ZNAČAJ SIMBIOTSKE FIKSACIJE DUŠIKA U EKOLOŠKOJ POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI

Topol, Jurka

Master's thesis / Diplomski rad

2012

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:637841

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

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

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Jurka Topol, apsolvent

Sveučilišni diplomski studij:

Ekološka poljoprivreda

ZNAČAJ SIMBIOTSKE FIKSACIJE DUŠIKA U EKOLOŠKOJ POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI

Diplomski rad

Osijek, 2012

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Jurka Topol, apsolvent

Sveučilišni diplomski studij:

Ekološka poljoprivreda

ZNAČAJ SIMBIOTSKE FIKSACIJE DUŠIKA U EKOLOŠKOJ POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI

Diplomski rad

Osijek, 2012

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Jurka Topol, apsolvent

Sveučilišni diplomski studij:

Ekološka poljoprivreda

ZNAČAJ SIMBIOTSKE FIKSACIJE DUŠIKA U EKOLOŠKOJ POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI

Diplomski rad

Povjerenstvo za obranu diplomskog rada:

Prof. dr. sc. Zlata Milaković, predsjednik

Doc. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, voditelj

Doc. dr. sc. Irena Rapčan, član

Osijek, 2012

SADRŽAJ:

1. UVOD 1
2. OSNOVE ISHRANE BILJA 1
3. PROCESI FIKSACIJE DUŠIKA 5
3.1. Abiotska fiksacija dušika 6
3.1.1. Prirodna abiotska fiksacija dušika 6
3.1.2. Umjetna abiotska fiksacija dušika 6
3.2. Biotska (biološka) fiksacija dušika 6
3.2.1. Asimbiotska fiksacija dušika 7
3.2.1.1. Aerobna asimbiotska fiksacija dušika 8
3.2.1.2. Fakultativno anaerobna asimbiotska fiksacija dušika 8
3.2.1.3. Anaerobna asimbiotska fiksacija dušika 8
3.2.2. Asocijativna fiksacija dušika 8
3.2.3. Simbiotska fiksacija dušika 9
4. OPĆE OSOBINE ČLANOVA SIMBIOTSKE FIKSACIJE DUŠIKA ZNAČAJNIH ZA POLJOPRIVREDNU PROIZVODNJU 13
4.1. Kvržične bakterije 13
4.1.1. Rod *Bradyrhizobium* 13
4.1.2. Rod *Rhizobium* 13
4.2. Biljke porodice *Leguminosae* 14
5. PROCES PREPOZNAVANJA KVRŽIČNIH BAKTERIJA I LEGUMINOZA 17
5.1. INFEKCIJA 19
5.2. NODULACIJA 20
5.2.1. Karakteristike kvržica 22
6. KEMIZAM SIMBIOTSKE FIKSACIJE ATMOSFERSKOG DUŠIKA 24
7. EKOLOŠKA POLJOPRIVREDNA PROIZVODNJA 27
8. PRIMJENA I ZNAČAJ SIMBIOTSKE FIKSACIJE DUŠIKA U EKOLOŠKOJ POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI 30
9. ZAKLJUČAK 36
10. POPIS LITERATURE: 37
11. SAŽETAK 42
12. SUMMARY 43
13. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 44

1. UVOD

Za život, biljkama je neophodna Sunčeva energija, voda, te različita biljna hraniva. Jedno od najvažnijih biljnih hraniva je dušik jer će o njemu značajno ovisiti rast i razvoj biljaka a s time i količina i kvaliteta dobivenih prinosa. U prirodi, najveće količine dušika nalazimo u atmosferi u molekularnom obliku N_2, ali s obzirom na činjenicu da biljke dušik mogu usvajati u samo dva oblika a to su amonijačni i nitratni, one sav ovaj dušik iz atmosfere nisu u mogućnosti iskoristiti.

Procesi fiksacije dušika definiraju se kao procesi vezanja molekularnog dušika u nove spojeve, čime dušik postaje raspoloživ da bude iskorišten od strane mikroorganizama ili biljaka. Procese fiksacije dušika možemo podijeliti na dvije osnovne skupine, a to su abiotska kod koje razlikujemo prirodnu i umjetnu, te biotska ili biološka kod koje razlikujemo asimbiotsku, asocijativnu i simbiotsku fiksaciju dušika.

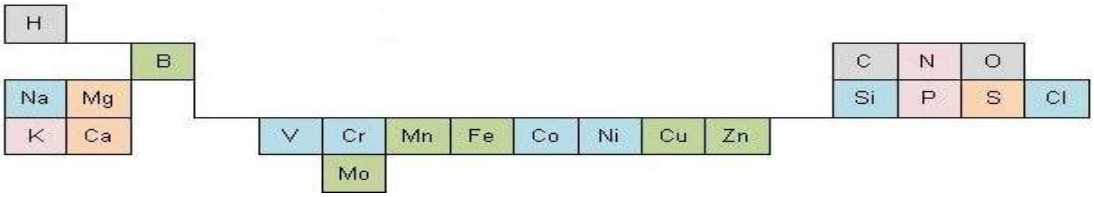
Za poljoprivrednu proizvodnju najznačajnija je simbiozna fiksacija dušika i to upravo ona koja nastaje kao rezultat simbioze između biljka iz porodice *Leguminosae* (mahunarke ili leguminoze) i kvržičnih bakterija iz rodova *Rhizobium i Bradyrhizobium* jer se putem ovih simbioznih odnosa fiksiraju najveće količine dušika. Genetski faktor oba ova simbionta uključeni su u njihovo međusobno prepoznavanje, infekciju, nodulaciju odnosno formiranje korijenovih kvržica ili nodula, te odvijanje samog procesa fiksacije dušika iz atmosfere. Ovaj proces omogućuje prevođenje dušika iz molekularnog oblika (N_2) u amonijačni oblik (NH_3), te na taj način biljkama nedostupan dušik sada postaje dostupan te ga mogu iskoristiti za svoje različite potrebe.

Uzgoj leguminoznih usjeva, koji žive u simbiozi s kvržičnim bakterija pa prema tome imaju i sposobnost fiksacije dušika, ima mnogobrojne i ekonomske i ekološke pogodnosti te je iz tog razloga njihov uzgoj postao jedan od osnovnih načela na kojima se temelji ekološka poljoprivredna proizvodnja. Ekološka poljoprivredna proizvodnja, za razliku od klasične konvencionalne poljoprivredne proizvodnje, teži smanjenju negativnih posljedica na okoliš te očuvanju prirodnih bogatstva i prirode u cijelosti, čemu se značajno doprinosi i uzgojem različitih leguminoznih usjeva.

2. OSNOVE ISHRANE BILJA

Biljkama je za život neophodna Sunčeva energija te raznovrsna biljna hranjiva koja im omogućuju transformaciju nežive, neorganske tvari u živu odnosno organsku tvar. Biljke usvajaju hranjiva koja su im potrebna (Slika 1.), u različitim kemijskim oblicima, kao

neutralne nenabijene molekule, te kao ione, pozitivno nabijene katione i negativno nabijene anione. Egzaktnim pokusima na vodenim kulturama, gdje je moguće potpuno izostaviti pojedine elemente ishrane, utvrđeno je da je za život viših biljaka neophodno 17 kemijskih elemenata (Vukadinović i Lončarić, 1997.). Svi ti elementi se zajedno nazivaju neophodni ili esencijalni elementi, a oni se mogu, ovisno o količini u kojima su potrebni biljkama podijeliti na: makroelemente (C, O, H, N, P, K, S, Ca, Mg, Fe) i mikroelemente (B, Mn, Zn, Cu, Mo, Cl, Ni). Prisutnost makroelemenata najčešće je veća od 0,1% dok mikroelementi čine tek 10^{-1} do 10^{-4} % izraženo na suhu tvar biljke. Sve biljne vrste, sa samo nekoliko iznimaka, imaju jednake zahtjeve za elementima ishrane, što ukazuje na male biokemijske promijene žive tvari tijekom filogeneze, nasuprot znatnoj morfološkoj evoluciji biljne građe (Vukadinović i Lončarić, 1997.).



Slika 1. Raznovrsna biljna hraniva
(Izvor: www.environmentplants.blogspot.com/)

Rast i razvoj biljaka a s time i količina i kvaliteta njihova prinosa, ovisit će o različitim vanjskim utjecajima kao što su svojstva tla (fizikalna, kemijska, biološka), svojstva klime (temperatura, količina padalina) i slično, ali ona velikim dijelom ovise i o usvajanju elemenata biljne ishrane, njihovom raspodjelom unutar biljke, te ugradnjom u organsku tvar. Sva ta biljna hranjiva u prirodi nalazimo u različitim oblicima jer su ona vrlo podložna promjenama odnosno prelasku iz jednog oblika u drugi, te će upravo o tome ovisiti raspoloživost pojedinog biljnog hranjiva biljkama u određenom trenutku. Promijene oblika raspoloživosti hranjiva nazivaju se jednim imenom dinamika hranjiva u tlu (Vukadinović i Lončarić, 1997.). Pod pojmom mobilizacija podrazumijevaju se svi procesi koji uzrokuju prijelaz nepristupačnih oblika hranjiva u pristupačne odnosno raspoložive oblike hranjiva, dok nasuprot tome, pod pojmom imobilizacije podrazumijevamo suprotan proces. Dakle, mobilizacija i imobilizacija su sinonimi za sve procese u tlu koji vode promjeni bioraspoloživosti hranjiva (Vukadinović i Lončarić, 1997.).

Uz dovoljne količine Sunčeve svijetlosti i vode, dušik je najznačajniji ograničavajući čimbenik o kojem će ovisiti rast i razvoj biljaka a s time i količina i kvaliteta prinosa svih poljoprivrednih kultura. Suha tvar biljaka u prosijeku sadrži između 2 i 5% dušika (Vukadinović i Lončarić, 1997.). Dušik se u biljkama tijekom čitave njihove vegetacije

ugrađuje u organsku tvar pri čemu se obavlja transformacija anorganskog oblika u organski oblik pa je raspoloživost dušika zbog velike potrebe i nedovoljne mobilizacije često ograničavajući činitelj rasta, razvoja i na kraju samog prinosa. Biljke usvajaju dušik samo u dva oblika: nitratni NO_3^- i amonijačni NH_4^+ oblik (Slika 2.). Usvajanje oba oblika dušika je aktivan proces što znači da se pri usvajanju ovih iona troši određena energija.



Slika 2. Oblici dušika koji mogu usvojiti biljke
(Izvor: www.nitrogenfree.com/problem/nitrogen_cycle.php.html)

Uloga dušika u biljkama je vrlo raznolika jer on predstavlja važnu komponentu mnogih genetskih, strukturnih i metaboličkih spojeva u biljnim stanicama. Dušik je sastavni dio nukleinskih kiselina koje sudjeluju u pohrani, prijenosu i ekspresiji genetičke informacije. Dušik je sastavni dio aminokiselina koje izgrađuju sve bjelančevine odnosno proteine čija uloga može biti strukturna (kao osnovni građevni element raznovrsnih struktura) i metaboličkih (kao što su različiti hormoni i enzimi). Nadalje, dušik sudjeluje u izgradnji fotosintetskog pigmenta klorofila koji biljkama omogućuje proces fotosinteze. Prema tome, dušik je jedan od elemenata koji su neizostavni za život svih živih organizama, pa se upravo zbog toga u agrokemiji odnosno ishrani bilja ulažu veliki napori u istraživanju ovog elementa. Opskrbljenost biljaka potrebnim količinama dušika ima izuzetan značaj u tvorbi prinosa i njegove kakvoće (Vukadinović i Lončarić, 1997.). Nedostatak dušika u tlu može imati višestruke posljedice za biljku. Biljke koje tijekom svoje vegetacije nisu imale dostupne potrebne količine dušika najčešće karakterizira usporen rast i razvoj, formiranje kratkih i tankih izbojaka, listovi su kraći i uži najčešće blijedozelene do žute boje zbog manjeg sadržaja klorofila što kao direktnu posljedicu ima manji intenzitet fotosinteze. Sve to na kraju rezultira smanjenom kvantitetom i kvalitetom očekivanog prinosa.

U prirodi, dušik je najzastupljeniji u atmosferi, gdje plinoviti N_2 čini čak 78,1% (Vukadinović i Lončarić, 1997.). Nažalost, N_2 je neupotrebljiv za većinu živih organizama. Biljke, životinje i mikroorganizmi mogu uginuti zbog nedostatka dušika, okruženi N_2 kojeg ne mogu upotrijebiti (Lindemann i Glover, 2003.). U tlu, dušik nalazimo u tri osnovna oblika:

kao sastavni dio organskih spojeva, te kao anorganski spojevi kao što su nitratni NO_3^- i amonijačni NH_4^+ ioni. Organski spojevi s dušikom potječu od nepotpuno razloženih biljnih i životinjskih ostataka ali i onih potpuno razloženih koji sudjeluju u stvaranju humusa u tlu. Anorganski spojevi s dušikom, koji su zapravo i jedini oblici dušika koji su na raspolaganju da budu iskorišteni od strane biljaka, čine samo maleni dio od ukupne količine dušika u tlu tako da su te količine uglavnom nedovoljne za dobru odnosno potpunu ishranu prilikom uzgoja poljoprivrednih kultura. 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 do 3% (Vukadinović i Lončarić, 1997.). Upravo zbog toga, u suvremenoj poljoprivrednoj proizvodnji koja teži postizanju visokih prinosa uzgajanih poljoprivrednih kultura, aplikacija dušika u obliku različitih vrsta gnojiva postala je neophodna i neizostavna agrotehnička mjera jer količine dušika koje su u tlu dostupne, u pravilu nisu dovoljne za postizanje željenih prinosa. Biljke inače rijetko kada mogu iskoristiti više od 50% dušika koji se doda gnojidbom. Ostatak dušika se veže na organsku tvar tla, ispere u podzemnu vodu, ili ishlapi u zrak (Znaor, 1996.).

Dušik je zbog svojih specifičnih kemijskih svojstava vrlo podložan reakcijama transformacije odnosno neprestanom prelasku iz jednog oblika u drugi, te na taj način dušik kruži u prirodi. Kruženje dušika u prirodi možemo podijeliti na nekoliko odvojenih reakcija koje su međusobno povezane u ciklus. Osnova ciklusa kruženja dušika u prirodi je njegov prijelaz iz anorganskih spojeva u organske spojeve i obratno. Ciklus kruženja dušika sastoji se od nekoliko nizova transformacija koje mogu uzrokovati gubitke biljkama pristupačnih oblika dušika iz tla. Najznačajniji putovi gubitka biljkama pristupačnog dušika iz tla su ispiranje, volatizacija, denitrifikacija i iznošenje usjevima. Ispiranjem dolazi do gubitka nitratnih oblika dušika iz tla koji se vrlo lako ispiru vodom koja se neprestano procjeđuje kroz tlo, što može dovesti do ozbiljnih problema onečišćenja nadzemnih i podzemnih voda. Ova je pojava izraženija kod porozne strukture tla i u uvjetima povišene vlažnosti tla. Isparavanjem ili volatizacijom može doći do gubitaka dušika u obliku amonijaka. Amonijski ion NH_4^+ je svojim pozitivnim nabojem vezan za čestice tla, no u određenim uvjetima u tlu on može izgubiti dodatni vodikov H^+ ion i preći u neutralni amonijak NH_3 koji se zbog nedostatka električnog naboja ne povezuje s česticama tla i zbog toga lako izgubi. Ova pojava značajno ovisi o pH reakciji tla jer su gubici amonijaka u tlima lužnate reakcije značajno veći nego kod tla neutralne ili kisele reakcije. Uzrok negativne bilance dušika u tlu također može biti i proces denitrifikacije u kojem se djelovanjem mikroorganizama nitrati NO_3^- reduciraju do

elementarnog dušika N_2 koji se onda gubi iz tla, te se na taj način tlo osiromašuje ovim hranjivom. Osim toga, određene količine dušika mogu se izgubiti iznošenjem usjeva nakon berbe ili žetve pri čemu se dušik koji je ugrađen u uzgajane poljoprivredne kulture u potpunosti uklanja i odnosi s poljoprivrednih površina.

