

UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Studijski program: Zemljište i ishrana biljaka
Podgrupa: Mikrobiologija

Karakterizacija mikroorganizama promotora rasta
i njihovo preživljavanje u rizosferi engleskog
ljudja

Doktorska disertacija

Mentor: Prof. Dr Mirjana Jarak
Stamenov

Kandidat: mr Dragana

Novi Sad, 2013. godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

Ključna dokumentacijska informacija Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa:

Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada:

Doktorska disertacija

VR

Ime i prezime autora:

mr Dragana Stamenov

AU

Mentor:

Dr Mirjana Jarak, redovni profesor

MN

Naslov rada:

Karakterizacija mikroorganizama promotora rasta
i njihovo preživljavanje u rizosferi engleskog ljulja

NR

Jezik publikacije:

Srpski

JP

Jezik izvoda:

Srpski / Engleski

JI

Zemlja publikovanja:

Republika Srbija

ZP

Uže geografsko područje:

AP Vojvodina

UGP

Godina:

2013.

GO

Izdavač:

Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa:

21000 Novi Sad, Poljoprivredni fakultet,
Trg D. Obradovića 8.

MA

Fizički opis rada:

9 poglavlja, 160 strana, 28slika, 13 grafikona,
35 tabele, 380 literaturnih navoda,

FO

Naučna oblast:

Biotehničke nauke

NO

Naučna disciplina:

Mikrobiologija

ND

Predmetna odrednica, ključne reči:

PGP mikroorganizmi, karakterizacija, inokulacija,
prinos, engleski ljulj

PO

UDK	579:573.4:631.559(043.3)
Čuva se:	Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta,
ČU	Novi Sad
Važna napomena:	Nema
VN	
Izvod:	
IZ	

PGP mikroorganizmi (Plant Growth Promoting) su predmet mnogobrojnih istraživanja, čiji je glavni cilj pronalaženje adekvatnog načina njihove primene u poljoprivredi, hortikulturi, šumarstvu i zaštiti životne sredine. Cilj ovih istraživanja bio je izolacija i karakterizacija mikroorganizama sa PGP svojstvima iz rizosfere engleskog ljulja, ispitivanje sposobnosti njihovog preživljavanja nakon unošenja u zemljište, kao i praćenje uticaja njihove primene na parametre prinosa i mikrobiološku aktivnost u rizosferi biljke.

Karakterizacija izolata roda *Pseudomonas*, *Bacillus* i *Streptomyces* obuhvatila je određivanje fizioloških, biohemijskih i PGP osobina. Uticaj introdukcije odabranih izolata i gljive *Trichoderma asperellum* na brojnost i mikrobiološku aktivnost u rizosferi engleskog ljulja, određivan je standardnim metodama na selektivnim hranljivim podlogama, a dehidrogenazna aktivnost spektrofotometrijskom metodom. U laboratorijskim uslovima ispitivan je efekat primene izolata na klijavost, dužinu korenka i stabaoca klice semena engleskog ljulja. U toku godine, uzimana su tri otkosa i pri tome su određivani dužina nadzemnog dela i korena biljke (cm) i prinos zelene i suve materije nadzemnog dela biljke po otkosu (t/ha).

Na osnovu morfoloških, fiziološko-biohemijskih, kao i PGP osobina koje su izolati pokazali, te na osnovu rezultata mnogobrojnih dosadašnjih istraživanja, može se zaključiti da izolati P1 i P9 pripadaju vrsti *Pseudomonas putida*, izolat P12 *Pseudomonas fluorescens*, izolati B1, B3 i B6 vrsti *Bacillus subtilis*, a izolati A1, A2, A3 rodu *Streptomyces*. Brojnost pojedinih sistematskih i fizioloških grupa mikroorganizama kao i enzimatska aktivnost u rizosferi engleskog ljulja, zavisila je od primenjenih inokulanata. Primena izolata *Pseudomonas* sp. P12 pozitivno je uticala na povećanje ukupnog broja mikroorganizama, brojnost gljiva, aminoheterotrofa i aktinomiceta. Izolat *Bacillus* sp. B1 uticao je na povećanje ukupnog broja mikroorganizama, brojnosti gljiva i azotobaktera. Primena izolata *Streptomyces* sp. A3 dovela je do povećanja broja aktinomiceta i oligonitrofila, dok je primena *Trichoderma asperellum* uticala pozitivno na povećanje broja aminoheterotrofa i azotobaktera. Primena izolata *Pseudomonas* sp. P12 i *Streptomyces* sp. A3 imala je najveći efekat na dehidrogenaznu aktivnost. Inokulacija je imala pozitivan uticaj na klijavost, svežu i suhu masu biljke, visinu i dužinu korena biljaka. Primena gljive *Trichoderma asperellum* i izolata *Streptomyces* sp. A3 delovala je pozitivno na klijavost, dužinu korenka i stabaoca klice. U proseku, najbolji efekat na prinos sveže i suve materije, kao i na visinu nadzemnog dela i dužinu korena biljke, imala je primena izolata *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1.

U proizvodnji krmnih trava mikroorganizmi još nisu našli značajniju praktičnu primenu iako je veći i kvalitetniji prinos jedan od ciljeva stočarske proizvodnje. Rezultati ovih istraživanja su pokazali da se primenom mikroorganizama mogu postići pozitivni efekti i u proizvodnji engleskog ljuļa. Zbog toga je veoma značajno da se vrše dalja ispitivanja uzajamnog odnosa primenjenih mikroorganizama i engleskog ljuļa u poljskim uslovima, kako bi se optimizirao naćin i vreme primene inokulanata.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća:

01. 04. 2010.

DP

Datum odbrane:

DO

Ćlanovi komisije:

KO

Prof. dr Mirjana Jarak, redovni profesor za uću naućnu oblast Mikrobiologija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Mentor:

dr Dragana Jošić, naućni savetnik, biotehnićke nauće-biotehnologija, Institut za zemljište, Beograd, Predsednik:

Prof. dr Branko Ćupina, redovni profesor za uću naućnu oblast Krmno bilje, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Ćlan:

University of Novi Sad
Faculty of Agriculture

Key word documentation Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

Monograph documentation

DT

Type of record:

Textual printed material

TR

Contents code:

PhD thesis

CC

Author:

Dragana Stamenov, M.Sc.

AU

Mentor:

Mirjana Jarak, PhD, Full Profesor

MN

Title:

Characterization of microorganisms with PGP characteristics and their survival in the rhizosphere of perennial ryegrass

TI

Language of text:

Serbian

LT

Language of abstract:

English / Serbian.

LA

Country of publication:

Republic of Serbia

CP

Locality of publication:

AP Vojvodina

LP

Publication year:

2013

PY

Publisher:

Author,s reprint

PU

Publication place:

Novi Sad, Faculty of Agriculture,

PP

D. Obradovića squer 8

Physical description:

9 chapters, 160 pages, 28 pictures, 13 figures, 35 tables, 380 references,

PD

Scientific field

Biotechnology

SF

Scientific discipline

Microbiology

SD

Subject, Key words

PGP microorganisms, characterization, inoculation, yield, perennial ryegrass

SKW

UDC

579:573.4:631.559(043.3)

Holding data:

Library of the Faculty of Agriculture of the University of Novi Sad

HD

Note:

None

N

Abstract:

AB

PGP microorganisms (Plant Growth Promoting) have been the subject of many research projects, whose main goal is to find appropriate methods of their use in agriculture, horticulture, forestry and environmental protection. The aim of this study is the isolation and characterization of microorganisms with PGP characteristics from the rhizosphere of perennial ryegrass, testing their ability to survive after entering the soil, and monitoring the impact of their application on yield parameters and microbial activity in the rhizosphere of plants.

Characterization of *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Streptomyces* included determination of the physiological, biochemical and PGP characteristics. Impact of the introduction of selected isolates and fungi *Trichoderma asperellum* on quantity and microbial activity in the rhizosphere of ryegrass was determined by using the standard method of selective media; dehydrogenase activity by the spectrophotometric method. The effects of the implementation of isolates on germination, seedling length sprouts seeds of perennial ryegrass were studied under laboratory conditions. During the year, three cuttings were taken. At each of the three cuttings, length of stem and roots of plants (cm) and yields of fresh and dry matter of the plant (t / ha) were measured.

Based on morphological, physiological and biochemical characteristics and PGP characteristics observed in the isolates, and based on the results of many previous studies, it can be concluded that (1) P1 and P9 isolates belong to the species *Pseudomonas putida*, (2) *Pseudomonas fluorescens* P12 isolate, isolates of B1, B3, B6, belong to the species *Bacillus subtilis*, and (3) A1, A2 and A3 isolates belong to the ordo *Streptomyces*. The quantity of systematic and physiological groups of microorganisms and enzymatic activity in the rhizosphere of ryegrass depended on the applied inoculants. Application of *Pseudomonas* sp. P12 had positive effects on increasing the total number of microorganisms, fungi, aminoheterotrophs and actinomycetes. Isolate *Bacillus* sp. B1 affected the increase of the total number of micro-organisms in the fungi and *Azotobacter*. Application of *Streptomyces* sp. isolates A3 led to an increase in the number of actinomycetes and oligonitrophyls, while the application of *Trichoderma asperellum* had positive impact on increasing the number aminoheterotrophs and *Azotobacter*. Application of *Pseudomonas* sp. P12 and *Streptomyces* sp. A3 had the greatest effect on dehydrogenase activity. Inoculation had a positive effect on germination, fresh and dry weight of plant, height and root

length of plants. Introduction of fungus *Trichoderma asperellum* and *Streptomyces* sp. A3 isolate acted positively on germination, length of seedling of germs. On average, the best effects on the yield of fresh and dry matter, the height of the stem of the plant and the length of the root were attained by the application of *Pseudomonas* sp.P12 and *Bacillus* sp. B1 isolates.

Microorganisms have not yet found significant practical use in the production of forage grasses, even though more qualitative yield has been sought in livestock production. The results of this study demonstrate that positive results in the production of perennial ryegrass can be achieved by the use of microorganisms. Therefore, it is very important to carry out further studies of the relationship between applied microorganisms and ryegrass under field conditions in order to optimize the method and time of application of inoculants.

Accepted on Scientific Board on:

01. 04. 2010.

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

Mirjana Jarak, PhD, Full Professor of Microbiology,
Faculty of Agriculture, Novi Sad, Mentor:

Dragana Jošić, PhD, Scientific Adviser, Institute
of soil science, Belgrade, President:

Branko Ćupina, Full Professor of Forage crops,
Faculty of Agriculture, Novi Sad, Member:

Ovom prilikom želim da se zahvalim mom mentoru prof. dr Mirjani Jarak, koja me je usmeravala i vodila u toku izrade ove teze. Zahvaljujem joj se na prenesenom znanju i ukazanim prilikama.

Zahvalnost dugujem i dr Dragani Jošić i prof. dr Branku Čupini, na brojnim stručnim smernicama i ukazanoj pomoći prilikom finalizacije teze.

Izrada ovog rada ne bi bila moguća bez pomoći mojih dragih koleginica. Posebno se zahvaljujem Simonidi, Timei i Eleni, sa kojima sam provela nebrojene sate u laboratoriji i koje su se pokazale kao pravi prijatelji. Takođe se zahvaljujem i Spomenci na čiju sam pomoć mogla uvek računati.

Neizmernu zahvalnost dugujem svom suprugu Bori, tati, mami, sestri i bratu i njihovim porodicama, koji su me naučili pravim vrednostima i bili mi oslonac na svakom koraku.

Ovaj rad posvećujem svojoj ćerci Lani, koja je izvor moje sreće, bez koje sve ovo ne bi imalo smisla.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	5
2. PREGLED LITERATURE.....	7
2.1. MEHANIZMI DELOVANJA PGP MIKROORGANIZAMA.....	7
2.1.1. Uloga PGP mikroorganizama u ciklusima hranljivih elemenata.....	8
2.1.2. Produkcija biljnih hormona.....	15
2.1.3. Sinteza enzima.....	17
2.1.4. Produkcija antibiotika.....	18
2.1.5. Produkcija siderofora	20
2.1.6. Produkcija cijanida (HCN).....	22
2.2. UTICAJ PGP MIKROORGANIZAMA NA BILJKU.....	22
2.2.1. Primena PGP mikroorganizama u biljnoj proizvodnji.....	23
2.2.2. Primena PGP mikroorganizama u proizvodnji engleskog ljujla.....	31
3. RADNA HIPOTEZA.....	34
4. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	35
5. MATERIJAL I METODE.....	36

5.1. IZOLACIJA, DETERMINACIJA I KARAKTERIZACIJA	
IZOLATA.....	37
5.1.1. Izolacija mikroorganizama iz roda <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> i <i>Streptomyces</i>	37
5.1.2. Morfološke osobine.....	37
5.1.3. Fiziološke osobine	38
5.1.4. Biohemijske osobine.....	39
5.1.5. Produkcija materija rasta.....	41
5.2. ISPITIVANJE EFEKTA INOKULACIJE NA MIKROBIOLOŠKU	
AKTIVNOST RIZOSFERNOG ZEMLJIŠTA.....	43
5.2.1. Broj mikroorganizama.....	43
5.2.2. Dehidrogenazna aktivnost.....	43
5.2.3. Praćenje brojnosti mikroorganizama introdukovanih grupa u rizosferi engleskog ljulja.....	45
5.3. ISPITIVANJE EFEKTA INOKULACIJE NA PARAMETRE	
PRINOSA BILJKE.....	45
5.3.1. Sorta Engleskog ljulja.....	45
5.3.2. Varijante oglada.....	45
5.3.3. Tip zemljišta.....	46

5.3.4. Ispitivanje uticaja izolata na klijanje semena i dužinu klice...	46
5.3.5. Ispitivani parametri prinosa.....	46
5.4. STATISTIČKA OBRADA DOBIJENIH REZULTATA.....	47
6. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	48
6.1. KARAKTERIZACIJA MIKROORGANIZAMA IZ RIZOSFERE ENGLESKOG LJULJA.....	48
6.1.1. Morfološke karakteristike ćelije i kolonije <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp. i <i>Trichoderma asperellum</i>	48
6.1.2. Fiziološke osobine izolata.....	51
6.1.3. Biohemijske osobine izolata.....	59
6.1.4. Plant growth promotion (PGP) osobine.....	67
6.2. MIKROBIOLOŠKE KARAKTERISTIKE ZEMLJIŠTA PRE INOKULACIJE I SETVE.....	72
6.3. EFEKAT INOKULACIJE NA BROJNOST MIKROORGANIZAMA U RIZOSFERI ENGLESKOG LJULJA.....	73
6.3.1. Efekat inokulacije na brojnost i aktivnost mikroorganizama u prvoj godini istraživanja.....	73
6.3.2. Efekat inokulacije na brojnost i aktivnost mikroorganizama u drugoj godini istraživanja.....	80

6.3.3. Efekat inokulacije na brojnost i aktivnost mikroorganizama u trećoj godini istraživanja.....	88
6.4. UTICAJ INOKULACIJE NA KLIJANJE, RAST I PRINOS ENGLESKOG LJULJA	92
6.4.1. Uticaj inokulacije semena na klijavost i dužinu klice.....	92
6.4.2. Uticaj inokulacije na masu sveže i suve materije; dužinu nadzemnog dela i korena engleskog ljulja.....	94
7. DISKUSIJA.....	106
8. ZAKLJUČCI.....	127
9. LITERATURA.....	130
10. BIOGRAFIJA.....	161

1. UVOD

Raznolikost i brojnost mikroorganizama u zemljištu daleko premašuje diverzitet organizama u drugim ekosistemima. Brojnost mikroorganizama u različitim tipovima zemljišta varira od 10^6 do 10^9g^{-1} suvog zemljišta (Whitman et al., 1998). Samo jedan gram zemljišta može biti stanište za više od 10 biliona mikroba, sa više hiljada različitih vrsta (Rosello-Mora i Amann, 2001.). Sastav populacija mikroorganizama u zemljištu rezultat je interakcija između tipa zemljišta, biljne vrste i lokalizacije mikroorganizma u rizosferi (Marschner et al., 2001).

