



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

Департман за ратарство и повртарство



Миња Дапчевић, дипл.инж.

**ИЗОЛАЦИЈА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА БАКТЕРИЈА ПРОМОТОРА
РАСТА ИЗ РИЗОСФЕРЕ ДИВЉИХ ЛЕКОВИТИХ БИЉАКА**

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2023



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Департман за ратарство и повртарство



Кандидат
Миња Дапчевић, дипл.инж

Ментор
проф др.Тимеа Хајнал Јафари

**ИЗОЛАЦИЈА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА БАКТЕРИЈА ПРОМОТОРА
РАСТА ИЗ РИЗОСФЕРЕ ДИВЉИХ ЛЕКОВИТИХ БИЉАКА**

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2023

КОМИСИЈА ЗА ОЦЕНУ И ОДБРАНУ МАСТЕР РАДА:

Др Тимеа Хајнал Јафари, ванредни професор

Ужа научна област: Микробиологија

Пољопривредни факултет, Нови Сад

-Ментор-

Др Драгана Стаменов, доцент

Ужа научна област: Микробиологија

Пољопривредни факултет, Нови Сад

-Председник-

Др Снежана Анђелковић, виши научни сарадник

Ужа научна област: Биотехничке науке-пољопривреда

Институт за крмно биље, Крушевац

-Члан-

Садржај

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	2
2.1. РИЗОСФЕРА ЛЕКОВИТИХ БИЉАКА.....	2
2.1.1. <i>Achilea millefolium</i> (Хајдучка трава).....	2
2.1.2. <i>Agrimonia eupatoria</i> (Петровац/Рањеник).....	3
2.1.3. <i>Mentha longifolia</i> (Нана).....	3
2.1.4. <i>Plantago lanceolata</i> (Усколисна боквица).....	4
2.1.5. <i>Stachys sylvatica</i> (Шумски чистац).....	4
2.1.6. <i>Centaurea jaceae</i> (Различак).....	5
2.2. Коренски ексудати.....	5
2.3. Бактерије промотори биљног раста.....	6
2.3.1. <i>Pseudomonas</i> sp.	7
2.3.2. <i>Bacillus</i> sp.	8
2.3.3. <i>Azotobacter</i> sp.	8
2.3.4. <i>Streptomyces</i> sp.	9
2.4. Примена бактерија у биљној производњи.....	10
2.4.1. Примена биопрепарата.....	10
2.4.2. Примена биопрепарата у производњи лековитог биља.....	11
3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА.....	12
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА.....	13
4.1. Одређивање бројности микроорганизама.....	13
4.2. Изолација бактерија.....	14
4.3. Карактеризација бактерија.....	15
4.3.1. Морфолошка карактеризација изолата.....	15
4.3.2. Физиолошка карактеризација изолата.....	16
4.3.3. Биохемијска карактеризација изолата.....	17
4.3.4. ПГП карактеризација изолата.....	18
4.4. Статистичка обрада података.....	19
5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА СА ДИСКУСИЈОМ.....	20
5.1. Бројност микроорганизама у ризосфери лековитих биљака.....	20

5.2. Морфолошка карактеризација бактерија из ризосфере лековитих биљака.....	21
5.2.1. Морфолошка карактеризација бактерија рода <i>Pseudomonas</i>	21
5.2.2. Морфолошка карактеризација бактерија рода <i>Bacillus</i>	23
5.2.3. Морфолошка карактеризација бактерија рода <i>Azotobacter</i>	25
5.2.4. Морфолошка карактеризација бактерија рода <i>Streptomyces</i>	27
5.3. Физиолошке особине бактерија из ризосфере лековитих биљака.....	29
5.3.1. Физиолошке особине бактерија рода <i>Pseudomonas</i>	29
5.3.2. Физиолошке особине бактерија рода <i>Bacillus</i>	31
5.3.3. Физиолошке особине бактерија рода <i>Azotobacter</i>	34
5.3.4. Физиолошке особине бактерија рода <i>Streptomyces</i>	36
5.4. Биохемијска карактеризација изолата из ризосфере лековитих биљака	39
5.4.1. Биохемијска карактеризација бактерија рода <i>Pseudomonas</i>	39
5.4.2. Биохемијска карактеризација бактерија рода <i>Bacillus</i>	40
5.4.3. Биохемијска карактеризација бактерија рода <i>Azotobacter</i>	41
5.4.4. Биохемијске карактеризација бактерија рода <i>Streptomyces</i>	42
5.5. ПГП карактеризација изолата из ризосфере лековитих биљака.....	42
5.5.1. ПГП карактеризација бактерија рода <i>Pseudomonas</i>	42
5.5.2. ПГП карактеризација бактерија рода <i>Bacillus</i>	43
5.5.3. ПГП карактеризација бактерија рода <i>Azotobacter</i>	44
5.5.4. ПГП карактеризација бактерија рода <i>Streptomyces</i>	45
5.5.5. Бактерије промотори раста из ризосфере дивљих лековитих биљака	46
6. ЗАКЉУЧАК.....	48
7. ЛИТЕРАТУРА.....	50

ИЗОЛАЦИЈА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА БАКТЕРИЈА ПРОМОТОРА РАСТА ИЗ РИЗОСФЕРЕ ДИВЉИХ ЛЕКОВИТИХ БИЉАКА

Миња Дапчевић

РЕЗИМЕ

Бројна истраживања у свету показују да је ризосфера лековитог биља веома специфична. Ризосферу настањују различите бактерије са ППП својствима због продукције и секреције секундарних метаболита које позитивно утичу на раст биљака. Различити су им механизми деловања, побољшавају доступност хранљивих материја, спречавају развој патогених микроорганизама, регулишу продукцију биљних хормона. У овом раду су изоловане бактерије рода *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Streptomyces* из ризосфере дивљих лековитих биљака. Извршена је њихова детаљна карактеризација на основу морфолошких, физиолошких, биохемијских и ППП својстава. Од укупно 36 бактеријских изолата, 9 изолата је показало способност продукције индол сирћетне киселине (IAA), 10 изолата способност продукције сидерофора, 27 способност продукције водоник цијанида (HCN). Значајан број изолата је показао биостимулаторни потенцијал, а издвојили су се изолати K3/2 и K5/1 (*Pseudomonas* sp.), M3/1 (*Bacillus* sp.), F1/2 (*Azotobacter* sp.) и S4/1 (*Streptomyces* sp.). Ови изолати су потенцијални кандидати за производњу микробиолошког препарата.

Кључне речи: бактерије, стимулатори раста, ризосфера, *Pseudomonas*, *Streptomyces*

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA FROM THE RHIZOSPHERIC SOIL OF WILD MEDICINAL HERBS

Minja Dapčević

SUMMARY

Many reaserches worldwide proved that the rhizosphere of medicinal plants is very specific. Rhizosphere is populated by PGP bacteria, which have positive effect on plant growth, all because of secondary metabolites production. They have different mode of action, such as nutrient availability improvement, control of pathogenic microorganisms, and production of plant hormones. Bacteria of different genus, namely *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Streptomyces* were isolated from the rhizosphere of wild medicinal herbs. They were fully characterized based on their morphological, physiological, biochemical and PGP traits. Out of total 36 bacterial isolates, 9 demonstrated production of indol acetic acid (IAA), 10 demonstrated the ability to produce siderophores, and 27 were good producer of hydrogen cyanid (HCN). Significant number of isolates showed biostimulatory potential, and the most important were K3/2 and K5/1 (*Pseudomonas* sp.), M3/1 (*Bacillus* sp.), F1/2 (*Azotobacter* sp.) and S4/1 (*Streptomyces* sp.). These isolates could serve as potential base in creation of a new microbe based formulation.

Key words: bacteria, plant promotion, rhizosphere, *Pseudomonas*, *Streptomyces*

1. УВОД

Земљиште се може дефинисати као сложен, динамичан систем у ком живи велики број различитих микроорганизама (бактерије, гљиве, алге, протозое и лишајеви). Они својом активношћу доприносе стварању и одржавању плодности земљишта (Јарак и Чоло, 2007).

Ризосфера, чији појам је први пут увео немачки агроном Хилтнер (1904), представља динамичан систем у коме земљишни микроорганизми и биљни корен чине једну целину. Микроорганизми у ризосфери биљака имају довољно извора хране за себе, те својом активношћу на различите начине потпомажу раст биљака. Они су означени као микроорганизми промотори биљног раста (ППП микроорганизми).

Људи су од давнина користили биљке као основни извор хране, те су и уочавали њихова лековита својства. Њихов допринос народној и савременој медицини је немерљив обзиром да су управо оне основни састојак свих лекова (Anwar et al., 2019; Kesdek et al., 2020; Mollova et al., 2020; Subasi 2020). Садрже велики број активних материја у различитим деловима биљака, већина је подложна екстракцији и користи се у различитим индустријама. Поред примене у традиционалној медицини ове биљке имају социо-културни и економски значај. Такође налази употребу и у фармацеутској, прехранбеној, козметичкој и хемијској индустрији (Турдулија Живановић, 2015). Многобројна истраживања показала су да већина лековитих и ароматичних биљака односно њихови екстракти имају значајне антимикробне, антиоксидативне и антирадикалске ефекте (Костић Николић, 2011).

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. РИЗОСФЕРА ЛЕКОВИТИХ БИЉАКА

Појам ризосфере се дефинише као зона око корена биљке, густо насељена микроорганизмима, која обухвата и сам корен који се “бори“ са другим кореновим системима за простор, воду и минералне материје (Ryan et al., 2001).

Од 250 000 регистрованих виших биљака на земљи, више од 80 000 имају лековита својства (Старовић и сар., 2015). Састав и количина органских једињења које биљке ослобађају преко корена утиче на хемијске и биолошке процесе у ризосфери. Различити су фактори који утичу на састав коренских излучевина, врста микроорганизма, еколошки фактори, врста и старост биљке (Мрковачки и сар., 2012). Многобројна истраживања показала су да већина лековитих и ароматичних биљака односно њихови екстракти имају значајне антимикробне, антиоксидативне и антирадикалске ефекте (Костић Николић, 2011). Код свих биљних врста, па и код лековитих биљака у ризосфери корена је бројност микроорганизма највећа.

2.1.1 *Achilea millefolium* (Хајдучка трава)

Achilea millefolium (Хајдучка трава) је биљна врста из фамилије *Asteraceae*, где су претежно зељасте, једногодишње и вишегодишње биљне врсте (Блечић, 1970). Фитохемијска истраживања нам показују да је већина компоненти овог рода биолошки активна и да налази своју употребу у традиционалној медицини.

Расте на сушним или умерено влажним ливадама, поред путева, на каменитим местима али и у шумским фитоценозама. Вектор је неких нематода и инсеката (Константиновић и сар., 2021). Најважнији секундарни метаболити ове врсте су флавоноиди и фенолна једињења (Ковачевић, 2000).

A. milefolium и још три врсте из фамилије *Asteraceae* доказано испољавају антибактеријско дејство на *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella enteritidis* (Стојановић и сар., 2005).

2.1.2. *Agrimonia eupatoria* (Петровац/Рањеник)

Ова вишегодишња зељаста биљна врста заступљена је на ливадама, пашњацима, равничарским теренима али и у планинама до 1500 m надморске висине. Воли сунчеву светлост и расте на умерено влажним или сувим пределима (Ivanova et al., 2011).

Са медицинског становишта је значајна јер се користи у третману лечења разних болести јетре, бешике, бубрега (Paluch et al., 2020). Што се тиче хемијског састава, доминирају флавоноиди, танини и фенолне киселине (Ivanova et al., 2011). Управо та хемијска структура појачава антиоксидативно дејство ове биљне врсте и на тај начин спречава оксидативни стрес у ћелијама биљака (Muruzović et al., 2016, Santos et al. 2017).

Коренске излучевине *A. eupatoria* имају улогу у елиминацији штетног дејства *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*. Њихова инхибиторска својства су се показала као ефикаснија код грам позитивних бактерија (Muruzović et al., 2016).

2.1.3. *Mentha longifolia* (Нана)

Нана, (*Mentha*) се издваја од осталих лековитих биљака због својих бројних улога, пре свега у превенцији болести попут дијабетеса, канцера и кардиоваскуларних болести. Има антибактеријско и антиупално дејство, изузетно ниску токсичност а велику ефикасност, што говори много о њеном утицају на живе организме.

Род *Mentha*, ком припада ова биљна врста спада у фамилију *Lamiaceae* где је за биљне врсте карактеристично изразито лековито дејство и пријатан мирис. Биљке из ове фамилије су богате полифенолима, садрже и кофеинску, ферулинску, циметну и оленолинску киселину.

Билке из рода *Mentha* у свом саставу садрже велики број антиоксиданата укључујући и феноле (аскорбинска киселина и каротеноиди који могу да одложе оксидацију молекула).

У истраживању које је спровео Park et al. (2019), доказано је да је *M. longifolia* врста која има највећу ефикасност у целом роду са 88.6 % антиоксидативне активности.

Етерична уља нане имају антимикуробно дејство против грам позитивних и грам негативних бактерија попут *Pseudomonas aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Tafrihi et al., 2021).

2.1.4. *Plantago lanceolata* (Усколисна боквица)

Ова биљка се претежно налази у травњацима, ређе на обрадивом земљишту, док њени секундарни метаболити углавном налазе примену у медицини. Брзо расте и корење јој се развија дубоко у ризосфери, што објашњава њену високу толерантност на сушу и способност усвајања хранљивих материја изнад дубљих слојева земљишта. Дуго времена јој је потребно да процвета, од маја до августа. Немају способност самооплодње, тако да се врши унакрсна оплодња (Warwick and Briggs, 1979). Коренови су им некад површински, док други продиру дубоко у земљиште и високо су толерантни према суши (Grime et al., 1988).

Ова биљна врста преферира земљишта са рН вредношћу од 6.5-7.3, међутим може се наћи и у земљиштима лошијег квалитета, са присуством тешких метала. Може живети у симбиози са микоризним гљивама, које снабдева угљеником, за узврат он добија воду и неопходне хранљиве елементе.

2.1.5. *Stachys sylvatica* (Шумски чистац)

Род *Stachys* садржи више од 270 врста и представља један од бројнијих родова у фамилији *Lamiaceae* (Saeedi et al., 2008). Врста *Stachys sylvatica* је вишегодишња коровска врста коју одликује усправно, длакаво стабло, висине 30-100 cm. Цвета од јуна до августа. Сви делови ове биљке имају карактеристичан, непријатан мирис (Tirillini et al., 2004).

Претходним истраживањима, у овој биљној врсти, је утврђен састав биолошки активних материја попут флавоноида и есенцијалних уља који испољавају своју антимикробну и антиоксидантну активност (Tirillini et al., 2004; Bilusic-Vundac et al., 2006; Rezazadeh et al., 2009.). Од давнина се користи у традиционалној медицини. У Ирану се користи у лечењу болести овчијег језика.

2.1.6. *Centaurea jacea* (Различак)

C. jacea припада једној од најбројнијих фамилија *Asteraceae*, којој припада чак од 200 до 700 биљних врста. Своја лековита својства дугује биолошки активним метаболитима које излучује, попут лигнана. Према животној форми је хемикриптофита, расте на ливадама, пашњацима. Цвета у јуну и веома је медоносна (Dauti et al., 2021).

Користи се у народној медицини као диуретик, антисептик, за лечење грознице, тумора (Јанаčković et al., 2008).

2.2. Коренски ексудати

Ексудати (излучевине корена) су извор енергије и хранљивих материја за једну биљку. Разликују се на основу њиховог хемијског састава па их тако делимо у две групе:

- 1) Коренске излучевине мале молекулске тежине (прости шећери, аминокиселине, органске киселине, биљни хормони, витамини, феноли, јони и други метаболити)
- 2) Коренске излучевине велике молекулске тежине (ензими, протеини, полисахариди, стероли, флавоноиди, нуклеотиди)

Према начину на који се ослобађају из корена ексудати су: пасивни (дифундују из корена као продукти метаболизма биљке) и активни (бивају излучени кроз поре ћелијске мембране) (Хајнал-Јафари и сар. 2019).

