Utjecaj mikrobiološke aktivnosti na pristupačnost organskog fosfora u tlu

Juzbašić, Sanja

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:151:616638

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

Sanja Juzbašić, apsolvent

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

Smjera Ishrana bilja i tloznanstvo

UTJECAJ MIKROBILOŠKE AKTIVNOSTI NA PRISTUPAČNOST ORGANSKOG FOSFORA U TLU

Diplomski rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Sanja Juzbašić, apsolvent

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

Smjera Ishrana bilja i tloznanstvo

UTJECAJ MIKROBILOŠKE AKTIVNOSTI NA PRISTUPAČNOST ORGANSKOG FOSFORA U TLU

Diplomski rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Sanja Juzbašić, apsolvent

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

Smjera Ishrana bilja i tloznanstvo

UTJECAJ MIKROBILOŠKE AKTIVNOSTI NA PRISTUPAČNOST ORGANSKOG FOSFORA U TLU

Diplomski rad

Povjerenstvo za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Suzana Kristek, predsjednik
2. izv. prof. dr. Brigita Popović, mentor
3. izv. prof. dr. Krunoslav Karalić, član
4. doc. dr. sc. Vladimir Ivezić, zamjenski član

Sadržaj

1. Uvod **1**

1.1 Fosfor 3

1.2 Mikroorganizmi 4

2. Pregled literature **6**

3. Metode utvrđivanja organskog fosfora u tlu **10**

3.1. Metoda žarenje uzorka tla za određivanje orgasnkog fosfora 10

3.2. Ekstrakcijska metoda po Mehte i sur. (1954) 11

3.3. Ekstrakcija organskog fosfora metodom s tri ekstrakcije 11

3.3.1. Određivanje labilnog organskog fosfora 11

3.3.2. Određivanje srednje labilnog (stabilni) organskog fosfor 12

4. Metode utvrđivanja mikrobiološke aktivnosti u tlu **15**

4.1. Određivanje broja bakterija po Gram-u metodom s KOH 16

4.2. Određivanje broja bakterija 16

4.2.1. Posredno 16

4.2.1.1. Kochova metoda 16

4.2.1.2. MPN metoda 16

4.2.1.3. Turbidimetrijska metoda 16

4.2.2. Neposredno 17

4.2.2.1. Brojanjem u Petroff – Hauserovoj komorici 17

4.2.2.2. Brojanjem nakon jednostavnog bojenja fluoroscentnom bojom 18

5. Mikroorganizmi zaduženi za mobilizaciju fosfora u tlu **19**

5.1. Rod *Bacillus* 19

5.2. Rod *Pseudomonas* 20

5.3. Rod *Aspergillus* i *Penicillium* 21

6. Mikorize **22**

6.1.Ektomikorizza 23

6.2.Endomikoriza 23

7. C/P odnos **25**

8. Potencijal organskog fosfora u tlu **25**

9. Zaključak **26**

10. Popis literature **27**

11. Sažetak **28**

12. Summary **29**

13. Popis slika **30**

Temeljna dokumentacijska kartica

Basic document card

1. Uvod

Tvar i energiju ne možemo uništiti ili stvoriti ni iz čega, one samo prelaze iz jednog u drugi oblik, a ono su što izgrađuje ovaj Svijet i Svemir. Izvor energije koji omogućuje život na Zemlji je Sunce. U Suncu odvijaju se nuklearne reakcije pri kojima dolazi do spajanja jezgara atoma i nastajanje teže jezgre (fuzija). Proces prati oslobađanje ili apsorpcija energije (egzotermne i endotermne reakcije) što ovisi o masi uključenih jezgri. Oko 2 % sunčeve energije koristi se u fotosintetskim procesima. Biljke imaju sposobnost transformacije nežive ili anorganske tvari u živu ili organsku tvar, a to rade uz pomoć sunčeve radijacije.

U stanici (mitohondriju) odvija se niz kemijskih reakcija koje su izvor energije za život, a kada su pod djelovanjem enzima nazivaju se metabolički put. Neke metaboličke reakcije odvijaju se spontano, ne treba im dotok energije, te su to kemijske reakcije u kojima se energija oslobađa (oksidacija organskih molekula), one su izvor energije za reakcije kojima je potrebna energija za odvijanje (sinteze – stanično disanje).

Energija iz jedne reakcije pokreće drugu preko prenositelja ATP, u čitavom živom Svijetu. Adenozin trifosfat ili ATP je glavno unutarstanično skladište energije, a u biljkama glavni su proizvođači kloroplasti. ATP građen je od dušične baze adenina, monosaharida riboze i tri fosfata. Prvi je fosfat vezan na ribozu čvrstom kovalentnom vezom koja nije energetski bogata, dok su druga dva međusobno vezana fosfatnom vezom, koja je vrlo bogata energijom. Tu energiju stanica dobiva hidrolizom fosfata. U fosfatnim vezama energija se dobiva staničnim procesom fosforilacije. To je proces pri kojemu se na adenozin monofosfat (AMP) veže dodatni fosfat energetski bogatom vezom i nastaje adenozin difosfat (ADP) nakon toga još jedan fosfat se veže na drugi i nastaje treća energijom bogata fosfatna veza, odnosno dobivamo ATP.

Proces fosforilacije odvija se u mitohondrijima a energija koja se ulaže u veze je ona koja se dobiva iz staničnog disanja. Hidroliza ATP-a je proces obrnut od fosforilacije pri kojem dolazi do pucanja zadnje fosfatne veze i odcjepljenja zadnjeg fosfata. Pri tome nastaje ADP, energetski siromašniji spoj koji sadrži samo jednu energijom bogatu vezu. Ako je stanici potrebno još energije ona odcjepljuje još jedan fosfat, puca i druga veza te se oslobađa energija koja je dalje potrebna stanici. Ovo je najvažnije pojavljivanje fosfora, kao i vodeća važeća uloga.

Fosfor je element koji se pojavljuje kako u organskom tako i u anorganskom obliku, te je element biljne ishrane. Kao takav može potjecati iz minerala Zemljine kore te kao produkt razgradnje žive ili organske tvari. Organska tvar u tlu podrijetlom je od ostataka živih organizama koji su više ili manje razloženi te iznova grade organske spojeve, ali koji se bitno razlikuju u odnosu na živu tvar. Prisutnost organske tvari u tlu određuje razliku između tla u smislu prirodnog supstrata biljne ishrane i rastresite mase raspadnutih stijena litosfere u termičkim i kemijskim procesima. Organska tvar znatno utječe na fizička i kemijska svojstva tla (struktura, kapacitet za vodu, sorpcija iona, sadržaj neophodnih elemenata), te je osnovni izvor energije za životnu aktivnost mikroorganizama tla. Eventualnim nestankom organske tvari tla došlo bi do katastrofalnih posljedica po čitav život na Zemlji.

Asimilacijskim procesima mikroorganizama iz atmosfere u tlo dospijevaju ugljik i dušik kao dio organske tvari tla, sumpor osim što može biti podrijetlom iz atmosfere može se pronaći i u plinovitom stanju, dok fosfor isključivo vodi podrijetlo iz materijala od kojeg je nastalo neko tlo. Ovi elementi sastavni su dio humusa (organske tvari), koji u procesu razgradnje prelaze u mineralne oblike uz djelovanje mikroorganizama te biljci postaju pristupačni, odnosno raspoloživi. Ovaj proces naziva se mineralizacija ili mobilizacija hraniva. Sadržaj organske tvari u tlu može se zadržati na istoj razini, smanjivati ili povećavati. Pošto su komponente humusa (huminske i fulvo kiseline) vrlo otporne na razlaganje, promjene su vrlo spore.

1.1.Fosfor

Fosfor (lat. *Phosphorus*; grč. svjetlonoša) je kemijski element koji u periodnom sustavu elemenata nosi simbol *P*. Nemetal je koji se u prirodi, tlu i biljkama javlja u peterovalentnom obliku, ali nikad u slobodnom stanju već kao dio važnih organskih spojeva kao što su fosfolipidi, nukleoproteidi, enzimi i mnogi drugi. Također, fosfor je dio spojeva koji povezuju u metabolizmu endergone i egzorgone reakcije, reakcije u kojima se energija veže ili oslobađa (ATP). Pri sobnoj temperaturi je kruta tvar.

Ciklus fosfora u tlu sastoji se iz razgradnje fosfornih spojeva u tlu, njihovog usvajanja biljkama i ponovnog nastanka minerala tla. Najvažniji minerali su mu fosforit i apatit, koji su glavni sastojci fosfornih ruda a i glavne sirovine za dobivanje fosfora. Poznato je još oko 170 različitih minerala fosfora. Najveća nalazišta su mu u Africi, SAD-u, Rusiji i na otocima u Tihom i Indijskom oceanu.

Fosfor je potreban za razvoj živih organizama, koji ga sadrže u obliku raznih organskih spojeva i kalcijeva fosfata. U biljkama su ti spojevi prvenstveno u plodovima i zrnju, a kod kralježnjaka najviše u sastavu kostiju i zubi, zatim u mišićima, mozgu i živčanim stanicama. Kalcijeva fosfata ima mnogo i u naslagama izmeta ptica – guano, koji se rabi kao mineralno gnojivo. Fosfor u tlu, dakle, potječe iz procesa razgradnje matičnih stijena (apatita). U poljoprivrednim tlima nalazi se između 40 – 80 % anorganski vezanog fosfora i 20 – 60 % organski vezanog fosfora. Oba oblika dijele se u više grupa koje obuhvaćaju prilično raznolike spojeve fosfora, a podjela se temelji na topljivosti tih spojeva u različitim otapalima. Tako imamo vodotopljive fosfate koji su najmanje zastupljena frakcija fosfora u tlu (0,02 – 1,0 ppm) , fosfor topljiv u slabim i jakim kiselinama, fosfor topljiv u lužnatim otopinama te teško topljivi fosfor (Vukadinović, 2011).