Pojam rizosfera, prvi put je uveo nemački agronom Hiltner (1904), da opiše zonu zemljišta koja se nalazi oko površine korena biljke, a u kojoj su brojnost, aktivnost i metabolizam mikroorganizama određeni i usmereni korenskim izlučevinama. Razlikuju se dve zone rizosfere: spoljna egzorizosfera, koja obuhvata sloj zemljišta do 0,5 cm od korena i unutrašnja histosfera, koja obuhvata tanki sloj na samoj površini korena. Rizosfera predstavlja dinamičan sistem u kome zemljišni mikroorganizmi i biljni koren čine jednu celinu (Raaijmakers et al., 2009).

Biljka svojim izlučevinama, eksudatima, sekrecijama i lizatima, stvara specifične, selektivne uslove u rizosferi, i na taj način utiče na sastav populacije mikroorganizama (Garsia et al., 2001). Korenske izlučevine se razlikuju po hemijskom sastavu. Eksudati su lako razgradivi šećeri, organske i aminokiseline koje nastaju izlučivanjem iz živog korena u toku metabolizma. Sekrecije koje se oslobađaju iz korena biljaka su rastvorene mineralne materije, dok lizati sadrže i aromatične aminokiseline, a nastaju autolizom korena (Kozdroj and van Elsas, 2000; Macek et al., 2000).

U odnosu na okolno zemljište, zbog povoljnih uslova za razvoj, broj mikroorganizama u rizosferi je i do 100 puta veći (Paul i Clark, 1989). Različiti mikroorganizmi, kao što su bakterije, gljive, aktinomicete, protozoe i alge, koegzistiraju u rizosferi. Najviše su zastupljene bakterije, posebno diazotrofi iz familije *Azotobacteraceae* i *Enterobacteraceae* (Wayne et al., 1977; Rennei, 1981), potom rodovi *Bacillus* (Nelson et al., 1976), *Azospirillum* sp., *Pseudomonas* sp. (Juhnke et al., 1989). Pošto su u rizosferi bakterije najbrojnije, smatra se da one u najvećoj meri utiču na fiziologiju same biljke (Zak et al., 1994; Antoun and Kloeppe, 2001).

Mikroorganizmi koji žive u rizosferi, mogu imati negativan ili pozitivan uticaj na rast i razviće biljke (Whipps, 2001). U prvu grupu spadaju patogeni mikroorganizmi (Beattie, 2006), dok u drugu grupu spadaju mikroorganizmi poznati kao mikroorganizmi promotori biljnog rasta, odnosno PGP mikroorganizmi (Barriuso et al., 2005; Beattie, 2006; Bashan and de-Bashan, 2010). Zbog aktuelne zabrinutosti u vezi nepoželjnih dejstava hemijskih sredstava, postoji povećano interesovanje za dublje razumevanje kooperacije između ovih korisnih rizosfernih mikroorganizama i biljaka, kao i za način primene tih saznanja u poljoprivredi.

2. PREGLED LITERATURE

Pojam PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) je prvi put upotrebljen 1978. godine (Kloepper i Schroth, 1978) da definiše heterogenu grupu bakterija, koje se mogu naći u zoni rizosfere, na površini ili u asocijaciji sa korenom biljke (Glick, 1995), a kada se koriste kao inokulanti imaju značajan uticaj na biljni rast, prinos i kvalitet poljoprivrednih kultura. PGPR se takođe nazivaju rizobakterije koje pozitivno utiču na zdravlje biljaka (PHPR, Plant Health Promoting Rhizobacteria) ili bakterije koje pospešuju nodulaciju (NPR, Nodule promoting Rhizobacteria) (Burr and Caesar, 1984). Somers et al. (2004) podelili su PGP mikroorganizme prema njihovoj aktivnosti na: biofertilizatore (povećavaju dostupnost hranljivih materija biljkama); fitostimulatore (stimulišu rast biljaka putem produkcije hormona); rizomedijatore (razlažu organske polutante) i biopesticide (kontrolišu bolesti biljaka produkcijom antibiotika i antifungalnih metabolita).

PGP mikroorganizmi su predmet mnogobrojnih istraživanja, čiji je glavni cilj pronalaženje adekvatnog načina njihove primene u poljoprivredi, hortikulturi, šumarstvu i zaštiti životne sredine (Zahir et al., 2004).

2.1. MEHANIZMI DELOVANJA PGP MIKROORGANIZAMA

PGP mikroorganizmi utiču na rast biljke različitim direktnim i indirektnim mehanizmima. Direktni mehanizmi uticaja na biljni rast podrazumevaju učešće u ciklusima hranljivih elemenata (pri čemu se biljke snabdevaju ugljen-dioksidom, lakodostupnim azotom, fosforom i sumporom), produkciju biljnih hormona (auksina, giberelina, citokinina), kao i smanjenje nivoa biljnog etilena (Van Loon et al, 1998; Glick et al, 1999; Perret et al, 2000).

Indirektni mehanizmi PGP mikroorganizama uključuju antibiotsku zaštitu od patogena (Shanahan et al., 1992), produkciju siderofora (Scher and Baker, 1982) i cijanida (Flaishman et al., 1996), sintezu enzima koji katalizuju lizu ćelijskog zida gljiva i kompeticiju sa štetnim mikroorganizmima (Weller et al., 2002).

2.1.1. Uloga PGP mikroorganizama u ciklusima hranljivih elemenata

Za ishranu biljaka od velike važnosti je dinamika odvijanja procesa mineralizacije i imobilizacije, a koji su pod kontrolom mikroorganizama (Cross and Schlesinger, 1995). U toku ovih procesa PGP mikroorganizmi obezbeđuju biljne asimilative i tako direktno pospešuju biljni rast.

Uloga PGP mikroorganizama u ciklusu ugljenika (C)

Iako se u prirodi ne nalazi u velikoj količini, svega oko 0,1% , ugljenik (C) spada u najvažnije elemente jer ulazi u sastav celokupnog organskog sveta. U prirodi se javlja u slobodnom i vezanom stanju. U slobodnom stanju je u obliku dijamanta i grafita, a u vezanom je u obliku neorganskih (oksidi i karbonati) i organskih (ugljeni hidrati, proteini, lipidi i dr.) jedinjenja.

Mikrobna biomasa C čini oko 1-5% organskog ugljenika u zemljištu (Jenkinson and Ladd, 1981; Smith and Paul, 1990). U intenzivnoj proizvodnji, koja podrazumeva primenu plodoreda i plodosmenu, mikrobna biomasa C je oko 1%. Mikrobna biomasa C je u pozitivnoj korelaciji sa prinosom žitarica u organskoj proizvodnji (Mader et al., 2002).

U odnosu na izvore ugljenika, mikroorganizmi se dele na heterotrofe, autotrofe i miksotrofe. Heterotrofi koriste organske izvore ugljenika, autotrofi koriste CO₂ za sintezu organske materije, a miksotrofi mogu da koriste i organske i neorganske izvore ugljenika, što zavisi od prisustva svetlosti.

Organska jedinjenja ugljenika u zemljište dospevaju uglavnom s biljnim ostacima. Po hemijskom sastavu to su monosaharidi, polisaharidi (celuloza, hemiceluloza, skrob, pektin), lignin, lipidi, voskovi i smole. Njihova transformacija u zemljištu odvija se različitom brzinom u zavisnosti od hemijskog sastava, mikrobiološke aktivnosti, tipa zemljišta i ekoloških uslova. Transformacija celuloze zauzima značajno mesto u biološkom kruženju ugljenika u prirodi i neposredno utiče na stvaranje humusa u zemljištu. To je složen i spor proces u prirodi. Posebno je veliki značaj gljiva (*Trichoderma* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.) i aktinomiceta (*Streptomyces* sp., *Actinomyces* sp.) u razlaganju celuloze i lignina, dveju osnovnih građivnih komponenti biljnih tkiva, s obzirom da se time u velikoj meri uslovljava plodnost zemljišta (Burns, 1982). Gljive produkuj velike količine celulaza direktno u stanište (Rhee i sar., 1987). U zemljištu, naročito u poljoprivrednim ekosistemima, bakterije razlagači

celuloze takođe zauzimaju značajno mesto, ali su u odnosu na gljive bakterije znatno slabiji razlagači celuloze. Među poznatije rezlagače celuloze ubrajaju se bakterije iz rodova *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Cellvibrio* sp. i *Cellulomonas* sp. Sa aspekta biljne proizvodnje najvažnija uloga heterotrofnih mikroorganizama je produkcija ugljenik-dioksida (CO₂) kao biljnog asimilativa i sinteza humusa.

Najčešća neorganska jedinjenja ugljenika su oksidi i karbonati. Oksidi ugljenika se uglavnom nalaze u atmosferi i vodi, a u manjoj meri u zemljištu. Najvažniji oksid ugljenika je ugljenik-dioksid (CO₂). Alge, autotrofni mikroorganizmi, u procesu fotosinteze, u prisustvu sunčeve svetlosti, pigmenta i vode, vezuju ugljenik-dioksid iz atmosfere i prevode ga u organsko jedinjenje, ugljeni hidrat. Osim što učestvuju u ciklusu ugljenika, alga *Chlorella* sp. takođe produkuje hormone rasta (auksine i citokinine), aminokiseline i vitamine te na taj način pozitivno utiče na rast biljke (Pulz and Grass, 2001).

Uloga PGP mikroorganizama u ciklusu azota (N)

U atmosferi azot čini oko 78% zapremine (Galloway et al., 2004). Biljke ne mogu da usvajaju elementarni azot; da bi bio dostupan biljkama N mora biti fiksiran u obliku jedinjenja vodonika ili kiseonika. U zemljištu azot se nalazi u organskom i neorganskom obliku. Oko 90% azota nalazi se u organskom obliku, ulazeći u sastav proteina, nukleoproteida, aminošećera, aminokiselina i karbamida (Foth and Ellis, 1997). Od ukupne količine azota u zemljištu, oko 40% nalazi se u obliku proteina (Schulten and Schnitzer, 1999).

U najvećem broju terestičnih ekosistema azot je nutrijent koji je nedovoljno dostupan biljkama (Robertson and Groffman, 2007). Rosswal (1976) procenjuje da je raspodela azota na kopnu sledeća: u biljkama 4%, biljnim ostacima 1%, mikroorganizmima 0,2%, organskoj materiji oko 85%, a manje od 1% prisutno je u mineralnim oblicima koji su pristupačni biljkama. Približno 2-3% organskog azota se godišnje mineralizuje, a veći deo oslobođenog azota se imobilizuje i usvoji od strane mikroorganizama (Rosswal, 1976). Uloga azota u živim sistemima je višestruka: učestvuje u brojnim fiziološkim procesima, ulazi u sastav jedinjenja kao što su strukturni i katalitički proteini, nukleinske kiseline (DNK, RNK) i dr. (Strasburger et al., 1988; Ulchida, 2000; Kastori i sar., 2005).

Biogeochemijski ciklus azota je od suštinskog značaja za poljoprivrednu proizvodnju, kao i za prirodne ekosisteme (Kavadia et al., 2011). Mikroorganizmi koriste organske i neorganske izvore azota i tako obezbeđuju kruženje ovog elementa u prirodi. Zbog česte obrade zemljišta, u agroekosistemima ovaj ciklus je poremećen, te nedostatak azota predstavlja ograničavajući faktor u proizvodnji biljaka (Vitousek et al., 2002; Shah et al., 2003).

Mikrobiološka transformacija azota protiče kroz nekoliko faza: amonifikacija, nitrifikacija, denitrifikacija i azotofiksacija.

Amonifikatori obuhvataju veliku grupu bakterija, gljiva i aktinomiceta koji učestvuju u procesu amonifikacije tj. procesu razgradnje proteina do amonijum jona (NH_4^+). Raznovrsnost i nespecifičnost amonifikatora je razlog da je ova grupa mikroorganizama u zemljištu brojna. Prema Alexanderu (1977) broj amonifikatora u površinskim horizontima se kreće od 10^5 do 10^7 po gramu zemljišta, a njihov broj zavisi od količine i vrste supstrata, tipa zemljišta i uslova koji tu vladaju. Za ovu grupu mikroorganizama je zajedničko da imaju sposobnost stvaranja ekstracelularnih proteolitičkih enzima koji uzrokuju hidrolitičku razgradnju velikih proteinskih lanaca na manje jedinice, koje ćelija može usvojiti. Hidrolitička razgradnja proteina do aminokiselina predstavlja prvi korak amonifikacije i naziva se degradacija. Dalja razgradnja aminokiselina do amonijum jona naziva se dezaminacija. Amonijačni azot usvajaju biljke i mikroorganizmi, gubi se u procesu volatilacije, fiksira se u zemljištu ili podleže procesu nitrifikacije.

Najveći deo amonijaka (amonijum jona) koji dospeva u zemljište u toku razlaganja organskih azotnih jedinjenja ili putem đubriva uključuje se u proces nitrifikacije. Sa aspekta poljoprivredne proizvodnje, *biološka nitrifikacija* je koristan proces, a brojnost nitrifikatora i njihova aktivnost često se koriste kao indeks plodnosti zemljišta. Nitrifikacija je proces u okviru ciklusa azota gde se amonijačni azot oksidiše u prvoj fazi do nitrita (NO_2^-) i u drugoj oksidacija se odvija do nitrata (NO_3^-). Kao glavni ekološki faktor koji utiče na zastupljenost nitrifikatora navodi se aciditet i aerisanost zemljišta. U slučaju visoke koncentracije vodonikovih jona nitrifikatori se retko ili se uopšte ne pojavljuju (Redžepović i sar., 1985; Sikora, 1990).

U zavisnosti od uslova koji vladaju u zemljištu, biljne vrste, aktivnosti mikroorganizama i agrotehničkih mera, nitrati se na više načina uključuju u dalje transformacije u kojima se vrši njihova redukcija. Proces redukcije nitrata nazvan je *denitrifikacija*. U zavisnosti od toga da li se denitrifikacija odvija u aerobnim ili anaerobnim uslovima, razlikuje se asimilaciona,

disimilaciona i prava denitrifikacija. U slučaju asimilacione i disimilacione denitrifikacije, nitrati se unutar biljnih ili mikrobnih ćelija redukuju do amonijum jona a potom ulaze u proces biosinteze amino-kiselina. U slučaju prave denitrifikacije, nitrati se redukuju do elementarnog azota koji u gasovitom stanju odlazi iz zemljišta.

