

Izolacija i fenotipska karakterizacija mikrosimbionata soje (*Glycine max* L.) u kontinentalnoj Hrvatskoj

Sažetak

Simbioznom fiksacijom dušika leguminoze mogu zadovoljiti veliki dio svojih potreba za dušikom na učinkovit i ekološki prihvatljiv način. Rizobije su skupine bakterija tla sa jedinstvenom sposobnošću tvorbe kvržica na korijenu leguminoza u kojima pomoću enzima nitrogenaze konvertiraju inertan atmosferski dušik u biljkama pristupačan amonijačni oblik. Pretpostavlja se da su u tlima kontinentalne Hrvatske prisutni autohtoni sojevi rizobija koji noduliraju soju te da se sojevi međusobno razlikuju po fenotipskim i genotipskim svojstvima. U cilju odabira najkvalitetnijih sojeva rizobija sakupljeni su uzorci tla iz tri područja kontinentalne Hrvatske u kojem postoji dugogodišnja tradicija uzgoja soje. Fenotipska karakterizacija uključila je utvrđivanje rasta na različitim temperaturama, pH vrijednostima i rast na različitim koncentracijama soli, biokemijsku karakterizaciju, ispitivanje otpornosti na antibiotike. Fenotipska karakterizacija pokazala je značajnu otpornost na stresne uvjete okoliša, posebno otpornost na niski pH što je izuzetno važno jer Hrvatska ima jako puno kiselih tala. Kao najbolji sojevi pokazali su se sojevi SR1, SR2 te SR3 zbog čega bi ih bilo korisno uključiti u daljnji program selekcije.

Gljučne riječi: kvržične bakterije, biološka fiksacija dušika, soja, fenotipska karakterizacija, ekološka karakterizacija

Uvod

Proces biološke fiksacije dušika (BNF) predstavlja simbiozu pojedinih mikroorganizama koji imaju sposobnost usvajanja elementarnog dušika iz atmosfere te ga preko enzima nitrogenaze reduciraju do amonijaka kojeg onda koriste brojne leguminoze za sintezu proteina. Bakterije koje posjeduju enzim nitrogenazu (diazotrofi) zauzimaju jedinstvenu ekološku nišu te sudjeluju u globalnom ciklusu kruženja dušika (Halbleib i Ludden, 2000). Procijenjene godišnje količine dušika putem simbiozne fiksacije dušika iznose oko 50–400 kg/ha (Ogedegbe i Falodun, 2016), a pored toga se tlo obogaćuje dušikom kojeg će koristiti budući usjevi, poboljšava se plodnost tla ali i smanjuju troškovi primjene mineralnih gnojiva. Porodica *Fabaceae* uključuje važne agronomske vrste poput soje (*Glycine max* L.), graha (*Phaseolus vulgaris* L.), lucerne (*Medicago sativa* L.), graška (*Pisum sativum* L.), leće (*Lens culinaris* Medik.) (Clúa i sur., 2018). Među leguminoznim usjevima posebno mjesto u poljoprivrednoj proizvodnji pripada soji (*Glycine max* L.) koja je zbog visokog sadržaja visokovrijednih proteina i ulja prepoznata kao kvalitetan izvor ljudske i stočne hrane te važna sirovina za prerađivačku industriju (FAOSTAT, 2021). Kako su biljke okružene mnogobrojnim mikroorganizama u tlu, razvile su sofisticirane mehanizme prepoznavanja koji im omogućuju razlikovanje, ne samo između korisnih i potencijalno patogenih bakterija, već i između kompatibilnih i nekompatibilnih rizobija. U interakciji leguminoza-rizobij, molekule koje stvara bakterija (Nod faktori) pokreću put prijenosa signala u stanicama ko-

¹ dr.sc. Sanja Kajić, Petra Borovec, mag.ing.agr., Lucija Sklepić, mag.ing.agr., prof. dr. sc. Sanja Sikora, doc. dr. sc. Ivana Rajnović, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Svetosimunska cesta 25, Zagreb, Hrvatska

² Viktorija Kočmar² mag.ing.agr., Osatina grupa, Grobljanska 70, Viškovci, Hrvatska

