

# KONTROLA KVALITETE INOKULANTA ZA PREDSJETVENU BAKTERIZACIJU SJEMENA SOJE

---

Jukić, Antonija

Undergraduate thesis / Završni rad

2013

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:242082>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-01**



Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet  
agrobiotehničkih  
znanosti Osijek**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical  
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of  
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Antonija Jukić

Sveučilišni preddiplomski studij

Smjer: Bilinogojstvo

**KONTROLA KVALITETE INOKULANTA ZA PREDSJETVENU**  
**BAKTERIZACIJU SJEMENA SOJE**

**Završni rad**

**Osijek, 2013.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Antonija Jukić

Sveučilišni preddiplomski studij

Smjer: Bilinogojstvo

**KONTROLA KVALITETE INOKULANTA ZA PREDSJETVENU**  
**BAKTERIZACIJU SJEMENA SOJE**

**Završni rad**

Povjerenstvo za obranu završnog rada:

1. prof. dr. sc. Zlata Milaković, predsjednik
2. doc. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor
3. doc. dr. sc. Irena Rapčan, član

**Osijek, 2013.**

# SADRŽAJ

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD.....                                                                         | 1  |
| 2. ZNAČAJ SOJE I PROIZVODNJA U SVIJETU I HRVATSKOJ .....                             | 1  |
| 3. MORFOLOŠKA SVOJSTVA SOJE .....                                                    | 4  |
| 3.1. Sjeme .....                                                                     | 4  |
| 3.2. Korijen .....                                                                   | 4  |
| 3.3. Kvržice (nodule) .....                                                          | 5  |
| 3.4. Stabljika .....                                                                 | 6  |
| 3.5. List .....                                                                      | 7  |
| 3.6. Cvijet .....                                                                    | 7  |
| 3.7. Mahuna .....                                                                    | 8  |
| 3.8. Dlake .....                                                                     | 9  |
| 4. EKOLOŠKI UVJETI ZA PROIZVODNJU SOJE.....                                          | 10 |
| 4.1. Tlo.....                                                                        | 10 |
| 4.2. Klima .....                                                                     | 10 |
| 4.3. Svjetlo.....                                                                    | 10 |
| 4.4. Vlaga.....                                                                      | 11 |
| 4.5. Toplina.....                                                                    | 11 |
| 5. AGROTEHNIKA SOJE .....                                                            | 13 |
| 5.1. Plodored.....                                                                   | 13 |
| 5.2. Obrada tla .....                                                                | 13 |
| 5.3. Sjetva .....                                                                    | 14 |
| 5.3.1. Rokovi, način, dubina sjetve i njega soje .....                               | 14 |
| 5.4. Žetva soje.....                                                                 | 15 |
| 6. FIKSACIJA DUŠIKA U TLU .....                                                      | 16 |
| 6.1. Podrijetlo dušika u tlu.....                                                    | 16 |
| 6.2. Nesimbiozna fiksacija dušika .....                                              | 17 |
| 6.3. Simbionzna fiksacija dušika i bakterizacija sjemena .....                       | 17 |
| 7. KONTROLA KVALITETE PRIPRAVAKA ZA PREDSJETVENU BAKTERIZACIJU<br>SJEMENA SOJE ..... | 21 |
| 8. MATERIJALI I METODE.....                                                          | 23 |
| 9. REZULTATI I RASPRAVA.....                                                         | 25 |
| 10. ZAKLJUČAK.....                                                                   | 27 |
| 11. LITERATURA .....                                                                 | 28 |
| 12. SAŽETAK .....                                                                    | 30 |
| 13. SUMMARY .....                                                                    | 30 |
| 14. POPIS TABLICA .....                                                              | 31 |
| 15. POPIS SLIKA .....                                                                | 32 |
| 16. POPIS GRAFOVA .....                                                              | 33 |
| TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....                                               | 34 |

## 1.UVOD

Soja *Glycine max* (L.) Merrill je stara ratarska kultura, koja se uzgaja više od četiri tisuće godina. Ona je jedna od najznačajnijih bjelančevinastih i uljnih kultura u svijetu. Zrno soje sadrži 35-50 % bjelančevina te 18-24 % ulja, ovisno o sorti i uvjetima uzgoja (Vratarić i Sudarić, 2000.).

Soja je biljka koja u simbiozi s bakterijom *Bradyrhizobium japonicum* fiksira atmosferski dušik, i prevodi ga u amonijačni oblik pristupačan biljci. Bakterije na korijenu formiraju kvržice unutar kojih se razvijaju. Kako bi smo postigli što veći broj kvržica na korijenu prije sjetve soje vršimo bakterizaciju sjemena.

Cilj ovoga rada prikazati je građu soje, način uzgoja te važnost primjene predstajvene bakterizacije sjemena soje kao i njegovu kontrolu kvalitete.

## 2. ZNAČAJ SOJE I PROIZVODNJA U SVIJETU I HRVATSKOJ

Soja ima zrno visoke kakvoće koje sadrži 35-50% bjelančevina i 18-24% ulja, pa je zbog tih svojstava vodeća uljna i bjelančevinasta kultura svijeta. Bjelančevine soje imaju visoku biološku vrijednost jer sadrže sve esencijalne aminokiseline, pa se izjednačuju s bjelančevinama životinjskog podrijetla (Gagro, 1997.). Bogata je provitaminom A i vitaminima B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>, a osim njih sadrži i vitamin C, D, E i K. Značajnu ulogu ima u ljudskoj prehrani, hranidbi domaćih životinja i u industriji. Soja je ratarska kultura koja preradom može biti iskorištena 100 %. Najveći dio soje u svijetu koristi se za hranidbu stoke. Od zrna soje proizvode se sačme i pogače, koje nastaju ekstrakcijom ulja. Također se može koristiti kao zelena masa, sijeno ili silaža. Sojino sijeno sadrži 17-19 % bjelančevina te je vrijednije od sijena lucerne.

U prehrani ljudi soja je veoma važna za proizvodnju ulja. Ulje soje koristimo pri proizvodnji boja, lakova, lijekova u farmaceutskoj industriji. Također se priprema i kao varivo, dok od njenog brašna pripremamo različita jela kao što su kolači, kruh, biskviti. U industrijskoj proizvodnji soju koristimo za proizvodnju gume, vodootpornog ljepljiva, šperploča, eksploziva, furnira i mnoštva drugih proizvoda.

Soja potječe iz Kine, a odatle se širila u azijske zemlje i na druge kontinente (Gagro, 1997.). Iako je soja poznata od davnina njena proizvodnja u Europi počinje tek u 19. st. Sve zemlje svijeta koje imaju uvjete za proizvodnju soje nastoje unaprijediti i proširiti njenu proizvodnju. Soja je danas važna ekonomska i politička kultura (Vratarić i Sudarić, 2008.). Površine pod sojom rastu iz godine u godinu. Prema FAO podacima 2006.godine u svijetu je bilo 92 988 859 ha pod sojom, dok je 2011.godine soja bila zasijana na 102 993 246 ha. Najveće površine pod sojom ima Amerika (85,82%), a nakon nje slijedi Azija s 11,62%, dok se od ukupnih svjetskih površina zasijanih sojom samo 1,61% nalazi u Europi (FAO). Vodeći svjetski proizvođač soje je SAD, a nakon njega je važan proizvođač Brazil (Graf 1.).



Graf 1. Pet najvećih svjetskih proizvođača soje  
(<http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE>)

U Hrvatskoj se soja pojavila u razdoblju 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. Obimniji rad o širenju soje u Hrvatskoj proveo je Stjepan Čmelik (Vratarić i Sudarić, 2008.) koji je iz Kine nabavio novu kolekciju sorata soje. Kasnije su te sorte izvezene u Bugarsku i Rumunjsku gdje su korištene u križanjima radi dobivanja novih sorti. U par navrata dolazilo je do pokušaja značajnijeg povećanja proizvodnje soje u Hrvatskoj, ali su uglavnom završavali neuspješno. Početnom godinom stabilnije proizvodnje soje u zemlji može se smatrati 1987. godina. U razdoblju do 1997. došlo je do stabiliziranja površina pod sojom na oko 20 000 ha, a najveće površine pod sojom u Hrvatskoj su u Slavoniji i Baranji. U posljednjih nekoliko godina površine soje u širokoj proizvodnji u Republici Hrvatskoj su stabilizirane u rasponu od 40 000 do 55 000 ha, s prosječnim urodom zrna od 2 500 do 3 000 kg/ha (Vratarić i Sudarić, 2008.). Prema Statističkom ljetopisu iz 2012. godine u Republici Hrvatskoj soja je uzgajana na 58 896 ha (2011.g), a prosječni prinos je iznosio 2,5 t/ha.

