

# Mogućnosti primjene bakterije *Azotobacter chroococcum*

---

Škorvaga, Jasmina

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:375101>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Jasmina Škorvaga

Mogućnosti primjene bakterije *Azotobacter chroococcum*

završni rad

Osijek, 2014.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK  
PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

Nastavni predmet  
Opća mikrobiologija

**Mogućnosti primjene bakterije *Azotobacter chroococcum***

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Lidija Lenart

---

Student: Jasmina Škorvaga

MB:2608/05

Mentor: doc. dr. sc. Lidija Lenart

Predano:

Pregledano:

---

Ocjena:

Potpis mentora:

---

## SAŽETAK

### **Mogućnosti primjene bakterije *Azotobacter chroococcum***

*Azotobacter chroococcum* je bakterija koja ima sposobnost prevođenja dušika iz zraka u amonijak uz pomoć enzima nitrogenaza čime pribavlja biljkama neophodne hranjive tvari i poradi tog svojstva je jedan od potencijalnih sastojaka organsko-bioloških gnojiva čija uporaba čini budućnost organsko-biološke poljoprivrede. Osim toga bakterija *Azotobacter chroococcum* ima mnoge druge sposobnosti i kvalitetne osobine kao što su: proizvodnja fitohormona, produkcija siderofora, biološka kontrola patogenih gljiva i nemetoda, sposobnost degradacije, sposobnost uzajamnog djelovanja sa mikoriznim gljivama, sinteza alginata itd.

Ključne riječi: *Azotobacter chroococcum*, biološko gnojivo, fungicidno djelovanje, vezanje dušika iz zraka,

## SUMMARY

The possibilities of applications *Azotobacter chroococcum* bacteria

*Azotobacter chroococcum* is bacterium capable to convert nitrogen contained in air to ammonia by help of enzyme nitrogenase providing essential nutrients to the plants. Therefore it is one of potential components of organic-biological fertilizers whose utilization makes the future of organic – biological agriculture. Except that, bacteria *Azotobacter chroococcum* has many other capabilities and quality characteristic like as: production of phytohormones, siderophore production, biological control of pathogenic fungi and nematodes, capabilities of biodegradation, interactions with vesicular arbuscular mycorrhizas, sinteze of alginates etc.

Key words: *Azotobacter chroococcum*, biofertilizer, fungicide activity, nitrogen fixation.

## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	OPĆI DIO.....	3
2.1.	NUŽNE TVARI U ŽIVOTU BILJAKA.....	4
2.2.	KRUŽENJE TVARI U PRIRODI.....	8
2.2.1	KRUŽENJE UGLJIKA.....	8
2.2.2.	KRUŽENJE DUŠIKA.....	8
2.3.	MIKROBIOLOŠKA GNOJIVA.....	12
2.4.	BAKTERIJA <i>Azotobacter chroococcum</i> .....	13
2.4.1.	OPĆE OSOBINE BAKTERIJE <i>Azotobacter chroococcum</i> .....	13
2.4.2.	PRIMJENA BAKTERIJE <i>Azotobacter chroococcum</i> .....	16
2.4.3.	PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA S BAKTERIJOM <i>Azotobacter chroococcum</i> .....	19
3.	ZAKLJUČCI.....	24
4.	LITERATURA.....	25

# **1. U V O D**

*Azotobacter chroococcum* je bakterija koja je sposobna vezati dušik iz zraka i pomoću svog enzimskog sustava nitrogenaza reducirati molekularni dušik iz atmosfere do amonijaka i ostalih važnih spojeva što sadrže dušik (Beijerinck, 1901.). Zbog toga svojstva ona je interesantna kao potencijalni sastojak biološkog gnojiva (Šantek i Marić, 1995.).

Od svih biogenih elemenata dušik ima najvažnije hranidbeno djelovanje i nezamisliv je uzgoj bilo koje kulture bez tog elementa, a mikroorganizmi imaju središnju ulogu u korištenju dušika kao izvora života na zemlji ( Duraković, 1996.).

Obogaćivanjem zemlje amonijakom iz zraka smanjila bi se potrošnja umjetnih gnojiva i omogućio ekološki pozitivan uzgoj poljoprivrednih kultura. Racionalna gnojidba traži sve više informacija o stanju i pristupačnosti hranjiva u tlu. Tradicionalna uniformna gnojidba umjetnim gnojivima često dovodi do preobilne ili nepotpune gnojidbe tim važnim elementom. Preobilna gnojidba može uzrokovati povećano ispiranje nitrata, a time i nepotrebne troškove i onečišćenje okoliša. Nepotpuna gnojidba opet dovodi do smanjenja prinosa. Veća koncentracija nitrata predstavlja i potencijalnu opasnost po zdravlje čovjeka jer izaziva methemoglobinemiju. Zabrinutost znanstvenika započela je 1970. g. kada je profesor Paul Crutzen upozorio na mogućnost da dušikovi spojevi iz umjetnih gnojiva mogu oštetiti ozonski omotač (Deshmukh, 1998.).

Energetska kriza u svijetu nametnula je potrebu istraživanja, racionalizacije i supstitucije novih i obnovljenih izvora energije gotovo u svim područjima čovjekove gospodarske djelatnosti. Takav je slučaj i u proizvodnji mineralnih dušičnih gnojiva. Velik utrošak energije i njezina neobnovljivost u proizvodnji mineralnih dušičnih gnojiva, njihova visoka cijena proizvodnje kao i opasnost od onečišćenja životne sredine utjecala je na smanjenje primjene mineralnih dušičnih gnojiva u proizvodnji ekonomski značajnih biljaka (Jurić, 1998.).

Primjenom suvremenih mjera koje je poljoprivredna znanost razradila, a praksa posljednjih desetljeća prihvatila, postižu se visoki prinosi u proizvodnji kulturnog bilja. Međutim, ista ta znanost danas upozorava da se vrhunski rezultati proizvodnje i visoka biološka kakvoća proizvoda neće moći trajno postizati u poljoprivredi bez primjene organskih i bioloških gnojiva (Slamić, 1992.).



## **2. OPĆI DIO**

Otkrića dvojice mikrobiologa godine 1880. stvorila su osnovu današnjeg razumijevanja biogeokemijskih ciklusa koji čine temelj života na Zemlji. Martinus Beijerinck i Sergej Vinogradski prvi su dokazali kako bakterije sudjeluju u kruženju biogenih elemenata između tla i atmosfere (Duraković i Duraković, 2001.).

Temeljit preokret u shvaćanju životnih funkcija biljke značilo je Liebigovo djelo koje postavlja tvrdnju da samo anorganska priroda daje biljkama prvobitnu hranu (Supek, 1971.).

Dušik, kisik i ugljik (kao CO<sub>2</sub>) elementi su prijeko potrebni za život, a u atmosferi se nalaze u plinovitu stanju. U najvećem broju slučajeva mikroorganizmi pretvaraju te elemente u oblike upotrebljive za biljke i životinje. Budući da su čovjekovi izvori hrane i biljnog i životinjskog podrijetla, važno je poznavati i razumjeti biološka načela mikrobne flore, koja su povezana s biljkama i životinjama u njihovim prebivalištima, i njihovu ulogu u svakom pojedinom slučaju. Životinjski organizmi ne mogu iz anorganskih tvari sintetizirati organske tvari potrebne za izgradnju svog tijela i za održavanje životnih funkcija, nego ih primaju gotove u obliku hrane izravno ili posredno iz biljnog svijeta. Iako se katkada čini da su mikrobi opasni po naše zdravlje zato što inficiraju i razgrađuju biljke i životinje, uključujući i ljude, to nije njihova prvenstvena uloga u prirodi. Prema našem sadašnjem pogledu na život na ovom planetu, prvenstvena je uloga mikroba u prirodi njihovo neprekidno bivstvovanje (Duraković i Duraković, 2001.).

## **2.1. NUŽNE TVARI U ŽIVOTU BILJAKA**

Hranjive tvari u životu biljaka su određeni biogeni makro i mikro elementi koji su nužni za rast i razvoj biljaka. Prema značaju u građi i metabolizmu izdvajaju se ugljik, kisik, vodik, dušik, fosfor i sumpor zbog toga jer su oni građevni elementi organskih tvari u biljkama. Osim makroelemenata, za obavljanje životnih funkcija važni su i mikroelementi kao što su: kalij, kalcij, željezo, magnezij, mangan, kobalt, bakar, cink, molibden itd. Sve te elemente biljka prima iz zemlje u obliku mineralnih soli koje moraju biti topljive u vodi kako bi ih biljka mogla resorbirati (Lešić i sur., 2002.).

### **VODA**

Voda je kolijevka života na zemlji. Prvi život razvio se u vodi. Voda je biljci potrebna za sintezu primarne organske tvari - ugljikohidrata, naravno uz nužnu prisutnost ugljik (IV)-oksida, CO<sub>2</sub>. Voda biljci omogućava primanje drugih hranjiva u obliku vodenih otopina i obavlja cirkulaciju tvari u organizmu biljke. Pomoću korijena biljke se opskrbljuju vodom koja obično čini 75-90% sadržaja žive stanične tvari. U biljnoj je prehrani voda donor organogenih elemenata – vodika i kisika koji sudjeluju u procesima fotosinteze. U tim se procesima kisik oslobađa u molekulskom obliku O<sub>2</sub> i odlazi u atmosferu gdje služi za disanje svih aerobnih organizama (Lešić i sur., 2002.).

## UGLJIK

Ugljik je najvažniji strukturni element za sve životne oblike. Biljke ga koriste iz zraka u kojem se nalazi u obliku ugljik (IV)-oksida ( $\text{CO}_2$ ). Sav ugljik u sastavu stanica potječe od ugljičnog dioksida iz atmosfere i bikarbonata i karbonata otopljenih u vodi na zemljinoj površini (Šutić i Radin, 2001.).

Zelena biljka, pomoću klorofila iz čisto anorganskih tvari,  $\text{CO}_2$  iz zraka, vode koju dobiva iz zemlje i sunčeve energije sintetizira složene organske tvari: škrob, šećer i celulozu. To je izrazito fotokemijski proces za koji je potrebna svjetlost i toplina, a koje biljka dobiva od sunca. Ovaj proces je primarna biokemijska manifestacija žive tvari koja ima osnovno značenje za život na zemlji (Supek, 1971.).

## DUŠIK

Dušik je najčešći ograničavajući faktor za rast i proizvodnju biomase u svakoj okolini koja klimatski omogućava izvor života. Zemljina atmosfera je bogat izvor dušika gdje ga u formi  $\text{N}_2$  plina ima 78,1% volumno ili 75,5 % težinski. Međutim, u tom molekularnom plinovitu obliku dušik je neiskoristiv za mnoge organizme, jer trostruka veza među atomima ga čini inertnim. Neki mikroorganizmi vežu molekularni dušik u procesu vezanja dušika i pretvaraju ga u amonijak iz kojeg zatim nastaju organske tvari kao što su: aminokiseline, proteini, nukleinske kiseline i sl. (Šutić i Radin, 2001.).

