

Fenotipska karakterizacija autohtonih sojeva rizobija koje noduliraju soju

Sažetak

Kvržične bakterije u simbioznim zajednicama s mahunarkama omogućuju značajan unos biološki vezanog dušika u tlo. Veliku važnost ima odabir sojeva koji su otporni na stresne uvjete u tlu. Danas se sve više susrećemo s ekstremnim vremenskim uvjetima te je od iznimne važnosti selekcija visoko učinkovitih sojeva kvržičnih bakterija (rizobija) kako bi predstajena bakterizacija sjemena mahunarki bila uspješna. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi fenotipske karakteristike sojeva kvržičnih bakterija izoliranih iz kvržica soje u uvjetima koji su izvan optimalnih vrijednosti za njihov rast. Uzorci tla za izolaciju sojeva prikupljeni su s područja Koprivničko-križevačke, Bjelovarsko-bilogorske i Vukovarsko-srijemske županije. Sposobnost rasta sojeva ispitivana je na različitim pH vrijednostima, temperaturama, koncentracijama soli, izvorima ugljikohidrata te je testirana osjetljivost na antibiotike. U svrhu utvrđivanja biokemijskog statusa svakog pojedinog izolata provedena su tri biokemijska testa (oksidaza, ureaza i katalaza) te su istražene morfološke karakteristike izolata. Utvrđeno je da je većina autohtonih sojeva rizobija iz ovog istraživanja u in vitro uvjetima pokazala značajnu otpornost na ispitivane uvjete, ali i da se međusobno značajno razlikuju po određenim svojstvima. Izolati K2 i K3 iz Koprivničko-križevačke županije pokazali su najveću toleranciju na povišene koncentracije soli. Od ispitivanih antibiotika, ampicilin je imao najslabiji utjecaj na izolate, dok su na streptomycin izolati bili najosjetljiviji. Dobiveni rezultati ukazuju na značaj selekcije autohtonih sojeva rizobija.

Ključne riječi: soja (*Glycine max* L.), kvržične bakterije, fenotipska karakterizacija sojeva, biokemijski testovi

Uvod

Soja [*Glycine max* (L.) Merr.] pripada porodici mahunarki (*Fabaceae*), podporodici *Papilionaceae* (*Fabaceae*). Jedna je od najznačajnijih kultura u svijetu koja ima široku primjenu u brojnim industrijama te je prepoznata kao visoko kvalitetan izvor ljudske i stočne hrane te važna sirovina za prerađivačku industriju (Vratarić i Sudarić, 2008). Domaća poljoprivredna proizvodnja soje u procesu je prilagođavanja agrarnoj politici Europske unije, koja daje prednost intenzivnijem uzgoju soje u odnosu na tradicionalni uzgoj pšenice i kukuruza koji u Republici Hrvatskoj zauzimaju najveći dio poljoprivrednih površina.

Mineralna gnojiva imala su značajan utjecaj na proizvodnju hrane u prošlosti no i danas predstavljaju dio moderne poljoprivredne proizvodnje. Njihov utjecaj na okoliš i zdravlje ljudi predstavlja glavno ograničenje njihove prekomjerne upotrebe. Zbog svega navedenog nalaže se veće iskorištavanje bioloških alternativa s ciljem smanjenja uporabe mineralnih dušičnih gnojiva.

Biološka fiksacija dušika jedan je od najviše istraživanih i praktično primjenjivih mikrobioloških procesa te je važna sastavnica procesa kruženja dušika u prirodi. Sposobnost usvajanja elementarnog dušika iz zraka ograničena je na nekoliko rodova prokariotskih mikroorganizama (cijanobakterije i bakterije) koje mogu enzimatskim sustavom- nitrogenazom reducirati elementarni dušik do amonijaka. Proces simbiozne fiksacije dušika osiguran je adekvatnim mutualističkim odnosom, simbioznom interakcijom mahunarki i kvržičnih bakterija (rizobija).

