

UTICAJ INOKULACIJE NA BROJNOST AZOTOBAKTERA U RIZOSFERI LUCERKE

Snežana Anđelković¹, Simonida Đurić, Jasmina Radović, Tanja Vasić, Dragan Terzić

Rezime

Prisustvo azotobaktera u zemljištu jeste značajan pokazatelj njegove biogenosti. U ovom radu je ispitivan uticaj inokulanata na prisustvo azotobakera u rizosferi lucerke (*Medicago sativa* L.). Seme lucerke je inokulisano sledećim inokulantima: rizobium (*Rhizobium meliloti*), azotobakter (*Azotobacter chroococcum*) i aktinomicete (*Streptomyces* sp.). Navedeni mikroorganizmi su korišteni kao pojedinačne i združene kulture (kombinacije dve, odnosno sve tri vrste mikroorganizama). Nakon inokulacije seme je iz svake varijante posejano u sudove ispunjene zemljom. Kontrolna varijanta je bez inokulacije. Za potrebe istraživanja korišćeno je zemljište povišene kiselosti. Posle prvog otkosa lucerke određen je broj azotobaktera u rizosferi svakog tretmana. Brojnost azotobaktera bila je povećana samo u varijantama u kojima je ovaj mikroorganizam bio prisutan u inokulumu, dok u tretmanima u kojima su korišćeni rizobium i aktinomicete kao monovalentni inokulum prisustvo azotobaktera bilo je smanjeno u odnosu na kontrolu.

Ključne reči: azotobakter, mikroorganizmi, brojnost, inokulacija

Uvod

Mikroorganizmi imaju značajan uticaj u poljoprivrednoj proizvodnji time što učestvuju u stvaranju i održavanju zemljišta i njegove plodnosti. Na rasprostranjenost mikroorganizama u zemljištu utiče veliki broj abiotičkih i biotičkih faktora. Sadržaj organske materije kao izvor energije za metabolizam mikroorganizama i hemijska svojstva zemljišta, pre svega pH vrednost zemljišta jesu granični životni činioci koji utiču na aktivnost mikrobioloških populacija. Zemljišta kisele reakcije odlikuju se malom mikrobiološkom aktivnošću i izosfera je ograničena na plitku površinsku zonu i sa povećanjem kiselosti smanjuje se biomasa mikroorganizama (Miličić i Jarak, 2008; Diaz-Ravina et al., 1998).

Slobodni azotofiksatori, među kojima su najznačajnije bakterije roda *Azotobacter*, daju važan doprinos obezbeđivanju biljaka azotom i povećanju azotnog bilansa zemljišta. Azotobakter na minimalne promene uslova u zemljištu reaguje smanjenjem brojnosti, zbog čega se i koristi kao indikator kvaliteta zemljišta. Bakterije roda *Azotobacter* daju prednost visokoproduktivnim neutralnim zemljištima i vrlo su osetljive na deficit vlage (Đukić i sar., 2007). Kisela reakcija sredine deluje negativno na aktivnost i brojnost azotobaktera i rezultati koje su u svojim istraživanjima dobili Čolo i Jarak (2006) ukazuju na veoma mali broj ili potpuno odsustvo ovog rizosfernog mikroorganizma u kiselim zemljištima.

U zavisnosti od uslova koji vladaju u zemljištu azotobakter može da usvoji 50-80 kg ha⁻¹ azota iz vazduha (Jarak i Čolo, 2007). Pored toga što vezuje elementarni azot, azotobakter proizvodi biološki aktivne materije (auksine, gibereline, pirodaksin, biotin i nikotinsku kiselinu

¹ Anđelković Snežana - istraživač saradnik, Institut za krmno bilje Kruševac, e-mail: snezana.andjelkovic@ikbks.com, Đurić Simonida-docent, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Radović Jasmina-naučni saradnik, Institut za krmno bilje Kruševac, Vasić Tanja- istraživač saradnik Institut za krmno bilje Kruševac, Dragan Terzić-naučni saradnik, Institut za krmno bilje Kruševac.

