

YU ISSN 0002-1954.

UDC 633.63.631.83 = 861

ZASTUPLJENOST SLOBODNIH DIAZOTROFA  
U RIZOSFERI ŠEĆERNE REPE

THE OCCURRENCE FREE-LIVING DIAZOTROPHS  
IN RHIZOSPHERE OF SUGAR BEET

Nada Milošević

UVOD

Azot — neophodna komponenta životnih procesa svih organizama nalazi se u clementarnom obliku u vazduhu, najvećoj rezervi u prirodi. Vezivanje i prevođenje azota (azotofiksacija) u podesna jedinjenja za biljku i mikroorganizme mogu da obavljaju mikroorganizmi azotofiksatori (slobodni i simbiotski).

Diazotrofi (slobodne azotofiksirajuće bakterije i neke plavo-zelene alge) iako nisu u direktnoj histološkoj vezi sa biljkom, kao simbionti, fiksiraju određene količine azota, te imaju ulogu u zemljištu. Azotobakter, oligonitrofilne bakterije su slobodni azotofiksatori — heterotrofi, dok su plavo-zelene alge prvenstveno autotrofi, a kao diazotrofi mogu biti slobodni i simbiotski.

U nas su vršena ispitivanja zastupljenosti slobodno — azotofiksirajućih bakterija u zavisnosti od mnogih činilaca, dok zastupljenost plavo-zelenih algi u zemljištu nije rađena. Zastupljenost azotobaktera i oligonitrofila u rizosferi zavisi kako od biljne vrste (*Sarić i Rašović, 1963; Sarić, 1968; Sarić i Ristić, 1982*), tako i od količine i kombinacije mineralnih đubriva (*Sarić, 1978*).

Plavo-zelene alge (cyanobacteria) su fototrofni prokarioti, mnoge od njih sposobne da fiksiraju slobodni azot i to u količinama od 4-60 kg azota/ha u zavisnosti od zemljišno-klimatskih uslova, primenjenih agromera, razvića ispitivane kulture i zone ispitivanja (*Patika i Andreeva, 1987; Venkataranan, 1971; Pankratova, 1984*).

Cyanobakterije izdvajaju u okolnu sredinu vitamine (B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>), auksine i antibiotike te utiču na biljku i okolne mikroorganizme (*Schtina i Pankratova, 1974; Stewart, 1980; Patika i Andreeva, 1987*).

Plavo-zelene alge u prirodnim uslovima u nesterilnim zemljištima razvijaju se u zajednici s različitim mikroorganizmima. U sluzi oko algi naseljavaju se bakterije — pratioci, a mnoge od njih su i azotofiksatori. Najčešći pratioci su oligonitrofilne bakterije (*Schtina i Pankratova, 1977*), mogu dostići broj od 3-25 miliona ćelija na 1 g mase alge (*Beršova et al, 1968*). Pored oligonitrofila plavo-zelene alge mogu biti u zajednici i sa pravim azotofiksatorima — azotobakterom, rhizobiumom (*Gollerbah i Schtina, 1969, Schtina i Pankratova, 1974*).

Mikroorganizmi u toj zajednici verovatno koriste produkte metabolizma za svoje funkcije. Mnogi autori su našli da se azotofiksacija u plavo-zelenih algi smanjuje ili čak prestaje kada postaju algalno čiste (Kalinskaja, 1967, Gollerbah i Shtina, 1969, Vaara et al, 1979).

U svetu je dosta ispitivana zastupljenost plavo-zelenih algi: u umerenim zemljištima Z. Evrope (Granhall end Henriksson, 1969, Henriksson et al, 1972, Stewart, a, b) u Americi (Jurgensen i Durrell, 1964). Takođe, ispitivan je uticaj mineralnih đubriva na zastupljenost Cyanobacteria, najviše od strane sovjetskih autora (Balezina, 1974, Golerbah i Shtina, 1969). Azotofiksirajuće forme plavo-zelenih algi našle su praktičnu primenu kao biološko đubrivo na poljima pirinča (Watanabe, 1973, Venkataraman, 1981). Zastupljenost plavo-zelenih algi u različitim tipovima zemljišta rađena je od strane Shtina (1969).

Cilj ovog rada je bio da se ispita dinamika slobodnih diazotrofa (azotobaktera, oligonitrofila i plavo-zelenih algi) u rizosferi, korenskoj zoni i okolnom zemljištu pod šećernom repom u zavisnosti od količine i kombinacije NPK đubriva.

