



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Депарتمان за ратарство и повртарство



Синиша Петровић

дипл. инж. пољопривреде

**БИОСТИМУЛАТОРНИ ПОТЕНЦИЈАЛ БАКТЕРИЈА ИЗ
РИЗОСФЕРЕ КОПРИВЕ (*Urtica dioica* L.)**

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2022.



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

Департман за ратарство и повртарство



Кандидат
Дипл. инж. Синиша Петровић

Ментор
Доц. др Драгана Стаменов

**БИОСТИМУЛАТОРНИ ПОТЕНЦИЈАЛ БАКТЕРИЈА ИЗ
РИЗОСФЕРЕ КОПРИВЕ (*Urtica dioica* L.)**

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2022.

КОМИСИЈА ЗА ОДБРАНУ И ОЦЕНУ МАСТЕР РАДА:

Др Драгана Стаменов, доцент

Ужа научна област: Микробиологија

Пољопривредни факултет, Нови Сад

-Ментор-

Др Тимеа Хајнал Јафари, ванредни професор

Ужа научна област: Микробиологија

Пољопривредни факултет, Нови Сад

-Председник-

Др Ружица Ждеро Павловић, доцент

Ужа научна обласат: Хемија и биохемија

Пољопривредни Факултет, Нови Сад

-Члан-

САДРЖАЈ:

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	2
2.1. РИЗОСФЕРА.....	2
2.2. РИЗОСФЕРА ЛЕКОВИТОГ БИЉА.....	4
2.3. МИКРООРГАНИЗМИ СТИМУЛАТОРИ БИЉНОГ РАСТА.....	5
2.3.1. Род <i>Bacillus</i>	6
2.3.2. Род <i>Streptomyces</i>	8
2.3.3. Род <i>Azotobacter</i>	9
2.4. МЕХАНИЗМИ ДЕЛОВАЊА RGR МИКРООРГАНИЗАМА.....	11
2.4.1. Продукција ензима.....	12
2.4.2. Продукција биљних хормона.....	13
2.4.3. Продукција сидерофора.....	14
2.4.4. Продукција цијанида.....	15
2.4.5. Улога микроорганизама у циклусу фосфора.....	15
2.5. УТИЦАЈ RGR МИКРООРГАНИЗАМА НА РАСТ БИЉАКА.....	16
2.5.1. Примена RGR микроорганизама у производњи лековитог биља.....	17
3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА.....	18
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	19
4.1. ИЗОЛАЦИЈА МИКРООРГАНИЗАМА.....	19
4.2. МОРФОЛОШКЕ ОСОБИНЕ ИЗОЛАТА.....	19
4.3. ФИЗИОЛОШКЕ ОСОБИНЕ ИЗОЛАТА.....	20
4.4. БИОХЕМИЈСКЕ ОСОБИНЕ ИЗОЛАТА.....	21
4.5. СПОСОБНОСТ ПРОДУКЦИЈЕ МАТЕРИЈА РАСТА.....	22
4.6. ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ИНОКУЛАЦИЈЕ НА ПАРАМЕТРЕ ПРИНОСА БИЉАКА.....	23
4.6.1. Испитивање утицаја изолата на клијање семена и дужину клице.....	23
4.6.2. Испитивање утицаја изолата на параметре приноса биљке.....	24
4.6.3. Биохемијски параметри приноса.....	24
4.6.3.1. Одређивање садржаја укупних фенола.....	25
4.6.3.2. Одређивање садржаја флавоноида.....	26

4.6.3.3. Одређивање антиоксидантне активности DPPH тестом.....	27
САДРЖАЈ:	
5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА СА ДИСКУСИЈОМ	30
5.1. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА МИКРООРГАНИЗАМА ИЗ РИЗОСФЕРЕ КОПРИВЕ ..	30
5.1.1. Морфолошке карактеристике изолата рода <i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> и <i>Azotobacter</i>	30
5.1.2. Физиолошке карактеристике изолата рода <i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> и <i>Azotobacter</i>	32
5.1.3. Биохемијска карактеризација изолата рода <i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> и <i>Azotobacter</i>	35
5.2. УТИЦАЈ ПРИМЕНЕ ИЗОЛАТА НА КЛИЈАЊЕ, ИНИЦИЈАЛНИ РАСТ КЛИЦЕ И ПРИНОС ЛЕКОВИТОГ БИЉА.....	38
5.2.1. Утицај инокулација семена на клијавост и иницијални раст клице	38
5.2.2. Утицај инокулације на масу свеже и суве материје, дужину надземног дела и корена биљке.....	47
5.3. БИОХЕМИЈСКИ ПАРАМЕТРИ	50
5.3.1. Садржај укупних фенола	50
5.3.2. Садржај флавоноида.....	52
5.3.3. Антиоксидантна активност.....	53
6. ЗАКЉУЧАК	55
7. ЛИТЕРАТУРА	58

БИОСТИМУЛАТОРНИ ПОТЕНЦИЈАЛ БАКТЕРИЈА ИЗ РИЗОСФЕРЕ

КОПРИВЕ (*Urtica dioica* L.)

Синиша Петровић

РЕЗИМЕ

Употреба микроорганизама има посебну оправданост и значај приликом узгајања лековитог и зачинског биља, где је добијање здраве и квалитетне биљне масе императив. Из тог разлога, неопходно је изоловати и детерминисати што већи број микроорганизама из ризосфере различитог биља и утврдити њихову ефикасност на побољшање раста биљке. Циљ овог истраживања био је изолација и карактеризација микроорганизама из рода *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter* из ризосфере коприве (*Urtica dioica* L.) и испитивање ефекта њихове примене на клијавост, иницијални раст и параметре приноса различитих врста лековитог биља. Примена микроорганизама изолованих из ризосфере коприве, довела је до повећања клијавости семена и имала је позитиван ефекат на испитиване параметре приноса код одабраних биљака. Изолати Bac3, Azb и Act показали су се као најефективнији. Ови изолати могу послужити као основа за даља истраживања и израду техничког решења за производњу микробиолошког препарата којим би се унапредила производња и подигао квалитет приноса различитих врста лековитог биља, а пре свега босиљка и жалфије.

Кључне речи: *Bacillus*, *Azotobacter*, *Streptomyces*, лековито биље, инокулација

BIOSTIMULATORY POTENTIAL OF BACTERIA FROM NETTLE (*Urtica dioica* L.)

RHIZOSPHERIC SOIL

Siniša Petrović

SUMMARY

The use of microorganisms has a special justification and importance in the cultivation of medicinal herbs and spices, where obtaining a healthy and quality plant mass is imperative. For that reason, it is necessary to isolate and determine as many microorganisms from the rhizosphere of different plants and determine their effectiveness in improving plant growth. The aim of this study was to isolate and characterize microorganisms from the genera *Bacillus*, *Streptomyces* and *Azotobacter* from nettle rhizosphere (*Urtica dioica* L.) and to examine the effect of their application on germination, initial growth and yield parameters of different species of medicinal plants. The application of microorganisms isolated from nettle rhizosphere led to an increase in seed germination and had a positive effect on the examined yield parameters in selected plants. Isolates Bac3, Azb and Act proved to be the most effective. These isolates can serve as a basis for further research and formulation of a technical solution for the production of microbiological preparation that would improve production and increase the yield quality of various types of medicinal herbs, especially basil and sage.

Key words: *Bacillus*, *Azotobacter*, *Streptomyces*, medicinal herbs, inoculation

1. УВОД

Производња здравствено безбедне хране на одржив начин, један је од највећих изазова са којим је суочена савремена пољопривреда. Потребно је смањити примену пестицида и агротехничких мера које негативно утичу на природну средину, обезбедити одржавање еколошке равнотеже, прилагодити се последицама климатских промена и обезбедити производњу оптималне количине хране. Управо из ових разлога, све се више места даје пољопривреди која се заснива на принципима одрживог развоја, која предвиђа значајне промене у технологији гајења усева, пре свега, смањење или потпуно одсуство употребе хемијских ђубрива и пестицида. У овај систем производње у потпуности се уклапа употреба микробиолошких препарата, односно уношење живих микроорганизама у земљиште који су потпуно еколошки одрживи, без штетних утицаја на животну средину и њене чланове. Из тог разлога, неопходно је изоловати и детерминисати што већи број микроорганизама из ризосфере различитог биља и утврдити ефикасност њихове примене на побољшање раста биљке. Микроорганизми код којих се утврди висок биостимулаторни потенцијал, послужиће као основа за осмишљавање нових микробиолошких препарата. Примена ових препарата допринеће унапређењу производње различитих биљних врста, побољшању квалитета и повећању количине приноса.

Примена микроорганизама као додаток, делимична или потпуна замена хемијским препаратима, има посебну оправданост и значај приликом узгајања лековитог и зачинског биља, где је добијање здраве и квалитетне биљне масе главни циљ којем треба тежити.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. РИЗОСФЕРА

За ризосферу се каже да је то највећи екосистем на Земљи, са огромним протоком енергије где један грам земљишта може бити станиште за више од 10 билиона микроба, са више хиљада различитих микроорганизама што далеко премашује диверзитет организама у односу на друге екосистеме (Bhardwaj et al., 2014; Huang et al., 2014). Састав популације микроорганизама у земљишту резултат је интеракције између типа земљишта, биљне врсте и локализације микроорганизама у ризосфери (Хајнал Јафари и сар., 2020).

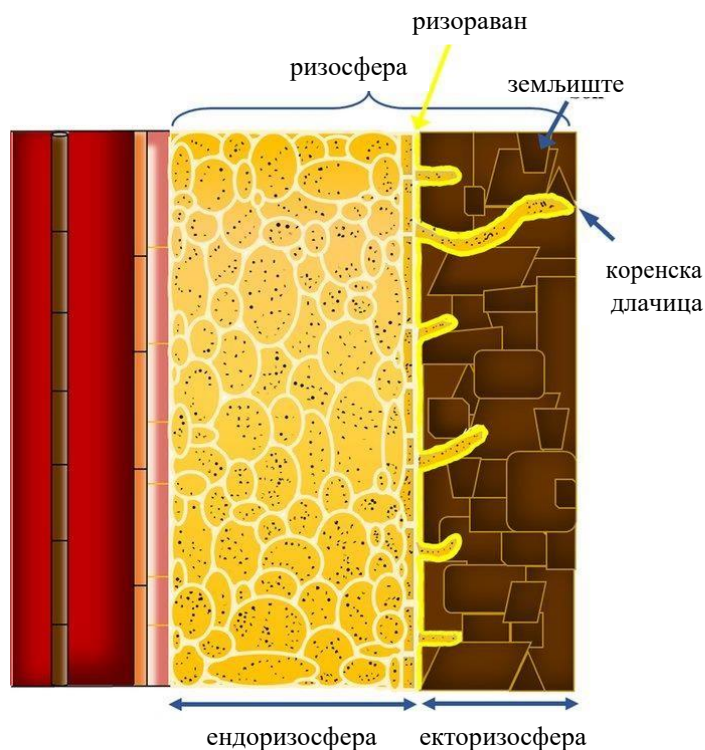
Појам *ризосфера* увео је немачки агроном Нилтнер (1904), да опише зону земљишта која се налази око површине корена биљке и обухвата појас широк свега око 5мм, а у којој су активност, бројност и метаболизам микроорганизама одређени и усмерени коренским излучевинама. По дефиницији, ризосфера представља веома динамичан систем у коме земљишни микроорганизми и биљни корен чине једну целину (Слика 1.) (Хајнал Јафари и сар., 2020).



Слика 1. Ризосфера (Хајнал Јафари и сар., 2020)

Ризосфера као динамични систем састоји се из три зоне које чине једну целину (Слика 2.):

1. Спољашња зона (екторизосфера) је зона која обухвата слој земљишта око саме површине корена.
2. Ризораван је зона која обухвата саму површину корена биљке на којој се налазе ситне партикуле земљишта и микроорганизми.
3. Унутрашња зона (ендоризосфера или хистосфера) је зона која обухвата ткиво корена и ендофитне микроорганизме који живе у овом делу корена (Хајнал Јафари и сар., 2020).



Слика 2. Ризосфера (преузето и прилагођено према McNear Jr, 2013)

На разноврсност и доминантност одређених врста микроорганизама у ризосфери директно утиче врста или сорта биљке, карактеристике корена и коренских ексудата, ђубрење азотом и фосфором, старост биљке, услови спољашње средине (физичко-хемијске особине земљишта) и антропогени утицаји (Wertz et al., 2007; Gusain and Bhandari, 2019).

Биљка током свог живота, путем корена, ослобађа различите материје које се једним именом називају коренски ексудати. Кроз излучивање различитих једињења корен мења физичка и хемијска својства земљишта, привлачи одређене врсте микроорганизама, утиче на њихову активност и бројност, али и стимулише корисне симбиозне односе (Huang et al., 2014). Доминантни представници микроорганизама у ризосфери су бактерије и гљиве. Бројност бактерија у ризосфери је 5 до 20 пута, а некада и знатно више, већа у односу на околно земљиште (Хајнал Јафари и сар., 2020). Бројност гљива у ризосфери је 10 до 20 пута већа, а бројност алги и протозоа око 3 пута већа у односу на неризосферно земљиште.

Микроорганизми који живе у ризосфери, могу имати негативан или позитиван утицај на раст и развиће биљке (Souza et al., 2015). Према томе делимо их у три групе. У прву групу спадају патогени микроорганизми, који негативно утичу на раст и развој биљке, док другу групу чине коменсални микроорганизми који немају никакв утицај ни на биљку, али ни на друге микроорганизме. У трећу групу спадају најбитнији, корисни микроорганизми. Ови микроорганизми, путем различитих директних или индиректних механизма, позитивно утичу на параметре раста биљке (Glick, 2012; Bashan and de-Bashan, 2010).

2.2. РИЗОСФЕРА ЛЕКОВИТОГ БИЉА

Познато је да су лековите биљке богате секундарним метаболитима и да су потенцијално корисне за производњу лекова. У ризосфери лековитих биљака налази се велика активност и разноликост микроорганизама. Резултати истраживања у свету показују да је ризосфера лековитог биља веома специфична (Bafana and Lohiya, 2013). Због продукције различитих секундарних метаболита, ризосфера лековитог биља има веома разноврсне бактерије које имају вишеструке PGP (од Plant Growth Promoting) особине које погодују расту биљака (Zhang et al., 2013). Zhao et al. (2013) истраживали су микробиолошку разноликост ризосферног земљишта многих лековитих биљака и пронашли укупно 50 сојева, разврстаних у 7 родова: *Mucococcus*, *Corallococcus*, *Cystobacter*, *Archangium*, *Stigmatella*, *Chondromyces*, *Puxidicoccus* са доминантним родовима *Mucococcus* и *Corallococcus*. Такође, исти аутори су анализирали разноликост

актиномицета у ризосфери седам лековитих биљних врста и пронашли 18 доминантних родова (Zhao et al., 2012).

Бактерије изоловане из ризосфере лековитог биља имају висок потенцијал да се користе као средства за подстицање раста и биоконтролу многих биљних врста. Многа истраживања су доказала да ризосферне бактерије лековитих биљака имају више PGP особина (Stamenov et al., 2021a).

2.3. МИКРООРГАНИЗМИ СТИМУЛАТОРИ БИЉНОГ РАСТА

Интеракције између микроорганизама који се налазе у ризосфери и биљака могу бити корисне, неутралне и штетне. Микроорганизми стимулатори биљног раста означени су термином PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) који је први пут увео 1978. године Јоџ Клоппер, да би дефинисао хетерогену групу бактерија, која се може наћи у зони ризосфере, на површини или у асоцијацији са кореном биљке (Souza et al., 2015). Доказано је да ови микроорганизми, чак и када се користе као инокулуми, побољшавају снабдевеност биљака хранљивим материјама, биљним хормонима, помажу биљци у одбрани од фитопатогена и појачавају њену отпорност на неповољне абиотичке факторе и на стрес. На тај начин имају значајан утицај на количину и квалитет приноса пољопривредних култура (Хајнал Јафари и сар., 2020).

Поред наведеног термина, у употреби су и други називи. Термин PHPR (Plant Health Promoting Rhizobacteria) се користи за ризобактерије које позитивно утичу на здравље биљака, док термин NPR (Nodule Promoting Rhizobacteria) означава бактерије које поспешују нодулацију (Стаменов, 2014).

Корисни микроорганизми који доприносе бољем здравственом стању биљака и хранљивим својствима земљишта, дефинисани су и као пробиотици за биљке, односно PPM - Plant Probiotic Microorganisms (Glick, 2012).

Микроорганизми стимулатори биљног раста - PGPM (од Plant Growth Promoting Microorganisms), један је од општих термина који се данас највише користи. Овај термин обухвата микроорганизме из свих група, попут гљива, протозоа, алга, а не само бактерија. Осим тога, овим термином обухваћени су и они микроорганизми који се не налазе у ризосфери, а који такође поспешују раст биљака (Хајнал Јафари и сар., 2020).

PGP микроорганизми су предмет многобројних истраживања, чији је главни циљ проналажење адекватног начина њихове примене у ратарству, хортикултури, шумарству и заштити животне средине, а све у циљу контроле биљних болести и одржавања плодности агроекосистема, и то као и замена или допуна редукованог употреби хемикалија у пољопривреди (Hungria et al., 2013).

Somers et al. (2004) поделили су PGP микроорганизме према њиховој активности на:

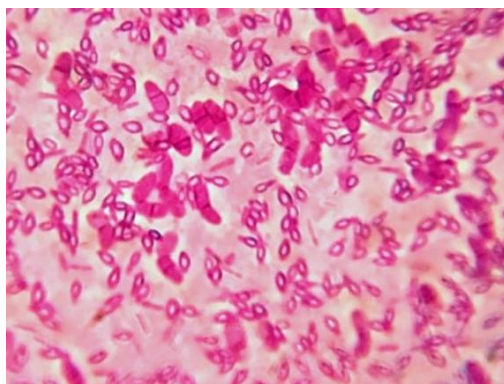
- Фитостимулаторе – стимулишу раст и развој биљака путем продукције хормона (ауксина, цитокинина, гибберелина, абсцисинске киселине и етилена);
- Биофертилизаторе – повећавају доступност биљних асимилатива и на тај начин директно поспешују биљни раст (снабдевање биљке азотом, фосфором и др хранљивим материјама);
- Ризомедијаторе – разлажу органске полутанте (хумификација и минерализација);
- Биоконтролне агенсе – контролишу болести биљака продукцијом антибиотика и антифугалних метаболита (антибиоза, компетиција, индукција системске отпорности биљака) (Хајнал Јафари и сар., 2020).

До данас је утврђено да групи PGP микроорганизама припадају бактерије различитих родова, од којих су најзначајнији: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Aeromonas*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Proteus*, *Frankia*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Xanthomonas*, *Phyllobacterium* и др. (Berg, 2009) док су најзначајније гљиве из родова: *Trichoderma*, *Variovovax*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Glomus*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Acaulospora* и друге. (Berg, 2009). Бактерије рода *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter* су једне од највише испитиваних и примењиваних бактерија (Hayat et al., 2010; Glick, 2012).

2.3.1. Род *Bacillus*

Род *Bacillus* припада разделу Firmicutes и представља најзаступљени род бактерија у ризосферном земљишту (Barriuso and Solano, 2008). Бактерије овог рода су препознатљиве по производњи ендоспора које се формирају унутар бактеријске ћелије, када се бактерија нађе у неповољним условима (Слика 3). Ендоспоре су отпорне на различите негативне утицаје. То су Грам-позитивне, штапићасте аеробне или

факултативно анаеробне бактерије чије су ћелије величине 0,5-2,5 x 1,2-10 μm , често груписане у парове или ланце, са округлим или четвртастим крајевима, покретне захваљујући перитрихалним флагелама (Хајнал Јафари и сар., 2020). Бројност *Bacillus*-а у једном граму земљишта варира од 10^6 у хладним, до 10^7 и више у топлим областима (Barriuso and Solano, 2008).