Интеракција између биљака, микроорганизама и гљива се у ризосфери регулише захваљујући коренским ексудатима који могу да делују симбиотски или дефанзивно (Мрковачки и сар., 2012). нпр. микоризне гљиве повећавају секрецију азота фенола и гиберелина.

2.3. Бактерије промотори биљног раста

Плодно земљиште је богато различитим врстама бактерија, између сто милиона и милијарду их има у једном граму. Свуда су присутне, у најситнијим порама земљишта, у унутрашњости и на површини земљишних агрегата, на хифама гљива и у корену биљака. На њихову активност и распрострањеност утичу рН реакција земљишта, количина органске материје, садржај воде и ваздуха, топлота, светлост, други микроорганизми и агротехничке мере.

ППП бактерије индиректно утичу на раст корена својим насејавањем и животом у ризосфери. Назив им је скраћеница од *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, односно бактерија стимулатора биљног раста (Клоеппер and Schroth, 1978).

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

Ауксини чине групу биљних хормона који стимулишу раст биљака у свим стадијумима развоја, регулишу деобу ћелија, елонгацију и диференцијацију. Индол- 3-сирћетна киселина (IAA) је најзаступљенији природни облик ауксина (Enders and Strader, 2015). Поред биљака, неке бактерије и гљиве такође имају способност синтезе IAA (Капер and Veldstra, 1958).

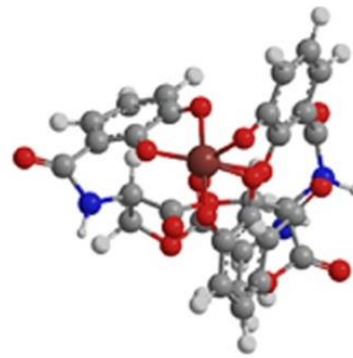
Обзиром да је гвожђе елемент без ког раст биљака не би био могућ његово усвајање је од круцијалног значаја за биљку. Као одговор на то микроорганизми су развили механизам везивања гвожђа – продукцију сидерофора. Назив им потиче од грчких речи *sidero* – гвожђе и *phore* – носити, у буквалном преводу оне су “носачи гвожђа”(Singh et al., 2015). Сидерофоре доводе до отпуштања јона гвожђа из оксида и хидроксида, те их том приликом вежу у сидерофора комплекс (Neilands 1995).

Делимо их у 3 главне групе:

1. Катехолатне сидерофоре (слика 1)

2. Хидроксаматне сидерофоре

3. Карбоксилатне сидерофоре



Слика 1. Катехолатна сидерофора
(фото:<https://sfamjournals.onlinelibrary>)

Секундарни метаболит који утиче на раст и развој микроорганизама и биљака јесте цијановодонична киселина (HCN). Она ихнибира активност ензима, попут цитохром оксидазе (Gehring et al., 1993). Неки микроорганизми имају и сами способност продукције HCN-а, попут врста из родова: *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* (Ahmad et al., 2008).

2.3.1. *Pseudomonas* sp.

Ова бактеријска врста је карактеристична по својој способности да насели различите екосистеме, али и по својој патогености и антимицробности. Изазива болести код људи, животиња и биљака. Притом јако се лако прилагођава свим условима живота у еколошким нишама (Ruiz-Roldan et al., 2021).

Припадници овог рода су најчешће сапрофити, грам негативни. Припадају групи облигатних аероба, међутим у изузетним случајевима могу да се развијају и у анаеробним условима. Оптимална температура на којој се развијају је 37°C.

Спадају у ППП микроорганизме због својих активности, наиме производе IAA, HCN, сидерофоре. Синтетишу АСС деаминазу (прекурсор етилена), те смањују концентрације етилена и помажу биљци при неповољним условима. Могу да разлажу и тешко растворљива једињења фосфора и тако обезбеђују биљку потребним хранивима, неке врсте могу и да фиксирају елементарни азот. Доказан је и њихов позитиван ефекат на производњу шећерне трске, репе, кукуруза, леблебије, кромпира, лука.. (Хајнал Јафари и сар., 2019).

Pseudomonas aeruginosa, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. putida*, *P. syringae* су само неке од врста које припадају овом роду.

2.3.2. *Bacillus* sp.

Род *Bacillus* одликује велики број бактерија са различитим карактеристикама. Оно што их све повезује јесте способност стварања приликом преласка у стању мировања.

Грам позитивне су бактерије, углавном штапићастог облика. Развијају се у аеробним условима али могу бити и факултативни анаероби. Отпорни су и на високе температуре (Holt et al., 1994).

Има важну улогу у пољопривреди. Врсте *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. popilliae*, и *B. lentimorbus* се користе као биопестициди у борби против инсеката.

Такође су и промотори раста биљака. Врста *B. subtilis* продужава трајност и робустност клијанаца (Cavaglieri et al., 2005; Ugoji et al. 2005). Још увек није утврђен тачан механизам по ком бактерије делују позитивно на раст биљака, међутим продукција хормона, ензима и антимикуробних супстанци су само неки од механизма стимулације биљног раста (Tye et al., 2002).

Припадници овог рода су значајни за развој медицине и очување здравља. Користе се у производњи антибиотика, пробиотика, за продукцију ензима и хормона (хормон раста) за људску употребу. Са друге стране две врсте које су посебно интересантне а изазивају болести људи јесу *B. anthracis*, као проузроковач антракса и *B. cereus*, који доводи до стомачних проблема узрокованих тровањем храном (Rooney et al., 2018).

2.3.3. *Azotobacter* sp.

Azotobacter sp. спада у групу слободних азотофиксатора, грам негативних. Њихова кључна улога је у фиксацији елементарног азота, али поред тога оне продукују биљне хормоне и сузбијају фитопатогене гљиве..

Чине их претежно хетеротрофне, диазотрофне бактерије, које не живе у симбиози и преферирају неутрална или алкална земљишта за живот са температурним опсегом од 20-30°C. Имају велики број флагела које доприносе њиховој покретљивости али их временом губе и постају непокретни (Sartaj et al., 2013).

Спадају у природне биофертилизатори, те повећавају плодност и квалитет земљишта а са друге стране самим тим и смањују употребу скувих азотних ђубрива (Srinives et al., 2017).

Земљишни су микроорганизми и присутни су у ризосфери многих биљака. Продукују хормоне значајне за раст биљака и формирају антагонистички однос са гљивама. Индол -3-сирћетна киселина, други ауксини, гиберелини и цитокинини, витамини, антимикробне компоненте и сидерофоре су само неки од њихових продуката (Pandey and Kumar 1989) који директно или индиректно учествују у расту биљака.

2.3.4. *Streptomyces* sp.

Припадници овог рода су пре свега значајни за развој фармацеутске индустрије, као произвођачи секундарних метаболита попут антибиотика (Mellouli et al., 2003). *Streptomyces* spp. претежно насељавају земљишта, сува и незакишељена и богата органском материјом (Chen et al., 2017). Разлажу биљне и животињске остатке, чиме повећавају своју активност и бројност у земљишту.

Привлаче пажњу истраживачима широм света због своје интеракције са биљкама. Стимулишу њихов раст, штите их од разних штеточина (Lloyd, 1969).

Механизми деловања *Streptomyces* sp. се могу поделити у следеће групе:

- 1) Продукција антибиотика
- 2) Продкција сидерофора
- 3) Секреција испарљивих материја
- 4) Продукција ензима (протеаза, хитиназа..)
- 5) Компетиција за простором и хранљивим нутритијентима
- 6) Иницирање системске резистентности биљака према патогенима

Због своје улоге у контроли бројности биљних патогена до сада је произведено неколико биопрепарата на бази ових бактеријских врста, биофунгициди који садрже *Streptomyces griseoviridis* и *Streptomyces lydicus*, који контролишу бројност *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. и *Botrytis* sp. на украсном биљу и поврћу (Хајнал Јафари и сар., 2019).

2.4. Примена бактерија у биљној производњи

2.4.1. Примена биопрепарата

Биопрепарати на бази микроорганизама имају значајну улогу у повећању плодности земљишта, то су тзв. биофертилизатори. Уносом микроорганизама у земљиште убрзава се процес трансформације органске материје, биљка брже долази до хранљивих материја и самим тим брже расте.

У интензивној обради земљишта примењују се превелика количина минералних ђубрива и пестицида. Како би се избегла употреба хемијских средстава као јединог решења у борби против штеточина дошло је до идеје о примени селекционих микроорганизама. Микробиолошки биопестициди у свом саставу имају гљиве, бактерије, вирусе или протозое, који продукују ензиме, витамине и хормоне и делују на имуни систем биљака, те повећавају њихову отпорност и антагонистички однос према другим организмима (Вуковић С. и сар., 2021).

Различити су механизми деловања микроорганизама. Могу да продукују сидерофоре, хелатна једињења гвожђа која омогућавају лакше везивање Fe јона за корен биљке, али и њихову асимилацију за друге елементе. Такође формирају и стабилне комплексе са тешким металима, што је значајно за процес биоремедијације¹.

Хумификација и минерализација, процеси значајни у трансформацији органске, односно минералне материје не би били реализовани без микроорганизама, што је још једна од предности биофертилизатора.

Бактерије које су најчешће део биопрепарата су врсте из рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megatherium*, *B. licheniformis*, *B. pulvinus*, затим *Paenibacillus* (*P. macerans*, *P. polymixa*, *P. Amyloliticus*) и *Cellvibrio flavescens* (Хајнал Јафари и сар., 2019).

¹Процес коришћења живих организама у циљу заштите животне средине

2.4.2. Примена биопрепарата у производњи лековитог биља

Данас се све више пажње посвећује органској производњи биљака уопште, а самим тим и лековитих биљака. Применом биофертилизатора се смањује употреба хемијских средстава чиме се побољшава здравствена безбедност биљака (слика 2).

Живи или латентни микроорганизми из ових препарата потпомажу усвајање хранљивих материја из ризосфере преко семена или земљишта. Истраживања којим је доказиван ефекат биофертилизатора вршена су на камилици (Fallafi et al. 2010; Farkoosh et al. 2011), мајорану (Gharib et al., 2008), коморачу (Mahfouz and Sharf-Eldin 2007; Darzi et al. 2009) и нани (Abd El-Hadi et al., 2009).

Такође, Аћимовић и сар. (2011) тестирали су ефекат препарата који у себи садрже бацилусе. Конкретно испитиван је утицај инокулације на укупну клијавост и енергију клијања семена кима, аниса и коријандера. Већи утицај није испољен код кима и аниса, док је код коријандера укупна клијавост повећана за 4.5% (Аћимовић и сар., 2011). Вршена су и испитивања на више биљних врста попут хризантеме, петуније, дувана, краставца, тиквица, малина у којим је утврђен позитиван ефекат ПГПР бактерија на њихов раст (Стаменов и сар., 2018).



Слика 2. Примена биопрепарата на биљку (фото <https://www.hsibv.com>)

3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА

Пољопривредна производња која се заснива на принципима одрживог развоја је све више у фокусу произвођача. Овај начин производње подразумева промену у технологији гајења усева, пре свега, смањење употребе или без примене хемијских ђубрива и пестицида.

Одржива производња омогућава примену микробиолошких препарата, најчешће примену живих микроорганизама директно у земљиште или на биљке. Примена микроорганизама као додатак, делимична или потпуна замена хемијским препаратима, има посебну оправданост и значај приликом производње поврћа, лековитог и зачинског биља, пре свега због добијања здраве и квалитетне свеже биљне масе и хербе.

Због тога је неопходно изоловати и детерминисати што већи број микроорганизама из ризосфере различитих биљака и утврдити њихову ефикасност на побољшање раста гајених биљака. Имајући то у виду, постављен је циљ истраживања да се изврши изолација и карактеризација бактерија промотора биљног раста које припадају роду *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Streptomyces* из ризосфере дивљих лековитих биљака

Претпоставља се да ће се код одређеног броја бактеријских изолата, пре свега на основу анализе ПГП својстава, утврдити висок биостимулаторни потенцијал који се мора детаљније испитати. Поједини изолати могу бити кандидати за креирање формулације и производњу микробиолошког препарата.

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. Одређивање бројности микроорганизама

За одређивање укупне бројности микроорганизама, бројности аминокетеротрофа, актиномицета, гљива као и бројности бактерија из рода *Pseudomonas* коришћен је метод агарних плоча. Засејавање у празне петри кутије је вршено са 0,5 ml суспензије земљишта, након чега је разливена одговарајућа отопљена хранљива подлога. Бројност *Azotobacter*-а одређивана је методом фертилних капи. Направљена је чврста безазотна хранљива подлога по Фјодору и разливена у петри кутије. На површину очврселе подлоге је засејано 0,2 ml суспензије.

Суспензија узорка земљишта се припремала методом разређења. Засејавање се вршило у 3 понављања за сваку испитивану групу микроорганизама, док се узорак земљишта сушио на 105°C.

Инкубација микроорганизама је извршена у термостату на температури од 28°C у трајању између 2 до 10 дана. Након истека периода инкубације, приступило се пребројавању броја израслих колонија.

Израчунавање броја микроорганизама се врши по формули:

$$N = a \times b \times c / d$$

N – број мо. у 1 g апсолутно сувог земљишта

a – Просечан број колонија израслих на засејаним петри кутијама

b – коефицијент корекције (5 или 2)

d – маса 1 g апсолутно сувог земљишта из ког је извршено засејавање

Број микроорганизама је прерачунат и приказан као Log₁₀ (No).

4.2. Изолација бактерија

Изолација бактерија вршена је класичним микробиолошким методама на селективним хранљивим подлогама (Јарак и Ђурић, 2006).

У истраживању смо испитивали бактерије изоловане из ризосфере земљишта лековитих биљака са локалитета Траписти (општина Бања Лука) чији узорци су приказани на слици 3.

Сви сојеви су изоловани на одговарајућим хранљивим подлогама; бактерије рода *Azotobacter* на Фјодоровој подлози, бактерије рода *Bacillus* на МРА подлози, бактерије рода *Pseudomonas* на King B подлози, и бактерије рода *Streptomyces* на синтетичкој подлози.



Слика 3. Узорци земљишта (фото: оригинал)

4.3. Карактеризација бактерија

Карактеризација је обухватила испитивање морфолошких, физиолошких, биохемијских и пгп својстава.

4.3.1. Морфолошка карактеризација изолата

У овом раду смо се бавили утврђивањем морфолошких карактеристика колоније и 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 микроорганизама. Узорак за препарат је узет из чисте кулуре бактериолошком езом (слика 4), 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 лъуспица. Након тога је препарат спеман за микроскопирање (Ћирић, 2014). Метод бојења по Граму се користи ради диференцијације ћелија на основу грађе ћелијског зида. 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 4. Бактериолошка еза са пламеником (фото оригинал)

4.3.2. Физиолошка карактеризација изолата

Од физиолошких карактеристика испитани су: однос према извору угљеника, температури, рН реакцији средине, концентрацији NaCl и тешким металима.

Hugh-Lifsson-ови подлогу смо користили за одређивање односа према угљенику (2 g пептона, K₂HPO₄ 0.3 g, NaCl 5 g, шећер 10 g, бромтимол плаво 0.03g, агар 3 g) (Hugh and Leifson, 1953). Након периода инкубације око колонија микроорганизама долази до промене боје из зелене у жуту, у случају позитивне реакције, што указује на способност коришћења угљених хидрата из подлоге. Зелена боја је знак негативне реакције.