#### MATERIJAL I METODA

U ovom radu korišćen je ogled dugog trajanja sa mineralnim đubrivima na oglednom polju Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Ogled je postavljen na zemljištu tipa čemozem.

Ispitivana je zastupljenost slobodnih diazotrofa: azotobaktera i oligonitrofilnih bakterija i plavo-zelenih algi u zemljištu, rizosferi i korenskoj zoni šećerne repe tri puta u toku vegetacije.

Uzorci za mikrobiološke analize uzimani su aseptično: za zemljište na dubini od 0-30 cm, a za rizosferu zemljište je skidano pažljivo od 0,5-1 cm od korena, dok je za ispitivanje korenske mikroflore prana i skidana površina korena biljke.

Broj azotobaktera i oligonitrofilnih bakterija rađen je na čvrstoj podlozi Fjodora. Za azotobakter korišćeno je  $10^{-2}$  razređenje, a zasejavanje je vršeno tehnikom kapi, dok je za oligonitrofilne zasejavanje vršeno sa  $10^{-5}$  razređenjem metodom razređenja. Inkubacija je trajala za azotobakter  $48^h$ , a za oligonitrofilne bakterije 5 dana na temperaturi od  $28^{\circ}C$ .

Broj plavo-zelenih algi određivan je na B6-II podlozi, sa  $10^{-2}$  razređenjem, a inkubacija je bila na sobnoj temperaturi (oko  $25^{\circ}C$ ) pri dnevnoj svetlosti tri nedelje.

Uzorci su uzimani sa sledećih varijanata:

- |                                  |  |
|----------------------------------|--|
| 1. Kontrola                      | 6. N <sub>2</sub> K <sub>2</sub>                 |
| 2. N <sub>2</sub>                | 7. P <sub>2</sub> K <sub>2</sub>                 |
| 3. P <sub>2</sub>                | 8. N <sub>1</sub> P <sub>1</sub> K <sub>1</sub>  |
| 4. K <sub>2</sub>                | 9. N <sub>2</sub> P <sub>2</sub> K <sub>2</sub>  |
| 5. N <sub>2</sub> P <sub>2</sub> | 10. N <sub>3</sub> P <sub>3</sub> K <sub>3</sub> |

Varijante đubrenja su sadržale sledeće količine azota, fosfora i kalijuma u kg/ha:

N <sub>1</sub>	P <sub>1</sub>	K <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	P <sub>2</sub>	K <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	P <sub>3</sub>	K <sub>3</sub>
50	50	50	100	100	100	150	150	150

## REZULTATI I DISKUSIJA

Brojnost slobodnih diazotrofa (graf. 1, 2, 3) zavisi od primenjene količine i kombinacije mineralnih đubriva, zone rizosfere, kao i faze razvića šećerne repe.

*Zastupljenost azotobaktera.*— Rezultati prikazani na grafikonu 1 pokazuju da su mineralna đubriva stimulisala razviće i zastupljenost azotobaktera, osim visokih doza NPK, što se uglavnom, slaže sa rezultatima *Sarić (1978)*. Stimulativan uticaj mineralnih đubriva na populaciju azotobaktera izražen je početkom vegetacije, i u fazi intenzivnog rasta biljke u zemljištu i rizosferi, da bi se smanjio krajem vegetacije kada broj opada (*Micev, 1971; Sarić, 1978*).

Najveći efekat dobiven je sa pojedinačnim fosfornim đubrivom — 100 kg/ha i kombinacije fosfora sa azotom, fosfora sa kalijumom (N<sub>2</sub>P<sub>2</sub> i P<sub>2</sub>K<sub>2</sub>), naročito u rizosferi. Fosforna i kalijumova đubriva su važni faktori u razviću azotobaktera (*Pokorna — Kozova, 1965, Galimova, 1960*).

Visoke doze NPK nisu stimulisale razviće azotobaktera, a samim tim dobiven je i manji broj.

U korenskoj zoni tokom cele vegetacije, nije nađen azotobakter (*Sarić, 1968*).

Graf. 1.

*Zastupljenost oligonitrofilnih bakterija.* — Uneta mineralna đubriva su stimulisala zastupljenost oligonitrofila, naročito u korenskoj zoni i rizosferi, a nešto slabije u varijantama okolnog zemljišta.

U varijantama sa azotom dobiven je manji broj ove mikroflore (*Čunderova, 1975; Sarić, 1978*), jer verovatno nije došlo do razvića azotofiksatora.

Graf. 2.

