

Sinergijski učinak *Rhizobium hidalgonense* i *Bacillus* sp. u fiksaciji dušika i promociji rasta graha (*Phaseolus vulgaris* L.)

Sažetak

Cilj ovog istraživanja bio je fenotipski karakterizirati sojeve simbioznih fiksatora dušika vrste *Rhizobium hidalgonense* i odabrati one s najpovoljnijim svojstvima za inokulaciju graha. Daljnji cilj bio je ispitati sinergijski učinak koinokulacije selektiranih sojeva i bakterija koje promoviraju rast biljka (PGPR) roda *Bacillus* (*B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*) u usporedbi s pojedinačnom inokulacijom.

U laboratorijskim uvjetima utvrđena su svojstva važna za uspješnu kolonizaciju i fiksaciju dušika, uključujući aktivnost katalaze, ureaze, oksidaze i sposobnost lučenja organskih kiselina. Soj 22BT pokazao je najveći potencijal temeljem fenotipskih karakteristika. In vitro testovi potvrdili su sposobnost svih analiziranih sojeva za biološku fiksaciju dušika. U ispitivanju antagonističkog djelovanja između rizobija i *Bacillus* spp. nije utvrđena međusobna inhibicija.

U pokusu provedenom u kontroliranim uvjetima, tretmani s koinokulacijom pokazali su statistički značajno više vrijednosti biomase graha i sadržaja dušika u biljci u odnosu na pojedinačne inokulacije. Kombinacija soja *R. hidalgonense* 22BT s *B. megaterium* (R2B3) rezultirala je najvišim sadržajem dušika u biljci (9,1 mg/biljci), dok je kombinacija istog soja s *B. thuringiensis* (R2B1) dala najveću masu suhe tvari nadzemnog dijela (2,62 g). Masa kvržica nije bila u korelaciji s količinom fiksiranog dušika.

Dobiveni rezultati potvrđuju potencijal *R. hidalgonense* u fiksaciji dušika te u promociji rasta graha u kombinaciji s PGPR čime se ovi sojevi ističu kao kvalitetni kandidati za razvoj učinkovitih mikrobnih biostimulanasa u održivoj poljoprivredi.

KLjučne riječi: biološka fiksacija dušika, koinokulacija, PGPR, biostimulansi, održiva poljoprivreda

Uvod

Grah (*Phaseolus vulgaris* L.), jedna je od najvažnijih mahunarki u ljudskoj prehrani zbog visokog sadržaja kvalitetnih proteina, ugljikohidrata, prehrambenih vlakana, vitamina, minerala te mikrohranjiva poput željeza, kalija, magnezija i folne kiseline (Camara i sur., 2013). Grah je u Hrvatskoj tradicionalna mahunarka koju uzgajaju mali poljoprivrednici koristeći tradi-

1 doc. dr. sc. **Ivana Rajnović**, **Iva Garofulić**, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Hrvatska

2 **Anastazija Huđ**, dr. sc. **Ines Sviličić Petrić**, Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10002 Zagreb, Hrvatska

Autor za korespondenciju: irajnovic@agr.hr

cionalne poljoprivredne tehnike u sustavima proizvodnje s niskim ulaganjima (Vidak i sur., 2015). Prema podacima Državnog zavoda za statistiku (DZS, 2023), površine pod graham u Hrvatskoj kreću se oko 2.500–3.000 ha, s ukupnom godišnjom proizvodnjom od 4.000–6.000 tona. Kao mahunarka, grah stupa u simbiotski odnos s bakterijama iz roda *Rhizobium*, koje u korijenskim kvržicama (nodulima) fiksiraju atmosferski dušik (N_2) u amonijak – oblik dostupan biljci. Ovaj proces omogućuje smanjenje potrebe za mineralnim dušičnim gnojivima, što ima značaj za održivu poljoprivredu i očuvanje okoliša. Za razliku od nekih strogo specifičnih mahunarki (npr. soja), grah pokazuje širok spektar simbioznih partnera; *Rhizobium etli*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium leguminosarum* (Shamseldin i Velazquez, 2020). Ova sposobnost ne jamči efikasnost; kvržice se mogu formirati i s neučinkovitim sojevima zbog čega se grah često opisuje kao simbiotski slabije učinkovita mahunarka (Martínez-Romero, 2003). Međutim, istraživanja u različitim agroklimatskim uvjetima pokazala su da inokulacija s visokoefikasnim sojevima može povećati prinos graha za 20 - 40 % i sadržaj dušika u biljkama za 30 - 60 % u odnosu na neinokulirane kontrole (Samago i sur., 2018).

