



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Департман за ратарство и повртарство



Јасмина Годић

дипл. инж. пољопривреде

**КАРАКТЕРИЗАЦИЈА БАКТЕРИЈА РОДА *BACILLUS*, *PSEUDOMONAS*,
AZOTOBACTER И *STREPTOMYCES* ИЗ РИЗОСФЕРЕ НАНЕ (*Mentha longifolia* L.)**

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2026.



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Департман за ратарство и повртарство



Кандидат

Дипл. инж. Јасмина Годић

Ментор

Проф. др Драгана Стаменов

**КАРАКТЕРИЗАЦИЈА БАКТЕРИЈА РОДА *BACILLUS*, *PSEUDOMONAS*,
AZOTOBACTER И *STREPTOMYCES* ИЗ РИЗОСФЕРЕ НАНЕ (*Mentha longifolia* L.)**

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2026.

КОМИСИЈА ЗА ОДБРАНУ И ОЦЕНУ МАСТЕР РАДА:

Др Драгана Стаменов, ванредни професор

Ужа научна област: Микробиологија
Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет
-Ментор-

Др Ружица Ждеро Павловић, ванредни професор

Ужа научна област: Хемија и биохемија
Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни Факултет
-председник Комисије-

Др Тимеа Хајнал Јафари, редовни професор

Ужа научна област: Микробиологија
Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет
-члан Комисије-

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	3
2.1. Микроорганизми промотори биљног раста	3
2.1.1. Разноврсност PGP микроорганизама.....	4
2.2. Механизми деловања PGP микроорганизама	11
2.2.1 Директни механизми деловања.....	11
2.2.2 Индиректни механизми деловања PGP микроорганизама	14
2.3. Значај PGP микроорганизама у одрживој пољопривреди.....	19
3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА	21
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	22
4.1. Изолација микроорганизама	22
4.2. Морфолошка карактеризација.....	23
4.3. Физиолошка карактеризација	23
4.4. Биохемијска карактеризација	25
4.5. PGP карактеризација.....	25
4.6. Испитивање ефекта инокулације на клијавост и почетни раст биљке	26
4.7. Статистичка обрада података	27
5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА СА ДИСКУСИЈОМ	28
5.1. Карактеризација микроорганизама из ризосфере нане	28
5.1.1. Морфолошке особине изолата	28
5.1.2. Физиолошке особине изолата	33
5.1.3. PGP особине изолата.....	42
5.2. Утицај примене одабраних изолата на клијавост и иницијални раст першуна.....	45
6. ЗАКЉУЧАК.....	49
7. ЛИТЕРАТУРА	51

КАРАКТЕРИЗАЦИЈА БАКТЕРИЈА РОДА *BACILLUS*, *PSEUDOMONAS*, *AZOTOBACTER* I *STREPTOMYCES* ИЗ РИЗОСФЕРЕ НАНЕ (*Mentha longifolia* L.)

РЕЗИМЕ

Производња здравствено безбедне и квалитетне хране у оквиру одрживог развоја представља један од најважнијих изазова савремене пољопривреде. Као алтернатива хемијским средствима, све већи значај добијају биопрепарати на бази корисних микроорганизама,. Циљ овог истраживања је изолација и карактеризација микроорганизама из родова *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* и *Azotobacter* из ризосфере нане (*Mentha longifolia*), као и процена потенцијала њихове примене у производњи першуна (*Petroselinum crispum* L.). Резултати испитивања јасно указују да свих 11 изолата поседује особине неопходне за адаптацију на неповољне услове средине, продукује ензиме и материје које промовишу раст биљака. Због позитивног утицаја на клијавост, развој корена и издуживање стабаоцета, изолат П1 (*Pseudomonas*) се издваја као најперспективнији кандидат за формулисање биођубрива који би могли наћи примену у производњи першуна и другог зачинског биља.

Кључне речи: ПГП микроорганизми, целулаза, сидерофоре, клијавост, *Petroselinum crispum* L.

CHARACTERIZATION OF RHIZOSPHERIC *BACILLUS*, *PSEUDOMONAS*, *AZOTOBACTER*, AND *STREPTOMYCES* ISOLATES FROM MINT (*Mentha longifolia* L.)

SUMMARY

The production of safe, high-quality food in accordance with the principles of sustainable agriculture is one of the major challenges facing modern agricultural production. In response to the growing need for environmentally friendly alternatives to chemical inputs, microbial-based bioproducts have attracted increasing attention in recent years. The aim of this study was to isolate and characterize microorganisms belonging to the genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, and *Azotobacter* from the rhizosphere of mint (*Mentha longifolia* L.), and to evaluate their potential for use in parsley production. The results showed that all 11 isolates exhibited traits associated with adaptation to unfavorable environmental conditions and demonstrated the ability to produce enzymes and other compounds with plant growth-promoting (PGP) properties. Based on their balanced effects on germination, root development, and hypocotyl elongation, isolate P1 (*Pseudomonas*) emerged as the most promising and versatile candidate for the development of microbial biofertilizers. This isolate may have potential for application in the production of parsley and other culinary herbs.

Keywords: PGP microorganisms, cellulase, siderophores, germination, *Petroselinum crispum* L.

1.УВОД

Савремена пољопривреда суочава се са великим изазовима, при чему производња биопрепарата, као замена за хемијска ђубрива и препарате, постају кључни аспекти њене одрживости (Хајнал Јафари и сар., 2020). Производња здраве и квалитетне хране у оквиру одрживог развоја представља један од најважнијих изазова данашње пољопривредне праксе. Важно је смањити претерану употребу агротехничких мера које штете животној средини, одржати еколошку равнотежу и прилагодити пољопривредне системе климатским променама. Посебно се инсистира на смањењу или укидању употребе синтетичких ђубрива и пестицида, уз повећану употребу биолошких агенаса као важног дела нових система производње. Један од таквих приступа је примена микробиолошких препарата, где се живи микроорганизми примењују приликом сетве или садње, уносе у ризосферу или примењују фолијарно на биљци, као стимуланси раста биљака или као заштита од фитопатогена (Khosro et al., 2024). Микроорганизми су у великој мери одговорни за снабдевање биљака свим неопходним хранљивим материјама (Хајнал Јафари и сар., 2020). Позитивни утицаји микроорганизама на својства земљишта и биљке подстакли су идеју о примени селекционисаних сојева који могу да унапреде раст, развој и опште перформансе усева. Из овог разлога потребно је изоловати и проучити што већи број микроорганизама из ризосфере различитих биљних врста, како би се испитао њихов потенцијал у подстицању раста и развоја биљака. Микроорганизми који имају значајан биостимулаторни ефекат представљају основу за развој нових микробиолошких препарата који ће побољшати продуктивност и квалитет биљака (Gupta et al., 2015).

Распрострањеност микроорганизама у земљишту условљена је бројним абиотичким и биотичким фактора (Jha et al., 2015). Бактерије, алге, гљиве, протозое и актиномицете налазе се у специфичном, уравнотеженом односу карактеристичном за сваки тип земљишта. Међутим, агротехничке мере попут обраде, примене пестицида, плодореда и мелиорација нарушавају ову равнотежу, што се директно одражава на њихову бројност и ензимску активност. Управо због тога се активност и бројност микроорганизама, уз

педолошке и хемијске параметре, користе као поуздани показатељи плодности земљишта (Gupta et al., 2015).

Наглом експанзијом модерних технологија и различитих научних дисциплина, савремена биотехнологија достиже готово неслућене домете. Овај напредак прате интензивне дебате, не само у стручној јавности већ и у области политике, као и у економско-социјалној сфери. Све то захтева свеобухватна и непрекидна проучавања одговора живих организама на нове технологије. Осим у органској пољопривреди, тренутно се активно ради на увођењу ових биолошких једињења у конвенционалну и интегралну пољопривредну производњу (Вуковић и Шуња, 2021). Овакав приступ има посебну важност у узгоју лековитог и зачинског биља, где захтеви за високим квалитетом и здравственом безбедношћу биљне масе у потпуности оправдавају делимичну или потпуну замену хемијских средстава одговарајућим биопрепаратима.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Микроорганизми промотори биљног раста

Савремена пољопривреда суочава се са бројним изазовима који укључују деградацију земљишта, смањење његове плодности, климатске промене и негативне последице прекомерне употребе хемијских средстава. Из тог разлога, све већи значај добијају биолошке методе унапређења производње, међу којима посебно место заузимају микроорганизми који стимулишу раст биљака и позитивно утичу на својства земљишта. Њихова примена омогућава смањење употребе минералних ђубрива и пестицида, побољшава плодност земљишта и доприноси одрживој пољопривредној производњи (Vessey et al., 2003). Последњих деценија све већа пажња посвећује се примени микроорганизама у пољопривреди као еколошки прихватљивој алтернативи интензивној употреби минералних ђубрива и пестицида. Развој савремене микробиологије, посебно усавршавање метода за изолацију и добијање чистих култура микроорганизама, омогућио је детаљно проучавање њихових морфолошких, физиолошких, биохемијских и генетичких својстава. На основу ових сазнања створени су микробиолошки препарати који се данас широко примењују у биљној производњи као микробиолошка ђубрива и биолошка средства за заштиту биљака од болести и штеточина (Hasan et al., 2024).

Највећи број корисних микроорганизама насељава ризосферу, где успостављају сложене интеракције са биљком. Они повећавају доступност хранљивих елемената, синтетишу биолошки активна једињења и подстичу развој кореновог система (Glick, 2012).

Поред побољшања исхране биљака, микроорганизми имају значајну улогу у заштити биљака од фитопатогених микроорганизама (Verma et al., 2019). Њихово присуство у ризосфери смањује могућност развоја фитопатогених микроорганизама путем конкуренције за хранљиве материје и простор, продукције антимикробних једињења и активирања одбрамбених механизма биљке. Истовремено, повећавају отпорност биљака на абиотички стрес, као што су суша, заслањеност земљишта, екстремне температуре и присуство тешких метала. На тај начин омогућавају ефикасније усвајање хранљивих

елемената и стабилнији раст биљака и у неповољним животним условима (Хајнал Јафари и сар., 2020).

У научној литератури, за означавање корисних микроорганизама често се користе појмови **PGPR**, **PGPM** и **PGPB** (Parveen and Ghosh, 2025). Иако се наведени појмови често користе као синоними, међу њима постоје разлике.

Посебну групу корисних микроорганизама представљају **PGPR** (engl. **Plant Growth Promoting Rhizobacteria**), односно ризобактерије које стимулишу раст биљака. То су бактерије које колонизују ризосферу, где успостављају интеракцију са биљком. Захваљујући својој метаболичкој активности, оне повећавају доступност азота, фосфора и других минералних елемената, производе фитохормоне као што су ауксини, цитокинини и гиберелини, а истовремено штите биљке од патогених микроорганизама продукцијом антибиотика, ензима и других биолошки активних једињења (Vessey, 2003).

Појам **PGPM** (engl. **Plant Growth Promoting Microorganisms**) представља најширу категорију и обухвата све микроорганизме који позитивно делују на раст биљака, без обзира на њихову таксономску припадност и где живе. Поред бактерија, ову групу чине микоризне гљиве, ендифитне гљиве, актиномицете и поједине алге. Они побољшавају исхрану биљака, стимулишу синтезу биљних хормона, повећавају отпорност на абиотички стрес и доприносе сузбијању фитопатогена, чиме имају важну улогу у очувању плодности земљишта и повећању пољопривредне производње (Хајнал Јафари и сар., 2020).

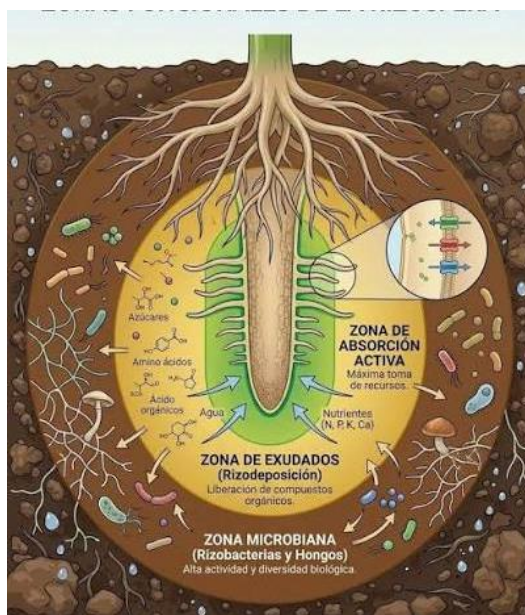
С друге стране, **PGPB** (engl. **Plant Growth Promoting Bacteria**) представља појам који се односи искључиво на бактерије способне да стимулишу раст биљака. За разлику од **PGPR** бактерија, које су ограничене на ризосферу, **PGPB** могу колонизовати и друге делове биљке, укључујући површину листова (филосферу), или слободно живети у земљишту (Salata et al., 2026). Њихова примена има велики значај у биолошкој контроли болести, повећању приступачности азота, фосфора и калијума, као и у смањењу потребе за употребом минералних ђубрива (Lugtenberg et al., 2002).

2.1.1. Разноврсност **PGP** микроорганизама

PGPM представљају веома разноврсну групу организама који се разликују по таксономској припадности, месту насељавања, физиолошким особинама и механизмима којима остварују позитиван утицај на раст и развој биљака. Њихова бројност и

разноврсност зависе од бројних биотичких и абиотичких фактора, при чему ризосфера представља најзначајније станиште у коме се остварују интеракције између биљака и микроорганизама (Ansabayeva et al., 2025).

Ризосфера је уски слој земљишта који непосредно окружује сам корен биљке (екторизосфера), површину корена (ризораван), али и спољашњи део самог ткива корена (ендоризосфера) и представља једно од биолошки најактивнијих станишта у природи (Слика 1). Термин је први увео немачки микробиолог Лоренц Хилтнер (Lorenz Hiltner) почетком XX века, описујући зону у којој корен својим излучевинама утиче на бројност и активност микроорганизама (Hartmann et al., 2008). У ризосфери се налазе бројне органске материје које биљка излучује у облику шећера, аминокиселина, органских киселина, витамина и других једињења. Ови ексудати представљају извор угљеника и енергије за микроорганизме, због чега је њихова бројност у ризосфери и до сто пута већа него у околном земљишту (Philippot et al., 2013).



