



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET  
STUDIJSKI PROGRAM AGRONOMIJA

**AZOTOFIKSIRAJUĆE CIJANOBAKTERIJE U  
ZEMLJIŠTIMA VOJVODINE I NJIHOVA  
ULTRASTRUKTURNA I GENETIČKA KARAKTERIZACIJA**  
DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:  
**dr Simonida Đurić - docent**

Kandidat:  
**mr Oliver Fojkar**

Novi Sad, 2016. godine

## ZAHVALNOST

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorki **Prof. dr Simonidi Đurić** koja mi je nesebično pomogla, obezbedila optimalne uslove za istraživački rad u laboratoriji za mikrobiologiju zemljišta Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, korisno me savetovala i pomogla da analiziram i statistički obradim mnogobrojne naučne podatke.

Veliku zahvalnost želim iskazati svojoj profesoricu **Prof. dr Mirjani Jarak** koja me je primila na doktorske studije, korisno me savetovala i vodila izradu disertacije do odlaska u zasluženu penziju. Zahvalan sam joj što je podržavala moj istraživački rad od samog početka posle diplomskih studija i dala svoj doprinos i pri izradi moje magistarske teze.

**Prof. dr Milivoju Belić**, redovnom profesoru na katedri za Pedagogiju, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, najlepše se zahvaljujem što je sa oduševljenjem pomogao izradu ovog doktorskog rada. Nepochinjivi su njegovi saveti i pomoć koji se tiču pedološkog i terenskog dela rada.

Zahvalnost dugujem **dr Dragani Jošić**, naučnoj savetnici iz Instituta za zemljište u Beogradu, na iskrenoj i korektnoj saradnji, vrednim savetima koji se odnose na poglavlje o genetičkoj karakterizaciji cijanobakterija i pomoći pri izradi doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem **Prof. dr Birgitti Bergman**, rukovodiocu Laboratorije za ispitivanje cijanobakterija u Institutu za botaniku pri Univerzitetu u Štokholmu, članu Švedske Kraljevske Akademije, na neprocenjivom znanju stečenom tokom četvoromesečnog boravka u njenoj laboratoriji. Veliku zahvalnost dugujem **dr Ulli Rasmussen** za edukaciju i dobre rezultate na primeni metode PCR kod cijanobakterija, kao i gospođi **Suzanne Lindval** na obuci pri radu na elektronskom mikroskopu.

Veliku zahvalnost dugujem **Federaciji Evropskih Mikrobioloških Društava (FEMS)** kao i **Srpskom Mikrobiološkom Društvu** na dodeljenoj stipendiji koja mi je omogućila boravak i usavršavanje na Univerzitetu u Štokholmu u Švedskoj.

Zahvaljujem se kolektivu **Pokrajinskog zavoda za zaštitu prirode** i svim kolegicama i kolegama na pomoći koju su mi pružili pri terenskom radu i izradi ove disertacije. Posebnu zahvalnost dugujem **Snežani Đekić** na pomoći pri dizajniranju i tehničkoj obradi disertacije.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojim roditeljima ocu **Oliveru** i majci **Katici**, koja više nije sa nama a koja bi se sada radovala i zahvaljivala Bogu na ovom trenutku. Hvala im što su me školovali, verovali u mene i bodrili me da istrajem na svome putu.

Zahvalnost, koja se ne da iskazati rečima, želim uputiti svojoj ženi **Mirjani** i ćerkama **Sari** i **Teodori**, za sve one trenutke koje nisam posvetio njima već nauci i izradi ovog rada. Neka ovo bude putokaz deci da i ona budu istrajna i uporna u svom radu i da prate svoju zvezdu vodilju, jer na kraju se ipak svaki trud isplati.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
POLJOPRIVRDNI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorski rad
Ime i prezime autora: AU	Mr Oliver Fojkar
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Simonida Đurić, docent
Naslov rada: NR	AZOTOFIKSIRAJUĆE CIJANOBAKTERIJE U ZEMLJIŠTIMA VOJVODINE I NJIHOVA ULTRASTRUKTURNA I GENETIČKA KARAKTERIZACIJA
Jezik publikacije: JP	Srpski jezik
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2016
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000, Novi Sad

Fizički opis rada: FO	broj poglavlja 8/ stranica 285 / slika 97/ tabela 40/ grafikona 45/ referenci 188
Naučna oblast: NO	Agronomija
Naučna disciplina: ND	Mikrobiologija zemljišta
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Azotofiksirajuće cijanobakterije, zemljišta Vojvodine, TEM - ultrastruktura cijanobakterija, PCR genetička karakterizacija DNA fragmenata STRR, Nostoc, Anabaena
UDK	631.461: 579.81: 579.266.2(043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta Novi Sad
Važna napomena: VN	Deo istraživanja ostvaren na Univerzitetu u Štokholmu, Švedska, zahvaljujući stipendiji FEMS
Izvod:	
<p>U radu je ispitana zastupljenost azotofiksirajućih cijanobakterija, ukupnog broja algi i ukupnog broja bakterija u različitim tipovima zemljišta na jedanaest lokaliteta u Vojvodini, od čega se sedam nalaze u zaštićenim prirodnim dobrima. Ispitana je brojnost u zavisnosti od dubine pedološkog profila, kao i od godišnjeg doba. Izvršena je izolacija sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija, određena njihova taksonomska pripadnost i osnovne citološke karakteristike. Ispitana je ultrastruktura vegetativnih ćelija, heterocista i spoljnih struktura na ćelijama fimbrije i pili, transmisionim elektronskim mikroskopom. Izvršena je genetička karakterizacija izolovanih sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija PCR metodom analizom STRR fragmenata DNA.</p> <p>Brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija i ukupna brojnost algi je bila znatno veća kod hidromorfnih i halomorfnih zemljišta, nego kod automorfnih zemljišta. Najveća prosečna godišnja brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija, u površinskom sloju 0-5cm, je utvrđena kod zemljišta fluvisol u SRP "Koviljsko petrovaradinskom ritu", 150864 jedinki po gramu apsolutno suvog zemljišta. Zemljište sa najnižom brojnošću azotofiksirajućih cijanobakterija, je gajnjača u NP Fruška gora, 1582 jed./gr zemljišta u površinskom sloju.</p> <p>Kod svih ispitivanih zemljišta brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija je bila najveća u površinskom sloju zemljišta, 0-5 cm dubine, opadala je sa dubinom zemljišta i bila najmanja u najdubljem sloju, 30 - 60 cm. Kod najvećeg broja ispitivanih zemljišta brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija je bila najveća tokom zimskog perioda. Azotofiksirajuće cijanobakterije su dominantne u našim zemljištima i zastupljene sa 56.27% u odnosu na druge grupe algi.</p>	



Izolovano je 30 sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija: 19 sojeva *Nostoc-a*, 4 soja *Anabaena*, 4 *Cylindrospermum*, i po jedan soj *Calothrix*, *Tolypothrix* i *Phormidium*. Prosečna zastupljenost heterocista, ćelija koje vrše azotofiksaciju, kod roda *Nostoc* je iznosila 8.28%, *Anabaena* 4.25%, *Cylindrospermum-a* 2.93%, *Calotrix elenkinii* 6.19% i *Tolypothrix* 7.76%.

Ultrastrukturnim ispitivanjem, TEM mikroskopom, vegetativnih ćelija azotofiksirajućih cijanobakterija uočili smo inkluzije redovnog pojavljivanja: karboksizome (Cs), cijanoficinkse granule (CG), polifosfatne granule (PG), ribozome (R), lipidne granule ( $\beta$  –granule) i tilakoide (T), kao i inkluzije neredovnog pojavljivanja: membranom ograničene kristalne inkluzije.

Koristeći TEM i tehniku bojenja ćelija sa RR i ultratankih preseka utvrdili smo prisustvo omotača od fimbrija kod tri soja (A.314, *A.azollae* i N.302) i tipične fimbrije kod dva soja (N.311 i N.9229). Metodom negativnog bojenja NS PTA uočili smo takođe tipične fimbrije, igličastog-dlakastog izgleda, jasnih granica niti kod tri soja (N.302, N.7901 i N.9229), međutim uočili smo i atipične sluzne fimbrije, koje nemaju jasno izražene granice, ali su veoma moćno raširene oko vegetativnih ćelija, kod tri soja (A.314, *A.azollae*, N.311).

Kod simbiotskih-infektivnih sojeva N.7901 i N.9229 javljaju se samo tipične fimbrije iz prve klase, a kod diazotofnih sojeva i simbiotskog - neinfektivnog soja *A.azollae* javljaju se atipične-sluzne fimbrije iz druge klase.

Za ispitivanje sličnosti cijanobakterija metodom PCR-a pomoću STRR konzervativnih sekvenci DNA genoma korišćeno je 39 sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija i kod 38 je utvrđeno njihovo prisustvo. Svi sojevi se mogu podeliti u tri grupe, klastera. Prvi klaster je najveći i obuhvata 24 soja i deli se na dva podklastera: Ia koji obuhvata 12 sojeva gde dominiraju sojevi *Nostoc-a* (8), i podklaster Ib koji obuhvata takođe 12 sojeva, od čega 6 sojeva pripada rodu *Anabaena*. Podklaster Ia i podklaster Ib pokazuju različitost od 90%. Sva tri simbiozna, infektivna, soja *Nostoc-a* se nalaze u klasteru I: N.7901, N.9229 i N. 8001. Svaki simbiozni soj *Nostoc-a* ima genetske sličnosti sa po jednim diazotrofnim sojem *Nostoc-a* izolovanim iz zemljišta Vojvodine.

Klaster II obuhvata sedam (7) sojeva među kojima dominiraju sojevi *Cylindrospermum-a*, dok klaster III obuhvata 7 sojeva od čega 6 pripadaju rodu *Nostoc*, a jedan rodu *Rivularia*.

<p>Detaljno poznavanje svojstava izolovanih azotofiksirajućih cijanobakterija doprineće njihovoj budućoj primeni kako u proizvodnji ratarskih i povrtarskih kultura, tako i u biotehnoškoj proizvodnji.</p>	
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>mentor: dr Simonida Đurić, docent za naučnu oblast Mikrobiologija, Poljoprivredni fakultet Novi Sad</p> <p>predsednik: dr Milivoj Belić, redovni profesor za naučnu oblast Pedologija i agrohemija, Poljoprivredni fakultet Novi Sad</p> <p>član: dr Dragana Jošić, naučni savetnik za naučnu oblast Ratarstvo i povrtarstvo, Institut za zemljište, Beograd</p>

University of Novi Sad  
Faculty of Agriculture  
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Oliver Fojkar, MSc
Mentor: MN	PhD Simonida Đurić, associated professor
Title: TI	NITROGEN-FIXING CYANOBACTERIA IN SOILS OF VOJVODINA PROVINCE AND THEIR ULTRASTRUCTURAL AND GENETIC CHARACTERIZATION
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Faculty of Agriculture, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad

Physical description: PD	8 chapters / 225 pages/ 97 pictures/ 40 tables/ 45 graphs/ 188 references
Scientific field SF	Agronomy
Scientific discipline SD	Soil microbiology
Subject, Key words SKW	nitrogen-fixing cyanobacteria, soils of Vojvodina, TEM - ultrastructural analysis, PCR genetics characterization DNA fragments STRR, Nostoc, Anabaena
UC	631.461: 579.81: 579.266.2(043.3)
Holding data: HD	Library of Faculty of Agriculture Novi Sad
Note: N	As a member and a receiver of scholarship from FEMS Oliver Fojkar specialized at <b>Stockholm University</b> modern genetic methods, as well as TEM and fluorescent microscopy of cyanobacteria.
Abstract: AB	<p>In this study examined is the frequency of nitrogen-fixing cyanobacteria, total number of algae and total number of bacteria in different soil types on eleven localities in the Vojvodina Province. Seven out of those eleven localities are found in protected nature reserves. Actually, studied was the number of the cyanobacteria and algae depending on the depth of pedological characterization as well as on season. First, isolated were the types of nitrogen-fixing cyanobacteria, determined was their taxonomic origin and basic cytological characteristics. Also examined was the ultrastructure of vegetative cells, heterocysts and other outer structures on fimbriae and pili cells using TEM, transmission electron microscope. Finally, performed was the genetic characterization of isolated types of nitrogen-fixing cyanobacteria using the PCR method and analyzing STRR fragments of DNA.</p> <p>The presence of nitrogen-fixing cyanobacteria and total number of algae was significantly higher with hydromorphic and halomorphic soils than with authomorphic ones. Highest annual average number of nitrogen-fixing cyanobacteria in the topsoil (0-5 cm) was reported with fluvisol soil in Special Nature Reserve „Koviljsko petrovaradinski rit” (Swamp) and there were 150864 units of bacteria per gram of absolutely dry soil. The soil with the lowest presence of nitrogen-fixing cyanobacteria recorded was cambisol in National Park “Fruska gora” with 1582 units per gram of soil in the topsoil.</p> <p>With all the researched types of soils the number of nitrogen-fixing cyanobacteria was in the topsoil, 0-5 cm of depth and decreased in line with the depth</p>

of soil and lowest was at the deepest layer, 30-60cm. The highest frequency of nitrogen-fixing cyanobacteria was found during the winter season with most of the examined soils. Nitrogen-fixing cyanobacteria are the dominant type of bacteria in our soils and are presented with 56, 27% compared to other types of algae.

30 strains of nitrogen-fixing cyanobacteria were isolated: 19 types of *Nostoc* sp., 4 of *Anabaena* sp. and one in each genus of *Calothrix*, *Tolypothrix* and *Phormidium*.

Using ultrastructural examination and TEM microscope when studying vegetative cells of nitrogen-fixing cyanobacteria observed were the inclusions of regular frequency: carboxysomes (Cs), cyanophycin granules (CG), polyphosphate granules (PG), ribosomes (R), lipid granules (SS -granule) and thylakoids (T) as well as the inclusion of irregular occurrence: a membrane-bound crystal inclusions.

Using TEM technique and staining the cells with the RR and ultra thin cross section, we determined the presence of depletion of the fimbriae with three strains (A.314, *A.azollae* and N.302) and typical fimbriae with the two strains (N.311 and N.9229). Applying the method of negative staining NS PTA also noticed were a typical fimbriae, needle-hairy like looks with clear boundaries with the three strains (N.302, N.7901, N.9229). However, also observed were atypical mucous fimbriae, which do not have clearly expressed borders, but they are very strongly spread around the vegetative cells, with the three strains (A.314, *A.azollae*, N.311).

With symbiotic - infective strains N.7901 and N.9229 only typical fimbriae of first class occurred, and in diazotroph strains and symbiotic – non infectious strain *A. azollae* found were atypical mucous fimbriae of second class.

To test the similarity of cyanobacteria by PCR method and using a STRR - conservative DNA sequence of the genome used were 39 strains fixing cyanobacteria and with 38 established was their presence. All strains can be divided into three groups of clusters. The first cluster is the largest and covers 24 strains, and is divided into two subclusters: Ia which includes 12 strains, where predominant are *Nostoc* strains (8), and subcluster Ib, which also implies 12 strains, out of which 6 strains belong to the genus *Anabaena*. Subcluster Ia and Ib show a difference of 90%. All three symbiotic, infectious *Nostoc* strains are classified in a cluster I: N.7901, N.9229 and N. 8001. Each symbiotic *Nostoc* strain has a genetic similarity with one di-nitrogen *Nostoc* strain isolated from a lot of different soils in Vojvodina.

Cluster II includes seven (7) strains, including strains among which the predominant are *Cylindrospermum* ones, while cluster III includes 7 strains of which 6 belong to the genus *Nostoc* and one to genus *Rivularia*.

<p>Detailed knowledge of the properties of isolated fixing cyanobacteria could contribute to their future application both in the production of field crops and vegetables, as well as in biotechnological production.</p>	
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>mentor: Simonida Đurić, PhD, associated professor, Faculty of Agriculture Novi Sad</p> <p>president: Milivoj Belić, PhD, full professor, Faculty of Agriculture Novi Sad</p> <p>member: Dragana Jošić, PhD, principal research fellow, Institute of Soil Science, Belgrade</p>

**SADRŽAJ**

	<b>Strana</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>3</b>
2.1. Rasprostranjenost cijanobakterija u zemljištu	3
2.2. Primena cijanobakterija u biljnoj proizvodnji i biotehnologiji	4
2.3. Ultrastruktura vegetativnih ćelija i heterocista cijanobakterija	10
2.4. Genetička ispitivanja cijanobakterija	12
<b>3. RADNA HIPOTEZA</b> .....	<b>15</b>
<b>4. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>17</b>
<b>5. MATERIJAL I METOD RADA</b> .....	<b>19</b>
5.1. Istraživani tipovi zemljišta	19
5.2. Klimatske karakteristike ispitivanog područja	22
5.3. Određivanje brojnosti mikroorganizama u zemljištu	29
5.4. Izolacija azotofiksirajućih cijanobakterija	31
5.5. Morfološke i citološke karakteristike azotofiksirajućih cijanobakterija	32
5.6. Određivanje taksonomske pripadnosti azotofiksirajućih cijanobakterija	32
5.7. Korišćeni komparativni sojevi cijanobakterija	32
5.8. Mikroskopsko fotografisanje	34
5.9. UV mikroskopiranje - DAPI bojenje DNA materijala u ćelijama cijanobakterija	34
5.10. Određivanje ultrastrukture cijanobakterija	36
5.11. Genetička karakterizacija azotofiksirajućih cijanobakterija metodom STR-PCR	39
5.12. Statistička obrada podataka	42
<b>6. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I DISKUSIJA</b> .....	<b>43</b>
<b>6.1. Osnovne karakteristike ispitivanih tipova zemljišta</b>	<b>43</b>
<b>6.2. Brojnost mikroorganizama u ispitivanim tipovima zemljišta</b>	<b>72</b>

6.2.1. Ukupna brojnost algi u zemljištima Vojvodine	72
6.2.2. Brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija u zemljištima Vojvodine	90
6.2.3. Ukupna brojnost bakterija u zemljištima Vojvodine	111
<b>6.3. Taksonomska pripadnost izolovanih sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija</b>	<b>127</b>
<b>6.4. Cito-morfološke karakteristike sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija</b>	<b>135</b>
6.4.1. Veličina vegetativnih ćelija	135
6.4.2. Veličina heterocista	136
6.4.3. Procentualna zastupljenost heterocista	138
6.4.4. Zastupljenost spora	141
<b>6.5. Ultrastruktura azotofiksirajućih cijanobakterija roda Nostoc i Anabaena</b>	<b>157</b>
6.5.1. Ultrastrukura vegetativnih ćelija	157
6.5.2. Ultrastruktura hetreocista	184
6.5.3. Ultrastruktura površinskih struktura: fimbrije - pili	195
<b>6.6. Genetička karakterizacija azotofiksirajućih cijanobakterija metodom STRR-PCR</b>	<b>219</b>
<b>7. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>256</b>
<b>8. LITERATURA.....</b>	<b>269</b>



## 1. UVOD

Zemljište predstavlja polidisperzni sistem koji nastaje u pedogenetskom procesu od matičnog substrata kao rezultat dugotrajnog delovanja klimatskih, bioloških i reljefskih faktora. U procesima stvaranja i održavanja zemljišta, kao veoma složenog ekosistema, mikroorganizmima pripada veoma značajna uloga. Svaki tip zemljišta se odlikuje svojim specifičnim karakteristikama, u prvom redu zemljišnim profilom, ali i specifičnim sastavom različitih mikroorganizama. U zemljištu se nalaze sve grupe mikroorganizama: bakterije, gljive, alge, protozoe, virusi i lišajevi. U odnosu na celokupnu organsku materiju u zemljištu na mikroorganizme otpada od 0,1 do 3%, u zavisnosti od tipa zemljišta. Njihova brojnost se kreće do nekoliko miliona po jednom gramu apsolutno suvog zemljišta, odnosno njihova biomasa iznosi 1 do 5 tona sirove mase po hektaru (Govedarica et al., 1995).

Cijanobakterije (*Cyanobacteria*) ili cijanofite (*Cyanophyta*) predstavljaju grupu fotoautotrofnih, prokariotskih mikroorganizama. Mnoge vrste cijanobakterija, koje pripadaju redovima *Nostocales*, *Stigonematales* i *Mastigocladales*, imaju sposobnost vezivanja atmosferskog azota i njegovog izlučivanja u spoljašnju sredinu (Venkataraman, 1976). Ove sposobnosti azotofiksacije i fotosinteze, zastupljene istovremeno, omogućavaju cijanobakterijama veliku sposobnost adaptacije na različite ekološke faktore. Žive na veoma različitim staništima od tropa do visokih geografskih širina. Naseljavaju slatke i slane vode, vlažna zemljišta a pojedine se mogu naći i na relativno suvim mestima.

Cijanobakterije igraju vrlo važnu ulogu u obrazovanju zemljišta, obogaćuju zemljište azotom i organskim materijama, sintetišu biološki aktivne materije, utiču na fizička i hemijska svojstva zemljišta, uzajamno deluju s drugim mikroorganizmima i višim biljkama. Cijanobakterije se u istočnim zemljama Azije tradicionalno koriste u proizvodnji pirinča, kao biođubrivo. Istraživane su i mogućnosti njihove primene kao biođubriva i u umerenom pojasu na manje vlažnim zemljištima.

Cijanobakterije se intenzivno ispituju i kao potencijalni mikroorganizmi u biotehnološkoj proizvodnji aminokiselina (Kerby et al.,1987), antibiotika (Flores et al.,1986), antikancerogenih materija (Borchi,1983), polisaharida (Anchikary, 1986), fikoeritrina, fluorescentnog pigmenta visoke komercijalne vrednosti (Glazer, 1984).

Sem cijanobakterija od slobodnih azotofiksatora posebno su zanimljivi sledeći rodovi: *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Beijerinckia* i *Derxia* (Govedarica, 1990; 1991; 1992). U našim zemljištima najveći značaj ima rod *Azotobacter* koji je najviše ispitan, a našao je i praktičnu primenu u proizvodnji mikrobioloških đubriva, a količina fiksiranog azota iznosi oko 50 kg po hektaru godišnje. Od simbioznih azotofiksatora posebno su značajni rodovi *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* koji stupaju u zajednicu sa leguminoznim biljkama. Na ovaj način se godišnje veže od 25 do 400 kg azota po hektaru godišnje ( Jarak, 1988).

## 2. PREGLED LITERATURE

Cijanobakterije ili modro-zelene alge predstavljaju najstariju grupu fotoautotrofnih, prokariotskih mikroorganizama što je potvrđeno i primenom elektronske mikroskopije (Stanier, 1971). Savremena klasifikacija cijanobakterija uglavnom se zasniva na morfološkim kriterijumima i načinu razmnožavanja. U svetu je do sada registrovano oko 3000 različitih vrsta cijanobakterija, a u Srbiji je determinisano 42 roda sa 174 vrste (8 varijeteta, 34 forme i 1 subformom) (Blaženčić i Cvijan, 1988). Nastale su pre oko tri milijardi godina i do današnjih dana zadržale su niz primitivnih svojstva kao što su nepostojanje pokretnih stadijuma u ciklusu razvića i vegetativan način razmnožavanja. Među cijanobakterijama se nalaze predstavnici na jednoćelijskom, kolonijalnom i trihalnom stepenu morfološke organizacije. Trihalne cijanobakterije najčešće se ne granaju, a kod onih koje se granaju grananje može biti pravo ili prividno (Blaženčić, 1988).

### 2.1. RASPROSTRANJENOST CIJANOBAKTERIJA U ZEMLJIŠTU

Na zastupljenost cijanobakterija u zemljištu utiču različiti ekološki i antropogeni faktori. Granhall (1975) među najvažnije faktore ubraja se vlažnost zemljišta i pH reakciju zemljišta. Na rast cijanobakterija u zemljištu utiče i način obrade, navodnjavanje i primena pesticida (Gantar et al., 1991a). Količina i vrsta mineralnih đubriva takođe imaju značajan uticaj na rast cijanobakterija (Venkataraman, 1976., Milošević, 1988). Većina azotofiksirajućih cijanobakterija fiksira više azota u prisustvu fosfornih đubriva (Gantar, 1992).

Podaci o rasprostranjenosti azotofiksirajućih cijanobakterija u našim zemljištima nisu obimni i prikazani su u svega nekoliko radova. U istraživanjima Milošević (1988) ispitivana je zastupljenost i uticaj različitih tretmana mineralnih đubriva na azotofiksirajuće cijanobakterije u rizosferi šećerne repe. Zastupljenost i karakterizaciju azotofiksirajućih cijanobakterija u različitim tipovima zemljišta Vojvodine, solonjecu, černoze i ritskoj crnici, ispitivali su i Gantar et al. (1991c). Najveću brojnost cijanobakterija ustanovili su kod solonjeca a najmanju

kod livadske crnice. Svi izolovani sojevi pripadali su redu *Nostocales*, i to najviše rodovima *Nostoc* i *Anabaena*.

Fojkar (2000) je ispitivao zastupljenost azotofiksirajućih *Cyanobacteria* u sedam različitih tipova zemljišta Vojvodine, i to: černozemu, ritskoj crnici, smeđem kiselom zemljištu, fluvisolu, arenosolu, solončaku i solonjecu. Najveća brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija je bila u solončaku, a najmanja u arenosolu. Većina izolovanih sojeva pripadala je rodu *Nostoc*.

Stojković (1998) iznosi podatke da je u različitim tipovima staništa, pre svega zemljištima, na teritoriji SRJ registrovala 120 predstavnika mikroalgi, od kojih 70 taksona spada u razdeo *Cyanobacteria*, 44 u razdeo *Bacillariophyta* i 6 u razdeo *Chlorophyta*. U okviru razdela *Cyanobacteria* najzastupljeniji su rodovi *Phormidium* sa 17 vrsta, *Oscillatoria* sa 12 vrsta, *Gloeocapsa* sa 10 vrsta, *Lyngbia* sa 5 vrsta, *Synechococcus* sa tri vrste i *Cylindrospermum* sa dve vrste. Sa po jednim predstavnikom registrovane su cijanobakterije iz rodova: *Microcystis*, *Anabaena*, *Merismopedia*, *Rhabdoderma*, *Gomposphaeria*, *Pleurocapsa*, *Stigonema* i *Symploca*.

Poslednjih desetak godina dosta pažnje se poklanja istraživanju bioloških filmova, pokorica, koje cijanobakterije i drugi organizmi stvaraju na površini raznih zemljišta. Rivera-Aguilar et al. (2006) te Tirkey i Adhikary (2005) navode da su cijanobakterije dominantna komponenta zemljišnih pokorica, da proizvode mukozne omotače sa koloritnom prevlakom i tako sa česticama zemlje daju finalni izgled i teksturu.

## **2.2. PRIMENA CIJANOBAKTERIJA U BILJNOJ PROIZVODNJI I BIOTEHNOLOGIJI**

Značajno polje istraživanja je i primena azotofiksirajućih cijanobakterija u poljoprivrednoj proizvodnji. Najčešći predstavnici azotofiksirajućih cijanobakterija su filamentozne vrste koje imaju sposobnost obrazovanja heterocisti. U heterocistama se odvija proces azotofiksacije pri aerobnim uslovima uz pomoć enzima nitrogenaze (Stewart et al., 1985; Carr i Whiton, 1982; Komarek i Anagnostidis, 1989., Murry i Wolk, 1989).

Cijanobakterije su nezamenljive i suštinske u zemljišnim ekosistemima. One igraju vrlo važnu ulogu u obrazovanju zemljišta, obogaćivanju zemljišta azotom i organskim materijama, sintetišu biološki aktivne materije, utiču na fizička i hemijska svojstva zemljišta, uzajamno deluju sa drugim mikroorganizmima i višim biljkama. Sada se istražuju mogućnosti primene u umerenom pojasu na manje vlažnim zemljištima. Određeni rezultati su već postignuti i komercijalizovani su preparati na bazi azotofiksirajućih cijanobakterija. Draganov (1979) navodi da je stvoren preparat "Agrovita" sastavljen od cijanobakterija, enzima i mikroelemenata koji je pogodan za primenu i na manje vlažnim zemljištima.

Proces azotofiksacije se zasniva na redukciji azota uz pomoć enzima nitrogenaze do amonijaka (Wolk, 1980). Najveći deo fiksiranog azota se ugrađuje u glutamin pomoću enzima glutamin sintetaze. Glutamin se transportuje u vegetativne ćelije gde se prevodi u dva molekula glutamata uz pomoć enzima glutamat sintetaze. Ukoliko dođe do inhibicije enzima glutamin sintetaze sa L-metioninsulfoksiaminom ćelije mogu da izluče i 90% fiksiranog azota ( Kerby et al., 1988; Stewart, 1980).

Heterociste su dizajnirane tako da zaštite nitrogenazu od atmosferskog O<sub>2</sub> kao i od O<sub>2</sub> produkovanog u fotosintezi aktivnih vegetativnih ćelija. U heterocistama je obezbeđeno mikro-anoksično okruženje pogodno za aktivnost nitrogenaze. Ubrzano disanje, prestanak fotosintetske proizvodnje kiseonika i stvaranje specifičnog ćelijskog omotača koji sprečava prodiranje O<sub>2</sub> su glavna sredstva kojima heterociste stvaraju interne mikro-anoksične uslove (Herrero i Flores, 2014).

U Indiji se od davnina zna da plodnost zemljišta zavisi od rasprostranjenosti cijanobakterija u njima. Venkataraman (1981) navodi 31 rod sa 152 vrste cijanobakterija koje vrše azotofiksaciju. Venkataraman je cijanobakterija koje vrše azotofiksaciju klasifikovao u sledeće grupe:

- 1) heterocistne forme koje fiksiraju azot pri aerobnim uslovima ( *Nostoc*, *Anabaena*)
- 2) jednoćelijske ili kolonijalne alge tipa *Gleocapsa* koje fiksiraju azot pri aerobnim uslovima
- 3) neheterocistne filamentozne forme koje fiksiraju azot samo u anaerobnim uslovima i u prisustvu azota i ugljenmonoksida ( *Oscillatoria*, *Phormidium*)
- 4) neheterocistne filamentozne forme koje mogu da fiksiraju azot i u aerobnim uslovima (*Trichodesmium*)

Poznato je da pirinač već vekovima uspeva na poljima tropske Azije bez dodataka mineralnog đubriva. Plodnost zemljišta je u direknoj vezi sa bujnim razvojem azotofiksirajućih cijanobakterija na površini zemljišta. Cijanobakterijska azotofiksacija u pirinčanim poljima iznosi preko 20-30 kg N/ha godišnje, pri čemu se prinos povećava za 20-30% (Venkataraman, 1971). U zapadnom Bengalu, gde je uobičajen doprinos azotofiksirajućih cijanobakterija od 25-49kg N/ha tokom vegetacije, ove vrednosti se mogu povećati na 70 kg N/ha u slučaju dodavanja fosfata u zemljište. Pored azotofiksacije cijanobakterije utiču da postojeća količina azota u zemljištu bude bolje iskorišćena oslobađanjem različitih vitamina i činioca rasta (Svirčev, 2005).

Cijanobakterije izlučuju peptide, polisaharide i lipide koji poboljšavaju agregaciju zemljišta, što dovodi do bržeg i lakšeg transporta vode i vazduha kroz zemljište (Mangum-Shields i Durrel, 1964). I drugi efekti, kao što su povećanje iskoristljivosti fosfornih jedinjenja, smanjenje toksičnosti sumpornih jedinjenja, suzbijanje rasta korova, takođe ukazuju na pozitivan uticaj prisustva cijanobakterija u zemljištu.

Pokazalo se da je faktor koji je veoma bitan za pojavljivanje heterocistnih cijanobakterija u umerenom klimatskom pojasu pre svega vlažnost zemljišta. Drugi važan faktor je pH vrednost zemljišta koji uslovljava kako kvantitativan tako i kvalitativan sastav cijanobakterija. U Švedskoj su visoko alkalna zemljišta i ona uslovljavaju javljanje čak 75% heterocistnih cijanobakterija, a minimalna pH vrednost za njihov razvoj iznosi 4,4, (Svirčev, 2005). Vrste iz rodova *Nostoc* i *Anabaena* su najzastupljenije u zemljištima Švedske, sa visokom pH tolerancijom, a nitrogenazna aktivnost je konstatovana u pH intervalu od 5 - 10,5, sa optimumom na 7,6. Utvrđeno je da zemljišne cijanobakterije u Švedskoj imaju i do deset puta veću azotofiksaciju u odnosu na sojeve u Indiji. Azotofiksacijom je u švedskim zemljištima vezano od 15-51 kg N/ha godišnje. Međutim, određeni autori navode znatno veće količine fiksiranog azota na pirinčanim poljima koja su inokulisana cijanobakterijom *Anabaena azollae*, i do 128 kg N/ha, godišnje (Cvijan, 1996). Cijanobakterije ne samo da povećavaju količinu azota u zemljištu već utiču da se postojeće količine azota bolje iskoriste, a proizvode materije rastenja i vitamine.

Na rast modro-zelenih algi u zemljištu utiče i način obrade, navodnjavanje i primena pesticida. Količina i kvalitet veštačkih đubriva takođe imaju značajan uticaj na rast modrozelenih algi. Azotna i fosforna đubriva imaju pozitivan efekat na rast svih algi. Međutim,

rast azotofiksirajućih cijanobakterija je favorizovan u odsustvu azotnih đubriva. U uslovima bez azota azotofiksirajuće cijanobakterije nemaju kompeticiju sa drugim algama tako da one mogu da se razviju u veoma velikom broju. U prisustvu fosfornih đubriva cijanobakterije usvajaju fosfor više nego što im je potreban, nakupljaju ga u obliku polifosfata i koriste u uslovima nedostatka fosfora. Većina azotofiksirajućih cijanobakterija fiksira više azota u prisustvu fosfornih đubriva (Gantar et al., 1992).

Za rast azotofiksirajućih cijanobakterija molibden je veoma bitan element, zbog njegove uloge u enzimima nitrat-reduktazi i nitrogenazi. Preporučuje se da se u zemljišta dodaje natrijum molibdat u količini od 0.25 kg/ha. Drugi elementi kao što su K, Na, S, Cu, Zn su takođe značajni za rast azotofiksirajućih cijanobakterija. Efekat primene organskih đubriva na rast cijanobakterija je uglavnom pozitivan, mada ima i suprotnih efekata (Richmond, 1986).

Sada se istražuju mogućnosti primene cijanobakterija u umerenom klimatskom pojasu na manje vlažnim zemljištima. Određeni rezultati su već postignuti, tako Draganov (1979), navodi da je stvoren preparat "Agrovita" sastavljen od cijanobakterija, bakterija, enzima i mikroelemenata koji je pogodan za korišćenje i na suvljim zemljištima. Ova problematika je veoma značajna za Vojvodinu kao izrazito poljoprivredni rejon. Gantar et al. (1991c) su pokazali da se brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija u zemljištu Vojvodine može porediti sa brojnošću ovih organizama u zemljištu pirinčanih polja.

U Svetu se pokušava i primena cijanobakterija u cilju poboljšanja kvaliteta zemljišta. U Indiji je pokušana popravka zemljišta koja su neupotrebiva za poljoprivredu zbog pojačanog saliniteta ili visoke pH vrednosti. Kaushik et al. (1981) su pokazali da 25 sojeva cijanobakterija ima dobar rast na takvim zemljištima i da nakon izvesnog vremena smanjuju salinitet za oko 25-30%. To se posebno odnosi na sojeve iz roda *Anabaena*. Pri tome su cijanobakterije, tokom perioda prilagođavanja, znatno promenile svoju ultrastrukturu, veličinu vegetativnih ćelija, broj i veličinu tilakoida i heterocista (Kaushik, 1985a i 1985b). Pokazalo se da azotofiksirajuće cijanobakterije inokulisane na slatinastim zemljištima, sa visokim pH vrednostima, nakon izvesnog vremena znatno smanjuju alkalnost, sa pH 9.38 u kontroli na 8.95. Povećavaju procenat ukupnog azota sa 0.205% na 0.226% (Kaushik et al., 1981).

Cijanobakterije i druge alge se poslednjih decenija intenzivno ispituju i koriste za prečišćavanje otpadnih voda. Najčešće se koriste otpadne vode sa svinjskih i govedarskih farmi,

kao i komunalne otpadne vode. Rezultati Obreht et al. (1988) pokazali su da cijanobakterija *Spirulina platensis* i druge alge efikasno usvajaju nutrijente iz tečnog stajnjaka koncentracije 40%. Količine ukupnog azota, amonijaka i fosfata su se smanjile od 90 do 99% na kraju kultivacije. Koncentracija tečnog stajnjaka preko 40% inhibitorno je delovala na rast algi. Shelef et al. (1980) su uzgajali cijanobakteriju *Spirulina maxima* na razblaženom govedem stajnjaku obogaćenom sa 1.6%  $\text{NaHCO}_3$  pri temperaturi od 30°C, uz konstantno mešanje stajnjaka. Rezultati ukazuju na visoku efikasnost u uklanjanju nutrijenata, preko 99%. S druge strane dobijena je biomasa algi koja je sadržala čak 66 t/ha/godišnje.

Neke cijanobakterije imaju visoki sadržaj proteina te se ispituju kao izvor hrane. Kao hrana neke se odavno koriste u Kini – *Nostoc flagelliforme*, na Javi i u Boliviji – *Nostoc commune*, u Sibiru – *Nostoc pruniforme*, oko jezera Čad u Africi – *Spirulina platensis*, u Japanu itd. *Spirulina platensis* u suvom stanju sadrži do 68% proteina, oko 20% glicina, do 3% lipida, sadrži vitamine A1, B1, B6, B12 i C kao i osnovne aminokiseline. Na vulkanskim stenama u Japanu razvijaju se sluzave prevlake modrozelenih algi *Gleocapsa aeruginosa*, *Gleocapsa palea* i *Gleocapsa linearis*, a na njima bakterije i gljive. To je organska masa poznata pod nazivom Tengu-hleb, koja u suvom stanju sadrži 86.41% organskih supstanci i služi za ishranu ljudi i životinja. Sakupljanje “vodenog cveta” i netoksičnih modrozelenih algi u Kini i Indiji je tradicionalno. Sakupljene alge koriste se u velikim količinama kao dodatak sladu pri proizvodnji piva ili osušene kao dodatak brašnu u proizvodnji keksa. U mnogim zemljama Južne Amerike uobičajena je prodaja modrozelenih algi, kolonije *Nostoc* sp., koje služe za pripremanje hrane (Cvijan i Blaženčić, 1996).

Plavi pigment, fikocijanin, koga poseduju cijanobakterije našao je svoju ulogu u prehrambenoj industriji. Koristi se kao boja i ima prednost nad sintetskim bojama koje mogu biti toksične i kancerogene (Tel-Or et al., 1980). Fikocijanin se koristi i kao pigment u kozmetici pošto ne iritira kožu. U biotehnološkoj proizvodnji cijanobakterije se intenzivno ispituju kao mikroorganizmi producenti aminokiselina (Kerby, 1987), antibiotika (Flores, 1986), antikancerogenih materija, polisaharida (Anchikary, 1986), fikoeritrina, fluorescentnog pigmenta visoke komercijalne vrednosti (Glazer, 1984).

Kod nekih cijanobakterija, kao kod *Spirulina platensis*, je dokazano prisustvo rezervnih materija poli-β-hidroksibutirata. *Spirulina* sadrži i do 6% ove materije u suvoj materiji. Poli-β-hidroksibutirat je našao primenu u proizvodnji biodegradabilnih plastičnih materija. Ova



problematika je izuzetno značajna sa polja ekologije i zaštite kopnenih i vodenih ekosistema od plastične nerazgradljive ambalaže koja ih je zatrpala (Campbell et al., 1982).

Pojedini predstavnici cijanobakterija, kao *Tolypothrix brisoidea*, proizvode materije koje se koriste u terapiji humanog karcinoma (Kerby i Stewart, 1987). Iz navedene cijanobakterije je izolovana materija tubercidin.

Cijanobakterije, sem azotnih materija mogu da sintetišu i izlučuju i druga različita jedinjenja koja imaju uticaj na rast biljaka, kao što su: hormoni rasta, šećeri, aminokiseline i proteini. Fiziološki aktivne materije slične giberelinima oslobađaju mnoge vrste cijanobakterija, a vrste iz rodova *Tolypothrix* i *Cylindrospermum* izlučuju vitamin B12, (Gantar, 1992).

Đurić et al. (2013) su ispitali inhibitornu aktivnost zemljišnih sojeva *Pseudomonas*, koji su izolovani iz rizosfere različitih gajenih biljaka, na slatkovodnu toksigenu cijanobakteriju *Nostoc sp.*, koja proizvodi toksin mikrocistin. Ovaj hepatotoksin je odgovoran za smrt divljih i domaćih životinjskih populacija, a ima i različite akutne i hronične patogene efekte i na ljude. Testovi inhibicije su izvedeni in vitro, koristeći tečna razblaženja i metod brojanja ćelija u hemocitometru svetlosnim mikroskopom u odgovarajućim fazama rasta. Testirani rizosferni izolat *Pseudomonas* izazvao je inhibiciju rasta *Nostoc-a* od 0.12 do 15.84 % kod T1 soja i od 8.22 do 14.17 % kod P3 soja *Nostoc sp.*, smanjivanjem broja ćelija i degradiranjem hlorofila u ćelijama.

Falchini et al. (1996) su ispitali uticaj sojeva *Nostoc sp.* na strukturu i stabilnost glinovitih zemljišta. Za eksperiment je korištena glina poreklom iz pliocenskih marinskih sedimenata. Sterilni uzorci gline u petri kutijama su inokulisani sojevima *Nostoc sp.*, inkubirani 3 meseca na 27°C pri konstantnom fluorescentnom osvetljenju. Cijanobakterije su svojim egzopolisaharidima uticale na poboljšanje strukture gline, a došlo je i do interakcije između egzopolisaharida i finih glinenih čestica.

Cijanobakterije su veoma važne ne samo kao slobodni azotofiksatori već i kao simbiotski. Određene vrste cijanobakterija stupaju u simbiotske odnose sa predstavnicima nekoliko razreda nižih i viših biljaka, sa algama (dijatomejama), gljivama (lišajevi), papratima (*Azolla*), sa gimnospermama (*Cycadophyta*) i sa angiospermama (*Gunnera*) (Bergman et al., 1992a; Johansson and Bergman, 1994; Bergman et al., 1992b; Rasmussen et al., 1994; Meeks

et al., 1987; Vagnoli et al., 1992). Poslednjih godina puno se radi na odabiranju sojeva, posebno iz roda *Nostoc*, koji imaju mogućnost naseljavanja korena pšenice i stvaranja nekog oblika asocijacije (Gantar et al., 1991a; 1991b). Ovi podaci u mnogome ukazuju na značaj ove grupe mikroorganizama kao i velike mogućnosti njihove primene u poljoprivredi.

Ova problematika je veoma značajna za Vojvodinu kao izrazito poljoprivredni rejon.

### **2.3. ULTRASTRUKTURA VEGETATIVNIH ĆELIJA I HETEROCISTA CIJANOBAKTERIJA**

Ćelije cijanobakterija pripadaju gram negativom morfotipu: one su okružene ćelijskim zidom koji sadrži peptidoglikanski sloj i spoljne membrane. Na površini ćelije, ponekad kapsula, sadrži parakristalne proteine ili glikoproteinski S-sloj, pili (takođe nazvane fimbrije) a mogu se naći i bodlje. Tilakoidi su unutar citoplazmatske membranske strukture odgovorne za snabdevanje energijom, oni ispunjavaju većinu citoplazme. Ove membranske strukture mogu formirati jedinstveni sistem nazvan tilakoidna mreža (Nevo et al., 2009).

Protoplazma cijanobakterija nije diferenciran na citoplazmu, jedro i plastide, već je izdvojen na dva regiona: središnji nukleoplazmu (centroplazma ili prokarion) i spoljni hromatoplazmu (protocitoplazma). U nukleoplazmi se nalazi hijaloplazma i genetski DNA materijal u vidu fibrila, štapića i granula. DNK u nukleoplazmi nije udružena sa histonima. Oko nukleoplazme nije obrazovana membrana i u njoj se ne nalazi jedarce, kao kod eukariotske ćelije.

U fotosintetičkom aparatu cijanobakterija je registrovano oko 30 pigmenata koji pripadaju hlorofilima, fikobilinima, ksantofilima i karotenoidima. Od hlorofila sadrže samo hlorofil *a*, a od fikobilina treba izdvojiti crveni pigment fikoeritrin i plavi pigment fikocijanin (Wolk, 1980).

U protoplastu cijanobakterija nalazi se niz struktura različite građe i funkcije. U odnosu na druge prokariotske mikroorganizme cijanobakterije u ćelijama sadrže znatno veći broj različitih inkluzija. Neke inkluzije se gotovo redovno nalaze kod svih cijanobakterija, to su inkluzije redovnog pojavljivanja: tilakoidi (T), karboksizomi (Cs), glikogen granule ( $\alpha$  –

granule), lipidne granule ( $\beta$  –granule), cijanoficinske granule (CG) i polifosfatne granule (PP), dok su neke nalažene samo kod nekih grupa cijanobakterija i nazivaju se inkluzije neredovnog pojavljivanja: gasne vakuole, Poli- $\beta$ -hidroksibutirat granule (PHB), polimorfna tela i vezikule (kristaloidne vezikule), membranom ograničene kristalne inkluzije i dr. (Berner, 1993).

Više autora se bavilo problematikom ultrastrukture i diferencijacije heterocista, što je od velikog značaja s obzirom da su to ćelije odgovorne za azotofiksaciju. Roussard- Jacquemin (1983) je ispitivao diferencijaciju heterocista kod vrste *Anabaena cylindica*. Diferencijacija heterocista je bila izazvana nakon prebacivanja soja na medijum bez azota, došlo je do stvaranja specifičnih membranskih struktura koje stvaraju anaerobnu sredinu neophodnu za aktivnost nitrogenaze.

Kod heterocista se nalazi znatno složeniji i deblji ćelijski zid u odnosu na vegetativne ćelije. Pored plazma membrane, peptidoglikanskog sloja i spoljašnje membrane, heterociste filamentoznih cijanobakterija su okružene i specifičnim glikolipidnim slojem (HGL) i specifičnim polisaharidnim slojem (HEP). Ovakav višeslojan ćelijski zid ima funkciju da zaštiti enzimsku nitrogenaznu aktivnost od spoljašnjih uticaja (Lang and Fay, 1971). Heterocista produkte azotofiksacije preko polarnog telašca, pore i mikroplazmodezmi, koje prolaze kroz septum, dostavljaju vegetativnoj ćeliji sa kojom je povezana.

Sem sluznog omotača na površini cijanobakterijske ćelije mogu se uočiti končaste strukture mikrofibrili, fimbrije ili pili (**F**) (Fogg i Stewart, 1973). Fimbrije (pili), odnosno bakterijski proteinski dodaci, su važni za bakterijsku kolonizaciju raznih biljnih i životinjskih organizama (Ivanaga i Hokama, 1992). Fimbrije su specifične i za simbiotske cijanobakterije (Dick i Stewart, 1980), i pronađene su kod nekoliko izolovanih *Nostoc* sp. iz cikada (Lindblad i Bergman, 1990). Važna karakteristika u ranim fazama infekcije, bilo simbiotske ili patogene bakterije, je prijanjanje na svog domaćina.

Johanson i Bergman (1994) su metodom negativnog bojenja (NS PTA) na TEM-u otkrili da predstavnici i infektivnih i neinfektivnih sojeva cijanobakterija poseduju veliki broj ekstracelularnih vlakana, verovatno fimbrija. Nakon tretiranja proteinazom K, ćelije su pokazale da nemaju takve vanćelijske fimbrije. To podrazumeva da su fimbrije uglavnom proteinskog sastava. Navode i da rod *Nostoc* ima fimbrije koje su uglavnom oko 7-10 nm debele i ponekad više od 20  $\mu$ m duge.

I jednoćelijske i filamentozne cijanobakterije pokazuju različite vrste pokretljivosti, imaju sposobnost da se kreću na površinama i da plivaju u tečnostima. Pokretljivošću cijanobakterije mogu da regulišu važne odgovore na signale životne sredine kao što su svetlo ili hemijski sastav podloge. U nekim slučajevima, pokretljivost je omogućena postojanjem pila, fimbrija, tipa IV PILA (TFP), (Jarrell i Mc Bride, 2008. godine; Mauriello et al., 2010).

Thanassi et al. (2012) navode da gram-negativne bakterije, gde spadaju i cijanobakterije, poseduju širok spektar organela na njihovoj ćelijskoj površini. Ove površinske strukture mogu biti proizvod sekrecionog sistema koji je smešten u ćelijskom zidu, koji luči fimbrije - pili, takozvani CU sistem. Pile nastale u CU organelama su dimenzija od 2 do 10 nm u prečniku i uobičajeno su 1-3  $\mu\text{m}$  dužine.

## 2.4. GENETIČKA ISPITIVANJA CIJANOBAKTERIJA

Kod cijanobakterija se primenjuju i najnovije metode genetičkih ispitivanja (genomic fingerprinting) i studije raznovrsnosti uz pomoć repetitivnih elemenata u genomu PCR metodom. Dve visoko repetitivne DNA sekvence su opisane u cijanobakterijskom genomu: kratka STRR (short tandemly repeated repetitive) (Jackman i Mulligan, 1995; Mazel et al., 1990) i duga LTRR (long tandemly repeated repetitive) (Masepohl et al., 1996). U početku je STRR sekvenca pronađena kod *Calothrix* vrsta u oko 100 kopija u genomu. Nakon toga ovaj segment je identifikovan kod mnogih cijanobakterija koje sadrže heterociste (Mazel et al., 1990). LTRR sekvenca, duga 37 baznih parova, je bila identifikovana kod *Anabaena* soja PCC 7120. LTRR sekvenca je pronađena i kod heterocistnih i kod neheterocistnih cijanobakterija. U poslednje vreme je pokazano da se STRR sekvenca može koristiti kao validan karakter za identifikaciju i karakterizaciju cijanobakterija.

Konstitutivne repetitivne sekvence čine važan deo prokariotskog genoma. REP (repetitive extragenic palindromic), (Stern et al. 1984), i ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus),(Hulton et al.,1991), sekvence su u početku opisane kod familije *Enterobacteriaceae* ali nakon toga su pronađene kod nekoliko gram-negativnih bakterija. Kod gram-pozitivne bakterije, *Streptococcus pneumoniae*, (Martin et al. 1992) su opisali BOX elemente u genomu.

Rasmussen et al. (1998) su analizirali ovom metodom simbiozne sojeve cijanobakterija izolovane iz biljaka *Gunera* i *Azolla* kao i slobodnoživeće cijanobakterije. Analize su pokazale da se ispitani sojevi mogu podeliti u nekoliko grupa koje su slične po genetskom profilu. Interesantno je da ovaj metod daje isti rezultat za aksenični i neaksenični soj, te je jasno da je ovaj metod specifičan samo za cijanobakterije. Ovaj metod se veoma uspešno može koristiti za jasno razlikovanje i klasifikaciju čak i veoma sličnih sojeva.

Rasmussen i Svenning (1998) su analizirali PCR metodom STRR i LTRR repetitivne sekvence DNA kod 30 simbioznih sojeva *Nostoc-a* i 12 diazotrofnih sojeva koji pripadaju rodovima: *Nostoc*, *Fisherella*, *Sinechocystis*, *Gleotheca*, *Microcoleus*, *Plectonema* i *Phormidium*. Zaključili su da je karakterizacija cijanobakterija ovim metodom veoma brz metod i veoma koristan za jasno razlikovanje i klasifikaciju čak i veoma sličnih sojeva. Ovaj metod su uspešno primenili i na neakseničnim kulturama cijanobakterija, što je od posebnog značaja jer se zna da je isčišćavanje cijanobakterijskih kultura od pratećih bakterija veoma teško i često bezuspešno.

Zheng et al. (1999) navode da su cijanobakterije sposobne da uđu u simbiotske odnose sa višim biljkama iz grupe *Briophyta*. PCR metodom uz pomoć STRR sekvenci su ispitali genetski diverzitet cijanobakterija koje stupaju u simbiozu sa svim vrstama vodene paprati roda *Azolla*. Na osnovu PCR analiza utvrđene su nepomirljive razlike između cijanobakterija izolovanih iz paprati grupe *Euazolla* i *Rhizosperm*. Upotrebom STRR-PCR profila dobijeni su novi podaci o taksonomiji cijanobakterija koje grade simbiozu sa rodnom *Azolla*, koji su teško mogli da se utvrde drugim metodama klasifikacije. Autori su zaključili da je metod STRR-PCR fingerprinta veoma vredan za utvrđivanje razlika i klasifikaciju simbiozih cijanobakterija izolovanih iz biljke *Azolla*, kao i za klasifikaciju samog roda *Azolla*.

Teaumroong et al. (2002) su ispitivali biodiverzitet azotofiksirajućih zemljišnih cijanobakterija na Tajlandu. Sto dva izolata su slučajnim izborom analizirana DNA fingerprinting metodom uz pomoć STRR-PCR-a. Dobijena su dva podskupa od 45 izolata *Nostoc* sp. i 44 izolata *Anabaena* sp.. Kada su ove dve grupe detaljnije analizirane uz pomoć STRR-PCR metode, dobijen je široki spektar raznovrsnosti kod oba roda.

Govinda et al. (2008) su ispitivali prisustvo repetitivnih DNK sekvenci STRR i visoko ponovljivog palindroma (HIP) kod genoma cijanobakterija koristeći PCR metod kod devet

kultura cijanobakterija roda *Westiellopsis*. Ovom metodom su uspjeli da detektuju klastere sojeva tolerantne na: kiselu sredinu (pH 4-5), na herbicide, na zaslanjenu sredinu i klaster ne tolerantnih sojeva.

Funkcija repetitivnih sekvenci je još uvek nedovoljno poznata. Repetitivne sekvence možda regulišu završetak transkripcije ili stvaraju DNA vezujuće proteine odgovorne za održavanje hromozoma u ćeliji (Haselkorn i Buikema, 1992). Konzervativan status repetitivnih sekvenci čini ih veoma važnim sa taksonomskog stanovišta. Istraživanje kratkih repetitivnih sekvenci, zastupljenih u bakterijskom genomu, dalo je osnovu za primenu PCR tehnika repetitivnih sekvenci, tzv. rep-PCR. Ovaj metod je korišćen za karakterizaciju (fingerprint) različitih bakterija, i pokazao se veoma efikasnim za diferenciranje bliskih sojeva. Neki od rodova na kojima se ovaj metod uspešno primenjuje su: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* itd. uz korišćenje drugih prajmera ( de Bruijn, 1992; Coutinho et al., 1993; Louws et al., 1994).

Za identifikaciju i karakterizaciju nekih cijanobakterija korišćena je vrsta rep-PCR bazirana na enterobakterijskim repetitivnim intergenskim konsenzus (enterobacterial repetitive intergeneric consensus - ERIC) elementima (Lyra et al., 2001; Bruno et al., 2006). Prema dosadašnjim istraživanjima PCR metod baziran na STRR i LTRR sekvencma je adekvatan za klasifikaciju i razlikovanje cijanobakterija u okviru iste vrste.

### 3. RADNA HIPOTEZA

Imajući u vidu izuzetnu ekološku plastičnost cijanobakterija, s jedne strane, i mnoga neistražena područja, s druge strane, može se pretpostaviti da se u zemljištima na teritoriji Vojvodine nalazi znatno veća raznovrsnost azotofiksirajućih cijanobakterija od do sada zabeleženih. Očekuje se da će se detaljnom analizom različitih tipova zemljišta Vojvodine, otkriti veći biodiverzitet azotofiksirajućih cijanobakterija koje do sada nisu determinisane na našim prostorima.

Obzirom na dosadašnja oskudna istraživanja azotofiksirajućih cijanobakterija u zemljištima Vojvodine očekujemo da ćemo doći do novih podataka i saznanja koja se odnose na distribuciju ovih mikroorganizama u zavisnosti od tipa zemljišta, njegove dubine i osnovnih hemijskih karakteristika. Detaljnim opisom i foto dokumentacijom mikroskopskih snimaka izolovanih sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija očekujemo da ćemo stvoriti bazu podataka koja će služiti za sva naredna istraživanja.

Ultrastrukturalna analiza izolovanih diazotrofnih sojeva cijanobakterija iz naših zemljišta poslužiće za komparaciju sa sličnim sojevima simbioznih cijanobakterija iz poznatih svetskih kolekcija. Pri analizi će pažnja biti obraćena na ultrastrukturu vegetativnih ćelija cijanobakterija, a posebno na ultrastrukturu heterocista, ćelija koje fiksiraju azot. Ultrastrukturalna ispitivanja će se sprovesti kod četiri diazotrofna soja (3 *Nostoc* i 1 *Anabaena*), koji su izolovani iz zemljišta Vojvodine, i četiri simbiozna soja (3 *Nostoc* izolovana iz biljke *Gunera*, i 1 *Anabaena* izolovan iz vodene paprati *Azolla*). Očekujemo da ćemo utvrditi određene sličnosti i razlike između ovih sojeva, koje će nam dati nova saznanja o sojevima cijanobakterija i simbiozi sa višim biljkama.

Primenom Transmissionog elektronskog mikroskopa i metodom bojenja NS PTA očekujemo da ćemo otkriti i vizualizovati fimbrije i pili, površinske strukture na ćelijama cijanobakterija. Fimbrije - pili su prema nekim istraživanjima odgovorne za početni kontakt i

početni stadijum stvaranja simbioze cijanobakterija i viših biljaka. Očekujemo da ćemo utvrditi određene razlike i sličnosti u prisustvu, broju i dimenzijama fimbrija - pili kod simbioznih i diazotrofnih sojeva cijanobakterija.

Obzirom da je metod STRR-PCR analize fragmenata DNK cijanobakterija uspješno primenjen i na neakseničnim kulturama, očekujemo da ćemo ga uspješno primeniti i za karakterizaciju sojeva cijanobakterija koji će biti izolovani iz naših zemljišta. Takođe se nadamo da ćemo utvrditi stepen sličnosti, odnosno različitosti, sa simbioznim komparativnim sojevima cijanobakterija.

Nadamo se da će primena novih genetskih metoda PCR-a omogućiti detaljniji opis novoizolovanih sojeva cijanobakterija na polju genetike, i da ćemo steći bolji uvid u raznovrsnost cijanobakterija. Dobijeni rezultati će u budućnosti dati doprinos i mogućnosti bolje primene azotofiksirajućih cijanobakterija kao biofertilizatora ili simbiotskih organizama sa gajenim biljkama, kako u našim zemljištima, tako i u celom svetu.



#### **4. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Predmet naših istraživanja je bio određivanje zastupljenosti i raznovrsnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u različitim tipovima zemljišta Vojvodine. Iz zemljišta su izolovani sojevi azotofiksirajućih cijanobakterija u cilju njihove detaljnije ultrastrukturne analize pod transmissionim elektronskim mikroskopom i PCR (Polymerase chain reaction – Lančana reakcija polimeraze) genetičkih analiza pomoću STRR (Short Tandemly Repeated Repetitive) fragmenata. Detaljno poznavanje svojstava izolovanih azotofiksirajućih cijanobakterija je značajno i u cilju njihove buduće primene kako u proizvodnji ratarskih i povrtarskih kultura, tako i u biotehnološkoj proizvodnji.



## 5. MATERIJAL I METOD RADA

### 5.1. ISTRAŽIVANI TIPOVI ZEMLJIŠTA

Zastupljenost azotofiksirajućih cijanobakterija, ukupnog broja algi i ukupnog broja mikroorganizama je ispitivana u različitim tipovima zemljišta na jedanaest lokaliteta u Vojvodini. Od jedanaest lokaliteta odabrano je sedam koji se nalaze u zaštićenim prirodnim dobrima Vojvodine i to: arenosol u Predelu izuzetnih odlika (PIO) "Subotička peščara", arenosol u Specijalnom rezervatu prirode (SRP) "Deliblatska peščara", regosol u SRP "Titelski breg", gajnjača u Nacionalnom parku (NP) "Fruška gora", fluvisol u SRP "Koviljsko petrovaradinski rit", ritska crnica u SRP "Carska bara" i solončak u SRP "Slano Kopovo". Ostala četiri lokaliteta su sledeća: černozem na Rimskim Šančevima, fluvisol u Kačkoj šumi, ritska crnica kod Bečeja i solonjec kod sela Kumane (Tabela 1., Slika 1.).

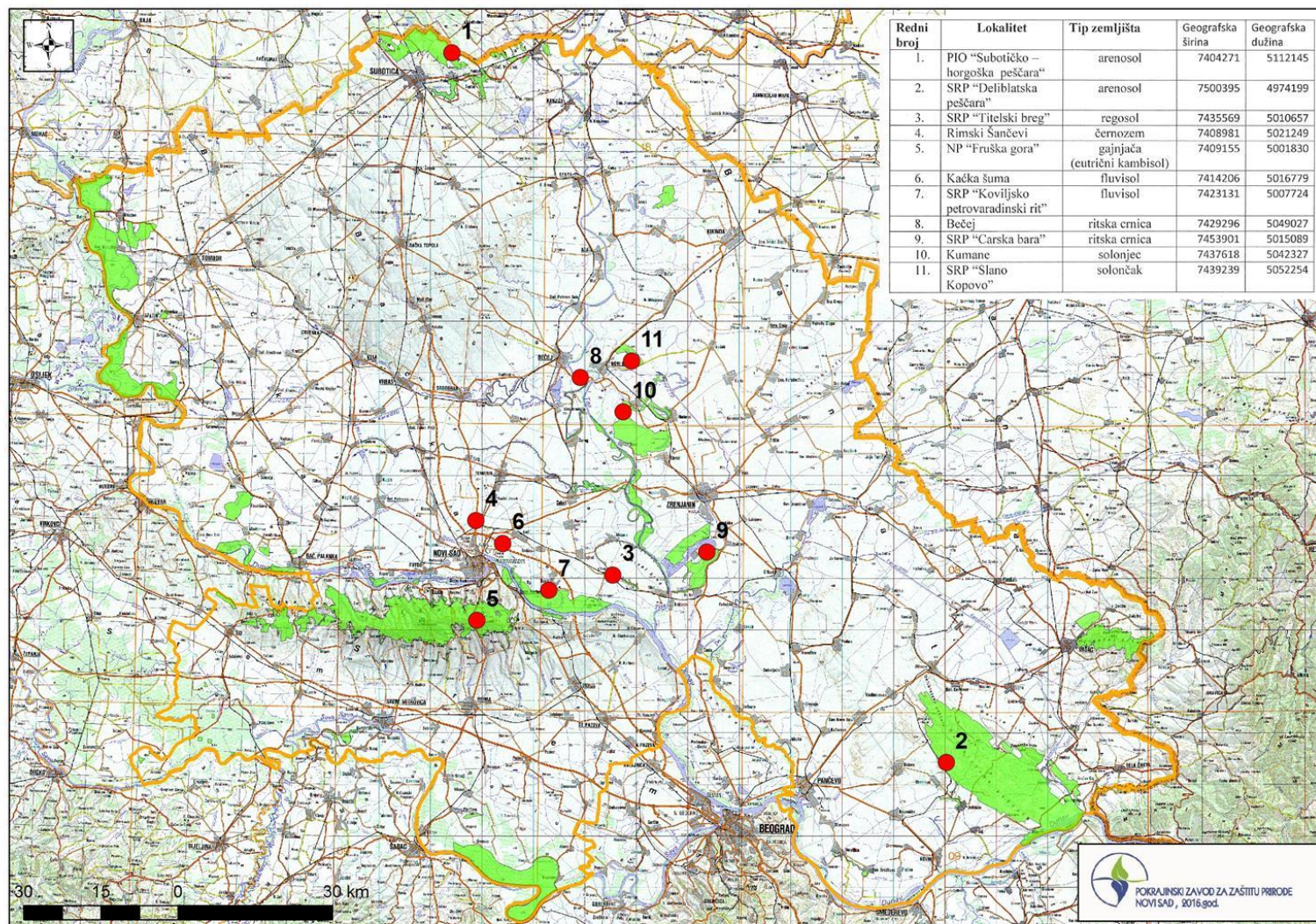
Tabela 1. Lokaliteti ispitivanih tipova zemljišta

Redni broj	Lokalitet	Tip zemljišta	Geografska širina	Geografska dužina	n.v. (m)
1.	PIO "Subotička peščara"	arenosol	7404271	5112145	114
2.	SRP "Deliblatska peščara"	arenosol	7500395	4974199	151
3.	SRP "Titelski breg"	regosol - sirozem	7435569	5010657	92
4.	Rimski Šančevi	černozem	7408981	5021249	85
5.	NP "Fruška gora"	eutrični kambisol - gajnjača	7409155	5001830	520
6.	Kačka šuma	fluvisol	7414206	5016779	84
7.	SRP "Koviljsko petrovaradinski rit"	fluvisol	7423131	5007724	84
8.	Bečej	humoglej – ritska crnica	7429296	5049027	87
9.	SRP "Carska bara"	humoglej - ritska crnica	7453901	5015089	81
10.	Kumane	solonjec	7437618	5042327	84
11.	SRP "Slano Kopovo"	solončak	7439239	5052254	84

Uzorci zemljišta su uzimani u tri ponavljanja, iz tri dubine profila 0-5 cm, 5-30 cm i 30-60 cm, tokom sva četiri godišnja doba: proleća, leta, jeseni i zime 2010. godine. Tačan položaj svakog lokaliteta, geografska širina i dužina, je utvrđen uz pomoć GPS uređaja marke Garmin (Etrex-Legend), (Slika 2.).

Osnovne hemijske analize su urađene za sve tipove zemljišta u Laboratoriji za ispitivanje zemljišta Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, (JDPZ, 1966.). Analize su obuhvatile:

- pH vrednost u suspenziji zemljišta sa vodom i suspenziji zemljišta sa kalijum hloridom, potenciometrijski;
- Sadržaj  $\text{CaCO}_3$  je volumetrijski, pomoću "Scheiblerov-og kalcimetra";
- Ukupan sadržaj azota - po metodi Kjeldahl-a;
- Lakopristupačni fosfor - AL metodom;
- Lakopristupačni kalijum - AL metodom;
- Ukupan sadržaj humusa - titrimetrijskom metodom po Tyrin-u, modifikovan po Nelson i Sommers, (1982).
- Sadržaj ukupnog ugljenika određen je automatskom metodom - CHNS analizatorom (AOAC metoda 972.43).



Slika 1. Karta lokaliteta istraživanih zemljišta u Vojvodini





Slika 2. Uređaj GPS GARMIN ETREX za određivanje tačne geografske širine i g. dužine (foto Fojkar O.)

## 5.2. KLIMATSKE KARAKTERISTIKE ISPITIVANOG PODRUČJA

Klima predstavlja veoma važan ekološki činilac koji utiče na brojnost i aktivnost cijanobakterija i uopšte mikroorganizama u zemljištu. Podaci o srednjim mesečnim sumama padavina i srednjim mesečnim temperaturama vazduha tokom 2010 godine su dati u Grafikonu 1. i 2. za lokalitet Palić, Grafikonu 3. i 4. za lokalitet Bečej, Grafikonu 5. i 6. za lokalitet Rimski Šančevi, Grafikonu 7. i 8. za lokalitet Zrenjanin i Grafikonu 9. i 10. za lokalitet Bela Crkva.

Iz navedenih podataka se vidi da je na lokalitetu Palić 2010. godine zabeleženo najviše padavina u mesecu maju, 158,9 mm, a najmanje u mesecu martu, 16,9 mm (Grafikon 1.). Srednja mesečna temperature je na istom lokalitetu bila najviša u toku jula, 23,4 °C, dok je bila najniža tokom januara – 1,1°C (Grafikonu 2.).

Na lokalitetu Bečej 2010. godine zabeleženo je najviše padavina u mesecu junu 159,2 mm, a najmanje u mesecu martu, 20,3 mm (Grafikon 3.). Srednja mesečna temperature je na

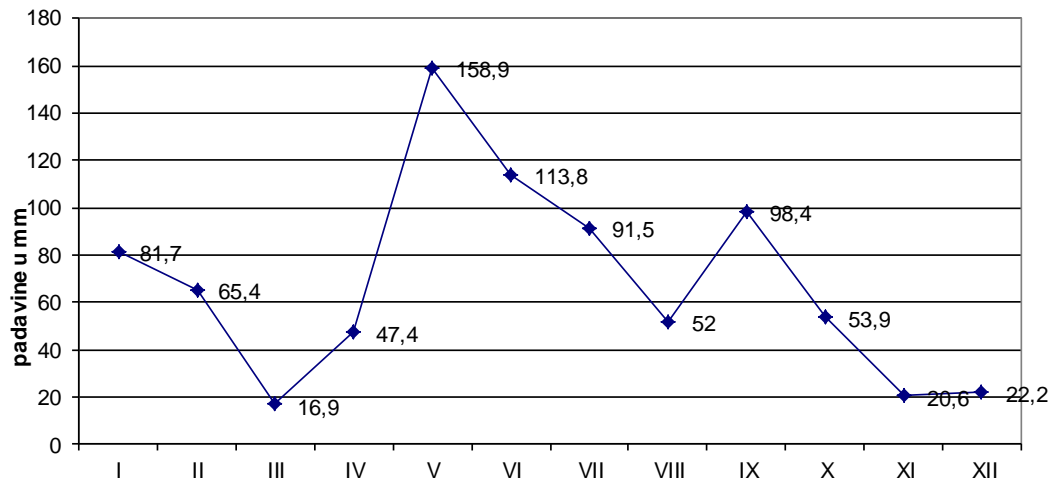
istom lokalitetu bila najviša u toku jula, 23,6 °C, dok je bila najniža tokom januara – 0,6°C (Grafikon 4.).

Na lokalitetu Rimski Šančevi 2010. godine zabeleženo je najviše padavina u mesecu junu 171,8 mm, a najmanje u mesecu martu, 38,7 mm (Grafikon 5.). Srednja mesečna temperature je na istom lokalitetu bila najviša u toku jula, 23,1 °C, dok je najniža bila tokom januara – 0,6 °C (Grafikon 6.).

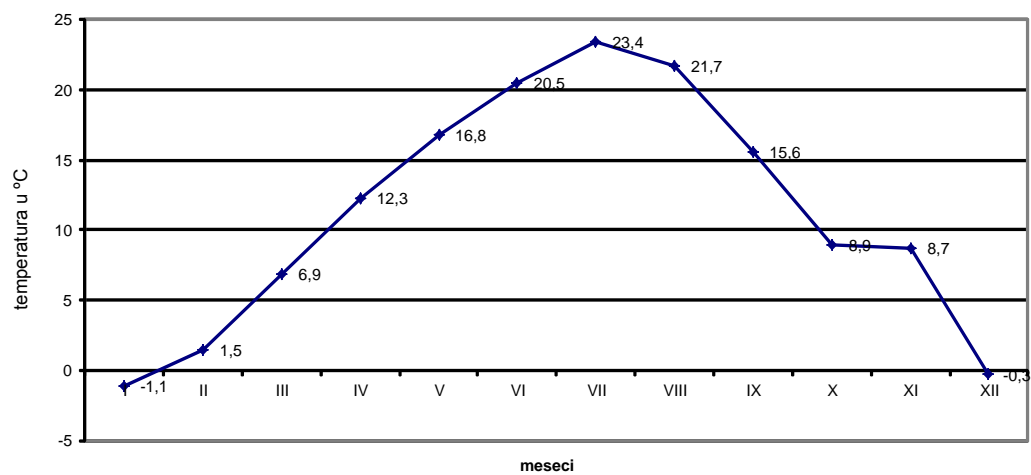
Na lokalitetu Zrenjanin 2010. godine zabeleženo je najviše padavina u mesecu maju 162,1 mm, a najmanje u mesecu martu, 26,5 mm (Grafikon 7.). Srednja mesečna temperature je na istom lokalitetu bila najviša u toku jula, 23,5 °C, dok je najniža bila tokom januara – 0,3°C (Grafikon 8.).

Na lokalitetu Bela Crkva 2010. godine zabeleženo je najviše padavina u mesecu junu 157 mm, a najmanje u mesecu septembru, 31,2 mm (Grafikon 9.). Srednja mesečna temperature je na istom lokalitetu bila najviša u toku jula, 22,9 °C, dok je najniža bila tokom januara 0,5 °C (Grafikon 10.).

U Tabeli 2. može se videti da je najmanja godišnja suma padavina u toku istraživanog perioda zabeležena na lokalitetu Bela Crkva i da je iznosila 762 mm vodenog taloga, a da je najveća godišnja suma padavina zabeležena na lokalitetu R. Šančevi, 1041.9 mm vodenog taloga. Srednja godišnja temperatura vazduha je na istraživanim lokalitetima varirala od najnižih 11.3 °C (lokalitet Palić) do 12.1 °C (lokalitet Bela Crkva).

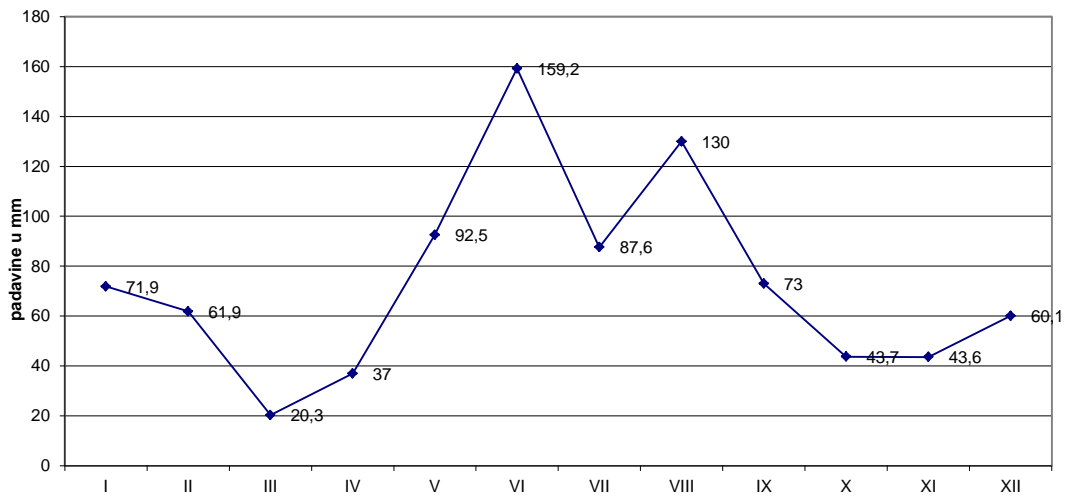


Graf. 1. Raspored srednjih mesečnih suma padavina, lokalitet Palić, 2010

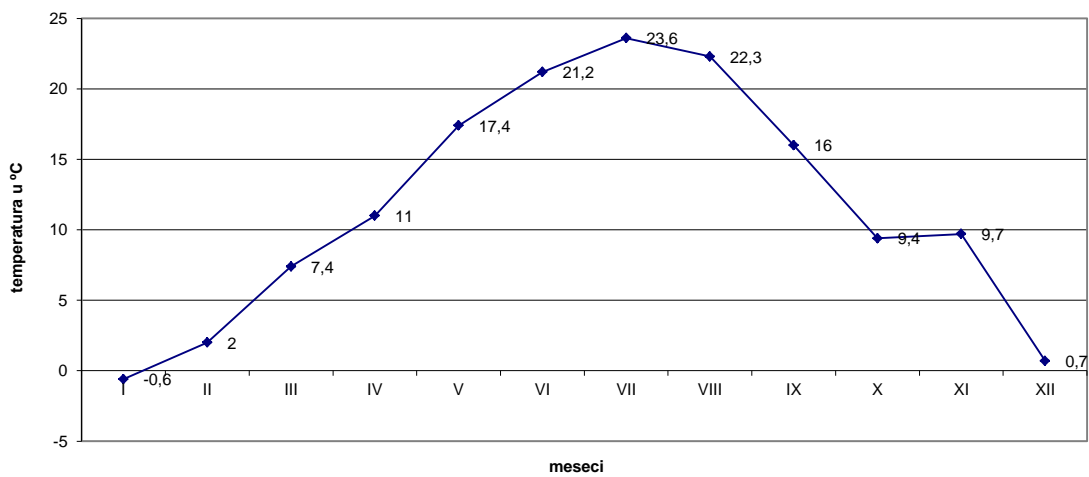


Graf. 2. Raspored srednjih mesečnih temperatura, lokalitet Palić, 2010.

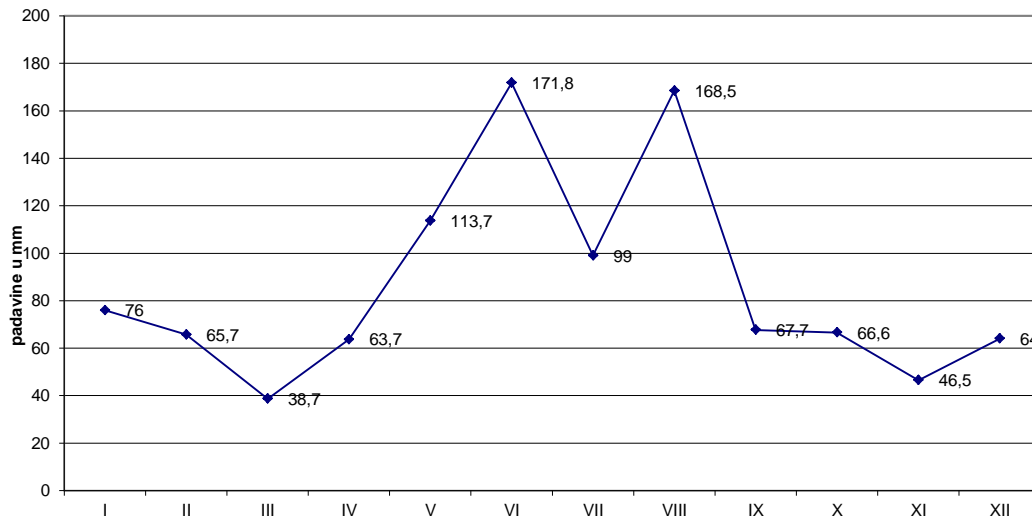




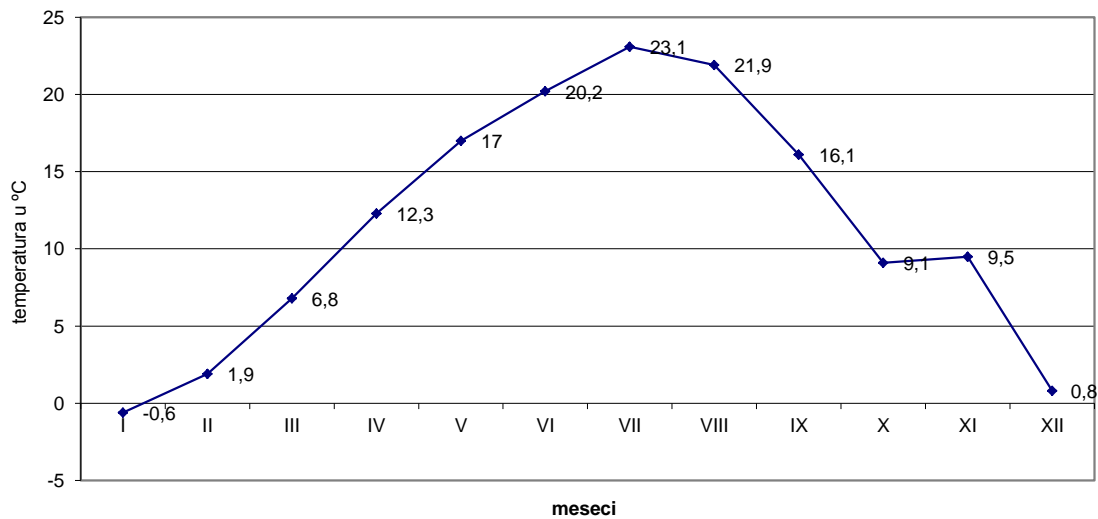
Graf. 3. Raspored srednjih mesečnih suma padavina, lokalitet Bečej, 2010.



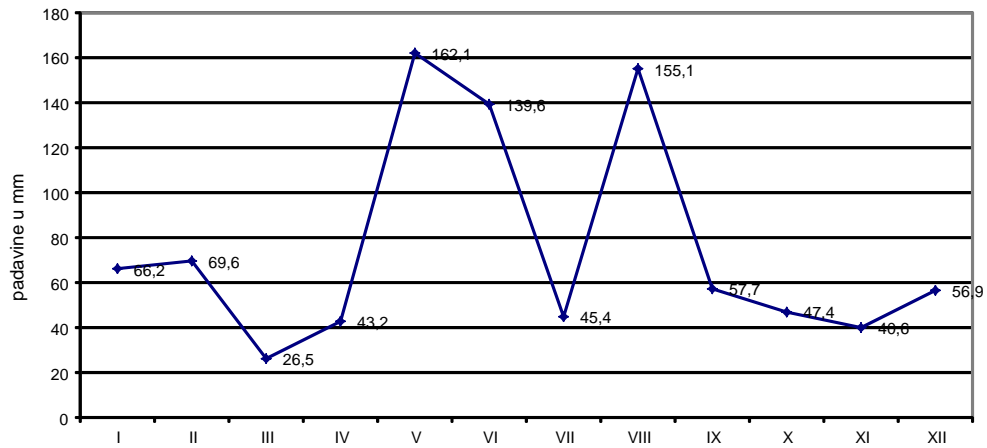
Graf. 4. Raspored srednjih mesečnih temperatura, lokalitet Bečej, 2010.



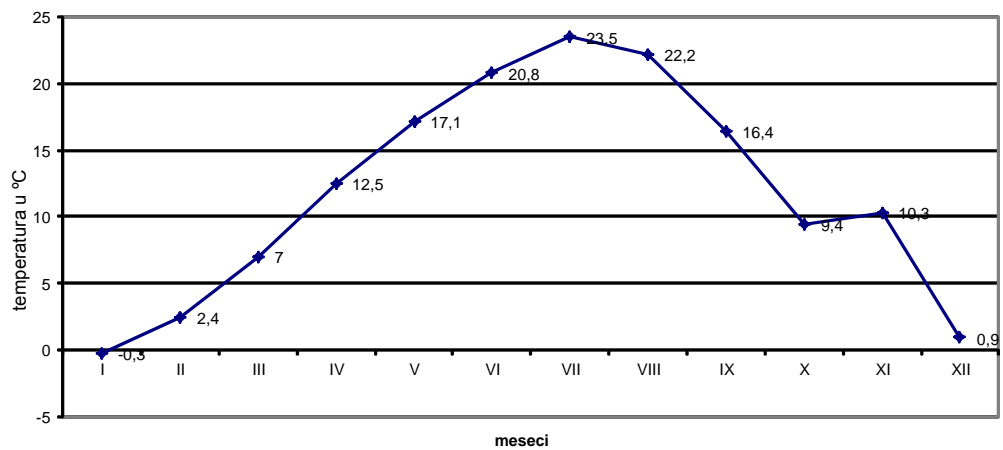
Graf. 5. Raspored srednjih mesečnih suma padavina, lokalitet Rimski Šančevi, 2010.



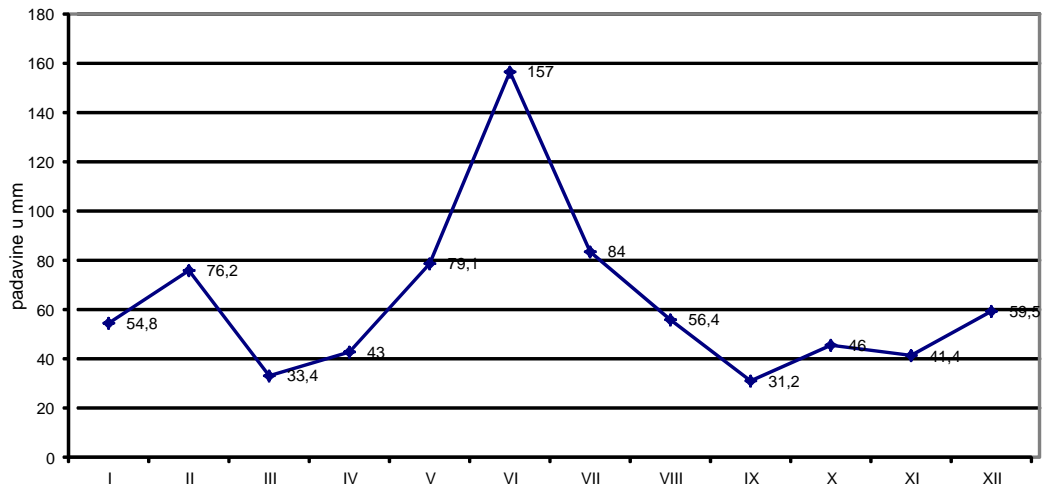
Graf. 6. Raspored srednjih mesečnih temperatura , lokalitet Rimski Šančevi, 2010.



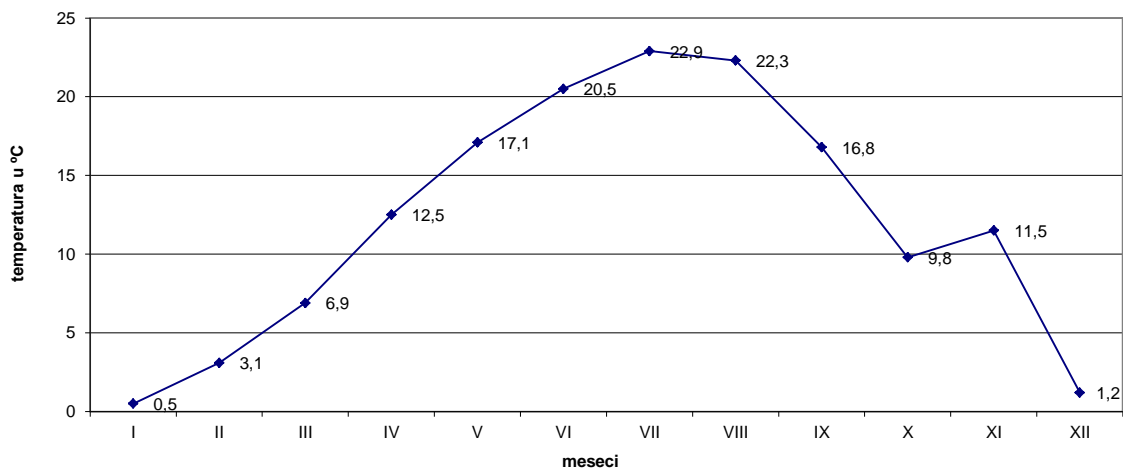
Graf. 7. Raspored srednjih mesečnih suma padavina, lokalitet Zrenjanin, 2010.



Graf. 8. Raspored srednjih mesečnih temperatura , lokalitet Zrenjanin, 2010.



Graf. 9. Raspored srednjih mesečnih suma padavina, lokalitet Bela Crkva, 2010.



Graf. 10. Raspored srednjih mesečnih temperatura, lokalitet Bela Crkva, 2010.

Tabela 2. Godišnja suma padavina (mm) i srednja temperatura vazduha (°C), 2010 godina

Lokalitet	Padavine (mm) suma godišnja	Temperatura vazduha °C srednja godišnja
Palić	926.5	11.3
Bečej	880.8	-
R.Šančevi	1041.9	11.6
Zrenjanin	910.3	11.9
Bela Crkva	762.0	12.1

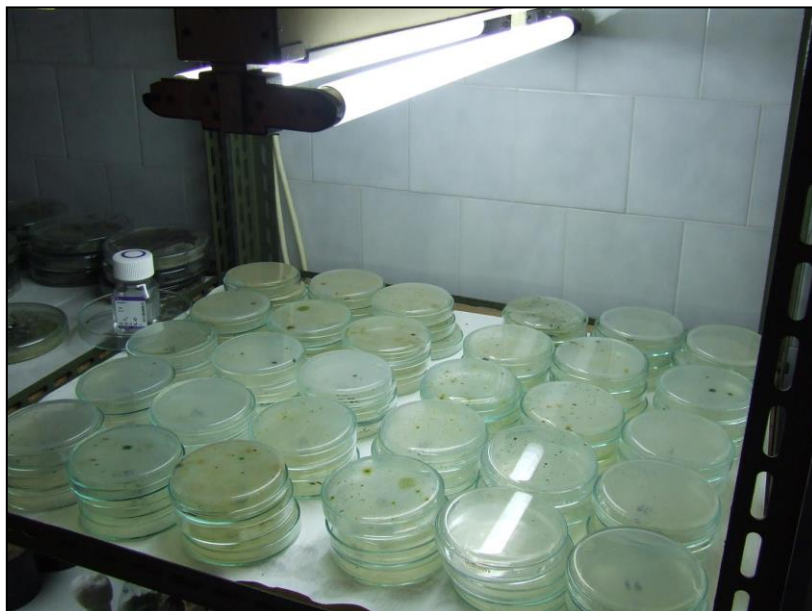
### 5.3. ODREĐIVANJE BROJNOSTI MIKROORGANIZAMA U ZEMLJIŠTU

Brojnost mikroorganizama određivana je indirektnom metodom razređenja suspenzije zemljišta na odgovarajuće, selektivne hranljive podloge. U zemljištu je određivana :

1. **Brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija** – na mineralnoj sintetičkoj podlozi BG-11, bez azota, ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ), Slika 3.
2. **Ukupan broj algi** – na mineralnoj sintetičkoj podlozi BG-11 sa azotom, ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ )
3. **Ukupan broj bakterija** – na zemljišnom agaru po Pochon et al. (1954), ( $10^{-6}$ ), Slika 4.

Azotofiksirajuće cijanobakterije i ukupne alge su inkubirane 21 dan pod konstantnim fluorescentnim osvetljenjem, pri temperature od 20 - 22°C. Obzirom na dužinu inkubacije bilo je neophodno održavati vlažnost agarizovane podloge BG-11 sa sterilnom destilovanom vodom da bi se sprečilo isušivanje.

Inkubacija ukupnog broja bakterija je vršena u termostatu pri konstantnoj temperaturi od 28°C u trajanju od 7 dana. Sve mikrobiološke analize rađene su u tri ponavljanja i broj mikroorganizama je preračunat na 1.0 gram apsolutno suvog zemljišta.



Slika 3. Određivanje broja azotofiksirajućih cijanobakterija na mineralnoj podlozi BG – 11 (-N), (Foto: Fojkar O.)



Slika 4. Određivanje ukupnog broja mikroorganizama na zemljišnom agaru po Pochonu), (Foto: Fojkar O.)

#### 5.4. IZOLACIJA AZOTOFIKSIRAJUĆIH CIJANOBAKTERIJA

Za izolaciju azotofiksirajućih cijanobakterija korišćena je mineralna sintetska podloga BG-11 bez azota,  $\text{NaNO}_3$  (Rippka et al., 1979), Tabela 3.

Tabela 3. Sastav podloge BG-11 (Rippka et al., 1979) je sledeći:

KOMPONENTE	KOLIČINA G/L
$\text{NaNO}_3$	1.500
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	0.040
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.075
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.036
$\text{Na CO}_3$	0.020
limunska kiselina	0.006
Fe amonium citrat	0.006
EDTA	0.001
A5 – rastvor oligoelemenata	1.0 ml / l

A5 rastvor oligoelemenata sadrži g/l:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2.86,  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  1.81,  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0.222,  $\text{MoO}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$  0.390,  $\text{Cu SO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  0.079,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  0.0494.

Nakon autoklaviranja i hlađenja pH vrednost podloge je bila podešena na 7.4.

Iz razređenja  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  i  $10^{-3}$  zemljišta u tečnoj podlozi BG-11 (-N) zasejavano je u sterilnim uslovima po 1.0 ml na agarizovanu podlogu. Zasejane petri kutije inkubirane su pod konstantnim fluorescentnim osvetljenjem 21 dan na temperaturi od 20 - 22 °C. Nakon tog perioda razvijaju se kolonije cijanobakterija modro-zelene, maslinaste i mrke boje. Mikrobiološkom petljom usamljene kolonije se izoluju i presejavaju na novu podlogu. Ukoliko se mikroskopskim pregledom utvrdi da je izolovano više različitih oblika azotofiksirajućih cijanobakterija pristupa se njihovo razdvajanje metodom migracije hormogonija ili metodom iscrpljivanja.

## 5.5. MORFOLOŠKE I CITOLOŠKE KARAKTERISTIKE AZOTOFIKSIRAJUĆIH CIJANOBAKTERIJA

Izolovani sojevi azotofiksirajućih cijanobakterija su opisani radi stvaranja kompletne dokumentacije o svakom soju. Mikrometarskim merenjem uz pomoć okular i objektiv mikrometra određene su dimenzije, dužina x širina ( $\mu\text{m}$ ), vegetativnih ćelija i heterocista. Imajući u vidu da su heterociste specifične ćelije u kojima se vrši azotofiksacija i da njihov % ukazuje na efikasnost vezivanja azota određen je njihov % u odnosu na vegetativne ćelije. Mikroskopskim pregledom je ustanovljeno i prisustvo specifičnog aserijalnog stadijuma koji karakteriše rod *Nostoc*. Kod sojeva kod kojih je uočeno prisustvo spora zabeležene su i njihove dimenzije.

Prilikom izolacije kolonija azotofiksirajućih cijanobakterija zabeležena je njihova dimenzija, boja, oblik i površinski izgled. Kolonije su fotografisane uz pomoć Olympus lupe pri uvećanju od 10 do 100 puta.

Izolovani sojevi mogu poslužiti kao osnova za začetak zbirke azotofiksirajućih cijanobakterija koja će služiti kao baza za odabir najefektivnijih azotofiksatora, za dalja fiziološka, genetska i primenjena istraživanja. Svi sojevi su označeni odgovarajućom šifrom i brojem.

## 5.6. ODREĐIVANJE TAKSONOMSKE PRIPADNOSTI AZOTOFIKSIRAJUĆIH CIJANOBAKTERIJA

Izolacija i klasifikacija unialgalnih sojeva cijanobakterija je urađena po metodu Rippka et al. (1979), Gantar et al.(1991c), a za determinaciju su korišteni ključevi Gollerbah et al. (1953), Starmach (1966) i Cvijan i Blaženčić (1996).



## 5.7. KORIŠĆENI KOMPARATIVNI SOJEVI CIJANOBAKTERIJA

Od jedanaest komparativnih sojeva cijanobakterija 3 pripadaju rodu *Nostoc*, Tabela 4.

Soj *Nostoc 7901* je simbiozni soj izolovan iz biljke *Gunnera dentata*, poreklom iz Kolekcije kultura algi i protozoa, Kembridž, Velika Britanija.

Soj *Nostoc PCC 9229* je simbiozni soj izolovan iz biljke *Gunnera monoica*, sa Novog Zelanda i poreklom je iz Nacionalne Kolekcije Kultura Mikroorganizama (CNCM), Paster Kolekcije Kultura Cijanobakterija (The Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria - PCC), Institut Paster, Pariz, Francuska.

Soj *Nostoc 8001* je takođe simbiozni soj izolovan iz biljke *Gunnera monoica*, poreklom sa Novog Zelanda, iz Kolekcije kultura algi i protozoa, Kembridž (CCAP), Velika Britanija.

Soj *Anabaena azollae* A.C. 1982 je simbiozni soj koji potiče iz vodene paprati *Azolla pinata*, nalazi se u kolekciji Departmana za botaniku u Štokholmu.

Tabela 4. Spisak komparativnih sojeva cijanobakterija

Broj	Soj	Poreklo	Kolekcije kultura
1.	<i>Nostoc 7901</i>	<i>Gunnera dentata</i>	CCAP
2.	<i>Nostoc 9229</i>	<i>Gunnera monoica</i> – Novi Zeland	CNCM
3.	<i>Nostoc 8001</i>	<i>Gunnera monoica</i> – Novi Zeland	CCAP
4.	<i>Anabaena azollae</i> A.C. 1982	<i>Azolla pinata</i>	Departman za botaniku, Štokholm
5.	<i>Anabaena PCC 7120</i>	-	CNCM
6.	<i>Anabaena cylindrica</i>	jezero	CCAP
7.	<i>Fisherella PCC 7521</i>	Nacionalnog parka Jelouston, SAD, vreli izvor	CNCM
8.	<i>Calothrix PCC 7504</i>	Slatkovodni akvarijum	CNCM
9.	<i>Calothrix PCC 7103</i>	-	CNCM
10.	<i>Phormidium sp.</i>	-	Departman za botaniku, Štokholm
11.	<i>Rivularia 307</i>	zemljište	Departman za botaniku, Štokholm

CNCM- Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, Paris, France.

CCAP- Culture Centre of Algae and Protozoa, Cambridge, UK.

Soj *Anabaena cylindrica* je dobijen iz Kolekcije kultura algi i protozoa, Kembridž (CCAP), Velika Britanija, dok soj *Anabaena PCC 7120* potiče iz Nacionalne Kolekcije Kultura Mikroorganizama (CNCM), Paster Kolekcije Kultura Cijanobakterija, Institut Paster, Pariz, Francuska.

Soj *Fischerella PCC 7521* je izolovan iz vrelih izvora Nacionalnog parka Jelouston, SAD, i potiče iz Nacionalne Kolekcije Kultura Mikroorganizama (CNCM), Paster Kolekcije Kultura Cijanobakterija, Institut Paster, Pariz, Francuska.

Sojevi *Calotrix PCC 7504* i *7103*, takođe potiču iz CNCM Francuska.

Ostali istraživani sojevi potiču iz kolekcije Departmana za botaniku u Štokholmu.

## 5.8. MIKROSKOPSKO FOTOGRAFISANJE

Zbog stvaranja kompletne dokumentacije i radi bolje komparativne analize morfoloških i citoloških karakteristika izolovanih azotofiksirajućih cijanobakterija svi sojevi su mikroskopski fotografisani. Fotografisanje je vršeno na svetlosnom mikroskopu "Reichert" i "Olympus" pri uvećanjima od 100 do 1000 puta, a korišćeni su polutrajni preparati sa glicerolom. Za snimanje kolonija korištena je binokularna lupa sa adapterom za fotoaparatus, a snimci su pravljeni pri uvećanju od 10 do 100 puta.

## 5.9. UV MIKROSKOPIRANJE - DAPI BOJENJE DNA MATERIJALA U ĆELIJAMA CIJANOBAKTERIJA

Fluorescentna boja 4'6 - diamidino - 2- fenilindol ( DAPI ) je visoko specifična boja za DNK. Koristi se kao citohemijski test za dokazivanje DNK u bakterijama, jedru eukariota, mitohondrijama, hloroplastima i na drugim mestima (Williamson and Fennel 1975; James and Jope 1978). Kada se tretirana ćelija osvetli UV svetlom pri talasnoj dužini od 365 nm do 390 nm, kompleks DNK - DAPI fluorescira svetlo plavom bojom. Nevezani DAPI i DAPI vezan za ne - DNK materijal može fluorescirati slabo žutom bojom. Bakterije se mogu, stoga lako razlikovati od drugih čestica koje ne sadrže DNK materijal.

