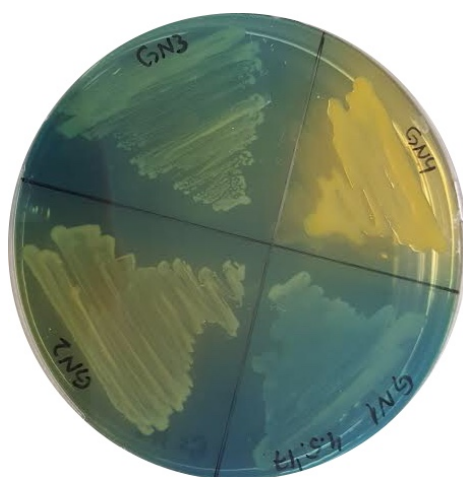
5.4. Ekološka karakterizacija izolata

5.4.1. Rast izolata na različitim pH vrijednostima

U ovom istraživanju cilj je bio ispitati utjecaj različite pH vrijednosti na rast sojeva. Na osnovu rezultata analiza pH vrijednosti uzoraka dokazano je kako većina izolata raste na ispitanim pH reakcijama. Također, ovim ispitivanjem utvrđena je znatna raznolikost ispitivanih izolata. Najviše izolata pokazalo je rast na pH vrijednostima 5,5 i 8.

Većina bakterija izoliranih iz različitih sojeva stabljike koje pripadaju u *Rhizobium* spp. i *Agrobacterium* spp., rasle su na hranjivoj podlozi s pH 5,5, 8 i 9. Preciznije, većina sojeva je rasla na pH vrijednosti bližoj optimumu za rast navedenih vrsta. Izolati koji su se nacijepili na podlogu s pH 4,5 pokazali su najmanji rast. Primjećuje se povezanost između izolata GN6, GN7 i GN8 koji pripadaju vrsti *S. sanguinis* jer su pokazali najslabiji rast unutar svih pH reakcija. Navedeni sojevi pokazali su djelomičan rast samo na pH 8.

Rhizobium i *Sphingomonas* vrste pokazale su najmanju toleranciju na pH 4,5. Čak 12 izolata imalo je konstantan rast na svim pH vrijednostima. Većina izolata koji imaju konstantan rast pripadaju vrsti *Pseudomonas* spp. što dokazuje njihovu toleratnost na kisela, neutralna i alkalna tla obzirom da je optimum pH reakcije za njihov rast između 4 i 8. Samo dva soja nisu ostvarila rast na pH 8 reakciji što dokazuje kako je skoro pa neutralna reakcija najpoželjnija za rast ispitanih sojeva.



Slika 12. Prikaz rasta izolata GN1, GN2, GN3 i GN4 na hranjivoj podlozi na pH 9

Izvor: Zavod za mikrobiologiju, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

(Foto: D. Krznarić, 2017)

Tablica 11. Prikaz rezultata rasta bakterija na različitim pH vrijednostima

| Naziv izolata | pH 4,5 | pH 5,5 | pH 8 | pH 9 |
|---------------|--------|--------|------|------|
| GN1 | + | + | + | +/- |
| GN2 | + | + | + | + |
| GN3 | + | + | + | + |
| GN4 | - | + | - | + |
| GN5 | - | + | - | + |
| GN6 | - | - | +/- | - |
| GN7 | - | - | +/- | - |
| GN8 | - | - | +/- | - |
| GN9 | - | + | +/- | +/- |
| GS1 | + | + | + | + |
| GS2 | + | + | + | + |
| GS3 | + | + | + | + |
| GS4 | + | + | + | + |
| GS5 | + | + | + | + |
| GS7 | - | +/- | +/- | +/- |
| GS11 | - | + | + | + |
| GK1 | +/- | + | + | - |
| AN2 | + | + | + | + |
| AN3 | + | + | + | + |
| AN4 | + | + | + | - |
| AN7 | - | + | + | + |
| AN11 | +/- | + | +/- | - |
| AS1 | - | - | +/- | +/- |
| AS2 | - | + | + | + |
| AS4 | - | - | + | + |
| AS5 | - | +/- | +/- | + |
| AK1 | + | + | + | + |
| AK2 | +/- | + | + | + |
| AK3 | + | + | + | + |

rast (+), nema rasta (-), djelomičan rast (+/-)

