

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

ПРОИЗВОДЊА И ПРИМЕНА МИКРОБИОЛОШКОГ ПРЕПАРАТА
„BACILLOMIX SPECIJAL“

МАСТЕР РАД

Кандидат :

Наташа Дошен 115/2014 М

Ментор:

Доцент др. Симонида Ђурић

Комисија за оцену и одбрану Мастер рада:

Др. Симонида Ђурић, Доцент, ужа научна област Микробиологија
27.02.2012. године, Пољопривредни факултет, Нови Сад, ментор.

Др. Даринка Богдановић, Редован професор, ужа научна област
Педологија и Агрохемија, 06.07.1996, Пољопривредни факултет, Нови Сад,
председник комисије,

Др. Ивана Максимовић, Редован професор, ужа научна област
Физиологија биљака, 24.05.2007., Пољопривредни факултет, Нови Сад,
члан комисије.

САДРЖАЈ

Резиме	3
Summary.....	4
1. Увод	6
2. Преглед литературе	8
2.1. Микробиолошка ђубрива (биофертилизатори)	8
2.2. Микроорганизми- стимулатори раста биљака	9
2.3. Ризобактерије	10
2.4. Основне карактеристике бактерија из рода <i>Bacillus sp.</i>	10
2.4.1. Биопестициди на бази бактерија из рода <i>Bacillus sp.</i>	11
2.4.2. Улога бактерија из рода <i>Bacillus</i> у биоремедијацији земљишта	14
3. Радна хипотеза	16
4. Циљ истраживања	17
5. Материјал и методе рада	18
5.1. Узимање узорка земљишта	18
5.2. Одређивање бројности микроорганизама у земљишту	20
5.3. Изолација аутохтоних сојева <i>Bacillus sp.</i>	20
5.4. Одређивање морфолошких карактеристика сојева из рода <i>Bacillus sp.</i> ..	21
5.5. Одређивање физиолошких карактеристика сојева из рода <i>Bacillus sp.</i> ..	22
5.6. Одређивање физиолошких карактеристика сојева из рода <i>Bacillus sp.</i> ..	23
5.7. Продукција материја раста	24
5.8. Умножавање изолованих сојева <i>Bacillus sp.</i> у течној култури	25
5.9. Провера ефективности добијених изолата на различитим биљним	26
културама у различитим производним условима	
5.10. Регистрација микробиолошког ђубрива као „ <i>Bacillomix Specijal</i> “	26
6. Резултати истраживања	27
6.1. Бројност микроорганизама у земљишту	27
6.2. Морфолошке карактеристике изолованих сојева <i>Bacillus sp.</i>	29
6.3. Физиолошке карактеристике изолованих сојева из рода <i>Bacillus sp.</i> ..	35
6.4. Продукција материја раста	46
6.5. Ефективност добијених изолата на различитим биљним културама у ..	48
заштићеном простору	
6.6. Ефективност добијених изолата на различитим биљним културама у ..	50
пољским условима	
7. Закључак	52
8. Литература	56
9. Биографија	62

РЕЗИМЕ

Биофертилизатори су препарати који садрже одабране културе микроорганизама који се користе у инокулацији семена и расада или се уносе у земљиште како би се интензивирали одређени микробиолошки процеси којима се повећава садржај приступачних хранива за биљку. Циљ овог истраживања је био да се од изолата *Bacillus sp.* који су изоловани из земљишта са локалитета Кисач , Футог и Ченеј произведе микробиолошко ђубриво „ BACILLOMIX SPECIJAL “ .

У лабораторијским условима је вршено умножавање и испитивање морфолошких и физиолошких особина 12 изолата *Bacillus sp.* Одређивање морфолошких особина сојева обухватило је одређивање морфологије колоније и морфологије ћелије. У оквиру физиолошких особина одређиван је однос према извору угљеника, раст на различитим температурама, раст на подлогама различите киселости и различитим концентрацијама NaCl, одређивана је отпорност према антибиотицима, тешким металима и пестицидима .

Провера ефективности добијених изолата је вршена на следећим пољопривредним културама : пшеници , јечму , кукурузу, шећерној репи, и купусу. Огледи са јечмом, пшеницом и кукурузом изведени су у полуконтролисаним условима у PVC контејнерима са хумусним супстратом. Огледи са шећерном репом и купусом спроведени су у производним условима, на земљишту типа чернозем у атару Ченеја и Кисача.

Пошто бактерије имају добру способност преживљавања при интродукцији и повољно утичу на раст биљке , 19.02.2014. године је регистровано микробиолошко ђубриво „ BACILLOMIX SPECIJAL “ од стране Министарства пољопривреде , шумарства и водопривреде Републике Србије .

SUMMARY

Biofertilizers are preparations containing selected cultures of microorganisms used in the inoculation of seeds and seedlings, or introduced into the soil in order to intensify certain microbiological processes that increase the content of available nutrients for the plant . The aim of this study was that of a *Bacillus* sp. which were isolated from soil from the site Kisač , Futog and Čenej produce organic fertilizer " BACILLOMIX SPECIAL " .

Multiplication and examination of morphological and physiological characteristics of 12 isolates of *Bacillus* sp. were done in laboratory conditions. Determination of morphological characteristics of strains included colony and cell morphology. Within the physiological characteristics attitude towards the source of carbon, growth at different temperatures , growth on substrates of different pH values and different concentrations of NaCl, resistance to antibiotics, heavy metals and pesticides were determined .

Checking the effectiveness of isolates was based on the following agricultural crops: wheat, barley, corn, sugar beets, and cabbage. The experiments with barley, wheat and corn are made in semi-controlled conditions in plastic containers with humus substrate. The trials with sugar beet and cabbage were conducted under production conditions, on a chernozem soil in the area of Čenej and Kisač.

Since bacteria have a good ability to survive in the introduction and favorably influence the growth of plants, 19.02.2014. were registered as microbiological fertilizer "BACILLOMIX SPECIAL" by the Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management of Republic of Serbia .

Овом приликом желим да се захвалим:

Дамиру Манчић, породичном пријатељу и пословном партнеру, директору АМАКС, d.o.o. Нови Сад, на великој подршци у превазилажењу разних потешкоћа на које смо наилазили приликом производње микробиолошког ђубрива „Bacillomix специјал“ и на указаном поверењу да заједничким снагама уђемо у овај посао.

Др Симониди Ђурић, свом ментору, на свој несебичној помоћи и подршци током експерименталног рада и током писања ове тезе, на свим саветима, а изнад свега на њеном ентузијазму и вери у мој рад који се дешавао у моментима моје борбе за ЖИВОТ.

Др Мирјани Јарак, на указаним стручним смерницама на самом почетку експерименталног рада.

Лаборанту Елени Ступавски, на свој несебичној помоћи и знању које ми је указала приликом рада у лабораторији.

Посебну захвалност дугујем свом супругу Ђорђу, на безграничној помоћи, љубави и подршци у моментима када су ми заиста били преко потребни.

Својим родитељима, сестри и свим осталим добрим људима, које сам назвала мојим анђелима, јер су се нашли на мом путу у протекле две године и помогли да победим у борби за ЖИВОТ.

И на крају се морам захвалити и самом производу „Bacillomix специјал“, јер ми је давао вољу за корак напред и онда када је баш и нисам имала.

Овај рад посвећујем својој деци Страхињи и Антонини, који су извор моје среће и без којих мој ЖИВОТ не би имао смисла.

1. УВОД

Интезивна обрада земљишта, примена тешке механизације, примена превеликих количина минералних ђубрива и пестицида доводе до деградације земљишта и нарушавања природне равнотеже између организама у земљишту. Да би се ови негативни ефекти смањили, све више се указује потреба за применом микроорганизама који би великим делом могли заменити минерална ђубрива и пестициде. Осим тога, њиховом применом повећавају се микробни диверзитет, плодност земљишта и исхрана биљака.

Усавршавањем метода за изолацију и добијање чистих култура микроорганизама омогућено је детаљно упознавање њихових морфолошких, физиолошких, биохемијских и генетских својстава. У биљној производњи се чисте културе микроорганизама примењују за производњу микробиолошких ђубрива – биофертилизатора, стимулатора раста и препарата за заштиту биљака од болести и штеточина- биопестицида.

Биофертилизатори су препарати који садрже одабране културе микроорганизама који се користе у инокулацији семена и расада или се уносе у земљиште како би се интезивирали одређени микробиолошки процеси којима се повећава садржај приступачних хранива за биљку. Биофертилизатори су допуна минералним и органским ђубривима, а само код неких биљних врста, као што су легуминозе, могу се користити као једина ђубрива.

Умножавање микроорганизама за микробиолошка ђубрива врши се на одговарајућим течним и чврстим хранљивим подлогама. Савремени погони за производњу микробиолошких ђубрива обезбеђени су ферменторима у којима се осим хранљивих састојака обезбеђује оптимална температура, аерација и рН. Умножени микроорганизми са високим бројем живих ћелија (висок титар) у стационарној фази користе се за припрему различитих форми микробиолошких ђубрива - влажна, течна и ђубрива у праху (Јарак и Чоло, 2007).

Последњих неколико година , PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) су укључени у биолошку контролу многих биљних патогена : бактерија, гљива, нематоде, инсеката и других. Многе болести су смањене и сузбијене применом PGP бактерија (Gerhardson, 2002; Compant et al., 2005). Сузбијање болести укључује инхибицију патогена конкуренцијом и/или антагонизмом (Couillerot et al., 2009).

Бактерије из рода *Bacillus* су становници ризосфере многих пољопривредних култура где се јављају као промотори раста и као антагонисти многим фитопатогеним бактеријама. PGPR из рода *Bacillus* су међу најефикаснијим које делују путем директних и индиректних механизма. Директно поспешивање раста биљака обухвата производњу биљних хормона (ауксина, гиберелина, цитокинина), АСС деаминазе и побољшавају доступност хранљивих материја (фиксацију азота и солубилизацију фосфата). Индиректно поспешивање раста биљака обухвата биолошку контролу биљних патогена путем колонизације површине корена, производњом екстрацелуларних литичких ензима, сидерофора, антибиотика, водоник цијанида или активирањем биљних одбрамбених механизма (Weller et al., 2002; Tsavkelova et al., 2006; Compant et al., 2005).

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Микробиолошка ђубрива (биофертилизатори)

Уношење микробиолошких ђубрива , биофертилизација представља уношење живих микроорганизама у земљиште. На овај начин може се побољшати снабдевање биљака азотом, фосфором, калијумом, гвожђем, сумпором, али и стимулисати раст корена. Уношењем ових бактерија у ризосферу биљака убрзавају се процеси трансформације органске материје и биљка се снабдева неопходним нутритијентима (Јарак и Ђурић , 2006).

Квалитетно микробиолошко ђубриво треба да садржи микроорганизме који морају бити добар компетитор аутохтоним микроорганизмима, морају имати добру способност преживљавања и прилагођавања на нову средину, те да активирају одређени микробиолошки процес којим се биљка обезбеђује асимилативима и да потпомажу њен раст. Ради испуњавања ових критеријума врши се селекција микроорганизама, прво у лабораторији, затим у заштићеном простору, те у производним условима (Јарак и Чоло, 2007).

Уношењем микробиолошких ђубрива у земљиште утиче се на ток и усмеравање микробиолошких процеса у земљишту што ће утицати на раст, развиће биљака али и на земљиште. Неки од микроорганизама који су унети у земљиште одликују се способношћу синтезе слузастих материја које играју значајну улогу у слепљивању микроагрегата што доприноси формирању fine структуре земљишта. Након изумирања микроорганизама унетих у земљиште микробиолошким ђубривима повећаће се укупна биомаса, а ефекти ће се одразити у следећој вегетацији. Повећање органске биомасе довешће до повећања плодности земљишта и стварања биљака неопходних минералних нутритијената (Рашковић, 2013).

Као компоненте микробиолошких ђубрива могу бити различите бактерије из рода *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и др.

2.2. Микроорганизми- стимулатори раста биљака

Многе бактерије стимулишу раст биљака. За ове микроорганизме користи се скраћеница PGPR – plant - growth – promoting rhizobacteria. Оне повећавају садржај хранива у ризосфери и производе материје раста - ауксине, гиберелине, цитокидине, абсцисинску киселину и етилен.

Ауксини стимулишу издуживање биљне ћелије, стимулишу диференцијацију ксилема и флоема, стимулишу развој цветних пупољака, индукују формирање плодова и др. Гиберелини стимулишу издуживање стабла и развој плодова. Цитокинини стимулишу деобу ћелија, морфогенезу, раст латералних пупољака, олистивање, отварање стома и др. Абсцисинска киселина индукује синтезу резервних протеина у семену, утиче на клијање, има улогу у смањењу сушног стреса и напада од патогена. Етилен стимулише клијање, раст корена и стабла, формирање адвентивних коренова, отварање цветова и сазревање плодова.

У бактерије које стимулишу раст биљака спадају родови *Achromobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Azospirillum* и *Streptomyces*. Род *Achromobacter* повећава количину нитрата и усвајање калијума, производи гиберелине, повећава масу стабла и корена за 22 до 33%. *Bacillus pumilus* и *Bacillus licheniformis*, изоловани из ризосфере јове (*Alnus glutinosa*), производе гиберелине.

Paenibacillus polymyxa производи cytokinine, фиксира азот, ослобађа фосфор, производи антибиотике, хитиназе и друге хидролитичке ензиме. Слично функционише и род *Azospirillum* који фиксира азот и производи физиолошки активне материје које стимулишу раст биљака. *Streptomyces* производи антибиотике и гиберелине.

Микробиолошки препарати који садрже PGP бактерије примењују се у земљиштима са слабијом природном минерализацијом (Јарак и Чоло, 2007).