Organski fosfor tla akumulira se u tlu pretežito nakon razgradnje biljnih ostataka, ali djelomično nastaje i kao posljedica djelovanja mikrobioloških kemosintetskih procesa u tlu. Ako organska tvar sadrži manje od 0,2 % fosfora u procesu mineralizacije, sav oslobođeni fosfor koriste mikroorganizmi za svoje potrebe (izgradnju tijela) i više biljke ostaju privremeno uskraćene za tako oslobođeni fosfor, sve do ugibanja mikroorganizama. Pojava se naziva biološka imobilizacija fosfora ili fiksacija fosfora (Vukadinović, 2011).

Sadržaj organske frakcije fosfora značajno ovisi o tipu tla, a njezino frakcioniranje može se izvesti u kiselinama i lužinama slično mineralnom fosforu tla. Za ishranu bilja povoljnija je

frakcija topljiva u kiselinama jer brže podliježe procesu mineralizacije. Međutim, tla koja su duže vremena u eksploataciji imaju veći sadržaj frakcije topljive u lužinama pa je na njima gnojidba fosforom efikasnija jer je povećanje prinosa veće, bez obzira na količinu pristupačnog fosfora u tlu. Osnovni faktor koji određuje pristupačnost fosfora je pH reakcija tla, odnosno zasićenost adsorpcijskog kompleksa bazama. Idealne vrijednosti su na skali od 5,5 – 7.

U neutralnim i lužnatim tlima prevladavaju kalcijevi fosfati koji su lakše topljivi od fosfata seskvioksida u kiselim tlima. Budući da raspoloživost fosfora snažno utječe na efektivnu plodnost tla, razumljiva je potreba za održavanjem ili prilagođavanjem pH vrijednosti tla. Stoga kalcizacija kiselih tala često snažnije utječe na povećanje prinosa mnogih poljoprivrednih vrsta nego gnojidba fosforom na kiselim tlima. Smatra se da je 1-2% $CaCO_3$ u tlu najpovoljniji sadržaj kalcija u odnosu na topljivost fosfornih spojeva. Raspoloživost fosfora značajno ovisi još o stanju vlažnosti tla i brzini obnavljanja fosforne kiseline u vodenoj fazi tla. Biljke ga usvajaju isključivo u obliku aniona, iz ortofosfatne kiseline u obliku $H_2PO_4^-$ i HPO_4^{2-}, te ga ugrađuje u organsku tvar bez redukcije. Usvajanje fosfora iz vodene faze tla je vrlo brz proces, ali je koncetracija H_2PO^{4-} u tlu vrlo mala. Prosječna koncentracija fosfora u biljkama iznosi oko 0,3 – 0,5 % a najveće potrebe biljaka su na samom početku vegetacije. Fosfor u biljci je dobro pokretljiv u oba smjera, i akropetalno i bazipetalno.

Nedostatak fosfora vrlo je česta pojava, a izraženija je na kiselim tlima. Slab rast biljaka prvi je simptom koji se ogleda u znatno nižem prinosu. Kod jače izraženog nedostatka slabo se razvija korjenov sustav, cvjetanje i zrioba biljaka kasne, smanjena je tvorba proteina uz povišen sadržaj amida i nizak sadržaj vitamina. Dok je nedostatak česta pojava, suvišak fosfora je prilično rijetka pojava u prirodnim uvjetima a događa se kada koncentracija fosfora u suhoj tvari prijeđe 1%. Simptomi su usporen rast, tamnomrke pjege na lišću koje se šire prema bazi lista i uzrokuju njegovo opadanje.

1.2.Mikroorganizmi

Mikroorganizmi su ključni pokretači sinteze i mineralizacije organske tvari u tlu, a brojnost i zastupljenost pojedinih fizioloških skupina mikroorganizama u tlu rezultira plodnošću tla. Tlo sadrži 8-15 tona raznih mikroba, koje čine bakterije, gljivice, protozoa, nematode, gliste i člankonošci. Mikrobi ili mikroorganizmi svojom prisutnošću i enzimatskom aktivnošću, sudjeluju u formiranju strukture tla, stvaranju povoljnih fizikalno – kemijskih karakteristika

tla, vodozračnih odnosa te održavaju plodnost tla na duže vrijeme. Kakva će biti brojnost i zastupljenost ovisi o utjecaju ekoloških faktora, antropogeno djelovanje, tipa vegetacija i međusobnih odnosa unutar mikrobne populacije tla. Dok god ima ugljika kao izvora energije, i mikroba će u tlu biti u velikom broju. Štoviše, u žličici tla ima više mikroba nego što ima ljudi na Zemlji.

Fosfomobilizatori su mikroorganizmi koji imaju sposobnost oslobađanja fosfata odnosno oslobađaju fosfor iz anorganskih spojeva primjerice iz kalcijevog fosfata. Fosfomobilizatori su i mikroorganizmi koji koriste ortofosfate za svoj rast u uvjetima kada se mineralizira organska tvar sa malom količinom fosfora. Mikrobiološki fosfor podliježe mineralizaciji do oslobađanja ortofosfata čija sudbina zatim ovisi o ekološkim uvjetima i svojstvima tla (Hynal i sur., 2004).

Bakterije koje sintetiziraju fosfataze (*Bacillus, Pseudomonas, Azotobacter, Enterobacter, Serratia, Streptomyces*) naseljavaju korijen biljaka i značajno utječu na mineralizaciju organskih spojeva fosfora na njegovoj površini i mogu se koristiti u poljoprivrednoj proizvodnji kao zamjena fosfornih mineralnih gnojiva (Đorđević i sur., 2000).

Mikroorganizmi mogu poboljšati kapacitet biljke za stjecanje fosfora iz tla kroz različite mehanizme koji se mogu sažeti kao:

- povećani rast korijena ili kroz produženje postojećeg korijenskog sustava (npr. mikorizne udruge) ili kroz hormonalnu stimulaciju rasta korijena, grananja ili razvoja korijenovih dlačica (fitostimulacija; npr.proizvodnja indol – 3 – octene kiseline ili enzima koji mijenjaju biljni etilen prokursor kao što je 1– aminociklopropan-1-karboksilat deaminaze) (Richardson i sur., 2009; Hayat i sur., 2010)
- promjene u ravnoteži usvajanja koje mogu rezultirati ili povećanjem neto transfera ortofosfatnih iona u otopini tla ili olakšavanje pokretljivosti organskog fosfora izravno ili neizravno putem prometa mikroorganizama (Seling i Zasoki, 1993)
- putem indukcije metaboličkih proces koji su djelotvorni pri izravnom otapanju i mineralizaciji fosfora iz slabo dostupnih oblika anorganskog i organskog fosfora iz tla (Richardson i sur., 2009)

2. Pregled literature

Postoji znatan broj informacija o prirodi ponašanja anorganskog oblika fosfora u tlu (Larsen, 1967). Uloga organskog fosfora u tlu je uglavnom zanemarena, što se događa zbog većeg udjela anorganskog oblika u ukupnom fosforu u obradivim mineralnim tlima.

Fosfor je 1669. godine otkrio njemački alkemičar Henning Brand, koji je u potrazi za *Kamenom mudrosti,* isušivao urin dok nije sva tekućina isparila. Kada je suhi ostatak zagrijao bez prisustva zraka, redukcijom sa organskom materijom nastao je bijeli fosfor, koji je zbog hemoluminiscencije svijetlio u mraku. Kao takvog upotrebljavali su ga kao noćnu svjetiljku, a radi svojih fascinantnih osobina (hemoluminiscencija) koristio se i kao lijek, a sve do danas i u proizvodnji šibica (Wikipedia).

Fosfor je vrlo raširen u prirodi te dolazi samo u spojevima, najčešće u solima fosfatne kiseline, fosfatima. Normalni je sastojak biljaka pa se stoga iscrpljenoj zemlji mora dodavati u obliku fosfornih gnojiva. Elementarni fosfor postoji u tri alotropske modifikacije: bijeli (ili žuti), crveni i crni (ili amorfni). Fosfor se dobiva žarenjem kalcijevog fosfata, silicijevog dioksida (kvarcnog pijeska) i ugljika u električnim pećima (Opća enciklopedija, 1977*).*

Da je fosfor neophodan element za rast i razvoj reproduktivnih organa, za rano sazrijevanje biljaka i dobar rast korijena, pokazala su istraživanja (Kacar, 1984) kao i da spojevi fosfora igraju važnu ulogu u fotosintezi, disanju kao i u pretvorbi energije u metaboličkim procesima.

Fosfor je kod lijeske pohranjen u granama i pupovima, a uvelike je korišten za vrijeme cvatnje i oplodnje. Stoga nedostatak fosfora u nasadima lijeske uzrokuje smanjenje prinosa kod slijedeće godine. S druge strane, ukoliko se u tlu nalaze dovoljne količine fosfora, dolazi do povećanja cvjetanja pa tako i prinosa. Iako je utvrđeno da fosforna gnojiva ne utječnu na debljinu ljuske, randman jezgre i količine sirovog ulja u lješnjaku, ona utječe na povećane vrijednosti fosfora u lišću, povećanje jezgre ploda i količinu bjelančevina u njemu (Sarhun and Genc, 1972; Kaya i Kucuk, 1986; Ozenc, 2004).

Fosfor je konstituent važnih organskih spojeva. Sastojak je fosfatida, nukleotida, nukleinskih kiselina, enzima itd., a kao rezerva fosfor je najčešće vezan u fitinskoj kiselini. Neorganski fosfor u biljci sudjeluje i u održavanju osmotskog tlaka. Značaj mu je izuzetan u aktivaciji većine organskih spojeva jer omogućuje savlađivanje energetskih prepreka u biokemijsko-fiziološkim reakcijama (metabolitska aktivacija supstrata). Kao sastavni dio različitih koenzima i prostetičkih grupa fosfor sudjeluje u važnim metaboličkim procesima. Sastavni je

dio purinskih, pirimidinskih, nikotinamidnih, flavinskih, piridoksalfosfatnih i tiaminfosfatnih koenzima i dr. Stoga fosfor ima dvije nezamjenjive funkcije: sudjeluje u metabolizmu energije ugljikohidrata, dušikovih i velikog broja drugih spojeva, te je konstituent DNK i ima nezamjenjivu ulogu u nasljeđivanju (Vukadinović, 2011).

Podaci o sadržaju fosfora u tlu prikupljeni u sklopu Projekata Osječko-baranjske županije govore da se vrijednosti fosfora kreću većinom od 9 -24 mg/100g tla - tla su srednje do dobro opskrbljena fosforom (obz.hr).