Слика 1. Ризосфера

(<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTsMkebiqZbAtcd8lqMZt1Rib8oKyo4z5wYI37JKgn-OA&s=10>)

Разноврсност микроорганизама у ризосфери условљена је бројним факторима. Најважнији су биљна врста и генотип, јер различите биљке луче различите врсте коренових ексудата

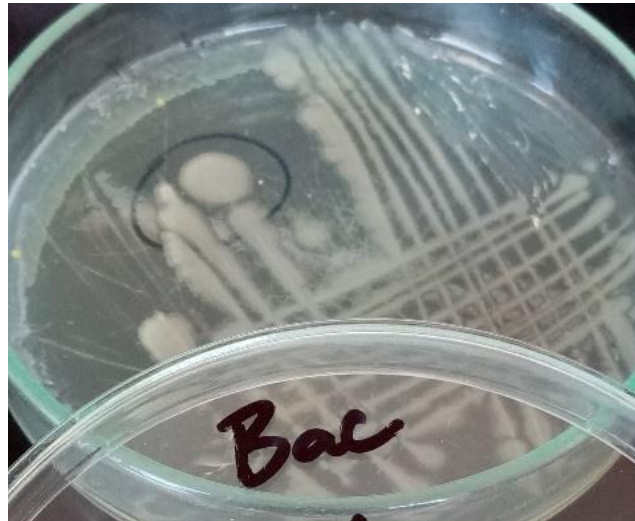
који селективно подстичу развој одређених микроорганизама. Значајан утицај имају и физичко-хемијске особине земљишта, као што су рН вредност, садржај органске материје, влажност, температура, аерација и количина приступачних хранљивих елемената. Климатски услови, начин обраде земљишта, плодоред и примена минералних ђубрива и пестицида такође значајно мењају структуру микробних заједница у ризосфери (Philippot et al., 2013).

Поред екторизосфере, PGP микроорганизми могу насељавати и површину корена (ризоплан), унутрашња ткива биљака као ендوفити, као и надземне делове биљке, односно филосферу. Ендофитни микроорганизми живе унутар биљних ткива без изазивања симптома болести и често обезбеђују додатну заштиту од патогена, повећавају толеранцију према суши и побољшавају искоришћавање хранљивих материја. Захваљујући способности колонизације различитих биљних органа, ови микроорганизми остварују дуготрајну и стабилну симбиозу са домаћином (Amaresan et al., 2012).

Према таксономској припадности, PGP микроорганизми обухватају бактерије, актиномицете, гљиве и цијанобактерије. Иако све ове групе могу позитивно утицати на раст биљака, бактерије представљају најзначајнију и најбоље проучену групу. Од бактерија, посебно се истичу врсте које припадају родовима: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Variovorax*, *Xanthomonas*, *Phyllobacterium* и други (Akinrinlola et al., 2018). Међу овима, бактерије рода *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* и *Azotobacter* издвајају се као највише испитиване и најчешће примењиване у пољопривредној пракси.

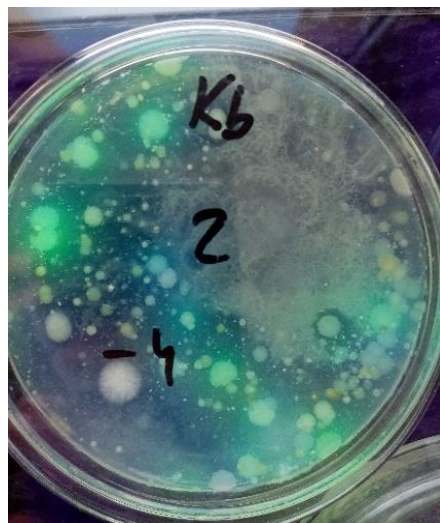
Представници рода ***Bacillus*** спадају међу најчешће примењиване PGP бактерије у комерцијалним биопрепаратима (Kashyap et al., 2019) (Слика 2). Ове Грам-позитивне, штапићасте бактерије су аеробне или факултативно анаеробне (Ghelardi et al, 2022). Њихова предност огледа се у способности формирања ендоспора, што им омогућава високу отпорност на неповољне услове спољашње средине. Најчешће врсте овог рода у ризосфери су: *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium* и *Bacillus thuringiensis*. Ове врсте синтетишу широк спектар секундарних метаболита и доприносе расту биљака, побољшању квалитета приноса и сузбијању фитопатогена кроз разне механизме (Etesami et al., 2023). Врсте као што су *Bacillus subtilis*, *Bacillus*

amyloliquefaciens и *Bacillus megaterium* производе антибиотике, ензими и фитохормоне, мобилишу фосфор и повећавају отпорност биљака према бројним патогенима (Bunk et al., 2009; Sharma et al., 2018).



Слика 2. Изглед колонија бактерије *Bacillus* (Фото Годић)

Један од најистраженијих родова је *Pseudomonas*, посебно врста *Pseudomonas fluorescens*. Род *Pseudomonas* чине аеробне, Грам- негативне, штапићасте бактерије чија је RGP активност добро позната већ дуги низ година (Krell and Matilla, 2024) (Слика 3). Њихова распрострањеност је веома велика и могу се наћи у ризосфери различитих биљака на различитим типовима земљишта, у отпадним водама, барама па чак и у храни. Неке врсте овог рода продукују метаболите међу којима су цијано-водоник и антибиотици, сидерофоре за абсорпцију тровалентног гвожђа, а неке од њих и биљне хормоне (Shaheen et al., 2022). Представници овог рода познати су по брзој колонизацији ризосфере, продукцији различитих испарљивих органских једињења која инхибирају развој фитопатогених гљива и бактерија. Поред тога, многе врсте производе АСС-деаминазу, ензим који умањује негативне последице стреса код биљака (Glick, 2014). Најзначајније врсте овог рода су *Pseudomonas palida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas jessenii* (Krell and Matilla, 2024).



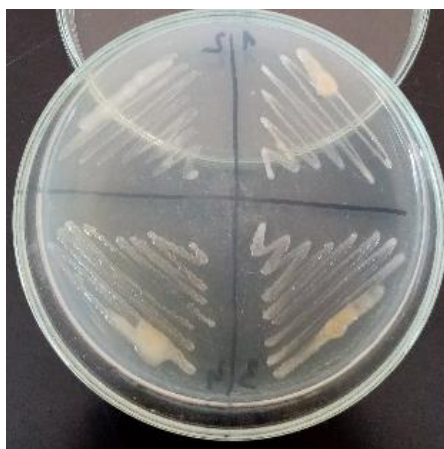
Слика 3. Бактерије рода *Pseudomonas* (Фото Годић)

Поред поменутих бактерија, важну групу PGP микроорганизама чине актиномицете, пре свега представници рода *Streptomyces* (Слика 4). Род *Streptomyces* чине Грам-позитивне, аеробне мицеларне бактерије које имају кључну улогу у микробиолошкој динамици земљишта (Abdellatif et al., 2024). Ове бактерије продукују сидерофоре, цијано-водоник, АСС-деаминазу, антибиотике и фитохормоне као што су ауксини, гиберелини и цитокинини, што доприноси побољшању клијавости семена, укорјењавања и почетног раста младих биљака (Vazquez-Hernandez et al., 2025). Такође, бактерије овог рода пружају ефикасну заштиту од различитих патогена (Kawicha et al., 2023). Истовремено, учествују у циклусима кружења многих хранљивих елемената и на тај начин повећавају њихову приступачност, што позитивно утиче на раст биљака (Dias et al., 2017). Најзначајније врсте су *Streptomyces olivaceoviridis*, *Streptomyces rimosus* и *Streptomyces rochei* (Gopalakrishnan et al., 2011).



Слика 4. Изглед колонија бактерија *Actinomicetes* (Фото Годић)

Међу најважнијим PGP бактеријама издвајају се бактерије рода *Azotobacter*, које су способне за фиксацију атмосферског азота (Jnawali et al., 2015; Aasfar et al., 2021) (Слика 5). Такође продукују и различите материје које подстичу раст биљака, као што су то биљни хормони, сидерофоре и антибиотици, које доприносе побољшању здравља, раста и развића биљака (Chennappa et al., 2016). Једне од најзначајнијих врста међу њима су *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum* и *Azotobacter beijerinckii*.



Слика 5. Бактерије рода *Azotobacter* (Фото Годић)

Поред поменутих родова бактерија, које су и биле предмет ових истраживања, веома значајно место у групи PGPM заузимају бактерије рода *Rhizobium* и *Azospirillum*. Бактерије рода *Rhizobium* успостављају симбиотски однос са легуминозним биљкама. Оне продиру у коренов систем и формирају коренове квржице у којима се одвија биолошка

фиксација атмосферског азота. Захваљујући овом процесу, легуминозе могу обезбедити значајне количине азота без примене минералних азотних ђубрива, што има велики економски и еколошки значај (Vessey, 2003). Представници рода *Azospirillum* познати су по способности асоцијативне фиксације атмосферског азота и синтези ауксина. Најчешће колонизују житарице, кукуруз, пшеницу, при чему стимулишу развој кореновог система и повећавају усвајање воде и минералних материја. Врсте *Azospirillum brasilense* и *Azospirillum lipoferum* спадају међу најчешће коришћене бактерије у производњи микробиолошких инокуланата (Hungria et al., 2010).

Посебно место међу PGPM заузимају гљиве. Микоризне гљиве представљају једну од најзначајнијих група корисних микроорганизама. Највећи значај имају арбускуларне микоризне гљиве из фамилије *Glomeraceae*, које формирају симбиотски однос са више од 80% копнених биљака. Оне повећавају површину кореновог система, омогућавају ефикасније усвајање фосфора, цинка и других микроелемената, повећавају отпорност биљака према суши и заслањености земљишта и доприносе стабилизацији структуре земљишта (Ouhaddou et al., 2025). Веома важна група гљива су и гљиве које припадају роду *Trichoderma*, чије врсте успешно колонизују ризосферу и површину корена. Ове гљиве стимулишу раст биљака, производе фитохормоне, повећавају приступачност хранљивих материја и испољавају изражен антагонистички ефекат према великом броју фитопатогених гљива. Због ових особина широко се користе као активна компонента биофунгицида и биостимулатора у органској и конвенционалној пољопривреди (Kasa et al., 2015).

У RGP микроорганизме убрајају се и поједине цијанобактерије, као што су *Anabaena*, *Nostoc* и *Oscillatoria*, које су способне за фотосинтезу и фиксацију атмосферског азота (Kollmen et al., 2022). Њихова примена нарочито је значајна у производњи пиринча, где представљају природни извор азота и доприносе повећању плодности земљишта.

Према Vafana and Lohiya (2013) микробиолошка заједница ризосфере лековитих биљака веома је специфична и разноврсна. Разлог овоме, сматрају Zhang et al. (2013), лежи у способности ових биљака да продукују различите секундарне метаболите. Зато је потребно изоловати што већи број микроорганизама из ризосфере лековитог биља, урадити њихову биохемијску карактеризацију и испитати њихову способност да промовишу раст биљака.

Захваљујући великом броју механизма којима позитивно утичу на раст биљака, сви ови микроорганизми представљају основу развоја савремених микробиолошких препарата и биостимулатора. Избор одговарајућег соја зависи од биљне врсте, особина земљишта и услова производње, јер различити микроорганизми испољавају различиту ефикасност у различитим агроеколошким условима. Због тога је разумевање њихове разноврсности од великог значаја за успешну примену у одрживој пољопривреди.

2.2. Механизми деловања PGP микроорганизама

Позитиван утицај PGP микроорганизама на раст и развој биљака заснива се на великом броју физиолошких и биохемијских механизма којима они побољшавају исхрану биљака, стимулишу њихов раст и повећавају отпорност према различитим факторима стреса. У литератури се механизми деловања најчешће деле на **директне** и **индиректне** (Goswami et al., 2016). Директни механизми подразумевају процесе који непосредно утичу на снабдевање биљака хранљивим елементима и регулисање њиховог раста, док индиректни механизми обухватају заштиту биљака од фитопатогена и повећање њихове отпорности на биотички и абиотички стрес (Glick, 2012).

2.2.1 Директни механизми деловања

Директни механизми представљају основу позитивног деловања PGP микроорганизама, јер непосредно утичу на физиолошке процесе у биљци. Најзначајнији механизми су биолошка фиксација атмосферског азота, повећање приступачности фосфора, калијума и других минералних елемената, учешће у циклусима хранљивих материја, синтеза фитохормона и продукција ензима АСС-деаминазе.

Азот представља један од најважнијих макроелемената неопходних за раст и развој биљака, јер улази у састав аминокиселина, протеина, нуклеинских киселина, ензима и хлорофила. Иако атмосферски ваздух садржи око 78% азота у облику молекуларног азота (N_2), биљке овај облик не могу директно усвајати. Због тога велики значај имају микроорганизми способни да атмосферски азот преведу у амонијачни облик, облик који је доступан биљкама.

Процес биолошке фиксације азота обавља ензимски комплекс нитрогеназа, који у условима ниске концентрације кисеоника редукује молекуларни азот до амонијака. Амонијак се затим укључује у синтезу аминокиселина и других органских једињења која биљка може искористити за свој раст (Glick, 2012).

Према начину живота, азотофиксатори се деле на симбиотске, асоцијативне и слободноживеће микроорганизме (Kuan et al., 2016). Симбиотске бактерије рода *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, и *Mesorhizobium* формирају коренове квржице на легуминозним биљкама, где фиксирају значајне количине атмосферског азота. Ова симбиоза представља један од најефикаснијих природних начина снабдевања биљака азотом и омогућава значајно смањење примене минералних азотних ђубрива (Vessey, 2003).

Поред симбиотских, значајну улогу имају и асоцијативне бактерије као што су *Azospirillum* spp., које колонизују површину корена житарица и других гајених култура. Оне фиксирају мање количине азота од симбиотских бактерија, али истовремено производе фитохормоне који стимулишу развој кореновог система, чиме посредно повећавају усвајање воде и минералних материја.

Слободноживећи азотофиксатори, као што су *Azotobacter* spp., такође имају значајну улогу у плодности земљишта. Иако фиксирају мање количине азота него симбиотске бактерије, њихова бројност и распрострањеност омогућавају значајан допринос природном циклусу азота (Хајнал Јафари и сар., 2020).

После азота, фосфор представља један од најважнијих елемената за правилан раст биљака. Он учествује у процесима фотосинтезе, дисања, деобе ћелија, синтезе нуклеинских киселина и преносу енергије путем АТР-а. Иако је у већини земљишта присутан у релативно великим количинама, највећи део фосфора налази се у облику нерастворљивих минералних или органских једињења, које биљка не може непосредно усвајати.

РGP микроорганизми повећавају приступачност фосфора путем солубилизације минералних једињења и минерализације органског фосфора. Најважнији механизам солубилизације подразумева синтезу органских киселина, као што су глуконска, лимунска, оксална, јабучна и млечна киселина. Ове киселине снижавају рН у непосредној околини корена и ослобађају фосфатне јоне из нерастворљивих једињења калцијума, гвожђа и алуминијума (Bechtaoui et al., 2020).

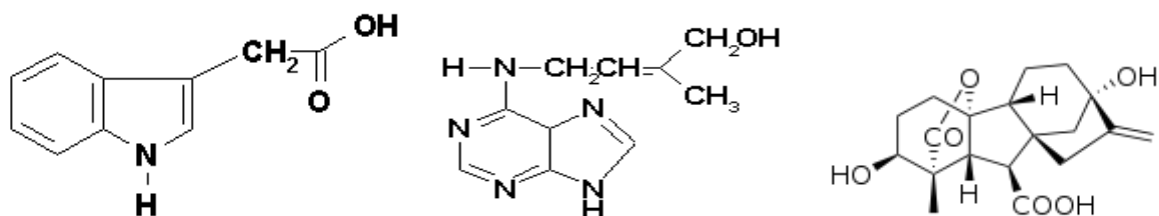
Поред органских киселина, микроорганизми производе ензими фосфатазе и фитазе који разлажу органска једињења фосфора и омогућавају његово усвајање. Захваљујући овим процесима, повећава се ефикасност коришћења постојећих резерви фосфора у земљишту, што доприноси смањењу потребе за применом минералних фосфорних ђубрива.