Kalijumova đubriva, kako pojedinačna tako i u kombinaciji stimulisala su zastupljenost oligonitrofila u sve tri zone tokom cele vegetacije. Za razliku od kalijumovih, fosforna đubriva nisu stimulisala ovu mikrofloru.

NPK đubriva su smanjila brojnost oligonitrofila u rizosferi i okolnom zemljištu, dok je njihova zastupljenost u korenskoj zoni bila velika tokom cele vegetacije. Uticaj biljke je očigledan — rizosferna i korenska zona imala je najveću zastupljenost oligonitrofila (*Sarić, 1978*). Za razliku od azotobaktera broj oligonitrofilnih bakterija se povećava u fazi intenzivnog rasta i krajem vegetacije.

*Zastupljenost plavo-zelenih algi.*— Dobiveni rezultati o zastupljenosti plavo-zelenih algi po zonama tokom vegetacije i uticaj mineralnih đubriva dat je na grafikonu 3.

Početkom vegetacije dobiven je manji broj algi, da bi se brojnost povećala u fazi intenzivnog rasta šećerne repe i na kraju vegetacije.

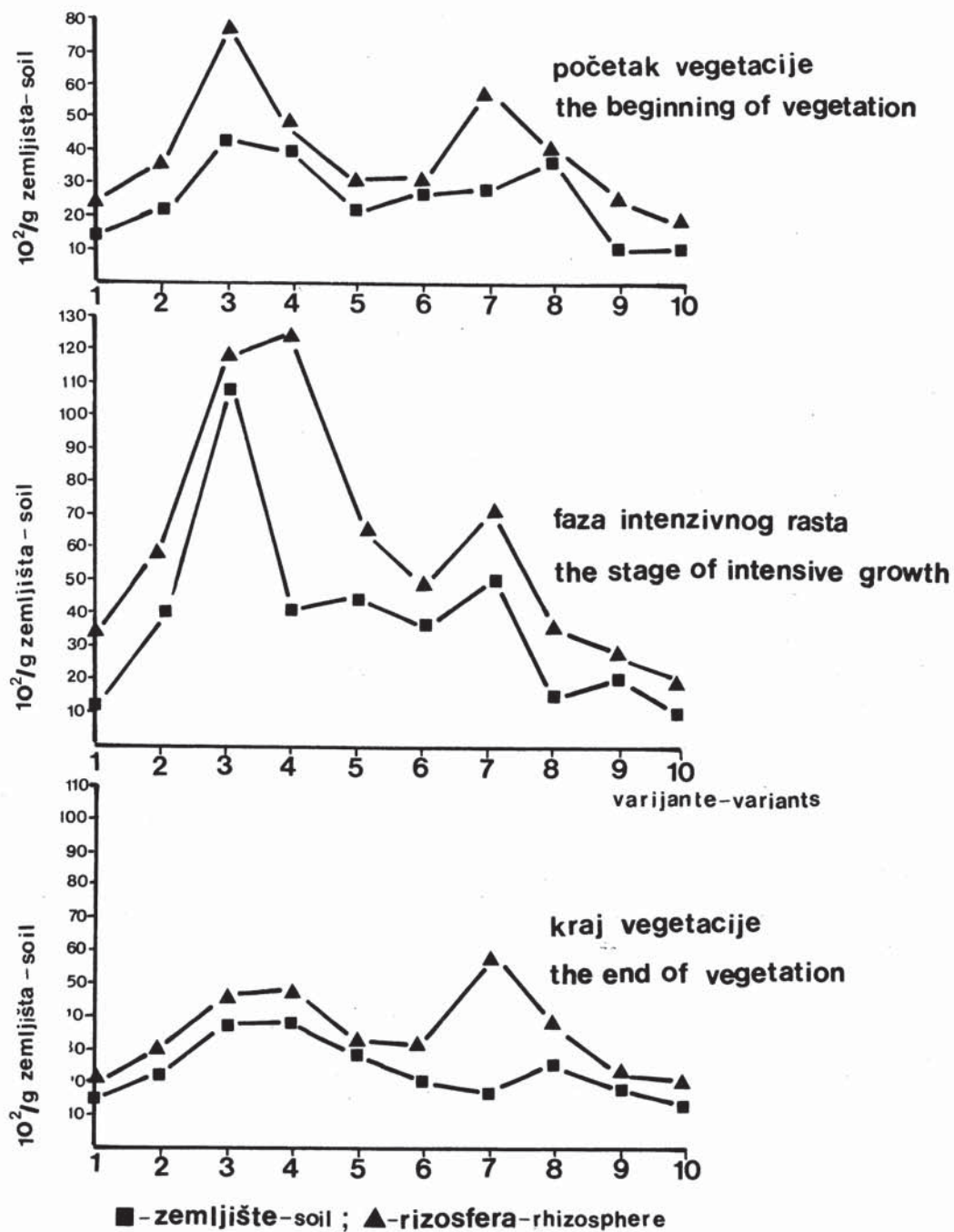
Cyanobacterie bile su zastupljene u većem broju u rizosferi nego u okolnom zemljištu, što se slaže sa rezultatima drugih autora koji su dobili veću zastupljenost plavo-zelenih algi u rizosferi (*Gonzalves i Yalavigi, 1960; Shtina et al, 1964; Shtina, 1972; Patika et al, 1982*).