Слика 3. *Bacillus* sp. (Хајнал Јафари и сар., 2020)

Најприсутније врсте овог рода у ризосфери су *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mucilaginosus* и *Bacillus polymyxa* (Хајнал Јафари и сар., 2020). За ове врсте је утврђено да синтетишу велики број секундарних метаболита и да путем различитих директних и индиректних механизма утичу на раст биљака, квалитет приноса и сузбијање фитопатогена (Nakkeeran et al., 2005).

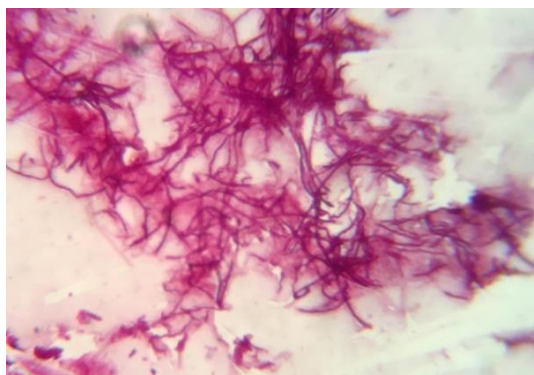
Поједине врсте овог рода продукују биљне хормоне попут индол-сирћетне киселине (у даљем тексту IAA од Indole Acetic Acid), цитокидине и гиберелине, и на тај начин утичу на развој корена биљке, биљни раст, као и на општу отпорност биљне врсте (Swain and Ray, 2009). *Bacillus* sp. продукује структурно различите антибиотике, сидерофоре, АСС (од 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) деаминазу, а разлаже и различита органска и неорганска једињења калијума, цинка и фосфора (Ongena et al., 2005). *Bacillus* sp. показује широк спектар механизма који могу да стимулишу раст биљака, брзо колонизује корен и има способност да се умножава на корену (Amin and Rakhisi, 2015). Индукује системску отпорност биљака производњом испарљивих органских једињења (Ryu et al., 2004). Смањује ниво етилена у биљкама деаминацијом једињења који је непосредни предходник етилена (Хајнал Јафари и сар., 2020). Бактерије из рода *Bacillus*

могу синтетисати органске киселине и фосфатазе које ће неприступачан фосфор превести у биљкама приступачну форму. Калијум који је у земљишту заробљен у облику алумосиликата, захваљујући активности бактеријама из рода *Bacillus*, постаје приступачан биљкама (Orhan et al., 2006).

Инокулација бактерија рода *Bacillus* у ризосферу биљака имала је значајан утицај на принос кукуруза (Liu et al. (2013), сирка (Nawangsih, A.A., 2011), јечма, шећерне репе (Sahin et al., 2004), јабуке и других воћних врста (Aslantas et al., 2007). Garcia et al. (2004) су утврдили позитиван ефекат инокулације *Bacillus sp.* у ризосферу паприке и парадајза, гдје је дошло до значајног повећања површине листова, броја листова као и тежине стабла и корена, а све то је знатно утицало на повећање приноса биљака. Тако да се ова инокулација показала као добра алтернатива хемијским ђубривима приликом узгајања ових биљака у стакленицима (García et al., 2004.). Утврђено је да примена *Bacillus spp.* позитивно утиче на принос, раст и исхрану малина у условима органске производње (Orhan et al., 2006).

2.3.2. Род *Streptomyces*

Род *Streptomyces* припада разделу Actinobacteria. То је група Грам-позитивних, кончастих, аеробних, мицеларних бактерија, величине у дијаметру 0,5-2 μm , које имају веома важну улогу у микробиолошкој заједници земљишта (Хајнал Јафари и сар., 2020). Колоније изолата *Streptomyces-a* су чврсте конзистенције, округле до неправилног облика, са таласастом ивицом, храпаве површине и различитих боја (Слика 4). Формирају супстратни, надсупстратни и ваздушни мицелијум, на коме се стварају споре у низовима.

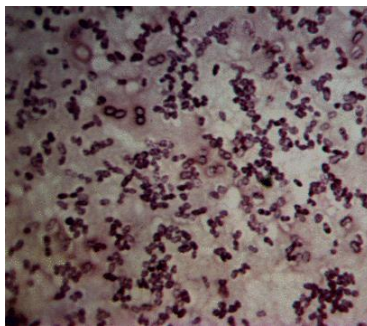


Слика 4. *Streptomyces sp.* (Фото: Д.Стаменов)

Актиномицете су једна од главних компоненти микробиолошке заједнице у земљишту (Suzuki et al., 2000). Најзаступљеније врсте овог рода су *Streptomyces olivaceoviridis*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces viridificans*, *Streptomyces griesus*, *Streptomyces fulvorobeus*, *Streptomyces clavuligerus* и др (Gopalakrishnan et al., 2011). Ове бактерије имају могућност да продукују сидерофоре, цијано-водоник, АСС деаминазу, антибиотике, витамине, фитохормоне (ауксине, гибберелине и цитокидине), што у биљној производњи поспешује клијање семена, боље укорјењавање и почетни раст младе биљке (Danish et al., 2019; Хајнал Јафари и сар., 2020). Осим тога, захваљујући овим особинама, бактерије овог рода могу пружити заштиту од неколико циљаних фитопатогених гљива (Nakkeeran et al., 2005; Khamna et al., 2009), а неке инхибирају раст фитопатогених бактерија *Erwinia amylovora* и *Agrobacterium tumefaciens* (Oskay et al., 2004). Применом бактерија рода *Streptomyces* долази до активног разлагања органских материја, лигнина, пектина, најотпорних материја хумуса и то захваљујући способности да продукују бројне ензиме, стварајући на тај начин неопходне асимилативе за гајене биљке (Ilic et al., 2007). Припадају групи целулолитских микроорганизама, што значи да разлажу целулозу, те се могу примењивати са циљем убрзања процеса разлагања органске материје. Сматра се да 60% свих биолошки активних материја у земљишту потиче од врста из рода *Streptomyces* (Ilic et al., 2007). Применом *S. olivaceoviridis*, *S. rimosus*, *S. rochei* и *Streptomyces* spp. у биљној производњи које продукују IAA, поспешује се клијање семена, почетни раст младе биљке и боље укорјењавање парадајза (Јарак и сар., 2007., El-Tarabily, 2008). Значајни резултати су постигнути применом *Streptomyces* spp. у узгајању грашка, паприке и другог поврћа, пшенице, соје, крмног биља, винове лозе и др. (Хајнал Јафари и сар., 2020).

2.3.3. Род *Azotobacter*

Род *Azotobacter* припада разделу Proteobacteria. То је група Грам-негативних, слободно азотофиксирајућих аеробних бактерија (Martyniuk and Martyniuk, 2003). Ћелије бактерија рода *Azotobacter* су штапићасте до овалног облика, величине 1,5-2,0 μm у пречнику. Налазе се појединачно, у паровима или у ланцима различитих дужина (Слика 5.).

Слика 5. *Azotobacter* sp.

([https:// Azotobacter - Beneficial Microbes \(fertnz.co.nz\)](https://Azotobacter-Beneficial-Microbes(fertnz.co.nz)))

Поједине врсте су покретне, а неке непокретне. (Martyniuk and Martyniuk, 2003). Размножавају се деобом, при чему добијају облик броја осам који је за њих карактеристичан. Колоније азотобактера су брзо растуће, округле, средње величине, беле боје, сјајне, делимично прозирне и слузаве, док им је ћелија обавијена капсулом. Положај колонија на подлози је површински, структура хомогена, ивице колоније равне а профил благо испупчен. Бактерија формира цисте у којима преживљава неповољне услове средине (Kurrey et al., 2018).

Бактерије рода *Azotobacter* имају велику улогу у повећању снабдевености биљака азотом из ваздуха. То остварују процесом који се назива азотофиксација. Код нелегуминозних биљака, азотофиксација се одвија или без директног контакта бактерије са биљком (слободни азотофиксатори), или у блиској заједници са биљком (на површини биљке или у самом њеном ткиву), али при томе не долази до морфолошких промена на телу биљке односно образовања квржица (асоцијативна азотофиксација) (Prajarati et al., 2008). Esmailpour et al. (2013) су утврдили да азотобактер има ефикасност фиксирања око 20 kg N/ha годишње, стога се може успешно примењивати у производњи разних пољопривредних култура као замена за бар неки део азотних минералних ђубрива.

Бактерије овог рода су означене и као фосфат-солубилизујуће бактерије које утичу на снабдевеност биљака фосфором (Jimenez et al., 2011).

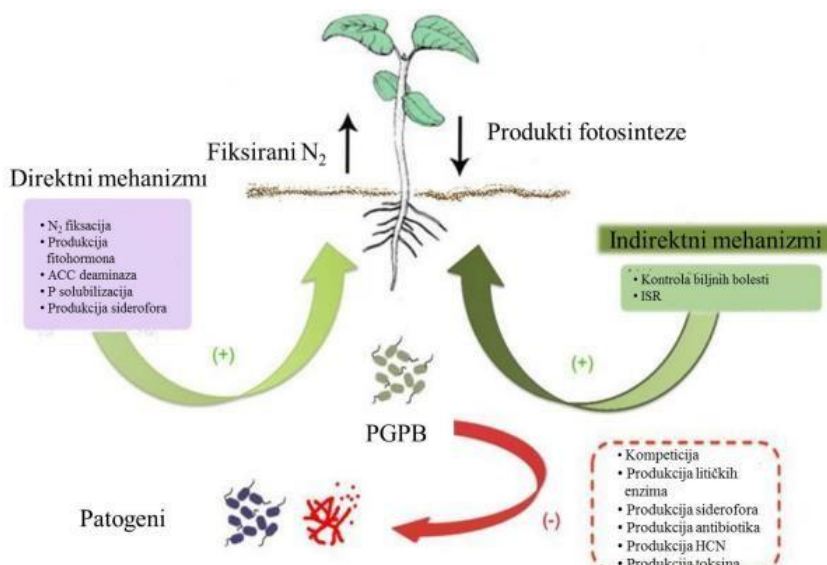
Велики број врста овог рода врши продукцију сидерофора попут бактерије *Azotobacter vinelandii* која продукује азотобактин (Хајнал Јафари и сар., 2020).

Azotobacter spp. имају повољан утицај на повећање плодности земљишта (Прајарати et al., 2008), кроз биостинтезу биолошки активних супстанци, продукцију фитопатогених инхибитора, хормона, деградацију пестицида и тешких метала, што у великој мери утиче на здравље, раст и принос гајених биљака (Aini et al., 2019).

2.4. МЕХАНИЗМИ ДЕЛОВАЊА PGP МИКРООРГАНИЗАМА

PGP микроорганизми утичу на раст и развој биљке различитим директним и индиректним механизмима (Стаменов, 2014). Директни механизми обухватају учешће микроорганизма у циклусима храњивих елемената, при чему биљке снабдевају угљен-диоксидом, различитим микро и макроелементима, а пре свега лакоприступачним азотом, фосфором и сумпором, врше продукцију биљних хормона (ауксина, гибберелина, цитокинина), као и смањење нивоа биљног етилена и продукције сидерофора (Слика 6) (Glick, 2012; Bhardwaj et al., 2014).

Индиректни механизми PGP микроорганизма подразумевају антибиотску заштиту од патогена и индуковање системске резидентности (ISR) биљке (Ahemad i Kibret, 2014). Разлика између ова два механизма деловања PGP микроорганизма често није уочљива. У појединим случајевима одређени механизми могу деловати и као директни и као индиректни, али и једни и други имају позитиван утицај на клијавост семена, развој корена, надземног дела биљке и повећање приноса пољопривредне културе као и заштиту биљке од патогена и абиотичког стреса (Хајнал Јафари и сар., 2020).



Слика 6. Директни и индиректни механизми деловања микроорганизама (преузето и прилагођено према García-Fraile et al., 2015)

2.4.1. Продукција ензима

За одређене PGP бактерије карактеристична је синтеза литичких ензима као што су хитиназе, протеазе, липазе и β -1,3- глуканазе који разграђују ћелије патогена. Хитиназа разлаже хитин, полисахарид ћелијских зидова гљива, бактерија али и инсеката (Nisa et al., 2010). Ензим β -1,3- глуканазе разлажу глукане који чине основну структуру ћелијског зида плесни, алги, бактерија и гљива. Применом *Pseudomonas cepacia* смањује се појава болести каје изазивају *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* i *Pythium ultimum* за 85, 48 и 71%, захваљујући продукцији β -1,3 – глуканазе (Vargas-Arispuro et al. 2009).

Трансформација, односно разлагање целулозе, заузима значајно место у биолошком кружењу угљеника, и оно се врши уз помоћ ензима: ендоглуканазе, егзоглуканазе и β -глюкозидазе. У бактерије, разлагаче целулозе, убрајају се *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Cellvibrio* spp. и *Cellulomonas* spp. (Хајнал Јафари и сар., 2020).

Етилен је веома важан фитохормон који учествује у регулацији свих процеса раста, развоја и старења биљке (Saleem et al., 2007). Међутим, у специфичним ситуацијама долази до повећања акумулације етилена, што може изазвати инхибицију раста биљке или њену смрт (Li et al., 2005). PGP микроорганизми продукују ензиме који могу да

регулишу ниво етилена, тако што деградирају прекурсор овог хормона, то јесте продукују АСС деаминазу која хидролизује аминокicloпропан-карбоксилну киселину, што резултира смањењем нивоа етилена у корену (Jalili et al., 2009). Продукција АСС деаминазе утврђена је код *Bacillus pulminis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus globisporus*, *Bacillus circulans*, *Alcaligenes sp*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas putida* и *Enterobacter cloacae* (Onofre-Lemus et al., 2009).

2.4.2. Продукција биљних хормона

Фитохормони (ауксини, гиберелини, цитокинини, абсцисинска киселина, етилен) су органске супстанце које не спадају у храњиве материје, али у минималним концентрацијама утичу на све физиолошке и биохемијске процесе у биљци и на тај начин делују на раст и развој биљака (Fuentes-Ramírez and Caballero-Mellado, 2006). Биљке на два начина долазе до хормона: ендогено, хормони продуковани из сопствених ткива и егзогено, хормони који су продуковани од стране PGP микроорганизама (Стаменов, 2014). PGP микроорганизми продукују ауксине, гиберелине и цитокинине (Слика 7) који претежно показују стимулативно деловање, док абсцисинска киселина и етилен делују инхибиторно (Sraeren et al., 2008).



Слика 7. Фитохормони продуковани од стране PGP микроорганизама

Синтеза фитохормона од стране PGPM сматра се једним од најважних механизма којим они делују на раст и развој биљака (Sraeren et al., 2008).

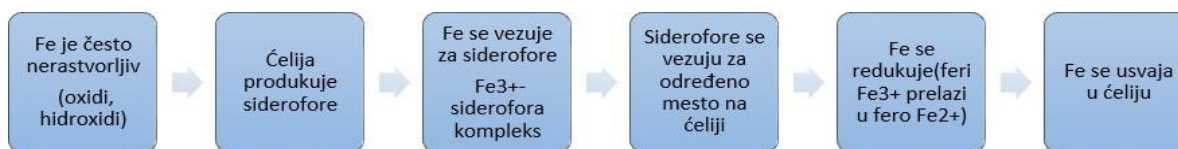
Ahmad et al. (2008) утврдили су да више од 80% испитиваних сојева *Azotobacter i Pseudomonas* продукују IAA, док је исто утврђено код 20% испитиваних сојева *Bacillus sp*. IAA продукујуће бактерије припадају родовима *Azospirillum*, *Bacillus* (Swain et al.,

2007), *Enterobacter* (Shoebitz et al., 2009), *Pseudomonas* (Hariprasad and Niranjana, 2009), *Rhizobium* и *Streptomyces* (Ghosh et al., 2008).

Способност да продукује гиберелине, утврђено је код бактерија рода *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* и други. Гиберелини су хормони који утичу на степен клијавости семена, издуживање стабла и развој плода (Стаменов, 2014).

2.4.3. Продукција сидерофора

Гвожђе је неопходан елемент за живот биљака али је његова доступност за биљке у земљишту веома мала. У условима недостатка гвожђа, биљке и микроорганизми, као што су бактерије и гљиве, продукују сидерофоре. Функција сидерофора је да проузрокују отпуштање јона гвожђа из оксида и хидроксида и да га потом веже, формирајући Fe^{3+} -сидерофора комплекс који се потом усваја од стране микроорганизма или биљке (Хајнал Јафари и сар., 2020) (Слика 8). Већина аеробних и факултативно анаеробних микроорганизма синтетише најмање једну врсту сидерофора: *Ustilago sphaerogena* синтетише ферихром, *Streptomyces pilosus* и *Streptomyces coelicolor* дефероксамин, *Bacillus subtilis* бацилибактин, *Azotobacter vinelandii* азотобактин, а *Pseudomonas aeruginosa* пиовердин (Kuffner et al., 2008).



Слика 8. Функција сидерофора

Примена сидерофор-продукујућих бактерија дала је значајне резултате у узгајању многих биљних врста, јер поред снабдевања биљке гвожђем, сидерофоре штите биљку од патогених микроорганизма. Предпоставља се да сидерофоре продуковане од стране PGPM, имају далеко већи афинитет према Fe^{3+} него патогене гљиве (Szilagyi-Zecchin et al., 2014). Услед недостатка гвожђа, патогеним гљивама је онемогућено да се размножавају и расту у ризосфери биљке. Бактерије рода *Bacillus*, које продукују сидерофоре инхибирају раст фитопатогених гљива *Fusarium verticillioides*,

Colletotrichum graminicola, *Bipolaris maydis* и *Cercospora zeaе-maydis* приликом узгоја кукуруза (Хајнал Јафари и сар., 2020).

2.4.4. Продукција цијанида

Цијановодоник (HCN), као секундарни метаболит многих PGP бактерија, потискује развој микроорганизама, а такође негативно утиче на раст и развој биљака (Siddiqui et al., 2006). Због тога што сузбија раст микроорганизама, па и многих фитопатогених микроорганизама, бактерије које га продукују се примењују у биљној производњи као биопестициди. Са друге стране, с обзиром да HCN може инхибирати клијавост семена, примена бактерија које су показале способност продукције HCN се не примењују приликом сетве, да не би негативно утицале на клијавост семена (Стаменов, 2014). PGP бактерије, који имају способност да продукују HCN, припадају врстама из родова *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Rhizobium* (Devi et al., 2007; Rezzonico et al., 2007; Ahmad et al., 2008). HCN инхибира синтезу АТФ-а, односно инхибира транспорт електрона што нарушава снабдевање ћелија енергијом и доводи до смрти патогених микроорганизама. Такође инхибира функционисање цитохром оксидазе код многих фитопатогених организама (Gehring et al., 1993). У истраживањима Ahmad et al. (2008), код 72 изолата, који припадају родовима *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Mesorhizobium*, и *Bacillus* а који су изоловани из различитих ризосфера биљака, утврђена је синтеза HCN и то код *Pseudomonas* (88,89 %) и *Bacillus* (50 %).