Најзначајнији микроорганизми који солубилишу фосфор припадају родовима *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Paenibacillus* и *Rhizobium*, док међу гљивама важну улогу имају врсте родова *Aspergillus* и *Penicillium*.

Поред фиксације азота и мобилизације минералних елемената, PGP микроорганизми активно учествују у биогеохемијским циклусима угљеника, и сумпора. Разлагањем органске материје они омогућавају ослобађање минералних једињења која постају доступна биљкама. Истовремено, побољшавају структуру земљишта, повећавају активност других корисних микроорганизама и убрзавају кружење хранљивих материја у агроекосистему (Pii et al., 2015).

Посебан значај имају целулолитички и лигнолитички микроорганизми који разлажу биљне остатке и учествују у формирању хумуса. На овај начин повећава се плодност земљишта и стварају повољнији услови за раст и развој биљака.

Један од најзначајнијих директних механизма деловања PGP микроорганизама јесте синтеза фитохормона (Слика 6). Микроорганизми производе једињења која су структурно и функционално слична биљним хормонима, чиме непосредно регулишу физиолошке процесе у биљци.



Слика 6. Фитохормони које продукују ПГП микроорганизми (ауксини, цитокинини, гиберелини)

Највећи број PGP бактерија производи индол-3-сирћетну киселину (IAA), најзначајнији природни ауксин. Ауксини стимулишу издуживање ћелија, образовање бочних и

адвентивних коренова, повећавају површину кореновог система и омогућавају ефикасније усвајање воде и минералних материја. Родови *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Rhizobium* познати су као изразити продуценти ауксина (Sraepen and Vanderleyden, 2011).

Значајну улогу имају и цитокинини, који стимулишу деобу ћелија, успоравају старење листова и повећавају интензитет фотосинтезе.

Поред поменутих фитохормона, многе бактерије синтетишу гиберелине, који стимулишу клијање семена, издуживање стабла и развој плодова. Производња гиберелина нарочито је изражена код представника родова *Azospirillum*, *Bacillus* и *Acinetobacter*.

Захваљујући комбинованом дејству ауксина, гиберелина и цитокинина, PGP микроорганизми значајно унапређују раст биљака и повећавају принос гајених култура.

Један од важних механизма којим PGP бактерије повећавају толеранцију биљака на стрес јесте продукција ензима АСС-деаминазе. Овај ензим разлаже 1-аминоциклопропан-1-карбоксилну киселину (АСС), која представља непосредни прекурсор етилена.

Етилен је биљни хормон који се у повећаним количинама синтетише током суше, заслаћености, поплава, присуства тешких метала или напада патогена. Повишене концентрације етилена успоравају раст корена и смањују принос. Разлагањем АСС-а PGP бактерије снижавају концентрацију етилена у биљци, омогућавају наставак раста корена и повећавају отпорност биљака према различитим облицима абиотичког стреса (Glick, 2014).

Најзначајнији продуценти АСС-деаминазе припадају родовима *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* и *Rhizobium*. Захваљујући овом механизму, ове бактерије успешно повећавају продуктивност биљака у неповољним условима животне средине и представљају једну од најважнијих компоненти савремених микробиолошких препарата.

2.2.2 Индиректни механизми деловања PGP микроорганизама

Поред директног утицаја на исхрану и физиологију биљака, PGP микроорганизми испољавају и бројне индиректне механизме деловања којима смањују штетно дејство фитопатогених микроорганизама и повећавају отпорност биљака према биотичким и абиотичким стресовима. За разлику од директних механизма, који обезбеђују хранљиве материје или регулишу раст биљака, индиректни механизми пре свега ограничавају развој

патогена и омогућавају биљци да расположиву енергију усмери ка расту и развоју (Goswami et al., 2016). Најзначајнији индиректни механизми обухватају продукцију сидерофора, антибиотика, испарљивих антимикробних једињења, литичких ензима, као и активирање природних механизма одбране биљака.

Један од битних механизма биолошке контроле фитопатогена јесте продукција сидерофора. Сидерофори су нискомолекулска органска једињења велике афинитетности према јонима тровалентног гвожђа (Fe^{3+}). Иако је гвожђе један од есенцијалних микроелемената неопходних за раст и развој свих живих организама, у већини земљишта оно се налази у облику тешко растворљивих једињења, због чега је његова приступачност ограничена.

PGP микроорганизми синтетишу сидерофоре који везују нерастворљиво гвожђе и формирају стабилне комплексе. Тако настали комплекси транспортују се у микробне ћелије, где се гвожђе ослобађа и користи у бројним метаболичким процесима. Истовремено, овим процесом се смањује количина слободног гвожђа у ризосфери, што ограничава раст фитопатогених бактерија и гљива које зависе од овог елемента. Захваљујући томе, сидерофори представљају важан механизам конкурентске предности корисних микроорганизама над патогенима (Saha et al, 2016).

Поред сузбијања патогена, поједини сидерофори могу посредно повећати доступност гвожђа и самој биљци. Биљке су способне да усвајају гвожђе из комплекса које формирају одређени микроорганизми, што доприноси бољој минералној исхрани, интензивнијој синтези хлорофила и већој фотосинтетичкој активности. На овај начин продукција сидерофора има двоструки значај, са једне стране ограничава развој патогена, а са друге побољшава исхрану биљака.

Најпознатији продуценти сидерофора припадају родовима *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Burkholderia* и *Streptomyces*. Посебно се издваја врста *Pseudomonas fluorescens*, која производи флуоресцентне сидерофоре (пиовердине), због чега је ова бактерија један од најважнијих агенаса биолошке контроле у савременој пољопривреди (Soares et al., 2022).

Други важан индиректни механизам деловања PGP микроорганизама јесте продукција антибиотика. Антибиотици су секундарни метаболити који инхибирају раст или доводе до угинућа патогених микроорганизама. Њиховом синтезом корисни микроорганизми

смањују бројност патогена у ризосфери и омогућавају успешнију колонизацију кореновог система.

Велики број PGP бактерија производи антибиотике различите хемијске структуре и начина деловања. Најпознатији су 2,4-диацетилфлороглуцинол (DAPG), феназини, пиролнирин, пиолутеорин, вискозина и сурфактин. Ова једињења могу оштетити ћелијски зид патогена, инхибирати синтезу протеина, пореметити пропустљивост цитоплазматске мембране или блокирати ензимске процесе неопходне за њихов раст и размножавање (Raaijmakers et al., 2002).

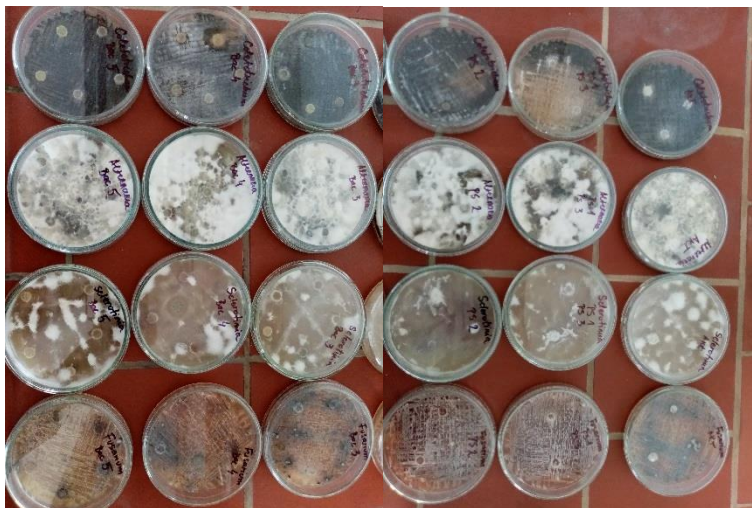
Представници рода *Pseudomonas* спадају међу најзначајније продуценте антибиотика и других секундарних метаболита у ризосфери. Њихови метаболити успешно сузбијају бројне фитопатогене гљиве, као што су *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* и *Phytophthora*, које изазивају економски значајне болести гајених биљака (Слика 7). Захваљујући томе, *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas chlororaphis* често представљају активну компоненту комерцијалних биолошких препарата.



Слика 7. Фитопатогене гљиве у петри кутијама (Фото Годић)

Поред псеудомонаса, велики број антибиотика и других секундарних метаболита са антимикробним деловањем, продукују и врсте рода *Bacillus* (Слика 8). Најзначајнији су липопептиди сурфактин, итурин и фенгицин, који испољавају снажно фунгицидно дејство. Они нарушавају интегритет ћелијске мембране патогених гљива, доводећи до цурења цитоплазматског садржаја и угинућа ћелије. Истовремено, ови метаболити могу стимулисати одбрамбене механизме биљака, што додатно повећава њихову ефикасност у биолошкој контроли (Raaijmakers et al., 2012).

Актиномицете, нарочито представници рода *Streptomyces*, производе највећи број до сада познатих антибиотика (Pросório et al., 2012). Захваљујући овој особини, они имају значајну улогу у контроли фитопатогених бактерија и гљива, али и у производњи антибиотика који се користе у медицини и ветерини.



Слика 8. Антагонистички однос PGP бактерија и фитопатогених гљива (Фото Годић)

Поред антибиотика, бројни PGP микроорганизми производе испарљива органска једињења (Volatile Organic Compounds - VOCs), која могу деловати на значајним удаљеностима од места синтезе. Ова једињења инхибирају развој фитопатогена, али истовремено могу стимулирати раст биљака и повећати њихову отпорност према стресу (Santoro et al., 2017).

Најпознатије испарљиво антимикробно једињење је водоник-цијанид (HCN). Одређене врсте рода *Pseudomonas* синтетишу HCN у малим концентрацијама, које су довољне да инхибирају ензиме патогених микроорганизма. На овај начин спречава се њихов раст и развој, чиме се смањује ризик од инфекције биљака (Kumar et al., 2012).

Поред HCN-а, микроорганизми производе и велики број других испарљивих једињења, као што су ацетоин, 2,3-бутандиол, диметил-дисулфид, терпени и различити алкохоли и кетони (Veselova et al., 2019). Истраживања показују да ова једињења могу стимулирати развој кореновог система, повећати фотосинтетичку активност и активирати одбрамбене реакције биљака. Посебно су значајни ацетоин и 2,3-бутандиол, које производе бактерије

рода *Bacillus*, јер доказано повећавају биомасу биљака и толеранцију према суши и заслањености (Kumar et al., 2012).

Захваљујући комбинацији продукције сидерофора, антибиотика и испарљивих антимикробних једињења, PGP микроорганизми представљају ефикасне природне антагонисте великог броја фитопатогених бактерија и гљива. Управо ови механизми чине основу њихове примене у биолошкој контроли болести и развоју микробиолошких препарата који представљају одрживу алтернативу хемијским средствима за заштиту биљака.

Поред продукције антибиотика, сидерофора и испарљивих антимикробних једињења, PGP микроорганизми могу сузбијати фитопатогене и продукцијом различитих хидролитичких, односно литичких ензима (Reddy et al., 2022). Ови ензими имају способност разградње структурних компоненти ћелијског зида патогених гљива и бактерија, чиме доводе до њиховог слабљења или потпуног уништавања. Овај механизам представља један од најзначајнијих начина директног антагонистичког деловања корисних микроорганизама у ризосфери (Glick, 2012).

Ћелијски зид фитопатогених гљива углавном је изграђен од хитина, β -глюкана, целулозе и других полисахарида, док бактеријски ћелијски зид садржи пептидогликан. PGP микроорганизми производе ензиме који разграђују ове компоненте, чиме нарушавају интегритет патогених ћелија.

Један од индиректних механизма деловања PGP микроорганизама јесте способност индукције системичне отпорности биљака, познате као ISR (Induced Systemic Resistance). Овај механизам подразумева активирање природних одбрамбених механизма биљке након колонизације корена корисним микроорганизмима, при чему биљка постаје отпорнија према различитим патогенима (Singh et al., 2016).

За разлику од директног уништавања патогена, ISR представља посредан механизам у коме микроорганизам делује као биолошки стимулатор имуног система биљке. При контакту са PGP микроорганизмима, биљка препознаје специфичне молекуле повезане са микроорганизмима, што доводи до активирања сигналних путева одбране (Millet et al., 2010).

Активирање ISR механизма доводи до повећане синтезе одбрамбених једињења, као што су фенолна једињења, фитоалексини, реактивне врсте кисеоника и протеини повезани са

патогенезом (PR-протеини). На тај начин биљка брже и ефикасније реагује приликом каснијег напада патогена (Yu et al., 2022).

Конкуренција за простор и хранљиве материје представља један од најједноставнијих, али веома ефикасних механизма којима PGP микроорганизми ограничавају развој фитопатогена (Compant et al., 2005). Ризосфера представља ограничен простор са ограниченим количинама доступних хранљивих материја, због чега микроорганизми морају успешно колонизовати корен како би обезбедили опстанак.

Брза колонизација кореновог система омогућава PGP микроорганизмима да заузму места на којима би се иначе могли населити патогени. На тај начин они физички спречавају контакт патогена са биљним ткивом и смањују могућност инфекције. Овај процес је посебно значајан у раним фазама развоја биљке, када је корен млад и осетљив на напад патогених микроорганизма.

Поред просторне конкуренције, PGP микроорганизми се такмиче са патогенима за доступне изворе угљеника, азота, фосфора и гвожђа. Микроорганизми који брже усвајају хранљиве материје имају предност у колонизацији ризосфере, док се развој патогена ограничава услед недостатка ресурса (Compant et al., 2005). Овај механизам посебно је изражен код брзорастућих бактерија рода *Pseudomonas* и *Bacillus*, које имају високу способност прилагођавања условима ризосфере. Њихова ефикасна колонизација корена, у комбинацији са продукцијом антибиотика, сидерофора и ензима, омогућава снажно супресивно дејство према фитопатогенима.

2.3. Значај PGP микроорганизама у одрживој пољопривреди

Сви наведени механизми показују да PGP микроорганизми делују комплексно и да њихов позитиван ефекат на биљке није последица само једне особине, већ комбинације различитих физиолошких и биохемијских активности. Један микроорганизам може истовремено фиксирати азот, производити фитохормоне, мобилисати фосфор, синтетисати сидерофоре, продуковати антибиотике и активирати одбрамбене механизме биљке (Yadav et al., 2020).

Разумевање ових механизма омогућило је развој различитих микробиолошких препарата који се користе као биостимулатори раста и биолошка средства заштите биљака. У поређењу са хемијским средствима, PGP микроорганизми представљају еколошки

прихватљив приступ који доприноси очувању микробиолошке разноврсности земљишта, смањењу загађења и повећању стабилности агроекосистема.