¹ dr. sc. Sanja Kajić, Nika Skendrović, mag. ing. Agr., dr. sc. Ivana Rajnović, prof. dr. sc. Sanja Sikora, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Hrvatska
Autor za korespondenciju: skajic@agr.hr

Među fiksatorima dušika koji noduliraju soju važno je spomenuti brzorastuće bakterije iz roda *Sinorhizobium* (*Ensifer*): *S. fredii* i *S. xinjiangense*, ali i već poznate spororastuće kvržične bakterije roda *Bradyrhizobium*, najčešćih vrsta *B. japonicum*, *B. diazoefficiens*, *B. ottawaense* i *B. elkanii*, (Ormeno-Orrillo i Rartinez-Romero, 2019).

Inokulacija raznih sorti soje sa učinkovitim autohtonim sojevima rizobija može dati sličan prinos zrna kao i primjena mineralnih dušičnih gnojiva. Rezultat je to brojnih istraživanja poput Hungria i sur. (2015) za *B. japonicum* i *B. diazoefficiens* u Brazilu, Koziel i sur. (2013) za *B. japonicum* u Poljskoj, Laggett i sur. (2017) za *B. japonicum* u Agrentini, Thuita i sur. (2018) za *B. japonicum* i *B. diazoefficiens* u Keniji. Značajne razlike u količini usvojenog dušika posljedica su genetskih karakteristika i simbiozne učinkovitosti različitih sojeva rizobija te njihove kompatibilnosti s biljkom (Blažinkov i sur., 2012).

Selekcijom visoko učinkovitih sojeva rizobija i njihovom primjenom u uzgoju mahunarki ostvaruju se veći prinosi, bolje kakvoće uz manja ulaganja (Sikora i Redžepović, 2000). Potencijal selekcije autohtonih sojeva leži u tome što se oni mogu bolje adaptirati na nepovoljne uvjete tla i imaju veću kompeticijsku sposobnost prema ostalim bakterijama tla, zbog toga se odlikuju većom simbioznom učinkovitošću. Ovo dokazuje da je proučavanje raznolikosti autohtonih rizobija važno u nastojanju da se pronađe soj koji je dobro prilagođen na nepovoljne uvjete u tlu i učinkovit u fiksaciji dušika kako bi se predsjetvenom bakterizacijom soje unaprijedio uzgoj ove vrlo vrijedne kulture u Hrvatskoj.

Glavni cilj rada je utvrditi fenotipska svojstva autohtonih sojeva rizobija koje karakterizira sposobnost stvaranja učinkovitih simbioznih zajednica sa sojom kako bi se mogli izabrati sojevi koji pokazuju najveću otpornost na nepovoljne agroekološke uvjete koji su često prisutni u području uzgoja soje u našoj zemlji.

Materijali i metode

Pedološke analize

Uzorci tla za izolaciju autohtonih sojeva rizobija sakupljeni su s poljoprivrednih površina koje se koriste za uzgoj ratarskih kultura. Uzorci su uzeti iz oraničnog horizonta dubine 0-30 cm sa 17 različitih lokacija Koprivničko-križevačke, Bjelovarsko-bilogorske i Vukovarsko-srijemske županije. U Zavodu za pedologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu određene su fizikalno-kemijske karakteristike istraživanih tala te njihova sistematska pripadnost.

Izolacija autohtonih sojeva rizobija

Za izolaciju autohtonih sojeva rizobija, postavljen je pokus u plasteniku. Sjeme soje, sorta Lucija, površinski je sterilizirano i posijano u prethodno dezinficirane lonce s tlom. Kvržice s korijena soje prikupljene su u fazi pune cvatnje. Izolacija autohtonih sojeva rizobija iz kvržica izvršena je standardnom metodom/postupkom (Vincent, 1970).

Morfološka karakterizacija izolata

Morfološka karakterizacija izolata (bojenja po Gramu) utvrđena je prema standardnom protokolu (Vincent, 1970).