Tablica 1. Požnjevena površina i proizvodnja soje u Hrvatskoj od 2006.-2011.g  
([http://www.dzs.hr/Hrv\\_Eng/ljetopis/2012/sljh2012.pdf](http://www.dzs.hr/Hrv_Eng/ljetopis/2012/sljh2012.pdf))

|       | Požnjevena površina, ha | Prirod po ha, t | Proizvodnja, t |
|-------|-------------------------|-----------------|----------------|
| 2007. | 46 506                  | 1,9             | 90 637         |
| 2008. | 35 789                  | 3,0             | 107 558        |
| 2009. | 44 292                  | 2,6             | 115 159        |
| 2010. | 56 456                  | 2,7             | 153 580        |
| 2011. | 58 896                  | 2,5             | 147 271        |

### 3. MORFOLOŠKA SVOJSTVA SOJE

#### 3.1. Sjeme

Sjeme soje (Slika 1.) je različitog oblika, veličine i boje što ovisi o sorti i načinu uzgoja (Vratarić i Sudarić, 2008.). Masa tisuću zrna se kreće od 20 do 500 grama (Vratarić i Sudarić, 2008.). Sjeme može biti okruglog, ovalnog, jajastog oblika te na krajevima blago spljošteno, dok mu veličina i krupnoća ovisi o sorti i agroekološkim činiteljima. Sjeme je sastavljeno od embria koji je obavijen sjemenskom opnom. Embrio se sastoji od dva kotiledona, plumule s dva primarna listića koji zatvaraju primordij prvog lista, epikotila, hipokotila i korjenčića (Vratarić i Sudarić, 2000.).



Slika 1. Zrno soje  
([http://t2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRQMO-fjwW8-Jda49Lcgrjw84sXBmKz1Shkwv4OjYS4F25\\_D1U4uQ](http://t2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRQMO-fjwW8-Jda49Lcgrjw84sXBmKz1Shkwv4OjYS4F25_D1U4uQ))

Sjemenska opna sastavljena je od: epiderme, hipoderme i unutarnjeg parenhima, a na nju otpada 7-8% ukupne mase sjemena (Vratarić i Sudarić, 2008.). Sjemenska opna je gruba i čvrsta. Boja sjemenske opne sortno je svojstvo, a može biti žuta, zelena, smeđa i crna, ili kombinacija ovih boja. Za preradu je najpoželjnija svjetložuta boja (Vratarić i Sudarić, 2008.).

#### 3.2. Korijen

Korijen soje (Slika 2.) je vretenastog oblika. Dobro je razgranat i sastoji se od glavnog korijena na kome se razvija mnoštvo postranih korjenčića, koji su rasprostranjeni na različitim dubinama u tlu. Korijen ima veliku apsorpcijsku sposobnost. Njegova dubina može biti do 180 cm, ali se glavnina korijena nalazi na



dubini od 30 cm. Dubina prodiranja korijena ovisi o sorti i vrsti zemljišta. Na korijenu soje dolazi do stvaranja kvržica, unutar kojih žive bakterije *Bradyrhizobium japonicum* koje vežu atmosferski dušik. Razvoj korijena ovisi o raspoloživoj vodi i hranivima u tlu, sastavu zemljišta te o asimiliranoj energiji (Vratarić i Sudarić, 2000.). Veličina i rasprostranjenost korijena i broj kvržica na njemu značajno utječu na konačan urod zrna sojine biljke (Vratarić i Sudarić, 2000.). U početku razvoja biljke korijen raste najbrže, a za vrijeme nalijevanja zrna njegov se razvoj uspori, te mu je rast u vrijeme fiziološke zriobe zrna završen.



Slika 2. Korijen soje

([http://www.bio.georgiasouthern.edu/bio-home/harvey/lect/images/soybean\\_root\\_nodules.jpg](http://www.bio.georgiasouthern.edu/bio-home/harvey/lect/images/soybean_root_nodules.jpg))

### 3.3. Kvržice (nodule)

Soja koristi dušik iz zraka preko bakterija koje žive na korijenu biljke u kvržicama (Slika 3.) i nazivaju se kvržične bakterije.



Slika 3. Presjek kvržica

([http://www.ctahr.hawaii.edu/mauisoil/images/c\\_nutrients01\\_clip\\_image004.jpg](http://www.ctahr.hawaii.edu/mauisoil/images/c_nutrients01_clip_image004.jpg))

Za soju je infektivna vrsta *B. japonicum* unutar koje se nalazi više sojeva (Vratarić i Sudarić, 2008.). Bakterije žive u simbiozi s biljkom, one od biljke uzimaju ugljikohidrate, a za uzvrat ju opskrbljuju dušikom. Bakterije pretvaraju anorganski dušik ( $N_2$ ) iz atmosfere u amonijski oblik ( $NH_4^+$ ) i na taj način postaje pristupačan biljci. Do formiranja kvržica na korijenu dolazi u trenutku infekcije bakterijom *B. japonicum* kroz korijenove dlačice. Na mjestima intenzivne diobe bakterija dolazi do stvaranja kvržica. Dva do tri tjedna nakon infekcije bakterije su sposobne vršiti fiksaciju dušika i hraniti biljku (Vratarić i Sudarić, 2008.). Četiri tjedna nakon infekcije promjer kvržica je najveći i fiksiranje dušika je intenzivno (Vratarić i Sudarić, 2008.). Kvržice se razvijaju postupno kao i soja, pa na korijenu možemo istovremeno naći kvržice različite starosti i veličine. U povoljnim uvjetima za razvoj kvržica na korijenu ih može biti i do 100. Aktivne kvržice u presjeku imaju intenzivnu ružičastu boju, dok su neaktivne kvržice u presjeku sivozelene boje. Na aktivnost bakterija utječu fizikalna i kemijska svojstva tla, posebno pH, te klimatski činitelji, prozračnost tla, agrotehnika i gnojidba (Vratarić i Sudarić, 2008.).

### 3.4. Stabljika

Soja ima uspravnu i razgranatu stabljiku, koja je na poprečnom presjeku okrugla. Visina stabljike kreće se od 20 do 200 cm, i sastavljena je od većeg broja članaka (najčešće 12-15) (Vratarić i Sudarić, 2000.).

Kod soje razlikujemo dva habitusa rasta, indeterminirani (nedovršeni) i determinirani (dovršeni). Kod indeterminiranog tipa rasta cvatnja počinje na petom-šestom nodiju (Vratarić i Sudarić, 2000.). Biljka dalje postepeno raste i cvjeta. Rast prestaje tek pred tehnološku zriobu. Stabljika je visoka s velikim brojem nodija čija je rodnost prema vrhu stabljike slabija, a smanjuje se i otpornost na polijeganje (Vratarić i Sudarić, 2008.).

Sorte determiniranog tipa rasta najprije narastu više od 80 % potrebne visine (Vratarić i Sudarić, 2000.). Zatim procvjetaju na svim nodijima, tako da poslije početka cvatnje za nekoliko dana prestaje svaki rast biljke. Stabljike su nešto niže i s većom mogućnošću granjanja. Zameću više prvu mahunu i otpornije su na polijeganje (Vratarić i Sudarić, 2000.). Na stabljici dolazi do formiranja listova. Prvi par pravih listova položen je nasuprotno na stabljici, dok se troliske formiraju naizmjenično na

stabljici, na nodijama. U prosjeku na stabljici imamo 10-18 nodija, a njihov broj ovisi o sortimentu i ekološkim činiteljima.

### 3.5. List

Postoje četiri tipa sojinih listova, i to: kotiledoni, jednostavni primarni listovi, troliske i trokutasti listovi-zalisci (Vratarić i Sudarić, 2008). Jednostavni ili primarni listovi formirani su još u sjemenci i dobro su razvijeni kad klijanac izbija na površinu (Vratarić i Sudarić, 2000.). Primarni listovi su jednostavni listovi sa peteljkom dužine 1-2 cm i položeni su nasuprotno na stabljici. Svi ostali listovi na stabljici su troliske i poredane su naizmjenično. Troliske većine komercijalnih sorata variraju po veličini, i to od 4 do 20 cm po duljini i 3 do 10 cm po širini (Vratarić i Sudarić, 2000.). Listovi mogu imati i različite oblike pa razlikujemo: okrugle, ovalne, jajaste i kopljaste listove. Zalisci su jednostavni, vrlo mali par listova, u bazi svake grane i najnižeg dijela peteljke svakog cvijeta (Vratarić i Sudarić, 2000.). Boja listova varira od blijedozelene do tamnozeleno, a površina im je pokrivena dlačicama. U zriobi listovi postaju žuti i otpadaju.