Priprema DAPI rastvora:

1. Dodati 2 ml dejonizovane vode ( dim  $H_2O$  ) na sadržaja DAPI bočice (10mg), napraviti 14.3 mM ( 5 mg / ml ) DAPI matičnog rastvora . Napomena : DAPI ima slabu rastvorljivost u vodi , pa je potrebno rastvoriti ga na tresilici. 5 mg / ml DAPI rastvor se može čuvati na 2-6 °C do 6 meseci ili  $\leq - 20$  ° C i duže .

2. Dopuniti 2.1  $\mu$ L 14.3 mM DAPI rastvora do 100  $\mu$ l PBS (fosfatnim puferom) i napraviti 300  $\mu$ M DAPI srednjeg razblaženja

3. Razrediti 300  $\mu$ M DAPI srednjeg razblaženja 1 : 1.000 u PBS koliko je potrebno da se napravi 300 nm DAPI krajnje boje.

Kap vodene kulture cijanobakterija staviti na predmetno staklo mikroskopa, dodati 3 kapi DAPI krajnjeg razređenja od 300nm i ostaviti u mraku 15 minuta da se oboji. Nakon toga posmatrati na UV mikroskopu pri 365-390nm, Slika 5.



Slika 5. UV mikroskop primenjen za DAPI metod bojenja cijanobakterija

## 5.10. ODREĐIVANJE ULTRASTRUKTURE CIJANOBAKTERIJA

Ultrastrukturalna ispitivanja azotofiksirajućih cijanobakterija je izvršena u Institutu za botaniku, Univerziteta u Štokholmu, Švedska, u laboratoriji Dr Birgitte Berrgman, u okviru stipendije Federacije Evropskih Mikrobioloških Društava (FEMS). Ultrastruktura sojeva

najzastupljenijih rodova cijanobakterija *Nostoc* i *Anabaena* je izvršena uz pomoć transmisionog elektronskog mikroskopa TEM Carl Zeiss, model EM906, Slika 6. Postupak pripreme uzoraka za analizu je dugotrajan, a korištena su dva načina bojenja, ruthenium-red (RR), (Hayat, 1989) i osmijum ( $\text{OsO}_4$ ). Za analizu su korištene 10-to dnevne kulture *Nostoca* uzgajane u tečnoj mineralnoj podlozi BG-11 bez azota, pri konstantnom fluorescentnom osvetljenju i konstantnim mešanjem.

### **Bojenje uzoraka ruthenium-redom (RR):**

1. Fiksiranje uzorka u kivetu nakon centrifugiranja – 1 čas
  - a) dodati 3,6% gluteraldehid u vodi - 0.5ml
  - b) 0,2M kakodilat pufer pH 7.3 – 0.5ml
  - c) RR rastvor, 0,15% u vodi – 0.5ml
  
2. Ispiranje ćelija 3 puta sa 0.15M kakodilat puferom 10 minuta
  
3. Fiksiranje 3 časa na sobnoj temperaturi (RR-osmijum smešom)
  - a) 5%  $\text{OsO}_4$  u dest.  $\text{H}_2\text{O}$  – 0.5ml
  - b) 0.2M kakodilat pufer, pH 7.3 – 0.5ml
  - c) RR rastvor, 0,15% u vodi – 0.5ml
  
4. Ispiranje ćelija sa puferom 3 puta po 5 minuta
  
5. Dehidracija u seriji alkohola: 20% etanol - 15min
  - 50% etanol – 15 min
  - 70% etanol - 15 min
  - 90% etanol - 15 min
  - 95% etanol - 15 min
  - 2 x 100% etanol - 15 min
  
6. Međufaza:
  - a) centrifugirati i isprati acetonom 2 x 15min
  - b) dodati aceton : EPON (1:1) 2časa ili celu noć
  - c) EPON 2časa ili celu noć

7. Učvrščivanje: U plastične boksove staviti uzorke zajedno sa malim etiketama, dodati EPON i ostaviti na 60 °C 48 časova da se izvrši polimerizacija.

8. Sečenje na ultramikrotomu.

9. Posmatranja na elektronskom mikroskopu Carl Zeiss model EM906.

Priprema kakodilat pufera:

1. Priprema 0.4M Na kakodilata:  $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$  21.4g , dodati destilovane vode do 250.0ml.

2. Priprema 0.2M kakodilat pufera: 0.4M Na kakodilata 50ml, 0.2M HCl 8.0ml (za pH 7.2), dodati destilovane vode do 100ml. pH pufera se podešava dodavanjem HCl.

### **Bojenje uzoraka osmijumom ( $\text{OsO}_4$ ) – za osnovne strukture:**

1. Fiksiranje uzorka u kiveti nakon centrifugiranja:

a) na talog dodati 2.5% glutaralhid u fosfatnom puferu ( 1.0 ml 25%GA + 9.0 ml fosfatnog pufera) – stoji 2-4 časa

b) centrifugirati, isprati 3 puta u fosfatnom puferu 0.01M

c) na ćelije dodati 2%  $\text{OsO}_4$  ( u fosfatnom puferu) – stoji 2 časa na 4°C ili 1 čas na sobnoj temperaturi. Napomena: 2%  $\text{OsO}_4$  u vodi dodati na uzorak, pa onda istu zapreminu 0.02M fosfatnog pufera (1.0ml 0.1M FP + 4.0ml vode)

d) centrifugirati i isprati u fosfatnom puferu 3x10 min .

2. Dehidratacija u seriji alkohola: 20% etanol - 15min

50% etanol – 15 min

70% etanol - 15 min

90% etanol - 15 min

95% etanol - 15 min

2 x 100% etanol - 15 min

3. Međufaza:

d) centrifugirati i isprati acetonom 2 x 15min

e) dodati aceton : EPON (1:1) 2 časa ili celu noć

f) EPON 2 časa ili celu noć

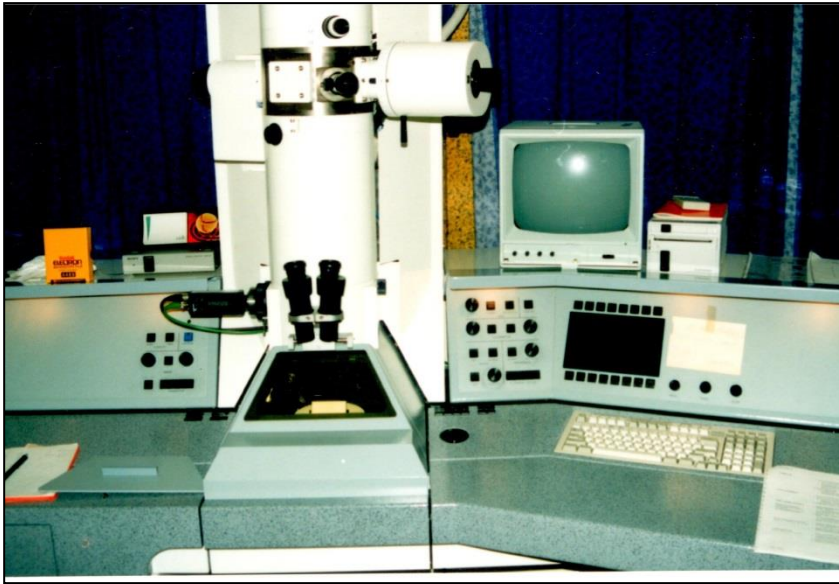
4. Učvrščivanje: U plastične boksove staviti uzorke zajedno sa malim etiketama, dodati EPON i ostaviti na 60 °C 48 časova da se izvrši polimerizacija.

5. Sečenje na ultramikrotomu, Slika 7..

6. Kontrastiranje sa uranil acetatom i olovo citratom.
7. Posmatranja na elektronskom mikroskopu Carl Zeiss model 906.

Priprema smole EPON: TAAB 812 – 12.0g, DDSA – 6.5g, MNA – 6.5g, BDMA – 0.3g, mešati sa magnetom 15 minuta i sačekati da vazdušni mehurići izađu.

Priprema 2%  $\text{OsO}_4$  : ampula sa 0.25g/ 12.5 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Pre upotrebe oprati ampulu sa acetonom ili toplom vodom.



Slika 6. Transmisioni elektronski mikroskop, Carl Zeiss model EM 906 (foto: Fojkar O.)



Slika 7. Ultramikrotom model RMC - 7000

## 5.11. GENETIČKA KARAKTERIZACIJA AZOTOFIKSIRAJUĆIH CIJANOBakterija METODOM STRR-PCR

PCR analiza umnoženih fragmenata DNA prajmerima dizajniranim na osnovu STRR (Short Tandemly Repeated Repetitive Sequences) konzervativnih sekvenci DNA je izvršena u laboratoriji dr Birgitte Berrgman na Institutu za botaniku, Univerziteta u Štokholmu, Švedska. Analiza STRR sekvenci i profila cijanobakterija dobijenih na osnovu njih je opisana u radovima Mazel et al. (1990) i Rasmussen i Svenning (1998). U ovom radu korišteni su navedeni uslovi PCR reakcija. Ovaj deo rada je obavljen u saradnji sa dr Ullom Rasmussen.

Za ispitivanje sličnosti, odnosno različitosti, cijanobakterija metodom PCR-a pomoću prajmera dizajniranih na osnovu STRR konzervativnih sekvenci DNA genoma odabrali smo ukupno 39 sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija. Dvadeset osam sojeva (28) je izolovano iz vojvođanskih istraživanih zemljišta, dok jedanaest (11) sojeva potiče iz kolekcije cijanobakterija Departmana za Botaniku, Univerziteta u Štokholmu, Švedska. Neki od sojeva sa Univerziteta u Štokholmu su međunarodno sertifikovani sojevi, a odabrani su radi komparacije sa našim sojevima.

Postupak:

1. **Priprema DNA:** tečni uzorak kulture 1.0ml centrifugirati i ispirati 3 puta sterilnom destilovanom vodom, a ćelijski talog resuspendovati u 100.0µl sterilne destilovane vode

2. **Priprema STRR-PCR:**

Reakciona smeša za STRR-PCR ( po uzorku):

a) 10x reakcioni pufer 2.5µl ( DynaZyme, Finnzymes)

b) st.dest voda 15.8µl

c) 50 pmol prajmer 1.0µl ( STRR-1A, 3'- CCCCTRACCCCTRACC-5' )

(Eurogentec Seraing, Belgija)

d) 1.25mM dNTP 0.2µl (deoxynukleoside triphosphate)

e) enzim 1 U DNA polymerase 0.5µl ( DynaZyme, Oy,Espoo, Finland).

U sterilnu tubu usuti 5.0µl pripremljenog uzorka DNA i 20.0µl STRR-PCR reakcione smeše (celokupne zapremine 25.0µl).

3. **Uslovi amplifikacije STRR-PCR:**

- a) Inicijalna denaturacija DNA 95°C 6min;
- b) 30 ciklusa: denaturacija 94°C 1min; vezivanje prajmera za ciljnu sekvencu DNA (annealing) 56°C 1min; izduživanje (ekstenzija) 65°C 5min;
- c) finalna ekstenzija 65°C u 16min;
- d) čuvanje uzoraka na 4°C.

Umnožavanje DNA sekvenci je ostvareno u PCR mašini PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc., Watertown, Mass.), Slika 8. Nakon reakcije 8 $\mu$ l umnoženog DNA je razdvojeno na 1.5% agaroznom gelu (Promega, Medison, Eis.), Slika 8. Za procenu veličine dobijenih amplifikovanih fragmenata (amplikona) DNA korišćen je marker pGEM (Promega, Medison, Eis.). Gel je nakon toga bojen etidijum bromidom i snimljen sa Eagle Eye II video sistemom (Stratagene, La Jolla, Calif.).

**Priprema gela:** na 100.0ml 1xTBE pufera doda se 1.5g agaroze i 10.0  $\mu$ l EtBr etidijum bromida. Gel se topi, uz mešanje, 3 minuta na 60°C. Količina uzorka za elektroforezu je 8.0 $\mu$ l, na uzorak se dodaje po 5.0 $\mu$ l nosećeg pufera. Marker se dodaje u količini od 7.0 $\mu$ l, Slika 9.

**Pufer 10xTBE:** 54.0g Tris- baze, 27.5g Boric acida, 20.0 ml 0.5M EDTA pH 8,0 , sve se dopuni do 500.0ml dest. vodom.

**Priprema 0.5M EDTA pH 8.0:** 186.1g EDTA x 2H<sub>2</sub>O u 800.0ml H<sub>2</sub>O izmešati magnetom. pH podesiti sa 20.0 g NaOH tabletama i dopuniti do 1l dest. H<sub>2</sub>O.

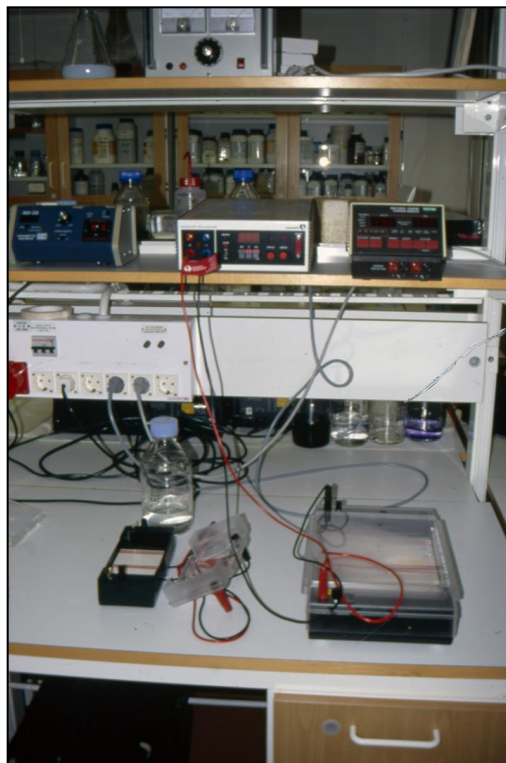
Boja za uzorak: 20% Ficoll (MW=400, ICN Biomedicals), 20.0mM EDTA pH 8.0 (0.5M EDTA), 0.05% bromphenol blue.

Svi PCR rezultati su ponovljeni i potvrđeni tri puta. Analiza gelova je izvršena pomoću programa Kodak Digital Science 1Dtm, Slika 10.





Slika 8. PCR mašina PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc., Watertown, Mass.) korišćena za amplifikaciju fragmenata DNA cijanobakterija korišćenjem STRR prajmera (foto: Fojkar O.)



Slika 9. Aparat za elektroforezu za razdvajanje produkata STRR-PCR (foto: Fojkar O.)



Slika 10. Sistem Kodak Digital Science 1Dtm za analizu gelova nakon elektroforeze.

## 5.12. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svi dobijeni podaci koji se odnose na brojnost istraživanih grupa mikroorganizama: azotofiksirajućih cijanobakterija, ukupne brojnosti algi i ukupne brojnosti bakterija su obrađeni statistički metodom ANOVA za dvofaktorijski ogled i analizirani LSD testom homogenosti ispitivanih varijanti, a primenom StatSoft programa Statistika 12,0.

Analiza STRR-PCR DNA produkata ispitivanih sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija urađena je Cluster analizom matrice StatSoft programa Statistika 12,0.

## 6. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I DISKUSIJA

### 6.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE ISPITIVANIH TIPOVA ZEMLJIŠTA

U radu je ispitivana zastupljenost azotofiksirajućih cijanobakterija, ukupnog broja algi i ukupnog broja mikroorganizama na 11 lokaliteta u 8 tipova zemljišta Vojvodine (Tabela 1.). Ispitivana zemljišta pripadaju različitim razdelima i klasama zemljišta i odlikuju se svojim specifičnim fizičkim i hemijskim karakteristikama. Osnovne hemijske karakteristike ispitivanih zemljišta date su u Tabeli 5.

#### Lokalitet 1. PIO “Subotička peščara“ - tip zemljišta: ARENOSOL

*Red:* AUTOMORFNA ZEMLJIŠTA

*I KLASA:* NERAZVIJENA ZEMLJIŠTA, (A)-C profila

*Tip:* **Arenosol**, eolski "živi" pesak (lat. *arena* – peščano borilište, *solum* – zemljište, gr. *Eol* – bog vetra)

Geomorfološka celina: Subotičko – horgoška peščara

Nadmorska visina: **114 m**

Geografska širina: 7404271, Geografska dužina: 5112145

Subotička peščara (Bukurov, 1975) je južni deo velike Bajsko-subotičke peščare i proglašena je Predelom izuzetnih odlika “Subotička peščara” 2003. godine. Zauzima površinu od 5369,9 ha. Prema nacionalnoj klasifikaciji spada u II kategoriju - Prirodno dobro od velikog značaja a ima i međunarodni značaj kao: Međunarodno stanište ptica (IBA), Međunarodno stanište biljaka (IPA) i Emerald područje.

Tabela 5. Osnovne hemijske karakteristike istraživanih zemljišta

Redni broj	Lokalitet	Tip zemljišta	% humusa	% C	% N	AL-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> mg/100g	AL-K <sub>2</sub> O mg/100g	pH u KCl	pH u H <sub>2</sub> O	% CaCO <sub>3</sub>
1.	PIO "Subotička peščara"	arenosol	2.14	1.24	0.14	23.93	6.17	6.97	7.49	7.23
2.	SRP "Deliblatska peščara"	arenosol	0.29	0.17	0.02	2.23	4.86	7.14	7.91	13.18
3.	SRP "Titelski breg"	regosol	2.54	1.47	0.17	46.13	54.78	6.59	7.32	7.23
4.	Rimski Šančevi	černoze m	2.78	1.61	0.18	13.58	31.45	6.92	8.11	3.83
5.	NP "Fruška gora"	gajnjača	1.83	1.06	0.12	1.14	11.45	4.58	5.22	3.40
6.	Kačka šuma	fluvisol	1.54	0.89	0.10	2.48	5.96	6.57	7.64	10.20
7.	SRP "Koviljsko - petrovaradinski rit"	fluvisol	2.32	1.34	0.15	11.73	8.49	6.67	7.34	6.80
8.	Bečej	ritska crnica	3.63	2.10	0.24	21.83	33.52	4.32	5.46	2.55
9.	SRP "Carska bara"	ritska crnica	3.96	2.30	0.26	4.75	12.0	6.61	7.59	4.68
10.	Kumane	solonjec	1.56	0.90	0.10	5.76	27.48	7.03	8.73	2.98
11.	SRP "Slano Kopovo"	solončak	1.27	0.74	0.08	17.37	39.19	7.16	8.19	3.83

Južno od Subotice su diluvijalne lesne naslage, koje se završavaju strmim lesnim odsecima Telečke, neposredno iznad Velikog kanala. U našoj zemlji Subotička peščara, zauzima uski pojas severno od Subotice pa do granice sa Mađarskom. Nadmorska visina Peščare je različita. Nagnuta je od severozapada ka jugoistoku. Najviši predeli su severno i severozapadno od Subotice, gde su visine na Čavolju 131 m, na Krivom blatu 141 m i na Tompi 143 m. Visina prema istoku, zapadu i jugu opada.

Od kontinentalnih peskova Evrope je odvaja osoben i raznovrstan živi svet koji je delimično uništen vekovnim prisustvom čoveka, a čija je delatnost doprinela specifičnom predeonom obliku područja. Vezana za najkontinentalniji deo Vojvodine, ova peščara je okarakterisana jedinstvenim ekološkim prilikama u uslovima blago zatalasanog dinskog reljefa, mozaičnog rasporeda peščanih i lesnih oaza, složenih pedoloških tvorevina koje su determinisane karbonatnim peskovima a pre svega režimom podzemnih voda.

Nekada je područje obilovalo i površinskim vodama, što je rezultiralo pojavom brojnih jezera u depresijama a u istočnom delu peščare i nizijskih tresetišta u nekadašnjoj plavnoj zoni rečice Kereš. Raznovrsnost prirodnih ekosistema Subotičke peščare odraz je specifičnog mozaika staništa u kom se peščarske i stepske čistine prepliću sa zasadima bagrema i bora, sađenim hrastovim šumama, malim oazama autohtonih šuma bele i sive topole, kao i posebno vrednim iskonskim tresetnim ekosistemima. Njihova mestimična očuvanost na svojevrsan način doprinosi da ovo prirodno dobro bude u evropskim razmerama značajno područje i nesumnjiv punkt specifičnog florističko-vegetacijskog, ali isto tako, i faunističkog diverziteta (Štetić et al., 2003.).

U Subotičkoj peščari (Gajić, 1986) javljaju se nekoliko vrsta peskova (smeđi, crni i crno-ilovasti). Smeđi pesak zauzima veće površine. U depresijama gde su plitke podzemne vode javlja se peskovita ritska crnica. Crni pesak ima 3 karakteristična horizonta (crni humusni, žuti ili smeđi i sivi-vlažni pesak). Površine pod crnim peskom su veoma male, nastale usled obrade-rigolovanjem. Crni ilovasti pesak je sličan crnom pesku, s tim da sadrži više humusa i gline. Nalazi se u mikrodepresijama gde je veće prisustvo gline u pesku. Najveće površine preko 50% Subotičke peščare, zauzima inicijalno zemljište na pesku i mestimično živi pesak. Ovo zemljište je danas pod šumskim zasadima i to na sledećim lokalitetima: Krivoblatska šuma, Kelebijska šuma, Daščanska šuma, Krstaška šuma, Jasenička šuma, Radanovačka šuma i Hajdukova šuma.



Slika 11. Spoljašnja morfologija arenosola, lokalitet PIO "Subotička pešćara" (foto: Fojkar O.)

Arenosol ili eolski pesak spada u red automorfnih i klasu nerazvijenih zemljišta sa (A)-C ili (A)-R profilom. Arenoslo nastaje površinskom migracijom i sedimentacijom materijala, gde je transportni agens vetar. Fluvijatilnom erozijom panonskih reka stvarani su prostrani izvori peskovitog materijala koji su premeštani delovanjem jakih vetrova. Uslovi nastajanja su suva klima i odsustvo ili samo delimična pokrivenost vegetacijom. Usled stalnih premeštanja površinskih slojeva ne mogu se obrazovati normalni profili, pa se trajno održavaju nerazvijena zemljišta.

Unutrašnja morfologija profila arenosola na ovom lokalitetu se odlikuje postojanjem sloja I (0-60 cm), eolski nanos, sivo žute boje u suvom stanju, a tamno sivo žute boje u vlažnom stanju. Srednje je karbonatan, ilovasti sitni pesak, jednočestične strukture, prožet korenom samo pri vrhu.

Dubina eolskog peskovitog nanosa može da varira od 50-200 cm i više. Ispod pešćanog sloja se nalaze različiti sedimenti ili fosilna zemljišta. U (A) horizontu se može uočiti samo delimična akumulacija razloženog organskog materijala do dubine 50-60 cm. Boja peska je najčešće siva do žućkasta. Arenosoli su vrlo propustljivi za vodu. Odlikuju se niskim poljskim vodnim kapacitetom a visokim vazdušnim kapacitetom, stoga su ovo suva, dobro aerisana i topla zemljišta. Kvarc je dominantni mineral u arenosolu, više od 70% svih minerala.





Slika 12. Unutrašnja morfologija arenosola, lokalitet Subotička peščara

Ispitivani arenosol se odlikuje slabo baznom reakcijom, pH u vodi iznosi 7.49. Sadržaj humusa je nizak i iznosi 2.14%, dok je količina fosfata visoka i iznosi 23.93% AL-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg/100g. Arenosol se posle regosola odlikuje najvećom količinom fosfata, od svih ispitivanih zemljišta. Količina kalcijum karbonata je takođe bila relativno visoka u odnosu na druge tipove zemljišta (7.23% CaCO<sub>3</sub>).

### **Lokalitet 2. SRP "Deliblatska peščara"- tip zemljišta: ARENOSOL**

**Red: AUTOMORFNA ZEMLJIŠTA**

**I KLASA: NERAZVIJENA ZEMLJIŠTA, (A)-C profila**

**Tip: Arenosol**, eolski "živi" pesak (lat. *arena* – peščano borilište, *solum* – zemljište, gr. *Eol* – bog vetra)

Geomorfološka celina: Deliblatska peščara

Nadmorska visina: **151 m**

Geografska širina: 7500395, Geografska dužina: 4974199

Deliblatska peščara predstavlja najveću evropsku kontinentalnu Peščaru, elipsastog oblika dimenzija 35 sa 20 km. Nalazi se u jugoistočnom delu Panonske nizije, u južnom

Banatu, i pruža se u pravcu JI-SZ. Veći deo ovog područja zahvata SRP „Deliblatska peščara“. Deliblatska peščara je nastala od silikatno-karbonatnog peska, plavina banatskih reka i nanosa Dunava, koje su vetrovi ledenog doba, sa njihovih obala razneli u pravcu SZ i zasuli prethodno formirani lesni plato. Na površini od 350 km<sup>2</sup> blago zatalasani reljef je preoblikovan u izrazito dinski, (Slika 13.).

Izrazito dinski reljef odlikuju apsolutne nadmorske visine vrhova dina između 70 i 197 m, dok relativne u udolinama dostižu i do 30 m. Glavni minerali sastojci peska su kvarc, feldspati i krečnjak.

Zemljišta Deliblatske peščare se odlikuju malim sadržajem humusa, nevezanošću čestica, kretanjem krečnjaka kroz profil, alkalnom reakcijom, malim vodnim kapacitetom i velikom specifičnom toplotom. Temperaturna amplituda površine zemljišta iznosi 90°C.



Slika 13. Spoljašnja morfologija arenosola, lokalitet SRP “Deliblatska peščara“: a) dinski reljef sa samoniklim klekama, b) rad na terenu uzimanje uzorka c) oskudna stepska vegetacija d) sasušene kolonije pionirskih modrozelenih algi *Nostoc sp.*, (foto: Fojkar O.)



Biljni svet Deliblatske peščare karakterišu: peščarske, stepske i šumske biljne zajednice. Od blizu 1000 biljnih vrsta koje ih grade, najkarakterističnije su biljke stepskih staništa: banatski božur, stepski božur, šerpet, bademić i dr. Kleka je jedini samonikli četinar, dok u malobrojnim autohtonim šumama dominiraju virgilijski hrast, lužnjak i bela lipa. Više od polovine površine Deliblatske peščare danas obrastaju sađene šume bagrema, crnog i belog bora, (Habijan Mikeš, 1998).

Stepsku vegetaciju ovoga područja, koja je nastala i održava se ispašom i kosidbom, predstavlja zajednica *Festuceto-Potentilletum arenariae* – vijuka. Nastanjuju je zaštićene vrste: *Pulsatilla vulgaris subsp. grandis* – velika sasa, *Paeonia tenuifolia* – stepski božur, *Rindera umbellate* – šerpet i *Colchicum arenarium* – mrazovac. U blizini se nalazi jedino mikro stanište *Paeonia officinalis ssp. banatica* – banatskog božura u Srbiji.

Na osnovu hemijske analize zemljišta zaključujemo da arenosol na lokalitetu u SRP Deliblatska peščara ima najniži sadržaj humusa (0.29 %), ugljenika (C 0.17%) i azota (N 0.02%) u odnosu na sva druga ispitivana zemljišta. Takođe se odlikuje i najmanjim sadržajem kalijuma (AL K<sub>2</sub>O 4.86% mg- 100g), i niskim sadržajem fosfata (AL-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 2.23 mg-100g). Ovo zemljište je alkalno pH 7.91 u vodi. Količina karbonata je najveća u odnosu na sva ispitivana zemljišta 13.18% CaCO<sub>3</sub>.

### **Lokalitet 3. SRP “Titelski breg” - tip zemljišta: REGOSOL (SIROZEM)**

**Red: AUTOMORFNA ZEMLJIŠTA**

**I KLASA: NERAZVIJENA ZEMLJIŠTA, (A)-C profila**

**Tip: Regosol** (*regos*-pokrivač i *solum*-zemljište, a naziv sirozem od reči sirov - nerazvijen).

Geomorfološka celina: **Titelski breg**

Nadmorska visina: **92 m**

Geografska širina: 7435569, Geografska dužina: 5010657

Specijalni rezervat prirode “Titelski breg” predstavlja izolovano lesno ostrvo na krajnjem jugoistoku Bačke, koje je smešteno u međurečju Dunava i Tise. Izdiže se 50 m iz aluvijalnih ravni ovih reka, dok se jugozapadno od samog Titela nadovezuje na Titelsku lesnu

terasu i na aluvijalnu ravan Dunava. Elipsastog je oblika što je posledica erozivnog dejstva dunavskih i tiskih voda (Bukurov, 1953, 1975). Sa svih strana jasno je omeđen strmim padinama i odsecima koji se izdižu od 35 do 55 m u odnosu na okolni prostor, (Slika 14.).

Njegovu jedinstvenost čine bogatstvo geomorfoloških oblika i pojava, koncentrisanih na relativno malom prostoru: surduci, poličice, pleća, lesni odseci, viseće doline, lesne piramide, lesne pećine, lesne škrape ili vrtače, provalije, plavine, slivci, odronje i lesne lutkice. Posebna vrednost Titelskog brega proističe iz neuobičajene moćnosti lesno-paleozemljišnih sekvenci koje su formirane tokom poslednjih pet glacijalnih ciklusa. Na osnovu toga možemo zaključiti da lesno-paleozemljišne sekvence Titelskog brega predstavljaju jedan od najdetaljnijih paleoklimatskih i paleoekoloških arhiva na evropskom kopnu, tokom poslednjih približno 600000 godina.



Slika 14. Spoljašnja morfologija regosola, lokalitet SRP "Titelski breg": a) travna vegetacija na blagoj padini, b) c) strmi lesni odsek kod sela Lok, d) rad na terenu (foto: Fojkar O.)

Kao rezultat ovih uslova i istorijskih faktora prisutne su brojne strogo zaštićene i zaštićene divlje vrste, u karakterističnoj i raznovrsnoj vegetaciji fragilnih tipova ekosistema,

koji pripadaju staništima prioritarnim za zaštitu, na međunarodnom i nacionalnom nivou. Među njima se ističu očuvana stepa na lesu, panonske termofilne šume medunca i ruja, kao i kserofilni šibljac. Na prostoru Specijalnog rezervata prirode "Titelski breg" zabeleženo je oko 630 biljnih vrsta, 137 vrsta ptica, 9 vrsta vodozemaca, 11 vrsta gmizavaca kao i 33 vrsta sisara retkih za ovo područje (tekunica, divlja mačka i dr.).

Miljković (1971), odnosno Živković et al. (1972), ukazuju da zemljište na području Titelskog brega čine dva osnovna tipa: inicijalno zemljište na lesu i černozem, dok je u okruženju jugozapadno od Titela konstatovana livadska crnica karbonatna na lesnoj terasi, a uz reku Tisu aluvijalno zemljište.

Inicijalno zemljište na lesu (sirozem) je debljine svega nekoliko centimetara i javlja se na strmim terenima na kojima je izražena erozija. Profil sirozema na lesu na blažoj padini Titelskog brega kod Loka ima horizont A, debljine 0-10cm, bleožute je boje, karbonatna glinovita ilovača i neizražene je mrvičaste strukture. Horizont C, debljine od 10 – 30 cm je i dalje karbonatni les, karakteristične žute boje i istog mehaničkog sastava, ali u nešto zbijenijem stanju od prethodnog sloja. Zapaženi su i sitni beličasti talozi kreča (Živković et al., 1972.).

Po mehaničkom sastavu je ilovača ili glinovita ilovača sa 14-16% kreča. Jedino je kod mesta Vilovo zabeleženo potpuno odsustvo kreča. Mestimično razvijena vegetacija dovodi do pedogeneze na matičnom supstratu. Otuda je i nagomilavanje humusa mozaično, zbog čega humusni horizont nije kontinuiran. Količina humusa je obično veoma niska (ispod 1%), a reakcija sredine neutralna do slabo alkalna, što se opet odražava na karakter oskudne vegetacije, (Timotić i Kovačev, 2011.).

Na osnovu hemijske analize zemljišta zaključujemo da sirozem na lokalitetu u SRP Titelski breg ima sadržaj humusa od 2.54% i ugljenika C 1.47%. Ovo se tumači razvijenom vegetacijom na blagim padinama brega. Ovo zemljište se odlikuje i najvećim sadržajem fosfata (AL-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 46.13 mg-100g) i kalijuma (AL K<sub>2</sub>O 54.78% mg-100g) u odnosu na sva ostala ispitivana zemljišta. Reakcija je blago alkalna pH 7.32 u vodi. Količina karbonata u ovom zemljištu iznosi 7.23% CaCO<sub>3</sub>.

#### Lokalitet 4. Rimski Šančevi - tip zemljišta: ČERNOZEM

*Red:* AUTOMORFNA ZEMLJIŠTA

*I KLASA:* Humusno – akumulativna zemljišta, A - C profila

*Tip:* Černozem (rus. černožjom – crna zemlja)

Geomorfološka celina: **bačka lesna terasa**

Nadmorska visina: **85 m**

Geografska širina: 7408981, Geografska dužina: 5021249

Černozem je zemljište aridnih do semi-aridnih stepskih oblasti. Obrazuje se na karbonatnim, ilovastim, a ređe i peskovitim rastresitim supstratima. Boja humusnog horizonta je tamno smeđa, ima dobro izraženu zrnastu strukturu, a česti karakteristični dijagnostički znaci su krotovine (napušteni hodnici stepskih životinjica) i pseudomicelije (talozi kalcijum karbonata).

U profilu černozema pored moličnog horizonta, čija dubina iznosi 40-80 cm, uvek je obrazovan i prelazni AC horizont, debljine 20-40 cm. Humusni horizont ima tamnosmeđu do crnu boju i vrlo dobro izraženu zrnastu strukturu. U prelaznom AC horizontu vrši se iluvijalna akumulacija  $\text{CaCO}_3$  i to u obliku sitnih igličastih kristala, pseudomicelija. Ilovasta tekstura, zajedno sa zrnastom strukturom, daje ovim zemljištima izuzetno povoljne fizičke osobine. Poroznost u našim černozemima se kreće oko 50%, zbog toga imaju povoljan poljski vodni kapacitet 35-40%, kao i vazdušni kapacitet 15-20%.

Ispitivan je černozem na lokalitetu Rimski Šančevi, koji spada u podtip černozema na lesu i lesolikim sedimentima, karbonatnom varijetetu, srednje dubokoj formi, (Slika 15.). Karakterističan pedogenetski proces černozema je sinteza i akumulacija humusa, te formiranje humusnog A horizonta različite moćnosti.

Unutrašnja morfologija profila černozema na ovom lokalitetu, (Slika 16.) se odlikuje sledećim horizontima:

**Amo<sub>p</sub> (0-31 cm) oranični horizont moličnog humusno-akumulativnog horizonta**, mutno žuto smeđe boje (10YR 5/3) u suvom stanju, a smeđe crne (10YR 3/2) u vlažnom stanju, karbonatan, ilovasta glina, sitnozrnasto mrvičaste structure, rastresit, jako prožet korenima. Prelazi oštro u Amo<sub>h</sub> horizont.

**Amo (31-62 cm), podoranični pothorizont moličnog humusno-akumulativnog horizonta**, mutno žuto smeđe boje (10YR 5/3) u suvom stanju, a smeđe crne (10YR 3/2) u vlažnom stanju, ilovasta glina, sitnozrnasto mrvičaste structure, malo zbijeniji u odnosu na Amo,p prožet korenima, postupno prelazi u ACca prelazni horizont.

**ACca (62-95 cm)**, prelazni horizont, žuto smeđe boje (2,5Y 5/4) u suvom stanju, a tamno smeđe (2,5Y 3/3) u vlažnom stanju, karbonatan, ilovasta glina, zrnaste strukture, sa pseudomicelijama.

**Cca (95-200 cm), matični supstrat – terasni les**, svetlo žute boje (2,5Y 7/4) u suvom stanju, a žuto smeđe u vlažnom stanju, jako karbonatan, ilovasta glina, neizražene strukture.

Ispitivani černozezem odlikuje se bazičnom pH vrednošću u vodi i iznosi 8.11 , sadržaj humusa iznosi 2.78%, a količina ukupnog azota 0,18 % (Tabela 5.).



Slika 15. Spoljašnja morfologija černozezem, lokalitet Rimski Šančevi (foto: O. Fojkar)



Slika 16. Unutrašnja morfologija černozezem, lokalitet Rimski Šančevi

**Lokalitet 5. NP Fruška gora - tip zemljišta: GAJNJAČA (eutrični kambisol, eutrično smeđe zemljište)**

**Red: AUTOMORFNA ZEMLJIŠTA**

**III Klasa: Kambična zemljišta, A-(B)-C ili A-(B)-R profila**

**Tip: Eutrični kambisol**

Geomorfološka celina: **planina Fruška gora**

Nadmorska visina: **520 m**

Geografska širina: 7409155, Geografska dužina: 5001830

Zemljišta iz ove klase nastaju evolucijom humusno-akumulativnih zemljišta i karakterišu se kambičnim (B) horizontom. *Cambio* – na latinskom znači izmeniti, koji se formira u središnjem delu profila. U ovom horizontu se odvijaju procesi transformacije i naleže na rastresiti supstrat – C ili na kompaktnu stenu – R.

Kambični horizont se obrazuje kod starijih zemljišta sa dubljim solumom u kojima hidrotermički elementi pogoduju transformaciji mineralnog dela. Raspadanjem primarnih alumosilikata oslobađaju se alumosilikati i baze kao produkti raspadanja koji su gradivni elementi u sintezi sekundarnih minerala glina (argilosinteza, lat.*argilla* = glina). Formirani (B) horizont se karakteriše povećanim sadržajem gline, a oslobođeni oksidi i hidroksidi gvožđa u procesu transformacije primarnih alumosilikata se adsorbuje na površinu minerala gline, dajući im žućkastu, smeđu, riđu, crvenkastu, crvenu boju.

U Srbiji se upotrebljava narodni naziv "gajnjača", zbog toga što se na ovom zemljištu često javljaju proređene listopadne šume - gajevi. Naziv eutrični kambisol označava zemljište dobro obezbeđeno bazama (eutrofno = zemljište bogato hranivima).

Na ovom lokalitetu od vegetacije dominiraju prirodne listopadne šume (hrast i grab), s velikim udelom travne vegetacije, (Slika 17.).





Slika 17. Spoljašnja morfologija gajnjače, eutričnog kambisola, lokalitet Iriški venac (foto: Fojkar O.)

Od pedogenetskih procesa prisutno je ogajnjačavanje – posmeđivanje, dugatrajan proces koji započinje ispiranjem karbonata, zatim baza, što dovodi do blagog zakišeljavanja.

Unutrašnja morfologija profila je obično: Amo - (B)v-C ili R. Po mehaničkom sastavu gajnjače su ilovaste do glinovito-ilovaste, a struktura je grašasta do orašasta, stabilna i obezbeđuje dobru prirodnu drenažu, Slika 18. Poroznost je oko 50%, a vodni kapacitet od 35 do 40%. Hemijska svojstva su takođe vrlo dobra. Zemljište je neutralno do slabo kisele reakcije, pH od 5.5 do 6.8, dok je na istraživanom lokalitetu pH nešto niži 5.22 . Gajnjača je stoga najkiselije od svih ispitivanih tipova zemljišta. Ovakvu povećanu kiselost ima distrični kambisol, pa ovi rezultati možda govore da se ne radi o tipičnoj gajnjači. Gajnjače sadrže od 2 do 6% humusa, a u našem slučaju je procenat humusa iznosio 1.83.

Visok sadržaj slobodnog gvožđa u svim eutričnim smeđim zemljištima može dovesti do imobilizacije fosfora. Takav je slučaj i kod ove ispitivane gajnjače gde sadržaj  $P_2O_5$  u A horizontu iznosi svega 1.14 mg/100g zemljišta, što je najmanja količina u odnosu na ostala ispitivana zemljišta (Tabela 5.).



Slika 18. Unutrašnja morfologija gajnjače, eutričnog kambisola, lokalitet Iriški Venac

#### **Lokalitet 6. Kačka šuma - tip zemljišta: FLUVISOL**

**Red: HIDROMORFNA ZEMLJIŠTA**

**Klasa: Nerazvijena zemljišta, (A)-I-II ili (A)-G ili (A)-C profila**

**Tip: Fluvisol**

Geomorfološka celina: **aluvijalna ravan Dunava**, središnja zona poloja

Nadmorska visina: **84 m**

Geografska širina: 7414206, Geografska dužina: 5016779

**Fluvisol** nastaje duž vodotoka svih naših reka (Dunava, Save, Tise ) u priobalnoj zoni poloja, u kojoj poplavne vode talože materijal. Prema proceni u Srbiji ih ima oko 500.000 ha ovog tipa zemljišta. Geneza fluvisola i njihova svojstva uslovljena su hidrološkim režimom reke i prirodom materijala koji se taloži. Usled česte promenljivosti uslova taloženja i intenziteta poplava, profil fluvisola se karakteriše izraženom slojevitošću.





Slika 19. Spoljašnja morfologija fluvisola, lokalitet Kačka šuma (foto: Fojkar O.)

Ispitan je fluvisol na lokalitetu Kačka šuma, na kome se nalaze veštački zasadi crne topole (*Populus nigra*) i euroameričke crne topole, *Populus euroamericana*, (Slika 19.).

Unutrašnja morfologija profila fluvisola na lokalitetu Kačka šuma, Slika 20, je:

**Amo,p (0-31cm), molični i oranični humusno-akumulativni horizont**, tamno žute boje u suvom stanju (2,5Y 6-3), a maslinasto smeđe u vlažnom stanju (2,5 Y 4-3), jako karbonatan, ilovača krupnozrnaste strukture, prožet korenom, prelazi postupno i neravno u Sloj I.

**Sloj I (31-62 cm), aluvijalni nanos**, svetlo žute boje u suvom stanju (2,5 Y 7-3), a maksimalno smeđe u vlažnom (2,5 Y 4-3), jako karbonatan, sitno peskovita ilovača, drobljive grudvičaste strukture, prelazi oštro i ravno u Sloj II.

**Sloj II (62-80 cm), aluvijalni nanos**, sivo smeđasti ilovasti pesak, karbonatan, pun korenja, oštro prelazi u Sloj III.

**Sloj III (80-112 cm), aluvijalni nanos**, sivi pesak, karbonatan, suv, korenje prolazi, oštro prelazi u Sloj IV.

**Sloj IV (112-136 cm), aluvijalni nanos**, ugasito sivi pesak, karbonatan, vlažan pod uticajem podzemne vode, pun korenja, oštro prelazi u Sloj V.

**Sloj V Gso (136-148 cm), aluvijalni nanos**, sivosmeđasta peskovita ilovača, karbonatan, zahvaćena oksido redukcionim procesima, vlažan, sa brojnim finim korenjem, oštro prelazi u Sloj VI.

**Sloj VI Gso (148-200 cm), aluvijalni nanos**, tamno sivi pesak, karbonatan, jako vlažan, sa znacima intenzivnih oksido-redukcionih procesa, korenje dopire i do ove dubine, Hadžić (1997.).



Slika 20. Unutrašnja morfologija profila fluvisola, lokalitet Kačka šuma (foto: Fojkar O.)

Tipično za morfologiju fluvisola je postojanje raznovrsnih slojeva koji se obeležavaju rimskim brojevima. Fizička i hemijska svojstva fluvisola variraju od sloja do sloja, tako da se ne može govoriti o nekim tipičnim svojstvima (Ćirić, 1989). Većina naših fluvisola su karbonatni, a ispitivani fluvisol sadrži 10,20%  $\text{CaCO}_3$ , što je druga po količini najveća količina  $\text{CaCO}_3$  u ispitivanim zemljištima. Količina humusa je mala i ne prelazi 1.54% u A horizontu, a količina azota je srednja i iznosi 0,1%N. Ovaj fluvisol se odlikuje i slabo alkalnom reakcijom pH vrednost u vodi iznosi 7,64.

#### **Lokalitet 7. SRP Koviljsko petrovaradinski rit - tip zemljišta: FLUVISOL**

**Red: HIDROMORFNA ZEMLJIŠTA**

**Klasa: Nerazvijena zemljišta, (A)-I-II ili (A)-G ili (A)-C profila**

**Tip: Fluvisol**

Geomorfološka celina: **aluvijalna ravan Dunava**, priobalna plavna zona poloja

Nadmorska visina: 84 m

Geografska širina: 7423131, Geografska dužina: 5007724

SRP „Koviljsko-petrovaradinski rit“ predstavlja najveći očuvani ritski kompleks, koji se nalazi na levoj i desnoj obali reke Dunav, na njegovom srednjem toku kroz Srbiju (rečnog km 1225-1250), Slika 21. Rezervat zahvata prostrano inundaciono područje reke Dunav pored naselja Kovilj i Petrovaradin po kojima je i dobio ime. Predstavlja jasno omeđen i kompaktan ritski kompleks koji se celom površinom nalazi u plavnom području reke Dunav (nebranjani deo). Rezervat se sastoji od dve odvojene celine koje povezuje tok reke Dunav: Petrovaradinski i Koviljski rit.

Osnovne karakteristike SRP Koviljsko-petrovaradinskog rita su očuvanost i raznovrsnost izvornih orografskih i hidrogrfskih oblika kao što su: rečne ade, stari vodeni rukavci, dunavci, meandri, pliče i dublje depresije i bare, kao i obalske grede nastali erozivnim i akumulativnim procesima. Na ovim prostorima su očuvana plavna područja sa ritskim šumama hrasta lužnjaka, jasena i veza, crne i bele topole, bele vrbe, zatim vlažnih livada, zajednica oštrica, belog i žutog lokvanja, vodenog oraška i dr. O bogatstvu flore govori i zabeleženih 443 taksona viših biljaka. Vrste značajne za zaštitu vodenih staništa: *Salvinia natans*– nepačka, *Callitriche palustris*-vodena bradica, *Numphar luteum*-žuti lokvanj, *Nymphaea alba*-beli lokvanj, *Trapa natans* agg.-vodeni orašak, *Utricularia australis*-mešinka, semiakvatičnih i muljevitih staništa: *Acorus calamus*-iđirot, *Marsilea quadrifolia*-raznorotka, *Cyperus glomeratus*-šilj gronjasti idr.

SRP „Koviljsko-petrovaradinski rit“ je skoro u celosti pod stalnim dejstvom poplavnih i podzemnih voda. Geološka podloga rita je aluvijalni nanos. Zemljište na ovoj podlozi je genetski nerazvijeno zbog stalnog dejstva podzemnih voda Dunava koje povremenim naizmeničnim nanošenjem i odnošenjem supstrata ne omogućuje pedogenetske procese. Po svim karakteristikama zemljište u SRP „Koviljsko-petrovaradinski rit“ je tipično za aluvijalna područja srednjeg toka Dunava.

Recentni aluvijalni nanos je različitog mehaničkog sastava. Po pravilu, na višim i priobalnim terenima uz korito preovlađuje pesak, a na nižim i terenima bližim odbrambenom nasipu tj. udaljenijim od obale korita Dunava preovlađuje mulj. Između ovih krajnosti nalaze se, u različitim odnosima, naizmenično nataloženi nanosi peska i mulja. Hemijske osobine



recentnog aluvijuma su povoljne za razvoj vegetacije. Ova zemljišta uglavnom su karbonatna, neutralne do slabo alkalne reakcije. Uslovi humifikacije i mineralizacije, osim u zabarenim terenima, su povoljni, a time i ishrana bilja mineralima. Stalno nanošenje novih fertilnih nanosa na iscrpljene, čini ovo zemljište pogodnim za razvoj bujne ritske vegetacije, naročito ritskih šuma. Na visokim gredama, gde je nanošenje i odnošenje zemljišnog supstrata minimalno, zapažaju se počeci pedogenetskih procesa, (Panjković i Stanišić, 2010).



Slika 21. Spoljašnja morfologija fluvisola, lokalitet SRP Koviljsko petrovaradinski rit: a) lokacija Šlajz kod sela Kovilj , b) plavne šume bele vrbe, c) sasušene končaste vodene alge nakon poplave, d) rad na terenu (foto: Fojkar O.)

Ispitivani fluvisol u SRP “Koviljsko petrovaradinskom ritu” ima manju količinu karbonata u odnosu na fluvisol na lokalitetu Kačka šuma, i iznosi 6.80 %  $\text{CaCO}_3$ . Količina humusa iznosi 2.32% u A horizontu, a količina azota je srednja i iznosi 0,15% N. Ovaj fluvisol se odlikuje i blago alkalnom reakcijom, pH vrednost u vodi iznosi 7,34.

**Lokalitet 8. Bečej - tip zemljišta: RITSKA CRNICA (humoglej)****Red: HIDROMORFNA ZEMLJIŠTA****Klasa: Fluvijatilnih i fluvioglejnih zemljišta, A-G profila****Tip: Ritska crnica (humoglej)**Geomorfološka celina: **aluvijalna ravan Tise**, priterasna zona poloja

Nadmorska visina: 87 m

Geografska širina: 7429296, Geografska dužina: 5049027

Ispitivano zemljište na lokalitetu Bečej, na lokaciji Gornji rit je udaljeno oko 1200 metara od korita reke Tise. Geomorfološki gledano spada u aluvijalnu ravan Tise, priterasna zona poloja. Ritska crnica (humoglej) spada u razdeo hidromorfnih zemljišta, klasu fluvijatilnih i fluvioglejnih zemljišta. Građa profila je A-G, tip humoglej, podtip nekarbonatni, vertični, slabozaslanjen i alkalizovan, glinaste forme, Slika 22.

Sinteza hidromorfnog humusa u moćnom A horizontu, u uslovima suficita vlage u većem delu godine i bujne hidrofitne vegetacije, predstavlja prvi tipski process humogleja. Drugi tipični pedogenetski process je oglejavanje u zoni oscilacije nivoa podzemne vode.

Unutrašnja morfologija profila ritske crnice na ovom lokalitetu odlikuje se postojanjem sledećih horizonata, Slika 23. :

**Aa,vt,p (0-21 cm), oranični pothorizont humusno akumulativnog horizonta**, tamnosivo žute boje (2,5 Y 5-2) u suvom stanju, a smeđe crne (2,5 Y 3-2) u vlažnom stanju, teška glina, beskarbonatna, sitnogrudvaste strukture, jako prožet korenom, prelazi u Aa,vt podoranični pothorizont.

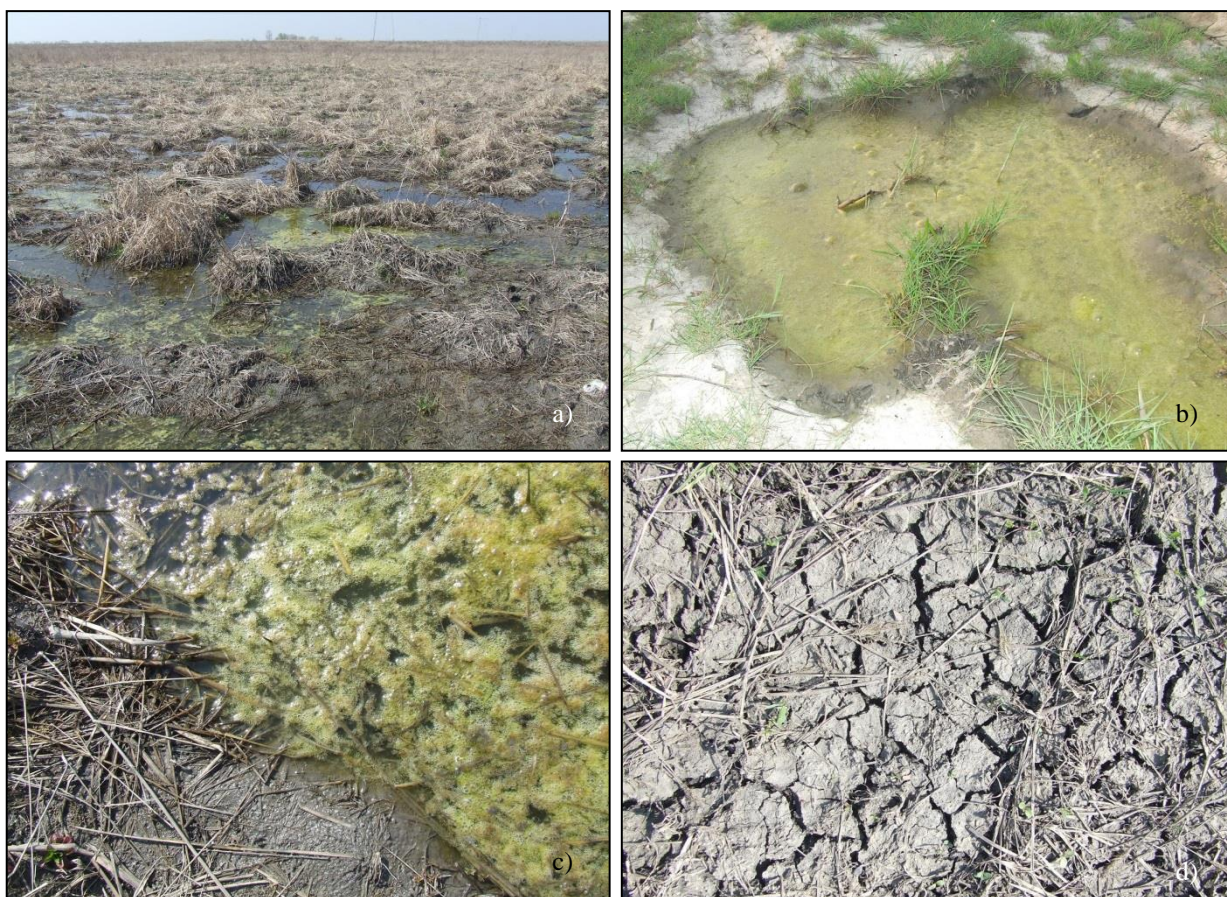
**Aa,vt (21-91 cm), podoranični pothorizont humusno – akumulativnog horizonta**, žuto sive boje (2,5 Y 4-1 ) u suvom stanju, a smeđe crne (2,5 Y 3-1) u vlažnom stanju, teška glina, beskarbonatna, srednje-prizmatične structure, zbijeniji u odnosu na Aa,vt,p prožet korenom, prelazi postupno u AGso prelazni horizont.

**AGso (91-134 cm), prelazni horizont**, svetlo žućkasto smeđe boje (2,5 Y 4-4) u vlažnom stanju, ilovasta glina, beskarbonatna, srednje prizmatične structure, sa znacima oglejavanja (rdaste mazotine) prelazi u Gr,so glejni horizont.



**Gr,so (134-184 cm) glejni horizont**, tamno žute boje (2,5 Y 6-4) u suvom stanju, a smeđe (2,5 Y 4-4) u vlažnom stanju, ilovasta glina, beskarbonatna, sa znacima oglejavanja (sivo-zelenkaste i plavičaste mikrozone i rđaste mazotine), podzemna voda na dubini od 184 cm.

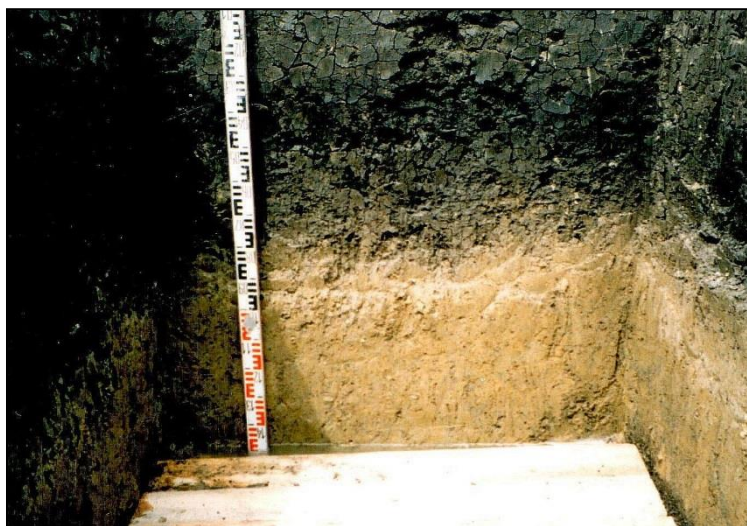
**Gr (184-200 cm) glejni horizont**, tamno žute boje (2,5 Y 6-3) u suvom stanju, a maslinasto smeđe (2,5 Y 4-2) u vlažnom stanju, peskovito – glinovita ilovača, slabo karbonatna, sa znacima oglejavanja (sivo-zelenkaste i plavičaste mikrozone), (Hadžić et al., 1997).



Slika 22. Spoljašnja morfologija ritske crnice lokalitet Bečej: a) nakupljanje atmosfere vode na površini ritske crnice, b,c) “cvetanje” zemljišta – razvoj algi u lokalnim barama, d) ispucao površinski sloj zemljišta tokom sušnog perioda (foto: Fojkar O.)

Težak mehanički sastav ritske crnice, visok udeo čestica manjih od 0,002 mm nepovoljno se odražava i na ostala vodno-fizička svojstva zemljišta. Pri jačem vlaženju struktura se gubi, zemljište je lepljivo i teško za obradu, a u suvom stanju od površine se javljaju pukotine, usled naizmeničnog bubrenja i kontrakcije.

Ova ritska crnica se odlikuje najnižim sadržajem  $\text{CaCO}_3$  u odnosu na sva druga ispitivana zemljišta (2,55%), srednjim sadržajem humusa 3.63%, kiselom reakcijom, pH vrednost u vodi iznosi 5,46 i visokim sadržajem azota (0,24%N) i kalijuma ( $\text{Al-K}_2\text{O}$  33,52 mg/100 g). Ritska crnica kod Bečeja je, prema našim zapažanjima, veoma glinovita i u kišnim periodima i periodima visokih podzemnih voda velikim delom prekrivena vodom.



Slika 23. Unutrašnja morfologija ritske crnice, lokalitet Bečej

#### **Lokalitet 9. SRP „Carska bara“ - tip zemljišta: RITSKA CRNICA (humoglej)**

**Red: HIDROMORFNA ZEMLJIŠTA**

**Klasa: Fluvijatilnih i fluvioglejnih zemljišta, A-G profila**

**Tip: Ritska crnica (humoglej)**

Geomorfološka celina: **aluvijalna ravan Begeja,**

Nadmorska visina: **81 m**

Geografska širina: 7453901, Geografska dužina: 5015089

Ispitivano zemljište na lokalitetu SRP „Carska bara“, nalazi se na lokaciji Botoški rit koji je na teritoriji K.O. Belo Blato, Slika 24. Ritska crnica (humoglej) spada u razdeo hidromorfnih zemljišta, a klasu fluvijatilnih i fluvioglejnih zemljišta, građe profila je A-G, tip humoglej.





Slika 24. Spoljašnja morfologija ritske crnice lokalitet SRP “Carska bara“ (foto: Fojkar O.)

Specijalni rezervat prirode “Carska bara” sada obuhvata 4726 ha. Prva zaštita dela ovog područja uspostavljena je još 1955. godine, kada je “Vojtina mlaka” proglašena za predeo izuzetnih prirodnih lepota. Prema klasifikaciji Međunarodne unije za zaštitu prirode IUCN potpada u IV kategoriju – Područja upravljanja staništima i vrstama (Habitat and species management area). Ovo područje je 1996.godine proglašeno i za Ramsarsko područje, močvarno područje izuzetnih prirodnih vrednosti, odnosno vlažno stanište od međunarodnog značaja.

Specijalni rezervat prirode “Carska bara” obuhvata ostatak nekadašnjeg plavnog područja duž donjeg toka reke Begej, sa očuvanim i raznovrsnim orografskim i hidrografskim ritskim oblicima i pojavama. Predstavlja kompleks - mozaik barsko - močvarnih, šumskih, livadskih, stepskih i slatinskih ekosistema sa raznovrsnim i bogatim živim svetom i staništima mnogih endemskih, subendemskih, reliktnih vrsta panonskog prostora.

Prirodne vrednosti Specijalnog rezervata prirode “Carska bara” visoko su ocenjene zbog postojanja oko 500 biljnih vrsta, 239 vrsta ptica (od kojih se svih osam evropskih vrsta čaplji



gnezde na ovom prostoru), 20 vrsta riba, kao i 30 vrsta sisara retkih za ovo područje (vidra, tekunica, šumska-mrka voluharica, divlja mačka i dr.), a od posebnog značaja su i ribnjačka jezera koja se nalaze između dva entiteta zaštićenog prirodnog dobra.

U geomorfološkom pogledu područje SRP «Carska bara» pripada aluvijalnoj ravni Tise. Posmatrajući teren od reke Tise ka banatskoj lesnoj terasi, aluvijalna ravan Tise idući od severa ka jugu ima nekoliko suženja i nekoliko proširenja (krstursko-novokneževačko, padejsko-novobečejsko, novobečejsko-aradacko i proširenje između Aradca i Perleza). Predmet geomorfološkog razmatranja je četvrto proširenje u kome je smešteno prirodno dobro, (Pil et al., 2010).

Područje Specijalnog rezervata prirode «Carska bara» sa širim okruženjem nalazi se u međurečju Tise i Begeja. Pored pomenutih reka prisutan je veći broj hidroloških objekata (jezera, bara i močvara) koji ovom prostoru daju poseban ambijent, a ujedno imaju i značajan uticaj na živi svet prirodnog dobra.

Ispitivana ritska crnica nastala je prevlaživanjem zemljišta, podzemnom i površinskom vodom. Po mehaničkom sastavu, ritske crnice su teška glinovita zemljišta. Ova ritska crnica se odlikuje najvećim sadržajem humusa od svih ispitivanih zemljišta i iznosi 3,96%, a takođe se odlikuje i najvećim sadržajem prisutnog azota 0,26% i sadržajem ugljenika 2,30%C. Zemljište se odlikuje slabo alkalnom reakcijom koja u vodi iznosi pH 7,59.

#### **Lokalitet 10. Kumane - tip zemljišta: SOLONJEC**

(ruski sol – so, deminutiv sufiks-ec)

**Red: HALOMORFNA ZEMLJIŠTA**

**Klasa: Solonjeca unutrašnje građe profila A/E – Bta,na -C**

**Tip: Solonjec**, podtip tipični, nezasoljeni varijetet, srednje duboke forme.

Geomorfološka celina: **banatska lesna terasa,**

Nadmorska visina: 84 m

Geografska širina: 7437618, Geografska dužina: 5042327

Zemljište sa lokaliteta Kumane, pripada halomorfnom redu, klasi solonjeca unutrašnje građe profila **A/E – Bt,na –C**, tipu solonjec, podtipu tipični, nezasoljenom varijetetu i srednje dubokoj formi.

Istraživani lokalitet nalazi se neposredno pored Oglednog polja Kumane, Poljoprivrednog Fakulteta Departmana za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu i Naučnog Instituta za ratarstvo i povrtarstvo - Novi Sad, Slika 25.. Na ovom lokalitetu se nalaze prirodni pašnjaci na kojima dominira asocijacija halofita i mezofita (*Festuca pseudovina*, *Camphorosma ovata*, *Artemisia salina*, *Cynodon dactylon*, *Polygonum aviculare*).

Osnovna komponenta tipskog procesa obrazovanja solonjeca je alkalizacija, tj. adsorpcija  $\text{Na}^+$  jona iz rastvora u adsorptivni kompleks. Ovaj proces se u ispitivanom zemljištu dešava pod uticajem raslanjivanja u uslovima sniženog nivoa podzemne vode i povećane vlažnosti u jesenjem i zimskom periodu. Anjonska komponenta soli se ispira, a vodorastvorni  $\text{Na}^+$  joni se ispiraju. Opisani proces se odigrava u Bt,na horizontu.

Eluvijalno-iluvijalna unutrašnja descendentna migracija zemljišnih koloida je prateća komponenta i formiranje iluvijalnog B horizonta karakteristične stubaste strukture.

Unutrašnja morfologija profila solonjeca na lokalitetu Kumane, (Slika 26.):

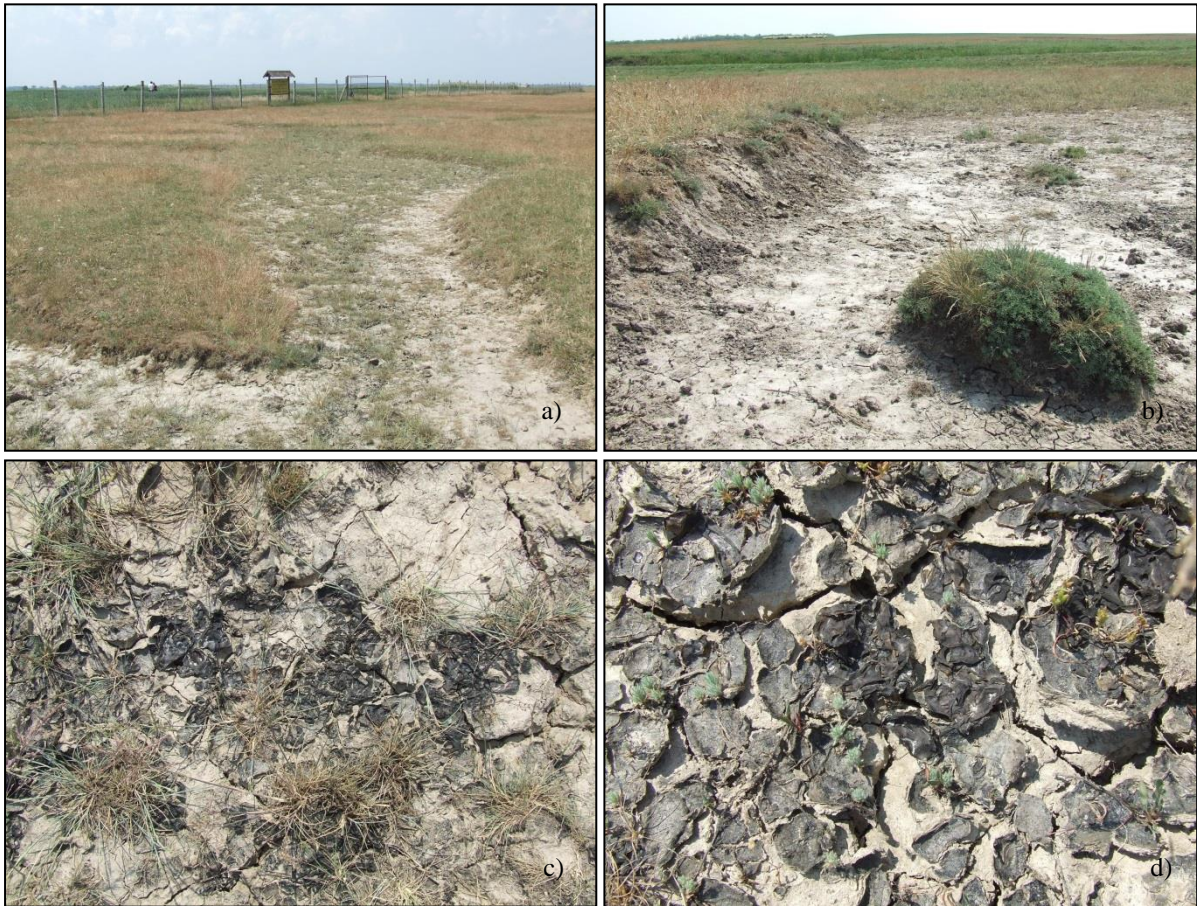
**Aoh,na/E (0/10cm)-ohrični humusno-akumulativni i eluvijalni horizont**, mutno žuto oranž boje (10YR 6/3) u vlažnom stanju, beskarbonatan, glinovita ilovača, sitnogrudvaste structure, rastresit, jako prožet korenom, prelazi oštro u **Bt,na** horizont.

**Bt,na (10/60cm) - argiluvični i natrični iluvijalni horizont**, tamno sive boje (2,5Y 5/2) u suvom stanju, a smeđe crne (2,5Y 3/2) u vlažnom stanju, beskarbonatan, teška glina, karakteristične stubaste strukture.

**Bt,na\*(60/104 cm) - argiluvični i natrični iluvijalni horizont**, sa dubinom se povećava sadržaj karbonata, te je manje kompaktan i svetlije boje.

**Bt,Cna\*(104/154 cm) – prelazni horizont**, mutno žute boje (2,5Y 5/2) u suvom stanju, a žuto sive (2,5Y 3/2) u vlažnom stanju, jako karbonatan, teška glina, sitnogrudvaste strukture.

**C\*(154/200 cm) matični supstrat – pretaložen les**, (Belić, 1999.).



Slika 25. Spoljašnja morfologija solonjeca, lokalitet Kumane: a) ogledno polje PF Novi Sad, b) mezogrede i mikrodepresije, c) d) listanje solonjeca i sasušene kolonije cijanobakterije *Nostoc sp.* (foto: Fojkar O.)



Slika 26. Unutrašnja morfologija profila solonjeca, lokalitet Kumane (foto Hadžić)

Solonjec se odlikuje teksturnom diferencijacijom između eluvijalnog i iluvijalnog horizonta. Povećani sadržaj koloida gline u Bt, na horizontu je posledica njihove descendentne migracije usled peptizacije pod uticajem adsorbovanih  $\text{Na}^+$  jona. Stubasta struktura svojstvena je samo solonjecu i nastala je uticajem  $\text{Na}^+$  jona na peptizaciju, bubrenje i kontrakciju akumulirane gline. Horizont B je vrlo kompaktan i zbijen u suvom stanju, a u vlažnom jako bubri i prouzrokuje vodonepropustljivost i slabu aeraciju. Pristupačna voda nalazi se u većoj meri u A/E horizontu.

Sadržaj humusa zavisi od vrste soli, sodni solonjeci imaju 1-2% humusa, a solonjeci s neutralnim solima mogu imati 2-6% humusa. Ispitivani solonjec sadrži 1,56% humusa u sloju do 30 cm. Količina ukupnog azota iznosi 0,1 N%, dok se procentualna zastupljenost C iznosi 0,9%. Odlikuje se i alkalnom sredinom koja u vodi iznosi pH 8.73 u Bt, na horizontu (Tabela 5.). Ovo je ujedno najalkalnije istraživano zemljište.

Za ovo zemljište bitno je napomenuti da se, gledano spolja, sastoji od mozaika mezogreda i mikrodepresija. Mezogrede su mikro uzvišenja, 30-50cm više od mikrodepresija. Iz mezogreda se ispire so i na njima je razvijena stepska vegetacija. So se taloži u mikrodepresije i na njima se može uočiti bela pokorica. U mikrodepresije obično nije razvijena vegetacija. U kišnim periodima ovo zemljište, naročito mikrodepresije, je prekriveno vodom koja zbog nepropusnog B horizonta ne može da prođe u dublje slojeve.

### **Lokalitet 11. SRP "Slano kopovo" - tip zemljišta: SOLONČAK**

**Red: HALOMORFNA ZEMLJIŠTA**

**Klasa: Akutno zaslanjena zemljišta** (sadrže najmanje 1% soli, ako je u pitanju hloridno i sulfatno zaslanjivanje ili 0,7 % ako je sodno zaslanjivanje, u bilo kom horizontu do 125 cm dubine)

**Tip: Solončak**, (naziv solončak je ruskog porekla i nastao je od ruske reči *sol* – so, i tatarske reči *čak* - mnogo (zemljište sa mnogo soli))

**Geomorfološka celina: aluvijalna ravan Tise,**

**Nadmorska visina: 84 m**

**Geografska širina: 7439239, Geografska dužina: 5052254**

U Srbiji su solončaci uglavnom zastupljeni u Vojvodini na oko 30.000 ha, i to u Bačkoj sa oko 25000 i Banatu oko 5000 ha. U svetu ima oko 260 miliona hektara. Slano kopovo predstavlja jednu od poslednjih očuvanih bara na slatinama Vojvodine, odnosno slanih jezera u paleo-meandrima. Slano kopovo je Tisin fosilni meandar, odnosno geomorfološki oblik postao radom rečne vode, što znači da pripada grupi rečnih ili fluvijatilnih jezera. Oblik kopova podseća na potkovicu, čiji kraci su okrenuti prema jugu. Istočna strana basena ima blag nagib, a iznad zapadne obale diže se dosta strmi odsek lesne terase Banata, relativne visine do 6 m, sa najvišom tačkom na Maslar humci 86,8m apsolutne visine. Prema severu i jugu se nastavlja suvo ili povremeno plavljeno dno fosilnog meandra. Istraživanja su pokazala da je dno pokriveno glinom i da ima veoma mali nagib, (Slika 27).

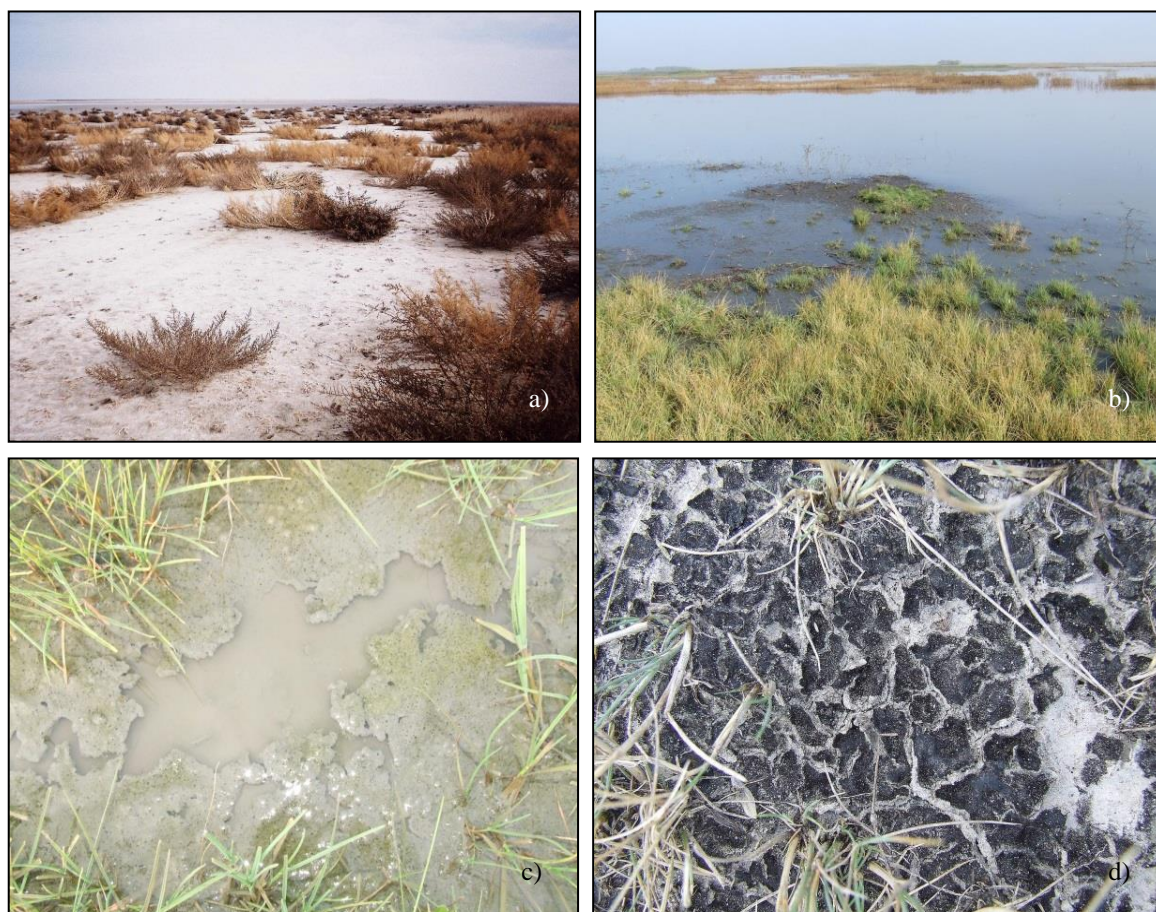
Slano kopovo je specifično po jedinstvenim panonskim ekosistemima tipičnim za slane, muljevite bare i njihovo povremeno isušene delove. Ovaj tip vodenih basena sve više nestaje širom Panonske nizije. Pečat Slanom kopovu daju očuvane specifične slatinske zajednice klase *Thero-Salicornietea* koje su u fazi iščezavanja. Razvijene na solončakastoj podlozi, izgrađene su od sukulentnih, i u manjoj meri polusukulentnih halofita, i pripadaju tipu izvornog biljnog pokrivača koji je već skoro nestao sa panonskog prostora. Tipične biljne vrste koje su prisutne su: jurčica, panonska jurčica, solnjača i druge i predstavljaju prave raritete, pa su mnoge i zakonom zaštićene, Pavkov (1999).

Ovo slano jezero predstavlja izuzetnu prirodnu vrednost i sa geomorfološkog, hidrološkog i mikroklimatskog aspekta. Pojačano isparavanje i povlačenje vode sa najnižih topografskih položaja dovodi do taloženja soli u slojevima debljine i nekoliko centimetara.

Na ovom solončaju je konstatovan duplo veći sadržaj soli (hlorida i sulfata) nego što je uobičajeno za ljute solončake u Vojvodini, što je rezultiralo pojavom neponovljivog biljnog sveta. Dok su bare bliže Tisi izrazito hloridne, dotle je Slano kopovo specifično kao sodno – sulfatni solončak, što je verovatno imalo za posledicu da je to jedini lokalitet u Vojvodini na kome raste jurčica. Sadržaj soli (hlorida i sulfata) u vodi Slanog kopova je 11-12 puta veći od uobičajene količine za solončake Vojvodine, a reakcija vode je izrazito bazična (pH 9,0-9,4). (Studija: SRP “Slano kopovo”, Zavod za zaštitu prirode Srbije, 1999.). U klimatskim uslovima aridnog i semiaridnog Banata, gde ukupno isparavanje prevazilazi ukupne padavine dolazi do uzlaznog toka podzemnih zasoljenih voda i taloženja soli na površinu tla. Zato je nakon



povlačenja soli Slano kopovo pod beličastom skramom debljine i nekoliko centimetara od “iscvetalih” kristala soli. Nataložena so daje području nestvaran polupustinjski izgled.



Slika 27. Spoljašnja morfologija solončaka, lokalitet Slano kopovo: a) u sušnom periodu, b) za vreme vlažnog perioda, visoke podzemne vode, c) ispucala pokorica, sol sa slojem modrozelenih algi d) cvetanje cijanobakterija za vreme vlažnog perioda (foto: Fojkar O.)

U svojoj doktorskoj disertaciji Vasin (2010) je ispitivao pedološki profil na lokalitetu Slano kopovo na koordinatama (GPS: 0439153 USR 5051829) na nadmorskoj visini od 81 m. Ističe da pedološki profil na ovom lokalitetu ima sledeću unutrašnju morfologiju profila:

**Aoh/Esa,na (0-8cm)** - složen ohrični humusno akumulativni i eluvialni saličan i natričan horizont. U stanju žuto smeđe boje (2,5Y 5-3) i tamno maslinasto smeđe boje (2.5Y 3-3) u vlažnom stanju. Po teksturi sitno peskovita ilovača, sitnoznaste i praškaste strukture, slabo karbonatan, prožet korenom i sa akumulacijom soli.

**Bt,sa,na (8-36 cm)** – iluvijalni, argiluvični, salični i natrični horizont. U suvom stanju maslinasto smeđe boje (2.5Y 4-3) i tamno maslinasto smeđe boje

(2,5Y 3-3) u vlažnom stanju. Po teksturi je ilovasta glina, vrlo tvrd i zbijen, stubaste strukture, slabo karbonatran, sa akumulacijom vodorastvorljivih soli.

**Bt,sa,naC (36-60 cm)** – prelazni horizont. U suvom stanju žuto smeđe boje (2.5Y 5-4) i maslinasto smeđe (2.5Y 4-4) u vlažnom stanju. Po teksturi teška glina, tvrd i zbijen, stubaste strukture, jako karbonatan, sa akumulacijom vodorastvorljivih soli i inkluzijama korena.

**Csa,naGso,r (60-83 cm)** - prelazni salični i natrični horizont – oglejeni matični supstrat. U suvom stanju svetlo žute boje (2.5Y 7-4) I mutno žute boje (2.5Y 6-4) u vlažnom stanju. Po teksturi je ilovasta glina, masivne structure, jako karbonatan, sa znacima sekundarne oksidacije (rdaste mazotine) i redukcije (sivo-zelenkaste I plavičaste mikrozone) I sa inkluzijama korena.

**Gso,r,na (83-140 cm)** – glejni horizont. U suvom stanju mutno žute boje (2.5Y 6-4) I žuto smeđe boje (2.5Y 5-4) u vlažnom stanju. Po teksturi je ilovasta glina, masivne strukture, jako karbonatan, sa znacima sekundarne oksidacije i redukcije.

Prema našim istraživanjima na osnovu hemijske analize možemo zaključiti da istraživani solončak ima alkalnu reakciju i u vodi pH iznosi 8.19. Sadržaj humusa i azota je veoma nizak, 1.27% humusa i 0.08%N. Niži sadržaj humusa i azota je utvrđen jedino u arenosolu u Deliblatskoj peščari. Sadržaj fosfora i kalijuma je relativno visok (AL-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 17.37 mg-100g, AL-K<sub>2</sub>O mg-100g).

## 6.2. BROJNOST MIKROORGANIZAMA U ISPITIVANIM TIPOVIMA ZEMLJIŠTA

### 6.2.1. Ukupna brojnost algi u zemljištima Vojvodine

Alge su eukariotski fototrofni mikroorganizmi. Veličina algi je različita i kreće se od nekoliko mikrometara, kod okruglih i štapićastih, pa do nekoliko metara kod filamentoznih. Bespolno se razmnožavaju fragmentacijom i deobom, apolno gametangijom. Sve alge u ćelijama imaju hloroplaste sa hlorofilom, a neke imaju i dopunske pigmente. Hlorofil i drugi pigmenti algama daju boju tako da one mogu biti zelene, smeđe, mrko-žute i crvene boje, (Jarak, 2013).

Alge su tipični stanovnici vodenih biotopa, mada su dosta široko rasprostranjene i izvan vodene sredine. Alge imaju izuzetnu ulogu u opštem ciklusu kruženja materije u kome se javljaju kao primarni organski producenti organske materije. S obzirom da poseduju hlorofil, sposobne su da vrše fotosintezu, tj da se hrane fotoautotrofno. Međutim, među algama se nalaze i organizmi koji se mogu ishranjivati miksotrofno i heterotrofno (Blaženčić, 1988).

Alge vode poreklo od nekih prokariotskih organizama koji su imali hlorofil i vršili fotosintezu pri kojoj se oslobađao kiseonik. Od takvih organizama, kao samostalna evolutivna grupa, pre oko tri milijardi godina izdvojile su se cijanobakterije (*Cyanobacteria* ili *Cyanophyta*). O njihovoj starosti ne govore samo paleontološki ostaci već i primitivna prokariotska organizacija, odsustvo polnog načina razmnožavanja, nepostojanje pokretnog stadijuma, prisustvo pigmenata iz grupe fikobilina, postojanje samo jednog hlorofila (a), potpuno odsustvo sterola i mureinska građa ćelijskog zida, (Blaženčić, 1988). Na osnovu morfoloških svojstava i boje alge su podeljene na: zelene alge (*Chlorophyta*), jednoćelijske zelene alge bez ćelijskog zida (*Euglenophyta*), zlatno-mrke alge (*Chrysophyta*), mrke (*Phaeophyta*), stenovite alge - pršljenčice (*Charophyta*), crvene alge (*Rhodophyta*), vatrene alge (*Pyrrrophyta*), (Jarak, 2013). Alge žive na površini ili u plitkom sloju zemljišta, a sa povećanjem dubine brojnost im opada iako se pojedine alge mogu naći i na dubini do 100 cm. Broj algi u zemljištu kreće se od 50000 do 100000 u jednom gramu apsolutno suvog zemljišta. U zemljištu su najvažnije zelene alge (*Chlorophyta*) i mrko-žute alge (*Chrysophyta*, podrazdeo *Bacillariophyta*).



Zemljišne alge su najčešće jednoćelijskih, kolonijalnih i višecelijskih končastih formi (Gollerbah i Ština, 1969). Broj algi i cijanobakterija koje naseljavaju zemljišta kreće se oko 2000 vrsta, a na prostorima bivšeg SSSR-a je determinisano u zemljištima oko 1218 vrsta. Najmnogobrojnije su cijanobakterije sa 403 vrste, od čega se masovno javlja 103 vrste. Prema ovim podacima vrste cijanobakterija su u zemljištima bivše Rusije zastupljene sa 33.08% u odnosu na broj ostalih vrsta algi. Prema broju vrsta dalje slede: zelene alge sa 373 vrste (masovno se javlja 78 vrsta), žuto-zelene 120 vrsta (31 masovna vrsta), dijatomeje 298 vrsta (20 masovnih vrsta), euglenofita 16 vrsta, zlatne alge 4 vrste i vatrene zastupljene sa 4 vrste (Gollerbah et al., 1969).

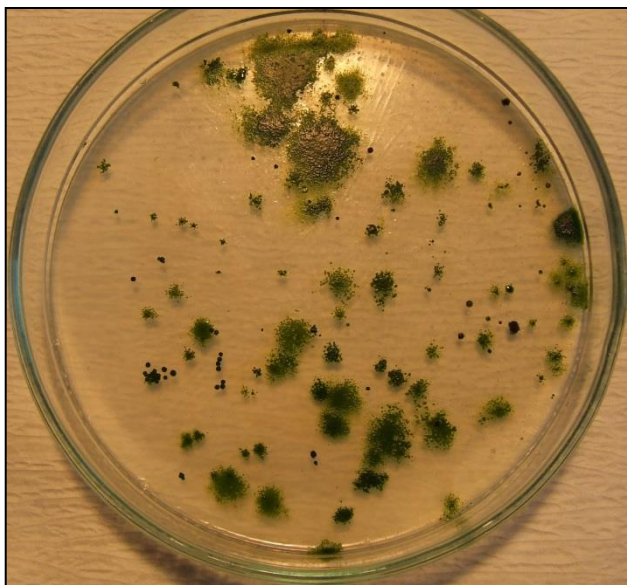
Istraživanja su pokazala da je ukupan broj algi veoma veliki kod hidromorfni i halomorfni zemljišta, a znatno manji kod automorfni zemljišta, (Grafikon 11 - 22.). U tabelama 6-9. su prikazani podaci statističke analize Fischerovim LSD testom homogenosti varijansi za ukupan broj algi u ispitivanim zemljištima, po sezonama za verovatnoću  $p=0,05$ .

### Ukupna brojnost algi u zavisnosti od tipa zemljišta

Fluvisol, na lokalitetu SRP Koviljsko petrovaradinski rit, je tip zemljišta koji u površinskom sloju ima najveći godišnji prosečan broj algi, 260794 jedinki po gramu zemljišta, (Grafikon 17 i 22.). Ovaj lokalitet se nalazi u nebranjenom delu reke, na aluvijalnoj ravani Dunava u priobalnoj plavnoj zoni poloja i izložen je visokim plavnim vodama reke. Najveći prosečan broj algi na ovom lokalitetu se upravo može tumačiti povećanom vlažnošću ovog zemljišta pod uticajem plavnih voda Dunava. Sem toga ovaj fluvisol se odlikuje i količinom humusa od 2.32% u A horizontu, i srednjom količinom azota od 0,15% N. Ovaj fluvisol se odlikuje i blago alkalnom reakcijom, pH vrednost u vodi iznosi 7,34 što povoljno utiče na razvoj algi. Fišerov LSD test homogenosti je pokazao da postoji statistički značajno veća razlika u ukupnoj brojnosti algi u zemljištu fluvisol na lokalitetu SRP Koviljsko petrovaradinski rit u odnosu na sva druga istraživana zemljišta za verovatnoću  $p=0,05$ .

Solončak, na lokalitetu SRP Slano Kopovo, u površinskom sloju ima drugu po vrednosti brojnost algi i ona u proseku iznosi 158539 jedinki po gramu zemljišta, (Grafikon 21 i 22.). Slano Kopovo predstavlja jednu od poslednjih očuvanih bara na slatinama Vojvodine, odnosno slanih jezera u paleo-meandrima. Ono je specifično po jedinstvenom panonskom ekosistemu

tipičnom za slane i muljevite bare i veliki deo godine je ovaj prostor prekriven podzemnom vodom koja pogoduje razvoju algi. Ovo zemljište se odlikuje i **Bt** iluvijalnim, argiluvičnim, saličnim i natričnim horizontom koje je po teksturi ilovasta glina, vrlo tvrda i zbijena i zadržava površinske padavine. Ovaj istraživani solončak ima alkalnu reakciju i u vodi pH iznosi 8.19. Bez obzira što je sadržaj humusa i azota veoma nizak, 1.27% humusa i 0.08%N, ovo zemljište se odlikuje velikim brojem ukupnih algi.



Černozem, na području Rimskih Šančeva, je treći lokalitet po ukupnoj brojnosti algi u površinskom sloju zemljišta, 135707 jedinki po gramu zemljišta, (Grafikon 14.). Ispitivani černozem takođe se odlikuje bazičnom pH vrednošću u vodi, iznosi 8.11, a sadržaj humusa i azota je takođe treći po visini u odnosu na druge tipove zemljišta, humus iznosi 2.78%, a količina ukupnog azota 0,18 %.

Slika 28. Ukupan broj algi na podlozi BG-11 (+N) černozem 0-5cm, Rimski Šančevi

Zatim sledi grupa zemljišta sa srednjom ukupnom brojnošću algi u koju spadaju: ritska crnica, Bečej (99468 jedinki), fluvisol, lokalitet Kačka šuma (88575 jedinki), ritska crnica, SRP Carska bara (80853 jedinki) i solonjec, kod Kumana sa (35116 jedinki), (Grafikon 22.).

Ritska crnica kod lokaliteta SRP "Carska bara" se odlikuje najvećom količinom humusa i najvećom količinom azota od svih ispitivanih tipova zemljišta, 3,96% humusa i 0,26% azota. Ritska crnica je tip zemljišta koji ima težak mehanički sastav, visok udeo čestica manjih od 0,002 mm nepovoljno se odražava i na ostala vodno-fizička svojstva zemljišta. Pri jačem vlaženju zemljište je lepljivo i teško za obradu, ali pogoduje razvoju algi. Tipovi zemljišta ritska crnica i halomorfna zemljišta se odlikuju specifičnim vodnim režimom koji u određenim periodima godine ili nakon kišnih perioda čine ova zemljišta prezasićna vodom, a što su idealni uslovi za razvoj algoflore.

Fluvisol na lokalitetu Kaćka šuma, u odnosu na fluvisol u SRP Koviljsko petrovaradsinski rit, nije više pod direktnim uticajem plavljenja Dunava pa je i ukupna brojnost algi manja nego na ovom lokalitetu.

U grupu sa veoma malom ukupnom brojnošću algi spadaju: regosol u SRP Titelski breg (31896 jedinki po gramu zemljišta), gajnjača, u NP Fruška gora (8415 jedinki po gramu zemljišta) i arenosol, u SRP "Deliblatska peščara" (7233 algi po gramu zemljišta).

Zemljište sa najnižom ukupnom brojnošću algi, u odnosu na sva ispitivana zemljišta je arenosol u PIO "Subotička peščara" i brojnost algi u površinskom sloju iznosi svega 6023 jedinice po gramu apsolutno suvog zemljišta, (Grafikon 11 - 22.).

Tip zemljišta arenosol, na oba ispitivana lokaliteta, je tip zemljišta koji ima najmanju prosečnu brojnost algi. Ovakav rezultat nije začuđujući pošto je arenosol tip zemljišta sa najnižim poljskim vodnim kapacitetom, a na lokalitetu u Deliblatskoj peščari se odlikuje i sa najmanjim sadržajem humusa 0.29% , azota 0.02 % , fosfata, kalijuma i ugljenika.

Fišerov LSD test homogenosti,  $p=0.05$ , pokazuje da postoji statistički značajna sličnost između ukupne brojnosti algi u arenosolu na ova dva lokaliteta tokom prolećnog, jesenjeg i zimskog perioda, ( Tabela 6 - 9.).

Automorfna zemljišta, arenosol, regosol i gajnjača, se odlikuju znatno manjim brojem ukupnih algi u odnosu na hidromorfna i halomorfna zemljišta. Gajnjača je tip zemljišta sa kiselom reakcijom, ima najnižu pH vrednost svega 5,22 te se mala brojnost algi u ovom zemljištu može time tumačiti.

Reakcija zemljišta je veoma značajna za rasprostranjenje algi. Najveće bogatstvo algi se pokazalo u zemljištima sa neutralnom pH vrednošću. U kiselim zemljištima uglavnom odsustvuju silikatne alge i cijanobakterije, a dominiraju zelene alge. U bazičnim zemljištima dominiraju cijanobakterije. Broj vrsta algi u kiselim zemljištima je upola manji nego u neutralnim zemljištima. Od zelenih algi u kiselim zemljištima dominiraju: *Volvocales* i *Chlorococcales*. Kisela zemljišta se odlikuju nedostatkom gvožđa, mangana i drugih gradivnih elemenata za alge, dok se bazna zemljišta odlikuju dostupnim kalcijumom, (Gollerbah et al., 1969).

Na rasprostranjenje algi utiče kako prisustvo dostupnih hranljivih materija tako i opšta koncentracija soli. Visoka koncentracija soli izražena je u slatinastim zemljištima, gde je pokazano da sa porastom zasoljenosti opada broj vrsta algi. Na slabo zasoljenim zemljištima, gde su soli koncentrisane na dubini od 10 cm, zapaženo je 11 vrsta algi, dok je na ljutim slatinama, gde soli leže na površini, zabeleženo svega tri vrste. Sastav algi međutim, ne zavisi samo od stepena nego i od hemizma zasoljenja. U mnogim slučajevima zasoljenost zemljišta deluje na populaciju algi posredno, preko razvijenosti viših biljaka. Tako na primer brojnost cijanobakterije *Nostoc commune* opada sa smanjenjem zasoljenosti zemljišta i odgovarajućim uvećanjem pokrivenosti zemljišta višim biljkama (Gollerbah et al., 1969).

### **Ukupna brojnost algi u zavisnosti od dubine pedološkog profila**

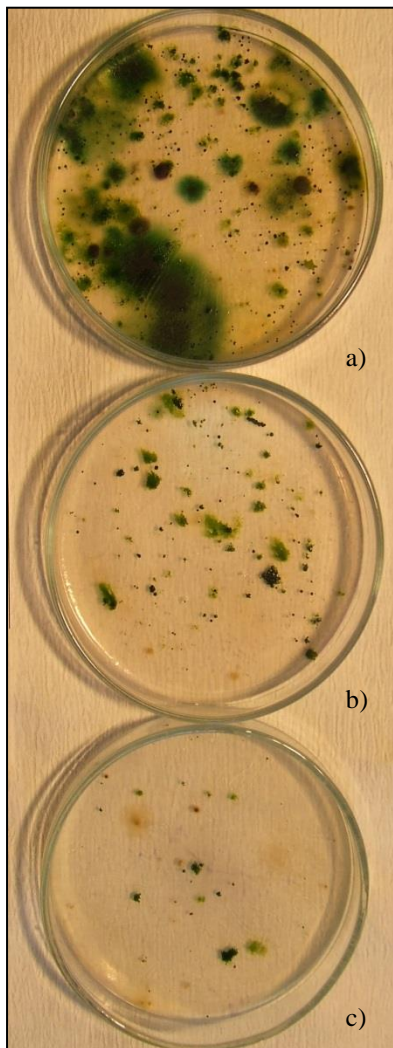
Kod svih ispitivanih tipova zemljišta ukupna brojnost algi je bila najveća u površinskom sloju zemljišta, 0-5 cm dubine, opadala je sa dubinom zemljišta i bila je najmanja u najdubljem sloju od 30 do 60 cm. Alge su fotoautotrofni organizmi i za svoj razvoj im je neophodna svetlost, stoga je sasvim razumljivo da je njihova brojnost najveća u površinskom sloju zemljišta. Alge ceđenjem vode dospevaju u dublje slojeve gde se kapsuliraju ili raspadaju i aktivno utiču na formiranje humusa. Međutim, neke alge imaju i mogućnost heterotrofnog načina ishrane pa mogu egzistirati i u uslovima slabog osvetljenja.

Fišerov LSD test homogenosti je pokazao da postoji statistički značajna razlika u ukupnom broju algi između površinskog i donjih ispitivanih slojevima zemljišta pri varijansi za vrednost od  $p=0.05$ . Najveća brojnost algi je bila u površinskom sloju svih zemljišta i statistički se razlikovala od brojnosti u dubljim slojevima od 5-30cm i 30-60 cm, (Tabela 6-9.).

U zavisnosti od prisustva vode u površinskom sloju zemlje, bilo da su u pitanju atmosferske padavine, visoke podzemne vode ili plavne vode, na pojedinim tipovima zemljišta uočili smo masovnu pojavu algi i formiranje modro-zelenog mikrobiološkog sloja, prevlake.

Najveća brojnost algi je zabeležena kod fluvisola u nebranjenoj, poplavnoj zoni SRP "Koviljsko petrovatradinskog rita" u površinskom sloju 0-5cm je iznosila 260794 jedinice po gr zemljišta, a u sloju 5-30cm brojnost algi je iznosila 53361 jedinku (što je 20,46% od površinske brojnosti), dok u najdubljem sloju od 30-60cm brojnost algi je iznosila svega 8003 jedinice po gr zemljišta (3,06% od površinske brojnosti), (Grafikoni 17 i 22.).

Zemljište sa drugom po redu ukupnom brojnošću algi je solončak u SRP “Slano Kopovo”, brojnost se u površinskom sloju kretala 158539 jedinki po gr. zemljišta, dok je u sloju od 5-30cm veoma opala i iznosila 12654 jedinice (7,98% u odnosu na površinsku brojnost), da bi u sloju od 30-60 cm iznosila svega 3339 jedinki (2,10% od površinske brojnosti), (Grafikon 21 - 22.).



Treći tip zemljišta po ukupnoj brojnosti algi je černo zem na lokalitetu Rimski Šančevi. Ukupna brojnost algi u površinskom sloju je iznosila 135707 algi po gramu zemljišta, a opala je na 27132 jedinice ( 19,99% od površinske brojnosti) u sloju od 5-30cm. U najdubljem ispitivanom sloju 30-60 cm brojnost algi je iznosila 4577 jedinki po gramu zemljišta (3,37% od površinskog broja), (Grafikon 14 i 22.).

Ritska crnica u Bečeju je četvrti lokalitet po ukupnoj brojnosti algi u površinskom sloju 0-5 cm brojnost je iznosila 99468 algi, a opala je na 30951 jedinku u sloju od 5-30 cm , što je 31,11% od površinske brojnosti. U sloju od 30 – 60 cm brojnost je pala na 2504 jedinice što je 2,51% od površinske brojnosti algi (Grafikon 18 i 22.).

Slika 29. Distribucija ukupnog broja algi po dubini zemljišta, a) 0-5 cm, b) 5-30 cm, c) 30-60cm, podloga BG-11 (+N), fluvisol, SRP Koviljsko-petrovaradinski rit

Peti i šesti lokalitet po ukupnoj brojnosti algi su fluvisol, Kaćka šuma, i ritska crnica, Carska bara. Kod fluvisola je brojnost algi sa 88575 jedinki u površinskom sloju opala na 25948 algi u sloju od 5-30 cm, što je 29,29% od površinske brojnosti. U najdubljem ispitivanom sloju brojnost algi je iznosila 7651 jedinku, 8,63% od površinske vrednosti (Grafikon 16 i 22.). Kod ritske crnice, Carskaq bara, je ukupan broj algi od površinskih 80853 jedinice pao na 16549 jedinice u sloju od 5-30cm (20,46% od površinske brojnosti). U sloju od 30-60cm brojnost je pala na 10331 algi po gramu zemljišta (12,77% od površinske brojnosti), (Grafikon 19 i 22. ).