Biokemijska karakterizacija izolata

U svrhu utvrđivanja fizioloških odnosno biokemijskih osobina svakog pojedinog izolata prema Shahzad i sur., (2012) provedena su tri biokemijska testa (katalaza, ureaza i oksidaza). Katalaza testom utvrđena je prisutnost enzima katalaze u bakterijama čija je uloga razlaganje toksičnog vodikovog peroksida na molekulu kisika i vodu. Oksidaza testom izvršena je identifikacija bakterija koje sadrže citokrom c oksidazu, enzim bakterijskog transportnog lanca elektrona, dok ureaza testom utvrđeno prisustvo enzima ureaze koji vrši hidrolizu uree pri čemu nastaje amonijak i CO₂.

Ekološka karakterizacija izolata

Optimalne temperature za rast kvržičnih bakterija su od 25-30 °C. Da bi se ispitalo kako različite temperature utječu na rast pojedinih izolata, ispitan je rast na temperaturama od 37 °C i 42 °C (Niste et al., 2015).

Standardna hranjiva podloga koja se smatra optimalna za rast rizobija sadrži 0,01 % NaCl-a. U ovom istraživanju ispitana je sposobnosti rasta izolata na 1 %, 2 % i 3 % koncentraciji NaCl (Romdhane et al., 2009).

Optimalan pH medija za rizobije je 6,8, no u svrhu utvrđivanja sposobnosti rasta na različitim pH vrijednostima prema Shamseldin i Werner (2005) provedeno je ispitivanje rasta izolata na četiri različite pH vrijednosti (pH 4,5, pH 5,5, pH 9 i pH 11).

Otpornost na antibiotike

U svrhu ispitivanja otpornosti izolata na određene antibiotike, proveden je test osjetljivosti filter disk metodom (Dekak i sur., 2018). U tu svrhu korištene su četiri različite vrste antibiotika: ampicilin, streptomycin, eritromicin i kanamicin različitih koncentracija (10, 15 i 30 µg mL⁻¹).

Rast sojeva na različitim izvorima ugljikohidrata

Standardna podloga za rast rizobija sadrži manitol kao izvor ugljikohidrata. U svrhu ispitivanja sposobnosti rasta izolata na drugim izvorima ugljikohidrata provest će se ispitivanje na YMA (Yeast Mannitol Agar) podlogama koje će umjesto standardnog manitola sadržavati druge ugljikohidrate kao izvore ugljika (Dekak i sur., 2018).

Rezultati i rasprava

Rezultati pedoloških analize pokazuju da istraživana tla prema klasifikaciji Husnjak (2014) pripadaju eutričnom smeđem tlu (Koprivničko-križevačkoj županija), područje Bjelovarsko-bilogorske županije pseudoglejnom tipu tla dok černozemnom tipu tla pripada područje Vukovarsko-srijemske županije. Fizikalne i kemijske analize tla napravljene su za prosječan uzorak svakog lokaliteta, dobiven uzimanjem s tri mjesta, dijagonalno na odabranoj parceli, iz površinskog sloja (dubine 0-30 cm).

Fizikalne analize tla pokazuju da najveći broj uzoraka (15 od 18) ima teksturnu oznaku praškasto ilovasto (Tablica 1) što je određeno prema sadržaju mehaničkih čestica (krupnog pijeska, sitnog pijeska, krupnog praha, sitnog praha i gline) dok preostalih pet uzoraka ima praškasto glinasto ilovasto (V3,V4,V5).