Dušik tla je u obliku organskih i anorganskih spojeva. Organski dio sadržan je u humusu i nepotpuno razloženim biljnim, životinjskim i mikrobiološkim ostacima. Najveći dio dušika u tlu rezultat je aktivnosti mikroorganizama. To je najprije rezultat djelovanja onih mikroorganizama koji mogu vezati molekularni dušik iz atmosfere i graditi vlastitu organsku tvar, a zatim drugih nižih i na kraju viših organizama kada za njihove životne potrebe u tlu ima dovoljno dušika. Mineralni dio koji je potpuno raspoloživ za usvajanje, samo je mali dio ukupnog dušika tla uglavnom u količini koja je nedovoljna za dobru prehranu bilja. Mineralni oblici dušika u zemlji su:  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_2\text{OH}$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  i  $\text{NO}_2$  i zastupljeni su u manjoj količini nego organski. Biljke u prehrani koriste isključivo anorganski dušik u obliku amonijevog iona  $\text{NH}_4^+$  ili nitratnog iona  $\text{NO}_3^-$ . Amonijev ion je pogodniji zbog mogućnosti neposrednog ugrađivanja u organske tvari, dok se nitratni ion prvo mora reducirati do amonijaka. Kapacitet nekog tla za vezanje amonijaka određen je, prije svega, prisustvom glinenih minerala. Vezanje povećavaju  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$ . Proces vezanja amonijskog iona analogan je vezanju kalija u tlu, pa veće prisustvo ilita i vermikulita utječe na intenzitet te pojave (Vukadinović i Lončarević, 1997.).

## FOSFOR

Fosfor je mineralni element koji je nužan u fiziologiji biljnih stanica i nezamjenjiv u građi stanica svih živih organizama, jer je sastavni dio makroenergetskih spojeva adenzindifosfata (ADP) i adenzintrifosfata (ATP), ulazi u sastav koenzima koji sudjeluju u prenošenju vodika u oksiredukcijskim procesima, sudjeluje u procesima nasljeđivanja osobina i sintezi proteina jer se nalazi u sastavu DNK i RNK, sudjeluje u procesima metabolizma, fosforilacije, disanja, fermentacije, sastavni je dio kostura ljudi i životinja itd. Mikroorganizmi su bitni čimbenici u pripremi fosfora potrebnog

biljkama. Biljke mogu primiti fosfor jedino u oksidiranom obliku i to kao ion fosforne kiseline  $H_3PO_4$  koja disocira u vodi na ione  $H_2PO_4^-$ ,  $HPO_4^{2-}$  i  $PO_4^{3-}$ . U prehrani biljaka dostupni su samo oblici fosfora koji su topivi u vodi (Šutić i Radin, 2001). Sva naša tla su uglavnom siromašna fosforom. Rezervu fosfora u tlu čine fosfatni minerali i organski fosforni spojevi. Iz minerala se fosfor postupno oslobađa razgradnjom istih, a iz organskog dijela mineralizacijom (Supek, 1971.).

## KALIJ

Kalij je vrlo rasprostranjen element u prirodi, a potječe iz stijena i minerala na kojima se zemljište formiralo. Može se nalaziti i u glini, gdje je čvrsto vezan i u povoljnim uvjetima se postupno oslobađa. Kalij je jedan od prijeko potrebnih elementa u životu biljaka i mikroorganizama, ali nije konstitutivni element, jer ne ulazi neposredno u sastav organskih spojeva. Nakuplja se u stanicama klorofila biljaka u ionskom obliku ili je mobilno vezan za organske tvari. Biljke usvajaju ion kalija ( $K^+$ ) pomoću korijena iz zemljišne otopine, a i putem lista u folijarnoj prehrani. Kalij je najznačajniji elektrolit živih tkiva. Njegova uloga može se razvrstati u dvije osnovne funkcije:

- aktivacija enzima;
- regulacija propusnosti živih membrana.

Mehanizam usvajanja kalija funkcionira normalno samo kod dovoljne količine vode i kisika u supstratu. Budući da je aktivnost enzima ATP-aze stimulirana prisustvom kalija dolazi do boljeg usvajanja svih hranjiva, bolje je korištenje svjetlosne i kemijske energije u procesu fotosinteze itd. Kod primjene viših doza dušika kalij smanjuje štetne učinke ugrađujući ga u slabo topljive dušikove spojeve. Dobra opskrbljenost kalijem umanjuje posljedice suše, povećana je sinteza rezervnih tvari kao što su škrob, saharoza, lipidi i proteini, a time i kakvoća i prinos proizvoda (Vukadinović i Lončarević, 1997.).

## KALCIJ

Kalcij je zemno-alkalni metal koji ima sposobnost izgradnje kompleksnih spojeva, ali ne sudjeluje u građi žive tvari. Fiziološka funkcija mu je nasuprot tomu vrlo značajna te se ubraja u nužne elemente. Utječe na fizikalno-kemijska svojstva protoplazme, nespecifično aktivira dvadesetak enzima, te povećava stabilnost živih membrana i utječe na njihovu propusnost. Kalcij ulazi u red najrasprostranjenijih elemenata litosfere. Podrijetlo kalcija u tlu je iz primarnih minerala silicija i sekundarnih minerala kalcija kao što su: kalcit ( $CaCO_3$ ), dolomit ( $CaCO_3 \times MgCO_3$ ), gips ( $CaSO_4 \times 2H_2O$ ), različiti kalcijevi fosfati itd. Anorganske rezerve kalcija u tlima su prosječno 0,2-2,0%, a u karbonatnim tlima često prelaze 10%. U kiselim tlima znatno je manje kalcija te se u praksi vrlo često javlja potreba za kalcizacijom. Naime, ogromna je uloga kalcija u održavanju pH reakcije tla te tako posredno utječe na raspoloživost svih drugih elemenata, najviše B, Fe, Mn, Zn i Cu. Kalcij je vrlo važan za održavanje strukture tla jer omogućuje povezivanje njegovih čestica u strukturne agregate zajedno s humusnim tvarima pa tako snažno utječe na vodozračni režim tla i oksidoredukcijske procese, čime izrazito povećava njegovu biogenost – proces amonifikacije, nitrifikacije, biološko vezanje dušika, oksidaciju sumpora itd. Kalcij zagrijava zemljište i pogodno djeluje na rahlost zemljišta čime omogućuje nesmetanu dobavu kisika u dublje slojeve zemljišta. Uloga kalcija je značajna u procesima fotosinteze i disanja jer utječe na propustljivost elektrona i protona u staničnoj stijenci biljaka. Značajna

je i zaštitna uloga kalcija od toksičnosti suviška mikroelemenata uz povećanje otpornosti na povećan sadržaj soli u tlu (Vukadinović i Lončarević, 1997.).

## MAGNEZIJ

Magnezij je zemnoalkalna kovina koja je sposobna graditi kompleksne spojeve od kojih je klorofil od iznimna značenja. Vrlo je rasprostranjen element i čini 2,1% litosfere, a potreban je za veći broj procesa sinteze organske tvari, nužan za promet energije i rezervnih tvari. Pozitivno utječe na metabolizam ugljikohidrata, proteina, masti te zajedno s drugim kationima djeluje na koloide protoplazme i aktivira velik broj enzima: peptidaza, dehidrogenaza, karboksilaza, dekarboksilaza i dr. Kofaktor je gotovo svih enzima koji kataliziraju reakcije fosforiliziranih supstrata, te je neposredno uključen u metabolizam energije. U fotosintezi sudjeluje kao aktivni centar klorofila. U glikolizi nespecifično aktivira enolazu, a također djeluje na dekarboksilaze Krebsovog ciklusa (Vukadinović i Lončarević, 1997.).

Magnezij nije predmet proizvodnje u industriji mineralnih gnojiva, javlja se u punilu kao kalcij-magnezij karbonat tj, dolomit (Supek, 1971.).

Simptomi nedostatka magnezija vezani su uz razgradnju klorofila i pojavljuju se prvo na starijem lišću u obliku kloroze, a zatim i na mlađem lišću. Kod jačeg nedostatka lišće dobija prvo narančastu, zatim crvenu i violetnu boju, te konačno dijelovi lista prelaze u nekrotične površine, dok lisne žile ostaju zelene. Žita su osjetljiva na nedostatak magnezija posebice u fazi vlatanja kada imaju najveću koncentraciju kloroplastnih pigmenata. Deficit magnezija čest je na lakim, pjeskovitim tlima (Lešić i sur., 2002.).

## SUMPOR

Sumpor je sastavni dio biljnog tkiva i biljke ga trebaju približno koliko i fosfora. U mineralnim se gnojivima nalazi kao sporedni element u obliku sulfata u kojem ga biljke i uzimaju iz tla. S obzirom na to da se u zraku nalazi, često i u povećanim količinama kao sporedni proizvod pri sagorijevanju ugljena, nafte i plina, kao SO<sub>2</sub>, biljke ga uzimaju izravno iz zraka. Ako ga u zraku ima previše, javljaju se takozvane kisele kiše koje zakiseljavaju okoliš (Šutić i Radin, 2001.).

## OSTALI ELEMENTI

**Željezo** posredno ili neposredno sudjeluje u biosintezi klorofila, ima značajnu ulogu u disanju biljaka, nužna je komponenta, zajedno s **molibdenom**, aktivnog centra nitrogenaze, enzima koji katalizira biološko vezanje dušika. Oksidacijom dvovalentnog željeza neke bakterije, uključujući i *Azotobacter* vrste, izdvajaju željezo iz korjenova sistema i talože ga oko svojih stanica u obliku Fe(OH)<sub>3</sub>. Ovaj anorganski spoj veže se s organskim komponentama i u zemlji nastaju tzv. siderofore u obliku mrkih kapljica ili spirala. Nedostatne količine željeza uzrokuju bolesti biljaka od koje joj požuti lišće (Lešić i sur., 2002.).

Osim navedenih prijeko potrebnih elemenata u životu za rast biljke još su potrebni: **natrij, klor, silicij** i dvadesetak elemenata. koji sudjeluju u izmjenama tvari.

## ODNOS UGLJIKA NASUPROT DUŠIKU

C:N omjer predstavlja potencijal mineralizacije organske tvari u tlu. Omjer ugljika i dušika u biljnim stanicama iznosi 15:1, pa pravilnim izborom i miješanjem materijala treba taj odnos postići i u gnojivu, kompostu, ili zemlji, jer je u tom omjeru biljci najpristupačnije uzimati hranjiva (Znaor, 1996.).