³ Lucija Horvat³ mag.ing.agr., Zavod za javno zdravstvo Zagrebačke županije, Mokrička ulica 54, Zaprešić, Hrvatska
Autor za korespondenciju: skajic@agr.hr

rijena koji aktivira bakterijsku infekciju i razvoj kvržice (Clúa i sur., 2018). Rizobiji s različitim kromosomskim podrijetlom mogu nositi slične gene za simbiozu, što objašnjava kako jedna biljka može biti nodulirana od nekoliko različitih vrsta rizobija. Usljed simbiotske fiksacije dušika, rizobijem upravljaju *nod*, *nif* i *fix* geni (Lindström i Mousavi, 2019). Rizobije sudjeluju i u promicanju rasta biljaka ne samo opskrdom dušikom već i drugim mehanizmima, poput proizvodnje siderofora, egzopolisaharida i fitohormona, a mogu pružiti i zaštitu od fitopatogenih gljiva (Verma i sur., 2017). Proces BNF može se iskoristiti kao održiva tehnologija za smanjenje neželjenih učinaka dušične gnojide poljoprivrednih kultura (Sharma i sur., 2020). Predsjetvena bakterizacija sjemena soje (*Glycine max* L.) često se vrši visokoučinkovitim sojevima *Bradyrhizobium japonicum* te se kao takva preporučuje kao redovna mjera u proizvodnji ove leguminoze. Kako bi se postigao bolji odgovor na inokulaciju, važna je selekcija rizobija budući da se međusobno razlikuju po svojoj simbiotskoj učinkovitosti, kompatibilnosti s različitim sortama kao i ekološkoj prilagodbi (Salvagiotti i sur., 2008). Autohtoni sojevi rizobija vrlo su kompetitivni zbog dobre prilagođenosti na uvjete kakvi mogu prevladavati u tlu kao što su nepovoljna temperatura, pH ili količina vlage (Rajnović, 2017). Njihova učinkovitost često je nepoznata zbog čega predstavlja vrlo veliki izazov za istraživanje. Poznavanje simbiotske učinkovitosti i genetske raznolikosti rizobija preduvjet je za selekciju visoko učinkovitih sojeva. Selekcijom visoko učinkovitih sojeva i njihovom primjenom u uzgoju leguminoza ostvaruju se veći prinosi, bolje kakvoće uz manja ulaganja. Proučavanje raznolikosti autohtonih sojeva rizobija važno je u nastojanju da se pronađe soj koji je dobro prilagođen na nepovoljne uvjete u tlu i učinkovit u fiksaciji dušika, kako bi se predsjetvenom bakterizacijom soje povećao održiv uzgoj ove vrlo vrijedne kulture u Hrvatskoj. Glavni cilj rada je utvrditi fenotipska svojstva autohtonih sojeva rizobija koje karakterizira sposobnost stvaranja učinkovitih simbiotskih zajednica sa sojom kako bi se mogli odabrati sojevi koji pokazuju najveću otpornost na nepovoljne agroekološke uvjete koji su često prisutni u području uzgoja soje u našoj zemlji.

Materijali i metode

Uzorkovanje tla i pedološke analize

Uzorci tala za izolaciju autohtonih sojeva rizobija sakupljeni su s poljoprivrednih površina koje se koriste za uzgoj ratarskih kultura kao i obiteljskih poljoprivrednih gospodarstva koja se bave uzgojem soje. Uzorci tala uzeti su iz oraničnog horizonta dubine 0-30 cm s ukupno 14 različitih lokacija uzorkovanja. Većina uzoraka uzeta je s područja Vukovarsko-srijemske županije te po jedan uzorak s područja Požeško-slavonske i Koprivničko križevačke županije. U Zavodu za pedologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu određivane su fizikalno-kemijske karakteristike tala.

Izolacija autohtonih sojeva rizobija

U cilju izolacije autohtonih sojeva rizobija iz prikupljenih uzoraka tla, postavljen je vegetacijski pokus u plasteniku Zavoda za povrćarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Sjeme sorte Lucija površinski je sterilizirano i prosijano u lonce u prethodno prikupljeno tlo. Šest tjedana nakon sjetve u faza pune cvatnje soje, prikupljene su kvržice s korijena biljaka soje te se pristupilo izolaciji čistih kultura rizobija po standardnom protokolu (Vincent, 1970).