Tablica 1. Tekstura istraživanih tala**Table 1.** The texture of the investigated soils

Oznaka uzorka	Sadržaj mehaničkih čestica tla (%)					Teksturna oznaka
	Krupni pijesak 2,0-0,2 mm	Sitni pijesak 0,2-0,063 mm	Krupni prah 0,063-0,02 mm	Sitni prah 0,02-0,002 mm	Glina <0,002 mm	
V1, V2	1,0	3,8	35,8	32,9	26,5	PrI
V3, V4	0,6	2,6	32,7	34,2	29,9	PrGI
V5	0,3	0,9	34,4	34,8	29,6	PrGI
V6	0,5	0,9	38,4	35,7	24,5	PrI
H1	0,4	2,8	48,0	29,9	18,9	PrI
H2, H3	0,5	3,7	50,4	29,3	16,1	PrI
H4	0,3	3,9	50,0	26,9	18,9	PrI
H5, H6	1,1	3,8	50,8	27,5	16,8	PrI
K1, K2	1,4	3,3	46,2	32,9	16,2	PrI
K3, K4	1,2	3,4	28,7	48,7	18,0	PrI
K5, K6	0,4	3,7	52,1	29,5	14,3	PrI

H1-H6 uzorci s područja Bjelovarsko-bilogorske županije; K1-K6 uzorci s područja Koprivničko-križevačke županije; V1-V6 uzorci s područja Vukovarsko-srijemske županije; PrI- praškasta ilovača; PrGI- praškasta glinasta ilovača

Kemijske analize pokazuju da dominiraju kisela tla (Tablica 2). Četiri tla su jako kisela (H1, H4, H5, H6), a takva tla su zastupljena u Bjelovarsko-bilogorskoj županiji. Sedam uzoraka tala koja su su kisela sakupljena su sa područja Koprivničko-križevačke županije (K1, K2, K5, K6), Bjelovarsko-bilogorske županije (H2, H3) i Vukovarsko-srijemske (V5). Pet slabo kiselih tala (V1, V2, V3, V4, V6) uzorkovanih su s područja Vukovarsko-srijemske županije dok su preostala dva uzorka tla (K3, K4) uzorkovani s područja Koprivničko-križevačke županije. Što se tiče sadržaja humusa, 16 uzoraka tala je slabo humozno, a samo dva uzorka (K3, K4) su bila dosta humozna. Prema sadržaju ukupnog dušika, većina tala (njih 16) spada u tla dobro opskrbljena dušikom dok ih je dva umjereno opskrbljeno.

Tablica 2. Kemijske karakteristike uzorkovanih tala: sadržaj humusa i reakcija tla
Table 2. Chemical characteristics of soil samples: humus content and soil reaction

Oznaka uzorka	Sadržaj humusa		pH (reakcija tla)		
	%	Interpretacija	H2O	KCl	Interpretacija
V1, V2	2,17	slabo	6,93	5,62	slabo kiselo
V3, V4	2,38	slabo	7,11	6,02	slabo kiselo
V5	2,33	slabo	6,41	4,80	kiselo
V6	1,9	slabo	6,77	5,55	slabo kiselo
H1	2,17	slabo	5,10	3,98	jako kiselo
H2, H3	2,51	slabo	6,00	4,64	kiselo
H4	1,81	slabo	5,55	4,26	jako kiselo
H5, H6	1,68	slabo	5,77	4,38	jako kiselo
K1, K2	2,38	slabo	6,33	5,09	kiselo
K3, K4	3,67	slabo	7,91	7,24	alkalično
K5, K6	2,15	slabo	5,93	4,75	kiselo

Tehnikom bojanja po Gramu utvrđeno je kako su svi izolati Gram negativni štapići. Nakon provedbe katalaza testa utvrđeno je da su svi izolati katalaza negativni. Provedenim ureaza testom utvrđeno je da većina ispitanih sojeva nema sposobnost razgradnje uree. Samo 30 % izolata pokazalo je pozitivnu reakciju. Provedenim oksidaza testom utvrđeno je da 40 % ispitanih izolata pokazuje pozitivnu reakciju te da posjeduje enzim citokrom oksidazu.