U posljednjem desetljeću bilježi se porast znanstvenih istraživanja koja ispituju sinergijski učinak koinokulacije rizobija s bakterijama koje promoviraju rast biljaka (engl. *plant growth-promoting bacteria* – PGPR), među koje ubrajamo pripadnike rodova *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Paenibacillus* i brojne druge (Kumari i sur. 2024). PGPR mogu doprinijeti uspješnosti simbioze i rastu biljaka kroz nekoliko mehanizama: sinteza fitohormona, povećana dostupnost hraniva, osobito fosfora i željeza (npr. proizvodnjom siderofora), povećana otpornost biljaka na stres (sušu, salinitet i temperaturu), stimulacija stvaranja kvržica i fiksacije dušika (Egamberdieva i sur., 2015; Cassán i sur., 2020).

Brojna istraživanja pokazala su da koinokulacija *Rhizobium* spp. i PGPR-a kod graha može rezultirati većim brojem i masom kvržica u odnosu na inokulaciju samo rizobijem, povećanjem sadržaja dušika u biljkama, ponekad i do 70 % više u odnosu na kontrolu te višom ukupnom biomasom i prinosom (Abaidoo i sur., 2019). Važno je istaknuti da učinak koinokulacije ovisi o kompatibilnosti sojeva (rizobija i PGPR-a), svojstvima tla i okolišnim uvjetima, sorti graha i njezinoj osjetljivosti na inokulante. Zato se sve češće razvijaju specifične formulacije mikrobnih biljnih biostimulansa koje uključuju pažljivo odabrane kombinacije mikroorganizama s komplementarnim svojstvima (Kumari i sur. 2024).

Rhizobium hidalgonense je simbiotska bakterija opisana relativno nedavno (Álvarez i sur., 2013), izolirana iz kvržica graha u regiji Hidalgo u Meksiku. Više sojeva ove vrste otkriveno je i tlima RH (Rajnović, 2017). Dokazano je da ova vrsta ima **značajnu** sposobnost nodulacije graha, međutim njezina **učinkovitost u fiksaciji dušika bila je niža u usporedbi s drugim vrstama** rizobija koje se standardno koriste za inokulaciju graha (Álvarez i sur. 2013).

Bakterije roda *Bacillus* pripadaju najvažnijim bakterijama koje potiču rast biljaka zbog njihove otpornosti na nepovoljne uvjete te raznolikosti mehanizama kojima stimuliraju rast biljaka. *Bacillus megaterium* se primjerice koristi kao biognojivo jer pokazuje pozitivne učinke na klijanje sjemena, rast korijena i prinos kod više kultura, uključujući mahunarke (Vassilev i sur., 2006). *Bacillus thuringiensis* široko je poznat kao biopesticid međutim kod brojnih sojeva otkrivena su svojstva koja potiču rast biljaka. *Bacillus amyloliquefaciens* poznat je po antifungalnim i antibakterijskim svojstvima, ali i po poticanju rasta biljaka putem produkcije enzima, siderofora i hormona. Uspješno se koristi u koinokulacijama s rizobijama za poboljšanje nodulacije i fiksacije dušika kod mahunarki (Kloepper i sur., 2004).

Pretpostavka ovog istraživanja je da neki od sojeva *R. hidalgonense* posjeduju pozitivne fenotipske karakteristike bitne za učinkovitu fiksaciju dušika. Pretpostavka je također da će koi-

inokulacija (rizobija i PGPR iz roda *Bacillus*) pozitivno utjecati na rast i sadržaj dušika kod graha.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati fenotipske karakteristike simbiotskih fiksatora dušika vrste *R. hidalgonense* i temeljem njih odabrati sojeve za primjenu u inokulaciji graha. Cilj je također bio utvrditi postoji li sinergijski učinak koinokulacije rizobija i PGPR bakterija u usporedbi s pojedinačnom inokulacijom.

Materijali i metode

Sojevi korišteni u pokusu

Sojevi vrste *R. hidalgonense* korišteni u ovome eksperimentalnom radu dio su kolekcije Zavoda za mikrobiologiju, Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta. Sojevi su izolirani i identificirani u sklopu izrade doktorskog rada Ivane Rajnović gdje su određena njihova fenotipska svojstva poput otpornosti na različite pH vrijednosti, temperature i koncentracije soli (Rajnović, 2017.). Ova svojstva su važan pokazatelj sposobnosti sojeva da prežive u različitim uvjetima u tlu.

U sklopu projekta „Potencijal rizosfernog mikrobioma u prilagodbi poljoprivrede klimatskim promjenama (PERSPIRE)“ (KK.05.1.1.02.0001), financiranog od strane Europskog fonda za regionalni razvoj, izolirani su i identificirani sojevi raznih vrsta *Bacillus* sp.. Određene su njihove karakteristike poticanja rasta biljaka (PGP): proteazna aktivnost, solubilizacija fosfora, proizvodnja egzopolisaharida, proizvodnja organskih kiselina, proizvodnja amonijaka, celulaznu aktivnost (Senko i sur., 2024). Temeljem najvećeg broja pozitivnih karakteristika odabrana su tri soja za koinokulaciju graha: B1 = K4-9 (*B. thuringiensis*), B2 = P2.9-8 (*B. amyloliquefaciens*) i B3 = P1.15-12 (*B. megaterium*).