2.3. Ризобактерије

Ризосфера обухвата велике и активне микробиолошке популације које су способне да врше користан, неутралан или штетан ефекат на раст биљака (Lynch et al., 1991). Данас је препозната важност микробиолошке популације ризосфере за одржавање здравља корена, усвајање хранљивих материја и толеранцију на стресне услове животне средине (Bowen and Rovira, 1999; Cook, 2002). Корисни микроорганизми су значајна компонента у постизању очекиваног приноса, који је дефинисан генетским потенцијалом за родност биљне врсте, биотичким и абиотичким уловима средине у којој се гаје (Cook, 2002).

Бактерије које живе у ризосфери, а позитивно утичу на раст биљака карактеришу се као бактерије које поспешују биљни раст. Способне су то да чине на начин што колонизују корен гајењих биљака (Клоеррег and Schroth, 1978). Истраживања ових бактерија су се битно проширила од увођења термина PGPR - Plant Growth Promoting Rhizobacteria

2.4. Основне карактеристике бактерија из рода *Bacillus sp.*

Род *Bacillus sp.* припада филуму *Firmicutes*, класи *Bacilli* , реду *Bacillales* и фамилији *Bacillaceae* која је препознатљива по производњи ендоспора које се формирају унутар бактеријске ћелије , чим се бактерија нађе у неповољним условима средине. Ендоспоре су отпорне на различите негативне утицаје . Бактерије овог рода су грам позитивни , спорогени штапићи , чије су ћелије величине 0,5-2,5 x 1,2-10 μm , често су груписане у парове или ланце , са округлим или четвртастим крајевима, покретне захваљујући перитрихалним флагеллама. Представници овог рода подразумевају аеробне и факултативно анаеробне , већином каталаза-позитивне бактерије.

Bacillus sp. показује широк спектар механизма који могу да стимулишу раст биљака .

Prvo, *Bacillus sp.* производи структурно различите антибиотике (Ongena et al. , 2005; Forchetti et al., 2007; Lee et al., 2008; Liu et al., 2009; Swain and Ray, 2009).

Друго, брзо колонизује корен биљака и има способност да се умножава на корену (Dijkstra et al., 1987).

Треће, индукује системску отпорност биљака производњом испарљивих органских једињења (Ryu et al., 2004) и утиче на развој корена производњом фитохормона и екстрацелуларних ензима (Yao et al., 2006; Forchetti et al.,2007; Lee et al., 2008; Swain and Ruy, 2009).

И четврто, смањује ниво етилена у биљкама деаминацијом ACC која је непосредни претходник етилена (Penrose and Glick,2003).

Бактерије из рода *Bacillus sp* ., могу синтетисати органске киселине и фосфатазе које ће неприступачан фосфор превести у биљкама приступачну формулу. Калијум који је у земљишту заробљен у облику алумосиликата, захваљујући активности бактерија из рода *Bacillus sp.*, постаје приступачан биљкама. Ове бактерије имају способност синтезе биљних хормона типа гиберелина, ауксина, чиме се додатно стимулише биљни раст и утиче на отпорност биљака.

2.4.1.Биопестициди на бази бактерија из рода *Bacillus sp.*

Биопестициди су препарати који садрже живе ћелије микроорганизама или продукте биљака , а користе се за сузбијање биљних патогена и штеточина. Примењују се уношењем микроорганизама – антагониста у земљиште непосредно пре сетве као и третирањем семена, корена или наџемних делова биљке микроорганизмима антагонистима. Највише се примањују биоинсектициди и биофунгициди (Јарак и Чоло, 2007).

Биолошка активност биофунгицида може бити заснована на продукцији бројних метаболита који делују антифунгално и антибактеријски. На пример, *B.subtilis* се у свету користи за припрему бројних препарата. Продукује антибиотике (bacilysin, fengумусин, dificidin и охуџифицидин) који делују на многе врсте аеробних и анаеробних бактерија. Продукти метаболизма, липопептиди, делују на различите компоненте ћелијског зида, спречавају приањање патогена на биљне органе, а ензим субтилин омета развој патогена (Клокочар-Шмит и сар., 2003).

Препарат на бази бактерије *Bacillus subtilis* први пут је произвео Becker Underwood 1994. године. Формулисан је као WP, WG и формулација за третирање семена. Механизам деловања заснован је на колонизацији корена биљке бактеријом и конкуренцији са патогеним организмима. . Изолат QST713 продукује липопептиде који испољавају фунгицидни ефекат. Примењује се за третирање семена памука, легуминоза и других врста у контроли *Rhizoctonia solani*, *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.* Такође се примењује и фолијарно у контроли *B. cinerea* на плавом патлићану, парадајзу и јагодамапа и *Sphaerotheca aphansis* на јагодама. Познати препарати су : Botokiller, Subtilex и System 3 (*B. subtilis*+ metalaxyl + quintozene) (Tomlin, 2006).

B. subtilis GB03 се примењује као фунгицид на украсним биљкама и њиховим семенима, као и на семену памука, поврћа, кикирикија, соје, јечма, грашка, пшенице и пасуља. Поменута бактерија колонизује коренов систем биљке и на тај начин ступа у конкуренцијске односе са фитопатогеним гљивама као што су *Rhizoctonia*, *Fusarium* и *Aspergillus*. Бактерија наставља да живи на кореновом систему и обезбеђује заштиту од патогена током целе вегетације. Будући *B. subtilis* формира споре, фунгициди на бази ове бактерије су стабилни, дакле на третираном семену чији је период складиштења продужен, остаје жива, а након сетве расте и умножава се. Примена овог фунгицида нема негативан утицај на човека и на животну средину. Препарати на бази ове активне материје могу се примењивати за третирање семена: а) мешањем фунгицида на бази *B. subtilis* са семеном у боксу сејалице непосредно пре сетве, или, б) припремањем мешавине препарата и семена уз додатак воде (slurry метод), а могуће је додати и инсектициде, и/или друге фунгициде. Такву мешавину неопходно је применити у року од 72h (Anonymous 1). Препарат Subtilex садржи 2,75% активне материје (минимум 5×10^{10} виталних спора/g *B. subtilis* изолат MBI600. При примени за третирање семена синтетичким фунгицидима обезбеђује дужу заштиту у односу на сам синтетички фунгицид. Као резултат биолошке заштите, повећан је пораст и механичка чврстоћа корена биљака уз повећање приноса. Препарат Subtilex повећава бројност квржица азотофиксатора на легуминозама , што има за последицу формирање здравијег кореновог система уз присуство бактерија (Anonymous 13). Код нас је регистрован препарат F-stop (*B. subtilis* сој ST 1/III) за сузбијање проузроковача трулежи плодова јабуке и пепелнице руже (Секулић и Савчић-Петрић, 2009), иако се према наводима (Anonymous 12) примењује још и за контролу проузроковача сиве трулежи руже (

B. cinerea) и проузроковача полегања расада поврћа. Ефекат F-stop у заштити и биорегулацији неких повртарских усева (две сорте паприке, парадајз) одређен је преко висине биљака, првог цвета, крупноће плода и приноса. Крупноћа плода и принос сорте паприке химера није повећана при примени *B. subtilis* у односу на контролу, али јесте у односу на ону где је примењен пропамокарб. При примени у парадајзу није било значајних разлика у висини биљака и појави првог цвета (Клокочар-Шмит и сар., 2003). При примени *B. subtilis* (F-stop и Бефунгин) на ускладиштеним кртолама кромпира, после 10 месеци није регистрован губитак у тежини кртола у односу на контролну варијанту (Клокочар-Шмит и сар., 2005, 2006а).

Биоинсектициди на бази бактерија се производе од неких врста бактерија из рода *Bacillus* које у ћелији имају протеинске кристале који садрже токсине. Протеинске кристале бактерија производи током спорулације . Бактеријски биоинсектицид се уноси у природна станишта ларви инсеката. Кад бактерија доспе у органе за варење ларве , споре клијају и бактерије се умножавају. Оштре ивице протеинских кристала оштећују црева ларви. Истовремено долази до растварања кристала, активације токсина, припајања токсина за рецепторе на епителу црева и перфорације црева и угинућа ларве.

У производњи бактеријских биоинсектицида највише се примењује *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Ова бактерија живи у земљишту , а сваки њен сој производи другачији састав протеинских кристала и специфичан је за уништавање једне или више врста ларви. Бактеријски биоинсектициди се могу применити фолијарно или уносити у друга природна станишта ларви инсеката. Препарат се примењује последњих педесет година у виду праха или емулзије.

Генетским инжењерингом убачен је ген овог бацилуса у неке биљке као што су памук, кукуруз, кромпир и пиринач. Ове биљке стварају токсине сличне онима које производи *Bacillus thuringiensis* , издвајају их кроз свој коренски систем и тако штите биљку од штетних инсеката. Генетски модификоване биљке издвајају далеко већи број токсина него бактерије , а ефекат ових токсина на околину није довољно испитан. *Bacillus sphaericus* се користи за уништавање ларви комараца у воденим срединама. Морталитет наступа 72-96 сати после примене. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* изазива угинуће ларви комараца и других инсеката после 48 сати (Јарак и Чоло, 2007).

2.4.2. Улога бактерија из рода *Bacillus* у биоремедијацији земљишта

Земљиште је често изложено утицају различитих токсичних материја које могу негативно утицати на биљке, животиње и микроорганизме. Најчешћи извори загађења земљишта су рудници, нафта и производи од нафте, пољопривреда, индустрија, комунални отпад и биолошки отпад. Из ових извора се у земљиште уносе тешки метали и токсичне органске материје типа полицикличних угљоводоника. Смањење њихове количине у земљишту делимично обављају микроорганизми, а процес одстрањивања токсичних материја из земљишта микробиолошким путем зове се биоремедијација (Јарак и Чоло, 2007).

Нафта и производи који настају у току производње и коришћења нафте представљају дуготрајну опасност за биодиверзитет микроорганизама у земљишту јер инхибирају разлагање целулозе, циклус азота, а специјално нитрификацију и азотофиксацију. Као загађивачи земљишта највећи проблем представљају полициклични ароматични угљоводоници (ПАН-ови), поларна једињења са угљоводоничном групом, минерална уља и др. Биолошко разлагање ових материја обавља се у ћелијама микроорганизама који поседују одговарајуће ензиме. Да би се процес одвијао, потребно је да земљиште садржи довољно азота, фосфора и других хранива, да постоји одговарајућа рН реакција, одговарајућа влажност, присуство и одсуство кисеоника и др. Биодеградација цикличних угљоводоника заснива се на способности микроорганизама да отвори ароматични прстен.

Аутохтони микроорганизми доста споро обављају процес биоремедијације. Генетским инжењерингом се стварају нови сојеви бактерија који су у могућности да разграђују већи број различитих угљоводоника. Неки представници рода *Bacillus* могу разлагати аромате, алкане дугих ланаца и фенил-уреу. Ова способност микроорганизама се користи у случајевима изливања већих количина нафте како би се спречила еколошка катастрофа (Јарак и Чоло, 2007).

Метали чија је густина већа од 5 kg dm^{-3} су тешки метали. У природи постоји велики број тешких метала као што су жива (Hg), арсен (As), селен (Se), молибден (Mo), кадмијум (Cd), олово (Pb), хром (Cr), никал (Ni) и др. Заступљени су у ваздуху, води и земљишту. У земљиште највећи део тешких метала доспева у процесу педогенезе – распадањем минерала. Осим тога, контаминација земљишта тешким металима се може вршити: отпадним водама, пестицидима, минералним ђубривом,

пепелом из термоелектрана и др. Присуство тешких метала у земљишту може узроковати дуготрајну инхибицију циклуса угљеника, азотофиксације, нитрификације, активности дехидрогеназе и успостављања микоризних заједница, што доводи до смањења биомасе микроорганизама. Трансформације тешких метала микробиолошким путем одвијају се : оксидацијом, редукцијом и биометилацијом. Са еколошког аспекта , процеси оксидације су штетни , јер метале конвертују у лако приступачне и токсичне форме, док су процеси редукције корисни, јер конвертују метале од токсичних и приступачних у нетоксичне и неприступачне. Биометилација доводи до детоксикације при чему се метали преводе у растворљива или испарљива једињења и тако се елиминишу из близине микроорганизама и из земљишта (Јарак и Чоло, 2007).

Пестициди су хемијске супстанце различитог састава. Према намени се деле на : инсектициде, хербициде и фунгициде. Превелике количине пестицида штетно делују на микробиолошке процесе у земљишту. Ефекат токсичне количине пестицида на метаболизам микроорганизама одликује се инхибицијом деобе , инхибицијом дисања, инхибицијом синтезе и функционисања протеина, губљењем селективности цитоплазмине мембране и др. Микроорганизми трансформишу пестициде на разне начине. Неки их трансформишу у нетоксичне компоненте при чему се смањује контаминација земљишта, површинских и подземних вода. Разлагање пестицида микробиолошким путем (биодеградација) заснива се на способности микроорганизама да ензиматским путем отворе прстенове молекула пестицида. Понекад микроорганизми разложе пестицид тако брзо да потпуно спрече његово дејство на патогене микроорганизме или корове. Овај феномен је познат као “обогаћена” деградација и резултира потребом поновне примене пестицида. Изолацијом микроорганизама који ефикасно разлажу пестициде , њиховим умножавањем и поновним увођењем у земљиште , смањује се количина пестицида и производа њихове деградације у земљишту (Јарак и Чоло, 2007).

3. РАДНА ХИПОТЕЗА

Биофертилизатори су препарати који садрже одабране културе микроорганизама који се користе за инокулацију семена и расада или се уносе у земљиште како би се интензивирали одређени микробиолошки процеси којима се повећава садржај приступачних хранива, а само код неких биљних врста, као што су легуминозе могу се користити као једино ђубриво.

Квалитетно микробиолошко ђубриво мора да садржи микроорганизме који ће бити добри конкуренти аутохтоним врстама, који ће имати добру способност преживљавања и прилагођавања на нову средину, те да активирају одређени микробиолошки процес којим се биљка обезбеђује асимилативима али се потпомаже и њен раст (Јарак и Ђурић, 2006).

Истраживање има за циљ да се изврши изолација аутохтоних сојева бактерија из рода *Bacillus* sp. са три локалитета (Футог, Кисач и Ченеј), испита њихова ефективност у сврху производње микробиолошког ђубрива „ BACILLOMIX SPECIJAL”.

4. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Уношење микробиолошких ђубрива, биофертилизација представља уношење живих микроорганизама . На овај начин се може побољшати снабдевање биљака азотом, фосфором, калијумом, гвожђем, сумпором али и стимулирати раст корена . Уношењем ових бактерија у ризосферу биљака убрзавају се процеси трансформације органске материје и биљка се снабдева неопходним нутритивним (Јарак и Ђурић, 2006).

Циљ истраживања је да се изврши изолација аутохтоних сојева бактерија из рода *Bacillus sp.* са три локалитета (Футог, Кисач и Ченеј), испита њихова ефикасност у сврху производње микробиолошког ђубрива „ BACILLOMIX SPECIJAL”.

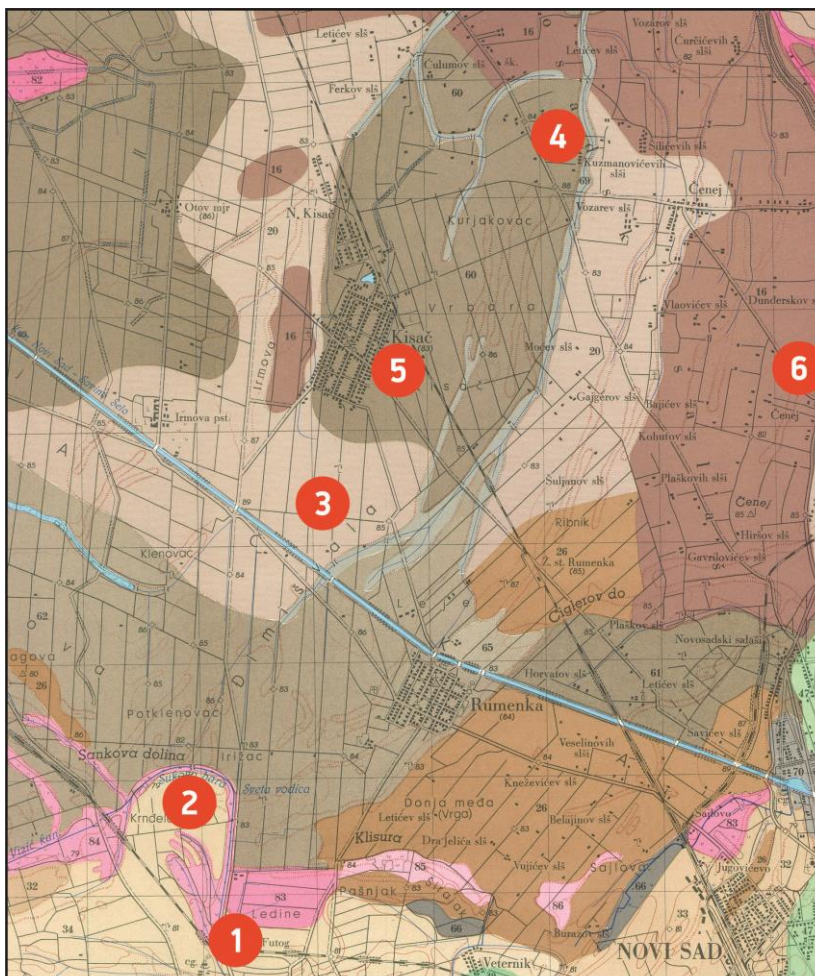
5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

5.1. Узимање узорака земљишта

На три локалитета (Футог, Кисач и Ченеј) су узети узорци земљишта, на којима су вршена испитивања у лабораторији за микробиологију Пољопривредног факултета у Новом Саду .

Користили смо узорке земљишта са 6 локалитета у Јужној Бачкој:

1. Футог $45^{\circ} 27'$ северне географске ширине и $19^{\circ} 71'$ источне географске дужине
2. Футог $45^{\circ} 30'$ северне географске ширине и $19^{\circ} 68'$ источне географске дужине
3. Кисач $45^{\circ} 32'$ северне географске ширине и $19^{\circ} 73'$ источне географске дужине
4. Ченеј $45^{\circ} 38'$ северне географске ширине и $19^{\circ} 77'$ источне географске дужине
5. Кисач $45^{\circ} 34'$ северне географске ширине и $19^{\circ} 74'$ источне географске дужине
6. Ченеј $45^{\circ} 34'$ северне географске ширине и $19^{\circ} 83'$ источне географске дужине



Bačka Palanka 4

14	Crnozem karbonatni (podzemni) sa ljetni terasi	33	Crnozem karbonatni na aluvijalnim nanosima	64	Livadsko crna sumparasta	83	Solunje i palud
15	Crnozem sa značajnim količinama kiselih humusa	34	Crnozem karbonatni na aluvijalnim nanosima	65	Livadsko crna sumparasta	84	Solunje sumparasto
19	Crnozem sa značajnim količinama kiselih humusa	47	Aluvijalno sivasto smeđilo	66	Crna crna karbonatna	85	Solunje i palud
20	Crnozem sa značajnim količinama kiselih humusa	48	Aluvijalno smeđilo	69	Crna crna karbonatna mešovito mešovita	86	Solunje
21	Crnozem bezkarbonatni	49	Aluvijalno smeđilo	70	Crna crna karbonatna sumparasta	87	Iskopa, bara i močvara
25	Crnozem bezkarbonatni	50	Crna crna karbonatna sa ljetni terasi	79	Močvarno gljivo smeđilo		
27	Crnozem na peskovitim lezima	51	Livadsko crna bezkarbonatna	82	Solunjska		
32	Crnozem karbonatni na aluvijalnim nanosima	62	Livadsko crna sumparasta				

P 1: 50 000

Слика 1. Секција педолошке карте Војводине, Бачка Паланка 4 (Нејгебауер и сар. 1971)

На Педолошкој карти Војводине (Нејгебауер и сар.1971), P 1:50.000, испитивана земљишта су означена као:

1. Чернозем огајњечен на алувијалним наносима
2. Чернозем огајњечен на алувијалним наносима
3. Чернозем са знацима оглејавања у лесу
4. Ливадска црница карбонатна на лесној тераси

5. Ливадска црница карбонатна на лесној тераси
6. Чернозем карбонатни на лесној тераси

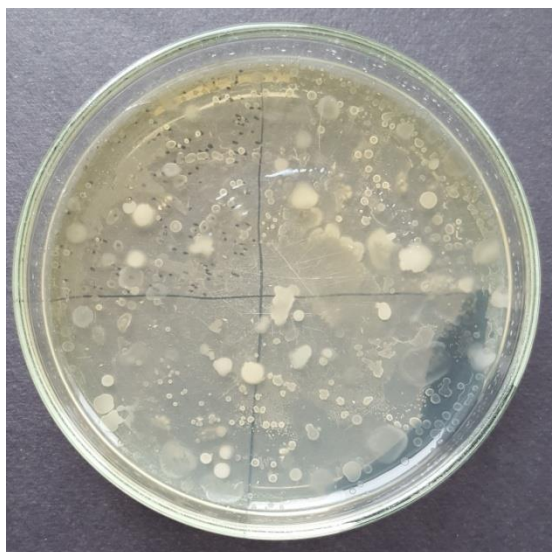
Узорци земљишта су узети асептичном техником, ашовом. На сваком локалитету узорак је узет са три места на дубини од 0-30 см. Око 0,5 kg просечног узорка је стављено у полиетиленске врећице у којима су пренешене до лабораторије за микробиологију Пољопривредног факултета у Новом Саду (Јарак и Ђурић, 2006).

5.2. Одређивање бројности микроорганизама у земљишту

Узорци земљишта су прво разређени у физиолошком раствору. У ту сврху су кориштена децимална разблажења. У ерленмајер боце је сипано 90 ml стерилног физиолошког раствора, а потом 10 g земљишта. Смеша је енергично мућкана 15-20 минута да би се добила хомогена суспензија. Затим су прављена децимална разређења. Из боце је одпипетирано 1 ml суспензије у прву епрувету, из прве епрувете је пренето 1 ml суспензије у другу и тако редом све до 10^{10} . Затим је вршено засејавање са по 1ml од сваког разређења у празне Петри кутије у које су накнадно сипане хранљиве подлоге. За засејавање је кориштен 1 стерилан наставак на аутоматској пипети, јер се кретало од највећег разређења према најмањем (Јарак и Ђурић, 2006).

5.3. Изолација аутохтоних сојева *Bacillus sp.*

Селективне хранљиве подлоге су специфичног састава и прилагођене су само за одређену врсту микроорганизама. За изолацију бактерија из рода *Bacillus sp.* кориштене су три селективне хранљиве подлоге : Mesoreptonski agar (MPA), L-agar (LA) и King B (KB). Расхлађене подлоге су преливане преко одпипетираних суспензија у Петри кутијама, које су потом стављане у термостат на температуру од 28° C у периоду од 48 сати. Након тога је вршено пребројавање бактеријских колонија.



Слика 2. Изглед колонија *Bacillus sp.* на хранљивој подлози у једној од Петри кутија

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

5.4. Одређивање морфолошких карактеристика сојева из рода *Bacillus sp.*

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

5.5. Одређивање физиолошких карактеристика сојева из рода *Bacillus* sp.

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

За одређивање односа према извору угљеника кориштена је Hugh-Lifsson-ова 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: глюкоза, галактоза, фруктоза, сахароза, лактоза и ксилоза. У случају позитивне реакције примећује се око колонија промена боје из зеленкасте у жуту.

Раст на различитим температурама (5°C, 15°C, 28°C, 37°C, 45°C), на подлогама различите киселости (pH 5, 7, 9) и на подлогама са различитим концентрацијама NaCl (3%, 5%, 7%), праћен је на МРА подлози. Приликом испитивања утицаја pH и NaCl, инкубација је у термостату на 28°C. Након 48 h инкубације, мерена је ширина раста и упоређивана са контролом. Потпуно одсуство раста обележено је са -, минималан раст са +, оптималан са ++, а обилан раст са +++.

За одређивање отпорности према антибиотицима примењена је метода антибиограма - поступак са дисковима. Поступак се састоји у густом засејавању хранљиве подлоге микроорганизмима. На површину хранљиве подлоге су поставељени дискови са антибиотицима. Испитивана је отпорност микроорганизама на следеће антибиотике: ampicilin (10 µg, 25 µg), neomycin (10 µg, 30 µg), eritromycin (5 µg, 15 µg), streptomycin (10 µg, 300 µg), chloramphenicol (10 µg), kanamycin (30 µg).

Дифузионом методом испитивана је отпорност микроорганизама на растворе следећих метала: кадмијум (CdCl₂), манган (MnCl₂·4H₂O) и олово (PbCl₂), у различитим концентрацијама : 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶ (mol·dm⁻³). Након густог засејавања подлоге, на површину се поставе дискови са растворима тешких метала.

Дифузионом методом испитивана је отпорност на следеће пестициде: prochloraz 36 CS (0,6 l ha⁻¹), nicosulfuron 40 g l⁻¹ (1,2 l ha⁻¹), benalaxyl + fluazinam 20 EC (1 l ha⁻¹), boskalid 267gkg⁻¹ + piraklostrobin 67 gkg⁻¹ (800 gha⁻¹) и mankozeb S који се користи

за третман семена у дози од 200g у 600ml воде за 100kg семена Испитиван је утицај препоручене дозе пестицида и дозе која је 10 пута већа од препоручене.

Инкубација је трајала 48 h на температури од 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 антибиотику, тешком металу или пестициду. Уколико је бактерија отпорна према одређеној супстанци, неће бити зоне инхибиције (-), а ако је осетљива, зона инхибиције ће бити мања (+) уколико је микроорганизам мање осетљив, а већа (++) или (+++) уколико је микроорганизам осетљивији на испитивану супстанцу. Интезивнији раст око диска доказ је стимулативног дејства испитиване супстанце на раст микроорганизма.

5.6. Одређивање физиолошких карактеристика сојева из рода *Bacillus sp.*

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

Хидролиза желатина испитивана је на дубоком желатинозном агару (Говедарица и Јарак, 1999). Дубоки желатинозни агар се прави тако да се хранљивом буљону (МРВ) дода 10-15% желатина, изврши стерилизација и епрувете оставе усправно да се добије дубоки агар. Засејавање са бактеријама се врши убодом, а инкубација траје најмање седам дана на температури 22-23°C. Отапање желатина доказ је способности микроорганизма да хидролизује желатин.

Продукција липазе испитивана је на подлози (пептон 10 g l⁻¹, NaCl 5 g l⁻¹, CaCl₂ ·H₂O 0,1 g l⁻¹, агар 15 g l⁻¹) којој је додат Tween 80 (Lanyi, 1987). Период инкубације је седам дана на 26°C. Замућене зоне око колоније доказ су липолитичке активности.

За одређивање способности микроорганизма да **хидролизује скроб** користи се метода агарних плоча на скробном агару (скроб у праху 10 g l⁻¹, KH₂PO₄ 0,5 g l⁻¹, K₂HPO₄ 0,5 g l⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 0,2 g l⁻¹, агар 15 g) (Rodina, 1972). Инкубација се врши 48

h на 28°C . Колоније се затим прелију раствором лугола. Скроб се у присуству јода боји плаво. Ако бактерије врше хидролизу скроба, око њихових колонија појавиће се необојена зона (зона хидролизе), која не садржи скроб, док ће се остали део подлоге на коме није дошло до хидролизе обојити плаво. Ако бактерије не разлажу скроб, подлога ће бити равномерно плаво обојена.

Способност продукције пектиназе испитивана је методом агарних плоча на пектинозном агару (K_2HPO_4 2 g l⁻¹, NaH_2PO_4 1 g l⁻¹, $MgSO_4 \times 7H_2O$ 0,5 g l⁻¹, NH_4NO_3 2 g l⁻¹, екстракт квасца 1g 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; Soriano et al., 2000).