### 3.6. Cvijet

Cvjetovi soje (Slika 4.) su sastavljeni od čaške, vjenčića, prašnika i tučka (Vratarić i Sudarić, 2008.) i skupljeni su u cvat, te se nalaze u pazušcima listova. Čaška je cjevasta i završava s pet nejednakih lapova, od kojih je najviši prednji (Vratarić i Sudarić, 2000.). Ostaje neoštećena do stvaranja mahune. Vjenčić ili corolla sastoji se od odvojenih latica (Vratarić i Sudarić, 2000.). Najveća je stražnja latica. Sa strane su dvije latice kao dva krilca, te dvije prednje latice kao lađice. Andrecej se sastoji od 10 prašnika i to 9 sraslih i jednog odvojenog. Prašnici se nalaze u vidu prstena oko tučka, tako da se polen istrese direktno na stigm (Vratarić i Sudarić, 2000.). Soja je samooplodna biljka, s malim postotkom stranooplodnje (0,5 do 1 %), cvjetovi se oprašuju uglavnom prije otvaranja (Vratarić i Sudarić, 2000.), a do otvaranja cvjetova dolazi u jutarnjim satima. Boja cvjetova može biti bijela, ljubičasta ili kombinacija ljubičasto-bijele boje. Ljubičasti cvjetovi su dominantni nad bijelima (Vratarić i Sudarić, 2000.).

Kod indeterminiranog tipa rasta vegetativni i reproduktivni rast idu zajedno. Od pojave cvijeta na petom ili šestom nodiju, ovisno o sorti, sojina biljka dalje raste i cvjeta (Vratarić i Sudarić, 2000.). Cvjetovi se stvaraju progresivno prema vrhu glavne stabljike i grana u pazušcima listova, a skupljeni su u cvat tipa grozda (3-5 cvjetova). Na vrhu stabljike ovih sorata formiraju se 2-3 aksilarne cvati koje su vrlo blizu jedna drugoj jer su kratki internodiji na vrhu stabljike (Vratarić i Sudarić, 2000.).

Kod determiniranog tipa rasta biljke soje narastu i procvjetaju u svim nodijima i termalnoj racemi koja se neznatno proširuje (Vratarić i Sudarić, 2000.). Cvjetovi se nalaze u pazušcima gdje su skupljeni u racemoznu cvat sastavljenu od 3 do 15 cvjetova, a stabljika se završava s termalnim cvatom (vrh stabljike) koji sadrži oko 35 cvjetova po čemu se i uočavaju razlike u tipovima rasta između determinirane i indeterminirane stabljike. Soja stvara više cvjetova nego što može razviti mahuna, pa je njihovo opadanje normalna pojava.



Slika 4. Cvijet soje

([http://www.clemson.edu/extension/rowcrops/soybeans/guide/files/growth\\_stages\\_image006\\_0001.jpg](http://www.clemson.edu/extension/rowcrops/soybeans/guide/files/growth_stages_image006_0001.jpg))

### 3.7. Mahuna

Mahuna soje (Slika 5.) može biti srpastog, okruglog ili spljoštenog oblika (Vratarić i Sudarić, 2008.). Oblik mahune ovisi o broju i obliku sjemenki unutar nje. Mahuna može imati 1-5 sjemenki, ali ih u prosjeku sadrži 2-3 (Vratarić i Sudarić, 2000.). Veličina mahune varira ovisno o sorti i vanjskim čimbenicima. Duljina mahuna je između 2-7 cm, a širina između 1-1,5 cm (Vratarić i Sudarić, 2008.). Boja mahuna varira od vrlo svijetle slamnatožute do gotovo crne. Tri su glavne boje: svijetla slamnatožuta, siva i crna. Kombinacija ovih boja sa smeđim i sivim dlačicama daje mahune koje se čine zasjenjene ili smeđe, ali osnovna boja je nepromijenjena.



Slika 5. Mahuna soje  
([http://www.jgi.doe.gov/News/lores\\_dried\\_soybean.jpg](http://www.jgi.doe.gov/News/lores_dried_soybean.jpg))

Prve mahune se formiraju oko 14 dana poslije pojave prvih cvjetova i poželjno je da se formiraju više na stabljici, jer su na taj način smanjeni gubitci prilikom žetve. U normalnim uvjetima razvoj mahuna traje oko tri tjedna. Maksimalan broj zrna po stabljici i mahuni je svojstvo uvjetovano uglavnom genetski, a stvarni broj i njegova veličina zavise od uvjeta u formiranje sjemena (Vratarić i Sudarić, 2000.).

### 3.8. Dlake

Stabljika, peteljka, čaška cvijeta i mahune normalne sojine biljke prekrivene su dlakama. Postoji umjerena varijabilnost u broju, opsegu, orijentaciji i rasporedu dlačica. Većina sorata ima prosječnu količinu dlaka. Međutim ima i sorata s vrlo gustim dlakama, koje su poput krzna, dok druge sorte imaju vrlo rijetke dlake na stabljici (Vratarić i Sudarić, 2000.). Među japanskim sortama ima sorata bez dlaka, tzv. gole sorte, koje su vrlo otporne na buhača mahune (Vratarić i Sudarić, 2000.). Boja dlaka je smeđa ili siva (Vratarić i Sudarić, 2000.).

## **4. EKOLOŠKI UVJETI ZA PROIZVODNJU SOJE**

Vanjski činitelji koji utječu na visinu uroda soje su tlo, vlaga, ugljični dioksid i temperatura. Urod soje je određen i genetičkim potencijalom, ali njegova realizacija ovisi o okolišnim uvjetima, odnosno oni ne djeluju pojedinačno nego su povezani (Vratarić i Sudarić, 2000.).

### **4.1. Tlo**

Soja se uglavnom uzgaja na dubokim plodnim tlima, bogatim humusom i sa pH 7, koje ima dobre vodozračne osobine. Može dati dobre rezultate i na siromašnijim tlima ukoliko ima dovoljno vode. Kako bi se korijen soje pravilno razvijao, a i kvržične bakterije, potrebno je da tlo ne bude ni kiselo ni slano, te da su vodozračni odnosi dobri i da su hraniva u tlu u pristupačnom obliku (Vratarić i Sudarić, 2000.). Za proizvodnju soje u obzir dolaze svi tipovi tla, osim jako pjeskovitih, jako kiselih i slanih, te plitkih tala (Vratarić i Sudarić, 2000.).

Ukoliko je došlo do opadanja plodnosti tla tada moramo više pažnje posvetiti gnojidbi kako bi smo dobili zadovoljavajuće urode. Na tlima na kojima uzgajamo soju nije važna samo plodnost, nego i uređenost tla, jer na uređenim tlima osiguravamo stabilne i sigurne urode (Vratarić i Sudarić, 2000.). Osim drenaže na tlima s niskim pH vršimo kalcizaciju (Vratarić i Sudarić, 2000.).

### **4.2. Klima**

Područje rasprostranjenja soje je vrlo veliko (Vratarić i Sudarić, 2000.). Soja uspijeva u uvjetima tropske, suptropske, umjerene i kontinentalne klime, što joj omogućuje veliki broj sorata različitih grupa zriobe (Vratarić i Sudarić, 2000.). Nadmorska visina ima manji utjecaj ako su ostali agroekološki uvjeti zadovoljeni. Soja se uzgaja uspješno i na 2000 m nadmorske visine u tropskom pojasu (Vratarić i Sudarić, 2000.).

### **4.3. Svjetlo**

Soja je biljka kratkog dana (Vratarić i Sudarić, 2000.). Značajan utjecaj na rast i razvoj soje ima duljina dnevnog osvjetljenja i spektralni sastav svijetla. Prijelaz iz

vegetativne u generativnu fazu razvoja soje ovisi o količini dnevnog osvjetljenja koje biljka prima svaki dan, a obično traži 10 sati mraka dnevno.

Pošto je soja klasificirana kao biljka kratkog dana, samo kratki dani mogu inicirati cvatnju. Cvjetanje počinje 30 dana nakon nicanja, ako je dužina dana kratka (Vratarić i Sudarić, 2000.). Svjetlo ima utjecaj na morfološke osobine soje tako što uzrokuje promjene u vremenu cvjetanja i zriobe, a to uzrokuje razlike u visini biljaka, visini do prve mahune, površini lista, polijeganju i drugim osobinama (Vratarić i Sudarić, 2000.). Svjetlo ima i veliki utjecaj na fotosintetički mehanizam, a preko njega ima utjecaj na fiksaciju dušika, ukupnu proizvodnju suhe tvari i urod zrna (Vratarić i Sudarić, 2000.).

