



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ**  
**ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

Департман за ратарство и повртарство



**Вања Црвенков, дипл. инж. пољопривреде**

**ДЕТЕРМИНАЦИЈА ИЗОЛАТА БАКТЕРИЈА ИЗ РОДА *BACILLUS***  
**И ЊИХОВ УТИЦАЈ НА ПОЧЕТНИ РАСТ ПШЕНИЦЕ**

МАСТЕР РАД

**Нови Сад, 2024.**



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ**  
**ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

Департман за ратарство и повртарство



Кандидат  
Вања Црвенков, дипл. инж.

Ментор  
проф др. Симонида Ђурић

**ДЕТЕРМИНАЦИЈА ИЗОЛАТА БАКТЕРИЈА ИЗ РОДА *BACILLUS***  
**И ЊИХОВ УТИЦАЈ НА ПОЧЕТНИ РАСТ ПШЕНИЦЕ**

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2024.

## **КОМИСИЈА ЗА ОЦЕНУ И ОДБРАНУ МАСТЕР РАДА:**

---

**Др Симонида Ђурић, редовни професор**

Ужа научна област: Микробиологија

Пољопривредни факултет, Нови Сад

Ментор

---

**Др Драгана Стаменов, ванредни професор**

Ужа научна област: Микробиологија

Пољопривредни факултет, Нови Сад

---

**Др Тимеа Хајнал Јафари, ванредни професор**

Ужа научна област: Микробиологија

Пољопривредни факултет, Нови Сад

## Садржај

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. УВОД                                                                            | 1  |
| 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ                                                              | 2  |
| 2.1. МИКРООРГАНИЗМИ СТИМУЛАТОРИ БИЉНОГ РАСТА                                       | 2  |
| 2.2. МЕХАНИЗМИ ДЕЛОВАЊА PGPR                                                       | 5  |
| 2.2.1. Фиксација азота                                                             | 6  |
| 2.2.2. Производња фитохормона                                                      | 6  |
| 2.2.3. Солубилизација фосфата                                                      | 7  |
| 2.2.4. Продукција сидерофора                                                       | 7  |
| 2.2.5. Производња антибиотика                                                      | 7  |
| 2.2.6. Нутритивна конкуренција                                                     | 8  |
| 2.2.7. Индукована отпорност (ISR)                                                  | 8  |
| 2.3. ОСНОВНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ БАКТЕРИЈА ИЗ РОДА <i>Bacillus</i> . ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА | 11 |
| 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА                                                         | 12 |
| 4.1. Узимање узорака земљишта                                                      | 12 |
| 4.2. Изолација аутохтоних сојева <i>Bacillus</i> sp.                               | 12 |
| 4.3. Одређивање морфолошких карактеристика сојева из рода <i>Bacillus</i>          | 13 |
| 4.4. Физиолошке карактеристике сојева из рода <i>Bacillus</i>                      | 14 |
| 4.5. Биохемијске карактеристике сојева из рода <i>Bacillus</i>                     | 15 |
| 4.6. Продукција материја раста                                                     | 17 |
| 4.7. Умножавање изолованих сојева <i>Bacillus</i> sp. у течной култури             | 18 |
| 4.8. Провера ефективности добијених изолата на биљкама пшенице                     | 19 |
| 5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА СА ДИСКУСИЈОМ                                             | 20 |
| 5.1. Узимање узорака земљишта                                                      | 20 |
| 5.2. Одређивање морфолошких карактеристика сојева из рода <i>Bacillus</i>          | 20 |
| 5.3. Физиолошке карактеристике изолованих сојева из рода <i>Bacillus</i>           | 24 |
| 5.4. Биохемијске карактеристике сојева из рода <i>Bacillus</i>                     | 31 |
| 5.5. Продукција материја раста                                                     | 33 |
| 5.6. Провера ефективности добијених изолата на биљкама пшенице                     | 35 |
| 6. ЗАКЉУЧАК                                                                        | 38 |
| 7. ЛИТЕРАТУРА                                                                      | 39 |

## **Детерминација изолата бактерија из рода *Bacillus* и њихов утицај на почетни раст пшенице**

**Вања Црвенков**

### **РЕЗИМЕ**

Микроорганизми стимулатори биљног раста (PGPM) налазе се у зони ризосфере и својим различитим механизмима деловања, производњом фитохормона, антибиотика, продукцијом HCN-а имају значајан утицај на здравље и развиће биљке. Бактерије из рода *Bacillus* изоловане су из ризосфере лековитог биља са различитих локалитета. Извршена је карактеризација њихових морфолошких, биохемијских и физиолошких особина, као и провера ефективности добијених изолата на биљкама пшенице. Већина изолата испољава PGP својства која су одговорна за раст биљака. Од 20 изолата 4 користе све испитане шећере као извор енергије, већина показује добру отпорност на тешке метале, способност подукције ензима, инодол-сирћетне киселине и HCN-а. Почетни раст корена и стабла пшенице доказује позитивно стимулативно деловање чинећи ове бактерије погодне кандидате за микробиолошка ђубрива.

**Кључне речи:** *Bacillus*, пшеница, PGPR, почетни раст, механизми деловања

## **Determinaton of *Bacillus* bacteria isolates and their effect on initial growth of wheat**

**Vanja Crvenkov**

### **SUMMARY**

Microorganisms that stimulate plant growth (PGPM) are found in the rhizosphere and positively influence the growth and development of plants by producing phytohormones, antibiotics, and HCN and other. *Bacillus* bacteria isolated from the rhizosphere of medicinal plants were characterized in terms of their morphological, biochemical, and physiological properties and the effectiveness of the isolates on initial growth of wheat. Most isolates showed positive reactions towards PGPR traits. Out of 20 isolates, 4 utilized all tested sugars as energy sources, demonstrating good resistance to heavy metals and the ability to produce indole-3-acetic acid and HCN. The initial growth of the roots and stems of wheat confirms the positive stimulatory effect, making these bacteria strong candidates for microbial fertilizers.

**Key words:** *Bacillus*, wheat, PGPR, initial growth, mechanisms of action

## 1. УВОД

Земљиште је дефинисано као сложен и динамичан систем у ком се налази велики број микроорганизама који активно утичу на његова својства као и на одржавање плодности земљишта. Исхрана биљака зависи од микроорганизама јер они врше трансформацију органских и неорганских једињења до облика који су приступачни за њихову исхрану.

Постоји посебна група микроорганизама који стимулишу биљни раст, штите од патогена и стреса, повећавају виталност биљке и снабдевају је хранљивим елементима. Такви микроорганизми се називају PGP организмима (**PGP – *plant growth promoting***) и имају различит утицај и механизам деловања на биљке. Симбиотске бактерије за промоцију раста биљака (PGPR) обогаћују микробиом земљишта и имају способност да побољшају раст пшенице (Dal Cortivo et al., 2020). У истраживању Singh и сар. (2011) доказано је да је инокулација пшенице са ризобактеријама које стимулишу раст и микоризним гљивама повећала принос пшенице за 41% у односу на пшеницу која није инокулисана и из тога закључили да корисни микроорганизми у пољопривредној производњи играју кључну улогу у обезбеђивању хране за будућност. Из тог разлога неопходно је извршити детерминацију микроорганизама и утврдити њихову ефикасност на раст биљака. Потребно је одредити морфолошка, физиолошка и биохемијска својства. Микроорганизми код којих се утврди да поседују биостимулативан потенцијал омогућена је производња биопрепарата који имају значајну примену како у ратарској производњи, тако и у хортикултури и шумарству.

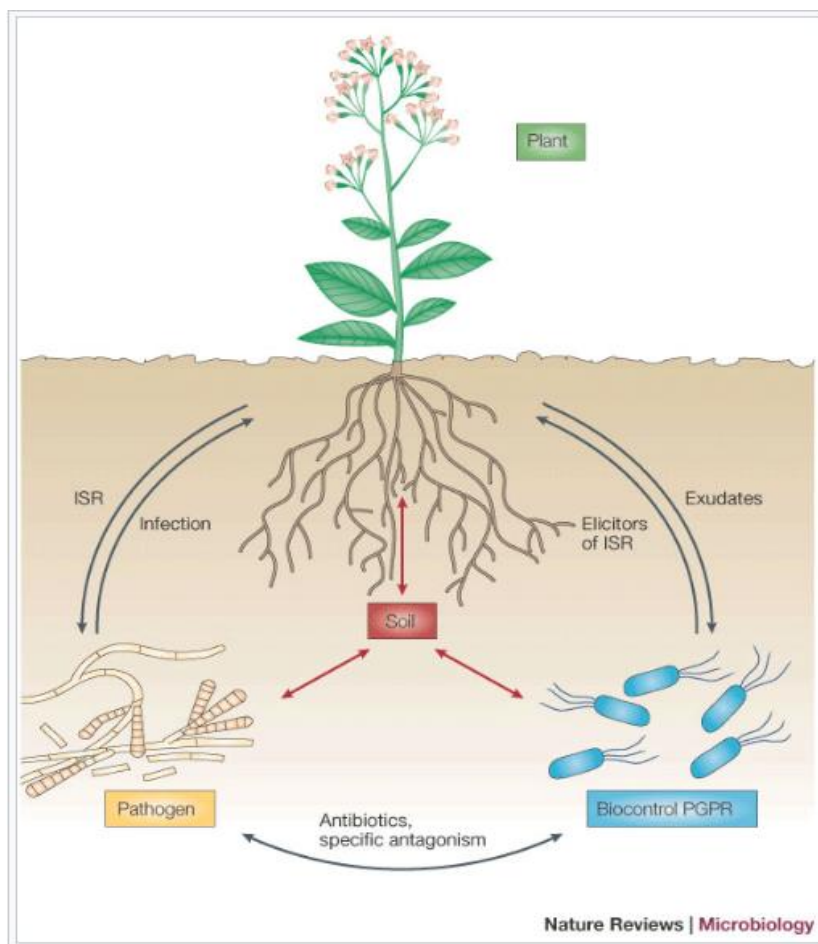
## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1. МИКРООРГАНИЗМИ СТИМУЛАТОРИ БИЉНОГ РАСТА

Појам **PGPR** (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) је први пут увео 1987. године Јоџ Клоерпер, да дефинише хетерогену групу бактерија, које се могу наћи у зони **ризосфере**, на површини или у асоцијацији са кореном биљке, а када се користе као инокуланти имају значајан утицај на биљни раст, количину и квалитет приноса пољопривредних култура (Хајнал Јафари и сар., 2020).

Ризобактерије које утичу позитивно на здравље биљака називамо - **PHPR**, Plant Health Promoting Rhizobacteria, оне које поспешују нодулацију - **NPR**, Nodule Promoting Rhizobacteria. **PGRM** (Plant Growth Promoting Microorganisms) је универзални назив за све микроорганизме који позитивно утичу на биљку, налазили се у ризосфери или не (Хајнал Јафари и сар., 2020).

Ризосфера је динамичан систем који се одликује физичким, хемијским и биолошким својствима. Појам **ризосфера** уводи Hiltner 1904. године који описује уску зону земљишта око површине биљке у којој су активност, бројност и метаболизам микроорганизама одређени коренским излучевинама. Биљка ствара специфичне услове у ризосфери својим излучевинама, ексудатима попут аминокиселина и шећера и обезбеђује богат извор енергије и хранљивих материја за бактерије и утиче на састав популације микроорганизама (слика 1).



Слика 1. Интеракција између ризобактерија (PGPR), биљке, патогена и земљишта.

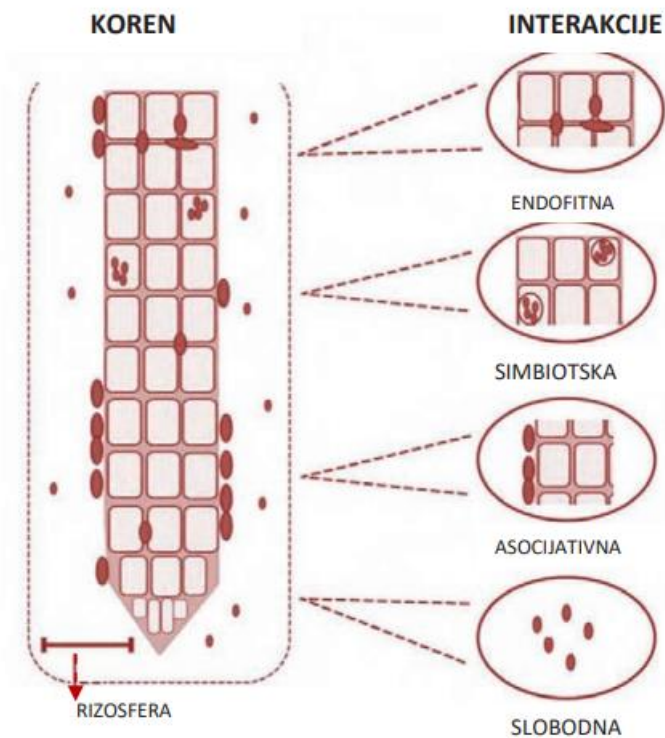
(<https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Nrmico1129-f1.gif>)

Велики број микроорганизама као што су бактерије, гљиве, протозое и алге коегзистирају у ризосфери. Бактерије су најзаступљеније међу њима. Неки од родова бактерија које побољшавају раст биљака су: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* и *Serratia* (Saharan и Nehra, 2011).