Продукција целулазе испитивана је на СМС агару (карбокси метил целулозни агар) (Kasing, 1995). Период инкубације је седам дана на 28°C. Након инкубације, Петри кутије су преливане раствором Congo-red (1mg/cm³ воде). Након петнаест минута, Congo-red је одливан а Петри кутије су преливане са 1M раствором NaCl. Обезбојене зоне око колонија доказ су целулазне активности микроорганизама.

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

Способност **коришћења цитрата**, као извора енергије, одређивана је на Simonsovom цитратном агару ($MgSO_4 \times 7H_2O$ 0,2 g l⁻¹, $NH_4H_2PO_4$ 1 g l⁻¹, K_2HPO_4 1 g l⁻¹, Na-цитрат 2 g l⁻¹, NaCl 5 g l⁻¹, бром тимол плаво 0,08 g l⁻¹, агар 15 g l⁻¹). Инкубација се врши 48h на 30°C. На основу раста и промене боје подлоге из зелене у плаву, одређено је који изолати могу да користе цитрат.

5.7. Продукција материја раста

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

Продукција индол сирћетне киселине (IAA) испитивана је методом по Gordon and Weber (1951). Употребом Salkowski реагенса ($\text{FeCl}_3\text{-HClO}_4$), утврђена је продукција IAA у медијуму који садржи 0, 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ и 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Л - триптофана. 100 μl суспензије бактерија старости 24h пренето је у 100 ml LB подлоге (Gerhardt *et al.* 1994; Sambrook and Russell, 2001). Да би се утврдила количина продуковане IAA, након 48 h , 5ml суспензије се центрифугира на 5 000 o/min у трајању од 15 минута. Једном ml супернатанта додаје се 2 ml $\text{FeCl}_3\text{-HClO}_4$ реагенса. Након 25 минута врши се читавање на UV-спектрофотометру на 530 nm.

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% пикринске киселине и 2% Na_2CO_3 . Период инкубације износи 4 дана на 28°C. Промена боје диска из жуте у наранџасто браон боју доказ је способности микроорганизама да продукује HCN.

Способност солубилизације неорганских једињења фосфора (фосфата) испитивана је на подлози Menkina, модификованој по Rodinoј (Menkina, 1961). Способност изолата да солубилизују неорганске фосфате испитивана је на подлози по Píkovskaya (Píkovskaya, 1948). Након 5 дана инкубације на 28°C, појава провидних зона око колонија доказ су способности микроорганизама да раствара фосфате.

5.8. Умножавање изолованих сојева *Bacillus sp.* у течној култури

Умножавање изолованих сојева *Bacillus sp.* са чврсте подлоге (MPA) на течну (MPB) подлогу је вршено у стерилној комори - ламинатору у којој је претходно помоћу UV зрака стерилисан ваздух а радни сто је пребрисан алкохолем. За пресејавање је кориштена еза која је пре и после преношења микроорганизама стерилисана на пламену. Потом су отвори ерленмајер боца и чепови такође стерилисани на пламену. По затварању , ерленмајер боце су стављене у шејкер инкубатор који је подешен на температуру од 28° C и 150 обртаја / мин. Након 24 сата је вршена провера, а након 48 сати су ерленмајер боце извађене из шејкер инкубатора (Јарак и Ђурић, 2006).

5.9. Провера ефективности добијених изолата на различитим биљним културама у различитим производним условима

Умножени инокулум је употребљен на следећим пољопривредним културама : пшеници , јечму , кукурузу, шећерној репи, и купусу.

Огледи са јечмом, пшеницом и кукурузом изведени су у полуконтролисаним условима у PVC контејнерима са хумусним супстратом. Семе је третирано пре сетве 10% раствором, супстрат је третиран 1% раствором а фолијарни третмани су вршени 1% раствором смеше изолата 2 пута у току вегетације.

Огледи са шећерном репом и купусом спроведени су у производним условима, на земљишту типа чернозем у атару Ченеја и Кисача. Третирано је земљиште пре сетве у количини од 2-3 l/ha , затим је третирано семе у количини од 100 ml инокулума на хектарску норму уз додатак воде по потреби и фолијарно третирање је извођено неколико пута у току вегетације у зависности од културе.

5.10. Регистрација микробиолошког ђубрива као „ BACILLOMIX SPECIJAL“

На основу поднете пријаве извршена је регистрација микробиолошког ђубрива „BACILLOMIX SPECIJAL“ од стране Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије према прописима чл. 3. тачка 4 и чл. 14. став 4, те чл. 35 и чл.54 Правилника о условима за разврставање и утврђивање квалитета средстава за исхрану биља, одступањима садржаја хранљивих материја и минималним и максималним вредностима дозвољеног одступања садржаја хранљивих материја и о садржини декларације и начину обележавања средстава за исхрану биља, методама за испитивање ђубрива («Сл. Гласник РС», бр.78/2009).

6. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

6.1. Бројност микроорганизама у земљишту

Број микроорганизама у узорцима земљишта је одређиван по методи агарних плоча, при чему је суспензија земљишта припремљена методом разређења. Засејавање је вршено у 3 понављања, а узорци земљишта из којих је вршено засејавање су сушени на 105° С, пошто се бројност микроорганизама обично изражава на 1 г апсолутно сувог земљишта. Формула по којој је израчунаван број микроорганизама гласи :

$$N = \frac{a \times b \times c}{d}, \text{ где су}$$

Н – број микроорганизама у 1 г апсолутно сувог земљишта

а - просечан број колонија израслих на засејаним Петри кутијама

б – коефициент корекције на 1 ml

ц – разређења којим је извршено засејавање

д – маса једног грама апсолутно сувог земљишта

Коришћена је селективна хранљива подлога за бактерије из рода *Bacillus* sp. – ЛА агар.

Табела 1. – Број ћелија на 1 g апсолутно сувог земљишта

Узорак земљишта	1. Понављање	2. Понављање	3. Понављање
1	$158,7073 \times 10^8$	$268,0391 \times 10^7$	$141,0732 \times 10^6$
2	$452,9357 \times 10^{10}$	$508,3973 \times 10^9$	$235,7115 \times 10^8$
3	$347,5543 \times 10^{10}$	$191,879 \times 10^9$	$815,7873 \times 10^8$
4	$99,16963 \times 10^8$	$2,38963 \times 10^7$	$60,93556 \times 10^6$
5	$882,7566 \times 10^{10}$	$258,9419 \times 10^9$	$522,5919 \times 10^8$
6	$175,4643 \times 10^8$	$55,72176 \times 10^7$	$72,31973 \times 10^6$

Табела 2. – Логаритам броја ћелија

Узорак земљишта	1. Понављање	2. Понављање	3. Понављање
1	10,2006	9,428198	8,149445
2	12,65604	11,7062	10,37238
3	12,54102	11,28303	10,91158
4	9,996379	7,378331	7,784871
5	12,94584	11,4132	10,71816
6	10,24419	8,746025	7,859257

Просек логаритамске вредности за узорке :

1. 9,2594
2. 11,5782
3. 11,5785
- 4. 8,3856**
5. 11,6924
6. 8,9498

Из просека логаритамске вредности се види да се ради о узорцима веома плодних земљишта богатих микроорганизмима. Узорци 5, 3, и 2 садрже највећи број ћелија бактерија из рода *Bacillus sp.* Такође ова вредност показује и да је узорак са локалитета Ченеј (4) најсиромашнији овим бактеријама.

Након пребројавања заступљености бактерија из рода *Bacillus sp.* 12 изолата са најбољим преживљавањем одабрано је за даља испитивања.

6.2. Морфолошке карактеристике изолованих сојева *Bacillus* sp.

Код одабраних 12 изолата *Bacillus* sp. одређене су морфолошке особине колоније и ћелије.

Морфолошке особине колоније

Табела 3: Облик, величина боја, површина и положај колонија одбраних изолата *Bacillus* sp.

Изолати	Облик	Величина	Боја	површина	Положај
2	Неправилан	Крупна	Слонова кост до крем према унутрашњости	Наборана, мат	Површински
4	Неправилан	Средња	Слонова кост	Наборана, мат	Површински
5	Неправилан	Крупна	Слонова кост	Наборана, мат	Површински
6	Неправилан	Крупна	Слонова кост	Наборана, мат	Површински
7	Неправилан	Крупна	Слонова кост	Наборана, мат	Површински
10	Неправилан	Крупна	Слонова кост до крем према унутрашњости	Наборана, мат	Површински
11	Неправилан	Крупна	Слонова кост	Наборана, мат	Површински
15	Неправилан	Крупна	Слонова кост	Наборана, мат	Површински
17	Неправилан	Крупна	Слонова кост	Наборана, мат	Површински
18	Неправилан	Крупна	Слонова кост	Наборана, мат	Површински
19	Неправилан	Јако крупна	Слонова кост	Наборана, мат	Површински
20	Неправилан	Крупна	Тамнија крем	Слузава, сјајна и глатка	Површински

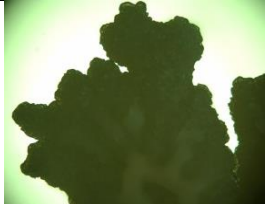
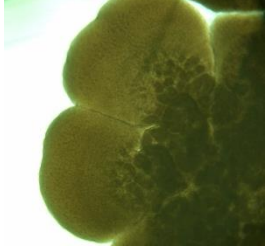
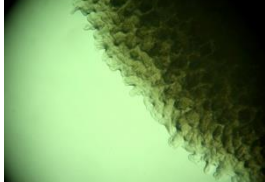
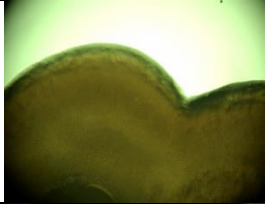
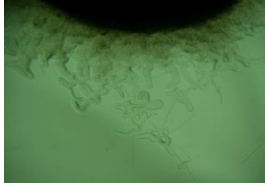

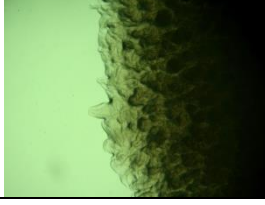
У оквиру одабраних изолата *Bacillus* sp., када су у питању морфолошке особине колоније, доминира неправилан облик, по величини су углавном крупне, боје слонове кости са набораном и мат површоном (Таб. 3). Све колоније су површинске, благо издигнуте и без промена у подлози. Углавном су све непровидне, а највише се разликују по ивици и структури (Таб.4).

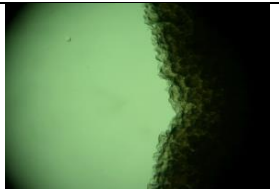



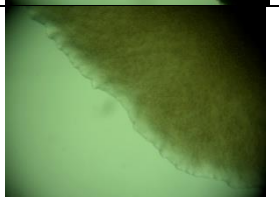
Табела 4: Ивица, структура, промене у подлози, профил и оптичке особине колонија одбраних изолата *Bacillus* sp.

Изолати	Ивица	Структура	Промене у подлози	Профил	Оптичке особине
2	Таласаста, дубоко режњевита	Крупно зрнаста	Нема	Благо издигнут	Непровидна ивица, полупровидна унутрашњост
4	Крупно таласаста	Кончаста	Нема	Благо издигнут	Непровидна
5	Крупно таласаста	Влакнасто-праменаста	Нема	Благо издигнут	Непровидна
6	Благо крупно таласаста	Ситно зрнаста	Нема	Благо издигнут	Непровидна
7	Таласасто-тестераста	Влакнаста	Нема	Благо издигнут	Непровидна
10	Крупно таласаста, са мањим избочинама	Крупно зрнаста	Нема	Благо издигнут	Непровидна ивица, полупровидна унутрашњост
11	Крупно таласаста	Влакнасто-праменаста	Нема	Благо издигнут	Непровидна
15	Крупно таласаста	Влакнасто-праменаста	Нема	Благо издигнут	Непровидна
17	Благо таласаста	Ситно зрнаста	Нема	Благо издигнут	Непровидна
18	Крупно таласаста	Влакнасто-праменаста	Нема	Благо издигнут	Непровидна
19	Крупно таласаста, зупчаста	Кончаста	Нема	Благо издигнут	Непровидна
20	Благо таласаста	Кончаста	Нема	Благо издигнут	Полупровидна

Код пресејавања изолата преовладавале су воскаста и тестасти конзистенција колоније а у Таб. 5 се јасно виде разлике у изгледу ивице колоније испитиваних изолата *Bacillus* sp. на приказаним микрофотографијама.

Табела 5: Конзистенција и изглед ивице колонија одбраних изолата *Bacillus* sp.