Najveća količina azota iz atmosfere vraća se u zemljište biološkim putem u toku procesa koji se zove biološka *azotofiksacija*. Biološku azotofiksaciju vrši posebna grupa prokariotskih mikroorganizama sa zajedničkim imenom- azotofiksatori ili diazotrofi.

PGP bakterije koje fiksiraju azot u rizosferi neleguminoznih biljaka bez direktnog kontakta sa biljkom jesu slobodni azotofiksatori (Glick et al. 1999). Slobodni azotofiksatori pripadaju rodovima *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azoarcus* (Reinhold-Hurek et al., 1993), *Azospirillum* (Bashan and de- Bashan, 2010), *Burkholderia* (Estrada de los Santos et al., 2001), *Gluconacetobacter* (Fuentes-Ramírez et al., 2001) i *Pseudomonas* (Mirza et al., 2006). Jedan od najviše proučavanih slobodnih azotofiksatora je *Azospirillum* sp., izolovan iz zemljišta siromašnog azotom (Holguin et al. 1999). Količina fiksiranog azota ovim putem u području umerenog klimata iznosi 20-60 kg, a po nekim rezultatima i do 150 kg /ha (Dobereiner et al., 1972; Mišustin i Emcev, 1978; Umarov, 1985).

Slobodni azotofiksatori mogu pozitivno uticati na rast mnogih neleguminoznih biljaka kao što je to kod rotkve (Antoun et al., 1998), pirinča (Mirza et al., 2006), kukuruza (Hajnal, 2010) i dr., ali i leguminoznih, npr. crvene deteline (Stamenov, 2009). Na taj način biljne kulture se mogu gajiti sa manjom upotrebom hemijskih đubriva (Bhattacharjee et al., 2008).

Endofitni mikroorganizmi koji kolonizuju unutrašnje biljno tkivo korena, stabla ili lista, su takođe sposobni da fiksiraju azot, i da na taj način pozitivno utiču na rast biljke (James and Olivares, 1997). Endofitni mikroorganizmi pirinča, kukuruza, šećerne trske, kao što su *Azotobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azoarcus* sp., *Enterobacter asburiae* i *Burkholderia* sp. u slučaju nedostatka izvora azota u zemljištu fiksiraju azot iz atmosfere (Reinhold et al. 1986, Doberener et al. 1993; Kirchhof et al. 1997).

Mikroorganizmi koji učestvuju u procesu simbiozne azotofiksacije, bakterije iz rodova *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorizobium* i *Azorhizobium*, (sa zajedničkim imenom *rizobium*) prodiru u koren ili stablo leguminoznih biljaka, formirajući pritom izraštaje, koji se nazivaju nodule ili kvržice (Gage, 2004; Wang et al., 2010). Međutim, ove bakterije poseduju i mnoga PGP svojstva. Rizobiumi mogu proizvoditi fitohormone,

siderofore, HCN, mogu rastvarati organska i neorganska jedinjenja fosfora. Nekoliko istraživanja ukazuje da su rizobiumi endofitni mikroorganizmi i pojedinih neleguminoznih biljaka. Antoun et al. (1998) navodi da rizobiumi kolonizuju koren mnogih neleguminoznih biljaka. Prinos zrna pšenice inokulisane sa *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* bila je za 25% veća u odnosu na neinokulisanu pšenicu (Hilali et al., 2001). McInroy i Kloepper (1995) su izolovali *Bradirhizobium japonicum* iz korena pamuka i kukuruza šećerca. Takođe, Reiter et al. (2002) i Sturz et al. (1999) su izolovali *Rhizobium giardinii* i *Sinorhizobium meliloti* iz korena paradajza. Prema ovim autorima, u ovim slučajevima posebno dolaze do izražaja PGP svojstva simbioznih azotofiksatora.

Uloga PGP mikroorganizama u ciklusu fosfora (P)

Dinamika fosfora u zemljištu je tesno povezana sa dinamikom biološkog ciklusa u kojem mikroorganizmi imaju centralnu ulogu (Tate and Salcedo, 1988; Wakelin et al., 2004; Vassilev et al., 2006). Fosfor se u prirodi nalazi u zemljištu, biljkama i mikroorganizmima u različitim organskim i neorganskim jedinjenjima. Najveće rezerve fosfora nalaze se u zemljištu i iznose oko $96-160 \times 10^{12}$ kg, od čega je više od 50% u organskom, a ostatak u neorganskom obliku (Borie et al., 1989). Fosfor čini od 1.5 do 2,5% suve mase bakterija i aktinomiceta, 0.5 do 1.0 % micelije gljiva i 0.05 do 0.5 % biljaka (Walker, 1979). I pored velike količine fosfora koji se nalazi u zemljištu, samo mali deo nalazi se u obliku koji je biljkama dostupan (Stevenson and Cole, 1999). Biljke mogu da usvoje fosfor samo ukoliko se nalazi u vidu $H_2PO_4^-$ i HPO_4^{2-} jona.

Mikroorganizmi koji rastvaraju organska i neorganska jedinjenja fosfora pripadaju grupi mikroorganizama koji poboljšavaju i unapređuju rast biljaka (Chabot, 1996). Poljski i laboratorijski ogledi su pokazali da se mikroorganizmi koji rastvaraju u vodi nerastvorne fosfate mogu koristiti u poljoprivredi kao alternativna fosforna đubriva (Illmer and Schinner, 1995; Richardson, 2001).

Mikroorganizmi utiču na stepen snabdevenosti biljke fosforom putem mineralizacije organskih jedinjenja fosfora, imobilizacijom pristupačnog fosfora kao i rastvaranjem nerastvorljivih minerala fosfora kao što je tri-kalcijum fosfat (Chen et al., 2006; Kang et al., 2002; Pradhan and Sukla, 2005). Oni to čine sekrecijom organskih kiselina i enzima (Kim et al., 1998).

Organska jedinjenja fosfora u zemljištu predstavljaju značajnu rezervu ovog hraniva za biljke, ali tek pošto se mineralizuju (Beck and Sanchez, 1996; Gyaneshwar et al., 2002). Od organskih jedinjenja fosfora, u zemljištu su najprisutniji inozitol-fosfati (fitati), fitin, nukleoproteini, fosfolipidi, glukozofosfati, adenzin-di-fosfat (ADP) i adenzin-tri-fosfat (ATP) (Borie et al., 1989). Uloga mikroorganizama u transformaciji ovih jedinjenja je nezamenjiva (Oberson et al., 2001), a katališu je enzimi fitaza, nukleaza, fosfolipaza i fosfataza (Naseby et al., 1998; Klose et al., 1999). Greaves and Webley (1965) su ustanovili da oko 70% mikroorganizama koji vrše mineralizaciju organskih jedinjenja fosfora poseduju fosfatazu, 20% lecitinazu, 40% fitazu, 40% ribonukleazu i 30% dezoksiribonukleazu. Veliki broj mikroorganizama u zemljištu ima sposobnost da oslobađa ortofosfat iz organskih fosfata: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, mikorizne gljive (Richardson and Hadobas, 1997; Hussin et al., 2007; Shedova et al., 2008).

Mikroorganizmi u zemljištu konkurišu sa korenom biljke za pristupačne oblike fosfora. Rast mikroorganizama se odvija u prisustvu pristupačnih formi fosfora, jer on učestvuje u ćelijskoj sintezi i metabolizmu. Na taj način se fosfor ponovo ugrađuje u organski oblik. Uključivanje ortofosfora u mikrobiološke ćelije označava se kao imobilizacija.

Od neorganskih jedinjenja fosfora u neutralnom zemljištu su najzastupljeniji fosfati kalcijuma (Goldstein and Krishnaraj, 2007), a u kiselim zemljištima fosfati aluminijuma i gvožđa (Mullen, 2005). Ovi minerali su slabo rastvorljivi u vodi. Manji deo neorganskog fosfora se nalazi u obliku rastvorljivog primarnog kalcijum-fosfata.

Mikroorganizmi mogu transformisati ova teško rastvorljiva jedinjenja direktnim ili indirektnim putem. Direktan uticaj na povećanje količine pristupačnog fosfora za biljke imaju mikorizne gljive i pojedine bakterije, kao što je to *Bacillus calcis*, koja direktno iz tercijarnog kalcijum-fosfata koristi kalcijum, nakon čega se oslobađa primarni ili sekundarni fosfat kalcijuma. Indirektna transformacija tercijarnih kalcijum-fosfata odvija se hemijskim putem, produkcijom organskih kiselina (Gyaneshwar et al., 1999; Mullen, 2005). Utvrđeno je da su to bakterije koje pripadaju rodovima *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Streptomyces*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Achromobacter*, *Agrobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* i *Erwinia* (Chung et al., 2005; Hariprasad and Niranjana, 2009; Oliveira et al., 2009).

Prema Đorđević i sar. (2000) inokulacija kukuruza bakterijama roda *Bacillus*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas* i *Flavonobacterium*, čije kulture odlikuje aktivnost kisele, neutralne i /ili alkalne fosfomonoesteraze, dovodi do povećanja dužine biljke, mase suve materije, sadržaja ukupnog fosfora u biljci kukuruza, kao i do povećanja ukupnog broja bakterija, biomase ugljenika i fosfora i aktivnosti alkalne fosfataze.

Takođe utvrđeno je da značajan broj bakterija u rizosferi različitih biljaka ima sposobnost da rastvara teško rastvorljiva jedinjenja fosfora : *Azotobacter chroococcum* u rizosferi pšenice (Kumar and Narula, 1999), *Bacillus circulans* i *Cladosporium herbarium* kod pšenice (Singh and Kapoor, 1999), *Enterobacter agglomerans* kod paradajza (Kim et al., 1998).

Među veoma važne mikroorganizme koji biljku obezbeđuju pristupačnim fosforom spadaju i mikorizne gljive. One u zajednici sa biljkama grade tvorevine nazvane mikorize koje se formiraju unutar korena ili na površini korena. Svojim hifama usvajaju fosfate iz zemljišta i direktno ih predaju biljci domaćinu.

Uloga PGP mikroorganizama u ciklusu sumpora (S)

Sumpor se u zemljištu nalazi u organskim i neorganskim jedinjenjima, kao i elementarnom stanju (Landers et al., 1983). Potiče iz primarnih minerala, biljnih, životinjskih i mikrobioloških ostataka, iz vode, iz atmosfere i iz mineralnih đubriva.

U zemljištu je sumpor zastupljen najviše u organskom obliku sa čak 90%. Organska jedinjenja sumpora čine aminokiseline (metionin, cistein, cistin), koenzimi (tiamin, biotin, koenzim A), gvožđe-sumporni proteini, glutation i penicilin, u kojima je sumpor vezan za ugljenik. (Freney et al., 1975). Neorganski oblici sumpora u zemljištu su elementarni sumpor, sulfidi i sulfati.

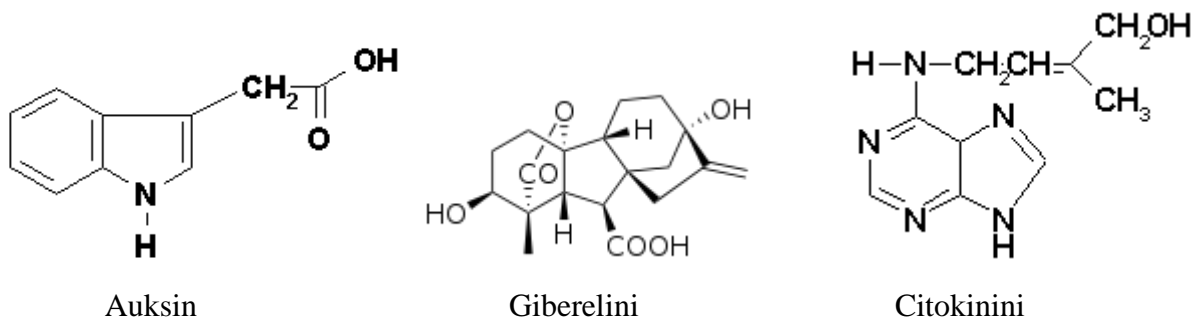
Transformaciju sumpora u zemljištu vrše mnogobrojne bakterije i gljive. Ovaj proces obuhvata mineralizaciju organskih jedinjenja do vodonik-sulfida, oksidaciju vodonik-sulfida preko elementarnog sumpora do sulfata i redukciju sulfata.

Mineralizaciju organskih jedinjenja sumpora i prevođenje u oblik dostupan biljkama i mikroorganizmima katališe enzim sulfataza (Eivazi and Bayan, 1996; Hayes et al., 2000). Čak i u zemljištima gde je pH izuzetno niska (pH 3 do 5) utvrđeno je da postoji aktivnost enzima sulfataze, ali je sam mehanizam delovanja u ovim ekstremnim uslovima nepoznat (Kahkonen et

al., 2002). Proces se odvija po tipu amonifikacije, a obavlja ga veliki broj mikroorganizama kao što su to bakterije iz roda *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* i gljive iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* i *Rhizopus*. Organska jedinjenja u kojima je sumpor vezan za kiseonik razlažu se hidrolizom na jone vodonika, sulfatni jon i holin –ROH. Razlaganje ovih jedinjenja vrše bakterije iz roda *Pseudomonas*.

2.1.2. Produkcija biljnih hormona

Fitohormoni su organske materije, koje već u veoma malim koncentracijama utiču na sve biohemijske i fiziološke procese u biljci (Fuentes-Ramírez and Caballero-Mellado, 2006). Biljke se snabdevaju hormonima na dva načina: endogeno, hormonima produkovanim iz sopstvenog tkiva i egzogeno, hormonima koji su produkovani od strane PGP mikroorganizama (Baca and Elmerich, 2007). PGP mikroorganizmi produkuju auksine (IAA), gibereline i citokinine koji mogu stimulisati rast biljke (Bottini et al., 2004; Spaepen et al., 2008) (Slika 1.).



Slika 1. Fitohormoni produkovani od strane PGP mikroorganizama

Produkcija fitohormona od strane PGP mikroorganizama smatra se jednim od najvažnijih mehanizama kojim oni utiču na rast biljaka (Spaepen et al., 2007). Veliki broj vrsta gljiva i bakterija može da produkuje fitohormone (Tsavkelova et al., 2006).

Auksini stimulišu izduživanje biljne ćelije, diferencijaciju ksilema i floema, razvoj cvetnih pupoljaka, indukuju formiranje plodova i dr. Utvrđeno je da oko osamdeset procenata mikroorganizama izolovanih iz rizosfere različitih biljaka ima sposobnost da produkuje auksine (Kampert et al. 1975; Loper and Schroth, 1986). Između produkcije auksina različitih PGP

mikroorganizama i njihove sposobnosti da povećaju broj izdanaka i mahuna postoji pozitivna korelacija (Asghar et al., 2002).