Одређени микроорганизми стимулишу раст биљака, обогаћују земљиште, разграђују загађиваче или штите биљке од патогена (Karnwal, 2012).

Микроорганизми који насељавају ризосферу могу се класификовати према њиховим ефектима на биљке и према начину на који узајамно делују са кореном, при чему су неки патогени, док други изазивају корисне ефекте (Saharan and Nehra, 2011).

Начини на који PGPR ступају у односе са биљкама могу бити **симбиотски, асоцијативни и слободни**.



Слика 2. Врсте интеракција и PGP микроорганизама (Хајнал Јафари и сар., 2020).

Поједине бактеријске врсте имају способност да се прикаче на површину корена, што им омогућава да максимално искористе коренске излучевине. Неке од њих су специјализованије, јер поседују способност да продру унутар коренских ткива (**ендофити**) и имају директан приступ органским једињењима присутним у апопласту<sup>1</sup> (Sivasakthi et al., 2014). Друге бактерије формирају нодусе или квржице на корену биљака и за њих се каже да су симбиотске (слика 2). Захваљујући овоме бактерије не морају да се суочавају с конкуренцијом од својих противника као што је то случај у ризосфери или у земљишту.

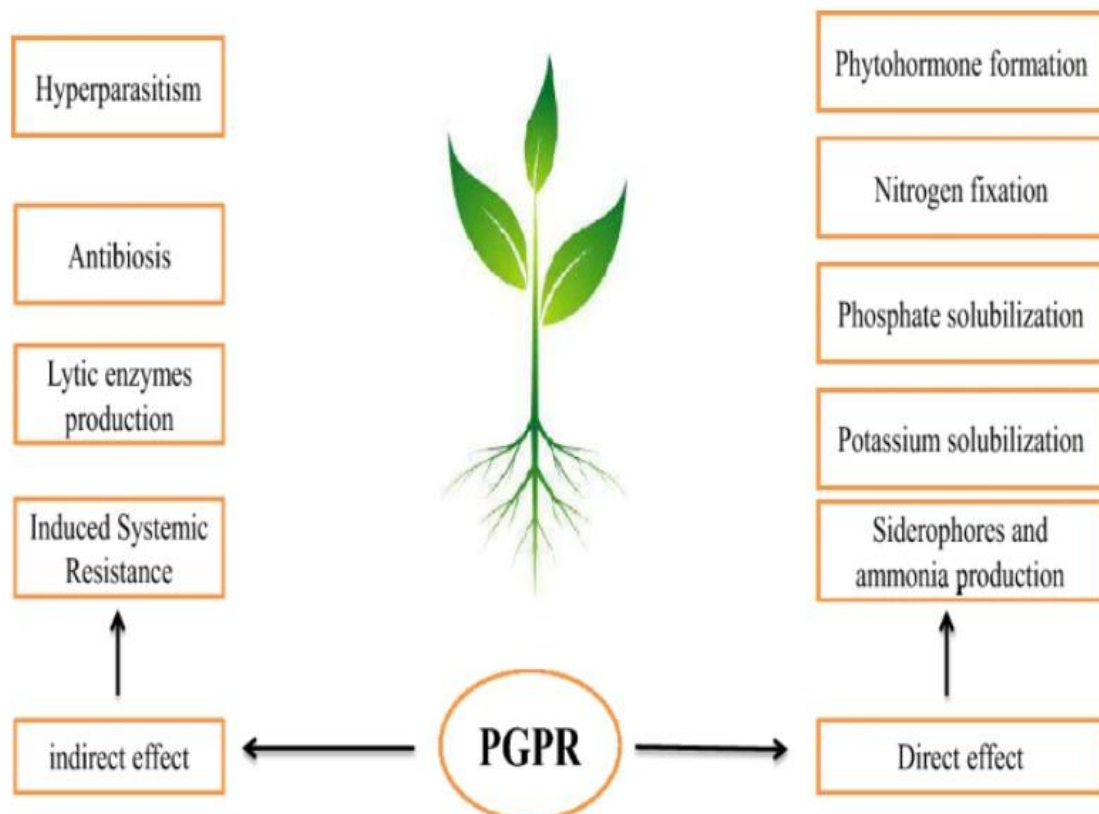
<sup>1</sup> Ванћелијски простор изван биљних мембрана, где се вода и растворене материје слободно крећу

## 2.2. МЕХАНИЗМИ ДЕЛОВАЊА PGPR

Постоји више механизма којим PGP бактерије утичу на раст биљака, они се могу поделити у две групе. Директни механизми који подразумевају побољшану доступност хранљивих материја, спречавају развој патогених микроорганизама, регулишу продукцију биљних хормона. Са друге стране су индиректни механизми који активирају одбрамбене механизме биљке у случају напада патогена (Стаменов et al., 2018).

Директни механизми укључују фиксацију азота, производњу фитохормона, солубилизацију фосфата и повећање доступности гвожђа (Kundan et al., 2015).

Индиректни ефекти укључују производњу антибиотика, нутритивну конкуренцију, паразитизам, инхибицију токсина патогена и индуковану отпорност (Elnahal et al., 2022) (слика 3).



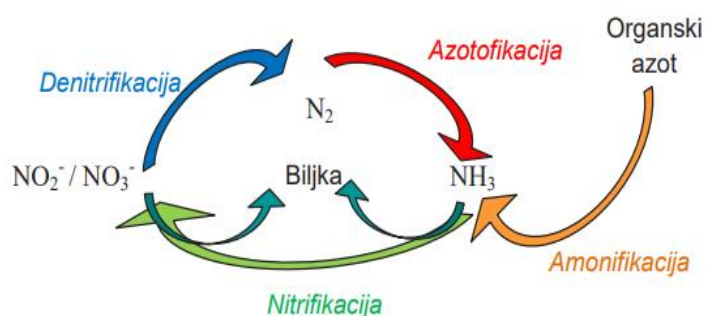
Слика 3. Директни и индиректни механизми деловања PGPR микроорганизама(<https://link.springer.com/article/10.1007/s41348-022-00642-3>)

### 2.2.1. Фиксација азота

Азот је кључни елемент, а често и ограничавајући фактор за остваривање високих и стабилних приноса. Један је од најважнијих хранљивих неопходних елемената. Налази се у органском и неогранском облику. У земљишту се не могу створити трајне резерве овог елемента стога микроорганизми имају значајну улогу у томе.

Поред тога што активно учествују у процесима мобилизације и имобилизације азотних форми, посебна група микоорганизама (диазотрофи) способна је да везује атмосферски азот и да га предаје биљци (Мрковачки и сар., 2012).

Микробиолошка трансформација азота протиче кроз четири фазе: **амонификација**, **нитрификација**, **денитрификација** и **азотофиксација**, у коме се азот преводи у облик које биљке могу усвојити (слика 4).



Слика 4. Микробиолошка трансформација азота (Хајнал Јафари и сар., 2020)

Микроорганизми који ово омогућавају јесу симбиотске азотофиксирајуће бактерије-*Rhizobium*, облигаторне симбиотске бактерије са легуминозама и слободне, асоцијативне или ендофитне попут *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus*, *Pseudomonas*, итд.

### 2.2.2. Производња фитохормона

Велики број различитих врста бактерија и гљива продукује фитохормоне: ауксине, цитокидине, гибберелине, абсцисинску киселину и етилен. Микроорганизми који производе фитохормоне и тиме стимулишу раст биљке називају се **фитостимулатори**.

Фитохормони су органске материје, које већ у малим концентрацијама утичу на све биохемијске и физиолошке процесе у биљци и на тај начин контролишу и делују на раст и развој биљака. Осим тога, фитохормони утичу на способност биљака да адекватно реагују на своју околину. Имају значајну улогу у процесу клијања семена, формирања корена и цветних пупољака, диференцијацији ксилема и флоема и формирања плодова (Хајнал Јафари и сар., 2020).

Ауксини чине групу биљних хормона који регулишу деобу ћелија, елонгацију и диференцијацију и стимулишу раст биљака у свим стадијумима развоја. Најзаступљенији облик ауксина јесте индол-3-сирћетна киселина (IAA).

### **2.2.3. Солубилизација фосфата**

Побољшање плодности земљишта је једна од најчешћих стратегија за повећање пољопривредне производње. Биолошка фиксација азота је веома важна за повећање плодности земљишта. Поред биолошке фиксације азота, фосфат солубилизација је подједнако важна. Фосфор (P) је главни есенцијални макронутријент за биолошки раст и развој ( Saharan and Nehra, 2011). Способност микроорганизама да фосфор из неприступачног облика преводе у облик приступачан за биљке, попут ортофосфата, је од изузетног значаја за принос биљака. Бактерије које ово чине су из рода *Bacillus*, *Rhizobium* и *Pseudomonas* а међу гљивама *Aspergillus* и *Penicillium*.

### **2.2.4. Продукција сидерофора**

Гвожђе је неопходни елемент за раст биљака, а у земљишту се налази у њима неприступачном облику. Биљке усвајају гвожђе у облику феро јона  $Fe^{2+}$ , а у земљишту он је најчешће присутан у облику фери јона  $Fe^{3+}$ , односно у виду оксида и хидроксида гвожђа (Salisbury and Ross, 1992).

Услед недостатка гвожђа биљке и микроорганизми производе сидерофоре. Улога сидерофора је да отпусте јон из оксида и хидроксида и да га вежу формирајући сидерофора-гвожђе комплекс. Овај комплекс бива транспортован или до површине корена или до ћелије бактерије, где захваљујући присуству специфичних мембранских рецептора долази до редукције  $Fe^{3+}$  јона у  $Fe^{2+}$  јон, који потом бива усвојен (Neilands, 1995).

### **2.2.5. Производња антибиотика**

Индијектни механизам подразумева способност PGPR-а да смањи штетне ефекте биљних патогена на раст. Ово укључује синтезу лизозомалних ензима, укључујући хитиназе, целулазе, 1,3-глуканазе, протеазе и липазе, који могу да разграде део ћелијског зида многих патогених гљива. Такође, различити антибиотици се производе као одговор на пролиферацију<sup>2</sup> биљних патогена. Међутим, претерана зависност од бактерија које производе антибиотике као биоконтролних агенаса може бити неповољна због развоја отпорности на специфичне антибиотике. Производња једног или више антибиотика је механизам који се најчешће повезује са способношћу бактерија које промовишу раст биљака да делују као антагонистички агенси против фитопатогена (Glick et. al., 2007).

Механизам антибиозе подразумева производњу једињења ниске молекулске масе која су штетна и критична за главне ензиме и метаболизам других микроорганизама, чиме се успорава њихов раст (Kundan et al., 2015).

### **2.2.6. Нутритивна конкуренција**

PGPR се понекад боре са штетним микроорганизмима за хранљиве материје које су присутне у траговима. Ово се може објаснити када у земљишту има доста непатогених микроорганизама који брзо колонизују површине биљака и користе доступне хранљиве материје, чиме инхибирају раст патогених микроорганизама. Конкуренција за хранљиве материје између PGPR-а и патогена сматра најважнијом интеракцијом која индијектно подржава стимулацију раста биљака инхибирањем раста патогена (Kundan et al., 2015).