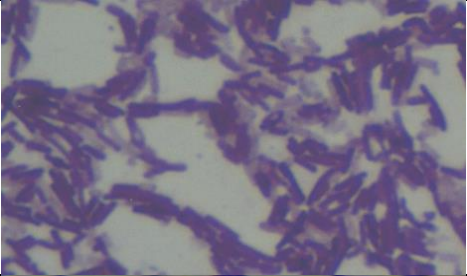
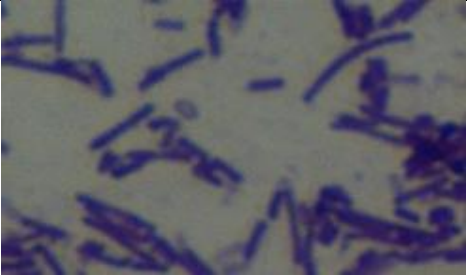
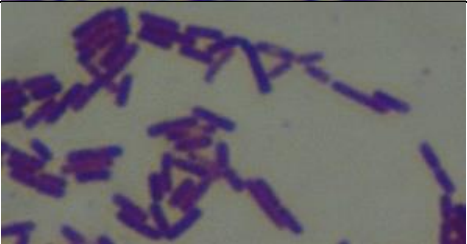
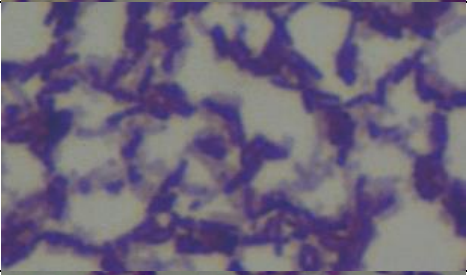
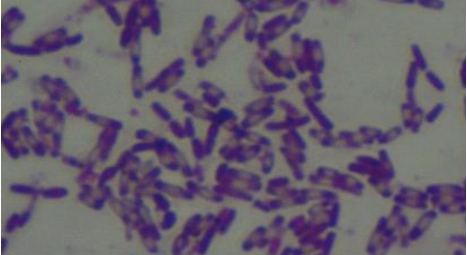
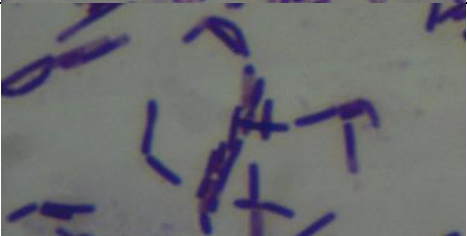
Изолати	Конзистенција	Изглед ивице
2	Воскаста	
4	Воскаста	
5	Тестасти	
6	Тестасти	
7	Тестасти	
10	Воскаста	
11	Тестасти	

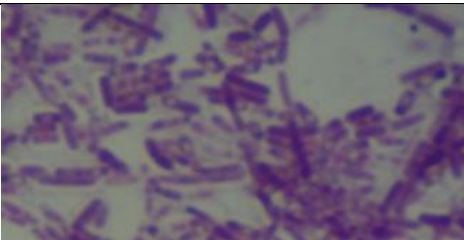





15	Теста́ста	
17	Теста́ста	
18	Теста́ста	
19	Теста́ста	
20	Теста́ста	

Морфолошке особине ћелије

Од морфолошких особина ћелије одређиван је : облик, спорогеност и бојење по Граму (Јарак и Ђурић, 2006).

Табела 6: Облик, спорогеност и бојење по Граму ћелија одбраних изолата *Bacillus* sp.

Изолати	облик	Спорогеност	Бојење по Граму	Микроскопски изглед ћелије
2	Штапићаст, издужен	Спорогена	Грам позитивна	
4	Штапићаст, издужен	Спорогена	Грам позитивна	
5	Штапићаст, издужен	Спорогена	Грам позитивна	
6	Штапићаст, издужен	Спорогена	Грам позитивна	
7	Штапићаст, краћи и заобљен	Спорогена	Грам позитивна	
10	Штапићаст, јако издужен	Спорогена	Грам позитивна	

11	Штапићаст, издужен	Спорогена	Грам позитивна	
15	Штапићаст, краћи и заобљен	Спорогена	Грам позитивна	
17	Штапићаст, краћи	Спорогена	Грам позитивна	
18	Штапићаст, издужен	Спорогена	Грам позитивна	
19	Штапићаст, кратак	Спорогена	Грам позитивна	
20	Штапићаст, издужен	Спорогена	Грам позитивна	

Као што је и очекивано, све ћелије испитиваних изолата *Bacillus* sp. су штапићастог облика, спорогене, и грам позитивне. Једине морфолошке разлике констатоване су код дужине и ширине самог штапића што се види на микрофотографијама (Таб. 6).

6.3. Физиолошке карактеристике изолованих сојева из рода *Bacillus sp.*

Почетни инокулум за испитивање морфолошких и физиолошких особина изолата *Bacillus sp.* приказан је у Таб. 7. Оптичка густина је читавана на 600 nm након 48 h инокулације . Кориштена је анологија абсорбанце од 0,625 која одговара броју ћелија од $1,0 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ инокулума . Из табеле се види да изолати 11 , 15 и 7 имају највећи број ћелија који износи и преко 10^9 . Најмањи број ћелија има изолат 4 и он износи $2,7 \times 10^8$. Резултати овог истраживања показују да се ради о инокулуму са високим титром.

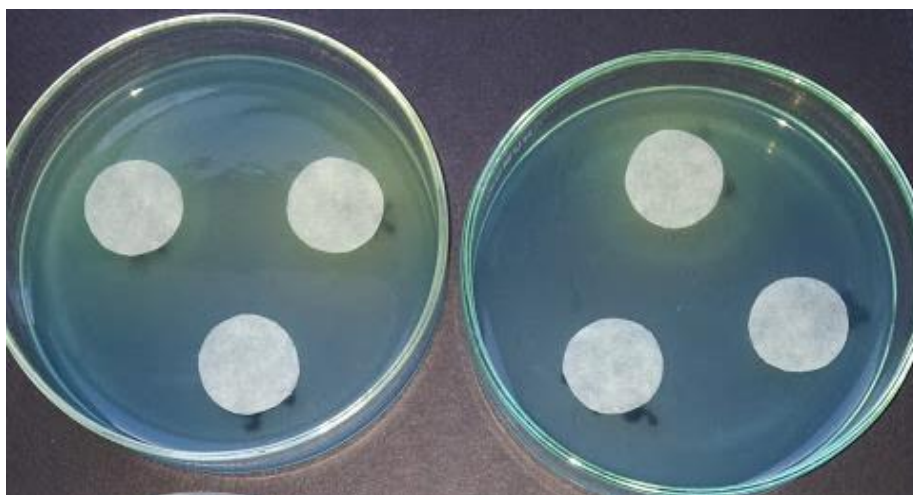
Табела 7 : Почетни инокулум

Изолати	Абсорбанца на 600 nm	Број ћелија по ml инокулума
2	0,218	3×10^8
4	0,172	$2,7 \times 10^8$
5	0,528	$8,4 \times 10^8$
6	0,555	$8,9 \times 10^8$
7	0,629	$1,0 \times 10^9$
10	0,245	$3,9 \times 10^8$
11	0,650	$1,04 \times 10^9$
15	0,648	$1,04 \times 10^9$
17	0,205	$3,3 \times 10^8$
18	0,213	$3,4 \times 10^8$
19	0,630	$1,01 \times 10^8$
20	0,305	$4,9 \times 10^8$

У овом истраживању су кориштени следећи шећери : сахароза , лактоза , ксилоза , фруктоза , галактоза и глукоза. Из Таб. 8 се види да галактозу као извор угљеника не користи ни један изолат. Ксилозу и лактозу користи само изолат 10. Сахарозу користе сви , осим изолата 4. Фруктозу, која је и најсличнија сахарози , користе готово сви изолати, осим 4 и 10. Глукозу не користе 4, 5, 17 и 18. Значи да је изолат 10 најприлагодљивији на различите изворе угљеника, јер расте на : сахарози , лактози , ксилози и глукози . Такође се може закључити да је сахароза шећер из ког изолати најлакше користе угљеник, те је због тога даље кориштен у производњи микробиолошког ђубрива које садржи ових 12 изолата.

Табела 8: Раст изолата *Bacillus sp.* на различитим изворима шећера

Изолати	Сахароза	Лактоза	Ксилоза	Фруктоза	Галактоза	Глукоза
2	+	-	-	+	-	+
4	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	+	-	-
6	+	-	-	+	-	+
7	+	-	-	+	-	+
10	+	+	+	-	-	+
11	+	-	-	+	-	+
15	+	-	-	+	-	+
17	+	-	-	+	-	-
18	+	-	-	+	-	-
19	+	-	-	+	-	+
20	+	-	-	+	-	+



Слика 3 : Промена боје подлоге у жуту је показатељ да изолат користи шећер

Приликом испитивања утицаја температуре на раст изолата кориштене су следеће температуре : 5°C, 15°C , 28°C , 37°C и 45°C . Из овог истраживања се може закључити да су сви изолати *Bacillus sp.* типични мезофили. На 5°C не расте ни један изолат. На 15°C не расте само 2, док на осталим температурама расту сви изолати. При томе је изолат 17 најтермофилнији. Изолати 7 , 19 , и 20 су прилагодљивији на више температуре од осталих . На температури од 28°C сви изолати расту једнаким интензитетом , а на температури од 37°C једино изолат 2 и 10 имају нешто слабији пораст од осталих. Ово истраживање показује да су најбоље температуре при ферментацији инокулума за производњу микробиолошког ђубрива *Bacillomix* специјал између 28°C и 37°C.

Табела 9: Раст изолата *Bacillus sp.* на различитим температурама

Изолати	5°C	15°C	28°C	37°C	45°C
2	-	-	+++	++	+
4	-	+	+++	+++	+
5	-	+++	+++	+++	+
6	-	++	+++	+++	+
7	-	++	+++	+++	++
10	-	+++	+++	++	+
11	-	+++	+++	+++	+
15	-	++	+++	+++	+
17	-	++	+++	+++	+++
18	-	++	+++	+++	+
19	-	+++	+++	+++	++
20	-	+++	+++	+++	++

Што се тиче раста изолата на различитим рН , из Таб.10 се види да су они изразити неутрофилни до благо алкалофилни микроорганизми. Једино изолат 10 нешто слабије расте на рН 9.

Концентрација од 3-7% NaCl не утиче на раст било ког изолата.

Табела 10: Раст изолата *Bacillus sp.* на различитом рН и различитим концентрацијама NaCl

Изолати	рН 5	рН 7	рН 9	NaCl 3%	NaCl 5%	NaCl 7%
2	-	+++	+++	+++	+++	+++
4	-	+++	+++	+++	+++	+++
5	-	+++	+++	+++	+++	+++
6	-	+++	+++	+++	+++	+++
7	-	+++	+++	+++	+++	+++
10	-	+++	++	+++	+++	+++
11	-	+++	+++	+++	+++	+++
15	-	+++	+++	+++	+++	+++
17	-	+++	+++	+++	+++	+++
18	-	+++	+++	+++	+++	+++
19	-	+++	+++	+++	+++	+++
20	-	+++	+++	+++	+++	+++

У испитивању отпорности према антибиотицима кориштени су следећи : Неомусин 10 µg и 30 µg , Erythromycin 5µg и 15 µg , Streptomycin 10µg и 300µg , Ampicilin 10 µg и 25 µg , Chloramphenicol 30 µg и Kanamycin 30µg . Из табеле 9 и 10 се види да

стимулације нема код Неомусина и Канамусина . На Неомусин 10 µg прилагођавање бактерија у облику успореног раста се не дешава само код изолата 2 , 4 , 10 и 17. Код Неомусин 30 µg јаку инхибицију развијају изолати 2 и 10 , а средњу изолат 18 , сви остали развијају резистенцију у виду успореног раста после благе инхибиције или без ње код изолата 7 и 15 . Изолат 17 развија резистенцију на : Неомусин , Erythromycin , Streptomycin , Ampicilin и Chloramphenicol . Код Erythromycin 5µg и 15 µg сви изолати у почетку реагују инхибицијом , а касније се прилагођавају на антибиотик у виду успореног раста или стимулације, осим изолата 4, 6 , 7 , 18 , 19 , и 20. На Erythromycin је резистентан само изолат 17 . На Streptomycin реагују стимулацијом следећи изолати : 2 ,4 , 10 и 17 . Тоталну инхибицију има само изолат 18 код оба Streptomycina. Код јачег Streptomycina тоталну инхибицију има и изолат 17 који је иначе показао највећу отпорност према антибиотицима.Изненађујуће је то да изолати 2 и 4 показују већу стимулацију код Streptomycin 300 µg него код Streptomycin 10 µg . На Ampicilin су реагују стимулацијом сви осим 2 и 18, код којих се појављује након благе инхибиције успорен раст, а 20 је без промена. Код Chloramphenicol 30 µg се појављује стимулација код 2 , 10 и 17. Средње инхибиторну реакцију имају 4 , 7 , 11 , 15 , 18 , 19 и 20. На Канамусин 30µg јаку инхибиторну реакцију има изолат 2, средњу имају изолати 10 , 17 и 18 , док остали реагују успореним растом.

Табела 11: Отпорност изолата *Bacillus sp.* на различите антибиотике

Изолати	Неомусин 10 µg	Неомусин 30 µg	Erythromycin 5µg	Erythromycin 15 µg	Streptomycin 10µg	Streptomycin 300µg
2	- -	- - -	- - - , ур	- - - , ур	- , +	+++
4	-	- , ур	-	-	++	+++ , ур
5	- , ур	- , ур	- , ур	- , ур	- , ур	- , ур
6	ур	- , ур	-	-	ур	ур
7	ур	ур	-	- , ур	- , ур	- , ур
10	-	- - -	- , ур	- , ур	- , +	-
11	- , ур	- - - , ур	- , ур	- - , ур	- , ур	- , ур
15	ур	ур	- , ур	- , ур	- , ур	- , ур
17	-	- , ур	- , ++	- - , +	- , ур, +	- - -
18	- , ур	- -	- -	- -	- - -	- - -
19	- , ур	- , ур	-	- , ур	ур, -	- , ур
20	ур	- , ур	-	-	- , ур	- , ур

Инхибиција (- слаба <5mm , - - средња 5-10 mm , - - - јака >10 mm)

Стимулација (+ слаба <5mm , ++ средња 5-10 mm , +++ јака >10 mm)

Ур – успорен раст

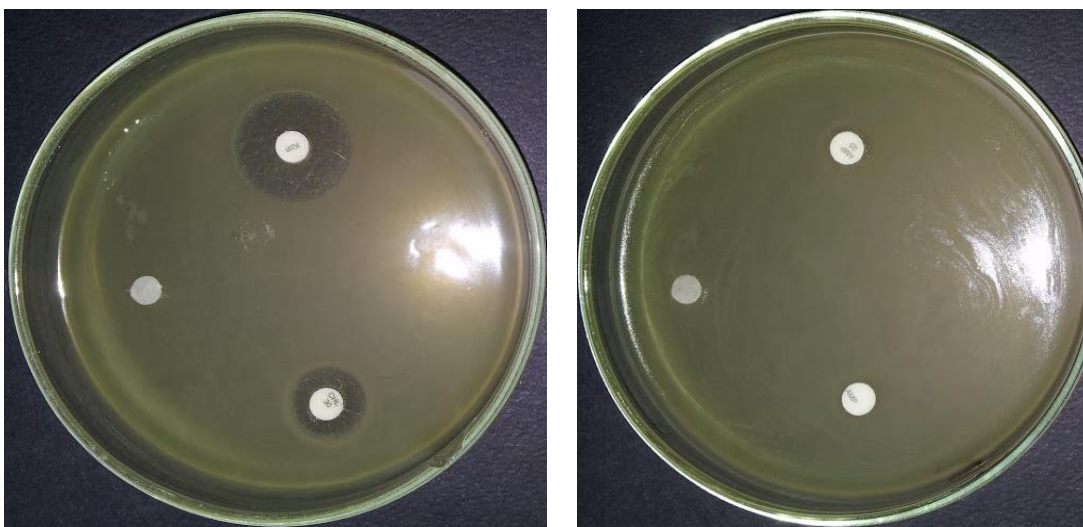
Табела 12: Отпорност изолата *Bacillus sp.* на различите антибиотике