U klasičnim konvencionalnim poljoprivrednim proizvodnim sustavima cilj je ostvariti visoke prinose, visoke kvalitete. Kako bi se to postiglo, uzgajanim poljoprivrednim kulturama se tijekom cijele njihove vegetacije moraju osigurati optimalni uvjeti, a jedan od njih je osiguravanje dovoljne količine pojedinih hranjiva. Dušik je jedan od esencijalnih makroelemenata, neizostavnih biljnih hranjiva jer njegov nedostatak uzrokuje usporen i smanjen rast i razvoj biljaka što na kraju rezultira smanjenom količinom i kakvoćom njihova prinosa. S obzirom da je dušik zbog svojih kemijskih svojstava i mogućnosti transformacije vrlo podložan gubicima iz tla potreba za njegovom nadoknadom postala je sve veća**.** Globalna potrošnja dušičnih gnojiva povećala se sa 8 na 17 kg ha^{-1} na poljoprivrednim tlima u periodu od 15 godina od 1973 do 1988 godine (FAO, 1990.). Značajno povećanje potrošnje dušičnih gnojiva pojavilo se i u razvijenim zemljama i u zemljama u razvoju (Peoples i sur., 1995.). Predviđa se da će potreba za dušičnim gnojivima i dalje rasti u budućnosti (Subba-Rao, 1980.); međutim, sa sadašnjom tehnologijom za proizvodnju gnojiva i neučinkovitim metodama za primjenu gnojiva, kako ekonomski tako i ekološki troškovi upotrebe ovih gnojiva na kraju će postati previsoki (Zahran, 1999.).

Povećan interes za ekologiju okoliša potaknuo je razvoj ekološke poljoprivredne proizvodnje, koja za razliku od klasične konvencionalne poljoprivrede, koju karakterizira prekomjerno i neracionalno trošenje neobnovljivih prirodnih resursa kao i korištenje agrokemikalija, ne ostavlja trajne štetne posljedice za okoliš i ne remeti cjelokupni ekosustav. Kao osnovni ciljevi ekološke poljoprivrede ističu se proizvodnja visokokvalitetne hrane, uz očuvanje prirodnih ekosustava, poticanje prirodnih procesa unutar njih, korištenje obnovljivih prirodnih resursa te smanjenje onečišćenja pa time i degradacije okoliša.

3. PROCESI FIKSACIJE DUŠIKA

Općenito, svaki proces fiksacije dušika se smatra procesom vezanja elementarnog odnosno molekularnog dušika (N_2) iz atmosfere u spojeve koji su onda raspoloživi mikroorganizmima i biljkama da ih iskoriste za svoje potrebe. Atmosferski dušik je zbog trostruke veze između dva atoma dušika vrlo stabilan pa je zbog toga i vrlo inertan te će teško kemijski reagirati s drugim elementima. Procesi fiksacije dušika omogućuju razdvajanje

dušikovih atoma iz molekule kako bi se oni mogli kemijski vezati s drugim elementima stvarajući pri tome različite druge spojeve. Fiksacija atmosferskog dušika je najvažnija komponenta u ciklusu kruženja dušika u prirodi, sa posebnim značajem za poljoprivrednu proizvodnju, naročito u područjima s niskom plodnošću tla. Procese fiksacije dušika možemo podijeliti na dvije osnovne skupine, a to su abiotska i biotska (biološka) fiksacija dušika.

3.1. Abiotska fiksacija dušika

Abiotska fiksacija dušika je fiksacija dušika koja se odvija bez prisutnosti mikroorganizama. Razlikujemo dva tipa, a to su prirodna i umjetna abiotska fiksacija dušika.

3.1.1. Prirodna abiotska fiksacija dušika

To je prirodan i spontan proces kojeg iniciraju određeni uvjeti u atmosferi. Prilikom olujnog nevremena, sijevanje munja uzrokuje raspadanje molekula dušika na atome koji se nakon toga vežu s kisikom stvarajući dušikove okside. Novonastali dušikovi oksidi se u dodiru s molekulama vode tope pri čemu nastaje dušična kiselina koja putem oborina dolazi na tlo.

3.1.2. Umjetna abiotska fiksacija dušika

Taj umjetan proces, iniciran i kontroliran od strane čovjeka, izvodi se u industrijskim postrojenjima, te se naziva Haber-Boschov postupak. U ovom procesu koristi se elementarni molekularni dušik iz atmosfere koji se u uvjetima visoke temperature i tlaka uz prisutnost određenog katalizatora prevodi u amonijak. Ovim postupkom proizvode se različita dušična gnojiva u količinama od oko 500 milijuna tona godišnje. Haber-Boschov postupak je od izuzetne važnosti jer su gnojiva proizvedena iz amonijaka odgovorna za održavanje jedne trećine svjetske populacije (Wolfe, 2001.).

3.2. Biotska (biološka) fiksacija dušika

Biotska odnosno biološka fiksacija dušika su procesi posredovani samo određenim skupinama mikroorganizama koji imaju sposobnost usvajati elementarni molekularni dušik iz atmosfere te ga reducirati do amonijaka koji onda postaje dostupan za usvajanje i korištenje drugim mikroorganizmima i višim biljkama.

Organizmi koji mogu fiksirati dušik odnosno prevesti stabilan plinoviti dušik iz atmosfere u biološki iskoristiv oblik, svi pripadaju biološkoj skupini organizama poznati kao prokarioti (Zahran, 1999.). Prokarioti su jednostanični organizmi jednostavnije stanične građe,

vrlo velike raznolikosti i brojnosti u prirodi. Imaju sposobnost preživljavanja u najrazličitijim životnim sredinama pa se zbog toga i smatraju najrasprostranjenijim organizmima u prirodi. Na osnovu klasifikacije mogu se podijeliti na *Eubacteria* ili *Bacteria* (eubakterije ili prave bakterije) i *Archaebacteria* ili *Archaea* (arheobakterije ili arheje). Široki raspon organizama ima sposobnost fiksiranja dušika, međutim, tu sposobnost ima samo vrlo mali udio vrsta; oko 87 vrsta u dva roda *Archaea*, 38 rodova bakterija i 20 rodova cijanobakterija su identificirani kao diazotrofi odnosno organizmi koji imaju sposobnost fiksiranja dušika (Dixon i Wheeler, 1986.; Sprent i Sprent, 1990.; Zahran i sur., 1995.). Ovakva velika raznolikost fiksatora dušika osigurava da će većina ekoloških niša sadržavati barem jedan ili dva predstavnika od ovih vrsta organizama te da će se uz pomoć njih izgubljeni dušik uvijek moći nadoknaditi (Zahran, 1999.).

Biološka fiksacija dušika predstavlja obnovljiv izvor dušika za poljoprivredu (Peoples i sur., 1995.). Ukupni godišnji unosi dušika u tlo koji su rezultat biološke fiksacije dušika kreću se u rasponu od 139 milijuna do 175 milijuna tona dušika (Burns i Hardy, 1975.; Paul, 1988.). Ovi podaci upućuju na značaj biološke fiksacije dušika i njenog doprinosa kako u ciklusu kruženja dušika u prirodi pa tako i u poljoprivrednim proizvodnim sustavima. Proširen interes za ekologiju preusmjerio je pozornost prema činjenici da je biološka fiksacija dušika ekološki dobroćudan i povoljan proces i da njegovo korištenje može smanjiti upotrebu fosilnih gnojiva i može pomoći u pošumljavanju i restauraciji produktivnosti zloupotrebljenih područja (Burris, 1994.; Sprent i Sprent 1990.). U svijetu, mnoga tla su degradirana i krajnje je vrijeme da se zaustavi destruktivno korištenje tla te pokrene institucionalizacija obrata degradacije tla odnosno remedijacije tla (Burris, 1994.). Ključnu ulogu u tome mogla bi imati biološka fiksacija dušika (Zahran, 1999.).

Biotsku odnosno biološku fiksaciju dušika možemo podijeliti prema odnosu između biljaka i mikroorganizama na asimbiotsku, asocijativnu i simbiotsku fiksaciju dušika.

3.2.1. Asimbiotska fiksacija dušika

Asimbiotska fiksacija dušika obuhvaća procese fiksacije dušika posredovane određenim skupinama mikroorganizama koji žive slobodno u vodi ili u tlu. Ti mikroorganizmi imaju sposobnost samostalne fiksacije plinovitog dušika iz atmosfere, znači bez interakcije s drugim mikroorganizmima ili biljkama. Energiju za ove procese dobivaju iz organske tvari tla, odnosno iz ugljikohidrata, točnije iz monosaharida. Asimbiotski fiksatori dušika su vrlo široko rasprostranjeni a njihova zastupljenost u tlu ovisi o karakteristikama, odnosno

fizikalnim i kemijskim svojstvima tla. Na njihovu brojnost i aktivnost utječe cijeli niz ekoloških čimbenika kao što su: pH reakcija životne sredine (optimalna je neutralna pH reakcija), temperatura (optimalna temperatura je između 15 i 25˚ C), količina kisika (različite vrste mikroorganizama imaju različite zahtjeve prema kisiku), sadržaj vode (također može biti limitirajući čimbenik jer su određene vrste osjetljive na sadržaj vode u tlu), sadržaj organske tvari (obzirom da asimbiotski fiksatori dušika kao izvor energije za fiksaciju dušika iz atmosfere koriste organsku tvar tla, sadržaj ugljikohidrata, osobito monosaharada u tlu značajno će utjecat na njihovu brojnost i aktivnost), te sadržaj mikroelemenata (za njihov metabolizam osobito je važna prisutnost različitih mikroelemenata). Asimbiotsku fiksaciju dušika s obzirom na zahtjeve mikroorganizama prema kisiku dijelimo na aerobnu, fakultativno anaerobnu i anaerobnu fiksaciju dušika.

3.2.1.1. Aerobna asimbiotska fiksacija dušika

Za aerobnu asimbiotsku fiksaciju dušika potrebni su aerobni uvjeti, odnosno prisutnost dovoljne količine kisika. Najznačajniji predstavnici su baterije iz rodova: *Azotobacter, Azomonas, Azospirillum, Derxia* i *Pseudomonas.*

3.2.1.2. Fakultativno anaerobna asimbiotska fiksacija dušika

Fakultativna anaerobna fiksacija dušika može se odvijati i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima jer prisutnost kisika za ove procese nije neophodna. Najznačajniji predstavnici su bakterije iz rodova: *Bacillus* i *Enterobacter*. U carstvu bakterija važno je spomenuti i koljeno *Cyanobacteria* odnosno cijanobakterije ili modrozelene alge jer mnogi predstavnici rodova *Anabena* i *Nostoc* također imaju sposobnost fiksiranja dušika iz atmosfere.

3.2.1.3. Anaerobna asimbiotska fiksacija dušika

Za anaerobnu asimbiotsku fiksaciju dušika nije potrebna prisutnost kisika jer se ona odvija u anaerobnim uvjetima. Mikroorganizmima su za ove procese potrebni lako pristupačni organski spojevi kao što su monosaharidi, disahridi i organske kiseline. Najvažniji predstavnici su bakterije iz roda *Clostridium*.

3.2.2. Asocijativna fiksacija dušika

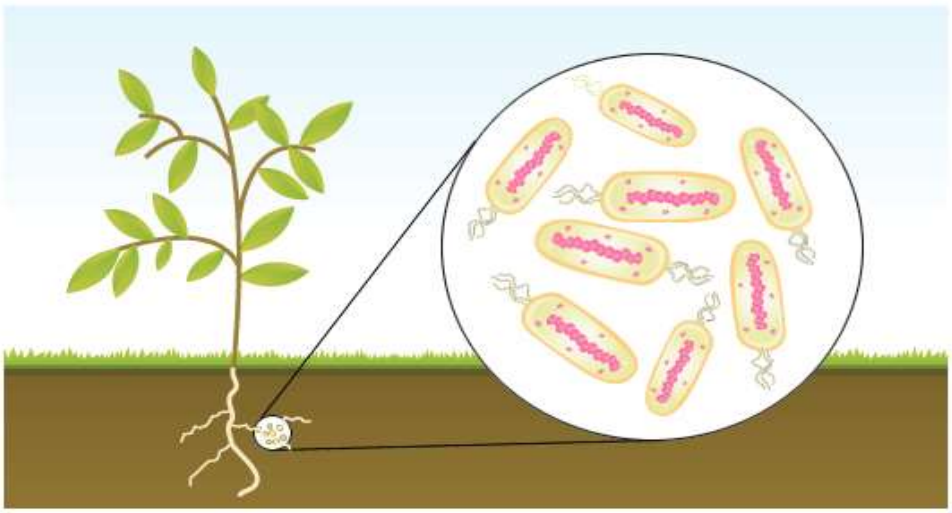
Asocijativna fiksacija dušika predstavlja prijelazni oblik između asimbiotske fiksacije dušika i simbiotske fiksacije dušika. Asocijativni fiksatori dušika su određene vrste bakterija koje žive i djeluju na samoj površini korijena biljaka oko kojeg stvaraju vrlo tanku i finu

ovojnicu. Ove bakterije pokazuju određeni stupanj specifičnosti prema pojedinim biljnim vrstama, jer će određeni sojevi bakterija nastaniti i biti aktivni na korijenu samo nekoliko određenih vrsta biljaka. Kod asocijativne fiksacije dušika, i bakterije i biljke uživaju pogodnosti koje su rezultat ovog međuodnosa. Bakterije kao izvor energije uglavnom koriste različite biljne eksudate koji se korijenovim sustavom otpuštaju u tlo, dok zauzvrat, biljke mogu koristiti fiksirani dušik iz atmosfere kojim se obogaćuje rizosfera oko njihovog korijenovog sustava. Na brojnost i aktivnost bakterija koje vrše asocijativnu fiksaciju dušika će osim različitih ekoloških uvjeta utjecati i sama biljka svojim eksudatima, a količina fiksiranog dušika ovisiti će o vrsti bakterije, o vrsti biljke, te o različitim ekološkim uvjetima staništa. Najznačajniji asocijativni fiksatori dušika su bakterije iz rodova: *Azospirillum, Azotobacter, Derxia* i *Klebsiella*.

3.2.3. Simbiotska fiksacija dušika

Nedostatak mineralnog oblika dušika u tlu vrlo često ograničava rast biljaka, pa su se upravo zbog toga razvili simbiotski odnosi između biljaka i raznovrsnih organizama sa sposobnošću fiksiranja dušika (Freiberg i sur., 1997.). Upravo najučinkovitiji fiksatori dušika uspostavljaju simbiozu s višim biljkama (Mylona i sur., 1995.). Postoje različiti tipovi simbiotske fiksacije dušika koji se međusobno razlikuju prema pojedinim članovima simbiotskih odnosa, jer različite vrste bakterija stvaraju simbiotsku interakciju s različitim vrstama biljaka.