Kod solonjeca kod Kumana je i u dubljim slojevima bila relativno bolja zastupljenost algi i u dubljim slojevima. Od 35116 algi u gramu površinskog sloja, broj je opao u sloju od 5-30cm na 14656 jedinki, ( 41,73% od površinskog broja). Dok je u sloju od 30-60 cm brojnost opala na 9523 jedinke, što je 27,11% od površinskog broja algi, (Grafikon 20 i 22.).

Kod regosola na Titelskom bregu, od površinskih 31896 algi po gramu zemljišta brojnost opada u sloju od 5-30 cm na 3357, što iznosi 10,52% od površinske brojnosti. U najdubljem sloju 30-60 cm broj algi je pao na 1084 što je 3,39% u odnosu na površinski sloj, (Grafikon 13 i 22.).

Kod gajnjače na Fruškoj gori je ukupna brojnost algi u sloju od 5-30 cm iznosila 1294 jedinki što je 15,37% od površinske vrednosti, a u sledećem sloju 30-60 cm je pala na 7,43% od početne vrednosti, (Grafikon 15 i 22.).

Kod arenosola u Deliblatskoj peščari, ukupna brojnost algi drastično opada sa dubinom. Od 7233 algi u površinskom sloju, broj opada na 701 algi (9,69%) u sloju od 5-30cm i na 291 algi (4,02%) u sloju od 30-60cm. Kod arenosola u Subotičkoj peščari površinska vrednost ukupnog broja algi iznosi 6023 jedinke po gramu zemljišta, a u sloju od 5-30cm brojnost opada na 1530 algi (25,40%), dok u sloju 30-60 cm brojnost iznosi 608 jedinki (10,09%),( Grafikon 11 i 22.).

Iz navedenih podataka se može videti da je solončak na lokalitetu Slano Kopovo tip zemljišta kod koga se najmanji broj algi može naći u dubljim slojevima zemljišta. Ovo se može tumačiti specifičnim mehaničkim sastavom solončaka i velikim koncentracijama soli koje on poseduje, a što ne pogoduje distribuciji i rasprostiranju algi. Ovaj solončak u sloju od 8-36 cm ima **Bt,sa,na** – iluvijalni, argiluvični, salični i natrični horizont koji je po teksturi ilovasta glina, vrlo tvrd i zbijen, stubaste strukture sa velikom akumulacijom vodorastvorljivih soli.

### Ukupna brojnost algi u zavisnosti od godišnjeg doba

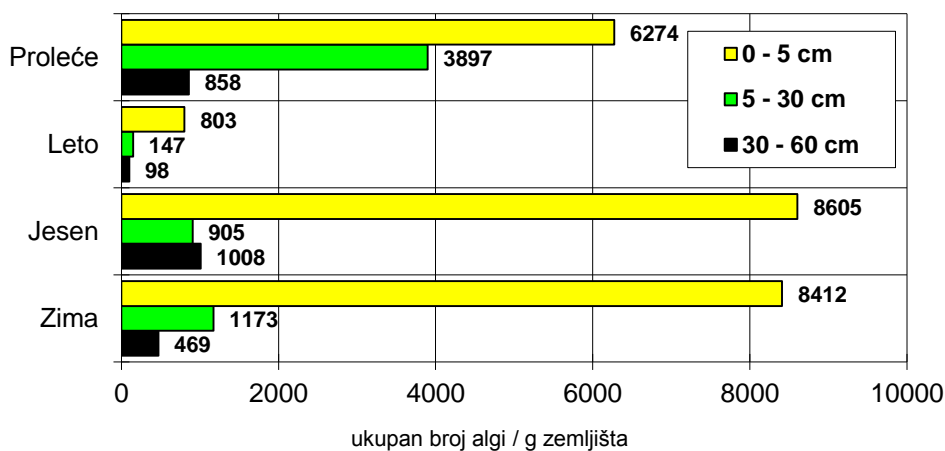
Ukupna brojnost algi je varirala u zavisnosti od godišnjeg doba, proleća, leta, jeseni i zime. Treba napomenuti da su znatno veća variranja brojnosti zabeležena u površinskom sloju zemljišta, a manja u dubljim slojevima.

Kod najvećeg broja ispitivanih zemljišta brojnost algi je bila najveća tokom jesenjeg i zimskog perioda. U jesenjem periodu ukupan broj algi je bio najveći kod sledeća četiri tipa zemljišta: arenosola (PIO "Subotička peščara"), černoze (Rimski Šančevi), fluvisola (SRP Koviljsko-petrovaradinski rit) i ritske crnice (SRP Carska bara).

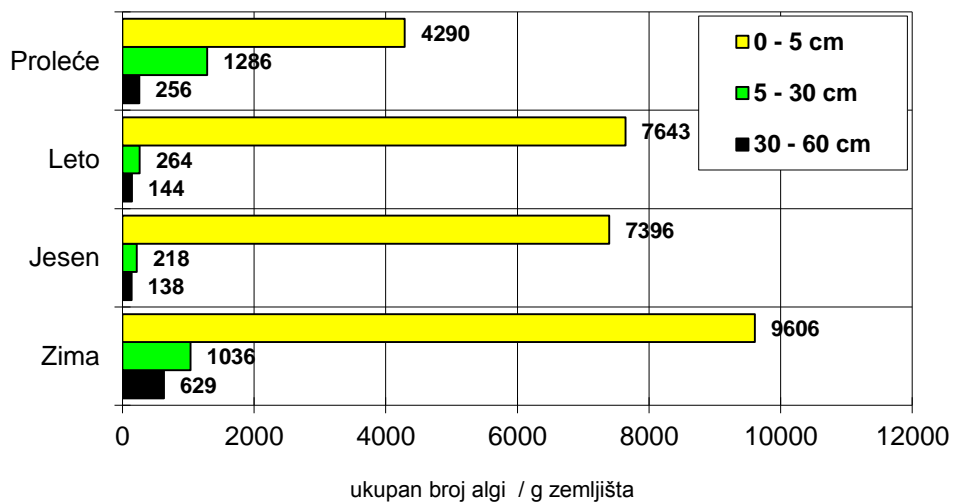
U zimskom periodu ukupan broj algi je bio najveći kod sledeća četiri tipa zemljišta: arenosola (SRP "Deliblatska peščara"), ritskoj crnici (Bečej), solonjeca (Kumane) i solončaka (SRP Slano Kopovo). U prolećnom periodu najveća brojnost ukupnih algi je zabeležena kod regosola (SRP "Titelski breg"), gajnjače (NP "Fruška gora") i fluvisola (Kačka šuma).

Najmanja ukupna brojnost algi je zabeležena u letnjem periodu i to kod sedam tipova zemljišta: arenosola (PIO "Subotička peščara"), černoze (Rimski Šančevi), gajnjače (NP "Fruška gora"), fluvisola (SRP "Koviljsko-petrovaradinski rit"), ritske crnice (Bečej), solonjeca (Kumane) i solončaka (SRP "Slano Kopovo").

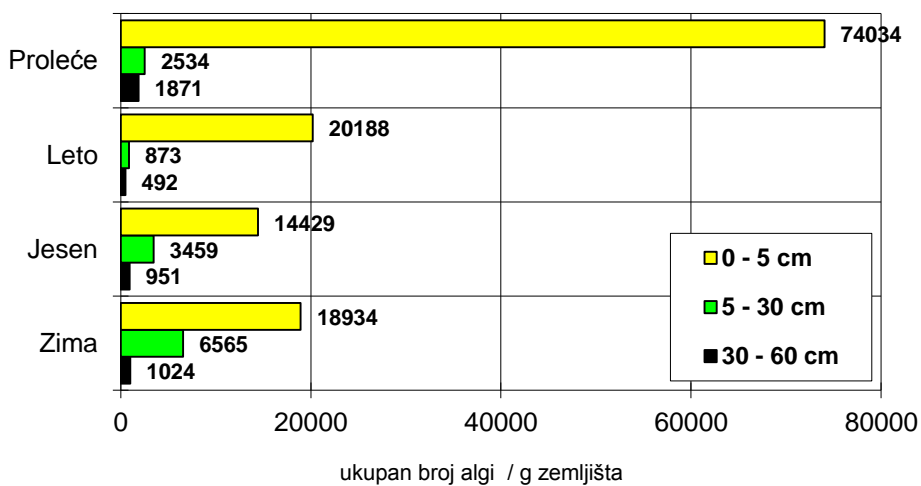
Vodni režim zemljišta je od presudnog značaja za rasprostranjenje algi u njemu. Optimalni uslovi za razvoj tipičnih zemljišnih algi se kreću od 60-80% od punog vodnog kapaciteta zemljišta. A optimalni vodni kapacitet zemljišta za azotifikaciju cijanobakterija se kreće od 80-100%. (Gollerbah et al., 1969). Iz grafikona koji se odnose na raspored srednjih mesečnih temperatura i srednjih mesečnih suma padavina (Grafikon 1 - 10.) može se zaključiti da su najviše temperature dominirale u letnjim periodima, a što je uticalo na isušivanje zemljišta a samim tim i na smanjenje ukupnog broja algi.



Graf. 11. Grafički prikaz ukupnog broja algi u arenosolu (PIO "Subotička peščara")

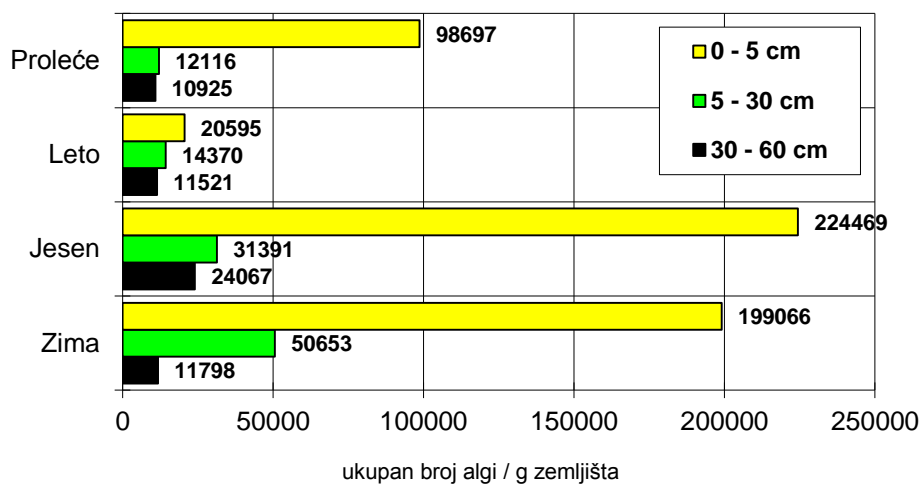


Graf. 12. Grafički prikaz ukupnog broja algi u arenosolu (SRP "Deliblatska peščara")

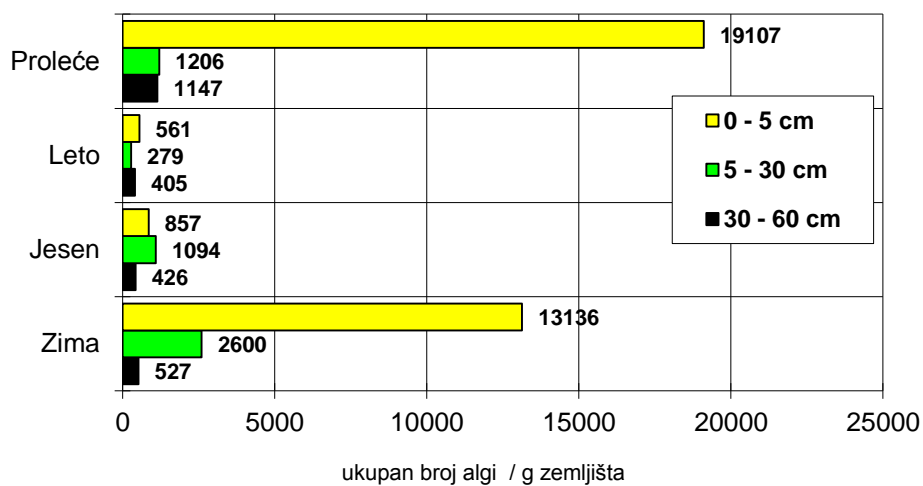


Graf. 13. Grafički prikaz ukupnog broja algi u regosolu (SRP "Titelski breg")

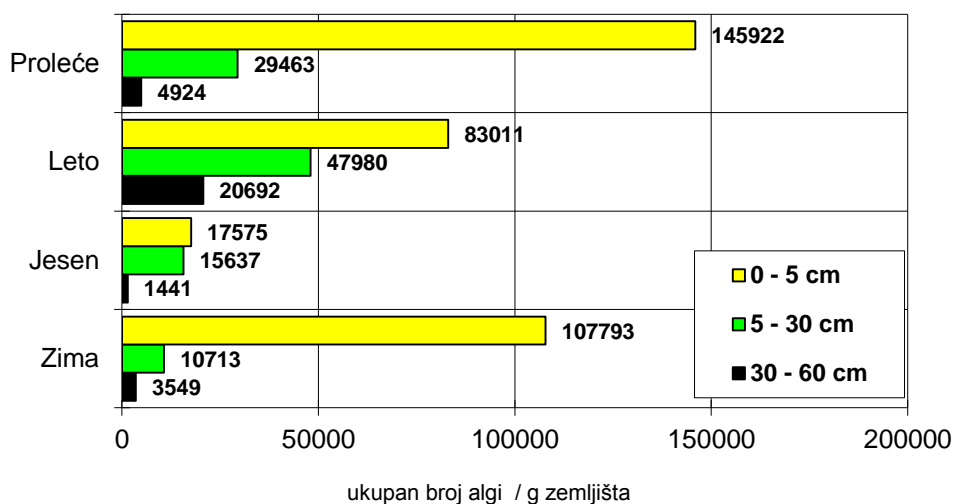




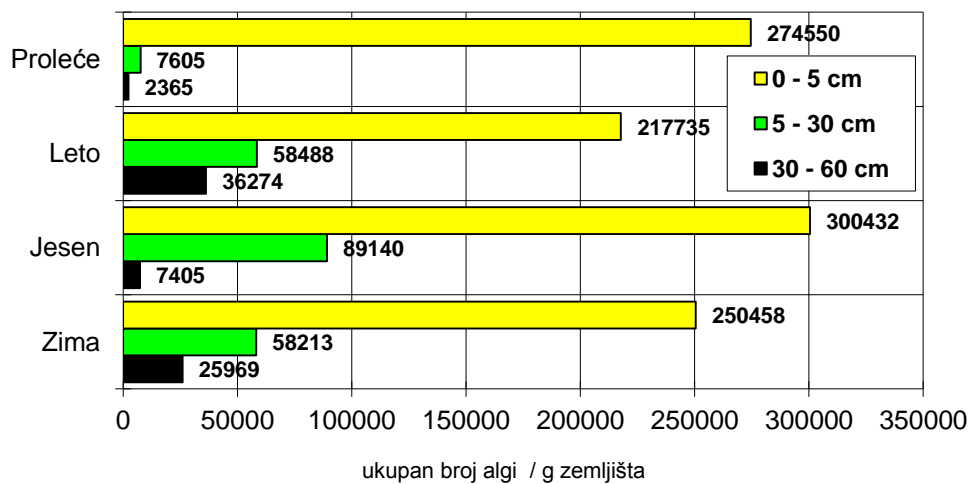
Graf. 14. Grafički prikaz ukupnog broja algi u černozeu (Rimski Šančevi)



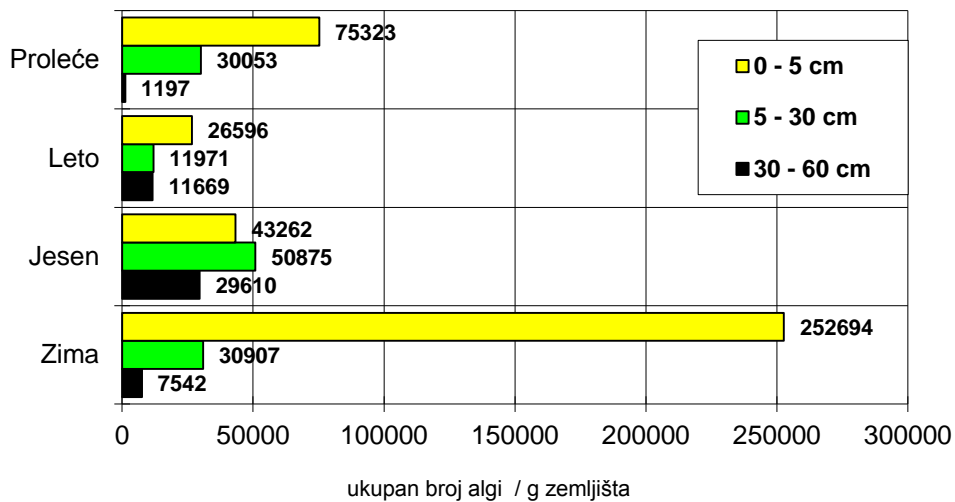
Graf. 15. Grafički prikaz ukupnog broja algi u gajnjači (NP "Fruška gora")



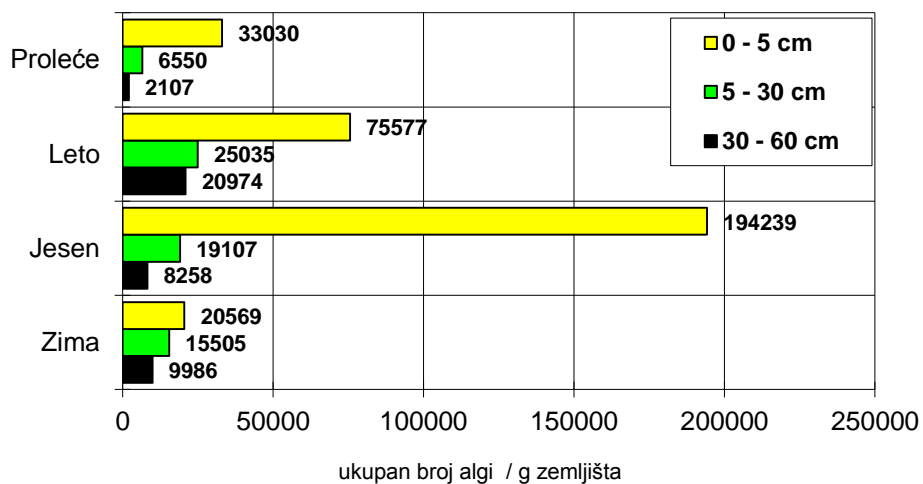
Graf. 16. Grafički prikaz ukupnog broja algi u fluvisolu (Kačka šuma)



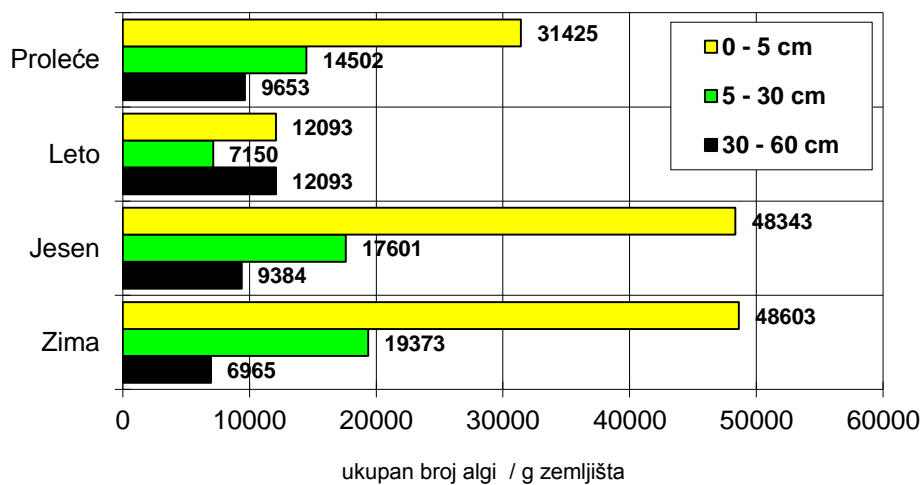
Graf. 17. Grafički prikaz ukupnog broja algi u fluvisolu (SRP "Koviljsko - petrovaradinski rit")



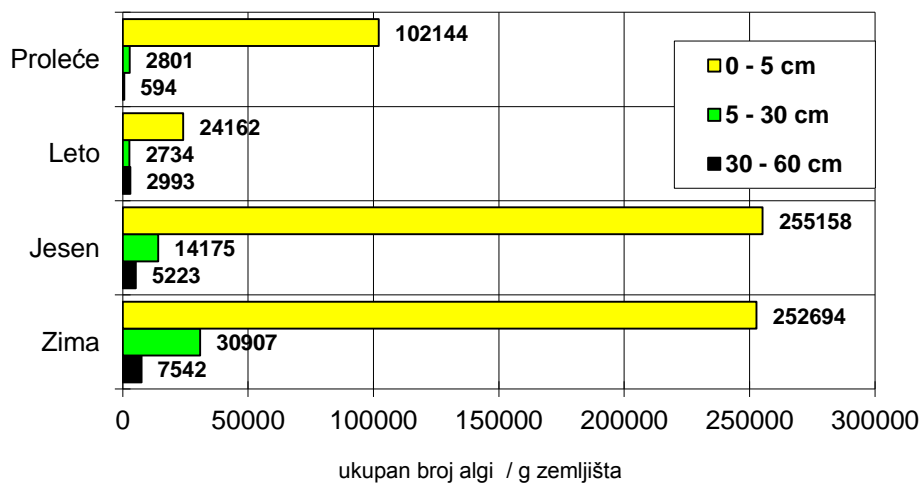
Graf. 18. Grafički prikaz ukupnog broja algi u ritskoj crnici (Bečej)



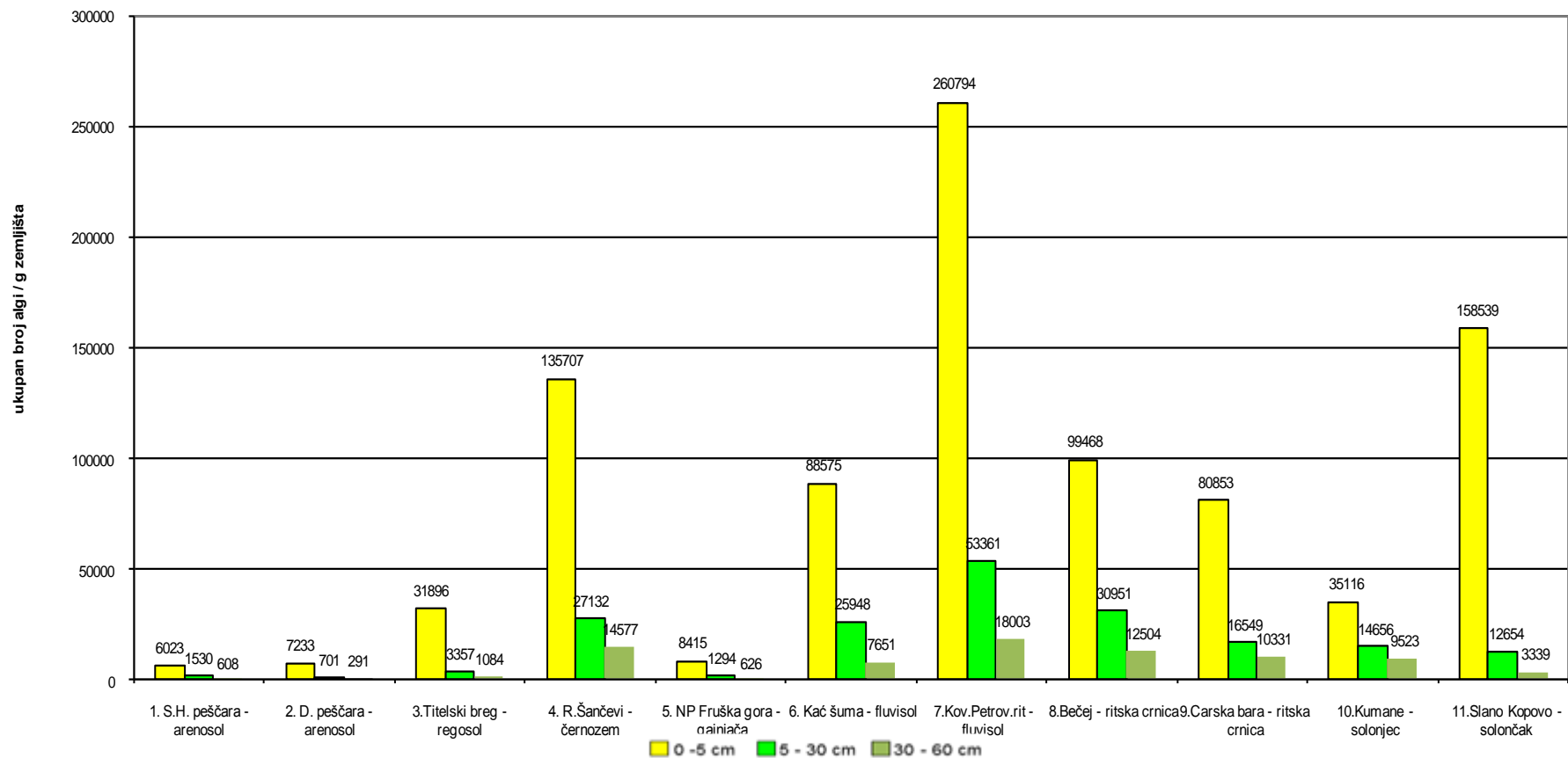
Graf. 19. Grafički prikaz ukupnog broja algi u ritskoj crnici (SRP "Carska bara")



Graf. 20. Grafički prikaz ukupnog broja algi u solonjecu (Kumane)



Graf. 21. Grafički prikaz ukupnog broja algi u solončaku (SRP "Slano Kopovo")



Graf. 22. Prosečan godišnji ukupan broj algi u zemljištima Vojvodine

Tabela 6. Fischer LSD test homogenosti varijansi za ukupan broj algi u ispitivanim zemljištima, sezona proleće 2010, za verovatnoću  $p=0,05$ 

Broj	Lokalitet	Tip zemljišta	Dubina (cm)	Ukupan broj algi/ gr zemljišta	Log. UB ALGI
1.	PIO "Subotička peščara"	arenosol	0-5	6274,26	3,71 kjih*
			5-30	3897,62	3,43 nmlk
			30-60	858,04	2,89 sr
2.	SRP "Deliblatska peščara"	arenosol	0-5	4290,41	3,48 mlkj
			5-30	1286,54	3,10 srqpon
			30-60	256,41	2,37 t
3.	SRP "Titelski breg"	regosol	0-5	74034,71	4,86 cb
			5-30	2534,55	3,38 onmlk
			30-60	1871,78	3,23 rqponm
4.	Rimski Šančevi	černozem	0-5	98697,16	4,98 b
			5-30	12116,86	4,07 gf
			30-60	10925,12	4,03 hgf
5.	NP "Fruška gora"	gajnjača	0-5	19107,92	4,28 fed
			5-30	1206,53	3,02 srqp
			30-60	1147,06	3,05 srqpo
6.	Kačka šuma	fluvisol	0-5	145922,00	5,16 ba
			5-30	29463,29	4,46 ed
			30-60	4924,58	3,67 lkji
7.	SRP "Koviljsko - petrovaradinski rit"	fluvisol	0-5	274550,10	5,43 a
			5-30	7605,74	3,82 jihg
			30-60	2365,09	3,36 ponmlk
8.	Bečej	Ritska crnica	0-5	75323,70	4,87 b
			5-30	30053,23	4,47 ed
			30-60	1197,80	2,94 srq
9.	SRP "Carska bara"	Ritska crnica	0-5	33030,39	4,51 dc
			5-30	6550,21	3,80 jihg
			30-60	2107,06	3,28 qponm
10.	Kumane	solonjec	0-5	31425,76	4,49 ed
			5-30	14502,37	4,15 gfe
			30-60	9653,61	3,98 ihgf
11.	SRP "Slano Kopovo"	solončak	0-5	102144,70	5,00 b
			5-30	2801,80	3,34 ponml
			30-60	594,13	2,67 rs

\*Različita slova ukazuju na postojanost statistički značajne razlike između varijanti na osnovu Fischer LSD testa homogenosti varijansi za verovatnoću  $p=0,05$

Tabela 7. Fischer LSD test homogenosti varijansi za ukupan broj algi u ispitivanim zemljištima, sezona leto 2010, za verovatnoću p=0,05

Broj	Lokalitet	Tip zemljišta	Dubina (cm)	Ukupan broj algi/ gr zemljišta	Log. UB ALGI
1.	PIO "Subotička peščara"	arenosol	0-5	803,97	2,89 l*
			5-30	147,94	2,16 po
			30-60	98,52	1,98 p
2.	SRP "Deliblatska peščara"	arenosol	0-5	7643,45	3,87 j
			5-30	264,52	2,38 on
			30-60	144,13	2,15 po
3.	SRP "Titelski breg"	regosol	0-5	20188,83	4,03 ji
			5-30	873,41	2,90 l
			30-60	492,07	2,65 nml
4.	Rimski Šančevi	černozem	0-5	20302,01	4,30 ihgfe
			5-30	14370,54	4,15 jihgf
			30-60	11521,69	4,06 jihg
5.	NP "Fruška gora"	gajnjača	0-5	561,44	2,72 ml
			5-30	279,13	2,44 onm
			30-60	405,57	2,59 nml
6.	Kačka šuma	fluvisol	0-5	83011,84	4,91 b
			5-30	47980,99	4,66 dcb
			30-60	20692,13	4,29 ihgfe
7.	SRP "Koviljsko - petrovaradinski rit"	fluvisol	0-5	217735,20	5,33 a
			5-30	58488,27	4,73 cb
			30-60	36274,38	4,30 ihgfe
8.	Bečej	Ritska crnica	0-5	26596,79	4,40 fed
			5-30	11971,76	4,07 jihgf
			30-60	11669,33	4,06 jihg
9.	SRP "Carska bara"	Ritska crnica	0-5	75577,05	4,86 cb
			5-30	25035,02	4,38 gfed
			30-60	20974,04	4,31 ihgfe
10.	Kumane	solonjec	0-5	37651,58	4,57 edc
			5-30	7150,12	3,85 j
			30-60	12093,89	4,07 jihgf
11.	SRP "Slano Kopovo"	solončak	0-5	24162,19	4,37 hgfed
			5-30	2734,52	3,43 k
			30-60	2993,88	3,46 k

\*Različita slova ukazuju na postojanost statistički značajne razlike između varijanti na osnovu Fischer LSD testa homogenosti varijansi za verovatnoću p=0,05

Tabela 8. Fischer LSD test homogenosti varijansi za ukupan broj algi u ispitivanim zemljištima, sezona jesen 2010, za verovatnoću  $p=0,05$ 

Broj	Lokalitet	Tip zemljišta	Dubina (cm)	Ukupan broj algi/ gr zemljišta	Log. UB ALGI
1.	PIO "Subotička pešćara"	arenosol	0-5	8605,40	3,91 ji*
			5-30	905,00	2,93 ml
			30-60	1008,08	2,99 ml
2.	SRP "Deliblatska pešćara"	arenosol	0-5	7396,83	3,86 ji
			5-30	218,17	2,31 o
			30-60	138,40	2,12 o
3.	SRP "Titelski breg"	regosol	0-5	14429,63	4,14hg
			5-30	3459,64	3,52 k
			30-60	951,43	2,96 ml
4.	Rimski Šančevi	černozem	0-5	224469,20	5,28 a
			5-30	31391,66	4,48 edc
			30-60	24067,95	4,36 gfe
5.	NP "Fruška gora"	gajnjača	0-5	857,50	2,91 m
			5-30	1094,90	3,03 ml
			30-60	426,18	2,56 n
6.	Kačka šuma	fluvisol	0-5	17575,51	4,24 gf
			5-30	15637,95	4,19 g
			30-60	1441,40	3,14 l
7.	SRP "Koviljsko - petrovaradinski rit"	fluvisol	0-5	300432,00	5,46 a
			5-30	89140,89	4,93 b
			30-60	7405,80	3,84 ji
8.	Bečej	Ritska crnica	0-5	43262,61	4,62 dc
			5-30	50875,85	4,70 c
			30-60	29610,95	4,46 fed
9.	SRP "Carska bara"	Ritska crnica	0-5	194239,00	5,28 a
			5-30	19107,67	4,25 gfe
			30-60	8258,67	3,91 ji
10.	Kumane	solonjec	0-5	48343,17	4,66 dc
			5-30	17601,34	4,23 gf
			30-60	9384,86	3,94 ih
11.	SRP "Slano Kopovo"	solončak	0-5	255158,20	5,40 a
			5-30	14175,48	4,14 hg
			30-60	5223,83	3,71 kj

\*Različita slova ukazuju na postojanost statistički značajne razlike između varijanti na osnovu Fischer LSD testa homogenosti varijansi za verovatnoću  $p=0,05$



Tabela 9. Fischer LSD test homogenosti varijansi za ukupan broj algi u ispitivanim zemljištima, sezona zima 2010, za verovatnoću  $p=0,05$ 

Broj	Lokalitet	Tip zemljišta	Dubina (cm)	Ukupan broj algi/ gr zemljišta	Log. UB ALGI
1.	PIO "Subotička peščara"	arenosol	0-5	8412,63	3,90 mlk*
			5-30	1173,68	3,06 o
			30-60	469,03	2,64 p
2.	SRP "Deliblatska peščara"	arenosol	0-5	9606,36	3,98 mlkj
			5-30	1036,33	2,98 o
			30-60	629,77	2,75 p
3.	SRP "Titelski breg"	regosol	0-5	18934,49	4,27 ihgf
			5-30	6565,28	3,81 m
			30-60	1024,62	2,99 o
4.	Rimski Šančevi	černozem	0-5	199066,40	5,29 ab
			5-30	50653,10	4,70 ed
			30-60	11798,01	4,07 kjih
5.	NP "Fruška gora"	gajnjača	0-5	13136,28	4,06 lkji
			5-30	2600,85	3,40 n
			30-60	527,31	2,71 p
6.	Kačka šuma	fluvisol	0-5	107793,90	5,02 c
			5-30	10713,26	4,00 mlkj
			30-60	3549,61	3,52 n
7.	SRP "Koviljsko - petrovaradinski rit"	fluvisol	0-5	250458,30	5,39 a
			5-30	58213,05	4,76 d
			30-60	25969,22	4,40 f
8.	Bečej	Ritska crnica	0-5	150250,20	5,17 cb
			5-30	48342,64	4,67 ed
			30-60	19452,26	4,28 hgf
9.	SRP "Carska bara"	Ritska crnica	0-5	20569,17	4,31 gf
			5-30	15505,01	4,18 jihg
			30-60	9986,56	3,99 mlkj
10.	Kumane	solonjec	0-5	48603,67	4,68 ed
			5-30	19373,17	4,28 hgf
			30-60	6965,20	3,80 m
11.	SRP "Slano Kopovo"	solončak	0-5	252694,60	5,39 a
			5-30	30907,71	4,48 fe
			30-60	7542,99	3,84 ml

\*Različita slova ukazuju na postojanost statistički značajne razlike između varijanti na osnovu Fischer LSD testa homogenosti varijansi za verovatnoću  $p=0,05$

### 6.2.2. Brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija u zemljištima Vojvodine

Mnoge vrste cijanobakterija imaju sposobnost vezivanja atmosferskog azota i njegovog izlučivanja u spoljašnju sredinu (Venkataraman, 1972). Ove sposobnosti azotofiksacije i fotosinteze, zastupljene istovremeno, omogućavaju cijanobakterijama veliku sposobnost adaptacije na različite ekološke faktore. Žive na veoma različitim staništima od tropa do visokih geografskih širina. Naseljavaju slatke i slane vode, vlažna zemljišta a pojedine se mogu naći i na relativno suvim mestima. Mnoge vrste cijanobakterija koje pripadaju redovima *Nostocales*, *Stigonematales* i *Mastigocladales* imaju sposobnost vezivanja atmosferskog azota i njegovog izlučivanja u spoljašnju sredinu (Venkataraman, 1972).

Cijanobakterije igraju vrlo važnu ulogu u obrazovanju zemljišta, obogaćuju zemljište azotom i organskim materijama, obrazuju biološki aktivne materije, utiču na fizička i hemijska svojstva zemljišta, uzajamno deluju s drugim mikroorganizmima i višim biljkama. Cijanobakterije se u istočnim zemljama Azije tradicionalno koriste u proizvodnji pirinča, kao biođubrivo. Istraživane su i mogućnosti njihove primene kao biođubriva i u umerenom pojasu na manje vlažnim zemljištima. Na zastupljenost cijanobakterija u zemljištu utiču različiti ekološki i antropogeni faktori. Granhall (1975) među najvažnije faktore ubraja vlažnost zemljišta i pH reakciju zemljišta. Na rast cijanobakterija u zemljištu utiče i način obrade, navodnjavanje i primena pesticida (Gantar et al., 1991). Količina i vrsta mineralnih đubriva takođe imaju značajan uticaj na rast cijanobakterija (Venkataraman, 1972; Milošević, 1988). Većina azotofiksirajućih cijanobakterija fiksira više azota u prisustvu fosfornih đubriva (Gantar, 1992).

U zemljištima su najčešće zastupljene cijanobakterije, a zatim mikroalge iz razdela *Chlorophyta*, *Xanthophyta* i *Bacillariophyta*. Njihov broj varira u zavisnosti od tipa zemljišta i uglavnom se kreće između  $10^3$  do  $10^6$  jedinki po gramu zemljišta, što je ekvivalentno biomasi od 1 do 1500 kg/ha, (Ordog, 2000). Prema istraživanjima u mađarskom nacionalnom parku Balaton, maksimalna zastupljenost mikroalgalne biomase je iznosila  $1.29 \times 10^6$  ćelija po  $\text{cm}^3$ , dok su vrednosti prosečne godišnje produkcije bile 1.93 – 6.31 kg/ha. Najveći broj algalnih ćelija je nađen u prvom centimetru zemljišta., a brojnost je varirala u zavisnosti od tipa

zemljišta. U odnosu na količinu biomase u zemljištu, najzastupljenija grupa su cijanobakterije u pirinčanim poljima, (Svirčev, 2005).

Cijanobakterije učestvuju u prvim fazama formiranja zemljišta. One prve nastanjuju stene i vrše njihovo primarno razlaganje. Cijanobakterije sintetišu pored CO<sub>2</sub>, organske kiseline kao što su jabučna, limunska, vinska, oksalna i druge koje vrše hemijsku razgradnju stena. Svojom fotosintetskom aktivnošću cijanobakterije i mikroalge sintetišu organska jedinjenja, neophodna u procesu obrazovanja zemljišta. U već formiranom zemljištu masa cijanobakterija i mikroalgi dostiže i do 100 kg/ha. Ako se uzme u obzir da se u toku vegetacije izvrši nekoliko životnih ciklusa sa izumiranjem i novim razvojem ćelija cijanobakterija, novonastala biomasa, ulazeći u proces mineralizacije, dostiže vrednost od 1400 kg po ha. Kvantitativne vrednosti oih mikroorganizama u zemljištu su ipak manje u odnosu na bakterije, gljive i aktinomicete, (Svirčev, 2005).

### **Brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija u zavisnosti od tipa zemljišta**

Rezultati brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u ispitivanim tipovima zemljišta su prikazani u Grafikonima 23 - 34. . Svi dobijeni podaci obrađeni su statistički metodom ANOVA za dvofaktorijelni ogled i analizirani LSD testom homogenosti ispitivanih varijanti, sa primenom StatSoft programa Statistika 12,0 (Tabele 10 - 13.).

Najveća prosečna godišnja brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija, u površinskom sloju 0-5cm, je utvrđena kod zemljišta fluvisol u SRP "Koviljsko petrovaradinskom ritu" i iznosila je 150864 jedinki po gramu apsolutno suvog zemljišta, (Grafikon 29 i 34.). Najveća prosečna brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija na ovom lokalitetu se može tumačiti povećanom vlažnošću ovog zemljišta pod uticajem plavnih voda Dunava. Ovaj lokalitet se nalazi u nebranjenom delu reke, u plavnoj zoni polja gde je izložen uticaj visokih voda reke. Ovaj fluvisol se odlikuje i količinom humusa od 2.32% u površinskom sloju, i srednjom količinom azota od 0,15% N. Fluvisol se odlikuje i blago alkalnom reakcijom, pH vrednost u vodi iznosi 7,34 što povoljno utiče na razvoj algi.

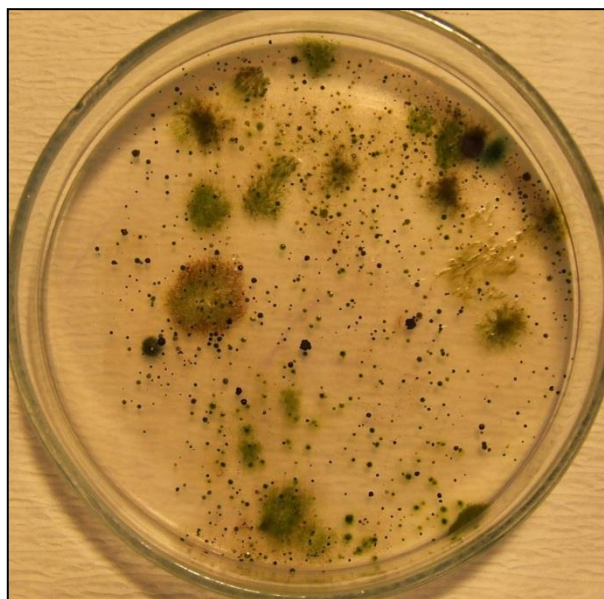
Fišerov LSD test homogenosti je pokazao da postoji statistički značajno veća razlika u brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u zemljištu fluvisol na lokalitetu SRP Koviljsko petrovaradinski rit u odnosu na sva druga istraživana zemljišta pri verovatnoći p=0.05 .

Solončak u SRP "Slano Kopovo" se takođe odlikovao velikom brojnošću azotofiksirajućih cijanobakterija, brojnost je u površinskom sloju iznosila 121077 cijanobakterija po gramu zemljišta u toku ispitivane godine, (Grafikon 33 i 34.). Slano Kopovo predstavlja baru na slatini, odnosno slano jezero. Veliki deo godine je ovaj prostor prekriven podzemnom vodom koja pogoduje razvoju algi. Solončak poseduje Bt horizont koji je po sastavu glina ilovaste teksture koja zadržava površinske padavine. Ovaj solončak ima alkalnu reakciju, pH u vodi iznosi 8.19. Sadržaj humusa i azota je nizak, 1.27% humusa i 0.08%N, ali je količina fosfata (AL-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 17.37 mg/100g) i kalijuma (AL-K<sub>2</sub>O mg/100g) relativno visoka pa ovo zemljište pogoduje razvoju azotofiksirajućih cijanobakterija.

Černozem, na području Rimskih Šančeva, je treći lokalitet po brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u površinskom sloju zemljišta, 70887 jedinki po gramu zemljišta, (Grafikon 26 i 34.). Ovo zemljište je bazne reakcije, pH u vodi iznosi 8.11, dok je sadržaj humusa i azota treći po visini u odnosu na ostale tipove zemljišta. Količina kalijuma je takođe relativno visoka (AL-K<sub>2</sub>O 31.45 mg-100gr).

Zatim sledi grupa zemljišta sa srednjom prosečnom brojnošću azotofiksirajućih cijanobakterija u koju spadaju: ritska crnica, SRP Carska bara (56824 jedinke po gr. zemljišta), fluvisol, lokalitet Kačka šuma (54085 jedinki po gr. zemljišta), ritska crnica, Bečej (52560 jedinki po gr. zemljišta) i solonjec, kod Kumana sa (30960 jedinki po gr. zemljišta), (Grafikon 34.). U vlažnim periodima godine na solonjecu je zabeležen i masovni razvoj krpičastih, kožastih, kolonija maslinasto-zelene ili mrke boje azotofiksirajuće cijanobakterije *Nostoc* sp. Pojedine kolonije su dostizale dimenzije i preko 10 cm.

Ritska crnica na lokalitetu SRP "Carska bara" poseduje najveću količinu humusa (3,96%) i najvećom količinom azota (0,26% ) od svih ispitivanih tipova zemljišta. Ritska crnica kod Bečaja takođe ima visok sadržaj humusa 3.63%, a takođe i azota 0.24%. Ritska crnica je tip zemljišta koji ima težak mehanički sastav, visok udeo čestica manjih od 0,002 mm nepovoljno se odražava i na ostala vodno-fizička svojstva zemljišta. Ritska crnica je lepljiva i teška za obradu u vlažnom periodu, ali pogoduje razvoju cijanobakterija. I ritska crnica i solonjec se odlikuju specifičnim vodnim režimom koji u određenim periodima godine, nakon kišnih perioda čine ova zemljišta prezasićna vodom, a to veoma pogoduje razvoju cijanobakterija.



Slika 30. Kolonije azotofiksirajućih cijanobakterija na podlozi BG-11 (-N) Kačka šuma, fluvisol, sloj 0-5 cm.

Fluvisol na lokalitetu Kačka šuma se nalazi iza nasipa u branjenom delu terena, dok je fluvisol u SRP "Koviljsko petrovaradinski rit" pod direktnim uticajem Dunava, pa je zbog toga brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija manja u zemljištu u Kačkoj šumi. Fluvisol u Kačkoj šumi ima i manje vrednosti ukupnog azota, humusa, fosfata i kalijuma nego fluvisol u SRP "Koviljsko petrovaradinski rit".

U grupu sa veoma malom brojnošću azotofiksirajućih cijanobakterija spadaju: regosol, u SRP Titelski breg, 9538 jedinki po gramu zemljišta, Grafikon 25., arenosoli, u SRP Deliblatska peščara, 4699 jedinki po gramu zemljišta, Grafikon 24., i PIO "Subotička peščara", 2808 jedinki po gramu zemljišta, Grafikon 23 i 32..

Arenosol se odlikuje veoma nepovoljnim vodnim režimom jer se atmosferska voda ne zadržava na površini već odmah prodire u dublje slojeve. Arenosoli na oba ispitivana lokaliteta imaju nizak poljski vodni kapacitet i veoma oskudnu vegetaciju, pa su veoma nepovoljni za razvoj azotofiksirajućih cijanobakterija i algi uopšte. Arenosol na lokalitetu u Deliblatskoj peščari se odlikuje i sa najmanjim sadržajem humusa 0.29% , azota 0.02 % , fosfata (AL  $P_2O_5$  2.23 mg / 100gr, kalijuma (4.86 mg /100 gr) i ugljenika 0.29%.

Zemljište sa najnižom brojnošću azotofiksirajućih cijanobakterija, u odnosu na sva ispitivana zemljišta je gajnjača u NP Fruška gora i brojnost u površinskom sloju iznosi svega 1582 jedinice po gramu apsolutno suvog zemljišta. Gajnjača se odlikuje i najnižom pH vrednošću 5.22 u vodi, u odnosu na sve ispitivana zemljišta, kao i najniži sadržaj fosfata (AL- $P_2O_5$  1.14 mg/100gr).

### **Brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija u zavisnosti od dubine pedološkog profila**

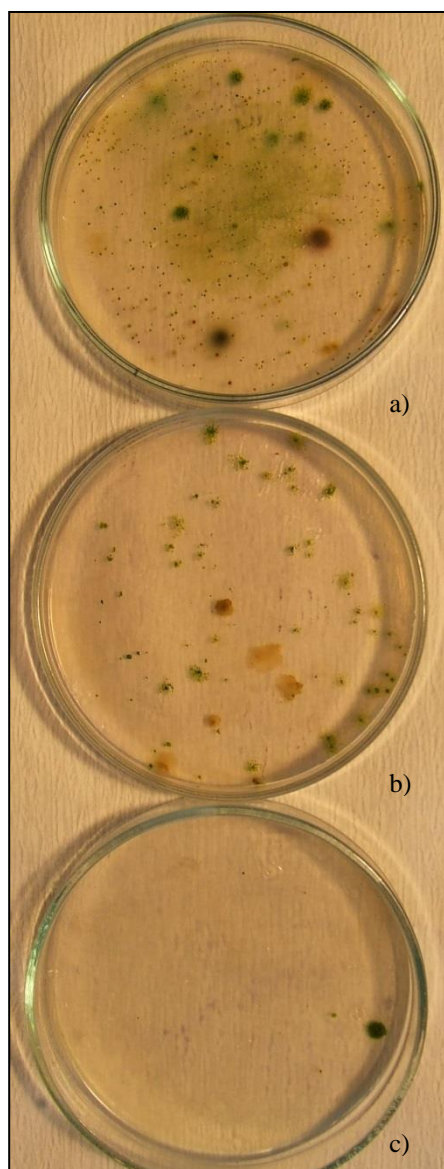
Kod svih ispitivanih zemljišta brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija je bila najveća u površinskom sloju zemljišta, 0-5 cm dubine, opadala je sa dubinom zemljišta i bila najmanja u najdubljem sloju od 30 do 60 cm.

Fišerov LSD test homogenosti je pokazao da postoji statistički značajna razlika u broju azotofiksirajućih cijanobakterija između površinskog i donjih ispitivanih slojevima zemljišta pri varijansi za vrednost od  $p=0.05$ , (Tabela 10 - 13.). Najveća brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija je bila u površinskom sloju svih zemljišta i statistički se razlikovala od brojnosti u dubljim slojevima od 5-30 cm i 30 -60 cm.

Površinski sloj zemljišta se odlikuje najoptimalnijim uslovima za rast i razmnožavanje azotofiksirajućih cijanobakterija obzirom da su one pre svega fotosintetski mikroorganizmi. Stoga ne čudi činjenica da je najveća brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija upravo na površini zemljišta. U zavisnosti od prisustva vode u površinskom sloju zemlje, bilo da su u pitanju atmosferske padavine, visoke podzemne vode ili plavne vode, na pojedinim tipovima zemljišta smo uočili masovnu pojavu cijanobakterija i formiranje tankog ili debljeg modro-zelenog mikrobiološkog sloja, prevlake.

Prosečna godišnja brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija u sloju 0-5cm je iznosila 150864 jedinice po gr zemljišta, a u sloju 5-30cm je broj pao na 38923 jedinice (što je 25,8% od površinske brojnosti), dok se u najdubljem sloju od 30-60cm kretala svega 8548 jedinice po gr zemljišta, što je 5,66% od površinske brojnosti.

Na ovom fluvisolu u nebranjenoj, poplavnoj zoni u SRP "Koviljsko petrovatradinskog rita" uočili smo i končaste, krpaste tvorevine, koje su se nakon visokih poplavnih voda zadržale na površini zemljišta ili vegetaciji.



Prosečna brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija na površini solončaka u SRP “Slano Kopovo” se kretala 121077 jedinki po gr. zemljišta, ali je u sloju od 5-30cm veoma opala i iznosila svega 8826 jedinki (7,28% u odnosu na površinsku brojnost), da bi u sloju od 30-60 cm iznosila svega 3416 jedinki (2,82% od površinske brojnosti).

Na površini solončaka u SRP “Slano Kopovo” uočili smo krpaste modro-zelene kolonije *Nostoc sp.*, dimenzija i do desetak santimetara u prečniku.

Kod černoziem na lokalitetu Rimski Šančevi površinska brojnost azt. cijanobakterija iznosi 70887 jed.po gr. zemljišta, a opala je na 21411 jedinki ( 30,20% od površinske brojnosti) u sloju od 5-30cm, da bi u najdubljem ispitivanom sloju iznosila 6904 jedinki po gramu zemljišta (9,73% od površinskog broja).

Slika 31. Distribucija azotofiksirajućih cijanobakterija po dubini zemljišta, a) 0-5 cm, b) 5-30 cm, c) 30-60cm, podloga BG-11 (-N), ritska crnica, Bečej.

Kod ritske crnice, SRP Carska bara, površinska brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija je sa 56824 po gramu zemljišta, opala na 11867 jedinki u sloju od 5-30 cm, a što je 20,88% od površinske brojnosti. U sloju od 30 – 60 cm brojnost je pala na 6212 jedinki po gramu zemljišta što je 10,93% od površinske brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija, (Grafikon 31.).

Sličan procentualni odnos azotofiksirajućih cijanobakterija u pedološkom profilu je zastupljen i kod fluvisola, Kačka šuma, (površina 54085 jedinki, u sloju od 5 – 30 cm 13813

jedinki, što je 25,53% od površinske brojnosti, a u sloju 30 – 60 cm 2880,00 što je 5,32%), (Grafikon 28.).

Kod ritske crnice, kod Bečeja, je veliki procenat azotofiksirajućih cijanobakterija u dubljim slojevima u odnosu na ostala ispitivana zemljišta. U sloju od 5-30 cm procenat azotofiksirajućih cijanobakterija iznosi 45,53% u odnosu na površinu zemljišta, a u sloju od 30-60 cm azf. cijanobakterije su zastupljene sa 22,0% u odnosu na površinski sloj ritske crnice, (Grafikon 34.). Relativno visok procenat je zastupljen i kod solonjeca u Kumanu, 41,95% u sloju od 5-30 cm i 27,11% u sloju od 30-60 cm u odnosu na površinu solonjeca, (Grafikon 34.).

Kod regosola na Titelskom bregu, procenat azf. cijanobakterija od površinskih 9538 jedinki, se smanjuje na 2600 jedinki po gramu u sloju od 5-30 cm, što iznosi 27,25% od površinskog broja, dok u najdubljem sloju pada na 585 jedinki što je 5,92% u odnosu na površinski sloj.

Kod arenosola u Deliblatskoj peščari, brojnost azf. cijanobakterija naglo opada sa dubinom peska. Od 4699 azf. cijanobakterija u površinskom sloju, broj opada na svega 289 jedinki (6,15% od površinskog broja) u sloju od 5-30 cm i na svega 198 jedinki (4,21%) u sloju od 30-60 cm, (Grafikon 24 i 34.). Kod arenosola u Subotičko-horgoškoj peščari površinska vrednost azf. cijanobakterija je 2808 jedinki po gramu zemljišta, u sloju od 5-30cm brojnost opada na 271 jedinku (9,65%), a u sloju 30-60 cm iznosi 233 jedinke (8,29%), (Grafikon 23 i 34.).

Gajnjača na Fruškoj gori se odlikuje najnižom brojnošću azf. cijanobakterija. Brojnost na površini iznosi 1582 jedinke, u sloju od 5-30cm pada na 940 jedinki (59,41%), dok u sloju od 30-60cm iznosi 293 jedinke (18,52%) u odnosu na brojnost na površini gajnjače, (Grafikon 27 i 34.).

Bitno je napomenuti zapažanje da se azotofiksirajuće cijanobakterije iz dubljih slojeva, 5-30 cm i 30-60cm, odlikuju znatno tamnijom bojom kolonija nego cijanobakterije iz površinskog sloja zemljišta. Kolonije cijanobakterija iz dubljih slojeva su mrke i tamnije modre boje, dok se površinske kolonije odlikuju svetlijom maslinastom i modrozelenom bojom. Ovo svakako ukazuje da se cijanobakterije iz dubljih slojeva svojim pigmentnim sastavom delimično prilagođavaju nepovoljnim uslovima sredine, nedostatak direktnog dnevnog svetla.



Tamnija boja kolonija verovatno potiče od povećanog sadržaja fikobiliproteinskih pigmenta koji su sposobni da vežu fotone graničnih talasnih dužina.

Zanimljivo je da kod slatinastog zemljišta solončaka kao i kod arenosola brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija znatno opada u dubljim slojevima, dok su cijanobakterije ravnomernije raspoređene u dubljim horizontima kod hidromorfni zemljišta, fluvisola i ritske crnice.

### **Brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija u zavisnosti od godišnjeg doba**

Kod najvećeg broja ispitivanih zemljišta brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija je bila najveća tokom zimskog perioda. Najveća brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija je bila tokom zimskog perioda kod sledećih sedam tipova zemljišta: arenosola (PIO "Subotička peščara"), regosola (SRP Titelski breg), černozema (Rimski Šančevi), gajnjače (NP "Fruška gora"), fluvisola (Kjačka šuma), ritske crnice (Bečej) i solončaka (SRP "Slano Kopovo").

Najmanja brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija je zabeležena u letnjem periodu i to kod šest tipova zemljišta, kod: arenosola (PIO "Subotička peščara"), regosola (SRP "Titelski breg"), černozema (Rimski Šančevi), gajnjače (NP "Fruška gora"), solonjeca (Kumane) i solončaka (SRP "Slano Kopovo").

Relativno visoka brojnost azf. cijanobakterija u toku letnjih meseci na lokalitetima arenosol (SRP "Deliblatska peščara"), fluvisol (Kačka šuma) i ritska crnica (SRP "Carska bara") može se tumačiti neobično visokim srednjim padavinama tokom letnjih meseci, što se može videti na grafičkim prikazima sume padavina (Grafikoni 5, 7, 9. ).

Brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija je manje varirala u dubljim slojevima zemljišta, nego u površinskom sloju u toku cele godine.

Kada uporedimo zastupljenost azotofiksirajućih cijanobakterija i ukupnih algi u ispitivanim zemljištima, u površinskom sloju 0-5 cm dubine, uočićemo da je brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija gotovo uvek manja od broja ukupnih algi. To je i logično s obzirom da se na podlozi za ukupne alge, BG-11 sa azotom, sem azotofiksirajućih

cijanobakterija razvijaju i ostale grupe algi, pre svega silikatne i zelene alge. Silikatne alge se odlikuju žućkastim i svetlo mrkim kolonijama, a zelene alge se odlikuju kolonijama svetlo zelene boje.

Upoređujući brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija sa ukupnim brojem algi u zemljištima Vojvodine, Tabela 14. , ustanovili smo da su azotofiksirajuće cijanobakterije dominantne u našim zemljištima i zastupljene sa 56.27% u odnosu na druge grupe algi, u površinskom sloju zemljišta 0-5 cm. U dubljim slojevima zemljišta procenat azf. cijanobakterija se povećava u odnosu na druge grupe algi, zastupljene su sa 65.59% u rizosfernom sloju od 5-30 cm, i sa 61.68% u najdubljem sloju od 30-60 cm.

Najveća procentualna zastupljenost azf. cijanobakterija, u odnosu na druge grupe algi, je ustanovljena kod halomorfnih zemljišta i to kod solonjeca sa 88.16%, a kod solončaka sa 76.37% u površinskom sloju. To pokazuje da azf. cijanobakterije znatno bolje podnose ekstremne uslove, pre svega visoke koncentracije soli, u odnosu na druge grupe algi. Sem toga halomorfna zemljišta su najbazičnija u odnosu na druge istraživane tipove zemljišta, solonjec pH u vodi 8.73 i solončak 8.19, što pogoduje razvoju azf. cijanobakterija.

Najmanja procentualna zastupljenost azf. cijanobakterija u površinsko sloju je ustanovljena kod gajnjače na Fruškoj gori 18.79% i kod regosola na Titelskom bregu 29.90%. Gajnjača je najkiselije od svih ispitivanih zemljišta, pH u vodi iznosi 5.22 i nepovoljno deluje na razvoj cijanobakterija.

Kod velikog broja ispitivanih zemljišta, 7 od 11, procentualna zastupljenost azf. cijanobakterija je bila najveća u rizosfernom sloju od 5 - 30 cm. Površina zemljišta pogoduje razvoju mnogih razdela algi, zbog dobrih svetlosnih uslova, dok dublji slojevi favorizuju azf. cijanobakterije i to posebno one koje imaju miksotrofan ili heterotrofan način ishrane. Od ovog slučaja odudaraju peskovita zemljišta, arenosoli, a posebno u PIO "Subotička peščara" kod koga je procenat azf. cijanobakterija manji u dubljim slojevima nego na površini.

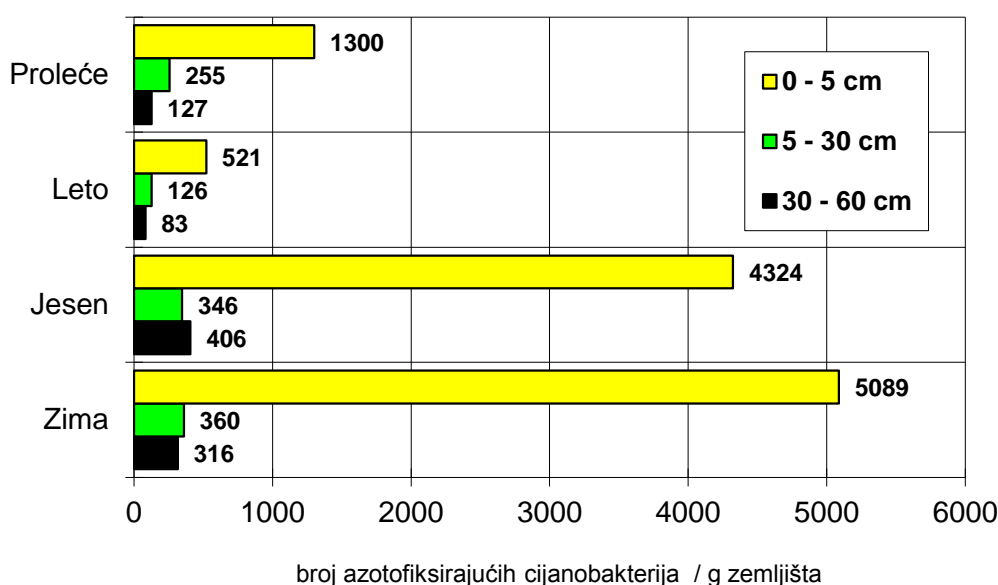
Tabela 14. Procentualna zastupljenost azotofiksirajućih cijanobakterija u odnosu na ukupan broj algi u ispitivanim zemljištima

<b>Redni broj</b>	<b>Lokalitet</b>	<b>Tip zemljišta</b>	<b>AZF. CIJ.% 0-5 cm</b>	<b>AZF. CIJ.% 5-30 cm</b>	<b>AZF. CIJ.% 30-60 cm</b>
<b>1.</b>	PIO "Subotička peščara"	arenosol	<b>46.62</b>	<b>17.71</b>	<b>38.32</b>
<b>2.</b>	SRP "Deliblatska peščara"	arenosol	<b>64.96</b>	<b>41.22</b>	<b>68.04</b>
<b>3.</b>	SRP "Titelski breg"	regosol	<b>29.90</b>	<b>77.45</b>	<b>52.12</b>
<b>4.</b>	Rimski Šančevi	černozem	<b>52.23</b>	<b>78.91</b>	<b>47.36</b>
<b>5.</b>	NP "Fruška gora"	gajnjača	<b>18.79</b>	<b>72.64</b>	<b>46.80</b>
<b>6.</b>	Kačka šuma	fluvisol	<b>61.06</b>	<b>53.23</b>	<b>37.64</b>
<b>7.</b>	SRP "Koviljsko petrovaradinski rit"	fluvisol	<b>57.84</b>	<b>72.94</b>	<b>47.48</b>
<b>8.</b>	Bečej	ritska crnica	<b>52.84</b>	<b>77.33</b>	<b>92.49</b>
<b>9.</b>	SRP "Carska bara"	ritska crnica	<b>70.28</b>	<b>71.70</b>	<b>60.12</b>
<b>10.</b>	Kumane	solonjec	<b>88.16</b>	<b>88.63</b>	<b>88.16</b>
<b>11.</b>	SRP "Slano Kopovo"	solončak	<b>76.37</b>	<b>69.74</b>	<b>100</b>
	ZEMLJIŠTA VOJVODINE	PROSEK	<b>56.27</b>	<b>65.59</b>	<b>61.68</b>

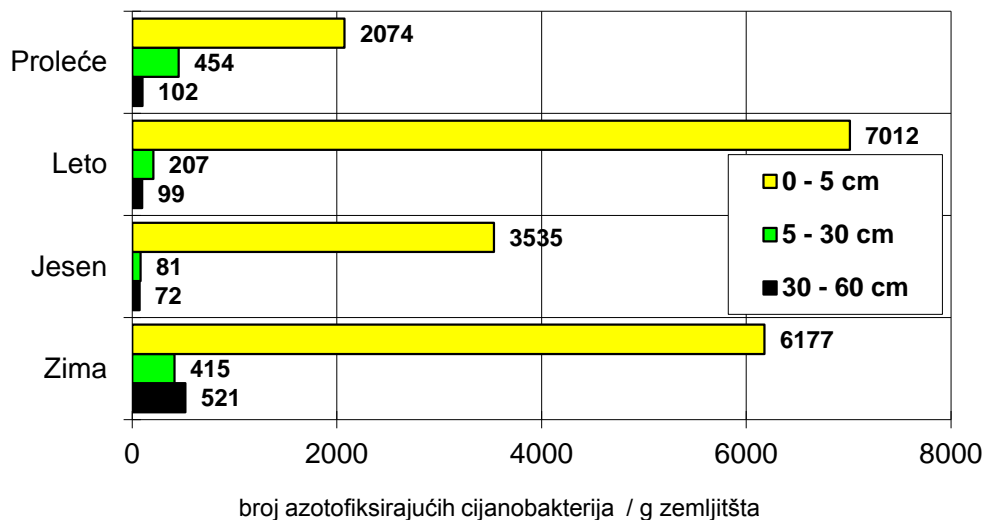
Gantar et al. (1991c), su ispitivali zastupljenost azotofiksirajućih cijanobakterija u površinskom sloju tri tipa zemljišta Vojvodine: livadskoj crnici, solonjecu i černozemu. Njihova ispitivanja su pokazala da je najveća brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija utvrđena u solonjecu na neobrađenom zemljištu, prosečna godišnja vrednost se kretala oko 4000 cijanobakterija po gramu zemljišta. Solonjec se odlikovao i najvišim sadržajem humusa 3.11%, kao i blago alkalnom reakcijom, pH 7.30. Černozem je imao nešto manju brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija, oko 2700 po gramu neobrađenog zemljišta. Livadska crnica je imala znatno manju brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija na neobrađenom zemljištu, oko 800 po gramu zemljišta. Livadska crnica se odlikovala i najnižim sadržajem humusa, 1.73%.

U našim istraživanjima brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija je bila znatno veća na navedenim zemljištima u odnosu na ispitivanja Gantar et al. 1991c. Iz ispitivanja pomenutih autora se može videti da je brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija bila veća na neobrađenom zemljištu nego na obrađenom, što se može tumačiti uticajem kako same mehaničke obrade zemlje tako i primenom raznih hemijskih preparata.

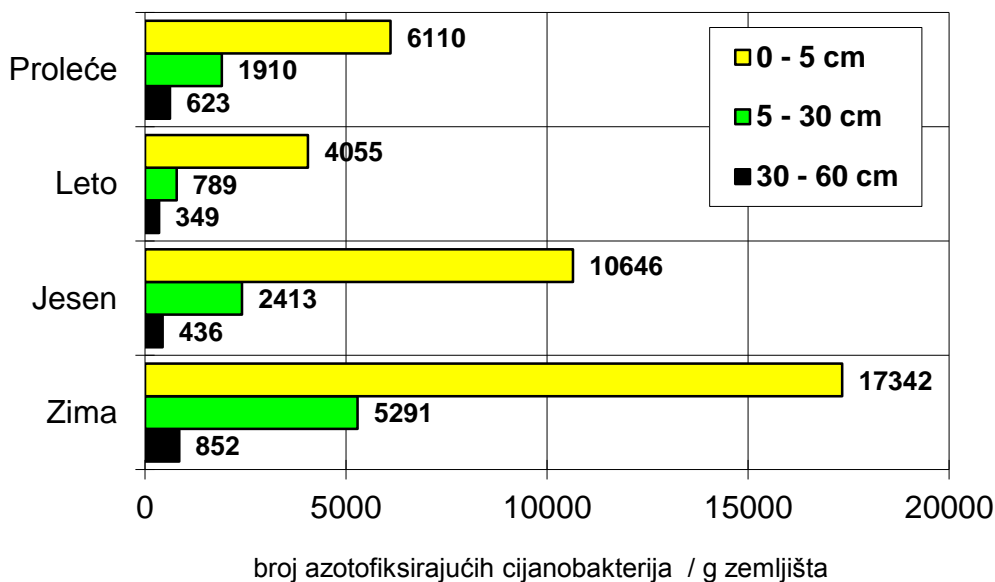
U ispitivanjima Milošević (1988) praćena je brojnost cijanobakterija u rizosferi šećerne repe na tipu zemljišta černozem, pri različitim varijantama đubrenja i tokom različitih faza vegetacije. Ispitivanja su pokazala da je brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija bila veća u fazi intenzivnog rasta šećerne repe i krajem vegetacije. Zastupljenost cijanobakterija u radu Milošević je bila veća u rizosferi nego u okolnom zemljištu, i korenskoj zoni. Visoke doze NPK đubriva su znatno uticale na smanjenje populacije cijanobakterija, a manje doze su bile stimulativne.



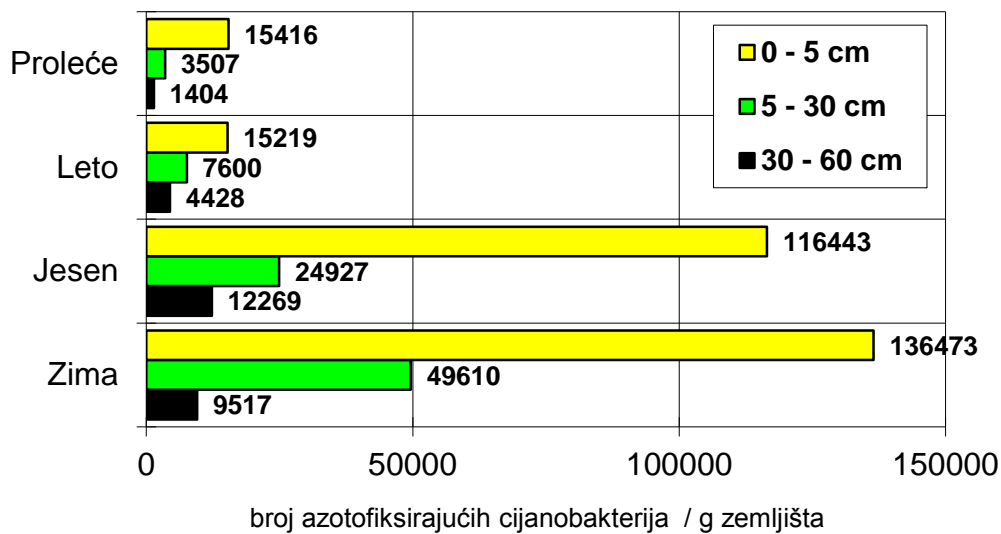
Graf. 23. Grafički prikaz brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u arenosolu (PIO "Subotička peščara")



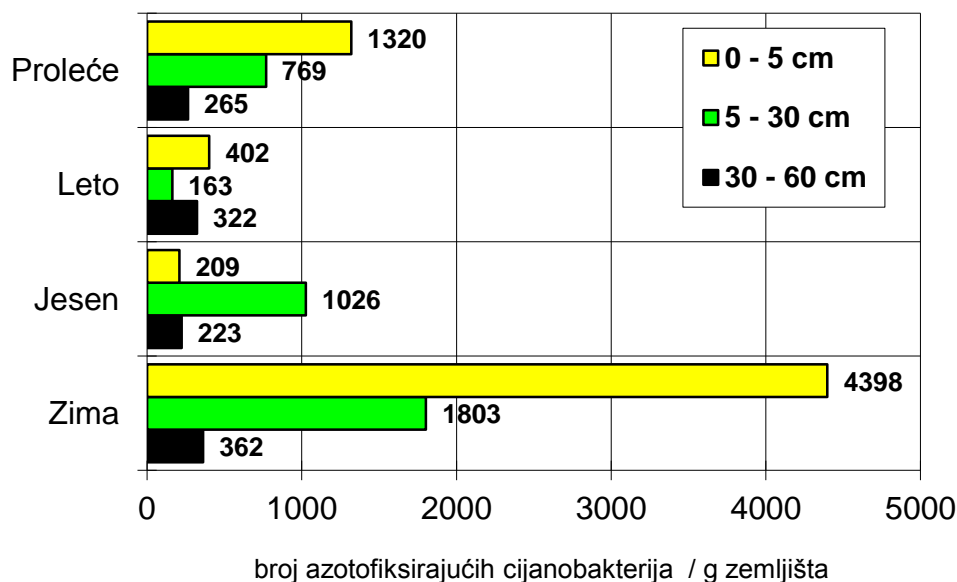
Graf. 24. Grafički prikaz brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u arenosolu (SRP "Deliblatska peščara")



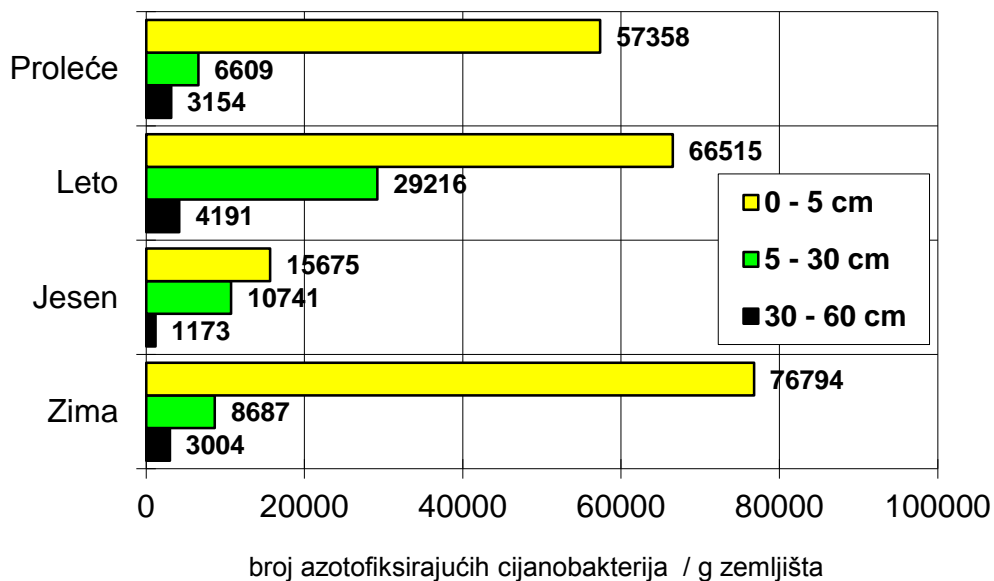
Graf. 25. Grafički prikaz brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u regosolu (SRP "Titelski breg")



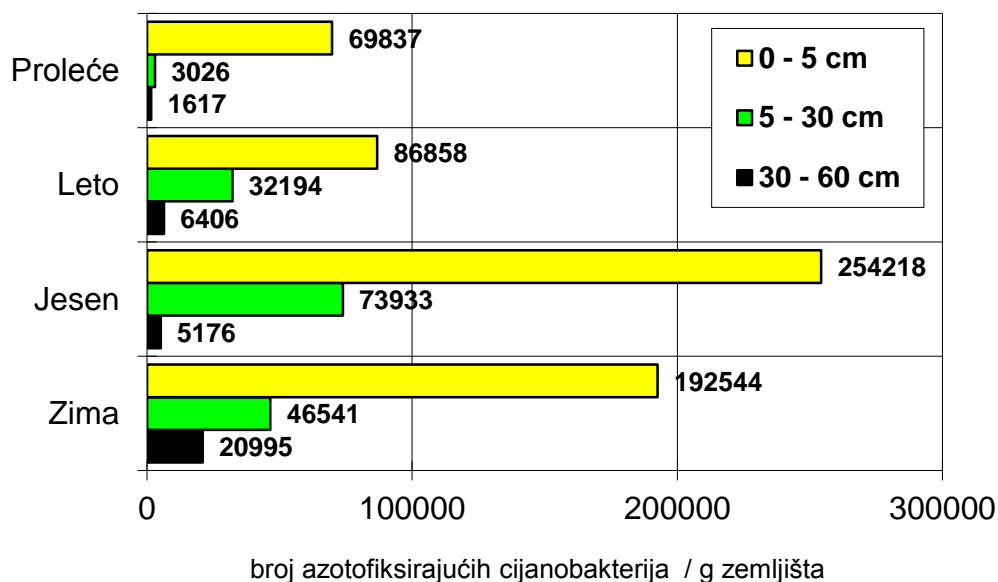
Graf. 26. Grafički prikaz brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u černozeu (Rimski Šančevi)



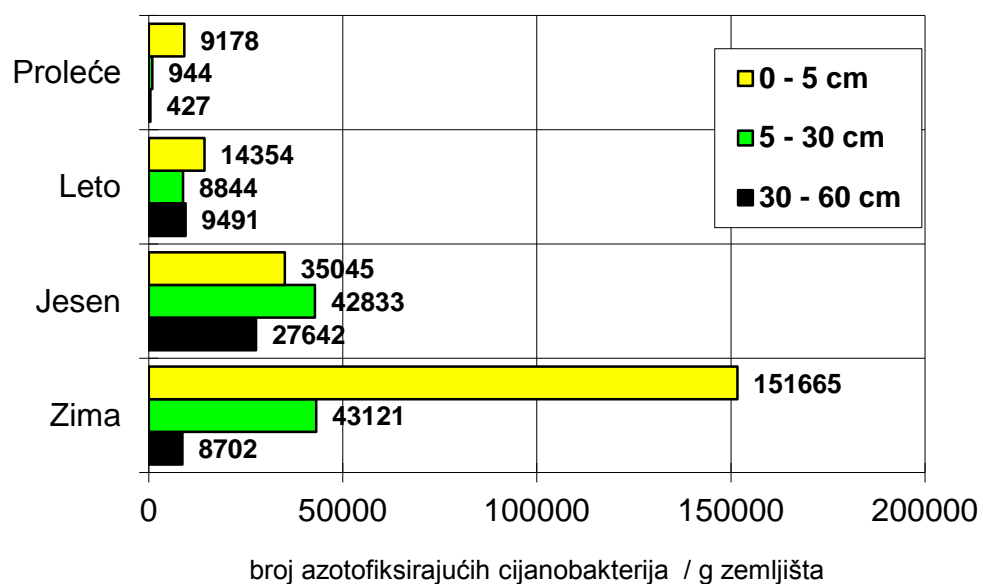
Graf. 27. Grafički prikaz brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u gajnjači (NP "Fruška gora")



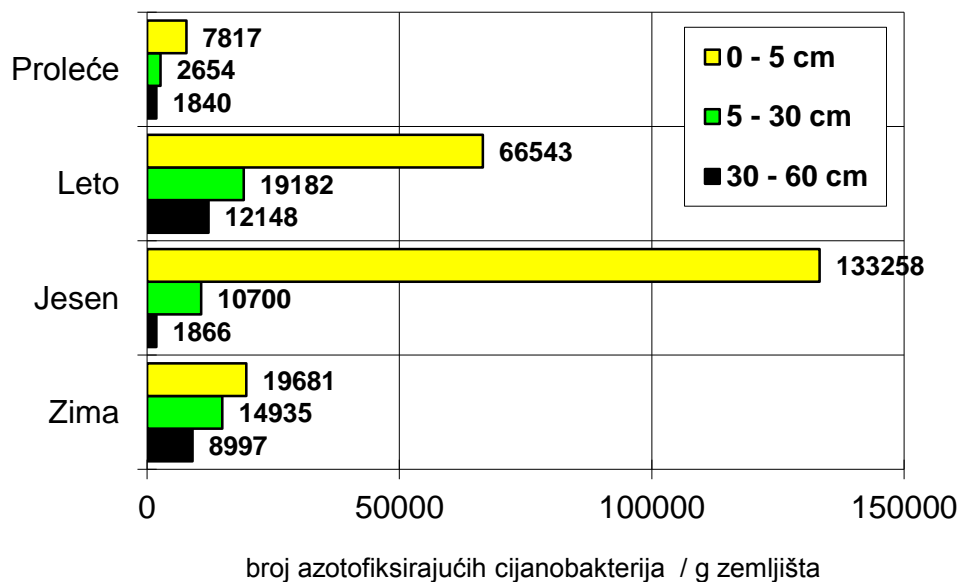
Graf. 28. Grafički prikaz brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u fluvisolu (Kačka šuma)



Graf. 29. Grafički prikaz brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u fluvisolu (SRP "Koviljsko-petrovaradinski rit")

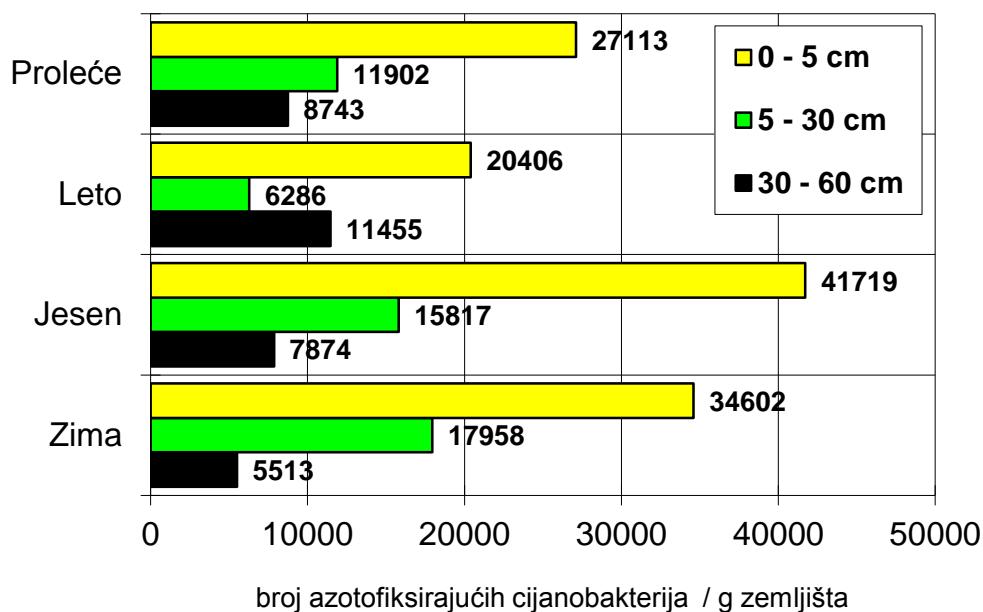


Graf. 30. Grafički prikaz brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u ritskoj crnici (Bečej)

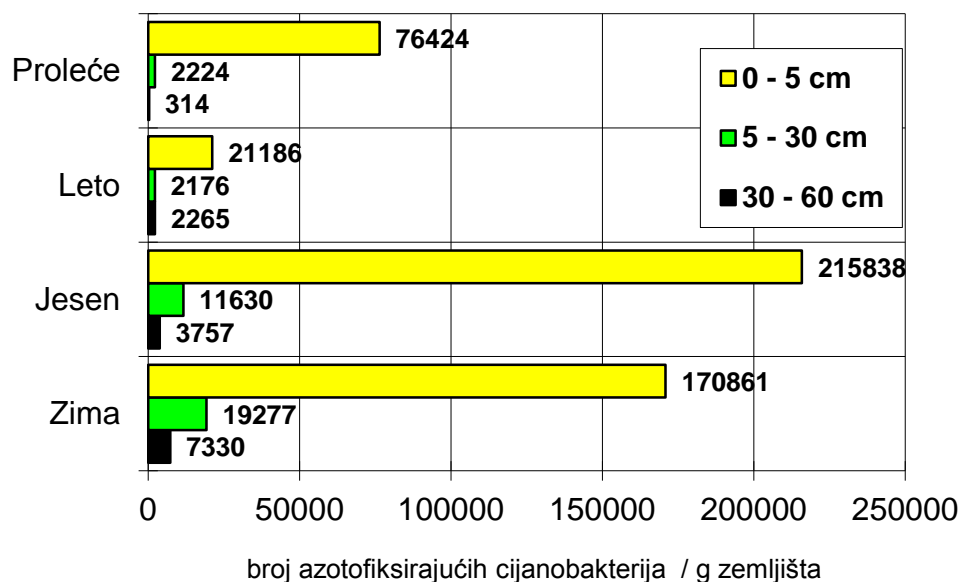


Graf. 31. Grafički prikaz brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u ritskoj crnici (SRP "Carska bara")

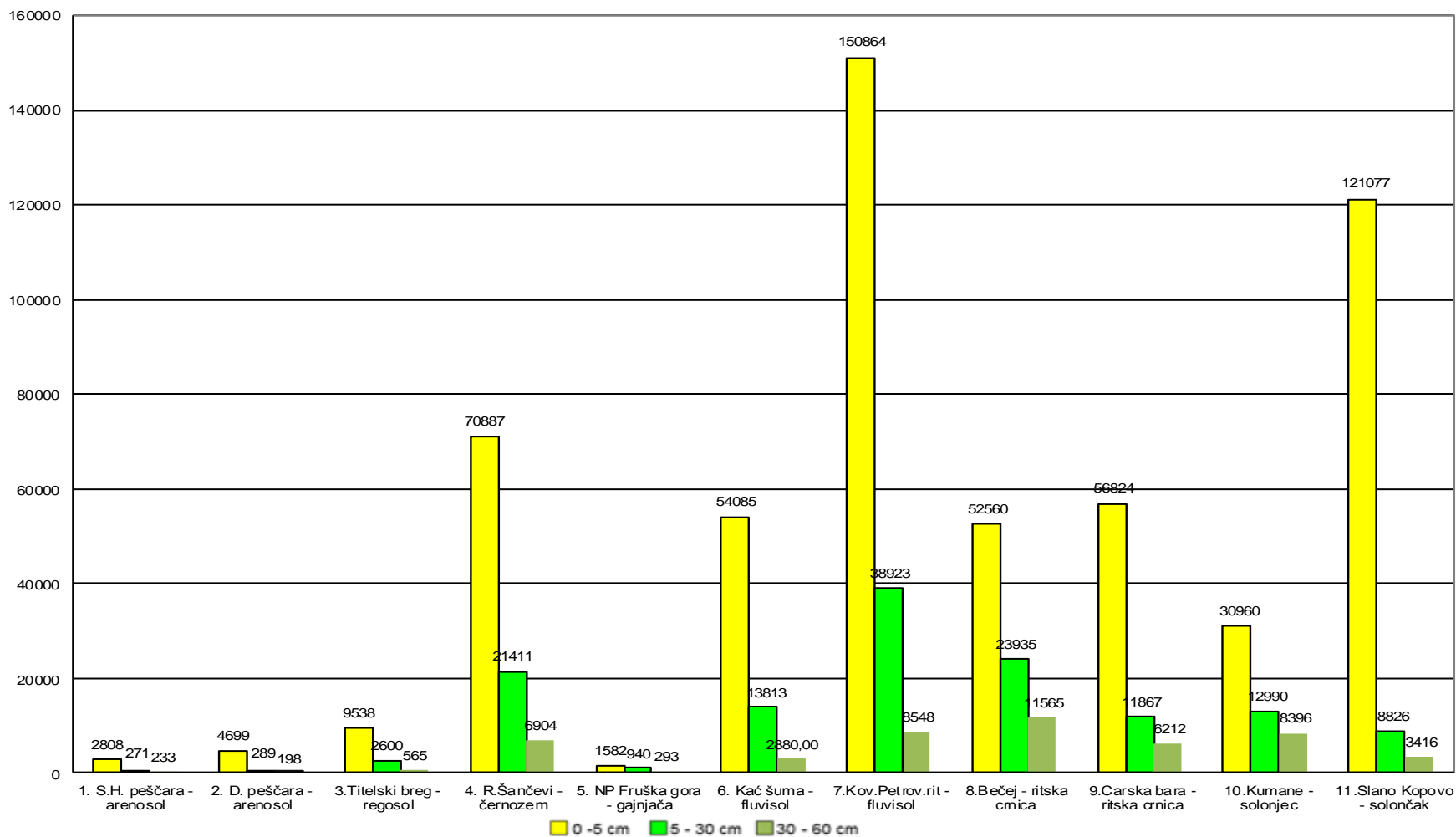




Graf. 32. Grafički prikaz brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u solonjecu (Kumane)



Graf. 33. Grafički prikaz brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u solončaku (SRP "Slano Kopovo")



Graf. 34. Grafički prikaz brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u zemljištima Vojvodine, godišnji prosek

Tabela 10. Fischer LSD test homogenosti varijansi za brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija u ispitivanim zemljištima, sezona proleće 2010, za verovatnoću  $p=0,05$ 

Broj	Lokalitet	Tip zemljišta	Dubina (cm)	Broj cijanobakterija /gr zemljišta	Log. broja cijanobakterija
1.	PIO "Subotička peščara"	arenosol	0-5	1300,46	3,11 kji*
			5-30	255,65	2,39 m
			30-60	127,01	2,02 n
2.	SRP "Deliblatska peščara"	arenosol	0-5	2074,38	3,31 ihg
			5-30	454,24	2,64 ml
			30-60	102,17	2,00 n
3.	SRP "Titelski breg"	regosol	0-5	6110,51	3,78 fed
			5-30	1910,59	3,25 jihg
			30-60	623,93	2,95 kj
4.	Rimski Šančevi	černozem	0-5	15416,19	4,17 cb
			5-30	3507,50	3,51 gfe
			30-60	1404,65	3,11 kji
5.	NP "Fruška gora"	gajnjača	0-5	1320,28	3,11 kji
			5-30	769,31	2,84 lk
			30-60	265,98	2,40 m
6.	Kačka šuma	fluvisol	0-5	57358,15	4,73 a
			5-30	6609,32	3,79 ed
			30-60	3154,81	3,48 hgf
7.	SRP "Koviljsko - petrovaradinski rit"	fluvisol	0-5	69837,18	4,83 a
			5-30	3026,77	3,47 hg
			30-60	1617,92	3,16 ji
8.	Bečej	Ritska crnica	0-5	9178,25	3,94 dc
			5-30	944,52	2,96 kj
			30-60	427,78	2,56 ml
9.	SRP "Carska bara"	Ritska crnica	0-5	15416,19	4,17 cb
			5-30	3507,50	3,51 gfe
			30-60	1404,65	3,11 kji
10.	Kumane	solonjec	0-5	27113,61	4,42 b
			5-30	11902,13	4,06 dc
			30-60	8743,31	3,93 dc
11.	SRP "Slano Kopovo"	solončak	0-5	76424,66	4,86 a
			5-30	2224,96	3,26 ihg
			30-60	314,08	2,47 m

\*Različita slova ukazuju na postojanost statistički značajne razlike između varijanti na osnovu Fischer LSD testa homogenosti varijansi za verovatnoću  $p=0,05$

Tabela 11. Fischer LSD test homogenosti varijansi za brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija u ispitivanim zemljištima, sezona leto 2010, za verovatnoću  $p=0,05$ 

Broj	Lokalitet	Tip zemljišta	Dubina (cm)	Broj cijanobakterija /gr zemljišta	Log. broja cijanobakterija
1.	PIO "Subotička peščara"	arenosol	0-5	521,87	2,71 on*
			5-30	126,96	2,09 rq
			30-60	83,81	1,91 r
2.	SRP "Deliblatska peščara"	arenosol	0-5	7012,49	3,84 kjhng
			5-30	207,70	2,22 qp
			30-60	99,34	1,97 rq
3.	SRP "Titelski breg"	regosol	0-5	4055,82	3,57 mlkj
			5-30	789,81	2,84 n
			30-60	379,16	2,52 po
4.	Rimski Šančevi	černozem	0-5	15219,19	4,17 fedc
			5-30	7600,94	3,87 jihgf
			30-60	4428,75	3,63 lkji
5.	NP "Fruška gora"	gajnjača	0-5	402,71	2,59 on
			5-30	163,02	1,93 rq
			30-60	322,07	2,49 po
6.	Kačka šuma	fluvisol	0-5	66515,89	4,81 a
			5-30	29216,15	4,46 cb
			30-60	4191,11	3,55 mlk
7.	SRP "Koviljsko - petrovaradinski rit"	fluvisol	0-5	86858,26	4,92 a
			5-30	32194,64	4,49 b
			30-60	6406,25	3,74 kjih
8.	Bečej	Ritska crnica	0-5	14354,02	4,15 fed
			5-30	8844,81	3,92 ihgf
			30-60	9491,17	3,96 hgfe
9.	SRP "Carska bara"	Ritska crnica	0-5	4055,82	3,57 mlkj
			5-30	789,81	2,84 n
			30-60	379,16	2,52 po
10.	Kumane	solonjec	0-5	20406,05	4,30 dcb
			5-30	6286,48	3,79 kjihg
			30-60	11455,39	4,05 gfed
11.	SRP "Slano Kopovo"	solončak	0-5	21186,74	4,32 dcb
			5-30	2176,86	3,30 m
			30-60	2265,64	3,35 ml

\*Različita slova ukazuju na postojanost statistički značajne razlike između varijanti na osnovu Fischer LSD testa homogenosti varijansi za verovatnoću  $p=0,05$

Tabela 12. Fischer LSD test homogenosti varijansi za brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija u ispitivanim zemljištima, sezona jesen 2010, za verovatnoću  $p=0,05$ 

Broj	Lokalitet	Tip zemljišta	Dubina (cm)	Broj cijanobakterija /gr zemljišta	Log. broja cijanobakterija
1.	PIO "Subotička peščara"	arenosol	0-5	4324,24	3,63 ih*
			5-30	346,44	2,53 l
			30-60	406,03	2,57 l
2.	SRP "Deliblatska peščara"	arenosol	0-5	3535,24	3,54 i
			5-30	81,70	1,79 n
			30-60	72,57	1,85 n
3.	SRP "Titelski breg"	regosol	0-5	10646,25	4,02 gf
			5-30	2413,70	3,38 ji
			30-60	436,16	2,59 l
4.	Rimski Šančevi	černozem	0-5	116443,87	5,00 b
			5-30	24927,08	4,39 ed
			30-60	12269,93	4,08 gf
5.	NP "Fruška gora"	gajnjača	0-5	209,81	2,21 m
			5-30	1026,23	3,00 k
			30-60	223,92	2,34 ml
6.	Kačka šuma	fluvisol	0-5	15675,91	4,19 fe
			5-30	10741,21	4,01 gf
			30-60	1173,72	3,06 k
7.	SRP "Koviljsko - petrovaradinski rit"	fluvisol	0-5	254218,95	5,40 a
			5-30	73933,14	4,84 cd
			30-60	5176,87	3,64 ih
8.	Bečej	Ritska crnica	0-5	35045,36	4,54 d
			5-30	42833,01	4,63 dc
			30-60	27642,69	4,42 ed
9.	SRP "Carska bara"	Ritska crnica	0-5	133258,33	5,12 ba
			5-30	10700,29	4,01 gf
			30-60	1866,36	3,22 kj
10.	Kumane	solonjec	0-5	41719,50	4,59 dc
			5-30	15817,23	4,19 fe
			30-60	7874,03	3,84 hg
11.	SRP "Slano Kopovo"	solončak	0-5	215838,54	5,32 a
			5-30	11630,22	4,02 gf
			30-60	3757,16	3,52 i

\*Različita slova ukazuju na postojanost statistički značajne razlike između varijanti na osnovu Fischer LSD testa homogenosti varijansi za verovatnoću  $p=0,05$

Tabela 13. Fischer LSD test homogenosti varijansi za brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija u ispitivanim zemljištima, sezona zima 2010, za verovatnoću  $p=0,05$ 

Broj	Lokalitet	Tip zemljišta	Dubina (cm)	Broj cijanobakterija /gr zemljišta	Log. broja cijanobakterija
1.	PIO "Subotička peščara"	arenosol	0-5	5089,49	3,69 kji*
			5-30	360,58	2,39 n
			30-60	316,69	2,49 n
2.	SRP "Deliblatska peščara"	arenosol	0-5	6177,64	3,78 jih
			5-30	415,89	2,60 n
			30-60	521,88	2,63 n
3.	SRP "Titelski breg"	regosol	0-5	17342,25	4,23 f
			5-30	5291,65	3,71 jih
			30-60	852,71	2,91 m
4.	Rimski Šančevi	černozem	0-5	136473,58	5,1 lab
			5-30	49610,59	4,69 cd
			30-60	9517,06	3,97 hg
5.	NP "Fruška gora"	gajnjača	0-5	4398,82	3,63 kj
			5-30	1803,95	3,24 l
			30-60	362,97	2,55 n
6.	Kačka šuma	fluvisol	0-5	76794,36	4,88 cb
			5-30	8687,74	3,90 ih
			30-60	3004,93	3,44 lk
7.	SRP "Koviljsko - petrovaradinski rit"	fluvisol	0-5	192544,53	5,27 a
			5-30	46541,70	4,66 dc
			30-60	20995,10	4,31 fe
8.	Bečej	Ritska crnica	0-5	151665,42	5,17 a
			5-30	43121,65	4,62 dc
			30-60	8702,32	3,93 ihg
9.	SRP "Carska bara"	Ritska crnica	0-5	19681,90	4,29 fe
			5-30	14935,03	4,17 gf
			30-60	8997,01	3,95 ihg
10.	Kumane	solonjec	0-5	34602,15	4,52 ed
			5-30	17958,52	4,25 f
			30-60	5513,24	3,70 ji
11.	SRP "Slano Kopovo"	solončak	0-5	170861,81	5,22 a
			5-30	19277,48	4,26 fe
			30-60	7330,91	3,82 jih

\*Različita slova ukazuju na postojanost statistički značajne razlike između varijanti na osnovu Fischer LSD testa homogenosti varijansi za verovatnoću  $p=0,05$

### 6.2.3. Ukupna brojnost bakterija u zemljištima Vojvodine

Bakterije su najbrojnija grupa mikroorganizama u zemljištu, i njihova brojnost se kreće od nekoliko stotina hiljada do jedne ili više milijardi po gramu apsolutno suvog zemljišta. Ukupna brojnost bakterija ustvari predstavlja broj izraslih bakterija na ne selektivnoj podlozi i zemljišnom agaru. Najveća brojnost i biohemijska aktivnost bakterija utvrđena je u zemljištu sa visokim sadržajem organske materije, odnosno humusa. Broj aerobnih bakterija je najveća u površinskim slojevima zemljišta, gde je najveća količina kiseonika, a sa dubinom zemljišta brojnost opada. U odnosu na reakciju zemljišta bakterije su prilagođene da žive u kiselim, neutralnim i alkalnim zemljištima. Najveća brojnost je utvrđena u neutralnim zemljištima. Bakterije imaju veliki značaj u pedogenezi tj. stvaranju zemljišta kao i u ostvarivanju njegove plodnosti, (Govedarica i Jarak, 1995).