Fiziološki najaktivniji auksin u biljkama je IAA (indol-sirćetna kiselina), koja je poznata po tome što stimuliše izduživanje ćelija, njihovu deobu i diferencijaciju (Salisbury, 1994).

Glick et al. (1999) i Kumar et al. (2002) su utvrdili da PGP mikroorganizmi proizvode indol-sirćetnu kiselinu i druge metabolički aktivne materije i na taj način dovode do povećanja dužine korena, visine nadzemnog dela biljke i njenog prinosa.

Od PGP mikroorganizama koji proizvode IAA, bakterije roda *Azospirillum* najviše su ispitane (Dobbelaere et al., 1999). Druge IAA proizvode bakterije pripadaju rodovima *Aeromonas* (Halda-Alija, 2003), *Agrobacterium* (Barazani and Friedman, 1999), *Azotobacter* (Ahmad et al., 2008), *Bradyrhizobium* (Antoun et al., 1998), *Bacillus* (Swain et al., 2007), *Burkholderia* (Halda-Alija, 2003), *Enterobacter* (Shoebitz et al., 2009), *Pseudomonas* (Hariprasad and Niranjana, 2009), *Rhizobium* i *Xanthomonas* (Ghosh et al., 2008), kao i bakterije *Alcaligenes faecalis* i *Acetobacter diazotrophicus* (Patten and Glick, 1996).

Citokinini su druga važna grupa fitohormona. Pod uticajem ovog fitohormona u biljkama se stimuliše deoba ćelija, morfogeneza, rast lateralnih pupoljaka, olistavanje, otvaranje stoma, kao i razviće korena i korenskih dlačica (Salisbury, 1994., Arshad i Frankenberger, 1993).

Citokinine proizvode veliki broj rizosfernih mikroorganizama kao što su *Paenibacillus polymoxa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum*, *Azospirillum* sp. (Noel et al., 1996; Garcia De Salamone et al., 2001; Bent et al., 2001). Upadhaya et al. (1991) navodi da pojedini sojevi *Rhizobium* sp. proizvode dve vrste citokinina: izopenteniladenin i zeatin. Prema Barea et al. (1976) oko 90% izolovanih bakterija iz rizosfere različitih biljaka ima sposobnost da proizvode citokinine.

Giberelini stimulišu izduživanje stabla i razvoj plodova. Dobbelaere et al. (2003) su numerisali preko 89 do sada poznatih giberelina (od GA1 do GA89). Najpoznatiji je giberelin GA3 (giberelinska kiselina), a najaktivniji u biljkama je GA1, koji je odgovoran za izduživanje izdanaka. Prema Gutierrez-Manero et al. (2001) *Bacillus pumilis* i *Bacillus licheniformes* proizvode četiri različite vrste giberelina.

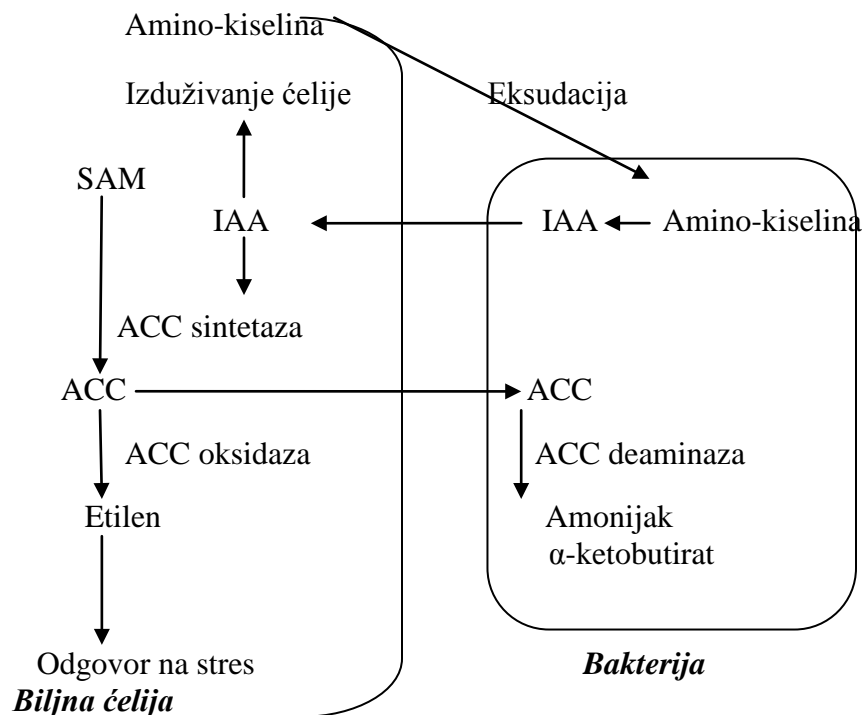
Abcisinska kiselina (ABA) indukuje sintezu rezervnih proteina u semenu i utiče na klijanje. Primarna uloga ABA je u zatvaranju stoma, kao i usvajanju i transportu materija u biljci. Prisustvo ABA u rizosferi je od izuzetnog značaja za biljku u uslovima stresa usled nedostatka

vode. Utvrđeno je da mikroorganizmi koji žive u suvim i polusuvim klimatima produkuju abscisinsku kiselinu, te je njihova uloga u u uslovima suše veoma važna.

2.1.3. Sinteza enzima

PGP mikroorganizmi produkuju enzime, koji mogu da regulišu nivo biljnog hormona, etilena, tako što degradiraju prekursore ovog hormona (Glick, 1995).

Etilen je veoma važan fitohormon za rast i razviće biljke, ali u specifičnim situacijama dolazi do povećane akumulacije ovog fitohormona, što može prouzrokovati inhibiciju rasta biljke ili njenu smrt (Li et al., 2005). U uslovima stresa za biljku, kao što je to niska temperatura, suša, prisustvo teških metala, infekcija patogenom, biljka sintetiše 1-aminociklopropan-1-karboksilat (ACC), koji je prekursor etilena (Chen et al., 2002; Glick et al., 2007). Deo sekretovanog ACC se ponovo reabsorbuje putem korena, gde se prevodi u etilen. Akumulacija etilena u korenu biljke dovodi do niza negativnih efekata, a pre svega do slabijeg rasta korena, što za posledicu ima slabiju sposobnost biljke da usvaja vodu i hranljive elemente. Istraživanja su pokazala da PGP mikroorganizmi produkuju ACC deaminazu (1-aminociklopropan-1-karboksilat- deaminaza) koja hidrolizuje ACC, što rezultira smanjenjem nivoa etilena u korenu, a dalje stimulacijom rasta korena (Glick et al., 1998). Bakterije mogu da koriste proizvode ove hidrolize, amonijum i α -ketobutirat, kao izvor azota i ugljenika za svoj rast (Slika 2.).



Slika 2. Regulacija nivoa etilena u biljnom tkivu bakterijama koje proizvode ACC deaminaze (Glick et al., 1998)

Babalola et al (2003) su utvrdili da mnoge PGP bakterije odlikuje ACC deaminazna aktivnost. Produkcija ACC deaminaze utvrđena je kod *Bacillus firmus*, *Bacillus globisporus*, *Bacillus circulans*, *Alcaligenes* sp., *Variovorax paradoxus*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas putida* i *Enterobacter cloacae* (Saleh and Glick, 2001; Belimov et al., 2001). Prema Grichko and Glick (2001) efekat ACC deaminaze posebno dolazi do izražaja u stresnim uslovima za biljku.

2.1.4. Produkcija antibiotika

Antibiotici obuhvataju hemijski heterogenu grupu organskih jedinjenja (Raaijmakers et al., 2002). PGP mikroorganizmi proizvode različite antibiotike (Tab.1.).

Tabela 1. Antibiotici proizvedeni od strane PGP mikroorganizama (Whipps, 2001)

<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Streptomyces sp.</i>
Antifungalni antibiotici	Kanosamin	Hloramfenikol
Fenazini	Cvitermicin A	Fenazin
Fenazine-1-karboksilna kiselina	Bacilomicin	Daptomicin
Fenazine-1-karboksiamid	Plipastatin A i B	Fosfomicin
Pirolnitrin		Lincomicin
Pioluteorin		Neomicin
2,4diacetilfloroglucinol		Puromicin
Ramnolipidi		Streptomicin
Oomicin A		Tetraciklin i dr.
Cepaciamid A		
Ekomicini		
Viscosinamid		
Butirolaktoni		
N-butilbenzen		
Sulfonamid		
Piocianin		
Antibakterijski antibiotici		
Pseudomonasna kiselina		
Azomicin		
Antitumorni antibiotici		
FR901463		
Cepafungini		
Antiviralni antibiotici		
Karalicin		

Na produkciju antibiotika utiču pH, temperatura i vlažnost zemljišta, raspoloživost hranljivim materijama, starost ćelije i dr. (Shanahan et al., 1992; Ownley et al., 1992). Prema Kojić i Venturi (2001) bakterije u najvećoj količini proizvode antibiotike kada se nalaze u stacionarnoj fazi.

Produkcija antibiotika od strane PGP mikroorganizama smatra se jednim od najmoćnijih biomehanizama jer antibiotici i u malim količinama imaju inhibitorno dejstvo na razmnožavanje i metabolizam patogenih mikroorganizama (Bowen i Rovira, 1999; Thomashow et al., 1997).

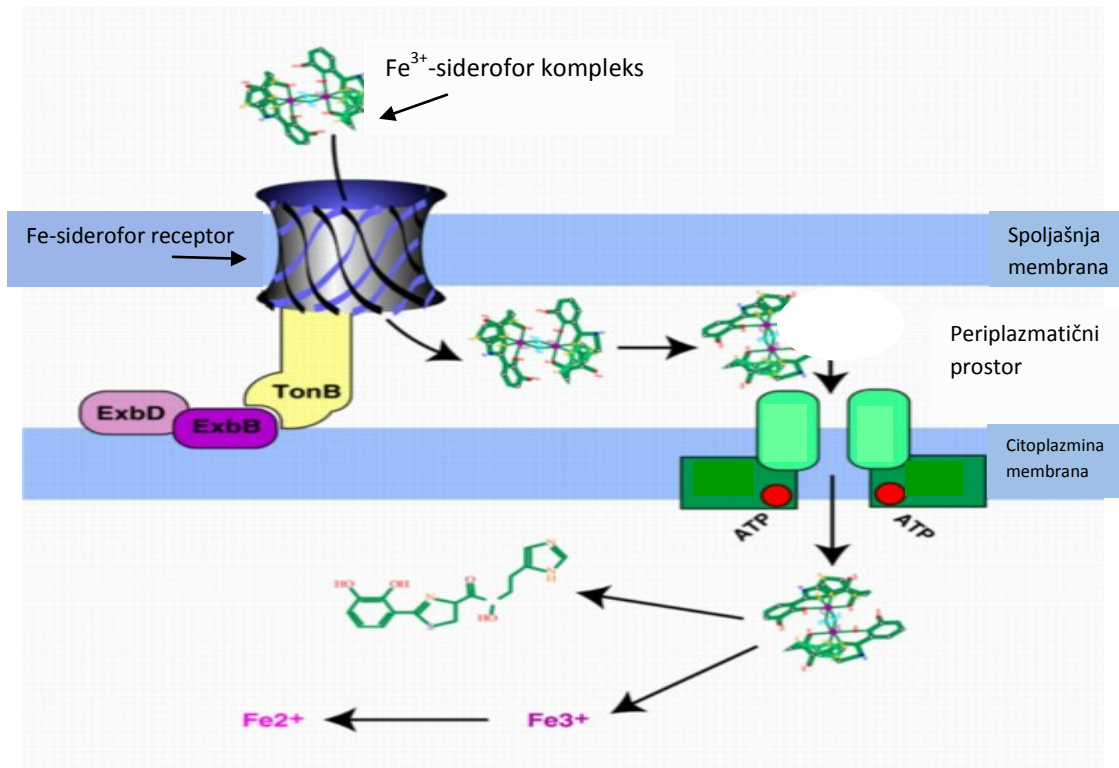
Antifugalno dejstvo pokazuju DAPG, pioluteorin, pironitril, fenazin, iturin, cviteromicin i hloramfenikol (Hammer and Evensen, 1993; Loper and Gross, 2007; Rezzonico et al., 2007).

Antibakterijsko dejstvo imaju DAPG, pioluteorin, iturin A i hloramfenikol (Yoshida et al., 2001, 2002; Velusamy et al., 2006).

Zbog sposobnosti da proizvode antibiotike, PGP mikroorganizmi se mogu primenjivati i u poljoprivrednoj proizvodnji.

2.1.5. Produkcija siderofora

Siderofore (od grčke reči „ nosioci gvožđa“) se definišu kao visokoafinitetna Fe^{3+} -helatna jedinjenja relativno male molekulske težine, u kojima su atomi metala uhvaćeni od strane elektronegativnih atoma vezanih za jedan organski radikal. Gvožđe je neophodni element za rast biljaka, a u zemljištu se nalazi u njima nepristupačnom obliku. Biljke usvajaju gvožđe u obliku fero jona Fe^{2+} , a u zemljištu on je najčešće prisutan u obliku feri jona Fe^{3+} , odnosno u vidu oksida i hidroksida gvožđa (crvenkasta i žuta boja zemljišta potiče od njihovog prisustva) (Salisbury and Ross, 1992). U uslovima nedostatka pristupačnog gvožđa, biljke i mikroorganizmi proizvode siderofore. Uloga siderofora je da izazove otpuštanje jona gvožđa iz oksida i hidroksida gvožđa i da ga veže formirajući Fe^{3+} -siderofora kompleks. Ovaj kompleks biva transportovan ili do površine korena ili do ćelije bakterije, gde zahvaljujući prisustvu specifičnih membranskih receptora dolazi do redukcije Fe^{3+} jona u Fe^{2+} jon, koji potom biva usvojen (Slika 3.) (Neilands, 1995).



Slika 3. Usvajanje Fe³⁺-siderofor kompleksa (<http://www.ohsu.edu/xd/education>)

Siderofore se najčešće klasifikuju na osnovu liganda čiji je zadatak da heliraju jon gvožđa. Najveći broj siderofora pripada grupi kateholata (fenolata), hidroksamata i karboksilata. Limunska kiselina se takođe može ponašati kao siderofora (Winkelmann and Dreschel, 1999).

Istraživanja siderofora mikrobiološkog porekla počela su pre oko pet decenija, i do danas je utvrđeno da većina aerobnih i fakultativnih anaerobnih mikroorganizama sintetišu najmanje jednu sideroforu. Tako *Ustilago sphaerogena* sintetiše ferihrom, *Streptomyces pilosus* i *Streptomyces coelicolor* deferoksamin, *Fusarium roseum* fuzarinin, *Burkholderia cepacia* ornibaktin, *Echerichia coli* enterobaktin, *Bacillus subtilis* bacilibaktin, *Azotobacter vinelandii* azotobaktin, *Pseudomonas aeruginosa* pioverdin i dr. (Boopathi and Rao, 1999; Khandelwal et al., 2002; Kuffner et al., 2008).