### **2.2.7. Индукована отпорност (ISR)**

Индукована системска отпорност је механизам повећане отпорности на одређеним местима код биљке у одређено време. Механизам одбране ISR активира се само када дође до напада патогених агенаса. ISR није специфичан против одређеног патогена, али помаже биљци да контролише болести. ISR укључује сигнализацију јасмоната и

---

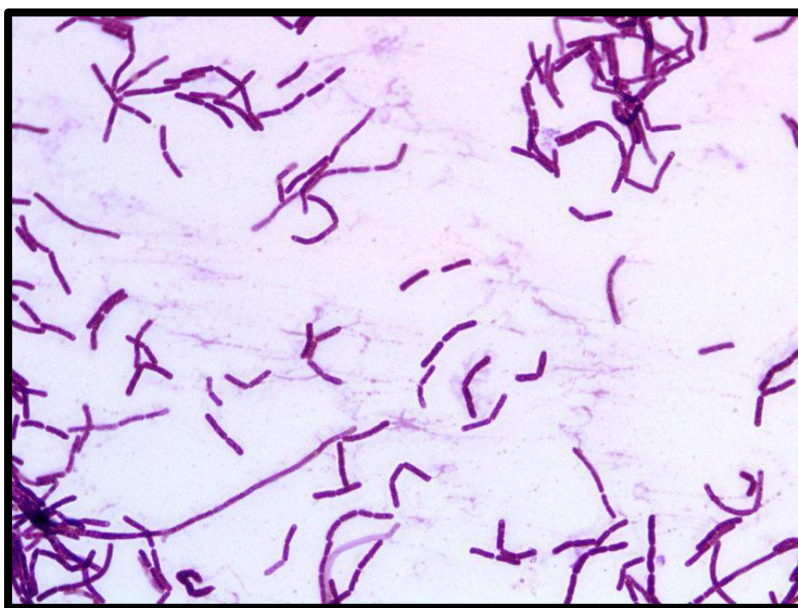
<sup>2</sup> Нагло повећање броја ћелија

етилена унутар биљке, а ови хормони стимулишу одбрамбене реакције домаћина на низ патогена (Verhagen et al., 2004).

Још један механизам је производња сидерофора, који онемогућава патогенима да приступе довољним количинама гвожђа, чиме се ограничава њихов раст.

### 2.3. ОСНОВНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ БАКТЕРИЈА ИЗ РОДА *BACILLUS*

Бактерије рода *Bacillus* су грам-позитивне, штапићасте, аеробне или факултативно анаеробне бактерије (слика 5). Једна од најистакнутијих карактеристика врста рода *Bacillus* је способност формирања ендоспора које пружају високу отпорност на неповољне услове спољашње средине (зрачење, суша, UV светлост и топлота), омогућавајући овим бактеријама да преживе у неповољним условима током продуженог периода у стању мировања (Nicholson, 2002).



Слика 5: Микроскопски изглед *Bacillus* spp. ([https://www.researchgate.net/figure/Bacillus-spp-morphology-visualised-using-Gram-staining-10-magnification\\_fig1\\_266028804](https://www.researchgate.net/figure/Bacillus-spp-morphology-visualised-using-Gram-staining-10-magnification_fig1_266028804))

Врсте рода *Bacillus* су широко распрострањене у природи, налазе се у ваздуху, води и земљишту (Nicholson, 2002). У ризосфери се најчешће налазе врсте: *Bacillus subtilis*,

*Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis* i *Bacillus firmus*.

Чланови рода *Bacillus* познати су по томе што имају више корисних својстава која помажу биљкама директно или индиректно, кроз снабдевање хранљивих материја, унапређење раста путем производње фитохормона, заштиту од патогена, итд. Неке врсте рода *Bacillus* могу обављати исту улогу као хемијска ђубрива и пестициди, делујући као биођубриво и/или биопестицид.

*Bacillus subtilis* успоставља стабилан однос са вишим биљкама и стимулише њихов раст и развој. Инокулација *Bacillus licheniformis* у ризосферу паприке и парадајза показало се као добра алтернатива хемијским ђубривима приликом узгајања ове биљке у стакленицима (García et al., 2004). *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* и *Bacillus mucilaginosus*, када бивају инокулисане у земљиште са ограниченим хранљивим материјама, повећавају доступност минерала, њихово усвајање и раст биљака одређених биљака.

Дакле, *Bacillus* може побољшати раст биљака и такође се боре са тешким металима и стресом салинитета земљишта. То је еколошки прихватљиво. Стога се *Bacillus* може препоручити као биођубриво за пољопривредне културе уместо да се користе као хемијска ђубрива (Rayavarapu, 2016).

Због широког спектра физиолошких карактеристика и способности да производе различите ензиме, антибиотике и метаболите, врсте рода *Bacillus* се користе у многим медицинским, фармацеутским, пољопривредним и индустријским процесима (Celandroni et al., 2019).

Биолошка контрола, коришћење микроорганизама за сузбијање биљних болести, пружа снажну алтернативу у употреби синтетичких хемикалија. Многе врсте рода *Bacillus* и сродних облика су потенцијална средства за биолошку контролу различитих патогених микроорганизама. Њихова способност формирања спора чини их идеалним кандидатом за развој ефикасних биопестицидних производа са технолошке тачке гледишта (Kumar, et al., 2011).

### 3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА

Циљ истраживања је да се изврши изолација аутохтоних сојева бактерија из рода *Bacillus* са три локалитета (Ртањ, Сува Планина и Сента), из ризосфере самониклог и гајеног лековитог биља, и испита њихов PGP потенцијал на биљкама пшенице у лабораторијским условима.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

Истраживања су спроведена у неколико фаза у току 2021. године на Пољопривредном факултету, у Новом Саду, Департман за ратарство и повртарство, у лабораторији за микробиологију.

### 4.1. Узимање узорака земљишта

На три локалитета су узети узорци земљишта:

1. Ртањ –  $43^{\circ} 48' 658''$  северне географске ширине и  $21^{\circ} 53' 252''$  источне географске дужине, на 718 метара надморске висине
2. Сува Планина –  $43^{\circ} 16' 211''$  северне географске ширине и  $22^{\circ} 11' 552''$  источне географске дужине на 500 метара надморске висине
3. Сента –  $45^{\circ} 53' 45''$  северне географске ширине и  $20^{\circ} 05' 17''$  источне географске дужине на 78 метара надморске висине

Узорци земљишта су узети асептичном техником, ашовом. На сваком локалитету узорак је узет са три места на дубини од 0-30 cm. Око 0,5 kg просечног узорка је стављено у полиетиленске врећице, затим у ручни фрижидер у који су пренешене до лабораторије за микробиологију Пољопривредног факултета у Новом Саду (Јарак и Ђурић, 2006).

### 4.2. Изолација аутохтоних сојева *Bacillus* sp.

Селективне хранљиве подлоге су специфичног састава и прилагођене су само за одређену врсту микроорганизама. За изолацију бактерија из рода *Bacillus* кориштена је хранљива подлога L-агар (LA). Расхлађене подлоге су преливане преко суспензија у Петри кутијама, које су потом стављане у термостат на температуру од  $28^{\circ}\text{C}$  у периоду од 48 сати.

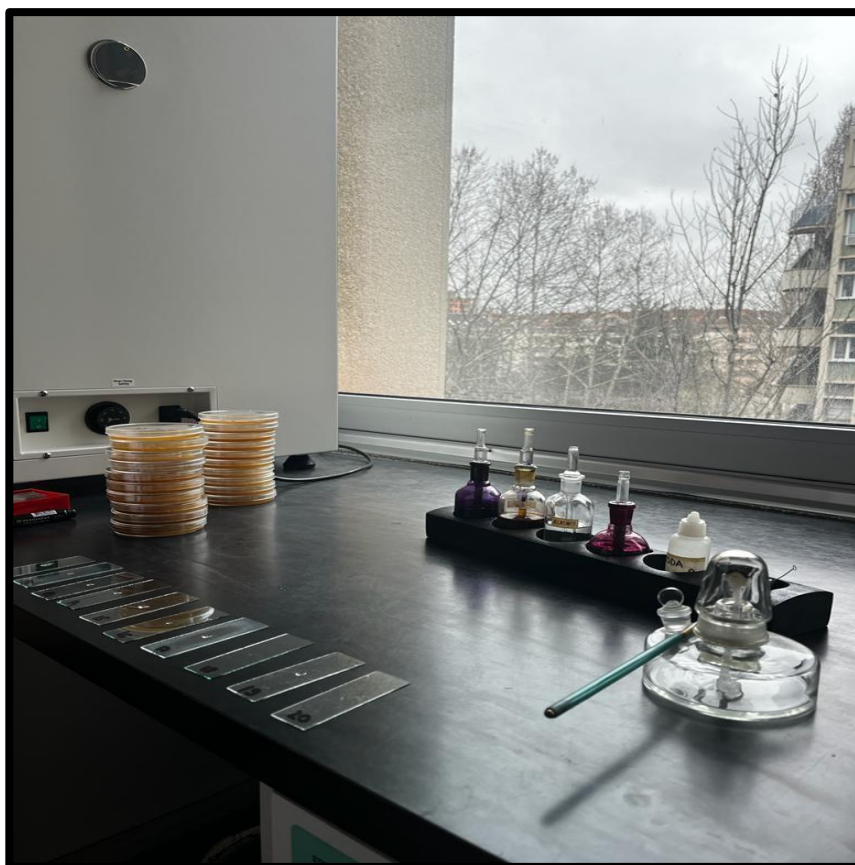
Изолација сојева *Bacillus* sp. вршена је из Петри кутија са L-агара. Након одређивања морфолошких карактеристика колоније и ћелије, одабрани изолати су пребачени на коси агар. Пресејавање је вршено у стерилној комори – ламинатору, у коме је претходно помоћу UV зрака стерилисан ваздух, а радни сто је пребрисан 70% алкохолом. За пресејавање је кориштена еза која је и пре и после преношења микроорганизама стерилисана на пламену. На искошену L-агар подлогу одабрани бактеријски сојеви су пресејавани стерилном езом у облику цик – цак линија. Потом су епрувете затворене стерилним металним запушачима и стављене у термостат на инкубацију. Инкубација је трајала 48 h на температури од 28 °C (Јарак и Ђурић, 2006).

#### **4.3. Одређивање морфолошких карактеристика сојева из рода *Bacillus* sp.**

Одређивање морфолошких особина сојева обухватило је одређивање морфологије колоније и морфологије ћелије.

Морфолошке карактеристике колоније се одређују засејавањем микроорганизама на чврсту подлогу убодом езе у центар петри кутије. Особине се испољавају након 48 h раста микроорганизама у термостату на температури од 28 °C. У својству морфологије колоније вршено је испитивање: облика, величине, површине, профила, ивице, структуре, боје, положаја, промена у подлози, оптичких особина, конзистенције.

Облик, покретљивост, бојење по Граму и спорогеност су испитивани у оквиру утврђивања морфолошких карактеристика ћелије. Прављењем нативних препарата је извршена процена покретљивости изолата. Узорак за препарат је узет из чисте кулуре бактериолошком езом, који се затим ставља на предметно стакло на које је претходно нанета кап воде. Езом се меша узорак са водом а преко се ставља покривна лџуспица. Након тога је препарат спеман за микроскопирање (Ћирић, 2014). Метод бојења по Граму се користи ради диференцијације ћелија на основу грађе ћелијског зида (слика 6). Бактерије са дебљим слојем муреина у ћелијском зиду су Грам + и обоје се љубичасто, док су бактерије с мањом концентрацијом муреина Грам – и обоје се у црвено.



Слика 6: Припрема препарата за микроскопирање и бојење по Граму (фото оригинал)

#### 4.4. Физиолошке карактеристике сојева из рода *Bacillus*

У оквиру физиолошких особина одређиван је однос према извору угљеника, раст на различитим температурама, раст на подлогама различите киселости и различитим концентрацијама NaCl, одређивана је отпорност према антибиотицима и тешким металима.

За одређивање односа према извору угљеника кориштена је Hugh-Lifsson-ова подлога (пептон 2 g,  $K_2HPO_4$  0,3 g, NaCl 5 g, шећер 10 g, бром-тимол плаво 0,03 g, агар 3 g) (Hugh and Leifson, 1953). У овим истраживањима кориштени су следећи шећери: глюкоза, фруктоза, декстроza, лактоза и ксилоза. У случају позитивне реакције примећује се око колонија промена боје из зеленкасте у жуту.

Раст на различитим температурама (4 °C, 10 °C, 28 °C, 37 °C, 45 °C), на подлогама различите киселости (pH 5, 7, 9) и на подлогама са различитим концентрацијама NaCl (3%, 5%, 7%), праћен је на МРА подлози. Приликом испитивања утицаја pH и

NaCl, инкубација је вршена у термостату на 28 °C. Након 48h инкубације, мерена је ширина раста и упоређивана са контролом. Потпуно одсуство раста обележено је са -, минималан раст са +, оптималан са ++, а обилан раст са +++. За одређивање **отпорности према антибиотцима** примењена је метода антибиограма - поступак са дисковима. Поступак се састоји у густом засејавању хранљиве подлоге микроорганизмима. На површину хранљиве подлоге су постављени дискови са антибиотцима. Испитивана је отпорност микроорганизама на следеће антибиотике: penicillin (10 µg), streptomycin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), ceftriaxone (30 µg). Дифузионом методом испитивана је **отпорност микроорганизама на растворе следећих метала**: кадмијум ( $\text{CdCl}_2$ ), манган ( $\text{MnCl}_2$ ) и олово ( $\text{PbCl}_2$ ), у концентрацијама од 10 mM. Након густог засејавања подлоге, на површину се поставе дискови са растворима тешких метала (слика 7).