## 2.2. KRUŽENJE TVARI U PRIRODI

### 2.2.1. KRUŽENJE UGLJIKA

U biosferi u kojoj autotrofni i heterotrofni organizmi žive zajedno događa se jedinstveni biološki ciklus u kojem autotrofi za sintezu organskih spojeva koriste atmosferski ugljični dioksid, a heterotrofni organizmi uporabom organskih spojeva autotrofa vraćaju ugljični dioksid u atmosferu. Potrošnja ugljičnog dioksida iz atmosfere je tako velika da bi ga zelene biljke mogle potpuno potrošiti za 50 godina, ako se on ne bi istodobno vraćao u atmosferu. Ravnoteža u potrošnji i proizvodnji ugljičnog dioksida je prirodni zakon koji regulira održavanje života na Zemlji. Tu mikroorganizmi imaju glavnu ulogu jer su u mogućnosti i stvarati organsku biomasu i razlagati je. Na taj način oni održavaju neprekidno kruženje ugljika u prirodi od anorganskog u organski oblik i obrnuto (Duraković, 1996.).

### 2.2.2. KRUŽENJE DUŠIKA

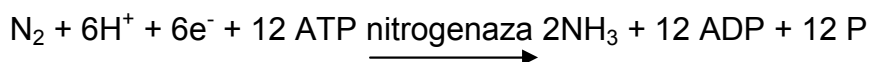
Zanimljiv prikaz kruženja dušika očevidan je na slici 1. Ciklus dušika se sastoji od dviju faza: **vezanja dušika** i **asimilacije dušika**.

#### Vezanje dušika

Vezanje dušika iz zraka može biti **biološko** i **nebiološko**. **Nebiološko** može biti prirodno i umjetno. Prirodno nebiološko fiksiranje dušika događa se pri sijevanju munja, a umjetno je osmislio čovjek i zove se Haber-Boschov postupak proizvodnje amonijaka (Supek, 1971.).

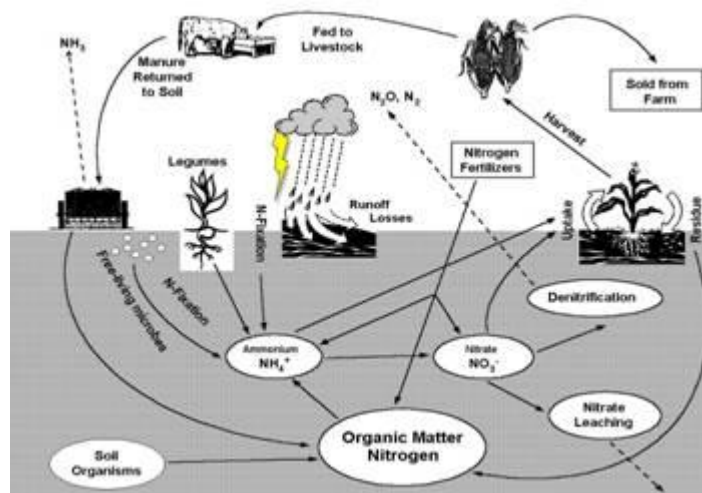
**Biološko** vezanje dušika je ekonomski veoma značajno jer priskrbljuje oko 55% ukupne količine dušika nužnog za uzgoj biljaka. Prvi je produkt vezanja dušika amonijak. On se ugrađuje u aminokiseline, a kasnije u proteine i nukleinske kiseline. Vežanje dušika znači redukciju molekuskog dušika iz atmosfere do amonijaka (NH<sub>3</sub>) i ostalih biološki važnih spojeva što sadrže dušik.

Reakcija vezanja dušika odvija se s pomoću bakterijskog enzimskog sustava, nitrogenaze i ATP. Sveukupna reakcija može se prikazati ovako, (Duraković, 1996.):



Biološko vezanje dušika može biti:

- NESIMBIONTSKO
- SIMBIONTSKO.



**Slika 1.** Kruženje dušika u prirodi

<https://www.google.hr/search?hl=hr&site=img&t=isch&source=hp&biw=1024&bih=614&q=kruženje+dušika+u+prirodi&oq=kruženje+dušika+&gs>

### Nesimbiontsko vezanje dušika

Velik broj cijanobakterija i bakterija koje žive u tlu i vodama, poznate su kao nesimbiontski fiksatori dušika. Tipični predstavnici te skupine su:

Samostalno živuće bakterije iz rodova:

*Azotobacter, Azotomonas, Bacillus, Clostridium, Desulfovibrio, Klebsiella, Nocardia, Pseudomonas, Rhodospirillum.*

Cijanobakterije iz rodova:

*Anabaena, Aphanizomenon, Chlorogloea, Nostoc, Stigonema, Trichodesmium.*

Nesimbiontski fiksatori dušika su mikroorganizmi koji nisu u neposrednoj vezi s višim biljkama, već koji žive slobodno u zemlji i vodi, a molekularni atmosferski dušik u svojim stanicama reduciraju do amonijaka kojeg koriste za izgradnju vlastitih staničnih sastojaka. Za taj način vezanja dušika mikroorganizmi koriste energiju iz pogodnog vanjskog izvora dobivenu oksidacijom organskih tvari, najčešće šećera. U prirodi ti mikroorganizmi često žive u blizini celulolitičkih mikroorganizama koji ih opskrbljuju jednostavnim ugljikohidratima (Vukadinović i Lončarević, 1997.) .

Ovisno o prisutnosti kisika u sredinama, slobodno vezanje dušika može biti:

- **anaerobno** i
- **aerobno.**

**U anaerobnom vezanju dušika** kao izvor energije najčešće služe monosaharidi čija se transformacija obavlja po tipu maslačne fermentacije, u kojoj se oslobođeni vodik koristi za redukciju dušika u amonijak. Mehanizam tog procesa odvija se na sljedeći način:

1.  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3-CH_2-CH_2-COOH + 2H_2 + 2CO_2$
2.  $N_2 + 3H_2 \rightarrow 2NH_3 + 92,2 \text{ J}$

Na ovaj način mikroorganizmi vežu dva do tri puta manje dušika nego u aerobnom vezanju dušika (Hardy i sur., 1973.).

U anaerobne fiksatore dušika pripadaju vrste bakterija iz roda *Clostridium* i to: *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum* i *Clostridium acetobutlicum*, zatim fototrofne crvene sumporne bakterije iz roda *Cromatium* i zelene sumporne bakterije iz roda *Chlorobium* i na kraju fakultativno anaerobne bakterije: *Enterobacter cloaceae*, *Klebsiella pneumoniae* itd. (Šutić i Radin, 2001.).

**Aerobno slobodno vezanje dušika** odvija se u životnim sredinama gdje ima dovoljno kisika u zraku, npr. dobro obrađivanim poljoprivrednim zemljištima i vodenim sredinama. U vezanju ovog tipa, za razliku od anaerobnog vezanja, nastaje više energije oksidacijom organskih tvari potrebne za redukciju dušika iz zraka.

Bakterije roda *Azotobacter* najjači su fiksatori dušika u prirodi. Tu pripadaju vrste: *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter beijerinckii*, *Azotobacter nigricans*, *Azotobacter americanus* i *Azotobacter paspali*. Porodici *Azotobacteriaceae* pored roda *Azotobacter*, pripadaju još i rodovi *Azotomonas*, vrste *Azotomonas agilis*, *Azotomonas insignis* i *Azotomonas maktocytogenes*)

U skupinu aerobnih fiksatora dušika pribrajaju se još i bakterije roda *Azospirillum*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Methylomonas*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, zatim gljive iz roda *Pullularia*, fotosintetske cianobakterije (plavo - zelene alge) od kojih su za poljoprivredna zemljišta značajni predstavnici rodova: *Anabaena*, *Nostoc* i *Tolypothrix* i druge cianobakterije: *Cylindrospermum*, *Gleotheca*, *Gleocapsa*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* i dr. (Šutić i Radin, 2001.).

U slobodnom vezanju dušika, sintetizirani dušični spojevi ostaju u stanicama živih mikroorganizama, nedostupni za biljnu prehranu sve dok mikroorganizam ne počne odumirati. Pritom se stanice razgrađuju i spojevi dušika podliježu procesu mineralizacije pri čemu se oslobađaju spojevi koje biljke mogu koristiti u prehrani (Gordon i Brill, 1972.).

### **Simbiotsko vezanje dušika**

Najveći je broj podataka o vezanju molekuskog dušika dobiven proučavanjem uzajamnog odnosa između nekih bakterija i leguminoza, biljaka poput graha, graška, djeteline i sličnih. Bakterije su u toj zajednici sve vrste roda *Rhizobium* i one su specifične za svaku biljnu vrstu s kojom se udružuju. Mikroorganizmi koji vežu dušik normalno žive u tlu, pa mogu prodrijeti u korijen leguminoze i stupiti u obostrano korisnu zajednicu. Preduvjet je za stvaranje te simbiotske zajednice da organizmi stupe u kontakt sa staničnim površinama. Bakterije se učvršćuju serijama kompleksnih interakcija i prodiru u korijenove dlačice biljke domaćina, gdje stvaraju lokalizirane kvržice ili nodule. Slobodan dušik, uhvaćen pomoću toga sustava nodula, biva pretvoren u amonijak. Iako postoje i ostali sustavi vezanja dušika, zajednica bakterija-leguminoza iznimno je djelotvorna u «hvatanju» dušika i jedan je od najvažnijih izvora dušika iz atmosfere (Duraković, 1996.).



Rod *Rhizobium* obuhvaća više vrsta koje su specifične za pojedine leguminozne biljke. Nodule bakterija osjetljive su na vanjske uvjete, posebice nedostatak vlage, a uništavaju ih i bakteriofagi (Redžepović i sur., 1997.).

### **Aktivnost nitrogenaze**

Proces vezanja dušika odvija se uz prisustvo nitrogenaze. To je enzimski kompleks koji se sastoji iz dva dijela:

1. dinitrogen reduktaze (molibdensko - željezni proteinski dio): veže dušik i reducira ga do amonijaka;
2. dinitrogenaza reduktaze (željezni proteinski dio): uz pomoć energije dobivene redukcijom dušika do amonijaka reducira prvi enzim - dinitrogen reduktazu.

Fe protein se prvo reducira uz pomoć elektrona koje donira feredoksin. Zatim reducirani Fe protein veže ATP i reducira molibden željezni protein koji daje elektrone dušiku  $N_2$  proizvodeći  $HN=NH$ . U dva sljedeća ciklusa ovog procesa  $HN=NH$  se reducira u  $NH_2-NH_2$  što daljnjom redukcijom prelazi u  $2 NH_3$ . Potrebna energija: 16 mola ATP po molu reduciranog  $N_2$ . Ovisno o tipu mikroorganizama reducirani feredoksin koji je izvor elektrona proizvodi se fotosintezom, respiracijom ili fermentacijom (Narula i Gupta, 1987., 1988.).