Раст на различитим температурама (5°C, 28°C, 45°C), на подлогама различите киселости (рН 5, 7 и 9) и са различитим концентрацијама NaCl (3 %, 5%, 7%), испитиван је на одговарајућим хранљивим подлогама. Приликом испитивања дејства NaCl и рН, температура у термостату је била 28°C. Период инкубације је био различит за сваку групу микроорганизама (2 до 5 дана), након чега је процењен обим раста. Потпуно одсуство раста је обележено са -, минималан раст са +, оптималан раст са ++, и обилан раст са +++.

Отпорност према тешким металима смо одређивали уз помоћ дифузионе методе. На површину густо засејане подлоге су стављени дискови са растворима тешких метала, кадмијума, олова и мангана, у различитим концентрацијама, 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶ (mol/dm³). Након густог засејавања подлога, по њиховој површини се поставе дискови са растворима тешких метала. У току инкубације, на подлози су се могле уочити зоне инхибиције раста бактеријских изолата, али и одсуство зоне уколико је изолат отпоран на дејство испитиваних метала. Величина зоне инхибиције је мерена у mm.

4.3.3. Биохемијска карактеризација изолата

У оквиру биохемијске карактеризације изолата испитивани су активности ензима липазе, амилазе, пектиназе, целулазе и уреазе.

Способности **продукције липазе** је испитивана на претходно направљеној подлози (пептон 10 g l^{-1} , NaCl 5 g l^{-1} , $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,1 \text{ g l}^{-1}$, агар 9 g l^{-1}) уз додатак Tween 80 (1% w/v). Инкубација је трајала 7 дана и изолати су држани на температури од 28°C .

Као доказ липолитичке активности јављају се замућене зона око колоније (Lanyi, 1987).

Методом агарних плоча на скробном агару, “spreadplate”, се утврђује способност микроорганизама да **хидролизују скроб-продукција амилазе** (скроб у праху 10 g l^{-1} , KH_2PO_4 $0,5 \text{ g l}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,2 \text{ g l}^{-1}$, агар 15 g l^{-1}) (Rodina, 1965). Инкубација траје 2 до 5 дана, на температури 28°C . Колоније затим преливамо раствором лугола. У присуству јода скроб се боји у плаво. Уколико дође до хидролизе скроба, око колоније ће се појавити необојена зона, без скроба, док ће остатак подлоге остати плаве боје.

Производња пектиназе је доказивана методом агарних плоча на пектинозном агару (K_2HPO_4 2 g l^{-1} , NaH_2PO_4 1 g l^{-1} , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,5 \text{ g l}^{-1}$, NH_4NO_3 2 g l^{-1} , екстракт квасца 1 g l^{-1} , пектин 10 g l^{-1} , агар 16 g l^{-1}). Већ након једног дана на температури од 37°C је готова инкубација, након чега се колоније преливају луголом. Као резултат активности пектиназе имамо појаву необојених зона (Cattelan et al., 1999).

Способност микроорганизама да **произведу целулазу** се доказује на СМС агару (карбоксил-метилцелулоза $0,5 \text{ g l}^{-1}$, NaNO_3 $0,1 \text{ g l}^{-1}$, K_2HPO_4 $0,1 \text{ g l}^{-1}$, KCl $0,1 \text{ g l}^{-1}$, MgSO_4 $0,05 \text{ g l}^{-1}$, квашчев екстракт $0,05 \text{ g l}^{-1}$, глюкоза $0,1 \text{ g l}^{-1}$, агар 7 g l^{-1}) (Kasing, 1995). Након инкубације петри кутије с микроорганизмима прелију се раствором 0,1% CongoRed-а и 1M NaCl (Zhang et al., 2009). Обезбојене зоне око колонија настају као доказ активности целулазе.

Разлагање урее је доказивано на Kristensen-овом агару (Јарак и Говедарица, 1999). Инкубација је једнодневна на 37°C . Појава црвене боје индикатора је доказ разградње урее у подлози.

4.3.4. ПГП карактеризација изолата

Од ПГП особина смо испитивали способност продукције индол-сирћетне киселине, сидерофора, HCN и способност растварања органских и неорганских једињења фосфора.

Продукција индол-сирћетне киселине (IAA) испитивана је додатком аминокиселине триптофана у течну подлогу (триптофан бујон). Доказивање присуства индола у подлози врши се додавањем Ковачевог реагенса и стварањем црвеног прстена на површини бујона.

Способност продукције сидерофора испитивана је методом по Milagres et al. (1999) употребом Chrome-Azurol S агара. CAS агар је смеша два раствора који се засебно стерилишу и припремају. Први раствор садржи 60,5 mg CAS, 50 ml H₂O, 10 ml раствора (1M FeCl₃ x 6H₂O и 10 m HCl), 40 ml воденог раствора HDTMA (хекса децилтриметиламонијум) (1,82 mg ml⁻¹). Други раствор садржи 30,24 g PIPES (1,4-пиперазин диетан сулфонска киселина) и 750 ml воде и 15 g агара и 12 g раствора 50% NaOH (рН се подеси на 6,8). Раствори се помешају након стерилизације. Тамно плава до зелена је боја CAS агара. У петри кутије се разливају хранљиве подлоге, након што очврсну пресеку се на пола а друга половина се избацује. У празну половину сипамо CAS агар, а засејавање се врши на половини са хранљивом подлогом, и пратимо промене у боји на линији раздвајања подлога. Као доказ продукција сидерофора имамо прелаз боје из тамно зелене у наранцасто црвену.

Продукција HCN-а испитивана је на хранљивом агару следећег састава: триптон из соје 30 g l⁻¹, глицин 4,4 g l⁻¹, агар 15 g l⁻¹ (Frey-Klett et al., 2005). Након инокулације на подлогу се ставља Whatman диск, претходно потопљен у раствор 0,5% пикринске киселине и Na₂CO₃. Инкубација траје 96 h на 28°C. Продукција цијанида је доказана променом боје диска из жуте у наранцасто-браон.

Минерализација органских једињења фосфора испитивана је на подлози Менкина (Менкин, 1963). **Солубилизација неорганских једињења фосфора** је тестирана на подлози по Píkovskaya (Píkovskaya, 1948). Доказ да микроорганизми растварају фосфате јесте појава провидних зона око колонија. Инкубација је трајала 5 дана на 28°C.

4.4 Статистичка обрада података

Статистичка обрада података је урађена статистичким програмом TIBO Statistics

13.3. Примењена је АНОВА анализа резултата једнофакторијалног огледа односно

Fisher тест хомогености варијансе са вероватноћом од 95% ($p=0,05$).

5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА СА ДИСКУСИЈОМ

5.1. Бројност микроорганизама у ризосфери лековитих биљака

Бројност микроорганизама у ризосфери испитиваних дивљих лековитих биљака су приказани у табели 1. На основу приказаних резултата се може уочити висок укупан број бактерија у свим узорцима, где су доминантни микроорганизми аминокетеротрофи односно микроорганизми који користе разне органске облике азота.

Табела 1- Укупна бројност микроорганизама у ризосфери лековитих биљака (Log₁₀ No)

ризосфера	Укупна бројност бактерија	Аминокетеротрофи	Псеудомонаси	Азотобактери	Актиномиците	Гљиве
<i>P.lanceolata</i>	9,09±0,24a	9,29±0,56a	7,46±0,16a	1,93±0,13ab	6,16±0,21a	4,92±0,33c
<i>M.longifolia</i>	8,66±0,31ab	8,75±0,52abc	7,14±0,20a	2,02±0,01b	5,80±0,25c	4,99±0,33c
<i>S.sylvatica</i>	8,60±0,09b	8,84±0,38ab	7,41±0,43a	2,01±0,29b	5,25±0,15d	3,97±0,52ab
<i>A.milefolium</i>	8,53±0,13b	8,63±0,22abc	7,37±0,30a	1,79±0,04ab	5,76±0,05c	4,65±0,36ac
<i>C.jacea</i>	8,30±0,02b	8,17±0,15bc	7,28±0,27a	1,85±0,59ab	5,29±0,02d	4,74±0,20c
<i>A. eupatoria</i>	8,25±0,52b	8,06±0,36c	7,23±0,02a	1,34±0,52a	4,37±0,00b	3,95±0,52b

У табели су приказане средње вредности (аритметичка средина три понављања)± стандардна девијација. Вредности које су обележене са истим словима нису значајно различите на основу Fisher LSD (најмање значајне разлике) теста ($p < 0.05$).

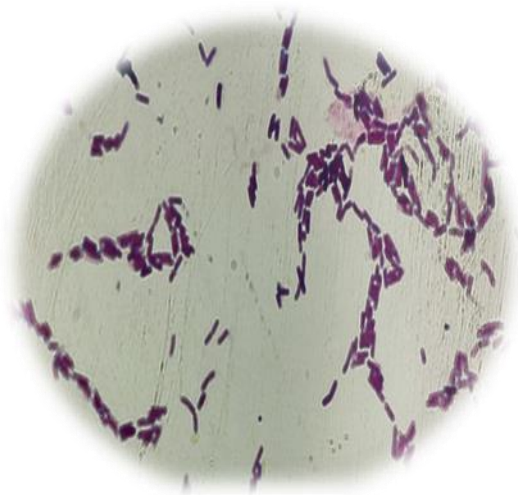
Нарочито је значајна група зракастих бактерија или актиномицета које су добри продуценти бројних секундарних биомолекула. Њихова заступљеност је такође потврђена у ризосфери бројних кинеских лековитих биљака као што су *Ainsliaea henryi* Diels, *Dioscorea opposita*, *Potentilla discolor* Bge, *Stellera chamaejasme* L., *Juncus effusus* L. var. *decipiens* Buchen, *Rhizoma arisaematis* (Li et al., 2008; Zhao et al., 2012). Ризосфера лековитих биљака је богата бројним секрецијама, ексудатима и лизатима које утичу на састав микробиома.

Наравно, и други фактори абиотичке природе, као што је састав зељишта, клима, годишње доба, присуство животиња и др. утичу на квантитет и диверзитет микробне популације у ризосфери одређене лековите биљке. Бактерије рода *Bacillus* и *Pseudomonas* су свеприсутне и могу се наћи у ризосфери свих биљака (Berg et al., 2011).

5.2. Морфолошка карактеризација бактерија из ризосфере лековитих биљака

5.2.1. Морфолошка карактеризација бактерија рода *Pseudomonas*

Код изолата *Pseudomonas* ћелије су штапићастог облика, величине 0,5-1 μm x 1,5 – 5 μm . Аеробне су и грам негативне, најчешће покретне (слика 5).



Слика 5. Микроскопски препарат *Pseudomonas* sp. увећање 1000x (фото оригинал)

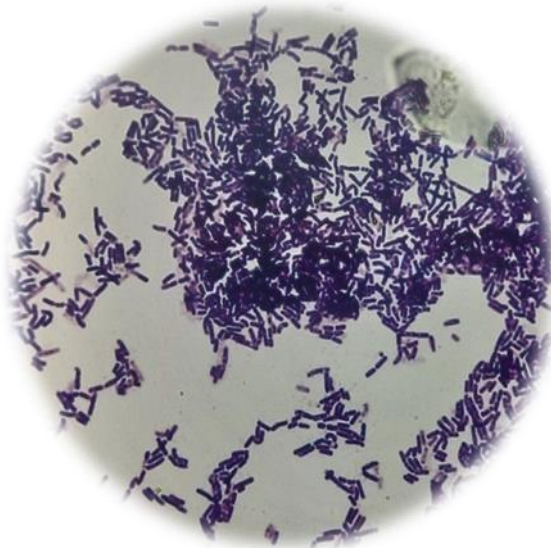
Што се тиче морфологије колоније рода *Pseudomonas* облик колонија који доминира је округлао, и све имају површински положај (табела 2). Величине су углавном средње (5-7 mm) или гигантске, преко 1 cm, а повшина мат/наборана. Профили се доста разликују у зависности од колоније, те су благо испупчени као код K1/1, али и равни код код K4/1. Промене у подлози нису регистроване, док оптичке особине има колонија K1/1. Боја колоније је крем, са светлијим или тамнијим варијантама. Слизаве и брашнасте су конзистенције, док су им ивице углавном равне или коврцаве. Структура колонија рода *Pseudomonas* је различита, хомогена, влакнаста, зрнаста.

Табела 2 – Морфолошке особине колонија бактерија рода *Pseudomonas*

Ознака изолата	Билна врста	облик	величина	профил	површина	положај	боја	ивица	структура	оптичке особине	промене у подлози	конзистенција
К 1/1	<i>P.lanceolata</i>	округао	средња	благо испупчен	сјајно/глатко	површински	крем	равна	хомогена	да	не	слузава
К 1/2	<i>P.lanceolata</i>	округао	средња	благо испупчен	сјајно/глатко	површински	бело/крем	равна	ситно зрнаста	не	не	слузава
К 1/3	<i>P.lanceolata</i>	коренолик	гигантска	неправилан	мат/наборана	површински	крем	коврцава	влакнаста	не	не	слузава
К 2/1	<i>M.longifolia</i>	округао	средња	благо испупчен	сјајно/глатко	површински	светло крем	равна	зрнаста	не	не	слузава
К 3/1	<i>S.sylvatica</i>	округао	средња	благо испупчен	сјајно/глатко	површински	крем	равна	зрнаста	не	не	слузава
К 3/2	<i>S.sylvatica</i>	округао	средња	благо испупчен	сјајно/глатко	површински	крем	равна	зрнаста	не	не	слузава
К 3/3	<i>S.sylvatica</i>	округао	средња	благо испупчен	сјајно/глатко	површински	бело/крем	равна	хомогена	не	не	слузава
К 4/1	<i>A.milefolium</i>	округао	средња	раван	мат/наборана	површински	бело/крем	коврцасто/ влакнаста	зрнаста	не	не	брашнаста
К 4/2	<i>A.milefolium</i>	коренолик	гигантска	неправилан	мат/наборана	површински	крем	коврцава	влакнаста	не	не	брашнаста
К 4/3	<i>A.milefolium</i>	округао	средња	благо испупчен	сјајно/глатко	површински	крем	равна	зрнаста	не	не	слузава
К 5/1	<i>C.jacea</i>	округао	средња	благо испупчен	сјајно/глатко	површински	крем	равна	зрнаста	не	не	слузава
К 6/1	<i>A.eupatoria</i>	округао	средња	благо испупчен	сјајно/глатко	површински	бело/крем	равна	зрнаста	не	не	слузава

5.2.2. Морфолошка карактеризација бактерија рода *Bacillus*

Од морфолошких карактеристика ћелија изолата *Bacillus* уочавамо да су штапићасте, грам позитивне и покретне (слика 6). Величина им је 0,5-2,5 μm x 1,2-10 μm .



Слика 6. Микроскопски препарат *Bacillus* sp. увећање 1000x (фото оригинал)

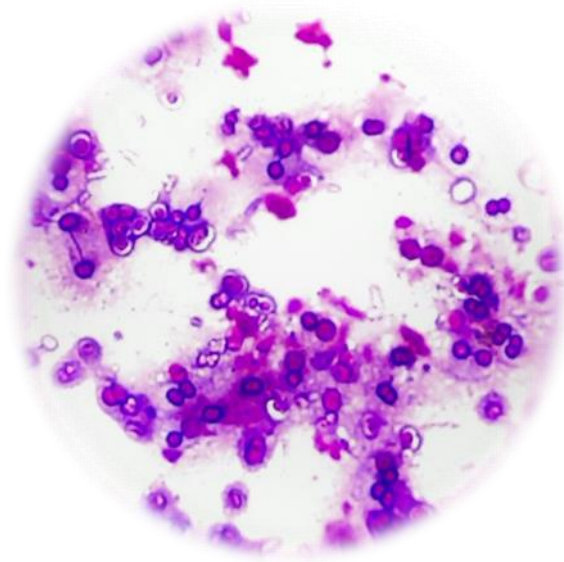
Као и код већине колонија све колоније рода *Bacillus* имају површински положај. Облик колоније је углавном округао, изузетак су МРА1/1, МРА(UB)1/1 и МРА(UB)6/1 чија колонија има неправилан облик. Величина колонија је најчешће средња док је облик раван или благо издигнут. Површина колонија *Bacillus-a* је мат/наборана, једини који имају сјајну и глатку колонију јесу К2/1МРА 3/1 и МРА 4/1. Промене у подлози ових колонија нису забележене док је појава оптичких особина регистрована само код МРА3/1. Конзистенција је слузава, углавном, док је ивица округла, ређе неправилног облика. Структура им је зрнаста, ређе хомогена и гранулирана.