Najznačajniji tip simbiotske fiksacije dušika za poljoprivredna tla je fiksacija dušika koja nastaje kao rezultat simbioze između bakterija iz rodova *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* s većinom biljka iz porodice *Fabaceae* ili *Leguminosae* (mahunarke ili leguminoze) (Slika 3.). Ovaj tip simbioze predstavlja primarni izvor fiksiranog dušika u svim kopnenim sustavima i može osigurati više od polovice fiksiranog dušika iz bioloških izvora (Tate, 1995.).



Slika 3. Simbiotski odnos između leguminoza i kvržičnih bakterija
(Izvor: www.bbc.co.uk/bitesize/standard/chemistry/plasticsandothermaterials/)

Simbiotska fiksacija dušika je inicirana i održana aktivnom izmjenom kemijskih signala između biljke domaćina i bakterija tla (Fox i sur., 2007.). Genetski faktori oba simbionta sudjeluju u stvaranju simbiotskog odnosa koji započinje međusobnim prepoznavanjem bakterije i biljke nakon čega slijedi infekcija biljaka bakterijama što na kraju rezultira nodulacijom odnosno formiranjem kvržica ili nodula na korijenovom sustavu biljaka unutar kojih će se odvijati procesi simbiotske fiksacije atmosferskog dušika. Proces fiksacije dušika zahtjeva prisutnost enzima nitrogenaze koji djeluje kao katalizator za reakciju podijele molekule dušika i njegove promjene u amonijak i osigurava za to potrebnu energiju i elektrone (Postgate, 1982.).

Simbiotski odnos temelji se na uzajamnoj koristi oba člana simbioze. Sposobnost fiksacije atmosferskog dušika proizlazi iz simbiotskih interakcija između leguminoza i bakterija u kojem leguminoze kroz produkte fotosinteze opskrbljuju bakterije ugljikom odnosno energijom, dok za uzvrat bakterije opskrbljuju leguminoze dušikom uglavnom u obliku amonijaka (Howard i Rees, 1996.). Prema tome, bakterije koriste translocirane produkte fotosinteze biljaka te se na taj način opskrbljuju nutrijentima s ugljikom koji predstavljaju izvor energije potrebne za procese fiksacije atmosferskog dušika, dok se biljke opskrbljuju novonastalim proizvodima fiksacije dušika odnosno reduciranim dušikom u obliku amonijaka. Struktura zrelih nodula, unutar kojih se odvija ova fiksacija, razvijena je kako bi udovoljila izmjeni nutrijenata između oba partnera simbioze (Mylona i sur., 1995.).

Pregled povijesti istraživanja biološke fiksacije dušika pokazuje da je interes uglavnom bio usmjeren na simbiotski sustav biljaka iz porodice leguminoza i bakterija iz roda *Rhizobium*, zbog toga što ove asocijacije imaju najveći kvantitativni utjecaj na ciklus kruženja

dušika u prirodi (Zahran, 1999.). Unosi u kopnene ekosustave od biološke fiksacije dušika odnosno od simbioznog odnosa između biljaka iz porodice leguminoza i bakterija iz roda *Rhizobium* iznose najmanje 70 milijuna tona dušika godišnje (Brockwell i sur., 1995.). Upravo zbog toga, ovi simbiozni odnosi su od najvećeg značenja za poljoprivredu, jer omogućuju obogaćivanje poljoprivrednih tala dušikom porijeklom iz atmosfere.

Učinkovita simbiotska fiksacija dušika može značajno smanjiti potrebu za umjetnim dušičnim gnojivima. Korištenje simbiotske fiksacije dušika kojom bi se smanjila ovisnost o komercijalnim dušičnim gnojiva, osim ekonomske koristi, ima koristi i za ekologiju okoliša (Fox i sur., 2007.). Proizvodnja dušičnih gnojiva i njegova primjena na poljoprivredna tla, ima raznovrsne negativne posljedice za okoliš odnosno na prirodne ekosustave. Sam proces proizvodnje dušičnih gnojiva zahtjeva korištenje neobnovljivih izvora energije čije su količine u prirodi ograničene. U ovim procesima koriste se fosilna goriva kao što su prirodni ili zemni plin i ugljen čijim korištenjem odnosno sagorijevanjem u industrijskim postrojenjima dolazi do stvaranja i oslobađanja ugljik dioksida. Ugljik dioksid je jedan od najznačajnijih stakleničkih plinova i povećanje njegovih koncentracija u atmosferi dovodi do antropogenih klimatskih promjena. S druge strane, dugoročna primjena dušičnih gnojiva na poljoprivrednim tlima uzrokuje degradaciju tla, odnosno narušavanje njegovih fizikalnih, kemijskih i bioloških svojstava, zagađenje podzemnih i nadzemnih voda te njihovu eutrofikaciju. Prema tome, proizvodnja i primjena dušičnih gnojiva je ekonomski i energetski vrlo zahtjevna i dovodi do vrlo ozbiljnih i zabrinjavajućih problema ugrožavanja prirodnih ekosustava. Simbioza između bakterija *Rhizobium* ili *Bradyrhizobium* i leguminoza predstavljaju jeftiniju i vrlo često učinkovitiju agronomsku praksu za osiguravanje odgovarajuće opskrbe dušikom za proizvodnju usjeva i pašnjaka temeljenih na leguminozama, nego što je to aplikacija dušičnih gnojiva. Povećanje prinosa usjeva zasađenih nakon žetve leguminoza su često jednake onima koje se očekuju nakon primjene 30 do 80 kg dušičnih gnojiva ha^{-1} (Zahran, 1999.). Korištenjem simbiotske fiksacije dušika ovih simbionta kao osnovnog izvora dušika u poljoprivrednoj proizvodnji imat će mnogobrojne pozitivne učinke ali će se na taj način izbjeći negativne posljedice proizvodnje i aplikacije dušičnih gnojiva.

Količine dušika fiksirane u simbiozi između biljaka iz porodice leguminoza i bakterija *Rhizobium* ili *Bradyrhizobium* su od najvećeg značaja kako u ciklusu kruženja dušika u prirodi tako i u poljoprivrednim proizvodnim ciklusima**.** No ova ogromna količina morat će biti još dodatno povećana sukladno s povećanjem svjetske populacije i smanjenjem prirodnih

izvora koja su potrebna za proizvodnju dušičnih gnojiva. Ovaj će se cilj postići kroz razvoj vrhunskih sorti leguminoza, poboljšanja postojeće poljoprivredne prakse i povećanje efikasnosti samog procesa fiksiranja dušika boljim upravljanjem simbiotskih odnosa između biljaka i bakterija (Zahran, 1999.).

4. OPĆE OSOBINE ČLANOVA SIMBIOTSKE FIKSACIJE DUŠIKA ZNAČAJNIH ZA POLJOPRIVREDNU PROIZVODNJU

Najznačajnija biotska odnosno biološka fiksacija dušika za poljoprivrednu proizvodnju je simbiozna fiksacija dušika koja nastaje kao rezultat simbioze kvržičnih bakterija s većinom biljka iz porodice *Leguminosae*. Prema tome, članovi ovih simbiotskih odnosa su:

4.1. Kvržične bakterije

Kvržične bakterije su bakterije tla koje imaju jedinstvenu sposobnost inficiranja korijenovih dlačica na korijenu biljaka iz porodice leguminoza, uslijed čega dolazi do infekcije i nodulacije, odnosno stvaranja kvržica ili nodula. Kvržice ili nodule su specijalizirane strukture na korijenovom sustavu biljaka leguminoza u kojima su smještene kvržične bakterije sa sposobnošću fiksiranja atmosferskog dušika. Morfologija i fiziologija ovih bakterija će se razlikovati kod slobodno živućih uvjeta i kod bakterioida u kvržicama (Mishra i Dadhich, 2010.). Kvržične bakterije pripadaju redu *Rhizobiales* s najznačajnijim porodicama *Bradyrhizobiaceae* s rodom *Bradyrhizobium* i *Rhizobiaceae* s rodom *Rhizobium*.

4.1.1. Rod *Bradyrhizobium*

Rod *Bradyrhizobium* obuhvaća gram-negativne bakterije tla od kojih mnoge imaju sposobnost stvaranja simbiotskih odnosa s biljkama iz porodice leguminoza i sposobnost fiksacije dušika. Bakterije iz ovog roda mogu stvarati specifične ili nespecifične simbiotske odnose (Somasegaran, 1994.). Kod specifične simbioze, simbiotski odnosi se stvaraju samo jednom određenom vrstom iz porodice leguminoza, dok kod nespecifične simbioze simbiotski odnosi se mogu stvarati s više vrsta iz porodica leguminoza. Bakterije iz ovog roda noduliraju leguminoze većinom iz tropskog pojasa, te neke vrste umjerenog pojasa.

4.1.2. Rod *Rhizobium*

Rod *Rhizobium* obuhvaća gram-negativne bakterije tla koje također imaju sposobnost stvarati simbiotske odnose s biljkama iz porodice leguminoza te fiksirati atmosferski dušik. Svaka vrsta iz roda *Rhizobium* stvara simbiotsku interakciju samo s određenom podskupinom domaćina biljnih vrsta (Fox i sur., 2007.). Ovi sojevi noduliraju leguminoze većinom iz umjerenog područja. Pojedini sojevi razlikuju se intenzitetom simbiotske fiksacije atmosferskog dušika (Vukadinović i Lončarić, 1997.).

4.2. Biljke porodice *Leguminosae*

Porodica *Leguminosae* ili *Fabaceae* obuhvaća preko 720 rodova s više od 18 000 vrsta rasprostranjenih širom svijeta (Lewis i sur., 2005.). Ova se porodica smatra trećom po veličini od svih biljaka cvjetnjača ili sjemenjača (Mabberley, 1997.). Zbog svoje iznimne brojnosti i raznolikosti te zbog izuzetne široke rasprostranjenosti, ova porodica ima vrlo velik ekonomski, agronomski i ekološki značaj. Ekonomski i agronomski značaj ove porodice očituje se u uzgoju pojedinih vrsta za dobivanje i proizvodnju hrane, krme, ulja, vlakna, goriva, drva, različitih kemikalija i lijekova te vrsta koje se koriste u hortikulturi kao ukrasno bilje i vrsta koje se koriste u poljoprivredi za obogaćivanje poljoprivrednih tala. Ekološki značaj porodice leguminoza je dvostruk zbog toga što ova porodica ima izraziti doprinos u raznolikosti gotovo svih ekosustava i zbog toga što ima temeljnu ulogu u globalnoj biogeokemiji; gotovo sve vrste stvaraju simbiotske odnose s određenim bakterijama pri čemu se stvaraju korijenove kvržice ili nodule u kojima dolazi do fiksacije atmosferskog dušika (Sprent i McKey, 1994.; Sprent, 2001.). Na taj način, zahvaljujući simbiozi s bakterijama iz rodova *Bradyrhizobium* i *Rhizobium*, nedostupan i neiskoristiv dušik iz atmosfere postaje dostupan leguminozama, koje ga onda iskorištavaju za svoje potrebe. Leguminozni usjevi sadrže izuzetno velike količine proteina za čije su stvaranje neophodne velike količine dušika, tako da su one razvile značajno različit odnos prema ishrani dušika za razliku od drugih ratarskih kultura. Na taj način, legumonozni usjevi mogu uz asimilaciju dušika iz tla koristiti i dušik iz atmosfere putem procesa simbiotske fiksacije dušika pod uvjetom da stvaraju simbiotske odnose s odgovarajućim kvržičnim bakterijama. Porodica leguminoza je vrlo važna i s poljoprivrednog i s ekološkog stajališta jer je ona odgovorna za značajan dio ciklusa kruženja dušika u prirodi i to iz atmosferskog oblika dušika pa do fiksiranih oblika dušika poput amonijaka, nitrata i organskog dušika (Zahran, 1999.). Kod leguminoza postoji ogroman potencijal za doprinos fiksacije dušika u kopnenim ekosustavima (Brockwell i sur., 1995.; Peoples i sur., 1995.; Tate 1995.).

Najznačajnije mahunarke ili leguminoze koje se uzgajaju za proizvodnju hrane su:

Grah (lat. *Phaseolus vulgaris*) je jednogodišnja biljka iz porodice leguminoza koja se kao povrtlarska kultura ubraja u skupinu zrnatih mahunarki. U ljudskoj prehrani grah se uz neke druge vrste mahunarka počeo upotrebljavati još u dalekoj prošlosti kod starih civilizacija. Nakon što je u 16 stoljeću iz Amerike uveden u Europu, počeo se uzgajati širom svijeta što je rezultiralo razvojem velikog broja različitih sorata koje se međusobno razlikuju po visini stabljike, obliku i boji zrna. Danas grah je najpoznatija je i najrasprostranjenija

zrnata mahunarka s preko 70 različitih sorata, te je važno napomenuti kako ni jedna druga povrtlarska kultura nije razvila toliko različitih sorata kao grah.

Grašak (lat. *Pisum sativum*) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice mahunarki koja se kao povrtlarska kultura ubraja u grupu zrnatih mahunarki. Grašak se u ljudskoj prehrani također počeo koristiti kod starih civilizacija u davnoj prošlosti. Početkom srednjeg vijeka, za vrijeme velikih seoba uveden je iz Amerike u Europu. Danas, grašak se uspješno uzgaja po cijelome svijetu.

Soja (lat. *Glycine max*) je jednogodišnja biljka iz porodice mahunarki ili leguminoza. Ubraja se u najstarije kultivirane biljke u svijetu. U Europu je donesena tek u 18 stoljeću. Biljka soje ima uspravnu razgranatu stabljiku s velikim zelenim listovima i bijelim, ružičastim ili ljubičastim cvjetovima. Plod soje je mahuna koja sadrži jednu do pet sjemenki koje mogu biti različitih boja od zelene, žute, smeđe, crvene i crne, ili mogu biti šarene. Danas postoji velik broj različitih sorata soje koje se međusobno razlikuju prvenstveno u veličini, obliku i boji sjemena. Sojino zrno je izuzetno bogato vitaminima, mineralima i proteinima. Soja je jedina biljka čije sjeme sadrži sve esencijalne aminokiseline koje su neophodne za pravilno funkcioniranje ljudskog organizma, te se čak njeni proteini smatraju jednako vrijednima kao proteinima iz mesa. Zbog ovih jedinstvenih svojstava, soja je postala nezamjenjiva i neizostavna namirnica u pravilnoj ljudskoj prehrani.

Bob (lat. *Vicia faba*) je jednogodišnja biljka koja se ubraja u skupinu zrnatih mahunarki. Bob se još od davnina koristi u ljudskoj prehrani. Biljka boba ima zeljastu i šuplju stabljiku na kojoj su smješteni dugački zeleni listovi i cvjetovi bijele boje s crnim šarama. Nakon cvatnje postupno se razvijaju mahune koje sadrže četiri do osam velikim zelenim sjemenki. Sjeme boba bogato je bjelančevinama, željezom, fosforom, kalcijem i vlaknima te se zbog toga smatra izuzetno hranjivom namirnicom.