Biokemijska karakterizacija izolata

U cilju utvrđivanja biokemijskih osobina izoliranih sojeva prema Dekak i sur. (2018) provedena su tri biokemijska testa (katalaza, ureaza i oksidaza). Oksidaza testom utvrđena je pri-

sutnost citokroma c oksidaze koji je dio transportnog sustava elektrona. Katalaza testom se utvrdila prisutnost enzima katalaze čija je zadaća razgradnja toksičnog vodikovog peroksida na molekulu kisika i vodu. Na kraju je ureaza testom (Cheriet i sur., 2015) utvrđena prisutnost enzima ureaze koji vrši hidrolizu uree na amonijak i CO₂.

Ekološka karakterizacija izolata

Koncentracija NaCl u standardnoj YMA podlozi iznosi 0,01 % te se smatra optimalnom za rast rizobija, dok povišena koncentracija soli djeluje inhibitorno na njihov rast. U ovom istraživanju ispitana je sposobnost rasta izolata na 1 %, 2 %, 3 % i 4 % koncentraciji NaCl (Yuan i sur., 2020).

Optimalne temperature za rast kvržičnih bakterija su od 25-30 °C. Da bi se ispitala sposobnost rasta na višim i nižim temperaturama ispitan je rast na temperaturama od 15 °C, 37 °C i 42 °C (Küçük i sur., 2006).

Optimalan pH medija za rizobije je 6.8. U ovom djelu istraživanja željela se ispitati sposobnost rasta rizobija na različitim pH vrijednostima (pH 4, pH 5, pH 6) odnosno u kiselom mediju te na pH vrijednosti (pH 8.5, pH 9, pH 10) odnosno u lužnatom mediju (Hung i sur., 2005).

Ispitivanje otpornosti na antibiotike

Test diskovi BD Sensi-Disc™ (BectonDickinsonGmbH) korišteni su za ispitivanje otpornosti svakog izolata na različite antibiotike. U istraživanju su korišteni antibiotici ampicilin u koncentraciji 10 µg/disku, eritromicin u koncentraciji 15 µg/disku, kanamicin u koncentraciji 30 µg/disku i streptomycin u koncentraciji 10 µg/disku. Svi izolati su prvo uzgajani u 5 ml tekuće YMB (Yeast Mannitol Broth) hranjive podloge na temperaturi 28 °C preko noći. Zatim se 100 µl bakterijske kulture svakog izolata prenijelo na YMA (Yeast Mannitol Agar) hranjivu podlogu. Diskovi s antibioticima u koncentracijama koje su navedene dodani su na podloge s nanese- nom bakterijskom kulturom svakog izolata. Inkubacija hranjivih podloga s nanesenim izolati- ma trajala je sedam dana, a nakon toga su očitani rezultati. Otpornost izolata na određenu koncentraciju antibiotika izražava se rastom bakterija oko diska antibiotika, dok izolat koji je osjetljiv na ispitivani antibiotik stvara prsten oko diska antibiotika, tj. zonu inhibicije u kojoj nema bakterijskog rasta.

Rezultati i rasprava

Za ova istraživanja odabrano je 14 lokacija s područja tri županije kontinentalne Hrvatske (tablica 1) iz kojih je izolirano 14 izolata. Uzorci tla su se međusobno razlikovali po svojim fizi- kalno-kemijskim karakteristikama. Kako bi se dokazala prisutnost autohtonih sojeva rizobija koje noduliraju soju te izvršila njihova izolacija, uzorci tla sakupljeni su s poljoprivrednih povr- šina na kojima se uzgaja soja. Rezultati fizikalnih analiza istraživanih tala (tablica 2) dobiveni su određivanjem mehaničkog sastava čestica tla (krupnog pijeska, sitnog pijeska, krupnog praha, sitnog praha i gline). Fizikalne analize pokazale su da većina uzoraka (SR2, SR3, SR5, SR7 SR8, SR12 i SR15-19) ima teksturnu oznaku praškasto glinasta ilovača. Pet uzoraka (SR1, SR4, SR6, SR9 i SR10) ima praškasto ilovastu teksturu, jedan uzorak (SR11) ima kombinaciju praškasto ilovaste i praškasto glinasto ilovaste teksture, a za jedan uzorak (SR13) nije određen mehanički sastav čestica tla.