#### **4.4. Vlaga**

Voda ima veliki utjecaj na razvoj soje i predstavlja jedan od limitirajućih čimbenika. Za vrijeme klijanja višak vode može biti štetan jednako koliko i suša. Suša ima nepovoljan utjecaj na razvoj kvržičnih bakterija (Vratarić i Sudarić, 2000.). Potrebe biljke za vodom rastu kako raste i biljka. Kako bi sjeme klijalo potrebno je da upije vode više od 50% svoje mase (Vratarić i Sudarić, 2000.). Suša u razdoblju nalijevanja zrna uzrokuje maksimalno sniženje uroda. Urodi zrna su u pozitivnoj korelaciji s oborinama, relativnom vlagom zraka i vlagom tla (Vratarić i Sudarić, 2000.). Soja je na nedostatke vode najosjetljivija u fazi cvjetanja i nalijevanja zrna (Vratarić i Sudarić, 2000.). Ukoliko u tim fazama dođe do suše urodi osjetljivih sorata mogu biti smanjeni 40-60 % (Vratarić i Sudarić, 2000.).

Smatra se da soja neekonomično postupa s vodom. Transpiracijski koeficijent za soju iznosi od 600 do 700, a ovisi vlazi zraka i tla, temperaturi zraka, intenzitetu svjetla, mineralnoj ishrani te o agrotehnici (Vratarić i Sudarić, 2000.).

#### **4.5. Toplina**

Soja za određene faze razvoja traži i određene temperature. Tako su minimalne temperature za klijanje 6-7 °C, a optimalne 15-25 °C. Mrazevi do -5°C ne nanose štete u fazi klijanja (Vratarić i Sudarić, 2000.). Niske temperature u stadiju cvatnje i sazrijevanja odgađaju zriobu, a ispod 14 °C prestaje svaki rast (Vratarić i Sudarić,

2000.). Cvjetovi se smrzavaju na temperaturi do  $-1^{\circ}\text{C}$ . Temperature imaju važan utjecaj i na rast korjenovog sustava i apsorpciju pojedinih hraniva, te na razvoj lisne mase (Vratarić i Sudarić, 2000.) .



## **5. AGROTEHNIKA SOJE**

Osim agroekoloških uvjeta na visinu prinosa soje utječe i agrotehnika. Glavne agrotehničke mjere su: plodored, obrada tla, sjetva, njega i žetva.

### **5.1. Plodored**

Plodored ima veoma važno mjesto u ratarskoj proizvodnji, iako dolazi do njegovog zanemarivanja uslijed primjene mineralnih gnojiva, suvremene mehanizacije i kemijskog suzbijanja korova (Vratarić i Sudarić, 2008.). Ipak širenjem i intenziviranjem proizvodnje soje plodored postaje sve važniji. U Istočnoj Hrvatskoj plodored uljnih kultura je uzak i dolazi do stalnog smjenjivanja suncokreta, soje i uljane repice, iako ove kulture imaju zajedničke bolesti (Vratarić i Sudarić, 2008.). Unutar plodoreda su slabo zastupljene višegodišnje leguminoze, te naknadni usjevi koji popravljaju strukturu tla. Također je smanjena uporaba stajnjaka, te se smanjuje količina humusa u tlu. Važnost plodoreda je u tome što na taj način možemo uvelike smanjiti pojavu gljivičnih oboljenja i njihov intenzitet zaraze (Vratarić i Sudarić, 2008.). Plodored omogućuje i bolje iskorištenje hraniva, jer različite kulture različito iznose hraniva iz tla.

Soja je jedan od najboljih predusjeva za mnoge ratarske kulture (Vratarić i Sudarić, 2008.). Ona putem kvržičnih bakterija veže dušik iz zraka i obogaćuje tlo organskom tvari. Korijenski sustav soje prodire duboko u tlo, te poboljšava fizikalna svojstva tla i na taj je način poboljšano čuvanje vlage u tlu (Vratarić i Sudarić, 2008.).

### **5.2. Obrada tla**

Kako bi smo biljci soje osigurali normalne uvjete za rast i razvoj prvo obavljamo oranje. Osnovnom obradom stvaramo povoljnu strukturu tla, potičemo biološku aktivnost i hraniva činimo pristupačnim (Vratarić i Sudarić, 2008.). Obrađeno tlo bolje prima vodu od neobrađenog, te na taj način osiguravamo zalihe vode koje nam mogu biti veoma važne u sušnim razdobljima (Vratarić i Sudarić, 2008.). Osim toga obradom tla popravljamo prozračnost tla i poboljšavamo biokemijske procese u tlu. Obradom tla i na mehanički način uništavamo i korove, te unosimo ostatke predusjeva u tlo gdje se razgrađuju aktivnošću mikroorganizama (Vratarić i Sudarić, 2008.). Obradu tla za soju

dijelimo na osnovnu (temeljnu), dopunsku (predsjetvenu), i obradu tla nakon nicanja usjeva (Vratarić i Sudarić, 2008.).

### **5.3. Sjetva**

Za postizanje visokih prinosa soje potrebno je izabrati kvalitetno sjeme sorte koja priznata i adaptirana na tome području. Sjeme treba biti kontrolirane proizvodnje praćeno certifikatom o kvaliteti (Vratarić i Sudarić, 2008.). Deklaracija jamči sortu i kategoriju, zdravstveno stanje, čistoću, klijavost, uporabnu vrijednost te da u sjemenu nema karantenskog korova (Vratarić i Sudarić, 2008.). Kvaliteta sjemena je jedno od jamstava sigurnog uroda zrna i zato treba isključivo sijati sjeme prve kvalitete klijavosti (Vratarić i Sudarić, 2008.).

#### **5.3.1. Rokovi, način, dubina sjetve i njega soje**

Sjetva soje je najsigurnija kada se površinski sloj tla zagrije na 8-10°C , a optimalni rokovi u našim područjima su od 20.travnja do 10.svibnja (Vratarić i Sudarić, 2008.). Optimalni rokovi sjetve temelje se na dovoljnim temperaturama tla i potrebnoj vlazi u tlu za zadovoljavajuću brzinu nicanja te nema razlike među sortama obzirom na grupu dozrijevanja (Vratarić i Sudarić, 2008.).

Soja se može sijati na uske i široke redove, trake, kućice, a i širom kao postrni usjev (Vratarić i Sudarić, 2008.). Kod nas prevladava sjetva u redove na razmak od 45 ili 50 cm. Način sjetve i veličina vegetacijskog prostora značajno utječu na urod soje (Vratarić i Sudarić, 2008.).

Sjeme treba unijeti i položiti u tlo na željenu dubinu koja će mu osigurati najpovoljnije uvjete za klijanje i nicanje (Vratarić i Sudarić, 2008.). Dubina sjetve mora biti optimalna, tako da rezerva hrane u sjemenu bude dovoljna dok biljka nikne, pozeleni i započne proizvoditi hranu fotosintezom (Vratarić i Sudarić, 2008.). Na koju ćemo dubinu obaviti sjetvu ovisi od: osobina sjemena i sorte ; svojstvima, obrađenosti i vlažnosti tla; klimatskim uvjetima i vremenu sjetve. Optimalna dubina sjetve je 4 do 6 cm.

Kod mjera njege razlikujemo mehaničke i kemijske. U mehaničke mjere spada međuredna kultivacija, ručno plijevljenje korova i prihrana dušikom. Kemijske mjere

su suzbijanje korova i zaštita usjeva od bolesti i štetnika. Međuredna kultivacija obavlja se višekratno, ovisno o stanju usjeva i tipu tla (Vratarić i Sudarić, 2008.). Kultivacija povoljno djeluje na vodozračne odnose tla, njome vršimo mehaničko uništavanje korova, a skupa s njome možemo obaviti i prihranu. Kemijska zaštita se prvenstveno odnosi na suzbijanje korova tj. primjenu herbicida nakon nicanja (Vratarić i Sudarić, 2008.). Suzbijanje bolesti fungicidima malo je zastupljeno u merkantilnoj, a više u sjemenskoj proizvodnji soje (Vratarić i Sudarić, 2008.). Suzbijanje štetnika odgovarajućim insekticidom nije redovita mjera jer se ne javljaju svake godine u jednakom intenzitetu (Vratarić i Sudarić, 2008.).

#### **5.4. Žetva soje**

Žetva soje je odgovoran posao i njeno pravovremeno i pravilno obavljanje je veoma važno za uspjeh proizvodnje. Žetva se obavlja univerzalnim žitnim kombajnima koji se prije žetve podese i preurede kako bi se žetva obavila sa što manjim gubitcima (Vratarić i Sudarić, 2008.). Optimalna vlažnost zrna soje za žetvu je 14-16 %. Gubitci soje uslijed žetve mogu nastati i zbog pucanja mahuna, pa bi trebalo izbjegavati sijanje takvih sorti (Vratarić i Sudarić, 2008.).