Leća (lat. *Lens esculenta*) je jednogodišnja biljka koja se ubraja u grupu zrnatih mahunarki. Leća se uzgajala još u mlađem kamenom dobu, a pretpostavlja se da potječe iz jugozapadne Azije, odakle se preko Sredozemlja proširila u Europu. Biljka leće ima jednu ili razgranatu stabljiku na kojoj se nalaze sastavljeni listovi. Cvjetovi su bijele, ljubičaste ili svijetloplave boje, a iz njih se razvijaju mahune, koje sadrže jednu do dvije sjemenke. Leća ne sadrži zasićene masnoće, kao ni štetni kolesterol, te je izvanredan izvor topivih i netopivih vlakana.

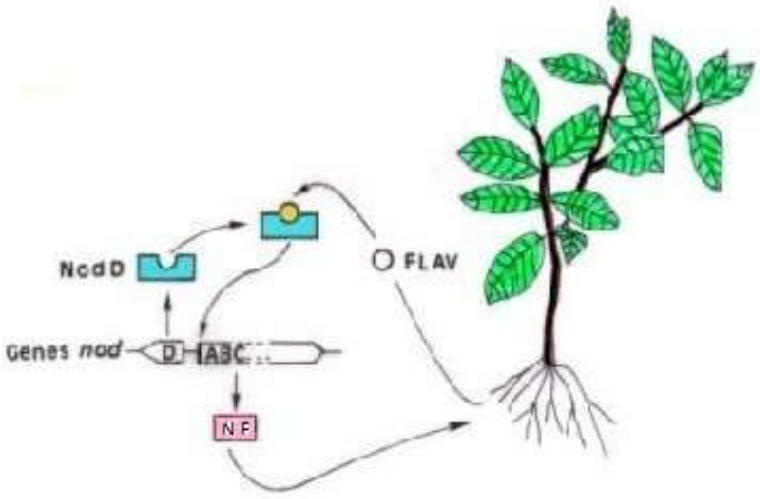
Kikiriki (lat. *Arachis hypogaea)* iako bi se izgledom mogao vrlo lako svrstati u skupinu oraštastih plodova, botanički on zapravo pripada porodici mahunarki ili leguminoza. Kikiriki je poznat već više od 1000 godina, te on potječe iz Južne Amerike gdje je imao vrlo važnu ulogu u prehrani drevnih indijanskih plemena. U 15 stoljeću Španjolci i Portugalci prenijeli su ga na afrički kontinent, nakon čega se postepeno proširio na cijeli svijet. Kikiriki je jednogodišnja biljka s manjim zelenim listovima i žutim cvjetovima. Nakon što su cvjetovi oprašeni, stabljike se spuštaju prema tlu, a cvjetovi ulaze u zemlju. Iz oprašenih cvjetova se razvijaju manje mahune svjetlo smeđe boje koje sadrže dva do tri sjemena odnosno zrna kikirikija. Svako zrno, ovalnog oblika i kremasto bijele ili žute boje sastoji se od dvije polovice koje su prekrivene crveno-smeđom tankom ovojnicom. Za ljudsku uporabu koristi se sjeme kikirikija. Kikiriki je bogat izvor bjelančevinama, vlaknima, mineralima, željezom, cinkom i vitaminima E i K. Kikiriki ne sadrži kolesterol.

Mahunarke se osim za ljudsku ishranu, velikim dijelom uzgajaju za prehranu stoke odnosno za proizvodnju krme, a najznačajnije vrste za to su lucerna (lat. *Medicago sativa* L.), različite vrste djetelina kao što su crvena djetelina (lat. *Trifolium pratense* L.), bijela djetelina (lat. *Trifolium repens* L.), podzemna djetelina (lat. *Trifolium subterraneum* L.), perzijska djetelina (lat. *Trifolium resupinatum* L.), aleksandrijska djetelina (lat. *Trifolium alexandrinum* L.) i inkarnatka (lat. *Trifolium incarnatum* L.).

5. PROCES PREPOZNAVANJA KVRŽIČNIH BAKTERIJA I LEGUMINOZA

Simbioza između bakterija iz rodova *Bradyrhizobium* ili *Rhizobium* i biljaka iz porodice *Leguminosae* može biti više ili manje specifična, što znači da će pojedine vrste bakterija stvarati simbiotske odnose samo sa jednom ili nekolikom vrsta leguminoza. Upravo zbog toga, proces prepoznavanja je osnova za stvaranje simbiotskih odnosa pa tako i simbiotsku fiksaciju dušika.

Bakterije iz ovih rodova sadrže posebne skupine gena nazvani nodulacijski geni odnosno nod geni koji su odgovorni za stvaranje bakterijskih signalnih molekula Nod faktora, koji imaju ključnu ulogu u međusobnom prepoznavanju točno određene vrste bakterija i leguminoza. Ti geni se ekspresioniraju samo kod bakterija koje će stvoriti simbiotski odnos s leguminozom, dok kod slobodno živućih bakterija neće doći do njihove ekspresije. Iznimka tome je jedino NodD koji se ekspresionira konstitutivno odnosno prirođeno (Mylona i sur., 1995.). NodD ima sposobnost vezanja na specifične flavonoide koje izlučuje korijen biljke domaćina (Goethals i sur., 1992.); nakon vezanja na flavonoide postaje transkripcijski aktivator drugih nod gena (Fisher i Long, 1992.), koji kodiraju enzime koji su uključeni u sintezi Nod faktora (Mylona i sur., 1995.) (Slika 4.). Nod faktor djeluje kao začetnik formiranja kvržica jer pokreće cijeli niz procesa za razvitak nodula i ulazak rizobium bakterija u korijen biljke (Long, 2001.; Geurts i Bisseling, 2002.; Gage, 2004.). Upravo to predstavlja vrlo važnu odrednicu specifičnosti domaćina (Spaink, 2000.).



Slika 4. Prepoznavanje leguminoza i kvržičnih bakterija
(Izvor: www.pic2fly.com/Nod+Genes.html)

Biljke leguminoze, odnosno domaćini stvaraju fitokemijske signale u obliku jedinstvene mješavine flavonoida, koji se preko korijenovog sustava otpuštaju u rizosferu. Ti fitokemijski signali imaju dvostruku funkciju, da na površinu korijena privuku kompatibilne vrste bakterija, te da odbiju ne odgovarajuće i nepovoljne vrste bakterija koje su prisutne u rizosferi odnosno u tlu. Bakterijski NodD otkriva i prepoznaje fitokemijske signale biljke, nakon čega inducira transkripciju drugih nod gena. Proizvod transkripcije nod gena su signalne molekule Nod faktori koji zapravo predstavljaju reakciju ili odgovor bakterija na fitokemijske signale biljke. Bakterijske Nod faktore prepoznaju specijalizirani receptori na korijenu što na samom kraju rezultira iniciranjem razvoja kvržica ili nodula na korijenovom sustavu biljke domaćina. Inicijacija formiranja kvržica ili nodula na korijenu kompatibilnih biljaka domaćina rezultat je molekularnog dijaloga između domaćina i bakterija (Dénarié i sur., 1993.; Schultze i Kondorosi, 1998.; Perret i sur., 2000.; Spaink, 2000.).

Prilikom procesa prepoznavanja bakterija i leguminoza, upravo Nod faktori određuju specifičnost simbioze. Većina bakterija stvara samo nekoliko različitih Nod faktora, koji im omogućuju sposobnost stvaranja simbiotskih odnosa s ograničenim brojem vrsta leguminoza. No, neke bakterije *Rhizobium* kao npr. *Rhizobium* NGR234 imaju nešto slobodniju prirodu. Ova vrsta *Rhizobium* može nodulirati različite tropske leguminoze jer izlučuje čak 18 različitih Nod faktora. Ova produkcija različitih Nod faktora smatra se osnovom za njegov širok raspon domaćina (Price i sur., 1992.).

5.1. INFEKCIJA

Nakon procesa prepoznavanja, koji je omogućio prve interakcije i međusobno prepoznavanje odgovarajućih vrsta bakterija i leguminoza, slijedi proces infekcije. Proces infekcije reguliran je vrlo složenim kemijskim komunikacijama između odgovarajućih bakterija i leguminoza.

Bakterije koloniziraju korijenov sustav leguminoza, te se pričvršćuju na njegovoj površini. Pri tome, bakterije stvaraju Nod faktore koji su od osnovnog značaja za proces infekcije jer iniciraju i reguliraju pojedine faze ovog procesa. Kao reakcija na percepciju Nod faktora bakterija kod biljaka dolazi do aktiviranja skupine gena koji se nazivaju nodulacijski geni (Geurts i Bisseling 2002.). Aktivacija i ekspresija tih gena je ključna jer omogućuje pokretanje reakcija i procesa u biljci koje su neophodne za uspješnu infekciju, nodulaciju pa i samu simbiotsku fiksaciju dušika. Razlikujemo rane i kasne nodulacijske gene. Rani nodulacijski geni kodiraju proizvode koji se ekspresioniraju prije samog početka procesa fiksacije dušika, te su oni uključeni u procese infekcije i nodulacije, dok su proizvodi kasnih nodulacijskih gena uključeni u stvaranje interakcije s endosimbiontom i metaboličkoj specijalizaciji nodula (Nap i Bisseling, 1990.). Nodulacijski geni kodiraju cijeli niz različitih proizvoda nazvanih nodulini koji mogu imati i strukturnu i metaboličku funkciju. Noduline nikada ne nalazimo kod slobodno živućih bakterija, samih bakteroida ili u korijenovom sustavu leguminoza kod kojeg nije došlo do infekcije bakterijama. S obzirom da nodulini jedino nastaju kao rezultat ekspresije nodulacijskih gena koji su aktivirani Nod faktorima bakterija, očito je kako je njihova prisutnost neophodna za stvaranje simbiotskog odnosa između bakterija i leguminoza.

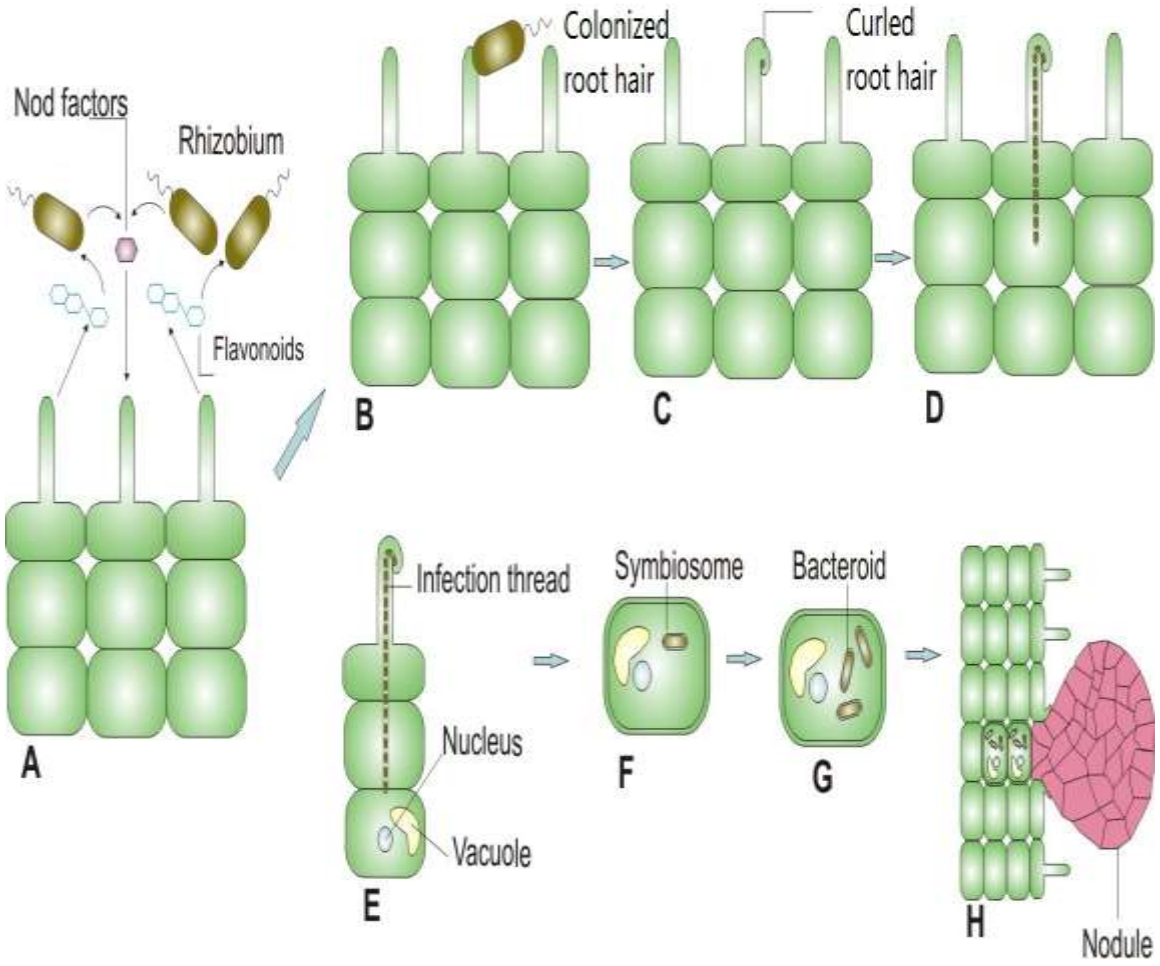
Kada se bakterije pričvrste na korijen, odnosno na vrh korjenovih dlačica, dolazi do uvijanja njihovih vrhova, te na taj način bakterijske stanice ostaju zarobljene u tom dijelu (Mylona i sur., 1995.). Na tom mjestu dolazi do razgradnje stanične stjenke biljne stanice (Callaham i Torrey, 1981.; Van Spronsen i sur., 1994.), te dolazi do uvijanja plazma membrane i nakupljanja i ugradnje novih materijala u membranu (Bauer, 1981.; Newcomb, 1981.; Brewin, 1991.; Kijne, 1992.). Ovo rezultira formiranjem potpuno nove strukture, tako zvane infekcijske niti, pomoću koje bakterije ulaze u biljku (Mylona i sur., 1995.). Infekcijsku nit ne stvaraju bakterije nego stanice korijena leguminoza kao reakciju na infekciju bakterijama. Infekcijska nit se prvo razvija i širi kroz stanice korijenovih dlačica nakon čega prodire u druge stanice korijena gdje se počinje granati u svim smjerovima. U stanicama

korijena, koje se nalaze ispred rastuće infekcijske niti, dolazi do promjena kao što su pregrađivanje citoskeleta, premještanje jezgre i stvaranje citoplazmatskih mostova što dovodi rezultira stvaranjem tako zvane preinfekcijske niti (Van Brussel i sur., 1992.). Širenjem i grananjem infekcijske niti koja sadrži bakterije dolazi do širenja infekcije kroz tkiva korijena. Bakterije unutar infekcijske niti se intenzivno dijele i neprestano stvaraju Nod faktore. Ti Nod faktori potiču diobu stanica unutar korijena te na taj način dolazi do stvaranja novih struktura, kvržica ili nodula, na korijenovom sustavu leguminoza. Bakterije iz infekcijske niti se otpuštaju u citoplazmu biljne stanice gdje se odmah okružuju peribakteroidnom membranom koju stvara biljna stanica (Mylona i sur., 1995.). Bakterije se dalje intenzivno dijele te se transformiraju u bakteroide, oblik koji ima sposobnost fiksacije atmosferskog dušika (Oke i Long, 1999.). Bakteroidi zajedno s peribakteroidnom membranom koja ih okružuje se nazivaju simbiosomi (Mylona i sur., 1995.).