Sojevi su oživljeni metodom iscrpljenja kako bi se dobile svježije, čiste kulture, slijedeći standardni protokol (Vincent, 1970). Sojevi rizobija inokulirani su na Petrijeve zdjelice s kvasnim ekstraktom i manitolom (YEM, yeast extract manitol), 5 dana na 28 °C, dok su sojevi *Bacillus* rasli na nutrient agaru (NA) na istoj temperaturi 3 dana.

Fenotipska karakterizacija rizobija

Deset sojeva *R. hidalgonense* (14Z, 20T, 20Z, 22BT, 22AZ, 23Z, 25T, 26T, 26Z, 27Z) testirano je na sljedeća svojstva važna za simbiotsku učinkovitost kako je opisano u priručniku za rizobije (Somasegaran i Hoben, 1994). Svi eksperimenti rađeni su u tri ponavljanja.

1. Katalazna aktivnost; na predmetno stakalce na kojem je dodana mala količina mikrobne biomase dodano je nekoliko kapi vodikovog peroksida. Stvaranja mjehurića smatra se pozitivnom reakcijom.

2. Za ispitivanje aktivnosti enzima ureaze, izolati su nacijspljeni na hranjivu podlogu s ureom i indikatorom fenol-crveno. Nakon inkubacije od tri dana na temperaturi od 30 °C, izolati kod kojih je došlo do promjene boje iz žute (pH 6.8) u ružičastu (pH 8.1) karakterizirani su kao urea pozitivni.

3. Oksidaza test proveden je u svrhu utvrđivanja postojanja enzima citokrom c oksidaze, sastavnog dijela transportnog lanca elektrona. Na filter papir dodana je kap reagensa (BBLTM Oxidase Reagent Droppers) te kap sterilne destilirane vode, a na to je sterilnom ezom nanijeta biomasa izolata. Promjene boje filter papira u ljubičastu upućuje na prisutnost enzima (pozitivna reakcija). Promjena boje interpretirana je kroz prvih 10 sekundi od dodavanja izolata.

4. Neke bakterije mogu iskorištavati glukozu razgrađujući je do mliječne, octene ili mravlje kiseline. Sposobnost sinteze tih kiselina testira se Methyl Red Voges-Proskauer (MR-VP) testom. Izolati su inokulirani te inkubirani na 28 °C 48 sati nakon čega je dodano 5 kapi metil crvenog indikatora. Kod pozitivnog rezultata indikator mijenja boju u crvenu.

5. Sposobnost biološke fiksacije dušika određena je na hranjivoj podlozi bez dušika. Izolati su inkubirani na Jansenovom agaru 5 dana na 28 °C. Pojava kremastih, bijelih i sjajnih kolonija predstavlja pozitivan rezultat ovog testa.

Test kompatibilnosti sojeva

Temeljem najvećeg broja pozitivnih fenotipskih karakteristika, te uzimajući u obzir rast tj. dobivenu biomasu, selektirana su dva soja *R. hidalgonense* (22BT i 26T) za pokus inokulacije graha u pojedinačnoj kulturi te u koinokulaciji s *Bacillus* sp..

Kako bi se provjerilo jesu li selektirani sojevi međusobno kompatibilni, tj. postoji li između njih antagonizam, primijenjena je metoda okomitog razmaza (Uhlir i sur., 2021). Svježa kultura *R. hidalgonense* razmazana je na NA mediju u ravnoj liniji i inkubirana 3 dana na 30 °C nakon čega je u okomitom razmazu dodane kultura *Bacillus* te su petrijevke inkubirane naredna tri dana. Pojava zone inhibicije veće od 3 mm ili gradijent na linijama rasta smatra se antagonizmom. Ovaj test je proveden na šest kombinacija (2 soja *R. hidalgonense* x 3 *Bacillus* sp.).

Učinak rizobija i Bacillus sp. u fiksaciji dušika i promociji rasta graha

Utjecaj dvaju sojeva vrste *R. hidalgonense* te njihove kombinacije s tri vrsta roda *Bacillus* na rast graha ispitan je monofaktorijskim pokusom postavljenim prema shemi slučajnog bloknoeg rasporeda (RCBD) u tri ponavljanja. Pokus je proveden u kontroliranim uvjetima komore rasta (temperatura 25 ± 2 °C/ dan, 20 ± 2 °C noć, fotoperiod 16 sati svjetla i 8 sati tame, uz relativnu vlažnost zraka 70 %).

Ukupno je testirano devet tretmana: dva soja *R. hidalgonense* (R1 = 26T, R2 = 22BT) korištena pojedinačno te u kombinaciji s trima vrstama *Bacillus* spp. (B1 = *B. thuringiensis*, B2 = *B. amyloliquefaciens*, B3 = *B. megaterium*) te negativna kontrola (0) -bez bakterizacije.