Fares i sur. (1974) proučavali su sadržaj organskog fosfora na andosolima, humusnim podzolima, smeđem ispranom tlu, vertisolu, smeđem vapnenom tlu, eutrofičnom grebenu i kalcijevom grebenu. Visoki sadržaj fosfora bio je povezan sa visokim sadržajem organske tvari. Promatran je inverzni odnos između stupnjeva polimerizacije humusne tvari i sadržaja organskog fosfora u humusu (Jacquin i Fares, 1974).

Waler i Adams proučavali su utjecaj kiše na sličnom materijalu. Pokazali su da se sadržaj fosfora u organskoj tvari smanjuje kako se povećavaju oborine i prosječne temperature. Drugi čimbenici koji utječu na organski sadržaj tla su (Williams i Saunders, 1956): drenaže (slabo drenirana tla sadrže manje organskog fosfora od dobro dreniranih tala) (Thompson i sur, 1954; Kaila, 1963); pH tla (sadržaj organskog fosfora povećava se kako se pH tla smanjuje); obrađivanje (smanjuje sadržaj organskog fosfora zbog mineralizacije organske tvari) (Black, 1968); sadržaj anorganskog fosfora matičnog materijala (Walker i Adams,1958); i sadržaj sumpora u područjima s niskim atmosferskim tlakom (Walker i Adams,1959).

Gerretsen (1948) je pokazao da bi čiste kulture zemljišnih bakterija trebale povećati fosfor biljkama za ishranu, pod kontroliranim uvjetima, kroz otapanje taloga kalcijeva fosfata.

Velika količina fosfora apliciranog kao gnojivo, dolazi u nepristupačnom obliku taloženjem, uz vrlo reaktivni Al^{3+} i Fe^{3+} u kiselim tlima, i Ca^{2+} u karbonatnim ili normalnim tlima (Gyaneshwar i sur, 2002; Hao i sur. , 2002).

Učinkovitost fosfornih gnojiva u cijelom svijetu je oko 10 – 25 % (Isherword, 1998), a koncentracija raspoloživog fosfora je vrlo niska, te doseže razinu od 1mg/kg u tlu (Goldstein, 1994).

Organski fosfor u biljkama uključuje inositol-fosfate (10 – 50 % u tlu), koji predstavljaju niz fosfatnih estera u rasponu od monofosfata do heksafosfata. Fitinska kiselina (inositol

heksafosfat) je glavni spoj koji biljke koriste za pohranu fosfora u sjeme kako bi podržale rani rast sadnica u fazi klijavosti. Fitin (Ca – Mg soli fitinske kiseline) je spoj koji je najoblinij od svih poznatih organosfosfornih spojeva u tlu. Organski fosfor u tlu pojavljuju se i u šećernim fosfatima, nukleotidima, fosfoproteinima i fosfolipidima (Yadav i Verma, 2012).

Bakterije su učinkovitije u otapanju fosfora nego gljivice (Alam i sur., 2002). Među cijelom populacijom mikroorganizama u tlu, potencijal za otapanje fosfora u tlu ima 1 do 50 % bakterija, a gljivice 0.1 do 0.5 %. (Chen i sur., 2006).

Broj bakterija koje služe za otapanje fosfora u tlu, među ukupnim brojem mikroorganizama iznosi oko 88 %, u sjeverno iranskom tlu. (Fallah, 2006)

Za ishranu biljaka od velike važnosti je dinamika odvijanja procesa mineralizacije i imobilizacije, a koji su pod kontrolom mikroorganizama (Cross i Schlesinger, 1995.).

Najučinkovitiji mikroorganizmi koji se ubrajaju u skupinu fosfomobilizatora su među bakterijama: *Bacillus* i *Pseudomonas*, te među gljivama *Aspergilus* i *Penicillium*.

Zanimanje za mikroorganizme u tlu poraslo je 1904. godine, kada je otkrivena simbioza između kvržičnih bakterija i leguminoza. Tada se uvodi pojam rizosfera – dio zemljišta koji je pod utjecajem biljnog korijena (Hiltner, 1904.).

Rizosfera predstavlja vruću točku („*hot-spot*“) za kolonizaciju mikroorganizama ali i za njihovu aktivnost (Tilak i sur., 2005.). Formira se oko svakog korijena i prati njegov rast, a pri tome korijen mijenja fizikalna, kemijska i biološka svojstva tla. Oko korijenovih dlačica je najveća biogenost jer se oko njih stvara neka vrsta mikrobiološkog filtra kroz koji prolaze sve izlučevine korijena, koje mikroorganizmi koriste za svoje potrebe.

Raspored mikroorganizama prema udaljenosti od korijena nazivamo rizosferni profil. Rizosferni profil sastoji se od zone korijena, rizosfere i okolnog tla – edafosfera (Barea i sur., 2005). U rizosferi postoje još i tri odvojena komponente, a to su : ektorizosfera, endorizosfera i rizoplana (Killham, 1994).

Reakcija tla, izražena kao pH vrijednost, pokazatelj je niza agrokemijskih svojstava tla važnih za ishranu bilja. Jedinica pH vrijednosti predstavlja negativan logaritam aktiviteta H^+ te kao jedno od temeljnih svojstava tla kontrolira kemijska, biološka i fizikalna svojstva tla (Vukadinović, i Lončarić, 1998).

pH vrijednost uzoraka tla određuje se pH-metrom, dakle elektrometrijski (ISO 10390, 1994.)

Humus u tlu utječe na vrlo značajna kemijska i fizikalna svojstva tla, kao što su struktura, kapacitet za vodu, sorpcija iona, sadržaj neophodnih elemenata itd. Sadržaj humusa u tlu određuje se bikromatnom metodom *(*ISO 14235, 1994) koja predstavlja mokro spaljivanje organske tvari tla kalijevim bikromatom.

3. Metode utvrđivanja fosfora u tlu

Analiza biljkama pristupačnog fosfora obavezna je agrokemijska analiza tla za procjenu plodnosti tla i preporuku gnojidbe, a u RH u upotrebi je najčešće AL metoda (Popović, 2009).

AL metoda (Egner, Riehm i Domingo) temelji se na ekstrakciji biljkama pristupačnog fosfora pufernom otopinom amonij-laktata čiji je pH 3,75. Za pripremu AL-otopine koriste se mliječna kiselina, 96% octena kiselina i amonij-acetat. Nakon ekstrakcije fosfor se u filtratu određuje spektrofotometrijskom metodom: plavom fosfo-molibdenskom metodom ili žutom vanadat-molibdenskom metodom.

Postoji i bikromatna metoda po Olsenu koja je prihvaćena u svijetu, a koristi se za mjerenje biljci raspoloživog fosfora u tlu. Originalno je razvijana za područje Sjeverne Amerike za analizu alkalnih tala (Đurđević, 2004). Kemikalije koje su potrebne za provedbu ove metode su: natrijev hidrogenkarbonat, amonijev heptamolibdat, kalijev antimon tartarat, askorbisnka kiselina, kalijev dihidrogenfosfat te sumporna kiselina.

Ekstrakcija fosfora provodi se i pomoću AA-EDTA metode koju čini smjesa 0.02 M EDTA (etilen-diamino-tetraacetatna kiselina), 0.5 M amonijevog acetata i 0.5 M octene kiseline. pH otopine podešen je na 4.6, a koristi se i za utvrđivanje biljci pristupačnih hraniva (makro i mikroelemenata), kao i za utvrđivanje toksičnih elemenata (Lakanen and Ervio, 1971).

3.1. Metoda žarenja uzroka tla za određivanje organskog fosfora

Ukupni organski fosfor određuje se žarenjem uzoraka tla (Kuo, 1996.). Metoda se temelji na postupku žarenja koji organski fosfor prevodi u anorganski oblik, te se zatim određuje ukupna količina organskog fosfora usporedbom utvrđene količine anorganskog fosfora u uzorku sa ili bez prethodnog žarenja. Koncentracija ukupnog fosfora u oba uzorka (sa ili bez žarenja) izračunava se po jednadžbi:

$$\text{ukupni P (mg kg}^{-1}\text{)= P konc (}\mu\text{g ml}^{-1}\text{) x 50/g}$$

g= odvaga tla

$$\text{organski P= ukupni P}_{\text{žarenje}} - \text{ukupni P}_{\text{bez žarenja}}$$

3.2. Ekstrakcijska metoda po Mehte i sur. (1954.)

Služi za određivanje sadržaja ukupnog fosfora ($P_{(ou)}$). $P_{(ou)}$ izražavamo kao razliku između sadržaja ukupnog fosfora u tlu ($P_{(ut)}$) i sadržaja ukupnog anorganskog fosfora ($P_{(ua)}$). Do sadržaja ukupnog fosfora u tlu dolazimo pomoću više uzastopnih ekstrakcija s HCl i NaOH. $P_{(ua)}$ se određuje izravno fotometrijskom metodom, dok se $P_{(ut)}$, nakon oksidacije organske tvari, može odrediti pomoću perklorne kiseline.

3.3. Ekstrakcija organskog fosfora metodom s tri ekstrakcije

3.3.1.Određivanje labilnog organskog fosfora

Ekstrakcija s $NaHCO_3$

Odvagati 0,5 g zrako-osušenog tla te ga navlaženog do PVK (0,4 ml vode na 1g tla) staviti u kivete za centrifugu od 100 ml. U svaku kivetu dodati 50 ml 0,5 M $NaHCO_3$, položiti kivete vodoravno i staviti na treskalicu 16 sati. Potrebno je na isti način pripremiti i kivetu bez tla (nulu). Nakon treskanja uzorke je potrebno centrifugirati na 7000 okretaja, 15 minuta te filtrirati kroz filter papir Whatman No. 41 u tikvice od 50 ml. Tikvice zatim treba nadopuniti do oznake.

Kako bi odredili labilni fosfor **(P_i)** potrebno je prenjeti alikvot koji u sebi sadrži 2-40 μg P u tikvice od 50 ml i dodati 5 kapi p-nitrofenola te namjestiti pH s 2 M HCl(oko 4-5 ml)dok se tamno žuta boja indikatora obezboji. Dodati oko 40 ml destilirane vode te 8 ml REAGENSA B, nadopuniti tikvice do oznake i dobro promućkati. Nakon 20 min odrediti koncentraciju fosfora na spektrofotometru na 880 nm. Isti postupak je i za pripremljenu nulu.