### **Asimilacija dušika**

Proteini što ih proizvode biljke, bivaju potrošeni i eventualno ponovno vraćeni u okoliš. Tijekom enzimatskih aktivnosti mikroorganizama organske molekule s dušikom razgrađuju se do amonijaka u procesima truljenja. Amonijak se stvara u procesu amonifikacije. Najveća količina amonijaka što je proizvedena pri truljenju pretvara se u nitrate ( $NO_3^-$ ) u dva reakcijska koraka. Kemosintetičke bakterije koje pripadaju rodu *Nitrosomonas* oksidiraju  $NH_3$  do nitrita ( $NO_2^-$ ). Nitriti se potom oksidiraju u nitrate pomoću bakterije iz roda *Nitrobacter*. Pojedine bakterije, primjerice *Pseudomonas* i neke gljive, upotrebljavaju dušikov atom iz nitrata kao akceptor elektrona i reduciraju ga u plinoviti dušik  $N_2$ . Pretvaranje u plinovite dušikove spojeve ili denitrifikacija zatvara ciklus dušika. Taj je proces dosljedno anaeroban (Duraković, 1996.).

## 2.3. MIKROBIOLOŠKA GNOJIVA

Mikrobiološka gnojidba je biološki proces u kojem se plodnost zemljišta ostvaruje neposrednim učešćem ili unošenjem u zemljište mikroorganizama koji svojom aktivnošću sudjeluju u pripremanju biljnih asimilativa i drugih biotičkih materija za potrebe biljaka. Aktivni čimbenici u mikrobiološkoj gnojidbi su živi organizmi i po tome se ona razlikuje od kemizacije i humizacije kojima se plodnost postiže unošenjem u zemljište mineralnih ili organskih tvari.

Mikrobiološka gnojidba može biti **prirodni i biotehnološki** proces. **Prirodna** mikrobiološka gnojidba javlja se u okviru postojeće životne zajednice – biocenoze. Sudionici su mikroorganizmi, članovi životne zajednice, koji svojom aktivnošću pribavljaju hranjive elemente za vlastitu prehranu i istodobno pridonose plodnosti zemljišta. U prirodnoj mikrobiološkoj gnojidbi, vodeće mjesto pripada biološkom vezanju dušika u kojoj mikroorganizmi koji žive u zemljištu i vodi vežu atmosferski dušik prevodeći ga pri tome u dostupne oblike za biljnu prehranu. Biološko vezanje dušika ima iznimno ekonomsko značenje, jer se njime opskrbljuje oko 55% ukupne količine dušika koja se biljkama stavlja na korištenje.

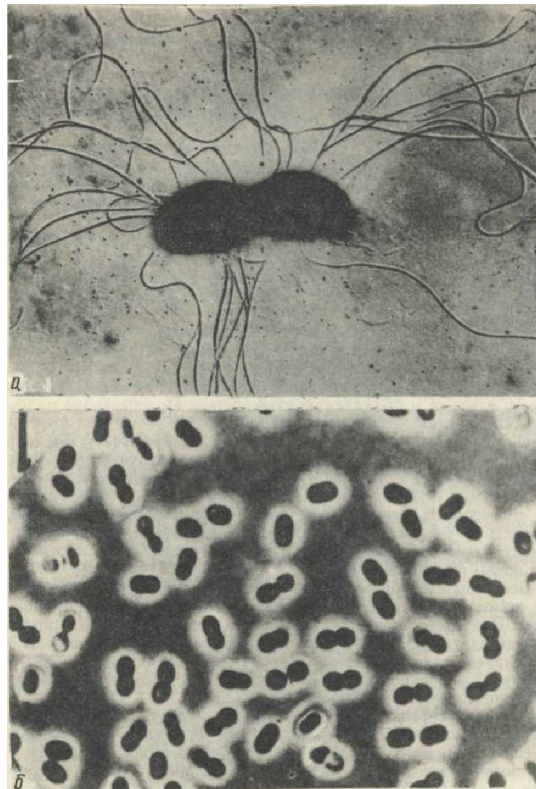
Za razliku od prirodne, **biotehnološka** gnojidba postiže se unošenjem u zemljište određenih kultura mikroorganizama, koji svojom aktivnošću pripremaju biljne asimilative i druge biotičke tvari potrebne biljci. Čiste kulture odabranih mikroorganizama pripremaju se u obliku posebnih bioloških preparata, koji se u zemljište unose pojedinačno ili zajedno sa sadnim materijalom. Čiste kulture mikroorganizama se umnožavaju u pogodnim hranjivim, tekućim ili čvrstim podlogama. U velikim količinama, njihovo umnožavanje obavlja se u fermentorima ili bioreaktorima, koji su opskrbljeni hranjivim supstratom, optimalnom temperaturom, aeracijom i povoljnom koncentracijom vodikovih iona. Za umnožavanje se odabiru aktivni sojevi mikroorganizama sposobni za aktivaciju mikrobiološkog procesa u zemlji s povoljnim utjecajem na biljni rast. Umnožene čiste kulture se zatim nacjepljuju na neki supstrat-nosač. Kvalitetan mikrobiološki pripravak treba sadržavati dovoljnu količinu mikroorganizama po jedinici težine tzv. mikrobiološki titar, kao i količinu koja se primjenjuje na određenoj površini zemljišta – tzv. hektarsku dozu. Primjena pripravka mora biti prilagođena tipu zemljišta i ekološkim uvjetima povoljnim za razvoj mikroorganizama koji se unose u zemljište. Unošenje stanica mikroorganizama u zemljište naziva se mikrobizacija zemljišta. (Šutić i Radin, 2001.).

## 2.4. BAKTERIJA *Azotobacter chroococcum*

### 2.4.1. OPĆE OSOBINE BAKTERIJE *Azotobacter chroococcum*

(Lenart, 2004.)

*Azotobacter chroococcum* je bakterija iz porodice *Azotobacteriaceae*. Porodica *Azotobacteriaceae* ima četiri roda. To su: *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia* i *Derxia* (Jensen, 1954.). Prvu i drugu vrstu iz roda *Azotobacter*, bakterije *Azotobacter chroococcum* i *Azotobacter agilis* otkrio je u Nizozemskoj Beijerinck 1901. godine. Zatim su redom izolirane sljedeće vrste: *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter beijerinckii*, *Azotobacter nigricans*, *Azotobacter paspali*, (Dobereiner, 1966.), *Azotobacter armenicus*, *Azotobacter salinestris*.



**Slika 2.** Mikroskopska slika bakterije *Azotobacter chroococcum*

<https://www.google.hr/search?hl=hr&site=img&tbm=isch&source=hp&biw=1024&bih=614&q=azotobacter+chroococcum>

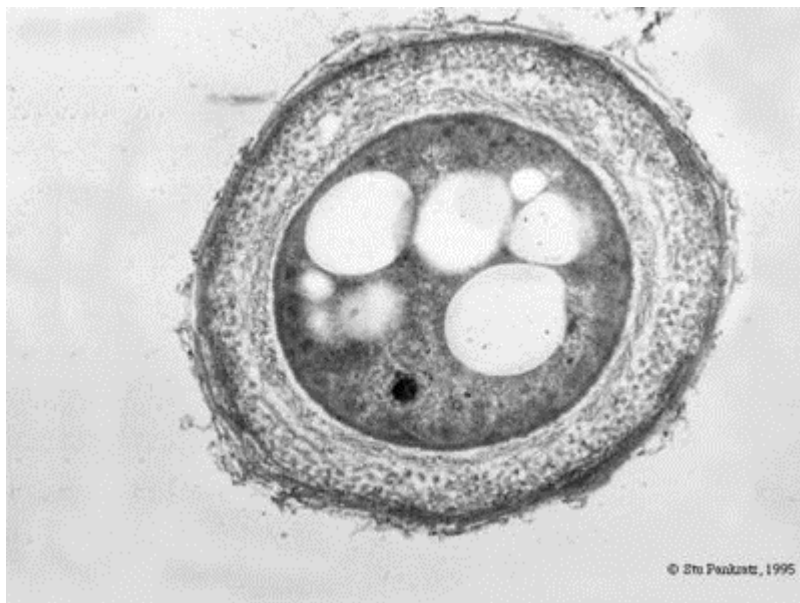
Bakterije iz roda *Azotobacter* su pleomorfne što znači da se morfološki mijenjaju u zavisnosti od uvjeta sredine. One mogu biti:

- u obliku kratkih tupih štapića veličine  $2 \times 4 \mu\text{m}$  (Winogradski, 1938.);
- okrugle stanice promjera  $2\text{-}3 \mu\text{m}$  koje se pojavljuju u nakupinama ili lancima;
- sitni tupi štapići ili okrugle stanice manje od  $1\mu\text{m}$ , a često se pojavljuju u parovima, (Winogradski, 1930.);
- veće stanice nepravilna vlaknasta oblika (Winogradski, 1938.);
- uspavane stanice zvane ciste okrugla oblika, metabolički neaktivne (Winogradski, 1938.).

Bakterija čije su osobine istraživane u ovom radu imala je izgled sitnih tupih štapića kraćih od  $1\mu\text{m}$  koji se pojavljuju u parovima. Na slici 2. vide se takve stanice koje su već prešle u oblik cista.

Bakterije vrste *Azotobacter chroococcum* su asporogene, gram negativne, heterotrofne i dosljedni su aerobi. Optimalna reakcija sredine za uzgoj bakterije *Azotobacter chroococcum* je neutralne vrijednosti, a optimalna temperatura varira od  $25\text{-}30^\circ\text{C}$ . U ostarjelim kulturama stanice *Azotobacter chroococcum* proizvode netopivi crni pigment melanin (Narula, 2000).

*Azotobacter chroococcum* ne proizvodi endospore, ali formira debelo obrubljene ciste (slika 3) kao dio njezinog životnog ciklusa. Ciste su stanice u fazi mirovanja. Nastaju iz vegetativnih stanica kada se bakterija nađe u nepovoljnim uvjetima. Svrha stvaranja cista je preživljavanje isušivanja, nedostatka hranjiva i mehaničkih oštećenja. Kada se stanica prevede u oblik ciste u njoj se zaustavljaju svi metabolički procesi. Mogućim dolaskom u povoljne uvjete bakterija opetovano prelazi u stanje vegetativne stanice. Bakterijske stanice u stanju cista pokazuju veliku otpornost na djelovanje kemikalija. Ciste sadržavaju velike količine kalcija, ali ne i dipikolinske kiseline. Kalcij je taj koji omogućuje otpornost na isušivanje. Dok su u stanju cista, stanice ne mogu fiksirati dušik.