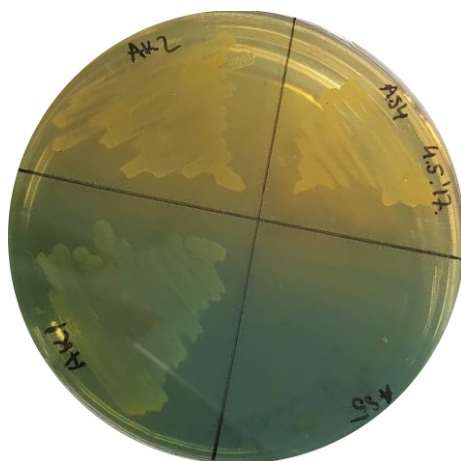
5.4.2. Rast izolata na različitim koncentracijama soli

Bakterizacija u pojedinim tlima može biti ograničena ukoliko je soj osjetljiv na povišene koncentracije soli. Prilikom pripreme YMA podloga za uzgoj sojeva svaka pripremljena podloga imala je različite koncentracije soli (NaCl). Sojevi različitih vrsta endofitskih bakterija različito reagiraju na sadržaj soli kao što dokazuje i navedena tablica. Istraživanje je pokazalo kako je većina sojeva pokazala dobar rast na povišenim koncentracijama soli.

Prema istraživanju koje je proveo Li (2017), izolirano je 62 endofitskih bakterija iz stabljike, lišća i korijena biljke *Lepidium perfoliatum* L. koja raste u pustinji u ekstremnim uvjetima. Istraživanje je pokazalo kako endofitske bakterije toleriraju 12% NaCl. Navedene činjenice dokazuju raznolikost endofitskih bakterija koje mogu tolerirati uvjete koji nisu optimalni za bilo koju vrstu endofitskih bakterija koje su do sad identificirane.

Skoro svi izolati su pokazali rast u koncentraciji NaCl 1% i NaCl 2%. Kod više od 50% izolata se prikazao konstantan rast na svim koncentracijama soli što dokazuje izrazitu otpornost na povišene koncentracije NaCl. Veća promjena rasta izolata se događa prilikom koncentracije soli u iznosu od 3%. Jedina tri izolata koja nisu rasla niti na jednoj koncentraciji soli su GN9, GK1 i AN11 koji pripadaju vrsti *B. japonicum*. U najvećoj koncentraciji soli u iznosu od 4% rast je pokazalo čak 17 izolata (od kojih je jedan slabo rasao).

Ukupno 13 sojeva nije pokazalo rast na hranjivoj podlozi s koncentracijom NaCl 4% što dokazuje kako je najveće odstupanje zapravo i najlošiji pokazatelj rasta za odabrane sojeve. Ovakvi rezultati pokazuju da postoji povezanost između pH raspona unutar kojeg mogu rasti bakterije i vrste koje su identificirane pomoću amplifikacije i sekvenciranja u ovom istraživanju.



Slika 13. Prikaz rasta izolata AK1, AK2 i AS4 na hranjivoj podlozi NaCl 4%
Izvor: Zavod za mikrobiologiju, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu (Foto: D. Krznarić, 2017)