Изолати	Ampicilin 10 µg	Ampicilin 25 µg	Chloramphenicol 30 µg	Kanamycin 30µg
2	- , ур	- , ур	- , ур , + , -	- - -
4	- , ур , +	- , ур , +	- -	- - , ур
5	ур , +	+	-	ур
6	+	+	ур	ур
7	+	+	- -	- , ур
10	- , +	- , +	- , ур , +	- -
11	+	+	- -	ур
15	+	+	- -	ур
17	- , +	- , +	- , +	- -
18	- - , ур	- - , ур	- -	- -
19	- , +	- , +	- -	ур
20	Без промена	Без промена	- -	ур

Инхибиција (- слаба <5mm , - - средња 5-10 mm , - - - јака >10 mm)

Стимулација (+ слаба <5mm , ++ средња 5-10 mm , +++ јака >10 mm)

Ур – успорен раст



Слика 4 : Деловање антибиотика на изолат (лево) и без деловања (десно)

Отпорност изолата *Bacillus sp.* је испитивана на растворе следећих тешких метала : кадмијум, олово и манган. Манган је на све изолате деловао стимулативно. Код олова је ситуација била без промена у односу на контролу , а код кадмијума је зависила од концентрације. На концентрацији 10^{-6} није било промена , на 10^{-4} су најотпорнији изолати : 4 , 6 , 7 , 17 , 18 , 19 и 20. Инхибиција се јавила код изолата 2 и 10 . Изолати 6 , 19 и 20 су отпорни и на високу концентрацију овог тешког метала.

Табела 13: Отпорност изолата *Bacillus sp.* на растворе тешких метала

Изолати	Cd 10 ⁻²	Cd 10 ⁻⁴	Cd 10 ⁻⁶	Pb 10 ⁻²	Pb 10 ⁻⁴	Pb 10 ⁻⁶
2	-- , ур , -	-	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена
4	-	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена
5	ур	ур	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена
6	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена
7	ур	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена
10	-- , ур, -, ур	- , ур	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена
11	ур	ур	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена
15	ур	ур	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена
17	-	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена
18	-	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена
19	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена
20	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена

Инхибиција (- слаба <5mm , - - средња 5-10 mm , - - - јака >10 mm)

Стимулација (+ слаба <5mm , ++ средња 5-10 mm , +++ јака >10 mm)

Ур – успорен раст

Табела 14: Отпорност изолатата *Bacillus sp.* на растворе тешких метала

Изолати	Mn 10 ⁻²	Mn 10 ⁻⁴	Mn 10 ⁻⁶
2	+++	++	Без промена
4	+++	++	+
5	+++	++	+
6	+++	++	+
7	+++	++	+
10	+++	++	+
11	+++	++	+
15	+++	+++	+
17	+++	++	+
18	+++	++	+
19	+++	++	+

20	+++	++	Без промена
----	-----	----	----------------

Инхибиција (- слаба <5mm , - - средња 5-10 mm , - - - јака >10 mm)

Стимулација (+ слаба <5mm , ++ средња 5-10 mm , +++ јака >10 mm)

Ур – успорен раст



Слика 5 : Стимулативно деловање Mn на изолат (лево) , инхибиторно деловање Cd (средина) и без деловања Pb (десно)

Отпорност изолата *Bacillus sp.* на растворе различитих пестицида испитивана је на следећим препаратима : Prochloraz , Nicosulfuron , Benalaxyl+ Fluazinam , Fluroхур-Меptyl , Boskalid + Piraklostrobin и Makozeb-S . На контактни фунгицид Prochloraz , у препорученој дози од 0,6 l/ha, сви изолати углавном реагују без промена, осим изолата 10 који реагује благом инхибицијом и и изолата 18 који реагује благом стимулацијом. На исти фунгицид у 10 пута јакој концентрацији изолати 2 , 4 , 10 , 15 , 17 , 19 и 20 реагују инхибицијом . Изолат 2 средњом , а сви остали слабом. Изолат 18 и овде реагује благом стимулацијом. Код осталих изолата нема промена у односу на контролу. Код хербицида Nicosulfuron у препорученој дози од 1,2 l/ha , је слична ситуација. Сви изолати су без промене , осим 18 код ког се јавља блага стимулација. У 10 пута јакој концентрацији промена се дешава код изолата 11 и 15 који реагују благом инхибицијом , док је код осталих ситуација непромењена . Код системичног фунгицида (против пламењаче) Benalaxy l+ Fluazinam се углавном у почетку јавља инхибиција , блага код препоручене дозе од 1 l/ha , а код 10 пута јаче концентрације средња до јака , која касније прелази у успорен раст, што значи да се изолати после кратког времена привикавају на фунгицид и даље се нормализује њихов раст и развој. Једино се успорен раст не јавља код изолата 18 где се дешава јака инхибиција и код изолата 20

где је инхибиција слаба. Код хормонског хербицида Fluroхурур- Мертл у препорученој дози од 2 l/ha је код свих изолата без промене осим код 19 где се јавља блага стимулација. На 10 пута јачу концентрацију сви изолати у почетку регују благом инхибицијом која прелази у благу стимулацију, осим 6 и 7 код којих се не јавља стимулација. Код системичног фунгицида (ботритицида) , Boskalid + Piraklostrobin у препорученој дози од 800 g/ha делује на изолате углавном благо стимулативно осим 2 , 7 и 20 код којих нема промене у односу на контролу. Код 10 пута јаче концентрације је код скоро свих изолата стимулација блага до средња , осим код изолата 2 где је без промена. Код фунгицида за третман семена Makozeb-S и у препорученој дози од 200g у 600ml воде за 100kg семена и у 5 пута јачој концентрацији, у готово свим случајевима се у почетку јавља средња инхибиција која прелази у средњу и јаку стимулацију, осим код изолата 17 код ког се јавља још и зона успореног раста. Из овог истраживања се закључује да се микробиолошко ђубриво Bacillomix спесијал може мешати са свим препаратима за заштиту биља без бојазни о смањењу његовог квалитета.

Табела 15: Отпорност изолата *Bacillus sp.* на растворе различитих пестицида

Изолати	Prothloraz П	Prothloraz К	Nicosulfuron П	Nicosulfuron К	Benalaxyl + Fluazinam П	Benalaxyl + Fluazinam К
2	Без промена	--	Без промена	Без промена	-- , ур	--- , ур
4	Без промена	-	Без промена	Без промена	- , ур	-- , ур
5	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена	- , ур	-- , ур
6	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена	- , ур	-- , ур
7	Без промена	Без промена	Без промена	Без промена	- , ур	-- , ур
10	-	-	Без промена	Без промена	- , ур	--- , ур
11	Без промена	Без промена	Без промена	-	- , ур	-- , ур
15	Без промена	-	Без промена	-	- , ур	-- , ур
17	Без промена	-	Без промена	Без промена	- , ур	-- , ур
18	+	+	+	+	---	--- , ур
19	Без промена	-	Без промена	Без промена	- , ур	-- , ур

20	Без промена	-	Без промена	Без промена	-	-- , ур
----	-------------	---	-------------	-------------	---	---------

Инхибиција (- слаба <5mm , - - средња 5-10 mm , - - - јака >10 mm)

Стимулација (+ слаба <5mm , ++ средња 5-10 mm , +++ јака >10 mm)

Ур – успорен раст

Табела 16: Отпорност изолата *Bacillus sp.* на растворе различитих пестицида

Изолати	Fluroхур- Meptyl П	Fluroхур- Meptyl К	Boskalid + Piraklostrobin П	Boskalid + Piraklostrobin К	Makozeb- S П	Mankozeb- S К
2	Без промена	- , +	Без промена	Без промена	-- ,+++	-- ,+++
4	Без промена	+	+	++	-- ,+++	-- ,+++
5	Без промена	- , +	+	++	-- ,+++	-- ,+++
6	Без промена	-	+	+	-- ,++	-- ,+++
7	Без промена	-	Без промена	+	-- ,+++	-- ,+++
10	Без промена	- , +	+	+	-- ,+++	-- ,+++
11	Без промена	- , +	+	+	- ,++	-- ,+++
15	Без промена	- , +	+	+	-- ,++	-- ,+++
17	Без промена	- , +	+	++	-- ,++ , ур	-- ,++ , ур
18	Без промена	- , +	+	+	-- ,+++	-- ,+++
19	+	- , +	+	+	-- ,+++	-- ,+++
20	Без промена	- , +	Без промена	+	-- ,+	-- ,++

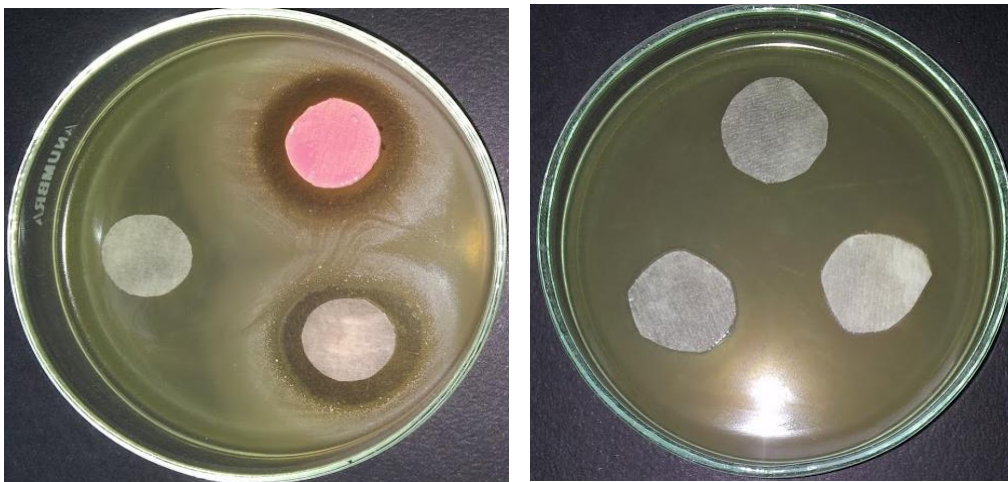
Инхибиција (- слаба <5mm , - - средња 5-10 mm , - - - јака >10 mm)

Стимулација (+ слаба <5mm , ++ средња 5-10 mm , +++ јака >10 mm)

Ур – успорен раст

П – препоручена доза

К – концентрована доза (10 пута већа од препоручене, осим код Mankozeb -S где је 5 пута већа)

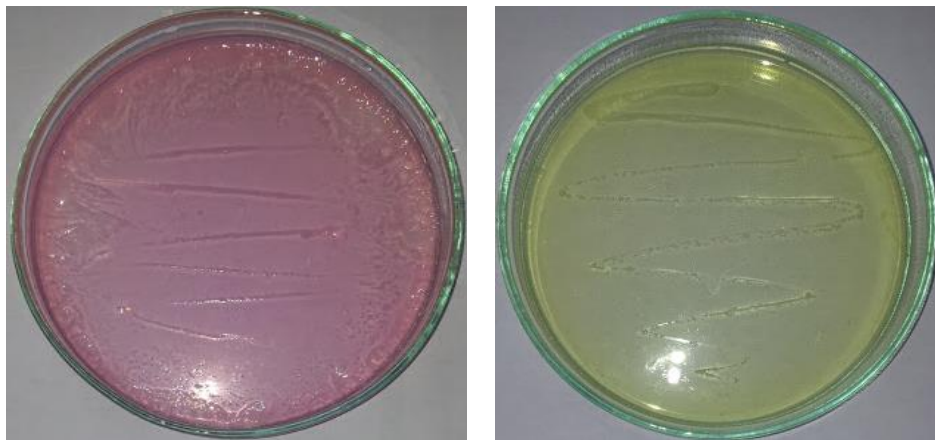


Слика 6 : Деловање Mankozeb-S на изолат (лево) и без промене код Prohlogaza (десно)

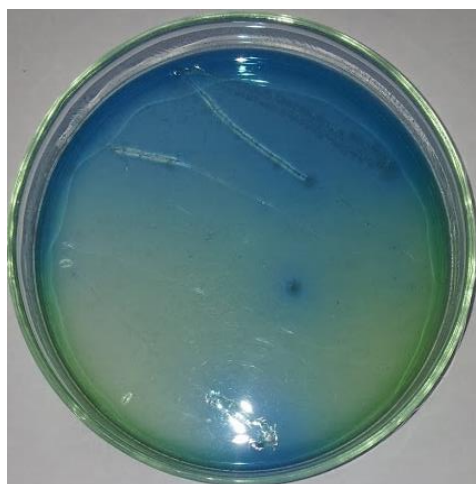
У истраживању способности изолата *Bacillus sp.* да користе цитрат и разграђују уреу провера је рађена на 24 h и 48 h . Након 24 h изолати 4 , 5 , 7 , 18 , 19 и 20 су почели да користе цитрат као извор енергије у слабијем интензитету, док после 48 h цитрат користе 2 , 4 , 5 , 7 , 10 , 18 ,19 и 20 . Изолати 2 и 20 у слабијем интензитету , а остали у јаком. Што се уреје тиче након 24 h позитивну реакцију имају само изолати 17 и 18 . Након 48 h позитивну реакцију имају још и изолати 5 , 7 и 10 . Изолати 2 , 4 , 5 , 7 , 10 , 18 , 19 и 20 имају способност да хидролизују желатин.