Tablica 1. Podrijetlo izolata korištenih u ovom istraživanju
Table 1. Origin of rhizobial isolates used in this study.

Mjesto uzorkovanja	Oznaka uzorka/izolata
Vukovarsko-srijemska županija	SR1
	SR2
	SR3
	SR4
	SR5
Požeško-slavonska županija	SR6
	SR7
	SR8
	SR9
	SR10
Koprivničko-križevačka županija	SR11
	SR12
	SR13
	SR14

Kemijske analize istraživanih tala (tablica 3) pokazale su da je kod 50 % uzoraka izmjereni pH u KCl-u iznosio manje od 6.02 što dokazuje da dominiraju uglavnom kisela tla. Tri uzorka (SR3, SR6 i SR13-14) su kisela te su ta tla zastupljena na području Vukovarsko-srijemske i Požeško-slavonske županije, dok su četiri uzorka (SR1, SR2, SR4 i SR12) slabo kisela te su ta tla zastupljena na području Vukovarsko-srijemske županije. Alkalnih tala bilo je četiri (SR5, SR8, SR9 i SR10) i ona su bila s područja Vukovarsko-srijemske županije. Tri tla su bila neutralna (SR7, SR11 i SR15-19) i ona su bila s područja Vukovarsko-srijemske i Koprivničko križevačke županije. Poznato je da je pH jedan od ključnih faktora o kojem ovisi zastupljenost simbioznih fiksatora dušika u tlu te njihova sposobnost stvaranja kvržica. Njihov rast često je ograničen ukoliko se nađu u tlima nepovoljne pH reakcije. Najčešće je kiselost tla razlog nemogućnosti odvijanja procesa simbiozne fiksacije dušika jer je u takvim uvjetima inhibirana nodulacija na korijenju leguminoza (Karmakar i sur., 2015). Iako je u ovom istraživanju kod većine tala utvrđena kisela pH reakcija, ipak je dokazana prisutnost autohtonih sojeva rizobija kod svih 14 uzoraka tla. S obzirom na sadržaj humusa, devet uzoraka (SR1, SR2, SR3, SR4, SR5, SR6, SR11, SR13 i SR14) je slabo humozno, a pet uzoraka (SR7, SR8, SR9, SR10 i SR12) je dosta humozno.

Tablica 2. Mehanički sastav tala korištenih u istraživanju
Table 2. Mechanical composition of the soils used in the study.

Sadržaj mehaničkih čestica tla (%)						
Oznaka uzorka/	Krupni pijesak/ 2,0-0,2 mm	Sitni pijesak/ 0,2-0,063 mm	Krupni prah/ 0,063-0,02 mm	Sitni prah/ 0,02-0,002	Glina <0,002 mm	Teksturna oznaka/
SR1	1,0	3,8	35,8	32,9	26,5	PrI
SR2	0,6	2,6	32,7	34,2	29,9	PrGI
SR3	0,3	0,9	34,4	34,8	29,6	PrGI
SR4	0,5	0,9	38,4	36,7	24,5	PrI
SR5	0,7	0,9	28,8	35,0	34,6	PrGI

Sadržaj mehaničkih čestica tla (%)						
SR6	0,2	1,0	38,7	34,2	25,9	PrI
SR7	0,1	1,5	37,9	31,5	29,0	PrGI
SR8	0,3	1,1	35,1	31,2	32,3	PrGI
SR9	0,5	3,2	37,9	31,6	26,8	PrI
SR10	0,5	3,0	37,7	32,4	26,4	PrI
SR11	0,2	1,5	39,5	31,8	27,0	PrI-PrGI
SR12	0,5	1,1	36,8	32,2	29,4	PrGI
SR13	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SR14	0,5	1,8	9,1	60,4	28,2	PrGI