Слика 7. Одређивање отпорности микроорганизама на тешке метале (фото оригинал)

#### 4.5. Биохемијске карактеристике сојева из рода *Bacillus* sp.

У оквиру биохемијских особина одређивана је продукција липазе, амилазе, пектиназе, целулазе, уреазе и способност коришћења цитрата као извора енергије.

**Продукција липазе** испитивана је на подлози (пептон 10 g L<sup>-1</sup>, NaCl 5 g L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 0,1 g L<sup>-1</sup>, агар 15 g L<sup>-1</sup>) којој је додат Tween 80 (Lanyi, 1987). Период инкубације је седам дана на 26 °C. Замућене зоне око колоније доказ су липолитичке активности.

За одређивање способности микроорганизма да **хидролизује скроб – продукција амилазе**, користи се метода агарних плоча на скробном агару ( скроб у праху 10 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,2 g L<sup>-1</sup>, агар 15 g) (Rodina, 1965). Инкубација се врши 48 h на 28 °C . Колоније се затим прелију раствором лугола. Скроб се у присуству јода боји плаво. Ако бактерије врше хидролизу скроба, око њихових колонија појавиће се необојена зона (зона хидролизе), која не садржи скроб, док ће се остали део подлоге на коме није дошло до хидролизе обојити плаво. Ако бактерије не разлажу скроб, подлога ће бити равномерно плаво обојена.

Способност продукције пектиназе испитивана је методом агарних плоча на пектинозном агару (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g L<sup>-1</sup>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,5 g L<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 2 g L<sup>-1</sup>, екстракт квасца 1 g L<sup>-1</sup>, пектин 10 g L<sup>-1</sup>, агар 16 g L<sup>-1</sup>). Инкубација траје 24 h на 37°C, након чега се израсле колоније прелију луголом. Појава необојених зона око колоније доказ су пектиназне активности (Soares et al., 1999; Soriano et al., 2000).

**Продукција целулазе** испитивана је на СМС агару (карбокси метил целулозни агар) (Kasing, 1995). Период инкубације је седам дана на 28 °C. Након инкубације, Петри кутије су преливане раствором Congo-red (1mg/cm<sup>3</sup> воде). Након петнаест минута, Congo-red је одливен а Петри кутије су преливане са 1M раствором NaCl. Обезбојене зоне око колонија доказ су целулазне активности микроорганизма.

Способност **разградње урее** испитивана је на подлози по Kristensen (Говедарица и Јарак, 1999). Период инкубације износи 24 h на 37° C. Појава црвене боје индикатора у хранљивој подлози доказ је разградње урее.

Способност **коришћења цитрата**, као извора енергије, одређивана је на Simonsovom цитратном агару (MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O 0,2 g L<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g L<sup>-1</sup>, Na-цитрат 2 g L<sup>-1</sup>, NaCl 5 g L<sup>-1</sup>, бром тимол плаво 0,08 g L<sup>-1</sup>, агар 15 g L<sup>-1</sup>). Инкубација се врши

48h на 30°C. На основу раста и промене боје подлоге из зелене у плаву, одређено је који изолати могу да користе цитрат.

#### 4.6. Продукција материја раста

Од PGP особина испитиване су: продукција индол – сирћетне киселине (IAA), егзополисахарида, HCN и способност растварања органских и неорганских једињења фосфора.

##### Продукција индол сирћетне киселине (IAA)

Способност изолата да продукује индол-сирћетну киселину (IAA) испитивана је употребом подлоге обogaћене аминокиселином триптофан (триптофан бујон). Присуство ензима триптофаназе, односно продукција индола у подлози, потврђује се додавањем Ковачевог реагенса, при чему настаје карактеристичан црвени прстен (слика 8).



Слика 8. Одређивање продукције IAA (фото оригинал)

Продукција HCN испитивана је на подлози следећег састава: триптон из соје 30 g l<sup>-1</sup>, глицин 4,4 g l<sup>-1</sup>, агар 15 g l<sup>-1</sup> (Frey-Klett et al., 2005). Након инокулације на подлогу је

постављен Whatman диск, који је предходно потапан у раствору састава 0,5% пикринске киселине и 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Период инкубације износи 4 дана на 28°C. Промена боје диска из жуте у наранцасто браон боју доказ је способности микроорганизма да продукује HCN.

**Способност минерализације органских једињења фосфора** испитивана је на подлози Menkina, модификованој по Rodinoј (Menkina, 1963). Способност изолата да солубилизују неорганске фосфате испитивана је на подлози по Píkovskaуа (Píkovskaуа, 1948). Након 5 дана инкубације на 28 °C, појава провидних зона око колонија доказ су способности микроорганизма да раствара фосфате.

#### 4.7. Умножавање изолованих сојева *Bacillus sp.* у течној култури

Пресејавање изолованих сојева *Bacillus sp.* са чврсте подлоге (МРА) на течну (МРВ) подлогу је вршено у стерилној комори - ламинатору у којој је претходно помоћу UV зрака стерилисан ваздух а радни сто пребрисан алкохолом. За пресејавање је кориштена еза која је пре и после преношења микроорганизама стерилисана на пламену. Потом су отвори ерленмајер боца и чепови такође стерилисани на пламену. По затварању, ерленмајер боце су стављене у шејкер инкубатор који је подешен на температуру од 28 °C и 150 обртаја/мин. Након 48 сати су ерленмајер боце извађене из шејкер инкубатора (слика 9) (Јарак и Ђурић, 2006).



Слика 9. Шејкер инкубатор (фото оригинал)

#### **4.8. Провера ефективности добијених изолата на биљкама пшенице**

На основу морфолошких, физиолошких и биохемијских особина испитиваних изолата, за оглед у судовима са пшеницом, изабрана су три изолата: изолат 16 из Сенте, изолат 4 са Ртња и изолат 19 са Суве Планине. Семе пшенице коришћено је у огледу за испитивање утицаја изолата на почетни пораст. За потребе истраживања коришћене су судови допуњени земљиштем. На инокулисану површину земљишта засејано је по 25 семена пшенице, 100 семена заливано је са 100ml инокулума, док је контрола заливена са 100ml стерилне воде. Инокулум је припремљен у трипстон соја бујону (ТСБ), 24ч култура. Дужина надземног дела биљке (cm) и корена (cm), одређивани су 4 недеље након постављања огледа.

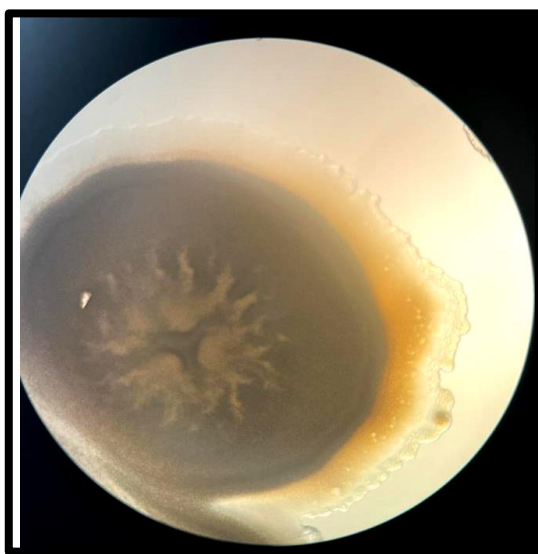
## 5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА СА ДИСКУСИЈОМ

### 5.1. Узимање узорака земљишта

За сврху овог истраживања издвојено је 20 изолата бактерије рода *Bacillus*. Изолати који су узети са Ртња означени су бројевима од 1-11, из Сенте од 12-17 и са Суве Планине од 18-20.

### 5.2. Одређивање морфолошких карактеристика сојева из рода *Bacillus* sp.

Код одабраних 20 изолата *Bacillus* sp. одређене су морфолошке особине колоније и ћелије.



Слика 10. Морфолошке особине колоније, неправилан облик, структура зрнаста, ивица таласаста  
(фото оригинал)

Облик бактерија је претежно округао, код изолата из Сенте и Суве Планине углавном неправилан или кончаст, крупне до средње величине, са разливеним профилем, а код неких благо испупченим (слика 10). Код изолата са Ртња површина је глатка и сјајна а ивица равна, док је код осталих површина избраздана или мат, а ивица влакнаста,

таласаста или ражњевита. Структура је претежно хомогена, код неких може бити кончаста и зрнаста (табела 1).

Табела 1. Мофолошке особине колоније изолата

| Изолати | Облик      | Величина  | Профил         | Површина        | Ивица     | Структура |
|---------|------------|-----------|----------------|-----------------|-----------|-----------|
| 1.      | Округао    | Средње    | Разливен       | Глатка и сјајна | Равна     | Зрнаста   |
| 2       | Округао    | Ситне     | Разливен       | Глатка и сјајна | Равна     | Хомогена  |
| 3.      | Неправилан | Крупне    | Разливен       | Мат             | Ражњевита | Хомогена  |
| 4.      | Неправилан | Крупне    | Разливен       | Мат             | Таласаста | Хомогена  |
| 5.      | Неправилан | Крупне    | Разливен       | Мат             | Таласаста | Хомогена  |
| 6.      | Округао    | Средње    | Разливен       | Глатка и сјајна | Таласаста | Хомогена  |
| 7.      | Округао    | Средње    | Разливен       | Глатка и сјајна | Равна     | Зрнаста   |
| 8.      | Округао    | Ситне     | Разливен       | Глатка и сјајна | Равна     | Хомогена  |
| 9.      | Округао    | Крупне    | Благо испупчен | Глатка и сјајна | Равна     | Хомогена  |
| 10.     | Округао    | Ситне     | Разливен       | Глатка и сјајна | Равна     | Хомогена  |
| 11.     | Кончаст    | Гигантске | Разливен       | Избраздана      | Влакнаста | Кончаста  |
| 12.     | Кончаст    | Гигантске | Разливен       | Избраздана      | Влакнаста | Кончаста  |
| 13.     | Кончаст    | Крупне    | Разливен       | Избраздана      | Граната   | Кончаста  |
| 14.     | Неправилан | Крупне    | Разливен       | Избраздана      | Таласаста | Таласаста |
| 15.     | Неправилан | Средње    | Разливен       | Глатка и сјајна | Таласаста | Хомогена  |
| 16.     | Округао    | Крупне    | Благо испупчен | Избраздана      | Таласаста | Зрнаста   |
| 17.     | Кончаст    | Средње    | Разливен       | Избраздана      | Граната   | Зрнаста   |
| 18.     | Неправилан | Крупне    | Разливен       | Мат             | Режњевита | Хомогена  |
| 19.     | Неправилан | Крупне    | Разливен       | Избраздана      | Режњевита | Хомогена  |
| 20.     | Неправилан | Средње    | Благо испупчен | Избраздана      | Равна     | Зрнаста   |

Све колоније су крем боје, површинске и без промена у подлози. Углавном су све неправилне, а пар полупровидне. Изолати се највише разликују по конзистенцији. Већина њих је брашнасте, а остале воштане и слузаве конзистенције (табела 2).

Табела 2. Морфолошке особине колоније изолата

| Изолати | Боја | Оптичке особине | Промене у подлози | Положај колоније | Конзистенција |
|---------|------|-----------------|-------------------|------------------|---------------|
| 1.      | Крем | Полупровидна    | Без промене       | Површински       | Брашнаста     |
| 2.      | Крем | Полупровидна    | Без промене       | Површински       | Слузава       |
| 3.      | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Брашнаста     |
| 4.      | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Брашнаста     |
| 5.      | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Брашнаста     |
| 6.      | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Брашнаста     |
| 7.      | Крем | Полупровидна    | Без промене       | Површински       | Брашнаста     |
| 8.      | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Слузава       |
| 9.      | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Брашнаста     |
| 10.     | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Воштана       |
| 11.     | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Слузава       |
| 12.     | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Слузава       |
| 13.     | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Воштана       |
| 14.     | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Слузава       |
| 15.     | Крем | Полупровидна    | Без промене       | Површински       | Брашнаста     |
| 16.     | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Слузава       |
| 17.     | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Брашнаста     |
| 18.     | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Брашнаста     |
| 19.     | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Брашнаста     |
| 20.     | Крем | Неправилна      | Без промене       | Површински       | Кожаста       |

Све ћелије испитаних изолата *Bacillus* sp. су штапићастог облика, спорогене, и грам позитивне (слика 11) .