5.2. NODULACIJA

Nodulacija je vrlo složen proces stvaranja kvržica ili nodula na korijenovom sustavu leguminoza. Nodulacija je inicirana infekcijom bakterija koje stvaraju Nod faktore koji imaju osnovnu ulogu u procesu stvaranja kvržica. Biljna percepcija bakterijskih Nod faktora uzrokuje rapidne reakcije stanica pojedinih tkiva u unutrašnjosti korijena. Nekoliko tipova stanica i tkiva moraju sinkronizirati svoj razvoj kako bi došlo do organogeneze kvržica ili nodula (Ferguson i sur., 2010.).

Razvoj samih nodula započinje kada bakterije u infekcijskoj niti stvaraju Nod faktore te se na taj način povećava njihova koncentracija (Slika 5.). Visoka koncentracija Nod faktora dovodi do mitozne aktivacije, odnosno iniciranja diobe stanica korteksa korijena. To rezultira stvaranjem primordijalnih nodula (Ferguson i sur., 2010.). U stanicama primordijalnih nodula dolazi do aktivacije a potom i ekspresije nekoliko nodulin gena koji rezultiraju stvaranjem razlika između tkiva primordijalnih nodula i ostalog meristemskog tkiva korijena biljke (Mylona i sur., 1995.). Infekcijske niti rastu kroz tkivo korijena, te kada dođu do primordijalnih nodula se počinju granati na male ogranke. Iz tih ogranak se u stanice primordijalnih nodula otpuštaju bakterije koje se okružuju peribakteroidnom membranom koju je stvorila biljka stvarajući pri tome simbiosom. Unutar stanica primordijalnih nodula bakterije se intenzivno dijele te se transformiraju u bakteroide koje imaju sposobnost fiksacije dušika. Primordijalne nodule se odmah zatim razviju u zrele nodule (Mylona i sur., 1995.).



Slika 5. Pojedine faze stvaranja korijenovih kvržica
(Izvor: www.uit.no/Content/210257/Figure%201_John%20Beck%20Jensen.jpg)

Razlikujemo dva morfološka tipa nodula kod leguminoza, determinirane i nedeterminirane nodule. Tip nodula koji će nastati određuje biljka domaćin (Ferguson i sur., 2010.). Razlike između ova dva tipa nodula su u pogledu prve unutrašnje diobe stanica, zadržavanje meristemske regije te formacije zrele nodule (Newcomb i sur., 1979.; Gresshoff i Delves, 1986.; Rolf i Gresshoff, 1988.). Kod nedeterminiranih nodula, prva dioba stanica se odvija u unutrašnjosti mezoderme nakon čega slijedi dioba stanica u endodermu i periciklu, sadrže mnogo trajnog meristema te zrele nodule imaju više cilindričan oblik unutar kojeg je vidljiv očit razvojni gradijent. Za razliku od toga, kod determiniranih nodula prva dioba stanica se odvija odmah ispod epiderme u vanjskom dijelu mezoderme, ne sadrže trajni meristem i zrele nodule su više okruglastog oblika unutar kojih nema vidljivog razvojnog gradijenta jer su sve stanice u određenom trenutku manje ili više u istoj fazi razvoja.

5.2.1. Karakteristike kvržica

Proces nodulacije završava stvaranjem kvržica na korijenovom sustavu leguminoza unutar kojih se odvija proces fiksacije atmosferskog dušika. Na poljima, male nodule postaju vidljive 2-3 tjedna nakon sadnje, ovisno o vrsti leguminoze i uvjeta za klijanje i nicanje (Lindemann i Glover, 2003.). Na početku razvoja, nodule su sitne, iznutra bijele do sive boje što upućuje na činjenicu da fiksacija dušika još nije započela. S vremenom, nodule postaju sve krupnije a iznutra mijenjaju boju u ružičastu ili crvenu te je to pouzdan znak da je fiksacija dušika započela.

Općenito, leguminoze možemo podijeliti na jednogodišnje i višegodišnje vrste, pa zbog toga postoje razlike između nodula na jednogodišnjim i višegodišnjim leguminozama. Kvržice na višegodišnjim leguminozama manjih su dimenzija, nepravilnog oblika, većinom smještene na glavnom korijenu biljke. Nodule višegodišnjih leguminoza su dugo živuće i fiksirat će dušik tokom cijele sezone rasta, sve dok su uvjeti za to povoljni (Lindemann i Glover, 2003.). Za razliku od toga, kvržice na jednogodišnjim leguminozama su većih dimenzija, okruglog oblika, raspoređene po cijelom korijenu biljke. Nodule jednogodišnjih leguminoza su kratko živuće tako da će se neprestano izmjenjivati tijekom cijele sezone rasta (Lindemann i Glover, 2003.).

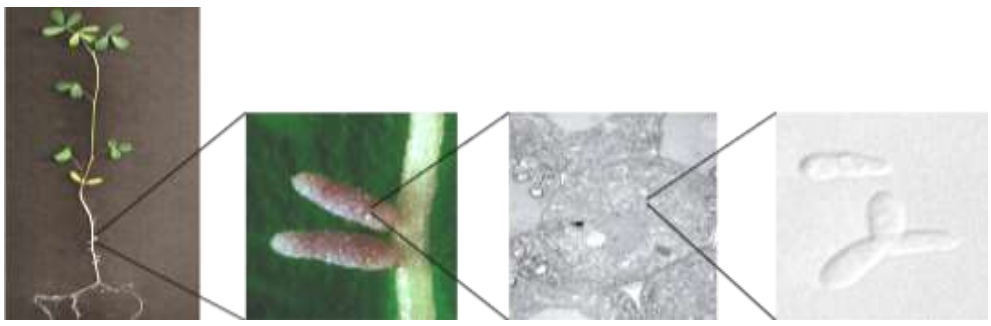
Nodule leguminoza koje više ne fiksiraju atmosferski dušik, postepeno mijenjaju boju u zelenkastu nakon čega čak mogu biti odbačene od biljke. U sredini sezone rasta na korijenu leguminoze trebale bi dominirati nodule ružičaste ili crvene boje. No ako dominiraju bijele, sive ili zelene nodule, fiksacija dušika je slaba što može biti rezultat infekcije i nodulacije s neučinkovitim *Rhizobium* sojem, nedovoljne ishrane biljke, razvoja mahune ili nekog drugog uzroka stresa biljke (Lindemann i Glover, 2003.).

Kod zrelih kvržica od osnovne važnosti je njihova građa jer je upravo ona odgovorna za osiguravanje točno određenih uvjeta koji omogućuju nesmetano odvijanje procesa fiksacije elementarnog, molekularnog dušika. Kod leguminoza, u svakoj zreloj noduli nalazi se peribakteroidna membrana stvorena od strane biljke koja okružuje unutarstaničnog mikrosimbionta, odnosno bakteroide koji u stanicama nodula fiksiraju atmosferski dušik. Ova membrana nastaje od plazma membrane domaćina odnosno biljke leguminoze. Peribakteroidna membrana nodula leguminoza sadrži fosfolipide i proteine organizirane drugačije nego kod plazma membrane (Perotto i sur., 1995.; Verma, 1992.), uz to mogu i sadržavat različite noduline biljaka i proteine bakterija (Fortin i sur., 1985.; Miao i sur., 1992.), te se pretpostavlja da im upravo to omogućuje neka nova specijalizirana svojstva i funkcije (Mylona i sur., 1995.).

U nodulama peribakteroidne membrane imaju višestruku ulogu i one su odgovorne za stvaranje uvjeta koji su potrebni za odvijanje procesa fiksacije dušika. Peribakteroidne membrane stvaraju granicu ali i poveznicu između simbiotskih partnera preko koje se izmjenjuju signali i metaboliti, te sprečavaju obrambenu reakciju biljke na unutarstanične bakterije (Nap i Bisseling, 1990.; Verma, 1992.; Werner, 1992.).

Peribaketroidne membrane sudjeluju u stvaranju anaerobnih uvjeta odnosno uvjeta bez prisutnosti kisika u unutrašnjosti nodula koji su neophodni za proces fiksacije dušika. Naime, enzim nitrogenaza koji je ključan u ovom procesu je izuzetno osjetljiv na kisik jer se u njegovoj prisutnosti ireverzibilno inaktivira. Peribakteroidne membrane također sudjeluju u sprečavanju nastanka obrambenih reakcija domaćina biljke leguminoze na prisutnost bakterija u stanicama nodula na korijenovom sustavu. Upravo je na taj način ovaj simbiozni odnos uopće moguć.

Kod procesa simbiotske fiksacije dušika, obzirom da se radi o simbiotskom odnosu između biljaka i bakterija (Slika 6.), biljke opskrbljuju bakterije potrebnim ugljikom i energijom, dok za uzvrat bakterije predaju biljci proizvod fiksacije dušika, reducirani dušik najčešće u obliku amonijaka. Zbog toga što peribakteroidne membrane čine granicu ali i vezu između bakteroida i biljke domaćina, imaju vrlo važnu ulogu u kontroli izmjene metabolita (Mylona i sur., 1995.). Biljke u procesima fotosinteze stvaraju ugljikohidrate, točnije glukozu koja se u obliku saharoze zajedno s dikarboksilnim kiselinama transportira u nodule korijena. Ovi organski spojevi predstavljaju izvor ugljika i energije bakteroidima u nodulama potrebni za proces fiksacije dušika. S druge strane, amonijak koji je proizvod fiksacije dušika se transportira iz nodula u biljku te na taj način postaje na raspolaganju biljci da ga iskoristi za svoje potrebe.

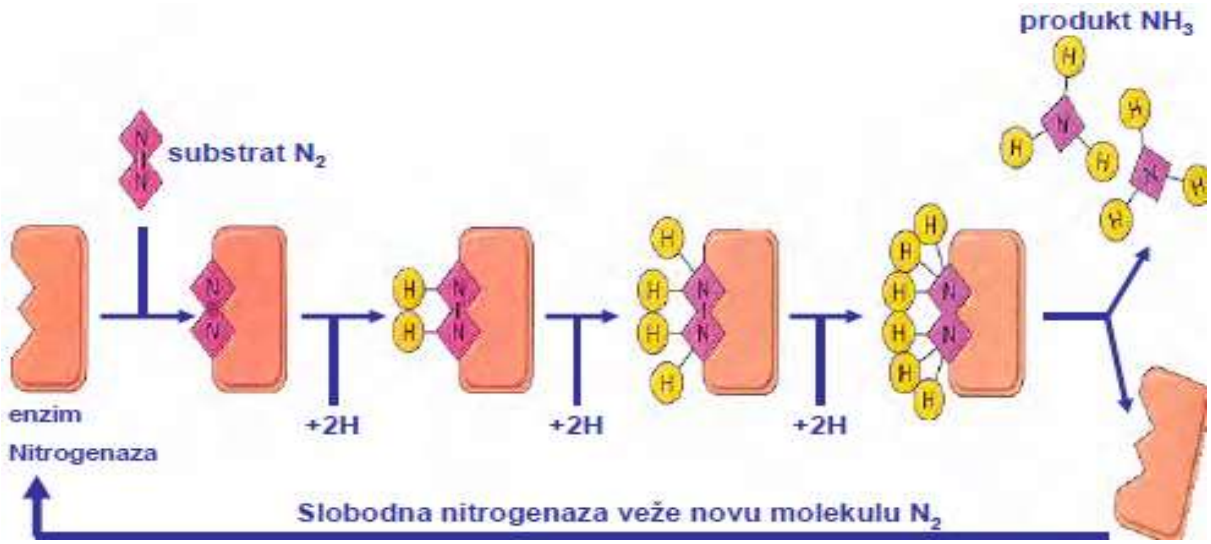


Slika 6. Korijenove kvržice u kojima se nalaze bakteroidi sa sposobnošću fiksacije dušika (Izvor: www.nature.berkeley.edu/tagalab/research.html)

6. KEMIZAM SIMBIOTSKE FIKSACIJE ATMOSFERSKOG DUŠIKA

Atmosfera sadrži čak 78,1% dušika u obliku N_2 (Vukadinović i Lončarić, 1997.). No sav taj dušik je nedostupan biljkama jer ga biljke mogu usvajati u samo dva oblika: nitratni i amonijačni oblik. Molekula dušika je vrlo stabilna zbog toga što su dva atoma dušika međusobno povezana u molekulu jakom trostrukom kemijskom vezom. Upravo zbog toga, ova će se molekula vrlo teško razdvojiti na atome koji bi onda mogli reagirali s drugim kemijskim elementima tvoreći nove spojeve. Simbioza između većine vrsta biljaka iz porodice *Leguminosae* i bakterija iz rodova *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* omogućuje upravo to da se plinoviti dušik N_2 iz atmosfere prevede u oblik koji je dostupan biljkama. Proces simbiotske fiksacije dušika N_2 iz atmosfere odvija se u specijaliziranim bakterijskim stanicama bakteroidima smještenim unutar kvržica ili nodula na korijenu leguminoza (Mylona i sur., 1995.). U tom se procesu elementarni molekularni dušik iz atmosfere prevodi u amonijak.

Proces simbiotske fiksacije atmosferskog dušika možemo prikazat sljedećom reakcijom: $N_2 + 8H+ + 8e^- + 16Mg\text{-}ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16Mg\text{-}ADP + 16Pi$ (Mylona i sur., 1995.). Iz ove reakcije je vidljivo je kako se molekula dušika N_2 razdvaja na dva atoma dušika od kojih se svaki povezuje s tri vodikova iona H^+ što na kraju rezultira stvaranjem dvije molekule amonijaka NH_3 uz stvaranje molekule vodika H_2 (Slika 7.). Ova reakcija zahtjeva unos kemijske energije kako bi se prevladala energetska aktivacijska barijera koja se dobiva hidrolizom 16 ekvivalenata ATP-a.



Slika 7. Proces simbiotske fiksacije atmosferskog dušika
(Izvor: www.agr.unizg.hr/cro/nastava/moduli/doc/26500_12_tlo_fiksacija_dusika.pdf)

Reakciju simbiozne fiksacije dušika katalizira enzim nitrogenaza (Mylona i sur., 1995.). Nitrogenaza je jedini do sada poznati enzimski kompleks koji može katalizirati ovu reakciju. Svi organizmi koji imaju sposobnost fiksacije atmosferskog dušika stvaraju ovaj enzim. U simbiozi između bakterija i leguminoza, ovaj enzim će se stvarati samo unutar specijaliziranih stanica bakteroida jer jedino oni imaju sposobnost njegove proizvodnje.

Nitrogenaza je enzimski kompleks sastavljen od dvije komponente. Jedna komponenta je Fe-Mo protein nazvana dinitrogenaza. On ima strukturu $\alpha_2\beta_2$ heterotetramera, što znači daje sastavljen od četiri podjedinice, dvije α i dvije β, koje se međusobno razlikuju. Uz to, on sadrži molidben i željezo. Komponenta Fe-Mo protein predstavlja katalitičko mjesto vezanja i redukcije molekule dušika N_2. Druga komponenta je Fe-protein nazvan dinitrogenaza reduktaza. On ima strukturu homodimera jer je sastavljen od dvije jednake podjedinice, te sadrži samo željezo. Komponenta Fe-protein predstavlja mjesto za specifično vezanje Mg-ATP-a. Proces simbiozne fiksacije dušika, odnosno reakcija redukcije molekularnog dušika N_2 do amonijaka NH_3 moguća je samo onda kada su prisutne obje komponente nitrogenaze enzimskog kompleksa (Perić i Trifunović, 2007.).