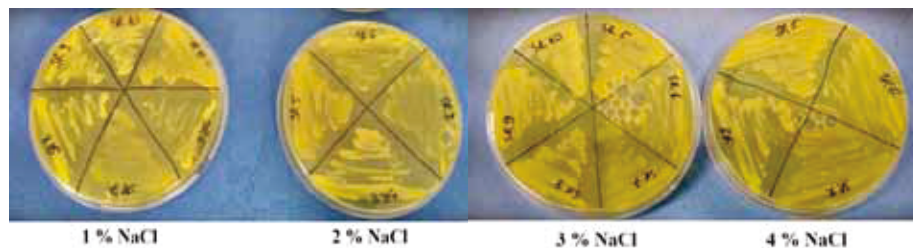
*PrI: praškasta ilovača, PrGI: praškasto glinasta ilovača, NA: not analyzed

Fenotipske karakteristika kao što su otpornost na biotičke i abiotičke čimbenike mogu varirati između različitih sojeva bakterija, a nekada se čak smatralo da su to dovoljno dobri pokazatelji za razlikovanje sojeva iste vrste. Ispitivanjem rasta na različitim temperaturama utvrđena je znatna raznolikost rizobija. Sposobnost rasta na temperaturi od 15 °C pokazali su uglavnom sojevi koji su izolirani s područja Vukovarsko-srijemske županije. S obzirom da su izolati prikupljeni s područja Vukovarsko-srijemske županije gdje se srednja godišnja temperatura se kreće u rasponu od od 12–29 °C može se uočiti korelacija između okolišnih čimbenika i prilagodbe rasta rizobija. Od ukupno 14 izolata samo njih šest (SR5, SR6, SR7, SR8, SR9 i SR10) odnosno 42 % raslo je pri temperaturi od 37 °C, dva izolata (SR9 i SR10) pokazali su slabi rast pri temperaturi od 42 °C. Rezultati ispitivanja rasta izolata na pojedinim temperaturama prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Kemijske karakteristike uzorkovanih tala: sadržaj humusa i reakcija tla
Table 3. Chemical characteristics of soil samples: humus content and soil reaction.

Oznaka uzorka/	Sadržaj humusa		pH (reakcija tla)		
	%	Interpretacija	H ₂ O	KCl	Interpretacija
SR1	2,17	slabo humozno	6,93	5,62	slabo kiselo
SR2	2,38	slabo humozno	7,11	6,02	slabo kiselo
SR3	2,33	slabo humozno	6,41	4,80	kiselo
SR4	1,99	slabo humozno	6,77	5,55	slabo kiselo
SR5	2,72	slabo humozno	8,16	7,28	alkalično
SR6	2,07	slabo humozno	6,33	4,80	kiselo
SR7	3,03	dosta humozno	7,94	7,14	neutralno
SR8	3,39	dosta humozno	8,07	7,34	alkalično
SR9	3,26	dosta humozno	8,22	7,59	alkalično
SR10	3,36	dosta humozno	8,07	7,48	alkalično
SR11	2,82	slabo humozno	7,61	7,09	neutralno
SR12	3,34	dosta humozno	6,83	5,80	slabo kiselo
SR13	2,14	slabo humozno	5,15	4,37	kiselo
SR14	2,76	slabo humozno	7,87	7,36	neutralno

Koncentracija NaCl u standardnoj YMA hranjivoj podlozi za uzgoj rizobija iznosi 0,01%. U ovom istraživanju izolati su testirani na sposobnost rasta u znatno većim koncentracijama soli (1 %, 2 %, 3 % i 4 %). Na koncentracijama 1 %, 2 % i 3 % NaCl svi sojevi pokazivali su dobar ili djelomičan rast osim izolata SR1 i SR11 koji nisu rasli na koncentraciji 3 % NaCl-a. Većina sojeva nije rasla na koncentraciji 4 % NaCl, dok je manji broj sojeva pokazivao rast ili djelomičan rast (tablica 3). Salinitet je jedan od čimbenika koji mogu nepovoljno utjecati na simbioznu fiksaciju dušika gdje su leguminoze najčešće osjetljiviji partner. Za rizobije se zna da za razliku od svojih biljaka domaćina mogu preživjeti u prisutnosti visokih koncentracija soli (Bouhmouch i sur., 2005). Slika 1 prikazuje pojedine izolate koji su pokazali najbolji rast na YMA hranjivim podlogama uz dodatak različitih koncentracija NaCl-a.