Слика 11. Микроскопски препарат *Bacillus* sp. увећање 1000х (фото оригинал)

### 5.3. Физиолошке карактеристике изолованих сојева из рода *Bacillus* sp.

#### Однос према различитим изворима угљеника

У овом истраживању изолати су се разликовали према способности кориштења различитих извора угљеника (табела 3).

Табела 3. Однос изолата према различитим изворима угљеника

| Изолати | Лактоза | Декстроza | Глукоза | Ксилоза | Фруктоза |
|---------|---------|-----------|---------|---------|----------|
| 1.      | -       | -         | -       | -       | -        |
| 2.      | -       | -         | +       | -       | -        |
| 3.      | +       | +         | +       | +       | +        |
| 4.      | +       | +         | +       | +       | +        |
| 5.      | -       | -         | -       | -       | -        |
| 6.      | -       | -         | -       | -       | -        |

|     |   |   |   |   |   |
|-----|---|---|---|---|---|
| 7.  | - | - | - | - | - |
| 8.  | - | - | - | - | - |
| 9.  | - | - | - | - | - |
| 10. | - | - | - | - | - |
| 11. | - | - | - | - | - |
| 12. | - | - | - | - | - |
| 13. | - | + | + | - | - |
| 14. | - | + | + | + | - |
| 15. | - | + | - | - | - |
| 16. | + | + | + | + | + |
| 17. | - | - | + | - | + |
| 18. | + | + | + | + | + |
| 19. | + | + | + | - | + |
| 20. | - | - | - | - | - |

+ позитивна реакција/производи; - негативна реакција/не производи

Изолати са Ртња под редним бројем 3. и 4. користе све шећере, изолат под редним бројем 2. користи само глукозу, док остали изолати не користе ниједан извор шећера (слика 12). Код изолата из Сенте лактозу користи само 16. изолат, декстрозу користе 13, 14, 15, и 16, глукозу користе 13, 14, 16 и 17, ксилозу 14 и 16, а фруктозу користе 16 и 17. Изолати са Суве Планине под редним броје 18. користи све шећере, 19 све сем ксилозе и 20 не користи ниједан шећер као извор угљеника. Новија истраживања (Akashdeep et al., 2024) указују да изолати *Bacillus* sp. најбоље користе трехалозу као извор шећера.



Слика 12. Промена боје подлоге у жуту је показатељ да изолат користи шећер (фото оригинал)

### Утицај температуре на раст изолата

Табела 4. Утицај температуре на раст изолата

| Изолати    | 4 °C | 10 °C | 28 °C | 37 °C | 45 °C |
|------------|------|-------|-------|-------|-------|
| <b>1.</b>  | +    | +     | ++    | +++   | +++   |
| <b>2.</b>  | o    | o     | ++    | +++   | +++   |
| <b>3.</b>  | +    | +     | ++    | +++   | +++   |
| <b>4.</b>  | +    | +     | ++    | +++   | +++   |
| <b>5.</b>  | +    | +     | +     | +     | +     |
| <b>6.</b>  | +    | +     | ++    | +++   | +++   |
| <b>7.</b>  | +    | +     | ++    | +++   | +++   |
| <b>8.</b>  | +    | +     | ++    | +++   | +++   |
| <b>9.</b>  | +    | +     | o     | +     | +     |
| <b>10.</b> | +    | +     | ++    | +++   | +++   |
| <b>11.</b> | +    | +     | ++    | ++    | +     |
| <b>12.</b> | +    | +     | ++    | ++    | +     |
| <b>13.</b> | +    | +     | ++    | +++   | +     |
| <b>14.</b> | +    | +     | ++    | ++    | ++    |
| <b>15.</b> | +    | +     | ++    | +++   | +++   |
| <b>16.</b> | +    | +     | ++    | ++    | +++   |
| <b>17.</b> | +    | +     | ++    | +++   | +     |
| <b>18.</b> | +    | +     | ++    | +++   | ++    |
| <b>19.</b> | +    | +     | ++    | +++   | ++    |
| <b>20.</b> | +    | +     | +     | +     | +     |

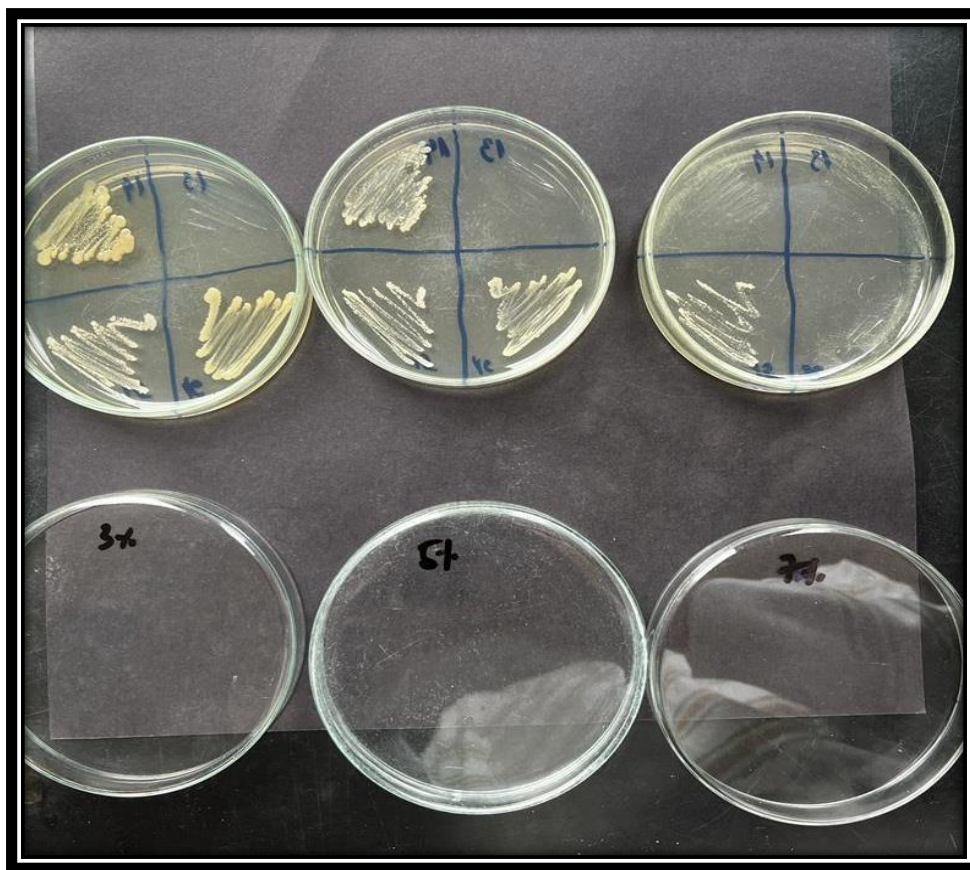
+минимални раст бактерија; ++ оптималан раст бактерија ; +++ интензиван раст бактерија; o колоније бактерија не расту у испитиваним условима

На температурама од 4 °C и 10 °C примећујемо минимални раст бактерија код свих изолата сем код изолата број 2. На 28 °C је присутан оптимални раст бактерија, осим код изолата 5, 9, и 20. За бактеријски раст на температурама од 37 °C и 45 °C уочен је интензиван раст код готово свих изолата сем код 5, 9 и 20, као и код 11, 12 и 13 где је уочен минимални раст. Из овога закључујемо да су бактерије претежно мезофили чији је оптимални раст на температурама од 28 °C (табела 4). За разлику од наших резултата у истраживањима Kim et al. (1997) код конципирања биопрепарата на бази *Bacillus* sp. изолат Л324-92 и Л324-92 су расли боље од *B. subtilis* A13 и 15 на 20 °C. Изолат Л324-92 је растао на 10 °C, али A13 није растао на 3 °C. Изолат Л324-92 је такође растао на

температурама од чак 4° C, са временом удвостручавања од 55,2 сата између 7 и 14 дана након инокулације.

### **Однос према различитој концентрацији NaCl-а и рН вредностима**

Изолати *Bacillus* sp. прилично успешно расту на подлози са 3% NaCl (слика 13). Оптималан раст утврђен је код осам изолата, а минималан раст код 10 изолата. Само два изолата (изолат 13 и 20) нису расли на овој подлози (табела 5). У присуству 5% NaCl већина изолата испољава минимални раст док се код изолата 5, 13, 17 и 20 не види раст. Код подлоге са 7% NaCl 50% изолата је остварио минималан раст, док остали изолати нису уопште могли расти на овој подлози.



Слика 13. Раст на подлогама са различитом концентрацијом NaCl (фото оригинал)

На подлогама од вредности рН 7 примећује се оптимални раст бактерија код готово свих изолата осим код изолата 5 и 10, где је утврђен минимални раст, и изолата број 9 код кога раст није уочен. На подлози рН 5 раст бактерија је био минималан, осим код изолата 4 и 20, где није забележен раст и изолата 17 где је уочен оптимални раст. Код рН 9 три изолата нису испољила раст (5, 9 и 20). Минимални раст уочава се код 11

изолата, док је код остали изолата утврђен оптималан раст. Из овога можемо закључити да су изолати изразити неутрофилни до благо алкалофилни микроорганизми (табела 5).

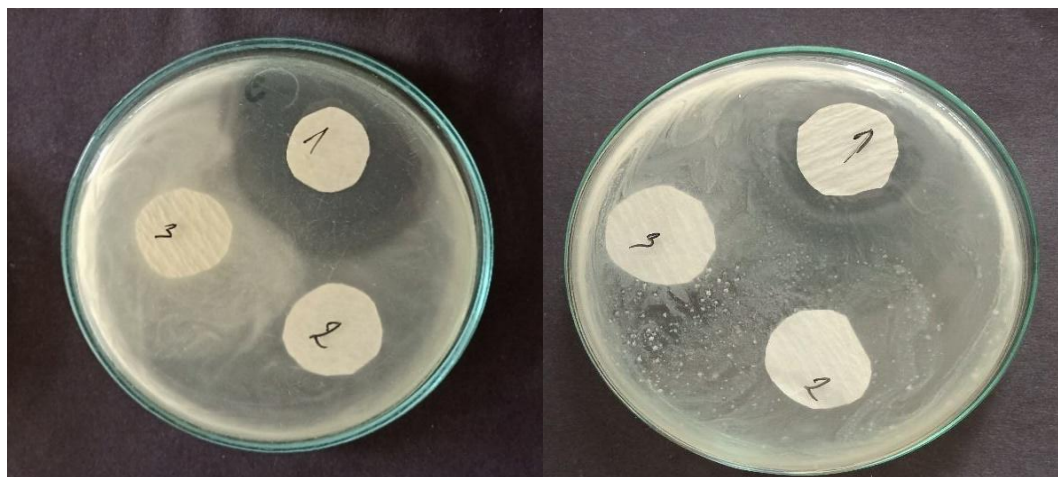
Табела 5. Раст изолата *Bacillus* sp. на подлогама са различитом концентрацијом NaCl и pH

| Изолати | NaCl<br>3% | NaCl<br>5% | NaCl<br>7% | pH<br>5 | pH<br>7 | pH<br>9 |
|---------|------------|------------|------------|---------|---------|---------|
| 1.      | ++         | +          | +          | +       | ++      | +       |
| 2.      | ++         | +          | +          | +       | ++      | +       |
| 3.      | ++         | +          | +          | +       | ++      | +       |
| 4.      | ++         | +          | +          | +       | ++      | +       |
| 5.      | +          | 0          | 0          | 0       | +       | 0       |
| 6.      | ++         | +          | +          | +       | ++      | +       |
| 7.      | ++         | +          | +          | +       | ++      | +       |
| 8.      | ++         | +          | +          | +       | ++      | ++      |
| 9.      | +          | ++         | 0          | +       | 0       | 0       |
| 10.     | ++         | +          | 0          | +       | ++      | ++      |
| 11.     | +          | +          | 0          | +       | ++      | ++      |
| 12.     | +          | +          | 0          | +       | ++      | ++      |
| 13.     | 0          | 0          | 0          | +       | ++      | ++      |
| 14.     | +          | +          | 0          | +       | ++      | +       |
| 15.     | +          | +          | +          | +       | ++      | +       |
| 16.     | +          | +          | 0          | +       | ++      | +       |
| 17.     | +          | 0          | 0          | ++      | ++      | ++      |
| 18.     | +          | +          | +          | +       | ++      | +       |
| 19.     | +          | +          | +          | +       | ++      | +       |
| 20.     | 0          | 0          | 0          | 0       | +       | 0       |

+ минимални раст бактерија; ++ оптималан раст бактерија ; +++ интензиван раст бактерија; 0 колоније бактерија не расту у испитиваним условима

### Отпорност на тешке метале

Изолати *Bacillus* sp. у раствору CdCl<sub>2</sub> формирају зоне инхибиције (слика 14). Четири изолата са Ртња (3, 4, 5 и 9) формирају зону инхибиције већу од 1,1 cm, остали праве зону од 0,6 - 1,0 cm, док изолат 10 формира од 0,0-0,5 cm. Изолати из Сенте 14 и 13 имају зону инхибиције већу од 1,1 cm, 12 и 15 од 0,6 - 1,0 cm и 14 и 7 и 13 формирају од 0,0-0,5 cm. Са Суве Планине изолати 18 и 20 инхибирају зону већу од 1,1 cm, а 19 од 0,0-0,5 cm. Код раствора мангана и олова изолати не испољавају никаву реакцију (табела 6).