**Slika 3.** Bakterija *Azotobacter chroococcum* u stadiju ciste

<https://www.google.hr/search?hl=hr&site=img&tbm=isch&source=hp&biw=1024&bih=614&q=azotobacter+chroococcum&oq=azotobacter+chroococcum>

Nastanak cista odvija se u 3 faze:

1. stanice gube flagelarne pokretače;
2. mijenjaju oblik iz ovalnog u okrugli;

3. stvaraju debeli omotač načinjen od:

- unutrašnjeg omotača, intine koga čine lipidi i ugljikohidrati;
- vanjskog omotača, koga čine lipoproteini i lipopolisaharidi.

U središnjem dijelu ciste smještene su velike granule polihidroksibutirata (PHB) koje služe kao rezervna tvar za prelazak sa aerobnog na anaerobni metabolizam. U omotaču ciste koji se naziva i kapsula nalazi se stanična sluz načinjena od polisaharida i glavnog sastojka alginata koji je odgovoran za mehaničku otpornost cista. Kapsula načinjena od alginata priječi ulazak kisika u stanicu. Očevidno je da je kvaliteta, a ne kvantiteta alginata mjerodavna za zaštitu nitrogenaze. Proces stvaranja cista je polagan, traje oko 36 sati (Narula, 2000.).

Optimalna temperatura za biosintezu alginata je 12-18 °C. Dodatak metalnih kationa, saharoze i n-butanola u hranjivu podlogu može izazvati stvaranje cista (Narula, 2000.)

Mnogi znanstvenici diljem svijeta već dugi niz godina proučavaju bakteriju *Azotobacter chroococcum*, tako da primjerice u Indiji postoji i standard o uzgoju i nacijepeljivanju bakterije *Azotobacter chroococcum*, Prema uputama indijskog standarda ovu bakteriju je moguće uzgojiti u bezdušičnim tekućim podlogama u koncentracijama većim od  $10^{13}$  mL<sup>-1</sup> živih stanica, koje se na čvrstim nosačima mogu održati dulje od 6 mjeseci. U Indiji se također preporučuje proizvodnja tekućeg biološkog gnojiva koje sadržava  $10^{11,5}$  mL<sup>-1</sup> stanica bakterije *Azotobacter chroococcum* u obliku cista radi njihova duga vijeka trajanja i održivosti preko 25 mjeseci pri temperaturama od 4°C pa sve do 42°C. (Narula, 2000.). Najvažnija osobina bakterije *Azotobacter chroococcum* je sposobnost vezanja slobodnog dušika iz zraka pomoću enzima nitrogenaze pri uzgoju na podlogama bez izvora dušika uz nužno prisustvo organskog ugljika kao izvora energije, a to mogu biti: glukoza, saharoza, neki alkoholi, organske kiseline, i sl. Bakterije ove vrste imaju najveću respiratornu aktivnosti jer su sposobne vezati i do 30 mg dušika iz zraka pri oksidaciji 1 g ugljikohidrata. Za aktivnost enzima nitrogenaze nužno je prisustvo molibdena ili vanadija koji mogu biti zamijenjeni i željezom (Narula i Tauro, 1986). Azotobakterije su ispitivane zbog vezanja dušika. Međutim, usprkos vrlo velikom broju eksperimentalnih podataka, uključujući stimulaciju razvoja biljaka, točan mehanizam djelovanja azotobakterija kojim utječu na rast biljke nije dovoljno razjašnjen. Moguća su četiri različita mehanizma:

1. vezanje dušika;
2. predavanje dušika biljci;
3. proizvodnja biljnih hormona koji mijenjaju morfologiju i uzrokuju rast biljke;
4. bakterijska redukcija nitrata koja povećava akumulaciju dušika u inokuliranoj biljci (Narula, 2000.).

Na osnovu svojih istraživanja za uzgoj bakterije *Azotobacter chroococcum* mnogi znanstvenici (Jensen, Brown, Winogradski) preporučuju selektivne bezdušične podloge.



**Slika 4.** Porast sluzavih kolonija bakterije *Azotobacter chroococcum* na Brown-ovoj bezdušičnoj podlozi.

<https://www.google.hr/search?hl=hr&site=img&tbm=isch&source=hp&biw=1024&bih=614&q=azotobacter+chroococcum>

#### **2.4.2. PRIMJENA BAKTERIJE *Azotobacter chroococcum***

Bakterija *Azotobacter chroococcum* koristan je zemljišni mikroorganizam koji ima pozitivan utjecaj na rast i razvoj biljaka. Njezina prisutnost u zemlji označava plodnu i obrađivanu zemlju. U šumskom zemljištu gotovo da je i nema. U neobrađenom i toksičnom zemljištu također nije prisutna. Njezin broj u obrađivanom zemljištu se kreće od nekoliko tisuća do nekoliko desetaka tisuća u gramu zemljišta (Narula, 2000.).

##### **Vežanje dušika iz zraka**

U klimi umjerenog pojasa mikroorganizmi u jednoj godini vežu 20-40 kg dušika iz zraka po hektaru. Izračunato je da se na čitavoj površini Zemlje za godinu dana veže oko  $10^{11}$  kg dušika iz zraka. Najveći dio vezanog dušika dostupan je biljkama tek nakon uginuća i liziranja stanica bakterija. Mnogi autori pokušali su praktično primijeniti to svojstvo vežanja dušika iz zraka putem *Azotobacter chroococcum*, te njen vrlo važan pozitivan učinak u proizvodnji koji ističe Narula, (2000.).

##### **Proizvodnja biljnih faktora rasta**

*Azotobacter chroococcum* luči biljne faktore rasta kao što su: giberalini, citokinoni, indol octena kiselina itd. (Narula, 2000.).

Fiziološki aktivne tvari su one koje u određenim uvjetima imaju isti stimulacijski ili inhibicijski učinak na fiziološke i biokemijske procese u biljci, a što rezultira

metabolitskim i morfološkim promjenama. Fitohormoni ili biljni hormoni su regulatori procesa rasta i razvitka, a dijele se u 5 grupa: auksini, giberelini, citokinini, abscisinska kiselina (ABA) i etilen.

Najvažnija fiziološka uloga citokinona je:

- stimuliranje diobe stanica;
- sudjelovanje u diferenciranju stanica i formiranju organa;
- reguliraju promet tvari organa koji više ne rastu;
- sprečavaju gubitak klorofila;
- utječu na sintezu RNA u stanicama;
- povećavaju otpornost biljaka na visoke i niske temperature;
- povećavaju otpornost na gljivična oboljenja.

Najvažniji fiziološki učinci giberelina su u:

- rastu biljaka;
- sintezi alfa amilaze i aktivnosti pojedinih enzima pri klijanju;
- razvoju ploda;
- utjecaju na broj i morfologiju listova;
- ubrzanju rasta korijena i stabljike;
- poboljšavanju cvatnje i oplodnje.

Auksini su hormoni koji djeluju stimulacijski na rast i razvoj biljaka, a ustanovljeno im je i herbicidno djelovanje. Najznačajniji auksin je indol-3-octena kiselina (IAA). (Vukadinović i Lončarević, 1997)

### **Biološka kontrola patogenih gljiva i nematoda**

Zemljišne gljive, najčešći nametnici na zrnju ječma (*Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium* itd.) izazivaju lošu humifikaciju, tj stvaraju nepovoljne oblike kao što su: krenska i apokrenska kiselina, čime pojačavaju kiselost zemljišta što se nepovoljno odražava na rast azotofiksacijskih i nitrifikacijskih bakterija.

Antagonističko djelovanje bakterije *Azotobacter chroococcum* na fitopatogene gljive proučavali su mnogi ali nije razjašnjeno uzrokuju li to siderofore ili antibiotici. Bakterija *Azotobacter chroococcum* ima i fungistatično djelovanje. Naime, ona promovira rast biljke u početnom stadiju time što inhibira razvoj *Fusarium.sp.*, *Alternaria sp.* i *Penicillium sp.* koji su vrlo često prisutni na sjemenu i sintetiziraju brojne toksične sastojke (Narula, 2000.).

### **Proizvodnja siderofora**

Siderofore su spojevi niske molekularne mase koje nastaju pri nestašici željeza, a služe kao prenosioci Fe (III) u mikrobnim stanicama. U dodatku izvornog željeza za proizvodnju stanica siderofore mogu djelovati kao faktori rasta i u nekim slučajevima kao potencijalni antibiotici. Željezo je četvrti po važnosti element zemljine kore i prijeko je potrebno za rast svih živih bića. Također je važan sastojak enzima kao što su peroksidaze, katalaze, hidrogenaze i ključnih elemenata u vezanju dušika, hidrogenaza i dinitrogenaza reduktaze (Narula, 2000.).

## **Međusobno djelovanje bakterija roda *Azotobacter* i mikoriznih gljiva**

Mikoriza je uzajamna ovisnost fotoautotrofnih biljaka i gljiva i predstavlja jednu od najvažnijih ali još nedovoljno razjašnjenih bioloških zajednica koja regulira, a time i omogućuje pravilno funkcioniranje ekosistema. Mikoriza je simbiotska zajednica gljiva i viših biljaka u kojoj su hife gljiva invadirane u korijen biljke i potpomažu usvajanje vode i hranjiva. Mikoriza može biti:

- infektivna (endomikoriza i ektomikoriza);
- neinfektivna (Vukadinović i Lončarević, 1997.).

Mikorizne gljive opskrbljuju bakterije roda *Azotobacter* fosforom, a zauzvrat uzimaju vezani dušik (Brown i Carr, 1984.). Ishac i sur. (1986), tvrde da dvojna inokulacija pšenice s azotobakterijama i mikoriznim gljivama pojačava aktivnost nitrogenaze u svim stadijima rasta pšenice u usporedbi s pojedinačnom inokulacijom. (Narula, 2000.).

## **Sinteza alginata**

Bakterije iz roda *Azotobacter* imaju još jednu pozitivnu osobinu. One stvaraju ekstracelularnu tvar sluzave ili želatinozne prirode. Ta tvar može stajati čvrsto priljubljena kao sloj oko stanice i naziva se kapsula ili se može slobodno odijeliti od stanice pa se naziva sluz ili gumasta masa i služi kao sirovina za proizvodnju biološki razgradivih plastičnih masa.

Optimalna temperatura za stvaranje alginata je 12-18 °C. Dodatak metalnih kationa, saharoze i n-butanola u hranjivu podlogu, može izazvati stvaranje cista. (Narula, 2000.).

## **Ostale mogućnosti primjene bakterije *Azotobacter chroococcum***

Osim navedenih svojstava, bakterije iz roda *Azotobacter* imaju sposobnost:

- biološke razgradnje pesticida (lindana), fenolnih spojeva i sl. (Gupta i Narula, 1996.);
- otapanja fosfata (Kumar, 1998.);
- proizvodnje enzima (Narula, 2000.);
- proizvodnje vitamina B<sub>12</sub> i C vitamina (Sankaram i Sundara, 1962.);
- primjene u ribnjacima za hranidbu riba; (Narula, 2000.)
- povećavanje sadržaja planktona u vodi (Narula, 2000.).