2.4.5. Улога микроорганизама у циклусу фосфора

Фосфор (P) представља есенцијални нутријент за биљке, учествује као структурна компонента у саставу нуклеинских киселина, фосфолипида и аденозин-трифосфата (АТФ), има велику улогу у физиолошким и биохемијским процесима биљака (Khan et al., 2009; Richardson and Simpson, 2011). Фосфат солубилизујући микроорганизми (PSM од Phosphate Solubilizing Microorganisms) утичу на снабдевеност биљака фосфором путем минерализације органских једињења фосфора, имобилизацијом приступачног фосфора као и растварањем нерастворених минерала фосфора (Хајнал Јафари и сар., 2020). У PSM се убрајају бактерије, гљиве, актиномицете и арбускуларне микоризне

гљиве (Khan et al., 2007). Најмоћније Р-солубилизаторе чине бактерије рода *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Erwinia*, гљиве рода *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* (Хајнал Јафари и сар., 2020).

2.5. УТИЦАЈ RGP МИКРООРГАНИЗАМА НА РАСТ БИЉАКА

Примена RGPМ на усеве разних биљака довело је до повећања клијавости, раста и развоја корена као и тежине корена, недземног дела и листова у раним фазама раста биљке, повећање укупне биомасе биљке, тежине семена као и повећање приноса (Ahemad and Kirbet, 2014). Литературни подаци наводе повољне ефекте инокулације на пиринач, спанаћ, кукуруз, кромпир, шећерну репу, пшеницу, ротквицу, соју, грашак, парадајз, купус и пасуљ (Sharma et al., 2013; Prathap and Kumari, 2015; Yegorenkova et al., 2016). У производњи ратарских и повртарских биљака применом мултипних инокуланата, односно смеше азотобактера и фосфоминерализатора, повећана је снабдевеност азотом и фосфором као и принос биљака (Bashan, 2010; Comprant et al., 2010). У истраживању Јарак и сар (2007), највећа висина и маса биљке луцерке добијена је применом инокулума који је садржао смешу ризобиума, азотобактера и актиномицета. Такође инокулацијом ових микроорганизама код грашка је убрзан пораст биљке (Јарак и сар., 2006). У раду Stamenov and Jarak (2010), највећи пораст црвене детелине је утврђен у варијантама где је извршена инокулација ризобиумом. Инокулација шећерне репе са *Azotobacter chroococcum* утврђено је повећање приноса корена као и повећан проценат шећера (Mrkovački et al., 2010). Значајно место у биљној производњи заузима и примена зелених алги које пружају механичку баријеру, штите биљку од напада фитопатогених микроорганизама али и снабдевају биљке потребним нутријентима (Хајнал Јафари и сар., 2020). Иста група аутора навела је да инокулацијом семена са *Trichoderma sp.* довело до значајног повећања клијавости сунцокрета, кукуруза, соје, пасуља, диње и лубенице.

2.5.1. Примена PGP микроорганизама у производњи лековитог биља

До данас, утврђено је да се микроорганизми могу веома успешно користити у производњи лековитог биља, јер подижу отпорност биљке према суши, високој и ниској температури, нивоу соли у земљишту (Singh et al., 2011; Jahanian et al., 2012; Ghorbanpour et al., 2013). Такође, потврђен је позитиван утицај примене микроорганизама на продукцију биолошки активних материја лековитог биља (Koeberl et al., 2013). Свој позитиван ефекат, ризосферне бактерије лековитог биља испољавају и кроз биоконтролу штетних бактерија или других патогена који инхибирају биљни раст, и то захваљујући способности продукције антибиотика, цијано-водоника и различитих ензима. Примена оваквих PGP бактерија веома успешно може заменити или барем смањити примену пестицида (Bhattacharyya and Jha, 2012; Podile and Kishore, 2006; Zahir et al., 2003). Резултати неколико студија потврдили су да значајан број бактерија подстиче раст и развој лековитих биљака (Whang et al., 2014; Bafana and Lohiya, 2013).

3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА

Како је добијање здраве и квалитетне биљне масе лековитог биља императив сваког произвођача и потреба потрошача, проналажење начина достизања овог циља постаје тема многих истраживања. До сада је показано да се микроорганизми могу успешно употребљавати у производњи многих биљака, и то као замена или допуна хемијским препаратима. Са друге стране, ризосфера лековитог биља до сада је мало истраживана. Имајући у виду напред наведено, циљ овог истраживања је изолација и карактеризација микроорганизама из рода *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter* из ризосфере коприве (*Urtica dioica* L) и испитивање ефекта њихове примене на клијавост, иницијални раст и параметре приноса различитих врста лековитог биља.

Резултати ових истраживања би требало да покажу да се коришћењем микроорганизама изолованих из ризосфере лековитог биља, односно коприве, постижу позитивни ефекти и у производњи лековитог биља, што је посебно значајно са еколошког али и са економског аспекта.

Изолати који се покажу као најефективнији, могу послужити као основа за даља истраживања и осмишљавање техничког решења за производњу микробиолошког препарата којим би се унапредила производња и подигао квалитет различитих врста лековитог биља.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. ИЗОЛАЦИЈА МИКРООРГАНИЗАМА

У лабораторијским условима изоловани су микроорганизми из рода *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter* из ризосфере коприве (*Urtica dioica* L).

Приликом изолације бактерија рода *Bacillus*, кориштен је хранљиви агар (Јарак и Ђурић, 2006), а бирани су изолати који се састоје од каталаза позитивних, грам-позитивних, штапићастих ћелија које формирају ендоспоре. Присуство каталазе детектовано је на основу ослобађања мехурића кисеоника у контакту колонија са разблаженим раствором водоник пероксида.

За изолацију бактерија рода *Streptomyces*, кориштен је Синтетички агар (Јарак и Ђурић, 2006), а бирани су изолати за које је утврђено да су им ћелије грам-позитивне и кончасте.

За изолацију бактерија из рода *Azotobacter*, кориштена је селективна подлога без азота (Фјодорова подлога (F-подлога)) (Јарак и Ђурић, 2006), а биране су млечно-беле, слузаве колоније за које је утврђено да су им ћелије Грам-негативне, кокоидне, са слузавом капсулом.

4.2. МОРФОЛОШКЕ ОСОБИНЕ ИЗОЛАТА

За испитивање морфолошких особина ћелија одређиван је: облик, величина, и присуство ендоспора (Јарак и Ђурић, 2006). За опис колоније одређиване су: облик, боја, величина, површина, ивица и структура (Јарак и Ђурић, 2006). За потребе описа ћелије, као и ивице и структуре колоније, кориштен је објектив 100x и 10x, на микроскопу типа Motic BA210.

4.3. ФИЗИОЛОШКЕ ОСОБИНЕ ИЗОЛАТА

Од физиолошких особина одређивани су: однос према извору угљеника, температури, реакцији средине, концентрацији NaCl и тешким металима.

За одређивање односа према извору угљеника кориштена је HL-подлога (пептон 2 g, K₂HPO₄ 0,3 g, NaCl 5 g, шећер 10 g, бром-тимол плаво 0,03 g, агар 3 g) (Hugh and Leifson, 1953). У овим истраживањима кориштени су следећи шећери: фруктоза, галактоза, сахароза. У случају позитивне реакције примећује се око колонија промена боје из зеленкасте у жуту.

Раст на температума (5°C, 28°C, 41°C,), на подлогама различите киселости (pH 5, 7, 9) и на подлогама са различитим концентрацијама NaCl (3%, 5%, 7%), праћен је на одговарајућим хранљивим подлогама: *Bacillus* на хранљивом агару, *Azotobacter* на F-подлози, а *Streptomyces* на синтетичком агару. Приликом испитивања утицаја pH и NaCl, инкубација је вршена у термостату на 28°C. Након 48 часова инкубације, праћен је квалитативан раст изолата и упоређиван са контролом. Потпуно одсуство раста обележено је са -, минималан раст са +, оптималан са ++, обилан раст са +++.

Дифузионом методом испитивана је отпорност микроорганизама на растворе следећих метала: кадмијум (CdCl₂) и олово (PbCl₂), у различитим концентрацијама: 10⁻² и 10⁻⁴ (mol/dm³) (Kuffner et al., 2008). Након густог засејавања подлоге, на површину се поставе дискови са растворима тешких метала. Инкубација је трајала 48 часова на 28°C. У току периода инкубације на подлози се формира густ бактеријски тепих, на коме се око дискова уочавају зоне инхибиције раста културе. Величина зоне инхибиције зависи од осетљивости бактерије према тешком металу. Уколико је микроорганизам отпоран према одређеној супстанци, неће бити зоне инхибиције (-). Ако је микроорганизам осетљив према одређеној супстанци доћи ће до појаве зоне инхибиције. Појава зоне инхибиције ширине 1-10 mm обележена је са +, а зоне шире од 10 mm са ++. Интезивнији раст око диска доказ је стимулативног дејства испитиване супстанце на раст микроорганизма и обележен је звездицом (*).

4.4. БИОХЕМИЈСКЕ ОСОБИНЕ ИЗОЛАТА

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

Продукција липазе испитивана је на подлози (пептон 10 g L^{-1} , $\text{NaCl } 5 \text{ g L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O } 0,1 \text{ g L}^{-1}$, агар 15 g L^{-1}) којој је додат Tween 80 (Lanui, 1987). Период инкубације је седам дана на 26°C . Замућене зоне око колоније доказ су липолитичке активности.

За одређивање способности микроорганизама да хидролизује скроб користи се метода агарних плоча на скробном агару (скроб у праху 10 g L^{-1} , $\text{KH}_2\text{PO}_4 0,5 \text{ g L}^{-1}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 0,5 \text{ g L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O } 0,2 \text{ g L}^{-1}$, агар 15 g) (Rodina, 1972). Инкубација се врши на 28°C током 48 сати. Колоније се затим прелију раствором лугола. Скроб се у присуству јода боји плаво. Ако микроорганизам врши хидролизу скроба, око његових колонија појавиће се необојена зона (зона хидролизе), која не садржи скроб, док ће се остали део подлоге на коме није дошло до хидролизе обојити плаво. Ако не разлаже скроб, подлога ће бити равномерно плаво обојена.

Способност продукције пектиназе испитивана је методом агарних плоча на пектинозном агару ($\text{K}_2\text{HPO}_4 2 \text{ g L}^{-1}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 1 \text{ g L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O } 0,5 \text{ g L}^{-1}$, $\text{NH}_4\text{NO}_3 2 \text{ g L}^{-1}$, екстракт квасца 1 g L^{-1} , пектин 10 g L^{-1} , агар 16 g L^{-1}). Инкубација траје 24 h на 37°C , након чега се израсле колоније прелију луголом. Појава необојених зона око колоније доказ су пектиназне активности (Soares et al., 2001).

За доказивање способности продукције протеазе, коришћен је пептон-гвожђе дубоки агар (пептон 15 g L^{-1} , фериамонијум цитрат $0,5 \text{ g L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 0,08 \text{ g L}^{-1}$, агар 15 g L^{-1}), у који се убудом засејава микроорганизам. У реакцији са јонима гвожђа, H_2S , ослобођен из разложеног протеина, формира нерастворљиви талог- FeS . Инкубација траје 48 h на 30°C , након чега се посматра да ли је дошло до промене подлоге у црно.

Продукција целулазе испитивана је на СМС агару (карбокси-метил-целулозни агар). Период инкубације је седам дана на 28°C . Након инкубације, петри кутије су преливене раствором Конго-ред (1 mg/cm^3 воде). Након 15 минута, Конго-ред је одливен а петри кутије су преливене са 1M раствором NaCl . Обезбојене зоне око колонија доказ су целулазне активности микроорганизама.

Способност продукције ензима уреазе, испитивана је на подлози по Кристенсен (Говедарица и Јарак, 1999). Период инкубације износи 24 сата на 37°C. Појава црвене боје индикатора у хранљивој подлози доказ је разградње урее.

4.5. СПОСОБНОСТ ПРОДУКЦИЈЕ МАТЕРИЈА РАСТА

Продукција IAA испитивана је применом подлоге богате аминокиселином триптофан (триптофан бујон). Способност продукције ензима триптофаназе, односно присуства индола у подлози, доказује се додатком Ковачевог реагенса и стварањем црвеног прстена.

Способност продукције сидерофора одређивана је употребом хром-азурол агара (CAS од chrome azurol S). Према овој методи, CAS агар је смеша два раствора који се припремају и стерилишу засебно. Први раствор садржи: 60,5 mg CAS, 50 ml воде, 10 ml раствора (1M FeCL₃.6H₂O, 10 mM HCl), 40 ml воденог раствора HDTMA (heksadeciltrimetilamonium) (1,82 mg ml⁻¹). Други раствор припремљен је растварањем 30,24 g PIPES (1,4-piperazindietansulfonska kiselina) у 750 ml воде, 15 g агара и 12 g раствора 50% NaOH (pH се подеси на 6,8). Након стерилизације раствори се мешају. Боја CAS агара је тамно плава до зелена. У петри кутије разлију се хранљиве подлоге које се након што очврсну пресеку на пола и половина избаци. У празну половину петри кутије сипа се CAS агар. Засејавање се врши на половини на којој је хранљива подлога, а прати се промена боје CAS агара на линији раздвајања ове две подлоге. Промена боје из плаво зелене у наранцасто црвенкасто доказ је да микроорганизам продукује сидерофоре.

Продукција HCN испитивана је на подлози следећег састава: Триптон из соје 30 g L⁻¹, глицин 4,4 g L⁻¹, агар 15 g L⁻¹ (Frey-Klett et al., 2005). Након инокулације на подлогу је постављен Whatman диск, који је предходно потапан у раствору састава 0,5% пикринска киселина и 2% Na₂CO₃. Период инкубације износи 4 дана на 28°C. Промена боје диска из жуте у наранцасто браон боју доказ је способности микроорганизма да продукује HCN.

Способност минерализације органских једињења фосфора испитивана је на подлози Менкина, модификованој по Родиној. Способност изолата да солубилизују неорганске

фосфате испитивана је на подлози по Риковскаја (Стаменов, 2014). Након 5 дана инкубације на 28°C, појава провидних зона око колонија доказ су способности микроорганизма да раствара фосфате.

4.6. ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ИНОКУЛАЦИЈЕ НА ПАРАМЕТРЕ ПРИНОСА БИЉАКА

У последњој фази истраживања извршен је одабир најефективнијих изолата из сваке групе, њихово умножавање и примена у полуконтролисаним условима.

Семе лековитог биља, које је коришћено у експериментима, представља део асортимана лековитог биља Института за ратарство и повртарство, Нови Сад.

4.6.1. Испитивање утицаја изолата на клијање семена и дужину клице

За испитивање утицаја изолата на степен клијавости, кориштено је семе следећих лековитих биљака: босиљак (*Ocimum basilicum*), жалфија (*Salvia sclerea*), оригано (*Origanum vulgare* L.), мајоран (*Origanum majorana* L.), чубар (*Satureja hortensis* L.), першун (*Petroselinum crispum*).

Испитивање утицаја изолата на дужину клице вршено је на семенима лековитих биљака на којима је добијено повећање степена клијавости применом одабраних изолата.

Испитивање утицаја изолата на клијање семена и дужину клице вршено је у лабораторијским условима. Семена (20 зрна) су постављена на стерилне дискове филтер-хартије које су предходно постављене у Перти-кутије. Након тога, у сваку Петри кутију унето је по 10 ml инокулума, титра 10⁹ CFU/ml. Петри кутије су потом смештене у термостат на 22°C. Степен клијавости читаван је након 7 и 10 дана. Иницијални раст клице одређиван је мерењем дужине клице (коренка и стабаоцета) (mm) након 10, 14 и 21 дана.

4.6.2. Испитивање утицаја изолата на параметре приноса биљке

Семе босиљка и жалфије коришћено је у огледу за испитивање утицаја изолата на параметре приноса биљке.

За потребе истраживања коришћене су посуде, запремине 750 ml. Судови су допуњени Класмановим субстратом (Klasman potground Н, Germany) до 2 cm испод врха суда. По 15 семена босиљка и жалфије засејано је на инокулисану површину земљишта. У субстрат је унесено 10 ml инокулума, титар 10^9 CFU/ml. Оглед је постављен у полуконтролисаним условима (температура ($22\pm 2^\circ\text{C}$), фотопериод природног дневног светла).

Дужина надземног дела биљке (cm) и корена (cm), свежа и сува маса (g) биљке, као и садржај укупних фенола, флавоноида и антиоксидативне активности у биљном материјалу, одређивани су 6 недеља након постављања огледа. За потребе одређивања суве масе биљке, као и биохемијских параметара приноса, биљни материјал је након огледа сакупљен и осушен у хладу на промаји.

4.6.3. Биохемијски параметри приноса

Од уситњеног материјала хербе припремљени су метанолни екстракти мацерацијом. На ваги се одмери 0,2 g биљног материјал и пренесе у чашу. У чашу се дода 1,2 ml 80% метанола, затвори се фолијом и остави 90 минута на 20°C . Екстракција се понавља 4 пута са новом количином растварача. Након сваке екстракције се садржај из чаше пренесе у пластичну кивету и центрифугира се 10 минута на 3500 обртаја/мин⁻¹. Добијени супернатант након центрифугирања се пренесе у епандорфицу, а талог се налије са новом количином 80% метанола. Након сваке екстракције, супернатанти се одвоје центрифугирањем. Сви супернатанти чине један екстракт који се користи за одређивање фенола, флавоноида и антиоксидантне активности. Концентрације и ознаке екстраката дате су у Табели 1.

Табела 1: Списак припремљених екстраката, ознаке и концентрације екстраката

БОСИЉАК			ЖАЛФИЈА		
Ознака	Третман	Концентрација босиљак (g/ml)	Ознака	Третман	Концентрација жалфија (g/ml)
контрола	контрола	0,03886	контрола	контрола	0,038558
Вас3	Bacillus	0,03821	Вас3	Bacillus	0,038558
Azb	Azotobacter	0,03885	Azb	Azotobacter	0,038558
Act	Actinomic.	0,03873	Act	Actinomic.	0,038481

4.6.3.1. Одређивање садржаја укупних фенола

Садржај укупних фенола одређен је спектрофотометријски према методи Ainsworth & Gillespie (2007) описаној у Практикуму из хемије са теоријским основама (Поповић et al., 2020). Ова метода се заснива на особини фенола да у реакцији са Фолин-Чокалтеовим реагенсом (смеша Na_2WO_4 , Na_2MoO_4 , HCl , H_3PO_4 и LiSO_4) дају обојени комплекс, чија апсорбанција се мери на 760 nm.

Реагенси:

- 0,1 mol/L Фолин-Чокалте (ФЧ) реагенс: 1,25 mL 2M ФЧ реагенса се разблажи дестилованом водом до 25.0 mL
- 7,5 % Na_2CO_3 : 7,5 g Na_2CO_3 је растворено у 100 g dH₂O
- 1 mg/mL Гална киселина: 0.0276 g галне киселине × 1 H₂O растворено у 25.0 mL dH₂O

Поступак одређивања:

У епрувету се аутоматском пипетом одмери 50 µl узорка (или раствора стандарда), 150 µl дестиловане воде и 1 ml 0,1 M ФЧ реагенса. Након 10 минута дода се 800 µl 7,5% раствора Na_2CO_3 и реакциони медијум се остави 1 h на собној температури да би се

одиграла реакција и развила боја. Садржај из епрувете се затим пребаци у кивету за спектрофотометар и измери апсорбанција на $\lambda = 760 \text{ nm}$.