1. Priprema inokuluma; Čiste kulture svakog soja uzgojene su u 100 ml odgovarajuće tekuće hranjive podloge: za rizobije u Yeast Mannitol bujonu (YMB), a za *Bacillus* u nutrient bujonu (NB). Uzgoj je proveden na 28 °C pri rotaciji od 150 rpm do postizanja koncentracije od 10⁸ CFU/ml – 6 dana za rizobije, odnosno 4 dana za *Bacillus*.

2. Sjetva i inokulacija; Sjeme graha sorte Trešnjevac dezinficirano je površinski potapanjem u 96 % etanol (1 minuta), zatim u 5 % otopinu natrijeva hipoklorita (5 minuta), uz trostruko ispiranje sterilnom destiliranom vodom. Sjeme je zatim inokulirano 20-minutnim umakanjem u inokulum te posijano u posude napunjene steriliziranim supstratom bez dušika (mješavina vermikulita i pijeska u omjeru 1:2 (v/v)). U svaku posudu posijano je pet sjemenki. Tijekom vegetacije, biljke su redovito zalijevane sterilnom hranjivom otopinom bez dušika kako bi se osiguralo da dušik u biljci potječe isključivo iz biološke fiksacije.

3. Sakupljanje uzoraka i analize biljnog materijala

U fazi pune cvatnje (otprilike 40 dana nakon sjetve), biljke su izvađene iz supstrata, a kvržice s korijena pažljivo sakupljene, isprane i sušene do konstantne mase na sobnoj temperaturi. Nadzemni biljni materijal sušen je u sušioniku na 70 °C do konstantne mase. Na temelju mase određeni su: Prinos suhe tvari biljke (g/biljci), Masa suhe tvari kvržica (mg/biljci)

Ukupna količina dušika u nadzemnom dijelu biljke (mg/biljci), metodom po Kjeldahlu (AOAC, 1995).

4. Dobiveni podaci analizirani su analizom varijance (ANOVA). Statistička obrada podataka provedena je korištenjem softverskog paketa SAS 9.4 for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Rezultati i rasprava

Korištenje selekcioniranih rizobija u predstjetvenoj inokulaciji graha tradicionalna je praksa koja osigurava dostupnost dušika prirodnim putem. Međutim, s obzirom na činjenicu da je grah, u usporedbi s drugim mahunarkama, slabiji fiksator dušika, veliki je izazov istražiti nove načine povećanja produktivnosti ove kulture na učinkovit i održiv način. Nadalje, grah stupa u simbiotne odnose s velikim brojem vrsta rizobija čija uspješnost u fiksaciji dušika ovisi o vrsti, soju, ali i o uvjetima koji vladaju u tlu (Singh i sur., 2023). Upravo je *R. hidalgonense* primjer vrste pronađene u tlima srednje i južne Amerike, ali i u RH (Rajnović, 2017) koja otvara mogućnost za istraživanje potencijala u simbiozi s grahom. S obzirom na to da istraživanja u ovome području pokazuju da je teško pronaći jedan soj koji posjeduje sve mehanizme pozitivnog utjecaja na rast bilja, sve veći naglasak je na pronalasku kombinacija raznih sojeva s poželjnim karakteristikama. Kako bi se iskoristio potencijal raznih sojeva, nakon njihove izolacije i identifikacije potrebno je provesti više testova koji ukazuju na potencijal za fiksaciju dušika i promociju rasta.

U ovome radu odabrani su sojevi PGPR-a roda *Bacillus* temeljem njihovih prethodno ispitanih svojstava. Za rizobije je proveden niz fenotipskih svojstva, za koje su rezultati prikazani su u tablici 1.

Katalaza test

Katalaza je enzim koji razdvaja za stanicu štetan vodikov peroksid na vodu i kisik štiteći organizam od oksidacije. Pozitivna katalazna aktivnost ukazuje na otpornost na oksidativni stres koji nastaje u tlu i tijekom stvaranja kvržica ili kolonizacije korijena. Prema rezultatima katalaza testa za sojeve *R. hidalgonense* samo je soj 22BT pokazao pozitivnu reakciju. U istraživanju Marzec-Grządziel i sur. (2020) također je mali broj izolata pokazao pozitivnu reakciju katalaze.

Ureaza test

Ureaza je enzim koji uz pomoć vode razdvaja ureu na amonijak i ugljikov dioksid. Aktivnost ureaze može pomoći u oslobađanju amonijaka kao izvora dušika, osobito u tlima s visokim sadržajem ureje (unesene putem mineralnih gnojiva). Pozitivni rezultati zabilježeni su kod sojeva 14Z, 20Z, 22BT (slika 1. a), 22AZ, 26T i 27Z. Smatra se da pozitivna aktivnost ureaze može pridonijeti boljoj adaptaciji na uvjete tla i učinkovitijoj fiksaciji dušika (Sharma i sur. 2022).