Tablica 12. Prikaz rezultata rasta bakterija na različitim koncentracijama NaCl

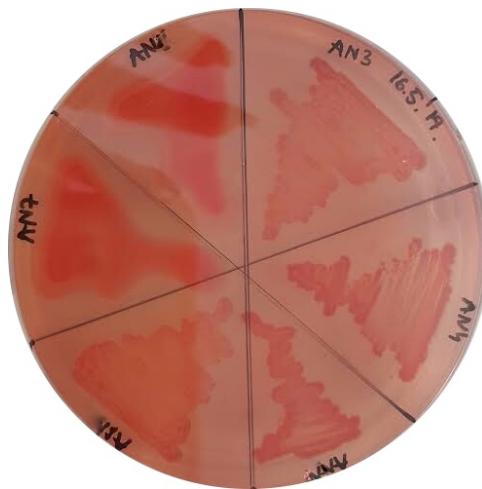
| Naziv izolata | NaCl 1% | NaCl 2% | NaCl 3% | NaCl 4% |
|---------------|---------|---------|---------|---------|
| GN1 | + | + | + | + |
| GN2 | + | + | + | + |
| GN3 | + | + | + | + |
| GN4 | + | +/- | - | - |
| GN5 | + | + | - | - |
| GN6 | + | + | +/- | - |
| GN7 | + | + | +/- | - |
| GN8 | + | + | +/- | - |
| GN9 | - | - | - | - |
| GS1 | + | + | + | + |
| GS2 | + | + | + | + |
| GS3 | + | + | + | + |
| GS4 | + | + | + | + |
| GS5 | + | + | + | + |
| GS7 | + | + | +/- | - |
| GS11 | + | +/- | - | - |
| GK1 | - | - | - | - |
| AN2 | + | + | + | + |
| AN3 | + | + | + | + |
| AN4 | + | + | + | + |
| AN7 | + | + | + | + |
| AN11 | - | - | - | - |
| AS1 | + | +/- | - | - |
| AS2 | + | + | + | - |
| AS4 | + | + | + | + |
| AS5 | + | + | +/- | - |
| AK1 | + | + | + | + |
| AK2 | + | + | + | + |
| AK3 | + | + | + | + |

rast (+), nema rasta (-), djelomičan rast (+/-)

5.4.3. Rast izolata na različitim temperaturama

Istraživanje je provedeno kako bi se dokazalo koje vrste endofitskih bakterija su otpornije od drugih i kojima visoka temperatura ne predstavlja ograničenje. Izolat AS5 je jedini izolat koji se pokazao kao vrlo osjetljiv na ekstremne temperature jer je pokazao djelomičan rast na temperaturi od 37 °C i nije prikazao rast na 45 °C. Dva izolata (GS11 i AS2) koji pripadaju u *Rhizobium* spp. su pokazali najveću tolerantnost jer su rasli na temperaturi od 37 °C i 45 °C. Zanimljiva je činjenica kako su bakterije

iz navedena tri izolata izolirana iz stabljike sorata Gabriela i Ana. Deset sojeva imalo je rast ili djelomičan rast na obje temperature. Pri temperaturi od 37 °C većina je sojeva, odnosno oko 95% pokazala rast što dokazuje tolerantnost na navedenu temperaturu. Bakterije koje pripadaju vrsti *Sphingomonas* spp., nisu rasle ili su djelomično rasle na temperaturi od 45°C što je vrlo zanimljivo ako uzmemo u obzir da je optimum rasta navedene vrste bakterija najniži (15 – 28 °C) od svih bakterija koje su uključene u istraživanje.



Slika 14. Prikaz rasta svih izolata na hranjivoj podlozi pohranjenoj na 37°C
Izvor: Zavod za mikrobiologiju, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu (Foto: D. Krznarić, 2017)

Tablica 13. Prikaz rezultata rasta bakterija na različitim temperaturama

| Naziv izolata | 37 °C | 45 °C |
|---------------|-------|-------|
| GN1 | + | - |
| GN2 | + | - |
| GN3 | + | - |
| GN4 | + | - |
| GN5 | + | - |
| GN6 | + | +/- |
| GN7 | + | +/- |
| GN8 | + | +/- |
| GN9 | + | - |
| GS1 | + | +/- |
| GS2 | + | +/- |
| GS3 | + | +/- |
| GS4 | + | - |
| GS5 | + | - |
| GS7 | + | - |
| GS11 | + | + |
| GK1 | + | - |
| AN2 | + | - |
| AN3 | + | +/- |
| AN4 | + | +/- |
| AN7 | + | +/- |
| AN11 | + | +/- |
| AS1 | + | - |
| AS2 | + | + |
| AS4 | + | - |
| AS5 | +/- | - |
| AK1 | + | - |
| AK2 | + | - |
| AK3 | + | - |

rast (+), nema rasta (-), djelomičan rast (+/-)