Biljke mogu da usvoje bakterijski kompleks Fe³⁺- siderofor (Bar-Ness et al., 1991; Wang et al., 1993) ali postoje različita mišljenja o značajnosti ovakvog načina snabdevanja biljke gvožđem. Prema Glick (1995), količina gvožđa koju biljka usvoji na ovaj način je veoma mala u odnosu na potrebe koje biljka ima. S druge strane, Duijff et al. (1994) smatraju ovaj način snabdevanja biljke gvožđem veoma važnim, a prema Masalha et al. (2000), za biljku je ovo od

vitalnog značaja, posebno u karbonatnim zemljištima. Bar-Ness et al. (1992) su utvrdili da su dve vrste bakterijskih siderofora (pseudobaktin i ferrioksamini B) bile neefikasne za biljku, i da su ove rizosferne bakterije i biljka bile u kompeticiji. Prema Hiifte et al. (1994) PGP mikroorganizmi koji proizvode siderofore štite biljku od patogenih mikroorganizama.

2.1.6. Produkcija cijanida (HCN)

Cijanid (HCN) je sekundarni metabolit koji potiskuje razvoj mikroorganizama, a takođe negativno utiče na rast i razvoj biljaka (Siddiqui et al., 2006). Pojedini PGP mikroorganizmi imaju sposobnost da proizvode HCN (vodonik-cijanid, poznat i kao samo cijanid) (Rezzonico et al., 2007). Pripadaju vrstama iz rodova *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Rhizobium* (Devi et al., 2007; Rezzonico et al., 2007; Ahmad et al., 2008).

Pojedine PGPR proizvode HCN koji inhibira citohrom oksidazu fitopatogenih mikroorganizama, a sami poseduju cijanid rezistentnu citohrom oksidazu. Međutim, sojevi koji proizvode u manjim količinama HCN su i manje efikasni u kontroli truleži pšenice i crne truleži korena duvana (Voisard, 1989).

Produkcija HCN može pospešiti simbioznu vezu između biljke i mikroorganizama što je utvrđeno u istraživanjima Cattelan et al. (1999).

2.2. UTICAJ PGP MIKROORGANIZAMA NA BILJKU

Prema mestu koje nastanjuju, PGP mikroorganizmi se dele na rizosferne i endofitne (Vessey, 2003).

U rizosferne spadaju mikroorganizmi koji naseljavaju rizosferu, površinu korena i površinski međucelijski prostor (McCulley, 2001). Sastav mikrobiološke zajednice u rizosferi zavisi i od biljne vrste (Macek et al., 2000). Pošto su mikroorganizmi rizosfere pod direktnim uticajem korenskih izlučevina, izlučevine korena ili semena su prvi faktor u uspostavljanju veze između mikroorganizma i biljke (Currier and Stobel, 1977; Heinrich and Hess, 1984; Scher et al. 1985). Takođe tip zemljišta, količina kiseonika i količina hranljivih materija utiču na brojnost i rasprostranjenost rizosfernih mikroorganizama (Broeckling et al., 2008). Utvrđeno je da svi mikroorganizmi ne mogu živeti u rizosferi, jer je ovaj deo zemljišta izložen raznim fizičkim i

hemijskim promenama: menja se pH zemljišta, parcijalni pritisak O₂, vodni potencijal i dr (Xu et al., 2011). Broj vrsta mikroorganizama u rizosferi može da varira od nekoliko hiljada do nekoliko miliona (Nihorimbere et al., 2011). U odnosu na okolno zemljište, broj mikroorganizama u rizosferi može biti i do sto puta veći (Paul and Clark, 1989). PGP mikroorganizmi koji naseljavaju površinu korena biljke mogu biti različito raspoređeni po površini korena (Andrews and Harris, 2000). Kolonizacija površine korena od strane različitih PGP mikroorganizama nije unifomna. Na primer, *Kluyvera ascorbata* nastanjuje dve trećine površine korena repice, ali nikada sam vrh korena (Ma et al., 2001).

Endofitni PGP mikroorganizmi žive u ćelijama biljke domaćina. U zavisnosti od biljke, PGP endofitni mikroorganizmi mogu nastaniti parenhimsko tkivo i ksilemske cevčice različitih delova biljke: seme, koren, stablo, list, plod (Fuentes- Ramirez, 1999). Najpoznatiji endofitni PGP mikroorganizmi su oni koji formiraju kvržice na korenu leguminoznih biljka. Proces uspostavljanja veze između biljke i mikroorganizma je veoma složen i regulisan različitim enzimima, a zavisi od genotipova oba simbionta (Kouchi et al., 2004). U simbiozi sa neleguminoznim biljkama živi manji broj bakterija, kao što su *Rhizobia* (Antoun et al., 1998), *Frankia* (Huss-Danell, 1997), *Anabaena* (Peters and Meeks, 1989), *Nostoc* (Bergman et al., 1992) i dr. Neki endofitni PGP mikroorganizmi poseduju enzime kao što su pektinaza i celulaza (Verma et al., 2001) za koje je utvrđeno da imaju važnu ulogu u fazi infekcije biljke (McCulley, 2001).

2.2.1. Primena PGP mikroorganizama u biljnoj proizvodnji

Na efektivnost PGP mikroorganizama utiču vrsta i starost biljke, korenske izlučevine (Benizri et al. 2001), klimatski uslovi, fizičko-hemijske i mikrobiološke karakteristike zemljišta, (Buyer et al., 1993) kao i primenjene agrotehničke mere (Germida and Siciliano, 2001; Marschner et al., 2004). Nakon unošenja u zemljište, PGP mikroorganizmi su izloženi svim napred navedenim faktorima.

Frommel et al. (1993) navode da je došlo do slabe kolonizacije korena krompira u poljskim uslovima od strane PGP mikroorganizama jer je pH vrednost zemljišta bila niska, za vreme vegetacije temperature su bile visoke, a padavine retke. Benizri et al. (2001), navode da je kolonizacija rizobakterija bila uspešnija na temperaturama oko 5°C nego na 25°C. U neplodnim

zemljištima je veća stimulacija rasta pšenice od strane PGP mikroorganizama, nego u plodnim zemljištima (De Freitas i Germida, 1990). Nepovoljne meteorološke prilike mogu biti jedan od najvažnijih faktora koji utiču na efektivnost PGPR inokulata (Suslow i Schroth, 1982; Dobbelaere, 2001; Jević, 2006). Mrkovački i sar (2003) su utvrdili da je maksimalno povećanje klijavosti i prinosa šećerne repe bilo kod biljaka inokulisanih PGPR sojevima izolovanim iz rizosfere biljke domaćina. Različita istraživanja su pokazala da su biljke tretirane PGP mikroorganizmima koji proizvode ACC deaminazu imale veću otpornost na stresne uslove životne sredine. Grinchko and Glick (2001) su inokulisali seme paradajza bakterijama *Enterobacter cloacae* i *Pseudomonas putida*, za koje je bilo utvrđeno da imaju sposobnost produkcije ACC deaminaze. Nakon 55 dana rasta i nakon što su biljke bile devet dana izložene plavnim uslovima, utvrđeno je da su inokulisane biljke bile jače i razvijenije. Mayak et al. (2004) su ispitivali uticaj inokulacije paradajza bakterijom *Achromobacter piechaudii* u uslovima visoke koncentracije soli u zemljištu i utvrdili značajno povećanje sveže i suve mase inokulisanih biljaka u odnosu na neinokulisane.

PGP mikroorganizmi se mogu primenjivati kao multipni (združeni) i kao pojedinačni inokulanti. I jedan i drugi način primene uglavnom daje dobre rezultate.

Dobar efekat na prinos i snabdevanje azotom i fosforom postignut je u proizvodnji pšenice, pirinča, kukuruza i drugih ratarskih i povrtarskih biljaka primenom multipnih inokulanata odnosno smeše azotobaktera i fosfomineralizatora (Bashan, 2010; Compant et al., 2010). Primena smeše *A. brasilense* i *P. striata* značajno je uticala na prinos biljke, usvajanje azota i fosfora od strane kineske šećerne trske (Alagawadi and Gaur, 1992). Oliveira et al. (1997) su utvrdili da inokulacija smeše *A. brasilense* sp.7 i *Rhizobium* sp. utiče pozitivno na nodulaciju i suhu masu korena biljke. U istraživanjima Jarak i sar. (2007a), najveća visina i masa biljke lucerke dobijena je primenom polivaletnog inokuluma koji je sadržao smešu rizobiuma, azotobaktera i aktinomiceta. Inokulacijom združenim kulturama ovih mikroorganizama kod graška je ubrzan porast biljaka (Jarak i sar., 2006). Ruiz-Lozano i Bonfante (2001) su utvrdili da asocijacija bakterija-mikorizna gljiva pozitivno utiče na usvajanje nutrijenata od strane biljke domaćina kao i na transport nutrijenata od mikorizne gljive ka biljci.

Ponekad se dobije bolji efekat primenom pojedinačnih inokulanata (Nieto and Frankenberger, 1991., Milošević i Govedarica, 2001). Značajno povećanje prinosa i sadržaja azota u biljnoj materiji pšenice dobija se uz inokulaciju sojevima *Azospirillum brasilense*

(Boddey i Dobereiner, 1988). Carrillo-Castaneda et al. (2002) je utvrdio pozitivan efekat pojedinačne primene siderofor produkujućih *Pseudomonas*, *Rhizobium* i *Azospirillum* na rast deteline. El Mohandes (1999) je utvrdio pozitivan efekat primene *Azospirillum*-a na prinos pšenice u staklari i u poljskim uslovima. Barbieri et al. (1986) su dokazali da primena *Azospirillum brasilense* povećava broj i dužinu bočnih korenova kod pšenice. Sojevi *Azospirillum brasilense* koriste se širom sveta za inokulaciju brojnih biljnih vrsta (Lucy et al., 2004; Okon and Labandera-Gonzales, 1994, Dobbelaere et al., 2001). U radu Stamenov (2009) najveći porast crvene deteline je utvrđen u varijantama gde je izvršena inokulacija rizobiumom. Niz rizobakterija pospešuju biljni rast pirinča, pšenice, šećerne trske, šećerne repe, pamuka, povećavajući njihov vegetativni rast i prinos (Mrkovački and Milić, 2011; Mrkovački and Mezei, 2003; Kennedy et al., 2004). Kod biljaka inokulisanih aktivnim sojevima kvržičnih bakterija znatno se povećava prinos kao i kvalitet i količina proteina i vitamina B grupe (Stevović et al., 2005). Prema Yanni and El-Fattah (1999), primena azotobaktera povećava prinos pirinča, a prema Mrkovački et al. (2002, 2008, 2009, 2010) utvrđeno je u poljskim ogledima da je inokulacijom šećerne repe sa *Azotobacter chroococcum* dobijeno povećanje prinosa korena i prinosa kristalnog šećera, kao i poboljšanje kvalitativnih osobina. Pozitivne rezultate primene PGPR kod kukuruza, pšenice i drugih žitarica utvrdili su i Glick et al. (1999), Sharma and Johri (2003) i Hajnal (2010). Primenom azotofiksatora u proizvodnji kukuruza, deo potrebnog azota može biti obezbeđen biološkim putem (Govedarica i sar., 1997, 1998, 1999; Milošević i sar., 2003; Milić i sar., 2004). Biljke inokulisane mikoriznom gljivom su u stanju da usvajaju nerastvorljive oblike P (Smith and Read, 1997).

Produkcijom egzopolisaharida mikroorganizmi menjaju strukturu zemljišta što utiče pozitivno na rast biljaka u uslovima suše. Alami et al. (2000) su inokulisali suncokret *Rhizobium* sp. Rast inokulisanog suncokreta bio je bolji nego kod neinokulisanih biljaka zahvaljujući produkciji egzopolisaharida. Lapinskas et al. (2005) su utvrdili da se primenom sojeva *R. meliloti* adaptiranih na povišenu kiselost zemljišta može povećati simbiozna azotofiksacija.

Nakon unošenja inokulanata u zemljište, postoji mogućnost da oni utiču na autohtone mikroorganizme, ali isto tako i da autohtoni mikroorganizmi utiču na inokulante. Kakav će se uticaj ostvariti zavisi od interakcije unutar i između autohtonih populacija, od biljke i zemljišta. Određene grupe mikroorganizama mogu biti stimulisane, druge inhibirane, a takođe se dešava da introdukovani mikroorganizmi ne utiču na strukturu autohtone populacije (Dobbelaere et al.,

2003). Johansen and Binnerup (2002), Nannipieri et al. (2003), Vivas et al. (2006), Artursson et al. (2006) su utvrdili da se primenom inokulacije u biljnoj proizvodnji povećava broj i enzimatsku aktivnost mikroorganizama, mikrobna biomasa, mikrobni divezitet u rizosferi te da se poboljšavaju proizvodne osobine zemljišta. Efekat bakterijske inokulacije na promenu mikrobiološke aktivnosti u zemljištu zavisi od uslova u zemljištu, biljne vrste, sposobnosti adaptacije introdukovanih mikroorganizama i dr. (Dobbelaere et al., 2003; Egamberdiyeva, 2007).

Kao što je napred navedeno, velika je raznovrsnost PGP mikroorganizama u zemljištu. Između ostalih to su rodovi *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. i *Trichoderma* sp.

Efekat primene Pseudomonas sp. u biljnoj proizvodnji

Pseudomonas su gram negativne bakterije, čija je PGP aktivnost već duži niz godina dobro poznata (Lucas et al., 2004). Rasprostranjenost ovog roda je velika, jer su mnogobrojne vrste izolovane iz rizosfere raličitih biljaka, iz različitog zemljišta širom sveta, a takođe se mogu naći i u barama, otpadnim vodama, pa i u hrani.