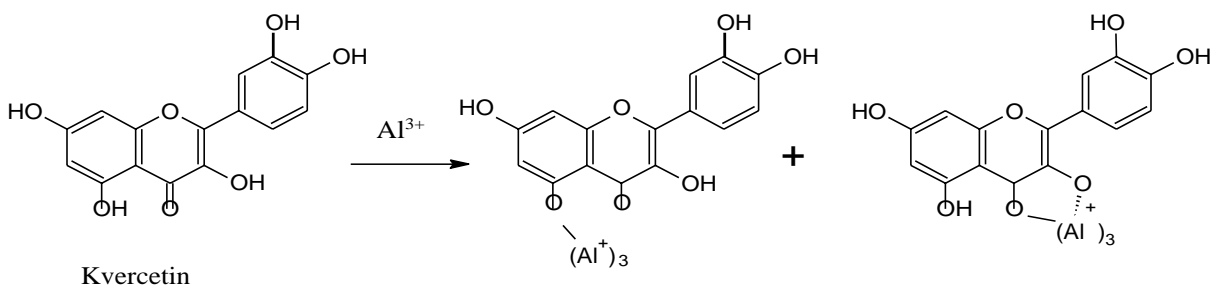
Из разлике апсорбанције средње вредности радних проба ($A_{\text{сп}}$) и корекције ($A_{\text{кор}}$) израчунате су апсорбанције (A) за сваки испитани екстракт:

$$A = (A_{\text{сп}} - A_{\text{кор}})$$

Садржај фенола је израчунат на основу калибрационе криве (функција апсорбанције у зависности од концентрације) стандарног раствора галне киселине. Резултат је изражен као средња вредност три мерења \pm стандардна девијација (милиграм-еквивалената галне киселине по граму сувог екстракта).

4.6.3.2. Одређивање садржаја флавоноида

Садржај флавоноида одређен је по спектрофотометријској методи Chang-а и сарадника (2002). Наиме, флавоноиди и флавоногликозиди дају са металима одговарајуће металокомплексе. Нарочито је значајан комплекс са јоном алуминијума (Слика 9), јер се Al^{3+} везује за укупне флавоноиде па се сумарни апсорбциони максимум лако одређује.



Слика 9. Настајање обојеног комплекса Al^{3+} јона и флавоноида

Реагенси:

1. 0.75 mol/L AlCl_3 : 4.5266 g $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ растворено у 25.0 mL 80% метанола
2. 1 mol/L CH_3COONa : 3.402 g $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ растворено у 25.0 mL dH_2O
- 3.1 mg/mL Кверцетин: 0.0264 g кверцетин $\times \text{H}_2\text{O}$ растворено у 25.0 mL 80% метанола

Поступак одређивања:

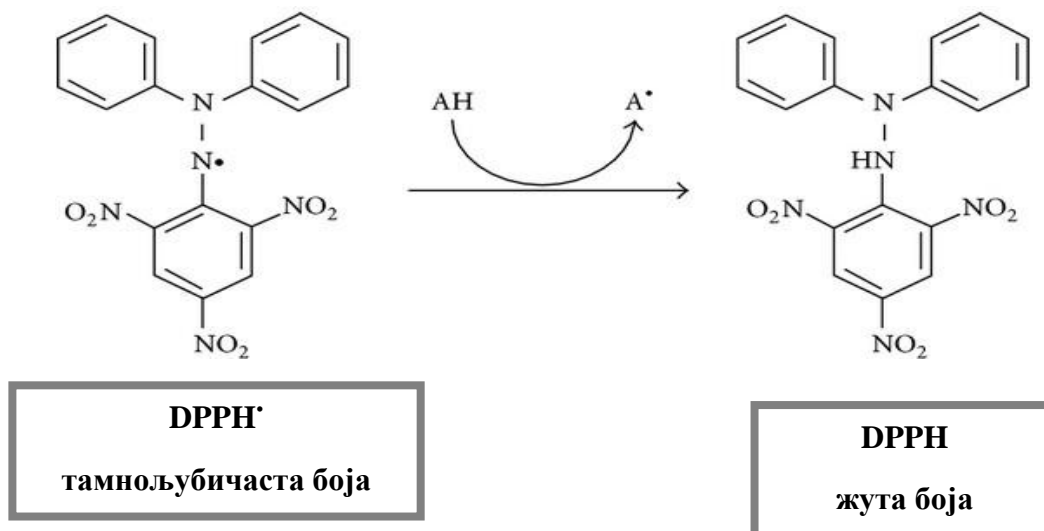
Разблажења кверцетина за стандардну криву су направљена у распону концентрације од 2,5 до 150 $\mu\text{g/mL}$. Све радне пробе рађене су у три понављања. У епрувету се аутоматском пипетом одмери 200 μl узорка (или раствора стандарда), 800 μl 80% метанола, 100 μl AlCl_3 реагенса, 100 μl раствора CH_3COONa и 1,8 ml 80% метанола. Припрема се и корекција која садржи све исто као и радна проба, али без AlCl_3 реагенса. Након 30 минута се измери апсорбанца на $\lambda = 415 \text{ nm}$. Из разлике апсорбанције средње вредности радних проба (A_{cp}) и корекције ($A_{\text{кор}}$) израчунате су апсорбанције (A) за сваки испитани екстракт:

$$A = (A_{\text{cp}} - A_{\text{кор}})$$

Садржај флавоноида је израчунат на основу калибрационе криве (функција апсорбанције у зависности од концентрације) стандарног раствора кверцетина. Резултат је изражен као средња вредност три мерења \pm стандардна девијација (милиграм-еквивалената кверцетина по граму сувог екстракта).

4.6.3.3. Одређивање антиоксидантне активности DPPH тестом

DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) тест представља један од најчешће коришћених тестова за испитивање антиоксидантне активности екстраката. Заснива се на употреби синтетичког једињења радикалске природе – DPPH $^{\bullet}$, тамнољубичасте боје. У присуству једињења која имају способност да донирају водоник или пренесу електрон, DPPH $^{\bullet}$ радикал се редукује и притом обезбојава (Слика 10). Познато је да биљни екстракти садрже различита полифенолна једињења, која поседују способност “хватања” слободних радикала и тиме показују антиоксидантну активност. Праћење трансформације љубичасто обојеног DPPH $^{\bullet}$ радикала у редуковану, жуто обојену форму, односно, промена апсорбанције након додатка испитиваног екстракта се користи као мерило антиоксидантне активности тог екстракта. Већи степен обезбојавања означава већу редукциону способност односно већу антиоксидантну активност екстракта.



Слика 10. Редуција DPPH• радикала. АН, антиоксидантно једињење из екстракта донира водоник (H) DPPH• радикалу при чему долази до обезбојавања или појаве бледо жуте боје која потиче од пикрил групе.

Реагенси:

1. 400 $\mu\text{mol/L}$ DPPH- основни раствор: 0,0158 g DPPH растворено у 100 mL етанола
2. 90 $\mu\text{mol/L}$ DPPH- радни раствор: 22,5 mL основног раствора разблажити са метанолом до 100 mL

Поступак одређивања:

За одређивање способности неутрализације DPPH радикала је примењен метод Sánchez-Moreno et al., (1998). Припремљена су серијска разблажења екстракта жалфије и босиљка (Табела 2 и Табела 3). У епрувете је испипетирано по 200 μL екстракта и додато 2 mL 90 μM DPPH радног раствора. Након 30 min стајања у мраку на собној температури, садржај из епрувета је пребачен у кивете и читана је апсорбанција. За максималну апсорбанцију, односно контролу која представља 100 % концентрације DPPH радикала, припремљен је узорак у којем је уместо екстракта додат само растварач. Процент инхибиције (I, %) за узорке је израчунат у поређењу са том контролом.

$$\text{Инхибиција (\%)} = \frac{A_{\text{контрола}} - A_{\text{узорка}}}{A_{\text{контрола}}} \times 100 (\%)$$

Коначан резултат је изражен као антирадикалски капацитет (АРК) вредност (реципрочна вредност концентрације узорка која неутрализује 50% DPPH радикала).

Табела 2: Табела разблажења узорка жалфије

Разблажење основног екстракта	Жељена концентрација C_2 (mg/ml)	V основног раствора концентрације $C_1 = 38,86$ mg/ml V_1 (μ l)	V 80% метанола (μ l)
10 пута	3,856	200	1800
20 пута	1,928	100	1900
40 пута	0,964	100	3900
80 пута	0,482	100	7900

Табела 3: Табела разблажења узорка босилка

Разблажење основног екстракта	Жељена концентрација C_2 (mg/ml)	V основног раствора концентрације $C_1 = 38,86$ mg/ml V_1 (μ l)	V 80% метанола (μ l)
2 пута	19,43	1000	1000
4 пута	9,715	500	1500
10 пута	3,886	200	1800
20 пута	1,943	100	1900

5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА СА ДИСКУСИЈОМ

5.1. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА МИКРООРГАНИЗАМА ИЗ РИЗОСФЕРЕ КОПРИВЕ

5.1.1. Морфолошке карактеристике изолата рода *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter*

У овом истраживању из ризосфере коприве (*Urtica dioica* L) изоловано је девет бактерија, од којих три припадају роду *Bacillus* (Вас1, Вас2, Вас3), три припадају роду *Azotobacter* (Азб1, Азб2, Азб3) и три бактерије које припадају роду актиномицета *Streptomyces* (Акт1, Акт2, Акт3). Колоније су издвојене на основу морфолошких карактеристика и неколико пута рекултивисане на одговарајућим подлогама да би се добиле чисте културе.

Ћелије изолата рода *Bacillus* су Грам-позитивне бактерије, штапићастог облика, величине 0,5-2,5 x 1,2-10 µm. Формирају споре које могу бити централне или терминалне. Често су груписане у парове или ланце различите дужине, са округлим или четвртастим крајевима, покретне захваљујући перитрихалним флагеллама. Профил колоније је раван, површина глатка до наборана, а положај на подлози површински (Табела 4 и 5).

Ћелије изолата рода *Streptomyces* припада типу актиномицета и то је група Грам-позитивних, мицеларних бактерија величине у дијаметру 0,5-2 µm. Ћелије су кончастог облика и не формирају споре. Колоније изолата *Streptomyces* су крупне, чврсте конзистенције, неправилног облика и кончасте структуре (Табела 4 и 5).

Род *Azotobacter* је група Грам- негативних бактерија. Ћелије изолата рода *Azotobacter* су штапићасте до овалног облика, величине 1,5-2,0 µm у пречнику. Могу се наћи појединачно, у паровима или у ланцима различитих дужина. Поједине врсте су

покретне, а неке непокретне. Ћелија им је обавијена капсулом и формирају цисте у којима преживљавају неповољне услове средине. Колоније изолата су брзо растуће, округлог до неправилног облика, средње – крупне величине, беле боје, сјајне, делимично прозирне и сузаве (Табела 4 и 5).

Табела 4: Морфологија ћелија изолата рода *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter*

Изолати	Ћелија		
	облик	величина	споре
Bac1	штапић	ситне	да
Bac2	штапић	крупне	да
Bac3	штапић	ситне	ситне споре
Azb 1	дипло-кока	ситне	не
Azb2	дипло-кока	крупне	не
Azb3	дипло-кока	ситне	не
Act1	кончаста	танке	не
Act2	кончаста	танке	не
Act3	кончаста	танке	не

Табела 5: Морфологија колонија изолата рода *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter*

Изолати	Колонија					
	облик	боја	величина	површина	ивица	структура
Bac1	округао	светло окер	средње	глатка	таласаста	хомогена
Bac2	ризоидан	крем	гигантске	наборана	граната	граната
Bac3	округао	крем	средње	глатка	таласаста	хомогена
Azb1	округао	светло крем	крупне	глатка	таласаста	ситно зрнаста
Azb2	неправилан	светло крем	крупне	наборана	таласаста	крупно зрнаста
Azb3	округао	бела	крупне	глатка	режњвита	ситно зрнаста
Act1	неправилан	сива	крупне	набране мат	кончаста	кончаста
Act2	неправилан	крем	крупне	набране мат	кончаста	кончаста
Act3	неправилан	браон	крупне	набране мат	кончаста	кончаста

5.1.2. Физиолошке карактеристике изолата рода *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter*

Резултати испитивања утицаја температуре, концентрације водоникових јона, NaCl, тешких метала (Cd, Pb) на раст и преживљавање изолата, као и однос изолованих бактерија према различитим изворима угљеника (фруктоза, сахароза, галактоза) приказани су у табелама 6, 7 и 8.

Утврђено је да сви изолати рода *Bacillus* на температури од 28°C имају оптималан пораст, док је на температури од 41°C запажено потпуно одсуство раста или минималан раст (код изолата Вас3) (Табела 6). На температури од 5°C минималан раст утврђен је само код изолата Вас2, док је код Вас1 и Вас3 дошло до изостанка раста.

На подлогума чија је рН вредност 5, 7 и 9 забележен је оптималан раст код свих изолата рода *Bacillus*.

На подлогама са додатком 3% NaCl сви изолати су имали оптималан раст, док је на истој подлози са додатком 5 и 7% NaCl дошло до одсуства раста, осим код Вас3 где је утврђен минималан раст.

Табела 6: Физиолошке особине и утицај тешких метала на раст изолата рода *Bacillus*

Изолати	Температура ^а (°C)			рН ^а (средине)			NaCl ^а (%)			Тешки метали ^б				Извор угљеника ^ц		
	5	28	41	5	7	9	3	5	7	Cd		Pb		Ф	С	Г
										10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻⁴			
Вас1	-	++	-	++	++	++	++	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Вас2	+	++	-	++	++	++	++	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Вас3	-	++	+	++	++	++	++	+	+	-	-	+	+	+	+	+

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

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

^цФ-фруктоза; С-сахароза; Г-галактоза; + позитивна реакција; - негативна реакција

За испитивање утицаја тешких метала на изолате у овом истраживању кориштени су раствори кадмијума и олова, у различитим концентрацијама од 10⁻² и 10⁻⁴ mol/dm³. Кадмијум који је примењен није утицао на раст сва три изолата *Bacillus*-а у обе концентрације. У овим случајевима није забележена појава зоне инхибиције. За разлику од кадмијума, раствор олова је у обе концентрације код свих изолата овог рода довео до

делимичне инхибиције раста, те је код сва три изолата утврђена појава зоне инхибиције у ширини до 10 mm.

Изолати рода *Bacillus* као извор угљеника користе све испитиване шећере, осим изолата Bac2 који не користи сахарозу.

Слично овим истраживањима, Јоо et al. (2007) су утврдили да изолати рода *Bacillus* имају оптималан раст на подлогама рН 6-9, при температури 28°C. Исти аутори су утврдили да је од седам изолата, само један изолат рода *Bacillus* користио галактозу и ксилозу, свих седам су користили глукозу. У истраживањима Karagoz et al. (2012), изолати овог рода имали су оптималан раст на подлогама где је концентрација NaCl износила 5 и 7%.

Оптималан раст колонија код изолата рода *Azotobacter* забележен је на температури од 28°C, док је при температурама од 5 и 41°C забележен минималан раст код свих изолата овог рода (Табела 7).

Табела 7: Физиолошке особине и утицај тешких метала на раст изолата рода *Azotobacter*

Изолати	Температура ^а (°C)			рН ^а (средине)			NaCl ^а (%)			Тешки метали ^б				Извор угљеника ^и		
	5	28	41	5	7	9	3	5	7	Cd		Pb		Ф	С	Г
										10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻⁴			
Azb 1	+	++	+	+	++	++	+	-	-	-	-	*	*	+	+	+
Azb2	+	++	+	+	++	++	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
Azb3	+	++	+	+	++	++	+	+	-	++	++	-	-	-	+	+

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

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

^иФ-фруктоза; С-сахароза; Г-галактоза; + позитивна реакција; - негативна реакција

У овом истраживању забележено је да на подлогама чија је рН вредност 7 и 9 долази до оптималног раста колонија, док код вредности рН 5 долази до минималног раста. На подлогама са додатком 3% NaCl сви изолати су имали минималан раст, док је на истој подлози са додатком 5% NaCl минималан раст забележен код Azb2 и Azb3 док код Azb1 дошло до потпуне инхибиције раста. Код свих изолата овог рода при концентрацији од 7% NaC дошло је до потпуног одсуства раста колоније. Многи аутори наводе да је заступљеност овог рода у киселом земљишту јако слаба, а често се његова присутност

не може ни утврдити (Миличић, 2009). За интензивнији развој азотобактера најповољнија је неутрална средина, довољна количина влаге, органске материје и довољна количина физиолошки активних материја, нарочито фосфора (Aquilanti et al., 2004).

Кадмијум који је примењен у испитивању деловања тешких метала на изолате рода *Azotobacter* у концентрацијама од 10^{-2} и 10^{-4} mol/dm³ није утицао на раст изолата Azb1, док је код Azb2 забележена појава зоне инхибиције у ширини до 10 mm, а код Azb3 зона инхибиције у ширини већој од 10 mm. Концентрације олова које су примењиване нису деловале инхибиторно на Azb2 и Azb3, док је код Azb1 примена олова у овим концентрацијама довела до стимулације раста изолата.

Утврђено је да изолати рода *Azotobacter* као извор угљеника користе све испитиване шећере, осим изолата Azb3 који не користи фруктозу.

Код актиномицете рода *Streptomyces* је при температури од 5°C дошло до потпуне инхибиције раста свих изолата (Табела 8). На температури од 28°C код Act1 и Act3 утврђен је минималан раст, а код Act2 оптималан. При температури од 41°C код Act1 утврђен је минималан раст колоније, а код Act2 и Act3 дошло је до потпуне инхибиције.

Табела 8: Физиолошке особине и утицај тешких метала на раст изолата рода *Streptomyces*

Изолати	Температура ^а (°C)			pH ^а (средине)			NaCl ^а (%)			Тешки метали ^б				Извор угљеника ^ц		
	5	28	41	5	7	9	3	5	7	Cd		Pb		Ф	С	Г
										10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻²	10 ⁻⁴			
Act1	-	+	+	+	++	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Act2	-	++	-	+	++	++	++	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Act3	-	+	-	+	++	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+

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

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

^цФ-фруктоза; С-сахароза; Г-галактоза; + позитивна реакција; - негативна реакција

На подлогама чија је вредност pH 5 забележен је минималан раст колонија свих изолата рода *Streptomyces*, док је на подлози чији је pH 7 раст био оптималан. Код изолата Act1

на подлози чији је рН 9 дошло је до изостанка раста за разлику од Act2 и Act3 који су на овој подлози имали оптималан раст.

На подлогама са додатком 3% NaCl изолати Act1 и Act3 су остварили минималан раст, а Act2 оптималан. На истим подлогама са додатком 5 и 7% NaCl забележена је потпуна инхибиција раста свих изолата рода *Streptomyces* који су испитивани у овом истраживању.

Кадмијум који је примењен у испитивању деловања тешких метала на изолате рода *Streptomyces* у концентрацијама од 10^{-2} и 10^{-4} mol/dm³ није довео до инхибиције раста свих изолата осим при концентрацији од 10^{-2} mol/dm³ код изолата Act1, где је забележена зона инхибиције раста изолата у границама од 1-10 mm. Раствор олова је у обе концентрације код свих изолата рода *Streptomyces* довео до појаве зоне инхибиције у ширини од 1-10 mm.

У овом истраживању утврђено је да изолати рода *Streptomyces* као извор угљеника користе све испитиване шећере, осим изолата Act2 и Act3 који не користе сахарозу.

Ови резултати су у складу са резултатима Abbas (2006), који је утврдио да је оптимална температуру раста актиномицета 25-28°C. У раду Moncheva et al. (2002), 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. Слично резултатима овог рада, у истраживањима (Suneetha et al., 2011) утврђено је да су изолати актиномицета користили глукозу, ксилозу, лактозу, као извор енергије, а да ниједан изолат није користио сахарозу.

5.1.3. Биохемијска карактеризација изолата рода *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter*

Од биохемијских особина у овом раду испитивана је способност изолата да продукују липазу, амилазу, пектиназу, протеазу, целулазу и уреазу.