Табела 3 –Морфолошке особине колонија бактерија рода *Bacillus*

Ознака изолата	Биљна врста	облик	величина	профил	површина	положај	боја	ивица	структура	оптичке особине	промене у подлози	конзистенција
МРА 1/1	<i>P.lanceolata</i>	неправилан	ситна	раван	мат наборана	површински	бело/крем	неправилна	хомогена	не	не	тестаста
МРА(UB)1/1	<i>P.lanceolata</i>	неправилан	средња	раван	наборана	површински	бела	неправилна	гранулирана	не	не	слузава
МРА(UB)1/2	<i>P.lanceolata</i>	округао	средња	благо издигнут	мат наборана	површински	крем	равна	зрнаста	не	не	тестаста
МРА(UB)1/3	<i>P.lanceolata</i>	округао	средња	раван	мат наборана	површински	крем	благо таласаста	зрнаста	не	не	брашнаста
МРА 2/1	<i>M.longifolia</i>	округао	средња	раван	наборана	површински	бела	равна	зрнаста	не	не	тестаста
МРА(UB)2/1	<i>M.longifolia</i>	округао	средња	испупчен	мат наборана	површински	бела	ситно назубљена	влакнаста	не	не	брашнаста
К 2/1	<i>M.longifolia</i>	округао	средња	раван	сјајна глатка	површински	крем	равна	зрнаста	не	не	слузава
МРА 3/1	<i>S.sylvatica</i>	округао	средња	благо издигнут	сјајно глатка	површински	крем	округао	зрнаста	да	не	слузава
МРА(UB)4/1	<i>A.milefolium</i>	округао	средња	благо издигнут	мат глатка	површински	бело/крем	таласаста	зрнаста	не	не	тестаста
МРА 4/1	<i>A.milefolium</i>	округао	ситна	раван	сјајно глатка	површински	крем	равна	зрнаста	не	не	слузава
МРА(UB)5/1	<i>C.jacea</i>	округао	ситна	благо издигнут	мат наборана	површински	крем	округао	хомогена	не	не	брашнаста
МРА(UB)6/1	<i>A.eupatoria</i>	неправилан	крупна	раван	мат наборана	површински	бело/крем	неправилна	гранулирана	не	не	брашнаста

5.2.3. Морфолошка карактеризација бактерија рода *Azotobacter*

Ћелије изолата *Azotobacter* имају ћелије штапићастог-овалног облика (слика 7). Неке врсте су покретне, неке не. Величина пречника им је 1,5-2,0 μm . Грам негативне су.



Слика 7. Микроскопски препарат *Azotobacter* sp увећање 1000x (фото оригинал)

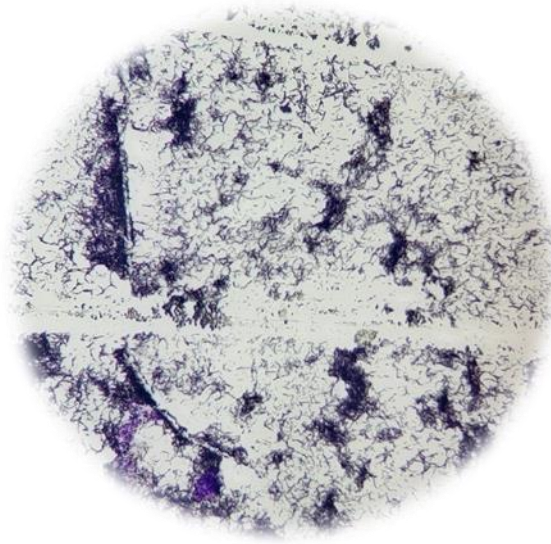
Облик свих колонија код овог бактеријског рода неправилан, изузев код F3/2 где је облик округао (табела 4). Величина је искључиво средња (5-7 mm) а профил је испупчен код свих колонија једино је код F1/2 неправилан. Положај колоније је површински а површина је мат/наборана. Код *Azotobacter*-а нису регистроване ни оптичке особине ни промене у подлози. Влакнаста и зрнаста структура је код *Azotobacter*-а , док је конзистенција слузава или тестераста. Ивице код ових колонија су различите, кончасте, тестерасте, равне али и таласасте.

Табела 4 -Морфолошке особине колонија бактерија рода *Azotobacter*

Ознака изолата	Билна врста	облик	величина	профил	површина	положај	боја	ивица	структура	оптичке особне	промене у подлози	конзистенција
F 1/1	<i>P. lanceolata</i>	неправилан	средња	испупчен	наборана	површински	браон	кончаста	влакнаста	не	не	слузава
F 1/2	<i>P.lanceolata</i>	неправилан	средња	неправилан	мат наборана	површински	браон	кратераста	влакнаста	не	не	тестерасто воскаста
F 2/1	<i>M.longifolia</i>	неправилан	средња	испупчен	наборана	површински	браон	равна	зрнаста	не	не	слузава
F 2/2	<i>M.longifolia</i>	неправилан	средња	испупчен	наборана	површински	браон	равна	зрнаста	не	не	тестераста
F 3/2	<i>S.sylvatica</i>	округао	средња	испупчен	сјајна/глатка	површински	крем/окер	кончаста	зрнаста	не	не	слузава
F 4/1	<i>A.milefolium</i>	неправилан	средња	испупчен	наборана	површински	браон	равна	зрнаста	не	не	слузава
F 5/1	<i>C.jacea</i>	неправилан	средња	испупчен	наборана	површински	браон	равна	зрнаста	не	не	слузава
F 6/1	<i>A.eupatoria</i>	неправилан	средња	испупчен	наборана	површински	браон	таласаста	зрнаста	не	не	воскаста

5.2.4. Морфолошка карактеризација бактерија рода *Streptomyces*

Кончасте, грам позитивне ћелије имају изолати *Streptomyces* sp. (слика 8), облик колоније варира од округлог до неправилног, могу формирати ваздушни мицелијум.



Слика 8. Микроскопски препарат *Streptomyces* sp. увећање 1000x (фото оригинал)

Облик испитиваних колонија је округао, а величина мала. Оптичке особине и промене у подлози нису регистроване. Што се тиче структуре *Streptomyces* sp. је кончаста, исто као и ивица. Боја колоније варира од беле до крем/окер. Профил је раван код S 4/1MPA и S5, док је код S4 и S 6/1K испупчен. Сви обухваћени изолати имају површински положај. Површина је мат или наборана (табела 5).

Табела 5 - Морфолошке особине колонија бактерија рода *Streptomyces*

Ознака изолата	Биљна врста	облик	величина	профил	површина	положај	боја	ивица	структура	оптичке особине	промене у подлози	конзистенција
S 4/1 МРА	<i>P.lanceolata</i>	округао	ситна	раван	наборана	површински	крем/окер	влакнаста	кончаста	не	не	кожаста
S 4	<i>P.lanceolata</i>	округао	ситна	испупчен	наборана	површински	бела	влакнаста	кончаста	не	не	кожаста
S 5	<i>P.lanceolata</i>	округао	ситна	раван	мат/наборана	површински	крем/окер	влакнаста	кончаста	не	не	кожаста
S 6/1 К	<i>A.eupatoria</i>	округао	ситна	испупчен	мат/наборана	површински	бела	влакнаста	кончаста	не	не	кожаста

5.3. Физиолошке особине бактерија из ризосфере лековитих биљака

5.3.1. Физиолошке особине бактерија рода *Pseudomonas*

Утицај температуре на раст изолата

Већина изолата, припадника рода *Pseudomonas*, не расте на ниским температурама (5 °C), изолати K1/2, K3/3, K4/1 су једини који су показали минималан раст (табела 6). На температури од 28°C најбоље расту, чак 5 изолата је испољило обилан раст, исто толико има и оптималан раст. Једино изолати K1/1 и K4/3 имају минималан раст. При температури од 45 °C немамо уједначене резултате. Изолати K1/2 и K2/1 показују обилан раст, K3/1 и K4/1 оптимално расту, K5/1 минимално расте, док остатак изолата не расте на тој температури. У истраживањима који су спровели Tsuji и сар. утврђено је да *Pseudomonas aeruginosa* подједнако добро расте на температурама од 25, 30, 37 и 42°C.

Однос према различитим рН вредностима

Изолат K 3/3 је једини изолат рода *Pseudomonas* који не расте при рН 5 што се између осталог може видети у табели 6, изолати K 1/2, K 2/1, K 4/1, K 4/2 и K 4/3 обилно расту при овој рН вредности. Код остатака изолата K 1/1, K 3/1, K 5/1, K 6/1 је забележен оптималан раст. Код изолата K 1/3 бележимо минималан раст. Што се тиче резултата истраживања при неутралној (рН 7), изолат K 1/1 не испољава раст. Више изолата K3/1, K3/3, K5/1, K6/1 има оптималан раст, док остатак изолата има обилан раст. Изолати K1/2 и K2/1 обилно расту при рН 9, K 1/3 и K 3/1 изолати имају минималан раст, а остатак изолата оптимално расте при овој рН.

Однос према различитој концентрацији NaCl-а

Код *Pseudomonas* sp. највише изолата при 3% NaCl-а, има оптималан раст K 1/2, K 4/2, K4/3, K5/1. K2/1, K3/2 и K6/1 бележе минималан раст, остатак изолата не расте. При 5% NaCl-а, K2/1 и K3/1 имају оптималан раст, K1/1, K1/2, K4/3, K5/1 минимално расту при овој концентрацији NaCl-а, остатак изолата не расте. При концентрацији NaCl-а од 7% једини изолат који има раст, и то минималан је K2/1. Биофилм код *Pseudomonas aeruginosa* се формира једнако у 2, 4 и 7 % раствору NaCl-а, што је доказано у истраживањима групе аутора (Вујовић и сар. 2016).

Табела 6 – Утицај температуре, рН вредности и концентрације NaCl-а на изолате

Ознака изолата	Биљна врста	t 5°C	t 28°C	t 45°C	pH 5	pH 7	pH 9	3%	5%	7%
К 1/1	<i>P.lanceolata</i>	-	+	-	++	-	++	-	+	-
К 1/2	<i>P.lanceolata</i>	+	++	+++	+++	++	+++	++	+	-
К 1/3	<i>P.lanceolata</i>	-	++	-	+	+++	+	-	-	-
К 2/1	<i>M.longifolia</i>	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+
К 3/1	<i>S.sylvatica</i>	-	++	++	++	++	+	-	++	-
К 3/2	<i>S.sylvatica</i>	-	+++	-	+	+++	++	+	-	-
К 3/3	<i>S.sylvatica</i>	+	+++	-	-	++	+	-	-	-
К 4/1	<i>A.milefolium</i>	+	+++	++	+++	+++	++	+	-	-
К 4/2	<i>A.milefolium</i>	-	++	-	+++	+++	++	++	-	-
К 4/3	<i>A.milefolium</i>	-	+	-	+++	+++	++	++	+	-
К 5/1	<i>C.jacea</i>	-	++	+	++	++	++	++	+	-
К 6/1	<i>A.eupatoria</i>	-	+++	-	++	++	++	+	-	-

-не расте; + минималан раст; ++ оптималан раст; +++ обилан раст

Утицај тешких метала на раст изолата

Pseudomonas sp. је релативно осетљива на раствор CdCl₂. Изолат К 3/3 је најосетљивији, те формира већу зону инхибиције, остатак изолата најчешће формира зону инхибиције од 0-2 mm. Раствор MnCl₂ x 4H₂O нешто слабије делује на ову врсту, углавном не формира инхибиторне зоне, изузев код изолата К1/2, К4/1 и К 6/1. Изолат К1/3 једини формира зону инхибиције малог пречника у раствору PbCl₂ (табела 7). Утврђивање отпности микроорганизама на утицај тешких метала је значајано за мониторинг загађења животне средине, а толерантни микроорганизми су јефтина алтернатива хемијској технологији.

Табела 7 – Утицај тешких метала на раст изолата

Ознака изолата	Биљна врста	CdCl ₂	MnCl ₂ x 4H ₂ O	PbCl ₂
К 1/1	<i>P.lanceolata</i>	+	-	-
К 1/2	<i>P.lanceolata</i>	++	+	-
К 1/3	<i>P.lanceolata</i>	++	-	+
К 2/1	<i>M.longifolia</i>	++	-	-
К 3/1	<i>S.sylvatica</i>	+	-	-
К 3/2	<i>S.sylvatica</i>	++	-	-
К 3/3	<i>S.sylvatica</i>	+++	-	-
К 4/1	<i>A.milefolium</i>	++	+	-
К 4/2	<i>A.milefolium</i>	+	-	-
К 4/3	<i>A.milefolium</i>	+	-	-
К 5/1	<i>C.jacea</i>	++	-	-
К 6/1	<i>A.eupatoria</i>	+	+	-

-без зоне; + зона инхибиције од 0-2 mm; ++ зона инхибиције од 2-5mm; +++ зона инхибиције преко 5 mm

Однос према различитим изворима угљеника

Већина изолата користи глукозу као извор угљеника, те долази до позитивне реакције, осим изолата К 1/3. Нешто мањи број изолта *Pseudomonas* sp. користи галактозу као извор угљеника, њих 7. Док К1/2, К1/3, К2/1, К4/1 и К4/2 не користе. Идентична ситуација је и са коришћењем ксилозе. Сахарозу не користе изолати К 1/1, К1/2, К1/3, К2/1, К4/2 и К4/1 (табела 8). Лактозу као извор енергије користи једино К3/1. Што се тиче фруктозе као извора енергије њу успешно користи већина изолата *Pseudomonas* sp. изузев К3/3 и К4/1.

Табела 8 – Однос бактерија рода *Pseudomonas* према различитим изворима угљеника

Oznaka izolata	Biljna vrsta	glukoza	galaktoza	ksiloza	saharoza	laktoza	fruktoza
К 1/1	<i>P.Lanceolata</i>	+++	++	++	--	--	+
К 1/2	<i>P.Lanceolata</i>	++	--	--	--	--	+
К 1/3	<i>P.Lanceolata</i>	--	--	--	--	--	±
К 2/1	<i>M.Longifolia</i>	+	-	-	-	-	+
К 3/1	<i>S.Sylvatica</i>	+++	++	+++	+++	-+	+++
К 3/2	<i>S.Sylvatica</i>	+++	++	++	-+	--	+
К 3/3	<i>S.Sylvatica</i>	+++	+++	++	--	--	~
К 4/1	<i>A.Milefolium</i>	++	--	--	+	--	±
К 4/2	<i>A.Milefolium</i>	+	+	+	+	-	+
К 4/3	<i>A.Milefolium</i>	+++	++	+++	++	-	±
К 5/1	<i>C.Jacea</i>	+++	+	+++	++	-	++

+ позитивна реакција; - негативна реакција

5.3.2. Физиолошке особине бактерија рода *Bacillus*

Утицај температуре на раст изолата

Изолати рода *Bacillus* при температури од 5°C најчешће не расту, изузев изолата МРА 3/1 из ризосфере *S. sylvatica* и МРА(UB)6/1 из ризосфере *A. eupatoria*. При температури од 28°C је другачија ситуација, сви изолати расту, из ризосфере *P. lanceolata* имају минималан раст (табела 9). Са друге стране изолати ризосфере *S. sylvatica* и *A. eupatoria* углавном испољавају раст обилно. При већој температури, од 45°C су подељени резултати међутим сви изолати расту, изузев изолата МРА(UB)1/1 и МРА(UB)5/1. У раду Дошен (2014) су слични резултати нашим, на 5°C не расте ни један изолат, док при 28°C сви расту једнаким интензитетом, дакле претежно су мезофилни организми.