Za određivanje ukupnog labilnog fosfora (**P)** u ekstraktu potrebno je u kivetu za razaranje na bloku dodati 0,5 g Kalijevog persulfata te odgovarajući alikvot (najčešće 10 ml) ekstrakta (početnog iz tikvica od 50 ml) i 6 ml 2,5 M sulfatne kiseline. Uzorke je potrebno digestirati na 160 °C 30 min (dok se uzorci ne prestanu pjeniti). Nakon hlađenja uzorke kvantitativno prenijeti u tikvice od 50 ml, dodati 5 kapi p-nitrofenola i namjestiti pH s 5 M NaOH (do pojave trajne žute boje). Zatim dodati oko 10 ml destilirane vode, 8 ml REAGENSA B i nadopuniti tikvice do oznake i dobro promućkati. Nakon 20 min mjeriti koncentraciju fosfora na spektrofotometru na 880 nm.

Razlika između ukupnog labilnog fosfora(P) i labilnog mineralnog fosfora(P_i) rezultira labilnim organskim fosforom (P_o): $\mathbf{P_o=P-P_i}$

3.3.2.Određivanje srednje labilnog (stabilni) organskog fosfora

Postupak se odvija u dva koraka.

Ekstrakcija s HCl

Na ostatak tla u kiveti od predhodne analize dodati 50 ml 1 M HCl i staviti na treskalicu 3 sata. Dio 1 M HCl (od 50 ml) potrebno je koristiti za ispiranje filter papira od predhodne ekstrakcije. Nakon 3 sata uzorke je potrebno centrifugirati na 7000 okretaja 15 min i filtrirati kroz Whatman papir u tikvice od 50 ml. Tikvice nadopunit destiliranom vodom i dobro promućkati.

Postupak određivanja srednje labilnog mineralnog fosfora (Pi) i ukupnog srednje labilnog fosfora (P) je isti kao i postupak za određivanje za labilnog fosfora.

Srednje labilni organski fosfor dobije se kao rezultat razlike ukupnog srednje labilnog fosfora i srednje labilnog mineralnog fosfora: $\mathbf{P_O=P-P_i}$

Ekstrakcija s NaOH

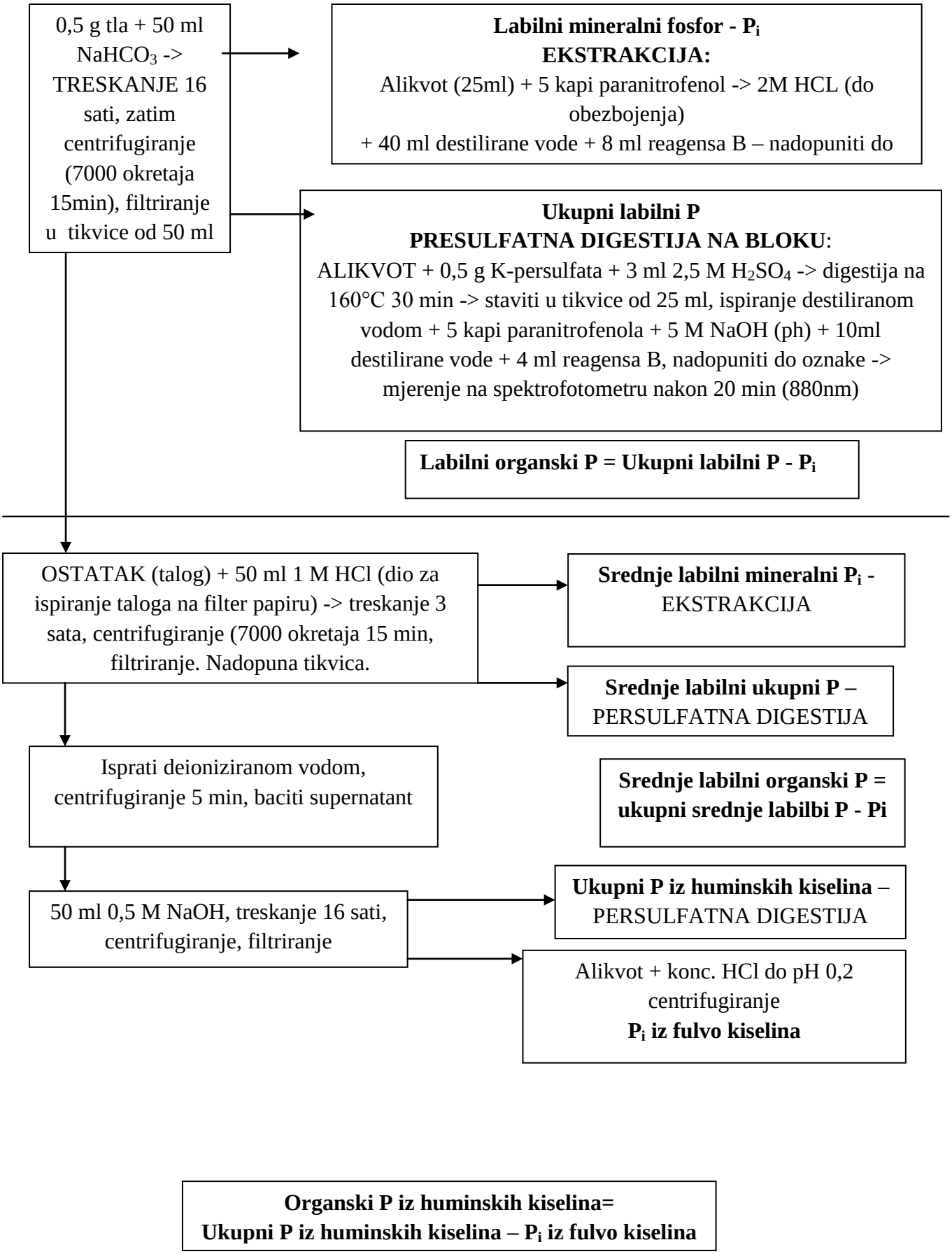
Kako bi odredili još jednu frakciju srednje labilnog fosfora (iz fulvo kiselina) potrebno je ostatak tla u kiveti za cenrifugiranje isprati destliranom vodom, centrifugirati 5 minuta i baciti supernatant. Zatim u kivete treba dodati 50 ml 0,5 M NaOH i staviti na treskanje 16 sati. Nakon treskanja uzorke centrifugirati na 7000 okretaja 15 min. Ovakav supernatant sadrži dvije frakcije fosfora: manje stabilni iz fulvo kiselina, te stabilni iz huminskih kiselina. Kako bi odvojili te frakcije potredno je dio alikvota odvojiti (nakon filtriranja u tikvice od 50 ml kao i u svim ostalim postupcima), prebaciti u kivete za centrifugu te ekstrakt zakiseliti s koncentriranom HCl do pH 0,2. Naime, pri toj pH vrijednosti, huminske kiseline se talože, a fulvo kiseline ostaju u otopini. Zakiseljene uzorke potrebno je centrifugirati na 7000 okretaja 15 min i filtrirati u tikvice od 50 ml. Po već prethodno spomenutom postupku, potrebno je odrediti ukupni srednje labilni fosfor (P) i srednje labilni mineralni fosfor (P_i). Organski fosfor iz humiskih kiselina dobiven je kao rezultat razlike ukupnog fosfora iz huminskih kiselina te fosfora iz fulvo kiselina..

IZRAČUN KONCENTRACIJE FOSFORA IZ SVAKE FRAKCIJE

Koncentracija fosfora dobivena pojedinom frakcijom računa se formulom:

P(mg/kg)= koncentracija P(mg/l) x (volumen ekstraktanta (l)/masa tla (kg)

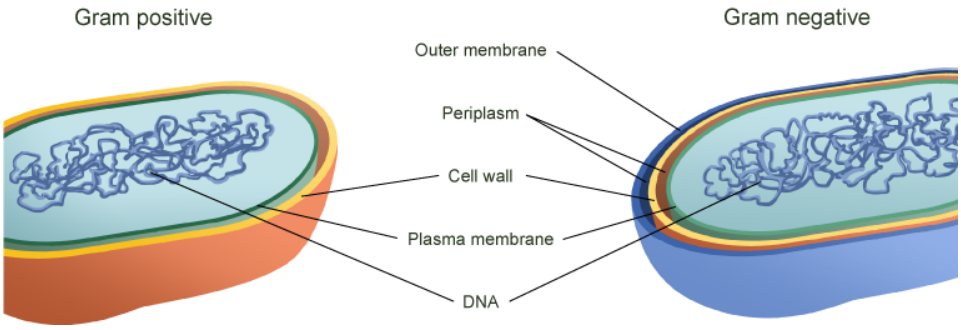
Shema 1. Shematski prikaz postupka određivanja koncentracije organskog fosfora u tlu



4. Metode utvrđivanja mikrobiološke analize u tlu

Ukupna mikrobiološka aktivnost mjera je za određivanje prometa organske tvari u prirodnim staništima, gdje je u prosjeku oko 90 % protoka energije kroz mikrobiološke razgrađivače. Kriteriji za određivanje mikrobiološke aktivnosti u tlu su npr.: disanje tla, dehidrogenazna aktivnost i rast temperature određena mikrokalorimetrijom. Odgovarajuća tehnika za mjerenje ukupne mikrobiološke aktivnosti mora biti nespecifična i jednostavna, a svaki nužni period inkubacije trebao bi biti što kraći (Schnurer i Rosswall, 1982). Bakteriološka podloga je hranjivi medij koji svojim sastavom omogućuje rast bakterija. Njihova osnovna namjena je uzgoj bakterija u laboratorijskim uvjetima. Bojanje bakterijskih stanica se obavlja radi lakšeg proučavanja svjetlosnim mikroskopom. Obojenost neke molekule potječe od područja bogatog dvostrukim vezama. Taj dio molekule naziva se kromofor. Za stanicu i stanične strukture boja se veže ionskim, kovalentnim i hidrofobnim vezama (Pajun, G.)