5.5. Biokemijska karakterizacija izolata

5.5.1. Katalaza test

Nakon provedbe katalaza testa utvrđeno je kako je većina izolata izazvala pozitivnu reakciju na katalaza test. Otprilike 30% ostalih izolata potvrdilo je negativnu ili djelomičnu reakciju. Ovim istraživanjem je prikazano da većina izolata

koji nisu reagirali na katalaza test spadaju u *Bradyrhizobium* ili *Rhizobium* vrste. Većina onih koji su pokazali rast spadaju u *Pseudomonas*, *Sphingomonas* i *Agrobacterium* vrste.

Tablica 14. Prikaz rezultata reakcije na katalaza test

| Naziv izolata | Reakcija katalaza testa |
|---------------|-------------------------|
| GN1 | + |
| GN2 | + |
| GN3 | + |
| GN4 | - |
| GN5 | - |
| GN6 | + |
| GN7 | + |
| GN8 | + |
| GN9 | - |
| GS1 | + |
| GS2 | + |
| GS3 | + |
| GS4 | + |
| GS5 | + |
| GS7 | +/- |
| GS11 | + |
| GK1 | - |
| AN2 | + |
| AN3 | + |
| AN4 | + |
| AN7 | +/- |
| AN11 | +/- |
| AS1 | - |
| AS2 | - |
| AS4 | + |
| AS5 | + |
| AK1 | + |
| AK2 | + |
| AK3 | + |

rast (+), nema rasta (-), djelomičan rast (+/-)

5.5.2. Oksidaza test

Rezultati analize pokazuju kako 85% ispitanih izolata ne reagiraju na enzim oksidazu. Svi izolati koji su imali pozitivnu reakciju na oksidazu test spadaju u sortu Ana, a bakterije su izolirane iz kvrčica i korijena. Izolati koji reagiraju na oksidazu (AN2, AN3, AK2 i AK3) pripadaju vrsti *Pseudomonas* spp.

Tablica 15. Prikaz rezultata reakcije na oksidaza test

| Naziv izolata | Reakcija oksidaza testa |
|---------------|-------------------------|
| GN1 | - |
| GN2 | - |
| GN3 | - |
| GN4 | - |
| GN5 | - |
| GN6 | - |
| GN7 | - |
| GN8 | - |
| GN9 | - |
| GS1 | - |
| GS2 | - |
| GS3 | - |
| GS4 | - |
| GS5 | - |
| GS7 | - |
| GS11 | - |
| GK1 | - |
| AN2 | + |
| AN3 | + |
| AN4 | - |
| AN7 | - |
| AN11 | - |
| AS1 | - |
| AS2 | - |
| AS4 | - |
| AS5 | - |
| AK1 | - |
| AK2 | + |
| AK3 | + |

rast (+), nema rasta (-), djelomičan rast (+/-)



Slika 15. Prikaz pozitivne reakcije AN2 i AN3 izolata na oksidaza test
Izvor: Zavod za mikrobiologiju, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu (Foto: D.
Krznarić, 2017)

6. ZAKLJUČAK:

- Unutar prirodnih populacija endofitskih bakterija u soji, utvrđena je velika genetska raznolikost obzirom na različita biljna tkiva iz kojih su dobiveni izolati
- Primjenom amplifikacije i sekvenciranja *rrs* gena u ovom istraživanju, identificirano je pet skupina bakterija različitih rodova: *Pseudomonas* spp., *Sphingomonas* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Rhizobium* spp. i *Agrobacterium* spp.
- Najveća pripadnost jednoj vrsti s ukupno 12 sojeva od 29 (otprilike 40% ukupnih izolata) spada skupini roda *Pseudomonas* spp. Svi izolati koji su identificirani kao *B. japonicum*, izolirani su iz korijena i kvržice biljke.
- Dendogram prikazuje usku povezanost rodova *Rhizobium* i *Agrobacterium* što potvrđuje činjenicu kako postoji mogućnost svrstavanja rodova u jednu skupinu.
- Na osnovu dobivenih rezultata, izdvojiti se mogu najtolerantniji izolati koji su pokazali najveću otpornost prilikom svih ispitivanja. Najtolerantniji izolat spada pod vrstu *P. chlororaphis*. U grupu najtolerantnijih spadaju i izolati GS2 i GS3 vrste *P. fluorescens*. Od *Rhizobium* vrsta najotporniji se pokazao izolat AN11.
- *P. fluorescens* vrši kompetativnu kolonizaciju korijena biljaka stoga se smatra kako spada u najperspektivniju skupinu PGPR bakterija (Yu et al., 2011). Ovim istraživanjem je to i potvrđeno jer je 12 izolata identificirano unutar roda *Pseudomonas*, izoliranih iz korijena, ali i kvržica i stabljike.