Brojnost mikroorganizama u zemljištu odavno je uzimana kao izvesno merilo pri oceni zemljišnog stanja i zemljišne plodnosti. Obično se uzimalo da su plodnija zemljišta koja su bogatija mikroorganizmima, nego ona koja su njima siromašnija. Nema sumnje da količina mikroorganizama u zemljištu može biti izvesna karakteristika zemljišne plodnosti, ali to nikako ne znači da su takva zemljišta u svakom slučaju i sa većom efektivnom plodnošću.

Zemljišna plodnost svakako ne zavisi samo od karakteristika zemljišnih mikroorganizama, veći i od drugih uslova, fizičkih i hemijskih osobina zemljišta. Na primer unošenjem velikih količina organskih ostataka siromašnih azotom može se izazvati pojava velike brojnosti mikroorganizama, ali to ne znači da će takvo zemljište pokazati i veću plodnost. Zbog toga se ne može govoriti o sigurnoj pozitivnoj korelaciji između broja mikroorganizama i zemljišne plodnosti, jer nekada ima i obrnutih slučajeva, (Tešić i Todorović, 1988).

Rezultati koji se odnose na ukupnu brojnost bakterija u ispitivanim zemljištima su prikazani u Grafikonima 35 - 45. Rezultati govore o zavisnosti ukupnog broja bakterija od: tipa zemljišta, od dubine pedološkog profila zemljišta (0-5 cm, 5-30 cm, 30-60 cm) i od godišnjeg doba (proleće, leto, jesen i zima). U Tabelama 15 - 18. prikazani podaci statističke analize



Fischerovim LSD testom homogenosti varijansi za ukupan broj bakterija u ispitivanim zemljištima, po sezonama za verovatnoću  $p=0,05$ .

### Ukupna brojnost bakterija u zavisnosti od tipa zemljišta

Upoređujući prosečnu ukupnu brojnost bakterija u ispitivanim zemljištima ustanovili smo da je najveća brojnost bakterija iznenađujuće bila u zemljištu solončak (Slano Kopovo) i iznosila je u površinskom sloju  $787,51 \times 10^6$  bakterija po gramu apsolutno suvog zemljišta, (Grafikon 45.). Ovo zemljište se odlikuje niskim procentom azota svega 0,8%N, ali ima baznu reakciju zemljišta, pH iznosi 8.19, a količina AL-K<sub>2</sub>O iznosi 39,19 mg/100g, Tabela 5. Površinski sloj solončaka na Slanom Kopovu je tokom zimskog, prolećnog i ponekad jesenjeg perioda prekriven slojem vode, poreklom podzemne ili atmosferske, te pogoduje razvoju algi koje grade modro-zelene želatinozne prevlake. Verovatno ti sluzni omotači algi predstavljaju odličnu podlogu za razvoj raznih grupa mikroorganizama i to može delimično objasniti ovakvu ukupnu brojnost bakterija.

Fišerov LSD test homogenosti je pokazao da postoji statistički značajna razlika u ukupnoj brojnosti bakterija u zemljištu solončak na lokalitetu SRP Slano Kopovo u odnosu na sva druga istraživana zemljišta pri verovatnoći  $p=0.05$ , Tabela 15 - 18.

Regosol, na lokalitetu SRP Titelski breg, u sloju od 5-30cm ima drugu ukupnu brojnost bakterija i ona u proseku iznosi  $742,57 \times 10^6$  bakterija po gramu apsolutno suvog zemljišta, Grafikon 37 i 45. Na blagim padinama Titelskog brega, gde su uzeti uzorci, regosol ima dobro razvijen humusni sloj sa 2.54% humusai 1.47% ugljenika. Ovo se tumači razvijenom vegetacijom na blagim padinama brega. Ovo zemljište se odlikuje i najvećim sadržajem fosfata (AL-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 46.13 mg-100g) i kalijuma (AL-K<sub>2</sub>O 54.78% mg-100g) u odnosu na sva ostala ispitivana zemljišta. Reakcija je blago alkalna pH 7.32 u vodi. Navedeni uslovi sigurno pogoduju dobrom razvoju mikroorganizama.

Ritska crnica, na lokalitetu Bečej, je treći lokalitet po ukupnoj brojnosti bakterija i u sloju od 5-30cm u proseku iznosi  $691,18 \times 10^6$  bakterija po gramu apsolutno suvog zemljišta, Grafikon 42 i 45. Ova obrađena ritska crnica se odlikuje velikom količinom humusa 3,63%, i velikom količinom azota 0,24% .

Černozem, na području Rimskih Šančeva, je četvrti lokalitet po ukupnoj brojnosti bakterija, u površinskom sloju zemljišta u proseku iznosi  $229,14 \times 10^6$  bakterija po gramu apsolutno suvog zemljišta, Grafikon 38 i 45. Ispitivani černozem se odlikuje bazičnom pH vrednošću u vodi (pH 8.11), a sadržaj humusa i azota je treći po visini u odnosu na druge tipove zemljišta, humus iznosi 2.78%, a količina ukupnog azota 0,18 %.

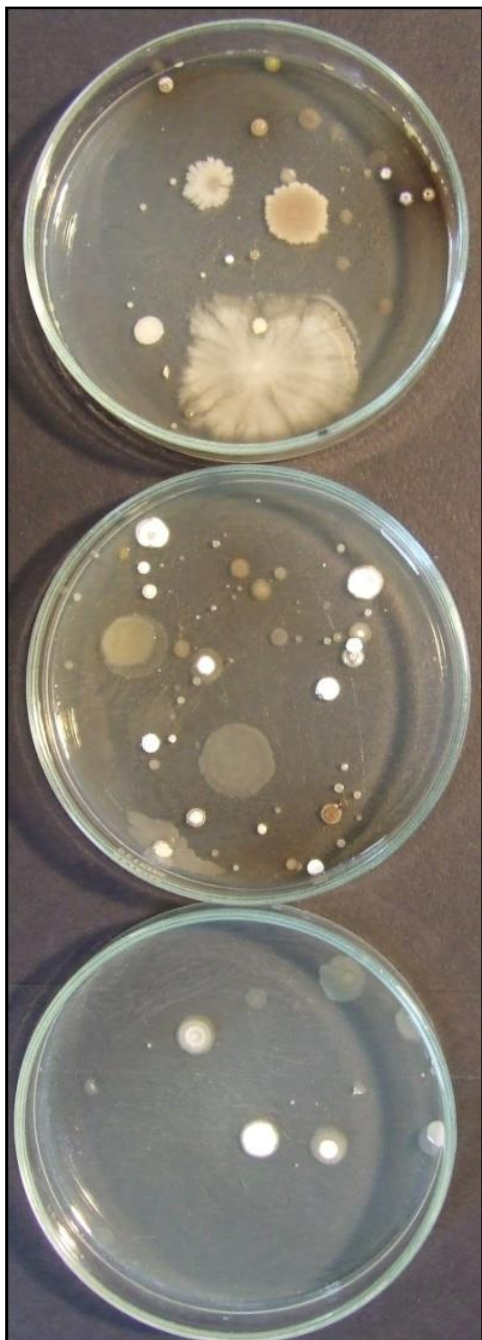
U grupu zemljišta sa srednjom ukupnom brojnošću bakterija spadaju: arenosol, PIO "Subotička peščara" ( $189,86 \times 10^6$  bakterija u površinskom sloju), ritska crnica, Carska bara ( $154,19 \times 10^6$ ), fluvisol, lokalitet Kačka šuma ( $128,65 \times 10^6$ ), solonjec, Kumane ( $111,61 \times 10^6$ ) i fluvisol, lokalitet SRP "Koviljsko petrovaradinski rit" ( $92,26 \times 10^6$ ), Grafikon 45.



Slika 32. Izgled kolonija bakterija na zemljišnom agaru po Pochonu, arenosol lokalitet PIO "Subotička peščara", (foto: Fojkar O.)

Zemljišta sa najnižom ukupnom brojnošću bakterija su gajnjača u NP Fruška gora ( $40,91 \times 10^6$  bakterija po gr. zemljišta u površinskom sloju), Grafikon 39 i 45. i arenosol u Deliblatskoj peščari ( $33,1 \times 10^6$  bakterija po gr. zemljišta u površinskom sloju), Grafikon 36 i 45. Gajnjača je najkiselije zemljište sa najnižom pH vrednošću 5,22. Zemljište arenosol na Deliblatskoj peščari se odlikuje najnižim vredostima humusa, azota, ugljenika, fosfata i kalijuma što opravdava ovako malu ukupnu brojnost bakterija.

## Ukupna brojnost bakterija u zavisnosti od dubine pedološkog profila



Ukupna brojnost bakterija je veoma varirala u zavisnosti od dubine zemljišta. Kod najvećeg broja ispitivanih tipova zemljišta ukupna brojnost bakterija je bila najveća u površinskom sloju zemljišta, 0-5 cm dubine. Kod osam od jedanaest istraživanih zemljišta ukupna brojnost bakterija je bila najveća u površinskom sloju i to kod: solončaka, Grafikon 44 i 45., solonjeca, ritske crnice (SRP "Carska bara"), fluvisola (Kačka šuma), fluvisola (SRP "Koviljsko petrovardinski rit"), černozema, gajnjače i arenosola (PIO "Subotička peščara"), Grafikon 45.

Kod tri ispitivana zemljišta je ukupna brojnost bakterija bila veća u sloju od 5-30 cm nego u površinskom sloju i to kod: regosola, ritske crnice (Bečej) i arenosola (SRP "Deliblatska peščara").

Slika 33. Određivanje ukupnog broja bakterija u tri sloja zemljišta solončak, lokalitet SRP "Slano Kopovo", a) 0-5 cm, b) 5-30 cm, c) 30-60 cm., zemljišni agar po Pochonu.

Kod šest od jedanaest ispitivanih zemljišta ukupna brojnost bakterija je opadala sa dubinom zemljišta i bila je najmanja u najdubljem sloju od 30 do 60 cm. To je slučaj sa sledećim tipovima zemljišta: arenosol (PIO "Subotička peščara"), arenosol (SRP "Deliblatska peščara"), fluvisola (Kačka šuma), fluvisola (SRP "Koviljsko petrovardinski rit"), ritske crnice (SRP "Craska bara") i solonjec (Kumane).

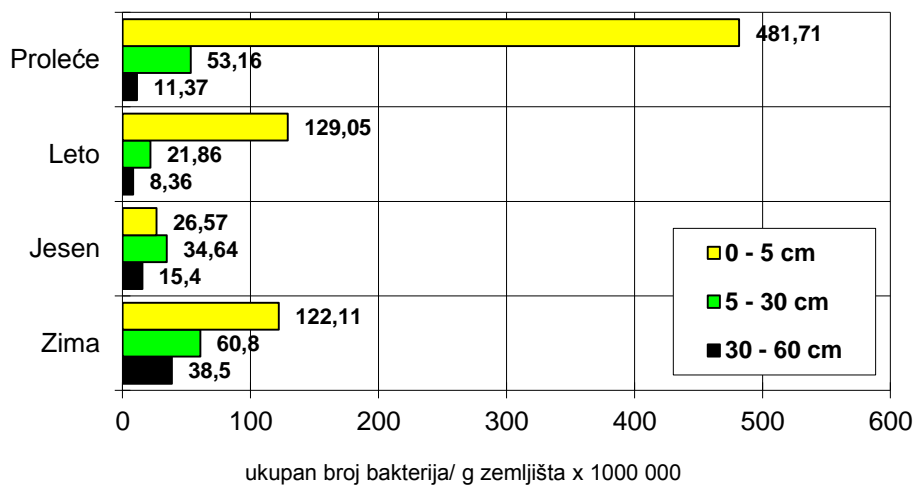
Površinski horizonti se najčešće odlikuju i najvišim sadržajem humusa pa je verovatno i to faktor koji utiče na ovakvu distribuciju bakterija. Sem toga površinski slojevi su bolje aerisani od dubljih slojeva te omogućavaju aerobnim mikroorganizmima da se dobro razvijaju.

### **Ukupna brojnost bakterija u zavisnosti od godišnjeg doba**

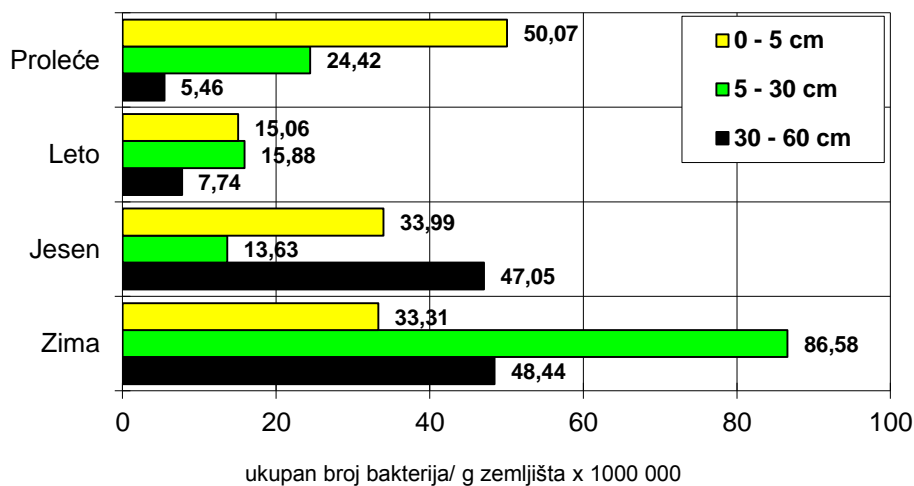
Ukupna brojnost bakterija u ispitivanim zemljištima je veoma varirala u zavisnosti od godišnjeg doba. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su variranja bila znatno veća u površinskom sloju zemljišta 0-5cm nego u dubljim slojevima, 5-30cm, 30-60cm.

Najmanja ukupna brojnost bakterija je kod najvećeg broja ispitivanih zemljišta utvrđena u letnjem periodu, i to kod sedam od jedanaest ispitivanih zemljišta. U letnjem periodu najmanja ukupna brojnost bakterija je bila kod: arenosola (SRP "Deliblatska peščara"), černozema (Rimski Šančevi), gajnjače (NP Fruška gora), ritske crnice (Bečej), ritske crnice (SRP "Carska bara"), solonjeca (Kumane) i solončaka (SRP "Slano Kopovo").

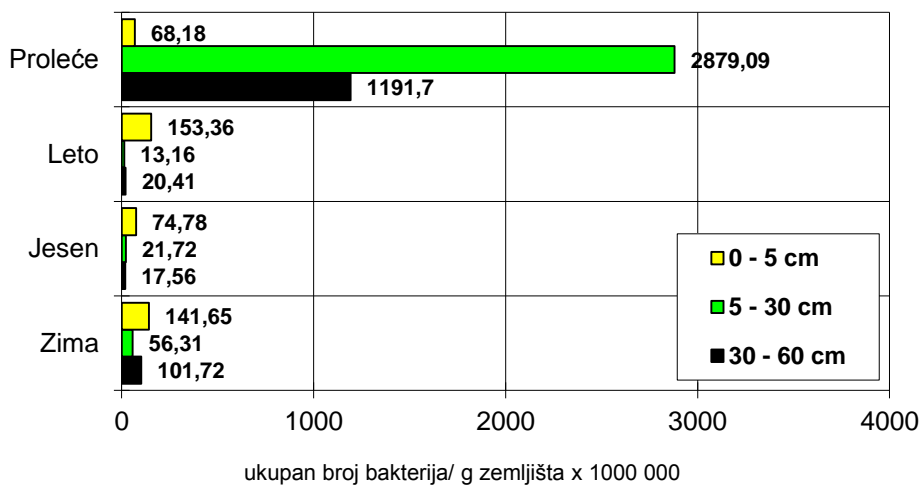
Najveća brojnost bakterija kod najvećeg broja ispitivanih zemljištima u površinskim slojevima je ustanovljena u prolećnom periodu. Kod sedam ispitivanih zemljišta je ustanovljena najveća brojnost bakterija u prolećnom periodu i to kod: arenosola (PIO "Subotička peščara")  $481,71 \times 10^6$  bakterija po gramu apsolutno suvog zemljišta, arenosola (SRP "Deliblatska peščara")  $50,07 \times 10^6$ , regosola (SRP "Titelski breg")  $2879,09 \times 10^6$ , černozema (Rimski Šančevi)  $486,78 \times 10^6$ , fluvisola (Kačka šuma)  $207,44 \times 10^6$ , ritske crnice (Bečej)  $2417,99 \times 10^6$  i solončaka (SRP "Slano Kopovo")  $2891,07 \times 10^6$ .



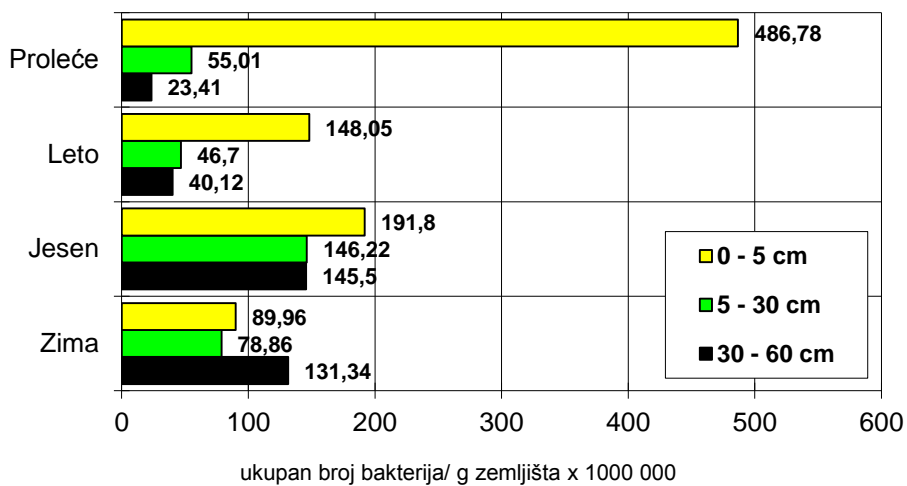
Graf. 35. Grafički prikaz ukupne brojnosti bakterija u arenosolu (PIO "Subotička peščara")



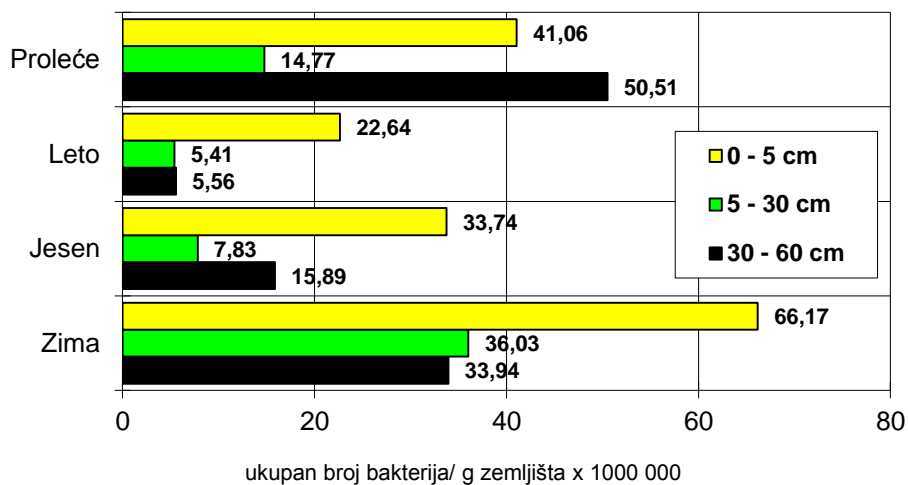
Graf. 36. Grafički prikaz ukupne brojnosti bakterija u arenosolu (SRP "Deliblatska peščara")



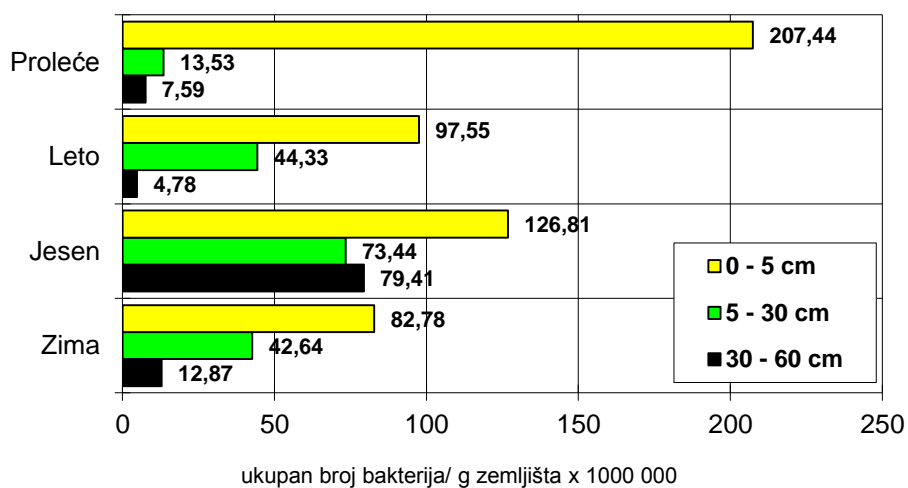
Graf. 37. Grafički prikaz ukupne brojnosti bakterija u regosolu (SRP "Titelski breg")



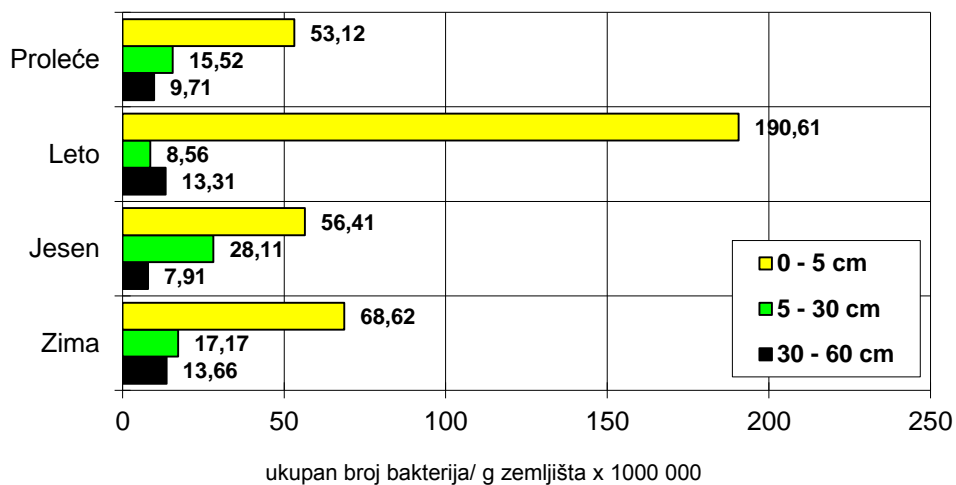
Graf. 38. Grafički prikaz ukupne brojnosti bakterija u černoze (Rimski Šančevi)



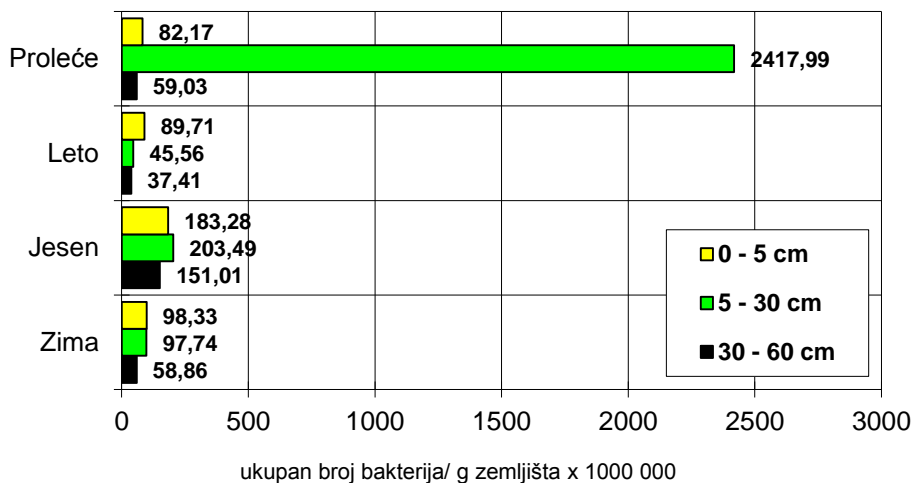
Graf. 39. Grafički prikaz ukupne brojnosti bakterija u gajnjači (NP "Fruška gora")



Graf. 40. Grafički prikaz ukupne brojnosti bakterija u fluvisolu (Kačka šuma)

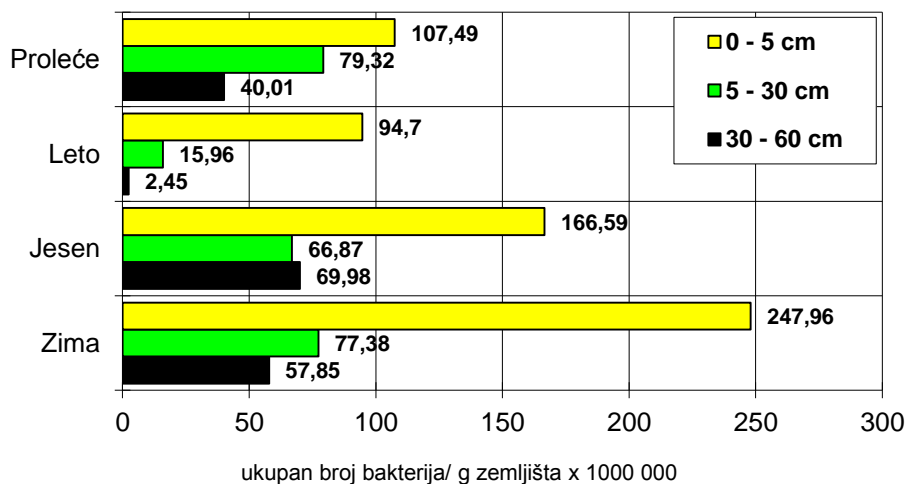


Graf. 41. Grafički prikaz ukupne brojnosti bakterija u fluvisolu (SRP "Koviljsko petrovaradinski rit")

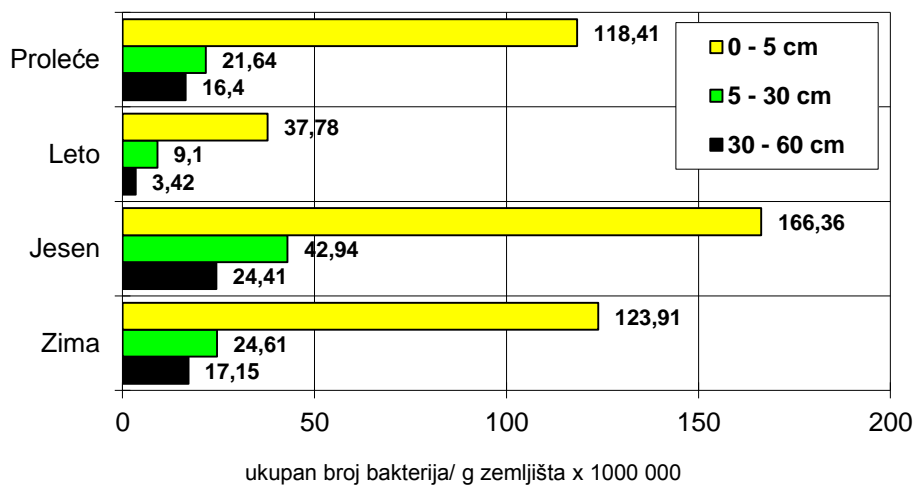


Graf. 42. Grafički prikaz ukupne brojnosti bakterija u ritskoj crnici (Bečej)

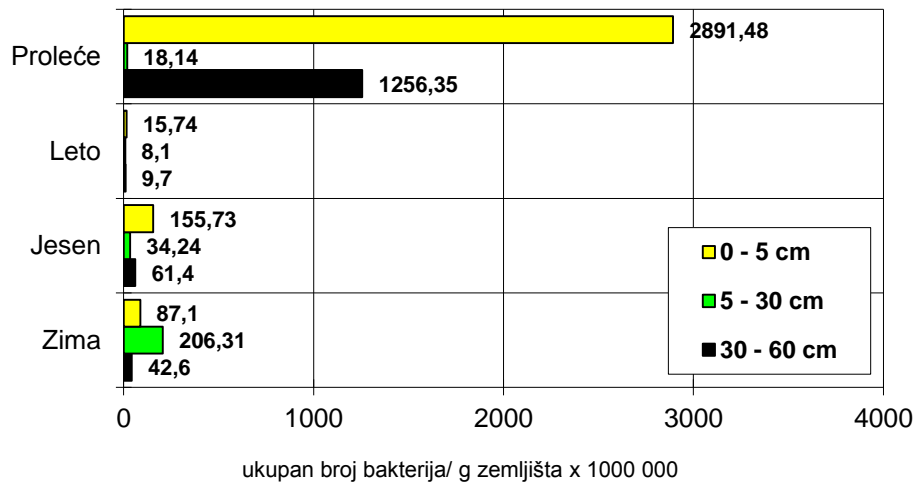




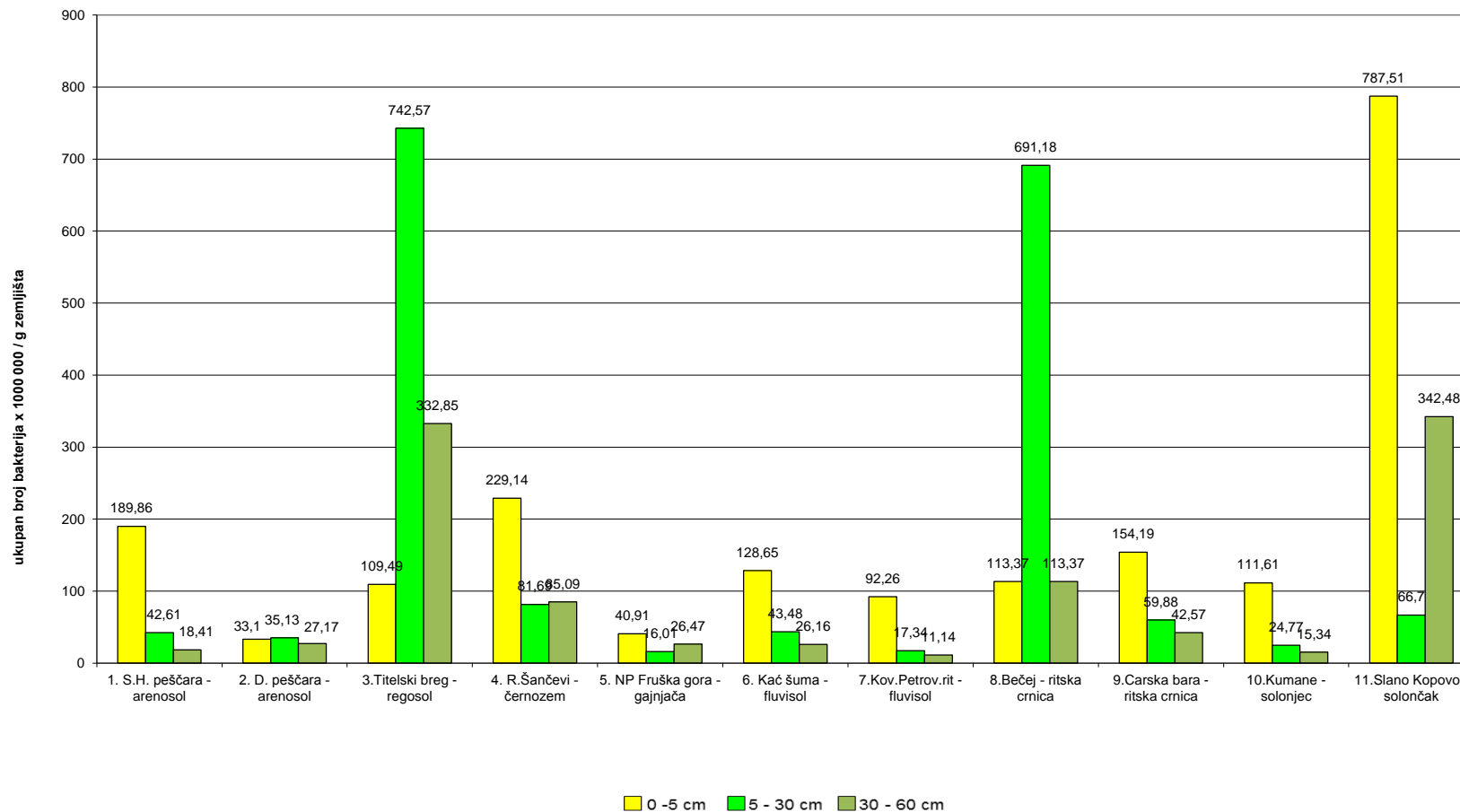
Graf. 42. Grafički prikaz ukupne brojnosti bakterija u ritskoj crnici (SRP "Carska bara")



Graf. 43. Grafički prikaz ukupne brojnosti bakterija u solonjecu (Kumane)



Graf. 44. Grafički prikaz ukupne brojnosti bakterija u solončaku (SRP "Slano Kopovo")



Graf. 45. Grafički prikaz prosečne godišnje ukupne brojnosti bakterija u zemljištima Vojvodine

Tabela 15. Fischer LSD test homogenosti varijansi za ukupan broj bakterija u ispitivanim zemljištima, sezona proleće 2010, za verovatnoću  $p=0,05$ 

Broj	Lokalitet	Tip zemljišta	Dubina (cm)	UKUPAN BROJ MO/gr zemljišta X 1000 000	Log.Ukup.broja bakterija
1.	PIO "Subotička peščara"	arenosol	0-5	481,71	3,11 kji*
			5-30	53,16	2,39 m
			30-60	11,37	2,02 n
2.	SRP "Deliblatska peščara"	arenosol	0-5	50,07	3,31 ihg
			5-30	24,41	2,64 ml
			30-60	5,46	2,00 n
3.	SRP "Titelski breg"	regosol	0-5	68,18	3,78 fed
			5-30	2879,09	3,25 jihg
			30-60	1191,70	2,95 kj
4.	Rimski Šančevi	černozem	0-5	486,78	4,17 cb
			5-30	55,00	3,51 gfe
			30-60	23,41	3,11 kji
5.	NP "Fruška gora"	gajnjača	0-5	41,06	3,11 kji
			5-30	14,77	2,84 lk
			30-60	50,51	2,40 m
6.	Kačka šuma	fluvisol	0-5	207,44	4,73 a
			5-30	13,53	3,79 ed
			30-60	7,59	3,48 hgf
7.	SRP "Koviljsko - petrovaradinski rit"	fluvisol	0-5	53,12	4,83 a
			5-30	15,52	3,47 hg
			30-60	9,70	3,16 ji
8.	Bečej	Ritska crnica	0-5	82,17	3,94 dc
			5-30	2417,99	2,96 kj
			30-60	59,03	2,56 ml
9.	SRP "Carska bara"	Ritska crnica	0-5	107,49	3,85 d
			5-30	79,32	3,39 ihg
			30-60	40,01	3,19 jih
10.	Kumane	solonjec	0-5	118,41	4,42 b
			5-30	21,64	4,06 dc
			30-60	16,40	3,93 dc
11.	SRP "Slano Kopovo"	solončak	0-5	2891,48	4,86 a
			5-30	18,14	3,26 ihg
			30-60	1256,35	2,47 m

\*Različita slova ukazuju na postojanost statistički značajne razlike između varijanti na osnovu Fischer LSD testa homogenosti varijansi za verovatnoću  $p=0,05$

Tabela 16. Fischer LSD test homogenosti varijansi za ukupan broj bakterija u ispitivanim zemljištima, sezona leto 2010, za verovatnoću  $p=0,05$ 

Broj	Lokalitet	Tip zemljišta	Dubina (cm)	UKUPAN BROJ MO/gr zemljišta X 1000 000	Log. Ukup. broj bakterija
1.	PIO "Subotička peščara"	arenosol	0-5	129,0533	3,11 kji*
			5-30	21,86667	2,39 m
			30-60	8,363333	2,02 n
2.	SRP "Deliblatska peščara"	arenosol	0-5	15,06333	3,31 ihg
			5-30	15,88667	2,64 ml
			30-60	7,743333	2,00 n
3.	SRP "Titelski breg"	regosol	0-5	153,36	3,78 fed
			5-30	13,16	3,25 jihg
			30-60	20,41333	2,95 kj
4.	Rimski Šančevi	černozem	0-5	148,05	4,17 cb
			5-30	46,70667	3,51 gfe
			30-60	40,12667	3,11 kji
5.	NP "Fruška gora"	gajnjača	0-5	22,64667	3,11 kji
			5-30	5,413333	2,84 lk
			30-60	5,563333	2,40 m
6.	Kačka šuma	fluvisol	0-5	97,55	4,73 a
			5-30	44,33667	3,79 ed
			30-60	4,783333	3,48 hgf
7.	SRP "Koviljsko - petrovaradinski rit"	fluvisol	0-5	190,61	4,83 a
			5-30	8,563333	3,47 hg
			30-60	13,30667	3,16 ji
8.	Bečej	Ritska crnica	0-5	89,71	3,94 dc
			5-30	45,56333	2,96 kj
			30-60	37,40667	2,56 ml
9.	SRP "Carska bara"	Ritska crnica	0-5	94,70667	3,85 d
			5-30	15,96	3,39 ihg
			30-60	2,45	3,19 jih
10.	Kumane	solonjec	0-5	37,78333	4,42 b
			5-30	9,903333	4,06 dc
			30-60	3,42	3,93 dc
11.	SRP "Slano Kopovo"	solončak	0-5	15,74333	4,86 a
			5-30	8,106667	3,26 ihg
			30-60	9,7	2,47 m

\*Različita slova ukazuju na postojanost statistički značajne razlike između varijanti na osnovu Fischer LSD testa homogenosti varijansi za verovatnoću  $p=0,05$

Tabela 17. Fischer LSD test homogenosti varijansi za ukupan broj bakterija u ispitivanim zemljištima, sezona jesen 2010, za verovatnoću  $p=0,05$ 

Broj	Lokalitet	Tip zemljišta	Dubina (cm)	UKUPAN BROJ MO/gr zemljišta X 1000 000	Log. Ukup. broj bakterija
1.	PIO "Subotička peščara"	arenosol	0-5	26,57	3,11 kji*
			5-30	34,64	2,39 m
			30-60	15,4	2,02 n
2.	SRP "Deliblatska peščara"	arenosol	0-5	33,99	3,31 ihg
			5-30	13,63	2,64 ml
			30-60	47,05667	2,00 n
3.	SRP "Titelski breg"	regosol	0-5	74,78	3,78 fed
			5-30	21,72	3,25 jihg
			30-60	17,56333	2,95 kj
4.	Rimski Šančevi	černozem	0-5	191,8067	4,17 cb
			5-30	146,2267	3,51 gfe
			30-60	145,5033	3,11 kji
5.	NP "Fruška gora"	gajnjača	0-5	33,74667	3,11 kji
			5-30	7,833333	2,84 lk
			30-60	15,89667	2,40 m
6.	Kačka šuma	fluvisol	0-5	126,81	4,73 a
			5-30	73,44667	3,79 ed
			30-60	79,41333	3,48 hgf
7.	SRP "Koviljsko - petrovaradinski rit"	fluvisol	0-5	56,40667	4,83 a
			5-30	28,11333	3,47 hg
			30-60	7,906667	3,16 ji
8.	Bečej	Ritska crnica	0-5	183,2833	3,94 dc
			5-30	203,4967	2,96 kj
			30-60	151,0033	2,56 ml
9.	SRP "Carska bara"	Ritska crnica	0-5	166,5967	3,85 d
			5-30	66,87333	3,39 ihg
			30-60	69,98	3,19 jih
10.	Kumane	solonjec	0-5	166,36	4,42 b
			5-30	42,94333	4,06 dc
			30-60	24,41	3,93 dc
11.	SRP "Slano Kopovo"	solončak	0-5	155,73	4,86 a
			5-30	34,24667	3,26 ihg
			30-60	61,4	2,47 m

\*Različita slova ukazuju na postojanost statistički značajne razlike između varijanti na osnovu Fischer LSD testa homogenosti varijansi za verovatnoću  $p=0,05$

Tabela 18. Fischer LSD test homogenosti varijansi za ukupan broj bakterija u ispitivanim zemljištima, sezona zima 2010, za verovatnoću  $p=0,05$ 

Broj	Lokalitet	Tip zemljišta	Dubina (cm)	UKUPAN BROJ MO/gr zemljišta X 1000 000	Log. Ukup. broja bakterija
1.	PIO "Subotička peščara"	arenosol	0-5	122,1067	3,11 kji*
			5-30	60,8	2,39 m
			30-60	38,5	2,02 n
2.	SRP "Deliblatskapeščara"	arenosol	0-5	33,31	3,31 ihg
			5-30	86,58667	2,64 ml
			30-60	48,44333	2,00 n
3.	SRP "Titelskibreg"	regosol	0-5	141,6533	3,78 fed
			5-30	56,31667	3,25 jihg
			30-60	101,7267	2,95 kj
4.	RimskiŠančevi	černozem	0-5	89,96	4,17 cb
			5-30	78,86	3,51 gfe
			30-60	131,3467	3,11 kji
5.	NP "Fruškagora"	gajnjača	0-5	66,17	3,11 kji
			5-30	36,03333	2,84 lk
			30-60	33,94667	2,40 m
6.	Kačkašuma	fluvisol	0-5	82,78	4,73 a
			5-30	42,64333	3,79 ed
			30-60	12,87333	3,48 hgf
7.	SRP "Koviljsko - petrovaradinskirit"	fluvisol	0-5	68,62667	4,83 a
			5-30	17,17667	3,47 hg
			30-60	13,66	3,16 ji
8.	Bečej	Ritskacrnica	0-5	98,33667	3,94 dc
			5-30	97,74667	2,96 kj
			30-60	58,86333	2,56 ml
9.	SRP "Carskabara"	Ritskacrnica	0-5	247,96	3,85 d
			5-30	77,38333	3,39 ihg
			30-60	57,85333	3,19 jih
10.	Kumane	solonjec	0-5	123,91	4,42 b
			5-30	24,61333	4,06 dc
			30-60	17,15	3,93 dc
11.	SRP "SlanoKopovo"	solončak	0-5	87,1	4,86 a
			5-30	206,3133	3,26 ihg
			30-60	42,60333	2,47 m

\*Različita slova ukazuju na postojanost statistički značajne razlike između varijanti na osnovu Fischer LSD testa homogenosti varijansi za verovatnoću  $p=0,05$

### 6.3. TAKSONOMSKA PRIPADNOST IZOLOVANIH SOJEVA AZOTOFIKSIRAJUĆIH CIJANOBAKTERIJA

U radu je izolovano 30 sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija. Najveći broj izolovanih sojeva pripada rodu *Nostoc*, 19 sojeva, Tabela 19. Četiri soja pripada rodu *Anabaena*, 4 soja rodu *Cylindrospermum*, i po jedan izolovani soj rodovima *Calothrix*, *Tolypothrix* i *Phormidium*, Tabela 20.

Najveći broj sojeva roda *Nostoc* izolovan je iz tipa zemljišta solonjec (Kumane), 12 sojeva, četiri *Nostoc*-a je izolovano iz ritske crnice (Bečej), dva iz černozema (Rimski Šančevi) i jedan iz solončaka (Slano Kopovo). Tri soja roda *Anabaena* je izolovano iz černozema (Rimski Šančevi), a jedan iz ritske crnice (Bečej). Soj iz ritske crnice je determinisan kao *Anabaena sphaerica* f. *conoidea*. Od četiri izolovana soja *Cylindrospermum*-a tri je izolovano iz arenosola (PIO "Subotička pešćara"), a jedan iz černozema. Svi sojevi *Cylindrospermum*-a izolovani iz arenosola pripadaju vrsti *Cylindrospermum stagnale*. Soj vrste *Calothrix elenkinii* je izolovan iz arenosola (PIO "Subotička pešćara"), *Tolypothrix tenuis* f. *terrestris* je izolovan iz solonjeca (Kumane), a *Phormidium ambiguum* je izolovan iz černozema (Rimski Šančevi).

Razdeo *Cyanobacteria* ili *Cyanophyta* se deli na tri klase ( Starmach; 1966; Cvijan i Blaženčić, 1996): *Chroococcophyceae*, *Chamaesiphonophyceae* i *Hormogoniophyceae*. Svi naši izolovani sojevi spadaju u klasu *Hormogoniophyceae* i potklasu *Nostocophycidae*.

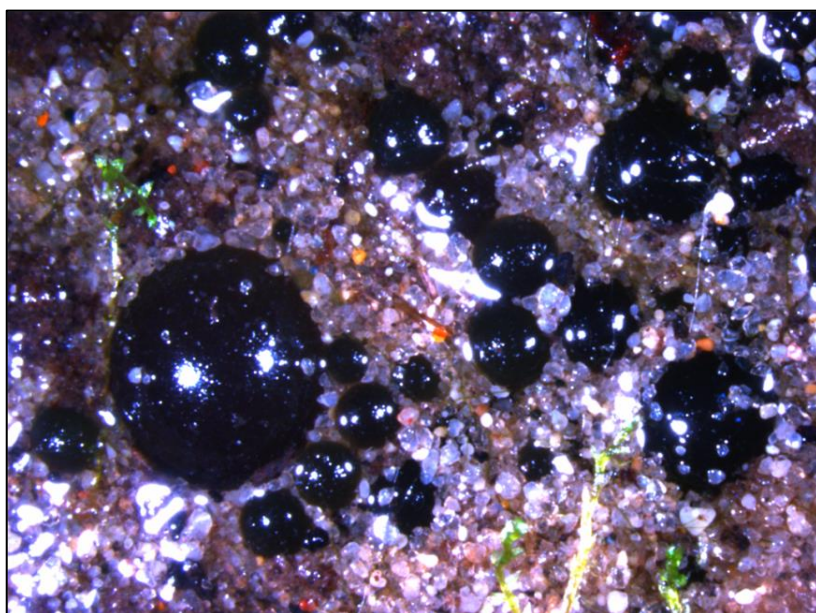
Rodovi *Nostoc*, *Anabaena* i *Cylindrospermum* spadaju u red *Nostocales* i familiju *Nostocaceae*. Cijanobakterije reda *Nostocales* imaju trihome koji su uvek izgrađeni od jednog niza ćelija, tj. ćelije se dele uvek u jednom pravcu, poprečno u odnosu na uzdužnu osu trihoma. U retkim slučajevima, kao kod razvojnih stadijuma, može da dođe i do uzdužne deobe ćelija i obrazovanja trihoma čiji je jedan deo izgrađen od dva niza ćelija. Pored vegetativnih ćelija, u građi trihoma obično učestvuju i heterociste i akineti. Trihomi su ne granati ili je grananje samo prividno. Kod najvećeg broja predstavnika trihomi nisu diferencirani na osnovu i vrh, međutim kod nekih predstavnika ova diferencijacija je jasno izražena. Rast trihoma je vršni i interkalarni.



Kod predstavnika koji imaju sluzni omotač sara, u njoj se najčešće nalazi jedan trihom (Cvijan i Blaženčić, 1996).

Predstavnici familije *Nostocaceae* imaju konce koji nisu granati i izgrađeni su od jednog niza ćelija. Rastu interkalarno, najčešće su celom dužinom jednake širine, retko se na oba kraja sužavaju i završavaju končasto-izduženim ćelijama (rod *Aphanizomenon*). Sara je sluzava, često debela, u vodi se često rasplinjava i nije uočljiva. Konci mogu da se razvijaju u grupama i tada grade mikroskopske ali i veoma krupne kolonije, specifičnog izgleda. Heterociste mogu biti interkalarne i terminalne, ponekad ih nema kao kod roda *Pseudanabaena* ili pri rastu cijanobakterija u sredinama bogatim azotnim jedinjenjima. Ako postoje, spore se razvijaju pojedinačno ili po nekoliko zajedno, u nizu. Kratke pokretne niti, hormogonije, se obrazuju raspadanjem konca na veći broj kraćih niti.

Sve vrste roda *Nostoc* su kolonijalne alge. Mlade kolonije su loptastog oblika, kasnije mogu imati različit oblik ili su kolonije bezoblične. Na slici 34. se vide tipične loptaste kolonije mrke boje nostoka sa lokaliteta PIO "Subotička pešćara" snimljene pod lupom. Kolonije poseduju debele sluzne omotače koji se obično u unutrašnjosti kolonije rasplinjavaju. Konci *Nostoca* su celom dužinom jednake širine ili se slabo sužavaju uz heterociste. Heterociste su interkalarne, pojedinačne ili po nekoliko u nizu. Pri obrazovanju hormogonija heterociste se mogu naći na krajevima trihoma. U nepovoljnim uslovima življenja vegetativne ćelije se transformišu u spore, pojedinačno ili u nizu.



Slika 34. Izgled kolonija *Nostoc* sp. među zrnima peska, lokalitet PIO "Subotička pešćara" (foto: Fojkar O.)

Kod izolovanih sojeva cijanobakterija koji pripadaju grupi *Nostoc-Anabaena* praćeno je prisustvo aserijalnog stadijuma, hormogonija i ostalih faza u razvoju. Stadijumi u razvojnem ciklusu su veoma bitni pri determinaciji ovih rodova jer ih je bez ovih podataka teško razlikovati.

Hormogonije su uočene kod svih izolovanih sojeva *Nostoc*-a, a aserijalni stadijum je zabeležen kod 16 sojeva, Slika 35 - 42. Sojevi *Nostoc*-a koji imaju i aserijalni stadijum i hormogonije spadaju u grupu sa tipičnim razvojnim ciklusom *Nostoc*-a, dok sojevi kod kojih nije uočen aserijalni stadijum spadaju u grupu sa atipičnim razvojnim ciklusom. Takvi sojevi su *Nostoc* 305, *Nostoc* 306 i *Nostoc* 317, Tabela 19.

Tipični *Nostoc* se odlikuje potpunim razvojnim ciklusom koji ima nekoliko razvojnih stadijuma. Kao početni stadijum razvića uslovno je uzeta hormogonija. Hormogonije nastaju fragmentacijom niti, sadrže 10-15 vegetativnih ćelija, i imaju sposobnost kretanja. Po prestanku kretanja dolazi do promene oblika i do promene rasporeda ćelija. Ćelije se pomeraju u stranu, a cela nit dobija specifičan izgled, tzv. aserijalni stadijum. Aserijalni stadijum je specifičan za rod *Nostoc* i predstavlja osnovni kriterijum za razlikovanje od roda *Anabaena*. Aserijalni paketići se povećavaju da bi u daljem procesu razvića dali duge niti, pri čemu se debela sluzava sara, koja je omotavala paketiće raspala i omogućila razvijanje uvijenih niti. Nakon izvesnog vremena dugi konci se fragmentišu na mestima gde se nalaze heterociste, koje ostaju slobodne. Mlade niti hormogonije vrše propagaciju i započinju novi ciklus.

Sojevi *Nostoc*-a sa nekompletnim razvojnim ciklusom odlikuju se postojanjem hormogonija, pseudoaserijalnog stadijuma tj. izvijenih niti koje nastaju od hormogonija kao i postojanjem nepokretnog filamentoznog stadijuma (Gantar et al., 1991c).

Tipični aserijalni stadijum smo uočili kod soja *Nostoc* 1., prikazan je na slici 35. Na uvećanju od 600 i 1000 puta lepo se vidi sluzavi omotač u kome se nalaze vegetativne ćelije maslinasto zelene boje u nepravilnom rasporedu. Na slici 35 c. vidi se mlađi aserijalni stadijum sa manjim brojem vegetativnih ćelija u smaknutom rasporedu, a nakon deobe aserijalni paket će biti ispunjen dobro upakovanim, zgužvanim, nitima sa većim brojem vegetativnih ćelija. Na svim aserijalnim paketima lepo su uočljive dve terminalne heterociste koje imaju funkciju azotofiksacije i snabdevanja vegetativnih ćelija u niti unutar paketa. Pod UV svetlošću i primenom DAPI metode bojenja uočava se da vegetativne ćelije unutar aserijalnih paketa

fluoresciraju ljubičasto zbog prisustva pigmenta fikocijanina i fikoeritrina. Svetla plavo bela polja, unutar vegetativnih ćelija, predstavljaju mesta koncentracije DNA materijala. Obzirom da heterociste ne poseduju fotosintetske pigmente one ne odaju ljubičastu svetlost već samo svetlo plavičastu koja govori o prisustvu DNA materijala u njima, slika 35 d,e.

Kod soja *Nostoc* 21. uočili smo razmotani aserijalni stadijum kod koga se niti vegetativnih ćelija ispravljaju. Na vrhu se može uočiti terminalna heterocista koja je svetle žute boje, verovatno tehminalna heterocista, slika 36 a. Razmotane niti *Nostoc*-a se zatim dele na kratke niti, hormogonije, a uočavaju se i svetlo zelene – žute interkalarne heterociste, slika 36 b. Kratke niti hormogonije su sastavljene od 2, četiri, pet ili više vegetativnih ćelija. Na dapi snimku se uočavaju tri, pretpostavljamo mlade vegetativne ćelije, sa izrazito ljubičastom bojom koja ukazuje na povećano prisustvo fikoeritrina. Heterociste ne fluoresciraju ljubičasto već imaju svetlo plavičastu boju zbog odsustva ovih pigmenta, slika 36 c.

*Nostoc sp.*, soj 22., se odlikuje prisustvom tipičnih aserijalnih stadijuma, kao i tipičnih kratkih niti hormogonija sa petnaestak vegetativnih ćelija, slika 37 a. Na slici 37 b. lepo je uočljiv aserijalni stadijum kod koga se iz sluzavog omotača razmotavaju niti sa vegetativnim ćelijama. Na želatinoznom omotaču vidljive su i dve heterociste koje su se otkaçile od vegetativnih ćelija tj. niti i završavaju svoju funkciju snabdevača fiksiranim azotom. Na DAPI fotografiji se uočavaju dve terminalne heterociste koje su svetlo plave boje, na površini aserijalnog paketića. U centralnom delu vegetativnih ćelija niti DNA material fluorescira beloplavom bojom, dok je obod vegetativnih ćelija crvenkast, slika 37 c.

*Nostoc sp.* 40 odlikuje se aserijalnim stadijumom sa terminalnim heterocistama bez uočljivog sluznog omotača, slika 38 a. Kod ovog soja smo uočili formiranje hormogonija sa desetak vegetativnih ćelija u fazi deobe, propagacije, slika 38 b i c. *Nostoc sp.*, soj 42.se takođe odlikuje aserijalnim paketima sa terminalnim heterocistama, bez sluzavog omotača, slika 39 a,b. Kod soja *Nostoc* 58. uočene su kratke niti, hormogonije sa 10 do 15 vegetativnih ćelija sa prisustvom terminalnih heterocisti, slika 39 c,d. Na snimcima pod UV svetlom i DAPI bojenjem u vegetativnim ćelijama se uočavaju tačkasta svetla polja koja obiluju DNA materijalom, dok je periferni ostatak vegetativne ćelije crvenkasto ljubičaste boje zbog fluorescentnih pigmenta. Terminalne heterociste su plavičaste boje.

Kod soja *Nostoc* 302. smo uočili aserijalne pakete bez sluzavog omotača, kao i kratke niti hormogonije sa pet do petnaest ćelija, slika 40. Kod niti u fazi deobe, diferenciranja, uočili smo prazne sluzne omotače koje su već napustile hormogonije. Na slici sa DAPI bojenjem pod UV svetlom sluzni omotač se još bolje uočava, slika 40 d.

Kod starije kulture *Nostoc sp.*, soj 311. uočili smo duge niti kod kojih pojedine vegetativne ćelije nisu delovale vitalno maslinasto – zeleno, već je dominirao crvenkast pigment, slika 41. Na DAPI snimku pod UV svetlom vitalne ćelije su crvenkaste boje, zbog prisustva fluorescentnih fotosintetskih pigmenata, slika 41 b,c. Za ćelije koje su plavičasto bele boje, u kojima fluorescira DNA material obojen DAPI bojom, pretpostavljamo da su smanjene vitalnosti zbog odsustva prirodno fluorescentnih pigmenata, slika 41 b,d. Isti soj poseduje i kratke vitalne niti maslinasto zelene boje.

Soj *Nostoc* 312., ima aserijalne pakete sa terminalnim heterocistama svetlo zelene boje, slika 42 a. Kod duge niti u fazi deobe na mestu interkalarne heterociste uočili smo formiranje dve nove terminalne heterociste, slika 42 b. Na istom preparatu DAPI obojenom heterociste su blago plave boje, dok su vegetativne ćelije crvene sa svetlim poljima u centru ćelije, prilog slika 42 c.

Rod *Anabaena* se odlikuju postojanjem trihoma koji može biti na različite načine uvijen, slika 43. Reprodukcijski kod ovog roda se vrši fragmentacijom vegetativnih trihoma u kraće lance koji se citološki ne razlikuju od roditeljskih trihoma. Vegetativne ćelije često sadrže gasne vakuole. Na kraju fragmenata se može nalaziti i terminalna heterocista koja nije novostvorena već vodi poreklo od starog filamenta. Trihomi su pojedinačni ili grupisani u meke, kožaste opne nepravilnog oblika.

Sojevi *Anabaena*-e 51, 313, 314, 316 se odlikuju odsustvom aserijalnog stadijuma i hormogonija. Ovi sojevi poseduju filamentozni stadijum, a reprodukcija se odigrava fragmentacijom vegetativnih trihoma. Nastali kraći ćelijski lanci se strukturno ne razlikuju od trihoma. Fragmenti se ne mogu okarakterisati kao hormogonije zato što su izgrađeni od vegetativnih ćelija iste veličine kao i ćelije trihoma. Ove vegetativne ćelije često sadrže gasne vakuole. Na kraju fragmenta se može nalaziti i terminalna heterocista koja nije novostvorena već vodi poreklo od starog filamenta. Prave hormogonije nostoka ne zadržavaju heterociste iz prvobitnog trihoma. Spore se obično stvaraju pored heterocista što se lepo može uočiti kod soja

*Anabaena* 51., (*Anabaena sphaerica* f. *conoidea*), slika 44. Kod *Anabaena* svi trihomi su pokretni, a kod *Anabaena* pokretljivost je ograničena samo na hormogonije. Kod soja *Anabaena sphaerica* f. *conoidea*, soj 51., uočili smo duge karakteristično spiralno uvijene niti kao i spore znatno većih dimenzija od vegetativnih ćelija, slika 43.

*Anabaena* 314., se odlikuje prisustvom dugih niti sa modro-zelenim vegetativnim ćelijama između kojih se uočavaju krupne heterociste svetlo zelene boje, slika 45. Pod UV zracima, bez DAPI bojenja, vegetativne ćelije fluoresciraju crvenom bojom, dok je na mestu nalaženja heterocista odsutno fluoresciranje zbog odsustva fluorescentnih pigmenta, slika 46.

Predstavnici roda *Cylindrospermum* se odlikuju trihomima koji su jednake širine celom dužinom. Trihomi su retko pojedinačni, najčešće se ujedanjuju u kolonije koje su bezoblične ili u obliku grudvica plavo-zelene boje. Krajnje ćelije trihoma ponekad su konusne. Heterociste su terminalne, nalaze se na oba kraja trihoma, veoma retko su interkalarne. Spore su takođe terminalne pojedinačne, ređe po dve ili više u nizu. Uvek se obrazuju neposredno ispod heterocista. Trihomi imaju sposobnost kretanja tokom celog života. Vrste ovog roda naseljavaju vlažno zemljište ali se sreću i u stajaćim vodama.

Kod soja *Cylindrospermum* 105a, slika 47 a, uočili smo duge niti podjednake vegetativnih ćelija sa terminalnom heterocistom i sporom u formiranju koja se nalazi pored terminalne heterociste. Na preparatu obojenom DAPI tehnikom pod UV zracima, vegetativne ćelije su roza boje sa centralnim belim poljima u kojima je skoncentrisan DNK metrijal. Heterociste su plavičaste boje bez fluorescentnih fotosintetskih pigmenta, slika 47 b. Na slici 47 c. i d. uočava se i mlada spora u formiranju kao slobodna, nezavisna, zrelija spora sa debelim omotačem.

*Cylindrospermum* 108., odlikuje se mnoštvom dugih niti sa razvijenim terminalnim heterocistama i formiranim zrelim sporama, slika 48 a. Vegetativne ćelije i spore su na DAPI snimku obojene roza sa svetlo beličastim centralnim poljima, dok heterociste nisu uočljive, slika 48 b. Krupne zrele formirane spore sa terminalnim heterocistama odvojene od vegetativnog trihoma su prikazane na slici 49 a. pri uvećanju od hiljadu puta. Iste spore pod UV svetlom obojene DAPI metodom se mogu videti na slici 49 b.

Rod *Calothrix* spada u red *Nostocales* i familiju *Rivulariaceae*. Familija *Rivulariaceae* se odlikuje asimetričnim trihomima koji se sužavaju od osnove ka vrhu. Trihomi se na vrhu najčešće završavaju “dlakom”. Rast trihoma je interkalaran, pri čemu se uočava meristemska zona. Pravog grananja nema, a ponekad se prividno granaju. Posедуje saru u kojoj se nalazi po jedan trihom. Heterociste su bazalne, ponekad interkalarne, dok ih kod nekih predstavnika nema. Karakteristični predstavnik ove familije je rod *Calothrix*. Trihomi su im asimetrični, sužavaju se od osnove ka vrhu. Poseduje bazalnu heterocistu, a ponekad imaju i interkalarne heterociste. Saru uvek imaju. U osnovi trihoma uglavnom je čvrsta, a ka vrhu konca osluzavi. Spore se najčešće razvijaju pojedinačno u osnovi trihoma, iznad heterocista.

Kod soja *Calotrix* 107, slika 50a., uočili smo asimetrične trihoma sa dve terminalne heterociste. Nakon DAPI bojenja, pod UV zracima, vegetativne ćelije su bile roza boje sa centralnim belo plavim poljima, a heterociste su plavičaste boje, slika 50b.

Rod *Tolypothrix* spada u red *Nostocales* i familiju *Scytonemataceae*. Predstavnici familije *Scytonemataceae* imaju trihome izgrađene od jednog niza ćelija, celom svojom dužinom su jednake širine, na krajevima mogu biti slabo prošireni ili suženi, ali se ne obrazuju “dlake”. Ponekad su diferencirani na osnovu i vrh. Heterociste su interkalarne ili bazalne. Sara obavlja jedan, ređe nekoliko trihoma. Konci su prividno granati. Hormogonije se obrazuju od najmlađih delova trihoma. Konci *Tolypothrix*-a su izuvijani, prividno granati. Prividne grane se od osnovnog konca najčešće odvajaju pod uglom od 45 stepeni ili su uz njega priljubljene. Sara može biti tanka ili veoma debela, bezbojna ili tamnije mrke boje. Ponekad se ka krajevima konca sužava, a od kraja trihoma nastavlja se i dalje – prazna. Heterociste su bazalne, u osnovi grana, retko interkalarne. Najčešće se javljaju u nizovima, i do 7-8 u nizu. Hormogonije se obrazuju na vrhovima konca.

Rod *Phormidium* spada u red *Oscillatoriales* i familiju *Oscilatoriaceae*. Red *Oscillatoriales* i familija *Oscilatoriaceae* se odlikuju homocitnom formom trihoma, trihomi su bez heterocista i spora. Sve ćelije trihoma imaju isti oblik, građu i funkciju, sem vršnih ćelija koje su najčešće manje, specifičnog su oblika i imaju taksonomski značaj. *Phormidium* se odlikuje pravim ili iskrivljenim trihomima, ređe spiralno uvijenim na krajevima. Najčešće su pojedinačni a u ređim slučajevima se udružuju. Oko trihoma se razvija sara u obliku manje – više mekog sluznog omotača. Vrste ovog roda često na podlozi grade sluzave, kožaste opne, a ređe se udružuju u snopiće (Cvijan i Blaženčić, 1996; Blaženčić, 1988).

Soj *Phormidium* 25. se odlikuje prisustvom dužih i kraćih niti samo sa vegetativnim ćelijama, u sluzavim sarama, slika 51 a. DAPI bojenjem, pod UV zracima bolje se uočavaju svetli beličasto obojeni centralni delovi vegetativnih ćelija, dok je periferija obojena roza bojom, slika 51 b.

## 6.4. CITO-MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE SOJEVA AZOTOFIKSIRAJUĆIH CIJANOBakterija

Ispitivanje cito-morfoloških karakteristika cijanobakterija u čistoj kulturi, kao i utvrđivanje različitih stadijuma u razvojnim ciklusima je od izuzetnog značaja za taksonomska, ali i za primenjena istraživanja. Klasični način determinacije cijanobakterija i mikroalgi uzetih iz prirodne sredine svodi se na fiksiranje materijala 4% formaldehidom i potonjim mikroskopskim pregledom. Međutim, kod određenih vrsta i rodova cijanobakterija koje poseduju specifične razvojne cikluse potrebno je pratiti čiste kulture određeno vreme da bi se uočili stadijumi i karakteristike neophodne za tačna taksonomska ispitivanja. Klasičnim načinom determinacije je stoga veoma teško ili nemoguće izvršiti uspešnu determinaciju određenih vrsta i rodova, pa je preporučljivo da se koriste čiste kulture cijanobakterija u te svrhe.

### 6.4.1. Veličina vegetativnih ćelija

Veličina vegetativnih ćelija i heterocista, kao i njihov oblik su ključni pokazatelji pri određivanju vrsta unutar rodova.

Kod izolovanih sojeva nostoka veličina vegetativnih ćelija, dužina i širina ćelije, se kreće u intervalu od 2.29 x 2.26µm kod soja *Nostoc 70*, izolovanog iz ritske crnice, pa do 5.76 x 4.92µm kod soja *Nostoc 306*, izolovanog iz ritske crnice (Bečej). Kod najvećeg broja sojeva nostoka dužina vegetativnih ćelija je približno jednaka širini ćelija, što ukazuje na njihov loptast oblik. Međutim, izvestan broj sojeva se odlikuje vegetativnim ćelijama koje su veće širine nego dužine, tj. imaju kratko-elipsoidan oblik, takvi sojevi su: *Nostoc 302*, *Nostoc 310*, *Nostoc 68*, *Nostoc 311*, svi su izolovani iz solonjeca, i *Nostoc 317* izolovan iz ritske crnice. Sojevi čije vegetativne ćelije su izrazito duže nego šire, tj. imaju izduženo-elipsoidan oblik, su *Nostoc 58*, izolovan iz solončaka, *Nostoc 301*, izolovan iz solonjeca i *Nostoc 306*, izolovan iz ritske crnice.



Prosečna veličina vegetativnih ćelija izolovanih sojeva *Nostoc* iz ispitivanih zemljišta je  $3.55 \times 3.64 \mu\text{m}$ .

Veličina vegetativnih ćelija kod izolovanih sojeva *Anabena* je varirala od  $3.00 \times 3.49 \mu\text{m}$  kod *A. sphaerica f. conoidea* 51, pa do  $6.03 \times 5.34 \mu\text{m}$  kod soja *Anabaena* 316, koji je izolovan iz černozema. Vegetativne ćelije tri soja anabene su kratko-elipsoidne, šire su nego duže, to su *A. sphaerica f. conoidea* 51, *Anabaena* 313 i *Anabaena* 314. Jedan soj poseduje izduženo-elipsoidne ćelije, *Anabaena* 316. Prosečna veličina vegetativnih ćelija anabena iznosi  $4.10 \times 4.38 \mu\text{m}$ .

Veličina vegetativnih ćelija cilindrospermuma su se kretale u rasponu od  $2.89 \times 3.80 \mu\text{m}$ , kod soja *Cylindrospermum* 8 koji je izolovan iz černozema, pa do  $4.10 \times 4.93 \mu\text{m}$ , kod *C. stagnale* 105a koji je izolovan iz arenosola. Oblik vegetativnih ćelija je kvadratno-cilindričan i kod svih sojeva ćelije su šire nego duže. Prosečna dužina sojeva *C. stagnale* izolovanih iz arenosola iznosi  $3.60 \times 4.01 \mu\text{m}$ .

Soj *Calothrix elenkinii* 107, izolovan iz arenosola, poseduje vegetativne ćelije koje su u osnovi trihoma dimenzija  $6.75 \times 6.36 \mu\text{m}$ . Vegetativne ćelije su kvadratnog oblika.

*Tolypothrix tenuis f. terrestris* 67, izolovan je iz solonjeca i ima vegetativne ćelije dimenzija  $5,00 \times 6,54 \mu\text{m}$ . Ćelije su kvadratnog oblika. *Phormidium ambiguum* 49, izolovan je iz černozema i ima vegetativne ćelije kvadratnog oblika veličine  $5.10 \times 5.10 \mu\text{m}$ .

#### 6.4.2. Veličina heterocista

Svi izolovani sojevi nostoka poseduju heterociste koje se lako mogu uočiti jer su svetlo žute boje, ne poseduju pigmente, za razliku od vegetativnih ćelija koje su modro-zelene ili maslinaste boje.

Kod izolovanih sojeva nostoka veličina heterocista, dužina i širina ćelije, se kreće u intervalu od  $2.83 \times 2.67 \mu\text{m}$  kod soja *Nostoc* 70, pa do  $5.57 \times 4.98 \mu\text{m}$  kod soja *Nostoc* 317, izolovanog iz ritske crnice. Kod devet od devetnaest izolovanih sojeva *Nostoc* dužina

heterocista je veća od širine heterocista, što ukazuje na njihov izduženo-elipsoidan oblik. Pet sojeva se odlikuje heterocistama koje su približno podjednake širine i dužine, tj. imaju okrugao oblik, takvi sojevi su: *Nostoc* 21, *Nostoc* 22, *Nostoc* 70, *Nostoc* 302 i *Nostoc* 308. Pet sojeva poseduje heterociste koje su šire nego duže, tj. imaju kratko-elipsoidan oblik, a to su *Nostoc* 303, *Nostoc* 304, *Nostoc* 310, *Nostoc* 64 i *Nostoc* 311. Prosečna veličina heterocista izolovanih sojeva *Nostoc* iznosi  $4.28 \times 4.09 \mu\text{m}$ .

Upoređujući dimenzije heterocista sa vegetativnim ćelijama *Nostoc* može se zaključiti da su kod svih ispitivanih sojeva heterociste većih dimenzija. U proseku su heterociste veće za 14.03% u odnosu na vegetativne ćelije.

Veličina heterocista kod četiri izolovana soja *Anabaena* je varirala od  $5.41 \times 5.02 \mu\text{m}$  kod *Anabaena* sp. 314, pa do  $6.39 \times 6.49 \mu\text{m}$  kod soja *Anabaena* 316. Heterociste dva soja *Anabaena* su izduženo-elipsoidne, duže su nego šire, to su *A. sphaerica* f. *conoidea* 51 i *Anabaena* 314. *Anabaena* 313 poseduju kratko-elipsoidne heterociste, dok *Anabaena* 316 ima okrugle do blago izdužene. Prosečna veličina heterocista *Anabaena* iznosi  $5.82 \times 5.38 \mu\text{m}$ . Kod sva četiri soja *Anabaena* heterociste su većih dimenzija nego vegetativne ćelije. U proseku su heterociste kod *Anabaena* veće od vegetativnih ćelija za 23,61%.

Dimenzije heterocista *Cylindrospermum* su se kretale u rasponu od  $5.07 \times 4.38 \mu\text{m}$ , kod soja *C. stagnale* 105a, pa do  $7.80 \times 4.30 \mu\text{m}$ , kod *C. stagnale* 105b. Kod sva četiri izolovana soja heterociste su izdužene, prosečnih dimenzija  $6.24 \times 4.72 \mu\text{m}$ . Kod *Cylindrospermum* su heterociste čak za 50.9% veće od vegetativnih ćelija.

Soj 107 *Calothrix elenkinii* poseduje heterociste koje su manjih dimenzija od vegetativnih ćelija koje se nalaze do njih, i iznose  $5.90 \times 5.25 \mu\text{m}$ . Heterociste su za 17.7% manje od vegetativnih ćelija.

*Tolypothrix tenuis* f. *terrestris* soj 67, ima heterociste dimenzija  $3.39 \times 4.65 \mu\text{m}$ . Heterociste su i kod ovog soja manje nego vegetativne ćelije za 44.0%. *Phormidium ambiguum*, označen kao soj 49, ne poseduje heterociste.

### 6.4.3. Procentualna zastupljenost heterocista

Procentualna zastupljenost heterocista, specifičnih ćelija koje vrše azotofiksaciju, svakako ukazuje na sposobnost azotofiksacije određenog soja. Međutim, procenat heterocista ne mora uvek biti u korelaciji sa količinom fiksiranog atmosferskog azota.

Procenat heterocista se kod sojeva nostoka gajenih na podlozi BG-11 bez azota kreće u rasponu od 3.06%, kod soja *Nostoc* 21, pa do 14.45%, kod soja *Nostoc* 22. Prosečna zastupljenost heterocista kod sojeva *Nostoc* iznosi 8.28%.

Sojevi determinisani kao rod *Anabaena* imaju manji procenat heterocista nego rod *Nostoc*, kreće se u intervalu od 3.90%, kod soja *Anabaena* 51, pa do 4.73%, kod soja *Anabaena* 313. Prosečan procenat heterocista kod *Anabaena* iznosi 4.25%.

*Cylindrospermum* se odlikuje manjom zastupljenošću heterocisti nego kod roda nostok i *Anabaena*. Prosečan procenat heterocisti iznosi svega 2.93%. Soj *C.stagnale* 105b sadrži najmanje heterocisti 1.92%, a soj *C.stagnale* 105a najviše 3.94%.

*Calotrix elenkinii* se odlikuje sa 6.19 % heterocisti, a *Tolypothrix tenuis f. terrestris* sa 7.76% heterocisti.

Tabela 19. Citološke karakteristike izolovanih sojeva azotofiksirajućih *Cyanobacteria*

Broj soja	Oznaka soja	Vrsta <i>Cyanobacteria</i>	Zemljište	Vegetativne ćelije duž x šir (µm)	Heterociste duž x šir (µm)	Heterociste %	Aserijalni Stadijum
1	NS AFCC 1	<b>Nostoc sp.</b>	Solonjec - Kumane	3.31 x 3.31	4.78 x 3.77	8.67	+
2	NS AFCC 21	<b>Nostoc sp.</b>	Solonjec – Kumane	3.03 x 3.07	5.18 x 5.10	3.06	+
3	NS AFCC 22	<b>Nostoc sp.</b>	Solonjec – Kumane	3.61 x 3.35	4.93 x 4.83	14.45	+
4	NS AFCC 40	<b>Nostoc sp.</b>	Černozem – R. Šančevi	2.55 x 2.75	4.95 x 3.82	5.98	+
5	NS AFCC 42	<b>Nostoc sp.</b>	Černozem – R. Šančevi	4.91 x 4.90	5.00 x 3.82	6.86	+
6	NS AFCC 58	<b>Nostoc sp.</b>	Solončak – S. Kopovo	2.93 x 2.55	3.43 x 2.75	6.86	+
7	NS AFCC 64	<b>Nostoc sp.</b>	Solonjec – Kumane	2.55 x 3.40	3.22 x 3.52	9.09	+
8	NS AFCC 70	<b>Nostoc sp.</b>	R. crnica - Bečej	2.29 x 2.26	2.83 x 2.67	-	+
9	NS AFCC 301	<b>Nostoc sp.</b>	Solonjec – Kumane	4.96 x 4.39	5.34 x 5.04	7.16	+
10	NS AFCC 302	<b>Nostoc sp.</b>	Solonjec – Kumane	3.00 x 3.79	3.79 x 3.82	6.72	+
11	NS AFCC 303	<b>Nostoc sp.</b>	Solonjec - Kumane	3.91 x 3.67	3.98 x 4.30	12.40	+
12	NS AFCC 304	<b>Nostoc sp.</b>	Solonjec – Kumane	3.30 x 3.48	4.34 x 4.66	8.36	+
13	NS AFCC 308	<b>Nostoc sp.</b>	Solonjec – Kumane	3.34 x 3.27	3.58 x 3.62	9.57	+
14	NS AFCC 310	<b>Nostoc sp.</b>	Solonjec – Kumane	3.64 x 4.18	3.94 x 4.16	6.98	+
15	NS AFCC 311	<b>Nostoc sp.</b>	Solonjec - Kumane	2.80 x 3.82	2.93 x 4.46	10.14	+
16	NS AFCC 312	<b>Nostoc sp.</b>	Solonjec - Kumane	4.02 x 4.20	4.16 x 3.86	-	+
17	NS AFCC 305	<b>Nostoc sp.</b>	R.crnica – Bečej	4.04 x 3.78	4.45 x 3.92	8.96	-
18	NS AFCC 306	<b>Nostoc sp.</b>	R. crnica – Bečej	5.76 x 4.92	4.96 x 4.70	9.04	-
19	NS AFCC 317	<b>Nostoc sp.</b>	R. crnica – Bečej	3.68 x 4.11	5.57 x 4.98	6.50	-

Tabela 20. Citološke karakteristike izolovanih sojeva azotofiksirajućih *Cyanobacteria*

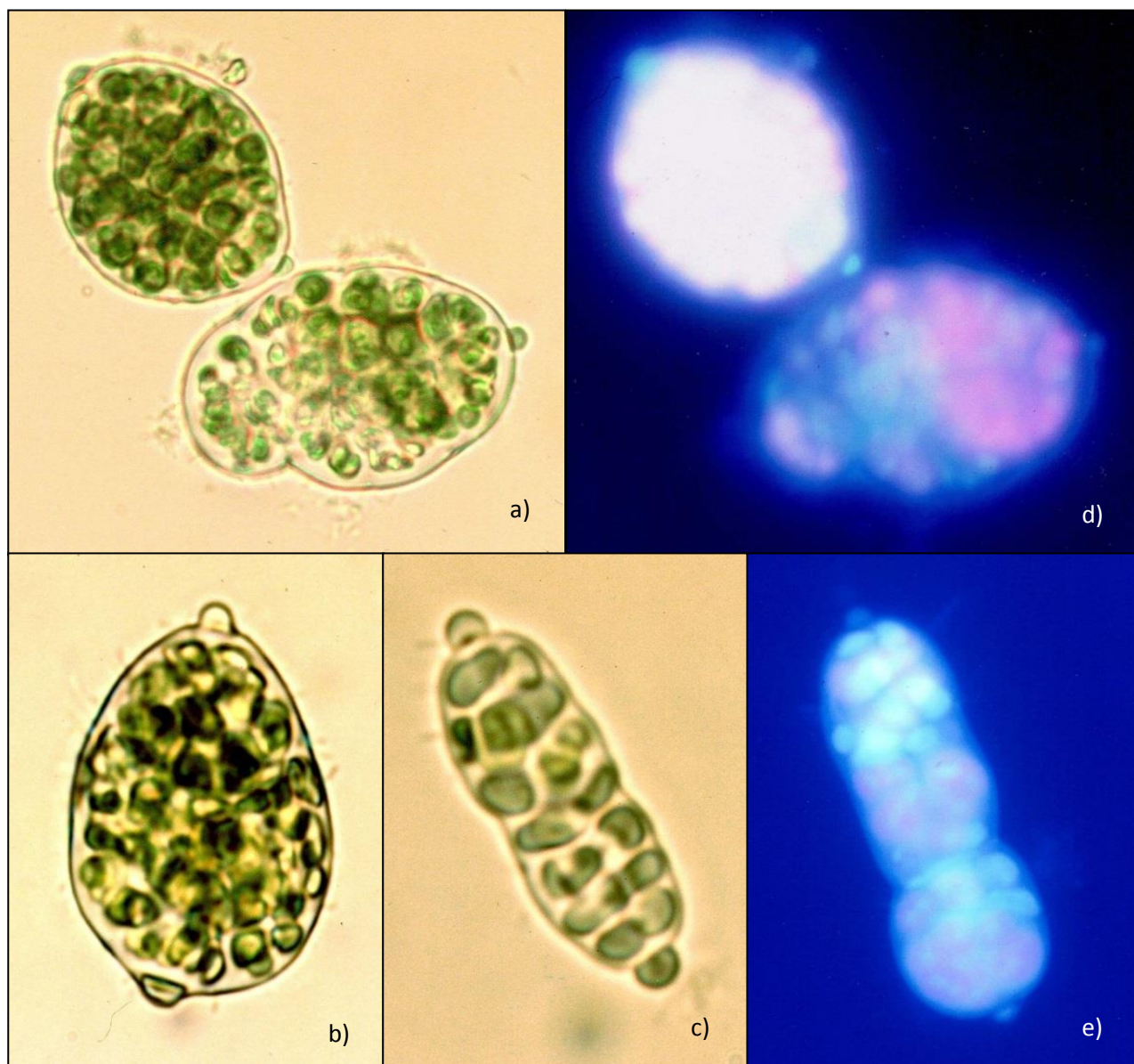
Broj soja	Oznaka soja	Vrsta Cyanobacteria	Zemljište	Vegetativna ćelija duž x šir (µm)	Heterocista duž x šir (µm)	Heterocista %	Aserijalni Stadijum
20	NS AFCC 51	<b>Anabaena sphaerica f. conoidea</b>	R. crnica – Bečej	3.00 x 3.49	6.02 x 4.33	3.90	-
21	NS AFCC 313	<b>Anabaena sp.</b>	Černozem – R. Šančevi	3.31 x 4.17	5.48 x 5.70	4.73	-
22	NS AFCC 314	<b>Anabaena sp.</b>	Černozem – R. Šančevi	4.06 x 4.54	5.41 x 5.02	4.23	-
23	NS AFCC 316	<b>Anabaena sp.</b>	Černozem – R. Šančevi	6.03 x 5.34	6.39 x 6.49	4.16	-
24	NS AFCC 105a	<b>Cylindrospermum stagnale</b>	Arenosol – SH peščara	4.10 x 4.93	5.07 x 4.38	3.94	-
25	NS AFCC 105b	<b>Cylindrospermum stagnale</b>	Arenosol – SH peščara	3.35 x 3.57	7.80 x 4.30	1.92	-
26	NS AFCC 108	<b>Cylindrospermum stagnale</b>	Arenosol – SH peščara	3.35 x 3.52	5.80 x 4.37	3.51	-
27	NS AFCC 8	<b>Cylindrospermum sp.</b>	Černozem – R. Šančevi	2.89 x 3.80	6.32 x 5.81	2.33	-
28	NS AFCC 107	<b>Calotrix elenkinii</b>	Arenosol – SH peščara	6.75 x 6.36	5.90 x 5.25	6.19	-
29	NS AFCC 67	<b>Tolypothrix tenuis f. terrestris</b>	Solonjec – Kumane	5.00 x 6.54	3.39 x 4.65	7.76	-
30	NS AFCC 25	<b>Phormidium ambiguum</b>	Černozem – R. Šančevi	5.10 x 5.10	-	-	-

#### 6.4.4. Zastupljenost spora

Kod osam sojeva izolovanih cijanobakterija je utvrđeno prisustvo spora, tabela 21. Spore su kod svih sojeva znatno većih dimenzija od vegetativnih ćelija. Kod soja *Nostoc* 58 spore su dimenzija 5.10 x 3.82 $\mu$ m, one su za 61.9% veće od vegetativnih ćelija. *Nostoc* 70 ima spore dimenzija 6.75 x 6.66 $\mu$ m, one su za 194% veće od vegetativnih ćelija. *Anabaena sphaerica* f. *conoidea* 51 poseduje spore koje su za 318.4 % veće od vegetativnih ćelija. Vrsta *Cylindrospermum stagnale* se odlikuje sporama koje su znatno veće od vegetativnih ćelija, kod soja C.105a za 226.8%, kod soja C.105b za 442.6%, i kod soja C.108 za 379.1%. *Calotrix elenkinii* 67, ima spore koje su svega za 5.23% veće od vegetativnih ćelija. *Tolypothrix tenuis* f. *terrestris* ima spore dimenzija 11.47 x 7.65 $\mu$ m, one su za 72.95% veće od vegetativnih ćelija.

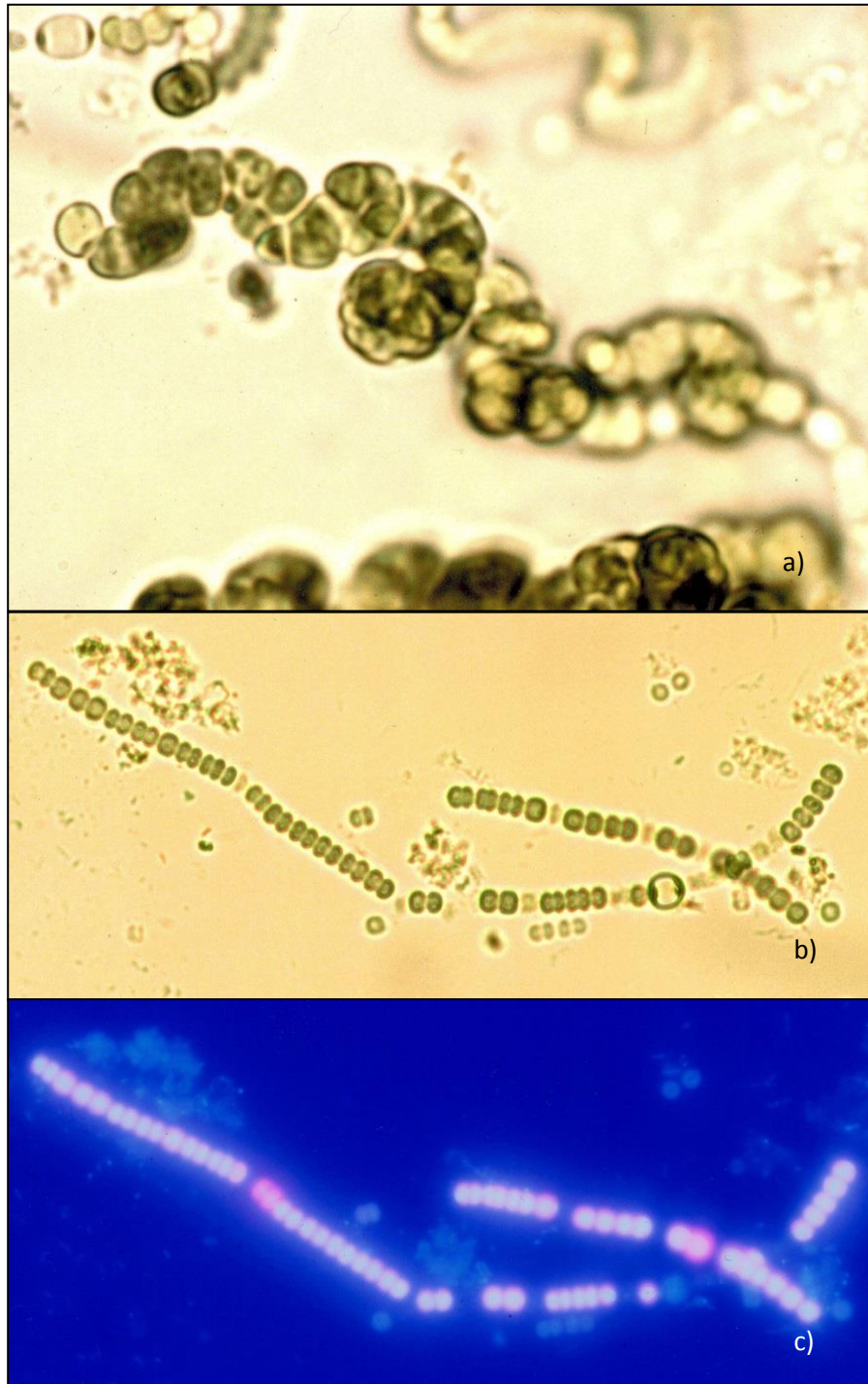
Tabela 21. Veličina spora ispitivanih sojeva cijanobakterija

Broj soja	Soj	Vrsta Cyanobacteria	Spore duž x šir ( $\mu$ m)	Vegetativna ćelija duž x šir ( $\mu$ m)
1	NS AFCC 58	<i>Nostoc</i> sp.	5.10 x 3.82	2.93 x 2.55
2	NS AFCC 70	<i>Nostoc</i> sp.	6.75 x 6.66	2.29 x 2.26
3	NS AFCC 51	<i>Anabaena sphaerica</i> f. <i>conoidea</i>	16.08 x 10.50	3.00 x 3.49
4	NS AFCC 105a	<i>Cylindrospermum stagnale</i>	19.40 x 8.90	4.10 x 4.93
5	NS AFCC 105b	<i>Cylindrospermum stagnale</i>	25.66 x 11.4	3.35 x 3.57
6	NS AFCC 108	<i>Cylindrospermum stagnale</i>	22.40 x 9.56	3.35 x 3.52
7	NS AFCC 107	<i>Calotrix elenkinii</i>	7.15 x 6.65	6.75 x 6.36
8	NS AFCC 67	<i>Tolypothrix tenuis</i> f. <i>terrestris</i>	11.47 x 7.65	5.00 x 6.54



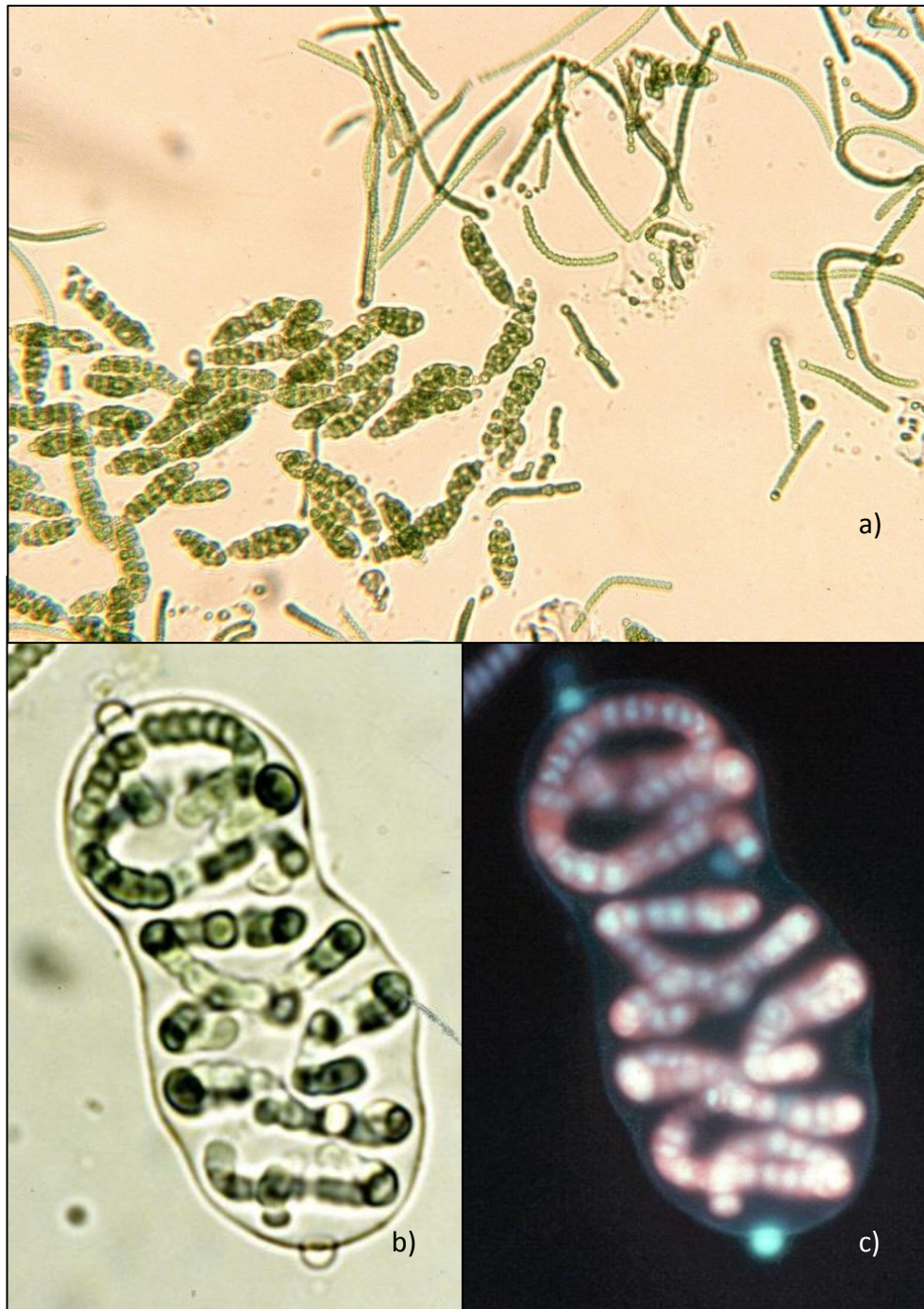
Slika 35. Mikrofotografija soj *Nostoc* 1: a) razmotani aserijalni stadijum (x1000), b) kratke niti u fazi diferenciranja sa uočljivom heterocistom svetlo zelene boje (x600), c) DAPI bojenje, UV svetlo, kratke niti, heterocista svetlo-plave boje (x600), (foto: Fojkar O.)



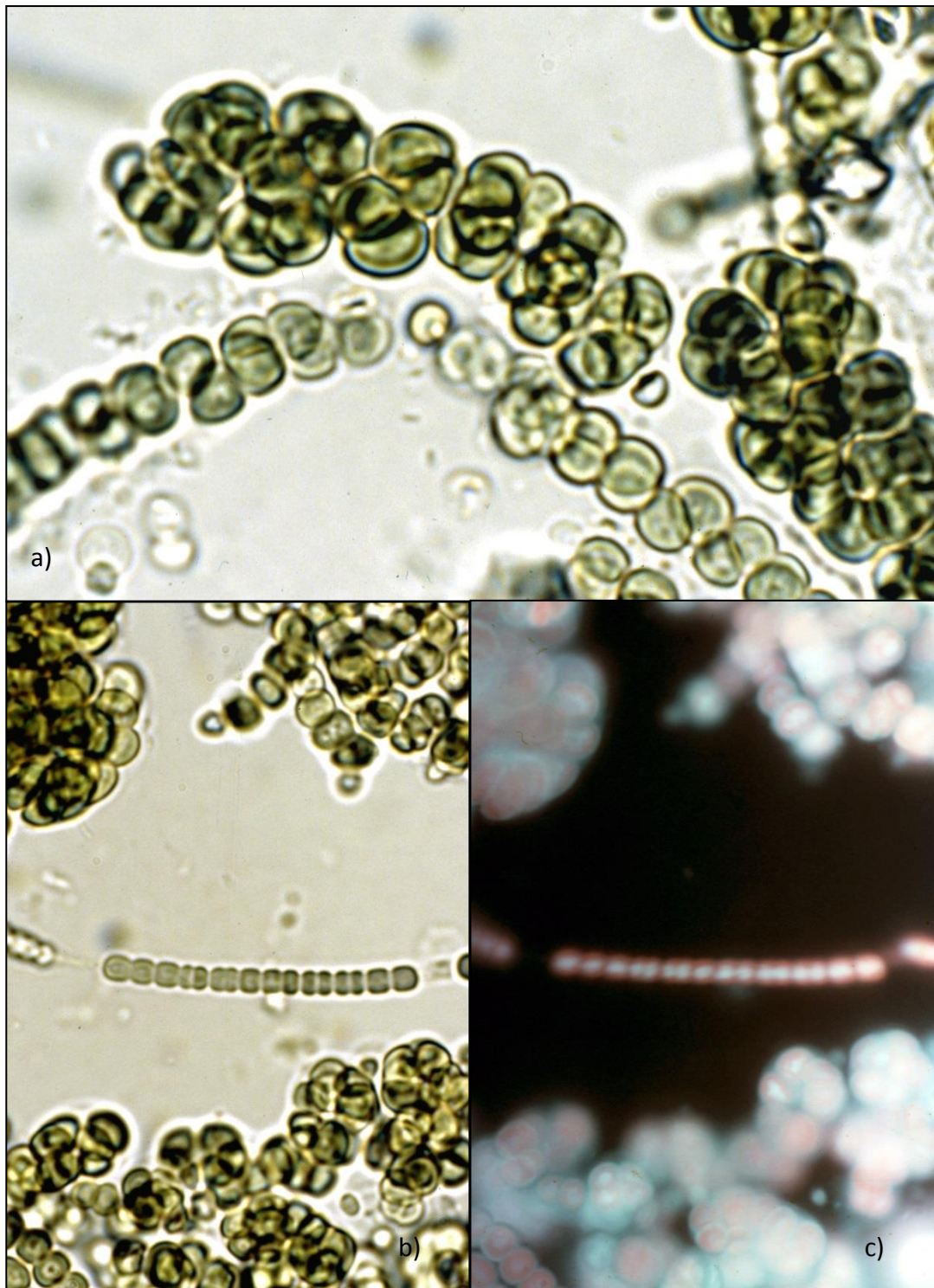


Slika 36. Mikrofotografija soj *Nostoc* 21: a) razmotani aserijalni stadijum (x1000), b) kratke niti u fazi diferenciranja sa uočljivom heterocistom svetlo zelene boje (x600), c) DAPI bojenje, UV svetlo, kratke niti, heterocista svetlo plave boje (x600), (foto: Fojkar O.)



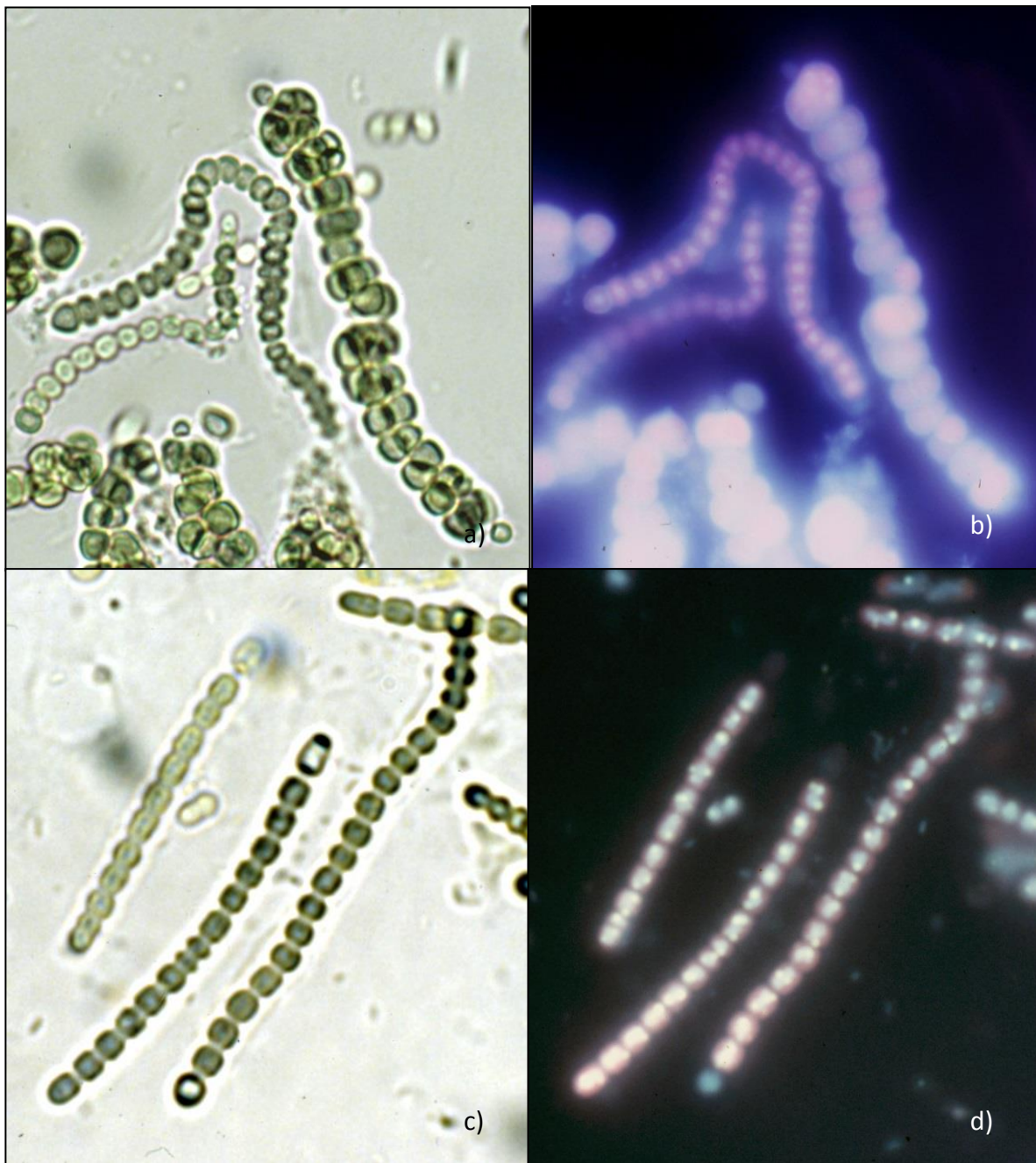


Slika 37. Mikrofotografija soj *Nostoc* 22: a) mladi aserijalni stadijum i kratke niti hormogonije (x250), b) aserijalni stadijum u fazi razmotavanja niti u želatinoznom omotaču, vidljive dve heterociste na omotaču (x1000), c) DAPI bojenje, UV svetlo, heterocista svetlo-plave boje, DNA material u vegetativnim ćelijama u centlanom delu belo-plave boje, obod veg. ćelije crvenkast (x1000), (foto: Fojkar O.)