Oksidaza test

Enzim citokrom c oksidaza dio je transportnog lanca elektrona, a voda ili vodikov peroksid nastaju kao krajnji produkt ovog metabolizma. Provedeni oksidaza test pokazao je pozitivne rezultate kod svih sojeva s time da je kod soja 22BT uočena slaba (s) reakcija. Većina sojeva rizobija je oksidaza-pozitivna, što je važno za preživljavanje u tlu prije uspostave simbiotnog odnosa (Somasegaran i Hoben, 1994).

Sinteza organskih kiselina (mravlja, mliječna, octena) značajna je za rizobije jer ovim putem otapaju nedostupne tvari poput fosfata olakšavajući biljkama njegovo usvajanje.

Rezultati testa sinteze organskih kiselina pokazali su da više od pola ispitanih sojeva ima tu sposobnost (14Z, 22BT, 25T, 26T i 27Z te soj 20Z sa slabom reakcijom).

Fiksacija dušika

Sposobnost biološke fiksacije dušika najvažnija je karakteristika u proučavanju autohtonih sojeva rizobija za potencijalnu primjenu. U *in vitro* uvjetima, svih 10 ispitanih sojeva pokazalo je sposobnost fiksacije dušika iako je kod nekih bila slabije izražena.

Tablica 1. Fenotipska karakterizacija sojeva *R. hidalgonense*
Table 1. Phenotypic characterisation of *R. hidalgonense* strains

Soj/ Strain	Katalaza test/ Catalase test	Ureaza Test/ Urease test	Oksidaza test/ Oxidase test	Produkcija organskih kiselina/ Organic acids production	Fiksacija dušika/ Nitrogen fixation
14Z	-	+	+	+	+
20T	-	-	+	-	+
20Z	-	+	+	s	s
22BT	+	+	s	+	s
22AZ	-	+	+	-	+
23Z	-	-	+	-	+
25T	-	-	+	+	+
26Z	-	-	+	-	+
26T	-	+	+	+	s
27Z	-	+	+	+	s

+ pozitivna reakcija, - negativna reakcija, s -slaba reakcija/ + positive reaction, - negative reaction, s - weak reaction/

Kompatibilnost rizobija i PGPR

S obzirom na to da je cilj bio ispitati učinkovitost različitih vrsta u koinokulaciji za grah, bilo je potrebno isključiti mogućnost da između selektiranih sojeva postoji antagonističko djelovanje. Ovo je ispitano metodom okomitog razmaza prema Uhlig i sur. (2021), a primjer rezultata takvog testa prikazan je na slici 1. b. Utvrđeno je da nema antagonističkog djelovanja između ispitanih rizobija i PGPR.

Učinak rizobija i *Bacillus* sp. u fiksaciji dušika i promociji rasta graha

Rezultati pokusa provedenog u kontroliranim uvjetima prikazani su u tablici 2, a pokazuju da koinokulacija sojeva *R. hidalgonense* s predstavnicima roda *Bacillus* pozitivno utječe na fiksaciju dušika i rast graha.

Statistički opravdane razlike dobivene su za masu suhe tvari biljke i za sadržaj dušika u nadzemnom dijelu biljke. Tretman R2B3 (soj *R. hidalgonense* 22BT u kombinaciji s *Bacillus megatherium*), ostvario je najviši sadržaj dušika u biljci (9,1 mg/biljci), dok je najveća masa suhe tvari biljke (2,62 g/biljci) zabilježena kod tretmana R2B1 - istog soja rizobija s *B. thuringiensis*.

Pozitivni učinci koinokulacije utvrđeni su i u istraživanjima na drugim kulturama poput, soje (Egamberdieva i sur., 2017), graška (Sadeghi i sur., 2012).

Masa suhe tvari kvržica između tretmana nije pokazala statistički opravdane razlike, unatoč

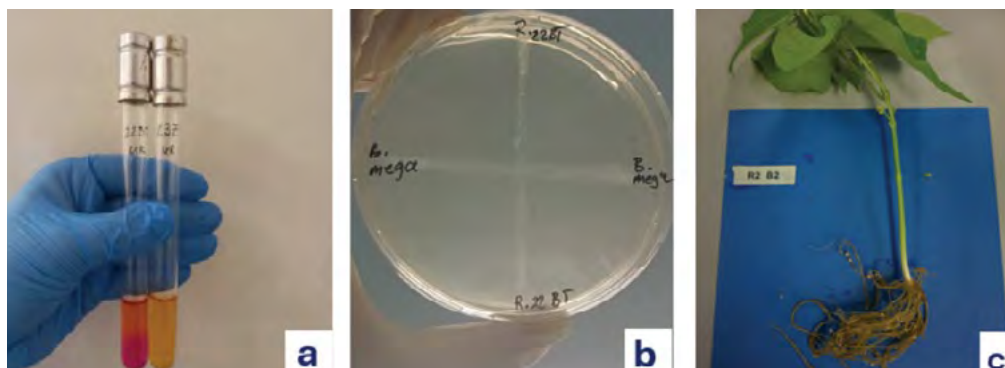
uočenim razlikama u apsolutnim vrijednostima. Dobiveni podaci ne potvrđuju ni korelaciju između mase kvržica i sadržaja dušika. Na primjer, kombinacijom R2B2 (slika 1. c), s relativno malom masom kvržica (0,18 g), ostvaren je jedan od najviših sadržaja dušika, što može ukazivati na bolju efikasnost. Ovo se podudara s radom Park i sur. (2021), koji su pokazali da manji, ali funkcionalnije kvržice mogu imati veći doprinos ukupnoj fiksaciji. Slična su zapažanja iznijeta u radu Rajnović (2017), gdje su pojedini sojevi *R. leguminosarum* tvorili kvržice manje mase, ali s višim ukupnim sadržajem fiksiranog dušika, dok je *R. hidalgonense* formirao kvržice veće mase s nižim sadržajem dušika.