- Iz kvržica i stabljike izolirana je bakterijska vrsta *Sphingomonas* spp. koja ima sposobnost korištenja kontaminanata kao hranjivih tvari pa bi se mogla koristiti u svrhu bioremedijacije.
- Biokemijska i morfološka svojstva sojeva utvrdili su raznolikost i otpornost endofitskih bakterija.
- Pomoću ekološke karakterizacije, utvrđena je znatna varijabilnost ispitivanih izolata u toleranciji različitih pH reakcija, temperatura i koncentraciji soli.
- Potrebna su daljnja istraživanja populacija endofitskih bakterija koja trebaju biti usmjerena na otkrivanje imaju li simbiozno djelovanje i mogu li se koristiti u biološkoj kontroli, u bioremedijaciji ili u zaštiti bilja protiv nematoda i biljnih bolesti.

7. LITERATURA:

1. Ait Barka E., Gognies S., Nowak J., Audran J.C., Belarbi A. (2002). Inhibitory effects of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biol Control* 24 (2): 135-142.
2. Almeida Lopes K.B., Carpentieri-Pipolo V., Oro T.H., Stefani Pagliosa E., Degrossi G. (2016). Culturable endophytic bacterial communities associated with field-grown soybean, *Wiley library*, 120(3):740-55.
3. Ambrović Ristov, Brozović A., Mađarić B., Četković H., Herek Bosnar M., Hranilović D., Katušić Hećimović S., Meštrović Radan N., Mihaljević S., Slade N., Vujaklija D. (2007). *Metode u molekularnoj biologiji*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb.
4. Araujo W.L., Marcon J., Maccheroni W. Jr, Van Elsas J.D., Van Vuurde J.W., Azevedo J.L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. 28(10):4906-14.
5. Bacon, C. W., White, J. (2000). *Microbial Endophytes*. Boca Raton, FL: CRC Press.
6. Bhatnagar R.K., Palta R.K. (1996). *Earthworm-Vermiculture and Vermicomposting*. Kalyani Publications, Ludhiana, India, 106 p.
7. Bai Y.M., Pan B., Charles T.C., Smith D.L. (2002). Co-inoculation dose and root zone temperature for plant growth promoting rhizobacteria on soybean (*Glycine max* L.) *Soil.biol.Chem.* 34: 1953-1957.
8. Bailey, B.A., Bae, H., Strem, M.D., Roberts, D.P., Thomas, S.E., Crozier, J., Samuels, G.J., Choi, I.Y., Holmes, K.A., (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* 224, 1149–1164.

9. Buchanan i Gibbons (1975). Bergey's manual of determinative bacteriology, 8. edition

10. Boddey R.M., Alves B.J., Soares L.H., Jantalia C.P., Urquiaga S. (2009). Biological nitrogen fixation and the mitigation of greenhouse gas emissions. *Agron Monogr* 52:387–413.

11. Bordeleau L.M., Prévost D. (1994). Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments

12. Chi F., Shen S. H., Cheng H. P., Jing Y. X., Yanni Y. G., Dazzo F. B. (2005). Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: A review. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (11): 7271–7278.

13. Costa J.M., Loper J.E. (1994). Characterisation of siderophore production by the biological control agent *Enterobacter cloacae*, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:440-448

14. De Bary, A. (1866). Morphologie und Physiologie Pilze, Flechten, und myxomyceten. Hofmeister's Handbook of Physiological Botany. Vol. 2. Leipzig.