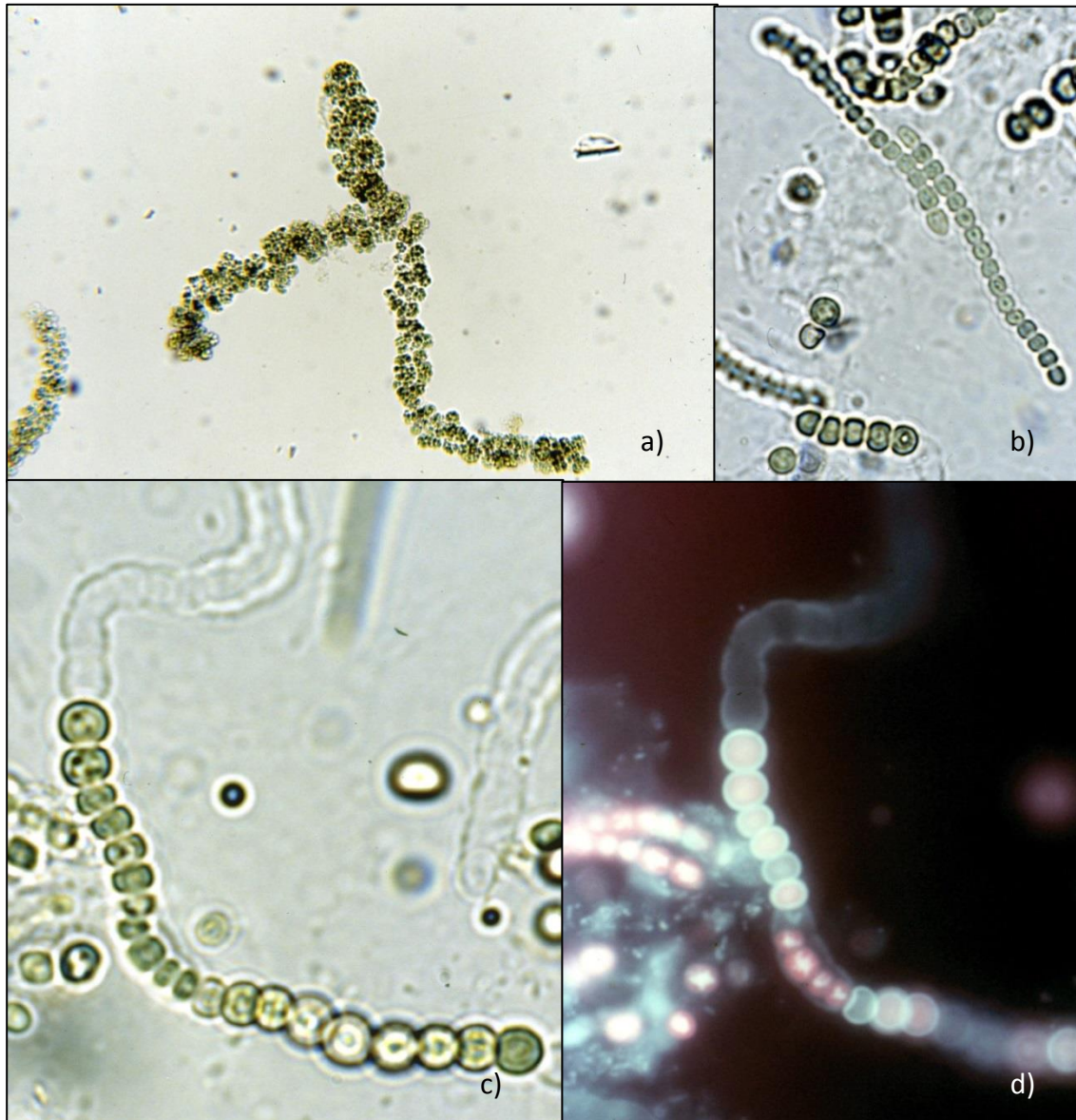


Slika 38. Mikrofotografija soj *Nostoc* 40: a) aserijalni stadijum sa terminalnim heterocistama, bez sluzavog omotača (x 1000) b) kratka nit – hormogonija ( x 1000) c) DAPI bojenje, UV svetlo, kratka nit – hormogonija ( x 1000), (foto: Fojkar O.)



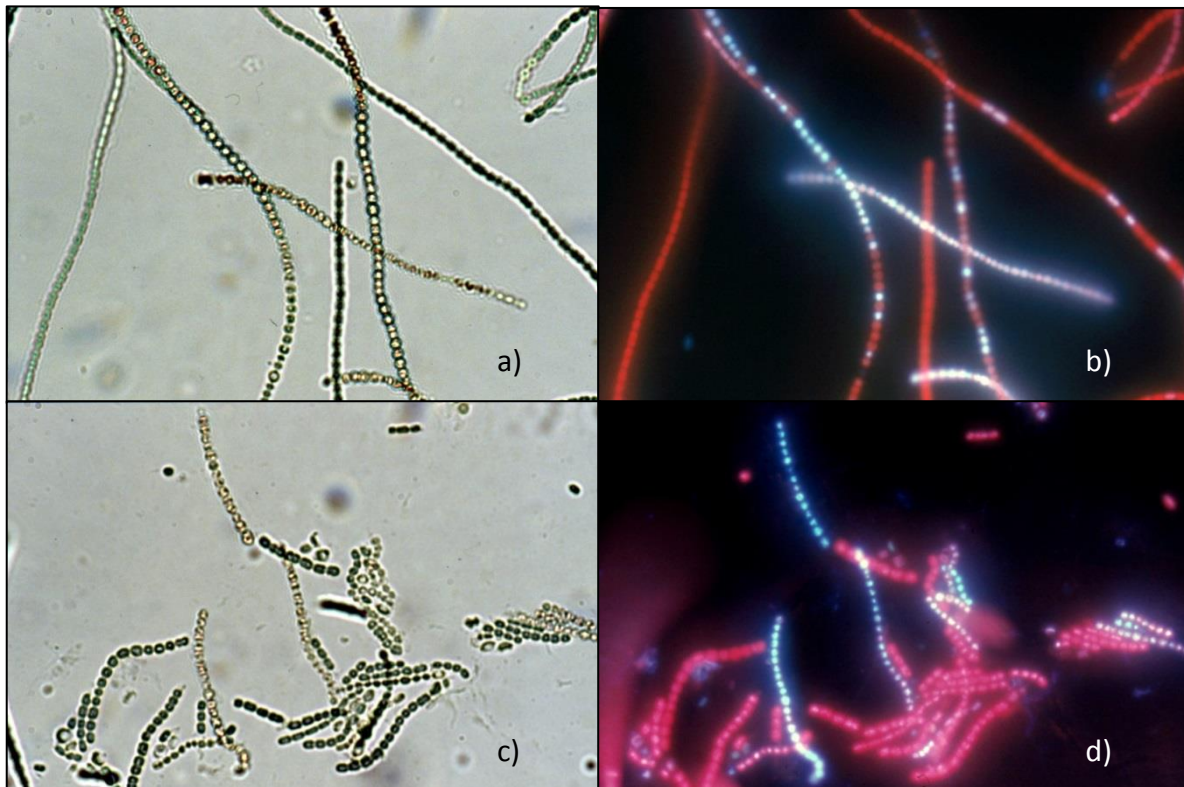


Slika 39. Mikrofotografija soj *Nostoc* 42: a) aserijalni paketi sa terminalnim heterocistama, bez sluzavog omotača i kratke niti (x 1000) b) DAPI bojenje, UV svetlo (x1000), c) *Nostoc* sp., soj 58., kratke niti sa terminalnim heterocistama (x1000) d) DAPI bojenje, UV svetlo (x1000), (foto: Fojkar O.)



Slika 40. Mikrofotografija soj *Nostoc* 302: a) aserijalni paket, bez sluzavog omotača (x 100) b) kratke niti hormogonije (x1000), c) nit sa ostatkom sluznog omotača (x1000) d) DAPI bojenje, UV svetlo, nit sa heterocistom u začetku(x1000), (foto: Fojkar O.)





Slika 41. Mikrofotografija soj *Nostoc* 311: a) duge niti sa pojedinim ćelijama koje gube fotosintetske pigmente (x 600) b) DAPI bojenje, UV svetlo, plavičasto-belo svetleće ćelije sa smanjenom vitalnošću, crvene vitalne veg. ćelije, heterocista ne osvetljena (x600), c) kratke modro-zelene vitalne niti, i blede niti sa smanjenom vitalnošću (x600) d) DAPI bojenje, UV svetlo, (x600), (foto: Fojkar O.)



Slika 42. Mikrofotografija soj *Nostoc* 312: a) aserijalni paketi sa terminalnim heterocistama svetlo-zelene boje (x 600) b) duge niti u fazi deobe, formiranje dve terminalne heterociste pored stare interkalarne hc. (x1000), c) DAPI bojenje, UV zraci, veg. ćelije crvene sa svetlim poljem u centru ćelije, hc. blago plavičaste boje (x1000), (foto: Fojkar O.)





Slika 43. Mikrofotografija soj *Anabaena sperica* f. *conoidea* 51, duge karakteristično spiralno uvijene niti (x 150), (foto: Fojkar O.)



Slika 44. Mikrofotografija soj *Anabaena sperica* f. *conoidea* 51, uočljive spore znatno većih dimenzija od vegetativnih ćelija, između njih se nalazi heterocista (x 240), (foto: Fojkar O.)



Slika 45. Mikrofotografija soj *Anabaena* 314, duge niti sa modro-zelenim vegetativnim ćelijama između kojih se uočavaju krupne **heterociste** svetlo-zelene boje (x 600), (foto: Fojkar O.)

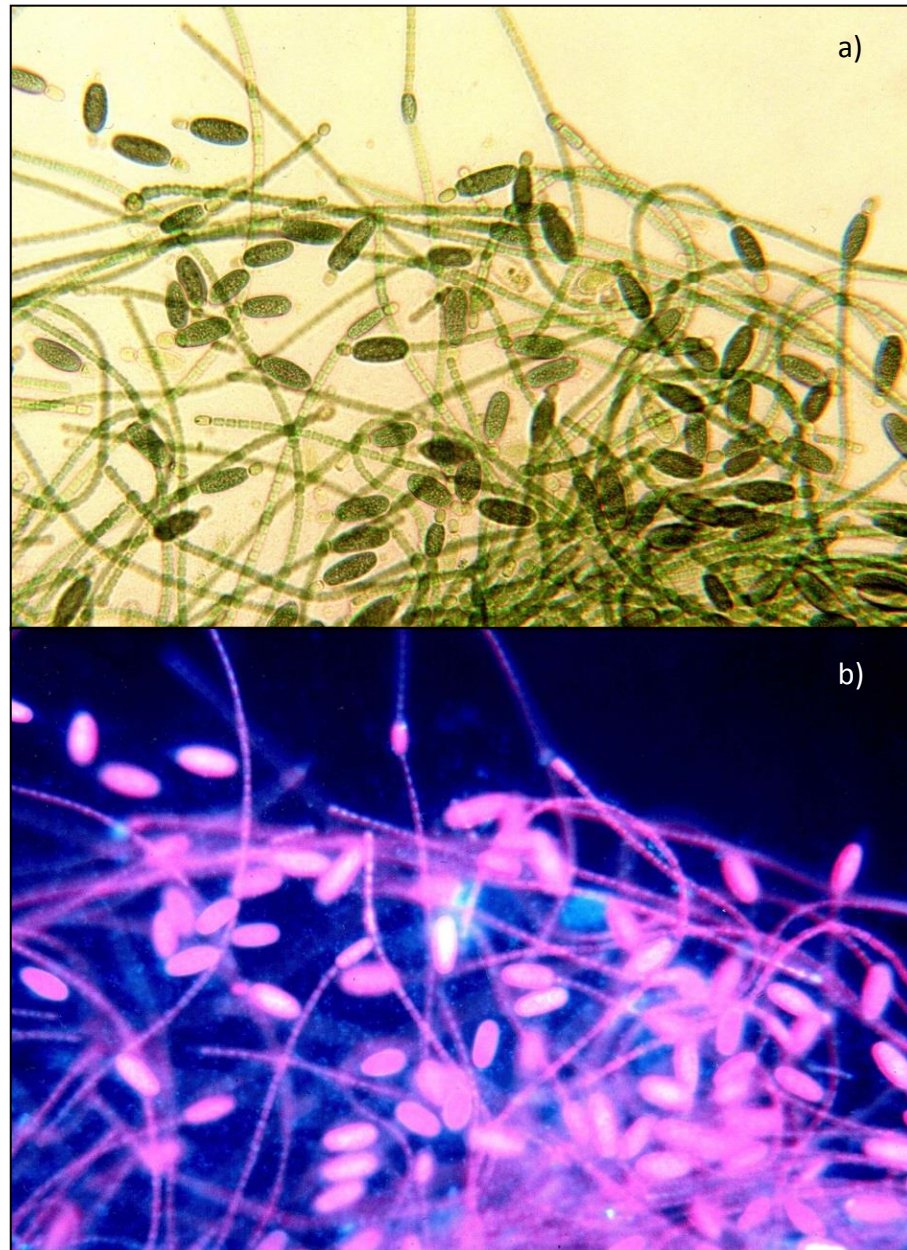


Slika 46. Mikrofotografija soj *Anabaena* 314, duge niti slikane pod UV zracima, vegetativne ćelije fluoresciraju crvenom bojom, na mestu nalaženja heterocista je odsutno fluoresciranje (x600),(foto: Fojkar O.)



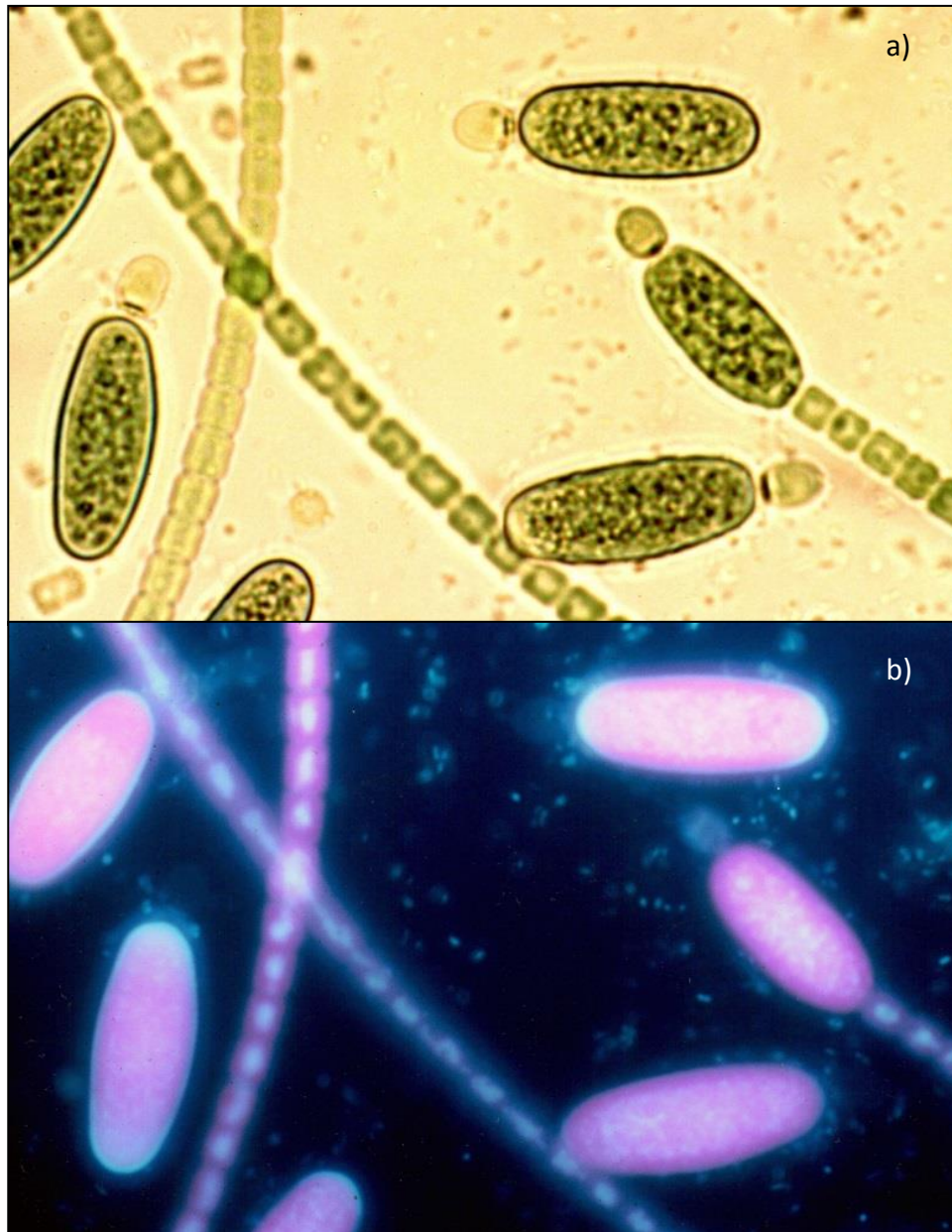


Slika 47. Mikrofotografija soj *Cylindrospermum* 105a: a) niti sa terminalnom heterocistom i sporom u formiranju (x1000), b) DAPI bojenje, UV zraci ,vegetativne ćelije roza boje sa centralnim belim poljima (DNK koncentrisana), hc. plavičaste boje (x1000), c) niti sa terminalnom heterocistom i mladom sporom u formiranju, slobodne zrelije spore (x1000) d) DAPI bojenje, UV zraci,(x1000), (foto: Fojkar O.)

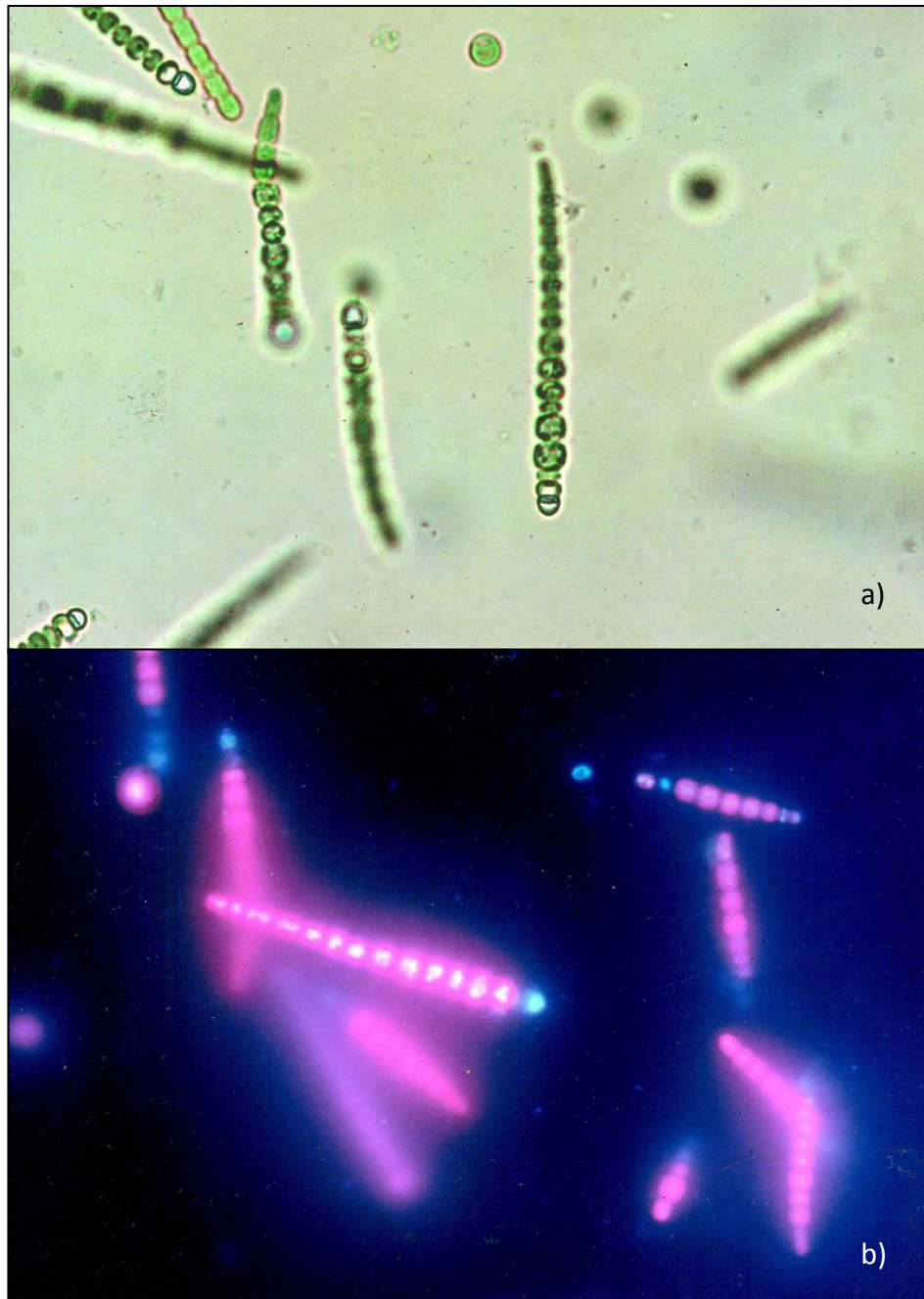


Slika 48. Mikrofotografija soj *Cylindrospermum* 108: a) duge niti sa terminalnim heterocistama i formiranim zrelim sporama (x400), b) DAPI bojenje, UV zraci,(x400), (foto: Fojkar O.)

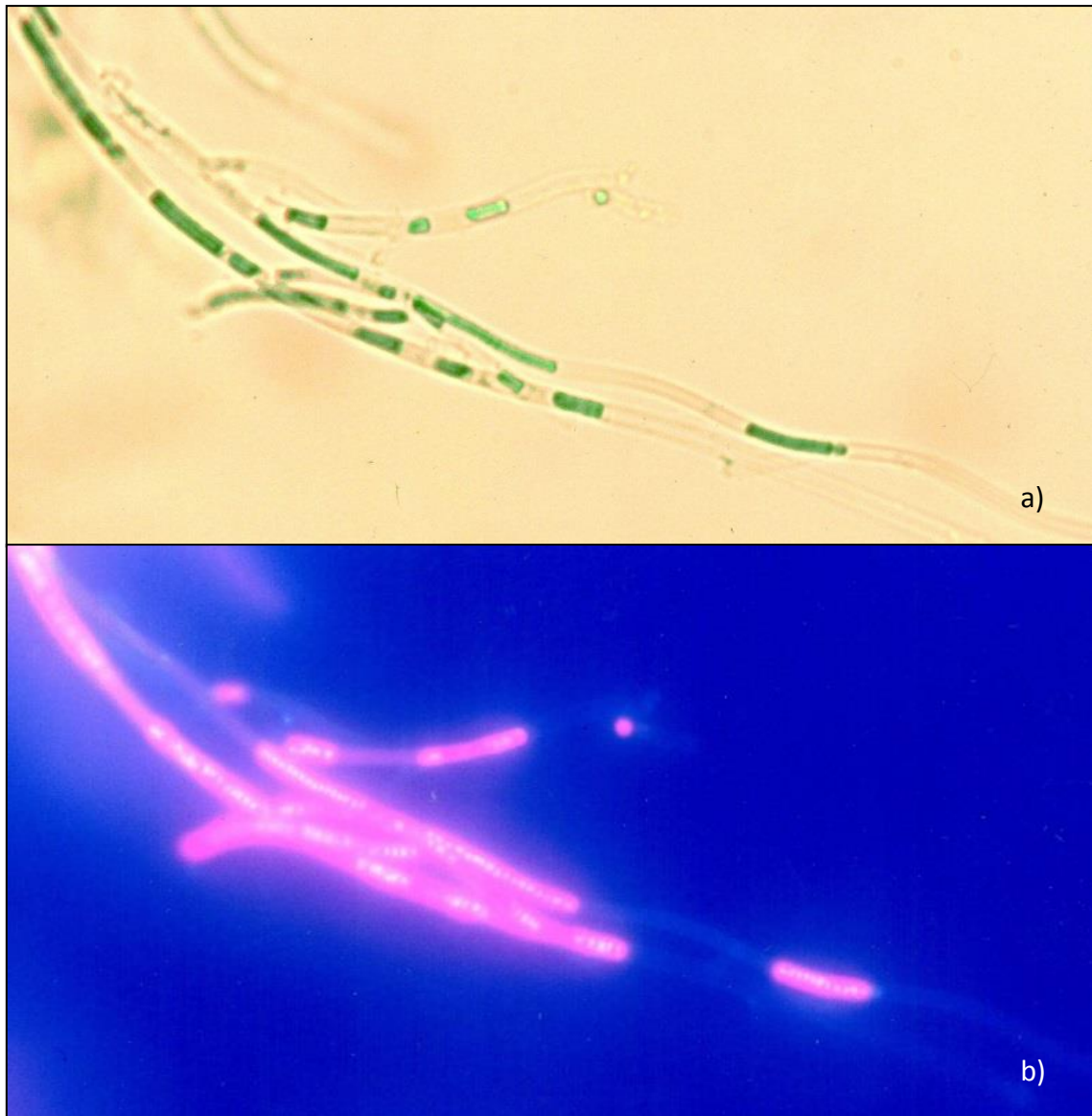




Slika 49. Mikrofotografija soj *Cylindrospermum* 108: a) zrele formirane spore sa terminalnim heterocistama (x1000), b) DAPI bojenje, UV zraci, (x1000),(foto: Fojkar O.)



Slika 50. Mikrofotografija soj *Calotrix 107*: a) nit sa dve terminalne heterociste (x600), b) DAPI bojenje, UV zraci, vegetativne ćelijeroza boje sa centralnim belo-plavim poljima i hc. plavičaste boje (x600), (foto: Fojkar O.)



Slika 51. Mikrofotografija soj *Phormidium* 25: a) duge i kraće niti vegetativnih ćelija u sluzavim sarama (x1000), b) DAPI bojenje, UV zraci (x1000), (foto: Fojkar O.)

## 6.5. ULTRASTRUKTURA AZOTOFIKSIRAJUĆIH CIJANOBAKTERIJA RODA NOSTOC I ANABAENA

Za analizu ultrastrukture azotofiksirajućih cijanobakterija odabrano je osam sojeva i to šest iz roda *Nostoc* i dva iz roda *Anabaena*. Od sojeva iz roda *Nostoc* odabrana su tri diazotrofna soja izolovana iz zemljišta solonjec: *Nostoc* 302, *Nostoc* 311 i *Nostoc* 312, i tri referentna simbiotska soja: *Nostoc* 9229 (CNCM) izolovan iz biljke *Gunnera monoica*, *Nostoc* 8001 (CCAP) takođe izolovan iz biljke *Gunnera monoica* i *Nostoc* 7901 izolovan iz biljke *Gunnera dentata*. Od sojeva iz roda *Anabaena* odabran je diazotrofni soja *Anabaena* 314 izolovan iz zemljišta černozem, i komparativni soj *Anabaena azollae* A.C.1982 (DBS) izolovan iz vodene paprati *Azolla pinata*.

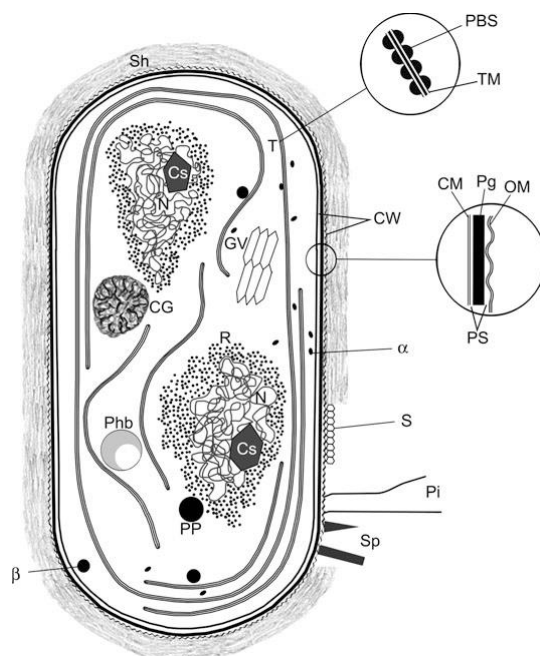
### 6.5.1. Ultrastrukura vegetativnih ćelija

U shemi, konstruisanoj na bazi ultrastrukturne analize predstavnika različitih taksonomskih grupa cijanobakterija (osim roda *Prochloron*, *Prochlorococcus* i *Prochlorothrix*, kao i *Acaryochloris marina*, koji se razlikuju u sastavu i pigmentnoj organizaciji intra citoplazmatsko-membranskih struktura), glavne strukturne komponente vegetativne ćelije cijanobakterija su prikazane na slici 52. Ćelije cijanobakterija pripadaju gram negativom morfotipu: one su okružene ćelijskim zidom koji sadrži peptidoglikanski sloj i spoljne membrane. Na površini ćelije, ponekad kapsula, sadrži parakristalne proteine ili glikoproteinski S-sloj, pili (takođe nazvane fimbrije) a mogu se naći i bodlje. Tilakoidi su unutar citoplazmatske membranske strukture odgovorne za snabdevanje energijom, oni ispunjavaju većinu citoplazme. Ove membranske strukture mogu formirati jedinstveni sistem nazvan tilakoidna mreža (Nevo et al., 2009).

Ćelija cijanobakterija, prokariotskih organizama, se odlikuje specifičnom građom. Njihov protoplast nije diferenciran na citoplazmu, jedro i plastide, već je izdijeljen na dva regiona: središnji nukleoplazmu (NP) (centroplazma ili prokarion) i spoljnji hromatoplazmu (CP) (protocitoplazma). Ćelije ispitivanih *Nostoc* i *Anabaena* sojeva se takođe odlikuju ovakvom strukturom. U nukleoplazmi se nalazi hijaloplazma i DNA materijal u vidu fibrila,



štapića i granula. DNK u nukleoplazmi nije udružena sa histonima. Replikacija DNA materijala se odvija u centroplazmi pri deobi ćelije. Oko nukleoplazme nije obrazovana membrana i u njoj se ne nalazi jedarce, kao kod eukariotske ćelije.



Slika 52. Generalna šema vegetativne ćelije cijanobakterija.  $\alpha$  - glycogen ( $\alpha$  –granule),  $\beta$  - Lipidne granule ( $\beta$  –granule), CG- cijanoficinkse granule, CM- citoplazmina membrana, Cs- carboksizomi, CW- ćelijski zid, GV- gasna vakuola, N- nukleoid, OM- spoljna membrana, Pg- peptidoglikan, PBS- fikobilizomi, Phb- poli-b-hidroksibutirat granule, Pi- pili, PP- polifosfatne granule, PS- periplazmin prostor, R- ribozomi, S- S-sloj, Sh- omotač, Sp - bodlje, dlake, T- tilakoidi, TM- tilakoidna membrana.

Hromatoplazma se nalazi na periferiji ćelije i obavija nukleoplazmu. Naziv joj potiče od obojenosti raznim pigmentima koje sadrži. Oko 30 fotosintetskih pigmenata sadrži hromatoplazma i to su hlorofil a, fikobilini i karotenoidi. Hromatoplazma stoga ima funkciju hromatofora.

U protoplastu cijanobakterija nalazi se niz struktura različite građe i funkcije. U odnosu na druge prokariotske mikroorganizme cijanobakterije u ćelijama sadrže znatno veći broj različitih inkluzija. Neke inkluzije se gotovo redovno nalaze kod svih cijanobakterija, to su **inkluzije redovnog pojavljivanja**, dok su neke nalažene samo kod nekih grupa cijanobakterija i nazivaju se **inkluzije neredovnog pojavljivanja**. Različite strukture i inkluzije su prisutne u ćelijama, a njihov raspored i pojavljivanje zavisi od vrste i uslova rasta cijanobakterija. Gasne vakuole su glavne komponente koje se javljaju kod vodenih cijanobakterija.



**Inkluzije redovnog pojavljivanja su:** tilakoidi (T), karboksizomi (Cs), glikogen granule ( $\alpha$  –granule), Lipidne granule ( $\beta$  –granule), cijanoficinkse granule (CG) i polifosfatne granule (PP ili PG).

**Inkluzije neredovnog pojavljivanja su:** gasne vakuole, Poli-b-hidroksibutirat granule (Phb), polimorfna tela i vezikule (kristaloidne vezikule), membranom ograničene kristalne inkluzije i dr.

Ultrastrukturalne karakteristike vegetativnih ćelija ispitivanih azotofiksirajućih sojeva cijanobakterija, odnosno brojnost i dimenzije pronađenih inkluzija i drugih ćelijskih struktura su prikazane u Tabelama 22 i 23. Mikrofotografije vegetativnih ćelija snimljene transmisionim elektronskim mikroskopom, TEM Carl Zeiss model EM 906, su prikazane na Slikama 53 - 67.

**Karboksizomi (Cs)** (višeugaona tela, poliedarska tela) su smešteni u centralnom delu ćelije i ograničeni su jednoslojnom membranom (oko 2nm debljine). Pored tilakoida predstavljaju najzastupljenije inkluzije kod cijanobakterija. Dimenzija su 90-500nm, a njihov broj je kod *Nostoc pruniforme* ustanovljen do 40 u jednoj ćeliji, (Berner, 1993). Kod *Anabaena variabilis* je ustanovljeno da karboksizomi zauzimaju i do 5.8% volumena ćelije. Karboksizomi su depoziti ključnog enzima koji kataliziraju CO<sub>2</sub> fiksaciju, ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza / oksigenaza (RuBisCO). Moguća funkcija karboksizoma je i kao rezerva određenih proteina. Pokazano je da spore koje nemaju fotosintetsku funkciju imaju veliki broj karboksizoma, (Berner, 1993).

Karboksizomi nisu zabeleženi samo kod cijanobakterija, nađeni su još i kod bezbojnih sumpornih bakterija, nitratnih i amonijum oksidujućih bakterija, kao i purpurnih bakterija.

Karboksizome smo uočili u centroplazmi vegetativnih ćelija kod svih ispitivanih sojeva cijanobakterija. Zastupljenost karboksizoma je bila najmanja kod diazotrofnog soja *Nostoc 302*, nijedna ili svega jedna inkluzija po preseku ćelije, Slika 53. Najveća brojnost karboksizoma je bila kod simbiotskog soja *A.azollae* i *Nostoc 8001* i kretala se do šest inkluzija po preseku ćelije, (Slika 64, 65, 67.). U proseku simbiotski sojevi cijanobakterija su imali veću brojnost karboksizoma po preseku ćelije, od 3 do 6, u odnosu na diazotrofne sojeve kod kojih se brojnost kretala od 1 do 5.

Što se dimenzija karboksizoma tiče najmanji karboksizomi su uočeni kod diazotrofnog soja *Nostoc* 312, prečnika do 270nm, (Slika 58.). Najveći karboksizomi su uočeni kod simbiotskog soja *Nostoc* 7901, prečnika do 453nm, (Slika 62 i 63.). Diazotrofni sojevi *Nostoc* su u proseku imali karboksizome prečnika do 308nm, dok su simbiozni sojevi roda *Nostoc* imali u proseku karboksizome prečnika do 420nm. Sojevi roda *Anabaena* su imali karboksizome u proseku veće od karboksizoma diazotrofnih *Nostoc* sojeva, a manje od simbiotskih *Nostoc* sojeva, iznosili su u prečniku 363nm kod *A.azollae* i 401nm kod A.314.

**Cijanoficinske granule (CG)** predstavljaju rezervoare polipeptidnih polimera aspartatske kiseline i arginina, najčešće u odnosu 1:1. Oni dakle predstavljaju rezervu organskog azota u ćeliji. U ćeliji se najčešće nalaze u blizini plazma membrane odnosno ćelijskog zida. Zbog svog šarenog izgleda u preseku lako su prepoznatljive. Ove granule su grubo sferičnog izgleda i dimenzija najčešće manjeg od 2 $\mu$ m. Njihov broj i veličina zavisi od uslova sredine i intenziteta metabolizma. Po pravilu ih ima mnogo u trajnim sporama i starijim vegetativnim ćelijama. Najčešće zauzimaju od 0.8 do 3% zapremine ćelije. Kod *Anabaena flos-aquae* cijanoficinske granule su zauzimale 0.64%, dok je kod *Oscillatoria prolifera* pronađena u zapremini 24.7% ćelije u uslovima rasta bez fosfora, (Berner, 1993).

Cijanoficinske granule smo uočili u vegetativnih ćelija kod svih ispitivanih sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija. Ove granule su uglavnom bile raspoređene u blizini ćelijskog zida i mestima stvaranja pregrade tj. deobe ćelije.

Najmanja brojnost CG se kretala kod diazotrofskih sojeva *Nostoc* N.302 i N.311, svega do jedne granule po preseku vegetativne ćelije, (Slika 53 i 56.). Najveća brojnost CG po preseku ćelije je uočena kod simbiotskog soja N.9229, do šest granula, (Slika 63.). U proseku su simbiotski sojevi *Nostoc* imali veći broj CG (2-6) u odnosu na diazotrofne sojeve *Nostoc* (1-4).

Kod sojeva *Anabaena* je broj CG bio veći u odnosu na sojeve *Nostoc* i kretao se do 6 CG kod *A.azollae* (Slika 67.) pa do 11 CG kod soja A.314, (Slika 66.). Soj *Anabaena* 314 je soj sa najvećim brojem CG od svih ispitivanih sojeva.

Veličina CG se kretala u prečniku od 243nm kod simbiotskog *Nostoc* N.8001 do maksimalnih 1236nm u prečniku kod diazotrofne *Anabaena* A.314.

**Polifosfatne granule (PG)** (volutinska zrnca, metahromatinska tela) su smeštene u nukleoplazmi i često se sreću u cijanobakterijskim ćelijama. Njihove dimenzija su od 15nm do 2 $\mu$ m. Dokazano je da sadrže polifosfate, ali i još jednu komponentu lipidnu ili proteinsku. Njihova funkcija je rezervisanje fosfora, za energetske svrhe. Uglavnom su malih dimenzija za vreme log faze ćelije, mađutim u daljim fazama rasta se češće javljaju. Uočeno je da kada je soj izložen gladovanju fosforom za određeno vreme dolazi do smanjenja dimenzija granula. U uslovima stresa mogu okupirati veliki procenat zapremine ćelije. Pokazano je da polifosfatne granule mogu da sadrže sem fosfata i razne druge materije magnezijum, lipide, kalcijum, kalijum, mangan, gvožđe, bakar, (Berner, 1993). Neki autori smatraju (Jensen, 1985) da ove granule imaju i detoksikatorsku ulogu kada su u pitanju teški metali.

Polifosfatne granule smo uočili uglavnom u nukleoplazmi kod svih ispitivanih sojeva cijanobakterija. Brojnost PG se kod najvećeg broja sojeva kretala do svega jedne (1) po preseku (diazotrofi N.302, N.311, A.314, simbionti N.7901, N.8001), do maksimalno pet (5) PG kod diazotrofa N.312, (Slika 58 i 59.) i simbionta *A.azollae* (Slika 67.).

Simbiotski sojevi *Nostoc* N.9229 i N.8001, imaju PG najvećih dimenzija, prečnika i do 735 i 736nm, (Slika 64.). Soj *Nostoc* sa najmanjim PG je diazotrof N.311 prečnika do 210 nm. U proseku simbiotski sojevi *Nostoc* imaju veće PG u odnosu na diazotrofne sojeve *Nostoc*.

Kod roda *Anabaena* takođe simbiotska *A.azollae* ima veće maksimalne vrednosti PG (599nm) nego diazotrofni soj A.314 (420 nm). PG granule nisu uočene u heterocistama.

**Masne inkluzije (LD)** ( $\beta$  granule) su nađene u velikom broju kod svih cijanobakterija (Fogg et al.,1973). Sferičnog su izgleda, tamne – elektron slabo propusne, i dijametra oko 30nm. Locirane su najšešće među tilakoidima ili češće u blizini ćelijskog zida. Masne inkluzije mogu zauzeti značajan deo zapremine ćelije, kod *Anabaena flos aquae* je pokazano da zauzima i do 1,5% zapremine, odnosno 14,87 inkuzija po preseku ćelije. Kod *A. variabilis* lipidne inkluzije su zauzimale 1.77% volumena ćelije, odnosno bilo je 21.53 granule po preseku, (Berner, 1993).

Masne inkluzije LD smo u velikom broju uočili u ćelijama kod svih ispitanih sojeva cijanobakterija. Granule LD su uglavnom bile smeštene uz ćelijski zid ili pored tilakoida. Kod roda *Nostoc* je uočeno da su LD brojčano zastupljenije kod diazotrofnih sojeva, od 6-13 kod

N.312 (Slika 58.), od 8-18 kod soja N.302 (Slika 53 i 54.), nego kod simbiotskih *Nostoc* sojeva, od 5-9 N.9229 (Slika 62 i 63.) do 3-12 N.8001 (Slika 64.). Slična situacija je uočena i kod sojeva *Anabaena*, diazotrof A.314 ima LD od 8-15 po preseku (Slika 66.) u odnosu na simbiot *A.azollae* svega 2-7 LD po preseku (Slika 67.).

Najveće lipidne granule su uočene kod diazotrofa N.312 prečnika do 156nm (Slika 58.), a najmanje su zabeležene kod simbionta N.7901 do 77nm (Slika 60, 61, 62.). Sojevi *Anabaena* su imali ujednačene LD granule prečnika od 110 -111 nm (Slika 66 i 67.).

**Ribozomi** su kod cijanobakterija pretežno raspoređeni u nukleoplazmi, mada se mogu naći raspršeni po čitavoj ćeliji. Na elektronskim snimcima se uočavaju kao sitna zrnca, dimenzija 10-15nm (Fogg et al., 1973). Ribozomi sadrže RNA i proteine i igraju veoma bitnu ulogu u sintezi proteina. Cijanobakterije poseduju ribozome tipa **70s**, koji ima podjedinice 50s i 30s. Ovakva građa ribozoma upućuje na bliskost sa ostalim bakterijama (Fogg et al., 1973). Sa druge strane Vasconcelos i Bogorad (1971) su pokazali da se građa ribozomskog proteina cijanobakterija razlikuje od proteina *E. coli*.

Na snimcima elektronskog mikroskopa uočili smo ribozome kod svih vegetativnih ćelija i heterocista ispitivanih cijanobakterija. Njihova brojnost je veoma velika i nije bilo mogućnosti da se prebroje. Međutim na snimcima velikog uvećanja od 46460 - 75000 puta mogli smo izmeriti njihove dimenzije. Dimenzije ribozoma su se kretale od 9.52nm kod soja *A.azollae*, do 15.32nm kod soja N.7901, što se dimenzijama uklapa u dosadašnja istraživanja. Prosečna dimenzija ribozoma kod diazotrofnih sojeva *Nostoc* (13.056nm) približno odgovara dimenzijama simbioznih sojeva (13.11nm). Diazotrofni soj anabene A.314 ima ribozome dimenzije 13.33nm, a soj *A. azollae* dimenzije 9.52nm.

**Tilakoidi** su membranske strukture najčešće grupisane u hromatoplazmi, tj. u perifernim delovima ćelije. Tilakoidi pokazuju značajnu raznolikost u rasporedu i građi kod različitih vrsta. Čak i kod iste vrste raspored tilakoida ne mora da bude stalan. Nekada se zapaža i grananje tilakoida ili grupisanje u obliku mreže. Tilakoidi su mesta odvijanja fotosinteze. Tilakoidne membrane su debljine oko 8nm.

Tilakoidi su formirani od uparenih membrana koje sadrže hlorofil A kao komponentu fotosistema. Hlorofil A je glavni fotosintetski pigment kod cijanobakterija, osim pojedinih marinskih cijanobakterija koje imaju hlorofil D kao glavni pigment (Miyashita et al., 1996). Na

spoljnoj strani membrane fotosintetskog aparata nalaze se fikobilizomi, PBS.). S obzirom da cijanobakterije nemaju mitohondrije ima mišljenja da bi tilakoidi mogli obavljati njihovu funkciju.

Kod svih ispitivanih sojeva cijanobakterija tilakoidi su veoma dobro zastupljeni u vegetativnim ćelijama, što se na fotografijama vidi. Soj *Nostoc* 302 se odlikuje veoma specifičnim spiralnim rasporedom tilakoida što se vidi na slikama. Na slici 58.a, kod soja *Nostoc* 312, se vidi razilaženje tilakoida prilikom formiranja septuma, pri deobi ćelije. U heterocistama ispitivanih sojeva su takođe uočeni tilakoidi. Poznato je da heterociste nemaju fotosintetsku ulogu, ali i da se diferenciraju iz vegetativnih ćelija. Tako da ovi tilakoidi u heterocistama gube funkciju mesta odvijanja fotosinteze, već imaju strukturnu ulogu.

Na tilakoidima su smešteni **fikobilizomi (PBS)**, zrnasta telašca u kojima su smešteni fikobilini, dimenzija 35-50nm. Fikobilizomi sadrže fikobiliproteinske pigmente: fikocijanin, fikoeritrin i alofikocijanin. Njihov oblik verovatno zavisi od sadržaja fikocijanina i fikoeritrina. Diskolik oblik imaju fikobilizomi kod kojih dominira fikocijanin, plavi pigment, a loptast oblik imaju ako u njima dominira fikoeritrin, crveni pigment. Fikobilizomi prenose energiju do hlorofila a, i imaju važnu ulogu u fotosistemu II fotosinteze. Njihova bitna funkcija je i u rezevisanju azotnih jedinjenja. Pigment C- fikocijanin apsorbuje svetlost između 615-620nm, a C-fikoeritrin, apsorbuje svetlost između 557-565nm, (Berner, 1993).

**Glikogen granule** ( $\alpha$  granule) predstavljaju rezervnu materiju sličnu glikogenu koja je produkt fotosinteze. Javlja se u obliku štapića ili su oblog oblika prečnika od 30nm do 65nm, a najčešće su postavljeni između tilakoida. Granule- $\alpha$  su rezervoar ugljenih hidrata i dobro se boje u elektronskoj mikroskopiji bojama koje sadrže olovo. Masovnu akumulaciju ovih granula uočili su Wildon i Mercer (1963) kod *Nostoc muscorum*. Pokazano je da neke cijanobakterije u suvoj masi mogu da imaju 40 do 60% glikogena nakon azotnog gladovanja. Na elektronskim snimcima ove granule nismo uočili.

**Poli-b-hidroksibutirat (PHB)** granule su sferične i opsega u prečniku do 0,8 $\mu$ m. Uglavnom su oko 0,5 $\mu$ m u prečniku. Ograničene su jednoslojnom membranom od 20Å i predstavljaju srednje-elektron propusnu sveto polje u tankom preseku. U ćelijama u kojima se nagomilava ovaj polimer može da se nagomila u velikom broju. Može se naći i do 10% suve mase vrste *Chlorogloea fritschii* i 6% vrste *Spirulina platensis*. PHB granule predstavljaju

prvenstveno skladište ugljenika u ćeliji. (Bernar, T., 1993). Poli-b-hidroksibutirat granule nismo uočili kod ispitivanih sojeva.

**Gasne vakuole (GV)** su ograničene slojem debljine od 20Å i mogu predstavljati kompleks od više vezikula. Najčešće su prečnika 65 do 75nm, a različite su dužine. U prirodnim uslovima su veoma česte, ali kada se cijanobakterije gaje u kulturi one standardno gube njihove gasne vakuole. Funkcija gasnih vakuola je da menja gustinu ćelije i da reguliše optimalne uslove za fotosintezu u vodenoj sredini. Van Eykelenburg je zapazio da jako svetlo indukuje njihovo formiranje kod *Spirulina platensis* (Bernar, 1993). Međutim, nekoliko vrsta cijanobakterija u kulturi je poznato da imaju gasne vakuole u svim uslovima rasta, kao na primer *Anabaena flos-aque*, *Pseudoanabaena* i *Nostoc sp.* UTEX 389. Na elektronskim snimcima gasne vakuole nismo uočili.

**Kristalne inkluzije ograničene membranom (MLCI)** su dimenzija oko 0,1 do 0.6µm u prečniku, sferične su i ograničena jedinstvenom membranom. One sadrže kristale, često igličastog oblika, debljine oko 2nm i do 80nm dužine, ili su granularnog i dlakastog oblika. Pokazano je da su kristali izgrađeni od kalcita, apatita ili hidroksiapatita. Ove inkluzije su opisane kod 19 izolata *Nostoc*, 7 *Anabaena*, 4 soja *Calothrix* i jednog *Gleottichia*, (Bernar, 1993). Broj ovih inkluzija varira i do pet u jednom preseku cijanobakterijske ćelije.

Kristalne inkluzije ograničene membranom smo uočili kod dva simbiozna soja i to *A. azollae* i N.9229. Kristalne inkluzije *A.azollae* su bile dimenzija 189nm i 270nm a bile su ograničene membranama prečnika 541 i 472nm, (Slika 67.a). Kod soja N. 9229 kristalna inkluzija je bila dimenzije 315nm, a membrana prečnika 542nm (Slika 63.b).

### Ćelijski zid (CW)

Cijanobakterije su prokarioti sa ćelijskim omotačem tipičnim za gram-negativne bakterije. Ćelijski omotač sastoji se od četiri različita sloja: **plazma membrane (PM)**, **peptidoglikanskog sloja (PG)**, **spoljašnje membrane (OM)** i u nekim slučajevima, na površini se nalazi **S-sloj**. Tradicionalno se poslednja tri sloja nazivaju **ćelijskim zidom**. Funkcionalnost ćelijskog omotača je definisana kooperativnim dejstvom njegovih lipida i membranski-ugrađenih proteina. Membrane cijanobakterijskih vrsta sadrže dve vrste lipida, fosfoglikolipide i galaktolipide. Proteini plazma membrane pokazuju tipičanu α-helix

membransku arhitekturu, dok proteini u spoljnjoj membrane imaju  $\beta$ -bačvast oblik. Proteini obavljaju mnoge različite funkcije od propuštanja rastvora do prenosa signala. Postoji dosta sličnosti između karakteristika omotača cijanobakterija i proteobakterija. Međutim, neka svojstva su jedinstvena za cijanobakterije.

U zavisnosti od ćelijskog-tipa cijanobakterija mogu se na površini nalaziti specifične strukture. Na primer heterociste filamentoznih cijanobakterija su okružena specifičnim glikolipidnim slojem (HGL) i specifičnim polisaharidnim slojem (HEP). U zidovima končastih algi se nalaze pore preko kojih pomoću citoplazmatskih konaca komuniciraju protoplasti susednih ćelija.

Debljina ćelijskog zida CW ispitivanih sojeva cijanobakterija se kretala od 41.22nm kod diazotrofnog soja N.302, do 54.17nm kod simbioznog soja N.8001. U proseku je ćelijski zid diazotrofnih sojeva *Nostoc* (42.58 nm) nešto tanji nego ćelijski zid simbioznih *Nostoc* sojeva (46.82 nm).

Kod diazotrofnog soja *Anabena* A.314 ćelijski zid CW (53.43 nm) je znatno deblji nego CW simbionta *A.azollae* (42.86nm).

Ultrastrukturalna citološka istraživanja sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija su pokazala da nema većih ultrastrukturnih razlika između diazotrofnih i simbiotskih sojeva roda *Nostoc* i *Anabaena*, kada se nalaze u čistoj kulturi. Ipak neka zapažanja su vredna pomena. Najveće, najduže, vegetativne ćelije od svih ispitivanih sojeva poseduju sojevi iz roda *Anabaena*, a soj A.314 se odlikuje najvećim vegetativnim ćelijama (4.001 x 3.79  $\mu$ m). Simbiozni sojevi *Nostoc* imaju nešto veće vegetativne ćelije od diazotrofnih, koji imaju najmanje vegetativne ćelije. Svi sojevi imaju relativno ujednačene dimenzije ćelijskog zida koje se kreću od 41.22nm kod diazotrofnog soja N.302, do 54.17nm kod simbioznog soja N.8001.

Simbiozni sojevi *Nostoc* imaju nešto veći broj karboksizoma Cs u odnosu na diazotrofne sojeve. Takođe karboksizomi su većih dimenzija kod simbioznih sojeva *Nostoc*. Najveći karboksizomi su utvrđeni kod soja N.7901. Ipak soj sa najizraženijim karboksizomima je *A.azollae*. Cijanoficinske granule CG su takođe brojčano zastupljenije kod simbioznih sojeva *Nostoc*, nego kod diazotrofnih. Oba soja *Anabena* su ipak sojevi sa najvećim i najbrojnijim



karboksizomima, a to se posebno odnosi na soj A.314 čiji su karboksizomi do 1236nm u prečniku.

Polifosfatne granule PG su bile slabije zastupljene u odnosu na cijanoficinske granule, najveći broj se kretao do pet po preseku kod sojeva N.312 i *A.azollae*. Najveće PG su imali simbiozni sojevi N.8001 i N.9229.

Diazotrofni sojevi *Nostoc* su bili i brojčano i po dimenzijama bogatiji sa lipidnim telašcima LD, nego simbiozni sojevi. Takođe je diazotrofni soj *Anabena* A.314 imao veći broj lipidnih inkluzija od simbioznog *A.azollae*.

Kristalne inkluzije su pronađene u vegetativnim ćelijama samo kod dva simbiozna soja i to *A.azollae* i N.9229.

Johansson i Bergman (1994) su ispitali razlike na ćelijskom nivou kod azotofiksirajućih sojeva cijanobakterija, posebno infektivnih i neinfektivnih sojeva *Nostoc*. Utvrdili su da nema većih ultrastrukturnih razlika, posmatrano elektronskim mikroskopom, između infektivnih i neinfektivnih sojeva kada su u slobodnom obliku, čista kultura, ili kada su u žlezdi više biljke *Gunnera*. Ipak navode da dva ne infektivna soja *Nostoc* 8002 i *Anabaena azzollae* sadrže brojne cianoficinske granule, karboksizome i polifosfatne granule dok su u žlezdi. Takođe navode da su cianoficinske granule neobično velike kod *Nostoc* 8002. Zapazili su i da infektivni sojevi *Nostoc* 8001, koga smo i mi ispitali, i *Nostoc* 893 sadrže brojne inkluzije dok su u žlezdi, a pronašli su i neke degenerisane ćelije cijanobakterije. Međutim, ćelijske deobe su bili dosta uobičajene kod oba soja. Intracelularne vegetativne ćelije svih sojeva sadržale su cianoficinske granule i brojne karboksizome, dok su polifosfatne granule bile pronađene uglavnom kod soja *Nostoc* 893 i *Nostoc* 7801, kao veoma velike i upadljive.

Tabela 22. Ultrastrukturne karakteristike vegetativnih ćelija azotofiksirajućih sojeva cijanobakterija

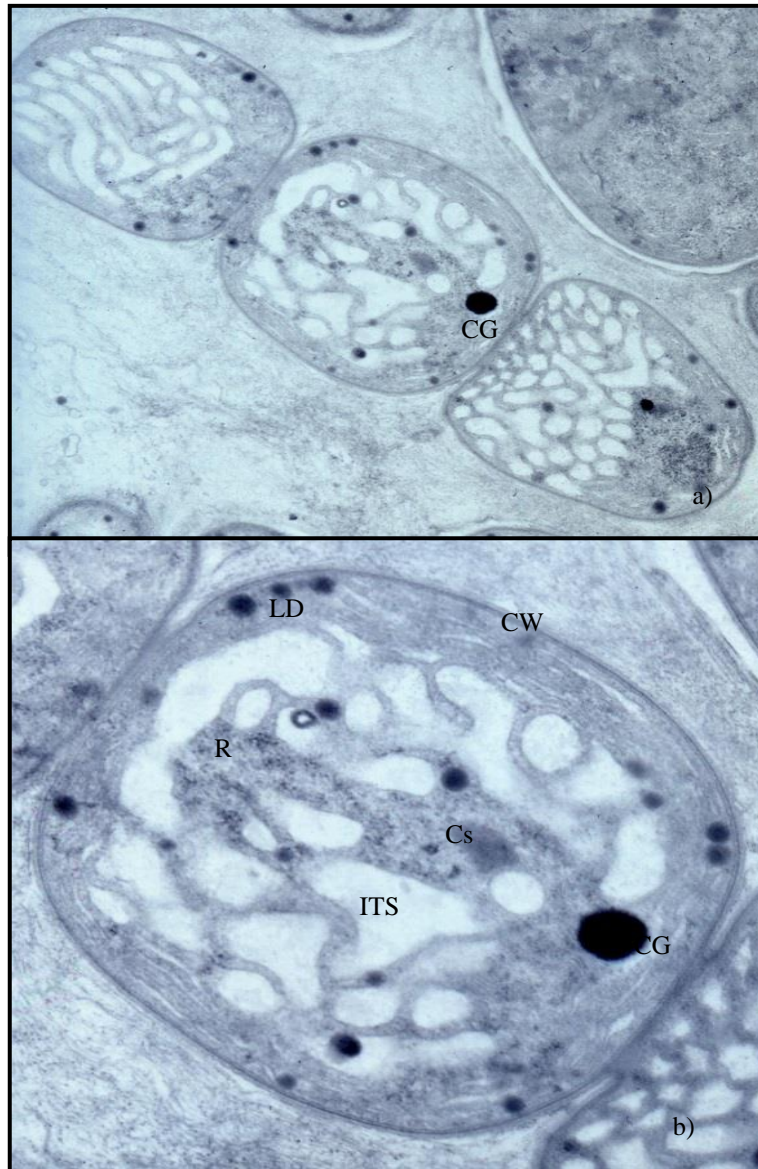
Br.	Soj	Način života	Poreklo	VĆ duž x šir ( $\mu\text{m}$ )	CW (nm)	Cs br/preseku	Cs (nm)	CG br/preseku	CG (nm)
1.	Nostoc 302	diazotrof	solonjec	2.60 x 2.39	41.22	0-1	310	0-1	280
2.	Nostoc 311	diazotrof	solonjec	2.54 x 1.92	42.59	0-4	345	0-1	577
3.	Nostoc 312	diazotrof	solonjec	3.08 x 2.59	43.93	0-5	270	0-4	344
4.	Nostoc 7901	simbiont	<i>Gunnera dentata</i>	2.60 x 2.80	43.59	0-3	453	0-4	433
5.	Nostoc 9229	simbiont	<i>Gunnera monoica</i>	3.22 x 2.09	42.7	0-4	434	0-6	746
6.	Nostoc 8001	simbiont	<i>Gunnera monoica</i>	2.80 x 3.26	54.17	0-6	373	0-2	243
7.	Anabaena 314	diazotrof	černozem	4.001 x 3.79	53.43	0-2	401	0-11 (2,3,7,7,7,11)	1236
8.	Anabaena azollae	simbiont	<i>Azolla pinata</i>	3.90 x 2.21	42.86	0-6 (2,2,4,4,6)	363	0-6	767

VĆ- vegetativna ćelija, CW- ćelijski zid, Cs- karboksizomi, CG- cijanoficinske granule

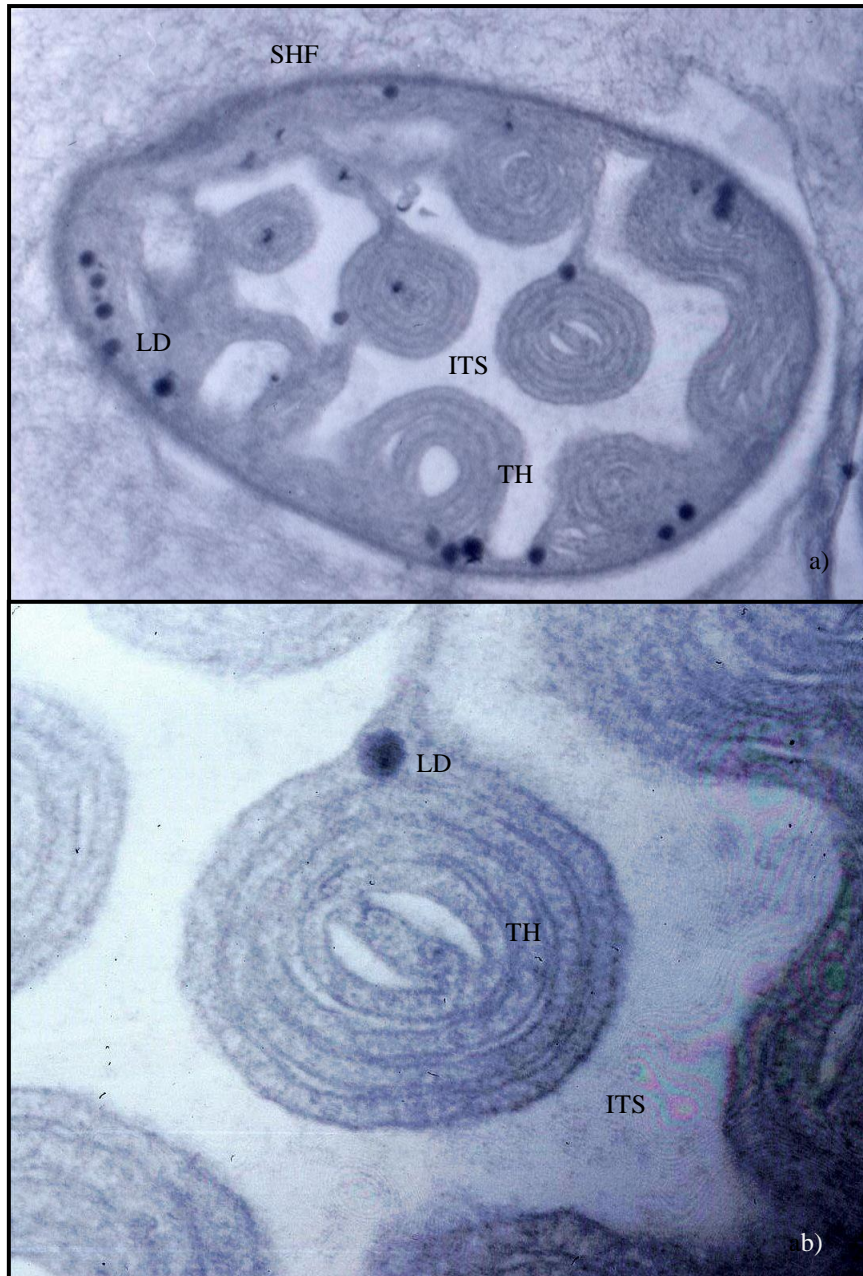
Tabela 23. Ultrastrukturne karakteristike vegetativnih ćelija azotofiksirajućih sojeva cijanobakterija

Br.	Soj	Način života	Poreklo	PG br/pre.	PG g-m (nm)	LD br/pre.	LD (nm)	R (nm)	CI (nm)
1.	<b>Nostoc 302</b>	diazotrof	solonjec	0-1	118-278	8-18	67-100	12	-
2.	<b>Nostoc 311</b>	diazotrof	solonjec	0-1	84-210	7-13	119-154	12.42	-
3.	<b>Nostoc 312</b>	diazotrof	solonjec	0-5	80-375	6-13	84-192	14.75	-
4.	<b>Nostoc 7901</b>	simbiont	Gunnera dentata	0-1	166-351	6-11	53-77	15.32	-
5.	<b>Nostoc 9229</b>	simbiont	Gunnera monoica	0-2	334-735	5-9	75-156	10.13	kristal 315 membrana 542
6.	<b>Nostoc 8001</b>	simbiont	Gunnera monoica	0-1	736	3-12	54-105	13.88	-
7.	<b>Anabaena 314</b>	diazotrof	černozem	0-1	420	8-15	90-110	13.33	-
8.	<b>Anabaena azollae</b>	simbiont	Azolla pinata	0-5	59-599	2-7	99-111	9.52	kristal 188, 270 membrana 541, 472

PG- polifosfatne granule, LD- lipidna telašca, R- ribozomi, CI- kristalne inkluzije



Slika 53. Mikrofotografija -ultrastruktura soja *Nostoc* 302: a) deo niti sa vegetativnim ćelijama (x 10000, RR), b) vegetativna ćelija (x 21560, RR), CW- ćelijski zid, TH- tilakoidi, ITS- inter tilakoidni prostor, Cs- karboksizomi, R-ribozomi, CG- cianoficinska granula, LD- lipidna telašca (foto: Fojkar O.).



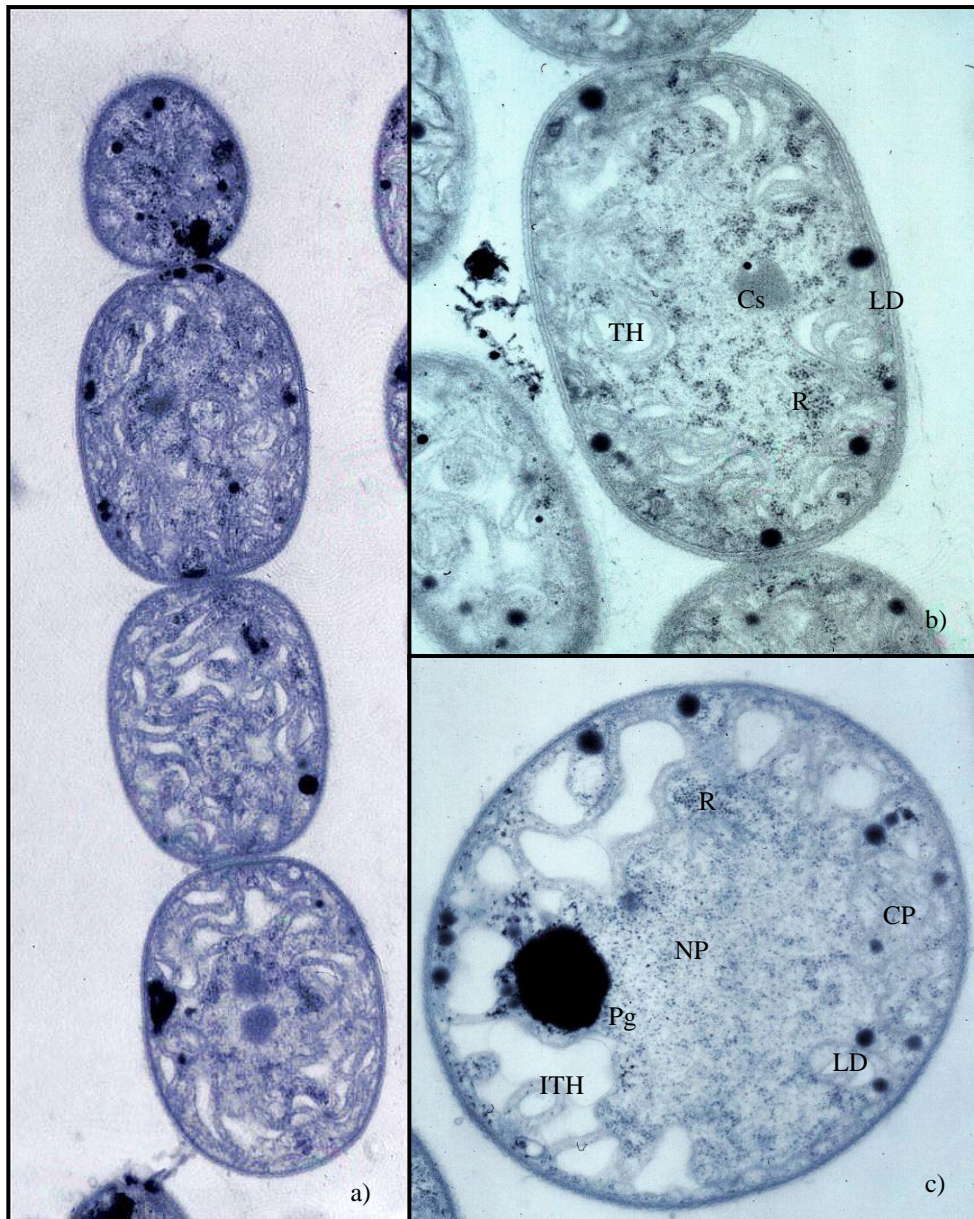
Slika 54. Mikrofotografija - ultrastruktura soja *Nostoc* 302: a) vegetativna ćelija (x 21560, RR), b) detalj tilakoid (x 60000, RR), SHF- pokrivač od fimbrija, CW- ćelijski zid, TH- tilakoidi, ITS- intertilakoidni prostor, LD- lipidna telašca, R- ribozomi (foto: Fojkar O.).





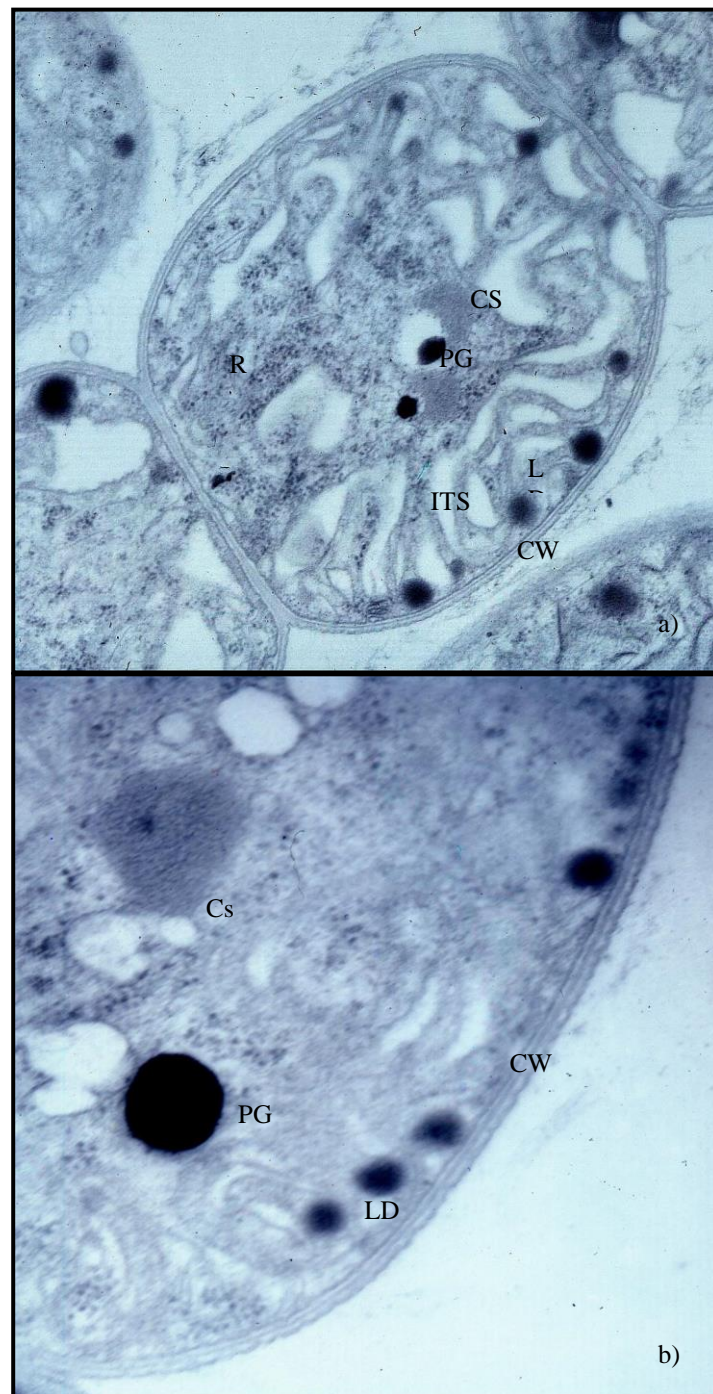
Slika 55. Mikrofotografija -ultrastruktura soja *Nostoc* 302: a) vegetativna ćelija (x 35970, RR), b) deo veg. ćelije (x 46460, RR), c) detalj PG- polifosfatna granula (x 46460), CW- ćelijski zid, TH- tilakoidi, LD- lipidna telašca, R- ribozomi, ITS- inter tilakoidni proctor (foto: Fojkar O.).



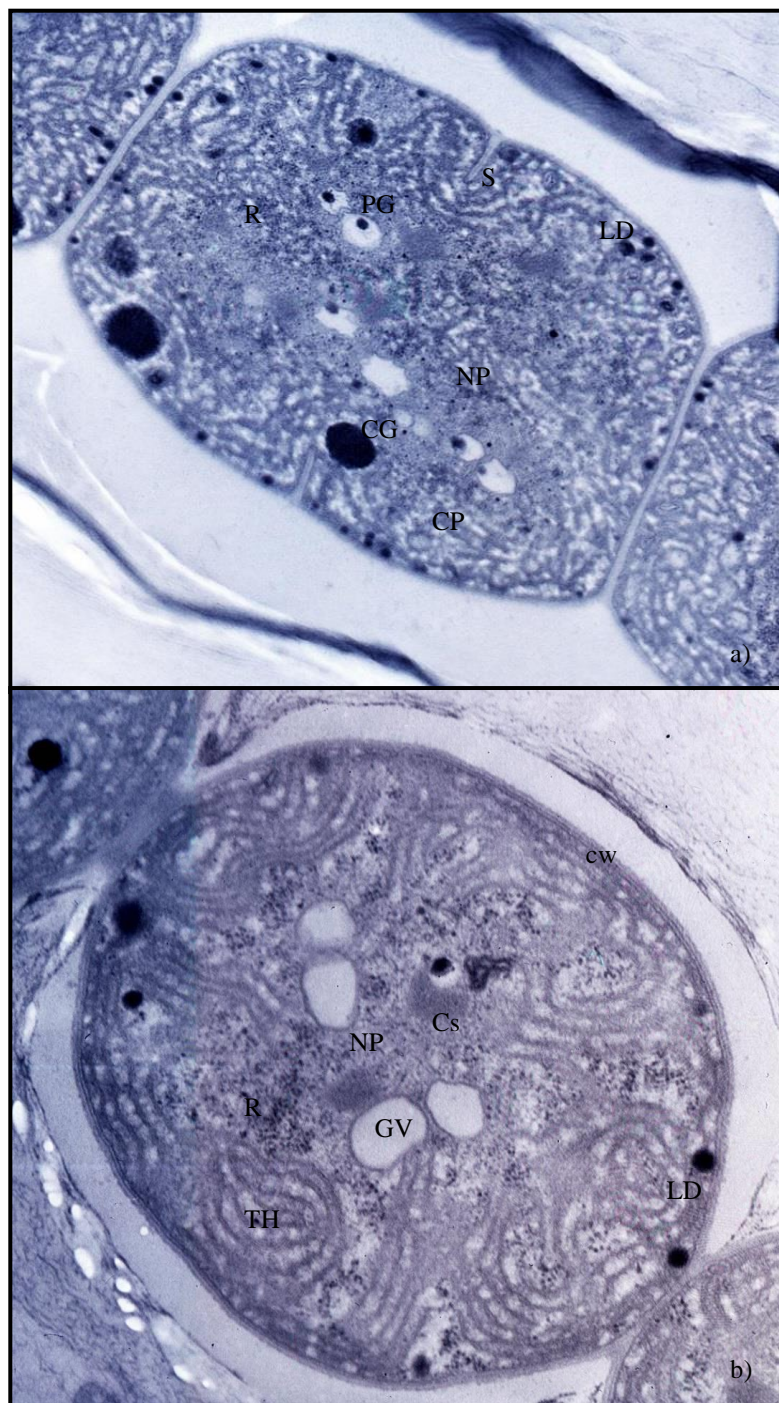


Slika 56. Mikrofotografija - ultrastruktura *Nostoc sp.*, soj 311, a) deo niti sa vegetativnim ćelijama (x 7750, RR) b) vegetativna ćelija, uzdužni presek (x21560, RR), c) vegetativna ćelija, poprečni presek (x21560, RR), NP- nukleoplazma, CP- hromatolazma, TH- tilakoidi, ITH- inter tilakoidni prostor, LD- lipidna telašca, R- ribozomi, Cs- karboksizomi, Pg- polifosfatne granule (foto: Fojkar O.).



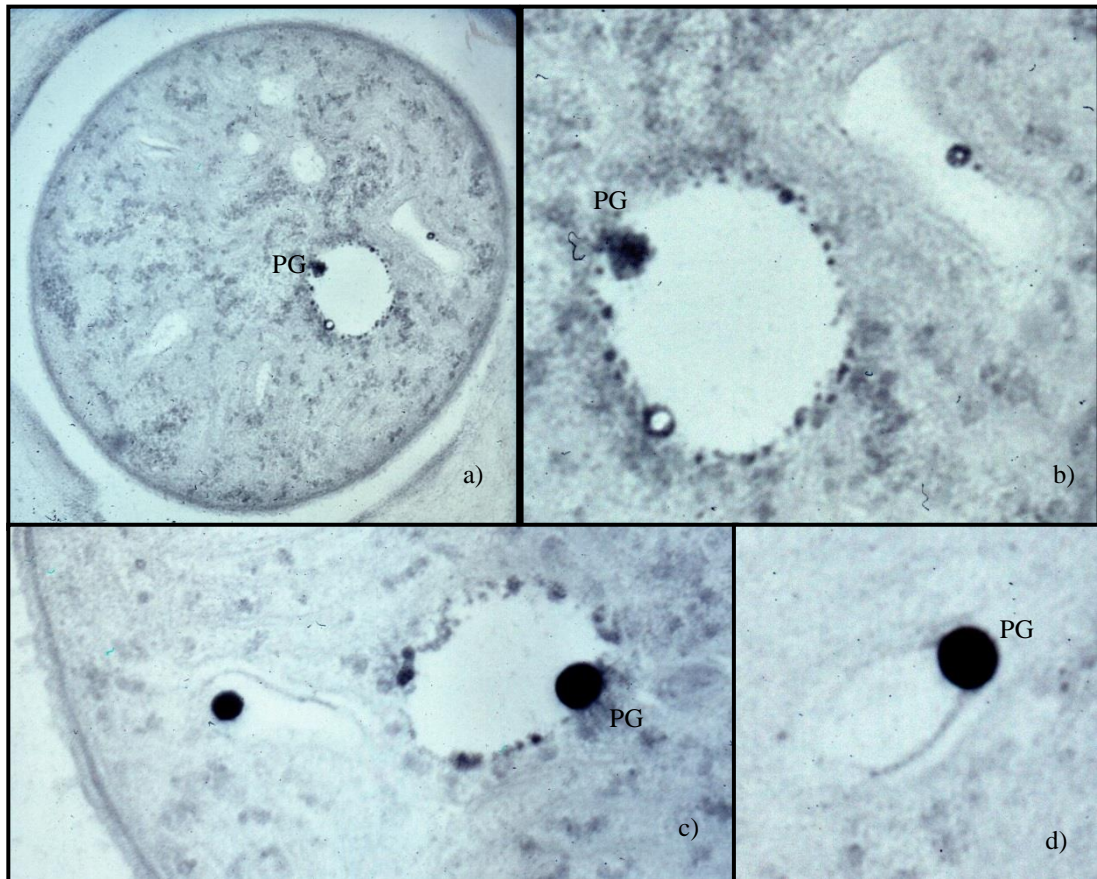


Slika 57. Mikrofotografija - ultrastruktura *Nostoc* 311, a) interkalarna vegetativna ćelija (x 27000, RR) b) detalj vegetativne ćelije sa Cs- karboksizomom, Pg i LD (x46460, RR), NP- nukleoplazma, CP- hromatolazma, TH- tilakoidi, ITS- inter tilakoidni prostor, LD- lipidna telašca, R- ribozomi, Cs- karboksizomi, Pg- polifosfatna granula (foto: Fojkar O.).

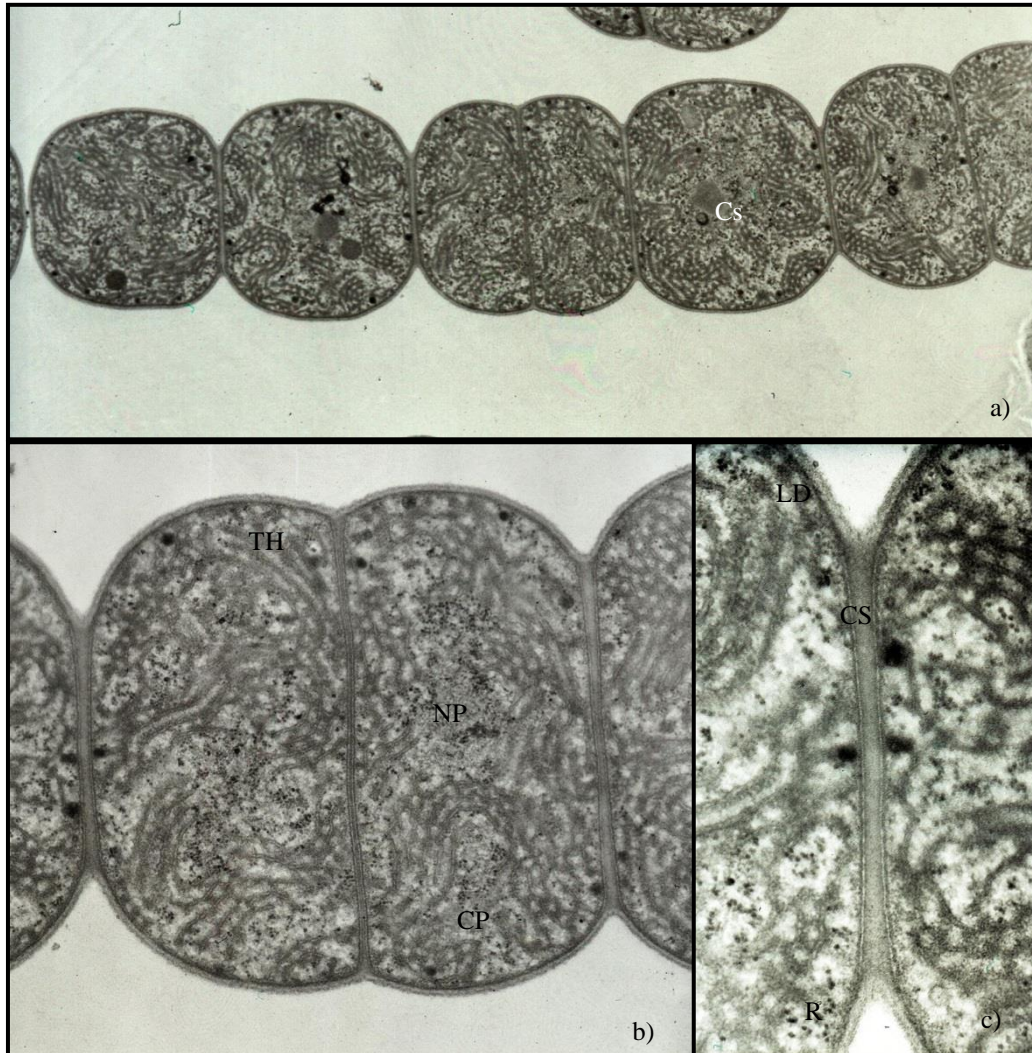


Slika 58. Mikrofotografija -ultrastruktura soja *Nostoc 312*: a) vegetativna ćelija u deobi (x 16700, RR), b) vegetativna ćelija ( x 21560, RR), NP- nukleoplazma, CP- hromatoplazma, CG- cianoficinske granule, PG- polifosfatne granule, Cs- karboksizomi, LD- lipidna telašca, R- ribozomi, GV- gasne vacuole, S- začetak formiranja pregradnog zida, CW- ćelijski zid, PL- plazmalema, TH- tilakoidi, PBS- fikobilizomi (foto: Fojkar O.).



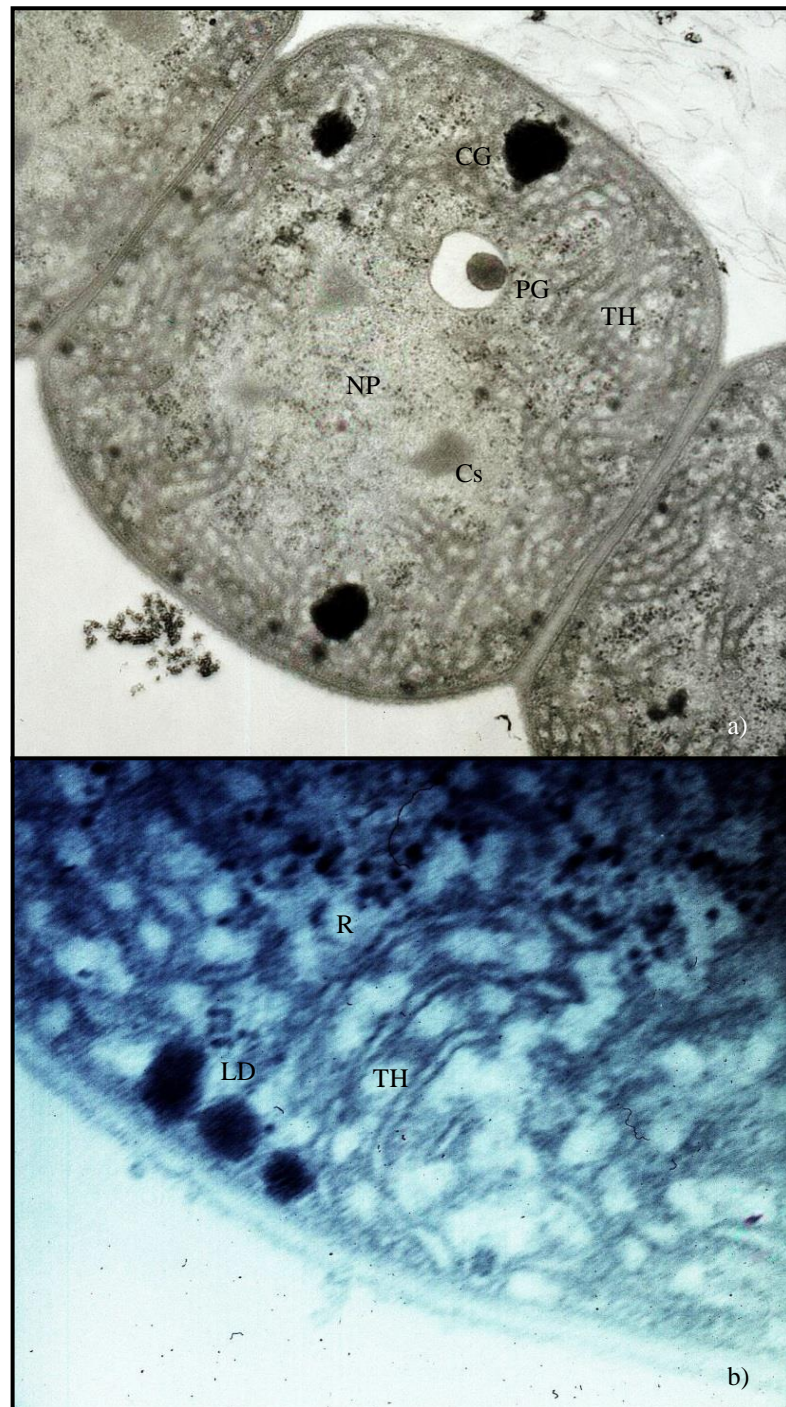


Slika 59. Mikrofotografija - ultrastruktura soja *Nostoc* 312: a) vegetativna ćelija (x 27800, Os), b) detalj PG- polifosfatne granule (x 46460, Os) c) PG- polifosfatne granule (x 46460, Os) d) PG- polifosfatna granula u ranoj fazi (x 35970, Os) (foto: Fojkar O.).

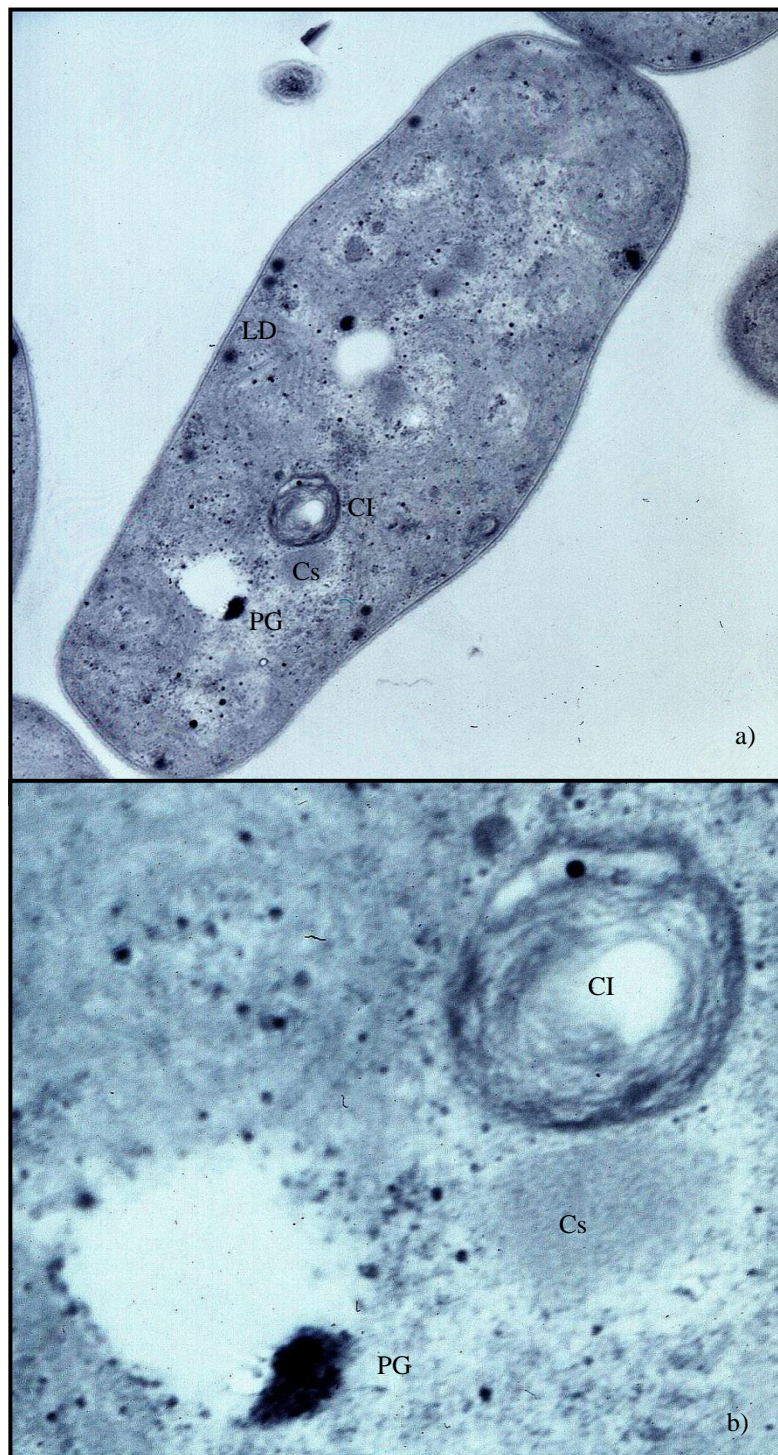


*Slika 60.* Mikrofotografija - ultrastruktura soja *Nostoc* 7901: a) deo niti sa vegetativnim ćelijama (x 6000, RR) b) podeljena vegetativna ćelija (x 21560, RR ), c) septum koji je podelio veg. ćeliju ( x 46460), NP- nukleoplazma, CP- hromatoplazma, Cs- karboksizomi, LD- lipidna telašca, TH- tilakoidi, R- ribozomi, CW- ćelijski zid, CS- kompletni pregradni zid, sastavljen od CM- citoplazma membrane i pg- peptidoglikanskog sloja (foto: Fojkar O.).



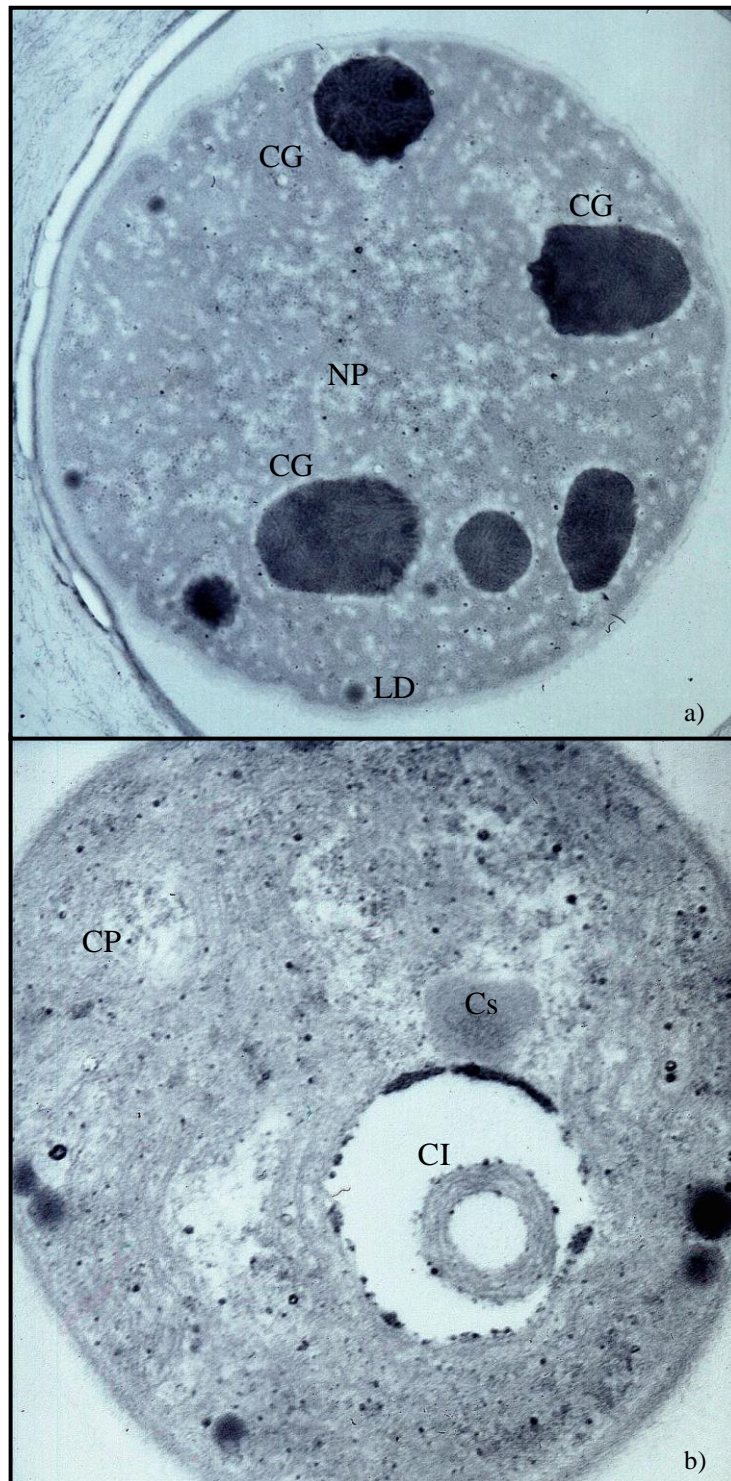


Slika 61. Mikrofotografija - ultrastruktura soja *Nostoc 7901*: a) vegetativna ćelija ( x 21560, RR), b) vegetativna ćelija detalj sa tri lipidna telašca (x 77500, RR), NP- nukleoplazma, CP- hromatoplazna, CW- ćelijski zid, PL- plazmalema, TH- tilakoidi, VT- vezikule tilakoida, PG- polifosfatna granula, CG- cijanoficinske granule, Cs- karboksizomi, LD- lipidna telašca, R- ribozomi (foto: Fojkar O.).