Hans Kristijan Gram 1884. godine je otkrio da se bakterijske stanice mogu podijeliti u dvije velike skupine (Gram pozitivne – G^+ i Gram negativne – G^-) s obzirom na različitu mogućnost njihovog odbojavanja, a što je posljedica razlika u strukturi bakterijskih staničnih stijenki. Gram-pozitivne bakterije imaju staničnu stijenku koju čine debeli (višeslojni) sloj peptidoglikani (50-90 % stanične stijenke). Peptoglikani zadržavaju boju – kristalviolet, unutar stijenke i nakon ispiranja alkoholom. Gram-negativne bakterije imaju tanji sloj peptidogilkana (10 % stanične stijenke), te se kristalviolet ispire alkoholom. Gram-negativne bakterije imaju i dodatnu vanjsku membranu koja sadrži lipide, a kod njih je i stanična stijenka odvojena od stanice periplazmatskim prostorom.

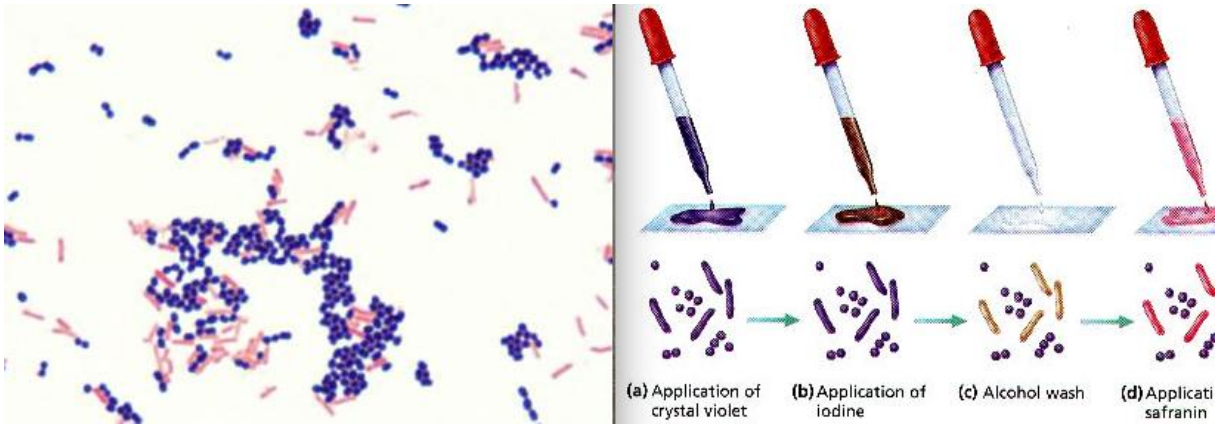


Slika 1. Prikaz razlike između gram pozitivne i gram negativne bakterije

http://www.shmoop.com/prokaryotes/diversity-classification.html

4.1. Određivanje bakterija po Gram-u metodom s KOH

Metoda bojanja po Gramu je empirijska metoda razlikovanja bakterija u dvije velike skupine (G^+ i G^-) koja se osniva na kemijskim i fizičkim svojstvima njihove stanične stijenke. Pomoću razrijeđene otopine kalijevog-hidroksida odrede se strukturalna svojstva stanične stijenke bakterijskih stanica tj, pripadnost bakterija po Gram-u. Ako je suspenzija viskozna ili gelasta unutar 50 – 60 s, ispitivana bakterija je definirana kao gram – negativna,a u protivnom kao gram pozitivna.



Slika 2. Prikaz bojenja po Gramu. Ljubičasto obojene su gram pozitivne, dok su rozo obojene gram negativne bakterije.

https://hemtecks.wordpress.com/2015/06/12/new-spin-on-gram-stain-bacteria/

4.2.Određivanje broja bakterija

Dvije su osnovne grupe metoda kojim se određuje broj bakterija, a to su posredne i neposredne metode.

4.2.1. Posredno

U okoliš (medij) prenese se bakterijski uzorak u kojem će uzrokovati vizualni efekt (porast kolonije na krutoj podlozi ili zamućenje tekuće podloge)

4.2.1.1. Kochova metoda

- brojanje kolonija na agarnoj podlozi u petrijevci
- služi određivanju broja stanica

- prebrojavaju se petrijevke na kojima je broj kolonija od 25 do 300: ovaj raspon postigne se nasađivanjem više decimalnih razrijeđenja
- prebrojavanje se obavlja uz pomoć povećala
- broj kolonija odgovara broju bakterijskih stanica u uzorku samo ako se svaka kolonija razvila od jedne bakterijske stanice; zbog toga se broj kolonija označava kao broj jedinica koje tvore kolonije ili CFU (eng. colony forming units)

  *Broj CFU = broj kolonija / nasađeni volumen * recipročna vrijednost nasađenog decimalnog razrijeđenja*

Nasađivanje uzorka moguće je napraviti na tri načina:

a. Razmazivanjem uzorka po površini skrutnutog agara u petrijevci pomoću staklenog štapića savinutog pod 90°
b. Miješanjem uzorka sa tekućim agarom; postoje dvije inačice: u petrijevku se najprije doda uzorak pa agar; uzorak i agar se pomiješaju u epruveti pa potom izliju u petrijevku
c. Membranska filtracija – filter na kojem su se zadržale bakterije se prenese na površinu agara u petrijevci

4.2.1.2. MPN metoda (eng. Most Probable Number)

- služi za određivanje najvjerojatnijeg broja bakterija (kloriformnih)
- statistička metoda zasnovana na teoriji vjerojatnosti

4.2.1.3. Turbidimetrijska metoda

- broj bakterija se određuje usporedbom izmjerene optičke gustoće bakterijske suspenzije sa standardnom krivuljom

4.2.2. <u>Neposredno</u>

Za određivanje ukupnog broja bakterija (živih i mrtvih) direktnim promatranjem

4.2.2.1. Brojanjem u Petroff – Hauserovoj komorici

- brojanje se obavlja u komorici određenog volumena pomoću svjetlosnog mikroskopa, a pri povećanju od 400x u Th. komorici odnosno 1000x u P-H komorici.

4.2.2.2. Brojanjem nakon jednostavnog bojanja fluoroscentnom bojom

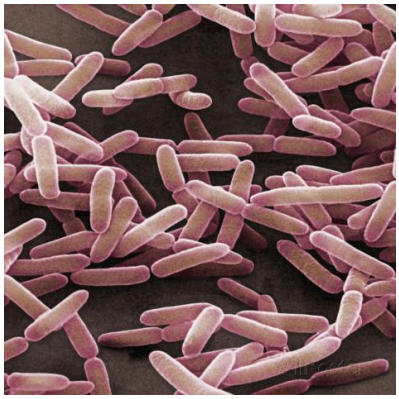
- brojanje se obavlja pomoću epifluoroscentnog mikroskopa
- bakterijske stanice se imobilizira na membrani uređaja za membransku filtraciju; oboja ih se fluoescirajućom bojom; promatra pod povećanjem 1000x ili više

5. Mikroorganizmi zaduženi za mobilizaciju fosfora u tlu

Najučinkovitiji mikroorganizmi koji se ubrajaju u skupinu fosfomobilizatora su među bakterijama: *Bacillus* i *Pseudomonas*, te među gljivama *Aspergilus* i *Penicillium*. Oni oslobađaju fosfor iz anorganskih spojeva, kao što je primjerice kalcijev fosfat.

5.1.Rod Bacillus

Štapićaste bakterije ili bacili (*lat. bacillus* – štapić) mogu biti različite duljine i promjera. Ako se nakon diobe štapići ne razdvajaju, zovu se diplobacili (u paru), streptobacili (lanac) ili palisade (poredani usporedno) (Saharan i Nehra, 2011). Vrste roda *Bacillus* su aerobi ili fakultativni anaerobi, mnogi od njih proizvode enzime i antibiotike. Efektivnost bakterizacije ovim rodom ovisi o vrsti i soju bakterija, hibrida kukuruza kao i godini istraživanja (Hajnal i sur., 2004). Bakterizacija sjemena kukuruza, s pojedinačnim i združenim sojevima *A. chroococcum* i *Bacillus megaterium*, izaziva povećanje mikrobiološke aktivnosti i povećanje prinosa hibrida kukuruza. Istraživanja pokazuju da je selekciju *A. chroococcum* i *B. megaterium* potrebno vršiti na nivou genotipa biljke, kako bi se za svaki hibrid odabrali najefektivniji sojevi. Primjenom bakterizacije u proizvodnji kukuruza može se dobiti jeftinija i ekološki visoko kvalitetna hrana. Rezultati istraživanja pokazuju da su ispitivani sojevi *A. chroococcum* i *B. megaterium*, pojedinačno i združeno, djelovali uglavnom stimulativno, povećavajući aktivnost dehidrogenaze u rizosfernom zemljištu (Hajnal i sur., 2004). Po Govedarici i sur. *(1999)* inokulacija sjemena kukuruza sa *B. megaterium* utječe pozitivno na dužinu, masu i sadržaj dušika u biljci kao i na sadržaj fosfora i dušika u tlu.



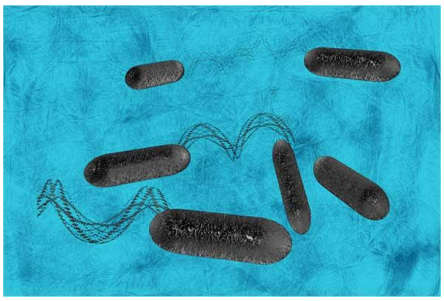
Slika 3. *Bacillus sp.*

http://www.allposters.com/-sp/Bacillus-Subtilis-is-a-Rod-Shaped-Gram-Positive-Bacteria-SEM-Posters_i9006275_.htm

U istraživanjima Yazdani i sur., (2009) utvrđeno je da bakterizacijom sa fosfat otapajućim mikroorganizmima (*PSM, Phosphate Solubilization Microorganisms*) i bakterijama koje potiču rast kod kukuruza značajno povećava porast kukuruza i prinos zrna, te da može smanjiti upotrebu fosfornih mineralnih gnojiva do 30%. Inokulacija sjemena kukuruza mikroorganizmima koji proizvodi fosfataze (*Bacillus, Pseudomonas, Azotobacter, Enterobacter, Serratia, Streptomyces*) utječe na aktivnost fosfomonoesteraza u njihovoj rizosferi, kao i na sadržaj ukupnog dušika i fosfora i na taj način na povećanje pristupačnog fosfora i prinosa biljaka.