Примена RGP микроорганизама представља један од најзначајнијих праваца развоја савремене одрживе пољопривреде (Yadav et al., 2017). Њихова способност да побољшају исхрану биљака, повећају отпорност према болестима и стресним условима, као и да смање зависност од минералних ђубрива и пестицида, чини их важним алатом у производњи здраве и квалитетне хране.

3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА

Производња лековитог и ароматичног биља високог квалитета представља значајан циљ савремене пољопривреде, због чега се све већа пажња посвећује примени еколошки прихватљивих метода за унапређење производње. У том смислу, корисни микроорганизми из ризосфере биљака представљају значајан потенцијал, јер могу стимулирати раст биљака, побољшати усвајање хранљивих материја и повећати отпорност према неповољним условима и фитопатогенима.

Ризосфера лековитих и ароматичних биљака, укључујући нану (*Mentha longifolia* L.), још увек није у потпуности истражена, иако представља значајан извор микроорганизама са потенцијалном применом у биљној производњи. Посебно се издвајају бактерије родова *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* и *Streptomyces*, које поседују различите механизме позитивног деловања на биљке.

Циљ овог истраживања је изолација и карактеризација микроорганизама из родова *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* и *Azotobacter* из ризосфере нане (*Mentha longifolia*), као и процена потенцијала њихове примене у производњи першуна. Очекује се да ће поједини изолати показати висок степен адаптабилности на различите абиотичке факторе и способности продукције широког спектра биостимулативних супстанци. Изолати који испоље најизраженију отпорност на варијације абиотичких услова и највећу продукцију материја које стимулишу раст биљака биће издвојени за даља испитивања као кандидати са највећим потенцијалом за примену у промоцији биљног раста и одрживој пољопривредној производњи.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Изолација микроорганизама

У лабораторијским условима из ризосфере нане (*Mentha longifolia* L.) изоловани су микроорганизми из родова *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* и *Streptomyces* (Слика 9 и 10).



Слика 9. Мерење и припрема ризосферног земљишта за изолацију бактерија (Фото Годић)

За изолацију бактерија рода *Bacillus* коришћен је хранљиви агар (Јарак и Ђурић, 2006). Одабирани су изолати чије су ћелије биле грам-позитивне, штапићастог облика, каталаза-позитивне и способне за формирање ендоспора. Присуство ензима каталазе утврђивано је на основу ослобађања мехурића кисеоника приликом контакта колонија са разблаженим раствором водоник-пероксида.

За изолацију бактерија рода *Pseudomonas* коришћена је подлога King B (Стаменов, 2014), при чему су одабирани изолати са флуоресцентним колонијама и грам-негативним, штапићастим ћелијама.

За изолацију бактерија рода *Azotobacter* коришћена је селективна подлога без азота, Фјодорова подлога (F-подлога) (Јарак и Ђурић, 2006). Као циљни изолати одабирани су

млечно-беле, слузаве колоније чије су ћелије биле грам-негативне, кокоидног облика и окружене слузавом капсулом.

Изолација бактерија рода *Streptomyces* вршена је на синтетичком агару (Јарак и Ђурић, 2006), а одабирани су изолати код којих су утврђене грам-позитивне, кончасте ћелије.



Слика 10. Кораци у поступку изолације микроорганизама (Фото Годић)

4.2. Морфолошка карактеризација

Морфолошка карактеризација ћелија обухватала је одређивање њиховог облика, величине и присуства ендоспора (Стаменов и сар, 2023). Приликом описа колонија праћене су следеће морфолошке особине: облик, боја, величина, површина, ивица и структура (Стаменов и сар, 2023).

За посматрање ћелија, као и за анализу ивице и структуре колонија, коришћен је микроскоп Motic BA210 са објективима увећања 10 $\times$ и 100 $\times$.

4.3. Физиолошка карактеризација

Од физиолошких особина испитивани су однос микроорганизама према температури, реакцији средине (pH), концентрацији NaCl и присуству тешких метала.

Раст изолата испитиван је на температурама од 5 $^{\circ}$ C, 28 $^{\circ}$ C и 41 $^{\circ}$ C, на подлогама различите реакције средине (pH 5, 7 и 9), као и на подлогама са различитим

концентрацијама NaCl (3%, 5% и 7%). За сваки род коришћена је одговарајућа хранљива подлога: хранљиви агар за изолате рода *Bacillus*, King-B за изолате рода *Pseudomonas*, F-агар за род *Azotobacter* и синтетички агар за род *Streptomyces*. При испитивању утицаја pH и концентрације NaCl, инкубација је вршена у термостату на 28 °C. После 48 часова праћен је квалитативни раст изолата и поређен са контролом. Потпуно одсуство раста означено је симболом (–), минималан раст (+), оптималан раст (++) и обилан раст (+++). Отпорност микроорганизама на тешке метале испитивана је дифузионом методом применом раствора кадмијума (CdCl₂) и олова (PbCl₂) у концентрацијама 10⁻² и 10⁻⁴ mol/dm³ (Kuffner et al., 2008). Након густог засејавања за сваки род бактерије одговарајуће подлоге, на њену површину постављени су дискови натопљени растворима тешких метала, а инкубација је трајала 48 часова на 28 °C. Током инкубације формирао се густ бактеријски тепих, на коме су се око дискова уочавале зоне инхибиције раста. Величина зоне инхибиције зависила је од осетљивости микроорганизма према испитиваном металу. Одсуство зоне инхибиције означавало је отпорност микроорганизма (–), зона ширине 1–10 mm означавања је симболом (+), док је зона ширира од 10 mm означавања симболом (++) . Интензивнији раст око диска указивао је на стимулативно дејство испитиване супстанце на раст микроорганизма и обележаван је звездицом (*) (Слика 11).



Слика 11. Визуелна дијагностика резултата испитивања (Фото Годић)

4.4. Биохемијска карактеризација

Од биохемијских особина испитивана је способност продукције ензима липазе, амилазе, пектиназе, целулазе и уреазе.

Продукција липазе испитивана је на подлози састава: пептон 10 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹, CaCl₂·H₂O 0,1 g L⁻¹ и агар 15 g L⁻¹, уз додатак Tween 80 (Lanyi, 1987). Инкубација је трајала седам дана на 26 °C. Појава замућених зона око колонија указивала је на липолитичку активност.

Способност хидролизе скроба одређивана је методом агарних плоча на скробном агару (скроб у праху 10 g L⁻¹, KH₂PO₄ 0,5 g L⁻¹, K₂HPO₄ 0,5 g L⁻¹, MgSO₄ × 7H₂O 0,2 g L⁻¹ и агар 15 g L⁻¹) (Rodina, 1972). После инкубације у трајању од 48 сати на 28 °C, колоније су преливане Луголовим раствором. Скроб у присуству јода добија плаву боју, док се код микроорганизама који врше његову хидролизу око колонија формирају необојене зоне. Уколико до разградње скроба није дошло, подлога остаје равномерно плаво обојена.

Продукција пектиназе испитивана је методом агарних плоча на пектинозном агару (K₂HPO₄ 2 g L⁻¹, NaH₂PO₄ 1 g L⁻¹, MgSO₄ × 7H₂O 0,5 g L⁻¹, NH₄NO₃ 2 g L⁻¹, екстракт квасца 1 g L⁻¹, пектин 10 g L⁻¹ и агар 16 g L⁻¹). После 24 часа инкубације на 37 °C колоније су преливане Луголовим раствором. Појава необојених зона око колонија указивала је на пектиназну активност (Soares et al., 2001).

Продукција целулазе испитивана је на СМС агару (карбоксиметил-целулозни агар). Инкубација је трајала седам дана на 28 °C, након чега су Петријеве посуде преливане раствором Congo red (1 mg/cm³ воде). После 15 минута раствор је уклоњен, а подлоге су испране 1 М раствором NaCl. Обезбојене зоне око колонија представљале су доказ целулазне активности микроорганизама.

Способност продукције ензима уреазе испитивана је на Кристенсеновој подлози (Говедарица и Јарак, 1999). Инкубација је трајала 24 часа на 37 °C. Појава светло црвене боје индикатора у подлози указивала је на разградњу урее.

4.5. PGP карактеризација

Способност продукције индол-3-сирћетне киселине (IAA) испитивана је применом подлоге богате аминокиселином триптофаном (триптофан бујон). Продукција ензима

триптофаназе, односно присуство индола у подлози, утврђивани су додавањем Ковачевог реагенса, при чему је формирање црвеног прстена представљало позитивну реакцију.

Способност продукције сидерофора испитивана је применом хром-азурол агара (CAS, *chrome azurol S*). Према овој методи, CAS агар представља смешу два раствора који се припремају и стерилишу одвојено. Први раствор садржи 60,5 mg CAS, 50 ml воде, 10 ml раствора (1 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ у 10 mM HCl) и 40 ml воденог раствора HDTMA (хексадецилтриметиламонијум; 1,82 mg ml⁻¹). Други раствор припрема се растварањем 30,24 g PIPES (1,4-пиперазиндиетансулфонска киселина) у 750 ml воде, уз додатак 15 g агара и 12 g 50% раствора NaOH, при чему се pH подешава на 6,8. Након стерилизације, оба раствора су помешана. Припремљени CAS агар има тамноплаву до зелену боју. Хранљива подлога је разливена у Петријеве посуде, а након очвршћавања свака подлога је пресечена на две половине, при чему је једна половина уклоњена и замењена CAS агаром. Засејавање је вршено на половини са хранљивом подлогом, док је праћена промена боје CAS агара дуж линије раздвајања две подлоге. Промена боје из плавозелене у наранџастоцрвену указивала је на продукцију сидерофора.

Продукција водоник-цијанида (HCN) испитивана је на подлози следећег састава: триптон из соје 30 g L⁻¹, глицин 4,4 g L⁻¹ и агар 15 g L⁻¹ (Frey-Klett et al., 2005). Након инокулације, на подлогу је постављен Whatman филтер-диск, претходно натопљен раствором који садржи 0,5% пикринске киселине и 2% Na₂CO₃. Петри кутије су обмотане парафилмом и стављене на инкубацију. Инкубација је трајала четири дана на 28 °C. Промена боје диска из жуте у наранџастобраон представљала је доказ способности микроорганизма да продукује HCN.

Способност минерализације органских једињења фосфора испитивана је на Менкиновој подлози, модификованој према Родиној. Способност изолата да солубилизују неорганске фосфате испитивана је на Píkovskaya подлози (Стаменов, 2014). После пет дана инкубације на 28 °C, појава провидних зона око колонија указивала је на способност микроорганизама да растварају неорганске фосфате.

4.6. Испитивање ефекта инокулације на клијавост и почетни раст биљке

У завршној фази истраживања извршен је избор најефикаснијих изолата из сваког испитиваног рода, њихово умножавање и примена у полуконтролисаним условима.

За испитивање утицаја изолата на степен клијавости семена лековитог и ароматичног биља, коришћено је семе першуна (*Petroselinum crispum* L.).

Утицај изолата на клијање семена и почетни раст клице испитиван је у лабораторијским условима. По двадесет семена постављено је на стерилне дискове филтер-хартје, претходно смештене у Петријеве посуде. Након тога, у сваку Петријеву посуду додато је по 10 ml инокулума титра 10^9 CFU ml⁻¹. Посуде су затим инкубиране у термостату на 22 °C. Степен клијавости одређиван је након 7 и 10 дана, док је почетни раст клице процењиван мерењем дужине коренка и стабаоцета (mm) после 12, 17 и 21 дана од постављања огледа.

4.7. Статистичка обрада података

Статистичка обрада података је урађена анализом варијансе (ANOVA), а разлике између средина третмана су поређене Фишеровим тестом на прагу значајности $\alpha = 0,05$. Резултати су обрађени коришћењем статистичког софтвера Statistica v.14. Иста слова у табелама указују да разлике у испитиваним својствима нису статистички значајне, а различита слова указују на статистичку значајност.

5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА СА ДИСКУСИЈОМ

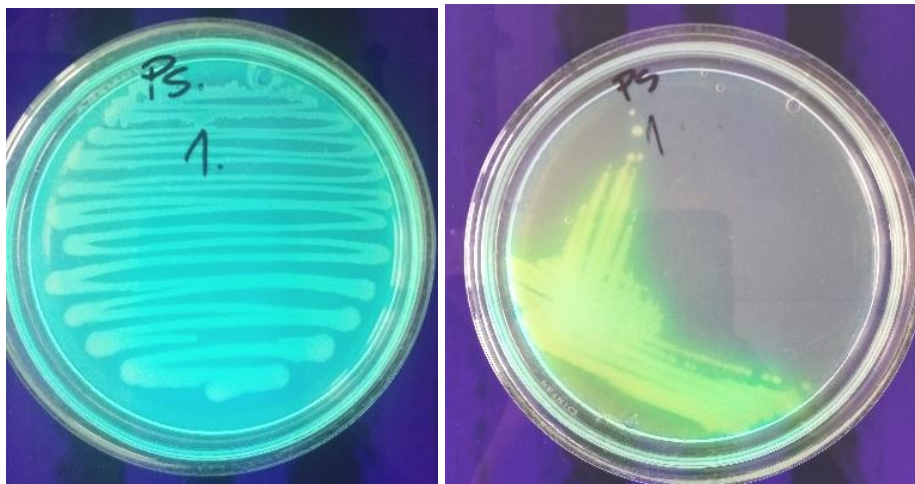
5.1. Карактеризација микроорганизама из ризосфере нане

У овим истраживањима, из ризосфере нане извршена је карактеризација укупно 11 изолата, и то један из рода *Pseudomonas* (означен са П1), пет из рода *Bacillus* (означени са Б1-Б5), један из рода *Streptomyces* (Означен са С1), и четири из рода *Azotobacter* (означени са А1-А4).

5.1.1. Морфолошке особине изолата

Колоније изолата су издвојене на основу морфолошких карактеристика, а да би се добиле чисте културе, неколико пута су рекултивисане на одговарајућим подлогама.

Ћелије изолата рода *Pseudomonas* (означен са П1) су Грам-негативни штапићи. Ћелије су ситни штапићи, споре нису присутне (Табела 1 и 2). Колоније су округле, крупне величине, жуте боје (Слика 12). Површина је глатка-мат са таласастом ивицом, а унутрашња структура је потпуно хомогена.