Однос према различитим рН вредностима

На основу добијених резултата се може закључити да врста *Bacillus* sp. неометано расте на различитим рН вредностима. При рН 5, сви изолати испољавају обилан или оптималан раст. Једино изолат МРА(УВ)5/1, из ризосфере *C. jacea* минимално расте. При неутралној рН 7, такође је приметан раст изузев код МРА(УВ)5/1, из ризосфере *C. jacea* и МРА(УВ)6/1 из ризосфере *A. eupatoria* где се *Bacillus* sp. не развија. Ни рН 9 није погодна за развој бактерија из ризосфере *C. jacea*, те изолат МРА(УВ)5/1 једини од испитиваних не расте. Према истраживањима Kim et al. (1997), оптимална рН за раст изолата рода *Bacillus* се креће између 5 и 8.

Однос према различитој концентрацији NaCl-а

Врста *Bacillus* sp. прилично успешно расте у 3% NaCl. Изузеци су МРА 3/1 из ризосфере *S. sylvatica* и МРА(УВ)5/1, из ризосфере *C. jacea* који не расту. Изолат МРА(УВ)1/3 из ризосфере *P.lanceolata* има минималан раст, а остатак изолата неометано расте. У присуству 5% NaCl је већ ређи раст, МРА(УВ)1/3, К 2/1 и МРА 3/1 имају минималан раст, МРА1/1 оптимано расте. Остатак изолата се не развија при овим концентрацијама. Код 7% NaCl је слична ситуација, само 5 изолата расте минимално, МРА2/1, МРА(УВ)2/1, МРА(УВ)5/1, МРА(УВ)6/1. Изолат МРА1/1 оптимално расте у присуству 7% NaCl.

Табела 9 - Утицај температуре, рН вредности и концентрације NaCl-а на изолате

Ознака изолаа	Биљна врста	t 5°C	t 28°C	t 45°C	рН 5	рН 7	рН 9	3 %	5 %	7 %
МРА 1/1	<i>P.lanceolata</i>	-	+	+	++	++	++	++	++	++
МРА(УВ)1/1	<i>P.lanceolata</i>	-	+	-	+++	++	+++	++	-	-
МРА(УВ)1/2	<i>P.lanceolata</i>	-	+	++	++	++	++	++	-	-
МРА(УВ)1/3	<i>P.lanceolata</i>	-	+	+	++	++	++	+	+	-
МРА 2/1	<i>M.longifolia</i>	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+
МРА(УВ)2/1	<i>M.longifolia</i>	-	+++	+++	+++	+++	++	++	-	+
К 2/1	<i>M.longifolia</i>	-	+++	++	+++	+++	+++	+++	+	-
МРА 3/1	<i>S.sylvatica</i>	+	++	+	++	+	+	-	+	-
МРА(УВ)4/1	<i>A.milefolium</i>	-	+++	++	+++	+++	+++	+++	-	-
МРА 4/1	<i>A.milefolium</i>	-	++	+	++	+	+	++	-	-
МРА(УВ)5/1	<i>C.jacea</i>	-	++	-	+	-	-	-	-	+
МРА(УВ)6/1	<i>A.eupatoria</i>	+	+++	++	+++	-	+++	++	-	+

-не расте; + минималан раст; ++ оптималан раст; +++ обилан раст

Утицај тешких метала на раст изолата

Изолати *Bacillus* sp. у раствору CdCl_2 формирају зоне инхибиције веће од 5mm (табела 10). Нешто другачија ситуација је код раствора $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, изолати МРА (UB)1/1, МРА(UB)1/2, МРА2/1, МРА(UB)2/1, МРА(UB) 4/1, К2/1 и МРА(UB) 6/1 формирају минималну зону инхибиције, док остатак изолата нема никакву реакцију. У раствору PbCl_2 само изолат К2/1 из ризосфере *M.Longifolia* има реакцију на раствор. Испитивања вршена на *Bacillus cereus* (Singh и сар. 2010) су показала отпорност бацилуса на Pb^{2+} , As^{2+} , Cs^{1+} од тешких метала, а у раду Samanta и сар. (2012) изолати *Bacillus* sp. су показали високу толеранцију на кадмијум.

Табела 10 – Утицај тешких метала на раст изолата

Ознака изолата	Биљна врста	CdCl_2	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	PbCl_2
МРА 1/1	<i>P.lanceolata</i>	++	-	-
МРА(UB)1/1	<i>P.lanceolata</i>	+++	+	-
МРА(UB)1/2	<i>P.lanceolata</i>	+++	+	-
МРА(UB)1/3	<i>P.lanceolata</i>	+++	-	-
МРА 2/1	<i>M.Longifolia</i>	+++	+	-
МРА(UB)2/1	<i>M.Longifolia</i>	+++	+	-
К 2/1	<i>M.Longifolia</i>	+++	+	+
МРА 3/1	<i>S.Sylvatica</i>	++	-	-
МРА(UB)4/1	<i>A.milefolium</i>	++	+	-
МРА 4/1	<i>A.milefolium</i>	+++	-	-
МРА(UB)5/1	<i>C.jacea</i>	+++	-	-
МРА(UB)6/1	<i>A.eupatoria</i>	++	+	-

-без зоне; + зона инхибиције од 0-2 мм; ++ зона инхибиције од 2-5мм; +++ зона инхибиције преко 5 мм

Однос према различитим изворима угљеника

Изолати *Bacillus* sp. доказано користе глукозу као извор енергије, сви изузев МРА 3/1 из ризосфере *S. sylvatica*. Са галактозом је обрнута ситуација, једини изолати који је користе као извор енергије су МРА3/1, МРА4/1 и МРА(UB)5. Ксилоза, је извор енергије код МРА(UB)1/2, МРА(UB)1/3, МРА3/1, МРА4/1, МРА(UB)5/1. Лактоза није у толикој мери користан извор енергије за *Bacillus* sp. минимално делује на МРА(UB)1/3, МРА 3/1, МРА(UB)5/1. Са друге стране фруктоза је добар извор енергије за већину изолата као и сахароза, те се само мали број изолата не развија на подлогама са њима (табела 11). Gangwar и Kaур (2009) су утврдили да изолати *Bacillus* sp. користе глукозу, галактозу ксилозу и манитол као извор енергије.

Табела 11 - Однос бактерија рода *Bacillus* према различитим изворима угљеника

Ознака изолата	Биљна врста	глукоза	галактоза	ксилоза	сахароза	лактоза	фруктоза
МРА 1/1	<i>P.lanceolata</i>	+	-	-	+	-	+
МРА(УБ)1/1	<i>P.lanceolata</i>	+	-	-	+	-	+
МРА(УБ)1/2	<i>P.lanceolata</i>	+	-	+	+	-	-
МРА(УБ)1/3	<i>P.lanceolata</i>	+	-	+	+	+	-
МРА 2/1	<i>M.longifolia</i>	+	-	-	-	-	-
МРА(УБ)2/1	<i>M.longifolia</i>	+	-	-	-	-	-
К 2/1	<i>M.longifolia</i>	+	-	-	-	-	-
МРА 3/1	<i>S.sylvatica</i>	-	+	+	-	+	+
МРА(УБ)4/1	<i>A.milefolium</i>	+	-	-	-	-	-
МРА 4/1	<i>A.milefolium</i>	+	+	+	+	-	+
МРА(УБ)5/1	<i>C.jacea</i>	+	+	+	+	+	+
МРА(УБ)6/1	<i>A.eupatoria</i>	+	-	-	+	-	+

+ позитивна реакција; - негативна реакција

5.3.3. Физиолошке особине бактерија рода *Azotobacter*

Утицај температуре на раст изолата

Резултати су нам показали да се изолати *Azotobacter* sp. најбоље развијају при температурама од 28°C, на температурама од 5°C и 45°C раст је минималан (табела 12). Saribay (2003) се такође бавио овом темом и утврдио је да ћелије *Azotobacter*-а не подносе високе температуре, при температури од 45-48 °C формирају цисте у којим преживљавају до настанка повољних услова

Однос према различитим рН вредностима

Без обзира на рН вредност средине сви изолати *Azotobacter*-а успешно расту и развијају се, неки више а неки мање. Издвојила бих F 2/1 и F 5/1 на рН 7, као и F 5/1 и F 6/1 при рН 9 који испољавају минималан раст. Becking (2006) сматра да је оптимална рН вредност средине у којој се *Azotobacter* развија 7-7., најпогоднија за развој физиологије биљке.

Однос према различитој концентрацији NaCl-а

Раствор NaCl-а од 3 % позитивно делује на раст изолата *Azotobacter*-а, сви оптимално расту изузев F5/1. Слично се дешава у 5% раствору, док у 7% раствору изолати минимално расту, једино F 6/1 уопште не расте. Неке врсте чак могу да расту и при већим концентрацијама NaCl-а (10%), конкретно *Azotobacter salinestris* која може и да егзистира у 8% раствору NaCl-а (Aasfar et al., 2021).

Табела 12 - Утицај температуре, рН вредности и концентрације NaCl-а на изолате

Ознака изолата	Биљне врсте	t 5°C	t 28°C	t 45°C	pH 5	pH 7	pH 9	3 %	5 %	7 %
F 1/1	<i>P.lanceolata</i>	+	++	+	+++	++	+++	++	++	+
F 1/2	<i>P.lanceolata</i>	+	++	+	+++	++	+++	++	++	+
F 2/1	<i>M.longifolia</i>	+	++	+	++	+	++	++	++	+
F 2/2	<i>M.longifolia</i>	+	+++	+	+++	++	+++	++	++	+
F 3/2	<i>S.sylvatica</i>	+	++	+	+++	++	++	++	+	+
F 4/1	<i>A.milefolium</i>	+	++	+	+++	++	++	+	+	+
F 5/1	<i>C.jacea</i>	-	+	+	++	+	+	-	-	+
F 6/1	<i>A.eupatoria</i>	-	++	+	+++	++	+	++	+	-

-не расте; +минималан раст; ++ оптималан раст; +++ обилан раст

Утицај тешких метала на раст изолата

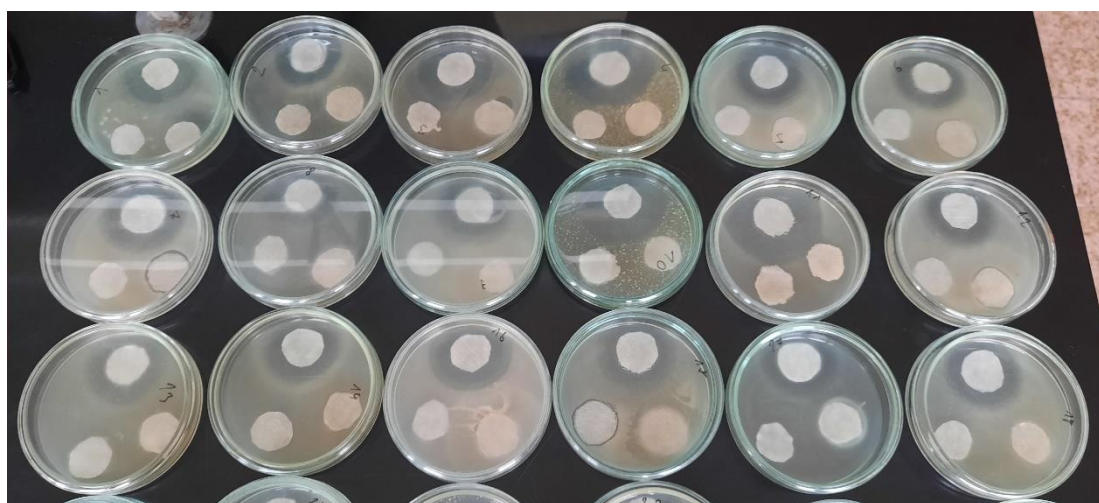
Изолати *Azotobacter-a* не реагују на растворе CdCl₂, MnCl₂·4H₂O, PbCl₂ (табела 13).

Неометано расту и не формирају зоне инхибиције, а ни стимулације (слика 9).

Табела 13 – Утицај тешких метала на раст изолата *Azotobacter sp.*

Ознака изолата	Биљна врста	CdCl ₂	MnCl ₂ ·4H ₂ O	PbCl ₂
F 1/1	<i>Planceolata</i>	-	-	-
F 1/2	<i>P.lanceolata</i>	-	-	-
F 2/1	<i>M.longifolia</i>	-	-	-
F 2/2	<i>M.longifolia</i>	-	-	-
F 3/2	<i>S.sylvatica</i>	-	-	-
F 4/1	<i>A.milefolium</i>	-	-	-
F 5/1	<i>C.jacea</i>	-	-	-
F 6/1	<i>A.eupatoria</i>	-	-	-

-без зоне; + зона инхибиције од 0-2 mm; ++ зона инхибиције од 2-5mm; +++ зона инхибиције преко 5 mm



Слика 9. Изолати третирани растворима тешких метала (фото оригинал)

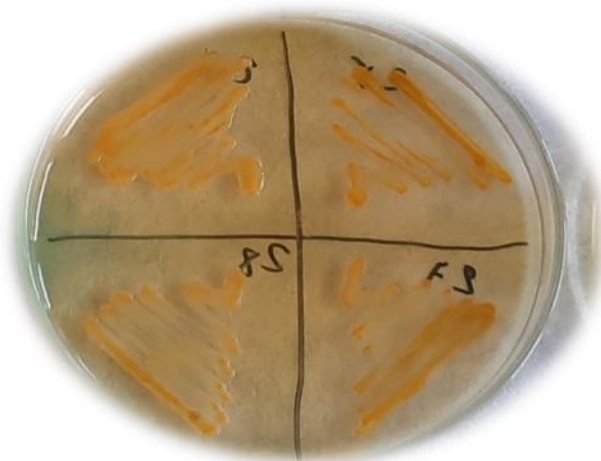
Однос према различитим изворима угљеника

Фруктоза, галактоза, ксилоза и сахароза имају велики утицај на раст и развој изолата *Azotobacter*-а (табела 14), они их користе као основни извор енергије. Раст у присуству ксилозе се најбоље види на слици 10. Глукозу користи 50% изолата (4 од 8), док у присуству лактозе једино не реагују изолати F4/1 и F6/1.