Слика 14. Зоне инхибиције на третираним изолатима растворима тешких метала (фото оригинал)

Табела 6. Отпорност изолата на тешке метале

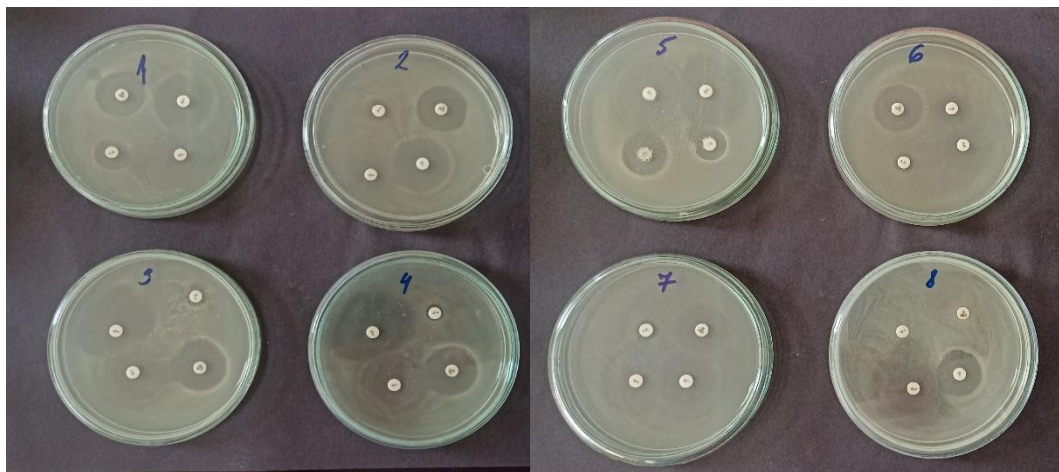
| Изолати | $\text{CdCl}_2$ | $\text{PbCl}_2$ | $\text{MnCl}_2$ |
|---------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1.      | --              | +               | +               |
| 2.      | --              | +               | +               |
| 3.      | ---             | +               | +               |
| 4.      | ---             | +               | +               |
| 5.      | ---             | +               | +               |
| 6.      | --              | +               | +               |
| 7.      | --              | +               | +               |
| 8.      | --              | +               | +               |
| 9.      | ---             | +               | +               |
| 10.     | -               | +               | +               |
| 11.     | --              | +               | +               |
| 12.     | --              | +               | +               |
| 13.     | -               | +               | +               |
| 14.     | ---             | +               | +               |
| 15.     | --              | +               | +               |
| 16.     | ---             | +               | +               |
| 17.     | -               | +               | +               |
| 18.     | ---             | +               | +               |
| 19.     | -               | +               | +               |
| 20.     | ---             | +               | +               |

(+) без зоне инхибиције ; (-) зона инхибиције од 0,0-0,5 cm; (++) зона инхибиције од 0,6-1,0 cm; (---) зона инхибиције већа од 1,1 cm ;

### Отпорност према антибиотицима

Испитивани изолати показали су различиту отпорност према пеницилину (слика 15) (табела 7). Највећа зона инхибиције (од 0,4 cm до 0,7 cm) измерена је код изолата 1, 5,

9 и 18, док код изолата број 8, 10, 11, 12, 13, 14 и 17 није утврђено њено постојање. Према антибиотику Chloramphenicol 7 изолата је показало отпорност, а код 9 изолата су измерене зоне инхибиције веће од 0,8 cm. У овим истраживањима ниједан испитивани изолат није показао отпорност према антибиотцима Streptomycin и Ceftriaxon. У случају антибиотика Streptomycin, зоне инхибиције веће од 0,8 cm измерене су код 12 изолата, док је у случају антибиотика Ceftriaxon то било утврђено код 15 изолата.



Слика 15. Различито деловање антибиотика на изолате (фото оригинал)

Табела 7. Отпорност изолата на антибиотике

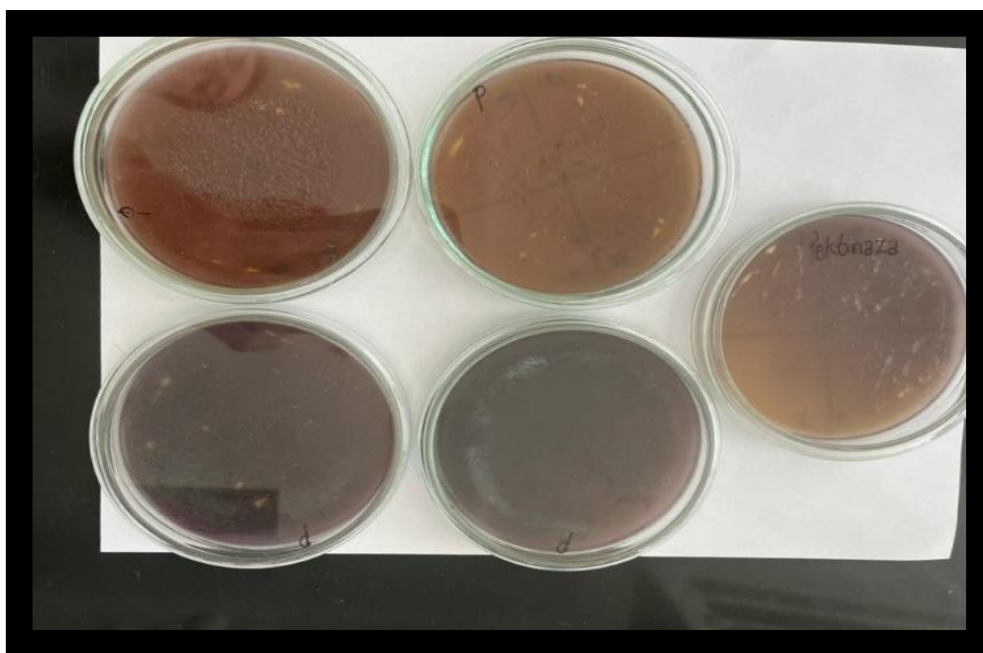
| Изолати | Penicillin | Chloramphenicol | Streptomycin | Ceftriaxon |
|---------|------------|-----------------|--------------|------------|
| 1.      | --         | ---             | --           | ---        |
| 2.      | -          | ---             | --           | ---        |
| 3.      | -          | ---             | ---          | ---        |
| 4.      | -          | ---             | ---          | ---        |
| 5.      | --         | --              | ---          | ---        |
| 6.      | -          | ---             | --           | --         |
| 7.      | -          | ---             | --           | ---        |
| 8.      | +          | +               | ---          | ---        |
| 9.      | --         | ---             | ---          | ---        |
| 10.     | +          | +               | ---          | ---        |
| 11.     | +          | +               | ---          | -          |
| 12.     | +          | +               | ---          | ---        |
| 13.     | +          | -               | ---          | ---        |
| 14.     | +          | -               | --           | --         |
| 15.     | -          | ---             | --           | ---        |
| 16.     | -          | +               | --           | ---        |
| 17.     | +          | +               | ---          | ---        |
| 18.     | --         | ---             | ---          | ---        |

|            |   |   |     |    |
|------------|---|---|-----|----|
| <b>19.</b> | - | - | --- | -- |
| <b>20.</b> | - | + | --  | -- |

(+) без зоне инхибиције ; (-) зона инхибиције од 0,0-0,3 cm; (--) зона инхибиције од 0,4-0,7 cm; (---) зона инхибиције већа од 0,8 cm ;

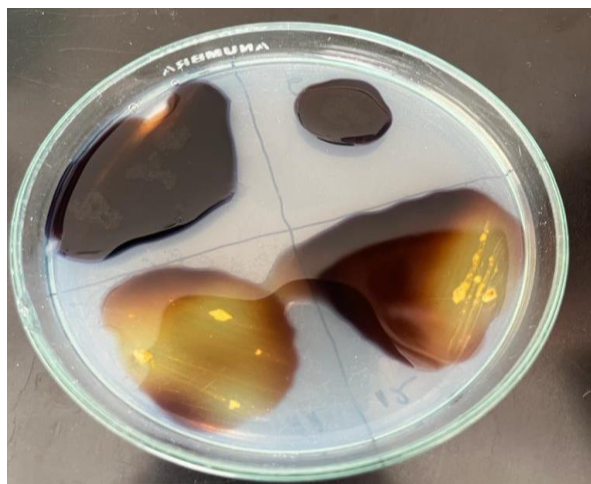
#### 5.4. Биохемијске карактеристике сојева из рода *Bacillus* sp.

Ниједан од издвојених изолата није показао позитивну реакцију када је у питању ензим пектиназа (слика 16) (табела 8).



Слика 16. Приказ изолата који не продукују ензим пектиназу (фото оригинал)

Липазу продукују изолати 1, 7, 8, 10 и 15, док код других продукција није уочена. Изолати који немају способност да хидролизују скроб су 9, 10, 18 и 20, док је код остатка изолата способност присутна (слика 17).



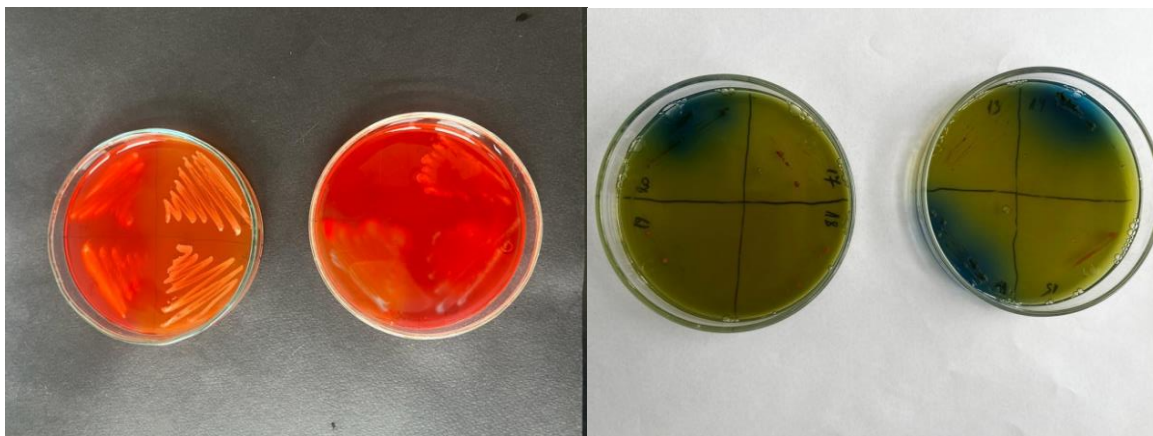
Слика 17. Хидролиза скроба (фото оригинал)

Способност продукције целулазе код изолата са Ртња испољавају сви осим изолата број 11 (слика 18). Другачију ситуацију имамо код изолата из Сенте где само један изолат (15) продукује ензим целулазу, а са Суве Планине сва три изолата имају способност продукције овог ензима. Разградња урее констатована је само код изолата 1, 5, 7, 15 и 16, а коришћење цитрата код изолата број 6, 14, 16, и 20.