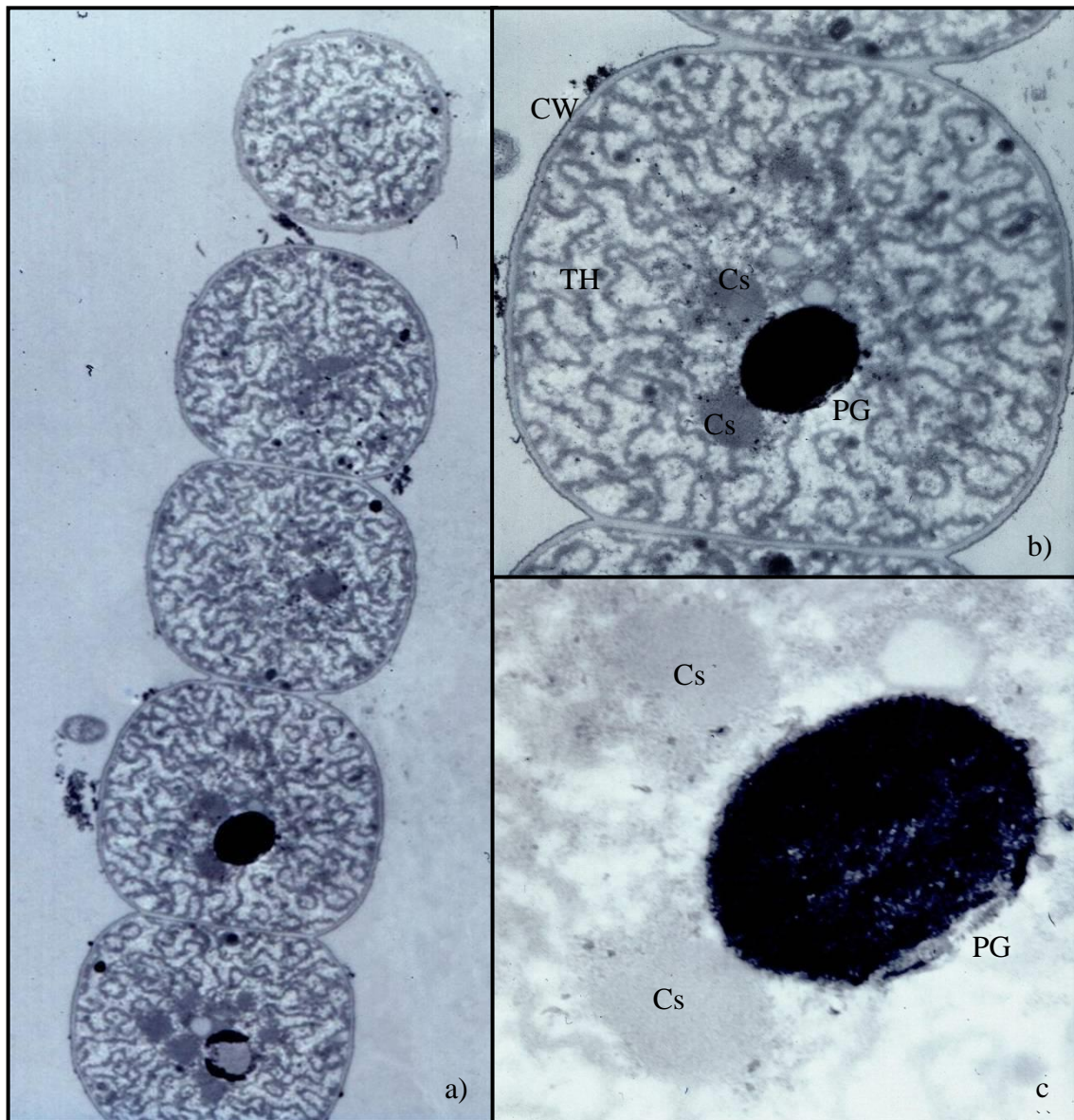
Slika 62. Mikrofotografija - ultrastruktura soja *Nostoc* 9229, a) vegetativna ćelija (x 16700, Os), b) detalj PG- polifosfatna granula i CI- kristalna inkluzija (x 46460, RR), NP- nukleoplazma, CP- hromatoplazna, CW- ćelijskizid, PL- plazmalema, TH- tilakoidi, LD- lipidna telašca, PG- polifosfatna granula, CI- kristalna inkluzija ograničena membranom, Cs- karboksizomi, R- ribozomi (foto: Fojkar O.).





Slika 63. Mikrofotografija - ultrastruktura soja *Nostoc* 9229, a) vegetativna ćelija sa CG cijanoficinskim granulama ( x 21560, RR), b) vegetativna ćelija detalj (x 46460, Os), CI- kristalna inkluzija ograničena membranom, LD- lipidna telašca, Cs- karboksizomi NP- nukleoplazma, CP- hromatoplazma , TH- tilakoidi, R- ribozomi (foto: Fojkar O.).



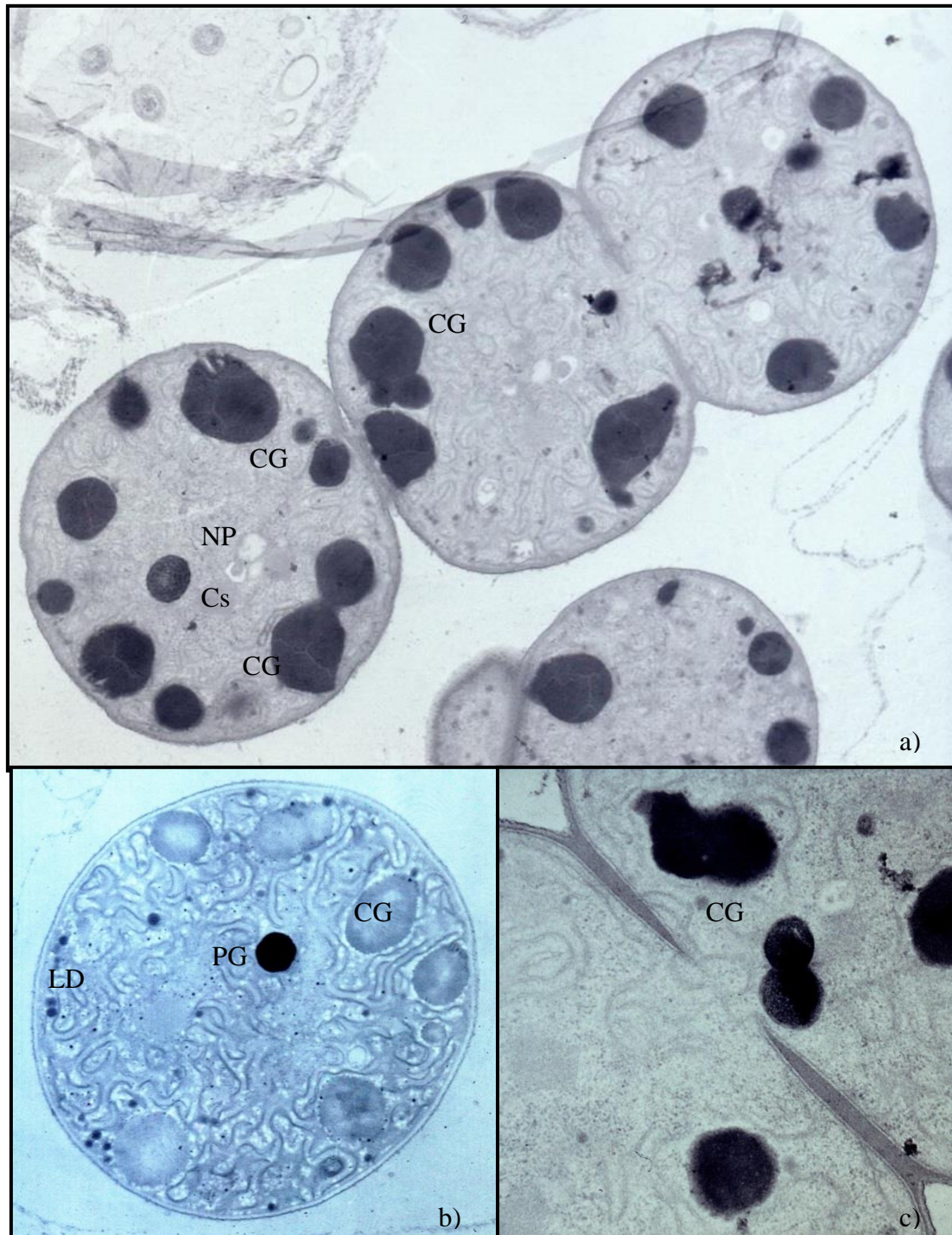


Slika 64. Mikrofotografija - ultrastruktura soja *Nostoc* 8001: a) deo niti sa vegetativnim ćelijama (x 6000, RR) b) vegetativna ćelija sa PG polifosfatnom granulom ( x 21560, RR), c) detalj PG- polifosfatna granula i dva Cs- karboksizoma (x 60000, RR), LD- lipidna telašca, TH- tilakoidi, NP- nukleoplazma, CP- hromatoplazna , CW- ćelijski zid (foto: Fojkar O.).



Slika 65. Mikrofotografija - ultrastruktura soja *Nostoc* 8001: interkalarna vegetativna ćelija (x 27800, Os), Cs- karboksizomi, R- ribozomi, CG-cijanoficinske granule, NP- nukleoplazma, CP- hromatoplazma (foto: Fojkar O.).





Slika 66. Mikrofotografija -ultrastruktura soja *Anabaena* 314, a) nit sa vegetativnim ćelijama ( x 7750 ,RR), b) vegetativna ćelija ( x 12930,RR), c) stvaranje septuma između dve vegetativne ćelije ( x 35970,RR), NP- nukleoplazma, CP- hromatoplazma, CG- cijanoficinske granule, Cs- karboksizomi, LD- lipidna telašca, PG- polifosfatne granule, R- ribozomi, TH- tilakoidi (foto: Fojkar O.).



Slika 67. Mikrofotografija - ultrastruktura soja *Anabaena azollae*, a) nit sa vegetativnim ćelijama ( x 6000,RR), b) uzdužni presek vegetativne ćelije ( x 16700,RR), c) vegetativna ćelija poprečni presek ( x 7750, Os), NP- nukleoplazma, CP- hromoplazma, CW- ćelijski zid, Cs- karboksizomi, PG- polifosfatne granule, CG- cijanoficinske granule, R- ribozomi, CI- kristalne inkluzije, LD- lipidna telašca (foto: Fojkar O.).

### 6.5.2. Ultrastruktura heterocista (HC)

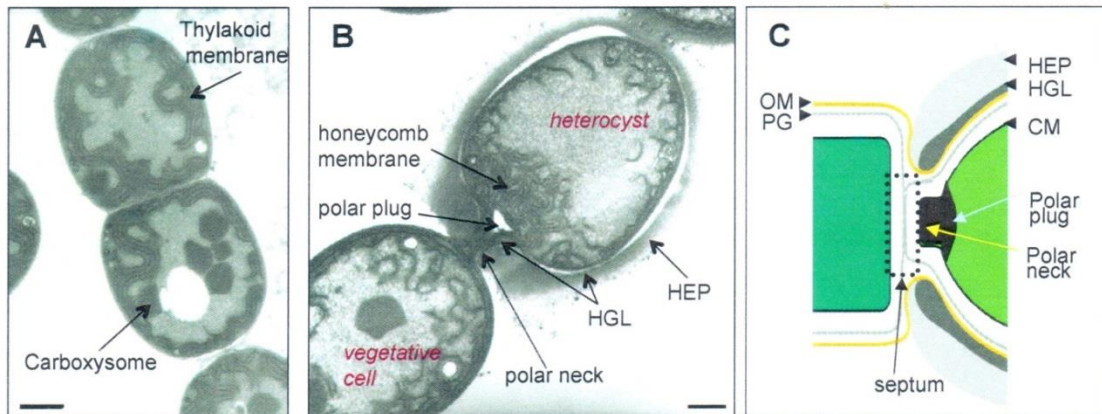
Heterocistne cijanobakterije mogu se smatrati pravim višćelijskim organizmima u kojima dva tipa ćelija vrše podelu metaboličkog rada: vegetativne ćelije fiksiraju CO<sub>2</sub>, a heterociste vrše fiksiraju N<sub>2</sub>.

Ćelije filameta su povezane i zavise jedne od drugih i sposobne su da sarađuju razmenom signalnih molekula i metabolita. Uspostavljanje rasta pri nedostatku azota uključuje tri glavna aspekta: (1) morfološku i funkcionalnu diferencijaciju vegetativnih ćelija koje će biti u stanju da ispune drugi metabolički zadatak; (2) razvoj i održavanje jedno-dimenzionalnog obrazca distribucije ćelija; i (3) komunikacija između ćelija multicelularnog organizma.

Heterocista je dizajnirana da zaštiti nitrogenazu od atmosferskog O<sub>2</sub> kao i od O<sub>2</sub> produkovanog u fotosintezi aktivnih vegetativnih ćelija. (Slika 68. A,B,C; Herrero, 2014). U heterocistama je obezbeđeno mikro-anoksično okruženje pogodno za aktivnost nitrogenaze. Ubrzano disanje, prestanak fotosintetske proizvodnje kiseonika i stvaranje specifičnog ćelijskog omotača koji sprečava prodiranje O<sub>2</sub> su glavna sredstva kojim heterociste stvaraju interne mikro-anoksične uslove.

Više autora se bavilo problematikom ultrastrukture i diferencijacije heterocista, što je od velikog značaja s obzirom da su to ćelije odgovorne za azotofiksaciju. Roussard i Jacquemin (1983) su ispitivali diferencijaciju heterocista kod vrste *Anabaena cylindrica*. Diferencijacija heterocista je bila izazvana nakon prebacivanja soja na medijum bez azota, došlo je do stvaranja specifičnih membranskih struktura koje stvaraju anaerobnu sredinu neophodnu za dejstvo nitrogenaze. Tilakoidne strukture su se značajno izmenile, spljoštile i stanjile, a neke od njih su se uklopile u vezikularne strukture ili plazmalemu. U toku diferencijacije heterocisti polifosfatna tela, cijanoficinske granule, DNA niti i karboksizomi nestaju. Na kraju diferencijacije heterocisti uočavaju se ribozomi, par poliglukozida i brojna lipidna telašca.





Slika 68. Elektronska mikrografije i šema vlakana pri spoju HC i VĆ, *Anabaena* sp. PCC 7120, A) rast u prisustvu nitrata, B) rast bez izvora azota, mera: 0.6  $\mu\text{m}$ ., C) Šema detalji ultrastrukturne veze između vegetativni ćelija i heterociste, HEP: heterocistni omotač polisaharidni; HGL : heterocistni glikolipidni sloj; CM : citoplazmatska membrana ; OM spoljna membrane ; PG : peptidoglikanski sloj (Herrero et al., 2014).

Kod specifičnih ćelija, **heterocista (HC)**, nalazi se znatno složeniji i deblji ćelijski zid u odnosu na vegetativne ćelije. Pored već opisanih slojeva plazma membrane (PM), peptidoglikanskog sloja (PG), spoljašnje membrane (OM), heterociste filamentoznih cijanobakterija su okružene specifičnim glikolipidnim slojem (HGL) i specifičnim polisaharidnim slojem (HEP). Pošto se u heterocistama odvija proces biološke azotofiksacije, ovakav višeslojan ćelijski zid ima funkciju da zaštiti enzimsku nitrogenaznu aktivnost od spoljašnjih uticaja (Lang i Fay, 1971).

Heterocista produkte azotofiksacije preko polarnog telašca, pore i mikroplazmodezmi, koje prolaze kroz septum, dostavljaju vegetativnoj ćeliji sa kojom je povezana. Na površini ćelijskog zida nalazi se sluzni omotač. Sluzni omotači mogu da budu jednostavni ili slojeviti. Sluz štiti ćeliju od isušivanja, a mogu imati i funkciju u procesu puzajućeg kretanja.

Na snimcima elektronskog mikroskopa uočili smo heterociste kod šest od osam ispitivanih sojeva. Heterociste nisu uočene samo kod simbioznog soja N.8001 i diazotrofnog soja A.314.

Sve uočene heterociste su bile znatno većih dimenzija u odnosu na vegetativne ćelije istog soja. Najmanje terminalne heterociste su uočene kod diazotrofnog soja N.302 (2.70 x 2.49 $\mu\text{m}$ ), (Slika 69.) i N.311 (3.52 x 2.75  $\mu\text{m}$ ), (Slika 70.). Znatno veće terminalne HC



poseduju sojevi N.312 (5.44 x 3.45  $\mu\text{m}$ ), (Slika 71.) i simbiozni soj N.7901 (4.84 x 4.45  $\mu\text{m}$ ), (Slika 72.). Simbiozni soj *A.azollae* takođe odlikuju krupne HC (5.05 x 4.14  $\mu\text{m}$ ).

Interkalarne HC su uočene kod diazotrofnih sojeva N.302 (4.85 x 3.05  $\mu\text{m}$ ) i N.311 (5.47 x 3.98  $\mu\text{m}$ ), (Slika 70.) i one su znatno većih dimenzija od terminalnih HC.

**Heterocistni glikolipidni sloj (HGL)** koji obavija ćelijski zid HC je uočen i izmeren kod svih heterocisti. Pokazalo se da se debljina HGL sloja kod sojeva *Nostoc* kretala između 112nm kod diazotrofnog soja N.302 do 132nm kod soja N.312. Debljina HGL sloja je bila znatno veća kod simbioznog soja *A.azollae* i iznosila je 263nm.

Treba istaći da je debljina HGL sloja bila znatno veća na mestu spoja HC sa vegetativnom ćelijom kod svih sojeva gde je to bilo moguće izmeriti. Debljina HGL sloja kod spoja sa VĆ je bila veća kod diazotrofnih sojeva *Nostoc* (N.302- 214nm, N.311- 264nm, N.312- 205nm) nego kod simbioznih sojeva *Nostoc* (N.9229- 135nm, N.7901- 190nm).

**Heterocistni polisaharidni sloj (HEP)** je takođe uočen kod šest sojeva i nalazio se na spoljnoj strani heterocisti. Debljina HEP sloja je kod *Nostoc* sojeva varirala od 116 nm kod diazotrofnog soja N.311 (Slika 70.), do 311nm kod simbioznog soja N.7901 (Slika 72.). Debljina ovog sloja je bila veća od HGL sloja. Kod soja *A. azollae* HEP sloj je varirao od 190 do 777nm .

HEP sloj je na mestu spoja HC sa VĆ bio znatno deblji nego na ostalim delovima ćelije i kretao se od 297nm kod diazotrofnog soja N.311 do 708nm kod simbioznog soja N.7901.

Značajno je zapažanje terminalne heterociste kod soja *A.azollae* snimljene elektronskim mikroskopom tehnikom negativnog bojenja (NS PTA) koja je bila obavijena sluznim omotačem dimenzija 8991 nm.

Kod svih heterocista je zapaženo prisustvo lipidnih telašaca LD. Broj lipidnih telašaca je bio najmanji po preseku i kretao se od 0-5 kod soja N.7901, pa do 11-17 po preseku HC kod soja N.302. U proseku LD su bila zastupljenija kod diazotrofnih sojeva *Nostoc* nego kod simbioznih. Kod *Anabena* soja *A.azollae* je zabeležen najveći broj lipidnih telašaca u heterocistama, kretao se od 11-23.

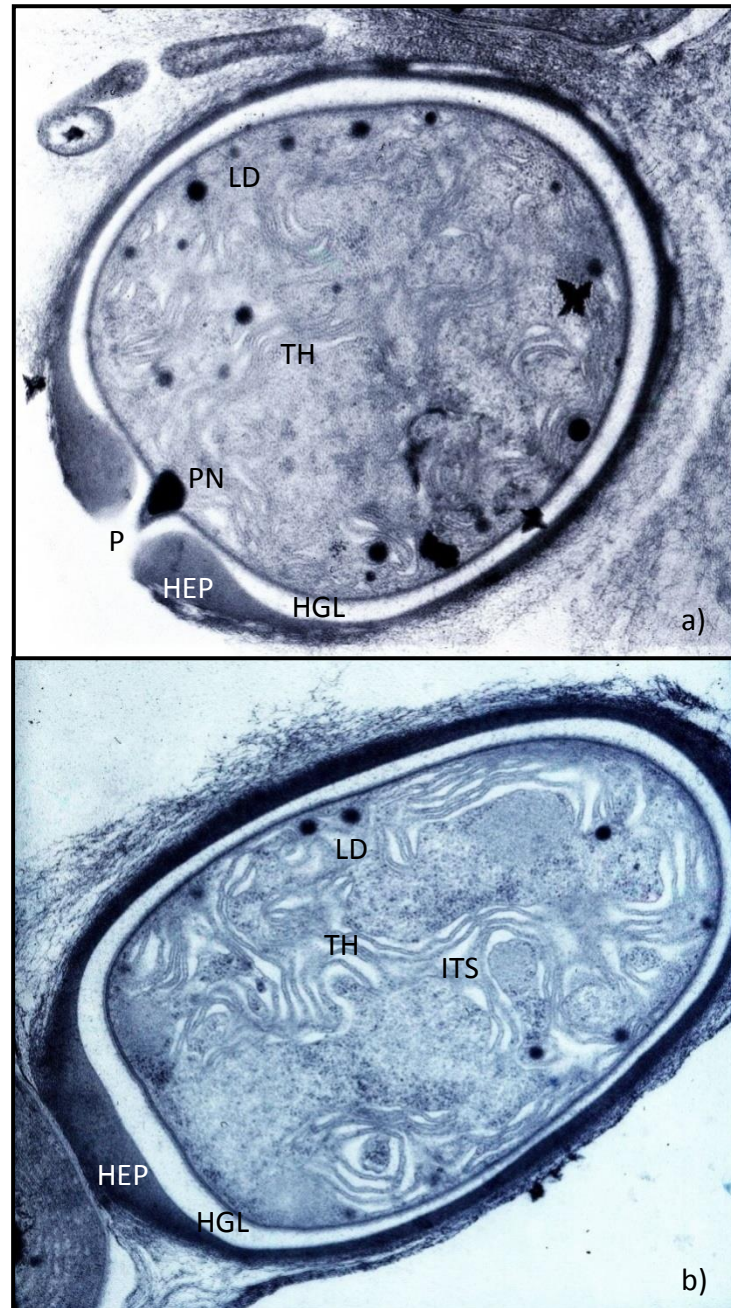
Najmanja lipidna telašca su zabeležena kod soja N.9229 i u prečniku su iznosila do 67nm, (Slika 73 i 74.). Najveće lipidno telašce je zabeleženo kod soja N.7901 , 242nm ( Slika 72.).

Kod soja anabaena *A.azollae* lipidna telašca su bila dimenzija od 64 do 112nm.

Tabela 24. Ultrastrukturne karakteristike heterocista azotofiksirajućih sojeva cijanobakterija

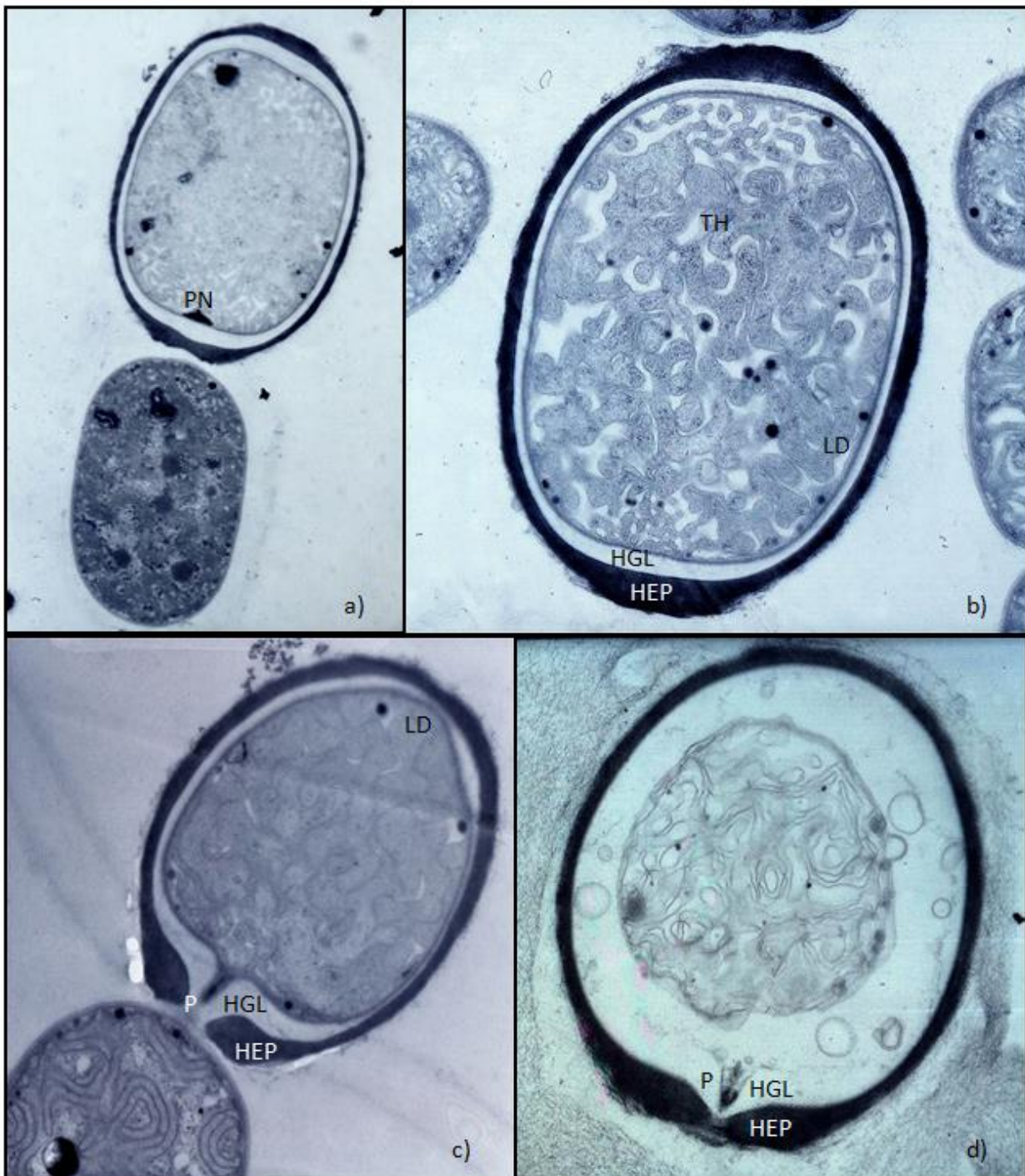
Br.	Soj	Način života	Poreklo	tHC duž x šir ( $\mu\text{m}$ )	iHC duž x šir ( $\mu\text{m}$ )	HEP nm	HEP kod vć (nm)	HGL (nm)	HGL kod vć (nm)	LD br/pres.	LD nm	POSEBNO ZAPAŽNJE
1.	<b>Nostoc 302</b>	diazotrof	solonjec	2.70 x 2.49	4.85 x 3.05	163	352	112	214	11-17	109	-
2.	<b>Nostoc 311</b>	diazotrof	solonjec	3.52x 2.75 3.34 x 2.70	5.47 x 3.98	116	297	119	264	7	86-129	-
3.	<b>Nostoc 312</b>	diazotrof	solonjec	5.44 x 3.45 3.29 x 2.88	-	155	364	132	205	6-7	89-185	-
4.	<b>Nostoc 7901</b>	simbiont	Gunnera dentata	4.84 x 4.45	-	311	708	112	190	0-5	242	-
5.	<b>Nostoc 9229</b>	simbiont	Gunnera monoica	4.22 x 2.48	-	229	485	127	135	7-9	67	-
6.	<b>Nostoc 8001</b>	simbiont	Gunnera monoica	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.	<b>Anabaena 314</b>	diazotrof	černozem	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8.	<b>Anabaena azollae</b>	simbiont	Azolla pinata	5.05 x 4.14 4.47 x 4.47	-	190 - 777	-	263	-	11-23	64-112	Hc sa sluznim omotačem 8991nm

tHC - terminalna heterocista, iHC - interkalarna heterocista, HEP - heterocistni polisaharidni sloj, HGL - heterocistni glikolipidni sloj, LD- lipidno telašce

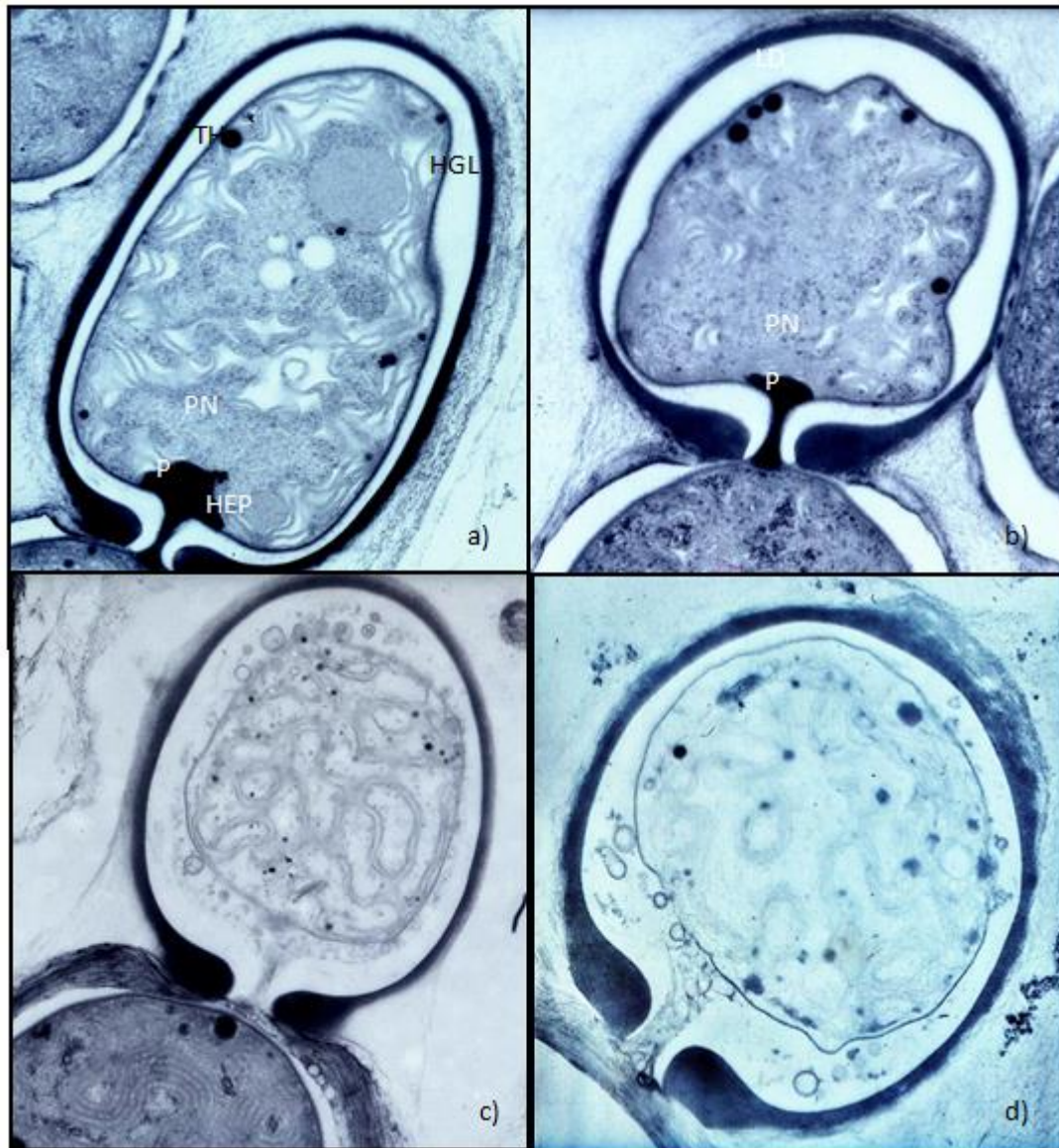


Slika 69. Mikrofotografija - ultrastruktura heterociste soj *Nostoc* 302: a) heterocista (x 16700, RR), b) heterocista (x16700, RR), HEP- polisaharidni omotač; HGL - glikolipidni sloj, PN- polarno telašce, P- pora, PL- plazmalema, TH- tilakoidi, ITS- inter tilakoidni prostor, R- ribozomi, LD- lipidna telašca (foto: Fojkar O.).





Slika 70. Mikrofotografija -ultrastruktura heterociste *Nostoc* 311., a) interkalarna HC i vegetativna ćelija (x 7750, RR) b) interkalarna HC , uzdužni presek (x 12930, RR), c) terminalna HC spojena sa vegetativnom ćelijom, (x 16700, RR), d) slobodna neaktivna terminalna HC ( x 21560,RR), HEP- polisaharidni omotač; HGL - glikolipidni sloj, PN- polarno telašce, P- pora, LD- lipidna telašca, TH- tilakoidi (foto: Fojkar O.).

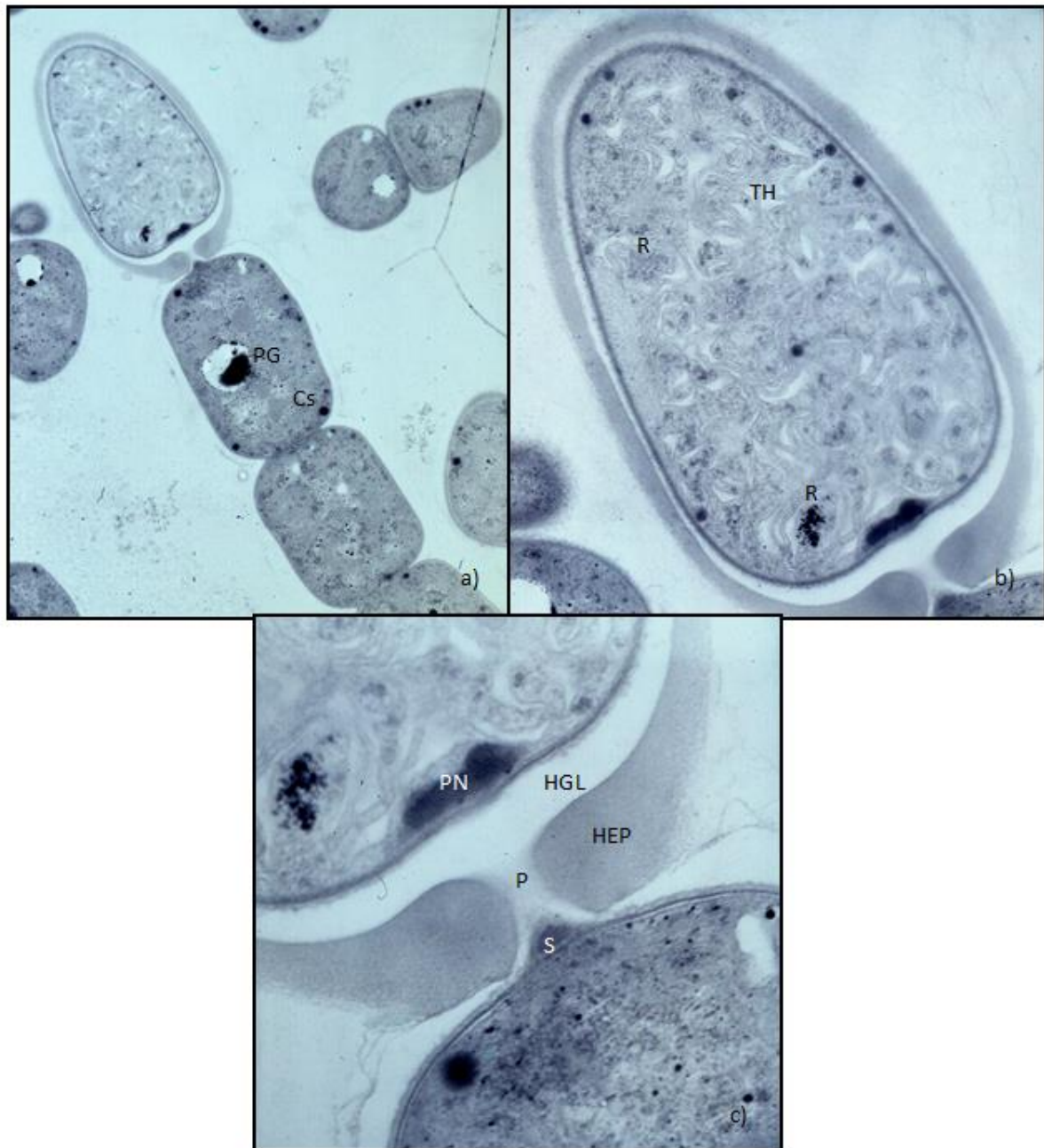


Slika 71. Mikrofotografija - ultrastruktura terminalne heterociste soj *Nostoc* 312: a) vitalna HC (x 12930, RR), b) vitalna HC (x 16700, RR), c) HC smanjene vitalnosti (x 12 930, RR) d) neaktivna HC ( x 21560, Os), HEP- polisaharidni omotač; HGL - glikolipidni sloj, PN- polarno telašce, P- pora, PG- polifosfatne granule, NP- nukleoplazma, CP- hromatoplazma, R- ribozomi, LD- lipidna telašca, TH- tilakoidi (foto: Fojkar O.).



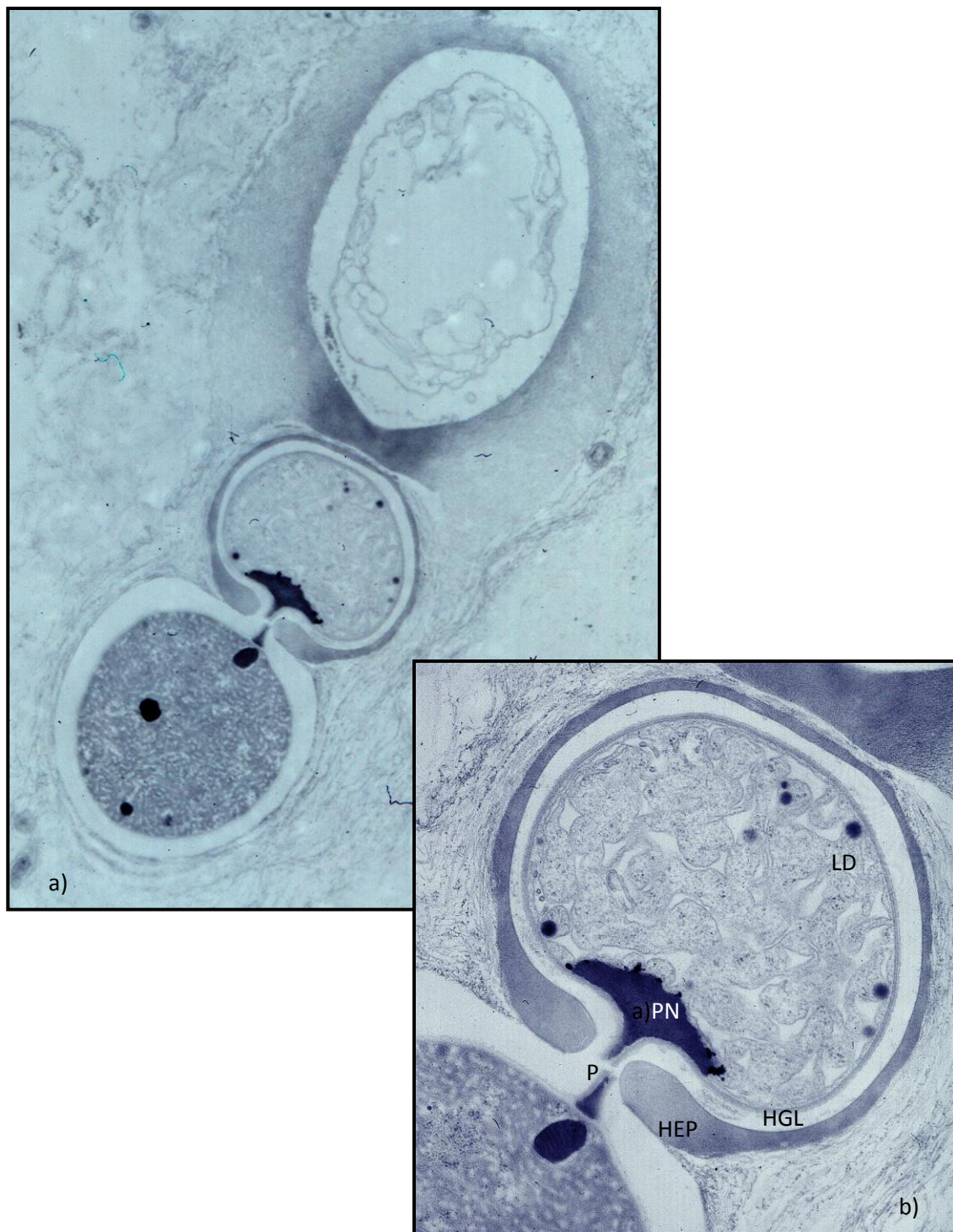


Slika 72. Mikrofotografija - ultrastruktura soja *Nostoc* 7901: a) spoj terminalne heterociste HC i vegetativne ćelije VČ (x10000, Os), HEP- polisaharidni omotač; HGL- glikolipidni sloj, CW- ćelijski zid, LD- lipidna telašca, R- ribozomi (foto: Fojkar O.).



Slika 73. Mikrofotografija - ultrastruktura heterocista soja *Nostoc* 9229: a) nit sa terminalnom heterocistom i veg. ćelijama, PG- polifosfatna granula, Cs- karboksizomi, LD- lipidna telašca, R- ribozomi (x 7750, Os), b) terminalna heterocista, TH- tilakoidi, (x 21560, Os), c) detalj spoj heterociste i vegetativne ćelije (x 46460, Os), HEP- polisaharidni omotač; HGL - glikolipidni sloj, PN- polarno telašce, P- pora, S- septum, CW- ćelijski zid (foto: Fojkar O.).





Slika 74. Mikrofotografija - ultrastruktura heterocista soja *Nostoc* 9229: a) spoj vegetativne ćelije i terminalne HC i odumrla terminalna HC (x 6000, RR ), b) detalj spoj terminalne HC i vegetativne ćelije (x 21560, RR), HEP- polisaharidni omotač; HGL - glikolipidni sloj, PN- polarno telašce, P- pora, LD- lipidna telašca (foto: Fojkar O.).

### 6.5.3. Ultrastruktura površinskih struktura: fimbrije - pili

Sem sluznog omotača na površini cijanobakterijske ćelije mogu se uočiti končaste strukture mikrofibrili, fimbrije ili pili (F) (Fogg i Stewart, 1973). Fimbrije (Pili), odnosno bakterijski proteinski dodaci, su važni za bakterijsku kolonizaciju raznih biljnih i životinjskih organizama (Iwanaga i Hokama, 1992). Korelacija između prisustva pili i naseljavanja *Pseudomonasa* na korene biljaka i lišća je takođe bilo dokazano (Korhonen et al. 1983; Vesper i Bauer, 1986; Vesper, 1987; Romantschuk et al., 1993). Osim toga, fimbrije mogu biti odgovorne i za pokretljivost bakterija i cijanobakterija (Herdman i Rippka, 1988; Damerval et al., 1991).

Fimbrije su specifične i za simbiotske cijanobakterije i pronađene su kod nekoliko izolovanih sojeva *Nostoc* iz cikada (Lindblad i Bergman, 1990). Važna karakteristika u ranim fazama infekcije, bilo simbiotske ili patogene bakterije je prijanjanje na svog domaćina. Inicijalno prijanjanje je izgleda uglavnom nespecifično (Romantschuk, 1992), ali je često praćeno od više specifičnih vezivanja. Adhezija može biti posredovana celuloznim fibrilima, lipopolisaharidima,  $\beta$  - 2-glukanom ili fimbrijama (Halverson i Stacey, 1986; Romantschuk, 1992).

I jednoćelijske i filamentozne cijanobakterije pokazuju različite vrste pokretljivosti, imaju sposobnost da se kreću na površinama i da plivaju u tečnostima. Pokretljivošću cijanobakterije mogu da regulišu važne odgovore na signale životne sredine kao što su svetlo ili hemijski sastav podloge. U nekim slučajevima, pokretljivost je omogućena postojanjem pila, fimbrija, tipa IV PILA (TFP). Klizeća pokretljivost je aktivna translokacija bakterijske ćelije na čvrstoj podlozi duž njene uzdužne osa. Pojava klizanja je zapažena kod nekoliko filogenetski različitih grupa bakterija, uključujući *Chloroflexaceae*, miksobakterije, članove *Bacteroidetes*, i filamentoznih cijanobakterija. Mehanizam klizanja nije još potpuno razjašnjen jer ni struktura ni organele nisu još lako vidljive. Verovatno da postoji više mehanizama koji su odgovorni za ovaj tip kretanja (Jarrell i McBride, 2008. ; Mauriello et al., 2010).

## Zastupljenost fimbrija (pila) kod ispitivanih sojeva cijanobakterija

Zastupljenost fimbrija (pila) smo pratili kod ispitivanih sojeva cijanobakterija koristeći dve tehnike bojenja na transmisionom elektronskom mikroskopu. Koristili smo klasično bojenje sa RR sa ultratankim preseccima na mikrotomu i negativno bojenje NS PTA takođe na TEMu. Bojenje sa RR smo koristili pre svega zbog ispitivanja unutrašnje strukture ćelija i prisustva različitih inkluzija i nismo se nadali da ćemo uz pomoć ove tehnike zabeležiti fimbrije i slične strukture na površini ćelije. Tehnika negativnog bojenja sa NS PTA je uobičajena tehnika za ispitivanje prisustva fimbrija (pila). Zastupljenost fimbrija kod istraživanih sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija su predstavljeni na mikrofotografijama, slikama 77 - 88.

Koristeći tehniku bojenja ćelija sa RR i ultratankih preseka uočili smo fimbrije na pojedinim vegetativnim ćelijama kod pet (5) od osam ispitivanih sojeva cijanobakterija. Zastupljenost fimbrija je uočena kod dva diazotrofna soja *Nostoc*: N.302 i N.311, i kod jednog simbioznog N.9229 (CNCM). Kod oba soja *Anabena* je uočeno prisustvo fimbrija i kod diazotrofa A.314 i kod simbionta *A. azollae*, tabela 25.

Kod diazotrofnog soja *Nostoc* N.302 na površini vegetativne ćelije je uočen gust sloj, prekrivač, fimbrija, uvećanje od 46460 puta. Pojedinačne fimbrije su bile dužine od 129-221nm, a širine od 6.45 - 7.37nm. Čini se da je na jednom delu ćelijskog zida došlo do odvajanja ovog sloja fimbrija. Slično je zapažanje i kod drugih sojeva, pa je moguće da je ova tehnika gruba i da usled pripreme uzoraka dolazi do odvajanja sloja fimbrija, ljušćenja sa ćelija zbog čega se one teško zapažaju, Slika 77.a.

Kod diazotrofnog soja *Nostoc* N.311 uočili smo pojedinačne fimbrije, grupu od desetak fimbrija, između vrhova dve vegetativne ćelije pri uvećanju od 46460 puta. Ove fimbrije su bile dužine od oko 315 - 341nm. Širina fimbrija je iznosila 6.95 - 8.34nm, Slika 79.b.

Simbiozni soj *Nostoc* N.9229 (CNCM) je na vrhu vegetativne ćelije imao grupu od više desetina fimbrija. Čini se da je to vršna vegetativna ćelija kratke niti, verovatno hormogonije. Dužina ovih fimbrija je iznosila 201 - 226nm. Debljina fimbrija je varirala od 5.74 - 11.14nm, Slika 81.

Kod diazotrofnog soja *Anabena* A.314 smo uočili gust sloj fimbrija oko vegetativne ćelije, slično kao kod soja N.302. Dužina ovih fimbrija je iznosila od 147 - 226nm, a debljina između 4.62 - 6.4nm. Ova zapažanja smo zabeležili na uvećanjima od 46460, 60000 i 77500 puta. Značajno je zapažanje i loptastih struktura ispod sloja fimbrija koje kao da su se takođe "otkačile" od površine ćelijskog zida, Slika 84.

Na vrhovima, ali i na bočnoj strani pojedinih vegetativnih ćelija kod simbioznog soja *Anabaena azollae* uočili smo mnoštvo fimbrija. Ove fimbrije su bile duge 301 - 445nm, a široke 5-6nm, Slika 86.

Iz navedenih podataka može se uvideti da najduže fimbrije poseduje soj *A.azollae* i do 445nm, a da najkraće fimbrije poseduje diazotrofni soj N.302 od 129 -221nm. Svi sojevi imaju dosta ujednačenu debljinu fimbrija i kreće se između 4.62 - 11.14nm. Najtanje fimbrije su zabeležene kod diazotrofnog soja A.314 (4.62-6.4nm), a najdeblje kod simbioznog soja N.9229 (CNCM) i do 11.14nm.

Koristeći transmisioni elektronski mikroskop i tehniku negativnog bojenja **NS PTA** ustanovili smo da šest (6) od osam ispitivanih sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija poseduje ekstracelularne fimbrije, pili. Fimbrije smo ovom metodom detektovali kod diazotrofnih sojeva *Nostoc*: N.302 i N.311. Kod simbioznih sojeva *Nostoc* N.7901 (CCAP) i N.9229 (CNCM) smo takođe detektovali fimbrije. Kod diazotrofnog soja *Nostoc* N.312 i simbioznog N.8001 (CCAP) nisu detektovane fimbrije, odnosno pili. Kod oba soja *Anabena*, diazotrofnog soja A.314 i simbioznog *A.azollae*, su detektovane fimbrije, videti tabelu 26.

Tipične fimbrije, pili, cevaste strukture su zapažene kod tri soja: diazotrofnog N.302, i simbioznih N.7901 (CCAP) i N.9229 (CNCM). Tipična struktura fimbrija, odnosno pili znači da su ekstracelularne tvorevine definisanog oblika, da im je jasno određena granica igličaste strukture. Pouzdano ne možemo utvrditi da li je igličasta struktura šuplja ili ne i da li je njena funkcija razmena određenog biološkog materijala, genetskog ili drugog. Zajedničko za prisustvo pili kod ovih sojeva je da su relativno retke brojčano. Kod sojeva N.302 i N.7901 (CCAP) su pronađene kod svega par vegetativnih ćelija u desetak primeraka, Slika 77.b., 78.b, 80.b.. Soj N.9229 (CNCM) je bio bogatiji sa fimbrijama i one su posebno dominirale u pazušnom delu dve vegetativne ćelije, odnosno mestu spoja dve ćelije. Na centralnom delu vegetativnih ćelija fimbrije su bile znatno ređe, Slika 82.



Fimbrije igličaste, tipične strukture, kod ova tri soja su bile karakteristične debljine od 6.68 - 7.8nm kod soja N.7901 (CCAP), od 7.1 - 8.34nm kod N.302, i do 9.5 - 10.7nm kod N.9229 (CNCM). Dužina tipičnih fimbrija kod ova tri soja je varirala od najkraćih kod N.7901 (CCAP) 671-685nm, preko fimbrija kod soja N.9229 (CNCM), 1392 - 1488nm, do diazotrofnog soja N.302, čije su fimbrije bile duge od 922 do čak 2571nm.

Za razliku od do sada opisanih tipičnih igličastih fimbrija, kod sojeva *Anabena*, A.314 i *A.azollae*, kao i kod soja *Nostoc* N.311, negativnim bojenjem NS PTA uočili smo veoma izraženi, atipični "fibrilarni" sluzni omotač. Ovaj omotač je veoma moćan i izražen kod sojeva *Anabena*, kod soja A.314 je dužine od 3550 do 3858 nm (Slika 85.), dok je kod soja *A.azollae* još moćniji dužine od 3690 do 6206nm, (Slika 87.) Atipični sluzni omotač soja N.311 je nešto skromniji i kreće se između 2680 do 2944nm, (Slika 79. a,c).

Ovde ne možemo govoriti o debljini fimbrija ili pili jer nisu jasno definisane strukture, nisu jasno ograničene ivicama, ali širina "sluznih fimbrija" se kretala od 18.5 - 23.15nm kod A.314, 18.7 - 28.06nm kod N.311, do 18.43 - 46.2nm kod simbioznog soja *A.azollae*.

Kod ova tri soja sa zrakastim atipičnim sluznim omotačima uočili smo postojanje svojevrsnih "kuglica" u omotaču. Prisustvo "kuglica" u omotaču je posebno izraženo kod soja *A. azollae*, kuglice su dimenzija od 514 - 553 nm, (Slika 87 i 88.). Sem "kuglica" prisutna su i zrnca dimenzija 51-90nm. Kuglice u omotaču atipičnog sluznog omotača soja A.314 su dimenzija od 333-500nm, a zrnca 55-97nm, (Slika 85.). Kod diazotrofnog soja *Nostoc* N.311 kugličaste strukture su manje zastupljene, ali su i one uočljive i dimenzija su 277-366nm, a zrnca 83-129nm, (Slika 79.). Nejasna je funkcija ovih kugličastih struktura u omotaču fimbrija i do sada nemamo podataka o njima u literaturi. Možda se radi o artefaktima, nečistoćama, koji potiču usled tehnike bojenja, u svakom slučaju buduća istraživanja će to razjasniti.

Kada uporedimo zastupljenost fimbrija - pili kod ispitivanih sojeva cijanobakterija koje smo dobili sa dve tehnike bojenja na TEMu uvidećemo da se dobijeni rezultati delimično razlikuju. Bojenjem sa RR i posmatranjem ultratankih preseka utvrdili smo prisustvo **omotača od fimbrija** kod tri soja (A.314, *A.azollae* i N.302) i **tipične fimbrije** kod dva soja (N.311 i N.9229). Metodom negativnog bojenja NS PTA uočili smo takođe **tipične fimbrije**, igličastog-dlakastog izgleda, jasnih granica niti kod tri soja (N.302, N.7901 i N.9229), međutim uočili smo i **atipične sluzne fimbrije**, koje nemaju jasno izražene granice ali su veoma moćno raširene

oko vegetativnih ćelija, kod tri soja (A.314, *A.azollae*, N.311), ali sluzne niti - fimbrije, smo u mnogo skromnijoj meri, detektovali i kod soja N.302 (Slika 78.a).

Tabela 25. Zastupljenost i karakteristike fimbrija na veg. ćelijama azotofiksirajućih sojeva cijanobakterija

Br.	Soj	Način života	Poreklo	FIMBRIJE RR	FIMBRIJE RR duž (nm)	FIMBRIJE RR šir (nm)	FIMBRIJE NS PTA	FIMBRIJE NS PTA duž (nm)	FIMBRIJE NS PTA šir (nm)	POSEBNO ZAPAŽANJE
1.	Nostoc 302	diazotrof	solonjec	++ omotač od fimbrija	129-221	6.45-7.37	+ tipične , ali i atipične sluzne	922-2572	7.1-8.34	-
2.	Nostoc 311	diazotrof	solonjec	+ tipične	315-341	6.95-8.34	+++ atipične sluzne	2680-2944	18.7-28.06	Kuglice u omotaču fimbrija 277-366 nm Zrnca 83-129 nm
3.	Nostoc 312	diazotrof	solonjec	-	-	-	-	-	-	-
4.	Nostoc 7901	simbiont	Gunnera dentata	-	-	-	+ tipične	671-685	6.68-7.8	-
5.	Nostoc 9229	simbiont	Gunnera monoica	+ tipične	201-226	5.74-11.14	++ tipične	1392-1488	9.5-10.7	Na mestima spoja dve veg. ćel. u grupama
6.	Nostoc 8001	simbiont	Gunnera monoica	-	-	-	-	-	-	-
7.	Anabaena 314	diazotrof	černozem	++ omotač od fimbrija	147-226	4.62-6.4	+++ atipične sluzne	3550-3858	18.5 -23.16	Kuglice u omotaču fimbrija 333-500 nm Zrnca 55-97 nm
8.	Ananaen aazollae	simbiont	Azolla pinata	++ omotač od fimbrija	301-445	5-6	+++ atipične sluzne	3690-6206	18.43 - 46.2	Kuglice u omotaču fimbrija 514-553 nm Zrnca 51-90 nm

Dimenzije fimbrija, bilo omotača od fimbrija ili tipičnih fimbrija, utvrđenih metodom bojenja RR su manjih dimenzija, i dužine i širine, nego fimbrija ispitivanih metodom NS PTA. Fimbrije merene RR metodom su dužine od 129 do 445nm, dok su višestruko duže kod NS PTA metode, od 671 - 6206nm. Širina fimbrija kod RR metoda se kreće od 4.62-11.14nm, dok se kod metoda NS PTA kreće od 6.68 do 46.2nm.

Metod bojanja ćelija RR i ultratankih preseka mikrotomom se pokazao dosta agresivnim metodom za ispitivanje površinskih struktura na vegetativnim ćelijama cijanobakterija. Vrlo često smo nalazili ogoljene, oljuštene, ćelijske zidove vegetativnih ćelija i slojeve fimbrija slobodne u prostoru daleko od ćelija. Tako da se naša zapažanja odnose na one retke delove preparata gde nije došlo do odvajanja površinskih struktura.

Sa druge strane čini se da je metod NS PTA manje agresivan i da registruje strukture na površini ćelije netaknute, ne ruinirane. Međutim, ovaj metod ne daje mogućnost povezivanja zavisnosti spoljašnjih i unutrašnjih struktura u vegetativnoj ćeliji.

Mnogi autori pominju postojanje većeg broja različitih vrsta pila, fimbrija kod grupe gram negativnih bakterija, gde spadaju i cijanobakterije. Metodi koje smo koristili su neselektivni i pružaju nam mogućnost da se upoznamo i detektujemo sve površinske strukture na ćelijama cijanobakterija. Naša istraživanja su pokazala da postoje različite vrste fimbrija, pila, na površini vegetativnih ćelija cijanobakterija, pre svega tipične, igličaste fimbrije i sluzne atipične fimbrije.

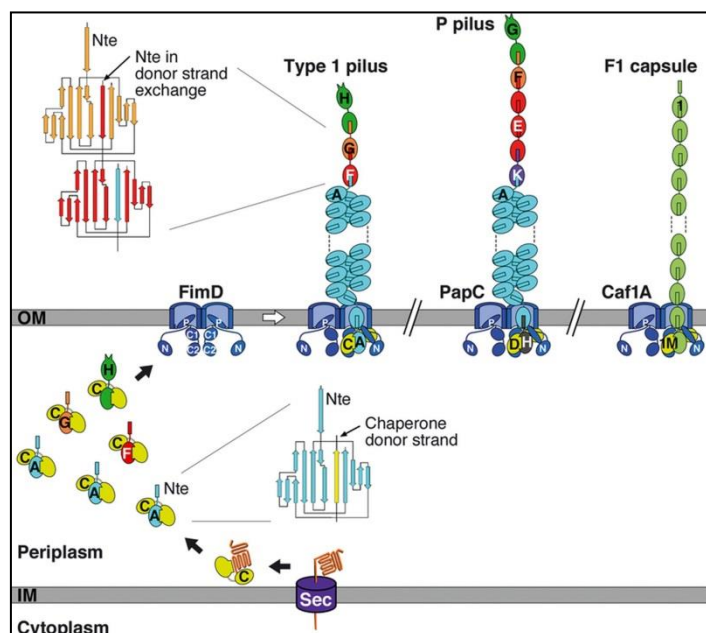
Thanassi et al. (2012) navode da gram-negativne bakterije, gde spadaju i cijanobakterije, poseduju širok spektar organela na njihovoj ćelijskoj površini. Ove površinske strukture mogu biti proizvod sekrecionog sistema koji je smešten u ćelijskom zidu, koji luči fimbrije - pili slično kao što se luče vlakna kose. Oni navode da bakterijske površinske strukture obavljaju razne funkcije koje su bitne za patogenezu i stvorene su, evoluirale su, da izdrže razne uticaje spoljašnje sredine i da se nose sa odbranom od strane imunog sistema domaćina. Thanassi et al. opisuju strukturu i funkciju površinskih organela nastalih od četiri različita bakterijska sekreciona sistema Gram-negativnih bakterija: CU puta, nastanak tipa IV pila, tip III i tip IV sekrecionog sistema. Organele poput flagela i pili možemo smatrati funkcionalno krajnjim proizvodom bakterijskog sekrecionog sistema. Ustvari one su nastale kao produkt sistema lučenja i imaju funkciju pokretljivosti i-ili prianjanja bakterija. Međutim, neki

sekrecioni sistemi stvaraju pile - kao strukture da služe za izlučivanje materija izvan bakterijskog omotača, kao vodovi za isporuku materija. Takve površinske strukture takođe mogu da pruže senzorne povratne informacije do sekrecionog sistema za otkrivanje kontakta ćelije ili funkcionišu kao mehanizam za prijanjanje da omoguće pristajanje bakterije na ćeliju domaćina.

### Tipovi sistema lučenja kod bakterija

Thanassi et al. (2012) opisuju organele smeštene u ćelijskom zidu Gram - negativnih bakterija koje stvaraju veliki broj virulentnih - prijanjajućih vlakana, pili. Ove organele su dobile naziv CU organele, prema komponentama svoje sekrecione mašine (chaperone-usher), koja se sastoji od namenskih periplazmičkih **transportera** i sastavnog dela spoljne membrane (OM) mesta nastanka fimbrija - pili, platforme nazivane "**poslužitelj**", mesto formiranja fimbrija, Slika 75.. CU organela stvara peritrihalna površinska vlakna koja mogu biti različita od tankih, fleksibilnih vlakana do krutih, igličastih PILA ili fimbrija. Ove strukture uglavnom funkcionišu kao strukture za prijanjanje, za vezivanje bakterija za tkivo domaćina i interakcije sa tkivom domaćina. Kao takve, organele nastale u CU procesu često funkcionišu kao ključni faktor virulencije.

Struktura CU pili je optimizirana da izdrži razne uslove na koje nailaze tokom kolonizacije površina, i svaka pila je prilagođena svojim posebnim funkcijama. Pored kolonizacije površine domaćina, CU pili su važne za bakterijsko-bakterijske interakcije, formiranje biofilma, kao i prijanjanje na abiotičke površine. Mehanizam nastanka vlakana, pila i fimbrija, i njihovo lučenje od strane CU organele je bio predmet opsežnih studija, posebno kod patogenih bakterija. CU organele su rasprostranjene među članovima grupa bakterija: *c-proteobacteria*, uključujući *E. coli*, *Salmonella*, i *Yersinia*, a pronađene su i među članovima *β-proteobacteria*, *Cyanobacteria* i bakterije *Deinococcus* (Yen et al., 2002; Nuccio i Baumler, 2007).



Slika 75. Model biogeneze pili, CU put nastanka. Prikazane su faze nastanka: tip 1 PILI kod *Escherichia coli*, kao i modeli za nastanak P pili i *Yersinia pestis* F1 kapsule. FIM, Pap, i Caf proteini su označeni sa pojedinačnim slovima (H, FimH; C, FimC; itd.). Delovi za Pili ulaze u periplazmu kao rastavljeni polipeptidi putem Sec puta. Podstanice puta stupaju u interakciju sa periplazmatskim transporterom, formiranjem stabilnog kompleksa preko dopunjavanja donator lanca. Nastanak i sekrecija vlakna pili se javlja u OM ploatformi, gde se transporter-podjedinica veza zamenjuju sa podjedinica-podjedinicom vezom putem razmene reakcije donator lanca. Dimerni razvodnici (vratarji) su prikazani sa područjem za priključak koji je kapija zatvarača kanala (P) i periplazmičke N i C domene. N Domen formira početno vezivanje za pratilja-podjedinica kompleks, a C domeni obezbeđuju druga vezivanja za nastanak pili vlakna. Pratilja-Adhesin kompleksi imaju najveći afinitet za poslužitelja i pokrenuti pilus sklop vezivanjem za poslužitelja N domena, (Thanassi et al., 2012).

Geni za CU organele su kodirani na obe DNA, i hromozomsku DNA i plazmidnu DNA lokaciju. Ekspresija CU klastera gena je obično visoko uređena, i predstavlja odgovore na signale životne sredine (Chen i Elberg, 1977; Van der Woude et al., 1996; Blomfield, 2001).

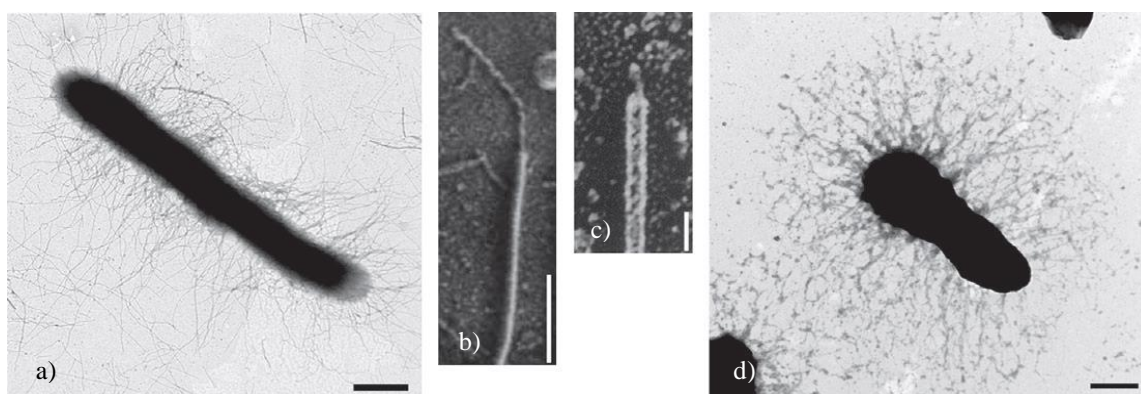
Pili nastale u CU organelama su dimenzija od 2 do 10 nm u prečniku i uobičajeno su 1-3  $\mu\text{m}$  dužine. Ove Pili se mogu podeliti na dve opšte strukturne klase. Prva klasa se sastoji od krutih, igličastih vlakana većeg promera, a druga klasa se sastoji od tankih, fleksibilnih vlakana ili amorfne strukture, (Thanassi et al. 2012).

CU organele mogu biti podeljene u dve podfamilije na osnovu različitih konzerviranih sekvenci prisutnih u **transporterima** - pratiocima. Transporteri - pratioci, sa kratkim petljama



koje povezuju njihove F1 i G1 b-niti pripadaju F1-G1 kratkoj podfamiliji (FGS), a pratile s dugom F1-G1 petljom pripadaju FGL podfamiliji (Hung et al., 1996; Zavialov et al., 2007). Zanimljivo je da, FGL transporteri - pratioci sastavljaju samo tanka ili amorfna pilus vlakna sastavljena samo od jednog ili dva tipa subjedinica. Nasuprot tome, FGS pratioci sastavljaju oba igličasta i tanka pilus vlakna, a vlakna su generalno sastavljena od više različitih tipova podjedinica i mogu imati složenu strukturu.

Na primer pili P i tip 1 Pili kod izrazito uropatogene *E. coli* (UPEC) su prototipi za krute, kosi nalik Pili koje pripadaju FGS podfamiliji, a nasuprot njima F1 kapsula kod bakterije *Yersinia pestis* je prototip tanke, "afimbrialne" strukture sastavljene od strane FGL podfamilije pratioca, Slika 76..



Slika 76. TEM mikrofotografije pili nastalih u CU organelama. (a) *Escherichia coli* bakterija stvara P pili. (b) i (c) Visoka-rezolucija, izgled pojedinačnih pili *E. coli* : P i tipa 1 pili, pokazuje vršni deo linearnog tipa vlakna i spiralne igličaste pili. (d) *Yersinia pestis* bakterija ispoljava F1 kapsulu. Skala 500nm (a), 100nm (b), 20nm (c), i 500nm (d). Foto (a –d) (Kuehn et al., 1992; Jones et al., 1995; Runco et al., 2008; Li et al., 2010).

F1 kapsula *Y. pestis* formira gustu prevlaku oko bakterije koja, nasuprot funkcije prijanjanja, lepljenja, koju imaju Pili, deluje kao "antiadhezivna" struktura koja sprečava fagocitozu makrofaga i sprečava okupiranje epitelnih ćelija respiratornog trakta (Du et al., 2002; Liu et al., 2006). F1 kapsula je takođe važan zaštitni antigen *Y. pestis* i ima ulogu u prenosu virulentnosti (Titball i Vilijamson, 2001; Sebbane et al., 2009; Weening et al., 2011).

Upoređujući izgled fimbrija i pili koji smo utvrdili kod ispitivanih sojeva cijanobakterija možemo povući paralelu i naći sličnost sa opisanim pilima kod gram negativnih bakterija. Fimbrije - pili koje smo opisali kao tipične pili, igličastog izgleda, možemo svrstati u Prvu klasu fimbrija krutih, igličastih vlakana. Fimbrije-pili koje smo opisali kao atipične sluzne

fimbrije, veoma podsećaju na one opisane kod roda *Yersinia* i spadaju u Drugu klasu amorfnih, fleksibilnih tankih vlakana. To bi značilo da određene cijanobakterije, u našem slučaju *Anabena* sojevi A.314 i *A.azollae*, kao i *Nostoc* N.311 grade omotač sličan F1 kapsuli. Dosadašnje iskustvo u gajenju sojeva cijanobakterija u čistoj kulturi nam govori da sojevi *Anabena* često izlučuju veće količine sluzi, ekstracelularnih polisaharida u tečni medijum što sada možemo povezati sa fimbrijama **druge klase i F1 kapsulom**. Takođe sojevi *Anabena* na čvrstoj agarizovanoj podlozi često stvaraju kolonije sa obiljem prozirne sluzi.

Naša merenja pokazuju da se debljina atipičnih sluznih fimbrija-pili kreće između 18.43 - 46.2nm, dok Thanassi et al. (2012) navode da su fimbrije Druge klase tanje od 6-10nm, što upućuje da je moguće da se naša merenja odnose na snopove zalepljenih fimbrija.

Poredeći rezultate zastupljenosti fimbrija - pili kod simbioznih i diazotrofnih sojeva možemo zaključiti da se pili javljaju kod tri simbiozna (N.7901, N.9229 i *A.azollae*) i kod tri diazotrofna soja (N.302, N.31 i A.314), a da se pili ne javljaju kod jednog simbioznog soja N.8001 i jednog diazotrofnog N.312. Ipak se može uvideti da se kod simbiotskih-infektivnih sojeva N.7901 i N.9229 javljaju samo tipične fimbrije iz Prve klase, a da se kod diazotofnih sojeva i simbiotskog - neinfektivnog soja *A.azollae* javljaju atipične-sluzne fimbrije iz Druge klase, mada su kod soja N.311 uočene i tipične pili.

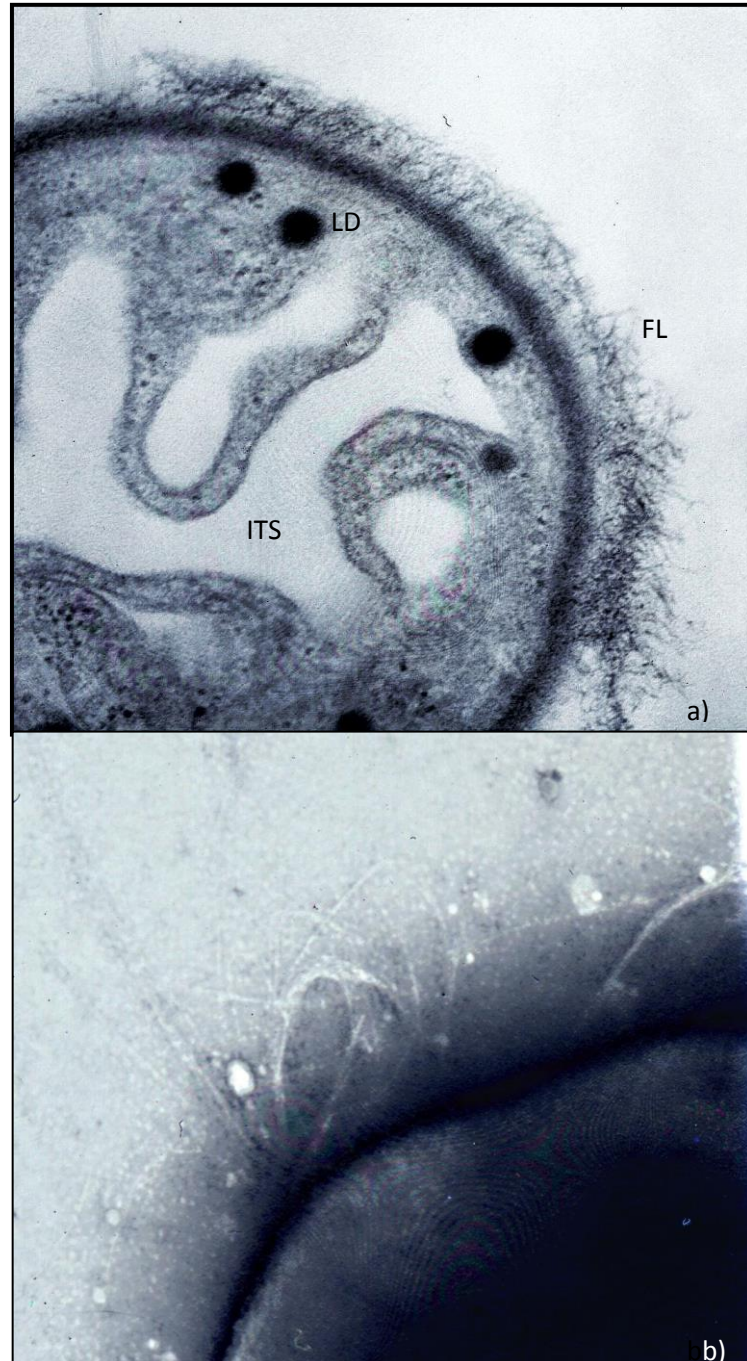
Johanson i Bergman (1994) su metodom negativnog bojenja (NS PTA) na TEMu otkrili da predstavnici i infektivnih i ne-infektivnih sojeva cijanobakterija poseduju veliki broj ekstracelularnih vlakana, verovatno fimbrija. Nakon tretiranja proteinazom K, ćelije su pokazale da nemaju takve vanćelijske fibrije. To podrazumeva da su fibrije uglavnom proteinskog sastava. Ekstracelularne fibrije *Nostoc* podsećale su na one kod roda *Sinechocistis* (Vaara, 1984), ukazujući da su to zaista fimbrije. Oni su pronašli da rod *Nostoc* ima fimbrije koje su uglavnom oko 7-10nm debele i ponekad više od 20µm duge, neke i pet puta duži nego što je dijametar ćelije. Fimbrije kod soja *Nostoc* PCC 7422 izgledale su neobično debelo (oko 30nm), ali navode da su to verovatno ustvari mali, gusti snopovi pre nego pojedinačna vlakna.

Johanson i Bergman (1994) navode da među infektivnim sojevima od testiranih, *Nostoc* PCC 7901, *Nostoc* PCC 9229 i *Nostoc* PCC 73102 su pokazali fimbrijaciju u različitoj meri, dok kod *Nostoc* 8001 i *Nostoc* 893 nisu utvrdili fimbrije. Takođe su uočili da neinfektivni sojevi: *Anabaena cylindrica*, *Nostoc* 268, *Nostoc* PCC 7422 i *Nostoc* ATCC 27896, svi imaju

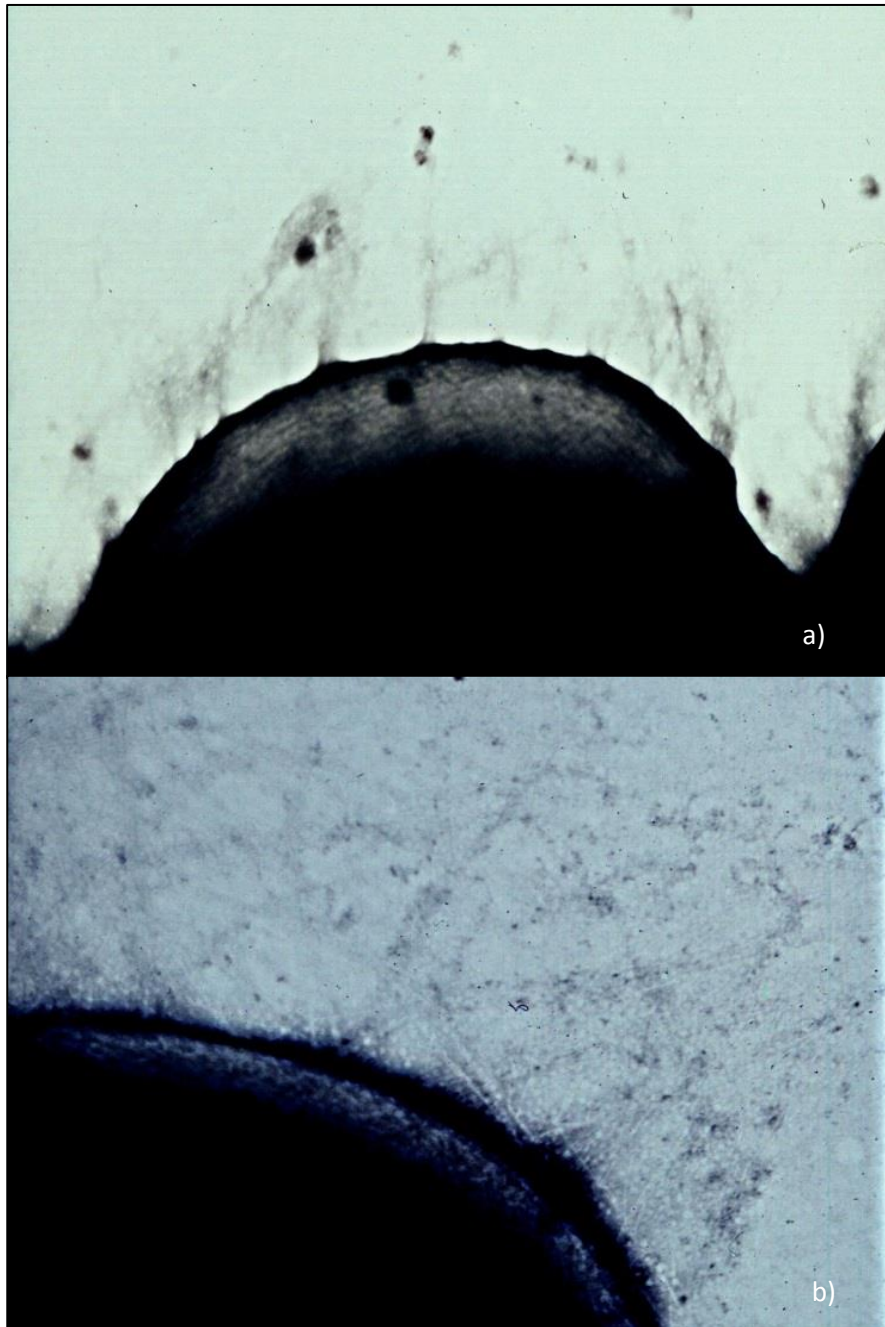
fimbrije. Oni zaključuju da i infektivni i neinfektivni sojevi roda *Nostoc* proizvode fimbrije, i da možda fimbrije nisu važne za sam proces razlikovanje između kompatibilnih i nekompatibilnih sojeva za stupanje u simbiozu. U stvari, nekim infektivnim sojevima izgleda da nedostaju fimbrije, dok neki od neinfektivnih sojeva su imali veliki broj fimbrija. Zaključili su da fimbrije možda nemaju (ili imaju mali značaj) prilikom procesa infekcije kod *Gunnera*—*Nostoc* simbioze. Slično tome, i virulentni i avirulentni sojevi *Pseudomonas solanacearum*, kao i divlji tip i za dodir deficijentni mutanti *Agrobacterium tumefaciens* i *Rhizobium japonicum*, svi proizvode fimbrije (Stemmer i Sequeira, 1987). Ipak, fimbrije mogu biti važne kao nespecifične privlačne sile u ranoj fazi kontakta.

Pojava fimbrija zavisi i od formiranja hormogonija kod nekih cijanobakterija kao kod roda *Nostoc*. Robinson et al. (2007) izveštavaju o tome da hormogonije *M. laminosus* mogu imati do tri koncentrična prstena pora ili mlaznice u blizini pregrada razdvajanja ćelija i on pretpostavlja da su to mesta izlučivanja sluzavog sekreta. Takođe, za razliku od vegetativnog vlakna, hormogonije su prekrivene pilima, fimbrijama sa spoljne strane (Damerval et al., 1991; Duggan et al., 2007).

I naša ispitivanja fimbrija-pili i ispitivanja Johanson i Bergman (1994) su bila ne selektivna i pokazala su prisustvo najverovatnije svih vrsta fimbrija na površini cijanobakterijske ćelije. Buduća ispitivanja bi trebalo usmeriti na definisanje prisustva različitih vrsta fimbrija i njihovu funkciju. Sem toga pojavljivanje fimbrija - pili je dinamična kategorija i ako su prisutni geni za njihovu sintezu u genomu cijanobakterije, da li će se one i formirati zavisi od puno faktora. Pojava fimbrija kod određenih cijanobakterija sigurno zavisi od signala koje može slati koren više biljke, od starosti kulture, hemijskog sastava podloge.

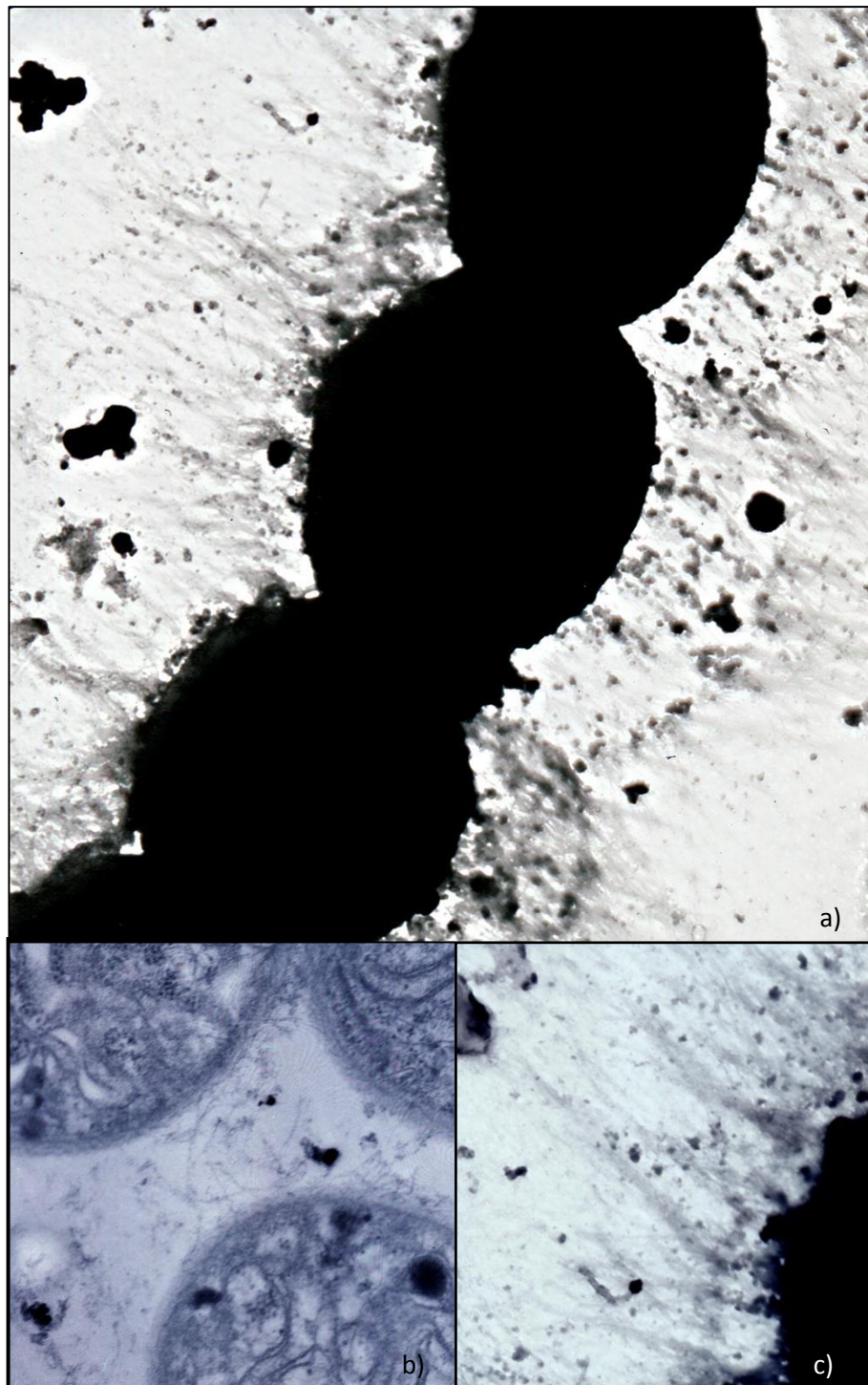


Slika 77. Mikrofotografija, fimbrije – pili soja *Nostoc* 302, a) vegetativna ćelija sa slojem fimbrija na površini ćelije, (x 46460, RR), FL- omotač od fimbrija, LD- lipidna telašca, R- ribozomi, ITS- inter tilakoidni prostor, b) fimbrije - pili (x 35970, NS PTA) (foto: Fojkar O.).



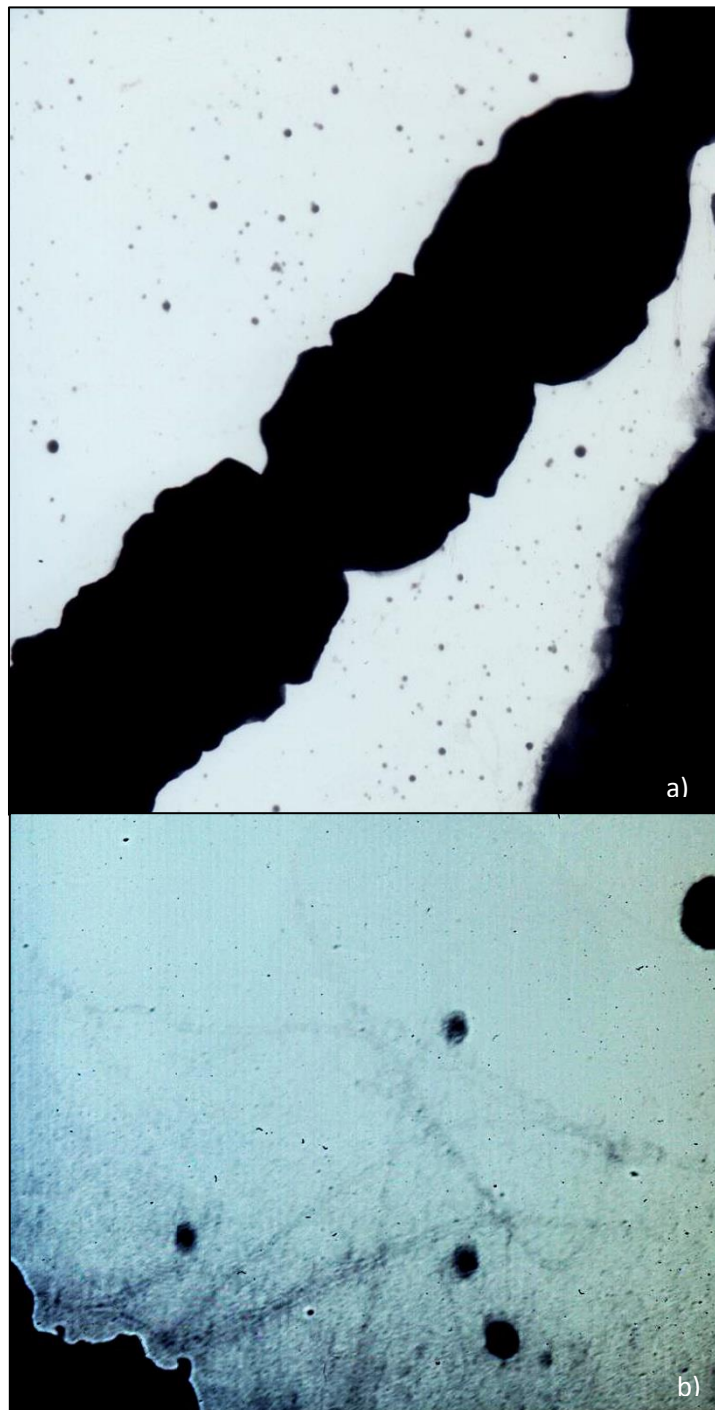
Slika 78. Mikrofotografija - fimbrije – pili soja *Nostoc* 302 a) erupcija sluznih niti sa površine vegetativne ćelije (x27800,NS PTA), b) pili tipične strukture (x35970,NS PTA), (foto: Fojkar O.).



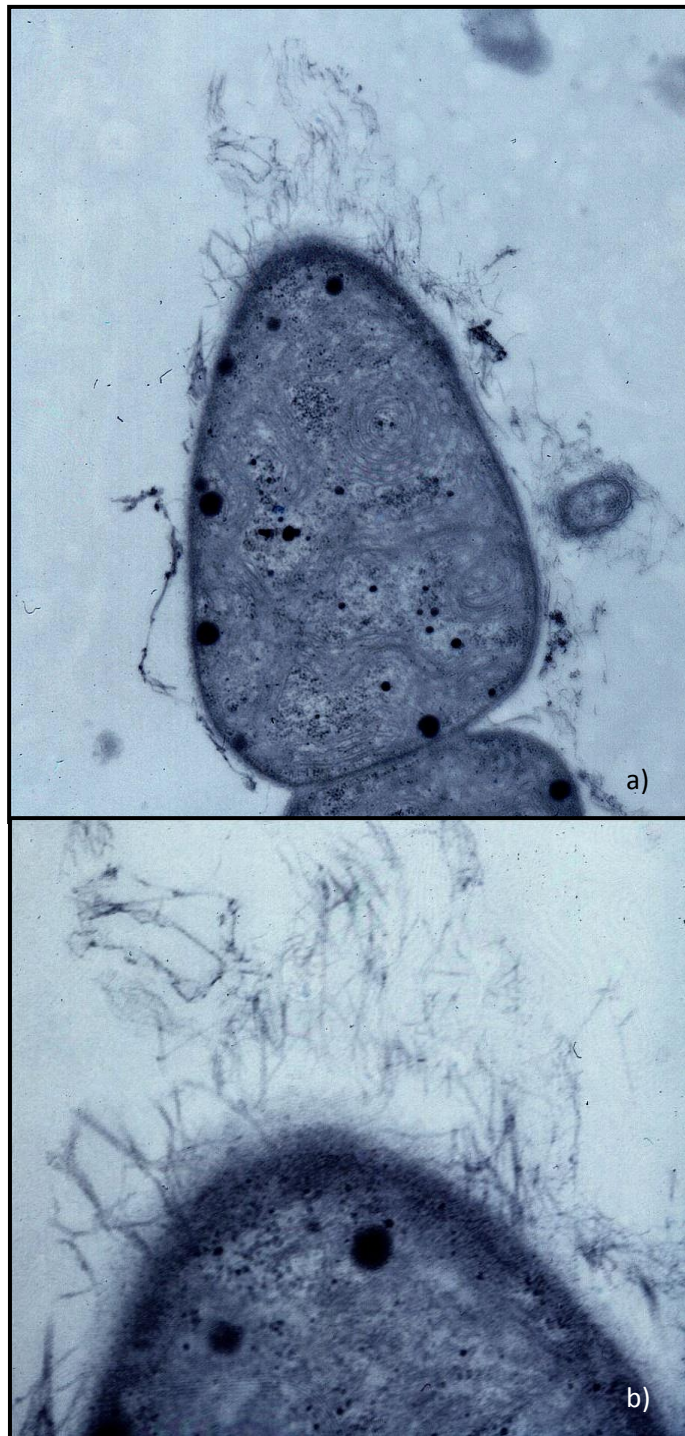


Slika 79. Mikrofotografija, fimbrije – pili soja *Nostoc* 311., a) sluzne nitina veg. ćelijama (x10000, NS PTA) b) detalj, pili tipične strukture između vegetativnih ćelija (x 46460, RR), c) sluzne niti – detalj ( x 27800, NS PTA), (foto: Fojkar O.).



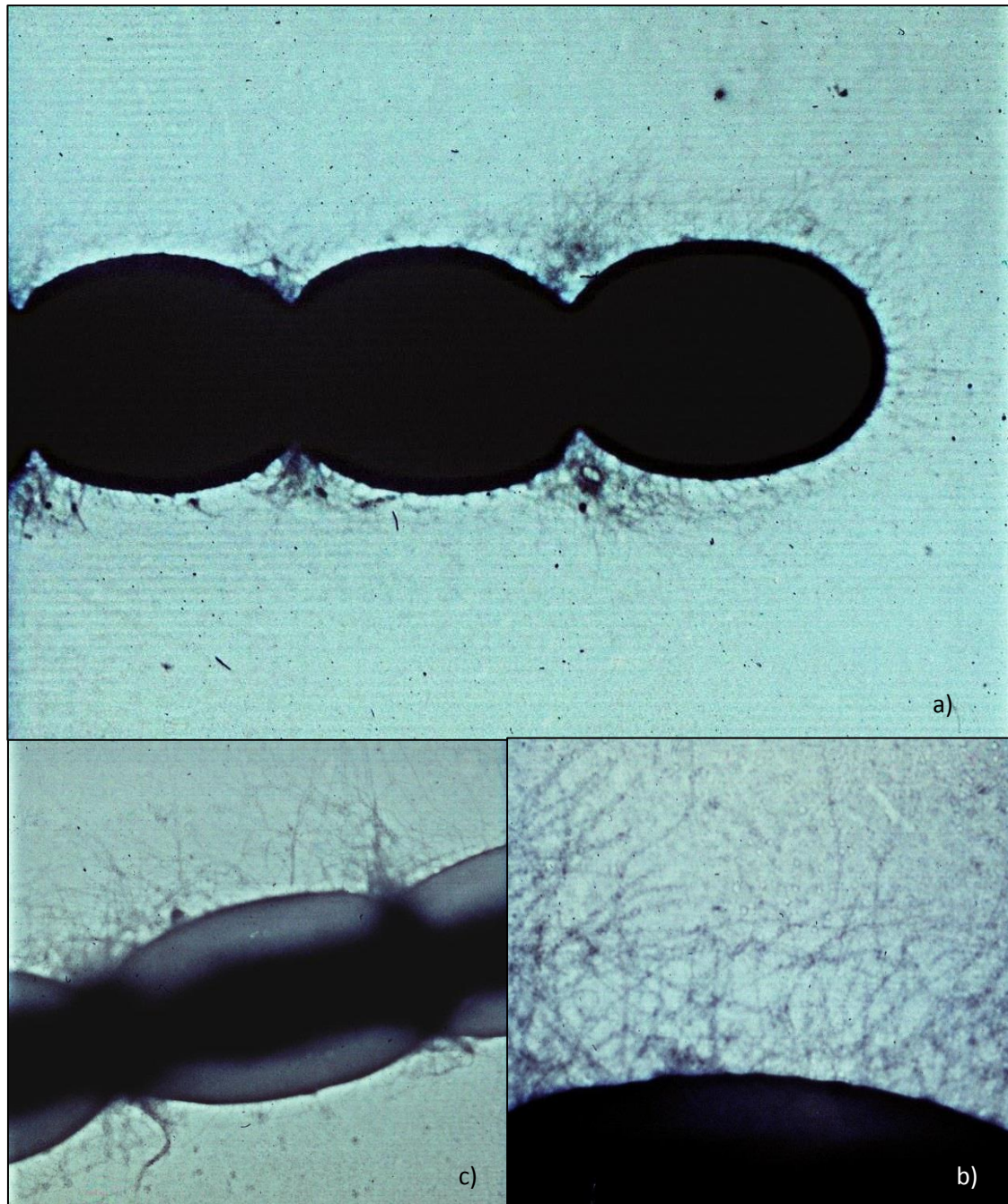


Slika 80. Mikrofotografija, soj *Nostoc* 7901: a) deo niti sa vegetativnim ćelijama u deobi bez fimbrija (x7750, NS PTA), b) detalj, retke fimbrije- pili na vegetativnoj ćeliji (x77500, NS PTA), (foto: Fojkar O.).

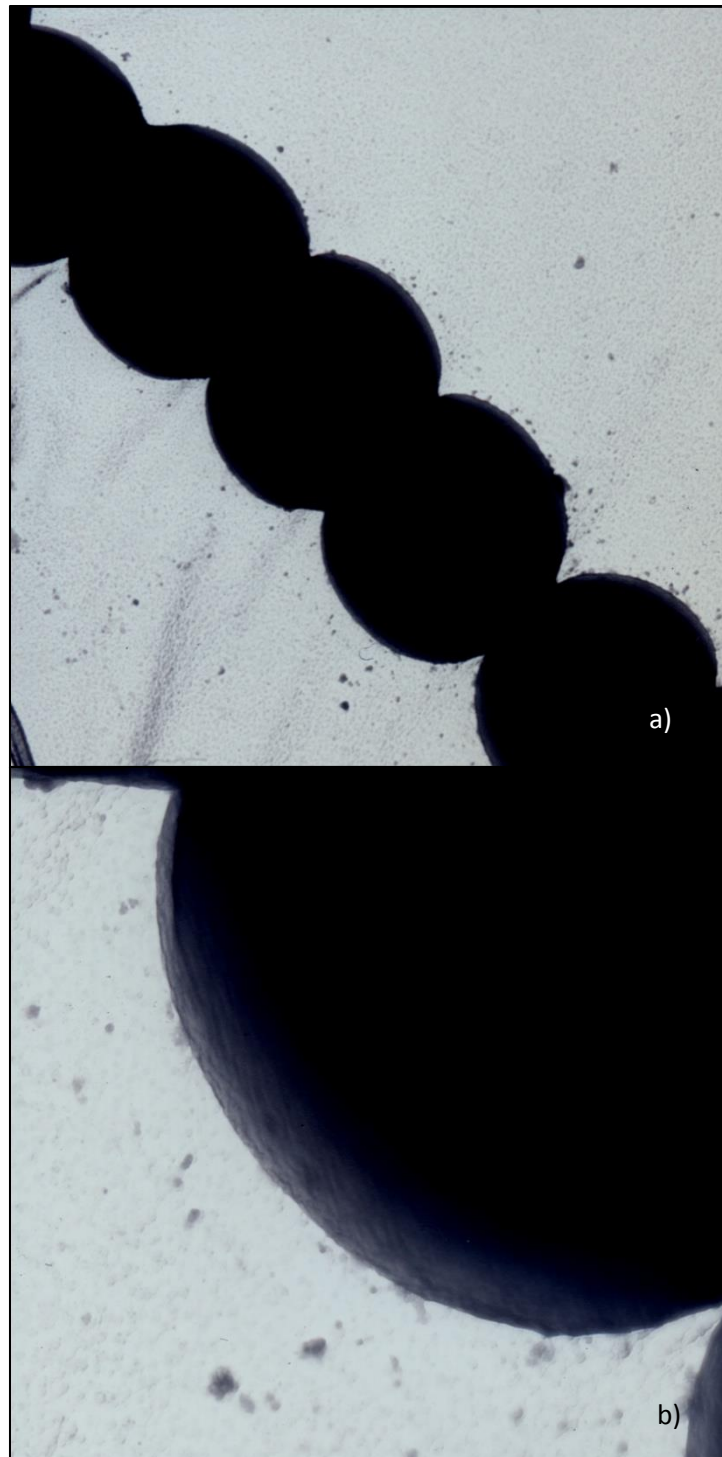


Slika 81. Mikrofotografija, fimbrije – pili soja *Nostoc* 9229, a) terminalna vegetativna ćelija sa F- fimbrijama- pilima ( x16700, RR), b) fimbrije – pili detalj (x 46460, Os), LD- lipidna telašca, TH- tilakoidi (foto: Fojkar O.).