Табела 14 - Однос бактерија рода *Azotobacter* према различитим изворима угљеника

Ознака изолата	Биљна врста	глукоза	галактоза	ксилоза	сахароза	лактоза	фруктоза
F 1/1	<i>P.lanceolata</i>	-	+	+	+	+	+
F 1/2	<i>P.lanceolata</i>	-	+	+	+	+	+
F 2/1	<i>M.longifolia</i>	-	+	+	+	+	+
F 2/2	<i>M.longifolia</i>	-	+	+	+	+	+
F 3/2	<i>S.sylvatica</i>	+	+	+	+	+	+
F 4/1	<i>A.milefolium</i>	+	+	+	+	-	+
F 5/1	<i>C.jacea</i>	+	+	+	+	+	+
F 6/1	<i>A.eupatoria</i>	+	+	+	+	-	+

+ позитивна реакција; - негативна реакција



Слика 10 – Однос бактерија рода *Azotobacter* према ксилози (фото оригинал)

5.3.4. Физиолошке особине бактерија рода *Streptomyces*

Утицај температуре на раст изолата

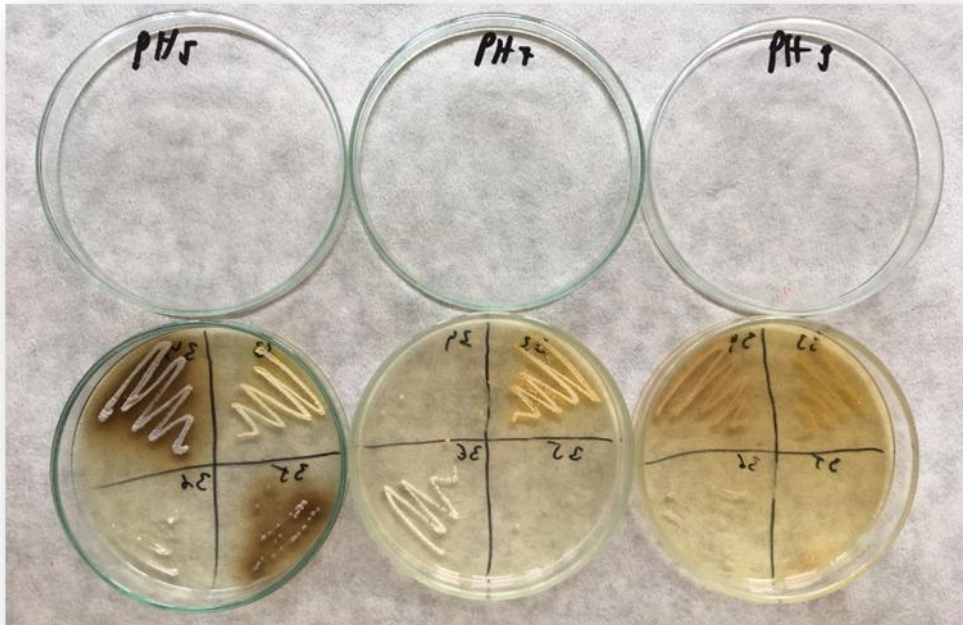
Температура од 5°C је температура при којој се изолати *Streptomyces*-а не развијају нити расту (табела 15). Када је инкубација на 28 °C изолат S 4/1MPA обилно расте, а S 6/1 К минимално. Исти ти изолати на температури 45°C не расту.

Однос према различитим рН вредностима

Најбољи раст и развој је примећен при рН 5, где сви изолати расту. S4 и S5 не расту при неутралној рН, а S5 ни при рН од 9, што се и види са слике 11. Пример где се скоро сви изолати актиномицета развијају при свим наведеним рН вредностима је забележен у докторској тези Највирт (2020).

Однос према различитој концентрацији NaCl-а

У тропостотном раствору NaCl-а се *Streptomyces* веома добро развија, док у 5% и 7 % раствору једини изолат који даје реакцију јесте S4/1 МРА из ризосфере *P. lanceolata*. Слични резултати су и у раду Највирт (2019), у 3% раствору NaCl-а су само два изолат забележила минималан раст, док у 5% и 7% раствору није утврђен.



Слика 11. Утицај рН вредности на изолате *Streptomyces* sp. (фото оригинал)

Табела 15 - Утицај температуре, рН вредности и концентрације NaCl-а на изолате

Ознака изолатата	Биљна врста	t 5 °C	t 28 °C	t 45 °C	pH 5	pH 7	pH 9	3 %	5%	7 %
S 4/1 МРА	<i>P.lanceolata</i>	-	+++	-	+++	+++	++	+++	++	+
S 4	<i>P.lanceolata</i>	-	-	++	+++	-	++	+++	-	-
S 5	<i>P.lanceolata</i>	-	-	+	++	-	-	+	-	-
S 6/1 К	<i>A.eupatoria</i>	-	+	-	+	+++	+	+++	-	-

-не расте; + минималан раст; ++ оптималан раст; +++ обилан раст

Утицај тешких метала на раст изолата

Раствор CdCl_2 једини утиче на изолате *Streptomyces-a*, те код сваког доводи до облиног раста (табела 16). Изолати у растворима $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ и PbCl_2 не дају никакву реакцију. Толеранција *Streptomyces-a* на тешке метале се види код Koushalshahi et al. (2012), од 41 изолата, седам је било толерантно на максималне концентрације бабра, док је четири било толерантно на живу.

Табела 16 – Утицај тешких метала на раст изолата

Ознака изолата	Биљна врста	CdCl_2	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	PbCl_2
S 4/1 МРА	<i>P.lanceolata</i>	+++	-	-
S 4	<i>P.lanceolata</i>	+++	-	-
S 5	<i>P.lanceolata</i>	+++	-	-
S 6/1 К	<i>A.eupatoria</i>	+++	-	-

-без зоне; + зона инхибиције од 0-2 mm; ++ зона инхибиције од 2-5mm; +++ зона инхибиције преко 5 mm

Однос према различитим изворима угљеника

Имајући у виду резултате истраживања, половина изолата *Streptomyces-a* успешно користе угљеник као извор енергије. Лактозу користи једино изолат S6/1 К, док S5/1 не користи ни један од тестираних шећера. Изолат S 4 не користи глукозу а S 6/1 К сахарозу. Све остале реакције на угљеник су позитивне (табела 17). Однос *Stremtomycies* sp. према сахарози и фруктози се може видети на слици 12. и 13. Dhanasekaran et al. (2009) су утврдили да изолати *Stremtomycies* sp. из њиховог истраживања успешно користе фруктозу и лактозу као извор угљеника.

Табела 17 – Однос бактерија рода *Stremtomycies* према различитим изворима угљеника

Ознака изолата	Биљна врста	глукоза	галактоза	ксилоза	сахароза	лактоза	фруктоза
S 4/1 МРА	<i>P.lanceolata</i>	+	+	+	+	-	+
S 4	<i>P.lanceolata</i>	-	+	+	+	-	+
S 5	<i>P.lanceolata</i>	-	-	-	-	-	-
S 6/1 К	<i>A.eupatoria</i>	+	+	+	-	+	+

+ позитивна реакција; - негативна реакција



Слике 12. и 13. – Однос бактерија рода *Streptomyces* према фруктози и сахарози (фото оригинал)

5.4. Биохемијска карактеризација изолата из ризосфере лековитих биљака

5.4.1. Биохемијска карактеризација бактерија рода *Pseudomonas*

Пектинолитски ензими (пектиназе) потпомажу разградњу пектина. У нашем истраживању није утврђена позитивна реакција, односно није утврђена способност разлагања пектина.

Целулазну активност је показало пет од 12 изолата *Pseudomonas* sp. Остатак изолата не показује реакцију.

Испитивани изолати у мањој мери продукују амилазу, иначе веома важан екзоензим. Благо позитивна реакција је установљена код K1/2, K 2/1, K 3/2 K и K4/3.

Уреаза са својом улогом катализатора у реакцији хидрлизе уреје је значајна за одржавање биљног метаболизма. Као доказ хидролизе долази до појаве ружичасте боје у хранљивој подлози. Сви изолати из ризосфере *S. sylvatica* су показали склоност ка продукцији уреазе, као и изолати ризосфере *A. milefolium*, K4/1 и K4/3.

Способност стварања ензима, липазе није доказана код изолата *Pseudomonas* sp. Једини са том способношћу су изолати K4/3 и K6/1, код њих долази до појаве слабо обојених зона око колоније.

Резултати рада су приказани детаљно у табели 18.

Табела 18 – Способност продукције ензима изолата *Pseudomonas* sp.

Ознака изолата	Биљна врста	липаза	уреаза	пектиназа	целулаза	амилаза
К 1/1	<i>P.lanceolata</i>	-	-	-	-	-
К 1/2	<i>P.lanceolata</i>	-	-	-	+	+
К 1/3	<i>P.lanceolata</i>	-	-	-	+	-
К 2/1	<i>M.longifolia</i>	-	-	-	+	+
К 3/1	<i>S.sylvatica</i>	-	+	-	-	-
К 3/2	<i>S.sylvatica</i>	-	+	-	-	+
К 3/3	<i>S.sylvatica</i>	-	+	-	+	-
К 4/1	<i>A.milefolium</i>	-	+	-	+	-
К 4/2	<i>A.milefolium</i>	-	-	-	-	+
К 4/3	<i>A.milefolium</i>	+	+	-	-	-
К 5/1	<i>C.jacea</i>	-	-	-	-	-
К 6/1	<i>A.eupatoria</i>	+	-	-	-	-

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

5.4.2. Биохемијска карактеризација бактерија рода *Bacillus*

Ниједан од издвојених изолата није показао позитивну реакцију, када је у питању ензим пектиназа. За разлику од осталих ензима са којима смо радили *Bacillus* sp. добро реагује и има значајну целулазну активност. Испољава благо и јаче позитивне реакције. Изолати МРА3/1 и МРА4/1 једини немају способност разлагања целулозе. Код већине узорака нисмо детектовали продукцију амилазе, ензима који омогућавају цепање унутрашњих гликозидних веза у молекулима скроба, све у циљу настанка олигосахарида и декстрина МРА(UB)1/2, МРА(UB)1/4 и МРА 4/1 су једини изолати код којих је примећена реакција, те они доказано врше хидролизу скроба. Утврдили смо да је МРА(UB) 4/1 једини изолат *Bacillus* sp. који разлаже уреу до амонијака и угљен-диоксида, и том приликом алкализује хранљиву подлогу. Уреа се иначе користи као један од главних земљишних извора азота. Ниједан од испитиваних изолата није показао способност продукције ензима липазе (табела 19). Различити резултати су пак утврђени код Joseph et al. (2007), где је свих 40 испитиваних изолата имало способност хидролизе скроба.

Табела 19 – Способност продукције ензима изолата *Bacillus* sp.

Ознака изолата	Биљна врста	липаза	уреаза	пектиназа	целулаза	амилаза
MPA 1/1	<i>P.lanceolata</i>	-	-	-	+	-
MPA(UB)1/1	<i>P.lanceolata</i>	-	-	-	+	-
MPA(UB)1/2	<i>P.lanceolata</i>	-	-	-	+	+
MPA(UB)1/3	<i>P.lanceolata</i>	-	-	-	+	+
MPA 2/1	<i>M.longifolia</i>	-	-	-	+	-
MPA(UB)2/1	<i>M.longifolia</i>	-	-	-	+	-
К 2/1	<i>M.longifolia</i>	-	-	-	+	-
MPA 3/1	<i>S.sylvatica</i>	-	-	-	-	-
MPA(UB)4/1	<i>A.milefolium</i>	-	+	-	+	-
MPA 4/1	<i>A.milefolium</i>	-	-	-	-	+
MPA(UB)5/1	<i>C.jacea</i>	-	-	-	+	-
MPA(UB)6/1	<i>A.eupatoria</i>	-	-	-	+	-

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

5.4.3. Биохемијска карактеризација бактерија рода *Azotobacter*

Изолати *Azotobacter* sp. нису склони продукцији ензима пектиназа. Једини изолат који доказано разлаже пектин јесте F 3/2, из ризосфере *S. sylvatica*.

Способност разлагања целулозе јесте карактеристична за већину изолата *Azotobacter* sp. Код изолата изолованих из ризосфере *A. milefolium* и *A. eupatoria* утврђена је способност продукције ензима целулазе и то у већој количини. *S. sylvatica* је једина биљка из чије ризосфере су изоловане бактерије које не продукују целулазу.

Амилазе, важни егзоензими са широком употребом се продукују у већим количинама од стране наших испитиваних изолата. Код F1/1 и F4/1 је потврђен настанак највећих количина овог ензима.

Способност разлагања уреје је веома развијена код изолата *Azotobacter* sp. Код свих је примећена позитивна реакција.

Код липазе је нешто другачија ситуација у односу на уреазу. Једини изолат који може да разлаже масти на глицерол и масне киселине је F2/1 из ризосфере *M. longifolia* (табела 20).

Табела 20 – Способност продукције ензима изолата *Azotobacter* sp.

Ознака изолата	Биљна врста	липаза	уреаза	пектиназа	целулаза	амилаза
F 1/1	<i>P.lanceolata</i>	-	+	-	+	+
F 1/2	<i>P.lanceolata</i>	-	+	-	-	+
F 2/1	<i>M.longifolia</i>	+	+	-	+	+
F 2/2	<i>M.longifolia</i>	-	+	-	+	+
F 3/2	<i>S.sylvatica</i>	-	+	+	-	+
F 4/1	<i>A.milefolium</i>	-	+	-	+	+
F 5/1	<i>C.jacea</i>	-	+	-	+	+
F 6/1	<i>A.eupatoria</i>	-	+	-	+	+

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

5.4.4. Биохемијске карактеризација бактерија рода *Streptomyces*

Наши изолати се нису показали као добри продуценти ензима уреазе, амилазе, целулазе и пектиназе. Што се тиче липазе, једино је продукују S4/1MPA и S4/1 из ризосфере *P. lanceolata* (табела 21). У истраживању Jeffrey (2008) је показао супротно, од укупно 62 изолата, 48 је продуковало целулазу, 46 липазу и 41 протеазу.

Табела 21 – Способност продукције ензима изолата *Streptomyces* sp.

Ознака изолата	Биљна врста	липаза	уреаза	амилаза	целулаза	пектиназа
S 4/1 MPA	<i>P.lanceolata</i>	+	-	-	-	-
S 4	<i>P.lanceolata</i>	+	-	-	-	-
S 5	<i>P.lanceolata</i>	-	-	-	-	-
S 6/1 K	<i>A.eupatoria</i>	-	-	-	-	-

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

5.5. ПГП карактеризација изолата из ризосфере лековитих биљака

5.5.1. ПГП карактеризација бактерија рода *Pseudomonas*

Сви изолати *Pseudomonas* sp. нису показали способност продукције IAA осим изолата K 6/1 из ризосфере *A. eupatoria*. Већина тестираних изолата је показала способност продукције HCN-а изузев K1/2, K1/3, K2/1, K3/1 као и K4/1. Бактеријски изолати који доказано формирају сидерофоре су K2/1, K3/3, K4/1, K4/2, K5/1. Остатак изолата из огледа нема те способности. Фосфомобилизациону способност имају само изолати K1/2 и K4/1, док фосфоминерализациону способност има 50% испитиваних изолата (табела 22).

Табела 22 – Способност продукције IAA, HCN-а, сидерофора и растварања органских и неорганских једињења Р изолата *Pseudomonas* sp.

Ознака изолата	Биљна врста	IAA	сидерофоре	HCN	P min	P mob
К 1/1	<i>P.lanceolata</i>	-	/	+++	-	-
К 1/2	<i>P.lanceolata</i>	-	/	-	-	+
К 1/3	<i>P.lanceolata</i>	-	/	-	-	-
К 2/1	<i>M.longifolia</i>	-	++	-	-	-
К 3/1	<i>S.sylvatica</i>	-	/	-	+	-
К 3/2	<i>S.sylvatica</i>	-	/	++	++	-
К 3/3	<i>S.sylvatica</i>	-	-	+	++	-
К 4/1	<i>A.milefolium</i>	-	+	-	++	+
К 4/2	<i>A.milefolium</i>	-	-	+++	-	-
К 4/3	<i>A.milefolium</i>	-	-	+++	-	-
К 5/1	<i>C.jacea</i>	-	+	++	+	-
К 6/1	<i>A.eupatoria</i>	+	/	+	+	-

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



Слика 14. Продукција сидерофора код *Pseudomonas* sp. (фото оригинал)

5.5.2. ПГП карактеризација бактерија рода *Bacillus*

Ниједан од тестираних изолата није показао способност продукције индол-сирћетне киселине. Готово сви изолати продукују HCN, неки у већој неки у мањој мери. Изузетак је само изолат МРА 1/1 из ризосфере *P. lanceolata*. Слични резултати су утврђени у истраживању В.Аlaylar (2022) који је изоловао *Bacillus* из ризофере *M. longifolia* и поред осталих ПГП својстава утврдио и висок степен продукције HCN. Делимично је успешан процес продукције сидерофора код ових бактерија. Половина тестираних бактерија их уопште не формира, док се код друге количине формирају али су слабо видљиве (МРА 2/1, МРА(UB)2/1, К 2/1, МРА(UB)4/1, МРА(UB)6/1).

Изолати рода *Bacillus* не показују способност растварања неорганских једињења фосфора, док изолати МРА(УВ)1/2, МРА(УВ)1/3, МРА 3/1, МРА 4/1 једини растварају органска једињења фосфора (табела 23).