Слика 12. Изолат П1 (*Pseudomonas*) (Фото Годић)

Табела 1. Морфологија ћелија изолата рода *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter*

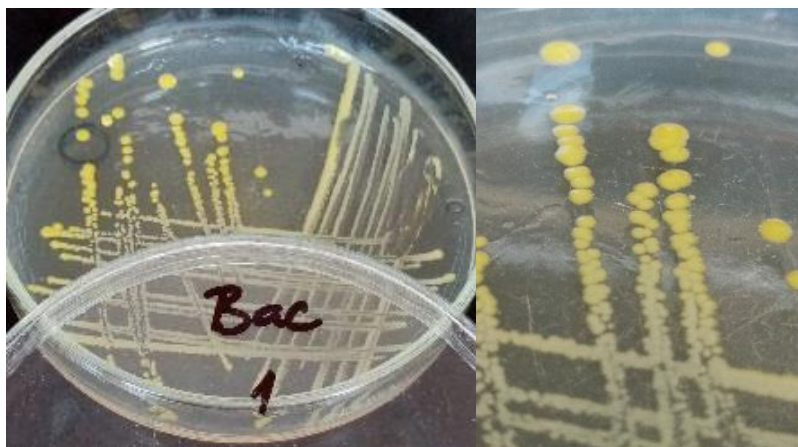
	Ћелија		
Изолат	Облик	Величина	Споре
П1	штапић	ситне	не
Б1	штапић	ситне	да
Б2	штапић	крупне	да
Б3	штапић	ситне	ситне споре
Б4	штапић	крупне	да
Б5	штапић	ситне	ситне споре
С1	кончаста	танке	не
А1	дипло-кока	ситне	не
А2	дипло-кока	крупне	не
А3	дипло-кока	ситне	не
А4	дипло-кока	ситне	не

Табела 2. Морфологија колонија изолата рода *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter*

	Колонија					
Изолат	Облик	Боја	Величина	Површина	Ивица	Структура
П1	округла	жута	крупна	глатка-мат	таласаста	хомогена
Б1	округао	жута	средња	наборана	тестераста	зрнаста
Б2	сочиваст	светло жута	средња	глатка	таласаста	хомогена
Б3	округао	крем	средња	наборана	тестераста	зрнаста
Б4	сочиваст	крем	средња	глатка-сјајна	таласаста	хомогена
Б5	сочиваст	жута	средња	глатка-сјајна	равна	хомогена
С1	неправилан	сиво- смеђа	крупна	наборана-мат	кончаста	кончаста
А1	округао	светло крем	крупне	глатка	таласаста	ситно зрнаста
А2	неправилан	светло крем	крупне	наборана	таласаста	крупно зрнаста
А3	округао	бела	крупне	глатка	режњевита	ситно зрнаста
А4	неправилан	крем	средња	глатка-сјајна	благо таласаста	ситно зрнаста

Оваква морфолошка карактеризација ћелија изолата рода *Pseudomonas* у потпуности се слаже са стандардним описима за флуоресцентне псеудомонасе које наводе Deshwal et al. (2013). Аутори наглашавају да оваква хомогена морфологија са глатком површином омогућава брзи раст колоније бактерија и рефлектује интензивно лучење екстрацелуларних метаболита.

Ћелије изолата рода *Bacillus* (означени са Б1-Б5) су Грам-позитивне бактерије, правог штапићастог облика. Често се јављају у дугим ланцима. Кључна особина овога рода је способност формирања ендоспора (унутрашњих структура за преживљавање екстремних услова средине). Изолати Б1 и Б3 формирају округле, наборане колоније, средње величине (Слика 13 и 14).



Слика 13. Изглед колонија изолата Б1 (*Bacillus*)



Слика 14. Изглед колонија изолата Б3 (*Bacillus*) (Фото Годић)

Боја варира од жуте (Б1), до крем (Б3). Изолати Б2, Б4 и Б5 формирају сочивасте, глатке колоније, средње величине. Боја колоније изолата Б2 је светло-жута, Б4 је крем, док је боја колоније изолата Б5 жута (Слика 15). Ивице колоније су таласасте или равне, а унутрашња структура је хомогена са глако-сјајном површином. Изолати Б2 и Б4 имају крупније штапиће и стварају класичне споре, док Б5 има ситније штапиће који праве ситне споре (Табеле 1 и 2).



Слика 15. Изглед колонија бактеријских изолата Б2, Б4 и Б5 (*Bacillus*)

(Фото Годић)

Кључна таксономска одлика формирања унутарћелијских ендоспора забележена је код свих пет испитиваних бацила. Анализа макроскопског изгледа колонија открива хетерогеност међу изолатима рода *Bacillus*, што је у складу са резултатима предходних испитивања. Gireesha et al. (2024) истичу да округло облик и изразито наборана површина колонија (у раду забележена код сојева Б1 и Б3) представљају типичну карактеризацију високопродуктивних сојева попут *Bacillus subtilis*. С друге стране, Matsushita et al. (2004) у свом раду описује колоније изолата бацилуса као глатке, сочивасте до округле колоније са хомогеном структуром, што је у овом раду забележено код сојева Б2, Б4 и Б5.

Ћелије изолата рода *Streptomyces* (Означен са С1) су грам-позитивне, високо разгранате, филаментозне бактерије (актиномицете). Расту у виду густог вегетативног и ваздушног мицелијума, због чега морфолошки подсећају на гљиве. Не формирају ендоспоре, већ се размножавају преко ланаца конидиоспора на крајевима ваздушастих хифа. Ћелије су танке, кончасте (филаментозне), без класичних ендоспора (Табела 1 и 2). Колонија је неправилног облика, крупне величине и карактеристичне сиво-смеђе боје (Слика 16).

Површина је наборана и мат, ивица је типично кончаста, а унутрашња структура одражава исплетану кончасту грађу.



Слика 16. Изглед колонија бактеријског изолата C1 (*Streptomyces*)
(Фото Годић)

Овакви резултати су научно верификовани у студији аутора Gohel et al. (2017), који наводе да смеђа боја ваздушастог мицелијума и кредаста структура, попут иститиваног C1 изолата, указују на зrelu фазу спорулације ланаца конидиоспора на чврстим подлогама.

Изолати рода *Azotobacter* (означени са A1-A4) имају грам-негативне, крупне, овалне ћелије. Изразито су плеоморфне (мењају облик од штапића до кока). Најчешће се јављају у паровима (диплококе). Не формирају ендоспоре али стварају цисте под неповољним условима. Око ћелија формирају дебелу слузаву капсулу која служи за заштиту ензима нитрогеназа.

Изолати A1, A3 и A4 су ситне, а A2 крупне диплококе. Колоније изолата A1 и A3 су округле, док су код изолата A2 и A4 неправилног облика, крупне до средње величине. Боја колоније се разликовала од изолата до изолата. Код изолата A1 и A2 боја колоније је била светло-крем (Слика 17), код A3 беле боје, док је код изолата A4 боја колоније била крем. Површина колоније већине изолата је глатко-сјајна, ивице таласасте и режњевите (A3), а унутрашња структура ситно и крупно (A2) зрнаста (Табела 1 и 2). Микроскопски распоред великих овалних ћелија у облику диплокока, без присуства споре, представља типичну морфологију рода *Azotobacter* (Тејера et al., 2005). Међутим, по изгледу колонија јасно се издваја изолат A2 као специфични крупнозрнасти и наборани варијетет, док преостала три изолата (A1, A3, A4) имају глатку површину и ситнозрнасту структуру.



Слика 17. Изглед колонија изолата рода *Azotobacter* гледано под микроскопом
(Фото Годић)

5.1.2. Физиолошке особине изолата

У табели број 3 приказани су резултати испитивања физиолошких особина изолата рода *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter* и утицај тешких метала на њихов раст (Слике 18-23).

Одређивање физиолошких карактеристика изолата пружа кључне информације о способности преживљавања и адаптације изолата у реалним земљишним условима. Сви испитивани изолати су изразити мезофили са оптималним растом на 28°C, али показују изузетну прилагодљивост (Табела 3). Већина изолата (преко 90%) успешно подноси високе температуре (41°C), док је скоро 64% психротолерантно (расту на 5°C). Униформна способност свих изолата рода *Azotobacter* (A1-A4) да се развија на ниским температурама (5°C) усклађена је са налазима аутора Miller et al. (1988), који наводе да сојеви овог рода задржавају метаболичку активност чак и у хладнијим периодима године. Са друге стране, развој колонија изолата рода *Bacillus* на 41°C прати тврдње аутора Gireesha et al. (2024) да сојеви рода *Bacillus* услед формирања ендоспора лако преживљавају топлотни стрес у површинским слојевима земљишта. Слично резултатима овог рада, Nathan et al. (2011) је утврдио да од 14 испитиваних изолата рода *Pseudomonas*, половина је имала минималан до оптималан раст на температури од 4°C и 41°C.

Сви испитивани изолати показали су апсолутну стабилност у киселим условима, што је добар показатељ потенцијала изолата за примену у киселим земљиштима. Висок проценат толеранције забележен и у алкалној средини (90,9% изолата расте на pH 9), при чеми је раст изостао само код изолата C1.

Табела 3. Физиолошке особине и утицај тешких метала на раст изолата *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter*

Изолат	Температура ^а (°C)			pH ^а (средине)			NaCl ^а (%)			Тешки метали ^б (mol/dm ³)			
	5	28	41	5	7	9	3	5	7	Cd		Pb	
										10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻⁴
П1	+	++	+	+	++	+	+++	+	+	-	*	-	-
Б1	-	++	-	++	++	++	++	-	-	+	+	-	-
Б2	+	++	+	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-
Б3	-	++	+	++	++	++	+++	+	-	+	+	-	-
Б4	-	++	+	++	++	++	+++	+	+	+	+	-	-
Б5	+	++	-	++	++	++	+++	+	+	+	+	-	-
С1	-	++	++	+	++	-	+	-	-	+	+	-	-
А1	+	++	+	++	++	++	+	-	-	+	+	+	+
А2	+	++	+	+	++	++	+	-	-	+	+	-	-
А3	+	++	+	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+
А4	+	++	+	+	++	+	+	-	-	+	+	-	-

^а потпуно одсуство раста -; минималан раст +; оптималан ++; обилан раст +++

^б без зоне инхибиције -; + зона од 1-10mm; ++ зона већа од 10 mm; * стимулација раста

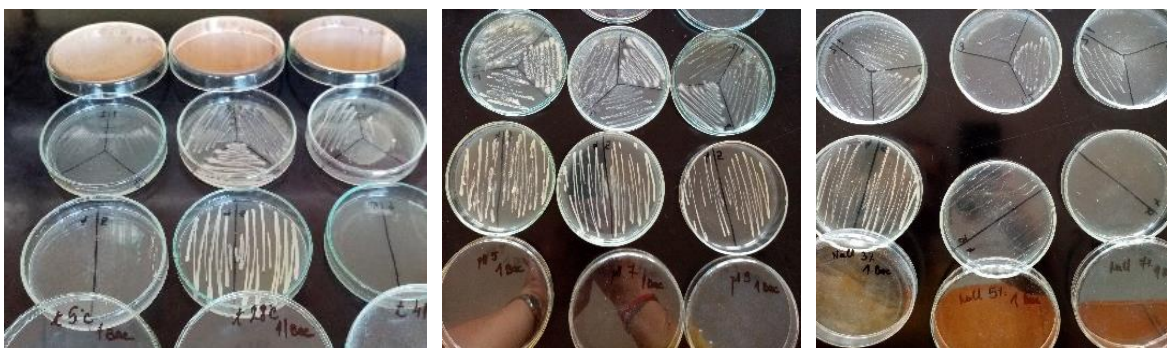
Упркос томе што су предходна истраживања потврдила да бактерије рода *Azotobacter* преферирају више неутралну средину, и да су сетљиве на ниске и високе вредности pH (Aquilanti et al., 2004), у нашем раду изолати овог рода су развили минималан до оптималан раст у овим срединама. Немогућност раста соја С1 при pH 9 потврђује осетљивост овог изолата на алкалне вредности pH, што је у супротности са наводима Gohel et al. (2017), који су утврдили високу толеранцију изолата актиномицета на варирање pH.

Испитивање утицаја различитих концентрација соли на раст колоније изолата, открило је њихову различиту халотолерантност. Док ниже концентрације соли (3%) подносе сви изолати, висок салинитет од 7% успешно преживљава 54,5% изолата. Као најотпорнији на изразите концентрације соли издваја се изолат Б2 (*Bacillus*), који је имао оптималан раст на подлози са високом концентрацијом соли.

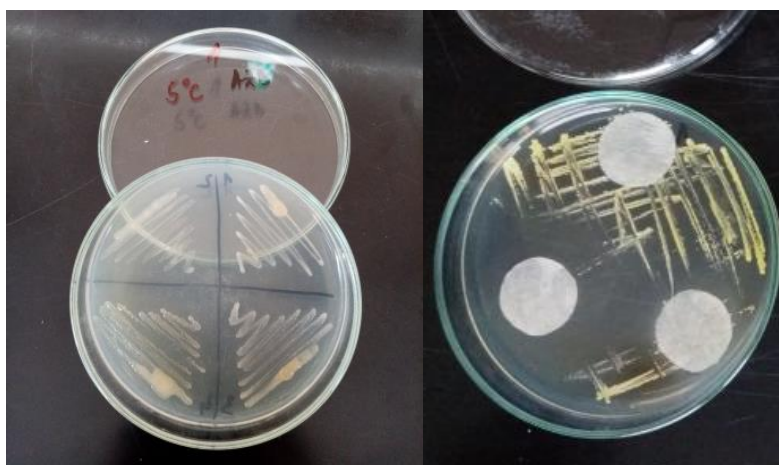
Овако широка еколошка валенца испитиваних изолата усклађена је са обимном студијом коју су спровели Mustapha et al. (2022). Такође, Mehnaz et al. (2009) је испитујући физиолошке особине седам изолата рода *Pseudomonas*, утврдио оптималан раст свих изолата на подлози са 3 и 5% NaCl, четири изолата је имало оптималан раст на рН 11, а три на рН 3. Резултати ових истраживања су у складу и са истраживањима Myeong-Hoon et al. (2007), који су утврдили да су изолати *Bacillus* spp. имали оптималан раст на подлогама рН 6-9, као и на подлогама где је концентрација соли износила 5% и 7%. У овом раду изолат из групе актиномицета није растао на ниским температурама, као и високој рН и високим концентрацијама соли. Ово је у складу са предходним истраживањима које је спровео Moncheva et al. (2002), а који је утврдио оптималан раст актиномицета утврђен је на подлогама које су садржавале мањи проценат NaCl (1,5; 3 и 5 %), док на подлогама са 7, 15 и 20 % NaCl није утврђен раст актиномицета.