U ovoj reakciji, nitrogenaza pojedinačnim prijenosom elektrona s Fe proteina na Fe-Mo protein stvara redukcijski potencijal koji je dovoljan za cijepanje samo jednog dijela trostruke kemijske veze kojom su atomi dušika međusobno povezani u molekulu. Kada se atomi dušika u potpunosti razdvoje nitrogenaza spaja svaki dušikov atom s tri iona vodika pri čemu na kraju nastaje amonijak.

Za ovu reakciju potreban je unos kemijske energije koji se dobiva iz ekvivalenta ATP-a, na način da nitrogenaza hidrolizira dvije molekule Mg- ATP-a za svaki elektron koji se prenosi s Fe proteina na Fe-Mo protein. Uz to, u ovoj se reakciji katalitičkim djelovanjem nitrogenaze uvijek proizvodi vodik tako da redukcija jedne molekule N_2 rezultira nastajanjem jedne molekula H_2 (Perić i Trifunović, 2007.).

Važno je napomenuti kako se reakcija redukcije molekularnog dušika do amonijaka uvijek odvija u anaerobnim uvjetima odnosno uvjetima bez prisutnosti kisika. Razlog tome je ta da je nitrogenaza vrlo osjetljiva na kisik zbog toga što se jedna njegova komponenta MoFe kofaktor u prisutnosti kisika ireverzibilno denaturira (Shaw i Brill, 1977.). Kako bi se spriječila ireverzibilna inaktivacija nitrogenaze enzimskog kompleksa kisikom u kvržicama ili nodulama je prisutan leghemoglobin koji omogućuje kontrolu razine kisika. Leghemoglobin je protein koji sadrži željezo i daje ružičastu ili crvenu boju unutrašnjosti nodula. Njegova je

funkcija zapravo vrlo slična hemoglobinu, a to je da na sebe veže kisik. Na taj način se osigurava dovoljna količina kisika za metaboličke funkcije bakteroida ali se istovremeno sprečava nakupljanje slobodnog kisika koji bi mogao inaktivirati nitrogenazu enzimski kompleks. Leghemoglobin nastaje kao rezultat simbiotskih odnosa i interakcija između bakterija i biljaka jer ni jedna od njih nije ga u mogućnosti proizvesti sama.

Proizvod procesa simbiozne fiksacije dušika je amonijak NH_3 kojeg bakteroidi predaju svom domaćinu, biljci leguminozi. Amonijak se iz bakteroida preko peribaketoidne membrane transportira u stanice nodula leguminoze. U citoplazmi stanica nodula amonijak se pomoću enzima veže na aminokiselinu glutamat kako bi se dobila aminokiselina glutamin. Nakon toga glutamin se metabolizira u transportne oblike dušika. U ovom metabolizmu ključnu ulogu imaju proizvodi nekoliko kasnijih nodulin gena (Mylona i sur., 1995.). Transportni oblik dušika omogućuje da se dušik iz nodula korijena nesmetano dopremi u sve dijelove biljke u kojima je potreban. Transportni oblik dušika u kojem će se dušik i transportirati ovisi o samoj biljci: leguminoze umjerenog klimatskog pojasa koje u većini slučajeva formiraju nedeterminirane nodule izvoze amide, dok leguminoze tropskog klimatskog pojasa koje najčešće formiraju determinirane nodule izvoze derivate uree (Mylona i sur., 1995.).

Ovaj simbiotski odnos između određenih vrsta biljka i bakterija omogućuje odvijanje procesa simbiotske fiksacije dušika u kojem se atmosferski molekularni dušik N_2 prevede u amonijak NH_3 kojeg biljke mogu iskoristiti za svoje potrebe. Dušik u biljnim stanicama ima vrlo raznoliku ulogu te se on ugrađuje kao sastavna komponenta u mnoge genetske, strukturne i metaboličke spojeve.

7. EKOLOŠKA POLJOPRIVREDNA PROIZVODNJA

Osnovna karakteristika klasične, konvencionalne poljoprivredne proizvodnje je postizanje visokih prinosa po jedinici poljoprivredne površine. Kako bi se to postiglo, u konvencionalnoj poljoprivredi koriste se vrlo visoki inputi koji se odnose na prekomjerno i neracionalno trošenje neobnovljivih prirodnih resursa i energije, te upotreba ogromnih količina različitih agrokemikalija. Ovakve mjere dovele su do iscrpljivanja neobnovljivih prirodnih resursa i ozbiljnih i opasnih ekoloških problema što na kraju rezultira ostavljanjem trajnih štetnih posljedica na cjelokupnu prirodu i prirodne procese, remeteći tako milijardama godina uspostavljanu ravnotežu u prirodi. Negativne posljedice koje su uzrokovane konvencionalnom poljoprivrednom proizvodnjom su mnogostruke, te se prvenstveno odnose na prekomjerno korištenje neobnovljivih prirodnih resursa i energije, onečišćenje i degradaciju tla, vode i zraka, te smanjenje biološke raznolikosti.

Tlo je jedan od najznačajnijih ali i najugroženijih svjetskih prirodnih resursa. Ono se smatra neobnovljivim prirodnim resursom zato što je proces stvaranja odnosno nastanka tla izuzetno dugotrajan, a posljedice onečišćenje i degradacija tla ponekad su ireverzibilne, odnosno narušene osobine tla nikada se ne mogu u potpunosti vratiti tlo u prvobitno stanje. Degradacija fizikalnih osobina tla uzrokovana agrotehničkim zahvatima koji dovode do kvarenja strukture tla, zbijanja tla, erozije tla, te kvarenje vodo-zračnih odnosa. Degradacija kemijskih osobina tla koje su rezultat dugotrajne i prekomjerne primjene agrokemikalija koje dovode do pada sadržaja organske tvari i humusa, onečišćavanje tla pesticidima i njihovim reziduama, onečišćenje tla nakupljanjem teških metala, te zakiseljavanje tla i zaslanjivanje tla. Degradacija bioloških osobina tla što dovodi do narušavanja života mikroorganizama u tlu koji su neophodni za prerađivanje organske tvari tla u posebne humusne tvari, te mineralizacija humusnih tvari u mineralne biljne asimilate što omogućuje kruženje tvari i energije u ekosustavu.

Voda se također smatra neobnovljivim prirodnim resursom i najveći problemi konvencionalne poljoprivrede odnose se na njezino prekomjerno iskorištavanje i zagađenje. Ljudi trenutačno koriste 40-50% globalno dostupne slatke vode u približnom omjeru od 70% za poljoprivredu, 22% za industriju i 8% za domaćinske svrhe, a ukupan volumen progresivno raste (Shiklamov, 1998.). Konvencionalna poljoprivreda vodu onečišćuje upotrebom mineralnih gnojiva, nitratima, nitritima, fosfatima, teškim metalima, ali pesticidima i njihovim reziduama koji se iz tla ispiru u vodu. Zbog onečišćenja osim što se smanjuje količina

dostupne čiste vode, dolazi i do eutrofikacije vodenih ekosustava koji uzrokuju poremećaje bioloških procesa, te se time uništava flora i fauna vodenih ekosustava.

Konvencionalna poljoprivredna proizvodnja dovodi i do onečišćavanja zraka odnosno atmosfere. Onečišćenje zraka se definira kao prisutnost u jedne ili više tvari u atmosferi koje su u količinama koje jesu ili mogu biti štetne za ljudsko zdravlje i dobrobiti, te za biljni i životinjski svijet. Konvencionalna poljoprivreda nekim svojim agrotehničkim mjerama uzrokuje otpuštanje različitih plinova u atmosferu gdje se povećava njihova koncentracija te dovodi do klimatskih promjena odnosno globalnog zatopljenja koji svakako ima utjecaj na cjelokupan okoliš.

Osim onečišćenja i degradacije neobnovljivih prirodnih izvora kao što su tlo, voda i zrak, konvencionalna poljoprivredna proizvodnja troši ogromne količine fosilnih goriva koja se koriste za proizvodnju raznih agrokemikalija koja se primjenjuju kao što su umjetna gnojiva i pesticidi te gorivo za rad poljoprivrednih mehanizacije odnosno strojeva. Konvencionalna poljoprivreda upravo zbog toga ima negativnu energetsku bilancu koja je posljedica većeg utroška energije u usporedbi s njezinom proizvodnjom. Takva negativna energetska bilanca biti će u budućnosti zasigurno najveći limitirajući faktor konvencionalne poljoprivredne proizvodnje.

Sve prisutnije posljedice i problemi uzrokovani klasičnom konvencionalnom poljoprivrednom proizvodnjom potaknuli su razvoj i širenje ekološke poljoprivredne proizvodnje. Ekološka poljoprivredna proizvodnja postaje nužnost želimo li Zemlju sačuvati za buduće naraštaje. Ekološka poljoprivreda podrazumijeva kompletan i kompleksan odnos čovjeka prema okolišu i prirodi. Pri tome, nije riječ samo o proizvodnji kvalitetnih prehrambenih namirnica, nego i o kvalitetnom odnosu prema tlu, vodi, atmosferi, biljkama, životinjama i ljudima kao sastavnom dijelu sredine u kojoj žive. Osnovni cilj ekološke poljoprivrede je proizvodnja visokokvalitetnih prehrambenih proizvoda ali na način da pri tome ne uzrokuje negativne posljedice za okoliš već da potiče očuvanje prirode. Stoga za ekološku poljoprivredu možemo reći da je to sustav poljoprivredne proizvodnje koji nastoji maksimalno iskoristiti potencijale određenog ekosustava odnosno gospodarstva, stimulirajući, jačajući i harmonizirajući biološke procese pojedinih njegovih dijelova (Znaor, 1996.). Ekološka poljoprivreda temelji se na nekoliko osnovnih načela koja stvaraju spone za novi, drukčiji odnos čovjeka i prirode. Jedno od osnovnih načela je očuvanje prirode na način da je poljoprivredna proizvodnja temeljena na suradnji s prirodom koja se postiže razvijanjem

razumijevanja za prirodu, njenih ritmova i zakona. Ekološka poljoprivreda teži mninimaliziranju utroška neobnovljivih prirodnih resursa i energije te isključuje ili samo iznimno dopušta upotrebu agrokemikalija kao što su umjetna gnojiva i kemijska sredstva za zaštitu bilja. Nadalje, sljedeće vrlo važno načelo ekološke poljoprivrede odnosi se na poljoprivredna tla koje se očituje u brizi za pravilno uzdržavanje tla u smislu očuvanja ali i povećanja njegove plodnosti, sadržaja hraniva, organske tvari i biološke aktivnosti, te poboljšanje strukture tla. Odgovarajuća briga o poljoprivrednim tlima postiže se harmoniziranjem i pravilnim gospodarenjem glede gnojidbe, obrade tla te uvođenjem plodoreda u koje je izuzetno važno uključiti leguminozne usjeve.

8. PRIMJENA I ZNAČAJ SIMBIOTSKE FIKSACIJE DUŠIKA U EKOLOŠKOJ POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI

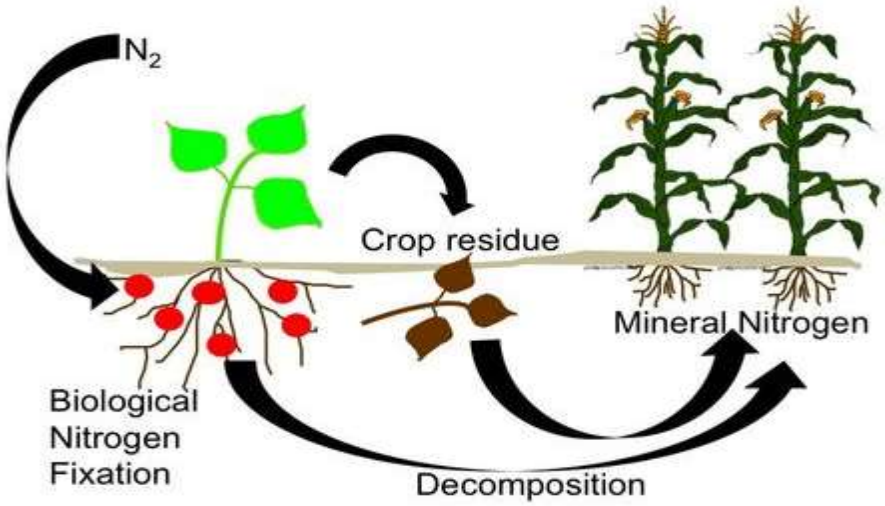
Za ekološku poljoprivrednu proizvodnju najznačajniji je simbiozni odnos između biljaka iz porodice *Leguminosae* i bakterija iz rodova *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* koji omogućuje stvaranje korijenovih kvržica ili nodula u kojima se odvija proces fiksacije atmosferskog dušika. Ovaj proces omogućuje pretvorbu biljkama nedostupnog oblika dušika N_2 u dostupan oblik NH_3 kojeg biljka uključuje u svoj metabolizam te ga na taj način dalje može iskoristit za svoje potrebe. Za poljoprivrednu proizvodnju ovi simbiotski odnosi su od najvećeg značaja jer se pomoću njih fiksira i najveća količina dušika iz atmosfere. Sjetva leguminoznih usjeva ima mnogostruke povoljne učinke za poljoprivredna tla.

Za početak, na taj način poljoprivredno tlo obogaćuje dušikom koji je jedan od osnovnih biljnih hranjiva neophodan biljkama za pravilan rast i razvoj pa tako i za ostvarivanje optimalnih prinosa. Osim toga, uzgojem leguminoza tlo se obogaćuje organskom tvari koja ima višestruke pozitivne učinke na poboljšavanje i održanje povoljnih svojstva tla kao što su: fizikalna svojstva tla koja se odnose na strukturu tla, vodozračne odnose u tlu, sposobnost tla za zadržavanje vode te smanjene mogućnosti gubitka tla erozijom uzrokovane vodom i vjetrom. Potom, kemijska svojstva tla koja se odnose na sadržaj organske tvari i humusa te pojedinih biljnih ranjiva, te biološka svojstva tla koja se očituju u brojnosti i aktivnost mikroorganizama tla koji su neophodni za odvijanje procesa kruženja tvari i energije u prirodi. Sva ova svojstva određuju plodnost tla, a plodno tlo je osnova i temelj svake poljoprivredne proizvodnje. Upravo iz tog razloga se preporuča da različiti leguminozni usjevi postanu neizostavni prilikom kreiranja svakog dobrog plodoreda.

Općenito, plodored predstavlja pravilnu prostornu i vremensku izmjenu usjeva na poljoprivrednoj proizvodnoj površini. Osnovni elementi plodoreda su: plodosmjena ili vremenska izmjena usjeva i poljosmjena ili prostorna izmjena usjeva. Osnovni cilj plodoreda na poljoprivrednim proizvodnim površinama je zamjena biološke ravnoteže spontane biocenoze odnosno fitocenoze. Uvođenja širokog plodoreda koji se odnosi na prostornu i vremensku izmjenu velikog broja raznolikih poljoprivrednih kultura odnosno usjeva, ima mnogostruke prednosti za poljoprivredna tla. Na taj se način poboljšavaju njegova fizikalna, kemijska i biološka svojstva, kao što su struktura, plodnost, sadržaj biljnih hraniva, sadržaj humusa i organske tvari, te biološka aktivnost tla.