Slika 1. Prikaz rasta reprezentativnih izolata na YMA hranjivoj podlozi uz dodatak različitih koncentracija NaCl / **Figure 1.** Growth of representative isolates on YMA nutrient medium with the addition of different concentrations of NaCl.

Tablica 4. Stupanj tolerancije različitih sojeva rizobija na različite koncentracije NaCl, pH vrijednosti i temperaturu / **Table 4.** Tolerance degree of rhizobial strains to different NaCl concentrations and temperature.

Oznaka izolata	Temperatura			NaCl %			
	15°C	37°	42°	1	2	3	4
SR1	+	-	-	+	+	-	-
SR2	+	-	-	+	+	+/-	-
SR3	-	-	-	+	+	+/-	-
SR4	+	-	-	+	+	+	+
SR5	+	+	-	+	+	+	+
SR6	+	+	-	+	+	+	+
SR7	+	+	-	+	+	+	+
SR8	+	+	-	+	+	+	+
SR9	+	+	+/-	+	+	+	+
SR10	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-
SR11	-	-	-	+/-	+/-	-	-
SR12	-	-	-	+	+/-	+/-	-
SR13	-	-	-	+	+	+	+/-
SR14	-	-	-	+	+	+	+/-

+ dobar rast; +/- djelomičan rast; - nema rasta

Optimalna pH vrijednost na kojoj rastu rizobije je 6,8. U cilju procjene rasta i na drugim pH vrijednostima u ovom istraživanju provedeno je ispitivanje sposobnost rasta izolata na šest različitih pH vrijednosti (4, 5, 6, 8,5, 9 i 10). U provedenom istraživanju utvrđena je znatna varijacija u rastu između pojedinih izolata. Najslabiji rast utvrđen je kod pH vrijednosti 4 na kojoj su izolati najslabije rasli. Kao najbolji izolati pokazali su se izolati SR15 i SR16 s područja Koprivničko-križevačke županije (Gola). Pri pH vrijednosti 5 i 6 svi izolati su pokazali dobar rast. Pri pH vrijednosti 8,5, 9 i 10 svi izolati pokazali su jako dobar rast što ukazuje da sojevi toleriraju izrazito alkalnu pH vrijednost sredine. Detaljan pregled rasta svih izolata na različitim pH vrijednostima prikazan je na grafu 1.



Graf 1. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja rasta izolata na različitim pH vrijednostima
Graph 1. Results of spectrophotometric determination of isolate growth at different pH values

Provedenim ureaza testom od ukupno 14 izolata, kod njih devet utvrđeno je prisustvo enzima ureaze što ukazuje na pozitivnu reakciju (tablica 4). Ureaza hidrolizira ureu te dovodi do nastanka amonijaka koji alkalizira pH hranjive podloge koja potom mijenja boju iz žute u ružičastu. Ostali izolati nisu pokazali prisustvo enzima ureaze što je znak negativne reakcije.

Tablica 5. Rezultati ispitivanja biokemijskih karakteristika i otpornosti na antibiotike
Table 5. Screening biochemical characterization and antibiotics resistance.

Oznaka izolata	Biokemijska karakterizacija				Antibiotici			
	Ureaza	Katalaza	Oksidaza	Str	Eri	Amp	Kan	
SR1	+	-	-	S	S	S	S	
SR2	+	+	-	S	S	S	S	
SR3	+	+	-	S	R	R	S	
SR4	-	-	-	S	S	S	S	
SR5	-	-	-	S	S	I	S	
SR6	-	+	-	S	S	S	S	
SR7	+	-	-	I	I	I	S	
SR8	-	-	-	S	I	R	S	
SR9	+	-	-	S	S	R	S	
SR10	-	+	-	S	S	R	S	
SR11	-	-	-	I	R	R	S	
SR12	-	-	-	S	S	R	S	
SR13	+	-	-	S	R	R	S	
SR14	+	+	-	S	R	R	S	

+ rast; - nema rasta; S-osjetljiv; R-rezistentan; I-umjereno osjetljiv; Str-streptomycin; Eri-eritromicin; Amp-ampicilin; Kan-kanamicin

Provedenim katalaza testom 35 % izolata bilo je pozitivno na prisustvo enzima katalaza koji razgrađuje vodikov peroksid na vodu i kisik (tablica 4). Izolati koji su pokazali pozitivnu reakciju stvarali su mjehuriće zraka (O₂) dodatkom vodikovog peroksida što ukazuje da je enzim katalaza razgradio vodikov peroksid na vodu i kisik. Rezultati provedenog oksidaza testa pokazali su da niti jedan izolat ne posjeduje enzim citokrom c oksidazu.