Утврђено је да сви изолати рода *Bacillus* имају способност да продукују липазу, док је продукција амилазе забележена само код изолата Bac2 (Табела 9). Пектинолитичка активност није доказана ни код једног изолата овог рода, као ни продукција протеаза. Сва три изолата су продуковала целулазу, док је уреазна активност утврђена код Bac2 и Bac3.

Сви изолати рода *Azotobacter* имали су способност продукције екстрацелуларних липаза, као и способност хидролизе скроба која је утврђена код свих изолата овог рода (Табела 9). Пектинолитичка активност утврђена је само ко Azb1, док активност ензима протеазе није забележена ни код једног изолата рода *Azotobacter*. Целулолитичка и уреазна активност утврђена је код свих испитиваних изолата.

Код изолата рода *Streptomyces* способност продукције липаза, способност хидролизе скроба као и ензима пектиназе утврђена је код свих изолата (Табела 9). Активност ензима протеазе забележена је само код Act2. Целулолитичка и уреазна активност није забележена само код изолата Act3.

Табела 9: Биохемијске особине изолата рода *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter*

Изолати	Липаза	Амилаза	Пектиназа	Протеаза	Целулаза	Уреаза
Bac1	+	-	-	-	+	-
Bac2	+	+	-	-	+	+
Bac3	+	-	-	-	+	+
Azb 1	+	+	+	-	+	+
Azb2	+	+	-	-	+	+
Azb3	+	+	-	-	+	+
Act1	+	+	+	-	+	+
Act2	+	+	+	+	+	+
Act3	+	+	+	-	-	-
Процент (%) позитивних изолата	100	77,77	44,44	11,11	88,88	77,77

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

Испитивањем способности изолата да продукују одређене ензиме, способност продукције липаза утврђена је код свих изолата (100%), док је продукција протеаза утврђена код најмањег броја изолата (11,11%). Целулазу је продуковало 88,88% изолата, док је способност продукције амилазе и уреазе забележена код 77,77% изолата. Активност пектиназе је утврђена код 4 изолата (44,44%).

Хидролитички ензими имају кључну улогу у одржавању плодности земљишта. Ови ензими хидролизују комплексна једињења, као што су полисахариди, протеини и уреа у једноставније облике, побољшавајући на тај начин плодност земљишта (Pidwirny, 2006). Осим тога добро је познато да хидролитички ензими могу изазвати парализу и смрт

патогених микроорганизама, посебно гљива (Beneduzi et al., 2012). На тај начин, микроорганизми који имају способност да продукују хидролитичке ензиме, један или више, могу имати примену у борби против низа биљних патогених гљива и бактерија, као и за побољшање раста биљака (Gomes et al., 2001). У овим истраживањима, изолати Azb1, Act1 и Act2 продуковали су највећи број испитиваних ензима, што указује да се ови изолати могу даље испитивати као потенцијални биоагенси за контролу фитопатогена.

Од PGP особина које утичу на раст биљака, у овом истраживању испитиване су способност продукције IAA, сидерофора, HCN и способност минерализације органских једињења фосфора као и растварање нерастворљивих минерала фосфора.

Једна од најважнијих PGP особина је способност продуковања IAA, хормона из групе ауксина, који код биљака контролише бројне физиолошке процесе, укључујући издуживање и деобу ћелије, диференцијацију ткива и одговор на светло, гравитацију и стресне услове спољашње средине (Gupta et al., 2015). У овом истраживању продукција IAA забележена је само код изолата Bac3, док код осталих изолата није дошло до продукције овог хормона (Табела 10).

Табела 10: PGP особине изолата рода *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter*

Изолати	IAA	Сидерофор	HCN	Минерализација фосфора	Солубилизација фосфора
Bac1	-	-	+	+	-
Bac2	-	+	+	-	-
Bac3	+	-	+	+	-
Azb 1	-	+	+	+	-
Azb2	-	+	+	-	-
Azb3	-	+	+	+	-
Act1	-	-	+	-	+
Act2	-	-	+	-	-
Act3	-	-	+	-	+
Процент позитивних изолата (%)	11,11	44,44	100	44,44	22,22

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

Један од начина којима се биљке и бактерије снабдевају гвожђем је продукција молекула мале молекулске масе и високог афинитета према Fe⁺³ тј. сидерофора (Souza

et al., 2015). Од укупног броја испитиваних изолата продукција сидерофора забележена је само код Bac2 и свих изолата рода *Azotobacter* (Azb1, Azb2 и Azb3). За разлику од ових резултата, у истраживањима Stamenov et al. (2021a), где је такође испитивана способност продукције сидерофора код бактерија рода *Bacillus* и *Azotobacter*, сви изолати рода *Bacillus* су продуковали сидерофоре, а азотобактери не.

Продукција HCN као секундарног метаболита који инхибира синтезу АТФ-а и доводи до смрти патогених микроорганизама, забележена је код свих изолата који су испитивани у овом истраживању. Према истраживањима Datta et al. (2011), продукција HCN од стране микроорганизама има за биљку повољан утицај.

Фосфор је есенцијални нутријент за биљке, улази у састав нуклеинских киселина, фосфолипида и АТФ-а и кључни је елемент многих метаболичких и биохемјских путева, као што је биолошка фиксација азота и фотосинтеза (Khan et al., 2007). Способност минерализације органских једињења фосфора и тиме снабдевање биљака овим есенцијалним нутријентом у овом истраживању забележено је код 44,44% испитиваних изолата а то су Bac1, Bac3, Azb1 и Azb3 док код осталих изолата ова карактеристика није доказана. Способност изолата да солубилизују неорганске фосфате забележено је само код 22,22% испитиваних изолата у овом раду тј. само код два изолата Act1 и Act3. Сличне резултате добили су Stamenov et al. (2021b), који су такође утврдили способност минерализације и солубилизације фосфорних једињења код изолата азотобактера и бактерија рода *Bacillus*.

5.2. УТИЦАЈ ПРИМЕНЕ ИЗОЛАТА НА КЛИЈАЊЕ, ИНИЦИЈАЛНИ РАСТ КЛИЦЕ И ПРИНОС ЛЕКОВИТОГ БИЉА

5.2.1. Утицај инокулација семена на клијавост и иницијални раст клице

На основу утврђених морфолошких, физиолошких и биохемјских особина изолата бактерија из рода *Bacillus*, *Streptomyces* и *Azotobacter* из ризосфере коприве (*Urtica dioica* L), као и особина које их сврставају у промоторе биљног раста, за испитивање утицаја изолата на клијавост семена и иницијални раст клице, одабрани су следећи изолати: род *Bacillus* (Bac1, Bac2, Bac3), *Azotobacter* (Azb1), у даљем тексту означено као Azb и *Streptomyces* (Act1), у даљем тексту означено као Act.

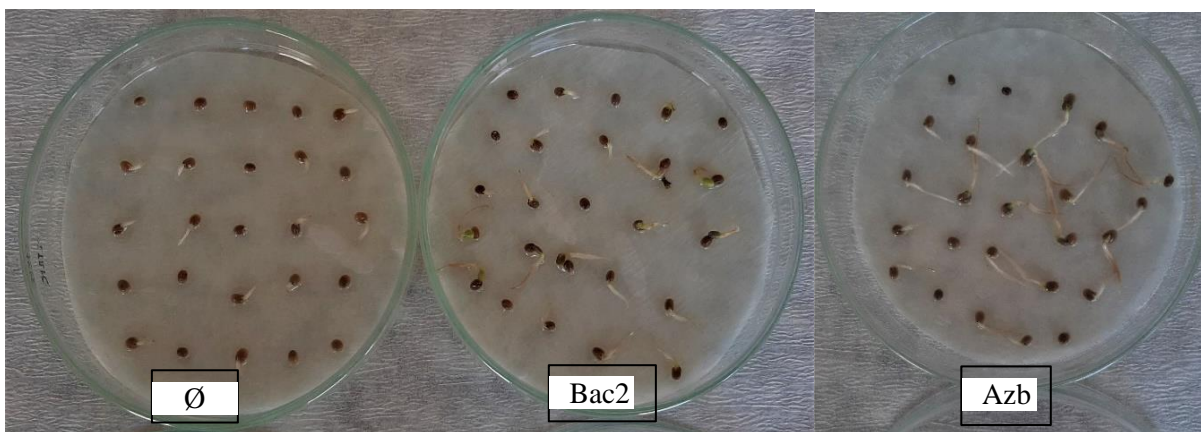
Седам дана након инокулације семена **босиљка**, бројност проклијалих семенки се статистички значајно повећала у свим варијантама у односу на контролу (Табела 11). Највећи проценат клијавости (75%) утврђен је применом изолата актиномицета, док је код примене изолата Azb забележен најслабији ефекат на клијање (48%).

Статистички значајно повећање клијавости у свим варијантама у односу на контролу запажено је и код **жалфије** (Слика 11). Највећа клијавост (96,5%) забележена је применом актиномицета, а најслабији ефекат је имала примена Bac1.

Табела 11: Клијавост семена након 7 дана од инокулације

Изолати	Босиљак		Жалфија		Оригано		Мајоран		Чубар		Першун	
	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
Bac1	10,33cd	51,65	11d	55	6,7d	33,5	3,6b	18	9,3cbd	46,5	10,6d	53
Bac2	11,7c	58,5	16c	80	10,3b	51,5	1,6c	8	11,6b	58	9,7d	48,5
Bac3	10,7cd	53,5	12,d7	60	8,6c	43	1,6c	8	7,3d	36,5	10d	50
Azb	9,6d	48	16,7c	83,5	7,7cd	38,5	1,6c	8	10cb	50	5,3b	26,5
Act	15a	75	19,3a	96,5	10,6b	53	6a	30	8,3cd	41,5	14a	70
контрола	4,7b	23,5	9b	45	1,6a	8	1c	5	2,6a	13	2c	10

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



Слика 11. Утицај изолата Bac2 и Azb на клијање жалфије

(Фото: Оригинал)

Примена испитиваних изолата на семе **оригана** је такође довела до статистички значајног повећања клијања у свим варијантама у односу на контролу. Најбољи резултат остварен је применом изолата Vac2 (51,5%) и Act (53%). Клијавост контроле била је свега 8%.

Инокулацијом семена **мајорана**, до статистички значајног повећања клијавости дошло је само код примене изолата (Vac1 и Act). У осталим варијантама је такође дошло до повећања клијавости али то повећање није било статистички значајно.

Значајно повећање клијавости у свим варијантама у односу на контролу запажено је код **чубра**. Највећа клијавост (58%) забележена је применом изолата Vac2 али нема статистички значајне разлике између Vac1, Vac3 и Act, док је код контроле била најлошија клијавост, свега (13%).

Код **першуна** се бројност проклијалих семенки статистички значајно повећало у свим варијантама у односу на контролу. До највеће клијавости першуна (70%) дошло је применом изолата актиномицета. Најслабији ефекат је постигнут применом изолата Azb. Разлика између изолата Vac1, Vac2 и Vac3 није статистички значајна.

Слично овим резултатима, у радовима појединих истраживања такође је потврђен позитиван утицај изолата на клијавост. Vakonyi et al. (2013) утврдили су повећање клијавости семена од 20% и суве масе клијанаца од 7% након инокулације кукуруза са биођубривом које садржи *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* и *Azotobacter chroococcum*.

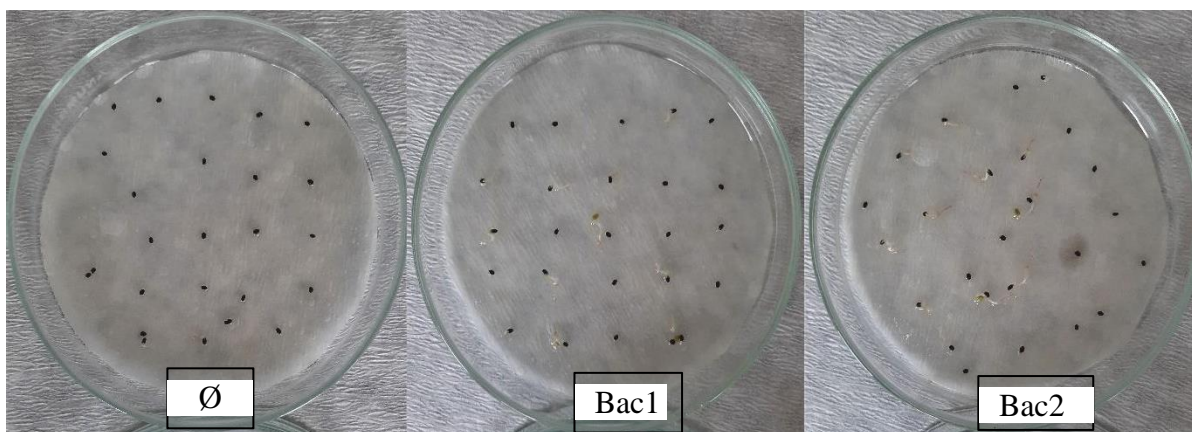
Десет дана након инокулације семена испитиваних лековитих биљака изолатима (Vac1, Vac2, Vac3, Azb и Act), бројност проклијалих семенки се код свих испитиваних биљака статистички значајно повећала, и то у свим варијантама у односу на контролу (Табела 12). Једини изузетак је код **чубра**, где је статистички значајно повећање у односу на контролу забележено само инокулацијом семена изолатима Vac1 и Vac2 (Слика 12). Клијавост **босиљка** је била најбоља применом изолата Act (76,5%), док између осталих изолата нема статистички значајних разлика. До 100% клијавости је дошло код **жалфије** инокулацијом изолата Act, док између осталих варијанти (Vac1, Vac2, Vac3, Azb) није било статистички значајне разлике. Клијавост **оригана** је била најбројнија применом изолата Vac2, Vac3 и Azb. Највећи проценат клијавости код **мајорана** изазвала је

инокулација са Act (46,5%), док је код **першуна** то било у варијанти где је примењен Bac1 и Act.

Табела 12: Клијавост семена након 10 дана од инокулације

Изолати	Босиљак		Жалфија		Оригано		Мајоран		Чубар		Першун	
	број	%	број	%	Број	%	број	%	број	%	број	%
Bac1	12d	60	16,7c	83,5	12cd	60	6,3c	31,5	13,3a	66,5	15,6cb	78
Bac2	14cb	70	17c	85	14b	70	5cd	25	14,7a	73,5	14,3cd	71,5
Bac3	11,6d	58	18c	90	13bcd	65	4,3d	21,5	10,3b	51,5	14,3cd	71,5
Azb	12,3cd	61,5	17,6c	88	13,7bc	68,5	4,6cd	23	11,3b	56,5	13d	65
Act	15,3b	76,5	20a	100	11,7d	58,5	9,3a	46,5	10b	50	17,3b	86,5
Контрола	8,7a	43,5	9,3b	46,5	7,7a	38,5	2b	10	9,7b	48,5	4a	20

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



Слика 12. Утицај изолата Bac1 и Bac2 на клијање семена чубра након 10 дана

(Фото: Оригинал)

Позитиван учинак инокулације бактеријама на клијавост и индекс виталности лековитих биљака такође су константовали Lenin i Jayanthi (2012). Khaosaad et al. (2006) су добили сличне резултате инокулацијом семена оригана RGP бактеријама и добили позитиван ефекат на клијање, дужину изданка и биомасу биљке.

Како су најбољи ефекти примене инокулације на клијавост семена постигнути код босиљка, жалфије, чубра и першуна, у даљем току истраживања, испитиван је утицај изолата на дужину клице код ове четири биљке. Одређивана је дужина коренка и стабаоцета након 10, 14 и 21 дана.

Резултати испитивања ефекта инокулације изолата (Ваc1, Ваc2, Ваc3, Azb и Act), на иницијални раст клице, односно на дужину коренка и стабаоцета испитиваних лековитих биљака (босиљак, жалфија, чубар и першун), приказани су у табелама 13, 14 и 15 и на фотографијама (13, 14, 15, 16 и 17).

Десет дана након инокулације семена **босиљка**, дошло је до статистички значајних разлика у расту коренка инокулацијом Ваc3, Azb и Act у односу на контролу. Код примене осталих изолата дошло је до повећања дужине коренка али то повећање није довело до статистички значајне разлике. Дужина стабаоцета босиљка је значајно повећана у свим варијантама инокулације у односу на контролу, а примена актиномицета је имала најбољи ефекат (Табела 13).

Табела 13: Дужина коренка и стабаоцета (mm) након 10 дана од инокулације

Изолати	Босиљак		Жалфија		Чубар		Першун	
	коренак	стабаоце	коренак	стабаоце	коренак	стабаоце	коренак	стабаоце
Ваc1	7,0c	16,0 d	24,7e	12,4a	7,6e	18,7d	9,7d	24,0d
Ваc2	8,0c	16,4dc	29,7b	17,7d	8,4b	19,8d	9,2d	16,3b
Ваc3	10,4b	17,9c	24,6e	20,9c	6,0c	14,7a	14,8a	26,25a
Azb	10,1b	15,7d	19,7c	18,2d	9,0b	25,0c	12,0b	23,5ed
Act	12,7a	26,2a	42,2a	20,0c	11,3a	30,0c	9,7d	22,1e
Контрола	6,0c	9,5b	13,7d	7,5b	3,7d	7,6b	4,8c	11,0c

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

Дужина коренка **жалфије** се статистички значајно повећала у свим варијантама инокулације, а најбољи ефекат постигнут је применом актиномицета где је просечна дужина коренка износила 42,2mm а најслаби ефекат применом изолата Azb . На дужину стабаоцета жалфије значајно су утицали сви примењени изолати.

Код **чубра** је утврђено да су сви примењени третмани довели до статистички значајног повећања дужине коренка, а најбољи ефекат је постигнут применом изолата Act. Дужина стабаоцета чубра након десет дана је била највећа применом изолата Azb и Act али и код осталих третмана је дошло до статистички значајног повећања дужине у односу на контролу.

Код **першуна** је након десет дана од инокулације утврђено је статистички значајно повећање дужине коренка и стабаоцета у свим варијантама у односу на контролу, а најбољи ефекат је постигнут применом Вас3.

Четрнаест дана након инокулације семена **босиљка** дужина коренка се статистички значајно повећала у свим варијантама осим код примене Вас2 где повећање није било статистички значајно (Табела 14). Дужина стабаоцета босиљка је значајно повећана у свим варијантама инокулације у односу на контролу, а примена Azb и Act је имала најбољи ефекат.

Табела 14: Дужина коренка и стабаоцета (mm) након 14 дана од инокулације

Изолати	Босиљак		Жалфија		Чубар		Першун	
	коренак	стабаоце	коренак	стабаоце	коренак	стабаоце	коренак	стабаоце
Вас1	10,6a	18,8b	28,5d	28,3d	8,0e	26,5c	13,3d	28,1a
Вас2	8,5b	22,2c	30,0a	25,3b	9,0b	19,8e	18,6e	17,5b
Вас3	13,2c	22,0c	27,8d	32,5a	7,8e	23,5d	19,7e	35,1c
Azb	13,3c	26,2a	30,6c	29,6d	10,7b	34,7b	28,3a	35,9c
Act	13,3c	25,2a	47,3cd	29,0d	15,3a	38,3a	25,7b	34,7c
Контрола	7,3b	15,8d	14,3b	13,0c	4,2d	14,5f	16,0c	17,3b

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

Дужина коренка **жалфије** се статистички значајно повећала у свим варијантама инокулације, а најбољи ефекат постигнут је применом актиномицета где је просечна дужина коренка износила 47,3mm. На дужину стабаоцета жалфије значајно су утицали сви примењени изолати у односу на контролу.

Код **чубра** је утврђено да су сви примењени третмани довели до статистички значајног повећања дужине коренка, а најбољи ефекат је постигнут применом изолата Act. Дужина стабаоцета чубра након четрнаест дана је била највећа применом изолата Azb и Act али и код осталих инокулација је дошло до статистички значајног повећања дужине у односу на контролу.