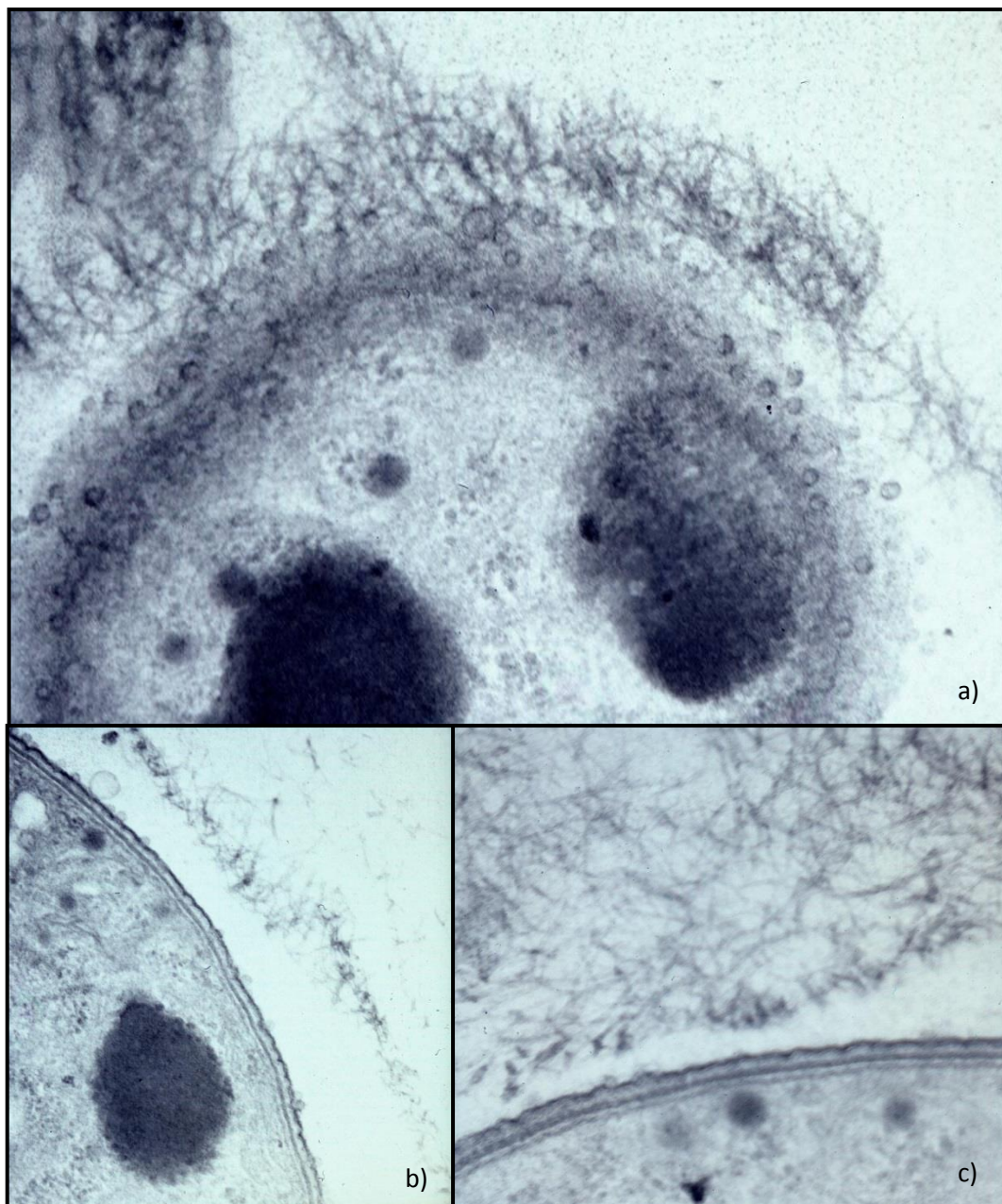


Slika 82. Mikrofotografija, fimbrije – pili soja *Nostoc* 9229, a) fimbrije – pili dominiraju na mestu spajanja dve vegetativne ćelije. (x 6000, NS PTA), b) fimbrije – pili na vć. (x 10000, NS PTA), c) detalj tipične fimbrije-pili (x 35970, NS PTA), (foto: Fojkar O.).



Slika 83 Mikrofotografija, niti i vegetativna ćelija soja *Nostoc* 8001, a) nit od veg. ćelija bez fimbrija (x 7750, NS PTA), b) vegetativna ćelija bez fimbrija –pili ( x 27800, NS PTA), (foto: Fojkar O.).



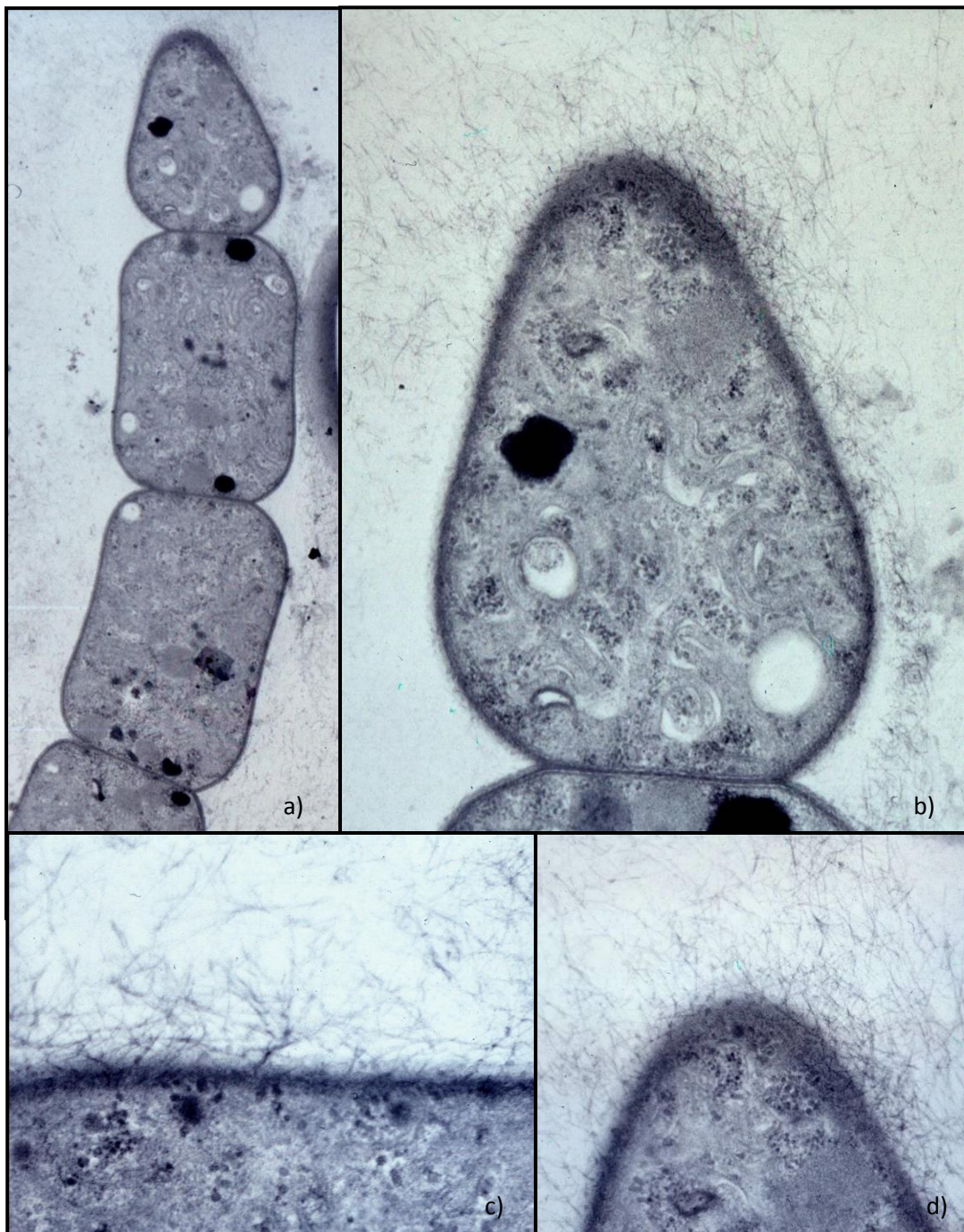


Slika 84. Mikrofotografija, fimbrije – pili soja *Anabaena* 314, a) FL- omotač od fimbrija na veg. ćeliji ( x46460, RR), b) detalj sloj F- fimbrija odvojen od veg. ćelije, CG- cijanoficinska granula, CW- ćelijski zid ( x 60000,RR), c) detalj sloj F- fimbrija odvojen od veg. ćelije ( x 77500,RR), (foto: Fojkar O.).

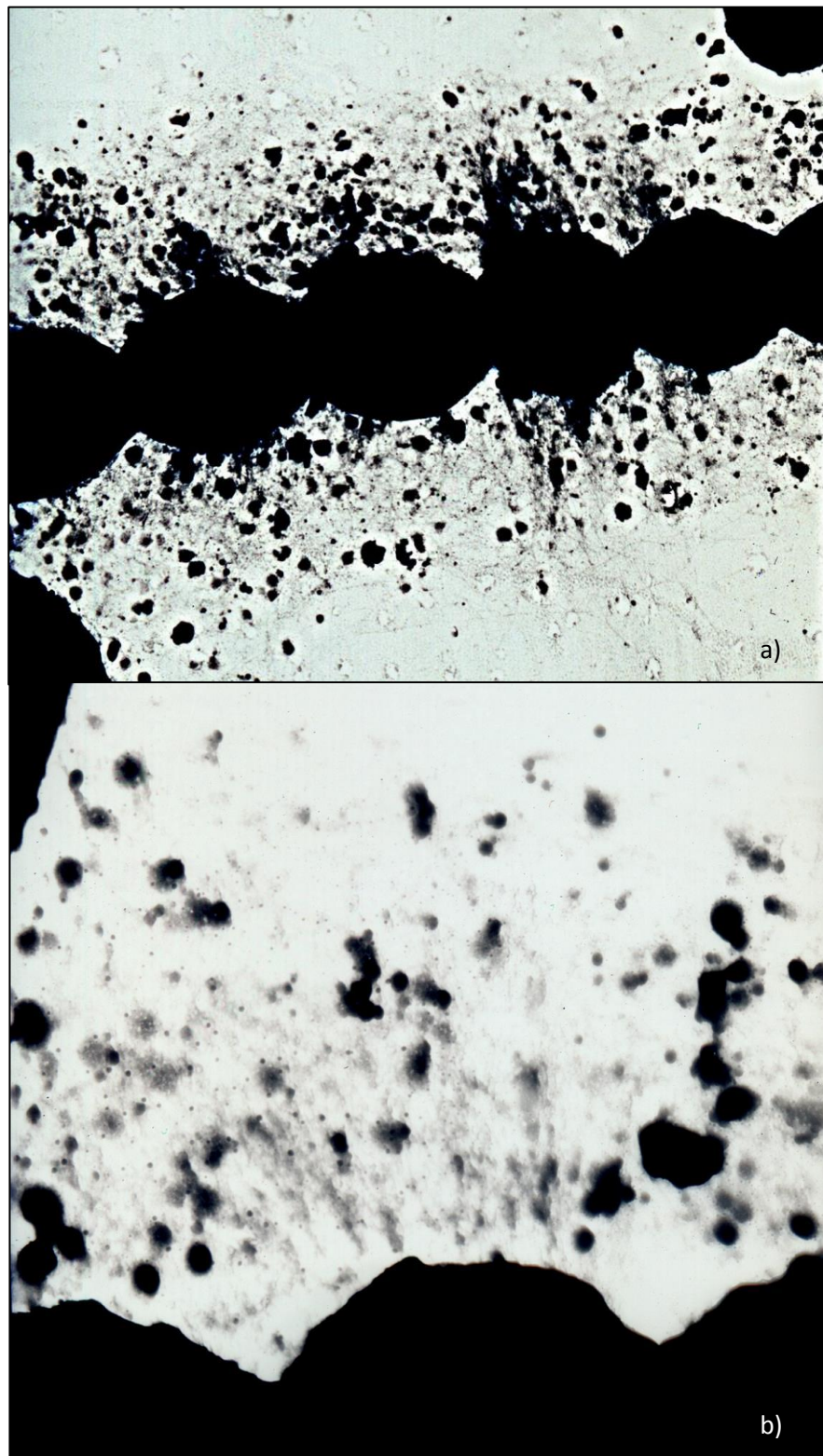


Slika 85 .Mikrofotografija, fimbrije – pili soja *Anabaena 314*: sluzne fimbrije- pili na površini veg. ćelija (x 4646, NS PTA), (foto: Fojkar O.).





Slika 86. Mikrofotografija, fimbrije – pili soja *Anabaena azollae*, a) nit sa vegetativnim ćelijama ( x 6000,RR), b) terminalna vegetativna ćelija sa tipičnim F- fimbrijama ( x 21560,RR), c) detalj F- fimbrije-pili na veg. ćeliji ( x 60000,RR), d) F- fimbrije-pili na vrhu veg. ćelije (x 46460, RR), (foto: Fojkar O.).



Slika 87. Mikrofotografija, fimbrije – pili soja *Anabaena azollae*: a) sluzne fimbrije-pili na vegetativnim ćelijama ( x 4646, NS PTA), b) detalj, sluzne fimbrije-pili na površini vć. ( x 12930, NS PTA), (foto: Fojkar O.).





Slika 88. Mikrofotografija, fimbrije – pili soja *Anabaena azollae* ( x3597, NS PTA),  
(foto: Fojkar O.).

## 6.6. GENETIČKA KARAKTERIZACIJA AZOTOFIKSIRAJUĆIH CIJANOBAKTERIJA METODOM STRR-PCR

Kod cijanobakterija je uspešno primenjena genetička karakterizacija PCR metodom uz pomoć repetitivnih elemenata u genomu (genomic fingerprinting) u cilju utvrđivanja sličnosti i razlika sojeva i vrsta. Dve visoko repetitivne DNA sekvence su opisane u cijanobakterijskom genomu: kratka STRR (short tandemly repeated repetitive), (Jackman i Mulligan, 1995; Mazel et al., 1990) i duga LTRR (long tandemly repeated repetitive), (Masepohl et al., 1996). STRR sekvenca je identifikovana u velikom broju kopija kod mnogih cijanobakterija koje sadrže heterociste, (Mazel et al., 1990). LTRR sekvenca, duga 37 baznih parova, je detektovana i kod heterocistnih i kod neheterocistnih cijanobakterija. U poslednje vreme je pokazano da se STRR sekvenca može koristiti kao validan karakter za identifikaciju i karakterizaciju cijanobakterija.

Mazel et al. (1990.) su precizno definisali strukturu i prirodu ponavljanja sekvence STRR kod soja cijanobakterije *Calothrix* PCC 7601. Ona se sastojala od višestruko ponovljenog heptonukleotida koji ima sastav CCCCA(A-B)T. Ovu ponovljenu sekvencu su nazvali STRR1 sekvenca. Oni su pronašli dva klastera STRR1 sekvence koji su bliski operonima *cpeBA* i *apcD*, jedan uzvodan a drugi nizvodan.

Za ispitivanje sličnosti cijanobakterija metodom PCR-a pomoću STRR konzervativnih sekvenci koje omogućavaju umnožavanje delova DNA genoma odabrali smo ukupno 39 sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija.

Dvadeset osam sojevaje izolovano iz istraživanih vojvođanskih zemljišta, dok jedanaest sojeva potiče iz kolekcije cijanobakterija Departmana za Botaniku, Univerziteta u Štokholmu, Švedska. Neki od tih sojeva su međunarodno sertifikovani - referentni, a odabrani su radi komparacije sa našim.

Od izolovanih sojeva iz zemljišta Vojvodine 18 sojeva pripada rodu *Nostoc*, 4 rodu *Anabaena*, 4 rodu *Cylindrospermum* i po jedan soj iz rodova: *Calotrix* i *Phormidium*. Ovi sojevi su izolovani iz zemljišta: solonjec, černozem, solončak, ritska crnica i arenosol.

Od jedanaest referentnih sojeva cijanobakterija 3 pripadaju rodu *Nostoc*: soj *Nostoc* 7901, simbiozni soj (CCAP), soj *Nostoc* PCC 9229, simbiozni soj (CNCM), soj *Nostoc* 8001, simbiozni soj (CCAP) (Tabela 4.). Tri referentna soja pripadaju rodu *Anabaena*: *Anabaena azollae* A.C. 1982, simbiozni soj (Kolekcija Departmana za botaniku u Štokholmu), soj *Anabaena cylindrica* (CCAP), i soj *Anabaena* PCC 7120 (CNCM). Korišteni su i sojevi: *Fischerella* PCC 7521, izolovan iz vrelih izvora Nacionalnog parka Jelouston, SAD, (CNCM), *Calotrix* PCC 7504 i 7103 (CNCM), *Phormidium* sp. i *Rivularia* 307 iz kolekcije Departmana za botaniku u Štokholmu.

### **Genetička raznolikost kod ispitivanih cijanobakterija na osnovu STRR-PCR**

Kod trideset osam ispitivanih sojeva je utvrđeno prisustvo STRR konzervativnih sekvenci genoma, a samo kod jednog soja *Anabaena sphaerica* f. *conoidea* A.51, koji je izolovan iz zemljišta ritska crnica – Bečej, nije utvrđeno prisustvo STRR konzervativnih sekvenci. Na osnovu STRR-PCR dobijeni su informativni profili (fingerprint) dobre rezolucije koji su korišćeni za karakterizaciju cijanobakterija i njihovo međusobno poređenje, kao i poređenje sa referentnim sojevima.

Svi rezultati su prikazani na četiri gela koji su obuhvatili dve grupe *Nostoc*, jednu grupu sojeva *Anabaena* i jednu grupu ostalih azotofiksirajućih cijanobakterija. Za svaku ispitivanu grupu sojeva dat je: standardni elektroforegram, elektroforegram analiziran programom Kodak Digital Science 1Dtm, kao i tri tabele sa preciznim podacima o broju baznih parova (bp), molekulsakoj masi (ng) i pokretljivosti (cm) traka dobijenih pomoću STRR segmenata kao prajmera.

Rezultati pokazuju da ispitivani sojevi cijanobakterija poseduju visok stepen raznolikosti, kako kod sojeva izolovanih iz zemljišta Vojvodine, tako i kod referentnih simbioznih i diazotrofskih sojeva.

U grupi sojeva *Nostoc* I nakon analize gelova pomoću programa Kodak Digital Science 1Dtm utvrđeno je da je najveći broj traka u STRR-PCR profilu amplifikovan kod soja *Nostoc* 303 (12), zatim N.304 i N.1 (11), N.21 i N.308 (10), N.311 (9), N.7901 i N.301 (8), N.302 (7) i N.310 i N.306 po šest traka.

Rezultati u obliku elektroforegrama STRR-PCR analize amplifikovanih fragmenata DNA azotofiksatorskih cijanobakterija, grupe sojeva *Nostoc* I, dati su na Slici 89., a rezultati elektroforegrama analizirani programom Kodak Digital Science 1Dtm su prikazani na Slici 90. Broj baznih parova (bp), molekulske mase (ng) i pokretljivost traka (cm) amplifikovanih prajmerima koji sadrže STRR segment azotofiksatorskih cijanobakterija grupe *Nostoc* I, analizani programom Kodak Digital Science 1Dtm su dati u tabelama 26, 27 i 28.

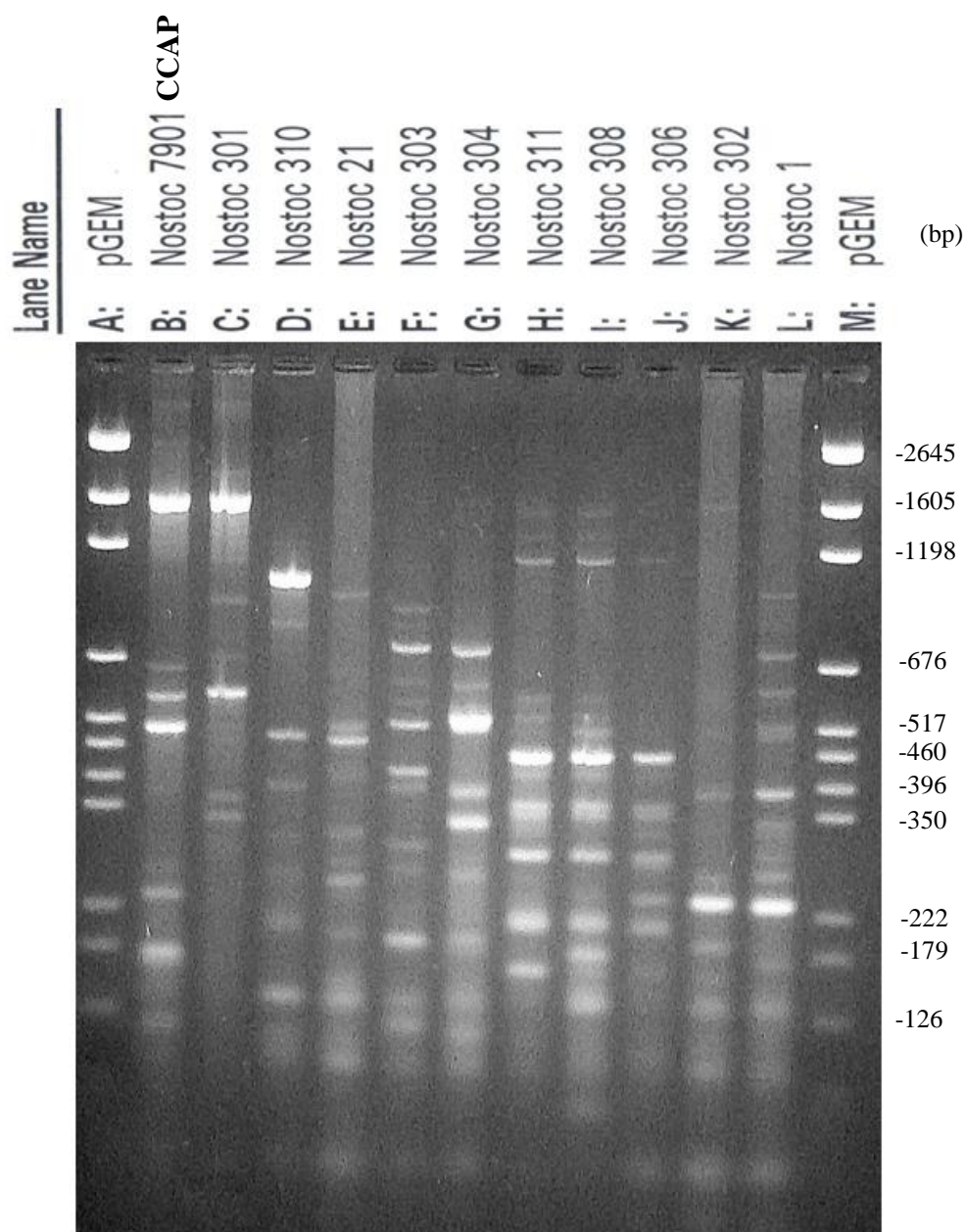
Sojevi *Nostoc* 7901 (CCAP) i *Nostoc* 301 imaju određenu sličnost, oba soja imaju po osam traka, od toga tri trake imaju skoro identične karakteristike. Oba soja se odlikuju prisustvom trake sa velikim brojem baznih parova i malom mobilnošću, N.7901 (CCAP) (3362bp, 0.31cm) i N.301 (3268bp, 0.38 cm). Ovakav amplikon sa velikim brojem baznih parova, od svih *Nostoc*, poseduje još samo soj *Nostoc* 8001 (CCAP). Druga traka *Nostoc* 7901 (CCAP) (sa 1637bp i masom od 2773ng) odgovara trećoj traci *Nostoc* 301 (sa 1609bp i masom od 2388 ng). Takođe četvrta traka *Nostoc* 7901 (CCAP) (sa 585bp i masom od 568ng) odgovara šestoj traci N.301 (596bp i 1279ng). Sličnost simbioznog soja *Nostoc* 7901 (CCAP) koji je izolovan iz biljke *Gunera dentata* i *Nostoc* 301 koji je izolovan iz solonjeca u Vojvodini ukazuje na potrebu ispitivanja sposobnosti soja *Nostoc* 301 da gradi simbiozu sa biljkom *Gunera dentata*, a možda i sa drugim višim biljkama.

Velika sličnost je ustanovljena između sojeva *Nostoc* 303 i *Nostoc* 304. Kod *Nostoc* 303 je ustanovljeno prisustvo dvanaest traka, a kod soja *Nostoc* 304 jedanaest traka sa STRR fragmentima. Čak sedam traka ova dva soja pokazuje zajedničke karakteristike. Oba soja su izolovana iz istog zemljišta solonjeca.

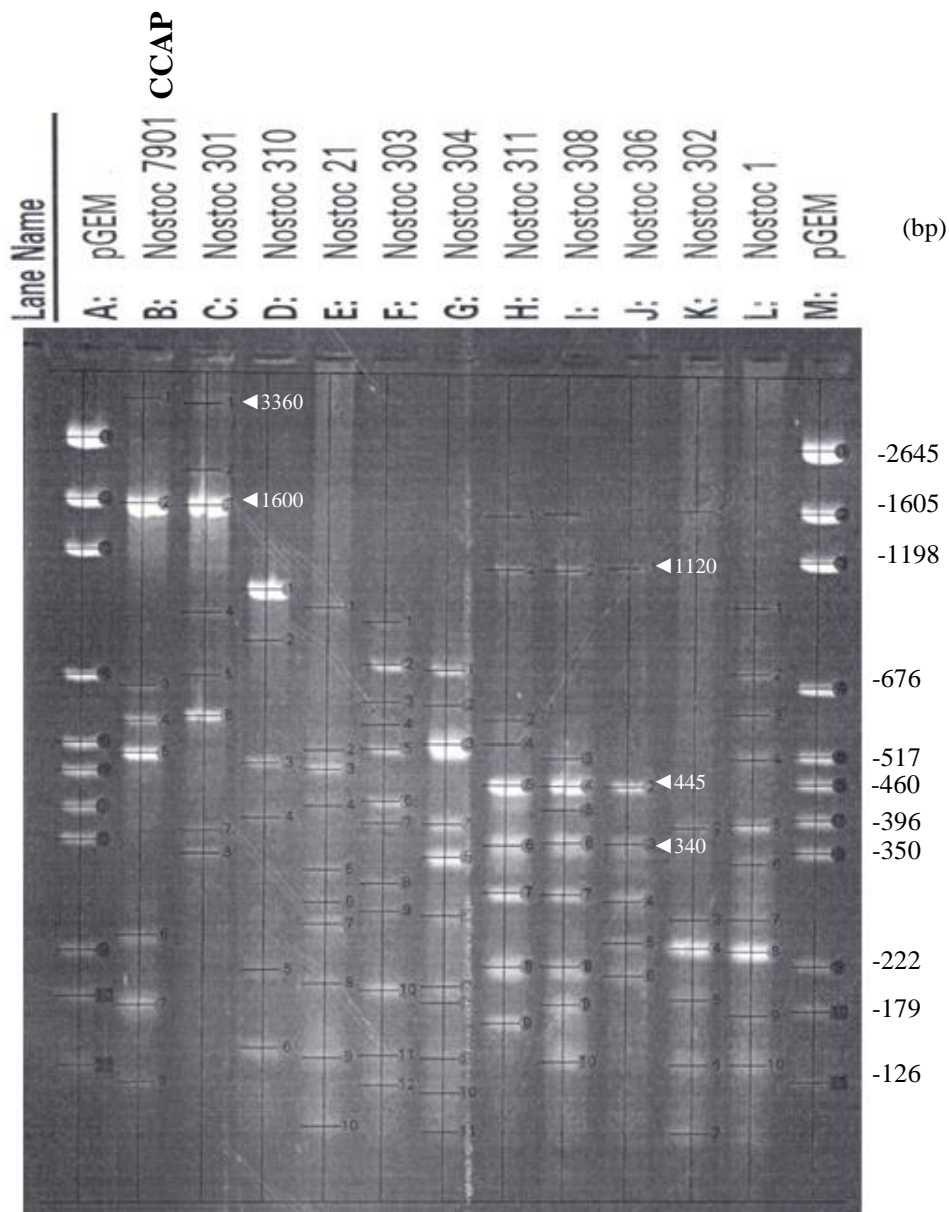
Sojevi *Nostoc* 311, 308 i 306 poseduju po devet, deset i šest traka STRR fragmenata. Ovi sojevi imaju četiri identične trake sa po približno 1120bp, 446bp, 347bp i 280bp. Sem toga sojevi N.311 i N.308 imaju još po dve identične trake i to prva traka sa približno 1530bp (mobilnosti 1.74 cm) i osma traka sa 205bp (mobilnosti 7.30cm). Sojevi N.311 i N.308 potiču iz istog zemljišta solonjeca, dok N.306 potiče iz ritske crnice (Bečej).



Sojevi *Nostoc* 302 i *Nostoc* 1 poseduju po 7, odnosno 10 traka sa STRR-PCR fragmentima. Ova dva soja imaju četiri zajedničke trake, sličnih karakteristika. To su trake sa sledećim brojem baznih parova: 373bp, 252bp, 220bp i 135bp (mobilnosti: 5.58cm , 6.71cm, 7.06cm i 8.51cm). Oba soja su izolovana iz zemljišta solonjec.



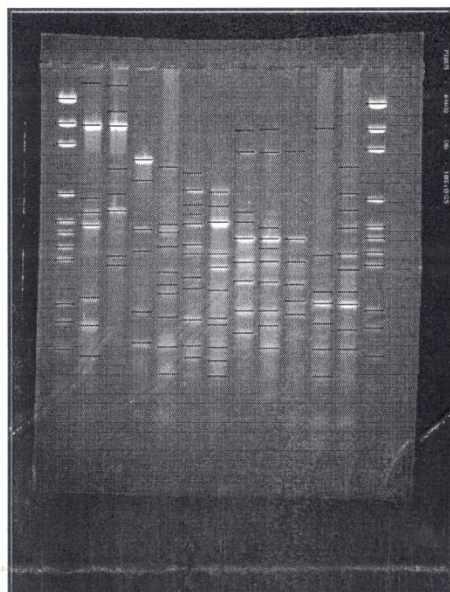
Slika 89. Elektroforegram STRR-PCR umnoženih fragmenata DNA azotofiksirajućih cijanobakterija, grupa sojeva *Nostoc* I, A. pGEM- (Promega, Medison, Eis.); B. referentni soj *Nostoc* 7901(CCAP); C-L. sojevi *Nostoc* iz različitih tipova zemljišta Vojvodine.



Slika 90. Elektroforegram STRR-PCR umnoženih fragmenata DNA azotofiksirajućih cijanobakterija, grupa sojeva *Nostoc* I, analiziran programom Kodak Digital Science 1Dtm. A. pGEM- (Promega, Medison, Eis.); B. referentni soj *Nostoc* 7901(CCAP); C-L. sojevi *Nostoc* iz različitih tipova zemljišta Vojvodine.

Tabela 26. Broj baznih parova (bp) traka (amplikona) sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija grupe *Nostoc* I, dobijenih STRR-PCR metodom, analiza programom Kodak Digital Science 1Dtm

Kodak Digital Science 1D™



Name: Oliver Fojkar

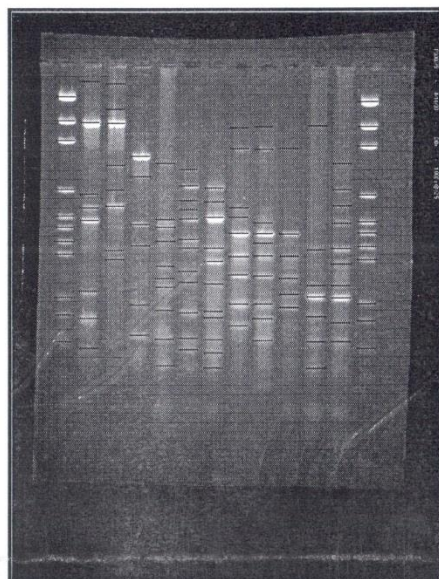
- A: pGEM
- B: Nostoc 7901 CCAP
- C: Nostoc 301
- D: Nostoc 310
- E: Nostoc 21
- F: Nostoc 303
- G: Nostoc 304
- H: Nostoc 311
- I: Nostoc 308
- J: Nostoc 306
- K: Nostoc 302
- L: Nostoc 1
- M: pGEM

	MW (bp)												
	A: pGEM	B:	C:	D:	E:	F:	G:	H:	I:	J:	K:	L: Nostoc 1	M: pGEM
1	2645	<b>3362.8</b>	<b>3268.2</b>	1021	944.9	891.6	727.7	<u>1521.7</u>	<u>1549.5</u>	1130.1	<u>1581.9</u>	954.1	2645
2	1605	<u>1637.6</u>	<u>2171.1</u>	821.3	516.2	745.5	626.4	1119.3	1119.3	444.3	373.3	720.7	1605
3	1198	680.1	<u>1609.7</u>	489.4	475.4	635.5	531.4	588.2	501.4	347.2	252.3	605.5	1198
4	676	585.4	926.8	388	407.3	576.9	376.9	531.4	446.5	272.6	223.6	499	676
5	517	511.2	710.3	203.9	310.6	521.2	327.6	446.5	401.4	229	179	378.8	517
6	460	235.8	596.8	146.1	271.3	415.2	256	345.5	348.9	198.1	135.8	318.2	460
7	396	175.5	366.2		247.5	378.8	189.7	282	280.6		<b>101.1</b>	252.3	396
8	350	130.8	332.4		192.4	293.1	177.2	205.9	205.9			220.3	350
9	222				139.8	261	139.8	162.5	175.5			167.3	222
10	179				<b>104.6</b>	186.9	<b>120.4</b>		137.8			135.8	179
11	126					141.9	<b>102.1</b>						126
12						<b>124.5</b>							



Tabela 27. Molekulske mase (ng) traka (amplikona) sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija grupe *Nostoc* I, u STRR- PCR profilima, analiza programom Kodak Digital Science 1Dtm

## Kodak Digital Science 1D™



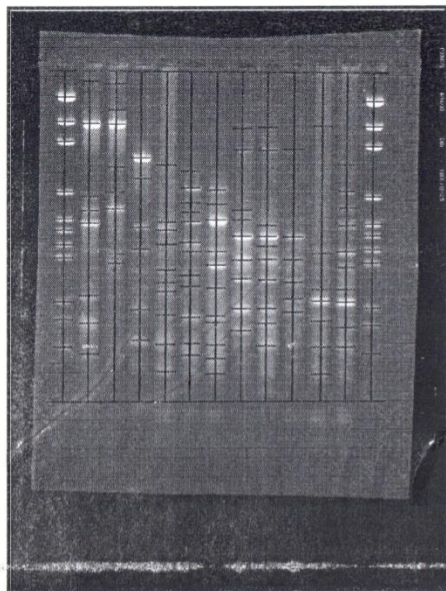
Project:Arteficial Symbioses  
Date: 4/14/98 6:17p  
Name: Oliver Fojkar

A: pGEM  
B: Nostoc 7901 CCAP  
C: Nostoc 301  
D: Nostoc 310  
E: Nostoc 21  
F: Nostoc 303  
G: Nostoc 304  
H: Nostoc 311  
I: Nostoc 308  
J: Nostoc 306  
K: Nostoc 302  
L: Nostoc 1  
M: pGEM

Mass (ng)													
	A: pGEM	B:	C:	D:	E:	F:	G:	H:	I:	J:	K:	L: Nostoc 1	M: pGEM
1	3000	-----	-----	2157	-----	-----	1072	-----	-----	-----	-----	-----	3000
2	1800	<b>2773</b>	-----	-----	-----	592.2	434	13.28	-----	1136	-----	-----	1800
3	1400	-----	2388	386.4	396.5	-----	<b>3707</b>	266.4	409	716.1	-----	-----	1400
4	800	568.9	-----	-----	-----	-----	1845	209.2	2272	917.3	2011	-----	800
5	600	1838	-----	70.15	-----	812.6	2301	<b>2709</b>	256.4	514	489.9	614.2	600
6	500	658.7	1279	554.2	-----	750.8	612.7	<b>2751</b>	2140	904.1	450.9	348.7	500
7	400	1883	-----	-----	201.1	236.5	1029	1895	1339	-----	-----	242.7	400
8	400	138	-----	-----	-----	239.6	-----	<b>2937</b>	1733	-----	-----	2176	400
9	300	-----	-----	-----	799	147.6	628	1838	1653	-----	-----	-----	300
10	200	-----	-----	-----	268.9	1208	225.3	-----	1521	-----	-----	295.1	200
11	200	-----	-----	-----	-----	272.8	26.46	-----	-----	-----	-----	-----	200
12	-----	-----	-----	-----	-----	521.9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Tabela 28. Pokretljivost traka (amplikona) (cm) sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija grupe *Nostoc* I, u profilima STRR-PCR, analiza programom Kodak Digital Science 1Dtm

Kodak Digital Science 1D™



Project:Arteficial Symbioses

Date: 4/14/98 6:17p

Name: Oliver Fojkar

A: pGEM

B: Nostoc 7901 CCAP

C: Nostoc 301

D: Nostoc 310

E: Nostoc 21

F: Nostoc 303

G: Nostoc 304

H: Nostoc 311

I: Nostoc 308

J: Nostoc 306

K: Nostoc 302

L: Nostoc 1

M: pGEM

		Mobility (cm)													
	A: pGEM	B:	C:	D:	E:	F:	G:	H:	I:	J:	K:	L: Nostoc 1	M: pGEM		
1	0.78	0.31	0.38	2.66	2.90	3.07	3.66	1.74	1.70	2.37	1.65	2.86	0.85		
2	1.53	1.55	1.20	3.31	4.65	3.59	4.10	2.40	2.40	5.07	5.58	3.67	1.65		
3	2.16	3.87	1.62	4.83	4.92	4.05	4.55	4.26	4.73	5.80	6.71	4.18	2.25		
4	3.72	4.30	2.98	5.51	5.37	4.33	5.57	4.57	5.07	6.51	7.06	4.75	3.81		
5	4.56	4.70	3.74	7.38	6.14	4.63	5.98	5.06	5.39	7.00	7.72	5.52	4.66		
6	4.93	6.96	4.25	8.34	6.54	5.29	6.70	5.82	5.78	7.42	8.51	6.04	5.02		
7	5.38	7.82	5.67		6.81	5.57	7.57	6.41	6.41		9.38	6.71	5.46		
8	5.81	8.79	5.95		7.54	6.30	7.77	7.34	7.31			7.09	5.89		
9	7.15				8.48	6.64	8.46	8.01	7.77			7.92	7.29		
10	7.73				9.34	7.61	8.91		8.50			8.52	7.82		
11	8.59					8.42	9.39						8.72		
12						8.81									

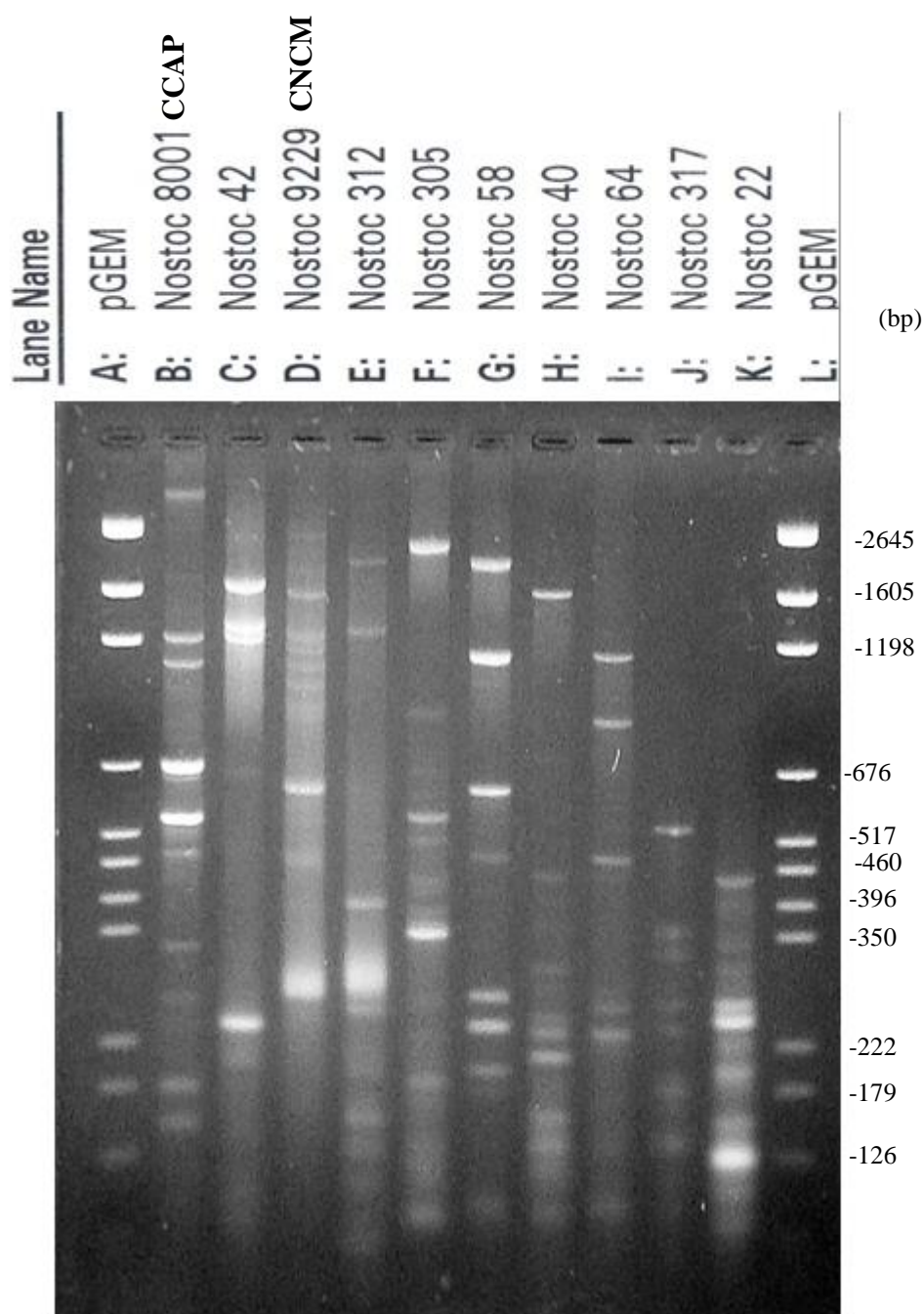


Grupa *Nostoc* II je obuhvatila deset sojeva od čega su dva simbiozna, i prisustvo traka u STRR-PCR profilima je utvrđeno kod svih sojeva. Najveći broj traka je utvrđen kod simbioznog soja *Nostoc* 8001 (CCAP) (10), *Nostoc* 22 je posedovao (9), sojevi N.9229 (CNCM), N.305 i N.58 (8), N.40 i N.317 (7), N.312 i N.64 (6), a N.42 svega pet (5) traka.

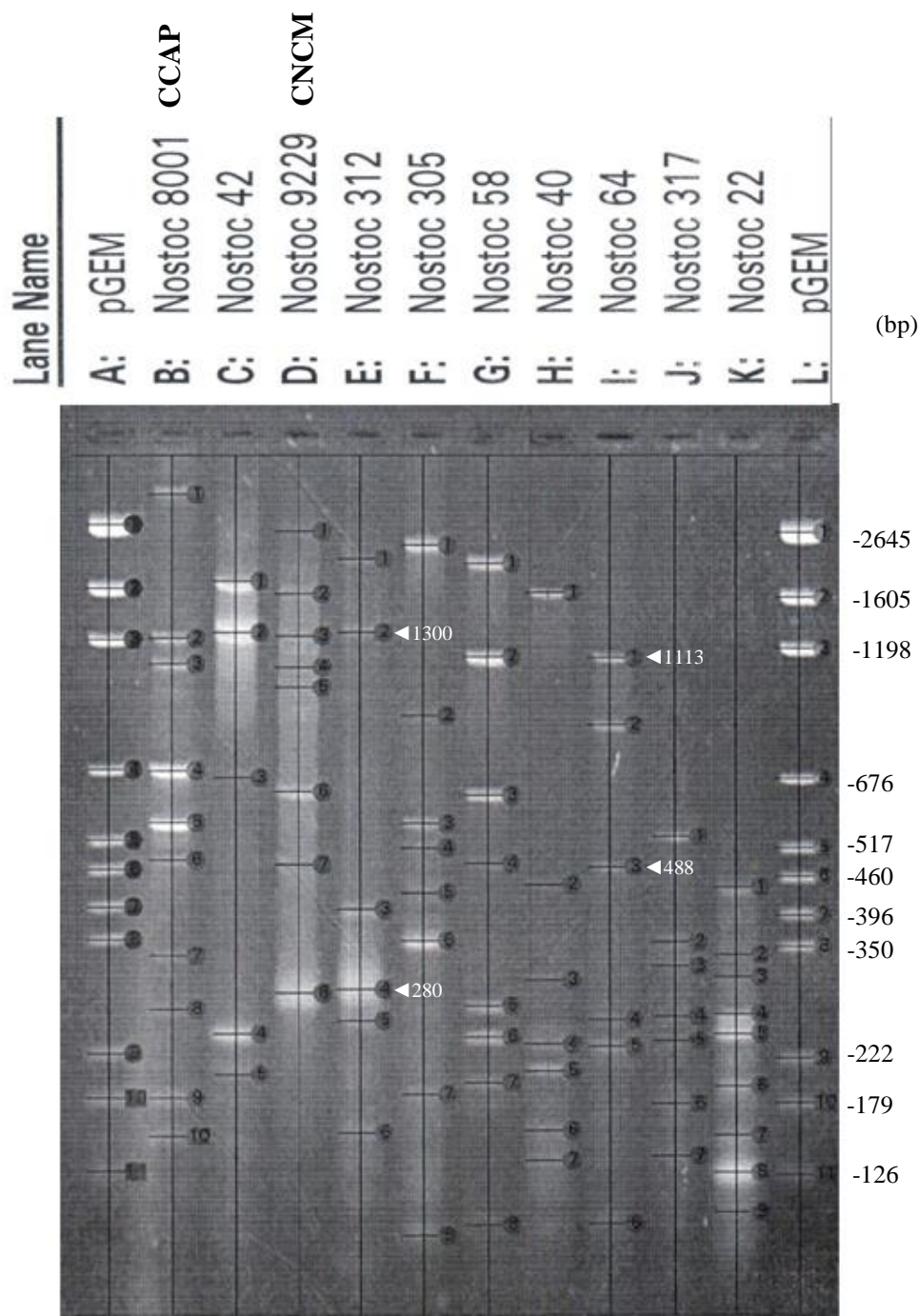
Rezultati u obliku elektroforegrama STRR-PCR fragmenata DNA azotofiksatorskih cijanobakterija, grupe sojeva *Nostoc* II, dati su na Slici 91., a rezulteti elektroforegrama analizirani programom Kodak Digital Science 1Dtm su prikazani su na Slici 92. Analize broja baznih parova (bp), molekulske mase (ng) i pokretljivost (cm) u profilima STRR azotofiksirajućih cijanobakterija grupe *Nostoc* II, analizani programom Kodak Digital Science 1Dtm su date u Tabelama 29, 30 i 31.

Sojevi N.8001 (CCAP), N.9229 (CNCM), simbiozni sojevi izolovani iz *G. monoica*, pokazali su sličnost u jednoj traci sa oko 1300bp sa diazotrofnim sojevima N.42 (izolovan iz černozema) i N.312 (izolovan iz solonjeca). Ovi referentni sojevi su pokazali izvesnu sličnost i sa sojevima N.58 i N.64 (izolovani iz solonjeca) i to u dve trake: prvom sa približno 1113bp variranjem broja baznih parova od 3 % i drugom sa približno 488bp.

Soj N.9229 (CNCM) i N.312 pokazuju i sličnost u traci od oko 280bp.



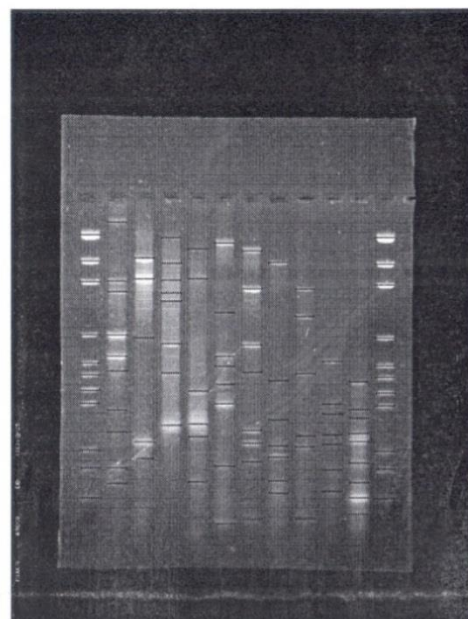
Slika 91. Elektroforegram STRR-PCR amplifikovanih fragmenata DNA azotofiksirajućih cijanobakterija, grupa sojeva *Nostoc* II. A. pGEM- (Promega, Medison, Eis.); B. referentni soj *Nostoc* 8001(CCAP); D. referentni soj *Nostoc* 9229 (CNCM), C, E-K. sojevi *Nostoc* iz različitih tipova zemljišta Vojvodine.



Slika 92. Elektroforegram STRR-PCR amplifikovanih fragmenata DNA azotofiksirajućih cijanobakterija, grupa sojeva *Nostoc* II, analiziran programom Kodak Digital Science 1Dtm. A. pGEM-(Promega, Medison, Eis.); B. referentni soj *Nostoc* 8001(CCAP); D. referentni soj *Nostoc* 9229 (CNCM), C, E-K. sojevi *Nostoc* iz različitih tipova zemljišta Vojvodine.

Tabela 29. Broj baznih parova (bp) traka sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija grupe *Nostoc* II, dobijenih STRR-PCR metodom, analiza programom Kodak Digital Science 1Dtm

Kodak Digital Science 1D™



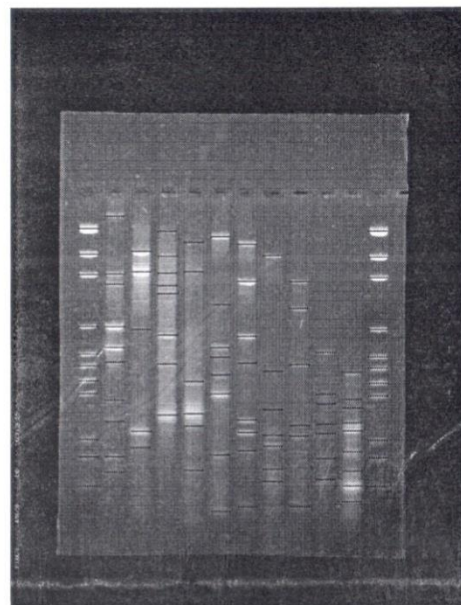
Name: Oliver Fojkar

- A: pGEM
- B: Nostoc 8001 CCAP
- C: Nostoc 42
- D: Nostoc 9229 CNCM
- E: Nostoc 312
- F: Nostoc 305
- G: Nostoc 58
- H: Nostoc 40
- I: Nostoc 64
- J: Nostoc 317
- K: Nostoc 22
- L: pGEM

MW (bp)												
	A: pGEM	B:	C:	D:	E:	F:	G:	H:	I: Nostoc 64	J:	K:	L: pGEM
1	2645	<b>3197.2</b>	<i>1791.7</i>	<i>2531.5</i>	<i>2147.8</i>	<i>2372.7</i>	<i>2072.8</i>	<i>1623.6</i>	1141	539.5	436.5	2645
2	1605	1284	1316.5	<i>1609.7</i>	1316.5	896.2	1146.6	440.8	861.5	346.2	328	1605
3	1198	1113.2	690.2	1296.9	397.5	569.5	641	294.3	474.6	312.2	298.7	1198
4	676	710.9	234.6	1096.9	282.9	513.5	481.7	224.4	248.9	252.6	255.1	676
5	517	572.3	197.4	1008.7	247.7	425.8	264	200.4	222.2	227.8	234.6	517
6	460	488.8		650.6	154.3	347.9	231.2	155.9	<b>105.1</b>	174.6	188	460
7	396	326.4		479.3		181.6	190.8	137.1		139.9	152.8	396
8	350	260.2		278.8		<b>100</b>	<b>104.6</b>				130.8	350
9	222	178.9									<b>110.4</b>	222
10	179	152.1										179
11	126											126

Tabela 30. Molekulske mase (ng) traka sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija grupe *Nostoc* II, dobijenih STRR-PCR metodom, analiza programom Kodak Digital Science 1Dtm

Kodak Digital Science 1D™



Name: Oliver Fojkar

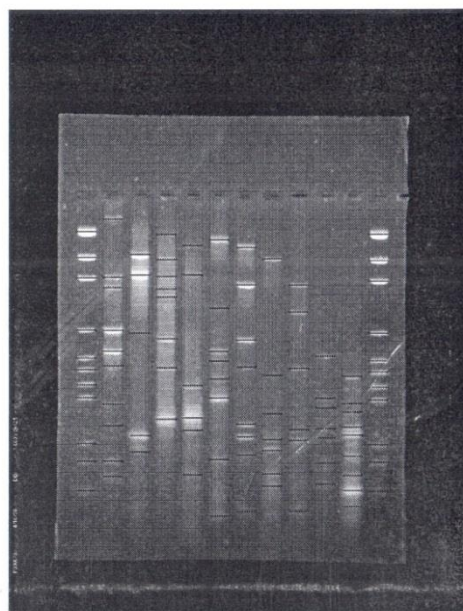
A: pGEM  
 B: Nostoc 8001 CCAP  
 C: Nostoc 42  
 D: Nostoc 9229 CNCM  
 E: Nostoc 312  
 F: Nostoc 305  
 G: Nostoc 58  
 H: Nostoc 40  
 I: Nostoc 64  
 J: Nostoc 317  
 K: Nostoc 22  
 L: pGEM

Mass (ng)												
A: pGEM	B:	C:	D:	E:	F:	G:	H:	I: Nostoc 64	J:	K:	L: pGEM	
1	3000	-----	1998	-----	-----	1470	1190	351.4	159.2	-----	466.3	3000
2	1800	770	<b>2932</b>	557.6	406.5	27.67	1749	-----	168.1	-----	141.4	1800
3	1400	745.3	90.65	718.9	1654	795.4	1108	-----	-----	-----	314.5	1400
4	800	2053	<b>2918</b>	548	<b>5002</b>	286.9	71.9	216.2	-----	-----	1282	800
5	600	2140	796	808.9	1040	644.3	628.6	545.9	26.65	-----	2317	600
6	500	438.2		2060	778.3	2278	989.2	274.9	-----	92.13	1841	500
7	400	216		1673		1032	218.8	191.1		127.7	976.4	400
8	400	89.71		<b>5079</b>		690.2	-----				<b>5202</b>	400
9	300	752.3									595.7	300
10	200	565.3										200
11	200											200



Tabela 31. Pokretljivost traka (cm) sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija grupe *Nostoc* II, dobijenih STRR-PCR metodom, analiza programom Kodak Digital Science 1Dtm

Kodak Digital Science 1D™



Name: Oliver Fojkar

A: pGEM  
 B: Nostoc 8001 CCAP  
 C: Nostoc 42  
 D: Nostoc 9229 CNCM  
 E: Nostoc 312  
 F: Nostoc 305  
 G: Nostoc 58  
 H: Nostoc 40  
 I: Nostoc 64  
 J: Nostoc 317  
 K: Nostoc 22  
 L: pGEM

	Mobility (cm)											
	A: pGEM	B:	C:	D:	E:	F:	G:	H:	I: Nostoc 64	J:	K:	L: pGEM
1	0.79	0.47	1.50	0.92	1.26	1.09	1.30	1.67	2.46	4.61	5.20	0.89
2	1.61	2.22	2.15	1.70	2.16	3.15	2.43	5.19	3.26	5.88	6.03	1.72
3	2.20	2.53	3.90	2.19	5.47	4.45	4.10	6.34	4.97	6.19	6.30	2.30
4	3.77	3.79	6.99	2.57	6.47	4.76	4.93	7.14	6.84	6.78	6.74	3.89
5	4.65	4.42	7.50	2.81	6.85	5.28	6.66	7.46	7.15	7.08	7.02	4.73
6	5.02	4.89		4.07	8.20	5.86	7.05	8.17	9.30	7.84	7.64	5.09
7	5.47	6.06		4.95		7.73	7.59	8.55		8.48	8.21	5.57
8	5.85	6.70		6.51		9.47	9.31				8.69	5.92
9	7.25	7.77									9.17	7.31
10	7.79	8.25										7.84
11	8.68											8.73



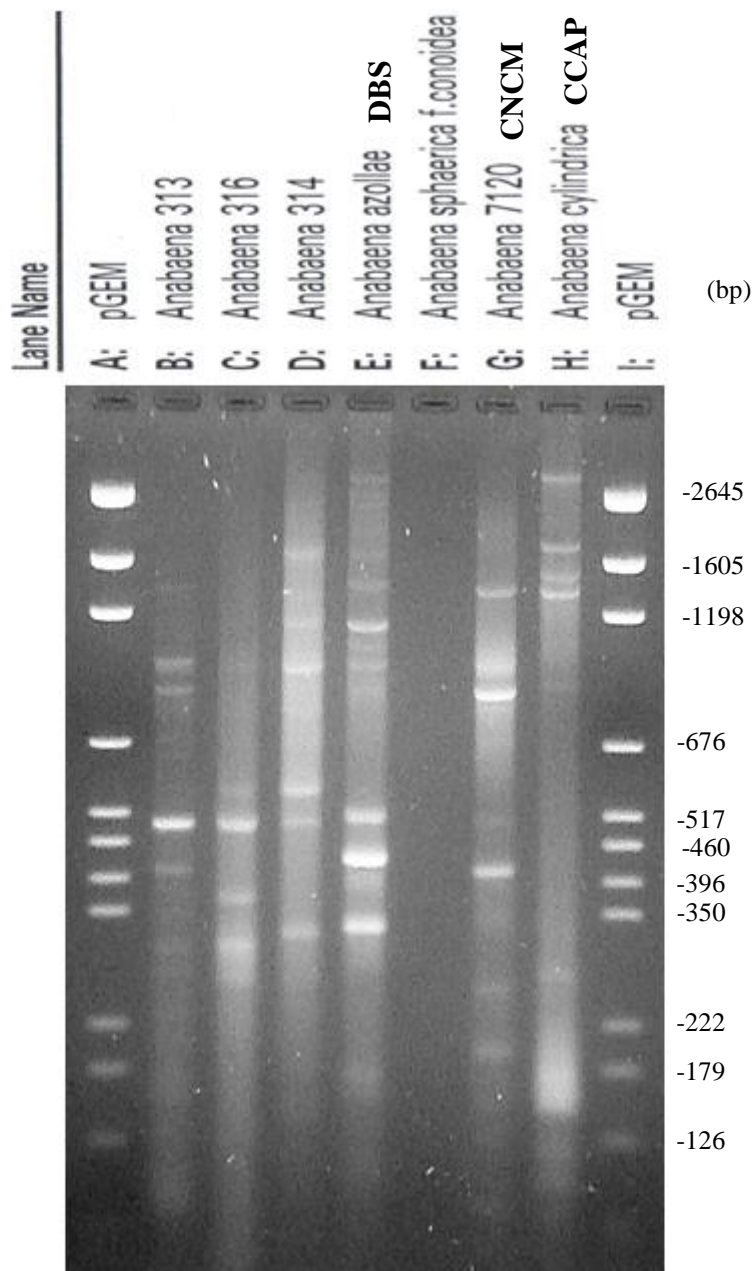
Kod grupe *Anabaena* od sedam ispitanih sojeva, soj *A. azollae* je imao najveći broj traka u STRR-PCR profilu (9). Dva soja *A.7120* (CNCM) i *A. cylindrica* (CCAP) su imala po 7 traka, 6 traka soj *A.316*, sojevi *A.313* i *A.316* po 5, dok kod soja *A.sphaerica f. conoidea* nije utvrđena ni jednatraka sa STRR-PCR fragmentima.

Rezultati u obliku elektroforegrama STRR-PCR fragmenata DNA azotofiksirajućih cijanobakterija, grupe sojeva *Anabaena*, dati su na Slici 93., a rezultati elektroforegrama analizirani programom Kodak Digital Science 1Dtm su prikazani su na Slici 94. Analize broja baznih parova (bp), molekulsake mase (ng) i pokretljivost traka (cm) u profilima STRR azotofiksirajućih cijanobakterija grupe *Anabaena*, analizani programom Kodak Digital Science 1Dtm su date u Tabelama 32, 33 i 34.

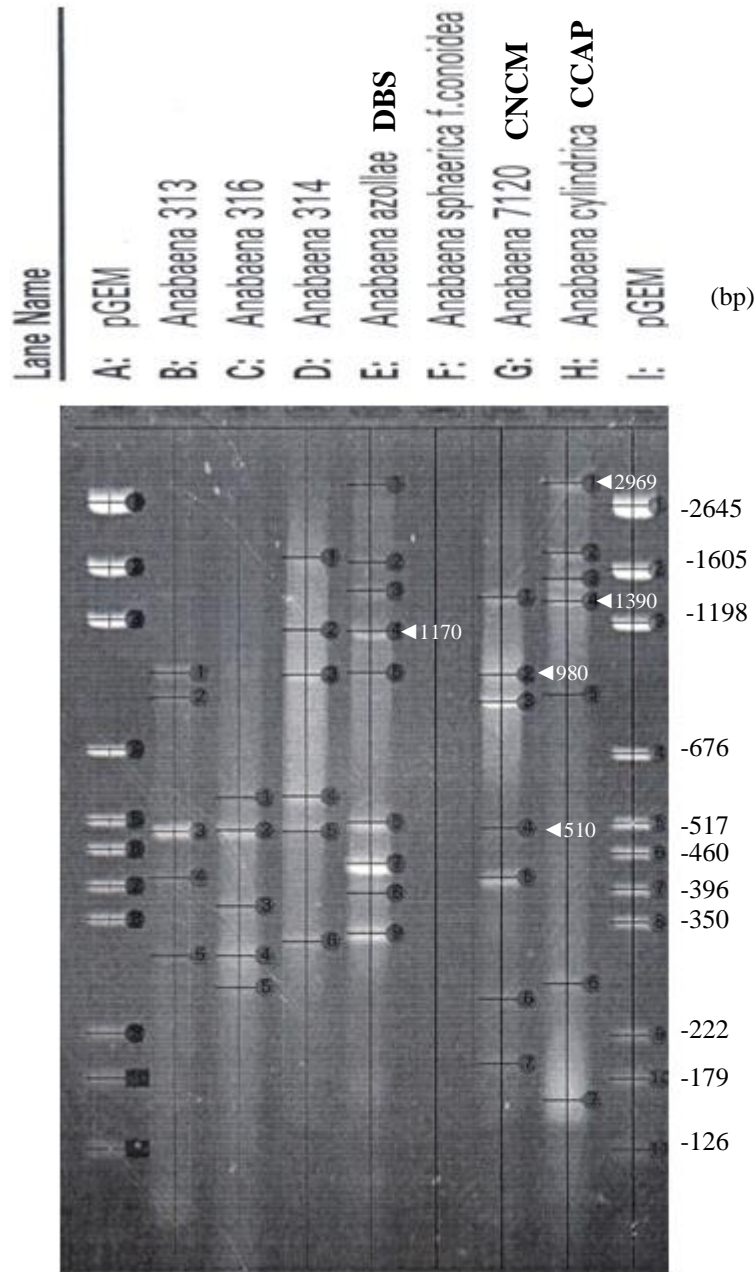
Soj *A. azollae*, izolovan iz biljke *Azolla pinata*, je sa četiri trake pokazao sličost sa drugim sojevima *Anabaena*. Prva traka sa najvećim brojem baznih parova *A. azollae* (2969bp) se poklapa sa prvom trakom *A. cylindrica* (2979bp). Traka *A. azollae* sa 1394bp pokazala je sličnost sa sojevima *A.7120* (CNCM) (1353bp) i *A.cylindrica* (1333bp). Soj *A. azollae* je pokazao sličnost i sa diazotrofnim sojem *A.314* u traci od oko 1180bp.

Četiri soja iz grupe *Anabaena* imaju trake u STRR-PCR profilima veličine od oko 980bp (*A. azollae*, *A. 313*, *A.314*, *A.7120*). Tri soja *Anabaena* imaju trake veličine od oko 880 bp (*A.313*, *A.7120* i *A.cylindrica*). Pet sojeva *Anabaena* imaju traku sa približno 510bp (*A.313*, *A.316*, *A.314*, *A.azollae*, *A.7120*). Soj *Anabaena 316* ima sličnosti u tri trake sa tri soja i to: sa sojem *A.314* (trake oko 580bp), sa sojem *A.313* sa identičnom trakom 297bp i sa sojem *A.cylindrica* (trake oko 260bp). Soj *Anabaena 313* ima sličnost sa sojem *A.7120* (CNCM) u identičnoj traci sa 413 bp.

U ovim istraživanjima pokazano je da najveći broj ispitivanih sojeva roda *Anabaena* nema trake u STRR-PCR profilima manje od oko 250bp (sem po jedne trake sojeva *A.7120* (CNCM) i *A.cylindrica*). Sojevi roda *Nostoc* uglavnom obiluju trakama sa malim brojem baznih parova, od oko 100 do 250 bp.



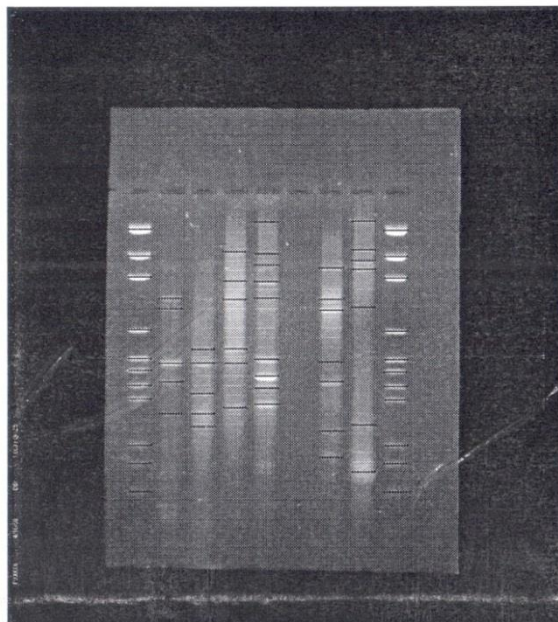
Slika 93. Elektroforegram STRR-PCR amplifikovanih fragmenata DNA azotofiksirajućih cijanobakterija, grupa sojeva *Anabaena*. A. pGEM- (Promega, Medison, Eis.); E. referentni soj *A.azollae* (DBS); G. referentni soj *Anabaena* 7120 (CNCM); H. referentni soj *A.cylindrica* (CCAP); B,C,D,F. sojevi *Anabaena* iz različitih tipova zemljišta Vojvodine.



Slika 94. Elektroforegram STR-PCR amplifikovanih fragmenata DNA azotofiksirajućih cijanobakterija, grupa sojeva *Anabaena*, analiziran programom Kodak Digital Science 1Dtm. pGEM- (Promega, Medison, Eis.); E. referentni soj *A. azollae* (DBS); G. referentni soj *Anabaena* 7120 (CNCM); H. referentni soj *A. cylindrica* (CCAP); B,C,D,F. sojevi *Anabaena* iz različitih tipova zemljišta Vojvodine.

Tabela 32. Broj baznih parova (bp) traka sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija grupe *Anabaena*, dobijenih STRR-PCR metodom, analiza programom Kodak Digital Science 1Dtm

Kodak Digital Science 1D™



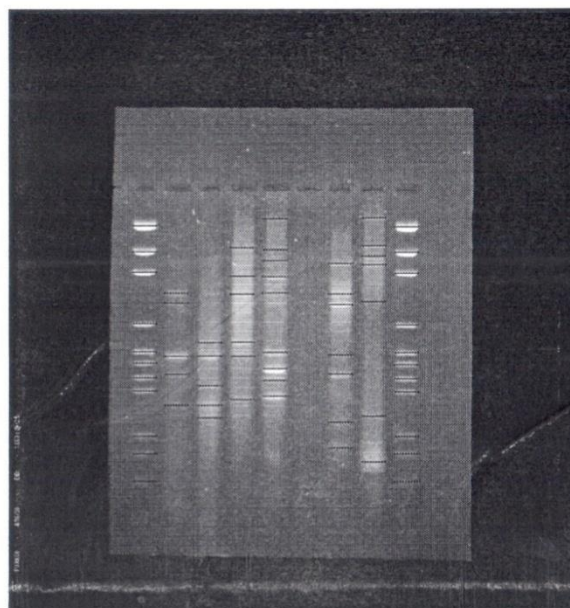
Name: Oliver Fojkar

- A: pGEM
- B: *Anabaena* 313
- C: *Anabaena* 316
- D: *Anabaena* 314
- E: *Anabaena azollae* DBS
- F: *Anabaena sphaerica* f. *conoidea*
- G: *Anabaena* 7120 CNCM
- H: *Anabaena cylindrica* CCAP
- I: pGEM

	MW (bp)							
	A: pGEM	B:	C:	D:	E:	G:	H:	I: pGEM
1	2645	987.6	581	<u>1776.9</u>	<u>2960.2</u>	1353.6	<u>2979.2</u>	2645
2	1605	889.1	505.1	1182.5	<u>1700.6</u>	977.7	<u>1853.3</u>	1605
3	1198	502.6	366.7	977.7	1394.9	871.4	1466.4	1198
4	676	413.5	297.2	584	1176.6	510.2	1333.4	676
5	517	297.2	259.6	502.6	987.6	413.5	898	517
6	460			315.6	523.1	246.9	263.5	460
7	396				439	187.5	160.6	396
8	350				387.4			350
9	222				326.8			222
10	179							179
11	126							126

Tabela 33. Molekulsake mase (ng) traka sojeva azotofiksatorskih cijanobakterija grupe *Anabaena*, dobijenih STRR-PCR metodom, analiza programom Kodak Digital Science 1D™

## Kodak Digital Science 1D™



Name: Oliver Fojkar

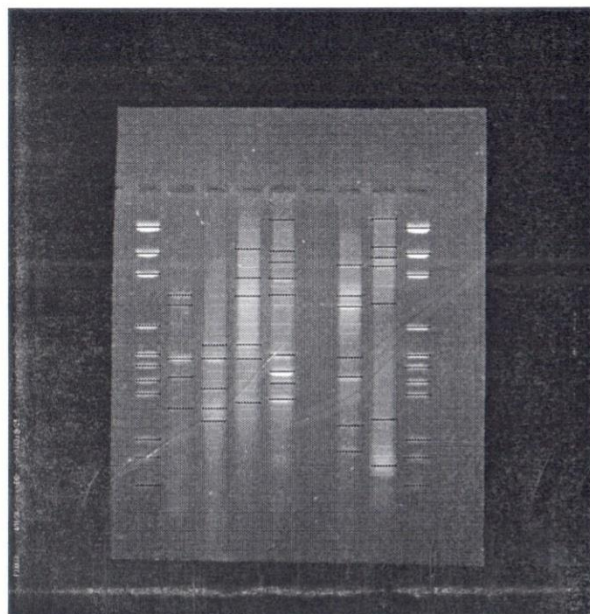
A: pGEM  
 B: *Anabaena* 313  
 C: *Anabaena* 316  
 D: *Anabaena* 314  
 E: *Anabaena azollae* DBS  
 F: *Anabaena sphaerica* f. *conoidea*  
 G: *Anabaena* 7120 CNCM  
 H: *Anabaena cylindrica* CCAP  
 I: pGEM

	Mass (ng)							
	A: pGEM	B:	C:	D:	E:	G:	H:	I: pGEM
1	3000	567.4	686.8	1245	-----	792.9	80.08	3000
2	1800	145.9	2236	1288	10.62	2163	305.1	1800
3	1400	2162	1382	1613	199.4	2076	669.3	1400
4	800	696.7	1718	1766	1204	163.1	731.8	800
5	600	466.4	826.5	1934	749.3	1831	-----	600
6	500			1864	1939	443.1	1132	500
7	400				<b>3175</b>	540.4	<b>4980</b>	400
8	400				757.8			400
9	300				<b>3012</b>			300
10	200							200
11	200							200



Tabela 34. Pokretljivost traka (cm) sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija grupe *Anabaena*, dobijenih STRR-PCR metodom, analiza programom Kodak Digital Science 1Dtm

Kodak Digital Science 1D™



Name: Oliver Fojkar

- A: pGEM
- B: Anabaena 313
- C: Anabaena 316
- D: Anabaena 314
- E: Anabaena azollae DBS
- F: Anabaena sphaerica f. conoidea
- G: Anabaena 7120 CNCM
- H: Anabaena cylindrica CCAP
- I: pGEM

	Mobility (cm)							
	A: pGEM	B:	C:	D:	E:	G:	H:	I: pGEM
1	0.86	2.94	4.42	1.54	0.68	2.03	0.65	0.90
2	1.64	3.22	4.80	2.42	1.61	2.95	1.50	1.67
3	2.26	4.83	5.72	2.95	1.95	3.28	1.81	2.30
4	3.80	5.40	6.32	4.41	2.42	4.79	2.08	3.87
5	4.68	6.32	6.70	4.83	2.93	5.37	3.21	4.73
6	5.06			6.16	4.71	6.84	6.67	5.10
7	5.48				5.21	7.63	8.08	5.53
8	5.89				5.58			5.93
9	7.26				6.05			7.29
10	7.79							7.81
11	8.65							8.66



U grupi ostalih azotofiksirajućih cijanobakterija utvrdili smo da sojevi roda *Cylindrospermum* poseduju različit broj traka u STRR-PCR profilima: *Cylindrospermum* 105b (11), *Cylindrospermum* 309 (8), *Cylindrospermum* 108 (6), dok je kod soja *Cylindrospermum* 105a utvrđeno svega četiri trake.

Rezultati u obliku elektroforegrama STRR-PCR fragmenata DNA grupe ostalih azotofiksatorskih cijanobakterija su dati na Slici 95., a rezulteti elektroforegrama analizirani programom Kodak Digital Science 1Dtm su prikazani na Slici 96. Analize broja baznih parova (bp), molekulske mase (ng) i pokretljivost traka (cm) u profilima STRR ove grupe azotofiksatorskih cijanobakterija, analizani programom Kodak Digital Science 1Dtm su date u tabelama 35, 36 i 37.

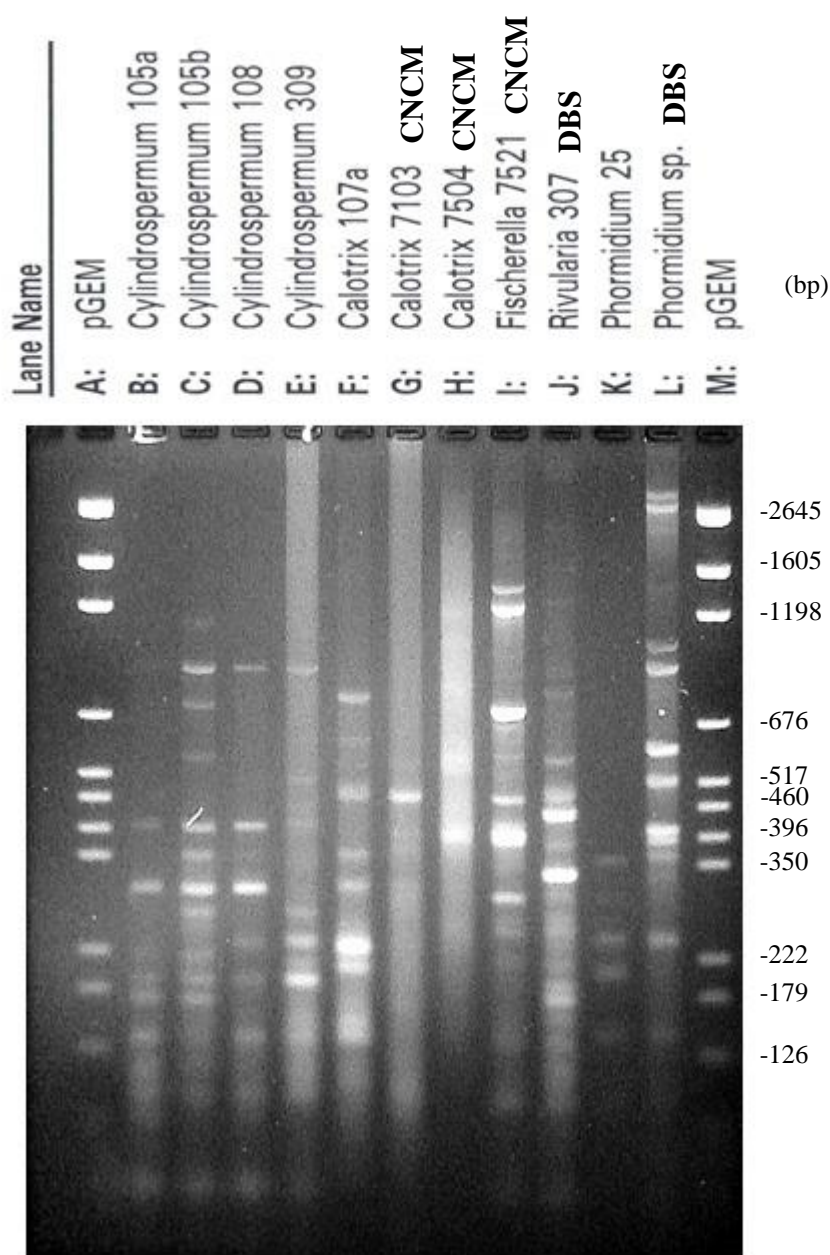
Kod sojeva roda *Cylindrospermum* utvrđeno je osam zajedničkih, sličnih traka po broju baznih parova. Traka sa oko 410bp je zastupljena kod sva četiri ispitivana soja (Cyl.105a, Cyl.105b, Cyl.108, Cyl.309). Osim soja Cyl.105a, ovi sojevi imaju još 2 zajedničke trake veličine 910 i 187 bp. Traka sa oko 300 bp je zastupljena kod tri različita soja *Cylindrospermum* (Cyl.105a, Cyl.105b, Cyl.108).

Ovi rezultati ukazuju na sličnu genetsku strukturu konzervativnih sekvenci kod istarživanih sojeva *Cylindrospermum* od kojih tri potiču iz zemljišta arenosol (Subotičko – horgoška peščara), a jedan Cyl.309 iz zemljišta černozem (Rimski Šančevi).

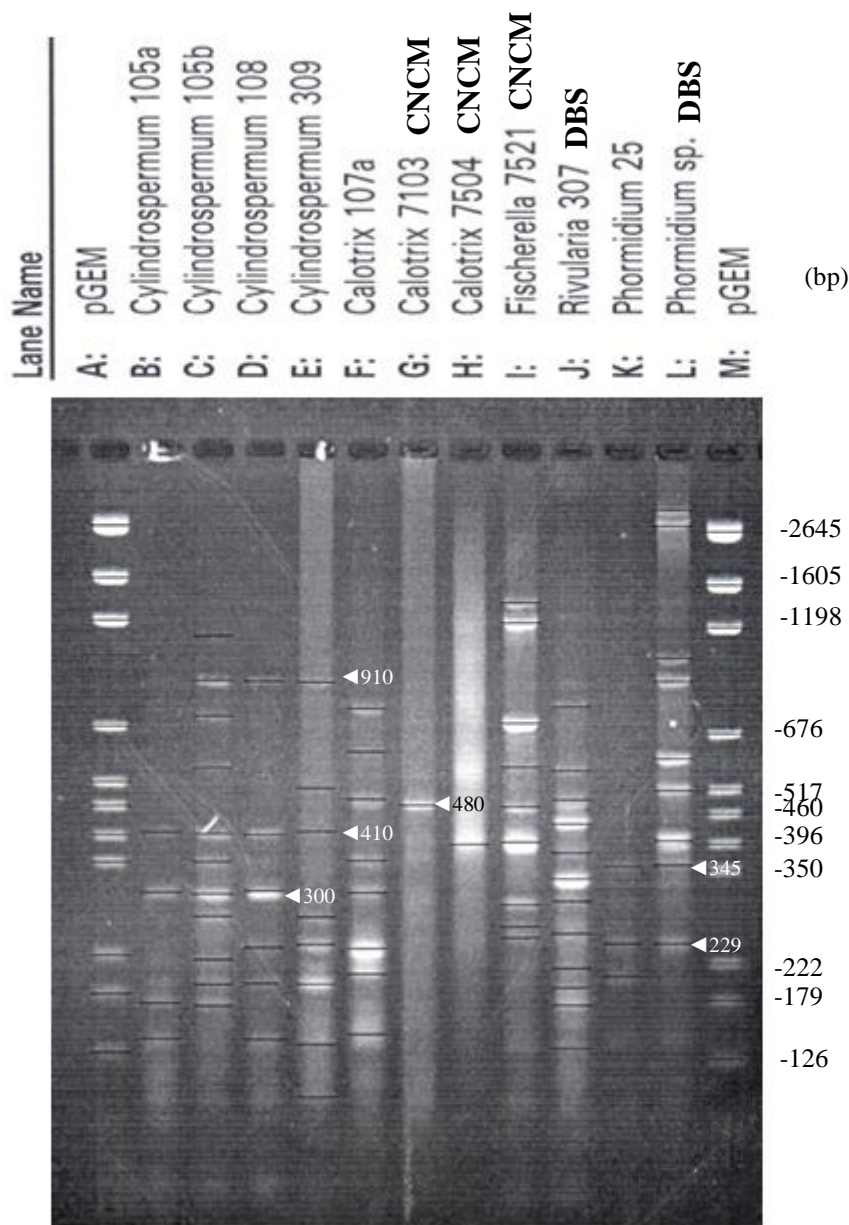
Kod sojeva iz roda *Calotrix* je utvrđeno da soj *Calotrix* 107a, iz zemljišta arenosol, poseduje 8 traka u STRR-PCR profilu, a referentni sojevi *Calotrix* 7504 (CNCM) i *Calotrix* 7521 (CNCM) svega po jednu traku. Soj *Calotrix* 107a i *Calotrix* 7504 (CNCM) su pokazali sličnost u jednoj traci od oko 480 bp.

Kod soja *Phormidium* sp. smo utvrdili postojanje 9 traka u STRR-PCR profilu, a kod soja *Phormidium* 25, koji je poreklom iz černozema, tri trake. Ova dva soja poseduju dve slične trake sa 345bp i 229bp.

Kod soja *Fischerella* 7521 (CNCM), koji potiče iz vrelih izvora NP Jelouston, SAD, utvrdili smo 9 traka u STRR-PCR profilu. Soj *Rivularia* 307 se odlikovao sa 12 traka u STRR-PCR profilu.



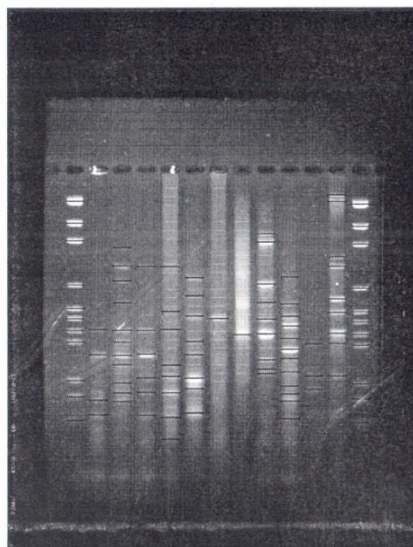
Slika 95. Elektroforegram STRR-PCR amplifikovanih fragmenata DNA azotofiksirajućih cijanobakterija, grupa sojeva: *Cylindrospermum*, *Calotrix*, *Fischerella*, *Rivularia*, *Phormidium*. pGEM- (Promega, Medison, Eis.); G. referentni soj *Calotrix* 7103 (CNCM); H. referentni soj *Calotrix* 7504 (CNCM); I. referentni soj *Fischerella* 7521 (CNCM); J. referentni soj *Rivularia* 307 (DBS), L. referentni soj *Phormidium* sp. (DBS). B-F,K. sojevi iz različitih tipova zemljišta Vojvodine.



Slika 96. Elektroforegram STRR-PCR amplifikovanih fragmenata DNA azotofiksirajućih cijanobakterija, grupa sojeva *Cylindrospermum*, *Calotrix*, *Fischerella*, *Rivularia*, *Phormidium*, analiziran programom Kodak Digital Science 1Dtm. pGEM- (Promega, Medison, Eis.); G. referentni soj *Calotrix* 7103 (CNCM); H. referentni soj *Calotrix* 7504 (CNCM); I. referentni soj *Fischerella* 7521 (CNCM); J. referentni soj *Rivularia* 307 (DBS), L. referentni soj *Phormidium* sp. (DBS). B-F,K. sojevi iz različitih tipova zemljišta Vojvodine.

Tabela 35. Broj baznih parova (bp) traka sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija grupe *Cylindrospermum*, *Calotrix*, *Fischerella*, *Rivularia*, *Phormidium*, dobijenih STRR-PCR metodom, analiza programom Kodak Digital Science 1Dtm

Kodak Digital Science 1D™



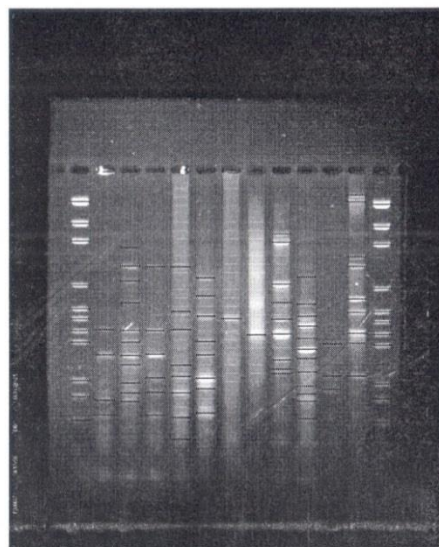
Name: oliver Fojkar

A: pGEM  
 B: *Cylindrospermum* 105a  
 C: *Cylindrospermum* 105b  
 D: *Cylindrospermum* 108  
 E: *Cylindrospermum* 309  
 F: *Calotrix* 107a  
 G: *Calotrix* 7103 CNCM  
 H: *Calotrix* 7504 CNCM  
 I: *Fischerella* 7521 CNCM  
 J: *Rivularia* 307 DBS  
 K: *Phormidium* 25  
 L: *Phormidium* sp. DBS  
 M: pGEM

	MW (bp)												
	A: pGEM	B:	C:	D:	E:	F:	G:	H:	I:	J:	K:	L:	M: pGEM
1	2645	414.2	1154	911	906.2	790.5	474.8	386.8	1365.4	794.7	344.6	<b>3000.8</b>	2645
2	1605	302.2	915.8	407.7	519.2	630.6			1229.1	567.7	229.9	<u>2605</u>	1605
3	1198	170.4	761.9	303.8	414.2	490			730.6	487.5	194.3	1022.7	1198
4	676	141.8	579.8	226.3	265	355.6			579.8	429.7		906.2	676
5	517		409.8	188.3	229.9	300.6			469.9	369		604.7	517
6	460		353.8	141	187.3	225.1			390.9	321.8		511.1	460
7	396		299		137.4	197.4			282.2	286.7		393	396
8	350		266.4		<b>104.5</b>	144.8			251.4	242.3		346.4	350
9	222		212.5						237.3	202.7		229.9	222
10	179		187.3							183.4			179
11	126		167.7							167.7			126
12										134.5			

Tabela 36. Molekulske mase (ng) traka sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija grupe *Cylindrospermum*, *Calotrix*, *Fischerella*, *Rivularia*, *Phormidium*, STRR-PCR metodom, analiza programom Kodak Digital Science 1Dtm

Kodak Digital Science 1D™



Name: oliver Fojkar

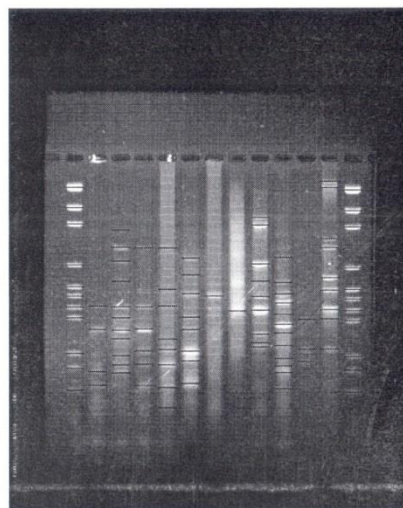
A: pGEM  
 B: *Cylindrospermum* 105a  
 C: *Cylindrospermum* 105b  
 D: *Cylindrospermum* 108  
 E: *Cylindrospermum* 309  
 F: *Calotrix* 107a  
 G: *Calotrix* 7103 CNCM  
 H: *Calotrix* 7504 CNCM  
 I: *Fischerella* 7521 CNCM  
 J: *Rivularia* 307 DBS  
 K: *Phormidium* 25  
 L: *Phormidium* sp. DBS  
 M: pGEM

Mass (ng)													
	A: pGEM	B:	C:	D:	E:	F:	G:	H:	I:	J:	K:	L:	M: pGEM
1	3000	-----	-----	-----	-----	902.7	1451	2019	625.9	27.66	-----	7.748	3000
2	1800	723.9	-----	-----	1015	31.47	275.3	-----	1768	659.5	-----	548.8	1800
3	1400	338.7	-----	-----	2075	78.8	1636	-----	2594	1279	-----	-----	1400
4	800	511.3	-----	-----	462.8	382.4	926.2	-----	551.7	2306	-----	684.8	800
5	600	-----	751.7	-----	454.2	1054	1582	-----	1459	786.5	-----	1357	600
6	500	-----	637.1	-----	414.6	1685	<b>2989</b>	-----	<b>4271</b>	2850	-----	1260	500
7	400	-----	1456	-----	-----	929.1	1408	-----	1322	339.2	-----	2034	400
8	400	-----	840.3	-----	-----	83.37	2682	-----	68.8	1650	-----	427.6	400
9	300	-----	499.1	-----	-----	-----	-----	-----	477.5	233.3	-----	323.6	300
10	200	-----	297.5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	658.6	-----	-----	200
11	200	-----	553.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	904	-----	-----	200
12	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	126.8	-----	-----	-----



Tabela 37. Pokretljivost traka (cm) sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija grupe *Cylindrospermum*, *Calotrix*, *Fischerella*, *Rivularia*, *Phormidium*, dobijenih STRR-PCR metodom, analiza programom Kodak Digital Science 1Dtm

Kodak Digital Science 1D™



Name: oliver Fojkar

A: pGEM  
 B: Cylindrospermum 105a  
 C: Cylindrospermum 105b  
 D: Cylindrospermum 108  
 E: Cylindrospermum 309  
 F: Calotrix 107a  
 G: Calotrix 7103    CNCM  
 H: Calotrix 7504    CNCM  
 I: Fischerella 7521    CNCM  
 J: Rivularia 307    DBS  
 K: Phormidium 25  
 L: Phormidium sp.    DBS  
 M: pGEM

		Mobility (cm)											
	A: pGEM	B:	C:	D:	E:	F:	G:	H:	I:	J:	K:	L:	M: pGEM
1	0.73	5.07	2.32	2.97	2.97	3.34	4.71	5.27	1.85	3.32	5.57	0.55	0.82
2	1.48	5.91	2.93	5.12	4.47	3.94			2.13	4.23	6.66	0.79	1.60
3	2.06	7.48	3.43	5.89	5.07	4.61			3.52	4.61	7.11	2.64	2.19
4	3.59	7.97	4.17	6.71	6.29	5.48			4.18	4.99		2.95	3.69
5	4.37		5.10	7.19	6.66	5.94			4.73	5.38		4.04	4.49
6	4.71		5.50	7.98	7.22	6.70			5.21	5.74		4.51	4.85
7	5.13		5.95		8.06	7.08			6.10	6.06		5.21	5.26
8	5.50		6.26		8.79	7.94			6.42	6.51		5.57	5.62
9	6.80		6.87						6.59	7.01		6.66	6.94
10	7.36		7.21							7.25			7.45
11	8.15		7.52							7.52			8.25
12										8.10			

## REZULTATI GENETIČKE KARAKTERIZACIJE CIJANOBAKTERIJA

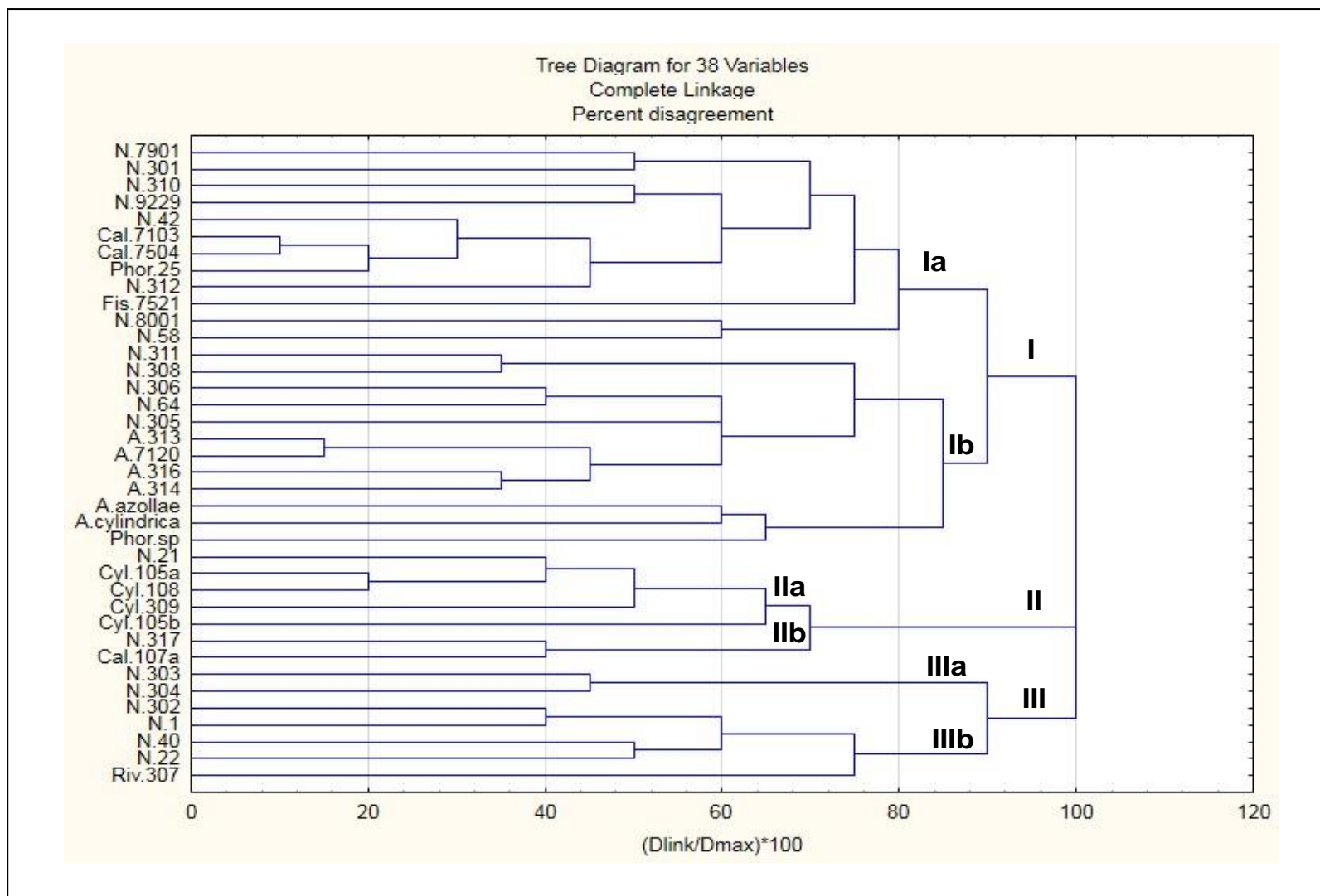
Rezultati dobijeni STRR- PCR karakterizacijom ispitivanih sojeva cijanobakterija su prikazani dendogramom koji ukazuje na stepen različitosti u profilima sojeva (Slika 97.). Na dendogramu se jasno uočava da se 38 ispitivanih sojeva mogu podeliti u tri grupe, klastera, koji se međusobno razlikuju 100%.

Prvi klaster je najveći i obuhvata 24 soja. Ovaj klaster se deli na dva subklastera, od kojih prvi Ia obuhvata 12 sojeva, od čega 8 sojeva iz roda *Nostoc*, 2 soja iz roda *Calothrix*, i jedan iz rodova *Phormidium* i *Fisherella*.

Drugi subklaster Ib obuhvata takođe 12 sojeva od čega 6 sojeva pripada rodu *Anabaena* (A.313, A.7120, A.314, A.316, *A.azollae*, *A.cylindrica*), 5 sojeva pripadaju rodu *Nostoc* (N.311, N.308, N.306, N.64 i N.305) i 1 soj *Phormidium sp.* Subklaster Ia i Ib pokazuju različitost od 90%.

U okviru Ia subklastera posebnu granu čine *Nostoc* 8001 (CCAP) (izolovan iz *G.dentata*) i soj N.58 izolovan iz zemljišta solončaka, koji su međusobno slični 40%, a samo 20% sa ostalim sojevima ovog subklastera. I druga dva simbiozna, infektivna, soja *Nostoc* se nalaze u ovom subklasteru, ali u posebnoj grani: N.7901 (CCAP) (izolovan iz *G.dentata*) i N.9229 (CNCM) (izolovan iz *G.monoica*). Svaki od njih ima 50% sličnosti sa po jednim diazotrofnim sojem *Nostoc*-a izolovanim iz zemljišta Vojvodine: N.7901 sa diazotrofnim sojem N.301 koji je izolovan iz zemljišta solonjeca, a soj N. 9229 sa sojem N.310 koji potiče takođe iz solonjeca. U istoj grani je i grupa sojeva *Calothrix* 7103 (CNCM) i *Calothrix* 7504 (CNCM) koji su ispoljili sličnost od 90%, što je maksimum u ovim istraživanjima. Soj *Phormidium* 25 pokazuje 80% sličnosti sa ovim sojevima, dok se *Nostoc* 312 razlikuje od njih oko 55%.

Diazotrofni sojevi *Nostoc* koji pripadaju klasteru Ia imaju izražen aserijalni stadijum, koji je tipičan za rod *Nostoc*. Karakteristike ispitivanih sojeva su prikazane u Tabeli 39.



Slika 97. Dendrogram sličnosti ispitivanih sojeva cijanobakterija na osnovu STRR-PCR fingerprinta

U posebnoj grani subklastera Ia se našao i soj *Fisherella* 7521 (CNCM), koji potiče iz vreljih izvora NP Jelouston, SAD. Ovaj soj se razlikuje 75% od 9 sojeva prethodne grane, a od sojeva N.8001 i N.58 se razlikuje 80%.

Subklaster Ib se deli na dve grane. Manja grana sadrži simbiozni soj *Anabaena azollae*, *A.cylindrica* i *Phormidium* sp. Ova grana pokazuje 15% sličnosti sa ostalim sojevima u drugoj grani subklastera Ib. Soj *Anabaena azollae* i *A.cylindrica* su pokazale međusobnu sličnost od 40%. *A.azollae* je simbiozni soj izolovan iz vodene paprati *Azolla pinata*, ima 9 traka u STRR-PCR profilu. Drugi soj *A.cylindrica* je diazotrofni, ima 7 traka u profilu. Soj *Phormidium* sp. je pokazao različitost od 65% u odnosu na sojeve u podgrupi *A.azollae* i *A.cylindrica*.