Ekološka karakterizacija izolata prikazana je u tablici 3. Iz tablice 3. se može vidjeti da većina izolata ima sposobnost rasta na visokim temperaturama (37°C) što je vrlo zanimljivo ako uzmemo u obzir da su sojevi izolirani iz tala istočne i sjeverozapadne Hrvatske koja se nalaze u području umjereno tople klime čije se srednje temperature zraka najtoplijih mjeseci kreću od 18 do 22 °C. Prema podacima Državnog hidrometeorološkog zavoda, u ovom području u ljetnim mjesecima zabilježene su maksimalne temperature zraka od 35,1 do 39,9 °C pa je sposobnost autohtonih sojeva da toleriraju tako visoke temperature vrlo značajna karakteristika. Tipični sojevi kao i referentni imaju sposobnost rasta i na temperaturi 42°C.

Najveću sposobnost rasta na povišenim koncentracijama NaCl-a pokazali su izolati s područja Koprivničko-križevačke županije, kao i referentni i tipični sojevi (Tablica 3). Dong i sur. (2017) ukazuju da postoje značajne razlike između različitih vrsta rizobija u pogledu toleran-

tnosti na povišene koncentracije soli. Laranjo i Oliveira (2011) navode na su na povišene koncentracije soli najviše osjetljive vrste roda *Bradyrhizobium*, dok *Rhizobium* i *Sinorhizobium* vrste pokazuju veću tolerantnost. Salinitet je jedan od čimbenika koji mogu nepovoljno utjecati na simbioznu fiksaciju dušika, a mahunarke su najčešće osjetljiviji partner. Dong i sur., (2017) navode da izolacija rizobija tolerantnih na povišene koncentracije NaCl-a predstavlja jednu od najznačajnijih metoda kojom se ublažava ekološki problem povišenog saliniteta tla čime se omogućava bolji rast biljaka domaćina.

Svi ispitivani izolati pokazuju dobar rast na pH 4,5. Svih 18 ispitanih izolata imalo je pozitivan rast na pH 5,5 i 9, dok na pH 11 rasla su samo tri izolata (V1, V2 i V6). Tipični sojevi kao i referentni soj pokazali su dobar rast na svim ispitivanim pH vrijednostima. Hinsinger i sur. (2003) navode da vrste roda *Bradyrhizobium* pokazuju bolji rast u kiselom mediju u odnosu na vrste roda *Shizorhizobium* koje bolje rastu u neutralnom i alkalnom mediju.

Tablica 3. Stupanj tolerancije različitih sojeva rizobija na različite koncentracije NaCl, pH vrijednosti i temperaturu

Table 3. Tolerance degree of rhizobial strains to different NaCl concentrations, pH values and temperature

Oznaka uzorka	NaCl %	pH	T (C°)
V1	0,01	4,5-11	28-37
V2	0,1-1	4,5-11	28-37
V3	0,01	4,5-9	28-37
V4	0,01-1	4,5-9	28-37
V5	0,01-1	4,5-9	28-37
V6	0,01	4,5-9	28-37
H1	0,01-2	4,5-9	28-37
H2	0,01-1	4,5-9	28-37
H3	0,01-1	4,5-9	28-37
H4	0,01-1	4,5-9	28-37
H5	0,01	4,5-9	28-37
H6	0,01	4,5-9	28-37
K1	0,01-2	4,5-9	28-37
K2	0,01-3	4,5-9	28-37
K3	0,01-3	4,5-9	28-37
K4	0,01-2	4,5-9	28-37
K5	0,01	4,5-9	28-37
K6	0,01	4,5-9	28-37

Rezultati istraživanja osjetljivosti na antibiotike prikazani su tablici 4. Osjetljivost na antibiotike razlikuje se između različitih vrsta rizobija, ali i između sojeva istih vrsta. Izolati iz ovog istraživanja bili su najotporniji na djelovanje ampicilina gdje je većina izolata dobro rasla u njegovom prisustvu stvarajući minimalne zone oko diskova. Streptomycin je imao najštetniji učinak na ispitivane sojeve, potom eritomicin i kanamicin.