Дужина коренка **першуна** након четрнаест дана од инокулације се статистички значајно повећала у свим варијантама, осим код примене изолата Вас1, где је дошло до

негативног ефекта и мање дужине коренка у односу на контролу. Најбољи ефекат је постигнут применом изолата Azb. Дужина стабаоцета першуна је значајно повећана у свим варијантама инокулације, осим код третмана Vac2 где није дошло до статистички значајне разлике у односу на контролу.

Двадесет један дан након инокулације семена, дужина коренка **босиљка** је значајно већа у односу на контролу у свим варијантама осим код инокулације са Vac2 где није дошло до статистички значајног повећања коренка (Табела 15). Дужина стабаоцета босиљка је статистички значајно повећана у свим варијантама инокулације у односу на контролу, а примена Act је имала најбољи ефекат (Слика 13), док између Vac1, Vac2, Vac3 и Azb нема статистички значајне разлике.

Табела 15: Дужина коренка и стабаоцета (mm) након 21 дана од инокулације

Изолати	Босиљак		Жалфија		Чубар		Першун	
	коренак	стабаоце	коренак	стабаоце	коренак	стабаоце	коренак	стабаоце
Vac1	11,0d	30,3c	37,3a	47,3e	15,6c	45,3d	17,1f	41,0e
Vac2	9,7ed	31,6c	40,7de	47,6e	9,6b	44,3d	30,3b	21,3c
Vac3	18,7b	30,3c	39,3e	33,6c	9,3b	42,3b	23,7d	38,7b
Azb	13,3c	30,0c	28,3b	38,7b	16,0c	44,3d	35,7a	42,1e
Act	21,6a	40,0a	41,6d	50,0a	16,6c	55,1a	26,7c	48,3a
Контрола	8,0e	16,3b	17,3c	22,3d	5,0a	16,1c	21,0e	19,0d

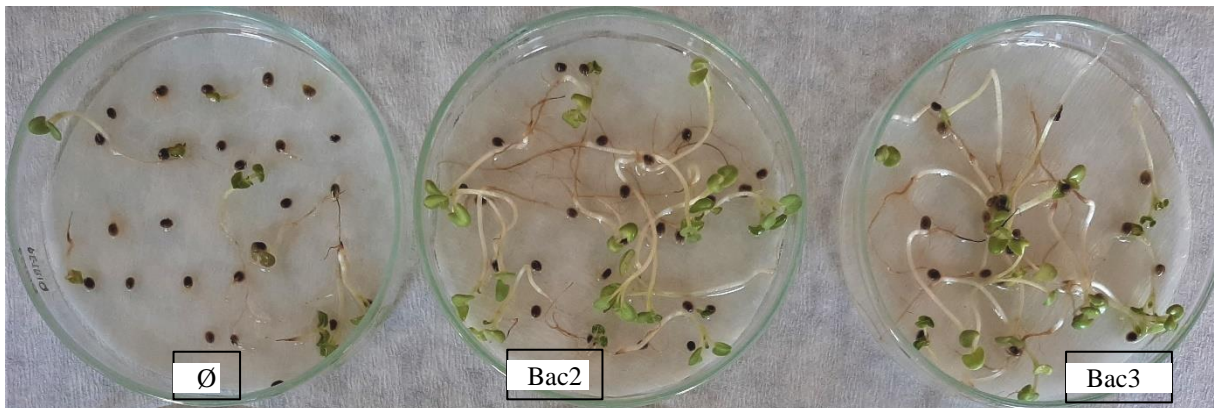
Вредности са различитим словним ознакама се према Фишеровом тесту статистички значајно разликује за $P < 0,05$



Слика 13. Утицај изолата Azb и Act на дужину коренка и стабаоцета босиљка

(Фото: Оригинал)

Статистички значајно повећање коренка **жалфије** утврђено је у свим варијантама инокулације у односу на контролу, где је забележена дужина коренка 17,3mm док је код инокулације изолатама Ваc2, Ваc3 (Слика 14) и Асt дужина коренка значајно већа.



Слика 14. Утицај изолата Ваc2 и Ваc3 на дужину коренка и стабаоцета жалфије

(Фото: Оригинал)

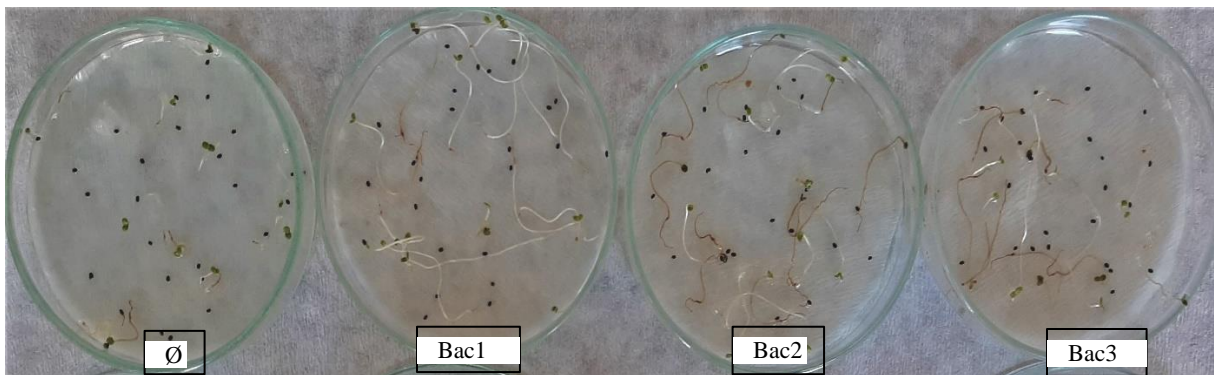
На дужину стабаоцета жалфије значајно су утицали сви примењени изолати у односу на контролу, а најбољи ефекат је био инокулацијом Асt (Слика 15).



Слика 15. Утицај изолата Azb и Act на дужину коренка и стабаоцета жалфије

(Фото: Оригинал)

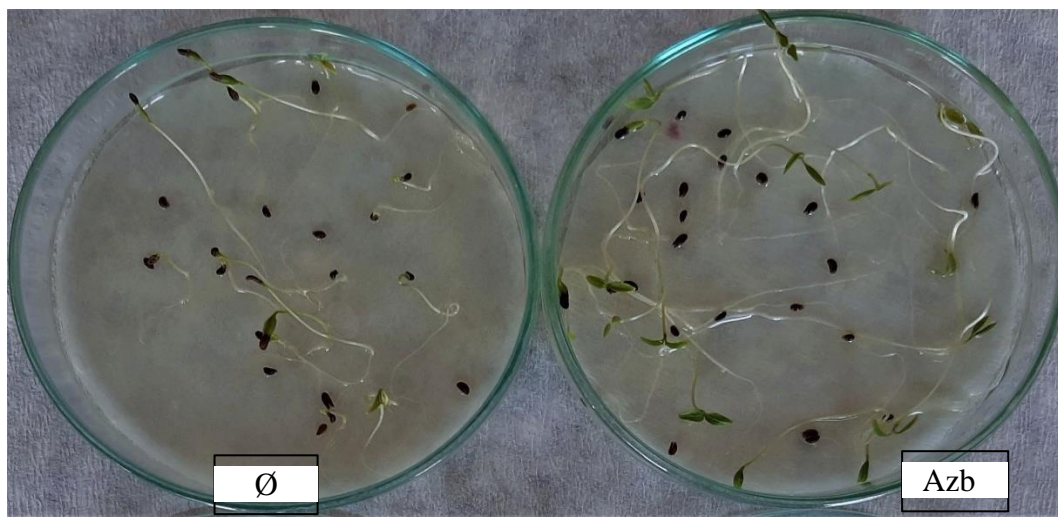
Код **чубра** је утврђено да су сви примењени третмани довели до статистички значајног повећања дужине коренка, док између Ваc1, Azb и Act нема статистички значајне разлике. Дужина стабаоцета чубра је драстично повећања у свим варијантама у односу на контролу (Слика 16). Најбољи ефекат је запажен инокулацијом семена са Act где је дужина стабаоцета 55,1mm, док је код контроле 16,1mm.



Слика 16. Утицај изолата Bac1, Bac2 и Bac3 на иницијални раст клице код чубра

(Фото: Оригинал)

Дужина коренка **першуна** након двадесет једног дана од инокулације се статистички значајно повећала у свим варијантама, осим код примене изолата Bac1, где је дошло до негативног ефекта и мање дужине коренка у односу на контролу. Најбољи ефекат постигнут је применом изолата Azb (Слика 17). Дужина стабаоцета першуна је статистички значајно повећана у свим варијантама инокулације. Најбољи ефекат је постигнут применом изолата Act у односу на контролу.



Слика 17. Утицај изолата Azb на на дужину коренка и стабаоцета першуна

(Фото: Оригинал)

Позитиван ефекат примене микроорганизама на дужину коренка и стабаоцета, односно на раст клице, утврђен је у многим истраживањима. Тако је у раду Stamenov et al. (2021b) забележен позитиван утицај примене изолата рода *Azotobacter*, *Pseudomonas* и *Bacillus* на дужину коренка и стабаоцета тимијана. Wu et al. (2005), су доказали да је

употреба PGP бактерија (*Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mucilaginosus*) резултирала у већој биомаси и дужини клијанца, као и већој асимилацији хранива (N, P и K) у биљкама кукуруза. Dawwam et al. (2013) су забележили стимулативан утицај инокулације са *Bacillus cereus* на раст слатког кромпира. Након месец дана овај изолат је довео до повећања висине надземног дела за 87% и биомасе надземног дела за 39%.

5.2.2. Утицај инокулације на масу свеже и суве материје, дужину надземног дела и корена биљке

На основу биохемијских, физиолошких и PGP особина, као и резултата примене изолата на проценат клијавости и дужину коренка и стабаоцета клице, одабрани су најнефективнији изолати (Вас3, Azb и Act) за испитивање утицаја изолата на принос биљке, односно на дужину стабла и корена босиљка и жалфије, као и свежу и суву масу биљака након 6 недеља.

Шест недеља након инокулације семена **босиљка**, запажен је позитиван ефекат примене свих изолата на дужину корена, али то повећање није било статистички значајно (Табела 16).

Табела 16: Принос биљака након 6 недеља од инокулације

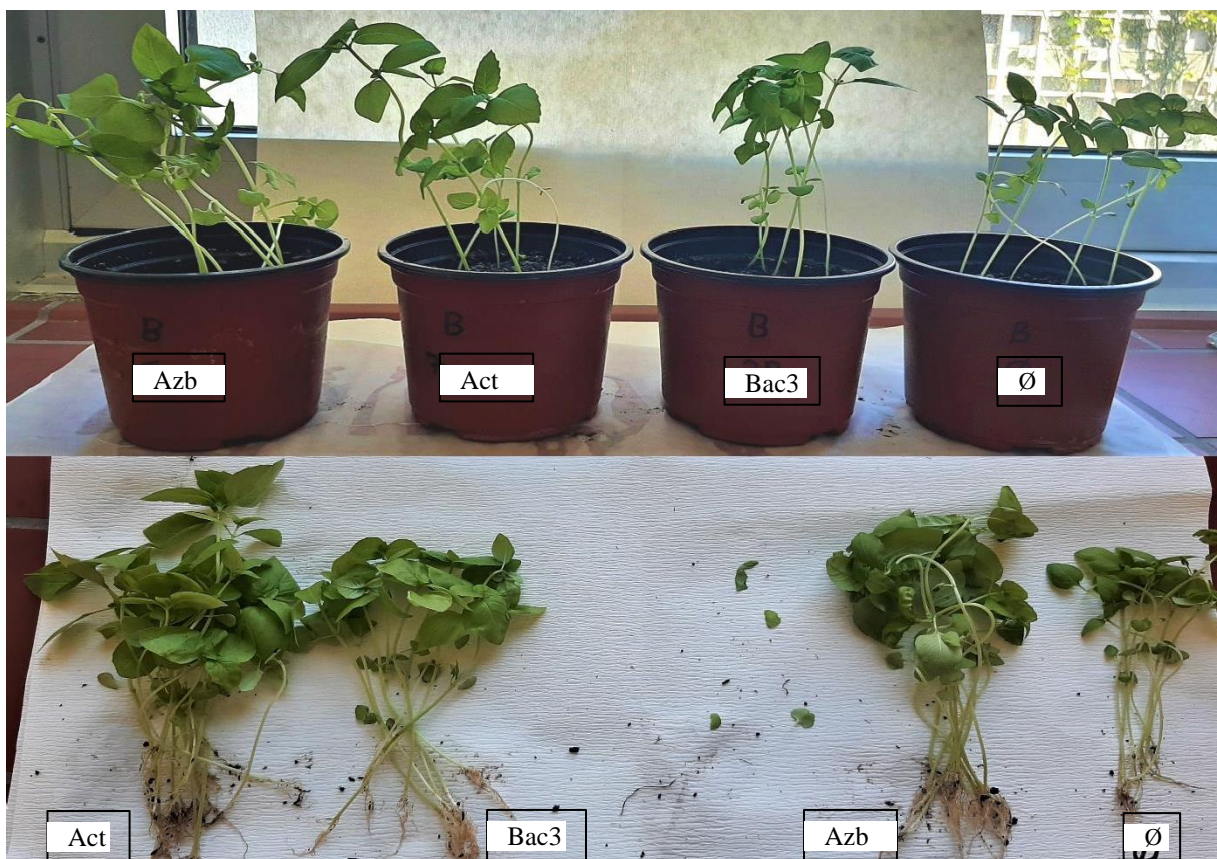
Изолати	Босиљак				Жалфија			
	корен (cm)	стабло (cm)	свежа маса(g)	сува маса(g)	корен (cm)	стабло (cm)	свежа маса(g)	сува маса(g)
Вас3	4,6a	13,3cb	13,8c	1,6a	5,1ab	9,0a	10,2c	0,70c
Azb	4,7a	17,0a	18,7a	1,2c	5,5a	10,8a	13,0a	0,67c
Act	4,1a	14,9b	14,0c	1,2c	4,4b	10,4a	11,1c	0,97a
Контрола	3,1a	12,5c	8,3b	1,0b	5,2ab	9,6a	6,25b	0,57b

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

На дужину стабла босиљка утицали су сви примењени изолати, али до статистички значајног повећања стабла дошло је применом изолата Azb и Act (Слика 18).

Маса свеже и суве материје босиљка се статистички значајно повећала у свим варијантама инокулације у односу на контролу. Најбољи ефекат на свежу масу босиљка

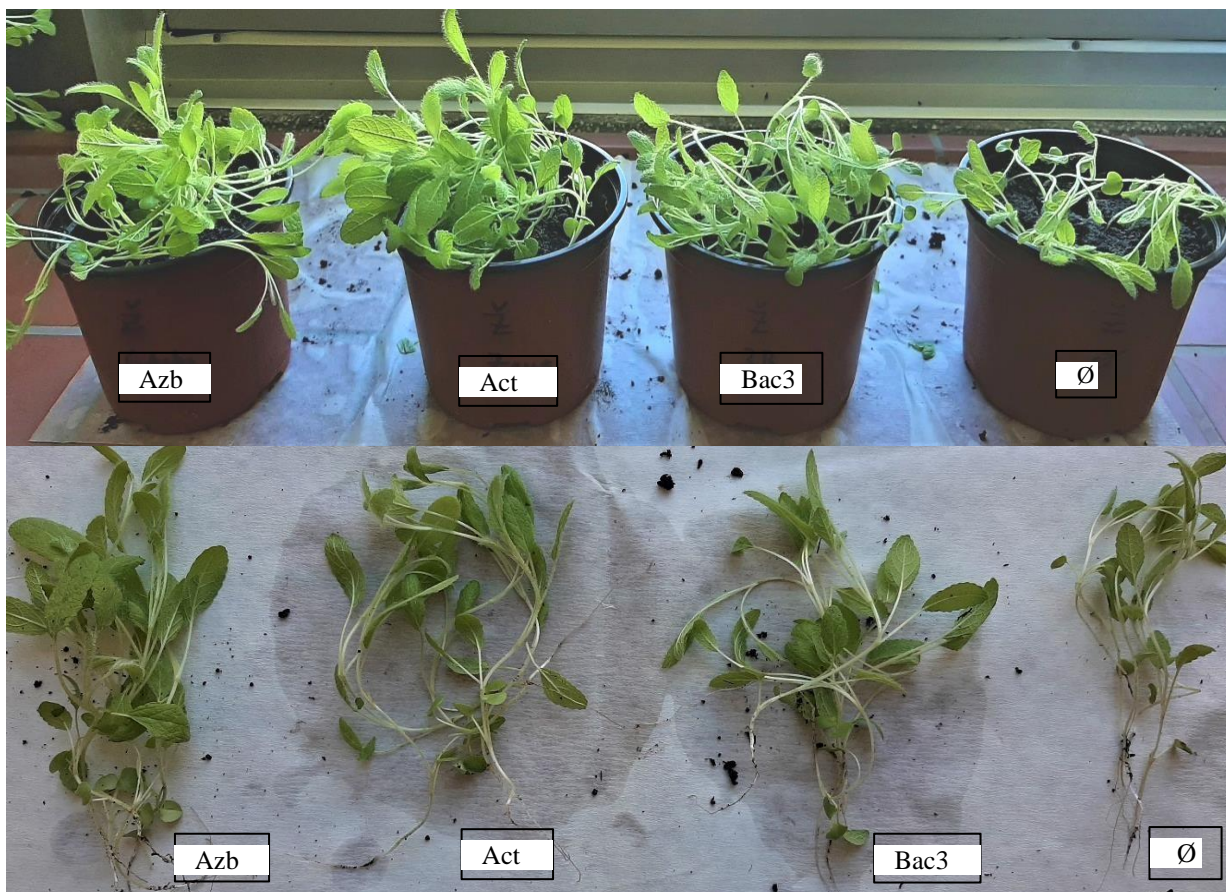
постигнут је применом Azb, док је највећи утицај на повећање суве масе имао изолат Bac3. Ови резултати су у складу са резултатима Carpellari et al. (2013) и Çakmakçi (2016). Они су у својим истраживањима добили позитиван ефекат, односно повећање биомасе младица и корена различитих лековитих и ароматичних биљака које су инокулисане PGP бактеријама .



Слика 18. Позитиван утицај бактеријских изолата (Act, Bac3 и Azb) на раст босиљка
(Фото: Оригинал)

Код **жалфије** након шест недеља од инокулације семена изолатима Bac3, Azb и Act, није дошло до статистички значајне разлике у дужини корена и стабла у односу на контролну варијанту. Са друге стране, код свих примењених изолата утврђено је статистички значајно повећање свеже и суве масе у односу на контролу. Најбољи ефекат на свежу масу жалфије постигнут је применом изолата Azb, док највећи утицај на повећање суве масе имао изолат Act (Слика 19). Слични резултати су добијени у истраживању Sachin et al. (2009) где је утврђена повећана дужина корена, висина

надземног дела и сува маса биљке након инокулације кукуруза са *Azotobacter chroococcum*.