Tlo predstavlja heterogenu grupu mikroorganizama od kojih su pojedini u stanju sintetizirati razne antibiotike, koji kao takvi mogu imati direktan ili indirektan utjecaj na rizobije u tlu (Martínez-Viveros i sur., 2010). Ispitivanje otpornosti na antibiotike (IAR, engl. intrinsic antibiotic resistance) važno je svojstvo za karakterizaciju rizobija. Ujedno je to danas i standardni test kojim se dobiva uvid u heterogenost populacije koja dijeli isto stanište. Osjetljivost rizobija na antibiotike razlikuje se između različitih vrsta, ali i između sojeva istih vrsta. Zahran i sur. (2012) u svom istraživanju pokazali su da su mikrosimbionti različitih kultura bili osjetljivi na tetraciklin, kanamicin i streptomycin, pri čemu je streptomycin imaju najštetniji učinak na rizobije. Ispitivanjem otpornosti na četiri različita antibiotika utvrđeno je da je 95 % izolata bilo osjetljivo na kanamicin. Primjenom streptomicina ni jedan izolat nije pokazao rezistentnost, odnosno utvrđena je 100 % osjetljivost, pri čemu je 80 % bilo osjetljivo, a 20 % umjereno osjetljivo. Rezistentnost na eritomicin pokazalo je 45 % izolata, dok je na kanamicin utvrđena rezistentnost samo jednog izolata (tablica 4).

Zaključak

U svim istraživanim tlima utvrđeno je postojanje autohtonih sojeva rizobija. Fenotipska karakterizacija izoliranih sojeva ukazuje na veliku varijabilnost i značajnu otpornost prema nepovoljnim okolišnim uvjetima. Posebno se ističe tolerancija na niske i visoke temperature, tolerancija na niske pH vrijednosti i povišen salinitet to ih čini pogodnima za potencijalnu primjenu u pripremi preparata za predstjetvenu inokulaciju soje. Biokemijskom karakterizacijom utvrđena je prisutnost enzima ureaze i katalaze kod pojedinih izolata, te odsutnost enzima citokrom c oksidaze kod svih izolata. Ispitivanjem otpornosti na antibiotike najviše izolata pokazalo je rezistentnost na ampicilin, dok je najviše izolata bilo osjetljivo na kanamicin.

Zahvala

Rezultati prezentirani u radu nastali su kao rezultat rada studenata koji su dobili Dekanovu nagradu 2020/2021 na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod naslovom „Izolacija i identifikacija mikrosimbionata soje (*Glycine max* L.) u kontinentalnoj Hrvatskoj“

Literatura

- Bouhmouch, I., Souad-Mouhsine, B., Brhada, F., Aurag, J. (2005). Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 162 (10), 1103-1113.
- Cheriet, A., Ouarts, D., Chekireb, S., Baba, A. (2015). Phenotypic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from *Medicago ciliaris* L. from Algeria. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, 115B (1), 29-43.
- Clúa J., Roda C., Zanetti, M.E., Blanco, F.A. (2018). Compatibility between Legumes and Rhizobia for the Establishment of a Successful Nitrogen-Fixing Symbiosis. *Genes*, 9 (3), 125.
- Dekak, A., Chabi, R., Menasria, T., Benhizia, Y. (2018). Phenotypic characterization of rhizobia nodulating legumes *Genista microcephala* and *Argyrolobium uniflorum* growing under arid conditions. *Journal of advanced research*. 14, 35-42.
- FAO (2021). FAOSTAT database collections. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Halbleib, C. M., Ludden, P. W. (2000). Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *Recent Advances in Nutritional Sciences*. 130 (5), 1081-1084. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1081>
- Hung, M. H., Bhagwath, A.A., Shen, F.T., Devasya, R.P., Young, C.C. (2005). Indigenous rhizobia associated with native

shrubby legumes in Taiwan. *Pedobiologia*, 49, 577–584.