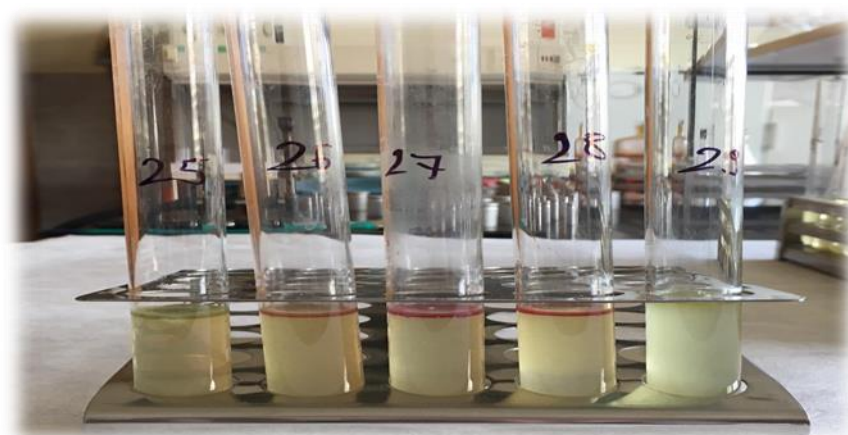
Табела 23 – Способност продукције IAA, HCN-а, сидерофора и растварања органских и неорганских једињења Р изолата *Bacillus* sp.

Ознака изолата	Биљна врста	IAA	сидерофоре	HCN	P min	P mob
МРА 1/1	<i>P.lanceolata</i>	-	-	-	-	-
МРА(УВ)1/1	<i>P.lanceolata</i>	-	-	++	-	-
МРА(УВ)1/2	<i>P.lanceolata</i>	-	-	++	+	-
МРА(УВ)1/3	<i>P.lanceolata</i>	-	-	++	+	-
МРА 2/1	<i>M.longifolia</i>	-	+	+	-	-
МРА(УВ)2/1	<i>M.longifolia</i>	-	+	+	-	-
К 2/1	<i>M..longifolia</i>	-	+	+++	-	-
МРА 3/1	<i>S.sylvatica</i>	-	-	++	++	-
МРА(УВ)4/1	<i>A.milefolium</i>	-	+	+	-	-
МРА 4/1	<i>A.milefolium</i>	-	-	++	+	-
МРА(УВ)5/1	<i>C.jacea</i>	-	-	+++	-	-
МРА(УВ)6/1	<i>A.eupatoria</i>	-	+	++	-	-

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

5.5.3. ПГП карактеризација бактерија рода *Azotobacter*

Изолати F1/2, F2/1, F2/2, F6/1 једини продукују IAA од тестираних изолата *Azotobacter-a* и формирају црвене прстенове (слика 15).



Слика 15. Продукција IAA (фото оригинал)

Сви изолати овог рода који су обухваћени у раду продукују HCN, неки са мањим а неки са већим успехом. Није доказана способност формирања сидерофора код *Azotobacter-a* изолованих из ризосфере лековитих биљака.

Што се тиче резултата ових истраживања, способност растварања неорганских једињења фосфора има само изолат F1/2, док сви изолати имају способност растварања органских једињења фосфора, што се и види из табеле 24.

Табела 24 – Способност продукције IAA, HCN-а, сидерофора и растварања органских и неорганских једињења P изолата *Azotobacter* sp.

Ознака изолата	Биљна врста	IAA	сидерофоре	HCN	P min	P mob
F 1/1	<i>P.lanceolata</i>	-	-	++	++	-
F 1/2	<i>P.lanceolata</i>	+	-	+++	++	+
F 2/1	<i>M.longifolia</i>	+	-	++	+	-
F 2/2	<i>M.longifolia</i>	+	-	+++	++	-
F 3/2	<i>S.sylvatica</i>	-	-	++	++	-
F 4/1	<i>A.milefolium</i>	-	-	++	+	-
F 5/1	<i>C.jacea</i>	-	-	++	++	-
F 6/1	<i>A.eupatoria</i>	+	-	++	+	-

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

5.5.4. ПГП карактеризација бактерија рода *Streptomyces*

Сви испитивани бактеријски изолати рода *Streptomyces* sp. продукују IAA. S4/1 МРА, изолован из ризосфере биљке *P.lanceolata* једини из наведеног рода продукује HCN. Није доказано формирање сидерофора од стране изолованих *Streptomyces*-а. Сви изолати обухваћени истраживањем имају способност разлагања и органских и неорганских једињења фосфора, изузев S5 који не разлаже органска једињења фосфора (табела 25).

Табела 25 – Способност продукције IAA, HCN-а, сидерофора и растварања органских и неорганских једињења P изолата *Streptomyces* sp.

Ознака изолата	Биљна врста	IAA	сидерофоре	HCN	P min	P mob
S 4/1 МРА	<i>P.lanceolata</i>	+++	-	+	+++	+++
S 4	<i>P.lanceolata</i>	+++	-	-	+++	+++
S 5	<i>P.lanceolata</i>	+++	-	-	-	++
S 6/1 К	<i>A.eupatoria</i>	+++	-	-	+	+++

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

5.5.5. Бактерије промотори раста из ризосфере дивљих лековитих биљака

Већ смо се осврнули на значај бактерија као промотора раста. Као пример можемо да узмемо истраживање из Индије (Bhattacharyya et al., 2020) којим је утврђен позитиван ефекат на раст клијанаца кукуруза и пиринча након третмана бактеријским изолатима из седам различитих ризосфера. Такође, Abdelshafy et al., (2022), је са својим сарадницима утврдио позитиван ефекат одређених бактеријских изолата на раст корена парадајза и памука. Наше истраживање је показало различите резултате али је доказано да готово сваки изолат поседује бар једну од испитиваних карактеристика који су битни за промоцију биљног раста. У табели 26 је приказан тачан број изолата који имају ППП својства, класификован према бактеријским родовима. Од укупно 36 бактеријских изолата, 9 изолата је показало способност продукције IAA, 10 изолата способност продукције сидерофора, 27 способност продукције HCN-а. Што се тиче способности растварања органских и неорганских једињења фосфора, 21 изолат се показао као фосфоминерализатор, док је 7 изолата имало фосфомобилизаторску способност. Утврђено је да велики број изолата из ризосфере *P. lanceolata* продукују HCN. Из ризосфере нане (*M. longifolia*) је изолован највећи број бактеријских изолата које продукују сидерофоре. Најбољи продуценти индол сирћетне киселине су изоловани из ризосфере *A. eupatoria*.

Индол сирћетна киселина је природни ауксин, хормон раста који позитивно утиче на раст биљака. Микроорганизми који продукују ауксине користе најчешће аминокиселину триптофан као једињење-прекурсор за синтезу. Примена ових микроорганизама може у значајној мери да побољша клијавост и почетни раст биљке (Raut et al., 2017).

Табела 26 – ППП својства свих испитиваних изолата

	Укупан број изолата	IAA	HCN	сидерофоре	P min	P mob
<i>Pseudomonas</i>	12	1	7	5	6	2
<i>Bacillus</i>	12	0	11	5	4	0
<i>Azotobacter</i>	8	4	8	0	8	1
<i>Streptomyces</i>	4	4	1	0	3	4
укупно	36	9	27	10	21	7

Продукција сидерофора је важно својство јер ови молекули мале специфичне масе помажу биљци у снабдевању и исвајању гвожђа (Fe^{+3}). Ова истраживања су извојила изолате бактерија *Pseudomonas* и *Bacillus* као једине продуценте сидерофора. Бројна истраживања говоре томе у прилог (Shemad et al., 2014; Mishra et al., 2018).

У овим истраживањима издвојила се способност продукције HCN изолата род *Pseudomonas*, као карактеристика коју је испољила већина изолата, независно од тога из које ризосфере су били изоловани (табела 27). Продукција HCN, као секундарног метаболита од стране ПГП микроорганизама је важна у контроли патогених микроорганизама. Токсичност HCN се огледа у инхибицији електрон транспортног ланца односно синтезе АТФ-а, што доводи до смрти патогена (El-Rahman et al., 2019). Истраживања групе аутора наводе да су најбољи продуценти водоник цијанида бактерије рода *Pseudomonas* и *Bacillus* (Shehrawat et al., 2022). То су и наша истраживања потврдила, мада су се и бактерије из групе азотофиксатора такође показали као одлични продуценти HCN-а.

Табела 27 - Способност продукције HCN изолата рода *Pseudomonas* sp.

	Продукује HCN	Не продукује HCN
<i>P.lanceolata</i> (12 изолата)	7	5
<i>M.longifolia</i> (6 изолата)	5	1
<i>S.sylvatica</i> (5 изолата)	4	1
<i>A.milefolium</i> (6 изолата)	5	1
<i>C.jacea</i> (3 изолата)	3	0
<i>A.eupatoria</i> (4 изолата)	3	1

Испитивани изолати су, пре свега били добри минерализатори органских једињења фосфора (P). Ово својство је од изузетног значаја, јер се у земљишту може налазити прилично велик резервоар органских извора P као што су фитин, нуклеинске киселине, фосфолипиди, енергетски молекули (АТФ и сл.). Превођењем ових једињења у биљци приступачан облик позитивно утиче на исхрану биљке овим макро нутријентом (Хајнал Јафари и сар., 2019).

6. ЗАКЉУЧАК

На основу спроведених истраживања и добијених резултата, могу се извести следећи закључци:

1. Из ризосфере шест дивљих лековитих биљака изоловано је укупно 36 бактеријских изолата који су на основу морфолошких карактеристика сврстани у родове *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Streptomyces*.
2. Физиолошка и биохемијска карактеризација је показала велику разноликост. Способност продукције ензима је зависила од бактеријске врсте. *Pseudomonas* изолати нису показали способност продукције пектиназе, док липазу продукују само изолати K4/3 и K6/1. Изолати рода *Bacillus* не продукују липазу и пектиназу, али имају високе степен продукције целулазе, једини изолати који немају ту способност јесу MPA3/1 и MPA4/1. Код бактерија рода *Azotobacter* сви изолати продукују ензиме амилазу и уреазу. Изолати рода *Streptomyces* у нашем истраживању углавном нису имали способност продукције ензима изузев изолата S4/1 MPA и S4/1 који продукују липазу.
3. ПТП својства - својства бактерија која су задужена за стимулацију раста и развоја биљака. Од укупно 36 бактеријских изолата, 9 изолата је показало способност продукције IAA, 10 изолата способност продукције сидерофора, 27 способност продукције HCN-а. Способност растварања органских једињења фосфора је показао 21 изолат, док је 7 изолата означено као растварачи неорганских једињења фосфора.

4. Из ризосфере *P. lanceolata* је изоловано највише бактерије који продукцију HCN. Ризосфери *M. longifolia* је била најповољнија за развој бактерија које су биле добри продуценти сидерофора.

Способност продукције IAA је ПГП карактеристика која је најређе детектована у нашим изолатима. Издваја се ризосфера *A. eupatoria* у којој је описано највише изолата које су продуковали IAA.

5. Издвојили су се изолати K3/2 и K5/1 (*Pseudomonas* sp), M3/1 (*Bacillus* sp.), F1/2 (*Azotobacter* sp.) и S4/1 (*Streptomyces* sp.) као најбољи појединачни изолати који би се додатно требали испитати у лабораторијским условима, али и у огледима са биљкама..

6. Ризосфера дивљих лековитих биљака је резервоар великог броја аутохтоних микроорганизама који имају потенцијал да се користе као стимулатори биљног раста.

7. Техника производње препарата на бази микроорганизама са ПГП својствима се већ примењује у пракси. Свакако би требало да тежимо да у будућности производимо све више оваквих препарата, који су пре свега еколошки прихватљиви за околину, али и здравствено безбедни за употребу.

7. ЛИТЕРАТУРА

Abd El-Hadi Nadia I.M., Abo El-Ala H.K and Abd El-Azim W.M. (2009): Response Of Some Mentha Species To Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) Isolated From Soil Rhizosphere, Australian Journal of Basic and Applied Sciences 3(4): 4437-4448.

Abd El-Rahman, A.F., Shaheen, H.A., Abd El-Aziz, R.M. et al. (2019): Influence of hydrogen cyanide-producing rhizobacteria in controlling the crown gall and root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. The Egyptian Journal of Biological Pest Control 29-41. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0143-7>.

Abdelshafy M.O.A., Yong-Hang L., Yin H., Li L., Jin-Biao M., Dilduza E., Lan G., Bao-Zhu F., Shaimaa H., Hong-Chen J., Wen-Jun L. (2022): The Metabolic Potential of Endophytic Actinobacteria Associated with Medicinal Plant *Thymus roseus* as a Plant-Growth Stimulator. Microorganisms 10(9).

Ahmad F., Ahmad I., Khan M.S. (2008): Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiol Res 163(2): 173-181.

Alaylar, B. (2022) : Isolation and characterization of culturable endophytic plant growth-promoting *Bacillus* species from *Mentha longifolia* L. Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Arts and Science, Ağrı İbrahim Çeçen University, Ağrı, Turkey.

Ali S. I., Gopalakrishnan B., Venkatesalu V. (2017): Pharmacognosy, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Achille amillefolium* L.: A Review. Phytotherapy Research 31(8): 1140–1161.

Ansari A.H., Dolićanin-Djekić D., Došenović T., Radenović S. (2017): Coupled coincidence point theorems for $(\alpha\text{-}\mu\text{-}\psi\text{-H}\text{-F})$ two sided-contractive type mappings in partially ordered metric spaces using compatible mappings. Filomat 31(9): 2657-2673.

Anwar A., Abbas A., Mehmood T., Gilani AH., Rehman N. (2019): Mentha: A genus rich in vital nutra-pharmaceuticals—A review. Phytotherapy Research 33: 2548–2570. doi: 10.1002/ptr.6423.

Аћимовић М., Ољача С., Дражић С., Тасић С., Виловски П., Вучковић Ј. (2011): Утицај биолошког и хемијског ђубрива на принос плода и етарског уља коријандера, Научни рад, UDK 631.895:582.794.1:665.3.

Berg G., Zachow C., Cardinale M., Müller H. (2011): "Ecology and human pathogenicity of plant-associated bacteria, "in *Regulation of Biological Control Agents*, ed. R.U.Ehlers (Dordrecht:Springer), 175–189.doi:10.1007/978-90-481-3664-3_8.

Becking J. H. (2006): "The family Azotobacteraceae," in *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*, eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (New York, NY: Springer), 759–783. doi: 10.1007/0-387-30746-X_26.

Bhattacharyya C., Banerjee S., Acharya U., Mitra A., Mallick I., Haldar A., Haldar S., Ghosh A. (2020): Evaluation of plant growth promotion properties and induction of antioxidative defense mechanism by tea rhizobacteria of Darjeeling, India. *Sci. Rep.* 10: 15536. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72439-z>.

Bilusic-Vundac V., Pfeifhofer W., Brantner A., Males Z. (2006): Essential oils of seven *Stachys* taxa from Croatia. *Biochemical Systematic and Ecology* 34: 875–881.

Блечић В. (1970): Систематика виших биљака, Завод за издавање уџбеника Социјалистичке републике Србије.

Cattelan AJ., Hartel PG., Fuhrmann JJ. (1999): Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal* 63, 1670-1680. <https://doi.org/10.2136/sssaj1999.6361670x>

Cavaglieri L., Orlando J., Rodríguez M.I., Chulze S., Etcheverry M. (2005): Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level, *Research Journal of Microbiology* 156:748–754.

Chen Y., Zhou D., Luo Y., Xie J., Qi D., Gao Z., (2017) : Growth Promotion and Disease Suppression Ability of a *Streptomyces* sp. CB-75 from Banana Rhizosphere Soil. *Frontiers in Microbiology* 8: 2704.