15. Deaker R., Roughley R.J., Kennedy I.R. (2004). Legume seed inoculation technology – a review, *Soil Biol Biochem* 36: 1275-1288.

16. Dresler-Nurmi A., Fewer D.P., Rasanen L.A., Lindstrom K. (2009). The Diversity and Evolution of Rhizobia. U: Prokaryotic Symbionts in Plants (ur. Pawlowski K.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 3-42.

17. Eaglesham A.R.J. (1984). Tropical stress ecology of rhizobia, root-nodulation and legume nitrogen fixation. U: Current Developments in Biological Nitrogen Fixation, (ur. Subba Rao, N.S.), Edward Arnold Publishers, London, United Kingdom, str. 1- 35.

18. Edgar, Robert C. (2004), MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* 32(5), 1792-97.
19. Euzéby J.P. (2013). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.
20. Ferreira A., Quecine M.C., Lacava P.T., Oda S., Azevedo J.L., Araújo W.L. (2008). Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiology Letters*, 287, pp. 8-14.
21. Gibson A.H. i Harper J.E. (1985): Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci.* 25:497-501.
22. Graham P.H., Vance C.P. (1999). Nitrogen fixation in perspective: An overview of research and extension needs; *Field Crop Research*; 65. 93-106.
23. Gutschy, Lj. (1950). Soja i njeno značenje u narodnom gospodarstvu, poljoprivredi i i prehrani. Tehnička knjiga, Zagreb.
24. Gvozdanić K., Čuljak V., Margeta P. (2015). Razvoj novih tehnologija sekvenciranja i njihova primjena u u istraživanju genoma domaćih životinja, Stručni članak, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Poljoprivredni institut Osijek.
25. Halliday J. (1985). Agrotechnologies Based on Symbiotic Systems That Fix Nitrogen. U: *Inovative Biological technologies for Lesser Developed Countries – Workshop Proceedings*. Washington DC, 161-182
26. Hallman J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43:895-914.

27. Henning K., Villforth F. (1940). Experimentelle untersuchungen zur frage der bacteriesymbiose in höheren pflanzen und ihre beeinflussung durch 'Leitelemente'. *Biochemische Zeitschrift*, 305: 299–309.
28. Hicks, D.R. (1978). Growth and development. In: A.G. Norman (ed). *Soybean physiology, agronomy and utilization*. New York: 17-44.
29. Hung P.Q., Annapurna K. (2007). Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine* sp).
30. Hussain N., Mujeeb F. , Tahir M. , Khan G.D., Hassan M.N., Bari A (2002). Effectiveness of Rhizobium Under Salinity Stress. *Asian Journal of Plant Sciences*, 1: 12-14.
31. Jordan D.C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a-genus of slow growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol* 32:136-139.
32. Kobayashi, D.Y., Palumbo, J.D. (2000). Bacterial Endophytes and Their Effects on Plants and Uses in Agriculture. In Bacon, C.W. and White, J.F., Eds., *Microbial Endophytes*, Marcel Dekker, New York, 99-233.
33. Kuklinsky-Sobral J., Rodrigo Mendez (2005). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. 1244-51.
34. Kulkarni N. S, Dalal J. M. (2012). Isolation and Identification of Endophytic Microorganisms of Soybean (*Glycine max* L.). *Biomed Pharmacol* 5(2)
35. Kuykendall, L.D. (2005). Family I. Rhizobiaceae. In *The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilonproteobacteria, The Proteobacteria, Part C. U: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (ur. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M.), Springer, New York, str. 324-362.