Слика19. Позитиван утицај бактеријских изолата (Azb, Act и Bac3) на раст жалфије

(Фото: Оригинал)

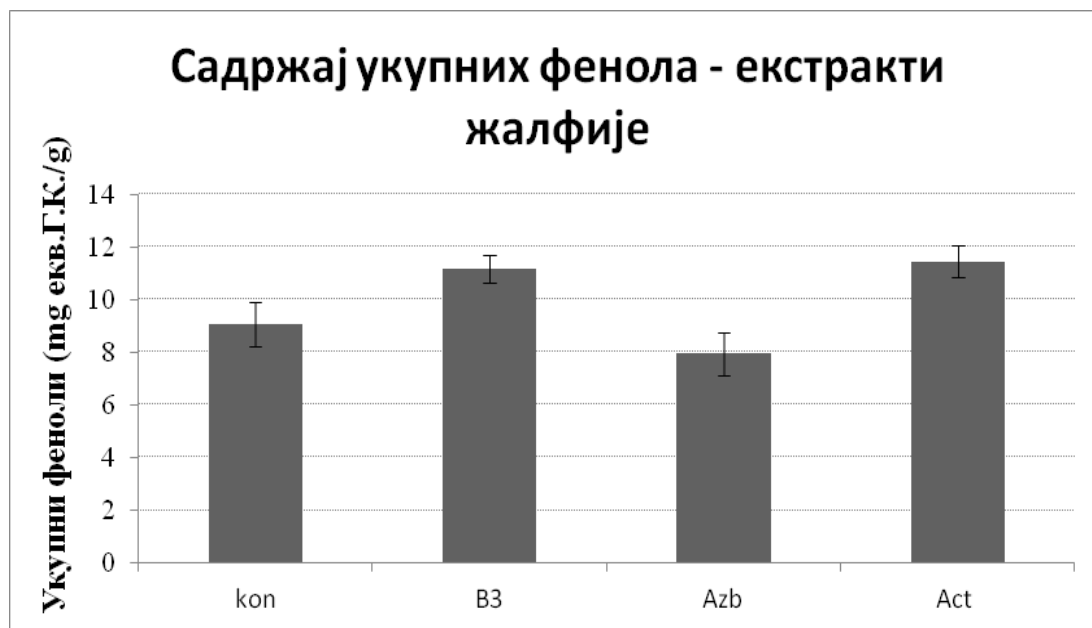
Ефекти итеракције биљака са тестираним изолатима у овом истраживању су различити. Продуктивност инокулације зависи од особина инокулума, али на успех инокулације битно утиче и састав коренских ескудата као и способност бактеријске колонизације корена (Souza et al., 2015), што доприноси изражавању различитих ефеката у односу на биљну врсту. Добијени резултати у овом истраживању су у складу са резултатима других истраживача који указују на то да ефекти PGP бактерија зависе од природе самог изолата, његове популације, концентрације инокулума, али и итеракције биљака и бактерија (Dobbelaere et al.; 2002; Sahin et al., 2004; Çakmakçi et al., 2006).

5.3. БИОХЕМИЈСКИ ПАРАМЕТРИ

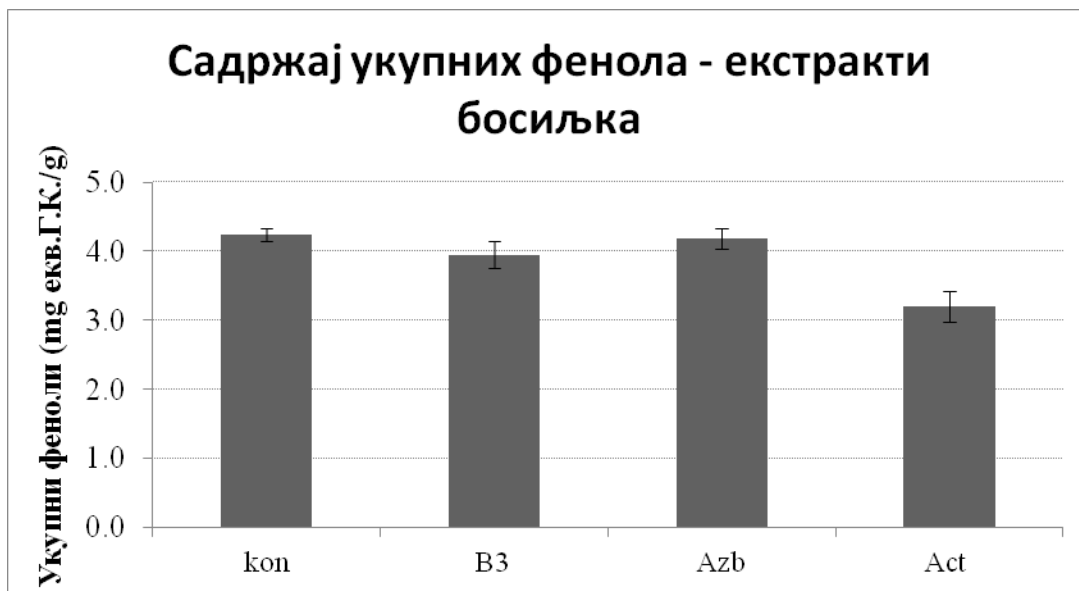
У последњем делу истраживања, испитан је утицај одабраних изолата на биохемијске параметре (садржај укупних фенола, флавоноида и антиоксидативна активност) у биљном материјалу жалфије и босиљка.

5.3.1. Садржај укупних фенола

Резултати одређивања укупних фенола у екстрактима жалфије дати су на Хистограму 1. На Хистограму 2. приказани су резултати одређивања укупних фенола у екстрактима босиљка.



Хистограм 1. Утицај инокулације на садржај укупних фенола у екстрактима жалфије.



Хистограм 2. Утицај инокулације на садржај укупних фенола у екстрактима босиљка.

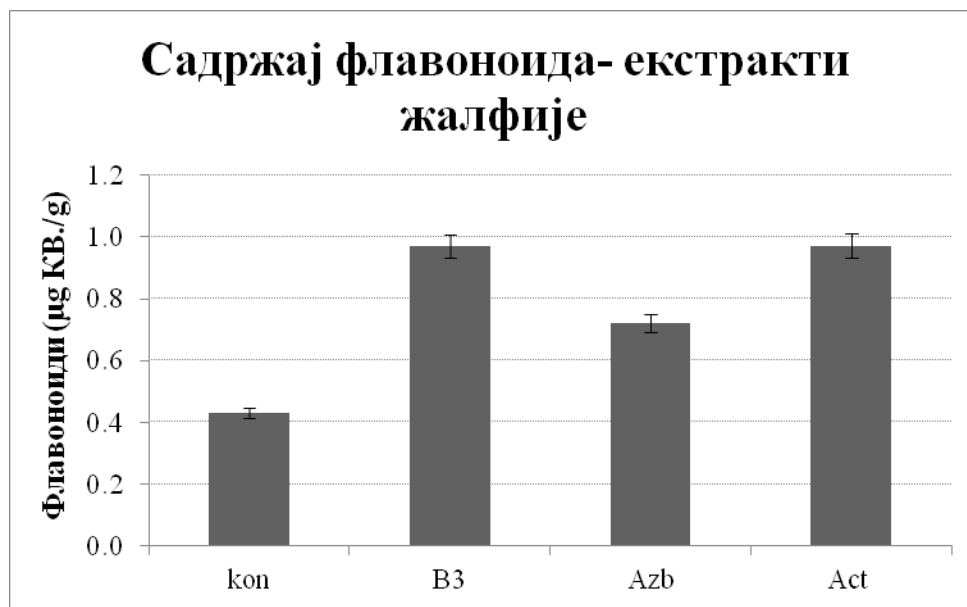
Садржај укупних фенола у екстрактима жалфије и босиљка изражен је у mg еквивалената галне киселине (Г.К.) по граму суве масе хербе (mg екв. Г. К./g) и у контролама је износио 9,06 mg екв. Г. К./g (жалфија) и 4,24 mg екв. Г. К./g (босиљак). Садржај укупних фенола у екстрактима жалфије добијених од биљака инокулисаних са Вас3 и Act се повећао у односу на контролу и износи: 11,16 mg екв. Г. К./g и 11,44 mg екв. Г. К./g редом. Под утицајем инокулације жалфије са Azb, садржај укупних фенола се смањио (7,95 mg екв. Г. К./g) у односу на контролу. Код босиљка нису забележене значајне промене садржаја укупних фенола при инокулацији биљака са Вас3 и Azb (3,95 mg екв. Г. К./g и 4,18 mg екв. Г. К./g), док је инокулација са Act довела до смањења садржаја укупних фенола (3,20 mg екв. Г. К./g) у односу на контролу.

Фенолна једињења су секундарни биомолекули у биљкама који су веома важни за раст и развој биљака, посебно у стресним условима. Широм света, овим једињењима се даје велика пажња због њихове заштитне улоге током оксидативних оштећења узрокованих различитим болестима као што су канцер, кардиоваскуларне болести и неуродегенеративна оштећења. Уколико би се неким експерименталним третманима постигло повећање садржаја фенолних једињења тиме би се побољшао квалитет саме

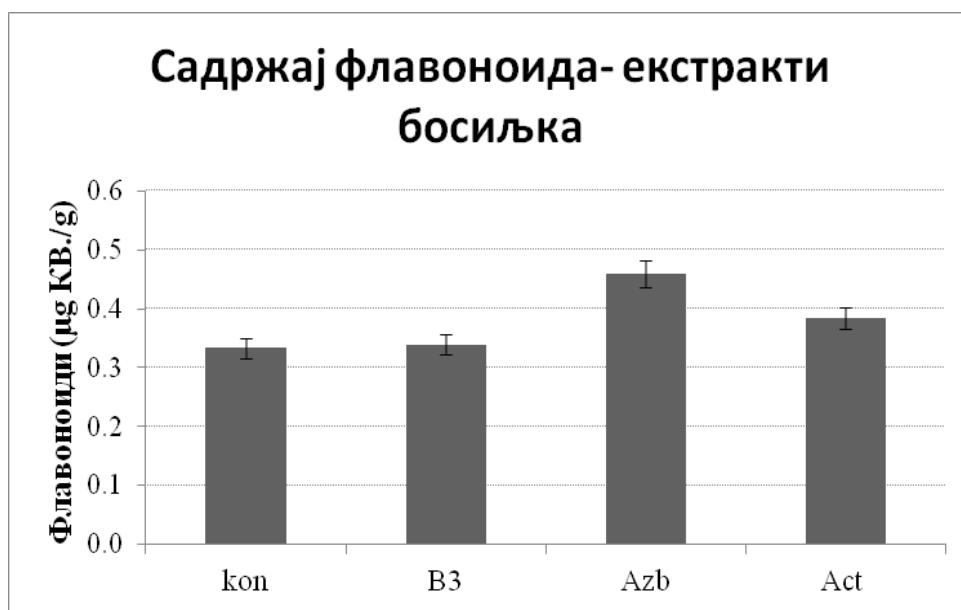
биљке и садржај фитохемикалија са позитивним здравственим ефектом. Према резултатима са Хистограма 1 и 2 може се закључити да садржај фенолних једињења у жалфији и босиљку варира при различитим експерименталним третманима. У истраживању спроведеном на спанаћу инокулисаном различитим PGPR, Khalid et al. (2017) истичу да се садржај укупних фенола повећао за 50% у односу на контролу. Резултати добијени за жалфију су у складу са резултатима Ghorbanpour et al. (2015) који су утврдили повећање садржаја укупних фенола у жалфији при инокулацији са другим PGPR.

5.3.2. Садржај флавоноида

Резултати одређивања флавоноида у екстрактима жалфије дати су на Хистограму 3. На Хистограму 4. приказани су резултати одређивања флавоноида у екстрактима босиљка.



Хистограм 3. Утицај инокулације на садржај флавоноида у екстрактима жалфије.



Хистограм 4. Утицај инокулације на садржај флавоноида у екстрактима босиљка.

Садржај флавоноида у екстрактима жалфије и босиљка изражен је у μg еквивалената кверцетина (КВ.) по граму суве масе хербе (μg екв. КВ./g) и у контролама је износио 0,430 μg екв. КВ./g (жалфија) и 0,334 μg екв. КВ./g (босиљак).

Код екстракта жалфије добијених од биљака инокулисаних са PGPR садржај се повећао у односу на контролу и износи: 0,970 μg екв. КВ./g (Bac3), 0,722 μg екв. КВ./g (Azb) и 0,972 μg екв. КВ./g (Act). Под утицајем инокулације босиљка са Azb одређено је највеће повећање садржај флавоноида (0,459 μg екв. КВ./g) у односу на контролу, док је код третмана са Bac3 садржај флавоноида био на нивоу контроле.

5.3.3. Антиоксидантна активност

Антиоксидантна активност у екстрактима жалфије и босиљка је измерена редукцијом слободног радикала DPPH. Резултати су приказани у Табели 17. као АРК вредност (антирадикалски капацитет), односно реципрочна вредност концентрације узорка при којој је неутралисано 50% DPPH радикала. Приказани резултати одређивања антиоксидантне активности у екстрактима жалфије указују на повећање антиоксидантне активности екстракта жалфије услед третмана са PGPR. Такође, из резултата добијених за екстракте босиљка јасно је да је само третман са Azb довео до значајног повећања

антиоксидантне активности, док је при осталим третманима антиоксидантна активност екстракта на нивоу контроле или мања.

Табела 17: Резултати одређивања антиоксидантне активности

Третмани	АРК вредност	
	Жалфија	Босиљак
Контрола	0,57	0,14
Вас3	0,89	0,15
Azb	0,99	0,21
Act	1,33	0,10

Полифеноли представљају биолошки активна једињења са израженим антиоксидантним особинама. Повећање антиоксидантне активности екстракта при третманима је уочено и у истраживању аутора Khalid et al. (2017), који су показали и позитивну корелацију антиоксидантне активности екстракта спанаћа са садржајем флавоноида. Такође, након инокулације са различитим PGPR, у херби жалфије је дошло до повећане акумулације флавоноида и фенола које је било у позитивној корелацији са повећаном антиоксидантном активности екстракта (Ghorbanpour et al., 2015).

6. ЗАКЉУЧАК

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

1. Изолати означени као *Bac1*, *Bac2*, *Bac3* припадају роду *Bacillus*, изолати *Azb1*, *Azb2*, *Azb3* припадају роду *Azotobacter*, а изолати *Act1*, *Act2*, *Act3* роду *Streptomyces*.
2. Сви изолати рода *Bacillus* су имали оптималан раст на температури од 28°C, док је изолат *Bac1* растао и на 5°C, а *Bac3* на 41°C. Киселост средине није утицала на раст изолата овог рода, као и ниже концентрације NaCl и олова. Изолати рода *Bacillus* као извор угљеника користе све испитиване шећере као извор угљеника, осим изолата *Bac2* који не користи сахарозу. Код свих изолата је утврђена способност продукције липазе и целулазе. Само изолат *Bac3* је продуковао IAA, а изолат *Bac2* сидерофоре. Сви изолати су показали способност продукције HCN. Способност да минерализују једињења фосфора утврђена је код изолата *Bac1* и *Bac3*.
3. Оптималан раст изолата рода *Azotobacter* забележен је на температури од 28°C, док је при температурама од 5 и 41°C забележен минималан раст код свих изолата овог рода. Вредност рН подлоге, као и концентрација соли утицала је различито на раст појединих изолата овог рода. Кадмијум је сузбио раст изолата *Azb2* и *Azb3*. Код изолата *Azb1* примена олова довела је до стимулације раста изолата. Утврђено је да изолати рода *Azotobacter* као извор угљеника користе све испитиване шећере, осим изолата *Azb3* који не користи фруктозу. Сви изолати су продуковали липазу, амилазу, целулази, уреазу, као и сидерофоре и HCN. Изолати *Azb1* и *Azb2* имају способност минерализације органских једињења фосфора.

4. Изолати рода *Streptomyces* нису расли на температури од 5°C, а на 41°C растао је само изолат Act1. Вредност рН подлоге није у потпуности инхибирао раст изолата, осим изолата Act1. Високе вредности соли у подлози, инхибирале су раст ових изолата. Олово је инхибирало раст свих изолата, а кадмијум само раст изолата Act1. У овом истраживању утврђено је да изолати рода *Streptomyces* као извор угљеника користе све испитиване шећере, осим изолата Act2 и Act3 који не користе сахарозу. Продукција липазе, амилазе, пектиназе и HCN утврђена је код свих изолата овог рода. Изолати Act1 и Act2 имају способност да разлажу неорганска једињења фосфора.
5. Инокулација семена различитог лековитог биља одабраним изолатима имала је позитиван утицај на клијавост и иницијални раст клице код свих биљака. У просеку, на клијавост семена, најбољи ефекат имала је примена изолата Act, и то код босиљка (76,5%), жалфије (100%), мајорана (46,5%) и першуна (86,5%). Код оригана и чубра, најбоља клијавост је забележена у варијанти где је примењен изолат Bac2 (70 и 73,5%, редом). Након 21 дана од постављања огледа, на дужину коренка и стабаоцета клице, најбољи ефекат постигнут је применом изолата Act, и то код босиљка, жалфије и чубра, док је код першуна то било применом изолата Azb.
6. Примена одабраних изолата имала је позитиван утицај на све испитиване параметре приноса и код босиљка и код жалфије. Најбољи ефекат на дужину стабла и корена, као и на тежину свеже и суве масе биљке, постигнут је применом изолата Azb, и то код обе биљке.
7. Примена одабраних изолата имала је различити утицај на испитиване биохемијске параметре у биљном материјалу. Садржај укупних фенола у екстрактима жалфије добијених од биљака инокулисаних са Bac3 и Act се повећао, док се под утицајем инокулације са Azb, садржај укупних фенола се смањио, у односу на контролу. Код босиљка нису забележене значајне промене садржаја укупних фенола при инокулацији биљака са Bac3 и Azb, док је инокулација са Act довела до смањења садржаја укупних фенола у односу на контролу. Садржај флавоноида код екстракта жалфије добијених

од биљака инокулисаних са PGPR био је већи у односу на контролу. Под утицајем инокулације босиљка са Azb одређено је највеће повећање садржаја флавоноида у односу на контролу, док је код третмана са Вас3 садржај флавоноида био на нивоу контроле. Резултати одређивања антиоксидантне активности у екстрактима жалфије указују на повећање антиоксидантне активности екстракта жалфије услед третмана са PGPR. Код екстракта босиљка само је третман са Azb довео до значајног повећања антиоксидантне активности, док је при осталим третманима антиоксидантна активност екстракта на нивоу контроле или мања.

8. Применом микроорганизама изолованих из ризосфере коприве, могу се постићи позитивни ефекти у производњи босиљка и жалфије. Изолати Вас3, Azb и Act показали су се као најефективнији. Ови изолати могу послужити као основа за даља истраживања и осмишљавање техничког решења за производњу микробиолошког препарата којим би се унапредила производња и подигао квалитет приноса различитих врста лековитог биља, а пре свега босиљка и жалфије.

7. ЛИТЕРАТУРА

- Abbas, I.H. (2006): A Biological and Biochemical Studies of Actinomycetes Isolated from Kuwait Saline Soil-Kuwait. *Journal of Applied Science Research*, 2(10): 809-815.
- Ahemad, M., Kibret, M. (2014): Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University Science*, 26: 1-20.
- Ahmad, R., Arshad, M., Khalid, A., Zahir, Z.A. (2008): Effectiveness of organic-/bio-fertilizer supplemented with chemical fertilizers for improving soil water retention, aggregate stability, growth and nutrient uptake of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*, 31(4): 57-77.
- Aini, N., Dwi Yamika, W. S., Ulum, B. (2019): Effect of nutrient concentration, PGPR and AMF on plant growth, yield and nutrient uptake of hydroponic lettuce. *International Journal of Agriculture and Biology*, 21 (1): 75–183.
- Ainsworth, E., Gillespie, K. (2007): Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2: 875–877.
- Amin, M., Rakhisi, Z.A.Z. (2015): Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties, *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 2 (1): 10-13.
- Aquilanti, V., Lombardi, A., Littlejohn, R. (2004): Hyperspherical harmonics for polyatomic systems: basis set for collective motions. *Theoretical Chemistry Accounts*, 111: 400–406.
- Aslantas, R., Cakmakci, R., Fiahin, F. (2007): Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple trees growth and fruit yield under orchard conditions. *Scientia Horticulture*, 111: 371-377.