Табела 8. Способност изолата да продукују ензиме

| Изолати | Липаза | Амилаза | Пектиназа | Целулаза | Уреаза | Цитрати |
|---------|--------|---------|-----------|----------|--------|---------|
| 1.      | +      | +       | -         | +        | +      | -       |
| 2.      | -      | +       | -         | +        | -      | -       |
| 3.      | -      | +       | -         | +        | -      | -       |
| 4.      | -      | +       | -         | +        | -      | -       |
| 5.      | -      | +       | -         | +        | +      | -       |
| 6.      | -      | +       | -         | +        | -      | +       |
| 7.      | +      | +       | -         | +        | +      | -       |
| 8.      | +      | +       | -         | +        | -      | -       |
| 9.      | -      | -       | -         | +        | -      | -       |
| 10.     | +      | -       | -         | +        | -      | -       |
| 11.     | -      | +       | -         | -        | -      | -       |
| 12.     | -      | +       | -         | -        | -      | -       |
| 13.     | -      | +       | -         | -        | -      | -       |
| 14.     | -      | +       | -         | -        | -      | +       |
| 15.     | +      | +       | -         | +        | +      | -       |
| 16.     | -      | +       | -         | -        | +      | +       |
| 17.     | -      | +       | -         | -        | -      | -       |
| 18.     | -      | -       | -         | +        | -      | -       |
| 19.     | -      | +       | -         | +        | -      | -       |
| 20.     | -      | -       | -         | +        | -      | +       |

+ позитивна реакција/продукује; - негативна реакција/не продукује

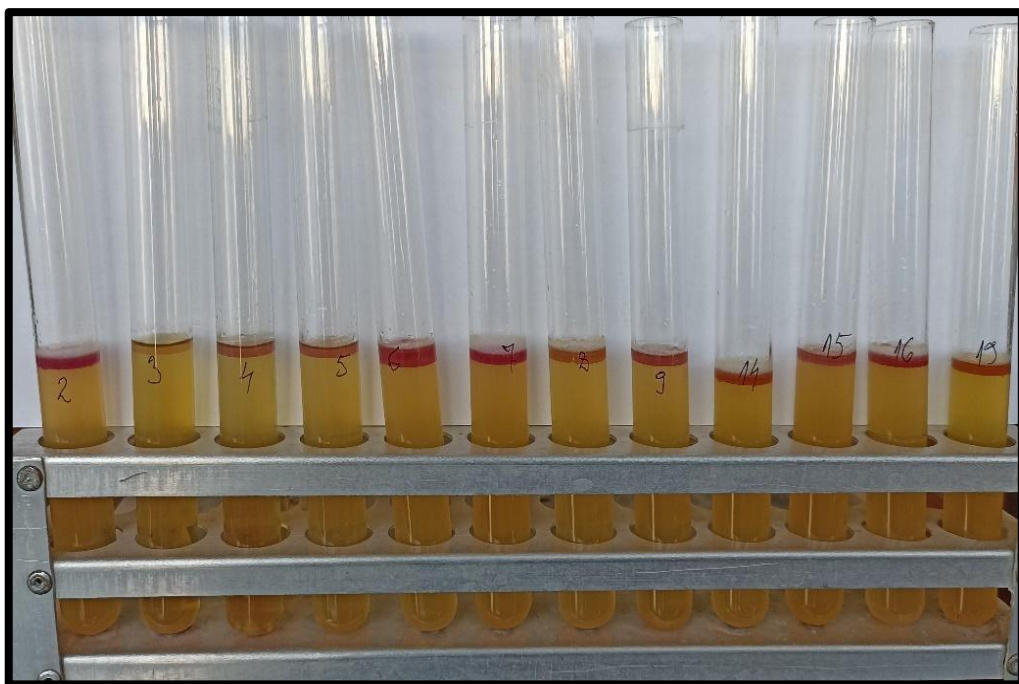


Слика 18. Продукција целулазе - лево, коришћење цитрата – десно (фото оригинал)

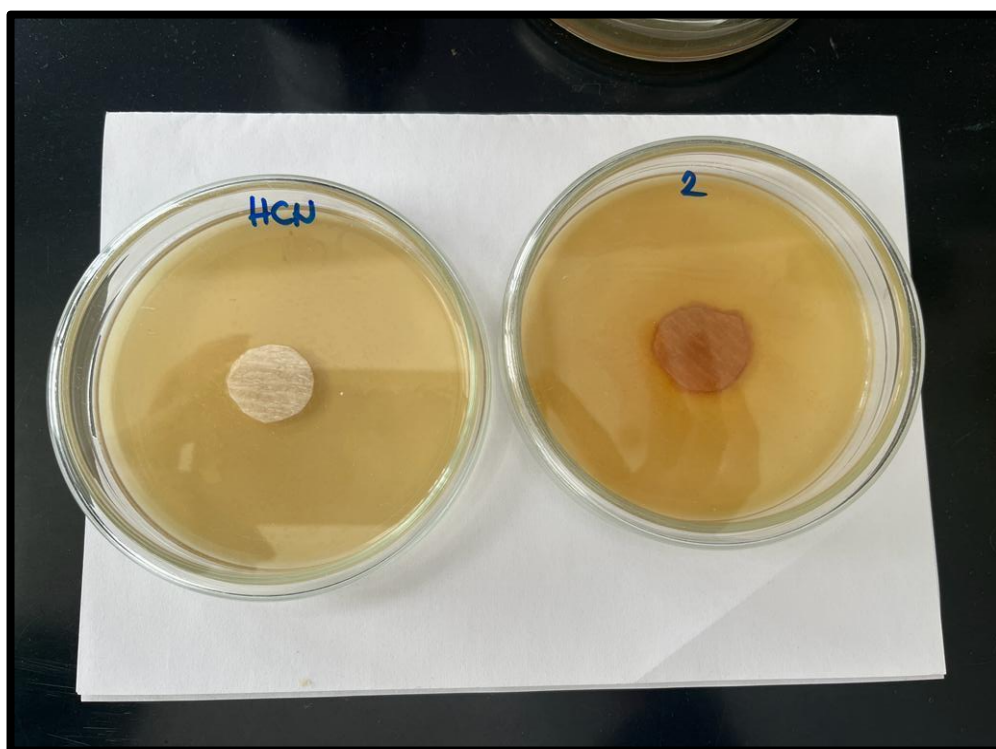
### 5.5. Продукција материја раста

Од свих испитаних изолата, изолати број 1, 3, 10, 11, 12, 12, 17 и 18 не продукују индол-сирћетну киселину. Код осталих изолата примећујемо појаву црвеног прстена што нам доказује производњу IAA (слика 19). Сви изолати осим изолата број 3, 4, 5, 9, 16 и 18, имају способност продукције HCN-а (слика 20). Једини изолат који има способност растварања органских једињења фосфора јесте изолат број 11 (слика 21), а изолати који имају способност растварања неорганских једињења фосфора су изолати број 1, 6, и 7 (табела 9).

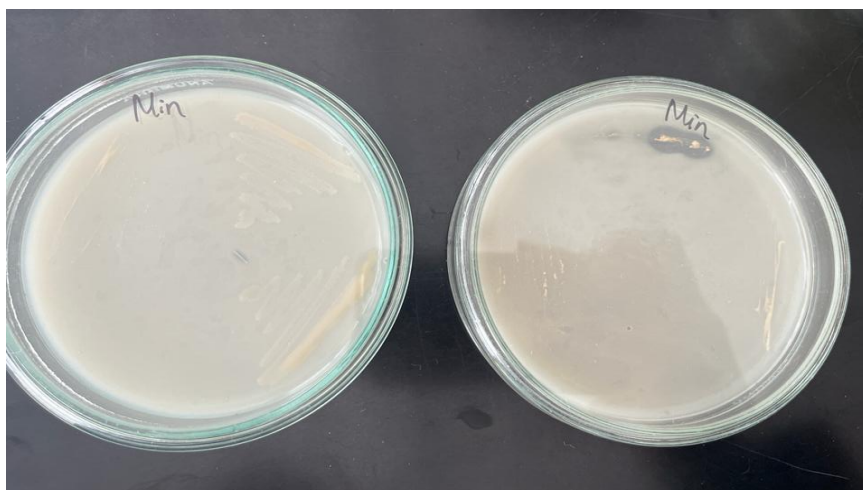
Продукција IAA варира како између врста рода *Bacillus* тако и између самих изолата. У истраживањима Cherif-Silini et al. (2016) анализа варијансе је показала да је производња IAA била статистички значајно различита при  $P < 0,01$ . Према подацима сојеви *Bacillus* су имали веома различите стопе производње. Ове варијације су се кретале од 0  $\mu\text{g/mL}$  (B6, B15, B16, B19) до 19,50  $\mu\text{g/mL}$ . Максималном продукцију имали су изолати D4 (19,5  $\mu\text{g/mL}$ ) и D7 (10,35  $\mu\text{g/mL}$ ).



Слика 19. Продукција IAA (фото оригинал)



Слика 20. Изолат који продукује HCN - десно и који не продукује – лево (фото оригинал)



Слика 21. Растварање органских једињења фосфора (фото оригинал)

Табела 9. Продукција материја раста

| Изолати | IAA | HCN | Минерализатори | Мобилизатори |
|---------|-----|-----|----------------|--------------|
| 1.      | -   | +   | -              | +            |
| 2.      | +   | +   | -              | -            |
| 3.      | -   | -   | -              | -            |
| 4.      | +   | -   | -              | -            |
| 5.      | +   | -   | -              | -            |
| 6.      | +   | +   | -              | +            |
| 7.      | +   | +   | -              | +            |
| 8.      | +   | +   | -              | -            |
| 9.      | +   | -   | -              | -            |
| 10.     | -   | +   | -              | -            |
| 11.     | -   | +   | +              | -            |
| 12.     | -   | +   | -              | -            |
| 13.     | -   | +   | -              | -            |
| 14.     | +   | +   | -              | -            |
| 15.     | +   | +   | -              | -            |
| 16.     | +   | -   | -              | -            |
| 17.     | -   | +   | -              | -            |
| 18.     | -   | -   | -              | -            |
| 19.     | +   | +   | -              | -            |
| 20.     | +   | +   | -              | -            |

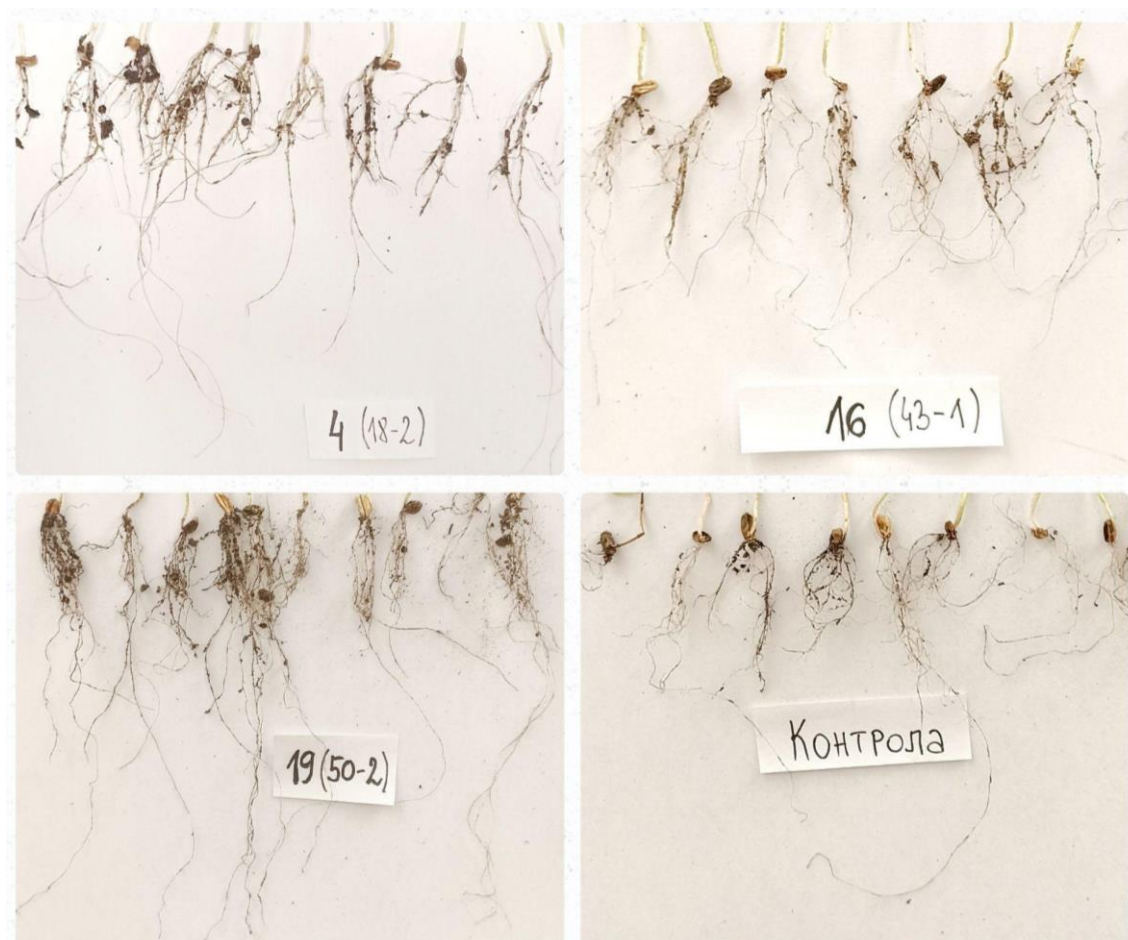
(+) позитивна реакција / продукује/ врши разлагање; (-) негативна реакција / не продукује/ не врши разлагање

## 5.6. Провера ефективности одабраних изолата на биљкама пшенице

За потребе испитивања ефективности примене изолата на раст и развој пшенице, од 20 изолата одабрана су три изолата, и то изолати број 4, 16 и 19. Ови изолати издвојили

су се по својим физиолошким и биохемијским својствима, као и особинама које их сврставају у промоторе биљног раста.