36. Leuzinger K., Dent M., Hurtado J., Stahnke J., Lai H., Zhou X., Chen Q. (2013). "Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins". *Journal of Visualized Experiments*. 77.
37. Li H., Ruan J., Durdin R. (2008). Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome Res.*, 18: 1851-1858.
38. Li Y., Cheng C., An D. (2017): Characterisation of endophytic bacteria from a desert plant *Lepidium perfoliatum* L. *Plant Protect. Sci.*
39. Martínez-Romero E., Segovia L., Mercante F.M., Franco A.A., Graham P., Pardo M.A. (1991). *Rhizobium tropici*: a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 417-426.
40. Maxam A.M., Gilbert W. (1977). A new method for sequencing DNA. *proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (2): 560-564.
41. McCulley R.L., Brosi G.B., Bush L.P. (2011). Effects of multiple climate change factors on the tall fescue-fungal endophyte symbiosis: infection frequency and tissue chemistry. 189(3):797-805.
42. Mundt, J. O., Hinkle, N. F. (1976). Bacteria within ovules and seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 694-698.
43. Olivares F.L., Baldani V.L.D., Reis V.M., Baldani J.I., Dobereiner J. (1996). Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves, predominantly of Gramineae, *Biol. Fert., Soils* 21: 197-200.
44. Pareek C.S., Smoczynski R. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl genetics*, 52. 413-435.

45. Perotti, R. (1926). On the limits of biological enquiry in soil science. Proc. Int. Soc. Soil Sci. 2:146-161.
46. Piljac I. (2006). Elektroforeza – Udžbenik. Media print tiskara Hrastić d.o.o., Zagreb.
47. Pillay V.K., Nowak J. (1997). Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a *Pseudomonas* bacterium. Canadian Journal of Microbiology. 43(4): 354-361.
48. Qureshi M.A., Ahmad Z.A., Akhtar N., Iqbal A., Mujeeb F. and Shakir M.A. (2012) J. Anim. Plant Sci., 22 (1), 204-210.
49. Redžepović S., Blažinkov M., Komesarović B., Sudarić A., Uher D., Sikora S. (2007.). Simbiozna učinkovitost selekcioniranih autohtonih sojeva *Bradyrhizobium japonicum*; Mljekarstvo 57(4) 289-302.
50. Rosenblueth M., Martinez-Romero E. (2004). *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. 181(5):337-44.
51. Sessitsch A., Reiter B., Pfeifer U., Wilhelm E. (2002). Cultivation - independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes - specific PCR of 16S rRNA genes. FEMS Microbiol Ecol 39: 23–32.
52. Shamloul M., Trusa J., Mett V., Yusibov V. (2014). "Optimization and utilization of Agrobacterium-mediated transient protein production in Nicotiana". Journal of Visualized Experiments 86.
53. Sikora S., Pohajda I., Huić Babić K., Rajnović I., Blažinkov M., Kajić S. (2014). Genetic diversity and symbiotic efficiency of indigenous common

bean rhizobia isolated from agricultural soils in the central Croatia. 11 th European Nitrogen Fixation Conference, Španjolska.

54. Srivastava R., Shalini. (2009). Antifungal activity of *Pseudomonas fluorescens* against different plant pathogenic fungi. The Internet Journal of Microbiology, Volume 7, Number 2. DOI: 10.5580.
55. Subba Rao, N.S. (1993). Biofertilizers in Agriculture and Forestry. Oxford and IBH Publishers, New Delhi, 242 p.
56. Sunj Sin Dun. (1958). Soja (prijevod sa kineskog), Poljoprivredni institut Osijek
57. Van Peer R., Schippers B., Bakker A.W. (1990.): Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. Volume 129, Issue 1, pp 75–83.
58. Velázquez E., Peix A., Zurdo-Pinero J.Z., Palomo J.L., Mateos P., Rivas R., Munoz- Adelantado E., Toro N., Garcia-Benavides P., Martínez-Molina E., (2005). The Coexistence of Symbiosis and Pathogenicity-Determining Genes in *Rhizobium rhizogenes* Strains Enables Them to Induce Nodules and Tumors or Hairy Roots in Plants, Volume 18, Number 12, Pages 1325-1332.
59. Vincent J.M. (1970). A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP, Handbook No 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
60. Vratarić M., Sudarić, A. (2008): Soja, *Glycine max* (L.) Merr., Osijek.
61. Vukadinović V. (1998.). Dušik - Ishrana, Interna skripta, Poljoprivredni fakultet u Osijeku
62. Williams i Wilkins. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