Tablica 4. Stupanj tolerancije sojeva rizobija na različite koncentracije antibiotika
Table 4. Antibiotic resistance of rhizobial isolates to different concentration of antibiotics

Antibiotik	Rezistencija %		
	10 µg mL ⁻¹	15 µg mL ⁻¹	30 µg mL ⁻¹
Ampicilin	100	100	78
Streptomycin	20	5	0
Eritromicin	50	36	28
Kanamycin	68	50	35

Rizobije su kemoorganotrofni mikroorganizmi (Pattnaik i sur., 2019) te kao takvi mogu iskoristavati velik broj ugljikovih spojeva za rast. Spektar tih komponenti ovisi o soju rizobija, te može dati uvid u prilagodbu na rizosferu biljke domaćina kao i na organske spojeve u tlu. Rezultati istraživanja ukazuju da su svi sojevi iskorištavali manitol, saharozu, maltozu, rafinozu, galaktozu, dekstrozu i fruktozu kao izvore ugljika što je bilo vidljivo iz njihovog rasta na hranjivim podlogama koje sadrže navedene šećere. Jedini soj koji nije rastao u prisutnosti laktoze je V6. Ovakvi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima na rizobijama izoliranim iz kvržica soje i drugih sporo rastućih rizobija (Hungria i sur., 2013).

Zaključak

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti da se autohtoni sojevi rizobija koji noduliraju soju međusobno značajno razlikuju po svojim svojstvima

Utvrđene su razlike u njihovim biokemijskim svojstvima te je uočena značajna otpornost prema nepovoljnim čimbenicima poput povišene temperature, povećanog sadržaja NaCl-a te niske pH vrijednosti što ima važnu ulogu u njihovoj potencijalnoj primjeni u pripremi preparata za predstjetvenu inokulaciju soje.

Daljnji tijek istraživanja vodio bi detaljnoj molekularnoj karakterizaciji sojeva koja bi omogućila identifikaciju na razini roda, vrste i soja.

Napomena

Rezultati prezentirani u ovom radu nastali su kao rezultat Diplomskog rada Nike Skendrović koji je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod naslovom „Fenotipska karakterizacija autohtonih sojeva kvržičnih bakterija koje noduliraju soju“

Literatura

- Blažinkov, M., Uher, D., Redžepović, S., Maćešić, D., Čolo, J., Štafa, Z., Sikora, S. (2012) Učinkovitost primjene bakterijske u uzgoju lucerne na području Bjelovarsko bilogorske županije. *Mljekarstvo* 62(3): 200-206.
- Dekak, A., Chabi, R., Benhizia, Y. (2018) Phenotypic characterization of rhizobia nodulating legumes *Genista microcephala* and *Argyrolobium uniflorum* growing under arid conditions. *Journal of Advanced Research*, 14: 35-42.
- Dong, R., Zhang, J., Huan, H., Bai, C., Chen, Z., Liu, G. (2017) High Salt Tolerance of a *Bradyrhizobium* Strain and Its Promotion of the Growth of *Stylosanthes guianensis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1625.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., Jaillard, B. (2003). Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant Soil* 248, 43–59.
- Hungria, M., Nogueira, M..A., Araujo, R.A. (2015). Soybean Seed Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability, *American Journal of Plant Sciences* 6: 811-817.
- Husnjak, S. (2014) Sistematika tala Hrvatske. Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb.
- Koziel, M., Gebala, B., Martyniuk, S. (2013) Response of Soybean to Seed Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and with Mixed Inoculants of *B. japonicum* and *Azotobacter chroococcum*, *Polish Journal of Microbiology* 62(4): 457–460.
- Leggett, M., Diaz-Zorita, M., Koivunen, M., Bowman, R., Pesek, R., Stevenson, C., Todd Leister, T. (2017). Soybean

Response to Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* in the United States and Argentina, *Agronomy Journal* 109(3): 1031-1038.