Резултати ових истраживања нас упућују на закључак да постоје разлике у дужини корена између контроле и третираних биљака (слика 22) (табела 10).



Слика 22. Разлика у дужини корена у поређењу са контролном групом (фото оригинал)

Табела 10. Утицај примене изабраних изолата на дужину корена пшенице (cm)

| Пшеница (корен) | Контрола | Изолат број 16 | Изолат број 4 | Изолат број 19 |
|-----------------|----------|----------------|---------------|----------------|
| 1               | 4,4      | 13,5           | 7,1           | 12,5           |
| 2               | 4,1      | 8,5            | 9,5           | 13,7           |
| 3               | 3,8      | 10,4           | 15            | 9              |
| 4               | 11,9     | 8,1            | 14            | 13,7           |
| 5               | 13,9     | 6,7            | 12,4          | 11             |
| 6               | 7,2      | 9,3            | 4,4           | 5,3            |
| 7               | 10,2     | 10,5           | 9,9           | 7,9            |
| 8               | 5        | 8,9            | 7,4           | 9,4            |

|                   |        |        |        |        |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|
| <b>9</b>          | 26     | 12,4   | 10,5   | 14     |
| <b>10</b>         | 4,3    | 12,2   | 15,9   | 14,7   |
| <b>Просек</b>     | 9,08   | 10,05  | 10,61  | 11,12  |
| <b>% повећања</b> | 100,00 | 110,68 | 116,85 | 122,47 |

Повећање дужине корена пшенице кретало се од 10,68% до 22,47% у зависности од примењеног изолат.

Примењени изолати имали су позитиван ефекат на дужину стабла пшенице (слика 23) (табела 11). Проценат повећање се кретао у распону од 30,90% до 36,21%. У просеку, на дужину стабла пшенице највећи ефекат имала је примена изолат број 16, а код корена изолат број 19.

Табела 11. Утицај примене изабраних изолат на дужину стабла пшенице (cm)

| <b>Пшеница (стабло)</b> | <b>Контрола</b> | <b>Изолат број 16</b> | <b>Изолат број 4</b> | <b>Изолат број 19</b> |
|-------------------------|-----------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| <b>1</b>                | 13,3            | 24,7                  | 24,1                 | 23                    |
| <b>2</b>                | 16,5            | 24,2                  | 24,5                 | 20,9                  |
| <b>3</b>                | 15,8            | 23,5                  | 24,6                 | 18,5                  |
| <b>4</b>                | 18,3            | 20,5                  | 22,5                 | 27,4                  |
| <b>5</b>                | 23,4            | 22,3                  | 18,3                 | 21,5                  |
| <b>6</b>                | 17,7            | 23                    | 23,8                 | 18,8                  |
| <b>7</b>                | 20,6            | 25,9                  | 27                   | 22,4                  |
| <b>8</b>                | 17,9            | 20,9                  | 25,6                 | 20,2                  |
| <b>9</b>                | 9,1             | 24,4                  | 19,7                 | 24,7                  |
| <b>10</b>               | 18,6            | 23,8                  | 22,2                 | 26,7                  |
| <b>Просек</b>           | 17,12           | 23,32                 | 23,23                | 22,41                 |
| <b>% повећања</b>       | 100,00          | 136,21                | 135,69               | 130,90                |

Табела 12. Утицај примене изабраних изолат на дужину надземног дела и корен пшенице (cm)

| <b>Варијанте</b> | <b>Дужина надземног дела (cm)</b> | <b>Дужина корена (cm)</b> |
|------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| <b>Контрола</b>  | 17,1200 a*                        | 9,0800 a                  |
| <b>Изолат 16</b> | 23,3200 b                         | 10,0500 a                 |
| <b>Изолат 4</b>  | 23,2300 b                         | 10,6100 a                 |
| <b>Изолат 19</b> | 22,4100 b                         | 11,1200 a                 |

\*Различита слова указују на постојање статистички значајне разлике између испитиваних варијанти након спроведеног Fisher-овог теста значајности разлика за једнофакторијални оглед са вероватноћом  $p=0,05$ .

На основу резултата статистичке анализе добијених резултата, примењени сојеви *Bacillus* sp.су утицали на статистички значајно повећање висине надземног дела (стабла) пшенице. Код корена је забележено повећање дужине али оно није статистички значајно.



Слика 23. Разлика у дужини стабла у поређењу са контролном групом (фото оригинал)

Испитујући утицај примене изолата *Bacillus* sp. и *Pseudomonas* sp. на принос јаре пшенице и и јарог јечма Kim et al. (1997) дошли су до следећих закључака. *Bacillus* sp. изолат Л324-92 значајно је повећао приносе јаре пшенице директно сејане у стајаће стрниште, као и јаре пшенице и јарог јечам у посебним пољским огледима 1993.

## 6. ЗАКЉУЧАК

На основу спроведених истраживања морфолошких особина примећује се да је облик колоније изолата углавном био неправилан и округао, профил разливен, а ивица претежно равна или таласаста. Колоније изолата су средње величине, са глатком и сјајном површином, хомогене структуре. Све ћелије испитиваних изолата *Bacillus* sp. су штапићастог облика, спорогене, и грам позитивне.

Физиолошком карактеризацијом утврђено је да изолати 3, 4, 1 и 18 користе све испитане шећере као извор енергије. Највећи раст бактерија присутан је на температурама од 28°C до 45 °C, на вредности од pH 7 и концентрацији NaCl 3%. Од тешких метала највише на изолате је инхибиторно утицао кадмијум, а од антибиотика streptomycin и ceftriaxon.

Способност изолата да продукују ензиме је разноврсна. У највећој мери хидролизују скроб и целулазу, док хидролиза пектина није уочена ни код једног изолата. Продукција индол-сирћетне киселине и HCN-а је присутна код већине изолата, а способност растварања фосфата мала.

Увећање дужине корена и надземног дела пшенице која је инокулисана одабраним изолатима, указује на позитиван ефекат изолата број 4, 16 и 19 на раст и развој биљака пшенице.

## 7. ЛІТЕРАТУРА

- Akashdeep, Kumari, S., & Rani, N. (2024). Novel cereal bran based low-cost liquid medium for enhanced growth, multifunctional traits and shelf life of consortium biofertilizer containing *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas* sp. *Journal of Microbiological Methods*, Volume 222, July 2024, 106952
- Celandroni, F., Vecchione, A., Cara, A., Mazzantini, D., Lupetti, A., Ghelardi, E. (2019). Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotic formulations. *PLoS One*, 14(5).
- Cherif-Silini, H., Silini, A., Yahiaoui, B., Ouzari, I., & Boudabous, A. (2016). Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. *Annals of Microbiology*, 66(7), 1087–1097.
- Dal Cortivo, C., Ferrari, M., Visioli, G., Lauro, M., Fornasier, F., Barion, G., Panozzo, A., & Vamerali, T. (2020). Effects of seed-applied biofertilizers on rhizosphere biodiversity and growth of common wheat (*Triticum aestivum* L.) in the field. *Frontiers in Plant Science*, 11, 72.
- Elnahal, A. S., El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Desoky, E. S. M., El-Tahan, A. M., Rady, M. M., et al. (2022). The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. *European Journal of Plant Pathology*. 162, 759–792.
- Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clausse, M.L., Courier, S., Le Roux, C., Raaijmakers, J., Martinotti, M.G., Pierrat, J.C., Garbaye, J. (2005). Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist*, 165(2), 317–328.
- García, J. A. L., Probanza, A., Ramos, B., Palomino, M. R., & Mañero, F. J. G. (2004). Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomie for Sustainable Development*, 24(Suppl 4), 169–176.
- Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. (1994). Methods for General and Molecular Bacteriology. ASM Press, Washington, D.C.

Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 329–339.

Gordon , S.A., Weber , R.P. (1951). Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant Physiology* 26 , 192 – 197.

Hugh, R., Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria . *Journal of Bacteriology* 66, 24 – 26.

Jafari T., Stamenov D., Đurić S, (2020). Proizvodnja i primena biopreparata, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.

Karnwal A. (2012). Screening od plant growth promoting rhizobacteria from maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum*), volume 12, No. 3, 6170-6183

Kasing , A. (1995). Cellulase production , Practical biotechnology , Sarawak, Malaysia .

Kim, D.-S., Cook, R. J., & Weller, D. M. (1997). *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*, 87(5), 551.

Kumar A., Prakash A., Johri B.N. (2011). *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem, Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 37–59

Kundan R., Pant G., Jadon N., Kumar Agarawai P. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Mechanism and Current Prospective, *Journal of Fertilizers & Pesticides*, 6 (2).

Lanyi, B. (1987). Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods in Microbiology*, 19, 1– 67.

Menkina, R.A. (1961). Rol *Bacillus megaterium* var phosphaticum b pitanii rastenij. Mikroorganizmi i efektivnoje plodprodiye počv. Akademii Nauk. SSSR. 238-245.

Mrkovački N., Jarak M., Đalović I., Jocković I. (2012). Značaj i efekat primene PGPR na mikrobiološku aktivnost u rizosferi kukuruza, pregledni članak, *Ratar. Povrt.* 49(3),335-344

Neilands, J.B. (1995). Siderophores - Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26723-26726.

Nicholson, W. (2002). Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 410-416.

Pikovskaya, R.I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activities by some microbial species. *Microbiologia*, 17, 362-370.

Rayavarapu, B. G., & Tallapragada, P. (2016). *Bacillus* sp. as potential plant growth promoting rhizobacteria. *International Journal of Advanced Life Sciences*, 9(1), 1-7.

Rodina, A.G. (1972). *Methods in Aquatic microbiology*. Ed. Colwell, R. and Zambruski, M.. University Park Press, Baltimore and Butterworth and Co Ltd., London.

Saharan BS., Nehra V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review, *Life Sciences and Medicine Research*, Vol 2011: LSMR-21

Salisbury, F. B., Ross, C. W. (1992). *Plant Physiology*. Belmont, CA: Wadsworth., 357-407.

Sambrook J., Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (3rd Edition, Vol. 1), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Singh, R., Mader, P., Kaiser, F., Adholeya, A., Uppal, H. S., Sharma, A. K., Srivastava, R., Sahai, V., Aragno, M., Wiemken, A., Johri, B., Fried, P. (2011). Inoculation of root microorganisms for sustainable wheat–rice and wheat–black gram rotations in India. *Soil Biology & Biochemistry* 43, 609 – 619.

Sivasakthi S., Usharani G., Saranraj P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review, *African Journal Of Agricultural Research*, 9(17), 1266-1277.

Soares, M.M., da Silva, R., Carmona, E.C, Gomes, E. (2001). Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 79–82.

Soriano, M., Diaz, P., Pastor, F.I.J. (2000). Pectinolytic systems of two aerobic sporogenous bacterial strains with high activity on pectin. *Current Microbiology*, 50, 114–118.

Stamenov D., Đurić S., Jafari Hajnal T., Ćirić V., Manojlović M. (2018). Microbiological Activity in the Soil of Various Agricultural Crops in Organic Production. *Contemporary Agriculture* 67(1), 34-39.

Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, van Loon LC, et al. (2004). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, 895–908.

Говедарица , М., Јарак , М. (1999). Практикум из микробиологије, Пољопривредни факултет, Нови Сад .

Јарак М., Ђурић, С. (2006). Практикум из микробиологије, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, Нови Сад.

Ћирић, С. (2014). Микробиологија практикум. Универзитет у Приштини, Пољопривредни факултет, Косовска Митровица–Лешак.