Küçük, Ç., Kivanç, M., Kinaci, E. (2006). Characterization of *Rhizobium* sp. Isolated from Bean. *Turkish Journal of Biology*, 30, 127–132.

Lindström, K., Mousavi, S.A. (2019). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314–1335.

Martínez-Viveros, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G., Mora, M. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by Rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10 (3), 293–319.

Ogedegbe, S.A., Falodun, E.J. (2016). Evaluation of Seven Forage Legumes for Biological Nitrogen Fixation (BNF) and Their Effects on *Amaranthus cruentus* in a Fluvisol (River Sand). *Journal of Experimental Agriculture International*, 1–6.

Rajnović, I. (2017). Bioraznolikost i simbiozna učinkovitost prirodnih populacija rizobija koje noduliraju grah (*Phaseolus vulgaris* L.), Doktorska disertacija. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet.

Salvagiotti, F., Cassman, K.G., Specht, J.E., Walters, D.T., Weiss, A., Dobermann, A. (2008). Nitrogen uptake fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Field Crops Research*, 108,(1), 1–13.

Sharma, V., Bhattacharyya, S., Kumar, R., Kumar, A., Ibañez, F., Wang, J., Guo, B., Sudini, H.K., Gopalakrishnan, S., DasGupta, M., Varshney, R.K., Pandey, M.K. (2020). Molecular Basis of Root Nodule Symbiosis between *Bradyrhizobium* and 'Crack-Entry' Legume Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plants*, 9 (2), 276.

Verma, M., Verma, S., Arora, N. K. (2017). Application of *Rhizobium-Pseudomonas* consortia for enhanced production of mungbean in sustainable manner. *International Journal of Science, Technology and Society*, 3 (2), 54–61.

Vincent, J. M. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria* (IBP Handbook No 15). Blackwell Scientific Publications. Oxford.

Yuan, K., Reckling, M., Ramirez, M. D. A, Djedidi, S., Fukuhara, I., Ohyama, T., Yokoyama, T., Bellingrath-Kimura, S. D., Halwani, M., Egamberdieva, D., Ohkama-Ohtsu, N. (2020). Characterization of Rhizobia for the Improvement of Soybean Cultivation at Cold Conditions in Central Europe. *Microbes and Environments*, 35 (1), ME19124. DOI: <https://doi.org/10.1264/j sme2.ME19124>

Zahrán, H.H., Abdel-Fattah, M., Yasser, M.M., Mahmoud, A. M., Bedmar, E.J. (2012). Diversity and Environmental Stress Responses of Rhizobial Bacteria from Egyptian Grain Legumes. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6 (10), 571–583.

Prispjelo/Received: 3.2.2023.

Prihvaćeno/Accepted: 24.2.2023.

Original scientific paper

Isolation and phenotypic characterization of soybean (*Glycine max* L.) microsymbionts in continental Croatia

Abstract

Symbiotic nitrogen fixation enables legumes to supply most of their needs for nitrogen in efficient and ecological manner. Rhizobia are group of prokaryotic organisms with the unique ability to form symbiotic relationships at the root of leguminosia in which they inert atmospheric nitrogen in plants is converted by nitrogenase enzymes. It is assumed that native rhizobial populations are also present in the soils of continental Croatia and that the strains differ from each other in phenotypic and genotypic properties. In order to select the best rhizobia strains, soil samples were collected from three areas of continental Croatia where there is a long tradition of soybean cultivation. Phenotypic characterization included the determination of growth at different temperatures, pH values and growth at different salt concentrations, biochemical characterization, antibiotic resistance testing. Phenotypic characterization has shown significant resistance to environmental stress conditions, particularly resistance to low pH, which is extremely important because Croatia has a lot of acid soils. Strains SR1, SR2 and SR3 have proven to be the best strains, therefore it would be useful to include them in a further selection programme.

Keywords: nodule bacteria, biological nitrogen fixation, soybean (*Glycine max* L.), phenotypic characterization, ecological characterization