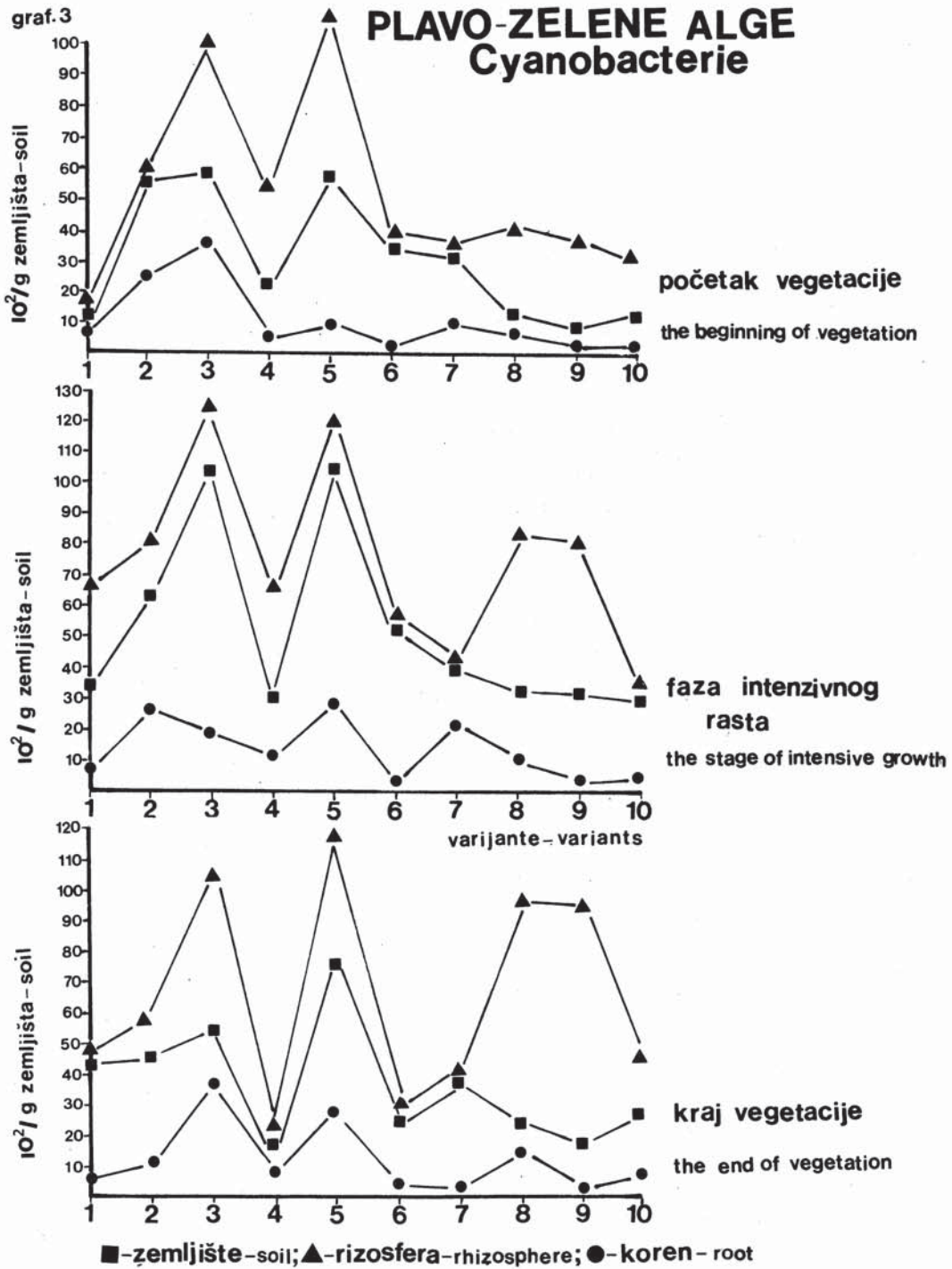
Međutim, na dinamiku plavo-zelenih algi uticale su i kombinacije i količina mineralnih đubriva (*Balezina, 1974, 1975; Mahapatra et al, 1971; Patika et al, 1987*).