Tablica 2. Učinkovitost *R. hidalgonense* i *Bacillus* sp. na rast graha i sadržaj dušika / **Table 2.** Effectiveness of *R. hidalgonense* and *Bacillus* spp. on bean growth and nitrogen content.

Tretman/ Treatment	Masa suhe tvari kvržica (mg/biljci)/ Nodule dry biomass (mg/plant)	Masa suhe tvari biljke (g)/ Shoot dry weight (g)	Sadržaj dušika u nadzemnom dijelu biljke (mg/biljci)/ Nitrogen content in the aboveground part of the plant (mg/plant)
0 (kontrola)	10,2 ^a	1,52 ^d	4,1 ^d
R1 (<i>R. hidalgonense</i> 26T)	14,5 ^a	2,01 ^c	6,3 ^c
R2 (<i>R. hidalgonense</i> 22BT)	16,0 ^a	2,23 ^{bc}	6,7 ^c
R1 (<i>R. hidalgonense</i> 26T) + B1 (<i>B. thuringiensis</i>)	16,8 ^a	2,26 ^{bc}	8,2 ^{ab}
R1 (<i>R. hidalgonense</i> 26T) + B2 (<i>B. amyloliquefaciens</i>)	15,1 ^a	2,18 ^c	7,0 ^{bc}
R1 (<i>R. hidalgonense</i> 26T) + B3 (<i>B. megaterium</i>)	15,7 ^a	2,20 ^c	7,4 ^{bc}
R2 (<i>R. hidalgonense</i> 22BT) + B1 (<i>B. thuringiensis</i>)	18,9^a	2,62^a	8,0 ^{ab}
R2 (<i>R. hidalgonense</i> 22BT) + B2 (<i>B. amyloliquefaciens</i>)	17,3 ^a	2,45 ^{ab}	6,8 ^c
R2 (<i>R. hidalgonense</i> 22BT) + B3 (<i>B. megaterium</i>)	17,5 ^a	2,49 ^{ab}	9,1^a

Prosjeci sojeva označeni istim slovom signifikantno se ne razlikuju prema LSD testu ($p < 0,05$)/ Means of the strains marked with the same letter are not significantly different according to the LSD test ($p < 0.05$).

Rezultati upućuju na poseban značaj soja R2 (*R. hidalgonense* 22BT), koji je u svim varijantama ostvario bolje rezultate u odnosu na soj R1 (26T) bez obzira na vrstu *Bacillus* s kojim je bio koinokuliran. Ovo može upućivati na njegovu veću kompatibilnost s grahom, odnosno na bolju adaptabilnost tom biljnom domaćinu, što se može pripisati specifičnim simbiotskim genima ili boljoj sposobnosti kolonizacije rizosfere.



Slika 1. Ispitivanje fenotipskih karakteristika *R. hidalgonesse* kompatibilnosti sojeva te nodulacije graha a) Ureaza test b) test antagonizma c) kvržice (noduli) na tretmanu R2B2

Figure 1. Testing the phenotypic characteristics of *R. hidalgonesse*, strain compatibility, and bean nodulation a) Urease test b) antagonism test c) nodules on R2B2 treatment

Izvor/ Source: a) Iva Garofulić, Završni rad b), c) Ivana Rajnović, foto

Ovi rezultati potvrđuju da pažljivo selektirane kombinacije sojeva rizobija i *Bacillus* mogu imati važnu ulogu u povećanju učinkovitosti biološke fiksacije dušika i rastu biljaka, čime se otvara prostor za razvoj ciljanih bioinokulanata (mikrobnih biljnih biostimulansa) za grah i srodne mahunarke.