- Bafana, A., Lohiya, R. (2013): Diversity and metabolic potential of culturable root-associated bacteria from *Origanum vulgare* in sub-Himalayan region. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29:63–74.
- Bákonyi, N., Bott, S., Gajdos, É., Szabó, A., Jakab, A., Tóth, B., Makleit, P., Veres, S. (2013): Using Biofertilizer to Improve Seed Germination and Early Development of Maize. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22: 1595-1599.
- Barriuso, J., Solano, B.R. (2008): Ecology, Genetic Diversity and Screening strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Journal of Plant Nutrition*, 1-17.
- Bashan, Y., De-Bashan, L.E. (2010): How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth a critical assessment. *Advances in Agronomy*, 108:77–136.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M.P. (2012): Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Journal of Genetics and Molecular Biology*, 35 (4): 1044-1051.
- Berg, G. (2009): Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84:11-48.
- Bhardwaj, D., Ansari, M.W., Sahoo, R.K., Tuteja, N. (2014): Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, 13: 1-10.
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K. (2012): Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 1327-1350.
- Çakmakçı, R. (2016): Screening of multi-trait rhizobacteria for improving the growth, enzyme activities, and nutrient uptake of tea (*Camellia sinensis*). *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47 (13–14): 1680–1690.
- Cappellari, L.D.R., Santoro, M.V., Nievas, F., Giordano, W., Banchio, E. (2013): Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology*, 70:16–22.

- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C. (2002): Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3):178-182.
- Compant, S., Van der Heijden, M.G.A., Sessitsch, A. (2010): Climate change effects in beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiology Ecology*, 73:197–214.
- Danish, S., Zafar-ul-Hye, M., Hussain, M., Shaaban, M., Núñez-Delgado, A., Hussain, S., Qayyum, M. F. (2019): Rhizobacteria with ACC-deaminase activity improve nutrient uptake, chlorophyll contents and early seedling growth of wheat under PEG-induced osmotic stress. *International Journal of Agriculture and Biology*, 21 (6): 1212–1220.
- Datta, M., Palit, R., Sengupta, C., Pandit, M. K., Banerjee, S. (2011): Plant growth promoting rhizobacteria enhance growth and yield of chilli (*Capsicum annuum* L.) under field conditions. *Australian Journal of Crop Science*, 5 (5): 531–536
- Dawwam, G. E., Elbeltagy, A., Emara, H. M., Abbas, I. H., Hassan, M. M. (2013): Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Science*, 58: 195-201.
- Devi, K.K., Seth, N., Kothamasi, S., Kothamasi, D. (2007): Hydrogen cyanideproducing rhizobacteria kill subterranean termite *Odontotermes obesus* (Rambur) by cyanide poisoning under in Vitro Conditions. *Current Microbiology*, 54: 74–78.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., Vanderleyden, J. (2002): Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils*, 36: 284–297.
- El-Tarabily, K.A. (2008): Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant and Soil*, 308:161-174.
- Esmailpour, A., Hassanzadehdelouei, M., Madani, A. (2013): Impact of livestock manure, nitrogen and biofertilizer (*Azotobacter*) on yield and yield components wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Cercetari Agronomice in Moldova*, 46 (2): 5–15.

- Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clause, M.L., Courrier, 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
- Fuentes-Ramírez, L.E., Caballero-Mellado, J. (2006): Bacterial biofertilizers. In: Z.A. Siddiqui (ed). *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Netherlands, 143-172.
- García, J.A.L., Probanza, A., Ramos, B., Palomino, M.R., Mañero, F.J.G. (2004): Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomie for Sustainable Development*, 24 (Suppl 4): 169-176.
- García-Fraile, P., Menéndez, E., Rivas, R. (2015): Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioengineering*, 2: 183-205.
- Gehring, P.J., Mohan, R.J., Watamare, P.G. (1993): Solvents, fumigants and related compounds. In: *Handbook of Pesticide Toxicology*, Vol. 2, (Eds. Hayes WJ and Laws ER.), Academic Press, inc., San Diego, California, 646-649.
- Ghorbanpour, M., Hatami, M. (2013): PGPR strains affect seedling vigor index and seed secondary metabolites accumulation of black henbane under drought stress. *Trakia Journal of Sciences*, 11:135–143.
- Ghorbanpour, M., Hatami, M., Kariman, K., Khavazi, K. (2015): Enhanced efficiency of medicinal and aromatic plants by PGPRs. Egamberdieva D. et al. (eds). *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants*. *Soil Biology*, 42 (3): 43–70.
- Ghosh, S., Sengupta, C., Maiti, T.K., Basu, P.S. (2008): Production of 3-indolylacetic acid in root nodules and culture by a *Rhizobium* species isolated from root nodules of the leguminous pulse *Phaseolus mungo*. *Folia Microbiologica*, 53: 351–355.
- Glick, B.R. (2012): *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Hindawi Publishing Corporation Scientica, 1-15.
- Gomes, L.T.A.S., Sêmedo, R.M.A., Soares, L.F., Linhares, C., Ulhoa, C.S., Alviano, R.R.R. (2001): Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated

- from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 653-661.
- Gopalakrishnan, S., Kiran, B.K., Humayun, P., Vidya, M.S., Deepthi, K., Jacob, S., Vadlamudi, S., Alekhya, G., Rupela, O. (2011a): Biocontrol of charcoal-rot of sorghum by Actinomycetes isolated from herbal vermicompost. *African Journal Biotechnology*, 10:18142–18152.
- Govedarica, M., Jarak, M. (1999) : Mikrobiologija zemljišta, Poljoprivredni fakultet, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.
- Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K., Singh, V. (2015): Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Microbial and Biochemical Technology*, 7: 96-102.
- Gupta, R.P., Kalia, A., Kapoor, S. (2007): Bioinoculants: a step towards sustainable agriculture. New India, New Delhi. ISBN 108189422219.
- Gusain, P., Bhandari, B. S. (2019): Rhizosphere associated PGPR functioning. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8 (5): 1181–1191.
- Hajnal Jafari, T., Stamenov, D., Đurić, S. (2020): Proizvodnja i primena biopreparata, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Hariprasad, P., Niranjana, S.R. (2009): Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant and Soil*, 316:13–24.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. (2010): Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60:579–598
- Hiltner, L. (1904): Uber neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Beru"cksichtigung der Gru"ndung und Brache. *Arb Dtsch Landwirtsch Ges Berl, (in German)*, 98:59–78.
- Huang, X.F., Chaparro, J.M., Reardon, K.F., Zhang, R., Shen, Q., Vivanco, J.M. (2014): Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*, 92: 267-275.

- Hugh, R., Leifson, E., (1953): The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 66(1):24–26.
- Hungria, M., Nogueira, M. A., Araujo, R. S. (2013): Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: Strategies to improve sustainability. *Biology and Fertility of Soils*, 49: 791-801.
- Ilic, S.B., Konstantinovic, S.S., Todorovic, Z.B., Lazic, M.L., Veljkovic, V.B., Jokovic, N., Radovanovic, B.C. (2007): Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. *Microbiology*, 76:421-428.
- Jahanian, A., Chaichi, M.R., Rezaei, K., Rezayazdi, K., Khavazi, K. (2012): The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination and primary growth of artichoke (*Cynara scolymus*). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4:923–929.
- Jalili, F., Khavazi, K., Pazira, E., Nejati, A., Rahmani, H.A. , Sadaghiani H.R. (2009): Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *Journal of Plant Physiology*, 166: 667-674.
- Jarak, M., Đurić, S. (2006): *Praktikum iz mikrobiologije*. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
- Jarak, M., Đurić, S., Đukić, D. (2007): Uticaj inokulacije na klijanje i početni rast i razvoj lucerke i crvene deteline. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad*, 42 (1): 415-421.
- Jarak, M., Jević, M., Đurić, S., Jakovljević, J. (2006): Primena združene inokulacije u proizvodnji graška. *Letopis naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta*, 30 (1): 53-59.
- Jimenez, D.J., Montana, J.S., Martinez, M.M. (2011): Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable grown in Columbia soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 846.

- Joo, M. H., Hur, S.H., Han, Y.S., Kim, J.Y. (2007): Isolation, identification and characterization off *Bacillus* strains from the traditional Korean soybean-fermented food. *Journal of Applied Biology and Chemistry*, 50 (4):202-210.
- Karagoz, K., Ates, F., Kotan, R., Cakmakci, K. (2012): Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from the rhizosphere of gravine grown in alkaline and acidic soils. *European Journal of Soil Biology*, 50: 144-150.
- Khalid, M., Hassani, D., Bilal, M., Asad, F., Huang, D. (2017): Influence of bio-fertilizer containing beneficial fungi and rhizospheric bacteria on health promoting compounds and antioxidant activity of *Spinacia oleracea* L. *Botanical Studies*, 58:35.
- Khamna, S., Yokota, A., Lumyong, S., (2009): Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 649–655.
- Khan, A.A., Jilani, G., Akhtar, M.S., Naqvi, S.M.S., Rasheed, M. (2009): Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agricultural Biology Science*, 1(1):48–58.
- Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A. (2007): Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. *Agronomy for Sustainable Development*, 27: 29–43.
- 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.
- Koeberl, M., Schmidt, R., Ramadan, E.M., Bauer, R., Berg, G. (2013): The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality, and health. *Frontiers in Microbiology*, 4:400.
- Kuffner, M., Puschenreiter, M., Wieshammer, G., Gorfer, M., Sessitsch, A. (2008): Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant and Soil*, 304: 35-44.

- Kurrey, D.K., Sharma, R., Lahre, M.K., Kurrey, R.L. (2018): Effect of *Azotobacter* on physio-chemical characteristics of soil in onion field. *Pharmaceutical Inn. Journal*, 7(2):108–113.
- Lanyi, B. (1987):. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods in Microbiology*, 19:1–67.
- Lenin, G., Jayanthi, M. (2012): Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on enhancement of growth, yield and nutrient content of *Catharanthus roseus*. *International Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2:37–42.
- Li, H., Johnson, P., Stepanova, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R. (2005): Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis*. *Development Cell*, 7: 193–204.
- Liu, Y., Zuo, S., Zou, Y., Wang, J., Song, W. (2013): Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. *Annals of Microbiology*, 63:71–79.
- Martyniuk, S., Martyniuk, M. (2003): Occurrence of *Azotobacter* spp. in some Polish soils. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12 (3):371–374.
- McNear, D.H. Jr. (2013): The rhizosphere – roots, soil and everything in between. *Nature Education Knowledge*, 4(3):1.
- Miličić, D. (2009): Mikroorganizmi u kiselim zemljištima: brojnost, aktivnost i efekat inokulanata. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Moncheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V., Antonova-Nikolova, S., Bogatzevska, N. (2002): Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. *Journal of Culture Collections*, 3: 3-14.
- Mrkovački, N., Čačić, N., Kuzevski, J., Kovačev, L., Mezei, S., Nagl, N., Bjelić, D. (2010): Uticaj načina primene *Azotobacter chroococcum* na mikroorganizme u rizosferi i prinos šećerne repe. *Soil Microbiology, Field and Vegetables Crops Research*, 47: 599-606.

- Nakkeeran, S., Fernando, W.G., Siddiqui, Z.A. (2005): Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. In: Siddiqui ZA (ed) PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer, Dordrecht, 257–296.
- Nawangsih, A., Wahyudi, A.T., Astuti, R.P., Widyawati, A., Meryandini, A., (2011): Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. Journal of Microbiology and Antimicrobiology, 3:34–40.
- Nisa, R.M., Irni, M., Amaryllis, A., Sugeng, S., Iman, R. (2010): Chitinolytic bacteria isolated from chili rhizosphere: chitinase characterization and its application as biocontrol for whitefly (*Bemisia tabaci* Genn). American Journal of Agricultural and Biology Sciences, 5 (4): 430–435.
- Ongena, M., Duby, F., Jourdan, E., Beaudry, T., Jadin, V., Dommes, J., Thonart, P. (2005): *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. Applied Microbiology and Biotechnology, 67:692-698.
- Onofre-Lemus, J., Hernández-Lucas, I., Girard, L., Caballero-Mellado, J. (2009): ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. Applied Environmental Microbiology, 75:6581–6590.
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., Sahin, F. (2006): Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. Scientia Horticulturae, 111 (suppl 1): 38-43.
- Oskay, M., Tamer, A.U., Azeri, C. (2004): Antibacterial activity of some Actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. African Journal of Biotechnology, 3, 9: 441- 446.
- Pidwirny, M. (2006): Biogeochemical cycling: Inputs and outputs of nutrients to ecosystems. Fundamentals of Physical Geography, 2nd Edition. <http://www.physicalgeography.net/fundamentals/9p.html>.

- Podile, A.R., Kishore, G.K., (2006): Plant growth-promoting rhizobacteria. In: Gnanamanickam, S.S. (Ed.), Plant-Associated Bacteria. Springer, Netherlands, 195–230.
- Popović, B., Štajner, D., Ždero Pavlović, R., Blagojević, B., Mičić, N. (2020): Praktikum iz hemije sa teorijskim osnovama, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Prajapati, K., Yami, K.D., Singh, A., (2008): Plant growth promotional effect of *Azotobacter chroococcum*, *Piriformospora indica* and vermicompost on rice plant. Nepal Academy of Science and technology, 9: 85–90.
- Prathap, M., Kumari, B.D.R. (2015): Critical review on plant growth promoting rhizobacteria. Journal of Plant Pathology and Microbiology, 6: 1-4.
- Rezzonico, F., Zala, M., Keel, C., Duffy, B., Moénne-Loccoz, Y., Défago, G. (2007): Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection. New Phytology, 173:861-872.
- Richardson, A.E., Simpson, R.J. (2011): Soil microorganisms mediating phosphorus availability. Plant Physiology, 156: 989–996.
- Rodina, A.G. (1972): Methods in Aquatic microbiology. Ed. Colwell, R. and Zambruski, M.. University Park Press, Baltimore and butterworth and Co Ltd. London.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Pare, P.W. (2004): Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. Plant Physiology, 134:1017–1026.
- Sachin, D.N. (2009): Effect of *Azotobacter chroococcum* (PGPR) on the growth of bamboo (*Bambusa bamboo*) and maize (*Zea mays*) plants. Biofrontiers, 1: 37-46.
- Sahin, F., Çakmakçı, R., Kantar, F. (2004): Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. Plant and Soil, 265: 123-129.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., Bhatti, A.S. (2007): Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. Indian Journal of Microbiology and Biotechnology, 34:635–648.

- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998): A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of Food and Agriculture Sciences*, 76: 270–276.
- Sharma, S. K., Ramesh, A., Johri, B. N. (2013): Isolation and characterization of Plant Growth-Promoting *Bacillus amyloliquefaciens* Strain sks_bnj_1 and its influence on Rhizosphere Soil Properties and Nutrition of Soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Journal of Virology and Microbiology*, 1-19.
- Shoebitz, M., Ribaudó, C.M., Pardo, M.A., Cantore, M.L., Ciampi, L., Curá, J.A. (2009): Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:1768–1774.
- Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., Hussain Sheikh, I., Khan, A. (2006): Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 22: 641–650.
- Singh, S.K., Pancholy, A., Jindal, S.K., Pathak, R. (2011): Effect of plant growth promoting rhizobia on seed germination and seedling traits in Acacia Senegal. *Annals of Forest Research*, 54:161–169.
- Soares, M.M., da Silva, R., Carmona, E.C, Gomes, E. (2001): Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 79-82.
- Somers, E., Vanderleyden, J., Srinivasan, M. (2004): Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*, 30: 205-235.
- Souza, R., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. P. (2015): Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38: 401-419.
- Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Vanderleyden, J. (2008): Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*, 312:15–23.

- Stamenov, D., Jarak M. (2010): Polyvalent inoculum: Influence on growth of *Trifolium pratense* and survival of *Azotobacter*, Proceedings (Currently on the CD) of 7. Th Balkan congress of microbiology, Mikromed 2010, 03-05. 06., Belgrade.
- Stamenov, D. (2014): Kkarakterizacija mikroorganizama promotora rasta i njihovo preživljavanje u rizosferi engleskog ljlja. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Stamenov, D., Đurić, S., Hajnal Jafari, T. (2021a): Biostimulatory potential of microorganisms from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) rhizospheric soil, Contemporary agriculture, 70 (3-4):108-115.
- Stamenov, D., Đurić, S., Hajnal Jafari, T., Anđelković, S. (2021b): Autochthonous plant growth-promoting rhizobacteria enhance *Thymus vulgaris* growth in well-watered and drought-stressed conditions, Zemdirbyste-Agriculture, 108 (4): 347–354.
- Suneetha, V., Karthick, R., Prathusha, K. (2011): Isolation and identification of *Streptomyces* ST1 and ST2 strains from Tsunami affected soils: Morphological and biochemical studies. Journal of Oceanography and Marine Science, 2(4): 96-101.
- Suzuki, S., Yamamoto, K., Okuda, T., Nishio, M., Nakanishi, N., Komatsubara, S. (2000): Selective isolation and distribution of *Actinomadura rugatobispora* strains in soil. Actinomycetologic. Actinomycetoma, 14:27-33.
- Swain, M.R., Naskar, S.K., Ray, R.C. (2007): Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of Yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. Polish Journal of Microbiology, 56: 103–110.
- Swain, M.R., Ray, R.C. (2009): Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora, Microbiological Research, 164 (2): 121-130.
- Szilagyi-Zecchin, V.J., Ikeda, A.C., Hungria, M., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Glienke, C., Galli-Terasawa, L.V. (2014): Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. AMB Express. doi:10.1186/s13568-014-0026-y.

- Vargas-Arispuro, I., Contreras-Valenzuela, A., Marti'nez-Te'llez, M. (2009): Lignans from *Larrea tridentata* (creosote bush) as fungal β -1,3-glucanase inhibitors. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 94:60–63.
- Wertz, C., Degrange, V., Prosser J.I., Poly F., Commeaux C., Guillaumaud N., Le Roux X. (2007): Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance, *Environmental Microbiology*, 9: 2211-2219.
- Whang, K.S., Lee, J.C., Lee, H.R., Han, S.I., Chung, S.H. (2014): *Terriglobus tenax* sp. nov., an exopolysaccharide-producing Acidobacterium isolated from rhizosphere soil of a medicinal plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64:431–437.
- Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheug, K.C., Wong, M.H. (2005): Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125: 155-166.
- Yegorenkova, I.V., Tregubova, K.V., Burygin, G.L., Matora, L.Y., Ignatov, V.V. (2016): Assessing the efficacy of co-inoculation of wheat seedlings with the associative bacteria *Paenibacillus polymyxa* 1465 and *Azospirillum brasilense* Sp245. *Canadian Journal of Microbiology*, 62: 279-285.
- Zahir, Z.A., Arshad, M., Frankenberger, W.T.J. (2003): Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advanced Agronomy*, 81: 97–168.
- 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.
- Zhao, K., Penttinen, P., Chen, Q., Guan, T.W., Lindstrom, K., Ao, X.L, Zhang, L.L., Zhang, X.P. (2012): The rhizospheres of traditional medicinal plants in Panxi, China, host a diverse selection of actinobacteria with antimicrobial properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94:1321–1335.

Zhao, Z., Zhang, X., Tan, Z., Guo, J., Zhu, H. (2013): Isolation and identification of cultivable myxobacteria in the rhizosphere soils of medicinal plants. *Acta Microbiologica Sinica*, 53:657–668.

[https://](https://fertainz.co.nz/) ([https://](https://fertainz.co.nz/) Azotobacter - Beneficial Microbes (fertainz.co.nz))