Табела 17: Способност изолата *Bacillus sp.* да користе цитрат и разграђују уреу и желатин

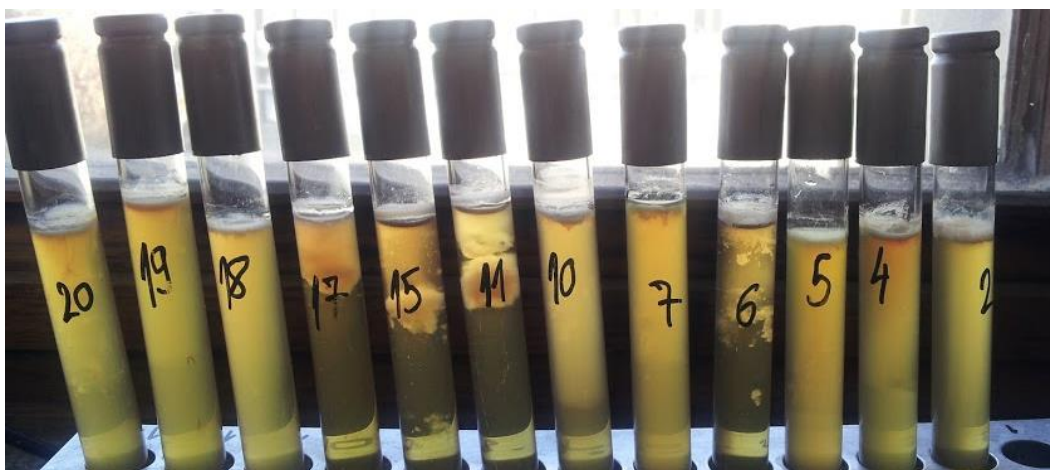
Изолати	Цитрат 24 h	Цитрат 48 h	Уреа 24 h	Уреа 48 h	Желатин
2	-	+	-	-	+
4	+	+++	-	-	+
5	+	+++	-	+	+
6	-	-	-	-	-
7	+	+++	-	+	+
10	-	+++	-	++	+
11	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
17	-	-	+	+++	-
18	+	+++	+	+++	+
19	+	+++	-	-	+
20	+	+	-	-	+



Слика 7: Изолат који разграђује уреју (лево) и без промене у подлози (десно)



Слика 8 : Изолат који користи цитрат



Слика 9 : Хидролиза желатина – у замућеним епруветама је позитивна реакција

Липолитичку активност имају сви изолати осим 10 . Способност хидролизе скроба имају скоро сви изолати осим 4 и 19 . Целулазну активност показују сви изолати. Способност продукције пектиназе имају само изолати 2 и 10 .

Табела 18: Способност изолата *Bacillus sp.* да продукују липазу, амилазу, целулазу и пектиназу

Изолати	Липаза	Амилаза	Целулаза	Пектиназа
2	+	++	+	+
4	+	-	+	-
5	++	+++	+	-
6	+++	+	+	-
7	+	+	+	-
10	-	++	+	+
11	+++	+++	+	-
15	++	+++	+	-
17	++	+++	+	-
18	+++	+	+	-
19	++	-	+	-
20	++	+	+	-



Слика 10 : Продукција амилазе (лево), целулазе (средина) и пектиназе (десно)

6.4 Продукција материја раста

Продукција индол сирћетне киселине (IAA) је мерена након 48 h на UV спектрофотометру. Из истраживања се закључује да поједини изолати продукују IAA без обзира на присуство Л – триптофана (2 , 6 , 7 , 15 , и 19), тј. вредност је иста или чак већа у контроли . Највећа продукција индол сирћетне киселине је код изолата 20 у течној култури са додатком $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ Л –триптофана ($6,50 \mu\text{g IAA ml}^{-1}$) . Високу

вредност има и изолат 2 (6,30 $\mu\text{g IAAml}^{-1}$) у истом медијуму. Трећа вредност по величини је код изолата 2 у контролној варијанти тј. у медијуму без додатка Л – триптофана. Најслабију продукцију IAA имају изолати 6 , 18 и 5, код којих је вредност мања од 1 $\mu\text{g IAAml}^{-1}$ супернатанта .

Табела 19. Способност изолата *Bacillus sp.* да продукују индол сирћетну киселину ($\mu\text{g IAAml}^{-1}$ супернатанта)

Изолати	Контрола	200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Л - триптофана	500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Л - триптофана
2	6,20	5,60	6,30
4	1,30	1,80	2,20
5	0,50	0,70	0,90
6	0,50	0,50	0,65
7	1,70	1,70	2,10
10	2,40	3,00	3,20
11	0,60	0,90	1,20
15	0,70	0,85	0,65
17	0,80	2,30	1,15
18	0,50	0,60	0,75
19	1,50	1,00	1,35
20	3,20	4,00	6,50

Солубилизацију неорганичког фосфора врше изолати 7 и 18 , а HCN придукују сви изолати осим 4 и 10 (Таб. 20).

Табела 20: Способност изолата *Bacillus sp.* да разлажу фосфате и продукују иHCN

Изолати	PO_4^-	HCN
2	-	+
4	-	-
5	-	+
6	-	+
7	+	+
10	-	-
11	-	+
15	-	+
17	-	+
18	+	+
19	-	+
20	-	+



Слика 11 : Изолат који продукује HCN (десно) и који не продукује (лево)

6.5. Ефективност добијених изолата на различитим биљним културама у заштићеном простору

Бактерије имају добру способност преживљавања при интродукцији и повољно утичу на раст биљке .

Огледи са јечмом, пшеницом и кукурузом изведени су у полуконтролисаним условима у PVC контејнерима са хумусним супстратом. Семе је третирано пре сетве 10% раствором, супстрат је третиран 1% раствором а фолијарни третмани су вршени 1% раствором смеше изолата 2 пута у току вегетације.

Табела 21: Утицај примене препарата на дужину корена, број главних коренова, дужину листа и дужину надземног дела јечма

варијанта	Дужина главног корена	Број главних коренова	Дужина I листа	Дужина стабљике (до I листа)
Контрола	15,40	6,8	6,68	2,62
Изолати	22,10	6,8	6,84	3,02
% у односу на контролу	43,51	0,0	2,40	15,27

Применом изолата је добијено повећање дужине корена јечма за 43,51% и дужине стабљике за 15,27%.

Табела 22. Утицај примене изолата на дужину корена, дужину листова и дужину надземног дела пшенице 12 дана након сетве

варијанта	Дужина главног корена	Дужина I листа	Дужина II листа	Дужина III листа	Дужина стабљике (до I листа)
Контрола	15,4	6,58	8,80	5,76	2,62
Изолати	22,1	7,3	9,02	6,68	3,02
% у односу на контролу	43,51	10,94	2,05	15,97	15,27

Применом изолата добијено је повећање дужине корена пшенице за 43,51% , дужине стабљике за 15,27% и дужине листова од 2,05 – 15,97%. Истовремено коренов систем је јачи за 25 – 30%, раније се формирају први листови и пшеница раније улази у фазу бокорења.

Примена изолата у усеву кукуруза, где ја семе третирано предсетвено а препарат је унет и у земљиште, дала је следеће резултате:

- Клијавост је са 92% подигнута на 98%
- Поник кукуруза остварује бољи и бржи пораст у односу на контролу
- Коренов систем је много развијенији и бујнији
- Третиране биљке пре формирају адвентивни корен
- Стабљика третираних биљака на почетку вегетације дебља је до 25% у односу на контролу
- Третиране биљке су у фази развоја увек за један прави лист испред контроле
- У току вегетације кукуруз који је третиран боље реаговао сушу !
- Коначан принос је 10% већи у односу на контролу (Слика 2)



Слика 12 : Изглед биљака кукуруза након примене изолата

6.6. Ефективност добијених изолата на различитим биљним културама у пољским условима

Огледи са шећерном репом и купусом спроведени су у производним условима, на земљишту типа чернозем у атару Ченеја и Кисача.

Табела 23. Утицај фолијарне примене изолата на принос и % дигестије шећера код шећерне репе (третирање 2x са 1,0% и 2x са 1,5% раствором)

	Изолат на 10 К.Ј.	Контрола на 10К.Ј.	% повећања
Принос нето у kg/К.Ј.	39800	37100	7,28%
Дигестија %	17,4	15,5	12,26%

Третиране биљке визуелно показују бољу кондицију, отпорност на сушу и здравију зелену масу, већи корен (Слика 1). Примећено је и заустављање болести *Cercospora beticola* и *Ramularia* када су биљке биле заражене око 5% ,без употребе фунгицида у огледу.



Слика13 : Изглед усева шећерне репе након примене изолата

Примена изолата у усеvu купуса, где је земљиште третирано 1x са 1,0% раствором, а биљке су третиране фолијарно 3 пута дала је следеће резултате:

- 15-20% боље укоренавање расада
- третиране биљке су у бољој кондицији и имају већи коренов систем, стабљике и лисну масу
- 7-10 дана пре долази у фазу главичења, нема болести!
- коначан принос је 15-20% већи у односу на контролу и 10 дана пре улази у фазу зрелости
- већи принос на сорти футошки купус око 20%



Слика 14 : Изглед биљака купуса на контролним варијантама



Слика 15 : Изглед биљака купуса на варијантама третираним одређеном количином изолата

7. ЗАКЉУЧАК

Након пребројавања заступљености бактерија из рода *Bacillus* sp. , 12 изолата са најбољим преживљавањем одабрано је за даља испитивања.

На основу морфолошких особина колоније и ћелије испитивани изолати *Bacillus* sp. се највише разликују према ивици и структури колоније, односно дужини и ширини самог штапићастог облика ћелије.

Сахароза је шећер из ког изолати најлакше користе угљеник, те је због тога даље кориштен у производњи „BACILLOMIX SPECIJALA“.

Приликом испитивања утицаја температуре на раст изолата доказано је да су сви изолати *Bacillus* sp. типични мезофили.

На основу испитивања раста изолата *Bacillus* sp. на различитим рН закључено је да су они изразити неутрофилни до благо алкалофилни микроорганизми.

Концентрација од 3-7% NaCl не утиче на раст било ког изолата.

Изолати *Bacillus* sp. најмању отпорност показују према антибиотицима Неомусин и Канамусин код којих не долази до појаве стимулације. Код Streptomycina од 300μg тоталну инхибицију има изолат 17 који је иначе показао највећу отпорност према антибиотицима.

Манган је на све изолате деловао стимулативно. Код олова је ситуација била без промена у односу на контролу , а код кадмијума је зависила од концентрације. Изолати 6 , 19 и 20 су отпорни и на високу концентрацију овог тешког метала.

Сви изолати *Bacillus sp.* су углавном отпорни на растворе различитих пестицида, осим изолата 10 који реагује благом инхибицијом на контактни фунгицид Prothloraz, у препорученој дози.

Након 48 h цитрат користе изолати *Bacillus sp.*: 2, 4, 5, 7, 10, 18, 19 и 20. Изолати 2 и 20 у слабијем интензитету, а остали у јаком.

Након 24 h уреу разграђују само изолати 17 и 18, а после 48 h позитивну реакцију имају још и изолати 5, 7 и 10.

Изолати 2, 4, 5, 7, 10, 18, 19 и 20 имају способност да хидролизују желатин.

Липолитичку активност имају сви изолати осим 10.

Способност хидролизе скроба имају скоро сви изолати осим 4 и 19.

Целулазну активност показују сви изолати.

Способност продукције пектиназе имају само изолати 2 и 10.

Поједини изолати продукују IAA без обзира на присуство Л – триптофана (2, 6, 7, 15, и 19). Највећа продукција индол сирћетне киселине је код изолата 20 у течной култури са додатком $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ Л – триптофана ($6,50 \mu\text{g IAA ml}^{-1}$).

Солубилизацију неорганиског фосфора врше изолати 7 и 18.

HCN продукују сви изолати осим 4 и 10.

Применом изолата *Bacillus sp.* у заштићеном простору је добијено повећање дужине корена пшенице и јечма за 43,51% и дужине стабљике за 15,27%. Клијавост кукуруза је повећана за 6%, а све испитиване биљне врсте биле су у бољој кондицији, пре су улазиле у наредне фенолошке фазе у односу на контролу.

Третиране биљке шећерне репе у пољским условима визуелно показују бољу кондицију, отпорност на сушу, здравију зелену масу и већи корен. Примећено је и заустављање болести *Cercospora beticola* и *Ramularia* када су биљке биле заражене око 5%, без употребе фунгицида у огледу.

Примена изолата у усеву купуса утицала је на 15-20% боље укоренавање расада, повећање кореновог система, стабљике и лисне масе као и улазак биљака у фазу главичења 7-10 дана раније у односу на контролу.