Darzi M.T., Ghalavand A. and Rejali F. (2009): The effects of biofertilizers application on N, P, K assimilation and seed yield in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 25 (1).

Dauti A., Kapidani G., Kallajxhiu J., Pupuleku B. (2021): The palyhomorphological data of *Centaurea jacea* L. in Albania. University “A. Xhuvani”, Faculty of Natural Sciences, Elbasan, Albania Faculty of Natural Sciences, University of Tirana, Tirana, Albania.

Дошен Н. (2014) : Производња и примена микробиолошког препарата “Bacillomix specijal”, мастер рад, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет.

Fallahi J., Koocheki A., Rezvani Moghaddam P. (2010): Effects of biofertilizers on quantitative and qualitative yield of chamomile (*Matricaria recutita*) as a medicinal plant. 6th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, April 18-22, 2010 Antalya – TURKEY, Abstract book.

Farkoosh S. S., Ardakani M. R., Rejali F., Darzi M. T., Faregh A. H. (2011): Effect of Mycorrhizal Symbiosis and Bacillus coagulance on Qualitative and Quantitative Traits of *Matricaria chamomilla* under Different Levels of Phosphorus. Middle-East Journal of Scientific Research 8 (1): 01-09.

Frey-Klett P., Chavatte M, Clausse ML. (2005): Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. New Phytologist 165:317–328.

Gangwar M., Kaur G. (2009): Isolation and characterization of endophytic bacteria from endorhizosphere of sugarcane and ryegrass. Internet Journal of Microbiology 7:139–144.

Gehring PJ, Mohan RJ, Watamare PG. (1993): Solvents, fumigants and related compounds. In: Handbook of Pesticide Toxicology, Vol. 2, (Eds. Hayes WJ & Laws ER.), Academic Press, inc., San Diego, California, pp.646-649.

Gharib F. A., Moussa L. A., Massoud O. N. (2008): Effect of Compost and Biofertilizers on Growth, Yield and Essential Oil of Sweet Marjoram (*Majorana hortensis*) Plant. International Journal of Agriculture & Biology 10(4): 381–387.

Govedarica M., Jeličić Z., Jarak M., Milošević N., Stojnić N., Rašković D., Pavlović M. (1999): Uticaj azotofiksatora i fosfomineralizatora na mikrobiološku aktivnost pod usevom kukuruza. Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik 5: 115-121.

Grime J.P., Hodgson J.G., Hunt R. (1988): Comparative Plant Ecology, Unwin Hyman Ltd, London, UK.

Hajnal Jafari T., Stamenov D., Đurić S. (2019): Proizvodnja i primena biopreparata. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Hiltner L. (1904): Über neuere Erfahrungen und Probleme aufdem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. ArbDLG 98:59–7.

Holt J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Stanley, S.T. (1994): Williams Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th ed.), Williams & Wilkins, Co., Baltimore.

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.

Ivanova D., Tasinov O., Vankova D., Kiselova-Kaneva Y. (2011): Antioxidative potential of *Agrimonia eupatoria* L. Department of Biochemistry, Molecular Medicine and Nutrigenomics, Medical University “Prof. Dr. P. Stoyanov”, 9002 Varna, Bulgaria.

Janačković P., Tešević V., P. D. Marin, Milosavljević S., Duletić-Laušević S., Janačković S., Veljić M. (2008): Brine shrimp lethality bioassay of selected *Centaurea* L. species (Asteraceae), Institute of Botany and Jevremovac Botanical Garden, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia.

Јарак М.Н., Говедарица М.М., Милошевић Н.А. (1999): Микроорганизми и плодоред. у: Молнар И. [ур.] Плодореди у ратарству, Нови Сад: Научни институт за ратарство и повртарство. Поглавље у монографији: 277-289.

Јарак М., Ђурић С. (2004): Практикум из микробиологије, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, Нови Сад.

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

Јарак М., Чоло Ј. (2007): Микробиологија земљишта, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, Нови Сад.

Jeffrey L.S.H. (2008): Isolation characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *African Journal of Biotechnology* 7: 3697-3702.

Joseph B., Patra R.R., Lawrence R. (2007): Characterization of plant growth promoting Rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L). *International Journal of Plant production* 1: 141-152.

Kaper J.M., Veldstra H. (1958): On the metabolism of tryptophan by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochim Biophys Acta* 30: 401-420.

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

Kesdek M., Kordali S., Bozhuyuk AU., Gudek M. (2020): Larvicidal effect of *Achillea bieber steinii* Afan, (Asteraceae) essential oil against larvae of pine processionary moth, *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffmüller, 1775) (Lepidoptera: Notodontidae), *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 44:451-460.

Kim K.Y., Jordan D., Donald G.A.M. (1997): Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fert. Soil* 26:79-87.

Kizilkaya R. (2009): Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ondokuz Mayıs University, 55139 Samsun, Turkey.

Kloepper J. W., Schroth M. N. (1978): Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: Angers (Ed.) *Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Gibert - Clarey Tours, p. 879-882.

Константиновић Б., Попов М., Самарџић Н. (2021): Основи хербологије практикум, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет.

Костић-Николић С. (2011): Екстракционе технике за лековито и ароматично биље и савремена производња прехранбених производа. *Економика пољопривреде* 4/2011.

Koushalshahi M.B., Issayadeh K., Tehranifard A., Reza M., Pahlaviani M.R.M.K., Massiha A. (2012) : Isolation of Hg and Cu resistant *Streptomyces* from marine sediments in different regions of the Caspian sea. African Journal of Microbiology Research 6: 4048-4052.

Kovačević N. (2000): Osnovi farmakognozije. Srpska školska knjiga, Beograd.

Kresanek J, Krejca J. (1977): Atlas of medicinal plants and wild berries (in Slovak), 1. ed. Osveta, Martin.

Li J., Zhao G. Z., Chen H.H., Wang H.B., Qin S., Zhu W.Y., et al. (2008): Anti tumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from pharmaceutical plants in rainforest. Letters in Applied Microbiology 47: 574–580. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02470.x.

Lloyd, A. B. (1969): Behaviour of *Streptomyces* in soil. Microbiology, 56(2), 165-170. Mc Neil, M. M., & Brown, J. M. (1994). The medically important aerobic Actinomycetes: epidemiology and microbiology. Clinical Microbiology Reviews 7(3): 357-417.

Mahfouz S.A., Sharaf-Eldin M.A. (2007): Effect of mineral vs. biofertilizer on growth, yield, and essential oil content of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). International Agrophysics 2: 361-366.

Mellouli L., Ameer-Mehdi RB., Sioud S., Salem M., Bejar S. (2003): Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. Research in Microbiology 154: 345-352.

Menkin V. (1963): Studies on the pathogenesis of amyloidosis. Ann Histochem 8: 283-94. PMID: 14169854.

Milagres A.F.M., Machuca A., Napoleao D. (1999): Detection of siderophore production from several fungi and bacterial by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. Journal of Microbiological Methods, 37: 1–6.

Mishra J., Arora N. K. (2018): Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. Applied Soil Ecology 125: 35-45.

Mollova S., Fidan H., Antonova D., Bozhilov D., Stanev S et al. (2020): Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of *Helichrys umitalicum* (Roth) G. on subspecies essential oils. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 44: 371-378.

Mrkovački N., Đalović I., Jarak M., Bjelić D., Adamović D. (2012): Mikroorganizmi u rizosferi: uloga i značaj u održivoj poljoprivredi. Bilten za alternativne biljne vrste 44 (85): 40-49.

Muruzović M., Mladenović K., Stefanović O., Vasić S., Čomić L. (2016): Extracts of *Agrimonia eupatoria* L. as sources of biologically active compounds and evaluation of their antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activity. Journal of Food and Drug Analysis 24: 539–547.

Највирт Б. (2020): Карактеризација микроорганиза минерализатора органске материје из различитих типова земљишта, докторска дисертација, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет.

Najvirt B., Đurić S., Hajnal Jafari T., Stamenov D. (2019): Characteristics of agricultural organic mater degrading bacterial isolates from different types of soil. Зборник Матице српске за природне науке / Matica Srpska J. Nat. Sci. 136: 69-78.

Neilands J.B., (1995): Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. The Journal of Biological Chemistry, 270, 26723-26726.

Paluch Z., Bircizova L., Pallag L., Marques E.C., Vargova N., Kmonickova E.(2020): The Therapeutic Effects of *Agrimonia eupatoria* L. Department of Pharmacology, Second Faculty of Medicine, Charles University, Praha, Czech Republic.

Pandey A., Kumar S. (1989): Potential of Azotobacters and Azospirilla as biofertilizers for upland agriculture: a review. Journal of Scientific and Industrial Research 48:134–144.

Park Y.J., Baek S.-A., Choi Y., Kim J.K., Park S.U. (2019): Metabolic Profiling of Nine *Mentha* Species and Prediction of Their Antioxidant Properties Using Chemometrics. Molecules: 24:258. doi: 10.3390/molecules24020258.

Pikovskaya R.I. (1948): Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya 17: 362-370.

Pol M., Schmidtke K., Lewandowska S. (2021): *Plantago lanceolata* – An overview of its agronomically and healing valuable features, Open Agriculture Vol 6 (1) <https://doi.org/10.1515/opag-2021-0035>.

Rezazadeh S, Pirali-Hamedani M, Hadjiakhondi A, Ajnai Y, Yarigar-Ravesh M, Shaflee A. (2009): Chemical composition of the essential oils of *Stachys atherocalyx* and *S. sylvatica* from Iran. Chem Nat Comp. 45(5): 742-744.

Rodina A.G. (1965) : Aquatic microbiology methods. Nauka, Moscow, Leningrad.

Rooney L. M., McCann L., Hoskisson P. A., & McConnell, G. (2018): Applying the Mesolens to microbiology: investigating the structural organisation of bacterial biofilms. RMS Frontiers in Bioimaging, Glasgow, United Kingdom.

Ruiz-Roldan L., Rojo-Bezares B., Lozano C., Lopez M. (2021): Occurrence of *Pseudomonas* spp. in Raw Vegetables: Molecular and Phenotypical Analysis of Their Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Traits. International Journal of Molecular Sciences 22(23): 12626 DOI: 10.3390/ijms222312626.

Ryan P.R., Delhaize E. and Jones D.L. (2001): Function and Mechanism of Organic Anion Exudation from Plant Roots. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52:527-560. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.527>.

Saeedi M., Morteza-Semnani K., Mahdavi MR., Rahimi F. (2008): Antimicrobial studies on Extracts of Four Species of *Stachys*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 70 (3): 403-406.

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

Samanta A., Bera P., Khatun M., Sinha C., Pal P., Lalee A., Mandal A. (2012): An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus* sp. isolated from municipal waste. Journal of Microbiology and Biotechnology Research 2(1): 178-189.

Santos T.P., Lessa Douglas Villela de Oliveira, Venancio I. M., Chiessi C. M., Mulitza S., Kuhnert H., Albuquerque A. L. S. (2017): Stable oxygen isotope record during Termination II in sediment core GL1090, Pangaea, <https://doi.org/10.1594/PANGAEA.884583>.

Saribay G.F. (2003) : Growth and nitrogen fixation dynamic of *Azotobacter chroococcum* in nitrogen-free and omw containing medium. The Graduate School of natural and applied sciences of Middle East Technical University.

Sartaj AW., Subhash C., Tahir A. (2013): Potential Use of *Azotobacter chroococcum* in Crop Production: An Overview. *Current Agriculture Research Journal* 1(1): 35-38.

Sehrawat A., Sindhu S.S., Glick B.R. (2022): Hydrogen cyanide production by soil bacteria: Biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. *Pedosphere* 32(1): 15-38.

Shemad M., Kibret M. (2014): Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteri: Current perspective. *Journal of Kings Saud University-Science* 26: 1-20.

Singh S.K., Tripathi V.R., Jain R.K., Vikram S., Garg S.K. (2010): An antibiotic, heavy metal resistant and halotolerant *Bacillus cereus* SIU1 and its thermoalkaline protease. *Microbial Cell Factories*, 9, 1-7.

Singh R., Shushni M.A., Belkheir A. (2015): Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *The Arabian Journal of Chemistry* 8: 322–328. doi: 10.1016/j.arabjc.2011.01.019.

Stamenov D., Đurić S., Hajnal-Jafari T. (2014): Effect of PGPR on the germination and growth of English ryegrass and microbiological activity in its rhizosphere. *Contemporary agriculture* 63 (1-2): 79-86.

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. <https://doi.org/10.2478/contagri-2018-0005>.

Старовић М., Павловић С., Стојановић С., Јошић Д. (2015): Фитоплазмозе лековитих биљака, Заштита биља, вол. 66 (1) Н 291, 7-31, 2015, Београд.

Stojanović G., Radulović N., Hashimoto T., Palić R. (2005): In vitro antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: The composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology* 101 (1-3): 185-190. DOI: 10.1016/j.jep.2005.04.026.

Srinivas N., Parkin J., Seelig G., Winfree E., Soloveichik D. (2017): Enzyme-free nucleic acid dynamical systems. *Science* 358 (6369): eaal2052. doi: 10.1126/science.aal2052. PMID: 29242317.

Subasi I. (2020): Seed fatty acid compositions and chemotaxonomy of wild *Crambe* (Brassicaceae) taxa in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 44: 662-670.

Tafrihi M., Imran M., Tufail T., Gondal TA., Caruso G., Sharma S., Sharma R., Atanassova M., Atanassov L., Valere Tsouh Fokou P., Pezzani R. (2021) : The Wonderful Activities of the Genus *Mentha*: Not Only Antioxidant Properties. *Molecules* 26(4): 1118.

Tirillini B., Pellegrino R., Bini L.M. (2004): Essential oil composition of *Stachys sylvatica* L. from Italy, *Flavour Fragr. J.*, 2004, 19, 4, 330-332, <https://doi.org/10.1002/ffj.1308> .

Турдулија Живановић С. (2015): Организација производње и прераде лековитог и ароматичног биља у Србији, докторска дисертација, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду.

Tye A.J., Siu F.K., Leung T.Y., Lim B.L. (2002): Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *Bacillus subtilis* 168 and *Bacillus licheniformis*. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology* 59:190–197.

Ugoji E.O., Laing M.D., Hunter C.H. (2005): Colonization of *Bacillus* spp. on seeds and in plant rhizoplane. *Journal of Environmental Biogogy* 26: 459–466.

Вујовић Б., Рудић Ж., Кљујев И., Рајковић Д., Божић М., Раичевић В. (2016): Потенцијал формирања биофилмова *Pseudomonas aeruginosa* из животне средине, Научни рад ISSN 0351-9465, E-ISSN 2466-2585 UDC:631.497 doi: 10.5937/ZasMat1603449V.

Вуковић С., Шуњка Д. (2021) : Биопестициди, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, Нови Сад.

Warwick S., Briggs D. (1979): The genecology of lawn weeds. III. Cultivation experiments with *Achillea millefolium* L., *Bellis perennis* L., *Plantago lanceolata* L., *Plantago major* L. and *Prunella vulgaris* L. collected from lawns and contrasting grassland habitats. *New Phytologist* 85: 275-288.

Zhang J., Wang, Z., Ma, Q., Zhong, H., Guan, S., Ji, C. (2009) : Effects of soybean trypsin inhibitors on nitrogen balance and apparent digestibility of feed nutrients in rex rabbits, *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine* 36 (6), 10-13.

Zhao K., Penttinen P., Chen Q., Guan T., Lindström K., Ao X., et al. (2012): The rhizospheres of traditional medicinal plants in Panxi, China, host a diverse selection of action bacteria with anti microbial properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94: 1321–1335. doi:10.1007/s00253-011-3862-6.

Ћирић С. (2014): Микробиологија практикум. Унивезитет у Приштини, Пољопривредни факултет, Косовска Митровица- Лешак.

<https://sfamjournals.onlinelibrary>

<https://www.hsibv.com>