U okviru druge grane Ib grupe *Anabaena*: A.313, A.7120 (CNCM), A314 i A.316 čine posebnu podgrupu sojeva koji pokazuju međusobnu sličnost od 55%. Ovi diazotrofni sojevi, sem A.7120 (CNCM), su izolovani iz zemljišta černozem, imaju 5 ili 6 traka u STRR-PCR profilima, a dominantna traka je veličine oko 502 bp. Značajnu sličnost od 85% su pokazali sojevi A.313 i A.7120 (CNCM).

Dva soja *Nostoc* su pokazala sličnost od 40% sa ovom grupom *Anabena*: N.305 i N.306 (iz ritske crnice) i N.64 (iz solonjeca). Oba soja *Nostoc* koji potiču iz ritske crnice, N.305 i N.306, ne poseduju tipični aserijalni stadijum, i stoga su ne tipični predstavnici ovog roda. Poseduju pseudo aserijani stadijum, izuvijane niti koje se raspadaju na kraće segmente hormogonije. U tom smislu ovakvi sojevi ne tipičnih *Nostoc-a* se prema svom razvojnom ciklusu i morfološkim karakteristikama nalaze negde između tipičnih predstavnika roda *Nostoc* i *Anabaena* što je i pokazala analiza STRR-PCR. Sojevi *Nostoc* 311 i *Nostoc* 308, koji poseduju aserijalni stadijum, međusobom se razlikuju oko 35%, a od ostalih sojeva ove grane oko 75%.

Klaster II obuhvata sedam sojeva među kojima dominiraju sojevi *Cylindrospermum*, i on pokazuje različitost od 100% u odnosu na klaster I i III. Klaster II ima dva subklastera: IIa u koju spadaju 4 soja *Cylindrospermum* (Cyl.105a, Cyl.105b, Cyl.108 i Cyl.309) i *Nostoc* 21 i subklaster IIb sa dva soja *Nostoc* 317 i *Calothrix* 107a. Ova dva subklastera pokazuju sličnost od 30%.

Najveću sličnost u subklasteru IIa pokazuju sojevi Cyl.105a i Cyl.108 od 80%. Svi sojevi u subklasteru pokazuju sličnost od 30%. Tri soja *Cylindrospermum* (Cyl.105a, Cyl.105b,

Cyl.108) potiču iz zemljišta arenosol, Cyl.309 iz černoze, a N.21 iz solonjeca. Svi sojevi u ovom subklasteru pokazuju izrazito nizak procenat zastupljenosti heterocista u odnosu na sve ispitivane sojeve u I i III klasteru. Procenat heterocista se kretao od 1,92% kod Cyl.105b, 2,33% kod Cyl.309, 3,06% N.21, 3,51% Cyl.108 i 3,94% Cyl.105a.

U subklasteru IIb sojevi *Nostoc* 317 i *Calothrix* 107a pokazuju sličnost od 60%. *Nostoc* 317 spada u netipične predstavnike ovog roda i odlikuje se atipičnim aserijalnim stadijumom. Ova dva soja imaju znatno veći procenat heterocista, 6,50% *Nostoc* 317 i 6,19% *Calothrix* 107a, u odnosu na sojeve u subklasteru IIa.

Klaster III obuhvata 7 sojeva od čega 6 pripadaju rodu *Nostoc*, a jedan rodu *Rivularia*. Deli se u dva subklastera IIIa gde spadaju *Nostoc* 303 i *Nostoc* 304, koji su izolovani iz solonjeca, i subklaster IIIb gde spadaju sojevi N.302, N.1 i N.40 (iz solonjeca), N.22 (iz černoze) i *Rivularia* 307. Ova dva subklastera pokazuju razliku od 90%. Svi sojevi *Nostoc* u klasteru III su tipični i imaju aserijalni stadijum.

*Nostoc* 303 i *Nostoc* 304, subklaster IIIa, pokazuju sličnost od 55%. Oni se odlikuju velikim brojem traka u STRR-PCR profilima 12 (N.303) i 11 (N.304), a takođe se odlikuju i visokim procentom heterocista 12,40% i 8,36%.

U subklasteru IIIb sojevi N.302 i N.1 pokazuju sličnost od 60%, a N.40 i N.22 sličnost od 50%. Soj *Rivularia* 307 pokazuje razliku od oko 75% u odnosu na sojeve *Nostoc* u IIIb subklasteru. I ovaj soj poseduje 12 traka u STRR-PCR profilu.

Sojevi cijanobakterija koji pripadaju rodu *Nostoc*, 21 soj, koji su ispitivani STRR-PCR metodom su pokazali veliki genetički diverzitet jer su zastupljeni u sva tri klastera, odnosno u svih šest subklastera. U klaster I spada trinaest sojeva *Nostoc*. Od toga u subklaster Ia spada osam sojeva među kojima su sva tri referentna simbiozna soja: N.7901 (CCAP), N.9229 (CNCM) i N.8001 (CCAP) i pet sojeva izolovanih iz zemljišta Vojvodine i to tri iz solonjeca, i po jedan iz černoze i solončaka. U subklaster Ib spada pet sojeva koji potiču iz zemljišta solonjec, tri soja, i dva iz ritske crnice. U klasteru II se nalazi svega dva soja i to jedan iz solonjeca spada u subklaster IIa, a iz ritske crnice u subklaster IIb. Klaster III obuhvata šest sojeva od kojih dva, koji potiču iz solonjeca, spadaju u subklaster IIIa, a četiri soja spadaju u subklaster IIIb, tri iz solonjeca a jedan iz černoze, tabela 38.



Ispitivani sojevi koji pripadaju rodu *Anabaena*, tri referentna soja A.7120 (CNCM), simbiozni soj *A.azollae* (DBS) i *A.cylindrica* (CCAP) i tri izolovana iz černoze Vojvodine, su pokazali veliku genetičku jednobraznost jer svi spadaju u subklaster Ib, tabela 39.

Sojevi ispitivanih cijanobakterija, njih jedanaest, koji pripadaju grupi pet različitih rodova: *Calotrix*, *Fisherella*, *Rivularia*, *Phormidium*, *Cylindrospermum* su pokazali veliki genetički diverzitet, jer su svrstani u sva tri klastera. Klaster I obuhvata pet sojeva od čega četiri spadaju u subklaster Ia, referentni sojevi *Calotrix* 7103 (CNCM), *Calotrix* 7504 (CNCM) i *Fisherella* 7521 (CNCM) i *Phormidium* 25 iz černoze, dok u subklaster Ib spada samo soj *Phormidium* 25 (DBS). U klaster II spada pet sojeva, od čega u subklaster IIa spadaju sva četiri soja *Cylindrospermum* izolovani iz arenosola i černoze, a u subklaster IIb spada soj *Calotrix* 107a iz arenosola. U subklaster IIIb spada samo jedan soj *Rivularia* 307 (DBS), tabela 40.

Rasmussen i Svenning (1998) su analizirali PCR metodom na osnovu STRR i LTRR repetitivnih sekvenci DNA kod 30 simbiozna soja *Nostoc* i 12 diazotrofnih sojeva koji pripadaju rodovima: *Nostoc*, *Fischerella*, *Sinechocystis*, *Gleothoece*, *Microcoleus*, *Plectonema* i *Phormidium*. Zaključili su da je karakterizacija cijanobakterija ovim metodom, sa STRR i LTRR prajmerom, veoma brz metod i veoma koristan za jasno razlikovanje i klasifikaciju čak i veoma sličnih sojeva. Ovaj metod su uspešno primenili i na neakseničnim kulturama cijanobakterija, što je od posebnog značaja s obzirom da je isčišćavanje cijanobakterijskih kultura od pratećih bakterija veoma teško i često bezuspešno. Metod su uspešno primenili sem na prečišćenoj DNA i na netaknutim filamentima cijanobakterija, što uveliko olakšava izvođenje ovih istraživanja. Simbiozne sojeve *Nostoc* izolovane iz biljke *Gunnera* metodom STRR-PCR podelili su u 4 grupe. Jednaki PCR profili uzoraka uočeni su kod izolata sakupljenih iz različitih vrsta biljke *Gunnera*. Slobodno-živeći sojevi i oni izolovani iz cikasa pokazali su različite PCR profile. Uprkos konstataciji Mazela et al. (1990) da je ovaj metod specifičan za heterocistne cijanobakterije, Rasmussen i Svenning su dobili dobre rezultate i kod ne heterocistnih cijanobakterija.

Zheng et al. (1999) navode da su cijanobakterije prokariotski fototrofi sa velikim evolucionim značajem, koje poseduju sposobnost da uđu u simbiotske odnose sa višim biljkama. Ovo uključuje biljke iz grupe *Briophita*. PCR metodom uz pomoć STRR sekvenci ispitali su genetski diverzitet cijanobakterija koje stupaju u simbiozu sa svim vrstama vodene paprati roda *Azolla*. Filamenti cijanobakterija su izolovani direktno iz lisnih šupljina *Azolla* ili

je korišten sadržaj homogenizovanog tkiva *Azolla* sa cijanobakterijom. Na osnovu PCR analiza utvrđene su značajne razlike između cijanobakterija izolovanih iz paprati grupe *Euazolla* i *Rhizosperm*. STRR-PCR profili su korišćeni i za formiranje filogenetskog stabla. Utvrđeno je postojanje tri različita klastera: prvi je sadržao četiri izolata iz sekcije *Euazolla*, drugi izolate iz *Azolla filiculoides*, a treći tri izolata iz sekcije *Rhizosperma*. Upotrebom STRR-PCR profila dobijeni su novi podaci o taksonomiji cijanobakterija koje grade simbiozu sa rodom *Azolla*, koji su teško mogli da se utvrde drugim metodama klasifikacije. Autori su zaključili da STRR-PCR profili mogu biti vredan alat za studije različitosti i klasifikacije simbiozih cijanobakterija iz *Azolla*, kao i za klasifikaciju samog roda *Azolla*.

Teaumroong et al. (2002) su ispitivali biodiverzitet azotofiksirajućih zemljišnih cijanobakterija na Tajlandu. Sto dva izolata su slučajnim izborom analizirana DNA fingerprinting metodom uz pomoć STRR-PCR. Dobijena su dva klastera od 45 izolata *Nostoc* i 44 izolata *Anabaena*. Kada su ove dve grupe detaljnije analizirane uz pomoć STRR-PCR metode, dobijen je široki spektar raznovrsnosti kod oba roda.

Govinda et al. (2008) su ispitivali prisustvo repetitivnih DNK sekvenci STRR i visoko ponovljivog palindroma (HIP) kod genoma cijanobakterija koristeći PCR metod kod devet kultura cijanobakterija roda *Westiellopsis*. Ovom metodom su uspjeli da pokažu da je moguće determinisati i grupisati sojeve cijanobakterija koji su sa sličnim osobinama tolerancije na stres. Izdvojili su klastere sojeva tolerantne na: kiselu sredinu (pH 4-5), na herbicide i na zaslanjenu sredinu.

Vrste heterocistnih cijanobakterija se tradicionalno razlikuju na osnovu morfoloških karakteristika. Jedna od mnogih karakteristika koje se koriste za razlikovanje vrsta jeste pozicija akinete u odnosu na heterociste. Ova karakteristika je korisna kada se vrši determinacija uzoraka sakupljenih iz prirode, ali kod kultivisanih sojeva, sporulacija ili kasni ili se formiranje heterocista javlja kao odgovor na hranljive sastojke dostupne u medijumu. Citološke karakteristike cijanobakterija uzgajanih u kontrolisanim uslovima, kao što su veličina vegetativnih ćelija, heterocista i akineta, vrlo često se razlikuju od onih raslih u prirodnoj sredini. Dakle, korišćenje morfoloških karakteristika za klasifikaciju veštačkih sojeva može da da netačne rezultate. Zbog toga su Tiwari et al. (2015) koristili STRR-PCR metod za razlikovanje heterocistnih cijanobakterija koji pripadaju rodovima: *Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix* i *Microchaete*. Specifični STRR-PCR profili su dobijeni za trideset dva

cijanobakterijska soja. Dendrogram je pokazao dva klastera. Glavni klaster, je bio podeljen u dva subklastera: subklaster 1 je obuhvatio šesnaest *Anabaena* sojeva, a subklaster 2 je podeljen u dve podgrupe: podgrupa 1 sa devet *Nostoc* sojeva i podgrupe 2 sa četiri soja *Calothrix*. Drugi manji klaster je obuhvatio tri soja *Microchaete* vrsta. Rezultati su jasno ukazali da se primenom STRR-PCR metoda sojevi cijanobakterija mogu podeliti prema rodovima.

U Tabelama 38, 39 i 40 su prikazane određene karakteristike ispitivanih sojeva cijanobakterija i to: poreklo soja, klaster, broj traka u profilu STRR-PCR, infektivnost (literaturni podatak), stvaranje simbioze (literaturni podatak), aserijalni stadijum (AS), pseudo aserijalni stadijum (PAS), procenat heterocista (HC%), dimenzije vegetativnih ćelija (duž x šir  $\mu\text{m}$ ), dimenzije heterocista (duž x šir  $\mu\text{m}$ ).

Tabela 38. Karakteristike ispitivanih sojeva cijanobakterija roda *Nostoc*

Broj	SOJ	POREKLO	KLASTER	BR. TRAKA	Infektivnost	Simbioza	AS	PAS	% HC	VC duž x šir ( $\mu\text{m}$ )	HC duž x šir ( $\mu\text{m}$ )
1.	Nostoc 7901 (CCAP)	Gunnera dentata	Ia	8	+	+	*	*	*	2.60 x 2.80	4.84 x 4.45
2.	Nostoc 9229 (CNCM)	Gunnera monoica – Novi Zeland	Ia	8	+	+	*	*	*	3.22 x 2.09	4.22 x 2.48
3.	Nostoc 8001 (CCAP)	Gunnera monoica - Novi Zeland	Ia	10	+	+	*	*	*	2.80 x 3.26	*
4.	Nostoc 42	Černozem	Ia	5	-	-	+	-	6.86	4.91 x 4.90	5.00 x 3.82
5.	Nostoc 58	Solončak	Ia	8	-	-	+	-	6.86	2.93 x 2.55	3.43 x 2.75
6.	Nostoc 301	Solonjec	Ia	8	-	-	+	-	7.16	4.96 x 4.39	5.34 x 5.04
7.	Nostoc 310	Solonjec	Ia	6	-	-	+	-	6.98	3.64 x 4.18	3.94 x 4.16
8.	Nostoc 312	Solonjec	Ia	6	-	-	+	-	-	4.02 x 4.20	4.16 x 3.86
9.	Nostoc 64	Solonjec	Ib	6	-	-	+	-	9.09	2.55 x 3.40	3.22 x 3.52
10.	Nostoc 305	Ritska crnica	Ib	8	-	-	-	+	8.96	4.04 x 3.78	4.45 x 3.92
11.	Nostoc 306	Ritska crnica	Ib	6	-	-	-	+	9.04	5.76 x 4.92	4.96 x 4.70
12.	Nostoc 308	Solonjec	Ib	10	-	-	+	-	9.57	3.34 x 3.27	3.58 x 3.62
13.	Nostoc 311	Solonjec	Ib	9	-	-	+	-	10.14	2.80 x 3.82	2.93 x 4.46
14.	Nostoc 21	Solonjec	IIa	10	-	-	+	-	3.06	3.03 x 3.07	5.18 x 5.10
15.	Nostoc 317	Ritska crnica	IIb	7	-	-	-	+	6.50	3.68 x 4.11	5.57 x 4.98
16.	Nostoc 303	Solonjec	IIIa	12	-	-	+	-	12.40	3.91 x 3.67	3.98 x 4.30
17.	Nostoc 304	Solonjec	IIIa	11	-	-	+	-	8.36	3.30 x 3.48	4.34 x 4.66
18.	Nostoc 1	Solonjec	IIIb	11	-	-	+	-	8.67	3.31 x 3.31	4.78 x 3.77
19.	Nostoc 22	Solonjec	IIIb	9	-	-	+	-	14.45	3.61 x 3.35	4.93 x 4.83
20.	Nostoc 40	Černozem	IIIb	7	-	-	+	-	*	*	*
21.	Nostoc 302	Solonjec	IIIb	7	-	-	+	-	6.72	3.00 x 3.79	3.79 x 3.82

\* nema podatka

Tabela 39. Karakteristike ispitivanih sojeva cijanobakterija roda *Anabaena*

Broj	SOJ	POREKLO	KLASTER	BR. TRAKA	Infektivnost	Simbi oza	AS	PAS	% HC	VC duž x šir (µm)	HC duž x šir (µm)
1.	Anabaena 7120 (CNCM)	CNCM	Ib	6	-	-	-	-	*	*	*
2.	Anabaena azollae (DBS)	Azolla pinata	Ib	9	-	+	-	-	*	3.90 x 2.21	5.05 x 4.14
3.	Anabaena cylindrica (CCAP)	jezero	Ib	7	-	-	-	-	*	*	*
4.	Anabaena 313	Černozem	Ib	5	-	-	-	-	4.73	3.31 x 4.17	5.48 x 5.70
5.	Anabaena 314	Černozem	Ib	6	-	-	-	-	4.23	4.06 x 4.54	5.41 x 5.02
6.	Anabaena 316	Černozem	Ib	5	-	-	-	-	4.16	6.03 x 5.34	6.39 x 6.49

\* nema podataka

Tabela 40. Karakteristike ispitivanih ostalih rodova sojeva cijanobakterija: *Calotrix*, *Fisherella*, *Rivularia*, *Phormidium*, *Cylindrospermum*

Broj	SOJ	POREKLO	KLASTE R	BR. TRAKA	Infektiv nost	Simbi oza	AS	PAS	% HC	VC duž x šir (µm)	HC duž x šir (µm)
1.	Calotrix 7103 (CNCM)	slatkovodni akvarijum	Ia	1	-	-	-	-	*	*	*
2.	Calotrix 7504 (CNCM)	-	Ia	1	-	-	-	-	*	*	*
3.	Fisherella 7521 (CNCM)	NP Yelouston – vreli izvor, SAD	Ia	9	-	-	-	-	*	*	*
4.	Phormidium 25	Černozem	Ia	3	-	-	-	-	-	5.10 x 5.10	-
5.	Phormidium sp. (DBS)	-	Ib	9	-	-	-	-	*	*	*
6.	Cyl.105a	Arenosol	IIa	4	-	-	-	-	3.94	4.10 x 4.93	5.07 x 4.38
7.	Cyl. 108	Arenosol	IIa	6	-	-	-	-	3.51	3.35 x 3.52	5.80 x 4.37
8.	Cyl. 309	Černozem	IIa	8	-	-	-	-	2.33	2.89 x 3.80	6.32 x 5.81
9.	Cyl. 105b	Arenosol	IIa	11	-	-	-	-	1.92	3.35 x 3.57	7.80 x 4.30
10.	Calotrix. 107a	Arenosol	IIb	8	-	-	-	-	6.19	6.75 x 6.36	5.90 x 5.25
11.	Rivularia 307 (DBS)	zemljište	IIIb	12	-	-	-	-	*	*	*

\* nema podataka



## 7. ZAKLJUČAK

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

**Ukupna brojnost algi** je bila znatno veća kod hidromorfnih i halomorfnih zemljišta, nego kod automorfnih zemljišta. Najveća ukupna prosečna brojnost algi u površinskom sloju zemljišta se pokazala kod fluvisola, u SRP "Koviljsko petrovaradinski rit", 260794 jedinki po gr zemljišta. Solončak, na lokalitetu SRP "Slano Kopovo", ima drugu brojnost algi u površinskom sloju, u proseku iznosi 158539 jedinki po gr zemljišta. Černozem, Rimski Šančevi, je treći lokalitet po ukupnoj brojnosti algi u površinskom sloju zemljišta, 135707 jedinki po gr zemljišta. U grupu zemljišta sa srednjom ukupnom brojnošću algi spadaju: ritska crnica, Bečej (99468 jed./gr zemljišta), fluvisol, Kačka šuma (88575 jed./gr zemljišta), ritska crnica, SRP "Carska bara" (80853 jed./gr zemljišta) i solonjec, kod Kumana (35116 jed./gr zemljišta). U grupu sa malom ukupnom brojnošću algi spadaju zemljišta: regosol u SRP "Titelski breg" (31896 jed./gr zemljišta) i gajnjača, u NP "Fruška gora" (8415 jed./gr zemljišta). Najniža ukupna brojnost algi je ustanovljena kod arenosola u SRP "Deliblatska peščara", 7233 algi po gramu zemljišta, i PIO "Subotička peščara", svega 6023 jedinice po gramu zemljišta.

Kod svih ispitivanih tipova zemljišta ukupna brojnost algi je bila najveća u površinskom sloju zemljišta, 0-5cm dubine, opadala je sa dubinom zemljišta i bila je najmanja u najdubljem sloju, 30 - 60cm. Fišerov LSD test homogenosti je pokazao da postoji statistički značajna razlika u ukupnom broju algi između površinskog i donjih ispitivanih slojevima zemljišta pri varijansi za vrednost od  $p=0.05$ .

Ukupna brojnost algi je varirala u zavisnosti od godišnjeg doba. Znatno veća variranja brojnosti su zabeležena u površinskom sloju zemljišta, a manja u dubljim slojevima. Kod najvećeg broja ispitivanih zemljišta brojnost algi je bila najveća tokom jesenjeg i zimskog perioda. U jesenjem periodu ukupan broj algi je bio najveći kod sledeća četiri tipa zemljišta: arenosola (PIO „Sub.-hor.peščara“), černozema (R. Šančevi), fluvisola (SRP „Kov.-petrovaradinski rit“) i ritske crnice (SRP „Carska bara“). U zimskom periodu ukupan broj algi

je bio najveći kod sledeća četiri tipa zemljišta: arenosola (SRP „Del.peščara“), ritskoj crnici (Bečej), solonjeca (Kumane) i solončaka (SRP „S. Kopovo“). Najmanja ukupna brojnost algi je zabeležena u letnjem periodu i to kod sedam tipova zemljišta: arenosola (PIO „Sub.-hor. peščara“), černozema (Rimski Šančevi), gajnjače (NP „F.gora“), fluvisola (SRP „Kov.-petrovaradinski rit“), ritske crnice (Bečej), solonjeca (Kumane) i solončaka (SRP „S.Kopovo“).

Najveća prosečna godišnja brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija, u površinskom sloju 0-5cm, je utvrđena kod zemljišta fluvisol u SRP „Kov.-petrovaradinskom ritu“, 150864 jedinki po gr apsolutno suvog zemljišta. Solončak u SRP „S.Kopovo“ se takođe odlikovao velikom brojnošću azotofiksirajućih cijanobakterija, u površinskom sloju je iznosila 121077 cijanobakterija po gramu zemljišta u toku godine. Černozem, na području Rimskih Šančeva, je treći lokalitet po brojnosti azotofiksirajućih cijanobakterija u površinskom sloju zemljišta, 70887 jedinki po grzemljišta. Grupa zemljišta sa srednjom prosečnom brojnošću azotofiksirajućih cijanobakterija je: ritska crnica, SRP „Carska bara“ (56824 jed./gr zemljišta), fluvisol, Kaćka šuma (54085 jed./gr zemljišta), ritska crnica, Bečej (52560 jed./gr zemljišta) i solonjec, Kumane (30960 jed./gr zemljišta). Ritska crnica, SRP „Carska bara“, se odlikuje najvećom količinom humusa (3,96% ) i najvećom količinom azota (0,26% ) od svih ispitivanih tipova zemljišta. U grupu sa malom brojnošću azotofiksirajućih cijanobakterija spadaju: regosol, SRP "Titelski breg" (9538 jed./gr zemljišta), arenosoli, SRP "D. peščara" (4699 jed./gr zemljišta) i PIO "Subotička peščara" ( 2808 jed./gr zemljišta). Arenosol na lokalitetu u Deliblatskoj peščari se odlikuje i sa najmanjim sadržajem humusa, azota, fosfora, kalijuma i ugljenika. Zemljište sa najnižom brojnošću azotofiksirajućih cijanobakterija, u odnosu na sva ispitivana zemljišta je gajnjača u NP „Fruška gora“, 1582 jed./gr zemljišta u površinskom sloju.

Kod svih ispitivanih zemljišta brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija je bila najveća u površinskom sloju zemljišta, 0-5cm dubine, opadala je sa dubinom zemljišta i bila najmanja u najdubljem sloju, 30 - 60cm. Fišerov LSD test homogenosti je pokazao da postoji statistički značajna razlika u broju azotofiksirajućih cijanobakterija između površinskog i donjih ispitivanih slojevima zemljišta pri varijansi od  $p=0.05$ .

Kod najvećeg broja ispitivanih zemljišta brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija je bila najveća tokom zimskog perioda, i to kod sedam zemljišta: arenosola (PIO „Subotička peščara“), regosola (SRP „Titelski breg“), černozema (R.Šančevi), gajnjače (NP „F. gora“), fluvisola (Kaćka šuma), ritske crnice (Bečej) i solončaka (SRP „S. Kopovo“). Najmanja brojnost

azotofiksirajućih cijanobakterija je zabeležena u letnjem periodu i to kod šest tipova zemljišta: arenosola (PIO „Sub.Peščara“), regosola (SRP „Titelski breg“), černozema (R.Šančevi), gajnjače (NP „F. gora“), solonjeca (Kumane) i solončaka (SRP „S. Kopovo“).

Upoređujući brojnost azotofiksirajućih cijanobakterija sa ukupnim brojem algi u zemljištima Vojvodine, ustanovili smo da su azotofiksirajuće cijanobakterije dominantne u našim zemljištima i zastupljene sa 56.27% u odnosu na druge grupe algi, u površinskom sloju zemljišta 0-5cm. U dubljim slojevima zemljišta procenat azotofiksirajućih cijanobakterija se povećava u odnosu na druge grupe algi, zastupljene su sa 65.59% u sloju od 5- 30cm, i sa 61.68% u najdubljem sloju od 30-60cm.

Najveća procentualna zastupljenost azotofiksirajućih cijanobakterija, u odnosu na druge grupe algi, je ustanovljena kod halomorfnih zemljišta, kod solonjeca sa 88.16%, a kod solončaka sa 76.37% u sloju 0-5cm. To pokazuje da azotofiksirajućih cijanobakterije znatno bolje podnose ekstremne uslove, pre svega visoke koncentracije soli, u odnosu na druge grupe algi. Najmanja procentualna zastupljenost azotofiksirajućih cijanobakterija u površinsko sloju je ustanovljena kod gajnjače na Fruškoj gori 18.79%.

Najveća brojnost bakterija bila u zemljištu solončak (SRP „S. Kopovo“) i iznosila je u površinskom sloju  $787.51 \times 10^6$  bakterija po grzemljišta. Regosol (SRP “Titelski breg”) u sloju 5-30cm ima drugu ukupnu brojnost bakterija i u proseku iznosi  $742,57 \times 10^6$  bakterija po gr zemljišta. Ritska crnica (Bečeja) je treći lokalitet po ukupnoj brojnosti bakterija i u sloju od 5-30cm u proseku iznosi  $691,18 \times 10^6$  bakterija po gr apsolutno suvog zemljišta. Černozem (R.Šančevi), je četvrti lokalitet po ukupnoj brojnosti bakterija, u površinskom sloju u proseku iznosi  $229,14 \times 10^6$  bakterija po gr zemljišta. U grupu zemljišta sa srednjom ukupnom brojnošću bakterijaspadaju: arenosol (PIO “Sub.Peščara”) ( $189,86 \times 10^6$ ), ritska crnica, (SRP „Carska bara“)( $154,19 \times 10^6$ ), fluvisol(Kačka šuma) ( $128,65 \times 10^6$ ), solonjec, (Kumane) ( $111,61 \times 10^6$ ) i fluvisol, (SRP “Koviljsko - petrovaradinski rit”) ( $92,26 \times 10^6$ ).Zemljišta sa najnižom ukupnom brojnošću bakterija su gajnjača u NP “F. gora” ( $40,91 \times 10^6$ ) i arenosol u SRP „D. Peščara“( $33,1 \times 10^6$ ).

Ukupna brojnost bakterija je veoma varirala u zavisnosti od dubine zemljišta. Kod osam od jedanaest istraživanih zemljišta ukupna brojnost bakterija je bila najveća u površinskom sloju zemljišta, 0-5cm dubine: solončaka, solonjeca, ritske crnice (SRP “Carska bara”),

fluvisola (Kačka šuma), fluvisola (SRP "K. petrovardinski rit"), černozema, gajnjače i arenosola (SRP "Sub. - horgoška peščara").

Najmanja ukupna brojnost bakterija je kod sedam od jedanaest ispitivanih zemljišta utvrđena u letnjem periodu, kod: arenosola (SRP "D. peščara"), černozema (R.Šančevi), gajnjače (NP "F. gora"), ritske crnice (Bečej), ritske crnice (SRP "Carska bara"), solonjeca (Kumane) i solončaka (SRP "Slano Kopovo"). Najveća brojnost bakterija ustanovljena je u prolećnom periodu, kod sledećih sedam tipova zemljišta: arenosola, (PIO "Sub.- horgoška peščara") ( $481,71 \times 10^6$  broj po gr zemljišta), arenosola, (SRP "D. peščara") ( $50,07 \times 10^6$ ), regosola, (SRP "Titelski breg") ( $2879,09 \times 10^6$ ), černozema, (R.Šančevi) ( $486,78 \times 10^6$ ), fluvisola, (Kačka šuma) ( $207,44 \times 10^6$ ), ritske crnice, (Bečej) ( $2417,99 \times 10^6$ ), solončaka, (SRP "S. Kopovo") ( $2891,07 \times 10^6$ ).

U radu je izolovano 30 sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija. Najveći broj izolovanih sojeva pripada rodu *Nostoc*, 19 sojeva, 4 soja pripada rodu *Anabaena*, 4 soja rodu *Cylindrospermum*, i po jedan izolovani soj rodovima *Calothrix*, *Tolypothrix* i *Phormidium*.

Najveći broj sojeva roda *Nostoc* izolovan je iz tipa zemljišta solonjec (Kumane), 12 sojeva, četiri *Nostoc*-a je izolovano iz ritske crnice (Bečej), dva iz černozema (Rimski Šančevi) i jedan iz solončaka (SRP "S. Kopovo"). Tri soja roda *Anabaena* je izolovano iz černozema (Rimski Šančevi), a jedan iz ritske crnice (Bečej). Soj iz ritske crnice je determinisan kao *Anabaena sphaerica f. conoidea*. Od četiri izolovana soja *Cylindrospermum* tri je izolovano iz arenosola (PIO "Sub.-horgoška peščara"), a jedan iz černozema. Svi sojevi *Cylindrospermum* izolovani iz arenosola pripadaju vrsti *Cylindrospermum stagnale*. Soj vrste *Calothrixelenkinii* je izolovan iz arenosola (PIO "Sub.-horgoška peščara"), *Tolypothrix tenuis f. terrestris* je izolovan iz solonjeca (Kumane), a *Phormidium ambiguum* je izolovan iz černozema (Rimski Šančevi).

Hormogonije su uočene kod svih izolovanih sojeva *Nostoc*, a aserijalni stadijum je zabeležen kod 16 sojeva. Sojevi *Nostoc* koji imaju i aserijalni stadijum i hormogonije spadaju u grupu sa tipičnim razvojnim ciklusom *Nostoc*, dok sojevi kod kojih nije uočen aserijalni stadijum spadaju u grupu sa atipičnim razvojnim ciklusom, takvi sojevi su: N.305, N.306 i N.317. Sojevi determinisani kao *Anabaena* se odlikuju odsustvom aserijalnog stadijuma i hormogonija.

Kod izolovanih sojeva *Nostoc* veličina vegetativnih ćelija se kreće u intervalu od 2.29 x 2.26µm, kod soja *Nostoc* 70, pa do 5.76 x 4.92µm kod soja *Nostoc* 306, izolovanog iz ritske crnice (Bečej). Prosečna veličina vegetativnih ćelija sojeva *Nostoc* je 3.55 x 3.64µm. Veličina vegetativnih ćelija kod izolovanih sojeva *Anabena* je varirala od 3.00 x 3.49µm kod *A. sphaerica f. conoidea* 51., pa do 6.03 x 5.34µm kod soja *Anabaena* 316, koji je izolovan iz černozema. Prosečna veličina vegetativnih ćelija *Anabena* iznosi 4.10 x 4.38µm.

Veličina vegetativnih ćelija kod roda *Cylindrospermum* su se kretale u rasponu od 2.89 x 3.80µm, kod soja *Cylindrospermum* 8 iz černozema, pa do 4.10 x 4.93µm, kod *C. stagnale* 105a koji je izolovan iz arenosola. Prosečna veličina vegetativnih ćelija sojeva *C. stagnale* izolovanih iz arenosola iznosila je 3.60 x 4.01µm.

Soj *Calothrix elenkini* 107, izolovan iz arenosola, poseduje vegetativne ćelije koje su u osnovi trihoma dimenzija 6.75 x 6.36µm. *Tolypothrix tenuis f. terrestris* 67, izolovan je iz solonjeca i ima vegetativne ćelije dimenzija 5,00 x 6,54µm. *Phormidium ambiguum* 49, izolovan je iz černozema i ima vegetativne ćelije veličine 5.10 x 5.10µm.

Prosečna veličina heterocista izolovanih sojeva *Nostoc* iznosi 4.28 x 4.09µm. Dimenzije heterocista su kod svih ispitivanih sojeva *Nostoc* većih dimenzija od vegetativnih ćelija u proseku za 14.03%. Prosečna veličina heterocista *Anabaena* iznosi 5.82 x 5.38µm. Kod sva četiri soja *Anabaena* heterociste su većih dimenzija od vegetativnih ćelija za 23,61%. Heterociste *Cylindrospermum* su kod sva četiri izolovana soja izdužene, prosečne dimenzije 6.24 x 4.72µm i za 50.9% veće od vegetativnih ćelija. Soj 107 *Calothrix elenkini* poseduje heterociste koje su manjih dimenzija od vegetativnih ćelija, 5.90 x 5.25µm. Heterociste su za 17.7% manje od vegetativnih ćelija. *Tolypothrix tenuis f. terrestris* 67, ima heterociste dimenzija 3.39 x 4.65µm imanje su od vegetativnih ćelija za 44.0%. Soj *Phormidium ambiguum* 49. nema heterociste. Prosečna zastupljenost heterocista kod *Nostoc* je iznosila 8.28%, *Anabaena* 4.25%, *Cylindrospermum* 2.93%, *Calotrix elenkini* 6.19%, *Tolypothrix tenuis f. terrestris* 7.76%.

Kod osam sojeva izolovanih cijanobakterija je utvrđeno prisustvo spora. Spore su kod svih sojeva znatno većih dimenzija od vegetativnih ćelija.

Prilikom ultrastrukturnih ispitivanja karakteristika vegetativnih ćelija azotofiksirajućih sojeva cijanobakterija elektronskim mikroskopom uočili smo sledeće **inkluzije redovnog pojavljivanja**: karboksizomi (Cs), cijanoficinkse granule (CG), polifosfatne granule (PP ili PG), ribosome (R), lipidne granule ( $\beta$  –granule) i tilakoide (T), kao i **inkluzije neredovnog pojavljivanja**: membranom ograničene kristalne inkluzije.

**Karboksizome (Cs)** smo uočili u centroplazmi vegetativnih ćelija kod svih ispitivanih sojeva cijanobakterija. Najveća brojnost karboksizoma je bila kod simbiotskog soja *A.azollae* i *Nostoc 8001*. Simbiotski sojevi cijanobakterija su imali veću brojnost karboksizoma po preseku ćelije u odnosu na diazotrofne sojeve. Najmanji karboksizomi su uočeni kod diazotrofnog *Nostoc-a 312*. Najveći karboksizomi su uočeni kod simbiotskog soja *Nostoc 7901*. Diazotrofni sojevi *Nostoc* su u proseku imali karboksizome prečnika do 308nm, dok su simbiotski sojevi *Nostoc* imali u proseku karboksizome prečnika do 420nm. Sojevi *Anabaena* su imali karboksizome u proseku veće od karboksizoma diazotrofnih sojeva *Nostoc*, a manje od simbiotskih *Nostoc* sojeva, iznosili su u prečniku 363nm kod *A.azollae*.

**Cijanoficinske granule (CG)** smo uočili u vegetativnim ćelijama kod svih ispitivanih sojeva azotofiksirajućih cijanobakterija. Najmanja brojnost CG se kretala kod diazotrofnih sojeva *Nostoc-a* N.302 i N.311, a najveća po preseku ćelije je uočena kod simbiotskog soja N.9229. U proseku su simbiotski sojevi *Nostoc-a* imali veći broj CG (2-6) u odnosu na diazotrofne sojeve *Nostoc-a* (1-4). Kod sojeva *Anabaena* je broj CG bio veći u odnosu na sojeve *Nostoc-a*. Soj *Anabaena 314* je soj sa najvećim brojem CG od svih ispitivanih sojeva. Veličina CG se kretala u prečniku od 243nm kod simbiotskog soja *Nostoc* N.8001 do maksimalnih 1236nm u prečniku kod diazotrofnog soja A.314. Cijanoficinske granule CG su brojčano zastupljenije kod simbiotskih sojeva *Nostoc*, nego kod diazotrofnih. Oba soja *Anabena* su ipak sojevi sa najvećim i najbrojnim cijanoficinskim granulama.

**Polifosfatne granule (PG)** smo uočili uglavnom u nukleoplazmi kod svih ispitivanih sojeva cijanobakterija. Brojnost PG se kod najvećeg broja sojeva kretala do svega jedne (1) po preseku (diazotrofi N.302, N.311, A.314, simbioti N.7901, N.8001), do maksimalno pet (5) PG kod diazotrofa N.312 i simbionta *A.azollae*. Simbiotski sojevi *Nostoc*, N.9229 i N.8001, imaju PG najvećih dimenzija. Soj *Nostoc* sa najmanjim PG je diazotrof N.311. U proseku simbiotski sojevi *Nostoc* imaju veće PG u odnosu na diazotrofne sojeve *Nostoc*. Kod roda



*Anabaena* simbiotski soj *A.azollae* ima veće dimenzije PG (599nm) nego diazotrofni soj A.314 (420 nm). PG granule nisu uočene u heterocistama.

**Masne inkluzije (LD)** smo u velikom broju uočili u ćelijama kod svih ispitanih sojeva cijanobakterija. Granule LD su uglavnom bile smještene uz ćelijski zid ili pored tilakoida. Kod sojeva *Nostoc-a* uočeno je da su LD brojčano zastupljenije kod diazotrofnih sojeva nego kod simbiotskih *Nostoc*. Slična situacija je uočena i kod sojeva *Anabaena*, diazotrof A.314 ima LD. Najveće lipidne granule su uočene kod diazotrofa N.312, a najmanje su zabeležene kod simbionta N.7901. Sojevi *Anabaena* su imali ujednačene LD granule.

**Ribozome (R)** smo uočili kao sitna zrnca kod svih vegetativnih ćelija i heterocista ispitivanih cijanobakterija. Dimenzije ribozoma su se kretale od 9.52nm kod soja *A.azollae*, do 15.32nm kod soja N.7901. Prosečna dimenzija ribozoma kod diazotrofnih *Nostoc* sojeva približno odgovara dimenzijama simbioznih *Nostoc-a*. Diazotrofni soj *Anabaena* A.314 ima ribozome dimenzije 13.33 nm, a soj *A. azollae* dimenzije 9.52 nm.

Tilakoidi su kod svih ispitivanih sojeva cijanobakterija bili veoma dobro zastupljeni u vegetativnim ćelijama. Soj *Nostoc* 302 se odlikuje veoma specifičnim spiralnim rasporedom tilakoida.

**Kristalne inkluzije ograničene membranom (MLCI)** smo uočili kod dva simbiozna soja i to *A. azollae* i N.9229. Kristalne inkluzije *A.azollae* su bile dimenzija 189nm i 270nm, a bile su ograničene membranama prečnika 541 i 472nm. Kod soja N. 9229 kristalna inkluzija je bila dimenzije 315nm, a membrana prečnika 542nm.

**Ćelijski zid (CW)** ispitivanih sojeva cijanobakterija se kretao od 41.22nm kod diazotrofnog soja N.302, do 54.17nm kod simbioznog soja N.8001. U proseku je ćelijski zid diazotrofnih sojeva *Nostoc* (42.58nm) bio nešto tanji nego ćelijski zid simbioznih sojeva *Nostoc* (46.82nm). Kod diazotrofnog soja *Anabaena* A.314 ćelijski zid CW (53.43nm) je znatno deblji nego CW simbionta *A.azollae* (42.86nm).

Na snimcima elektronskog mikroskopa uočili smo heterociste kod šest od osam sojeva. Heterociste nisu uočene kod simbioznog soja N.8001 i diazotrofnog soja A.314.

**Heterocistni glikolipidni sloj (HGL)** je uočen kod svih heterocisti. Debljina HGL sloja kod sojeva *Nostoc* kretala se između 112nm kod diazotrofnog soja N.302 do 132nm kod soja N.312. Debljina HGL sloja je bila znatno veća kod simbioznog soja *A.azollae* i iznosila je 263nm. Debljina HGL sloja bila je znatno veća na mestu spoja HC sa vegetativnom ćelijom. Debljina HGL sloja kod spoja sa VĆ je bila veća kod diazotrofnih sojeva nego kod simbioznih sojeva *Nostoc-a*.

**Heterocistni polisaharidni sloj (HEP)** je takođe uočen kod šest sojeva i nalazio se na spoljnoj strani heterocisti. Debljina HEP sloja je kod sojeva *Nostoc* varirala od 116nm kod diazotrofnog soja N.311 do 311nm kod simbioznog soja N.7901. Debljina ovog sloja je bila veća od HGL sloja. Kod soja *A. azollae* HEP sloj je varirao od 190 do 777nm. HEP sloj je na mestu spoja HC sa VĆ bio znatno deblji nego na ostalim delovima ćelije i kretao se od 297nm kod diazotrofnog soja N.311, pa do 708nm kod simbioznog soja N.7901.

Kod svih heterocista je zapaženo prisustvo lipidnih telašaca LD. Broj lipidnih telašaca je bio najmanji po preseku i kretao se od 0-5 kod soja N.7901, pa do 11-17 kod soja N.302. U proseku LD su bila zastupljenija kod diazotrofnih sojeva *Nostoc-a* nego kod simbioznih. Kod *Anabaena* soja *A.azollae* je zabeležen najveći broj lipidnih telašaca, kretao se od 11-23.

Najmanja lipidna telašca u heterocistama su zabeležena kod soja N.9229, u prečniku su iznosila do 67nm. Najveće lipidno telašce je zabeleženo kod soja N.7901, 242nm. U heterocistama kod soja *A.azollae* lipidna telašca su bila dimenzija od 64 do 112nm.

Koristeći tehniku bojenja ćelija sa **RR i ultratankih preseka** uočili smo fimbrije na pojedinim vegetativnim ćelijama kod pet od osam ispitivanih sojeva cijanobakterija. Zastupljenost fimbrija je uočena kod dva diazotrofna soja *Nostoc*: N.302 i N.311, i kod jednog simbioznog soja *Nostoc* N.9229. Kod oba soja *Anabena* je uočeno prisustvo fimbrija.

Tipične fimbrije, pili, cevaste strukture su definisane kod tri soja: diazotrofnog N.302, i simbioznih N.7901 i N.9229. Nismo utvrdili da li je igličasta struktura šuplja ili ne, a zajedničko za tipične pile je da su relativno retke. Kod sojeva N.302 i N.7901 su pronađene kod svega par vegetativnih ćelija u desetak primeraka. Soj N.9229 je bio bogatiji sa fimbrijama i one su posebno dominirale u pazušnom delu dve vegetativne ćelije, odnosno mestu spoja dve ćelije. Na centralnom delu vegetativnih ćelija fimbrije su bile znatno ređe.

Fimbrije igličaste, tipične strukture, su bile karakteristične debljine: 6.68 - 7.8nm kod soja N.7901, 7.1 - 8.34nm kod N.302 i 9.5 - 10.7nm kod N.9229. Dužina tipičnih fimbrija kod ova tri soja je varirala od najkraćih kod N.7901 (671-685nm), preko fimbrija kod soja N.9229 (1392 - 1488nm), do diazotrofnog soja N.302, čije su fimbrije bile duge od 922 do čak 2571nm.

Kod sojeva *Anabena*, A.314 i *A.azollae*, kao i kod soja *Nostoc* N.311, negativnim bojenjem NS PTA uočili smo veoma izraženi, atipični "fibrilarni" sluzni omotač. Ovaj veoma moćan i izražen omotač je kod soja A.314 dužine od 3550 do 3858nm, dok je kod soja *A.azollae* još moćniji dužine od 3690 do 6206nm. Atipični sluzni omotač soja N.311 je nešto skromniji i kreće se između 2680 do 2944nm. Atipične fimbrije nisu jasno definisane strukture, nisu jasno ograničenih ivica i njihova širina se kretala od 18.5 - 23.15nm kod A.314, 18.7 - 28.06nm kod N.311, do 18.43 - 46.2nm kod simbioznog soja *A.azollae*.

Kod sojeva A.314 i *A.azollae* i *Nostoc* N.311, sa zrakastim atipičnim sluznim omotačima uočili smo postojanje svojevrsnih "kuglica" u omotaču. Prisustvo "kuglica" u omotaču je posebno izraženo kod soja *A. azollae*, dimenzija od 514 - 553nm. Sem "kuglica" prisutna su i zrnca dimenzija 51-90nm. Kuglice u omotaču soja A.314 su dimenzija od 333-500nm, a zrnca 55-97nm, a kod *Nostoc* N.311 kugličaste strukture su manje zastupljene, dimenzija su 277-366nm, a zrnca 83-129nm.

Kada uporedimo zastupljenost fimbrija - pila kod ispitivanih sojeva cijanobakterija koje smo dobili sa dve tehnike bojenja na TEM-u uvidećemo da se dobijeni rezultati delimično razlikuju. Bojenjem sa RR i posmatranjem ultratankih preseka utvrdili smo prisustvo **omotača od fimbrija** kod tri soja (A.314, *A.azollae* i N.302) i **tipične fimbrije** kod dva soja (N.311 i N.9229). Metodom negativnog bojenja NS PTA uočili smo takođe **tipične fimbrije**, igličastog-dlakastog izgleda, jasnih granica niti kod tri soja (N.302, N.7901 i N.9229), međutim uočili smo i **atipične sluzne fimbrije**, koje nemaju jasno izražene granice, ali su veoma moćno raširene oko vegetativnih ćelija, kod tri soja (A.314, *A.azollae*, N.311). Sluzne niti - fimbrije, smo u mnogo skromnijoj meri, detektovali i kod soja N.302.

Dimenzije fimbrija, bilo omotača od fimbrija ili tipičnih fimbrija, utvrđenih metodom bojenja RR su manjih dimenzija, i dužine i širine, nego fimbrija ispitivanih metodom NS PTA. Fimbrije merene RR metodom su dužine od 129 do 445nm, dok su višestruko duže kod NS

PTA metode, od 671 - 6206nm. Širina fimbrija kod RR metoda se kreće od 4.62-11.14nm, dok se kod metoda NS PTA kreće od 6.68 do 46.2nm.

Metod bojenja ćelija RR i ultratankih preseka mikrotomom se pokazao dosta agresivnim metodom za ispitivanje površinskih struktura na vegetativnim ćelijama cijanobakterija. Vrlo često smo nalazili ogoljene, oljuštene, ćelijske zidove vegetativnih ćelija i slojeve fimbrija slobodne u prostoru daleko od ćelija. Naša zapažanja se odnose na one retke delove preparata gde nije došlo do odvajanja površinskih struktura.

Čini se da je metod NS PTA manje agresivan i da registruje strukture na površini ćelije netaknute, ne ruinirane. Međutim, ovaj metod ne daje mogućnost povezivanja zavisnosti spoljašnjih i unutrašnjih struktura u vegetativnoj ćeliji.

Naša istraživanja su pokazala da postoje različite vrste fimbrija i pila na površini vegetativnih ćelija cijanobakterija, pre svega tipične, igličaste fimbrije i sluzne atipične fimbrije.

Određene cijanobakterije u našem slučaju *Anabena* sojevi A.314 i *A.azollae*, kao i *Nostoc* N.311 grade omotač sličan **F1 kapsuli**. Dosadašnje iskustvo u gajenju sojeva cijanobakterija u čistoj kulturi nam govori da sojevi *Anabena* često izlučuju veće količine sluzi, ekstracelularnih polisaharida u tečni medijum što sada možemo povezati sa fimbrijama druge klase i F1 kapsulom.

Poredeći rezultate zastupljenosti fimbrija - pila kod simbioznih i diazotrofnih sojeva možemo zaključiti da se pile javljaju kod tri simbiozna (N.7901, N.9229 i *A.azollae*) i kod tri diazotrofna soja (N.302, N.31 i A.314). Pile se ne javljaju kod jednog simbioznog soja N.8001 i jednog diazotrofnog soja N.312.

Kod simbiotskih-infektivnih sojeva N.7901 i N.9229 javljaju se samo tipične fimbrije iz prve klase, a da se kod diazotofnih sojeva i simbiotskog- neinfektivnog soja *A.azollae* javljaju atipične-sluzne fimbrije iz druge klase, mada su kod soja N.311 uočene i tipične pile.

Kod trideset osam ispitivanih sojeva (38) je utvrđeno prisustvo STRR konzervativnih sekvenci genoma i amplifikovani su informativni STRR-PCR profili, a samo kod jednog soja

*Anabaena sphaerica f. conoidea* A.51, koji je izolovan iz zemljišta ritska crnica – Bečej, nije utvrđeno njihovo prisustvo.

Rezultati pokazuju da ispitivani sojevi cijanobakterija poseduju visok stepen raznoličnosti, kako sojeva izolovanih iz zemljišta Vojvodine, tako i referentnih simbioznih i diazotrofskih sojeva koji su služili za poređenje. Rezultati dobijeni STRR-PCR karakterizacijom sojeva cijanobakterija ukazuju da se svi sojevi mogu podeliti u tri grupe, klastera koji su međusobno različiti 100%.

Prvi klaster je najveći i obuhvata 24 soja. Ovaj klaster se deli na dva subklastera, od kojih prvi subklaster Ia obuhvata 12 sojeva (8 sojeva iz roda *Nostoc*, 2 soja iz roda *Calothrix*, i jedan iz rodova *Phormidium* i *Fisherela*). Drugi subklaster Ib obuhvata takođe 12 sojeva od čega 6 sojeva pripada rodu *Anabaena* (A.313, A.7120, A.314, A.316, *A.azollae*, *A.cylindrica*), 5 sojeva pripadaju rodu *Nostoc* (N.311, N.308, N.306, N.64 i N.305) i 1 soj *Phormidium sp.* Subklaster Ia i subklaster Ib pokazuju različitost od 90%.

Sva tri simbiozna, infektivna, soja *Nostoc* se nalaze u klasteru I: N.7901 (izlovan iz biljke *G.dentata*), N.9229 (izolovan iz *G.monoica*) i N. 8001 (izolovan iz *G.dentata*). Svaki simbiozni soj *Nostoc* ima genetske sličnosti sa po jednim diazotrofnim sojem *Nostoc* izolovanim iz zemljišta Vojvodine. Soj N.7901 pokazuje sličnost od 50 % sa sojem N.301 koji potiče iz solonjeca. Soj N. 9229 pokazuje sličnost od oko 50% sa sojem N.310 koji takođe potiče iz solonjeca, dok *Nostoc* 8001 pokazuje sličnost od oko 40% sa sojem N.58 izolovanim iz zemljišta solončaka.

Diazotrofni sojevi *Nostoc* koji pripadaju subklasteru Ia imaju izražen aserijalni stadijum, koji je tipičan za rod *Nostoc*.

U subklasteru Ia se našao i soj *Fisherela* 7521, koji potiče iz vrelih izvora NP Jelouston, SAD. Ovaj soj se razlikuje 75% od većine sojeva u subklasteru Ia, a od sojeva N.8001 i N.58 se razlikuje 80%.

U klasteru Ia se nalaze i sojevi *Calothrix* 7103 i *Calothrix* 7504 koji su veoma velike sličnosti od 90%. U istoj grani sa sojevima *Calothrix* nalaze se i sojevi *Phormidium* 25 i *Nostoc* 312 koji pokazuju međusobnu sličnost od 70%.

Subklaster Ib se deli na dve grane. Manja sadrži simbiozni soj *Anabaena azollae*, *A.cylindrica* i *Phormidium sp.* i pokazuje 15% sličnosti sa ostalim sojevima u subklasteru Ib. Soj *Anabaena azollae* i *A.cylindrica* su pokazale međusobnu sličnost od 40%.

Sojevi *Anabaena*: A.313, A.7120, A314 i A.316 čine posebnu podgrupu sojeva koji pokazuju međusobnu sličnost od 55%. Ovi diazotrofni sojevi, sem A.7120, su izolovani iz zemljišta černoze, imaju 5 ili 6 traka sa STRR fragmentima, a dominantna traka u STRR-PCR profilu poseduje oko 502 bp. Značajnu sličnost od 85% su pokazali sojevi A.313 i A.7120 (CNCM).

Sojevi *Nostoc* koji su pokazali sličnost od 40% sa *Anabenama* su: N.305 i N.306 (iz ritske crnice) i N.64 (iz solonjeca). Oba soja *Nostoc*-a koji potiču iz ritske crnice, N.305 i N.306, ne poseduju tipični aserijalni stadijum, već pseudo aserijani stadijum, i stoga su netipični predstavnici ovog roda. Sojevi netipičnih *Nostoc* se prema svom razvojnem ciklusu i morfološkim karakteristikama nalaze negde između tipičnih predstavnika roda *Nostoc* i *Anabaena*, što je genetička karakterizacija PCR sa STRR fragmentima i pokazala.

Klaster II obuhvata sedam sojeva među kojima dominiraju sojevi *Cylindrospermum*. Klaster II ima subklaster: IIa gde spadaju 4 soja *Cylindrospermum* (Cyl.105a, Cyl.105b, Cyl.108 i Cyl.309) i *Nostoc* 21 i IIb sa dva soja *Nostoc* 317 i *Calothrix* 107a. Ovi subklasteri pokazuju sličnost od 30%.

Svi sojevi u subklasteru IIa pokazuju sličnost od 35%, a najveću sličnost od 80% pokazuju sojevi Cyl.105a i Cyl.108. Svi sojevi u ovoj podgrupi pokazuju izrazito nizak procenat zastupljenosti heterocista u odnosu na sve ispitivane sojeve u I i III klasteru. U subklasteru IIb sojevi *Nostoc* 317 i *Calothrix* 107a pokazuju sličnost od 60%. *Nostoc* 317 spada u netipične nostoke i odlikuje se atipičnim aserijalnim stadijumom. Ova dva soja imaju znatno veći procenat heterocista, *Nostoc* 317 (6,50%) i *Calothrix* 107a (6,19%), u odnosu na sojeve u podgrupi IIa.

Klaster III obuhvata 7 sojeva od čega 6 pripadaju rodu *Nostoc*, a jedan rodu *Rivularia*. Deli se u dva subklastera IIIa i IIIb. Sojevi koji čine IIIa, *Nostoc* 303 i *Nostoc* 304, pokazuju sličnost od 55%. Oni se odlikuju velikim brojem traka u STRR profilima -12 (N.303) i 11



(N.304), kao i visokim procentom heterocista, 12,40% i 8,36%. IIIb subklaster se razlikuje 90% od prethodnog, a soj *Rivularia* oko 75% od 4 soja *Nostoc*, koji pripadaju istom subklasteru i pokazuju od 50-60% sličnosti.

Primena STRR-PCR metode u ovim istraživanjima pokazala je visok stepen diverziteta među ispitivanim sojevima cijanobakterija poreklom iz zemljišta Vojvodine, a naročito u okviru roda *Nostoc*.

Detaljno poznavanje svojstava izolovanih azotofiksirajućih cijanobakterija moglo bi doprineti njihovoj budućoj primeni kako u proizvodnji ratarskih i povrtarskih kultura, tako i u biotehnološkoj proizvodnji.

## 8. LITERATURA

1. A n d r e i a k, E.I., K o p t e v a, A.P., Z a n i n a, V.V.(1990): Cianobacterii, Kijev naukova dumka, Kijev, 70-76.
2. B a l d w i n, N.A., W h i t t o n, B.A. (1992): Cyanobacteria and eukaryotic algae in sports turf and amenity grasslands: a reiew. *Journal of Applied phycology* 4, 39-47.
3. B e l i ć, M. (1999) Uticaj meliorativnih mera na adsorptivni kompleks solonjeca. Novi Sad: Poljoprivredni fakultet, doktorska disertacija.
4. B e l i ć, M., Pejić, B., Hadžić, V., Nešić, Lj., Bošnjak, Đ., Sekulić, P., Maksimović, L., Vasin, J.& Dozet, D., (2003.) Influence of irigation on the properties of the chernozem soil. *Field and Vegetable Crops Research*, 38, 21-36.
5. B e l i c, M., Nešic, Lj., Dimitrijevic, M., Petrovic, S., Ciric, V., Pekec, S., Vasin, J. (2012): Impact of reclamation practices on the content and qualitative composition of exchangeable base cations of the solonetz soil. *AJCS* 6(10):1471-1480.
6. B e l i ć, M., Manojlović, M., Nešić, Lj., Ćirić, V., Vasin, J., Benka, P., Šeremešić, S. (2013): Pedo-ecological significance of soil organic carbon stock in south-eastern pannonian basin. *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*, Vol. 8. No. 1, 171 – 178.
7. B e n e t, A., B o g o r a d, L. (1971): Properties of Subunits and Agregates of Blue-Green Algal Biliproteins. *Biochemistry* Vol.10, No. 19.
8. B e r g m a n, B., R a i, A.N., J o h a n s s o n, C., S o d e r b a c k, E. (1992a): Cyanobacterial-Plant Symbioses. *Symbiosis*, 14: 61 81.
9. B e r g m a n, B., J o h a n s s o n C., S o d e r b a c k E. (1992b): Tansley Review No. 42. The Nostoc-Gunnera Symbiosis. *New Phytol*, 122: 379-400.
10. B e r n e r, Tamar (1993): Ultrastructure of microalgae. CRC Press.
11. B l a ž e n č i ć, J. (1988): Sistematika algi. Naučna knjiga, Beograd,
12. B l a ž e n č i ć, J., C v i j a n, M. (1988): Građa za floru algi SR Srbije. Glasnik Instituta za Botaniku i Botaničke Bašte Univerziteta u Beogradu, Tom XXII, 154-193.
13. B l o m f i e l d, I.C. (2001): The regulation of pap and type 1 fimbriation in *Escherichia coli*. *Adv Microb Physiol.* ;45:1–49.

14. B r u i j n, F.J. (1992): Use of Repetitive ( Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction To Fingerprint the Genomus of Rhizobium meliloti Isolates and Other Soil Bacteria. Appl. Environ. Microbiol., Vol.58, No. 7, 2180-2187.
15. B u k u r o v, B. (1953): Geomorfološke crte južne Bačke. Zbornik radova Geografskog instituta SANU «Jovan Cvijić», 4: 1-63.
16. B u k u r o v, B. (1975): Fizičkogeografski problemi Bačke. Posebna izdanja SANU, knj. CDLXXXI, Odeljenje za prirodno-matematičkih nauka, knj. 43, Beograd.
17. C a m p b e ll, J., Stevens,S.E., Bulkwill, D.L. (1982): Accumulation of PHB in *Spirulina platensis*. J. Bacteriol. 149: 361-363.
18. C a r r, N.G., W h i t t o n, B.A. ( 1973): The biology of blue-green algae, University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California, 162-165.
19. C a r r, N.G., W h i t t o n, B.A. ( 1982): The biology of Cyanobacteria. Oxford Blackwell Sci., Oxford.
20. C h e n, T.H., Elberg SS. (1977): Scanning electron microscopic study of virulent *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* type 1. Infect Immun.;15:972–977.
21. C o u t i n h o, H. L. ., B A. Handley, H. E.Kay, L. Stevenson and J. E. Beringer (1993): The effect of colony age on PCR fingerprinting. Lett. Appl. Microbiol. 17 (282–284).
22. C v i j a n, M., Blaženčić,J. (1996): Cyanophyta. Beograd: Naučna knjiga, Tom 1.: Flora algi Srbije.
23. D o d d s, W.K., G u d d e r, D.A. ( 1995): The ecology of Nostoc. J. Phycol., 31,2-18.
24. C o u t i n h o, H.L., H a n d l e y, H.E., K a y, L. S t e v e n s o n, L., B e r i n g e r, J.L. (1993): The effect of colony age on PCR fingerprinting. Letters in Applied Microbiology, 17, 282-284.
25. D a m e r v a l, T., Guglielmi,G., Houmard,J. and Tandeau de Marsac, N. (1991): Hormogonium Differentiation in the Cyanobacterium Calothrix: A Photoregulated Developmental Process. The Plant Cell, Vol. 3, 191-201.
26. D i c k, H., Stewart, WDP. (1980): Tbe occurrence of fimbriae on a N.-fixing cyanobacterium which occurs in lichen symbiosis. Archives of Microbiology 124: 107-109.
27. D r a g a n o v, S. (1979): Sinozeleni vodorasli v počvite na severno blagarskata lesnostepna zona. Sofijski Universitet “ Klement Ohridski” Biologičeski Fakultet. Sofia.
28. Du, Y., Rosqvist, R., Forsberg, A. (2002): Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. Infect Immun. 70:1453–1460.

29. D u g g a n, P.S., Gotardello, P., Adams, D.G. (2007): Molecular analysis of genes in *Nostoc punctiforme* involved in pilus biogenesis and plant infection. *Journal of Bacteriology* 189, 4547–4551.
30. D u o n g, T.P., Tiedje, J.M. (1985): Nitrogen fixation by naturally occurring duckweed-cyanobacterial associations. *Can. J. Microbiol.*, Vol. 31, 327330.
31. D j u r i c, S., Protulipac V., Simeunovic J., Svircev Z., Miladinovic M., Jošić D. (2012): Inhibiting activity of *Pseudomonas* soil isolates against toxigenic freshwater cyanobacteria *Nostoc sp.*"International Symposium on Current Trends in Plant Protection", 25<sup>th</sup> – 28<sup>th</sup> September, 2012, Belgrade, Serbia.
32. E l e n k i n , A. ( 1938): Sinezelenie vodorasli SSSR, VIP I.- Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR, Moskva-Leningrad.
33. E l e n k i n ,A. ( 1949): Sinezelenie vodorasli SSSR, VIP II.-IBID.
34. F a l c h i n i, L., Sparvoli, E., Tomaselli, L. (1996): Effect of *Nostoc* (cyanobacteria) inoculation on the structure and stability of clay soils. *Biol. Fertil. Soils*, 23, 346–352.
35. F l o r e s, E., Wolk, C.P. (1986) Production, by filamentous, nitrogen-fixing cyanobacteria, of a bacteriocin and of other antibiotics that kill related strains. *Archives of Microbiology*, Volume 145, Issue 3, pp 215-219
36. F o g g, G. E., Stewart, W. D. P., Fay, P. & Walsby, A. E. (1973). *The Blue-Green Algae*. Academic Press, London .
37. F o j k a r, O. (2000): Zastupljenost azotofiksirajućih cijanobakterija i drugih grupa mikroorganizama u zemljištima Vojvodine. Magistarska teza, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
38. G a j i ć, M. (1986): Flora i vegetacija Subotičko-horgoške pešcare. Šumarski fakultet, Beograd, Šumsko gazdinstvo Subotica.
39. G a n t a r, M., K e r b y, N.W., R o w e l l, P., O b r e h t, Z. (1991a): Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N<sub>2</sub>-fixing Cyanobacteria: I . A survey of soil cyanobacterial isolates forming associations with roots. *New Phytol.* 118: 477-483.
40. G a n t a r, M., K e r b y, N.W., R o w e l l, P. ( 1991b): Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N<sub>2</sub>-fixing Cyanobacteria: II . An ultrastructural study. *New Phytol.* 118: 485 492.
41. G a n t a r, M., O b r e h t, Z., F o j k a r, O. (1991c): Occurrence and characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in different temperate soils. *Mikrobiologija*, Vol.28 No. 1, 33-44.
42. G a n t a r, M., Obreht, Z., Gajin, S., Petrović, O. (1992): Mogućnost primene mikroalgi u biotehnologiji. *Zbornik Matice srpske, serija za prirodne nauke* 93: 97-118.

43. G h o s h, T.K., S a h a, K.C. (1988): Influence of Carbofuran on the growth and nitrogen accretion by blue-green algae (Cyanobacteria). Indian Agric., Vol 32, No.3, 153-161.
44. G h o s h, T.K., S a h a, K.C. (1993): effects of inoculation with N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria on the nitrogenase activity in soil and rhizosphere of wetland rice ( *Oryza sativa* L.). Biol. Fertil Soils, 16: 16-20.
45. G l a z e r, A.N., S t r y e r, L. (1984): Phycofluor probes. Trends. Biochim. Sci.9:423.
46. G o l l e r b a h, M.M., Kosinskar, E.K., Polrnskii, V.I. (1953): Sinezelenie vodorosli. Gosudarstvennoe izdateljstvo "Sovjetskar Nauka", Moskva.
47. G o l l e r b a h, M.M., Ština E.A. (1969): Počvenne vodorosli. Izdatelstvo "Nauka", Leningradkoe otdelenie, Leningrad.
48. G o v e d a r i c a, M. (1990): Specifičan odnos sojeva *Azospirillum lipoferum* i nekih hibrida kukuruza. Zemljište i biljka, Vol. 39 No.2, 117-124.
49. G o v e d a r i c a, M. (1990): Specifičan odnos sojeva *Beijerinckia derox* i nekih hibrida kukuruza. Zemljište i biljka, Vol. 39 No.2, 125-132.
50. G o v e d a r i c a, M. (1991): A specific relationship between *Azotobacter chroococcum* strains and some corn hybrids. Mikrobiologija, Vol. 28, No. 1, 45-55.
51. G o v e d a r i c a, M., J a r a k, M., M i l o š e v i ć, N., V o j v o d i ć-V u k o v i ć, M., M o l n a r, I., M i l o š e v, D. (1991): Effect of saturation mud and mineral fertilizer on microbiological processes in hydromorphic black soil. Zemljište i biljka, Vol. 40, No. 3, 159-164.
52. G o v e d a r i c a, M., J a r a k, M., M i l o š e v i ć, N., V o j v o d i ć-V u k o v i ć, M., M o l n a r, I., M i l o š e v, D. (1991): Effect of worm casting and mineral fertilizer on microbiological processes in chernozem. Mikrobiologija, Vol. 28, No.2, 153-160.
53. G o v e d a r i c a, M. (1991): The occurrence and effect of the genus *Beijerinckia* in some maize hybrids. Agronomski glasnik 1- 2, 69-78.
54. G o v e d a r i c a, M. (1992): *Azotobacter* frequency and its effect on some maize hybrids. Mikrobiologija, Vol. 29, No. 2, 129-138.
55. G o v e d a r i c a, M., M i l o š e v i ć, N., J a r a k, M. (1991): Specific association between *Derxia gumosa* strains and some maize hybrids. Zemljište i biljka, Vol. 41, No. 3, 207-212.
56. G o v e d a r i c a, M. (1992): Effectiveness of *Azospirillum* in some maize hybrids. Zemljište i biljka, Vol. 41, No. 3, 201-205.
57. G o v e d a r i c a, M., M r k o v a č k i, N. (1993): Effect of different herbicides on the frequency of microorganisms, number of nodules and soybean yield. Zemljište i biljka, Vol. 42, No.1, 79-86.

58. G o v e d a r i c a, M., J a r a k, M., M i l o š e v i ć, N., V o j v o d i ć-V u k o v i ć, M., M o l n a r, I., M i l o š e v, D.(1993): Effect of saturation mud on the changes of microbiological properties of hydromorphic black soil. *Zemljište i biljka*, Vol. 42, No. 1, 87-91.
59. G o v e d a r i c a, M., J a r a k, M., M i l o š e v i ć, N., V o j v o d i ć-V u k o v i ć, M., H a d ž i ć, V., B e l i ć, M., N e š i ć, Lj. (1993): Microbiological activity of soil in an alcohol distillery dump. *Zemljište i biljka*, Vol. 42, No. 1. 35-39.
60. G o v e d a r i c a, M., J a r a k, (1995): Opšta mikrobiologija. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet. 198-200.
61. G o v i n d a, S., G o p a l a s w a m y, G. (2008): PCR based fingerprinting of *Westiellopsis* cultures with short tandemly repeated repetitive (STRR) and highly iterated palindrome (HIP) sequences. *Biologia* 63/3: 283—288, 2008
62. G r a n h a l l, U. (1975): Nitrogen fixing by blue-green algae in temperate soils. *International Biological Programme*. Vol 6: 189-197.
63. G u s e v, M.V., N i k i t i n a, K.A. (1979): *Cianobakterii- fiziologir i metabolizm*, Izdateljstvo "Nauka", Moskva, 57-76.
64. H a b i j a n M i k e š, V. (1998): Zavod za zaštitu prirode Srbije, Studija Predlog za zaštitu prirodnog dobra "Deliblatska peščara" kao specijalnog rezervata prirode.
65. H a d ž i ć, V., Dragović, S., Sekulić, P., Vasin, J., Belić, M., Nešić, Lj. (1997): Vodič kongresne ekurzije. IX Kongres JDPZ, str.3-7, Novi Sad.
66. H a y a t, M.A. (1989): Principles and techniques of electron microscopy. Third edition, The Mac Millan Press LTD. ISBN 0-333-45294-1, str.285-286.
67. H a l v e r s o n, L.J., Stacey, G. (1986): Signal exchange in plantmicrobe interactions. *Microbiological Reviews* 50, 193-225.
68. H a s e l k o r n, R., Buikema W J. (1992): Nitrogen fixation in cyanobacteria. In: Stacey G, Burris R H, Evans H E, editors. *Biological nitrogen fixation*. New York, N.Y: Chapman and Hall; pp. 166–190.
69. H e r d m a n, M., and Rippka, R. (1 988). Cellular differentiation: Hormogonia and baeocytes. *Methods Enzymol.* 167,232-242.
70. H e r r e r o, A.; F l o r e s, E. (2014): *Cell Biology of Cyanobacteria*. Norfolk, UK : Caister Academic Press.
71. H u l t o n, C. S. J., Higgins, C. F. and Sharp, P. M. (1991), ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*, 5: 825–834.



72. H u n g, D.L., Knight, S.D., Woods, R.M., Pinkner, J.S., Hultgren, S.J. (1996): Molecular basis of two subfamilies of immunoglobulin-like chaperones. *EMBO J.* 15:3792–3805.
73. I w a n a g a, M., and A. Hokama. 1992. Characterization of *Aeromonas sobria* TAP 13 pili: a possible new colonization factor. *J. Gen. Microbiol.* 138:1913– 1919. 17.
74. J a c k m a n, D.M., M u l l i g a n, M.E. (1995): Characterization of a nitrogen-fixation (*nif*) gene cluster from *Anabaena azollae* 1a shows that closely related cyanobacteria have highly variable but structured intergenic regions. *Microbiology*, 141, 2235-2244.
75. J a m e s, T.W., Jope, C. (1978): Visualisation of fluorescence of chloroplast DNA in higher plants by means of the DNA-specific probe 4'6-diamidino-2-phenylindole. *J Cell Biol* 79:623–630.
76. J a r a k, M. (1988): Istraživanje važnijih svojstava nekih sojeva *Rhizobium leguminosarum*. Doktorska disertacija, FPZ, Zagreb, 1988.
77. J a r a k, M. (2013): Mikrobiologija - za studente biljne proizvodnje. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
78. J a r r e l l, K., McBride, M. (2008) The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nature Reviews Microbiology* 6: 466–476.
79. JDPZ (1966.): Priručnik za ispitivanje zemljišta, knjiga I, Hemijske metode ispitivanja zemljišta, Beograd.
80. J o h a n s s o n, C., B e r g m a n, B. (1994): Reconstitution of the symbiosis of *Gunnera manicata* Linden: cyanobacterial specificity. *New Phytol*, 126: 643-652.
81. J o n e s, C.H., Pinkner, J.S., Roth, R., Heuser, J., Nicholoes, A.V., Abraham, S.N., Hultgren, S.J. (1995): FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the *Enterobacteriaceae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*;92:2081–2085.
82. K a u s h i k, B.D., K r i s h n a m u r t u, G.S.R., V e n k a t a r a m a n, G.S. (1981): Influence of blue-green algae on saline-alkaline soils. *Sci. Cult.* 47,169.
83. K a u s h i k, B.D., S u b h a s h i n i, D. (1985a): Amelioration of Salt-affected Soils with Blue-green Algae.II. Improvement in Soil Properties. *Proc. Indian natn. Sci. Acad.* B51 (3) pp 386-389.
84. K a u s h i k, B.D., J a i n, B.L. (1985b): Response of sorghum to algalization in saline-alkali soils. *Bull. Soc. Sagar*, 32: 193-196.
85. K e r b y, N.W., R o w e l l, P., S t e w a r t, W.D. P. ( 1985): Ethylenediamine uptake and metabolism in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Arch Microbiol*, 141, 244-248.

86. Kerby, N.W., Musgrave, S.C., Rowell, P., Shestakov, S.V., Stewart, W.D.P. (1986): Photoproduction of ammonium by immobilized mutant strains of *Anabaena variabilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 24, 42-46.
87. Kerby, N.W., Rowell, P., Stewart, W.D. P. (1987): Cyanobacterial ammonium transport, ammonium assimilation, and nitrogenase regulation. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, Vol. 21: 447-455.
88. Kerby, N.W., Niven, G.W., Rowell, P., Stewart, W.D. P. (1988): Ammonia and amino acid production by cyanobacteria. *Algal Biotechnology* 1: 277-286.
89. Khai, C., Yakunin, A.F., Gogotov, I.N. (1988): Influence of different forms of bound nitrogen of growth and nitrogenase activity of Cyanobacteria isolated from Vietnamese rice paddy soil. *Mikrobiologiya*, Vol. 57, No. 6, 972-976.
90. Komarek, J., Anagnostidis, K. (1989): Modern approach to the classification system of cyanophytes 4-Nostocales. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 82 (3): 247-345.
91. Korhonen, T. K., Tarkka, E., Ranta, H. & Haahtela, K. (1983). Type-3 fimbriae of *Klebsiella* sp. : Molecular characterization and role in bacterial adhesion to plant roots. *Journal of Bacteriology* 155.
92. Krasilnikov, N.A. (1958): Mikroorganizmi počvi i višije rastenija. Moskva.
93. Kuehn, M.J., Heuser J, Normark S, Hultgren SJ. (1992): Pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature*;356:252–255.
94. Kumar, A., Tabita, F. R., Van Baalen, C. (1982): Isolation and Characterization of Heterocysts from *Anabaena* sp Strain CA. *Arch. Microbiol.*,133: 103-109.
95. Kumar, A., Tabita, F. R., Van Baalen, C. (1983): High Endogenous Nitrogenase Activity in Isolated Heterocysts of *Anabaena* sp. strain CA After Nitrogen Starvation. *Journal of Bacteriology*, Vol. 155, No. 2, 493-497.
96. Lang, N. J. & Fay, P. (1971). The heterocysts of bluegreen algae. II. Details of ultrastructure. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 178: 193-203.
97. Lambert, G. R., Carr, N.G. (1982): Rapid Small-Scale Plasmid Isolation by Several Methods from Filamentous Cyanobacteria. *Arch. Microbiol.*, 133: 122-125.
98. Latorre, C., Lee, J.H., Spiller, H., Shanmugam, K.T. (1986): Ammonium ion- excreting cyanobacterial mutant as a source of nitrogen for growth of rice: a feasibility study. *Biotechnology Letters* , Vol. 8 No. 7, 507-512.
99. Li, Q., Ng, T.W., Dodson, K.W., (2010): The differential affinity of the usher for chaperone-subunit complexes is required for assembly of complete pili. *Mol Microbiol.*;76:159–172.

100. Liu, F., Chen, H., Galvan, E.M., Lasaro, M.A., Schifferli, D.M. (2006): Effects of Psa and F1 on the adhesive and invasive interactions of *Yersinia pestis* with human respiratory tract epithelial cells. *Infect Immun.* 74:5636–5644.
101. Lindblad, P., Bergman, B. (1990): The cycad-cyanobacterial symbiosis. In: Rai AN, ed. *Handbook of symbiotic cyanobacteria*. Boca Raton; CRC Press, 137-159.
102. Lenhard, G. (1956): Die Dehydrogenase aktivitat des Bodens als Mass fur die Microorganismen tatigheit im Boden. *Z. Pflanz. Dung. Bod.*, 73, 1-11.
103. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T., Bruijn, F.J. (1994): Specific Genomic Fingerprints of Phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* Pathovars and Strains Generated with Repetitive Sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.60, No7, 2286-2295.
104. Lowery, O.H., Roserbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
105. Lupski, J.R., Weinstock, G.M. (1992): Short, Interspersed Repetitive DNA Sequences in Prokaryotic Genomes. *J. Bacteriol.* Vol. 174, No. 14, 4525-4529.
106. Lutge, U., Budel, B., Ball, E., Strube, F., Weber, P. (1995): Photosynthesis of terrestrial Cyanobacteria under light and desiccation stress as expressed by chlorophyll fluorescence and gas exchange. *Journal of Experimental botany*, Vol. 46, No. 284, 309-319.
107. Mackinney, G. (1941): Absorption of light by chlorophyll solutions, *J. Biol. Chem.* 140: 315-322.
108. Mangum-Shields, L., Durrel, L.W. (1964): *Algae in relation to soil fertility*. Bronx, N.Y. New York Botanical Garden.
109. Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, D. A., Boulnois, G. J., Claverys, J.P. (1992): A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 20:3479–3483.
110. Masepohl, B., Gorlitz, K., and Bohme, H. (1996): Long tandemly repeated repetitive (LTRR) sequences in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochim Biophys Acta* 1307: 26–30.
111. Mazel, D., Houmard, J., Castets, A.M., Tandeau de Marsac, N., (1990): Highly repetitive DNA sequences in cyanobacterial genomes. *J. Bacteriol.*;172:2755–2761.
112. Maurilio, E.M., Mouhamar, F., Nan, B., Ducret, A., Dai, D., Zusman, D.R., Mignot, T. (2010) Bacterial motility complexes require the actin-like protein, MreB and the Ras homologue, MglA. *EMBO J* 29: 315–326.
113. Meeks, J.C., Steinberg, N.A., Enderlin, C., Joseph, C., Peters, G. (1987): *Azolla - Anabaena Relationship*. *Plant Physiol*, 84: 883-886.

114. M c C a r t y, G.W., B r e m n e r, J.M. (1992): Regulation of assimilatory nitrate reductase activity in soil by microbial assimilation of ammonium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 89, 453-456, Agricultural Sciences.
115. M i l o š e v i ć, N. (1988): Zatupljenost slobodnih diazotrofa u rizosferi šećerne repe. Agronomski Glasnik (2/3), 3-12.
116. M i l j k o v i ć, N. (1971): Zemljišta Šajkaške. str.32-53 IN Bukurov, B. (Ed.) (1971): Šajkaška. Priroda kraja. Vojvođanski muzej - Matica srpska, Novi Sad.
117. M i y a s h i t a Y, Moriya T, Yokosawa N, Hatta S, Arai J, Kusunoki S, Toratani S, Yokosawa H, Fujii N, Asami K. (1996): Light-sensitive response in melanophores of *Xenopus laevis*: II. Rho is involved in light-induced melanin aggregation. J Exp Zool; 276 (2): 125-31.
118. M u r r y, M.A., W o l k, C.P.(1989): Evidence that the barrier to the penetration of oxygen into heterocysts depends upon two layers of the cell envelope. Arch. Microbiol. 151: 469-474.
119. N e l s o n, D.W., Sommers, L.E. (1982): Total carbon, organic carbon, and organic matter. U: Methods of Soil Analysis Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Soil Science Society of America (2nd Ed). American Society of Agronomy: Madison, USA.
120. N e v o, R., Chuartzman, S., Tsabari, O., Reich, Z., Charuvi, D., Shimoni, E. (2009): Architecture of thylakoid membrane networks. In: Wada H, Murata N (eds) Lipids in photosynthesis: essential and regulatory functions. Springer Science and Business Media.
121. N u c c i o, S.P., Bäumlér, A.J.(2007): Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. Microbiol Mol Biol Rev. 2007; 71:551-575.
122. O b r e h t, Z., Gantar, M., Dalmacija, B., Karlović, E., Markićević, R., Đapić, B. (1988): Primena mikroalgi u procesu prečišćavanja tečnog stajnjaka. Zbornik radova Konferencije o aktuelnim problemima zaštite voda "Zaštita 88", 690-700.
123. O r d o g, V. (2000): Impact of microalgae on plant-soil system. 4.th European Workshop Biotechnology of Microalgae. Bergholz-Rehbrücke. Germany. Book of Abstracts 46.
124. P a n j k o v i ć, B., Stanišić, J. (2010): Studija zaštite SRP "Koviljsko - petrovaradinski rit", predlog za stavljenje pod zaštitu, Pokrajinski zavod za zaštitu prirode, Novi Sad.
125. P a v k o v, G. (1999): Studija zaštite SRP "Slano Kopovo", predlog za stavljenje pod zaštitu, Zavod za zaštitu prirode Srbije, Odeljenje u Novom Sadu.
126. P a v i ć e v i ć, N., Stankević, P. (1962): Pedološke osobine Subotičko-horgoške pešcare. Institut za šumarstvo i drvnu industriju NR Srbije - Beograd.

127. P i e n k o s, P.T., B o d m e r, S., T a b i t a , R. (1983): Oxygen Inactivation and recovery of Nitrogenase Activity in Cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, Vol. 153, No. 1, 182-190.
128. P i l, N., Sekulić, N., Galamboš, L. (2010): Studija zaštite SRP "Carska bara", predlog za stavljenje pod zaštitu, Pokrajinski zavod za zaštitu prirode, Novi Sad.
129. P o c h o n, J., A u g i e r, J., de B a r j a c, H., M a r t r e c o p p i e r, o., C h a l y i g n a c, M.A. K a j u d i e, J. (1954): Manuel technique d'analyse microbiologique du sol, Paris.
130. P r o s p e r i, C., B o l u d a, L., L u n a, C., F e r n a n d e z-V a l i e n t e, E. (1992): Environmental factors affecting in vitro nitrogenase activity of cyanobacteria isolated from rice-fields. *Journal of Applied Phycology*, 4, 197-204.
131. R a s m u s s e n, U., J o h a n s s o n, C., B e r g m a n, B. (1994): Early Communication in the Gunnera-Nostoc Symbiosis: Plant-Induced Cell Differentiation and Protein Synthesis in the Cyanobacterium. *MPMI* 7, (6), 696-702.
132. R a s m u s s e n, U., S v e n i n g, M.M. (1998): Fingerprinting of Cyanobacteria Based on PCR with Primers Derived from Short and Long Tandemly Repeated Repetitive Sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*
133. R i c h m o n d, A. (1986): Ed. Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca-Raton, Fl.
134. R i p p k a, R., D e r u e l l e s, J., W a t e r b u r y, J.B., H e r d m a n, M., S t a n i e r, R.Y. (1979): Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, (111): 1-61.
135. R i v e r a-A g u i l a r, V., Montjano, G., Rodriguez-Zaragoza, S., Duran-Diaz, A. (2006): Distribution and composition of cyanobacteria, mosses and lichens of the biological soil crusts of the Tehuacan Valley, Puebla, Mexico. *J. Arid Environ* 67:208-225.
136. R o b i n s o n, W.B., Mealor, A.E., Stevens, S.E.J., and Ospeck, M. (2007): Measuring the force production of the hormogonia of *Mastigocladus laminosus*. *Biophys J* 93: 699–703.
137. R o g e r, P.A., L a d h a, J.K. (1992): Biological N<sub>2</sub> Fixation in wetland rice fields: estimation and contribution to nitrogen balance. *Plant and Soil*, 141, 41-55.
138. R o g e r, P.A. (1995): Biological N<sub>2</sub>-fixation and its management in wetland rice cultivation. *Fertilizer research*, 42, 261-276.
139. R o g e r s, S.L., B u r n s, S.L. (1994): Changes in aggregate stability, nutrient status, indigenous microbial populations and seedling emergence, following inoculation of soil with *Nostoc muscorum*. *Biol Fertil Soils*, 18, 209-215.

140. R o m a n t s c h u k, M. (1992): Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. Annual Review of Phytopathology 30: 225-243.
141. R o m a n t s c h u k, M., Nurmiaho-Lassila, E. L., Roine, E. & Suoniemi, A. (1993). Pilus-mediated adsorption of *Pseudomonas yingae* to the surface of host and non-host plant leaves. J Gen Microbiol 139.
142. R o u s s a r d-J a c q u e m i n, M. (1983): Etude ultrastructurale de la différenciation des hétérocystes chez la cyanobactérie *Anabaena cylindrica* Lemm. Canadian Journal of Microbiology 29(11): 1564-1575.
143. R u n c o, L.M., Myrczek, S., Bliska, J.B., Thanassi, D.G., (2008): Biogenesis of the fraction 1 capsule and analysis of the ultrastructure of *Yersinia pestis*. J Bacteriol. 190:3381–3385.
144. S e b b a n e, F., Jarrett, C., Gardner, D., Long D, Hinnebusch BJ. (2009): The *Yersinia pestis* *cafIMIAI* fimbrial capsule operon promotes transmission by flea bite in a mouse model of bubonic plague. Infect Immun. 77:1222–1229.
145. S h e l e f, G., Soeder, C.J. (1980): Algae Biomass. Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
146. S i e g e l m a n, H.W., K y c i a, J.H. (1978): Algal biliproteins, Phycological Methods, Cambridge University Press.
147. S m i t h, R.L., V a n B a a l e n, C., T a b i t a, F.R. (1987): Alteration of the Fe protein of nitrogenase by Oxygen in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain CA. Journal of Bacteriology, Vol. 169, No. 6, 2537-2542.
148. S t a l, L. J. (1995): Tansley Review No. 84 Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. New Phytol., 131, 1-32.
149. S t a r m a c h, K. (1966): Flora słodkowodna Polski, tom 2.- Polska Akademia Nauk, Warszawa.
150. S t a n i e r, R.J. (1971): The position of cyanobacteria in the world of phototrops. Carlsberg Res. Commun. 42: 77-98.
151. S t e r n, M.J., Ames, N.H., Smith, E.C. Robinson and S.F. Higgins (1984): Repetitive extragenic palindromic sequences: A major component of the bacterial genome. Cell 37: 1015 - 1026.
152. S t e m m e r, W.P.C., Sequeira, L. (1987): Fimbriae of phytopathogenic and symbiotic bacteria. Phytopathology 77: 1633-1639.
153. S t e w a r t, W.D.P. (1980): Some aspects of structure and function in N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria. Ann.Rev. Microbiol. 34: 497-536.



154. S t e w a r t, W.D.P. (1982): Nitrogen fixation- its current relevance and future potential. *Israel Journal of Botany*, Volo. 31, 5-44.
155. S t e w a r t, W.D.P., Rowell, P., Cossar, J.D., Kerby, N.W. (1985): Physiological studies on N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria. In: *Nitrogen fixation and CO<sub>2</sub> metabolism* (P.W. Ludden and L.E. Burris, eds) pp. 269-279. Elsevier Science Publishing Co., Inc . London.
156. S t o j k o v i ć, S. (1998), Magistarski rad: Rasprostranjenost i taksonomska pripadnost cijanobakterija i mikroalgi u različitim tipovima staništa na teritoriji SRJ. PMF, Univerzitet u Novom Sadu.
157. S v i r č e v, Z. (2005): *Microalgae and cyanobacteria in biotechnology*. Faculty of Natural Sciences, University of Novi Sad, Novi Sad.
158. Š t e t i ć, J., Butorac, B., Krizmanić, I. (2003): Studija PIO "Subotička pešćara", predlog za stavljanje pod zaštitu, Zavod za zaštitu prirode Srbije.
159. T i t b a l l, R.W., Williamson, E.D. (2001): Vaccination against bubonic and pneumonic plague. *Vaccine*. 19:4175–4184.
160. T i m o t i ć, D., Kovačev, N. (2011): Pokrajinski zavod za zaštitu prirode, Studija zaštite SRP "Titelski breg" - predlog za stavljanje pod zaštitu.
161. T h a n a s s i, D. G., Bliska, J. B., & Christie, P. J. (2012): Surface Organelles Assembled by Secretion Systems of Gram-Negative Bacteria: Diversity in Structure and Function. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(6), 1046–1082.
162. T h a l m a n n, A. (1967): Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenase activitat Boden nittels Triplenyltetrazolium chlorid (TTC). *Landw. Forsch.* 21, 249-257.
163. T e a u m r o o n g, N., I n n o k, S., C h u n l e u c h a n o n, S., N a n t a k o r n (2002): Diversity of nitrogen-fixing cyanobacteria under various ecosystems of Thailand: I. Morphology, physiology and genetic diversity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18: 673–682.
164. T e l - O r, E., B o u s s i b a, S., R i c h m o n d, A. (1980): Products and chemicals from *Spirulina platensis*. *Algae Biomass* (ed) Shelef, G., Soeder, C.J. Elsevier - North Holland Biomedical Press., pp. 611-617.
165. T e š i ć, Ž., Todorović, M. (1988.) *Mikrobiologija*, Naučna knjiga, Beograd.
166. T i w a r i, O.N., Premi, P., Thadoi, A., Dineshwori, Y., Chungkham, S., Wangkhem, I., Gunapati, O., Indrama, T., Khangembam, R., Shamjetshabam, M., Subhalaxmi, A., Keithellakpam, O.S., Oinam, A.S., Dolly, W.D. (2015): Genetic diversity analysis of cyanobacteria from acidic rice fields of Manipur, India falling under Indo-Burma biodiversity hotspots. *International Journal of Advanced Research* (2015), Volume 3, Issue 5, 790-800.

167. T i r k e y, J., Adhikary, SP. (2005): Cyanobacteria in biological soil crusts of India. *Current Science* 89 (3), 515-521.
168. V a a r a, T. (1984). The surface structures of chroococcacean cyanobacteria. Ph.D. thesis. University of Helsinki, Finland.
169. V a g n o l i, L., M a r g h e r i, M.C., A l l o t t a, G., M a t e r a s s i, R. (1992): Morphological and physiological properties of symbiotic cyanobacteria. *New Phytol.* (120); 243-249.
170. V a n d e r W o u d e, M., Braaten B, Low D. (1996): Epigenetic phase variation of the pap operon in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* ;4:5-9.
171. V a s i n, J. (2010): Солончаки Војводине - карактеристике и савремена класификација, докторска дисертација. Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет у Новом Саду, Нови Сад.
172. V a s c o n c e l o s, A.C.L. and Bogorad, L. (1971): *Biochim. Biophys. Acta* 228. 492.
173. V a z q u e z, F.J., A c e a, M.J., C a r b a l l a s, T. (1993): Soil microbial populations after wildfire. *FEMS Microbiology Ecology* 13, 93-104.
174. V e n k a t a r a m a n, G.S., Rajyalakshmi, B. (1971): Tolerance of blue green algae to pesticides, *Curr.Sci.*, 40,143-4.
175. V e n k a t a r a m a n, G.S. (1972): Algal biofertilizers and rice cultivation. *Indian Agricultural Research Institute, New Delhi*, 1-14.
176. V e n k a t a r a m a n, G.S. (1981): Blue-green algae for rice production. A manual for its promotion. Food and agriculture organisation of the United Nations. Rome.
177. V e s p e r, S. J., and W. D. Bauer. (1986): Role of pili (fimbriae) in attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:134-141.
178. V e s p e r, S.J., (1987): Production of pili (fimbriae) by *Pseudomonas Jiuorescens* and correlation with attachment to corn roots. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1397-1405.
179. V o j v o d i ć - V u k o v i ć, M., G o v e d a r i c a, M., J a r a k, M., M i l o š e v i ć, N. (1993): Effect of some herbicides on total number of bacteria and dehydrogenase activity of microorganisms in pea rhizosphere. *Zemljište i biljka*, Vol. 42, No. 1, 73-77.
180. Z a v i a l o v, A., Zav'yalova, G., Korpela, T., Zav'yalov, V. (2007): FGL chaperone-assembled fimbrial polyadhesins: anti-immune armament of Gram-negative bacterial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.*;31:478-514.
181. Z h e n g, W.W., N i l s s o n, M., B e r g m a n, B., R a s m u s s e n, U. (1999): Genetic diversity and classification of cyanobacteria in different *Azolla* species by the use of PCR fingerprinting. *Theoretical and Applied Genetics*. Nov 1999, Vol. 99 Issue 7-8.

182. Ž i v k o v i ć, B., Nejgebauer, V., Tanasijević, Đ., Miljković, N., Stojković, L., Drezgić, P. (1972): Zemljišta Vojvodine. Institut za poljoprivredna istraživanja, Novi Sad.
183. Y a n n i, Y.G., A b d E l-R a h m a n, A.A.M. (1993): Assessing phosphorus fertilization of rice in the Nile delta involving nitrogen and Cyanobacteria. Soil Biol. biochem., Vol. 25, No. 2, 289-293.
184. Y e n, M.R., Peabody, C.R., Partovi, S.M., Zhai, Y., Tseng, Y.H., Saier, M.H.(2002): Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. Biochim Biophys Acta. 2002;1562:6–31.
185. W e e n i n g, E.H., Cathelyn, J.S., Kaufman, G., Lawrenz, M.B., Price, P., Goldman WE, Miller VL.(2011): The dependence of the *Yersinia pestis* capsule on pathogenesis is influenced by the mouse background. Infect Immun. 79:644–652.
186. W i l d o n, D.C. and Mercer, F.V. (1963): The ultra-structure of the vegetative cell of blue green algae. Austral. J. of Biol. Sci. 16: 585-596.
187. W i l l i a m s o n, D. H.; & Fennell, D. J. (1975) Methods Cell Biol. 12. 335-351.
188. W o l k, C.P. (1980): Cyanobacteria (Blue-green algae). The Biochemistry of Plants 1:659 - 687.

## BIOGRAFIJA

**Oliver Fojkar** je rođen u Vrbasu 9. 9. 1969. godine. Osnovnu školu je završio u Odžacima, a Gimnaziju "Jovan Jovanović Zmaj" smer biologija u Novom Sadu. Tokom školovanja učestvovao je na takmičenjima Pokret "Nauku mladima" na kojima je zlatnu medalju osvojio tri puta, a srebrnu dva puta iz naučne oblasti biologija na nivou tadašnje države Jugoslavije.

**Diplomirao je Biologiju** - istraživački smer, na PMF-u u Novom Sadu 1995. godine sa prosečnom ocenom 9,41 i diplomskim radom iz oblasti mikrobiologije: "Pojava anastomoze kod roda *Nostoc* i *Anabaena*, *Cyanobacteria*". Magistrirao je na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu 2000. godine, sa ocenom 10 i radom iz oblasti zemljišne mikrobiologije: "Zastupljenost azotofiksirajućih *Cyanobacteria* i ostalih grupa mikroorganizama u zemljištu".

Bio je istraživač-stipendista Ministarstva za nauku Republike Srbije u periodu 1995-2000 i angažovan na Katedri za Mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta i Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Kao stipendista Evropske Mikrobiološke Federacije (FEMS) usavršavao se četiri meseca na Univerzitetu u Štokholmu u laboratoriji Dr Birgitte Bergman, iz oblasti PCR genetskih metoda i primene transmisiona elektronske i fluorescentne mikroskopije kod cijanobakterija.

Kao daroviti student bio je stipendista Univerziteta u Novom Sadu tri godine i dobitnik stipendije Norveške Vlade i Grupe G17 plus za 2000 godinu.

Bio je član Mladih Istraživača Srbije, Društva BID "Josif Pančić" na PMF-u u Beogradu i Naučno-istraživačkog društva studenata biologije "Josif Pančić" na PMF-u u Novom Sadu, kao i njegov predsednik u periodu 1990-91. godine. Učestvovao je na preko 15 naučno - istraživačkih programa ovih društava i bio delegat na XI Kongresu UNESCO-a, održanog u Austriji 1991. godine.

Član je Društva mikrobiologa Srbije, Udruženja filmskih i TV radnika Vojvodine, međunarodnog udruženja FFC – Filmmakers For Conservation. Osnivač je i prvi predsednik Akademskog Društva za proučavanje i zaštitu prirode – Novi Sad. Stekao je sertifikat za kameru 2006. godine na Novosadskom Otvorenom Univerzitetu. Nosilac je diplome ronioca Professional Scuba Schools.

Radio je u Obrazovno-naučnom programu RTS TV Novi Sad kao autor i scenarista emisija o prirodi 7 godina (1995-2002). Autor je više naučno-popularnih filmova iz oblasti biologije i ekologije: **U senci civilizacije, Zimski let, Gljive fruške gore, Molitva za goru, serija Priroda kao život, Moj prijatelj štiglič, Bele rode moje ravnice, Male stajaće vode Vojvodine, Reka života – Dunav, Konji Krčedinske ade, Potiski biser....** Učestvovao je na više prestižnih međunarodnih festivala u: Italiji, Grčkoj, Velikoj Britaniji, Japanu, Finskoj, Poljskoj, Slovačkoj, Mađarskoj i Srbiji.

Dobitnik je više nagrada, a neke od njih su:

- Nagrada naučnog komiteta Ekološkog Filmskog Festivala u Viterbu, Italija (1996),
- SREBRNI BOR, Najbolji ekološki film 12. MEFEST, Zlatibor, (2004),
- Panda Award Finalist, WILDSCREEN 2006 Bristol, Velika Britanija,

- Najbolji edukativni ekološki film, Japan Wildlife Film Festival (2007),
- Memorijalna nagrada «Aleksandar Saša Petrović» MEFEST (2008),
- „ZLATNO PAUNOVO PERO“ Grand prix, 12. Međ. festival filma, Gospođinci (2009),
- Specijalna nagrada, 13. Međ. Festival Filma o prirodi, Lođ, Poljska (2009).
- Zlatna povelja „Sveti Sava“ PU „Radosno detinjstvo“ Novi Sad 2009.
- „ZLATNI LIST“ Nacionalnog Parka „Fruška gora“ za 2012. godinu
- „ZELENI LIST“ 2013. Radija B92 i Pokreta gorana Vojvodine.

Objavio je i prezentovao 25 naučnih radova u zemlji i insotranstvu, od čega treba izdvojiti XI Svetski Kongres Mikrobiološke azotofiksacije u Pasterovom Institutu u Parizu 1997.

Nosilac je sertifikata o završenom programu: **„Jačanje kapaciteta uprave za integraciju Srbije u Evropsku uniju“** koji je obuhvatio studijsku posetu institucijama Evropske Unije u Briselu, u organizaciji BOŠ-a i Kancelarije za evropske integracije Vlade Republike Srbije.

Profesionalno se bavi zaštitom prirode i zaposlen je u Pokrajinskom zavodu za zaštitu prirode u Novom Sadu kao Načelnik odeljenja za promociju, edukaciju i odnose sa javnošću.

Oženjen je suprugom Mirjanom i ima ćerke Saru i Teodoru.