5.2. Rod Pseudomonas

Pseudomonas fluorescens pripada štapićastim, asporogenim, Gram-negativnim bakterijama, koje su kao saprofitni oblici široko rasprostranjene u tlima i vodama. Promjer bakterije je 0,5-1,0 µm u dužinu, a rastu prilično brzo. Pokreću se uz pomoć jednog ili više polarnih bičeva (Migula, 1894). Ime ove bakterije dolazi od njegove proizvodnje topivog fluorescentnog pigmenta. Ovi mikrobi imaju više polarnih bičeva za promicanje i koriste siderofore za pomoć u prikupljanju željeza i borave oko korijena biljaka ili usjeva. Također, ove bakterije dobivaju određene hranjive tvari iz biljaka koje se nalaze u neposrednoj blizini, a za uzvrat, pomažu biljkama na nekoliko načina: uništavaju određene vrste toksina i zagađivača, uključujući stiren, policikličke aromatske ugljikovodike i trinitrotoluen (TNT). Također, mogu zaštititi biljke od uzročnika infekcija stvaranjem sekundarnih metabolita kao što su antibiotici i vodikov cijanid koji ubijaju druge bakterije i gljivice. Teoretski bi *P. fluorescens* mogla biti dobra alternativa sintetičkim pesticidima zbog svoje toksičnosti na ličinke i kukuljice vektorskih komaraca, dva glavna problema u poljoprivrednoj praksi. *Pseudomonas sp.* povećava topivost anorganskih oblika fosfora oko aktivne zone korijena, mobilizira fosfor i poboljšava tlak biljke i prinos za 15 – 29% (Migula, 1894). Pozitivno djeluju na sve poljoprivredne kulture, a vrlo su učinkovite kada se primjenjuju s rhizobium bakterijama.



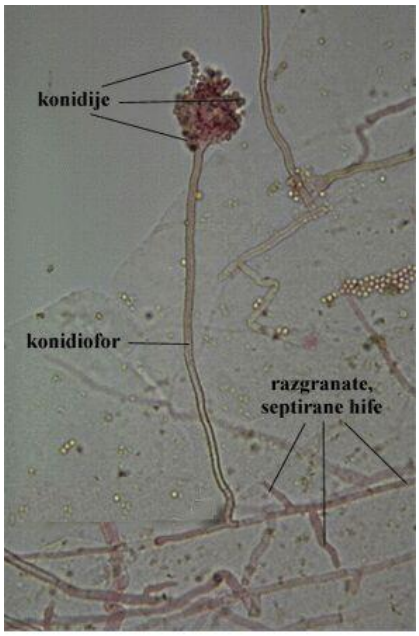
Slika 4. *Pseudomonas fluorescens*

http://organicsoiltechnology.com/pseudomonas-fluorescens-phosphate-solubilization.html

Prema istraživanjima Đorđević i sur. (2000) inokulacija sjemena kukuruza s *Pseudomonas* utječe pozitivno na dužinu biljaka, masu suhe tvari korijena i nadzemnog dijela biljke. Također, bakterizacija sjemena kukuruza utječe je na povećanje količine fosfora u korijenu, dok je u nadzemnom djelu biljke količina fosfora manja ili na nivou kontrole. Svi ispitani rodovi *Bacillus, Microococcus, Enterobacter, Serratia, Pseudomonas* i *Flavonobacterium* utječu na povećanje ukupnog fosfora u biljkama kukuruza, a povećanja preko 100 % u prosjeku izazvali su *Bacillus* (soj 26), *Pseudomonas* i *Flavobacterium*. *Pseudomonas sp.* posjeduju mnoge osobine koje ih čine dobrim biokontrolnim agensima (Weller, 1988). Te osobine su odlika sposobnosti da ubrzano rastu u proizvodnji in vitro, te se mogu brzo iskoristiti za masovnu proizvodnju (Weller, 1988). Proizvode i široki spektar bioaktivnih metabolita kao što su antibiotici, siderofori, hlapljive tvari. Prilagođavaju se stresnom okolišu i agresivno se natječu s drugim mikroorganizmima (Weller, 1988). Prema Kloepper i sur. (2004), primjena *Pseudomonas sp*. može povećati prinos biljke i za 144%.

5.3.Rod *Aspergillus* i *Penicillium*

Ova dva roda spadaju u porodicu *Aspergillaceae*. Plodonosna tijela imaju sitne, nadzemne i tipski građene kleistotecije. Peridija je građena od tijesno spojenih hifa. Konidionoše sa konidijama su obilno razvijene. *Penicillium* ima razgranate konidiofore, a gljive *Apergillus* proširenu konidioforu. Pod njihovim utjecajem razgrađuju se organske tvari u podlozi.



Slika 5. *Aspergillus spp.*

http://www.botanic.hr/praktikum/Aspergillus_sp3.htm



Slika 6. *Penicillium spp.*

https://en.wikipedia.org/wiki/Penicillium#

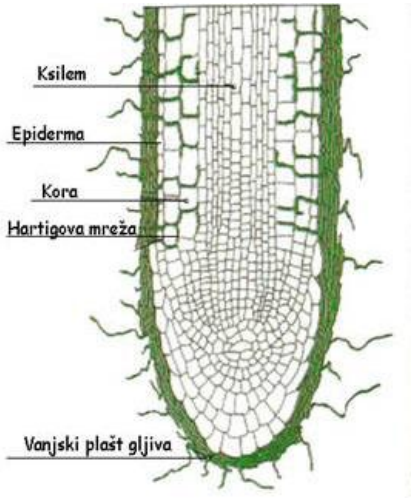
6. Mikorize

Prema Brunderttu (2009), mikorize su visoko razvijene, mutualističke zajednice između gljiva i korijenja biljaka u tlu. U doslovnom prijevodu naziv mikoriza znači "gljivino korijenje", te je najbolje prirodno rješenje za poboljšanje vegetacije i zdravlja biljaka. Mikoriza predstavlja simbiozu korijena i micelija mikoriznih gljiva, koja pojačava prehranu biljaka. Na taj način gljive imaju idealne uvjete za rast sa stalnom zalihom ugljikohidrata od biljaka, dok zauzvrat gljive snabdijevaju biljke fosforom i drugim mineralima koje selektivno upijaju iz tla te povećavaju površinu za uzimanje vode. Nadalje, gljive luče i hormone rasta koji potiču korijenje na rast i grananje, enzime koji omogućavaju uzimanje minerala iz organskih oblika i proizvode antibiotike koji pomažu u zaštiti biljke od patogenih gljiva i bakterija u tlu. Navodi se da je simbioza biljaka i gljiva jedna od evolucijskih prilagodbi koje je biljkama omogućila nastanjivanje tla, koje tada bilo siromašno hranjivim tvarima. U mnogim slučajevima tlo sadrži obilje nutrijenata koji se u tlu nalaze u oblicima koji su biljci nepristupačni, tu nastupa mikoriza sa sposobnošću mobilizacije i transporta hranjivih tvari.

Korjenove dlačice su većeg obujma za razliku od hifa koje su tanje i mogu ući u najsitnije pore u tlu te se povećava učinkovitost upijanja hranjivih tvari i vode. Zbog mogućnosti lakšeg primanja hranjiva iz tla mikoriza je vrlo važna za kruženje hranjiva u prirodi. Mosse (1975), je sugerirao da se mikoriza ne smije smatrati samo kao odnos biljka - gljiva, već kao odnos biljka-gljiva-tlo. Mikorize imaju važnu ulogu u razgradnji detritusa ali povećavaju i njegovu sposobnost uzimanja hranjiva iz tla, tako što prodiru u veći volumen tla i povećavaju ukupnu površinu biljke koja je aktivna za asimilaciju hranjiva. Mikorize imaju sposobnost skladištenja vode što omogućuje opskrbu biljke tokom sušnog razdoblja. Prednosti mikorize su zdraviji i gušći korijenski sustav, veći i brojniji urod, smanjenja potreba za zalijevanjem i gnojidbom, veća otpornost na sušu, smanjenja potreba za navodnjavanjem te zaštita od bolesti (Smith i Read, 2008). Postoje dvije glavne skupine mikoriza: ektomikoriza (za drvenaste biljke) i endomikoriza (za zeljaste biljke), te prijelazni oblik: ektoendomikoriza (Novak, 1998). U ektomikorizi micelij formira gust omotač oko korijena. Hife se šire iz tog omotača u tlo i znatno povećavaju upijanje vode i minerala. Također, hife urastaju u srž korijena ali ne probijaju njegove stanice, već tvore mrežu u međustaničnim prostorima koja omogućava izmjenu nutrijenata između gljive i biljke. U usporedbi s "običnim" korijenjem, korijenje s ektomikorizom je u pravilu gušće, veće i razgranatije. Takvo korijenje ne razvija dlačice koje bi bile suvišne uz veliku površinu micelija, jer se rizosfera povećava do 1000 %. Ektomikorize su vrlo važne u poljoprivredi i šumarstvu (Novak, 1998).

6.1.Ektomikoriza

Ektomikoriza prisutna je isključivo u drvenastim vrstama, posebno kod rodova *Pinus* i *Fagus*. Neki rodovi gljiva kao što su krasnice (*Russula*), pupavke (*Amanita*), vrganji (*Boletus*) i mliječnice (*Lactarius*) žive simbiotski. Oko korijena se nalazi "omotač" od micelija. Hife gljiva ne ulaze u same stanice, ali često oko njih čine Hartigovu mrežu. Ektomikoriza olakšava apsorpciju fosfata (Novak, 1998).