Osobine i mogućnosti primjene bakterije *Azotobacter chroococcum* su neiscrpan izvor za istraživanje mnogim znanstvenicima (Lenart, 2004.)



### 2.4.3. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA S BAKTERIJOM *Azotobacter chroococcum*

Prirodno stanište bakterije *Azotobacter chroococcum* je zemlja koja je bogata organskim tvarima (Gordon, 1981.).

Normalna populacija bakterija porodice *Azotobacteriaceae* u zemlji u različitim dijelovima svijeta je uglavnom ispod  $10^4 \text{ g}^{-1}$ . Izuzetak je visok sadržaj *Azotobacter chroococcum* u dolini Nila  $10^7 \text{ g}^{-1}$  (Abd-el-Malak, 1971.).

*Azotobacter chroococcum* raste intenzivnije u zoni oko korijena biljke nego u samoj zemlji (Dey, 1973.). Ovaj podatak upućuje na činjenicu kako korijenje otpušta hranjive tvari koje pospješuju rast ove bakterije. Rovira (1965.) skreće pažnju kako veličina populacije *Azotobacter* vrste u zemlji i oko biljke ovisi o vrsti uzgajane biljke. Pojačano vezanje dušika u rizosferi biljke *Ammophila arevariae* pripisuje se združenom učinku bakterija roda *Azotobacter* sa korijenom biljke. Dokazano je kako bakterija *Azotobacter chroococcum* obitava i u parenhimskim stanicama lišća i korijenja (Tippanahnavar i Ramachandra, 1989.). Bakterija *Azotobacter chroococcum* je izolirana iz rizosfere tropskih trava i mnogih biljaka Južne Afrike, sa Srednjeg Istoka i Zapadne Australije (Dobereiner, 1974.).

Vrlo velika populacija bakterije *Azotobacter chroococcum* ustanovljena je u mravinjacima i termitnjacima. To je stoga što mravi i termiti razgrađuju organsku tvar celulozne prirode te na taj način stvaraju hranidbeno bogat okoliš za rast i umnožavanje ove bakterije (Boyer, 1971).

Istraživanja Garga (1998.) upućuju na činjenicu kako *Azotobacter chroococcum* raste i u vodenim sredinama jezera i ribnjaka. U uvjetima in vitro u inokuliranoj vodi bakterija *Azotobacter chroococcum* umnožila se za 30 dana četverostruko u odnosu na početni broj, tj sa  $2,67 \times 10^4 \text{ CFU mL}^{-1}$  na  $9,51 \times 10^4 \text{ CFU mL}^{-1}$ . U isto vrijeme smanjila se količina otopljenog kisika u vodi sa  $9,6 \text{ mg L}^{-1}$  na  $6,6 \text{ mg L}^{-1}$ .

Mishustin i Naumova (1962.) su mišljenja kako optimalna temperatura rasta bakterije *Azotobacter chroococcum* ovisi o geografskom području u kojem je prisutna. Primjerice, u Indiji ova bakterija optimalno raste pri 35-40 °C. Minimalna temperatura za rast i razmnožavanje bakterije *Azotobacter chroococcum* je 10 °C, ispod 5 °C može preživjeti ali se ne razmnožava (Jensen, 1954.).

Mrkovački i sur., (2000) proveli su istraživanje održivosti bakterije *Azotobacter chroococcum* pri različitim temperaturama u svrhu industrijskog piliranja sjemena šećerne repe bakterijskom biomasom. Dokazali su kako neki sojevi ove bakterije izolirani iz rizosfere šećerne repe preživljavaju 30 minutno djelovanje temperatura od 40 °C, 50 °C pa čak i 60 °C i to u koncentraciji  $10^{13}$ - $10^{19}$  živih stanica u mL.

Šantek i Marić u svojim istraživanjima 1995. godine dokazali su dobar rast i sposobnost vezanja dušika iz zraka pri temperaturi 30 °C, dok su pri 20 °C ustanovili kako je rast bakterija vrste *Azotobacter chroococcum* znatno smanjen, uz primjetno povećanje stvaranja cista. Becking (1991.) i Green (1932.) zaključili su kako

*Azotobacter* vrste pokazuju najbolji rast na onim temperaturama koje inače vladaju u okolišu iz kojeg su izolirane.

Transport amonijaka kroz citoplazmenu membranu bakterije *Azotobacter chroococcum* ima glavnu ulogu pročišćivača okoline i održavanja povoljnog unutarstaničnog sadržaja. Gotovo sav dušik koji dospije u stanicu prelazi u amonijak ili u glutamat, tj početnu tvar za sintezu aminokiselina, nukleinskih kiselina i proteina. Vezani dušik zadržava se u stanicama azotobakterija sve dok one ne uginu i ne raspadnu se. Nakon oslobađanja proteina, peptidoglikana i nukleinskih kiselina u okolinu nužno je razgraditi navedene makromolekule do amonijaka uz pomoć ekstracelularnih enzima i amonifikacionih procesa (Merrick, 1988.).

U svojim istraživanjima Chahal i Chahal (1986.) dokazali su kako bakterija *Azotobacter chroococcum* potpuno sprečava liježenje mladunaca iz jaja korijenovih nematoda ako se jajašca drže devet dana u tekućoj kulturi bakterije koja sadržava  $10^6 \text{ mL}^{-1}$  živih stanica.

Pri temperaturi od 30 °C i 50 % - tnoj vlažnosti zemlje ustanovljena je maksimalna razgradnja lindana (2,4-D) ako je zemlja nacijepljena bakterijom *Azotobacter chroococcum* (Balajee i Mohadevan, 1993), (Gahlot i Narula, 1996). *Azotobacter chroococcum* izolirana iz tla koje je obogaćeno zaoravanjem slame sposobna je rasti na fenolnim spojevima kao izvorima ugljika (4-hidroksi benzojeva kiselina, rezorcinol, pirokatehol i vanilinska kiselina), što je također dokaz sposobnosti biološke razgradnje (Weiser i sur. 1994.).

Uzgojem mješovite kulture bakterija *Azotobacter chroococcum* i *Coprinus fimetarius* na pšeničnoj slami u bioreaktoru za uzgoj na čvrstim supstratima povećao se sadržaj proteina za 16,1%. (Singh i sur., 1994.).

Toksičnost otpadnih voda nakon prerade maslina smanjuje se za 30% ako se u otpadnu vodu nacijepi bakterija *Azotobacter chroococcum*. (Borja i sur., 1993).

Nakon tretmana sjemena rajčice sintetskim biljnim hormonom  $\text{GA}_3$  biljke rajčice jednako su se razvijale kao kada je sjeme tretirano bakterijskom biomasom *Azotobacter chroococcum* (Brown i sur., 1968.).

Umjetno zaražene sjemenke kukuruza s plijesnima *Alternaria* vrste, dale su za 30% smanjen urod. Nakon njihove bakterizacije s bakterijom *Azotobacter chroococcum* urod je bio 100 %-tan (Mallikarjunaiah i Bhide, 1981.).

Osam vrsta plijesni izoliranih iz rizosfere pri uzgoju pšenice tretirano je bakterijom *Azotobacter chroococcum*. Nakon toga ustanovljeno je smanjeno stvaranje spora plijesni u količinama od: 3,2% kod *Aspergillus flavus*; 2,8% kod *Aspergillus phenecis*; 19,2% kod *Fusarium equiseti*; 13,9% kod *Fusarium oxysporum*; 3,1% kod *Penicillium oxalicum*; 10,5% kod *Helmethos poriumoryzae*; 17% kod *Pythium aphanidermatum*; i čak 32,2% kod *Colletorichum capsici* (Sharma i sur., 1986. , 1987.).

Dokazano je kako neke bakterije zaustavljaju rast bakterije *Azotobacter chroococcum*. Tako npr. nakon 24 sata međudjelovanja bakterija: *Pseudomonas*

*putida* i *Azotobacter chroococcum* - 36,7% stanica bakterije *Azotobacter chroococcum* prelazi u oblik ciste; *Bacillus subtilis* i *Azotobacter chroococcum* - 86% stanica bakterije *Azotobacter chroococcum* prelazi u oblik ciste; *Xanthomonas oryzae* i *Azotobacter chroococcum* - 51,7% stanica bakterije *Azotobacter chroococcum* prelazi u oblik ciste (Sharma i sur., 1987.).

Prisutnost bakterije *Azotobacter chroococcum* u vodi pospješuje rast algi vrste *Calothrix antarctica*, zaključili su Saubert i Strijdom (1969.) na osnovu povećanja sadržaja hranjivih tvari u vodi i tamno zelene boje stanica algi.

Vežanje dušika iz zraka najbolje se odvija u mraku. Sunčeva svjetlost negativno djeluje na rast i razvoj stanica bakterije *Azotobacter chroococcum* (Ganf i Horne, 1975.).

Vežanje dušika iz zraka pomoću bakterije *Azotobacter chroococcum* moguće je i u morskoj vodi i to u količinama od 1,84 -10  $\mu\text{g N g}^{-1}\text{h}^{-1}$  (Pearl i sur., 1981.). Ove tvrdnje podudaraju se i s rezultatima istraživanja Dickera i Smitha (1981.) koji su ustanovili da je sposobnost vežanja dušika obrnuto proporcionalna salinitetu vode.

Delince (1992.) tvrdi kako je bakterija *Azotobacter chroococcum* sposobna vezati dušik i u mikroaerofilnim uvjetima u talozima ribnjaka, doduše u manjim količinama, ali uz veću zastupljenost hranjivih supstrata.

Primjena herbicida uglavnom negativno djeluje na mikrobnu populaciju u tlu, posebice na bakterije roda *Azotobacter* (Strzelec, 1984.). Suprotno navedenom, neki pesticidi, npr. karbofuran, djeluju stimulirajuće na rast i djelovanje bakterija roda *Azotobacter*.

Inokulacija rižine slame bakterijom *Azotobacter chroococcum* zajedno s gljivom *Trichoderma reesei* dovodi do povećanja stupnja razgradnje slame i sadržaja dušika u pripravku. Mješovita kultura *Azotobacter chroococcum* i *Rhizobium* bakterija povećava broj i sadržaj suhe tvari nodula biljke leće (Kumar i sur., 1988.).

Mješovita kultura bakterija iz rodova *Azotobacter*, *Rhizobium* i *Pseudomonas* inokulirana na sjeme slanutka daje značajno povećanje prinosa, mase korijena i mase nodula slanutka, kao i sadržaja dušika u zemlji. (Maurya i Sanoria, 1986.)

Lakshamanan (1982.) tvrdi kako je moguće u potpunosti nadomjestiti umjetna gnojiva mikrobiološkom gnojidbom, naravno uz pravi odabir biljne sorte i uvjeta uzgoja.