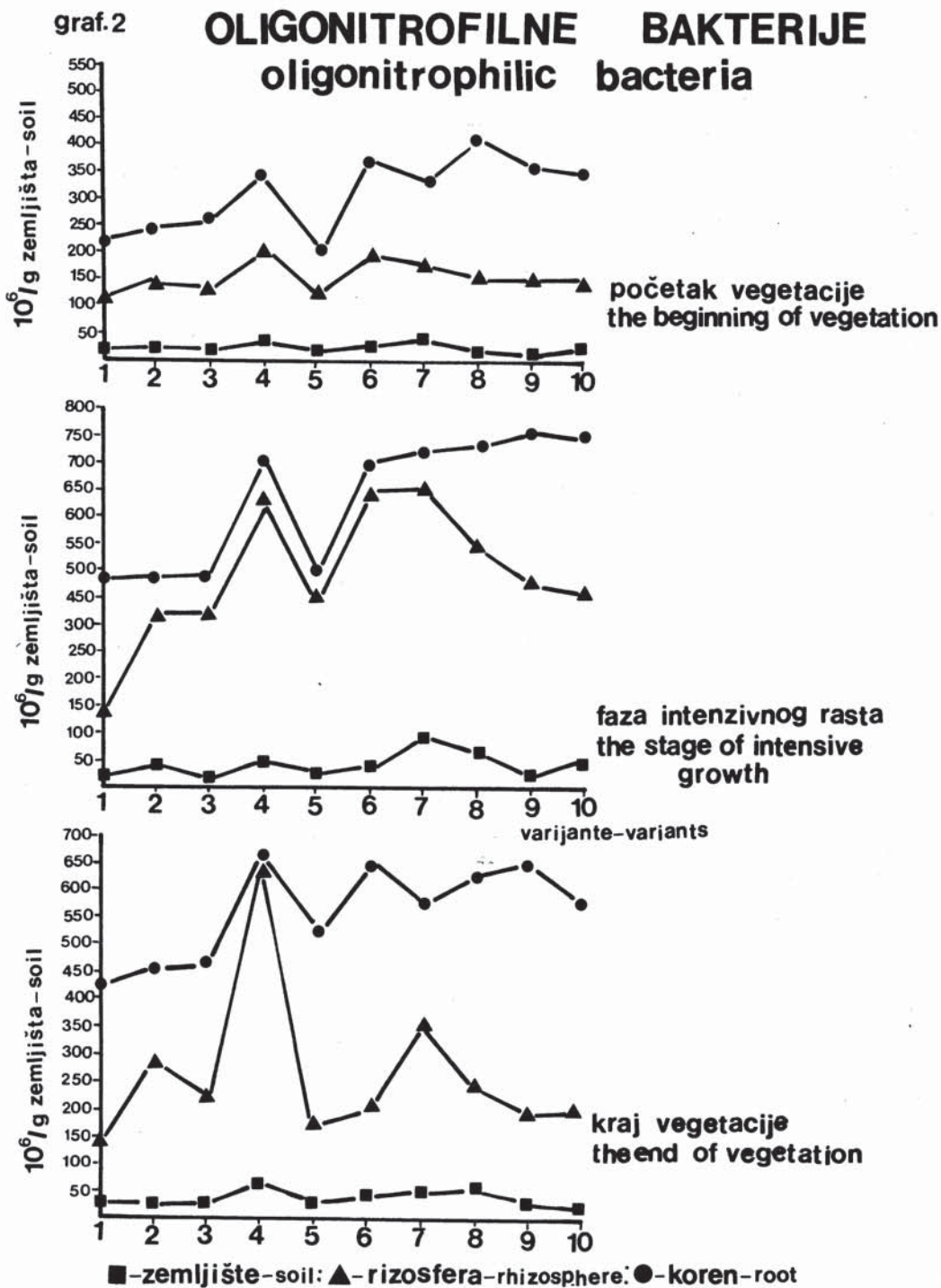
Graf. 3.