Република Србија
МИНИСТАРСТВО
ПОЉОПРИВРЕДЕ, ШУМАРСТВА И
ВОДОПРИВРЕДЕ
Управа за заштиту биља
Број: 321-01-00286/2014-11
Датум: 19.02.2014. године
Нови Београд
Омладинских бригада 1

На основу члана 18. став 3. и 4. Закона о средствима за исхрану биља и оплемењивачима земљишта („Сл. гласник РС”, бр. 41/09) и члана 192. Закона о општем управном поступку („Сл. лист СРЈ”, бр. 33/97, 31/01 и „Сл. гласник РС”, бр. 30/10), директор Управе за заштиту биља, по овлашћењу министра пољопривреде, шумарства и водопривреде по решењу бр. 119-01-441/2013-11 од 13.09.2013. године, решавајући по захтеву Амакс доо, Београд, Руварчева 10 за упис микробиолошког ђубрива Bacillomix специјал у Регистар средстава за исхрану биља и оплемењивача земљишта, доноси

РЕШЕЊЕ

1. УПИСУЈЕ СЕ средство за исхрану биља у Регистар средстава за исхрану биља и оплемењивача земљишта, под редним бројем уписа **2013**, са следећим подацима:

- 1) *Трговачки назив:* Bacillomix специјал
- 2) *Врста:* Микробиолошко ђубриво
- 3) *Тип:* Микробиолошки препарат који садржи стимулаторе раста биљака
- 4) *Назив ђубрива у оквиру типа:* Микробиолошки препарат који садржи микроорганизме који производе материје раста
- 5) *Назив и адреса произвођача:* Амакс доо, Београд, Руварчева 10
- 6) *Назив и садржај хранљиве материје*

Бактерија	Садржај
<i>Bacillus sp.</i>	1,5 x 10 ⁸ ћелија/ml

- 7) *Физичке особине*

7.1.	облик формулације	раствор
7.2.	боја	светло жута
7.3.	мирис	без
7.4.	рН	6,5-7

- 8) *Примена*

8.1.	<i>Биљне врсте и тип земљишта за које је намењено</i>	У производњи ратарских, повртарских, воћарских биљних врста и у цвећарству.
8.2.	<i>Количина примене</i>	1,0%-1,5% раствор за фолијарну примену, третирање земљишта и уз наводњавање кап по кап. До 10% раствор за хектарску дозу код предсетвене инокулације семена.
8.3.	<i>Време и начин примене</i>	Фолијарно 2-4 пута у току вегетације третирањем надземних делова биљке. Предсетвена инокулација семена најраније 120 дана пре сетве. Третирање земљишта (прскање са заоравањем) или

		током вегетације биљака.
8.4.	Број третирања у току године	2-6 пута.

2. **РОК ВАЖЕЊА РЕШЕЊА:** До 19.02.2024. године.

Образложење

Амакс доо, Београд је, у својству произвођача поднео захтев (допис од 31.01.2014. године заведен под бројем 321-01-00286/2014-11 од 11.02.2014. године) за упис микробиолошког ђубрива Bacillomix специјал у Регистар средстава за исхрану биља и оплемењивача земљишта.

Уз захтев су приложена следећа документа:

1. извештај о извршеним испитивањима физичких и хемијских особина са мишљењем о биолошкој хранљивој вредности ђубрива, урађен од стране овлашћене организације: Пољопривредни факултет, Нови Сад, Лабораторија за испитивање земљишта, ђубрива и биљног материјала, Трг Доситеј Обрадовића 8 (допис бр. 2000-92/2 од 30.01.2014. године);
2. сертификат о саставу и садржају хранљивих материја;
3. безбедносни лист;
4. подаци о начину производње и сировинама које улазе у састав;
5. доказ о упису у Регистар привредних субјеката.
6. Доказ о испуњености услова за производњу средстава за исхрану биља (мишљење о давању сагласности на Студију о процени утицаја на животну средину бр. 011-00-00066/2014-05 од 03.02.2014. године).

Поступајући по наведеном захтеву, одлучено је као у диспозитиву а на основу приложене документације, у складу са:

1. чланом 18. ст. 3. и 4. Закона о средствима за исхрану биља и оплемењивачима земљишта („Сл. гласник РС“, бр. 41/09);

2. чл. 3. тачка 4), чл. 14. став 1. тачка 3) и став 4., чл. 17., чл. 35. и чл. 54. Правилника о условима за разврставање и утврђивање квалитета средстава за исхрану биља, одступањима садржаја хранљивих материја и минималним и максималним вредностима дозвољеног одступања садржаја хранљивих материја и о садржини декларације и начину обележавања средстава за исхрану биља („Сл. гласник РС“ бр. 78/09) и

3. чл. 2, 3. ст. 1. и 2. и чл. 7. Правилника о обрасцу и садржини захтева за упис у Регистар средстава за исхрану биља и оплемењивача земљишта и садржини и начину вођења тог регистра, садржини захтева и документације која се прилаже уз захтев за коришћење средстава за исхрану биља и оплемењивача земљишта која се користе у научно-истраживачке сврхе и стављање у промет на одређено време и у одређеној количини („Сл. гласник РС“, бр. 104/09).

Таксе у складу са Законом о републичким административним таксама („Сл. гласник РС“, бр. 43/03, 51/03-исправка, 53/04-др. пропис, 42/05- др. пропис, 61/05, 101/05- др. закон, 42/06- др. пропис, 47/07- др. пропис, 54/08- др. пропис, 5/09, 54/09, 35/10- др. пропис, 50/11, 70/11- др. пропис, 55/12, 93/12, 47/13- др. пропис и 65/13- др. пропис) по тарифном броју 1. у износу од 280 динара и по тарифним броју 19. тачка 1. у износу од 1.400 динара плаћене су посебним уплатницама уз поднесак.

Упутство о правном средству:

Ово решење је коначно у управном поступку. Против овог решења може се покренути управни спор пред Управним судом Србије, у року од 30 дана од дана пријема решења.



Достављено:

1. Амакс доо, Београд, Руварчева 10
2. Архива

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Anonymus 1 : *Bacillus subtilis* GB03 (129068) Fact. Sheet. http://www.epa.gov/pesticides/biopesticide/ingredients/factsheets/factsheet_129068.htm, 1999 .
2. Anonymus 13 : Subtilex biological fungicide. <http://www.nutrasol.com/library/subtilex.pdf>, 2003 .
3. Bowen , G.D., Rovira, A.D., (1999) : The rhizosphere and its management to improve plant growth . *Avan . Agron .* 66 , 1-102
4. Compant , S., Duffy , B., Nowak, J., Clement , C., Barka , E.A., (2005) : Use of Plant Growth Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles , Mechanisms , of Action and Furtture Prospect . *Applied and environmental microbiology* , 71 (9) : 4951 – 4959 .
5. Cook, R.J.,(2002) : Advances in plant healt management in the twentieth century . *Ann. Rev . Phytopathol .* 38 : 95-116
6. Couillerot , O., Prigent – Combaret , C., Caballero – Mellado , J. and Moenne – Loccoz , Y. (2009) : *Pseudomonas fluorescens* and closely – related fluorescent pseudomonas as biocontrol agents of soil – borne phytopatogens. *Lett. Apl. Microbiol.* 48 , 505 – 512 .
7. Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D., Abdala, G., (2007): Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 1145–1152.

8. Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clause, M.L., Courier, S., Le Roux, C., Raaijmakers, J., Martinotti, M.G., Pierrat, J.C., Garbaye, J. (2005): Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist*, 165:317–328
9. Gerhardson, B. 2002 : Biological substitutes for pesticides . *Trend Biotechnol.*, 20 : 338 – 343
10. Gerhardt, P., Murray, R.G.E. , Wood, W.A. , Krieg, N.R. (1994): *Methods for General and Molecular Bacteriology*. ASM Press, Washington, D.C.
11. Gordon , S.A., Weber , R.P. (1951) : Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant Physiol* 26 , 192 – 197 .
12. Hugh, R., Leifson, E. (1953) : The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria . *J Bacteriol* 66, 24 – 26 .
13. Kasing , A. (1995) : Cellulase production , *Practical biotechnology* , Sarawak, Malaysia .
14. King , E.O., Ward, M.K., Randey D.E. (1954) : Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein . *J Lab Clin Med* 44 , 301 – 307 .
15. Kloepper, J. W., Schroth, M. N. (1978): Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. ed. Station de Pathologic Vegetal et Phytobacteriologic. 2:879-882.

16. Lanyi, B. (1987) : Classical and rapid identification methods for medically important bacteria . *Methods Microbiol* 19 , 1 – 67 .
17. Lee, K.J., Kamala-Kannan, S., Sub, H.S., Seong, C.K., Lee, G.W., (2008): Biological control of Phytophthora blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*. *World J. Microb. Biotechnol.* 24, 1139–1145.
18. Liu, B., Qiao, H., Huang, L., Buchenauer, H., Han, Q., Kang, Z., Gong, Y., (2009): Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biol. Control* 49, 277–285.
19. Lynch , J.M. and Whipps , J.M. (1991) : Substrate flow in the rhizosphere . Pages 15-24 in : *The rhizosphere and plant growth* D.L.Keister and B. Cregan , eds. Beltsville Sympos . In *Agric. Res .* 14 Kluwer , Dordecht , The Netherlands .
20. Menkina, R.A. (1961): Rol *Bacillus megaterium* var *phosphaticum* b pitanii rastenij. *Mikroorganizmi i efektivnoje plodprodiye počv. Akademii Nauk. SSSR.* 238-245.
21. Neјgebauer , V., Живковић , Б., Танасијевић , Ћ.М., Миљковић , Н. (1971) : Педолошка карта Војводине . Нови Сад
22. Ongena, M., Duby, F., Jourdan, E., Beaudry, T., Jadin, V., Dommès, J., Thonart, P., (2005): *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 692–698.
23. Penrose, D.M., Glick, B.R., (2003): Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol. Plant.* 118, 10–15.
24. Pikovskaya, R.I. (1948): Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activities by some microbial species. *Microbiologia*, 17: 362-370.

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

26. Ryu, C.M., Murphy, J.F., Mysore, K.S., Kloepper, J.W., (2004): Plant growth-promoting rhizobacterial systemically protect *Arabidopsis thaliana* against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *The Plant J.*, 39: 381-392

27. Sambrook, J., Russell, D.W. (2001): *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

28. Soares, M.M., da Silva, R., Carmona, E.C, Gomes, E. (2001): Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *J Microbiol Biotechnol*, 17: 79-82.

29. Soriano, M., Diaz, P., Pastor, F.I.J. (2000): Pectinolytic systems of two aerobic sporogenous bacterial strains with high activity on pectin. *Curr Microbiol*, 50: 114-8.

30. Swain, M.R., Ray, R.C., (2009): Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiol. Res.* 164, 121–130.

31. Tomlin, C., (Ed.) (2006) : *The Pesticide Manual* British Crop Protection Council . Farnham, UK

32. Tsavkelova , E., A., Klimova , S. Yu ., Cherdyntseva , T.A., Netrusov , A.I. (2006) : Microbials producers of plant growth stimulators and their practical use : A review . *App. Biochem. Microbiol.* 42 (2) : 117 – 126

33. Weller , D. M., Raaijmakers , J.M., Gardener , B. B. M., Thomashow , L . S. (2002) : Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens . Ann. Rev. Phytopath. 40 : 309 – 348 .
34. Yao, A.V., Bochow, H., Karimov, S., Boturov, U., Sanginboy, S., Sharipov, A.K., (2006): Effect of FZB® 24 *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. Arch. Phytopathol. Plant Prot. 39, 323–328.
35. Вера Рашковић (2013) : Органска производња поврћа , Висока пољопривредна школа струковних студија , Шабац .
36. Говедарица , М., Јарак , М. (1999) : Практикум из микробиологије . Пољопривредни факултет , Нови Сад .
37. Јарак, М. ,Ђурић, С. (2006) : Практикум из микробиологије . Пољопривредни факултет , Нови Сад .
38. Јарак, М., Чоло, Ј. (2007) : Микробиологија земљишта . Пољопривредни факултет , Нови Сад .
39. Клокочар – Шмит , З., Јарак, М., Мijaлчић, М., Инђић, Д. и Ђурић, Т. (2005) : *Bacillus* based products in control of *Fusarium* potato tuber rot . Proceedings Balkan Scientific Conference , Carnobat , Bulgaria , 578 – 582
40. Клокочар – Шмит , З., Ђурић, Т., Инђић, Д., Перичевић, Д., Бочаров, А. и Николић, Н. (2003) : Ефекат *Bacillus subtilis* ST/III (ВЕС) у заштити и биорегулацији неких повртарских врста. Зборник резимеа шестог саветовања о заштити биља, Златибор, стр. 68 .

41. Клокочар – Шмит , З., Шовљански , Р. и Инђић, Д. (2006) : Биопрепарати – алтернатива у заштити плодови­тог порћа. Биљни лекар , XXXIV (1) :19 – 30 .
42. Клокочар – Шмит , З., Шовљански , Р. и Инђић, Д. и Вуковић, С. (2006) : Могућност еколошке производње кромпира . Зборник IV Међународне Еко – конференције 2006 , Нови Сад , стр. 319 – 324 .
43. Милић В., Јарак М., Мрковачки Н., Милошевић Н., Говедарица М., Ђурић С., Маринковић Ј.: Примена микробиолошких ђубрива и испитивање биолошке активности у циљу заштите земљишта (прегледни Dijkstra, A.F., Scholten, G.H.N. van Veen, J.A., (1987): Colonization of wheat seedling (*Triticum aestivum*) roots by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Biol. Fert. Soils* 4, 41–46.

9. БИОГРАФИЈА

Наташа Дошен је рођена 09.03.1976. године у Лозници. Похађала основну школу „Анта Богићевић“ у Лозници и завршила је са одличним успехом .

1994. године завршила са одличним успехом природно-математички смер у Гимназији „Вук Караџић“ у Лозници .

2003. године завршила је основне академске студије на Пољопривредном факултету у Новом Саду на смеру Заштита биља са општим успехом 7,31 и оценом 9 на дипломском испиту из научне области Познавање и сузбијање корова .

2014. године уписује дипломске академске студије - мастер на Пољопривредном факултету у Новом Саду, студијски програм : Земљиште и исхрана биљака . Утоку мастер студија положила је све предвиђене испите са просечном оценом 9,83 и пријавила мастер рад под насловом „ Производња и примена микробиолошког препарата BACILLOMIX SPECIJAL“ из научне области Производња и примена биопрепарата .

Од 2004 - 2014. била је власник пољопривредне апотеке „ Agrocentar Došen“ у Кисачу, где је стицала професионална искуства у светодавству на терену и у апотеци.

Од 2009 – 2015. била је запослена у Nafta d.o.o. на месту стручног консултанта у набавци пестицида и ђубрива . Рад на тој позицији је подразумевао и саветовање пољопривредних произвођача о употреби и примени истих.

Од 1999. године удата и има двоје деце : Страхињу (15) и Антонину (12).