Niste, M., Vidican, R., Rotar, I., Pop, R. (2015) The Effect of Temperature Stress on *Rhizobium trifolii* and *Sinorhizobium meliloti* Strains *In Vitro*, *Bulletin UASVM Agriculture*, 72 (1).

Ormeno-Orrillo, E., Rartinez-Romero, E. (2019). A Genomotaxonomy View of the *Bradyrhizobium* Genus. *Frontiers in Microbiology* 10: 1334-1347.

Pattnaik S., Mohapatra B., Kumar U., Pattnaik M., Samantaray D. (2019) Microbe-Mediated Plant Growth Promotion: A Mechanistic Overview on Cultivable Plant Growth-Promoting Members. In: Giri B., Prasad R., Wu QS., Varma A. (eds) *Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment. Soil Biology*, vol55. Springer, Cham.

Romdhane, S.B., Trabelsi, M., Aouani, M. E., de Lajudie, P., Mhamdi, P. (2009) The diversity of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) under water deficiency as a source of more efficient inoculants. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 2568-2572.

Shahzad, F., Shafee, M., Abbas, F., Babar, S., Tariq, M. M., Ahmad, Z. (2012) Isolation and biochemical characterization of rhizobium meliloti from root nodules of Alfalfa (*Medicago sativa*). *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 22(2): 522-524.

Shamseldin, A., Werner, D (2005) High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium etli* strains from Egyptian soils. *Current Microbiology*, 50, 11-16.

Sikora, S., Redžepović, S. (2000) Identifikacija autohtonih sojeva *Bradyrhizobium japonicum* izoliranih iz različitih tipova tala zapadne Slavonije. *Poljoprivredna znanstvena smotra* 65: 229-236.

Thuita, M., Vanlauwe, B., Mutegei, B., Masso, C. (2018) Reducing spatial variability of soybean response to rhizobia inoculants in farms of variable soil fertility in Siaya County of western Kenya. *Agriculture, Ecosystem and Environment* 261: 153-160.

Vincent, J.M. (1970) A manual for practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England

Vratarić, M., Sudarić, A. (2008) Soja, Poljoprivredni institut Osijek, 1-460.

Prispjelo/Received: 4.2.2021.

Prihvaćeno/Accepted: 26.3.2021.

Original scientific paper

Phenotypic characterization of indigenous soybean rhizobia

Abstract

Nodule bacteria in symbiotic communities with legumes allow a significant uptake of biologically fixed nitrogen into the soil. The selection of strains that are resistant to stressful soil conditions is of great importance. Selection of highly efficient strains of nodule bacteria (rhizobia) for successful pre-sowing bacterization of legume seed is especially important today, when we are increasingly faced with extreme weather conditions. The aim of this study was to determine the phenotypic characteristics of strains of nodule bacteria isolated from soybean nodules under conditions that are beyond the optimal values for their growth. Soil samples for strain isolation were collected from Koprivnica-Križevci, Bjelovar-Bilogora and Vukovar-Srijem counties. The ability of strains to grow was tested at different pH values, temperatures, salt concentrations and carbohydrate sources. Antibiotic susceptibility was tested as well. In order to determine the biochemical status of each individual isolate, three biochemical tests (oxidase, urease and catalase) were performed, and the morphological characteristics of the isolates were investigated. It was found that most indigenous strains of rhizobia from this study *in vitro* showed significant resistance to testing conditions, but they also differ significantly from each other in certain properties. Isolates K2 and K3 from Koprivnica-Križevci county showed the highest tolerance to elevated salt concentrations. From tested antibiotics, ampicillin showed to have the weakest effect on the selected isolates, while the isolates were most sensitive to streptomycin. The obtained results indicate the importance of selection of autochthonous strains of rhizobia.

Keywords: soybean (*Glycine max* L.), nodule bacteria, phenotypic characterization of strains, biochemical tests