Pojedine vrste ovog roda produkuju metabolite kao što su antibiotici i vodonik-cijanid (HCN) (Weller and Thomashow, 1993), neke produkuju siderofore sa velikim afinitetom za absorbciju Fe^{3+} (Kloepper et al., 1980), a neke auksin (Khakipour et al., 2008). Svi ovi metaboliti snažno utiču na sredinu, time što inhibiraju rast pojedinih štetnih mikroorganizama, a sa druge strane biljkama povećavaju raspoloživost hranljivih materija. Dokazano je da su pojedini sojevi roda *Pseudomonas* sposobni da razlažu teško rastvorna fosforna jedinjenja i da na taj način biljku obezbeđuju neophodnim hranivom (Sundara et al., 2002). Istraživanjima u polju utvrđen je pozitivan efekat ovih bakterija na mnoge leguminoze. Patten and Glick (2002) su utvrdili da *Pseudomonas* sp. produkcijom IAA utiče pozitivno na rast i razvoj korena kod repice (*Brassica rapa*), povećavajući dužinu korena za 35-50% u odnosu na kontrolu. Prema Kloepper et al. (2004), primena *Pseudomonas* sp. može da poveća prinos biljke i za 144%. U zemljištu sa visokim sadržajem bakra, Reed i Glick (2005) su utvrdili povećanje suve mase korena biljaka inokulisanih *Pseudomonas asplenii*, za koju je bilo utvrđeno da produkuje ACC deaminazu. Bakterije koje poseduju ACC deaminazu stimulišu rast biljaka u različitim tipovima zemljišta (Belimov et al., 2007). Nakon ugradnje gena za ACC deaminazu utvrđeno je da *Pseudomonas fluorescens* izaziva stimulaciju rasta kod uljane repice i poboljšava zaštitu ponika krastavaca i

krtola krompira od fitopatogenih gljiva (Wang et al., 2000). S druge strane, prema Begonia and Kremer (1994), pseudomonasi izolovani sa korena *Abutilon theophrasti* (teofrastova lipica) su negativno uticali na rast biljke. Astrom and Burst (1989) navode da produkcijom HCN, pseudomonasi inhibiraju rast korena pasulja. Zbog negativnog uticaja HCN, na biljku, PGP pseudomonasi koji proizvode HCN mogu se primenjivati za kontrolu rasta korova (Kremer and Souissi, 2001). Prema rezultatima Rokhzadi et al. (2008), primena *Pseudomonas fluorescens* ima pozitivne efekte na rast i prinos graška, a Menhaz et al. (2009) su utvrdili pozitivan efekat ovih bakterija na svežu i suhu masu šećerne trske. Kloepper et al. (1980) su primenom vrsta roda *Pseudomonas* postigli povećanje prinosa krompira, šećerne repe i rotkvice. Za soj *Pseudomonas putida* GR 12-2, izolovan u Kanadi, utvrđeno je da promovise rast repice fiksiranjem azota, prevođenjem nerastvornih fosfata u biljci dostupan oblik, sintezom siderofora, produkcijom fitohormona IAA i snižavanjem koncentracije etilena produkcijom enzima ACC deaminaze (Glick et al. 1994b, 1995; Lifshitz et al. 1986, 1987; Xie et al. 1996)

Bakterije roda *Pseudomonas* su poznate i po svojoj sposobnosti da suzbijaju rast brojnih biljnih patogena. U Kanadi, *Pseudomonas fluorescens* se koristi kao biološko sredstvo za kontrolu rasta fitopatogenih gljiva roda *Pythium* (Paulitz and Belanger, 2001) i drugih biljnih patogena, povećavajući na taj način prinos i rast paradajza i rotkve (Burr et al. 1978; Kloepper et al. 1980; Howie and Echandi 1983).

Pseudomonas fluorescens pomaže i u održavanju prirodnih svojstava zemljišta (Lugtenberg and Dekkers, 1999; Lata et al., 2002).

Efekat primene Bacillus sp. u biljnoj proizvodnji

Bacillus je najrasprostranjeniji rod bakterija u rizosferi, a njegova PGP aktivnost poznata je već godinama. Brojnost bakterija ovog roda varira od 10^6 u hladnijim, do 10^7 i više u gramu zemljišta, u toplijim oblastima (Alexander, 1961). U rizosfernom zemljištu *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis* i *B. firmus* su najprisutnije vrste ovog roda (Wipat and Harwood, 1999; Garbeva et al., 2003). Bakterije ovog roda su štapićaste, pokretne, grampozitivne, aerobne ili fakultativno anaerobne, sposobne da formiraju endospore. Poznato je da ove bakterije sintetišu veliki broj sekundarnih metabolita kojim utiču na svoju okolinu, povećavajući na taj način pristupačnost hranljivih materija biljkama (Barriuso and Solano, 2008).

Bakterije roda *Bacillus* povećavaju prinos i rast različitih biljaka (Orhan et al., 2006). Introdukcijska bacilusa imala je pozitivne efekte na prinos sirka (Broadbent et al., 1977), kukuruza (Pal, 1998), pirinča (Sudha et al., 1999), šećerne repe (Cakmakci et al., 1999), ječma (Sahin et al., 2004) i jabuke (Aslantas et al., 2007).

Unošenje *Bacillus* sp. u rizosferu paprike pokazalo se kao dobra alternativa hemijskim đubrivima prilikom uzgajanja ove biljke u staklenicima (García et al., 2004). Utvrđeno je da primena *Bacillus* pozitivno utiče na prinos, rast i ishranu malina u uslovima organske proizvodnje (Orhan et al., 2006). *Bacillus* sp. izolovan iz rizosfere zelenog čaja (*Camellia sinensis*) ima sposobnost da produkuje IAA i da na taj način stimuliše rast biljke (Chakraborty et al., 2006). Swain et al. (2007) su utvrdili pozitivan efekat primene *Bacillus subtilis* koji produkuje IAA na *Dioscorea rotundata* L (gvinejski jam).

Kokalis-Burelle et al. (2002) su utvrdili statistički značajno povećanje rasta paradajza u toku dve vegetacione godine, inokulacijom sa *Bacillus amyliquefaciens*. Povećana je površina listova, broj listova, kao i težina korena i stabla. Primena *Bacillus subtilis* u kontrolisanim uslovima utiče na značajno povećanje mase stabla i korena i visine stabla kod belog luka (Reddy i Rahe, 1989). Neki bacilusi proizvode fitazu što je utvrđeno i u istraživanjima Idriss et al. (2002). Autori su inokulisali seme kukuruza sa *Bacillus amyliquefaciens*. Biljke su gajene u uslovima limitiranim količinama fosfora. Inokulisane biljke su imale bolji rast nego neinokulisane. Garcia et al. (2004) su utvrdili pozitivan efekat inokulacije *Bacillus licheniformis* na prinos paradajza i paprike. Upoređujući efekat primene *Bacillus* sp. i *Pseudomonas* sp. na prinos i suhu masu paradajza, spanaća i okra, Adesemoye et al. (2008) nisu utvrdili statistički značajnu razliku između ova dva inokulanta.

Efekat primene Streptomyces sp. u biljnoj proizvodnji

Aktinomicete su jedna od glavnih komponenti mikrobiološke zajednice u zemljištu. One pripadaju velikoj i široko rasprostranjenoj grupi gram pozitivnih aerobnih, micelarnih bakterija koje imaju važnu ulogu u kruženju materije (Halder et al., 1991). Prema Williams et al. (1984), aktinomicete predstavljaju aktivne razlagače organske materije. Mogu da razlažu lignin, pektin, najotpornije materije humusa, stvarajući na taj način neophodne asimilative za biljku (Crawford, 1988; Nolan and Cross, 1988). Aktinomicete produkuju antibiotike, fitohormone i vitamine, koji

deluju povoljno na rast različitih biljaka (Fermino - Soares et al., 2007). Neke su antagonisti fitopatogenim gljivama (Getha et al., 2005; Minuto et al., 2006) a neke inhibiraju rast fitopatogenih bakterija - *Erwinia amylovora* i *Agrobacterium tumefaciens* (Oskay et al., 2004).

Većina aktinomiceta u zemljištu pripadaju rodu *Streptomyces* (Suzuki et al., 2000). Naseljavaju rizosferno zemljište koje je bogato korenovim izlučevinama i zbog toga je pogodna sredina za rast ovih mikroorganizama (Aldesuquy et al. 1998). Kao i druge aktinomicete, tako i rod *Streptomyces* proizvodi materije rasta, antifungalne i antibakterijske supstance. Smatra se da 60% svih biološki aktivnih materija u zemljištu potiče od vrsta iz roda *Streptomyces* (Ilic et al. 2007). Primenom *Streptomyces* u biljnoj proizvodnji pospešuje se klijanje i početni rast biljaka (Jarak i sar., 2007). Primenom *S. olivaceoviridis*, *S. rimosus*, *S. rochei* i *Streptomyces* spp. koje proizvode IAA, poboljšava se klijanje semena, rast mlade biljke i bolje ukorenjavanje paradajza (Tokala et al. 2002.; El-Tarabily, 2008).

Efekat primene Trichoderma sp. u biljnoj proizvodnji

Trichoderma sp. je široko rasprostranjena gljiva, izolovana iz rizosfere brojnih biljaka (Harman et al., 2004). Dobar je razlagač polisaharida i lignina te je značajna u sintezi i mineralizaciji humusa. Neke vrste roda *Trichoderma* su posebno značajne zbog svoje sposobnosti da proizvode antibiotike i enzime (Howell, 2003), razgrađuju ksenobiotičke materije (Zhou et al., 2007) i povećavaju otpornost biljaka prema različitim bolestima (Hanson and Howell, 2004). Osim toga, poznato je da su ove gljive paraziti i antagonisti brojnih fitopatogenih gljiva i da na taj način utiču na brojnost i razvoj patogena (Brunner et al., 2005; Sahebani and Hadavi, 2008).

Trichoderma različitim mehanizmima utiče na brojnost fitopatogenih gljiva. To su: kompeticija za nutrientima i prostorom, mikoparazitizam, produkcija inhibitornih materija, inaktivacija enzima fitopatogenih gljiva (Elad et al., 1999; Roco and Perez, 2001). Gljive ovog roda veoma brzo rastu, šireći se po substratu, i na taj način onemogućavaju patogenim gljivama, kao što je *Fusarium* sp., da se nastane (Papavizas, 1985). Zahvaljujući tome, seme tretirano preparatima koja sadrže trihodermu, ima oko sebe zonu zaštite od patogenih gljiva (Howell, 2003). U zemljištu tretiranom sporama trihoderme potisnut je razvoj fitopatogenih gljiva *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* i *F. oxysporum* f. sp. *Melonis* (Sivan and Chet, 1989). Ozbay and Newman (2004) navode da je rast fitopatogenih gljiva *Rhizoctonia solani*, *Pythium*

ultimum i *Chalara elegans* bio inhibiran trihodermom u *in vitro* uslovima. *Trichoderma* parazitira na nekoliko fitopatogenih gljiva (Chet et al., 1981). Na ovaj način ona limitira rast i aktivnost ovih gljiva, i štiti biljku od njihovog uticaja. Trihoderma luči enzime β -1,3-glukanazu, celulazu i hitinazu, koji razlažu glukan u ćelijskom zidu *Pythium* sp., hitin i glukan u zidu *Rhizoctonia solani* (Harman et al., 1980). Smatra se da su ovi enzimi ključni u procesu parazitiranja trihoderme na patogenim gljivama (Cherif and Benhamou, 1990). Inaktivacija enzima sekretovanih od strane fitopatogenih gljiva, jedan je od važnih mehanizama kojima trihoderma štiti biljku. Elad et al. (1999) navode da su enzimi fitopatogene gljive *Botrytis cinerea*, pektinaza, glukanaza i hitinaza bili blokirani sekrecijom proteaze od strane trihoderme. Takođe, u istraživanjima Roco and Perez (2011), aktivnost enzima endopoligalakturonaza i pektinliaza, sekretovanih od strane fitopatogene gljive *Alternaria alternata*, bila je inhibirana aktivnošću trihoderme.

Trihoderma proizvodi organske kiseline, kao što su limunska, fumarna i glukuronska kiselina, koje snižavaju pH zemljišta, i na taj način omogućava biljci da solubilizuje fosfate, katjone, kao što su gvožđe, mangan i magnezijum, i ostale mikronutrijente neophodne za normalan metabolizam biljke (Benitez et al., 2004; Harman et al., 2004).

Zbog svojih osobina, gljive ovog roda imaju veliku primenu u poljoprivredi, i to kao biopesticidi i biofertilizatori (Harman, 2000; Harman et al., 2004; Lorito et al., 2004). *Trichoderma* sp. se danas uspešno koristi u suzbijanju bolesti izazvanih gljivama *R.solani*, *Sclerotium* sp., *Pythium* sp. i *Macrophomina phaseolina* i to kod pasulja, paradajza, kikirikija, pirinča, salate, susama, šećerne repe, duvana i graška (Coley-Smith et al., 1991). Bolesti trava izazvanih *R. solani*, *Sclerotinia homoeocarpa* i *Pythium graminicola* su u značajnoj meri smanjene primenom trihoderme (Lo et al., 1996).

Primena gljive *Trichoderma* sp. povećava klijavost semena paprike, pasulja, rotkve, paradajza i krastavca, dužinu klijanaca, veličinu površine lista kod paprike, i suhu masu biljke krastavca (Kleifeld and Chet, 1992). Povećana produktivnost useva kao posledica primene trihoderme utvrđena je kod brojnih vrsta biljaka kao što su: karanfil, hrizanteme, petunije, krastavac, patlidžan, grašak, paprika, rotkva, duvan, paradajz, zelena salata, šargarepa, kukuruz, mak, proso, pasulj, kakao i kod trava (Resende et al., 2004; Gravel et al., 2007; De Souza et al., 2008).

2.2.2. Primena PGP mikroorganizama u proizvodnji engleskog ljulja

Engleski ljulj (Lolium perenne)

Engleski ljulj (*Lolium perenne* L.) je među prvim gajenim i najviše korištenim višegodišnjim travama. U Engleskoj se gaji još od XVII veka na području Oxforda, pa je zbog toga dobila ime Engleski ljulj (Đukić, 2002). Rasprostranjen je u Evropi, severnoj Americi, Africi, Australiji i srednjoj Aziji. Ubraja se među najkvalitetnije trave (Hannaway, 1999). Akumulira visok nivo ugljenih hidrata u toku proleća i jeseni. Morvan-Bertrand et al. (2001) su utvrdili da se oko 70 % ukupnog sadržaja fruktoze nalazi u stablu biljke. Na vrhu lista sadržaj fruktoze je najmanji, a količina fruktoze se povećava prema korenu lista odnosno stablu biljke (Pavis et al. , 2001). Koristi za ispašu svih vrsta stoke, za seno i silažu (Hannaway et al., 1999; Hubbard, 1992). Takođe se koristi za ukrasne travnjake i igrališta te za zaštitu od erozije, posebno u smesama s drugim vrstama trave.

Korenov sistem engleskog ljulja je površinski, do 10 cm dubine zemljišta. Stabljike su kratke, nežne i veoma polegljive. U vreme cvetanja biljka dostiže visinu od 20 do 80 cm. Lišće je uzano, kratko, svetlozelene boje i nežno. Cvast je klas. Engleski ljulj je trava ozimog tipa rasta (Delagarde et al., 2000). Dobro podnosi niske temperature, ali ne i mraz i duboki snežni pokrivač (Hannaway et al., 1999). Optimalna temperatura za razvoj biljaka engleskog ljulja je od 18 do 20°C . Dugotrajne suše smanjuju prinos, a temperature od 25 – 30 °C mogu da zaustave njegov rast. U područjima umerenijih temperaturnih uslova, sa većom vlažnošću, raste i generiše se više puta tokom leta (Đukić, 2002). Prilično dobro uspeva na alkalnim zemljištima, ako ima vode. Dobra predkultura za engleski ljulj su jednogodišnje mahunarke, žitarice, kukuruz i suncokret. Vek trajanja je 3 – 6 godina ako se koristi za seno, a ako se koristi za ispašu u povoljnim uslovima traje i do deset godina. Između dve ispaše ili košnje, preporučljivo je da se trava ostavi da naraste od 10 – 25 cm (Fulkerson and Donaghy, 2001; Hannaway et al., 1999). Tokom godine engleski ljulj može dati 4 do 6 otkosa. Prinosi zelene mase variraju zavisno od klimatskih uslova i agrotehnike, a mogu iznositi 60 i više t/ha. Razlikuju se dva tipa engleskog ljulja: vegetativni tip formira puno lišća i malo stabala i generativni tip formira malo lišća i puno stabljika, a daje puno semena.