## 6. FIKSACIJA DUŠIKA U TLU

Dušik ima poseban položaj u grupi neophodnih elemenata (Vukadinović, 1993.). Porijeklom je iz atmosfere, ali se usvaja u mineralnoj formi i zato se svrstava u grupu mineralnih elemenata. Sastavni je dio proteina, nukleinskih kiselina, fotosintetičkih pigmenata, amina, amida i drugih spojeva koji čine osnovu života pa kemija ovog elementa sačinjava važan dio agrokemije, odnosno ishrane bilja (Vukadinović, 1993.). Značaj dušika je to veći što ga samo mali broj organizama može iskoristiti iz atmosfere u plinovitom obliku ( $N_2$ ). Za prevođenje molekularnog oblika dušika do amonijaka i nitrata, u kojem ga obliku biljke usvajaju, potrebna je ogromna količina energije (712 KJ) (Vukadinović, 1993.). S druge strane dušik se lako vraća u molekularno stanje u kome je i najstabilniji pa se lako gubi iz tla gdje se njegova količina procjenjuje na  $4 \times 10^{14}$  tona (Vukadinović, 1993.). Nositelj je visine uroda.

Dušik u tlu dolazi u obliku organskih i anorganskih spojeva. Organski dio predstavlja humus i nepotpuno razloženi biljni i životinjski ostatci. Mineralni dio, koji je potpuno raspoloživ za usvajanje, samo je mali dio ukupnog dušika tla, uglavnom u količini koja je nedovoljna za dobru ishranu biljke. U poljoprivrednim tlima ukupna količina dušika je najčešće 0,1-0,3 %, od čega je za ishranu bilja pristupačno tijekom jedne vegetacijske sezone svega 1-3 % (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Količina dušika u tlu ovisi o nizu čimbenika kao što su klima, vegetacija, topografija terena, matični supstrat. U prirodi dušik ima svoj kružni tijek gdje atmosfera predstavlja njegov izvor, a transformacije dušika u tlu obavljaju mikroorganizmi tla koji obavljaju njegovu fiksaciju.

### 6.1. Podrijetlo dušika u tlu

Unutar matičnog supstrata iz kojega tlo nastaje nema dušika, pa se on u tlu tijekom procesa pedogeneze nakuplja djelovanjem živih organizama (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Najveći dio dušika u tlu rezultat je aktivnosti mikroorganizama, isključivo prokariota. To je najprije rezultat djelovanja onih mikroorganizama koji mogu vezati molekularni dušik iz atmosfere i graditi organsku tvar, a zatim drugih nižih i na kraju viših organizama kada za njihove životne potrebe u tlu ima dovoljno dušika (Vukadinović, 1993.). Procjene svjetske godišnje mikrobiološke fiksacije dušika kreću se oko  $175 \times 10^6$  t, što je višestruko više od godišnje svjetske proizvodnje dušičnih

mineralnih gnojiva ( $30 \times 10^6$  t/god) (Vukadinović, 1993.; Vukadinović i Vukadinović, 2011.).

Mehanizam mikrobiološkog vezanja dušika funkcionira uz pomoć enzima nitrogenaze, koji je kompleks dvaju proteina od kojih prvi sadrži željezo, molbiden i sumpor ( $2 \text{ MoFe}_8\text{S}_6$ ), a drugi ima jedan atom željeza (Vukadinović, 1993.).

## 6.2. Nesimbiozna fiksacija dušika

Neke vrste bakterija, plavozelenih algi (rodovi *Chroococcales*, *Chamaestiphonales* i *Hormonogales*) i možda gljivica, mogu uz pomoć energije oslobođene oksidacijom organske tvari tla vezati atmosferski  $\text{N}_2$  i koristiti ga za svoje potrebe (Vukadinović, 1993.). Od aerobnih, slobodno živućih fiksatora dušika poznati su *Azotobacter*, *Azospirillum* i *Beijerinckia* s više vrsta, a od anaerobnih *Clostridium pasteurianum* te fakultativno anaerobnih *Klebsiella* (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Količine dušika vezenog nesimbiotskim putem su promjenjive iz više razloga, npr. *Azotobacter* veže  $\text{N}_2$  ispod pH 5, a aktivnost mu ovisi i od prisustva Mo, K, Fe i Mn u tlu uz povoljno djelovanje dobre raspoloživosti P u tlu. Također povoljni uvjeti podrazumijevaju dovoljnu količinu organske tvari s povoljnim omjerom C:N (Vukadinović, 1993.). Plavozelene alge, kao fiksatori atmosferskog dušika, imaju značaj samo u vlažnim i toplim uvjetima, kao što su rižina polja, gdje mogu vezati između 42 i 150 kg N/ha godišnje (Vukadinović i Vukadinović, 2011.).

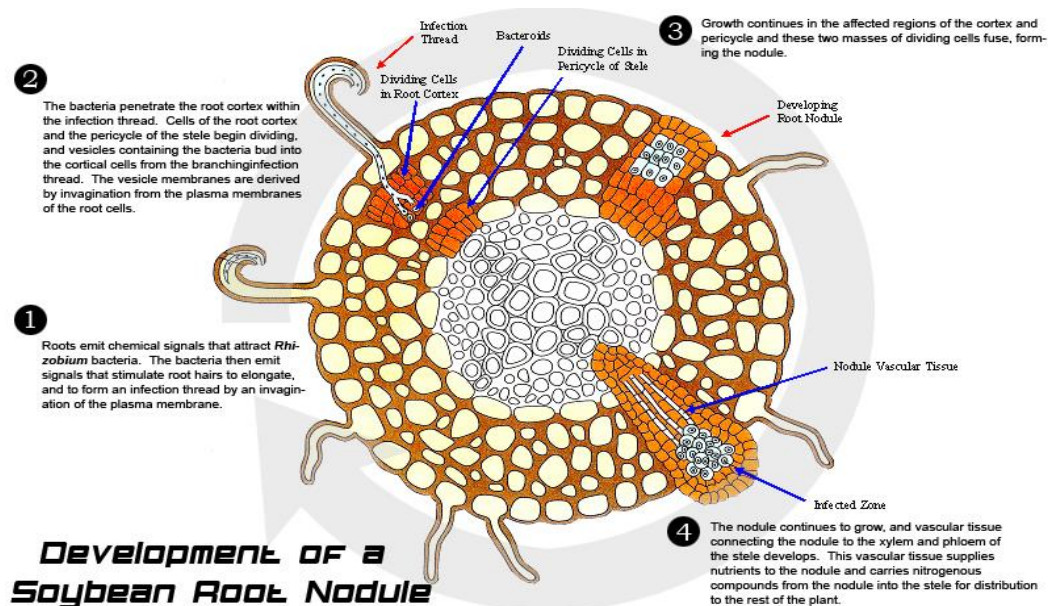
## 6.3. Simbionzna fiksacija dušika i bakterizacija sjemena

Pored tla važan izvor dušika je atmosfera u kojoj ga ima u plinovitom obliku ( $\text{N}_2$ ) oko 78,1 % volumno ili težinski 75,5 %, odnosno ukupno  $3,8 \times 10^{15}$  ili 86,5 t/ha (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Atmosferski dušik u tlo dolazi procesom fiksacije koja može biti abiotska i biotska. Za biotsku fiksaciju važne su kvržične bakterije rodova *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* koje žive u simbiotskoj zajednici s biljkom i na njenom korijenu stvaraju nodule. Rod *Rhizobium* obuhvaća više vrsta koje su specifične za pojedine leguminozne biljke (Vukadinović, 1993.). One biljku opskrbljuju reduciranim dušikom, a od nje uzimaju tvari potrebne za svoj razvoj. Ako u tlu postoji dovoljna količina raspoloživog dušika, tako da su zadovoljene potrebe biljke

domaćina i bakterija, rast kvržica se smanjuje uz opadanje njihovog broja (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Za normalnu aktivnost bakterija roda *Rhizobium* potrebno je prisustvo molibdena i kobalta. Sojevi ovoga roda se međusobno razlikuju intenzitetom simbiotske fiksacije atmosferskog dušika (Vukadinović, 1993.).

Bakterija *B. japonicum* je gram-negativna, štapičasta, pokretna (ima flagelu na polu) bakterija tla koja fiksira dušik iz zraka, a fiksacija dušika predstavlja važan proces u ciklusu kruženja dušika. Obavijena je sluzavom kapsulom izgrađeno od egzopolisaharida koja je štiti od štetnih vanjskih utjecaja i pomažu joj da se pričvrsti na korjenove dlačice. Optimalne temperature za njezin razvoj su 25-30°C, a pH 6-7. Ona formira kvržice na korijenu soje, uspostavlja simbiotski odnos i povoljno utječe na njen rast.