Dokazano je da su visoke doze NPK đubriva znatno uticale na smanjenje populacije plavo-zelenih algi (*Pankratova, 1979*), dok manje doze mogu biti stimulativne (*Tretjakova, 1972*).

graf. 1 **AZOTOBACTER**







Dobiveni rezultati (graf. 3) pokazuju da su azotna i kalijumova đubriva slabo sumulisala razviće Cyanobacteria, dok su fosforna đubriva pojedinačna i u kombinaciji sa azotom pozitivno uticala na zastupljenost ove grupe diazotrofa tokom cele vegetacije (Balezina, 1974, 1975; Tretjakova i Nekrasova, 1971).

Iako slobodni diazotrofi nisu u direktnoj histološkoj vezi sa biljkom, uticaj biljke je izrazit i zavisi od zone i razvića ispitivane kulture (Sarić, Rašović, 1963; Shtina, 1965, 1972; Shtina et al, 1964; Sarić, 1968; Sarić i Ristić, 1982).

Azotobakter i plavo-zelene alge bile su najbrojnije u rizosferi (Gonzalves et Yalavagi, 1960; Shtina, 1972; Patika et al, 1982), dok je korenska zona bila slabo nastanjena, a azotobakter nije konstatovan (Sarić, 1968; Sarić i Ristić, 1982).

Zastupljenost oligonitrofilnih bakterija je donekle suprotna u odnosu na prethodne dve grupe azotofiksatora. Najveća zastupljenost oligonitrofilnih bakterija nađena je u korenskoj zoni, a najmanji broj ustanovljen je u okolnom zemljištu tokom cele vegetacije šećerne repe.

#### ZAKLJUČAK

Zastupljenost slobodnih diazotrofa zavisila je kako od količine i kombinacije mineralnih đubriva, tako i od zone i faze razvića šećerne repe.

Najveća zastupljenost azotobaktera i plavo-zelenih algi je u varijantama sa fosforom, dok je kalijum stimulisao oligonitrofilne bakterije.

Azotna đubriva i visoke doze NPK nisu stimulisali brojnost slobodnih azotofiksatora.

Rizosfera biljke stimulisala je razviće diazotrofa u odnosu na okolno zemljište. Korenska zona je najviše nastanjena oligonitrofilnim bakterijama, dok azotobakter uopšte nije konstatovan u toj zoni.

Azotobakter i oligonitrofilne bakterije su brojnije početkom vegetacije, dok je krajem vegetacije šećerne repe došlo do nakupljanja plavo-zelenih algi.

#### SAŽETAK

Cilj istraživanja je bio da se ispita zastupljenost azotobaktera, oligonitrofilnih bakterija i plavo-zelenih algi u rizosferi, korenskoj zoni šećerne repe i okolnom zemljištu, tri puta tokom vegetacije.

Zastupljenost diazotrofa zavisila je kako od količine i kombinacije đubriva tako i od zone i faze razvića biljke.

Ispitivano je 10 varijanti: sa pojedinačnim đubrivima (N<sub>100</sub>, P<sub>100</sub>, K<sub>100</sub>) u kombinaciji po dva (N<sub>100</sub>P<sub>100</sub>, N<sub>100</sub>K<sub>100</sub>, K<sub>100</sub>P<sub>100</sub>), tri kombinacije NPK i kontrola.

Najveća zastupljenost azotobaktera i plavo-zelenih algi je u varijantama sa fosforom, dok je kalijum stimulisao oligonitrofilne bakterije.

Azotna đubriva i visoke doze NPK nisu stimulisali brojnost slobodnih azotofiksatora.

Rizosfera biljke stimulisala je razviće diazotrofa u odnosu na okolno zemljište. Korenska zona je najviše nastanjena oligonitrofilnim bakterijama, dok azotobakter uopšte nije konstantovan u toj zoni.

Azotobakter i oligonitrofilne bakterije su brojnije početkom vegetacije, dok je krajem vegetacije šećerne repe došlo do nakupljanja plavo-zelenih algi.

#### SUMMARY

In this paper the occurrence of azotobacter, oligonitrophilic bacteria and blue-green algae in the chernozem and the influence of mineral fertilizers on the dynamics the microorganisms during the vegetation of sugar beet.