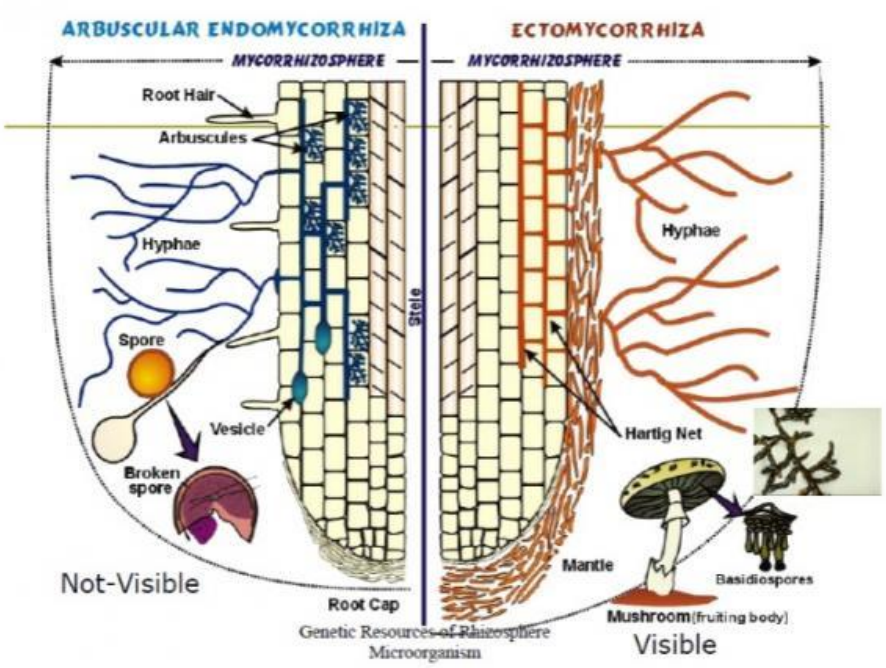
Slika 7. Ektomikoriza

http://paulovnija.hr/ektomikoriza/

6.2.Endomikoriza

Endomikroiza se razlikuje od ektomikorize po tome što nema gust omotač oko korijena (Novak, 1998). Takvo korijenje izgleda kao "normalno" s dlačicama i potreban je mikroskop da bi se vidjele sitne hife koje se šire iz korijena u tlo. Hife se šire unutar korijena ali ne probijaju membranu. Ovaj tip mikorize je puno češći od ektomikorize, pa ga nalazimo u simbiozi s više od 90% biljnih vrsta (Novak, 1998). Endomikoriza se javlja i kod drvenastih i kod zeljastih biljaka. Endomikorize imaju važnu ulogu u jačanju biljke, rastu i prinosu jer povećavaju opskrbu fosfora u biljci domaćinu te ujedno povećavaju i otpornost na stres i bolesti. Najčešći i najvažniji tip endomikorize je arbuskularna mikoriza (AM) ili vezikularno - arbuskularna mikoriza (VA). Uspostavljanje arbuskularne mikorize počinje izmjenom signala između gljive i biljke. Nakon toga dolazi do ekspresije gena za simbiozu te grananja hife i korijena. Kad hifa dođe do korijena na vrhu hife formira se apresorij, pomoću kojeg hifa ulazi u korijen sve do unutarnje kore gdje se u stanicama formiraju arbuskuli. Arbuskuli se koriste

za razmjenu hranjivih tvari između biljaka i gljive (Novak, 1998) ili grade strukture za skladištenje organskih tvari – vezikule (Smith i Read, 2008). Vezikule predstavljaju hipertrofirane nitaste tvorevine micelija, vrećastog oblika i nalaze se na vrhu hife. Samo 80% vezikularno-arbuskularnih mikoriznih gljiva tvore vezikule (Peterson i sur., 2004). One mogu biti intra ili intercelularno, a predstavljaju „organe“ za skladištenje rezervne hrane (Cayrol, 1991). Ektoendomikoriza predstavlja prijelazni tip mikoriza kod kojeg hife micelija obavijaju korijenje izvana, ali jednim djelom prodiru u stanice korijenja. To su specifične mikorize koje nisu toliko česte u prirodi kao ektomikorize i endomikorize (Novak, 1998). Neke od najvažnijih poljoprivrednih kultura koje tvore endomikorizu jesu: kukuruz, ječam, pšenica, raž, leguminoze, voćne vrste, vinova loza, maslina, krumpir, rajčica, luk, suncokret, duhan, kava, čajevac, kaučuk, kakao, banana. Vrste kao što su orhideja, borovnica ili brusnica ne mogu klijati, a ni rasti niti se razvijati bez prisustva mikroznih gljiva.



Slika 8 . Grafički prikaz endo- i ekto- mikroize

http://www.agroklub.com/sumarstvo/tlo-i-mikorizne-gljive/16246/

7. C/P odnos

Razumljivo je kako između sadržaja ugljika u tlu i organske frakcije fosfora postoji uska korelacijska veza. Organski oblici u tlu su manjim dijelom fosfolipidi, nukleinske kiseline (35-58 %) i heksafosforni ester inozitola fitin (41-49%). Intezitet mineralizacije organskog fosfora značajno ovisi o temperaturi i količini svježe organske tvari u tlu kao neophodnom izvoru energije za razvoj mikroorganizama. Slično mineralizaciji dušika, vrlo je važan omjer između ugljika i fosfora u organskoj tvari. Do imobilizacije fosfora dolazi ako je omjer C/P veći od 300:1, a do mobilizacije tek kad se omjer suzi na 200:1, stoga se opravdano smatra kako količina raspoloživog fosfora za ishranu bilja pretežito ovisi o sadržaju neorganskog fosfora u tlu.

8. Potencijal organskog fosfora u tlu

Fosfor je često slabo topljiv u tlu, a time i nedostatak fosfora u biljkama predstavlja glavnu prepreku u svjetskoj poljoprivrednoj proizvodnji. Biljka posjeduje mnogo potencijalnih mehanizama za povećanje unosa fosfora iz tla, uključujući i pojačano djelovanje transportnog sustava fosfora u membrani, povećani razvoj korjenovih dlačica, povećanje mikoriznih udruženja, otpuštanje fosfataza, promjene u građi korijena i otpuštanje organskih kiselina. Koncentracija biljkama pristupačnog fosfora u tlu usko je povezana sa kemijskim sastavom tla, uglavnom je to pH vrijednost tla. Zapravo, odnos frakcija anorganskog fosfora u tlu prvenstveno ovisi o pH, u kiselim tlima (posebno gdje je pH u KCl <5,5), željezo i aluminij su dominantni ioni, koji lako ulaze u kemijske reakcije sa fosfatnim ionima u tlu te formiraju Al – i Fe – fosfate, koji su biljci uglavnom nepristupačni oblici. U takvim kiselim tlima, organski fosfor ima veliki potencijal za ishranu bilja. Organski fosfor u tlu dio je više od 50 % ukupnog fosfora, uglavnom u obliku inositol penta- i heksa – fosfata vezanih za željezo i aluminij. Aktivnost enzima fosfataze je krucijalno za pristupačnost organskog fosfora u tlu, zato što većina biljaka može usvojiti fosfor isključivo u anorganskom obliku. Organski fosfor može biti otpušten kroz proces mineralizacije, putem organizama u tlu i korijenjem biljaka koje izlučuju fosfataze. Na ove procese utječe vlaga tla, temperatura, površinska fizičko – kemijska svojstva, pH tla i Eh (za redoks potencijal). Također, ukupni organski fosfor u tlu usko je povezan sa sadržajem organske tvari u tlu (Popović i sur., 2015).

9. Zaključak

Tijekom razvoja ekosustava i formacije tala, primarni mineralni izvori fosfora postaju sve više iscrpljeni. Anorganski oblik fosfora snažno je vezan za sekundarne minerale stoga je biljkama teško dostupan i ne ispire se iz tla. Kako je rijetko istraživano, malo je poznato o protoku oblika otopljenog organskog fosfora i njegove uloge u kruženju fosfora. Ipak, postoje dokazi da je otopljeni organski fosfor koji je sastavni dio organskih spojeva fosfora koje proizvodi biljka, kao što su fitati, manje pokretljivi i skloni sorpciji mineralne površine, dok spojevi koji su produkti mikroorganizama, kao što su nukleinska kiselina i jednostavni fosfomonoesteri mogu predstavljati veću pokretljivost oblika fosfora u tlu. U tlu iz organskog sloja, utvrđena je visoka enzimatska aktivnost monoestera koja ukazuje na visoku učinkovitost recikliranja i brzu hidrolizu labilnog otopljenog organskog fosfora. Otopljeni organski fosfor je dominantan oblik fosfora u otopinama tla na nekim mjestima, uz veći doprinos otopljenog fosfora zimi nego ljeti. Koncentracija otopljenog organskog fosfora smanjuje se duž gradijenta pristupačnosti fosfora, od manje prema više razvijenim šumskim ekosustavima (Brodlin i sur., 2016).

10. Popis literature

1. Bower, C.A. (1949): Studies on the Forms and Availability of Soil Organic Phosphorus Agricultural experiment Station Iowa State College of Agriculture and Mechanic Arts: Soils Subsection; Agronomy Section: 963-985.
2. Colville, W.L., Chairman, Kunze, G. W., Baker, D.G., Weibel, D.E., Dutt, G.R., Gorz, H.J., Stelly, M. (1977): Advances in Agronomy; Volume 29: 83-96.
3. Đorđević, S., Govedarica, M., Milošević, N., Jakovljević, M. (2000): Uticaj bakterijske inokulacija na biomasu C, P i aktivnost fosfataza u rizosferi kukuruza, EKO- KONFERENCIJA 2000, Zdravstveno bezbedna hrana, Tematski zbornik I, 359-364.
4. Đurić, S., Najdenovska, O., Đorđević, S., Mitkova, T., Markoski, M., (2004): Mikrobiološka kativnost u rizosfernom zemljištu različitih biljnih vrsta. Letopis naučnih radova, Godina 28 (2004), broj 1, 110-115.
5. Govedarica, M., Jeličić, Z., Jarak, M., Milošević, N., Stojnić, N., Rašković, D., Pavlović, M., (1999): Uticaj azotofiksatora i fosfomineralizatora na mikrobiološku aktivnost pod usevom kukruza. Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomika 5, 1, 115-121.
6. Hajnal, T., Jeličić, Z., Jarak M. (2004): Mikroorganizmi iz ciklusa azota i fosfora u proizvodnji kukuruza. Zbornik naučnih radova. Radovi sa XVIII savetovanja agronoma, veterinara i tehnologa Beograd, 43-55.
7. Hajnal-Jafari T. (2010): Uticaj inokulacije na prinos i mikrobiološku aktivnost u zemljištu pod usevom kukuruza. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
8. Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Naqvi, S. M. S., Rasheed, M. (2009): Phosphorus solubilizing bacteria for crop production. Published in J. Agric. Biol. Sci. 1(1):48-58.
9. Khan, S., Zaidi, A., Ahmad, E. (2014): Mechanism of Phosphate Solubilization and Physiological Functions of Phosphate-Solubilizing Microorganisms. Springer International Publishing Switzerland. ISBN: 978-3-319-08215—8, p 297.
10. Ozenc, N., Bender Ozenc, D. (2009): Interaction between available phosphorus and lime treatments or extremely acid pH soils of hazelnut orchards. Acta Horticulare (ISHS) 845: 379-386.