Prilikom gajenja ljulja, primena mineralnih đubriva bi trebalo da omogući najpotpunije iskorišćavanje proizvodnog potencijala sorti za prinos (Đukić, 2002). Primena azotnih mineralnih đubriva preporučuje se tokom jeseni, što bi dovelo do brzog kretanja vegetacije u proleće, a time i povećanje sadržaja sirovih proteina u suvoj masi. Efikasnost đubrenja tokom jeseni je posebno izražena ukoliko je zima bila blaga, bez mrazeva koji bi uticali na eventualno izmrzavanje useva, čak i na plodnim zemljištima.

Rezultati ispitivanja primene različitih mikrobnih inokulanata u proizvodnji engleskog ljulja pokazali su da efekat zavisi od sorte, vrste inokulanata i tipa zemljišta. Stamenov et al. (2011a) su ispitivali uticaj primene gljive *Trichoderma asperellum* na svežu i suhu masu *Lolium perenne*, sorta Calibra kao i na brojnost mikroorganizama u njegovoj rizosferi. Sveža masa inokulisanih biljaka bila je za 44,3% veća u odnosu na kontrolu, dok je suva masa inokulisanih biljaka bila za 43,75% veća od kontrole. Primenom ove gljive postignut je pozitivan efekat na brojnost većine ispitivanih grupa mikroorganizama.

Ispitivanjem efekta primene *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp. i *Trichoderma* sp. na prinos engleskog ljulja sorta Esquire posle prvog, drugog i trećeg otkosa utvrđeno je da je najveće procentualno povećanje prinosa sveže i suve mase biljaka bilo nakon prvog otkosa, i to u varijantama gde su bili primenjeni *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus subtilis* (Stamenov et al., 2012a). Na varijantama gde je primenjen *Pseudomonas fluorescens* postignut je najbolji efekat na broj gljiva, dok je primena *Bacillus subtilis* imala najbolji efekat na broj aktinomiceta i azotobaktera. Primenom *Trichoderma asperellum* postignut je najbolji efekat na ukupan broj mikroorganizama i broj aminoheterotrofa.

Kod sorte Calibra, primenom *Bacillus subtilis* prinos sveže mase biljaka povećan je za 63%, dok je prinos suve mase bio za 84% veći. Prinos sveže materije biljaka inokulisanih sa *Pseudomonas fluorescens* bio je za 51% veći nego kontrolnih, dok je prinos suve materije bio za 63% veći (Stamenov et al., 2012b).

Primenom tri soja *Streptomyces* sp. i jednog soja *Azotobacter chroococcum* kod sorti Eminent i Leia utvrđeno da su svi inokulanti uticali pozitivno na visinu i suhu masu biljke sorte Eminent, a kod sort Leia efekat je bio slabiji (Stamenov et al., 2012c). Najbolji efekat na porast biljke kod obe sorte engleskog ljulja postignut je primenom soja *Streptomyces* sp.5. Efekat inokulacije na brojnost mikroorganizama zavisio je od sorte engleskog ljulja i primenjenih inokulanata.

Kincses i Sipos (2008) su ispitivali efekat primene bakterijskog inokulanta na sadržaj azota u Engleskom ljuju gajenom na černozeu, kiselom i neutralnom peskovitom zemljištu. Za inokulaciju korišćene su različite količine smeše sojeva bakterija roda *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* i *Azospirillum*. Rezultati su pokazali da primenjeni inokulanti utiču pozitivno na količinu azota u biljkama koje su rasle na černozeu i alkalnom zemljištu. Kod biljaka koje su rasle na kiselom zemljištu rezultat primene smeše sojeva bakterija roda *Bacillus* bio je negativan jer je količina azota u biljkama bila značajno smanjena.

3. RADNA HIPOTEZA

Primenom mikrobioloških preparata koja sadrže efektivne PGP mikroorganizme smanjuje se upotreba azotnih đubriva, omogućava se biljci lakše usvajanje fosfora, utiče se na pravac i dinamiku mikrobioloških procesa koji utiču na održavanje i povećanje plodnosti zemljišta. Primena ovakvih preparata kao dodatak ili zamena mineralnim đubrivima ili pesticidima je posebno opravdana kod biljnih vrsta koje se gaje na velikim površinama kao što su krmne trave.

U cilju postizanja što boljih rezultata potrebno je izolovati što veći broj mikroorganizama iz rizosfere trava, utvrditi njihovu efikasnost na poboljšanje rasta biljke, pronaći najadekvatniji način primene inokulanata, kao i utvrditi koji faktori doprinose boljem preživljavanju unetih mikroorganizama u zemljište. Mikrobiološka aktivnost u rizosferi krmnih trava, kao što je engleski ljulj, je do sada veoma malo istraživana.

U ovim istraživanjima očekuje se da će primena izolata roda *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* i gljive *Trichoderma asperellum* ispoljiti efekte na brojnost pojedinih sistematskih i fizioloških grupa mikroorganizama, kao i dehidrogenaznu aktivnost u rizosferi engleskog ljulja (*Lolium perenne*).

Na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja primene mikroorganizama na drugim biljkama, pretpostavlja se da se mikroorganizmi mogu uspešno koristiti i u proizvodnji engleskog ljulja i drugih trava.

Očekuje se da će unošenje mikroorganizama promotora biljnog rasta (*Pseudomonas* sp. i *Bacillus* sp.), te mikroorganizama mineralizatora organske materije i producenata antibiotika (*Streptomyces* sp., i *Trichoderma asperellum*) uticati na ispitivane parametre prinosa engleskog ljulja.

Rezultati ovih istraživanja bi trebalo da pokažu da se korišćenjem PGP mikroorganizama koji pospešuju porast biljaka i obezbeđuju biljku neophodnim hranivima, postižu pozitivni efekti i u proizvodnji trava, što je posebno značajno sa ekološkog ali i sa ekonomskog aspekta.

4. CILJ ISTRAŽIVANJA

Primena prevelikih količina mineralnih đubriva i pesticida dovodi do degradacije zemljišta i narušavanja prirodne ravnoteže između organizama u zemljištu. Intenzivna proučavanja su pokazala da PGP mikroorganizmi mogu imati značajnu ulogu u poljoprivredi i hortikulturi i da predstavljaju alternativu upotrebi hemijskih sredstava, koja se koriste za povećanje biljnog rasta. Primenom PGP mikroorganizmama postignut je dobar efekat u uzgajanju različitih biljnih vrsta.

Cilj ovih istraživanja je izolacija i karakterizacija mikroorganizama sa PGP svojstvima iz rizosfere engleskog ljulja, ispitivanje sposobnosti njihovog preživljavanja nakon unošenja u zemljište, kao i praćenje uticaja njihove primene na parametre prinosa i mikrobiološku aktivnost u rizosferi biljke.

5. MATERIJAL I METODE

Istraživanja su vršena u toku tri godine (2010, 2011 i 2012 godine).

Prvi deo istraživanja odnosio se na izolaciju mikroorganizama iz roda *Pseudomonas*, *Bacillus* i *Streptomyces*, i određivanje njihovih fizioloških, biohemijskih i PGP osobina.

Drugi deo istraživanja odnosio se na ispitivanje efekta inokulacije odabranih izolata (*Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. i *Streptomyces* sp.) i gljive *Trichoderma asperellum* (iz mikrobiološkog preparata Trifender) na mikrobiološku aktivnost rizosfernog zemljišta, klijavost semena engleskog ljulja i parametre prinosa biljke. U toku prve i treće godine istraživanja, određivana je brojnost mikroorganizama introdukovanih grupa u rizosferi engleskog ljulja.

Engleski ljulj (*Lolium perene*) je iz kolekcije Instituta za krmno bilje, Kruševac, Srbija.

Mikrobiološke analize su rađene na Odeljenju za mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Ogled je izveden u polukontrolisanim uslovima u žičari Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, u vegetacionim sudovima zapremine 10 l, u tri ponavljanja.



Slika 4. Ogled u polukontrolisanim uslovima

5.1. IZOLACIJA, DETERMINACIJA I KARAKTERIZACIJA IZOLATA

5.1.1. Izolacija mikroorganizama iz roda *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Streptomyces*

Prilikom izolacije bakterija roda *Bacillus* birani su izolati koji se sastoje od katalaza pozitivnih, grampozitivnih, štapićastih ćelija koje formiraju endospore.

Prisustvo katalaze detektovano je na osnovu oslobađanja mehurića kiseonika u kontaktu kolonija sa razblaženim rastvorom vodonik peroksida.

Prilikom izolacije bakterija roda *Pseudomonas* birani su izolati za koje je utvrđeno da su im ćelije gramnegativne, štapićaste i da produkuju pigment fluorescin.

Produkcija fluorescina testirana je na *Pseudomonas* Flo agaru (proteose pepton 20 g l⁻¹, bacto maltoza 10 g l⁻¹, K₂HPO₄ 1,5 g l⁻¹, MgSO₄ 0,73 g l⁻¹, glicerol 10 ml/l, agar 15 g l⁻¹). Fluorescencija je vidljiva pod kratkim UV-zracima (Knežević-Vukčević i Simić, 1997).

Za izolaciju aktinomiceta iz roda *Streptomyces* korišten je selektivni medijum sa glukozom i nitratom (glukoza 10 g l⁻¹, NaNO₃ 10 g l⁻¹, K₂HPO₄ 10g l⁻¹, KCl 10g l⁻¹, MgSO₄ x 7H₂O 10 g l⁻¹, agar 15 g l⁻¹).

Iz rizosfere engleskog ljujla, izolovano je 12 bakterija roda *Pseudomonas*, 20 bakterija roda *Bacillus* i 10 bakterija roda *Streptomyces*. Bakterije su na osnovu morfoloških karakteristika razvrstane u po tri grupe. Za deo istraživanja koji se odnosio na karakterizaciju mikroorganizama, odabrano je devet izolata, po tri iz svakog roda. Takođe, određivane su i morfološke i pojedine biohemijske osobine gljive *Trichoderma asperellum*.

5.1.2. Morfološke osobine

Za ispitivanje morfoloških osobina ćelija određivan je: oblik, pokretljivost, bojenje po Gramu i prisustvo endospora (Jarak i Đurić, 2004).

Za opis kolonije određivane su: oblik, površina, ivica, položaj, boja (Jarak i Đurić, 2004).

5.1.3. Fiziološke osobine

Od fizioloških osobina određivani su: odnos prema izvoru ugljenika, temperaturi, reakciji sredine, koncentraciji NaCl, teškim metalima, antibioticima i pesticidima.

Za određivanje odnosa prema izvoru ugljenika korištena je Hugh-Lifsson-ova podloga (pepton 2 g, K_2HPO_4 0,3 g, NaCl 5 g, šećer 10 g, brom-timol plavo 0,03 g, agar 3 g) (Hugh and Leifson, 1953). U ovim istraživanjima korišteni su sledeći šećeri: glukoza, galaktoza, fruktoza, saharoza, laktoza i ksiloza. U slučaju pozitivne reakcije primećuje se oko kolonija promena boje iz zelenkaste u žutu.

Rast na temperaturama ($5^{\circ}C$, $15^{\circ}C$, $28^{\circ}C$, $37^{\circ}C$, $45^{\circ}C$), na podlogama različite kiselosti (pH 4, 5, 6, 7) i na podlogama sa različitim koncentracijama NaCl (3%, 5%, 7%), praćen je na odgovarajućim hranljivim podlogama *Pseudomonas* na King-B (King et al., 1954), *Bacillus* na hranljivom agaru, a aktinomicete na PDA (krompirov-dekstrozni agar). Prilikom ispitivanja uticaja pH i NaCl, inkubacija je u termostatu na $28^{\circ}C$. Nakon 48 h (za *Pseudomonas* i *Bacillus*) i 5 dana (za aktinomicete) inkubacije, merena je širina rasta i upoređivana sa kontrolom. Potpuno odsustvo rasta obeleženo je sa -, minimalan rast sa +, optimalan sa ++, a obilan rast sa +++.

Za određivanje otpornosti prema antibioticima primenjena je metoda antibiograma-postupak sa diskovima. Postupak se sastoji u gustom zasejavanju hranljive podloge mikroorganizmima. Na površinu hranljive podloge se postavljaju diskovi sa antibioticima. Ispitivana je otpornost mikroorganizama na sledeće antibiotike: ampicilin (10 μ g, 25 μ g), neomicin (10 μ g, 30 μ g), erithromicin (5 μ g, 15 μ g), streptomycin (10 μ g, 300 μ g), hloramfenikol (10 μ g), kanamicin (30 μ g).

Difuzionom metodom ispitivana je otpornost mikroorganizama na rastvore sledećih metala: kadmijum ($CdCl_2$), mangan ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) i olovo ($PbCl_2$), u različitim koncentracijama: 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} (mol/dm^3). Nakon gustog zasejavanja podloge, na površinu se postavljaju diskovi sa rastvorima teških metala.

Difuzionom metodom ispitivana je otpornost na sledeće pesticide: metribuzin (0,5-1 kg ha⁻¹), oksifluorfen (1-1,25 l ha⁻¹) i bentazon (3-4 l ha⁻¹). Ispitivan je uticaj preporučene doze pesticida, doze koja je 10 i 100 veća od preporučene.

Inkubacija je trajala 48 h za *Pseudomonas* i *Bacillus* i 5 dana za *Streptomyces* na 28°C. U toku perioda inkubacije na podlozi se formira gust bakterijski tepih na kome se oko diskova uočavaju zone inhibicije rasta kulture. Veličina zone inhibicije zavisi od osetljivosti bakterije prema antibiotiku, teškom metalu ili pesticidu. Ukoliko je bakterija otporna prema određenoj supstanci, neće biti zone inhibicije (-), a ako je osetljiva, zona inhibicije će biti manja (+) ukoliko je mikroorganizam manje osetljiv, a veća (++) ili (+++) ukoliko je mikroorganizam osetljiviji na ispitivanu supstancu. Intenzivniji rast oko diska dokaz je stimulativnog dejstva ispitivane supstance na rast mikroorganizma.

5.1.4. Biohemijske osobine

Od biohemijskih osobina ispitivane su: hidroliza želatina, aktivnost lipaze, amilaze, pektinaze, proteaze, celulaze, ureaze i sposobnost korišćenja citrata kao izvora energije. Kod izolata roda *Pseudomonas*, određivana je sposobnost produkcije pigmenata piocijanina (plavo-zeleni pigment). Ispitivan je i odnos izolata prema pojedinim gljivama.

Hidroliza želatina ispitivana je na dubokom želatinoznom agaru (Govedarica i Jarak, 1999). Duboki želatinozni agar se pravi tako da se hranljivom buljonu (MPB) doda 10-15% želatina, izvrši sterilizacija i epruvete ostave uspravno da se dobije duboki agar. Zasejavanje sa bakterijama se vrši ubodom, a inkubacija traje najmanje sedam dana na temperaturi 22-23°C. Otapanje želatina dokaz je sposobnosti mikroorganizma da hidrolizuje želatin.