Ten variants were examined with particular fertilizers (N<sub>100</sub>, P<sub>100</sub>, K<sub>100</sub>) in combination of two (N<sub>100</sub>P<sub>100</sub>, N<sub>100</sub>K<sub>100</sub>, K<sub>100</sub>P<sub>100</sub>), NPK combinations (N<sub>50</sub> P<sub>50</sub> K<sub>50</sub>, N<sub>100</sub>P<sub>100</sub>K<sub>100</sub>, N<sub>150</sub>P<sub>150</sub>K<sub>150</sub>) and control. The samples were taken three times in the course of vegetation of sugar beet, from the soil, rhizosphere and root zone.

Mineral fertilizers differently affected the occurrence of the analyzed group of nitrogen fixing bacteria.

The largest number azotobacter and blue-green algae was obtained in variants for P, and K-fertilizers stimulated oligonitrophilic bacteria.

The stimulative effect on the number diazotrophs did not obtained in variants with nitrogen mineral fertilizers and high NPK doses.

The highest occurrence diazotrophs was obtained in the rhizosphere. In the course of sugar beet vegetation, azotobacter, were not found in the root zone.

#### LITERATURA

1. Balezina, L.S. (1974): Deistvie koncentrirovanih mineralnih udobrenii na razvitie počvenih vodoroslei, Počvovedenie, No 9, 94-96,
2. Balezina, L.S. (1975): Vlijanie mineralnih i organskih udobrenii na razvitie vodoroslei v dnovno-podzolistoi počev, Mikrobiologija, V 2, T. XLIV, 347-350,
3. Beršova, O.I., Kopteva, Ž.P., Tancjurenko, E.V. (1968): Sb "Cvetenie vodi", Kiev, Nauka Dumk.,
4. Čunderova, A.I., Zubko, I.K., Knjazova, V.L. (1975): Vlijanie okuljtyrivanija dnovno-podzolistih počev na ih Azotofiksirujuščju aktivnost. Bjulleten vsesojuznogo naučnoisledovateljskogo instituta selj. Mikrobiologii, 17 (2), 56-61
5. Galimova, O.I. (1960): Vlijanie udobroenii na žiznedejatelnost azotobaktera v prikorenskoj zone kukuruza na oroščafmih počvah. Trudi kazahsk. s.-h. in-ta 8, 138-141
6. Gonzalove, S.E.A. and Yalavigi, V.S. (1960): Alage in the rhizospheres of some crops plants. Proc. Sympos. algal. New Delhi
7. Gollerbah, M.M. and Shtina, E.A. (1969): Pochvennye vodorosli "Nauka" 222 pp.
8. Granhall, V. end Henriksson, E. (1969): Nitrogen-fixing blue-green alage in Swedish soil. Oikos, 20, 175-8,
9. Jurgensen, M.F. end Davey, C.B. (1968): Nitrogen-fixing blue-green alage in acid forest and nursery soils. Can. J. Microbiol. 14, 1179-83