Prilikom uspostavljanja simbiotskog odnosa između soje i *B. japonicum* razlikujemo tri etape, a to su: prepoznavanje, infekcija i nodulacija. Aktivna fiksacija dušika odvija se u centralnom dijelu kvržice koji je crvene boje zbog prisustva leghemoglobina. Uspostavljanje simbioze između biljke i *B. japonicum* zasniva se na međusobnom prepoznavanju biljnih flavonoida i lektina i bakterijskih egzopolisaharida (Milošević i Marinković, 2009.). Do infekcije dolazi preko korijenovih dlačica (Slika 6.). Proces fiksacije nije jednostavan i započinje umnažanjem kvržičnih bakterija koje su unesene u tlo. Kasnije dolazi do diferenciranja bakteroida u kvržicama, enzimatske redukcije, asimilacije amonijaka i sinteze dušičnih organskih spojeva. Smatra se da soja na taj način može fiksirati do 160 kg /ha dušika (Vratarić i Sudarić, 2008.). Bakterizacija sjemena soje bakterijom *B. japonicum* spp. trebala bi biti redovita agrotehnička mjera prije sjetve soje, pogotovo na onim tlima gdje soja ranije nije uzgajana ili gdje nije sijana na duže vremensko razdoblje (Vratarić i Sudarić, 2008.). Unošenje inokulanta u tlo pomaže popravljajući strukturu tla, utječe na povećanje sadržaja bjelancevina u zrnu soje, te štedimo na dušičnim gnojivima (Vratarić i Sudarić, 2008.). Smatra se da bakterizaciju treba provoditi i kada se u tlu nalazi dovoljno bakterija za prirodnu infekciju, jer na ovaj način povećavamo težinu suhe tvari kvržica, a time i količinu fiksiranog dušika (Vratarić i Sudarić, 2008.). Ako u tlu nema dovoljno bakterija, a nismo izvršili bakterizaciju sjemena biljka će koristiti dušik iz tla i iz gnojiva, pa će ga biti potrebno dodati u većim količinama (Vratarić i Sudarić, 2008.).



Slika 6. Razvoj nodula na korijenu soje ( [http://www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/osu\\_pcmb/pcmb\\_lab\\_resources/images/pcmb102/n\\_fixation/root\\_nod\\_dev.jpg](http://www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/osu_pcmb/pcmb_lab_resources/images/pcmb102/n_fixation/root_nod_dev.jpg))

Bakterizaciju sjemena obavljamo na sam dan sjetve, obavezno u hladu i bez izlaganja sunčevim zrakama (Vratarić i Sudarić, 2008.). Istraživački tim Katedre za mikrobiologiju i zemljišne resurse Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, pod vodstvom prof. dr. sc. Zlate Milaković i uz sufinanciranje Upravnog odjela za poljoprivredu i gospodarstvo Osječko-baranjske županije je nakon dugogodišnjih laboratorijskih i poljskih istraživanja proizveo novi i vrlo efikasan inokulant za predsjetvenu bakterizaciju sjemena soje pod trgovačkim nazivom Nitrobakterin<sup>S</sup>. To je ekološki proizvod koji sadrži 3-5 milijardi više visokoučinkovitih i brižljivo odabranih sojeva živih kvržičnih bakterija po gramu sterilnog treseta. Primjenom Nitrobakterina<sup>S</sup> utječemo na bolju nodulaciju korijena soje, zapravo dolazi do stvaranja krupnijih kvržica na primarnom i gornjem lateralnom korijenju, koje su u presjeku ružičaste ili crvene boje i u prosjeku fiksiraju 120 kg/ha dušika. Formiranje kvržica (nodula) i fiksacija dušika počinje već 2-3 tjedna od sjetve, produžuje se često do zriobe, a N-fiksacija doseže maksimum na koncu cvatnje i s početkom formiranja mahuna (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Učinkovitost predsjetvene bakterizacije sjemena soje može se poboljšati primjenom tvari koje povećavaju adheziju preparata na sjeme. Na taj se način osigurava veći inicijalni inokulum u tlu, što utječe na stvaranje većeg broja i mase kvržica, što u konačnici rezultira i većim ostvarenim prinosom (Milaković i sur., 2012.). Također njegovom primjenom povećavamo rast i prinos soje, kvalitetu

zrna, te biološku aktivnost tla. Na uspješnost bakterizacije utjecaj imaju sam postupak izvođenja bakterizacije i sjetve, tip tla, pH tla, opskrba tla hranivima, agrotehnika, biološka svojstva sorte, primjena pesticida, gnojidba makro i mikroelementima, divlji sojevi u tlu i drugo (Vratarić i Sudarić, 2008.). Soju ne bi trebali sijati na kiselim tlima jer bakterije nemaju uvjete za razvoj na tlima u kojima je pH niži od 5,5 (Vratarić i Sudarić, 2008.). Bakterizaciju smatramo uspješnom ukoliko na svakoj sojinoj biljci imamo razvijeno 15-30 kvržica (Vratarić i Sudarić, 2008.).



## 7. KONTROLA KVALITETE PRIPRAVAKA ZA PREDSJETVENU BAKTERIZACIJU SJEMENA SOJE

Prvi inokulant za bakterizaciju sjemena soje proizveden je u Njemačkoj 1897. godine. U Australiji su sa komercijalnom proizvodnjom inokulanata krenuli 1953. pri čemu je treset služio kao nosač bakterija, a od tada pa do danas došlo je do poboljšanja kvalitete inokulanata praćenjem čimbenika koji utječu na preživljavanje kvržičnih bakterija unutar treseta. Osamdesetih godina prošlog stoljeća težilo se potpunoj zamjeni mineralnog dušika biološkim dušikom u uzgoju leguminoza (BNF-bum) (Milošević i Marinković, 2009.). Najveći proizvođač inokulanata danas u svijetu jest SAD. Mjerilo kvalitete inokulanta je broj živih bakterija po gramu sterilnog treseta i kreće se od  $5 \times 10^7$  do  $1 \times 10^9$  *Rhizobia* po gramu svježe pripremljenog inokulanta. U pojedinim zemljama kao što su Kanada i Francuska kontrola kvalitete inokulanata je obavezna i regulirana je zakonom, dok se njena provedba preporučuje u Australiji, Novom Zelandu i Južnoj Africi (Lupwayi i sur., 2000.). Na taj se način nastoje zaštititi poljoprivrednici, ali i sami proizvođači. U SAD-u se već 1930. godine uvedene različite mjere zaštite poljoprivrednika, dok je u Indiji propisana kontrola i proizvodnje i same kvalitete pripravka (Thompson, 1984.). U Australiji je osnovan Australian Inoculants Research and Control Service (AIRCS) koji se bavi istraživanjem i kontrolom inokulanata. Zadaća AIRCS-a je da vrši selekciju, testiranje i održavanje odgovarajućih sojeva *Rhizobia*, zatim da vrši kontrolu kvalitete, savjetuje proizvođača, i da poljoprivrednicima ukazuje na greške prilikom aplikacije inokulanta koje utječu na njegovu učinkovitost molim literturni navod. Prilikom kontrole kvalitete proizvod mora sadržavati dovoljan broj bakterija koji je naveo proizvođač a koje su sposobne izvršiti infekciju sjemena U zemljama koje su zakonski regulirale kontrolu kvalitete došlo je do značajnog poboljšanja kvalitete.

Broj živih bakterija u inokulantu određujemo različitim metodama, a najčešće primjenjivi su: „Pour plate“, MPN test (most probable number plant infection), mikroskopski pregled uzorka i imunološki testovi.

Uzorci za metodu prelijevanja „pour plate“ se razrjeđuju do odgovarajućeg razrjeđenja i potom se inkubiraju na 30°C. Kod brzorastućih *rhizobia* period inkubacije traje 2-3 dana, a 5-6 dana kod spororastućih. Broj kolonija na ploči u prosjeku iznosi od 20 do 300 kolonija. Ovu metodu koristimo ukoliko nam je nosač sterilan. Proizvod

mora imati oznaku koja garantira dovoljan broj živih stanica kako bi došlo do infekcije korijena i oznake moraju biti potvrđene od nadležnih organa.

MPN test je najčešće korištena metoda prilikom kontrole kvalitete stanice *Rhizobia* naciepljuju na domaćina gdje razvijaju nodule, a nodulacija korijena dokaz je prisutnosti bakterija. Metoda se oslanja na uspješnost nodulacije, odnosno ona može biti pozitivna ili negativna. Uspješnost MPN metode ovisi i o sposobnosti istraživača da biljku domaćina održi zdravom i da ne dođe do kontaminacije četiri tjedna. Izdaju se potvrde i certifikati o svakom ispitanom uzorku i šalju se nadležnim ustanovama (Lupwayi i sur., 2000.).

Mikroskopski pregled uzoraka temelji se na tome da su stanice unutar njega morfološki jednake. Ukoliko se unutar uzorka nalaze kontaminanti oni prisutni u većoj koncentraciji od stranice *Rhizobia* jer rastu većom brzinom. Za prebrojavanje ukupnog broja stanica *Rhizobia* u uzorku služe nam Thoma-ova komorica i Petroff-Hauser-ova komorica. Metoda nije pogodna za prebrojavanje stanica u tresetu (Lupwayi i sur., 2000.).