Svaki dobro organiziran plodored trebao bi sadržavati leguminozne usjeve. Jedinstveno obilježje leguminoznih usjeva je u tome da većina njih stvara simbiotske odnose s

bakterijama iz rodova *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* koji im daje sposobnost fiksacije atmosferskog dušika kojim se na taj način obogaćuje poljoprivredno tlo. Naime, u ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji gnojidba se provodi primjenom različitih vrsta organskih gnojiva od kojih se najčešće upotrebljava stajnjak ili kruti stajski gnoj, gnojovka ili polutekući stajski gnoj i gnojnica odnosno tekući stajski gnoj, dok je upotreba umjetnih gnojiva zabranjena. Osim gnojidbom, tlo se može obogatiti biljnim hranjivima ali organskom tvari sjetvom leguminoznih usjeva. Sjetvom leguminoza poljoprivredno se tlo obogaćuje osnovnim biljnim hranjivom dušikom, ali osim toga i velikim količinama organske tvari koja će se razgradnjom prevesti u humusne tvari koja će postepeno oslobađati biljna hraniva kroz duži vremenski period (Slika 8.). Zbog svega toga, u ekološkoj poljoprivredi je uključivanje leguminoznih usjeva u plodored od osnovne važnosti jer se na taj način tlo obogaćuje dušikom ali i organskom tvari koja pozitivno utječu na dugoročnu plodnost tla i na održavanje i poboljšanje svih njegovih svojstava.



Slika 8. Pogodnosti uključivanja leguminoznih usjeva u plodored
(Izvor: www.extension.org/pages/64401/legume-inoculation-for-organic-farming-systems)

U ekološkoj poljoprivredi se uzgojem leguminoznih usjeva smanjuje količina organskih gnojiva bogatim dušikom koje treba aplicirati. U pravilu same leguminozne usjeve nije potrebno gnojiti izuzev samo manjim količinama na početku njihove vegetacije za početni rast i razvoj sve dok one ne formiraju korijenove kvržice i dok ne počne proces fiksacije dušika. S druge strane leguminozni usjevi nakon svoje vegetacije ostavljaju različite količine dušika u tlu što prvenstveno ovisi o vrsti leguminoze i soju bakterije, a taj će dušik iz tla biljke moći iskoristiti u čak nekoliko sljedećih godina.

Leguminozni usjevi obuhvaćaju velik broj raznolikih vrsta koji se međusobno razlikuju po vremenu sadnje i trajanju njihove vegetacije tako da postoji širok raspon

mogućnosti njihovog uključivanja u svaki plodored. Leguminoze se mogu uključiti u plodored kao predusjev koji se sije prije glavne kulture, kao naknadni usjev koji se sije nakon glavne kulture ili čak kao međuusjev koji se sije između vegetacijskog perioda glavnih kultura. Osim toga, neki leguminozni usjevi se mogu uzgajati i u kombinaciji s glavnim usjevom. U ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji se upravo zbog tako velike raznolikosti leguminoznih usjeva one mogu uključiti u svaki dobro osmišljeni i organizirani plodored.

U današnje vrijeme u svijetu kao posljedica pretjeranog iskorištavanja ili čak iscrpljivanja, mnoga tla su znatno degradirana. Degradacija fizikalnih značajki tla odnose se prvenstveno na kvarenje strukture tla što bi moglo rezultirati trajnim gubicima tla erozijom uzrokovane vodom ili vjetrom. Degradacija kemijskih značajki tla povezana je s upotrebom raznih agrokemikalija kao što su umjetna gnojiva i pesticidi koji uzrokuju kontaminaciju tla, opadanje sadržaja organske tvari i humusa, zakiseljavanje tla, zaslanjivanje tla što sve na kraju dovodi do smanjenja njegove plodnosti. Degradacija bioloških svojstava tla odnosi na smanjnje brojnosti i aktivnosti povoljnih organizama u tlu. Uzgojem leguminoza na ovakvim tlima s degradiranim fizikalnim, kemijskim i biološkom svojstvima može se potaknuti njihova remedijacija. Naime, porodica leguminoza obuhvaća velik broj raznolikih vrsta koje se prema tome mogu uzgajati u vrlo raznolikim uvjetima što se odnosi na različite uvjete u pogledu svojstva tla, klime i slično. Leguminoze koje imaju sposobnost fiksiranja dušika imaju jedinstvenu prednost koja im omogućuje da se prilagode i na najekstremnije uvijete te da na taj način prvi koloniziraju raznolike ekološke niše. Simbiotski mikroorganizmi koji im daju sposobnost fiksiranja dušika, imaju vrlo važnu ulogu u životu ovih biljaka, ne osiguravajući ima samo osnovni element njihove ishrane već i mogućnost obrane od različitih patogena i štetnika te prilagođavanje na raznolike okolišne uzročnike stresa (Franche i sur., 2009.). Zbog ovih svojstava, razne vrste leguminoza se uzgajaju u područjima s degradiranim tlima narušenih značajki kako bi povratili povoljna svojstva tla i njegovu plodnost.

U ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji prilikom uzgoja leguminoznih usjeva, metodom inokulacije možemo povećati učinkovitost procesa simbiotske fiksacije dušika te na taj način povećati i količinu fiksiranog dušika. Primjena inokulacije rezultira kontinuiranim linijskim povećanjem bakterijske infekcije i nodulacije korijenovog sustava leguminoza koji dovode do povećanja procesa fiksacije dušika a s njime i količine fiksiranog dušika što na samom kraju rezultira i povećanjem njihovog prinosa. Nekoliko istraživanja izvijestilo je o povećanju prinosa i do 25%. Inokulacija predstavlja vrlo učinkovitu metodu kojom se efikasni sojevi bakterija uvode u tlo odnosno u rizosferu (Deaker i sur., 2004.). Cilj inokulacije je

osigurati dovoljan broj efikasnih sojeva bakterija koja bi inducirala stvaranje rapidne kolonizacije rizosfere omogućavajući da infekcija i nodulacija započnu čim prije nakon klijanja i nicanja, te na taj način rezultira optimalnim prinosom (Thompson, 1988.; Catroux, 1991.). Potreba za inokulacijom visokim brojem efikasnih bakterija postoji kako bi se na taj način nadmašila kompeticija s populacijama neefikasnih sojeva bakterija u tlu ili kako bi se nadogradila populacija efikasnih bakterija na tlima čiji su uvjeti limitirali njihov opstanak (Deaker i sur., 2004.).

Počeci razvoja metode inokulacije vezani su s otkrićima da se proces fiksacije dušika odvija u korjenovim kvržicama ili nodulama koje nastaju kao rezultat simbioznih odnosa između bakterija i biljaka leguminoza. Znanstvenici su nakon toga prepoznali mnogo više specifičnu vezu između određenih sojeva bakterija i određenih vrsta leguminoza odnosno njihovih domaćina u kontekstima infektivnosti (mogućnosti infekcije i noduliranja) i efektivnosti (sposobnosti fiksiranja atmosferskog N_2) (Deaker i sur., 2004.). Daljnja istraživanja su se prvenstveno odnosila na otkrivanje i izoliranje efikasnih sojeva bakterija koji bi stvarali simbiotske odnose sa specifičnim domaćinom odnosno točno određenom vrstom leguminoze. Uz to, istraživanja su se također odnosila na razvoj različitih oblika inokulanata i metoda njihove primjene. Obzirom da učinkovitost inokulacije ovisi o nekoliko različitih faktora koji imaju utjecaj na održanje broja bakterija u inokulantu koji su onda na raspolaganju za infekciju i nodulaciju korijena leguminoza, u budućnosti biti će potrebna daljnja istraživanja koja bi povećala stopu preživljavanja bakterija u inokulantu i time još više povisila učinkovitost inokulacije a s time i prinos leguminoza. U nekim državama su uspostavljene službe za kontrolu inokulanata koje su poduprte zakonima i propisima. Mnogobrojna poboljšanja samih inokulanata osigurala su optimiziranje i održavanje njihove kvalitete. No zbog manjka kontrole postupka inokulacije, unatoč uvijek prisutnim preporukama proizvođača koje se odnose na čuvanje i aplikaciju inokulanata, visoki potencijali proizvoda visoke kvalitete nisu uvijek postignuti (Deaker i sur., 2004.).

Postoji nekoliko različitih tehnika inokulacije kao što su inokulacija tla ili inokulacija samog sjemena. Inokulacija sjemena može se provoditi komercijalno nakon čega se takvo predinokulirano sjeme može skladištiti kroz duži vremenski period sve do njegove prodaje. Inokulaciju sjemena također mogu provoditi trgovci sjemena nakon čega bi se to sjeme moralo posijati u razdoblju od tjedan dana. Nadalje inokulaciju sjemena mogu provoditi sami poljoprivrednici neposredno prije sjetve. Osim inokulacije sjemena, alternativne metode inokulacije uključuju direktnu inokulaciju tla koristeći tresetne inokulante suspendirane u

vodi ili inokulante formirane kao tekućina ili granule. Direktnom inokulacijom postelje u koju se ulaže sjeme za vrijeme sjetve koristeći tekuće ili granulirane inokulante izbjegava se oštećivanje krhkih omota oko sjemena te se također smanjuje mogućnost gubitka bakterija za vrijeme prolaska sjemena kroz uređaje za ulaganje sjemena u tlo ili kada se omot sjemena diže iznad zemlje tijekom klijanja i nicanja (Deaker i sur., 2004.). Svaka od ovih tehnika inokulacije ima svoje prednosti i nedostatke tako da će odabir najpovoljnije tehnike prvenstveno ovisiti o individualnoj praksi, dostupnoj opremi, te vrsti leguminoza odnosno o veličini njihova sjemena. U Republici Hrvatskoj je uobičajena inokulacija sjemena neposredno pred sjetvu.

Na Hrvatskom tržištu danas je prisutno nekoliko različitih inokulanata koji se koriste za inokulaciju različitih vrsta leguminoznih usjeva. Nitrobakterin^{S} je novi inokulant koji se koristi za predsjetvenu inokulaciju sjemena soje. Soja živi u obostranom korisnom odnosu s kvržičnom bakterijom *Bradyrhizobium japonicum.* Ove se bakterije mogu naći u tlu, ali najčešće ne u dovoljno velikom broju kako bi došlo do dobre infekcije i nodulacije koja bi rezultirala učinkovitom fiksacijom molekularnog elementarnog dušika iz atmosfere. Upravo zbog toga preporuča se inokulacija sjemena soje inokulantima koji sadrže visokoučinkovite sojeve ovih bakterija, kao što je inokulant Nitrobakterin^{S} (Slika 9.). Nitrobakterin^{S} nastao je kao rezultat dugogodišnjih laboratorijskih i poljskih istraživanja koje je provodio istraživački tim Katedre za mikrobiologiju i zemljišne resurse Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku pod vodstvom prof.dr.sc. Zlate Milaković uz sufinanciranje Upravnog odjela za poljoprivredu i gospodarstvo Osječko-baranjske županije. Nitrobakterin^{S} je ekološki proizvod koji sadrži do 10 milijardi više različitih visokoučinkovitih sojeva živih kvržičnih bakterija po gramu sterilnog treseta. Primjenom ovog inokulanta prilikom uzgoja soje povećava se brojnost odgovarajućih bakterija čime se povećava učinkovitost bakterijske infekcije korjenovog sustava soje, nodulacija odnosno stvaranje korijenovih kvržica i nodula te na kraju i učinkovitost procesa simbiozne fiksacije atmosferskog dušika. Na taj način pozitivno se utječe na rast i razvoj soje što će rezultirati povećanjem kvantitete i kvalitete prinosa njenog prinosa. Nadalje, primjenom ovog inokulanta tijekom uzgoja soje povećava se biološka aktivnost tla, a nakon samog uzgoja soje tlo je značajno obogaćeno organskom tvari i dušikom. Iz ovog primjera vidljivo je kako prilikom uzgoja različitih leguminoznih usjeva primjena inokulanata ima mnogobrojne i ekonomske i ekološke prednosti te bi upravo zbog toga trebala postati uobičajena mjera prilikom uzgoja leguminoza.



Slika 9. Nitrobakterin^{S} pakiranje
(Izvor: www.tloznanstvo.com.hr/nitrobakterin.html)

9. ZAKLJUČAK

Klasična odnosno konvencionalna poljoprivredna proizvodnja je najzastupljeniji tip poljoprivredne proizvodnje u svijetu. U konvencionalnoj poljoprivredi osnovni cilj je ostvarivanje visokih prinosa po jedinici površine, a kako bi se oni postigli koriste se raznolike mjere koje su s vremenom uzrokovale cijeli niz negativnih posljedica, kako za samog čovjeka tako i za okoliš u koljem živi. Konvencionalna poljoprivreda dovela je do iscrpljivanja neobnovljivih prirodnih resursa, degradacije pojedinih prirodnih bogatstva te onečišćenja cjelokupnog okoliša. Sve ovo, bili su osnovani razlozi koji su potakli razvoj posve novih tipova poljoprivrednih proizvodnja, a jedan od njih je i ekološka poljoprivredna proizvodnja. Ekološka poljoprivredna proizvodnja temelji se nekoliko osnovnih načela kojima se nastoji minimalizirati negativan utjecaj poljoprivredne proizvodnje na okoliš te potaknuti njegovo očuvanje.

U ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji iznimnu važnost imaju raznolike biljke iz porodice *Leguminosae* koje imaju sposobnost stvaranja simbioznih odnosa s kvržičnim bakterijama iz rodova *Rhizobium* i *Bradyrhizobium*. Ovi specifični simbiozni odnosi započinju međusobnim prepoznavanjem biljaka i bakterija nakon čega slijedi bakterijska infekcija korijenovog sustava biljke što na kraju rezultira nodulacijom odnosno formiranjem korijenovih kvržica. Upravo u tim kvržicama odvija se proces fiksacije dušika iz atmosfere, u kojem se uz prisustvo enzima nitrogenaze molekularni dušik prevodi u amonijak. Na taj način, ovaj je proces omogućio pretvorbu dušika iz biljkama nedostupnog oblika u dostupan oblik tako da ga sad biljka može uključiti u svoj metabolizam i iskoristit za svoje potrebe.

U ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji uzgoj leguminoznih usjeva ima mnogostruke pozitivne učinke, koji se prvenstveno odnose na obogaćivanje poljoprivrednih tala osnovnim biljnim hranivom dušikom i organskom tvari, te se na taj način potiče poboljšavanje i održavanje povoljnih fizikalnih kemijskih i bioloških svojstva tla koja direktno utječu na plodnost tla. Plodnost tla je od osnovne važnosti prilikom uzgoja svih poljoprivrednih kultura jer omogućuje biljkama pravilan rast i razvoj koje će rezultirati optimalnim prinosima.

10. POPIS LITERATURE:

1. Bauer W. D. (1981): lnfection of legumes by rhizobia. Annu. Rev. Plant Physiol. 32, 407-449.

2. Brewin N. J. (1991): Development of the legume root nodule. Annu. Rev. Cell Biol. 7, 191-226.

3. Brockwell J., Bottomley P. J., Thies J. E. (1995): Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. Plant Soil 174:143–180.

4. Burns R. C., Hardy R. W. F. (1975): Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer-Verlag, New York.

5. Burris R. H. (1994): Biological nitrogen fixation—past and future, p. 1–11. In Hegazi N. A., Fayez M., Monib M. (ed.), Nitrogen fixation with nonlegumes. The American University in Cairo Press, Cairo, Egypt.