Dosadašnja saznanja o funkcionisanju zajednice lucerke i mikroorganizama, mogućnostima usmeravanja toka mikrobiološke aktivnosti u cilju povećanja sadržaja biljnih hraniva ukazuju na potrebu primene mikrobnih inokulanata.

Cilj ovih istraživanja je da se ispita uticaj rizobuma, azotobaktera i aktinomiceta, posebno (monovalentni inokulumi) i u kombinacijama (polivalentni inokulumi) na brojnost azotobaktera u rizosferi lucerke.

Materijali i metod rada

Za potrebe istraživanja korišćeno je zemljište koje pripada tipu tipu eutrično smeđih zemljišta (gajnjača). Ovo zemljište je povišene kiselosti pH 4.97 (KCl), spada u grupu zemljišta srednje obezbeđenosti humusom (sa tendencijom prema visokom sadržaju humusa). Fizičko-hemijske analize zemljišta određene su standardnim metodama u hemijskoj laboratoriji Instituta za krmno bilje u Kruševcu. (Tab. 1).

Tab.1 Hemijski sastav zemljišta

Parametar Zemljište	Ukupni azot, %	P ₂ O ₅ mg/100g	K ₂ O mg/100g	Humus, %	pH/KCl
B	0.204	10.20	51.0	4.30	4.97

Varijante inokulanata bile su sledeće:

1. Rizobium
2. Azotobakter
3. Aktinomicete
4. Rizobium + azotobakter
5. Rizobium + aktinomiceta
6. Azotobakter + aktinomiceta
7. Rizobium + azotobakter + aktinomiceta
8. Kontrola – bez inokulacije

Inokulacija je vršena monovalentnim – sadrže samo jednu vrstu mikroorganizama (1,2 i 3) i polivalentnim inokulumima koji sadrže dve ili više vrsta mikroorganizama (4, 5, 6 i 7). U istraživanjima su korišćeni po jedan soj sledećih mikroorganizama: *Rhizobium meliloti* (broj bakterija je $10,8 \times 10^{11}$ u ml, *Azotobacter chroococcum*, (28×10^{11} po ml) i aktinomicete (*Streptomyces sp.*) čiji je broj bio $7,6 \times 10^{10}$ u ml. Ovi mikroorganizmi su iz kolekcije Odeljenja za Mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Kulture rizobiuma umnožavane su u YM podlozi po Vincentu, azotobakter u tečnoj podlozi po Fjodorovu, a aktinomicete na podlozi po Krasiljnikovu (Jarak i Đurić, 2006).

U ovim istraživanjkima korišćena je sotra lucerke K-28 koja je selekcionisana u Insitutu za krmno bilje u Kruševcu.

Seme lucerke je sterilisano sa 0,2% rastvorom HgCl₂ i sa 70% alkoholom, više puta isprano sterilnom česmenskom vodom, a zatim potopljeno u odgovarajući inokulum. Nakon toga seme je iz svake varijante inokuluma posejano u sudove ispunjene zemljištem. U svaki sud uneseno je i po 10ml odgovarajućeg inokuluma. U fazi cvetanja biljaka, uzeti su uzorci zemljišta iz zone njihovog korenovog sistema za mikrobiološku analizu. Brojnost azotobaktera određivana je metodom fertilnih kapi na podlozi Fjodorova. Zasejavanje je vršeno sa 0,2ml suspenzije zemljišta razređenja 10⁻¹. Inkubacija je trajala 48h na 28°. Broj izraslih kolonija preračunat je na 1 gram apsolutno suvog zemljišta (Jarak i Đurić, 2006).