а) б) ц)
Слика 18 . Утицај температуре (а), рН (б) и соли (ц) на развој колоније изолата ПП
(Фото Годић)



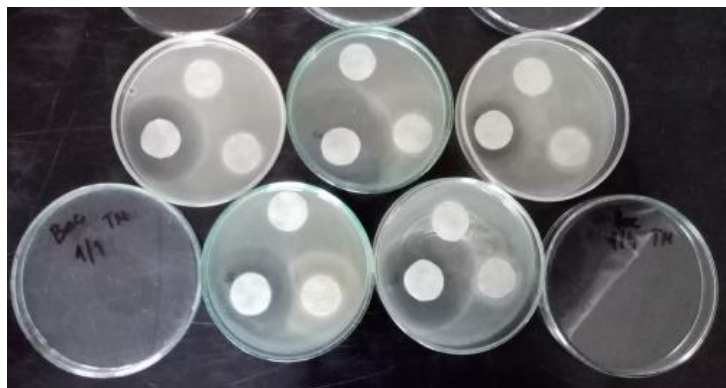
а) б) ц)
Слика 19 . Утицај температуре (а), рН (б) и соли (ц) на развој колоније изолата Б1
(Фото Годић)



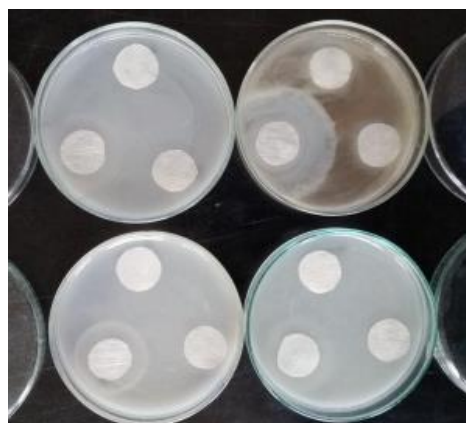
Слика 20. Утицај ниске температуре (слика лево) и тешких метала (слика десно) на развој колоније изолата С1 (*Streptomyces*) (Фото Годић)



а) б) ц)
Слика 21. Утицај температуре (а), рН (б) и соли (ц) на развој колоније изолата рода *Azotobacter* (Фото Годић)



Слика 22. Утицај тешких метала на развој колонија изолата рода *Bacillus*
(Фото Годић)



Слика 23. Утицај тешких метала на развој колонија изолата рода *Azotobacter* (Фото Годић)

У овом истраживању, примењени тешки метали имали су различит утицај на раст и развој испитиваних изолата (Табела 3). Олово (Pb) је показало много мање токсично деловање на испитиване изолате у односу на кадмијум (Cd). Већина изолата (преко 72%) показала је потпуну резистенцију на олово у обе концентрације. Највише осетљивости на олово показали су изолати рода *Azotobacter* (изолати A1 и A3), што према аутору Rasulov et al. (2013) указује на то да се јони олова лако вежу за полисахаридну капсулу азотобактера изазивајући пермеабилност мембране.

Токсичност кадмијума уочена је код већине сојева (90,9% осетљивих изолата са зоном инхибиције), што је у складу са општим микробиолошким начелима према којима јони кадмијума лако продире у ћелију и изазивају тешка оштећења ензима (Asare et al., 2023).

У односу на друге изолате, изолат П1 се издвојио. Овај изолат не само да је показао апсолутну отпорност на кадмијум у вишој концентрацији (10^{-2} mol/dm³), већ је у присуству ниже концентрације овог метала (10^{-4} mol/dm³) остварило стимулацију раста. Ово указује на развијен специфичан механизам за детоксикацију или толеранције на овај тешки метал.

Биохемијске особине изолата

У овом раду испитиване су и биохемијске особине изолата, односно њихова способност да продукују различите ензиме. Резултати испитивања су показали да се изолати међусобно веома разликују по испитиваним биохемијским особинама, и да су се четири изолата издвојила по својој великој ензимској активности (Табела 4).

Активност ензима липазе и амилазе су најзаступљеније међу испитиваним изолатима бактерија (Слика 24 и 25). Седам од једанаест изолата успешно продукује оба ова ензима (81,8%). То указује на изузетно високу способност ових бактерија да разлажу масти (липиде) и скроб (угљене хидрате), што им омогућава преживљавање у различитим срединама и даје им огроман биохемијски потенцијал. Високу заступљеност амилаза и липаза код ризосферних микроорганизама истиче и Devi et al. (2023) који наводе да ови ензими помажу успешној колонизацији корена и компетитивности у ризосфери.



Слика 24. Продукција ензима липазе (замућене зоне око колонија изолата рода *Bacillus* и *Streptomyces* доказ ензимске активности) (Фото Годић)

Табела 4. Биохемијске особине изолатa рода *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter*

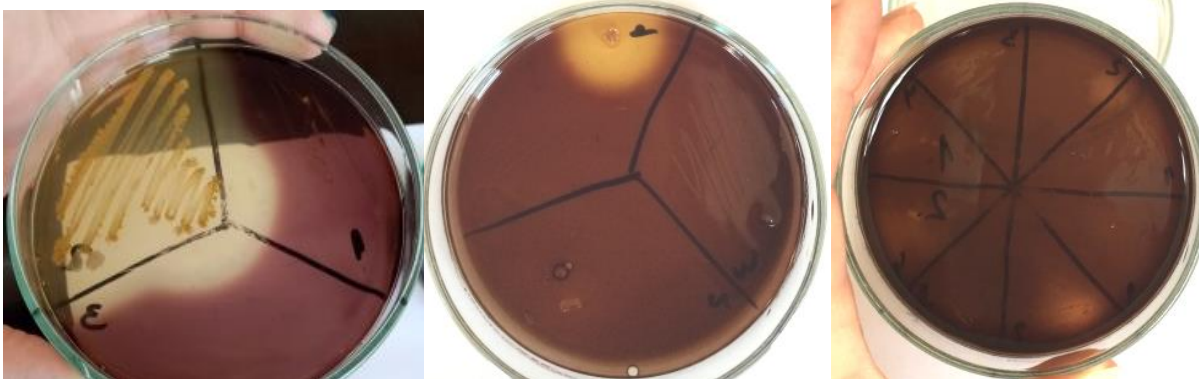
Изолат	Липаза	Амилаза	Пектиназа	Целулаза	Уреаза	Проценат позитивних особина (%)
П1	+	-	-	-	+	40
Б1	+	+	+	-	-	60
Б2	-	+	-	+	+	60
Б3	+	+	-	-	-	40
Б4	+	-	-	-	-	20
Б5	+	+	-	-	-	40
С1	+	+	+	+	-	80
А1	+	+	-	+	+	80
А2	-	-	+	+	+	60
А3	+	+	-	+	+	80
А4	+	+	-	+	+	80
Проценат позитивних изолатa (%)	81,8	81,8	27,2	54,5	54,5	

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



Слика 25. Продукција ензима амилазе (необојене зоне око колонија изолатa рода *Azotobacter*, *Bacillus* и *Streptomyces* доказ активности ензима амилазе) (Фото Годић)

Способност разградње пектина (Слика 26) имао је најмањи број изолата (27,3%) (позитивни су само Б1, С1 и А2). Остали изолати не показују пектолитичку активност, што значи да нису примарни разлагачи овог биљног полисахарида. Релативно мали број изолата способних да продукују пектиназу, у складу је са тврдњама које наводе Reddy et al. (2022). Они објашњавају да је пектиназа претежно еволутивни алат ендофита или фитопатогена који морају да пробију средњу ламелу биљног ћелијског зида. Dogan et al. (2021) наводи сличне резултате, потврђујући да овај ензим није примарно заступљен код слободноживећих PGPR сојева, већ се углавном везује за специфичне ендофите или фитопатогене микроорганизме.

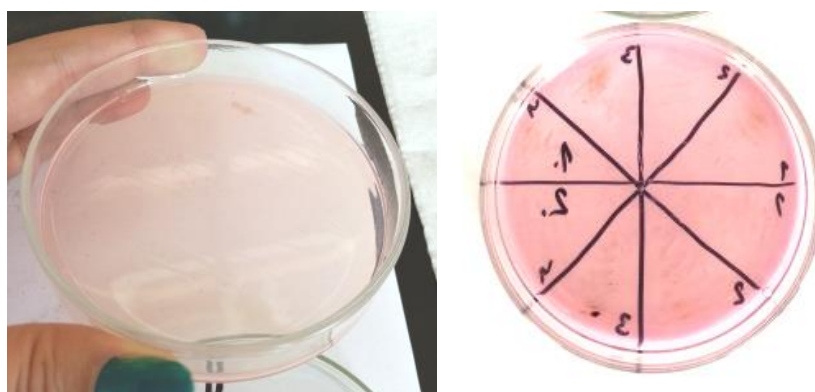


Слика 26. Продукција ензима пектиназе (необојене зоне око колонија изолата Б1, С1 и А2 (слике редом) доказ активности ензима пектиназе) (Фото Годић)

Способност продукције ензима целулазе (Слика 27) и уреазе (Слика 28) утврђена је код 5 изолата, и то код свих изолата рода *Azotobacter*, и само једног изолата рода *Bacillus* Б2. Целулазу је продуковао и изолат С1, а уреазу и изолат П1. Продукција целулазе омогућава бактеријама благо разлагање целулозних влакана корена чиме се олакшава улазак или чвршће везивање за ризоплану. У истраживањима које су објавили Sritongon et al. (2023), сојеви који поседују мултифункционална PGP својства углавном показују пратећу активност целулазе паралелно са амилазом као што је случај код испитиваних сојева Б2, С1, А1, А2, А3 и А4.



Слика 27. Продукција ензима целулазе (необојене зоне доказ способности продукције целулазе изолата) (Фото Годић)



Слика 28 . Продукција ензима уреазе (необојене зоне доказ активности ензима код изолата П1 и изолата рода *Azotobacter*, слике редом) (Фото Годић)

Уреаза има кључну улогу у кружењу азота јер хидролизује уреу до амонијака. Према раду Mekonnen et al. (2021), уреазна активност је високо распрострањена код сојева који учествују у азотном циклусу земљишта, што директно оправдава 100% заступљености ове особине у испитиваној групи изолата бактерија рода *Azotobacter*.

Упоредјујући саме изолате међусобно, уочава се да су изолати рода *Azotobacter* показали највећу ензимску активност. Ова група показује изузетно високу и уједначену метаболичку активност (проценат позитивних особина по изолату је 60%-80%). Већина изолата рода *Azotobacter* успешно продукују липазу, амилазу, цеулазу и уреазу. Једини изузетак је пектиназа, коју продукује само изолат А2. Изолат рода *Pseudomonas* П1 показује специфичан биохемијски профил (40% особина), позитиван је на липазу и уреазу, али му у недостаје способност продукције амилазе, пектиназе и целулазе. Између изолата

рода *Bacillus* примећује се велика разноликост. Изолат Б2 има 60% позитивних особина, док изолат Б4 има свега 20% (позитиван само на липазу). Већина испитиваних изолата рода *Bacillus* деле заједничку особину а то је да су негативни на уреазу (осим изолата Б2) и пектиназу (осим изолата Б1). Изолат рода *Streptomyces* (С1), показује врло широк радијус хидролитичке активности (80% позитивних особина). Једини је изолат који упоредо продукује и пектиназу и целулазу (способност разградње ћелијског зида биљака).

5.1.3. PGP особине изолата

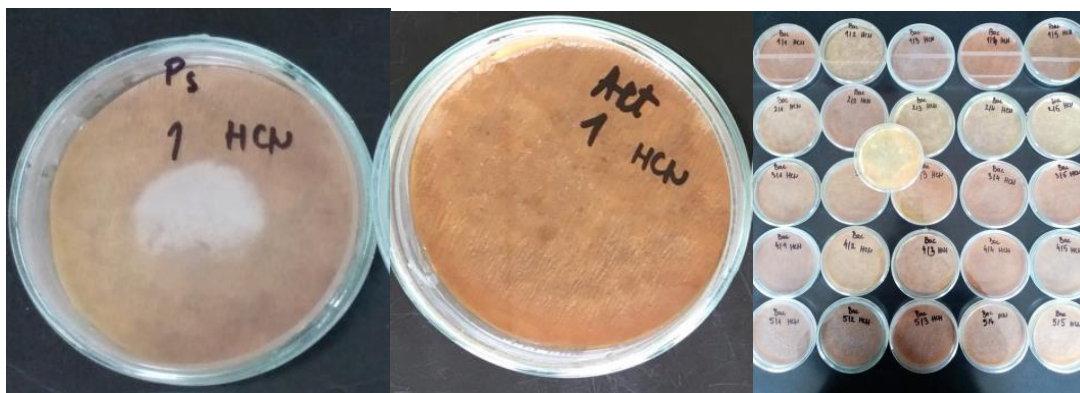
У табели број 5 приказани су резултати испитивања способности изолата да продукују сидерофоре, цијановодоник (HCN), као и да минерализују органске изворе фосфора и солубилизују тешко растворљиве фосфате. У овим истраживањима, сви испитивани изолати показали су способност продукције HCN (Слика 29).

Табела 5. PGP особине изолата рода *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter*

Изолат	HCN	Сидерофоре	Минерализација фосфора	Солубилизација фосфора	Проценат позитивних особина (%)
П1	+	+	+	+	100
Б1	+	+	-	-	50
Б2	+	-	+	+	75
Б3	+	-	-	+	50
Б4	+	-	+	-	50
Б5	+	-	-	-	25
С1	+	-	-	+	50
А1	+	+	+	-	75
А2	+	+	-	-	50
А3	+	+	+	-	75
А4	+	+	+	-	75
Позитивни изолати (%)	100	54,5	54,5	36,4	

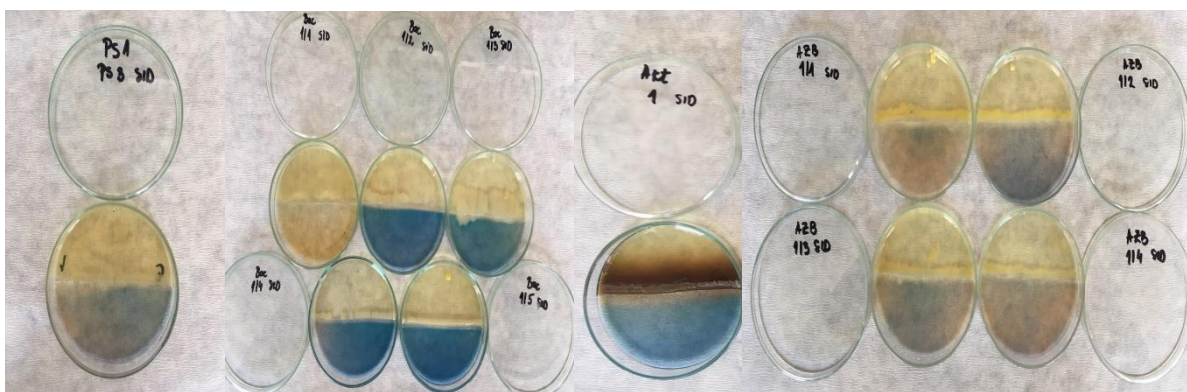
(+) позитивна реакција / продукује/ врши разлагање; (-) негативна реакција / не продукује/ не врши разлагање

Овако висока заступљеност ове особине у потпуности је у складу са истраживањима аутора Anwar et al. (2016), који наглашавају да је симултана експресија HCN-а код ризосферних бактерија доминантан биоконтролни алат за супресију земљишних фитопатогена. У раду Deshwal et al. (2013) истиче се да је HCN секундарни метаболит са јаким антагонистичким деловањем који спречава дисање у митохондријама фитопатогених гљива у ризосфери, чиме биљку штити од болести.