Gordon i Brill (1972.) su zaključili kako prisutnost amonijaka u okolišu u kojem rastu bakterije iz roda *Azotobacter* inhibira aktivnost enzima nitrogenaze, a time i mogućnost bakterija za vežanje dušika iz zraka. Oni također tvrde kako je jedino nakon uginuća i raspada stanica ovih bakterija moguće oslobađanje amonijaka iz stanica, ali postoje mutanti kod kojih se amonijak oslobađa iz živih stanica.

Gnojidba mikrobiološkim gnojivom na bazi biomase bakterije *Azotobacter chroococcum* povećava koncentraciju suhe tvari, što su ustanovili autori pri uzgoju šećerne repe (Mrkovački i sur., 1996), povrća (Mehrota i Lehri, 1971.), suncokreta (Pathak i sur., 1993.) itd.

Ova bakterija proizvodi vitamine (Revillas et al., 2000.), antibiotike (Prša, 1964.), fitohormone (Relić, 1989.), siderofore (Pandey i Kumar, 1989.), što pospješuju rast biljke.

Bakterije iz roda *Azotobacter* često žive u blizini nekih celulolitičkih mikroorganizama (Citophaga i dr.) i koriste se proizvodima razgrađene celuloze kao izvorom energije za vezanje dušika, uzajamno vraćajući dušik tim celulolitičkim mikroorganizmima. *Azotobacter chroococcum* je u sinergističkim i antagonističkim odnosima s drugim članovima mikrobne populacije (Narula, 2000.).

Primjena bakterije *Azotobacter chroococcum* kao mikrobnog gnojiva značajno povećava sadržaj suhe tvari, ukupan sadržaj dušika i prinos kukuruza, pšenice, šećerne repe i suncokreta (Emam i sur., 1986.), (Pandey i sur., 1998.).

Bakterija *Azotobacter chroococcum* ima i fungistatično djelovanje. Potiče rast biljke u početnom stadiju tako što zaustavlja razvoj plijesni *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. i *Penicillium* sp. vrlo često prisutnih na sjemenu i u tlu. Pares i Afanchao, (1960.) iznose da inokulacija azotobakterijama neutralizira toksična svojstva plijesni *Alternaria* vrste.

Markinow (1934.) tvrdi kako se vezanje dušika iz zraka stimulira ako *Azotobacter chroococcum* raste u simbiozi s bakterijama koje imaju sposobnost razgradnje celuloze. npr. *Cellulomonas biozotea*, *Aerobacter aerogenes* i sl.

Garg (1998.) je ukazao da se dodatkom biomase *Azotobacter chroococcum* u vodu ribnjaka značajno povećava masa ribe, a što utječe na troškove proizvodnje u ribnjacima. Isti autor je izmjerio da se dodatkom biomase *Azotobacter chroococcum* u vodu ribnjaka nakon 45 dana populacija fitoplanktona i zooplanktona povećava peterostruko.

*Azotobacter chroococum* ima sposobnost otapanja fosfata u zemlji (Gand i Gaur 1991.).

Bakterizacijom sjemena kukuruza s biomasom *Azotobacter chroococcum* u suptropskom području Indije dobiven je prinos zrna 1,15 puta veći od kontrolnog uzgoja bez bakterizacije sjemena i bez gnojidbe. Također je ustanovljena 5 puta veća populacija bakterije *Azotobacter chroococcum* u zemlji, u sredini vegetacijskog perioda uzgoja bakteriziranog kukuruza. Zabilježeno je i značajno povećanje sadržaja dušika i fosfora u suhoj tvari biljke kukuruza uzgojene iz bakteriziranog sjemena (Pandey i sur., 1998.).

Mishustin i Shilniker (1969.) su dokazali u nekoliko poljskih pokusa 7-12%-tno povećanje prinosa suncokreta uz mikrobiološku gnojidbu u odnosu na uzgoj bez gnojidbe.

Shabaev i sur. (1991.) i Ahmed i sur. (1983.) ustanovili su povećanu koncentraciju dušika u zemlji pri uzgoju čaja, kave i kokosa ako se zemlja gnoji pomoću biomase *Azotobacter chroococcum*.

Povećanu koncentraciju ukupnog dušika u biljkama pri mikrobiološkoj gnojidbi uz pomoć bakterije *Azotobacter chroococcum* ustanovili su svojim istraživanjima: Mrkovački i sur. (1996.) u šećernoj repi, Milić i Sarić, (1988.) u kukuruzu, Milošević i sur, (1994.) u paprici, itd.

Povećan urod kukuruza uz mikrobiološku gnojidbu bakterijom *Azotobacter chroococcum* dobili su Martinez-Toledo i sur. (1988.), pšenice (Srivastava i Sinha, 1992.), rajčice, krastavaca i krumpira Lehri i Mehrota (1972.).

Na visinu biljke šećerne trske povoljan utjecaj imala je mikrobiološka gnojidba s *Azotobacter chroococcum* (Agarwal i sur., 1977.).

Pozitivan utjecaj bakterije *Azotobacter chroococcum* na klijavost ječma dokazali su Harper i Lynch (1979.).

Rad indijskih istraživača (Narula, 2000.) dokazao je da se uporabom mikrobnog gnojiva povećavaju prinosi mnogih biljaka do 25%, a uz dodatak NPK gnojiva mikrobnog gnojiva na bazi bakterije *Azotobacter chroococcum* prinosi se povećavaju 8-15%. Oni su također ostanovili smanjen intenzitet napada korijenove muhe i snijeti na biljkama maka.

Bagyaraj i Menge (1978.) su dokazali 62%-tno povećanje suhe tvari rajčice uzgojene od sjemena bakteriziranog biomasom *Azotobacter chroococcum*.

Ishac i sur. (1986.) su povećanje prinosa pšenične slame za 5 g po biljci i trostruki prinos zrna pšenice uzgojene uz mikrobnu gnojidbu.

Ishac i sur. (1990.) su umjetno zagadili 40 zrna soje s plijesnima *Fusarium* vrste. Od toga je isključalo 13 zrna što čini 32,5% u odnosu na nezagađena zrna. Nakon bakterizacije zagađenog zrna s bakterijom *Azotobacter chroococcum* isključalo je 39 zrna što čini 97,5%.

Statistički značajno povećanje klijavosti, prinosa i suhe tvari zrna pšenice ako se sjemenke tretiraju s bakterijom *Azotobacter chroococcum* ustanovili su Badgire i Bindu (1976.).

Utjecaj bakterizacije s *Azotobacter chroococcum* pri uzgoju kukuruza istraživali su Hussain i sur. (1987.), Srivastava i Sinha (1988.) i Govedarica (1993.). Ustanovili su statistički značajno povećanje biomase, ukupnog dušika i visine biljke.

Bakterija *Azotobacter chroococcum* mogla bi preživjeti i pod uvjetima temperature, pritiska i sastava atmosfere koji vladaju na Marsu. To su u svojim istraživanjima dokazali Moll i Vestal (1992.). Oni su uspjeli bakteriju održati živom 112 dana na tlu kojeg ima na Marsu, a čiji osnovni sastojak čini  $Fe^{3+}$ -montmorilonit. (Lenart, 2004.)

## ZAKLJUČCI

Mogućnosti primjene bakterije *Azotobacter chroococcum* su sljedeće:

Bakterija *Azotobacter chroococcum* je potencijalni sastojak bioloških gnojiva zbog:

- sposobnosti vezanja dušika iz zraka;
- proizvodnje biljnih faktora rasta;
- proizvodnje siderofora;
- pogubnog djelovanja na fitopatogene gljive;
- sposobnosti otapanja fosfata u zemlji.

Mogućnost proizvodnje biološki razgradive plastične mase zbog sposobnosti sinteze alginata.

Osim toga bakterija *Azotobacter chroococcum* ima sljedeće pozitivne osobine:

- Stimulira rast i razvoj biljaka;
- Djeluje na povećanje prinosa poljoprivrednih kultura;
- Raste dobro uz prisutnost mikoriznih gljiva;
- Proizvodi vitamine i enzime;
- Ima sposobnost biološke razgradnje nekih otrova (lindana);
- Djeluje na povećanje biomase riba u ribnjacima;
- Mogla bi preživjeti uvjete koji vladaju na planeti Mars.

#### 4. LITERATURA

- 1) Abd-el-Malak, Y. (1971), Free living nitrogen fixing bacteria in Egyptian soil and their possible contribution to soil fertility. *Plant and Soil. Special Volume*, 423-442.
- 2) Aggarwal, M.L., Shishodia, O.P.S., Khan, Z.A. & Dayal, R. (1977): Response of *Azotobacter* inoculation on sugarcane yield. *Ind. Sug. Crops Journal.*, 4: 66-68.

- 3) Bagyaraj, D.J. & Menge, J.A. (1978), Interaction between VA myccorrhiza and Azotobacter and their effect on rhizosphere microflora and olant growth. *New Phytol.*, 80: 567-573.
- 4) Balajee, S., Mahadevan, A. (1993), Biodegradation of 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid in soil by Azotobacter chroococcum. *Toxicol. & Environ. Chem.*, 39: 167-172.
- 5) Becking, J.H. (1992), The family Azotobacteriaceae in the Prokaryotes (Vol. IV) A Handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications. New York, 3144-3170.
- 6) Beijerinck, M.W. (1908), Fixation of Free Atmospheric Nitrogen by Azotobacter in pure culture. *Koninel. Ned. Acad. Weteucchapp, Prac.* 11.
- 7) Borja, D., Martin, A., Gomez, L., Ramos-Cormezana, A. (1993), Anaerobic digestion of olive mill waste water pretreated with Azotobacter chroococcum. *Resources Conser & Recy.*, 9: 201-211.
- 8) Brown, M.E. (1974), Seed and root bacterization. *Ann. Rev. Phytopath.*, 12: 181-197.
- 9) Chahal, P.P.K., Chahal, V.P.S. (1986), Effect of Azotobacter chroococcum on the hatching of egg masses and eggs of *Metoidogyne incognita*. *Plant & Soil*, 95, 289-291.
- 10) Delince, G. (1992), The ecology of the fish pond ecosystem. Kluwer Academic Publishers, pp. 230.
- 11) Deshmukh, A.M. (1998), Biofertilizers and biopesticides, R.P. Goyal for Technoscience Publications, B-34, dev Nagar, Tonk Road, Jaipur, India.
- 12) Dey, B.K. (1973), Bacterial inoculatin in relation to root exudates and rhizosphere effect. III Effect of root exudates on the rhizosphere microflora of Azotobacter inoculated maize and Rhizobium inoculated gram. *Ind. Agric.*, 17: 125-133.
- 13) Dicker, H.J. & Smith, D.W. (1981), Nitrogen fixation, *Applied and Environmenthal Microbiology*, 42: 740-744.
- 14) Dobereiner, J. (1974), Nitrogen fixing bacteria in the rhizosphere. In: *The Biology of Nitrogen Fixation*, pp. 86-120. A. Quispal (Ed.) North Holland Pub. Co., Amsterdam.
- 15) Duraković, S. (1996), Primjenjena mikrobiologija. Prehrambeno-tehnološki inženjering, Znanstveno-stručna biblioteka, Zagreb.
- 16) Duraković, S., Duraković, Lejla (2000), Specijalna mikrobiologija, Biblioteka udžbenici i priručnici Sveučilišta u Zagrebu.
- 17) Duraković, S., Duraković, Lejla (2001), Mikrobiologija namirnica, osnove i dostignuća. Knjiga treća, Udžbenici sveučilišta u Zagrebu: Kugler.
- 18) Emam, N., Fayez, M., Makboul, H.E. (1986), Wheat growth as affected by inoculation with Azotobacter isolated from different soils. *Zentrallblat fur Microbiologie* 141, 17.
- 19) Gaind, S., Gaur, A.C. (1991), Thermotolerant P-solubilizing mutant and their interaction with moongbeen. *Plant & Soil.*, 133: 141-149.