Kod imunoloških testova se uz pomoć reakcije antigena i antitijela vrši identifikacija rizobija u tekućim hranjivim podlogama, tresetu, tlu itd. (Lupwayi i sur., 2000.).

Točnost ovih testova je oko 95%, a uzorke je potrebno pripremljati u sterilnim uvjetima. Na primjer u Kanadi je uzorak zadovoljavajući ukoliko imamo  $5 \times 10^8$  rhizobia/g, dok Francuska traži da taj broj iznosi  $10^9$  rhizobia/g. Iako se kvaliteta izražava u broju stanica/g sterilnog treseta, FAO traži da se te vrijednosti izražavaju po sjemenu. U tome slučaju inokulant bi trebao formirati  $10^3$  rhizobia/sjemenu kod sitnozrnatih leguminoza (lucerna), za zrna srednje krupnoće  $10^4$  rhizobia/sjemenu (grah), a kod krupnozrnatih mahunarki kao što su soja i lupina  $10^5$  rhizobia/sjemenu (Lupwayi i sur., 1999.). Ove vrijednosti predstavljaju minimalne standarde jer nakon sjetve samo dio bakterija ostane na sjemenu soje. Osim što je propisano koliko se unutar inokulanta treba nalaziti stanica *Rhizobia*, propisane su i količine kontaminanata u uzorku. U Australiji ih ne smije biti više od  $10^7$  cfu/g treseta, dok u Francuskoj ne smiju uopće biti prisutni tijekom cijelog skladištenja inokulanta. Ali nekada usprkos tome što je inokulant zadovoljio propisane kriterije na polju zna pokazati lošije rezultate, a uzrok tomu može biti nizak pH tla, gnojdba, primjena pesticida i drugo.

## 8. MATERIJALI I METODE

Ispitani uzorci pripravka za predsjetvenu bakterizaciju sjemena soje trgovačkog naziva Nitrobakterin<sup>S</sup> su različitih datuma proizvodnje kako slijedi: 15.02, 01.03, 15.03 i 20.3.2013 godine (Slika 7.). Analiza kontrole kvalitete uzoraka obavljena je 04. lipnja i obuhvatila je pripremu uzoraka metodom razrjeđenja (do  $10^9$ ) u sterilnim uvjetima (Slika 8. i 9.). Metodom prelijevanja u tri ponavljanja izvršena je inokulacija uzoraka. Podloga korištena za rast *B. japonicum* je manitol-kvašćev agar. Inkubacija je provedena kroz sedam dana na 28°C. Nakon inkubacije prebrojane su specifične kolonije koje su okrugle, konveksne i poluprozirne. Broj bakterija je izražen kao CFUg<sup>-1</sup>. Dodatno, morfološka identifikacija specifičnih kolonija je provjerena bojenjem po Gramu i mikroskopiranjem na mikroskopu Olympus BX41.



Slika 7. Ispitani uzorci



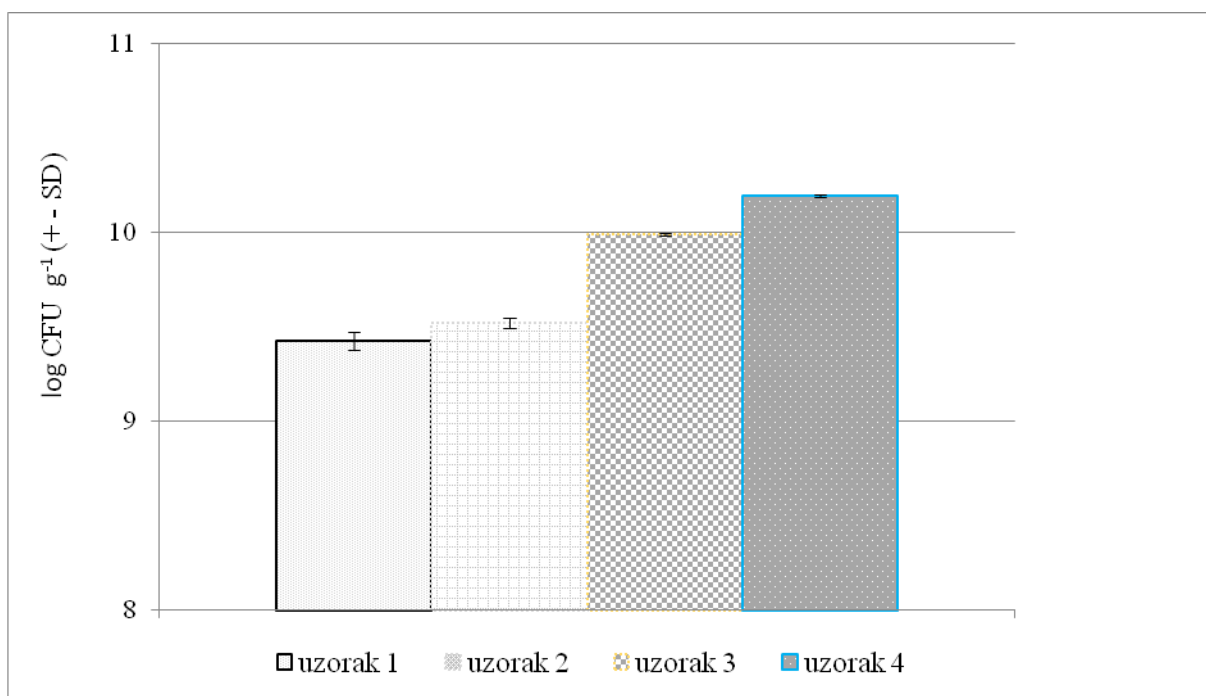
Slika 8. Pripravljavanje uzoraka metodom razrjeđenja



Slika 9. Zasijavanje hranjivih podloga

## 9. REZULTATI I RASPRAVA

Na temelju provedenog istraživanja kontrole kvalitete Nitrobakterina<sup>S</sup> različitih datuma proizvodnje u svim uzorcima utvrđeno je prisustvo od  $10^9$  do  $10^{10}$  vijabilnih stanica *B. japonicum* (Graf 2.).



Graf 2. Broj vijabilnih stanica *B. japonicum* u ispitanim uzorcima

Ovakav rezultat odgovara i samoj deklaraciji proizvoda koja navodi da Nitrobakterin<sup>S</sup> sadrži 3-5 milijardi živih kvržičnih bakterija po gramu sterilnog treseta. Ispitani uzorci su dodatno morfološki identificirani bojenjem po Gramu pri čemu je utvrđena uniformnost populacije. Prema istraživanju Singletona i sur. (1997.) o gustoći rizobne populacije proizvoda za inokulaciji iz 12 razvijenih zemalja utvrđeno je u 7% uzoraka odsustvo rizobnih stanica, u 75% uzoraka ih je bilo log 8- 9 po gramu dok je samo 19 % uzoraka sadržavalo više od log 9 rizobia po gramu inokulanta. Treset dobre kvalitete bi trebao sadržavati  $2 \times 10^9$  rizobija po gramu (Lupwayi i sur., 2000.). Također potrebno je dodatno povećanje broja stanica u inokulantima (Brockwell i Bottomley, 1995.). Ovakvo povećanje rizobnih stanica može se postići daljnim naporima istraživača ali i implementacijom jednostavnih programa kontrole kvalitete (Lupwayi i sur., 2000.). Iz svega navedenoga može se zaključiti kako proizvod Nitrobakterin<sup>S</sup> Poljoprivrednog

fakulteta u Osijeku predstavlja vrlo efikasan i po europskim kriterijima kvalitetan inokulant za predstjetvenu bakterizaciju sjemena soje.

## 10. ZAKLJUČAK

Soja je sve značajnija kultura svijeta i površine zasijane sojom su sve veće. Ima važno mjesto u ljudskoj prehrani i hranidbi domaćih životinja. Također ima bitno mjesto u plodoredu jer ostavlja tlo bogato dušikom. Prije sjetve soje potrebni je izvršiti bakterizaciju. Važno je da se za inokulaciju koriste visokokvalitetni sojevi bakterije *B. japonicum* koji potiču stvaranje većeg broja nodula na korijenu soje što utječe na veći prinos biljke. Također neophodno je vršiti kontrolu kvalitete inokulanata i na taj način zaštititi i poljoprivrednike i proizvođače. Od inokulanta se trži da sadrži dovoljan broj živih bakterija *B. japonicum* koje su sposobne vršiti infekciju korijena, a njihova brojnost se određuje različitim metodama. Kontrolom kvalitete pripravka Nitrobakterina<sup>S</sup> utvrđeno je prisustvo  $10^9$  do  $10^{10}$  vijabilnih stanica *B. japonicum* što predstavlja izvrstan početni inokulum u procesu infekcije i nodulacije korijena soje.