Слика 29. Продукција HCN (промена боје из жуте у браон, доказ способности изолата да продукује HCN) (Фото Годић)

Шест изолата (сви изолати рода *Azotobacter*, П1 и Б1), показало је способност продукције сидерофора (Слика 30).



Слика 30. Продукција сидерофора (појава жутих и наранџастих зона на прелазу у плаву подлогу, доказ способности изолата да продукује сидерофоре) (Фото Годић)

Синтеза сидерофора представља један од најзначајнијих бактеријских механизма који истовремено делује и директно (као нутритивна подршка биљци) и индиректно (као агенс за биолошку контролу патогена). Анализа способности продукције сидерофора код 11 изолата открива јасну прилагођеност и таксономску специфичност међу испитиваним изолатима. Уочена варијабилност и висок интензитет лучења сидерофора код изолата П1 (*Pseudomonas*) и већине изолата из рода *Azotobacter* (првенствено А1, А3 и А4) у потпуности су усклађени са резултатима које наводе Aeron et al. (2011). Ови аутори наглашавају да су флуоресцирајући Псеудомонаси и слободноживећи азотофиксатори природно прилагођени продукцији сидерофора, који имају изразито висок афинитет према везивању тровалентног гвожђа (Fe^{3+}). Добијене испитиване вредности у табели 5 су у складу са студијом коју су спровели Deshwal et al. (2013), који су испитивањем већег броја земљишних изолата забележили веома сличну процентуалну заступљеност продукције сидерофора међу сродним ризосферним микроорганизмима.

Способност минерализације органског фосфора (54,5% позитивних изолата) (Слика 31) је била нешто заступљенија у односу на солубилизацију неорганског фосфора (36,4% позитивних изолата) (Слика 32).



Слика 31 . Минерализација фосфата (појава провидних зона око колонија изолата Б2 и Б4 (слика лево), П1 (слика у средини) и А1, А3 и А4 (слика десно), доказ способности минерализације органског фосфата) (Фото Годић)



Слика 32. Солубилизација фосфата (појава провидних зона око колонија изолата П1 (слика лево), Б2, Б3 (слика у средини) и С1 (слика десно), доказ способности солубилизације тешко растворљивог фосфата) (Фото Годић)

Сви сојеви углавном поседују један од ова два механизма, а изузетак су П1 (*Pseudomonas*) и Б2 (*Bacillus*). Апсолутна функционална супериорност уочена је код сојева П1 (*Pseudomonas*) и Б2 (*Bacillus*) који су способни за оба процеса истовремено (и минерализацију и солубилизацију). Овај феномен истичу Gomez-Ramirez et al. (2021), наводећи да су овакви сојеви изузетно ретки у природи. Они омогућавају биљци потпуно снабдевање фосфором из комплетног земљишног резервоара, без обзира на то да ли се он тамо налази у органској материји или у нерастворљивим неорганским једињењима.

Упоређујући међусобно изолате, посебно се издваја изолат П1, а потом и изолати Б2, и изолати рода *Azotobacter* (А1, А3 и А4). Изолат П1 се издваја као изолат са 100% позитивних RGP особина. За изолат Б2 утврђено је да једино не продукује сидерофоре, док изолати азотобактера нису показали способност солубилизације фосфата. Изолат са најмањим бројем позитивних испитиваних RGP особина био је изолат Б5, који је показао само способност продукције HCN.

5.2. Утицај примене одабраних изолата на клијавост и иницијални раст першуна

На основу физиолошких, биохемијских и RGP особина, за потребе даљих истраживања одабрана су 4 изолата: П1, Б2, С1 и А3. Ови изолати показали су да поседују способност прилагођавања променама средине, способност продукције највећег броја ензима и да

поседују највећи број PGP особина. Ово су уједно и представници сва четири испитивана рода.

Према Malik et al. (2011), употреба PGP микроорганизама у производњи лековитог и зачинског биља постала је кључна, јер је употреба различитих хемијских препарата (вештачких ђубрива, хербицида, фунгицида) у производњи ових биљака постала непожељна. У табели 6 приказани су резултати испитивања утицаја одабраних изолата на параметре клијавости семена и иницијалног раста першуна.

Табела 6. Утицај примене одабраних изолата на клијавост и иницијални раст першуна

Изолати	Број исклијалих семена		Дужина коренка (mm)			Дужина стабаоцета (mm)		
	7. дан	10. дан	12. дан	17.дан	21. дан	12. дан	17. дан	21. дан
П1	16,0 ^c	19,3 ^b	16,0 ^b	17,0 ^a	34,3 ^{ab}	8,0 ^{ab}	34,3 ^b	39,3 ^b
Б2	15,7 ^{bc}	19,7 ^b	5,7 ^a	13,3 ^a	29,3 ^a	13,7 ^{bc}	28,0 ^{ab}	41,0 ^b
С1	19,0 ^c	19,3 ^b	17,3 ^b	35,0 ^b	43,3 ^b	11,3 ^{bc}	18,7 ^a	35,0 ^b
А3	10,3 ^{ab}	18,0 ^b	7,0 ^a	28,3 ^b	31,0 ^a	17,0 ^c	28,0 ^{ab}	42,0 ^b
контрола	7,0 ^a	9,0 ^a	6,3 ^a	16,0 ^a	23,7 ^a	3,3 ^a	17,3 ^a	14,0 ^a

Вредности са различитим словним ознакама се према Фишеровом тесту статистички значајно разликује за $p < 0,05$

Најмањи степен клијавости утврђен је у контролној варијанти, и то током оба мерења (7. и 10. дана). Сви испитивани изолати (П1, Б2, С1, А3) имали су позитивно дејство на клијавост семена, и код већине изолата довели су до статистички значајног повећања клијавости семена у односу на контролу. Седмог дана, најбољи ефекат на клијавост семена имала је примена изолата С1 (*Streptomyces*) и П1 (*Pseudomonas*) са 19 и 16 исклијалих семена (редом). Десетог дана, у свим варијантама утврђен је скоро максималан број исклијалих семена, док је у контроли забележено само девет исклијалих семена.

На самом почетку (12. дана), изолат С1 доводи до највећег издуживања коренка (17,3 mm), док изолати Б2 (5,7 mm) и А3 (7,0 mm) у овом моменту не показују значајан помак у односу на контролу (6,3 mm). Међутим, током другог мерења (17. дана), варијанта у којој

је применењен изолат А3 доживљава експлозивн раст и коренак достиже дужину 28,3 mm. Најдужи коренак измерен је у варијанти где је био примењен изолат С1. У варијантама где су били примењени изолати С1 и А3, дошло је до статистички значајног повећања дужине коренка, док у варијанти где је био примењен изолат Б2, дужина коренка је била мања у односу на измерену дужину у контролној варијанти, али ово смањење није било статистички значајно. Током трећег мерења (21. дана огледа), утврђено је да изолат С1 и даље има најјаче позитивно дејство на дужину коренка, где је измерена дужина коренка од 43,3 mm, што је скоро дупло дуже у односу на контролу (23,7 mm). Овог пута, у свим варијантама је утврђено повећање дужине коренка у односу на контролу, али је само у варијанти са примењеним изолатом С1 то повећање било статистички значајно.

Што се тиче дужине стабаоцета клице, током првог и последњег мерења, изолат А3 (*Azotobacter*) довео је до највећег издуживања стабаоцета. У последњем мерењу (21. дан), стабаоце код биљака третираним са изолатом А3 достигле су у просеку дужину од 42,0 mm, што је три пута већа вредност у односу на нетретирану контролу (14,0 mm). Изолати Б2 (41,0 mm) и П1 (39,3 mm) су такође показали статистички значајан позитиван ефекат на дужину надземног дела биљаке.

Изолат С1 је био најуспешнији у стимулацији подземног система биљаке (коренак дужине 43,3 mm), док је изолат А3 највише утицао на издуживање стабаоцета першуна (42,0 mm). Пошто бактерије рода *Azotobacter* представљају слободне азотофиксаторе, може се предпоставити да је појачано снабдевање азотом директно стимулисало интензивнији вегетативни раст надземне масе. Што се тиче изолата П1, он показује подједнако добар ефекат на оба биљна система. Изолат П1 је одржавао конзистентан и висок раст дуж целе биљке (коренак 34,2 mm, стабаоце 39,3 mm).

Позитиван ефекат примене PGP бактерија рода *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter* утврђен је и код других лековитих и зачинских биљака. У раду Stamenov et al. (2024a), утврђен је позитиван ефекат примене изолата рода *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter* изолованих из ризосфере коприве, на клијавост и почетни раст оригана (*Origanum vulgare* L.) и мајорана (*Origanum majorana* L.). Khaosaad et al. (2006) су добили сличне резултате инокулацијом семена оригана са PGP бактеријама, што је резултирало позитивним ефектом на клијавост, дужину изданка и биомасу биљке. У истраживањима Stamenov et al. (2024b), испитиван је ефекат примене изолата рода *Pseudomonas*, *Bacillus*, и

Azotobacter на клијавост и почетни раст, али и на принос биљке босиљка (*Ocimum basilicum* L.) у условима суше и превлаживања. Резултати су показали да је примена ових изолата довела до повећања клијавости семена биљке, а осим тога, биљке су лакше превазишле услове суше и поплаве у односу на контролу.

6. ЗАКЉУЧАК

На основу изведених истраживања и добијених резултата приликом израде мастер рада, могу се извести следећи закључци:

1. Детаљна микроскопска и макроскопска анализа 11 изолати пружила је класичан таксономски увид и потврдила типичне морфолошке особине испитиваних родова бактерија. Изолат означен као П1 припада роду *Pseudomonas*, изолати Б1-Б5 припадају роду *Bacillus*, изолати А1-А4 припадају роду *Azotobacter*, а изолат С1 роду *Streptomyces*.
2. Резултати испитивања физиолошких особина изолати јасно указују да изолати поседују особине и механизме неопходне за деловање у неповољним условима средине (стрес суше, салинитета и контаминације тешким металима). Изолат П1 се због стимулације растом у присуству кадмијума и високе халотолеранције потврђује као потенцијално идеалан кандидат за биоремедијацију загађених земљишта. Са друге стране, изолат Б2 (*Bacillus*) представља потенцијално погодног кандидата за примену у заслањеним земљиштима.
3. Висока заступљеност способности продукције ензима липаза, амилаза, целулаза и уреазе, указује на то да ови изолати имају способност разградње органске материје у земљишту. Присуство уреазе код изолати рода *Pseudomonas* и *Azotobacter* сугерише на њихову активну улогу у кружењу азота (трансформације урее), што директно доприноси плодности земљишта и исхрани биљака.
4. Сви изолати показују јасне карактеристике бактерија које стимулишу раст биљака. Као најбољи кандидати за израду биођубрива издвајају се изолати П1 (*Pseudomonas*), Б2 (*Bacillus*), те из рода *Azotobacter* изолати А1, А3, А4.
5. Тестирани изолати се оправдано могу класификовати као високопродуктивни сојеви са директним PGP деловањем. Изолати С1 (*Streptomyces*) и П1 (*Pseudomonas*) делују као најјачи иницијатори у почетној фази клијања семена и раста клице. Док се изолат А3 (*Azotobacter*) препоручује за поспешивање развоја надземне масе,

изолат C1 (*Streptomyces*) представља идеалан избор за развој корена. Међутим, због избалансираног утицаја на брзину клијања, развој корена и издуживање стабаоцета, изолати П1 (*Pseudomonas*) се издваја као кандидат за формулисање биођубрива који би могли наћи примену у производњи першуна и другог зачинског биља.

7. ЛІТЕРАТУРА

- Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., Meftah Kadmiri, I. (2021). Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Frontiers in microbiology*, 12, 628379.
- Abdellatif, A.A., Gebily, D.A., Elmaghraby, M.M., Sahu, P.K., Thakur, B. and Kaur, S. (2024). Transforming Roles of *Actinobacteria* in Sustainable Agriculture: From Soil Health and Plant Productivity Perspective. *Metabolomics, Proteomics and Gene Editing Approaches in Biofertilizer Industry*, 2, 299-338.
- Aeron, A., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K., Pandey, P., Bajpai, V.K. and Kang, S.C. (2011). Multifarious activity of bioformulated *Pseudomonas fluorescens* PSI and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* in Indian rapeseed (*Brassica campestris* L.). *European journal of plant pathology*, 131(1), pp.81-93.
- Akinrinlola, R.J., Yuen, G.Y., Drijber, R.A. and Adesemoye, A.O., (2018). Evaluation of *Bacillus* strains for plant growth promotion and predictability of efficacy by in vitro physiological traits. *International journal of microbiology*, 2018(1), 5686874.
- Amaresan, N., Jayakumar, V., Kumar, K. and Thajuddin, N. (2012). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annum*) seedling growth. *Annals of microbiology*, 62(2), pp.805-810.
- Ansabayeva, A., Makhambetov, M., Rebouh, N.Y., Abdelkader, M., Saady, H.S., Hassan, K.M., Nasser, M.A., Ali, M.A. and Ebrahim, M. (2025). Plant growth-promoting microbes for resilient farming systems: mitigating environmental stressors and boosting crops productivity—a review. *Horticulturae*, 11(3), p.260.
- Anwar, S., Ali, B. and Sajid, I., (2016). Screening of rhizospheric *actinomycetes* for various in-vitro and in-vivo plant growth promoting (PGP) traits and for agroactive compounds. *Frontiers in microbiology*, 7, p.1334.
- Aquilanti, V., Lombardi, A., Littlejohn, R. (2004). Hyperspherical harmonics for polyatomic systems: basis set for collective motions. *Theoretical Chemistry Accounts*, 111, 400-406.

- Bafana A. and Lohiya R. (2013). Diversity and metabolic potential of culturable root-associated bacteria from *Origanum vulgare* in sub-Himalayan region, *World Journal of Microbiota*, 29:63–74.
- Bechtaoui, N., Raklami, A., Benidire, L., Tahiri, A.I., Göttfert, M. and Oufdou, K. (2020). Effects of PGPR co-inoculation on growth, phosphorus nutrition and phosphatase/phytase activities of faba bean under different phosphorus availability conditions. *Polish Journal of Environmental Studies*, 29(2), pp.1557-1565.
- Bunk, B., Biedendieck, R., Jahn, D. and Vary, P.S. (2009). *Bacillus megaterium* and other bacilli: industrial applications. *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology*, pp.1-15.
- Chennappa, G., Naik, M.K., Adkar-Purushothama, C.R., Amaresh, Y.S. and Sreenivasa, M.Y., (2016). PGP potential, abiotic stress tolerance and antifungal activity of *Azotobacter* strains isolated from paddy soils. *Indian journal of experimental biology*, 54(5), pp.322-331.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Barka, E.A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), pp.4951-4959.
- Deshwal, V.K. and Kumar, P. (2013). Production of plant growth promoting substance by *Pseudomonads*. *J Acad Ind Res*, 2(4), pp.221-225.
- Devi, S., Sharma, S., Tiwari, A., Bhatt, A.K., Singh, N.K., Singh, M., Kaushalendra and Kumar, A. (2023). Screening for multifarious plant growth promoting and biocontrol attributes in *Bacillus* strains isolated from indo gangetic soil for enhancing growth of rice crops. *Microorganisms*, 11(4), p.1085.
- Dias, M.P., Bastos, M.S., Xavier, V.B., Cassel, E., Astarita, L.V. and Santarém, E.R. (2017). Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, pp.479-493.
- Dogan, G. and Taskin, B. (2021). Hydrolytic enzymes producing bacterial endophytes of some poaceae plants. *Polish journal of microbiology*, 70(3), pp.297-304.
- Etesami, H., Jeong, B.R. and Glick, B.R. (2023). Biocontrol of plant diseases by *Bacillus* spp. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 126, 102048.

- Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clausse, M.L., Courier, S., Le Roux, C., Raaijmakers, J., Martinotti, M.G., Pierrat, J.C., Garbaye, J. (2005): Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist*, 165:317–328
- Ghelardi, E., Abreu y Abreu, A.T., Marzet, C.B., Álvarez Calatayud, G., Perez III, M. and Moschione Castro, A.P. (2022). Current progress and future perspectives on the use of *Bacillus clausii*. *Microorganisms*, 10(6), 1246.
- Gireesha, D., Patil, P.V., Gowda, G.R., Vijaykumar, K.N. and Doggalli, G. (2024). Morphological and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* isolated from rhizosphere of sugarbeet. *Biochemical & Cellular Archives*, 24(1), p.1077.
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, pp. 1–15.
- Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), pp.30-39.
- Gohel, S.D. and Singh, S.P. (2017). Morphological, Cultural and Molecular diversity of The Salt-Tolerant Alkaliphilic *Actinomycetes* from Saline Habitats. *Microbial Biotechnology Technological Challenges and Developmental Trends*, 1, pp.337-354.
- Gomez-Ramirez, L.F. and Uribe-Velez, D. (2021). Phosphorus solubilizing and mineralizing *Bacillus* spp. contribute to rice growth promotion using soil amended with rice straw. *Current Microbiology*, 78(3), pp.932-943.
- Gopalakrishnan, S., Pande, S., Sharma, M., Humayun, P., Kiran, B.K., Sandeep, D., Vidya, M.S., Deepthi, K. and Rupela, O., (2011). Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. *Crop Protection*, 30(8), 1070-1078.
- Goswami, D., Thakker, J.N. and Dhandhukia, P.C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), p.1127500.
- Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K. and Singh, V., (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J Microb Biochem Technol*, 7(2), pp.096-102.
- Hartmann, A., Rothballer, M. and Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and soil*, 312(1), pp.7-14.

- Hasan, A., Tabassum, B., Hashim, M. and Khan, N. (2024). Role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as a plant growth enhancer for sustainable agriculture: A review. *Bacteria*, 3(2), pp.59-75.
- Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M. and Pedrosa, F.O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and soil*, 331(1), pp.413-425.
- Jha, C.K. and Saraf, M. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *J. Agric. Res. Dev*, 5(2), pp.108-119.
- Jnawali, A.D., Ojha, R.B. and Marahatta, S. (2015). Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability—a review. *Adv. Plants Agric. Res*, 2(6), pp.1-5.
- Kasa, P., Modugapalem, H. and Battini, K., (2015). Isolation, screening, and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolates of *Azotobacter* and *Trichoderma* and their beneficial activities. *Journal of natural science, biology, and medicine*, 6(2), p.360.
- Kashyap, B.K., Solanki, M.K., Pandey, A.K., Prabha, S., Kumar, P. and Kumari, B. (2019). *Bacillus* as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a promising green agriculture technology. In *Plant health under biotic stress: volume 2: Microbial Interactions* (pp. 219-236). Singapore: Springer Singapore.
- Kawicha, P., Nitayaros, J., Saman, P., Thaporn, S., Thanyasiriwat, T., Somtrakoon, K., Sangdee, K. and Sangdee, A. (2023). Evaluation of soil *Streptomyces* spp. for the biological control of *Fusarium* wilt disease and growth promotion in tomato and banana. *The plant pathology journal*, 39(1), 108.
- Khaosaad, T., Vierheiling, H., Nell, M., Zitterl-Eglseer, K., Novak, J. (2006). Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in Oregano (*Origanum* sp., *Lamiaceae*). *Mycorrhiza*, 16, 443-446.
- Khoso, M.A., Wagan, S., Alam, I., Hussain, A., Ali, Q., Saha, S., Poudel, T.R., Manghwar, H. and Liu, F. (2024). Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant nutrition and root characteristics: Current perspective. *Plant Stress*, 11, p.100341.
- Kollmen, J. and Strieth, D. (2022). The beneficial effects of cyanobacterial co-culture on plant growth. *Life*, 12(2), p.223.

- Krell, T. and Matilla, M.A. (2024). *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends in microbiology*, 32(2), 216-218.
- Kuan, K.B., Othman, R., Abdul Rahim, K. and Shamsuddin, Z.H. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PloS one*, 11(3), p.e0152478.
- Kuffner, M., Puschenreiter, M., Wieshammer, G., Gorfer, M., Sessitsch, A. (2008): Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil*, 304: 35-44
- Kumar, A., Kumar, A., Devi, S., Patil, S., Payal, C. and Negi, S. (2012). Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent research in science and technology*, 4(1), pp.1-5.
- Lanyi, B. (1987). Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods Microbiol*, 19:1–67.
- Lugtenberg, B.J., Chin-A-Woeng, T.F. and Bloemberg, G.V. (2002). Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1), pp.373-383.
- Malik, A. A., Suryapani, S., Ahmad, J. (2011). Chemical vs organic cultivation of medicinal and aromatic plants: the choice is clear, *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 1, 5-13.
- Matsushita, M., Hiramatsu, F., Kobayashi, N., Ozawa, T., Yamazaki, Y. and Matsuyama, T. (2004). Colony formation in bacteria: experiments and modeling. *Biofilms*, 1(4), pp.305-317.
- Mehnaz, S., Weselowski, B., Aftab, F., Zahid, S., Lazarovits, G., Iqbal, J. (2009): Isolation, characterization, and effect of fluorescent pseudomonads on micropropagated sugarcane. *Canadian Journal of Microbiology*, 55: 1007–1011.
- Mekonnen, E., Kebede, A., Nigussie, A., Kebede, G. and Tafesse, M. (2021). Isolation and characterization of urease-producing soil bacteria. *International journal of microbiology*, 2021(1), p.8888641.
- Miller, R.W. and Eady, R.R. (1988). Molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*. Low temperature favours N₂ reduction by vanadium nitrogenase. *Biochemical Journal*, 256(2), pp.429-432.

- Millet, Y.A., Danna, C.H., Clay, N.K., Songnuan, W., Simon, M.D., Werck-Reichhart, D. and Ausubel, F.M. (2010). Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by microbe-associated molecular patterns. *The Plant Cell*, 22(3), pp.973-990.
- Moncheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V., Nikolova, S.A., Bogatzevska, N. (2002): Characteristics of soil actinobacteria from Antarctica. *J. Culture Collections*. 3:3-14.
- Mustapha, Z., Zakaria, A.J., Othman, R., Mohd, K.S. and Dalilazawawi, D. (2022). Effects of growth medium, pH, temperature and salinity on BRIS soil plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) growth.
- Myeong-Hoon, J., Sung-Ho, H., Yong-Soo, H., Ji-Yeon, K. (2007): Isolation, Identification, and Characterization of *Bacillus* strains from the Traditional Korean Soybean-fermented Food, Chungkookjang. *J. Appl. Biol. Chem.*, 50(4):202-210.
- Nathan, P., Rathinam, X., Kasi, M., Rahman, Z. A., Subrama-niam, S. (2011): A pilot study on the isolation and biochemical characterization of *Pseudomonas* from chemical intensive rice ecosystem. *African Journal of Biotechnology*, 10(59): 12653-12656.
- Ouhaddou, R., Anli, M., Ben-Laouane, R., Boutasknit, A., Baslam, M. and Meddich, A. (2025). The importance of the glomus genus as a potential candidate for sustainable agriculture under arid environments: a review. *International Journal of Plant Biology*, 16(1), p.32.
- Parveen, M. and Ghosh, S. (2025). Ecological dynamics and microbial consortia: Enhancing soil health and sustainable agriculture. *Egyptian Journal of Botany*, 65(3), pp.627-643.
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P. and Van Der Putten, W.H., (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature reviews microbiology*, 11(11), pp.789-799.
- Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S. and Crecchio, C. (2015). Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biology and fertility of soils*, 51(4), pp.403-415.
- Procópio, R.E.D.L., Silva, I.R.D., Martins, M.K., Azevedo, J.L.D. and Araújo, J.M.D. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), pp.466-471.

- Raaijmakers, J.M. and Mazzola, M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*, 50(1), pp.403-424.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M. and De Souza, J.T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van leeuwenhoek*, 81(1), pp.537-547.
- Rasulov, B. A., Yili, A. & Aisa, H. A. (2013) Biosorption of metal ions by exopolysaccharide produced by *Azotobacter chroococcum* XU1. *J. Environ. Protection*, 4(9), 989-993.
- Reddy, E.C., Reddy, G.S., Goudar, V., Sriramula, A., Swarnalatha, G.V., Al Tawaha, A.R.M. and Sayyed, R.Z. (2022). Hydrolytic enzyme producing plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in plant growth promotion and biocontrol. In *Secondary metabolites and volatiles of PGPR in plant-growth promotion* (pp. 303-312). Cham: Springer International Publishing.
- Rodina, A.G. (1972): Methods in Aquatic microbiology. Ed. Colwell, R. and Zambruski, M. University Park Press, Baltimore and butterworth and Co Ltd. London.
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B.K., Bhattacharjee, S. and Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), pp.3984-3999.
- Salata, A., Borisova, G. and Maleva, M. (2026). Microbial allies in stress resilience: the role of plant growth-promoting bacteria in crop rhizosphere, endosphere, and phyllosphere. *Journal of Agricultural Sciences*, 32(2), pp.202-221.
- Santoro, M., Cappellari, L., Giordano, W. and Banchio, E., (2015). Production of volatile organic compounds in PGPR. In *Handbook for Azospirillum: technical issues and protocols* (pp. 307-317). Cham: Springer International Publishing.
- Shaheen, S., Mishra, N. and Sundari, S.K. (2022). Assessment of *Pseudomonas* spp. for growth promotion, biocontrol and stress tolerance applicability towards organic and inorganic pollutants. *Ecology, Environment and Conservation*, 28, 316-29.
- Sharma, R., Singh, J. and Verma, N. (2018). Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, pp.132-139.

- Singh, R.P. and Jha, P.N. (2016). The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 augments induced systemic resistance and enhanced salinity tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS one*, 11(6), p.e0155026.
- Soares, E.V. (2022). Perspective on the biotechnological production of bacterial siderophores and their use. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(11), pp.3985-4004.
- Soares, M.M., da Silva, R., Carmona, E.C, Gomes, E. (2001): Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *J Microbiol Biotechnol*, 17: 79-82.
- Spaepen, S. and Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(4), p.a001438.
- Sritongon, N., Boonlue, S., Mongkolthanaruk, W., Jogloy, S. and Riddech, N. (2023). The combination of multiple plant growth promotion and hydrolytic enzyme producing rhizobacteria and their effect on Jerusalem artichoke growth improvement. *Scientific Reports*, 13(1), p.5917.
- Stamenov, D., Đurić, S., Hajnal Jafari, T., Hasanagić, D. (2024a): Plant growth promoting potential of *Bacillus*, *Azotobacter* and *Streptomyces* bacteria from nettle rhizospheric soil, *Acta Agriculturae Serbica*, 29(57), 35-41.
- Stamenov, D., Hajnal Jafari, T., Đurić, S., Kiproviski, B., Aćimović, M. (2024b): Mitigating effect of PGPR on abiotic stress in basil (*Ocimum basilicum* L.), *Chilean Journal of Agricultural research*, 84(5), 588-596.
- Tejera, N.L.C.M.M.G.J., Lluch, C., Martinez-Toledo, M.V. and González-López, J. (2005). Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and soil*, 270(1), pp.223-232.
- Vazquez-Hernandez, L., De la Vega-Camarillo, E., Hernández-García, J.A., Villa-Tanaca, L. and Hernández-Rodríguez, C. (2025). Functional genomics and phenotypic characterization of PGP and biocontrol traits of rhizospheric *Streptomyces* spp. from Mexican milpa agroecosystem. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-6587204/v1>
- Verma, P.P., Shelake, R.M., Das, S., Sharma, P. and Kim, J.Y. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF): potential biological control agents of diseases and pests. In *Microbial Interventions in Agriculture and Environment: Volume 1: Research Trends, Priorities and Prospects* (pp. 281-311). Singapore: Springer Singapore.

- Veselova, M.A., Plyuta, V.A. and Khmel, I.A. (2019). Volatile compounds of bacterial origin: structure, biosynthesis, and biological activity. *Microbiology*, 88(3), pp.261-274.
- Vessey, J. K. (2003). Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571–586.
- Yadav, A.N. (2020). Plant microbiomes for sustainable agriculture: current research and future challenges. *Plant microbiomes for sustainable agriculture*, pp.475-482.
- Yadav, A.N., Verma, P., Singh, B., Chauhan, V.S., Suman, A. and Saxena, A.K. (2017). Plant growth promoting bacteria: biodiversity and multifunctional attributes for sustainable agriculture. *Adv Biotechnol Microbiol*, 5(5), pp.1-16.
- Yu, Y., Gui, Y., Li, Z., Jiang, C., Guo, J. and Niu, D. (2022). Induced systemic resistance for improving plant immunity by beneficial microbes. *Plants*, 11(3), p.386.
- Zhang, H.Y., Xue, Q.H., Shen, G.H., Wang, D.S. (2013). Effects of actinomycetes agent on ginseng growth and rhizosphere soil microflora, *Journal of Applied Ecology*, 24, 2287–2293.
- Вуковић, С. и Шуњка, Д. (2021). Биопестициди. Нови Сад: Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет.
- Говедарица, М., Јарак, М. (1999). Микробиологија земљишта, Пољопривредни факултет, Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад.
- Јарак, М., Ђурић, С. (2006). Практикум из микробиологије. Универзитету Новом Саду, Пољопривредни факултет.
- Стаменов, Д. (2014). Карактеризација микроорганизама промотора раста и њихово преживљавање у ризосфери енглеског љуља, Докторска дисертација, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет.
- Стаменов, Д., Хајнал Јафари, Т., Ђурић, С. (2023). Микробиологија практикум, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет.
- Хајнал Јафари, Т., Стаменов, Д., Ђурић, С. (2020). Производња и примена биопрепарата, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет.

https://www.accademiadiagricoltura.it/wp-content/uploads/2023/05/agronomy-12-00899.pdf?utm_source=chatgpt.com