10. **Kaliniskaja, T.A. (1967):** Rol mikrobnih simbiozov v fiksaciji azota i ego rol živujušćimi mikroorganizmami. U ka. "Bilogičeskii azot i ego rol v zemledelii". M., Nauka, 221-229,
11. **Henriksson, E. (1971):** Algal nitrogen fixation in temperate regions. Plant and Soil, Special Volume, po. 415-19
12. **Henriksson, E., Englund, B., Heden, M.B. and was, I. (1972):** Nitrogen fixation in swedish soil by blue-green algae. In taxonomy and Biology of blue-green algae Madras 1970 (ed. Desikachery, T.V.), pp. 265-9
13. **Mahapatra, J.C., Mudholkar, N.J., Patnaik, H. (1971):** Effect of N,P and K fertilizers on the prevalence of algae under field conditions. Indian Journal of Agronomy, 16 (1) 19-22
14. **Mayland, H.F., Mc Intosh, T.H. and Fuller, W.A.:** Fixation of isotopic nitrogen on a semi-arid soil by algal crust organisms. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 30, 59-60,
15. **Micev, N. (1971):** Dosadašnji rezultati ispitivanja slobodne azotofiksacije (azotobacterium) u rizosferi nekih kultura i nekih zemljišnih tipova SR Makedonije, Agrohemija, NO 7-8
16. **Pankratova, E.M. (1979):** Očastie azotofiksirajušćih vodoraslei u nakaplenii azota u počve. Izv. AN, SSSR, ser. biol. 2: 188-197
17. **Pankratova, E.M.:** On the role of nitrogen-fixing blue-green algae in the nitrogen economy of temperate zone soil in the USSR, advances in nitrogen fixation research, Proceeding of the 5 th International Symposium on Nitrogen Fixation Noordwijkerhout, The Netherlands.
18. **Patika, V.F., Ermolina, A.V., Andreeva, N.A. (1982):** Vzaimootnošenje počvennih mikroorganizmov — azotofiksatorov s rastenijami risa v predelah rizosferi. Tez. dokladov V resp. konf. po probemam allelopattii Kiev. 140-141.
19. **Patika, V.F., Andreeva, N.A. (1987):** Cianobakterii i azotonii balans zataplivaemih počv. sel'skohozjastvennii biologija, No 1, 59-66
20. **Pokorna-Kozova, J. (1965):** Azotobakter pri ruznem organickem a mineralnom hnojenii — Rostlinna Vyroba, Ročnik, 11, 9: 985-992
21. **Sarić, Z., Rašović, B. (1963):** Uticaj nekih biljaka na dinamiku azotobaktera u zemljištu, Letopis naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, 7, 94-106
22. **Sarić, Z. (1968):** Kvantitativna karakteristika rizosferne mikroflore šećerne repe. "Zbornik radova" Instituta za poljoprivredna istraživanja, Novi Sad, 109-115,
23. **Sarić, Z. (1978):** Uticaj mineralnih đubriva na populaciju azotobaktera i oligonitrofila u čeromezemu. Mikrobiologija, Vo 15, No 2, 153-166
24. **Sarić, Z., Ristić, O. (1982):** Kvalitativna i kvantitativna zastupljenost rizosferne mikroflore u toku vegetacije šećerne repe. Zemljište i biljka, Vo 31, No 3, 385-392
25. **Shields, L.M. and Durrell, L.W. (1964):** Algae in relation to soil fertility. Bot. Rev. 30, 92-128
26. **Schtina, E.A. (1956):** Vilijanie počvenjh vodoroslei na rost i urožai selekohozjastvennih rasteinii. Tr. Kirovsk sel'skohoz. inst.,T 11, v. 3
27. **Schtina, E.A., Bairamova, L.A., Perminova, G.N., Tretjakova, A.N. (1964):** Vzaimodeistvie medžu počvennimi vodorosljami i ubiššimi rastenijami. Vkn: Fizika, hemija, biologija i mineralogija počv SSSR. "Nauka" M.

28. **Schtina, E.A. (1969):** Some regularities in the distribution of blue-green algae in soil. *Biologija Sine-zelenikh voooroslej*, 2, 21-45
29. **Schtina, E.A. (1972):** Some peculiarities of the distribution of nitrogen-fixing blue-green algae in soils. In: *Taxonomy and Biology of blue-green Algae*. T.V. Desikachavy, ed. Nadras University Press, pp. 294-295
30. **Schtina, E.A. i Pankratova, E.M. (1974):** Vzaimodeistvija azotofiksirujuščih sine-zelenih vodososleei s mikroorganizmami-sutikami. Aktualnie problemi biologii sinezelenih vodorosle "Nauka" 61-78
31. **Stewart, W.D.P. (1967a):** Nitrogen turnover in marine and brackish habitats. II Vse of  $^{15}\text{N}$  in measuring nitrogen fixation in the field. *Ann. Bot.*, N.S. 31, 385-407
32. **Stewart, V.D.P. (1967b):** Transfer of Biologically fixed nitrogen in a sand dune slack region. *Naturelondon*. 214, 603-4
33. **Tretjakova, A.H., Hekrasova, K.A. (1971):** Redakcija vodoroslei na formi i dozi mineralnih udobrenii. *Tr. Kirovskogo s.-h. instituta*, 23, 55: 214-220
34. **tretjakova, A.N. (1972):** Viživae most vodoroslei v počve pri raznih sposobah inokulacii. *Vsb.: Metodi izučenia v praktičeskogo ispozovanja počevni vodoslei Kirov*, 229-235
35. **Vaara, T., Vaara, M. and Niemela, S. (1979):** Two Improved Methods for obtaining Axenic Cultures of cyanobacteria, *Applied and Envir. Mmicrob.*
36. **Venkataraman, G.S. (1981):** Blue-green algae for rice production — a manual for its promotion, *FAO soils Bulltin*
37. **Watanabe, A. (1973):** On the inoculation of paddy fields in the Pacific area with nitrogen — fixing blue-green algae. *Soil Biol. Biochem*, 5,1: 161-162

**Adresa autora — Author's address:**

dipl. biolog Nada Milošević  
Poljoprivredni fakultet  
OOUR Institut za ratarstvo i  
povrtarstvo  
21000 Novi Sad  
M. Gorkog 30