- 20) Ganf, G.G. & Horne, A.J. (1975), Diurnal stratification, photosynthesis and nitrogen fixation in shallow equatorial lake, *Fresh Water Biol.*, 5: 13-59.
- 21) Garg, S.K. (1998), Role of Azotobacter an agricultural biofertilizer for sustainable fish culture. In: *Nat. Symp on sustainable aquaculture, Delhi*, (In press).
- 22) Greene, R.A. (1932), The effect of temperature upon the nitrogen fixation by Azotobacter. *Soil Sci.*, 33, 153-161.
- 23) Hardy, R.W.F., Burns, R.C. and Holsten, R.D. (1973), Application of acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* 5, 47.
- 24) Ishac, Y.Z., El-Haddad, M.E. Daft, M.J. (1986), Effect of seed inoculation, mycorrhizal infection and organic amendment on wheat growth. *Plant & Soil*, 90: 373-382.
- 25) Jensen, H.L. (1954), The Azotobacteriaceae. *Bact. Rev.*, 18: 195-214.
- 26) Jurić, I., Žugec, I., Otroški, S., Stipičević, B. (1998), Promjene stanja dušika u tlu u uzgoju pšenice. XXXIV Znanstveni skup hrvatskih agronoma s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija.
- 27) Kumar, A., Malik, M.K., & Ahmad, N. (1988), Effect of mixed culture inoculation of Rhizobium and Azotobacter on yield, nutrient uptake and quality of lentil in Calcarious saline soil. *Lens Newsletter (ICARDA), Lentil Exspl. Service*, 15 (2): 24-27.
- 28) Lakshmanann, M. (1982), Genetics of Azotobacter and its application to field studies. In: *Biological Nitrogen fixation. Proceedings. Indian Agrl. Res. Inst. New Delhi* pp. 87-100.
- 29) Lakshminarayana, K. (1993), Influence of Azotobacter on nitrogen nutrition of plants and crop productivity. *Proc. Natl. Sci Acad.* (3&4): 303-308.
- 30) Lenart, L. (2004) Utjecaj uvjeta uzgoja i čuvanja bakterije Azotobacter chroococcum na fiziološku aktivnost u uvjetima primjene. *Disertacija, Zagreb*
- 31) Lešić, Ružica, Borošić, J., Butorac, I., Ćustić, Mirjana, Poljak, M., Romić, D., (2002) *Povrčarstvo, Zrinski d.d. Čakovec*
- 32) Mallikarjunaiah, R.R. and Bhide V.P. (1981), Effect of Azotobacter on germination of spores of different fungi. *Zentl. Mikrobiol.*, 136. 1325-1329
- 33) Markinow, I.A. (1934), Die biologische Bearbeitung von planzenresten. *Zbl. Bakt. Abt. II* 90: 154-157.
- 34) Martinez - Toledo, M.V., de la Rubia T., Moreno, J. & Gonzalez-Lopez, J.(1988), Root exudates of Zea mays and production of auxins, gibberelins and cytokinins by Azotobacter chroococcum. *Plant & Soil.*, 110: 149 -152.
- 35) Maurya, B.R., Sanoria, C.L. 1986. Beneficial effects of co-inoculating chickpea seed with Rhizobium, Azotobacter and Pseudomonas. *Ind. J. Agric., Sci.* 56(6): 43-466.
- 36) Mehrotra, C.L. & Lehri, L.K. (1971), Effect of Azotobacter on crop yield. *Ind. J. of Ind. Society of Soil Science.*, 19: 243-248.
- 37) Mishustin, E.N. & Shilnikera, V.K. (1969), Free living nitrogen fixing bacteria of the genus Azotobacter. In: *Soil biology, Reviews of Research*, pp. 72-124 (UNESCO Publication)

- 38) Moll, Deborah, M., Vestal, R.J. (1992), Survival of microorganisms in smectite clays: Implications for Martian exobiology, *Icarus*, Vol. 98, 2: 233-239.
- 39) Mrkovački, Nastasija, Mezei, Snežana, Kovačev, L. (1996), Effects of *Azotobacter* inoculation on dry matter mass and nitrogen content in the hybrid varieties of sugar beet. *Zbornik radova, Naučni institut za ratarstvo i povrtlarstvo* No. 25; p.p. 107-113.
- 40) Mrkovački, Nastasija, Milić, Vera, Čačić, N. (2000), Effect of temperature of the growth of *Azotobacter chroococcum* strains. *Mikrobiologija*, Vol. 37, No. 1, 15-19, Beograd.
- 41) Narula, N. (2000), *Azotobacter* in Sustainable Agriculture; Vedams; Academic Books from India; New Delhi.
- 42) Narula, N. & Gupta, K.G. (1986), Ammonia excretion by *A. chroococcum* in liquid culture and soil in the presence of Mn<sup>+</sup> and clay minerals. *Plant & Soil.*, 93: 205-209.
- 43) Narula, N. & Gupta, K.G. (1987), Effects of aminoacids and growth factors on ammonia excretion and ammonia assimilatory enzymes of *A. chroococcum*. *Zentral. Microbiol.*, 142: 507-514.
- 44) Narula, N. & Gupta, K.G. (1988), Effects of trace elements on growth, ammonia excretion and ammonia assimilatory enzymes of *A. chroococcum*. *Annals Biol.*, 4: 93-96.
- 45) Pandey, A. & Kumar, S. (1990), Inhibitory effect of *A. chroococcum* and *Azospirillum brasilense* on a range of rhizosphere fungi. *Ind. J. expt. Biol.*, 28: 52-54.
- 46) Pandey, A., Sharma, E., Palni, L.M.S. (1998), Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming system of the Sikkim Himalaya, *Soil Biology & Biochemistry*, 30 (3): 379-384.
- 47) Pares, Y. & Afanchao, A.M. 1960. Pouvoir antibiotique d'*Alternaria humicola* Oudemans *C.R.Acad. Sci. (Paris)* 250 (14): 2601-2602.
- 48) Pearl, H.W., Webb, K.L., Baker, J., Wiebe, W.J. (1981), Nitrogen fixation in waters. *Clarendon Press Oxford*, Vol. 1, pp. 193-241.
- 49) Prša, M. (1964), Antibiotiska svojstva *Azotobacter chroococcum*. *Poljoprivredna znanstvena smotra* 19, 117.
- 50) Redžepović, S., Vratarić, M., Sudarić, A., Sikora, V. (1997), Simbiozna učinkovitost autohtonih sojeva *Bradyrhizobium japonicum* u agroekološkim uvjetima Slavonije. *Zbornik sažetaka simpozija XXXIII znanstvenog skupa hrvatskih agronoma s međunarodnim sudjelovanjem. Opatija.*
- 51) Relić B. (1989), Plant hormone activity in *Azotobacter* culture and effect on wheat. *Magistarski rad. PMF Univerzitet u Novom Sadu.*
- 52) Rovira, A.D. (1965), Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.*, 19: 241-266.
- 53) Saubert, S., Strijdom, B.W. (1969), The effect of *Azotobacter chroococcum* and *Beijerinckia indica* on growth of *Calothrix antarctica*. *Phytophylactica*, 1: 153-156.
- 54) Sharma, P.K., Dey, S.K., Chahal, V.P.S. (1986), In vitro interaction between phytopathogens and two *Azotobacter* species. *Ind. Phytopato.*, 39: 117-119.

- 55) Singh, K., Puniya, A.K., Neelakanatan, S. (1994), Degradation of wheat strow components during two stages solid supstrat fermentation with *Coprinus fimetarius* and *Azotobacter chroococcum*. *Ind. J. of Dairy Sci.*, 47: 314-318.
- 56) Slamić, F. (1992), Mikrobiološka istraživanja organskih gnojiva proizvedenih uzgojem gujavica. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet u Zagrebu.
- 57) Srivastava, U.K. & Sinha, N.K. 1992, Response of maize and wheat to *Azotobacter* inoculatin and fertilizer application. *Indian J. Agron.*, 37 (2): 356-357.
- 58) Strzelec, A. (1984), Effect of herbicides on soil metabolism. *Soil Science Annual*, 35 (2): 107-121.
- 59) Supek, Z. (1971), Tehnologija s poznavanjem robe, Izdavačko poduzeće "Školska knjiga" Zagreb.
- 60) Šantek, B., Marić, V. (1995), Temperature and Dissolved Oxygen Concent as Parameters of *Azotobacter chroococcum* Cultivation for Use in Biofertilizers. *Biotechnology Letters*, Vol.17., No.4.
- 61) Šutić, D., Radin, D. (2001), Mikrobiologija – mikroorganizmi u životu biljaka, Vizartis, Beograd.
- 62) Tippannawar, C.M. & Ramachandra Reddy, T.K. (1989), *Azotobacter* in root system and leaf tissues of cells of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. *L. Curr. Sci.*, 58: 1342-1343.
- 63) Vukadinović, V., Lončarević, Z. (1997), Ishrana bilja, Sveučilište J.J. Strossmayer u Osijeku, Poljoprivredni fakultet Osijek.
- 64) Weiser, M., Cberspacher, J., Volger, D., Lingens, I. (1994), Metabolism of 4-chlorophenol by *Azotobacter* sp. GP 1: Structure of the meta cleavage product of 4-chlorocatechol. *FEMS Microbiol. Letters.*, 116: 73-78.
- 65) Winogradsky, S. (1938), E´tudes sur La microbiologie du sol et des eaux. IX. Sur la morphologies et l'oecologie des *Azotobacter*. *Annal. De institute. Pasteur.*, 60: 351-400.
- 66) Znaor, D. (1996), Ekološka poljoprivreda, Izdavačka djelatnost, Zagreb.