Zaključak

Dobiveni rezultati pokazuju da koinokulacija sojeva *R. hidalgonesse* i bakterija roda *Bacillus* može imati pozitivan učinak na fiksaciju dušika i rast graha u kontroliranim uvjetima. Statistički značajne razlike utvrđene su između tretmana za sadržaj ukupnog dušika te masu suhe tvari. Najveći sadržaj ukupnog dušika u biljci postignut je kod tretmana s kombinacijom R2B3 odnosno soja *R. hidalgonesse* 22BT i *B. megaterium*, dok je najviša masa suhe tvari nadzemnog dijela zabilježena kod kombinacije R2B1 (*R. hidalgonesse* 22BT i *B. thuringiensis*), što ukazuje na potencijalnu sinergiju između određenih sojeva.

Iako je različitim tretmanima dobivena razlika u masi kvržica, ti rezultati nisu bili statistički značajni. Ovo potvrđuje da masa kvržica nije nužno u korelaciji s količinom fiksiranog dušika. Fiziološka aktivnost kvržica važniji je pokazatelj simbiotičke učinkovitosti od njihove morfologije odnosno mase. Rezultati istraživanja potvrđuju hipotezu da i manje istražen simbiotički fiksator dušika, *R. hidalgonesse* može biti učinkovit u fiksaciji dušika, a u koinokulaciji s PGPR može poticati rast graha. Ove rezultati mogu poslužiti kao temelj za razvoj novih formulacija biostimulansa za primjenu u održivoj proizvodnji graha. Daljnja istraživanja u tu svrhu trebala bi uključiti testiranje ovih kombinacija u poljskim uvjetima, a bilo bi korisno i proširiti ih na veći broj bakterija.

Napomena

Dio rezultata prezentiranih u ovom radu nastali su tijekom izrade Završnog rada studentice Ive Garofulić pod naslovom „Fenotipska karakterizacija autohtonih sojeva *Rhizobium hidalgonesse* izoliranih iz tala sjeverozapadne Hrvatske“.

Literatura

- Abaidoo, R.C., Finer, J.J., Unity, W.S., Dumbroff, E.B., Sadowsky, M.J. (2019).** Response of common bean to co-inoculation with *Rhizobium* and PGPR in sub Saharan Africa. *African Journal of Agricultural Research*, 14 (12), 651–659. doi:10.5897/AJAR2019.14055
- Álvarez, F., Vinuesa, P., Sanjuán, J., Ballard, R. (2013).** *Rhizobium hidalgonense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63 (5), 1682–1687. doi:10.1099/ijs.0.042151-0
- AOAC. (1995).** Official method of analysis of AOAC International. 16th Edition, Vol. I, Arlington, USA.
- Camara, C.R.S., Urrea, C.A., Schlegel, V. (2013).** Pinto Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a Functional Food: Implications on Human Health. *Agriculture* 3: 90–111.
- Cassán, F., Giordano, W., Luna, V. (2020).** Synergistic interactions between *Rhizobium* and PGPR: A promising strategy to improve legume productivity. *Rhizosphere*, 13, p.100194. doi:10.1016/j.rhisph.2020.100194
- DZS (2023).** Statistički ljetopis Republike Hrvatske. Državni zavod za statistiku. URL: <https://www.dzs.hr> (03.06.2025.)
- Egamberdieva, D., Berg, G., Lindström, K., Räsänen, L.A. (2015).** Alleviation of salt stress in wheat by a combination of nitrogen fixing and plant growth promoting rhizobacteria. *Plant and Soil*, 405, 305–319. doi:10.1007/s11104-015-2532-0
- Egamberdieva, D., Kucharova, Z., Davranov, K., Berg, G., Makarova, N., Azarova, T. (2017).** Plant growth promoting bacteria associated with medicinal plants: Influence of *Bacillus* spp. on growth and nutrient uptake of *Salvia officinalis* L. and *Melilotus officinalis* L. under salt stress. *Plant and Soil*, 415 (1–2), 385–399. doi:10.1007/s11104-016-3164-8
- Kloepper, J.W., Ryu, C.-M., Zhang, S. (2004).** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94 (11), 1259–1266. doi:10.1094/PHTO.2004.94.11.1259
- Kumari, R., Pandey, E., Bushra, S., Faizan, S., Pandey, S. (2024)** Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) induced protection: A plant immunity perspective. *Physiologia Plantarum*, 176(5):e14495. doi: 10.1111/ppl.14495. PMID: 39247988.
- Martínez-Romero, E. (2003).** Diversity of *Rhizobium*–*Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil*, 252 (1), 11–23. doi:10.1023/A:1024182720844
- Marzec-Grządziel, A., Gałczka, A., Marek-Kozaczuk, M., Skorupska, A. (2020).** Genetic and phenotypic diversity of rhizobia isolated from *Trifolium rubens* root nodules. *Microorganisms*, 8 (12), 2004. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8122004>
- Park, M.S., Kim, M., Oh, M.H., Lee, K.H., Kang, S.M. (2021).** Functional diversity of rhizobial nodules revealed by *nifH* transcript quantification. *Scientific Reports*, 11, p.10458. doi:10.1038/s41598-021-89843-z
- Rajnović, I. (2017.)** Bioraznolikost i simbiozna učinkovitost prirodnih populacija rizobija koje noduliraju grah (*Phaseolus vulgaris* L.). Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet.
- Sadeghi, A., Zakeri, H., Ebrahimzadeh, M.A. (2012).** Genetic diversity and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from root nodules of pea (*Pisum sativum*). *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2 (3), 330–336.
- Samago, T.Y., Anniye, E.W., Dakora, F.D. (2018).** Grain yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties is markedly increased by rhizobial inoculation and phosphorus application in Ethiopia. *Symbiosis*, 75, 245–255.
- SAS Institute Inc. (2013).** SAS 9.4 for Windows Cary, NC, SAD: SAS Institute Inc.
- Senko, H., Kajić, S., Huđ, A., Palijan, G., Petek, M., Rajnović, I., Šamec, D., UdikovićKolić, N., Mešić, A., Brkljačić, L., Petrić, I. (2024).** Will the beneficial properties of plantgrowth promoting bacteria be affected by waterlogging predicted in the wake of climate change: A model study. *Applied Soil Ecology*, 198, 105379. doi:10.1016/j.apsoil.2024.105379
- Shamseldin, A., Velázquez, E. (2020).** The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: a review. *World Journal of Microbiol Biotechnology*, 20; 36(5):63. doi: 10.1007/s11274-020-02839-w. PMID: 32314065.
- Sharma, L., Yadav, P., Yadav, R. (2022).** Function of Urease in Plants with Reference to Legumes: A Review. In R. Yadav (Ed.), *Urease: Structure, Functions and Role in Plants* (Chapter 3). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.103997>