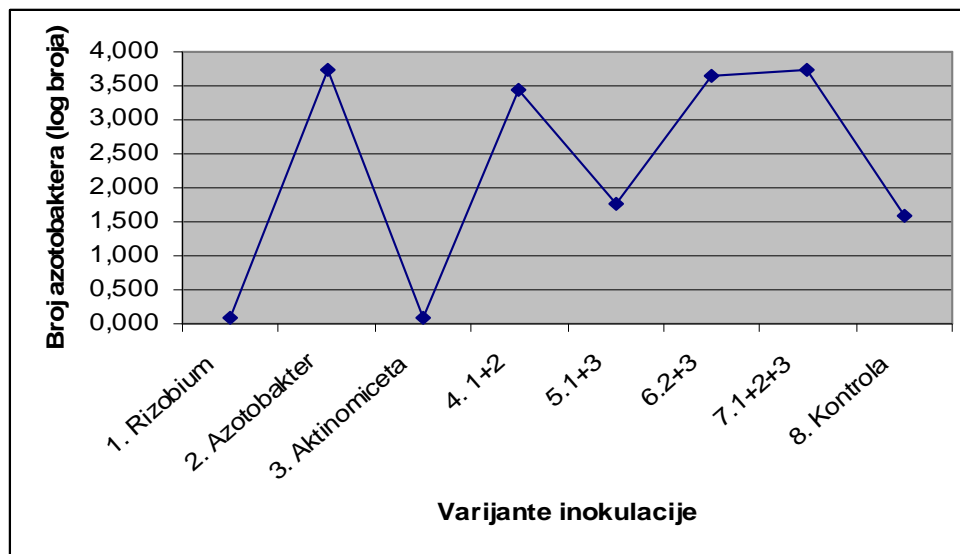
Statistička obrada podataka izvršena je programom Costat i značajnost efekta primenjenih tretmana testirana je t-testom.

Rezultati i diskusija

U ovim istraživanjima praćen je efekat inokulacije rizobumom, azotobakterom i aktinomicetama, posebno i u kombinacijama na brojnost azotobaktera u rizosferi lucerke koja je gajena na zemljištu povišine kiselosti. Svaki tip zemljišta ima karakteristične odlike mikrobioloških procesa na koje se može uticati različitim merama (Govedarica i sar., 1997). 80 – 90% svih bioloških procesa koji se odvijaju u zemljištu katalališu mikroorganizmi (Nannipieri and Badalucco, 2003). Na brojnost i raznovrsnost mikroorganizama u zemljištu utiču fizičko-hemijska svojstva zemljišta - kiselost, količina i vrsta organske materije, vodno-vazdušni i toplotni režim, struktura i mehanički sastav zemljišta i dr. (Jarak i Čolo, 2007). Poznavanjem uloge pojedinih grupa mikroorganizama mikrobiološki procesi mogu se usmeriti u željenom pravcu (Milošević i sar., 2003).

Tab. Uticaj inokulacije na brojnost azotobaktera

Varijante inokulacije	1	2	3	4	5	6	7	8	LSD 5 %
Srednje vrednosti broja azotobaktera (log broja)	0.100	3.737	0.100	3.493	1.764	3.637	3.737	1.177	0.010



Grafikon 1. Brojnost azotobaktera u različitim varijantama inokulacije u rizosferi lucerke

Rezultati istraživanja pokazuju da je broj azotobaktera najveći u tretmanu u kome je izvršena inokulacija monovalentnim inokulumom ovog mikroorganizma, kao i u varijanti u kojoj je primenjen polivalentni inokulum koji je sadržavao sojeve rizobiuma, azotobaktera i aktinomiceta. Brojnost azotobaktera bila je statistički značajno povećana i u varijantama inokulacije u kojima je ovaj mikroorganizam korišćen u kombinaciji sa rizobiunom, kao i sa aktinomicetama. Inokulacijom semena leguminoza efektivnim sojevima mikroorganizama i njihovom introdukcijom u zemljište, dolazi do narušavanja starih i formiranja novih odnosa među mikroorganizmima. U kom broju će preživeti mikroorganizmi nakon unošenja u zemljište u velikoj meri od uslova koji vladaju u njemu (Jošić, 2004).

U rizosferi lucerke prilikom aplikacije rizobiuma i aktinomiceta kao pojedinačnih kultura došlo je do statistički značajnog smanjenja broja azotobaktera u odnosu na kontrolnu varijantu. U tretmanu inokulacije sa rizobiumom i aktinomicetama došlo je do smanjenja

broja azotobatera u odnosu na varijantu bez inokulacije. Ispitivano zemljište se odlikuje izuzetno malom brojnošću azotobaktera i do sličnih rezultata o brojnosti azotobaktera ispitujući zemljište povišene kiselosti došli su Jarak i Čolo (2006). Bakterije roda *Azotobacter sp.* daju prednost visokoproduktivnim neutralnim zemljištima i vrlo su osjetljive na deficit vlage (Đukić i sar., 2007).