63. Woese C.R., Stackebrandt E., Weisburg W.G., Paster B.J., Madigan M.T., Fowler V.J., Hahn C.M., Blanz P., Gupta R., Nealson K.H., Fox G.E. (1984). The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Systematic and Applied Microbiology* 5: 315-326.
64. Yabuuchi E, Kosako Y (2015). "Sphingomonas". *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons.
65. Yadav, A.K., Mowade, S.M. (2005). *Handbook of Microbial Technology*. Regional Centre for Organic Farming, Nagpur, India, 236 p.
66. Youseif S. H., Abd El-Megeed F.H., Ageez A., Mohamed Z.K., Shamseldin A., Saleh S.A. (2014). Phenotypic characteristic and genetic diversity of rhizobia nodulating soybean in Egyptian soils. *European Journal of Soil Biology* 60 (2014) 34 – 43.
67. Yu X., Ai C., Xin L., Zhou G. (2011). The siderophore-producing bacterium *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on fusarium wilt and promotes the growth of pepper. *Eur.J. Soil Biol.*, 47: 138-145.
68. Zahran H.H. (1999). Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 968–989.
69. Zhao L.F., Xu Y.J., Lai X.H. (2017). Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties, Shangqiu Normal University, College of Life Sciences, China

Internet izvori:

<https://microbeonline.com/capsule-stain-principle-procedure-results/>

(Pristupljeno 20. kolovoza 2018.)

<http://akademija.inovagen.hr/optimizacija-pcr-reakcije-ostale-komponente-reakcijske-smjese-koliko-i-zasto/>

(Pristupljeno 20. kolovoza 2018.)

<https://www.laboratory-equipment.com/blog/testing-analysis/gel-electrophoresis-stain-use/>

(Pristupljeno 5. rujna 2018.)

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/fluorescein#section=Top>

(Pristupljeno 5. rujna 2018.)

8. PRILOG

Popis i objašnjenje kratica

| | |
|------------------|---------------------------------------|
| g | gram |
| ml | militar |
| mm | milimetar |
| DNA | deoksiribonukleinska kiselina |
| RNA | ribonukleinska kiselina |
| rRNA | ribosomalna ribonukleinska kiselina |
| YMA | yeast mannitol agar hranjiva podloga |
| YMB | yeast mannitol broth hranjiva podloga |
| ATL pufer | engl. tissue lysis buffer |
| AL pufer | engl. lysis buffer |
| AW1 pufer | engl. wash buffer 1 |
| AW2 pufer | engl. wash buffer 2 |
| AE pufer | engl. elution buffer |
| M | marker (1kb) |
| A | adenin |
| T | timin |
| G | gvanin |
| C | citozin |

Životopis

Dora Krznarić, rođena 03.listopada 1993. godine u Zagrebu. Upisuje Agronomski fakultet, smjer Ekološka poljoprivreda 2012. Završni rad je obranila na Zavodu za mikrobiologiju 2015. godine te iste godine upisuje diplomski studij Agroekologija, smjer Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi. Obavila je studentsku praksu preko programa Erasmus + u Španjolskoj u Institutu za prirodne resurse i agrobiologiju (IRNASA – CSIC) 2016. godine gdje je stekla vještine i iskustvo rada u laboratoriju. Također, prisustvovala je Erasmus + programu u Austriji na BOKU Sveučilištu 2018. godine na Zavodu za sanitarno inženjerstvo i kontrolu kvalitete vode. Sudjelovala je u Ljetnoj školi preko Erasmus+ programa u Kini u mjesecu lipnju 2018. godine te na Ceepus programu u Poljskoj u srpnju 2018. godine pod temom “Sustainable food production chain”. Prisustvovala je na Međunarodnom kongresu Mikrobiologije u Sv. Martinu na Muri 2016. godine. Također, iste godine je prisustvovala na Međunarodnom kongresu “Power of Microbes in Industry and Environment” na otoku Krku te na kongresu “Power of viruses” u Poreču u svibnju 2018. godine. Tijekom diplomskog studija, bila je uključena u program studenata tutora.