## 11. LITERATURA

1. Brockwell, J., Bottomley, P.J. (1995.): Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biol. Biochem.* 27, 683-697.
2. Deaker, R., Roughley, R. J., Kennedy, I. R. (2004.): Legume seed inoculation technology-a review. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1275-1288.
3. Gagro, M. (1997.): Ratarstvo i obiteljsko gospodarstvo; Žitarice i zrnate mahunarke, Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb, 207-223
4. Jevtić, S., Šuput, M., Gotlin, J., Pucarić, A., Miletić, N., Klimov, S., Đorđevski, J., Španring, J., Vasilevski, G. (1986.): Posebno ratarstvo (I. dio), IRO „Naučna knjiga“, Beograd, 334-353
5. Lupwayi, N. Z., Olsen, P. E., Sande E. S., Keyser, H. H., Collins, M. M., Singleton, P. W., Rice, W. A. (2000.): Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Research* 65, 259-270
6. Milaković, Z., Kanižai Šarić, G., Veselovac, I., Kalajžić, I.J. (2012.): Djelotvornost adhezivnih sredstava u predsjetvenoj bakterizaciji sjemena soje. *Poljoprivreda* 18: 19-23.
7. Milošević, N. i Marinković, J., Rizobiumi-biođubriva u proizvodnji leguminoza. (2009.): Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtlarstvo, vol. 46, br. 1, 45-54.
8. Singleton, P. W., Boonkerd, N., Carr, T. J., Thompson, J. A. (1997.): Technical and market constraints limiting legume inoculant use in Asia. In: Rupela, O.P., Johansen, C., Herridge, D.F. (Eds.), *Extending Nitrogen Fixation Research to Farmers' Fields: Proceedings of an International Workshop on Managing Legume Nitrogen Fixation in the Cropping Systems of Asia*. ICRISAT Asia Centre, India, 20±24 August 1996. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India, 17- 38.
9. Thompson, J. A. (1984.): Production and quality control of carrier-based legume inoculants. *Information Bulletin No. 17*, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics
10. Vratarić, M. i Sudarić, A. (2000.): Soja, Poljoprivredni institut, Osijek
11. Vratarić, M. i Sudarić, A. (2008.): Soja-*Glycine max* (L.) Merr., Poljoprivredni institut, Osijek
12. Vukadinović, V. (1993.) Ishrana bilja, Sveučilište u Osijeku, Poljoprivredni fakultet, Osijek



13. Vukadinović, V. i Vukadinović, V. (2011.): Ishrana bilja, Poljoprivredni fakultet u Osijeku
14. [http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bradyrhizobium\\_japonicum](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bradyrhizobium_japonicum) (14.7.2013.)
15. Methods for testing legume inoculant and pre-inoculated seed products (May, 2005). <http://www.inspection.gc.ca/plants/fertilizers/sampling-and-testing/methods-for-testing/eng/1308033966900/1308034369347> (14.7.2013)
16. Nitrobakterin<sup>S</sup>. <http://tloznanstvo.com.hr/nitrobakterin.html> (15.7.2013)
17. Statistički ljetopis Republike Hrvatske 2012.,  
[http://www.dzs.hr/Hrv\\_Eng/ljetopis/2012/sljh2012.pdf](http://www.dzs.hr/Hrv_Eng/ljetopis/2012/sljh2012.pdf) (1.7.2013)
18. <http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD> (1.7.2013)
19. <http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE> (15.7.2013.)
20. [http://t2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRQMO-fjwW8-Jda49Lcgrjw84sXBmKz1Shkwv4OjYS4F25\\_D1U4uQ](http://t2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRQMO-fjwW8-Jda49Lcgrjw84sXBmKz1Shkwv4OjYS4F25_D1U4uQ) (15.7.2013.)
21. [http://www.bio.georgiasouthern.edu/bio-home/harvey/lect/images/soybean\\_root\\_nodules.jpg](http://www.bio.georgiasouthern.edu/bio-home/harvey/lect/images/soybean_root_nodules.jpg) (14.7.2013)
22. [http://www.ctahr.hawaii.edu/mauisoil/images/c\\_nutrients01\\_clip\\_image004.jpg](http://www.ctahr.hawaii.edu/mauisoil/images/c_nutrients01_clip_image004.jpg) (15.7.2013)
23. [http://www.clemson.edu/extension/rowcrops/soybeans/guide/files/growth\\_stages\\_image006\\_0001.jpg](http://www.clemson.edu/extension/rowcrops/soybeans/guide/files/growth_stages_image006_0001.jpg) (14.7.2013)
24. [http://www.jgi.doe.gov/News/lores\\_dried\\_soybean.jpg](http://www.jgi.doe.gov/News/lores_dried_soybean.jpg) (14.7.2013)
25. [http://www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/osu\\_pcmb/pcmb\\_lab\\_resources/images/pcmb102/n\\_fixation/root\\_nod\\_dev.jpg](http://www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/osu_pcmb/pcmb_lab_resources/images/pcmb102/n_fixation/root_nod_dev.jpg) (14.7.2013)

## 12. SAŽETAK

Soja ima veliki značaj u proizvodnji hrane i krmiva te u industrijskoj proizvodnji. Bakterizacijom sjemena soje visokokvalitetnim sojevima *Bradyrhizobium japonicum* utječe se na povećanje učinkovitosti simbiotske fiksacije dušika, a samim time i na povećanje prinosa. Redovna kontrola kvalitete proizvoda za predstjetvenu bakterizaciju sjemena soje garancija je učinkovitog i djelotvornoga proizvoda.

Ključne riječi: soja, *Bradyrhizobium japonicum*, bakterizacija sjemena, kontrola kvalitete.

## 13. SUMMARY

Soybean has a great importance in the production of food and feed and in industrial production. Inoculation of soybean seeds with high quality strains of *Bradyrhizobium japonicum* impact on increasing the efficiency of symbiotic nitrogen fixation, and thereby to increase the yield. Regular quality control of products for the inoculation of soybean seeds guarantee the efficient and effective product.

Key-words: soybean, *Bradyrhizobium japonicum*, seed inoculation, quality control.

## **14. POPIS TABLICA**

|                                                                                     |   |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---|
| Tablica 1. Požnjevena površina i proizvodnja soje u Hrvatskoj od 2006.-2011.g ..... | 3 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---|

## 15. POPIS SLIKA

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| Slika 1. Zrno soje.....                                 | 4  |
| Slika 2. Korijen soje .....                             | 5  |
| Slika 3. Presjek kvržica .....                          | 5  |
| Slika 4. Cvijet soje.....                               | 8  |
| Slika 5. Mahuna soje .....                              | 9  |
| Slika 7. Ispitani uzorci .....                          | 23 |
| Slika 8. Pripravljanje uzoraka metodom razrjeđenja..... | 23 |
| Slika 9. Zasijavanje hranjivih podloga .....            | 24 |

## 16. POPIS GRAFOVA

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| Graf 1. Pet najvećih svjetskih proizvođača soje .....                          | 3  |
| Graf 2. Broj vijabilnih stanica <i>B. japonicum</i> u ispitanim uzorcima ..... | 25 |

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište J. J. Strossmayera  
Poljoprivredni fakultet u Osijeku  
Završni rad

KONTROLA KVALITETE INOKULANTA ZA PREDSJETVENU BAKTERIZACIJU SJEMENA  
SOJE

QUALITY CONTROL OF INOCULANTS FOR SOYBEAN SEED INOCULATION

Antonija Jukić

## Sažetak:

Soja ima veliki značaj u proizvodnji hrane i krmiva te u industrijskoj proizvodnji. Bakterizacijom sjemena soje visokokvalitetnim sojevima *Bradyrhizobium japonicum* utječe se na povećanje učinkovitosti simbiotske fiksacije dušika, a samim time i na povećanje prinosa. Redovna kontrola kvalitete proizvoda za predsjetvenu bakterizaciju sjemena soje garancija je učinkovitog i djelotvornoga i proizvoda.

Ključne riječi: soja, *Bradyrhizobium japonicum*, bakterizacija sjemena, kontrola kvalitete.

## Summary:

Soybean has a great importance in the production of food and feed and in industrial production. Inoculation of soybean seeds with high quality strains of *Bradyrhizobium japonicum* impact on increasing the efficiency of symbiotic nitrogen fixation, and thereby to increase the yield. Regular quality control of products for the inoculation of soybean seeds guarantee the efficient and effective product.

Key-words: soybean, *Bradyrhizobium japonicum*, seed inoculation, quality control.

Datum obrane rada: 4.10.2013