Zaključak

Inokulacijom semena lucerke azotobakterom, bilo da je primenjen monovalentni inokulum ove bakterije ili njegova kombinacija sa rizobiumom i aktinomicetama došlo je do povećanja broja ovog slobodnog azotofiksatora u rizosfernom zemljištu.

Najveći broj azotobaktera bio je u tretmanu u kome je primenjena smeša sojeva rizobiuma, azotobaktera i aktinomiceta.

U varijantama inokulacije semena lucerke pojedinačnim kulturama rizobiuma i aktinomicetama došlo je do smanjenja broja azotobaktera u odnosu na tretman bez inokulacije.

Literatura

- Čolo, J., Jarak, M. (2006): Primjena bakterizacije i kalcifikacije u proizvodnji lucerke i djeteline na kiselim zemljištima, Radovi, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Sarajevu, XVIII Naučno-stručni skup poljoprivrede i prehrambene industrije, Vol II, Broj 51/1, Neum. 107-115.
- Diaz-Ravina, M., Carballas, T., Acea, M. J. (1998.): Microbial biomass and metabolic activity in four acid soil. *Soil Bio. Biochem.*, 20(6), 817-823.
- Đukić, A.D., Jemcević, T.B., Kuzmanova, J. (2007): Biotehnologija zemljišta, Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet, Čačak.
- Govedarica, M., Milošević, N., Jarak, M. (1997): Teški metali i mikroorganizmi u zemljištu. Teški metali u životnoj sredini. Ed. R.Kastori, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, 155-193.
- Jarak, M., Čolo, J. (2007): Mikrobiologija zemljišta, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet..
- Jarak, M., Đurić, S. (2006): Praktikum iz mikrobiologije, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Jošić, D. (2004): Biodiverzitet autohtone populacije kvržičnih bakterija deteline (*Rhizobium leguminosarum bv.trifolii*). Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Miličić, D., Jarak, M. (2008): Popravka kiselih zemljišta primenom mikrobnih inokulanata i kalcifikacije, Letopis naučnih radova, Godina 32 (1), Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, 51-56.
- Milošević, N., Govedarica, M., Ubavić, M., Hadžić, V., Nešić, Lj. (2003): Mikrobiološke karakteristike zemljišta-osnova za kontrolu plodnosti. Zbornik radova, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Sv.39, 93-100.
- Nannipieri, P. and Badalucco, L. (2003): Microbial diversity and soil functions. *Eur.J.Soil Sci.* 54, pp.665-670.

THE EFFECT OF INOCULANTS ON THE ABUNDANCE OF AZOTOBACTER IN THE RHIZOSFERE OF ALFALFA

*Anđelković Snežana¹, Đurić Simonida², Radović Jasmina¹, Vasić Tanja¹,
Dragan Terzić¹*

Abstract

The presence of Azotobacter in soil is a prominent indicator of its biogenity. In this paper, the effects of microbial inoculants on the abundance of azotobacter in the rhizosphere soil of alfalfa (*Medicago sativa* L.) were studied. Alfalfa seed was inoculated with following inoculums: rhizobium (*Rhizobium meliloti*), azotobacter (*Azotobacter chroococcum*) and actinomycetes (*Streptomyces* sp.). The above listed microorganisms were used individually and in joined cultures (a combination of two or all three microorganism species). After inoculation seed from each inoculum variant were planted in the pots filled with soil. The control variant was without inoculation. For research purposes, the soil with increased acidity was used. After the first alfalfa cutting, the number of azotobacter for each combination, in the rhizosphere soil of alfalfa was determined. The number of azotobacter is increased just in the combinations in which very this microorganism was present in the inoculum, while in the treatments in which were used rhizobium and actinomycetes as monovalent inoculums the number was decreased compared to control.

Keywords: *Azotobacter*, microorganisms, abundance, inoculation

¹ Institute for Forage crops Kruševac

² Faculty of Agriculture Novi Sad