11. Popović, B., Lončarić, Z., Karalić, K., Semialjac, Z., Pećar, N. (2015): The potential of organic phosphorus in acidic soils of eastern Slavonia. Proceedings of the 9th International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH, Dubrovnik, 37-37.
12. Schnurer J., Rooswall T. (1982): Fluoroscein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter. Applied and Environmental Microbial 43(6):1256-1261.
13. Turner, B. L. (2008): Resource partitioning for soil phosphorus: a hypothesis. Volume 96, Issue 4, Pages 698-702 .
14. Vasilj, V., Redžepović, S., Bogunović, M., Babić, K., Sikora S. (2007): Mikrobiološke karakteristike različitih tipova tala zapadne Hercegovine. Agronomski glasnik 6, ISSN 0002-1954, 425-444 .
15. Vojnović, B., Bokić Lj., Kozina M., Kozina A. (2007): Optimiranje analitičkog postupka određivanja fosfata u deterdžentima i otpadnim vodama praonica, 147-157.

Knjige:

1. Đukić, D., Jemcev, V. T., Kuzmanova, J. (2007): Biotehnologija zemljišta, Čačak
2. Govedarica, M., Jarak, M. (1995): Mikrobiologija zemljišta, Novi Sad
3. Milaković, Z. (2013): Interna skripta opće mikrobiologije, Poljoprivredni fakultet u Osijeku
4. Tešić, Ž., Todorović, M. (1988): Mikrobiologija, četvrto izdanje, Poljoprivredni fakultet Beograd
5. Vukadinović, V., Lončarić, Z. (1988): Ishrana bilja, Osijek
6. Vukadinović, V., Vukadinović, V. (2011): Ishrana bilja, Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Jedinice s interneta:

1. http://download.bioon.com.cn/upload/month_1005/20100519_2394dd0f2aa5628af964jGTPH1poW7yK.attach.pdf
2. http://biologija.unios.hr/webbio/wp-content/uploads/2013/predavanja/mikrobiologija-bakteriologija.pdf
3. http://meetingorganizer.copernicus.org/EGU2016/EGU2016-16676.pdf
4. http://www.extension.umn.edu/agriculture/nutrient-management/phosphorus/the-nature-of-phosphorus/
5. http://www.agroklub.com/sumarstvo/tlo-i-mikorizne-gljive/16246/

6. http://www.obz.hr/hr/index.php?tekst=501
7. https://hr.wikipedia.org/wiki/Fosfor
8. http://www.bio-buducnost.com/mikoriza.html
9. http://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/1821-3944/2011/1821-39441102305M.pdf
10. http://www.inovativnaskola.eu/content.php?pagename=materijali
11. http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-2-587
12. https://www.researchgate.net/profile/Zakaria_Solaiman/publication/226626355_Measurement_of_Microbial_Biomass_and_Activity_in_Soil/links/54ff189e0cf2672e2241c49c.pdf
13. http://documents.tips/documents/seminarski-radovi-alge-1.html

11. Sažetak

Fosfor je element koji se pojavljuje kako u organskom tako i u anorganskom obliku, te je element biljne ishrane. Kao takav može potjecati iz minerala Zemljine kore te kao produkt razgradnje žive ili organske tvari. Ciklus fosfora u tlu sastoji se iz razgradnje fosfornih spojeva u tlu, njihovog usvajanja biljkama i ponovnog nastanka minerala tla. Sadržaj organske frakcije fosfora značajno ovisi o tipu tla, te pH vrijednosti tla. Mikroorganizmi koji imaju sposobnost oslobađanja fosfata, odnosno oslobađaju fosfor iz anorganskih spojeva primjerice, iz kalcijevog fosfata, nazivaju se fosfomobilizatori. Kakva će biti brojnost i zastupljenost ovisi o utjecaju ekoloških faktora, antropogeno djelovanje, tipa vegetacija i međusobnih odnosa unutar mikrobne populacije tla. Bakterije koje sintetiziraju fosfataze (*Bacillus*, *Pseudomonas*) naseljavaju korijen biljaka i značajno utječu na mineralizaciju organskih spojeva fosfora na njegovoj površini i mogu se koristiti u poljoprivrednoj proizvodnji kao zamjena fosfornih mineralnih gnojiva.

12. Summary

Phosphorus is an element that occurs in both the organic and the inorganic form, and as a plant nutritient element. As such it can be derived from the minerals of the Earth's crust, and as a product of the composition of organic or living matter. Cycle of phosphorus in the soil consists of the decomposition phosphorous compounds in soil, their plant asimilation and re-occurrence of minerals in soil. The content of the organic fraction of phosphorous significantly depends on the type of soil and pH soil value. Microorganisms that have abillity to release phosphate, or releasing phosphorus from inorganic compounds, such as calcium phosphate, are called phosphorous mobilizing bacteria. What will be the representation number depends on the impact of environmental factors, anthropogenic activity, type of vegetation and relationships within the microbial population of the soil. Bacterica which synthesize phosphatase (Bacillus, Pseudomonas) inhabited by root and significantly affect the mineralization of organic compound of phosphorous on the surface and can be used in agriculture as a substitute phosphorous fertilizers.

13. Popis slika

Slika 1. Prikaz razlike između gram pozitivne i gram negativne bakterije
Slika 2. Prikaz bojenja po Gramu. Ljubičasto obojene su gram pozitivne, dok su rozo obojene gram negativne bakterije
Slika 3. . *Bacillus sp*
Slika 4. *Pseudomonas fluorescens*
Slika 5. *Aspergillus spp*
Slika 6. *Penicillium spp*
Slika 7. Ektomikoriza
Slika 8. Grafički prikaz endo- i ekto- mikroize

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo, smjer Ishrana bilja i Tloznanstvo

Utjecaj mikrobiološke aktivnosti na pristupačnost organskog fosfora u tlu

Sanja Juzbašić

Sažetak

Fosfor je element koji se pojavljuje kako u organskom tako i u anorganskom obliku, te je element biljne ishrane. Kao takav može potjecati iz minerala Zemljine kore te kao produkt razgradnje žive ili organske tvari. Ciklus fosfora u tlu sastoji se iz razgradnje fosfornih spojeva u tlu, njihovog usvajanja biljkama i ponovnog nastanka minerala tla. Sadržaj organske frakcije fosfora značajno ovisi o tipu tla, te pH vrijednosti tla. Mikroorganizmi koji imaju sposobnost oslobađanja fosfata, odnosno oslobađaju fosfor iz anorganskih spojeva, primjerice iz kalcijevog fosfata, nazivaju se fosfomobilizatori. Kakva će biti brojnost i zastupljenost ovisi o utjecaju ekoloških faktora, antropogeno djelovanje, tipa vegetacija i međusobnih odnosa unutar mikrobne populacije tla. Bakterije koje sintetiziraju fosfataze (*Bacillus, Pseudomonas*) naseljavaju korijen biljaka i značajno utječu na mineralizaciju organskih spojeva fosfora na njegovoj površini i mogu se koristiti u poljoprivrednoj proizvodnji kao zamjena fosfornih mineralnih gnojiva.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Mentor: izv. prof. dr. Brigita Popović

Broj stranica:32
Broj slika:8
Broj literaturnih navoda:34
Broj priloga:0
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: fosfor, mikroorganizmi

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. prof. dr. sc. Suzana Kristek, predsjednik

2. izv. prof. dr. Brigita Popović, mentor

3. izv. prof. dr. Krunoslav Karalić, član

4. doc. dr. sc. Vladimir Ivezić, zamjenski član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1 d.

BASIC DOCUMENTION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Graduate thesis**
Faculty of Agriculture in Osijek
University Graduate Studies of Plant production, course Plant nutrition and Soil Science

The influence of microbiological activity to the organic phosphorous availability in the soil

Sanja Juzbašić

Abstract

Phosphorus is an element that occurs in both the organic and the inorganic form, and as a plant nutritient element. As such it can be derived from the minerals of the Earth's crust, and as a product of the composition of organic or living matter. Cycle of phosphorus in the soil consists of the decomposition phosphorous compounds in soil, their plant asimilation and re-occurrence of minerals in soil. The content of the organic fraction of phosphorous significantly depends on the type of soil and their pH soil value. Microorganisms that have abillity to release phosphate, or releasing phosphorus from inorganic compounds, such as calcium phosphate, are called phosphorous mobilizing bacteria. What will be the representation number depends on the impact of environmental factors, anthropogenic activity, type of vegetation and relationships within the microbial population of the soil. Bacterica which synthesize phosphatase (Bacillus, Pseudomonas) inhabited by root and significantly affect the mineralization of organic compound of phosphorous on the surface and can be used in agriculture as a substitute phosphorous fertilizers. Analysis of plant available phosphorous is obligate chemical analysis of soil fot the assessment of soil fertility and fertilizer recommendatitons, and in Republic of Croatia in use is the most common method AL.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek
Mentor: Ph.D. Brigita Popović

Number of pages:32
Number of figures: 8
Number of references:34
Number of appendices:0
Original in: Croatian

Key words: phosphorous, microorganisms

Thesis defenden on date:

Reviewers:
1. Ph.D. Suzana Kristek, professor

2. Ph.D. Brigita Popović, menthor

3. Ph.D. Krunoslav Karalić, associate professor

4. Ph.D Vladimir Ivezić, assistant professor

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kralja Petra Svačića 1d.