- Singh, A., Schöb, C., Iannetta, P.P.M. (2023).** Nitrogen fixation by common beans in crop mixtures is influenced by growth rate of associated species. *BMC Plant Biol* 23, 253 <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04204-z>
- Somasegaran, P. and Hoben, H.J. (1994).** Handbook for Rhizobia: Methods in LegumeRhizobium Technology. New York SpringerVerlag,. doi:10.1007/9781461383758
- Uhlir, E., Kjellström, A., Nurminen, N., Olsson, C., Oscarsson, E., CanaviriPaz, P., Mogren, L., Alsanus, B., Molin, G., Håkansson, Å. (2021).** Use of bacterial strains antagonistic to *Escherichia coli* for biocontrol of spinach: a field trial. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 74, p.102862. doi:10.1016/j.ifset.2021.102862
- Vassilev, N., Vassileva, M., Nikolaeva, I. (2006).** Simultaneous Psolubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71 (1), 137–144. doi:10.1007/s00253-006-0380z
- Vidak, M., Malešević, S., Grdiša, M., Šatović, Z., Lazarević, B., Carović-Stanko, K. (2015).** Phenotypic Diversity among Croatian Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Landraces. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 80 (3), 133-137.
- Vincent, J.M. (1970).** A Manual for the Practical Study of RootNodule Bacteria. IBP Handbook No. 15. Oxford/Dublin, Blackwell Scientific.

Prispjelo/Received: 1.6.2025.

Prihvaćeno/Accepted: 4.7.2025.

Original scientific paper

Synergistic effect of *Rhizobium hidalgonense* and *Bacillus* sp. in nitrogen fixation and growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

Abstract

The aim of this study was to phenotypically characterize nitrogen-fixing symbiotic strains of *Rhizobium hidalgonense* and to select those with the most favorable traits for bean inoculation. A further objective was to examine the potential synergistic effect of co-inoculation with selected strains and PGPR (Plant growth Promoting Rhizobacteria) of the genus *Bacillus* (*B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*) in comparison to single inoculation.

Phenotypic analysis revealed traits important for successful root colonization and nitrogen fixation, including catalase, urease, and oxidase activity, as well as the ability produce organic acids. Strain 22BT exhibited the highest potential based on its phenotypic characteristics. In vitro assays confirmed that all analyzed strains possessed biological nitrogen fixation capacity. No antagonistic interactions were observed between *Rhizobium* and *Bacillus* spp. in compatibility testing.

Co-inoculation treatments tested under controlled conditions showed statistically significantly higher values for bean biomass and for nitrogen content in the plant compared to single rhizobium strain inoculations. The combination of *R. hidalgonense* 22BT with *B. megaterium* (R2B3) resulted in the highest nitrogen content in the plant (9.1 mg/plant), while the combination of the same strain with *B. thuringiensis* (R2B1) yielded the highest shoot dry weight (2,62 g). Nodule biomass did not correlate with the amount of fixed nitrogen.

These results confirm the potential of *R. hidalgonense* in nitrogen fixation as well as in promoting bean growth when combined with PGPR bacteria. This highlights their suitability as promising strains for the development of effective microbial plant biostimulants for sustainable agriculture.

Keywords: biological nitrogen fixation, coinoculation, PGPR, biostimulants, sustainable agriculture