6. Callaham D. A., Torrey J. G. (1981): The structural basis of infection of root hairs of *Triolium repens* by *Rhizobium*. Can. J. Bot. 59: 1647-1664.

7. Catroux G. (1991): Inoculant quality standards and controls in France. In: Thompson J.A., (ed.), Expert Consultation on Legume Inoculant Production and Quality Control, FAO, Rome, pp. 113–120.

8. Deaker R., Roughley R. J., Kennedy I. R. (2004): Legume seed inoculation technology- a review, Soil Biology & Biochemistry 36 (2004) 1275–1288

9. Dénarié J., Debellé F., Truchet G., Promé J. C. (1993): Rhizobium and legume nodulation: A molecular dialogue. In: Palacios R., Mora J., Newton W. E. (eds.), New horizons in nitrogen fixation. Kluwer, Dordrecht, pp 19–30.

10. Dixon R. O. D., Wheeler C. T. (1986): Nitrogen fixation in plants. Blackie, Glasgow, United Kingdom.

11. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (1990): Fertilizer yearbook, vol. 39. Rome, Italy.

12. Ferguson B. J., Indrasumunar A., Satomi Hayashi, Meng-Han Lin, Yu-Hsiang Lin, Reid D. E., Gresshoff P. M. (2010): Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. Invited Expert Review Journal of Integrative Plant Biology, 52 (1): 61–76.

13. Fisher R. F., Long S. R. (1992): *Rhizobium*-plant signal exchange. Nature 357, 655-660.

14. Fortin M. G., Zechelowska M., Verma, D. P. S. (1985): Specific targeting of membrane nodulins to the bacteroid-enclosing compartment in soybean nodules. EMBO J. 4, 3041-3046.

15. Fox J. E., Gulledge J., Engelhaupt E., Burow M. E., McLachlan J. A. (2007): Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants
16. Franche C., Lindström K., Elmerich C. (2009): Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant Soil 321:35–59.
17. Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W. J., Rosenthal A., Perret X. (1997): Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature 387:394–401.
18. Gage D. J. (2004): Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68:280–300.
19. Geurts R., Bisseling T. (2002): Rhizobium nod factor perception and signalling. Plant Cell 14 (Suppl): S239–S249.
20. Goethals K., Van Montagu M., Holsters M. (1992): Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveals a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 1646-1650.
21. Gresshoff P. M., Delves A. C. (1986): Plant genetic approaches to symbiotic nodulation and nitrogen fixation in legumes. In: Blonstein A. D., King P. J., (eds.), Plant Gene Research III. A Genetical Approach to Plant Biochemistry. Springer Verlag, Wien. pp. 159–206.
22. Howard J. B., Rees D. C. (1996): Structural basis of biological nitrogen fixation, Chem. Rev. 96, 2965–2982.
23. Kijne J. W. (1992): The *Rhizobium* infection process. In: Biological Nitrogen Fixation, Stacey G., Burris R. H. , Evans H. J., (eds.), New York: Chapman and Hall, pp. 349-398.
24. Lewis G., Schrire B., Mackinder B., Lock, M. (2005): In press. Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew.
25. Lindemann W. C., Glover C. R. (2003): Nitrogen Fixation by Legumes, Guide A-129, College of Agriculture and Home Economics.
26. Long S. R. (2001): Gene and signals in the Rhizobium-legume symbiosis. Plant Physiol 125:69–72.
27. Mabberley D. J. (1997): The Plant Book. Second edition. Cambridge Universitiy Press, Cambridge.
28. Miao G. H., Hong Z., Verma D. P. S. (1992): Topology and phosphorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of the peribacteroid membrane. J. Cell Biol. 118, 481-490.
29. Mishra B. K., Dadhich S. K. (2010): Methodology of Nitrogen Biofertilizer Production, J. Adv. Dev. Res., Vol-1.
30. Mylona P., Pawlowski K., Bisseling T. (1995): Symbiotic Nitrogen Fixation. The Plant Cell. Vol. 7, 869-885. American Society of Plant Physiologists.

31. Nap J. P., Bissellng T. (1990): Developmental biology of a plantprokaryote symbiosis: The legume root nodule. Science 250, 948-954.

32. Newcomb W. (1981): Nodule morphogenesis and differentiation. In: Biology of the *Rhizobiaceae*, Giles K. L., Atherly A. G. (eds.), New York: Academic Press, pp. 247-297.

33. Newcomb W., Sippel D., Peterson R. L. (1979): The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. Can. J. Bot. 57, 2603–2616.

34. Oke V., Long S. R. (1999): Bacteroid formation in the *Rhizobium*–legume symbiosis, Current Opinion in Microbiology, 2:641–646.

35. Paul E. A. (1988): Towards the year 2000: directions for future nitrogen research, p. 417–425. In Wilson J. R. (ed.), Advances in nitrogen cycling in agricultural ecosystems. CAB International, Wallingford, United Kingdom.

36. Peoples M. B., Herridge D. F., Ladha J. K. (1995): Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. Plant Soil 174:3–28.

37. Peoples M. B., Ladha J. K., Herridge D. F. (1995): Enhancing legume N_2 fixation through plant and soil management. Plant Soil 174:83–101.

38. Perić M., Trifunović J. (2007): Fiksacija azota i gvožđe-sumpor proteini. Hemijski pregled. vol. 48, br. 1, str. 8-13 Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu.

39. Perotto S., Donovan N., Droback B. K., Brewin, N. J. (1995): Differential expression of a glycosyl inositol phospholipid antigen on the peribacteroid membrane during pea nodule development. MOI. Plant-Microbe Interact. In press.

40. Perret X., Staehelin C., Broughton W. J. (2000): Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiol Mol Biol Rev 64:180–201.

41. Postgate J. R. (1982): Biological nitrogen fixation: fundamentals, Philos. Trans. R. Soc. B 296, 387–375.

42. Price N. P. J., Rellc, E., Talmont, F., Lewln A., Promb D., Pueppke S. G., Malllet F., Dbnarlb J., Promb J. C., Broughton, W. J. (1992): Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated. MOI. Microbiol. 6, 3575-3584.

43. Rolfe B. G., Gresshoff P. M. (1988): Genetic analysis of legume nodule initiation. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39, 297–319

44. Schultze M., Kondorosi A. (1998): Regulation of symbiotic root nodule development. Annu. Rev. Genet. 32:33–57

45. Shaw V. K., Brill W. J. (1977): lsolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74,3249-3253.

46. Shiklamov I. (1998): World Water Resources: A New Appraisal and Assessment for the 21st century; A Summary of the Monograph World Water Resources prepared in the Framework of the International Hydrological Programme

47. Spaink H. P. (2000): Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 54:257–288.

48. Sprent J. I., Sprent P. (1990): Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects. Chapman & Hall, London, United Kingdom.

49. Sprent J. I., McKey D. (1994): Advances il Legume Systematics, Part 5, The Nitrogen Factor. Royal Botanic Gardens, Kew.

50. Sprent J. I. (2001): Nodulation in Legumes, Royal Botanic Gardens, Kew.

51. Somasegaran P. (1994): Handbook for rhizobia: methods in legume-rhizobium technology. New York: Springer-Verlag. pp. 1–6, 167.

52. Subba-Rao N. S. (1980): Crop responses to microbial inoculation, p. 406–420. In Subba Rao N. S. (ed.), Recent advances in nitrogen fixation. Edward Arnold, London, United Kingdom.

53. Tate R. L. (1995): Soil microbiology. Symbiotic nitrogen fixation, p. 307–333. John Wiley & Sons, Inc., New York.

54. Thompson J. A. (1988): Survival of root-nodule bacteria on inoculated seed. In: Murrell, W. G., Kennedy I.R. (eds.), Microbiology in Action, Research Studies Press, Letchworth, pp. 67–80.

55. Van Brussel A. A. N., Bakhuizen R., Van Spronsen P. C., Spaink H. P., Tak T., Lugtenberg B. J. J., Kijne J. W. (1992): Induction of preinfection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipooligosaccharides of *Rhizobium*. Science 257, 70-72.

56. Van Spronsen P. C., Bakhuizen R., Van Brussel A. A. N., Kljne J. W. (1994): Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a twostep process. Eur. J. Cell Biol. 64, 88-94.

57. Verma D. P. S. (1992): Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of Rhizobium. Plant Cell 4, 373-382.

58. Vukadinović V., Lončarić Z. (1997): Ishrana bilja. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet Osijek. Drugo izmijenjeno i dopunjeno izdanje.

59. Werner D. (1992): Physiology of nitrogen-fixing legume nodules: Compartments and functions. In: Biological Nitrogen Fixation, Stacey G., Burris R. H., Evans H. J., (eds.), New York: Chapman and Hall, pp. 399-431.

60. Wolfe D. W. (2001): Tales from the underground: a natural history of subterranean life, Cambridge, Mass: Perseus Publication.
61. Zahran H. H. (1999): *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate, Microbiology and molecular biology reviews, p. 968–989, Vol. 63, No. 4.
62. Zahran H. H., Ahmed M. S., Afkar E. A. (1995): Isolation and characterization of nitrogen-fixing moderate halophilic bacteria from saline soils of Egypt. J. Basic Microbiol. 35:269–275.
63. Znaor D. (1996): Ekološka poljoprivreda, Nakladni zavod Globus, Zagreb.
64. www.agr.unizg.hr/cro/nastava/moduli/doc/26500_12_tlo_fiksacija_dusika.pdf
65. www.bbc.co.uk/bitesize/standard/chemistry/plasticsandothermaterials/
66. www.environmentplants.blogspot.com/
67. www.extension.org/pages/64401/legume-inoculation-for-organic-farming-systems
68. www.nature.berkeley.edu/tagalab/research.html
69. www.nitrogenfree.com/problem/nitrogen_cycle.php.html
70. www.pic2fly.com/Nod+Genes.html
71. www.tloznanstvo.com.hr/nitrobakterin.html
72. www.uit.no/Content/210257/Figure%201_John%20Beck%20Jensen.jpg

11. SAŽETAK

U poljoprivrednoj proizvodnji, uz dovoljne količine Sunčeve energije i vode, dušik je osnovni ograničavajućih čimbenik rasta i razvoja biljaka, a s time i postizanja optimalnih prinosa. Najveće zalihe ovog elementa nalaze se u atmosferi, gdje se dušik nalazi u molekularnom obliku kojeg biljke nisu u mogućnosti usvojiti i iskoristiti. Nedostupan dušik iz atmosfere se kroz proces fiksacije veže u nove spojeve te na taj način postaje dostupan mikroorganizmima i biljkama da ih iskoriste za svoje metaboličke potrebe. Fiksacija dušika može biti abiotska i biotska. Abiotska fiksacija dušika nije posredovana živim organizmima te se dijeli na prirodnu i umjetnu fiksaciju dušika. Biotska fiksacija dušika posredovana je živim organizmima i uključuje asimbiotsku, asocijativnu i simbiotsku fiksaciju dušika. Simbiotska fiksacija dušika najznačajnija za poljoprivrednu proizvodnju nastaje kao rezultat simbiotskih interakcija između većine biljka porodice *Leguminosae* i bakterija rodova *Rhizobium* i *Bradyrhizobium*. Simbiotske interakcije započinju prepoznavanjem odgovarajućih kvržičnih bakterija i leguminoza, nakon čega slijedi infekcija i nodulacija. U nodulama, uz prisustvo enzima nitrogenaze, dolazi do procesa fiksacije dušika u kojem se atmosferski dušik prevodi u amonijak kojeg biljka dalje uključuje u svoj metabolizam te ga iskorištava za svoje raznovrsne potrebe. U ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji koja je koncipirana na način da teži očuvanju prirode i okoliša, jedno od osnovnih načela je sjetva legumnioznih usjeva koja ima mnogostruke pozitivne ekonomske i ekološke učinke.

12. SUMMARY

In agricultural production, with sufficient amount of solar energy and water, nitrogen is main limiting factor for growth and development of plants and thereby also achieving optimum yield. Largest stock of this element is in the atmosphere, where the nitrogen is in a molecular form which plants are not able to uptake and use. Unavailable nitrogen from the atmosphere through the fixing process binds into new compounds, and thereby becomes available to microorganisms and plants to use them for their own metabolic needs. Nitrogen fixation can be abiotic and biotic. Abiotic nitrogen fixation is not mediated by living organisms, and it can be divided to natural and artificial nitrogen fixation. Biotic nitrogen fixation is mediated by living organisms and includes asymbiotic, associative and symbiotic nitrogen fixation. Symbiotic nitrogen fixation which is of the greatest importance for agricultural production occurs as a result of symbiotic interactions between the plants from family *Leguminosae* and bacteria from genera *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. Symbiotic interaction begins by mutual recognition of appropriate rhizobia and legumes, followed by infection and nodulation. In the nodule, with the presence of nitrogenase enzyme, the process of nitrogen fixation occures in which atmospheric nitrogen is transformed to ammonia which plant can include in its metabolism and use it for their various needs. In organic farming, which is designed to preserve the nature and environment, one of the basic principles is cultivation of legume crops that have multiple positive economic and environmental effects.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište J. J. Strossmayera

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Diplomski rad

ZNAČAJ SIMBIOTSKE FIKSACIJE DUŠIKA U EKOLOŠKOJ POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI

Jurka Topol

Sažetak: Dušik pripada skupini esencijalnih makroelementata i vrlo često predstavlja osnovni ograničavajući čimbenik postizanja optimalnih prinosa u poljoprivrednoj proizvodnji. Biljke dušik mogu usvajati iz tla i to u dva oblika amnonijačni i nitratni, dok sve ostale oblike dušika kao što je molekularni dušik iz atmosfere, nisu u mogućnosti usvojiti. Fiksacija dušika su procesi u kojima se nedostupan dušik iz atmosfere veže u nove spojeve te na taj način postaje dostupan biljkama da ga iskoriste za svoje raznovrsne potrebe. Procese fiksacije dušika dijelimo na abiotsku kod koje razlikujemo prirodnu ili umjetnu, te biotsku ili biološku kod koje razlikujemo asimbiotska, asocijativnu i simbiotska fiksaciju dušika. Simbiotska fiksacija dušika koja nastaje kao rezultat simbioze između kvržičnih bakterija i leguminoza je od najvećeg značaja za ekološku poljoprivrednu proizvodnju, jer sjetvom leguminoznih usjeva poljoprivredno tlo obogaćujemo dušikom te potičemo povećanju i održanju njegove plodnosti.

Ključne riječi: dušik, simbiozna fiksacija dušika, kvržične bakterije, leguminoze, ekološka poljoprivredna proizvodnja

Summary: Nitrogen belongs to a group of essential macroelements and often is the main limiting factor in achieving optimum yield in agriculture production. Plants can uptake nitrogen from the soil in two forms ammonium and nitrate, while all other forms of nitrogen such as molecular nitrogen from the atmosphere, they are not able to uptake. Nitrogen fixation are processes in which unavailable nitrogen from the atmosphere is transformed to new compounds, and thereby becomes available to plants to use them for their diverse needs. Nitrogen fixation processes are divided into abiotic which includes natural or artificial, and biotic or biological which includes asimbiotic, associative and symbiotic nitrogen fixation. Symbiotic nitrogen fixation that occurs as a result of the symbiosis between rhizobia and legumes is of greatest importance for organic farming because sowing legume crop agricultural soil is enriched with nitrogen, and stimulates increasing and maintaining soil fertility.

Key words: nitrogen, symbiotic nitrogen fixation, nodule bacteria, legumes, organic farming