Produkcija lipaze ispitivana je na podlozi (pepton 10 g l⁻¹, NaCl 5 g l⁻¹, CaCl₂ ·H₂O 0,1 g l⁻¹, agar 15 g l⁻¹) kojoj je dodat Tween 80 (Lanyi, 1987). Period inkubacije je sedam dana na 26°C. Zamućene zone oko kolonije dokaz su lipolitičke aktivnosti.

Za određivanje sposobnosti mikroorganizma da hidrolizuje skrob koristi se metoda agarnih ploča na skrobnom agaru (skrob u prahu 10 g l⁻¹, KH₂PO₄ 0,5 g l⁻¹, K₂HPO₄ 0,5 g l⁻¹, MgSO₄ x 7H₂O 0,2 g l⁻¹, agar 15 g) (Rodina, 1965). Inkubacija se vrši 48 h za *Pseudomonas* sp. i

sp., 5 dana za aktinomicete na 28°C . Kolonije se zatim preliju rastvorom lugola. Skrob se u prisustvu joda boji plavo. Ako bakterije vrše hidrolizu skroba, oko njihovih kolonija pojaviće se nebojena zona (zona hidrolize), koja ne sadrži skrob, dok će se ostali deo podloge na kome nije došlo do hidrolize obojiti plavo. Ako bakterije ne razlažu skrob, podloga će biti ravnomerno plavo obojena.

Sposobnost produkcije pektinaze ispitivana je metodom agarnih ploča na pektinoznom agaru (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, ekstrakt kvasca 1g l⁻¹, pektin 10 g l⁻¹, agar 16 g l⁻¹). Inkubacija traje 24 h na 37°C, nakon čega se izrasle kolonije preliju lugolom. Pojava nebojenih zona oko kolonije dokaz su pektinazne aktivnosti (Soares et al., 1999; Soriano et al., 2000).

Za dokazivanje produkcije vodonik sulfida (H_2S), kao krajnjeg proizvoda katabolizma proteina, peptida i aminokiselina, koristi se pepton-gvožđe duboki agar (pepton 15 g l⁻¹, proteose pepton 5 g l⁻¹, feri amonijum citrat 0,5 g l⁻¹, $Na_2S_2O_3$ 0,08 g l⁻¹, agar 15 g l⁻¹), u koju je ubodom zasejan mikroorganizam. U reakciji sa jonima gvožđa, H_2S formira crni, nerastvorljivi talog FeS . Inkubacija traje 48 h na 30°C, nakon čega se posmatra da li je došlo do promene boje podloge u crno.

Produkcija celulaze ispitivana je na CMC agaru (karboksi metil celulozni agar) (Kasing, 1995). Period inkubacije je sedam dana na 28°C. Nakon inkubacije, petri kutije su prelivene rastvorom Congo-red (1mg/cm³vode). Nakon petnaest minuta, Congo-red je odliven a petri kutije su prelivene sa 1M rastvorom NaCl. Obezbojene zone oko kolonija dokaz su celulazne aktivnosti mikroorganizma.

Sposobnost razgradnje ureje ispitivana je na podlozi po Kristensen (Govedarica i Jarak, 1999). Period inkubacije iznosi 24 h na 37°C. Pojava crvene boje indikatora u hranljivoj podlozi dokaz je razgradnje ureje.

Sposobnost korišćenja citrata, kao izvora energije, određivana je na Simonsovom citratnom agaru ($MgSO_4 \times 7H_2O$ 0,2 g l⁻¹, $NH_4H_2PO_4$ 1 g l⁻¹, K_2HPO_4 1 g l⁻¹, Na-citrat 2 g l⁻¹, NaCl 5 g l⁻¹, brom timolplavo 0,08 g l⁻¹, agar 15 g l⁻¹). Inkubacija se vrši na 30°C 48h. Na osnovu rasta i promene boje podloge iz zelene u plavu, određeno je koji izolati mogu da koriste citrat.

Produkcija piocijanina testirana je na *Pseudomonas* P agaru (bakto pepton 20 g l⁻¹, DL-alanin 2 g l⁻¹, Na-citrat 10 g l⁻¹, K₂SO₄ 8,6 g l⁻¹, KCl 1,4 g l⁻¹, MgSO₄ 1,4 g l⁻¹, glicerol 10 ml l⁻¹, agar 15 g l⁻¹). Plavo-zeleni pigment se razvija posle 6-7 dana inkubacije.

Za ispitivanje odnosa antagonizma između ispitivanih bakterijskih izolata i pojedinih gljiva (*Fusarium* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Sclerotinium sclerotiorum*) primenjena je metoda po Dennis and Webster (1971). Ispitivani izolati zasejani su uz ivicu petri-kutije, na jednoj strani, na PDA (krompirov dekstrozni agar) podlozi. Na suprotnoj strani, postavljeni su diskovi gljiva. Inkubacija je vršena na temperaturi od 28°C. U kontrolnoj petri kutiji postavljeni su samo diskovi gljiva, takođe uz ivicu petri kutije. Nakon 5-7 dana, u kontrolnoj i oglednoj petri kutiji meri se rast micelije gljiva. Inhibitorni uticaj izolata na gljivu može se izraziti u procentima prema formuli po Vincent (1927): $I(\%) = (C-T) / C \times 100$, gde je I- inhibicija; C-dužina micelije gljive u kontrolnoj petri kutiji; T- dužina micelije gljive u oglednoj petri kutiji.

5.1.5. Produkcija materija rasta

Od Plant-Growth Promotion osobina ispitivane su: produkcija indol-sirćetne kiseline (IAA), egzopolisaharida, siderofora, HCN i sposobnost rastvaranja organskih i neorganskih jedinjenja fosfora.

Produkcija indol sirćetne kiseline (IAA) ispitivana je metodom po Gordon and Weber (1951). Upotrebom Salkowski reagensa (FeCl₃-HClO₄), utvrđena je produkcija IAA u medijumu koji sadrži 0, 200 µg ml⁻¹ i 500 µg ml⁻¹ L-triptofana. 100 µl suspenzije bakterija starosti 24h preneto je u 100 ml podloge: bakterije roda *Pseudomonas* u podlogu King-B (King et al.,1954), bakterije roda *Bacillus* u podlogu LB (Gerhardt et al. 1994; Sambrook and Russell, 2001). Aktinomicete su gajene na podlozi PDA (krompirov dekstrozni agar), i potom su sa površine od 226,9 cm² sastrugane i prenete u 100 ml PDB (krompirov dekstrozni buljon) podloge. Da bi se utvrdila količina produkovane IAA, nakon 24 i 48 h kod bakterija, odnosno 7 i 14 dana kod aktinomiceta, 5ml suspenzije se centrifugira na 5 000 o/min u trajanju od 15 minuta. Jednom ml supernatanta dodaje se 2 ml FeCl₃-HClO₄ reagensa. Nakon 25 minuta vrši se očitavanje na UV-spektrofotometru na 530 nm.

Ispitivanje produkcije egzopolisaharida (sukcinoglukana) za bakterije *Pseudomonas* sp. i *Bacillus* sp. izvršena je po metodi Cote and Krull (1988) i Liu et al. (1998). Bakterije su gajene na mesopeptonskom agaru (MPA) sa dodatkom 0,02% kalkofluor boje (Calcofluor White M2R, Sigma) tokom sedam dana da bi se uočile jasne razlike u fluorescenciji. Efekat kalkofluor fluorescencije očitao je po Reed et al. (1991).

Sposobnost produkcije siderofora određivana je po metodi Milagres et al. (1999) upotrebom chrom-azurool agara (CAS agar). Prema ovoj metodi, CAS agar je smeša dva rastvora koji se pripremaju i sterilišu zasebno. Prvi rastvor sadrži: 60,5 mg CAS, 50 ml vode, 10 ml rastvora (1M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM HCl), 40 ml vodenog rastvora HDTMA (heksadeciltrimetilamonium) ($1,82 \text{ mg ml}^{-1}$). Drugi rastvor pripremljen je rastvaranjem 30,24 g PIPES (1,4-piperazindietansulfonska kiselina) u 750 ml vode, 15 g agara i 12 g rastvora 50% NaOH (pH se podesi na 6,8). Nakon sterilizacije rastvori se mešaju. Boja CAS agara je tamno plava do zelena. U petri kutije razliju se hranljive podloge koje se nakon što očvrstnu preseku na pola i polovina izbacuju. U praznu polovinu petri kutije sipa se CAS agar. Zasejavanje se vrši na polovini na kojoj je hranljiva podloga, a prati se promena boje CAS agara na liniji razdvajanja ove dve podloge. Promena boje iz plavo zelene u narandžasto crvenkasto dokaz je da mikroorganizam proizvodi siderofore.

Produkcija HCN ispitivana je na podlozi sledećeg sastava: Tripton iz soje 30 g l^{-1} , glicin $4,4 \text{ g l}^{-1}$, agar 15 g l^{-1} (Frey-Klett et al., 2005). Nakon inokulacije na podlogu je postavljen Whatman disk, koji je prethodno potapan u rastvoru sastava 0,5% pikrinska kiselina i 2% Na_2CO_3 . Period inkubacije iznosi 4 dana na 28°C . Promena boje diska iz žute u narandžasto braon boju dokaz je sposobnosti mikroorganizma da proizvodi HCN.

Sposobnost mineralizacije organskih jedinjenja fosfora ispitivana je na podlozi Menkina, modifikovanoj po Rodinoj (Menkina, 1963). Sposobnost izolata da solubilizuju neorganske fosfate ispitivana je na podlozi po Pikovskaya (Pikovskaya, 1948). Nakon 5 dana inkubacije na 28°C , pojava providnih zona oko kolonija dokaz su sposobnosti mikroorganizma da rastvara fosfate.

Na osnovu dobijenih rezultata u prvom delu istraživanja, za ispitivanje efekta inokulacije na mikrobiološku aktivnost rizosfernog zemljišta i prinos biljke, odabrana su tri izolata, po jedan iz svakog roda (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*).

5.2. ISPITIVANJE EFEKTA INOKULACIJE NA MIKROBIOLOŠKU AKTIVNOST RIZOSFERNOG ZEMLJIŠTA

5.2.1. Broj mikroorganizama

Broj mikroorganizama određivan je metodom agarnih ploča na odgovarajućim selektivnim hranjivim podlogama (Wollum, 1982.). Zasejavanje svih grupa mikroorganizama vršeno je sa 0,5 ml, a za azotobakter 0,2 ml suspenzije zemljišta iz odgovarajućeg razređenja.

Određivane su sledeće grupe mikroorganizama:

- Ukupan broj mikroorganizama na podlozi prema Poshon i Tardieux (1962), iz 10^{-6} razređenja;
- Gljive na Chapek- Dox agaru, (Shalau,2000.), iz 10^{-4} razređenja;
- Aktinomicete na sintetičkom agaru Waksman-Carey (Shalau,2000.), iz 10^{-4} razređenja;
- Oligonitrofilne bakterije na Fjodorovoj podlozi (Anderson i Domsch, 1958.), iz 10^{-5} razređenja;
- Amonifikatori na meso-peptonskom agaru, iz 10^{-5} razređenja;
- Broj roda *Azotobacter* na podlozi Fjodorova (Anderson i Domsch,1958), iz 10^{-2} razređenja;

Mikroorganizmi su inkubirani na temperaturi od 28°C. Period inkubacije za ukupan broj mikroorganizama i aktinomiceta iznosio je sedam dana, za gljive pet dana, četiri dana za oligonitrofile, tri dana za aminoheterotrofe i dva dana za azotobakter.

5.2.2. Dehidrogenazna aktivnost

Dehidrogenazna aktivnost zemljišta određivana je spektrofotometrijskom metodom po Lenhard (1956), modifikovanoj po Thalmann (1968).

Metoda se zasniva na sposobnosti enzima dehidrogenaze da vodonik sa supstrata prenosi na bezbojni 1.3.5.- trifeniltetrazolijum-hlorid (TTC), pri čemu ga redukuje i prevodi u crveno obojeni trifenil-formazan (TPF). Aktivnost dehidrogenaze određuje se na osnovu merenja inteziteta crvene boje TPF-a.

Reagensi:

0,15M TTC: priprema se u 0,1M Tris (hidroksimethylaminomethan- $C_4H_{11}O_3N$) puferu (pH 7,4).

Rastvor za ekstrakciju se priprema od acetona i ugljentetra-hlorida u odnosu 9:1.

Rastvor TPF za standardnu krivu: za zemljišta bogatija organskom materijom standardna kriva se pravi sa većim, a za siromašnija zemljišta sa manjim vrednostima TPF. Najčešće se koristi 0.25 do 5 μ g TPF. TPF se rastvara u rastvoru za ekstrakciju i tris-puferu u odnosu 4:1, a koriste se odmerne tikvice od 50 do 100ml.

Postupak:

Odmeri se 10 g vazdušno suvog zemljišta prosejanog kroz sito prečnika rupica 2 mm i prenese u tamne boce od 100 ml, doda se 10 ml 0.5% rastvora TTC u Tris- puferu, promeša i inkubira 24 časa u termostatu na 30°C. Uporedo se na inkubaciju stavlja kontrolni uzorak (slepa proba) koji sadrži samo rastvor TTC u Tris-puferu, a ne sadrži zemljište. Nakon inkubacije u uzorke i u kontrolu se doda 40 ml rastvora za ekstrakciju da bi se ekstrahovao TPF, promućka se i inkubira još dva časa na sobnoj temperaturi i profiltrira. Zapremina filtrata treba da bude identična zapremini rastvora koji se koriste za pravljenje standardne krive. Očitavanje se vrši na sledeći način : u jednu kivetu se sipa slepa proba, a u druge dve filtrat. Prvo se slepa proba stavi na talasnu dužinu od 546 nm i skala se podesi na 0 (tako se izvrši korekcija izmerenih vrednosti za uzorak). Nakon toga se očitava intezitet crvene boje (ekstinkcija) uzoraka. Očitane vrednosti se upoređuju sa očitanim vrednostima na standardnoj krivi. Određivanje dehidrogenaze treba vršiti u poluzamračenim prostorijama jer je TPF fotolabilno jedinjenje.

Aktivnost dehidrogenaze izražava se u μ g TPF na g zemljišta.

5.2.3. Praćenje brojnosti mikroorganizama introdukovanih grupa u rizosferi engleskog ljulja

U toku prve i treće godine istraživanja praćena je brojnost mikroorganizama introdukovanih grupa.

Nakon trećeg otkosa, na osnovu predhodno utvrđenih morfoloških i fiziološko-biohemijskih osobina izolata, određivana je brojnost bakterija *Pseudomonas* sp. (na podlozi King-B), *Bacillus* sp. (na podlozi L-agar), *Streptomyces* sp. (na sintetičkoj podlozi) i gljive *Trichoderma asperellum* (na Čapekovej podlozi).

Brojnost mikroorganizama introdukovanih grupa na kraju vegetacione sezone biljke, upoređivana je sa brojem mikroorganizama u kontrolnoj posudi i brojem unetih ćelija prilikom setve.

5.4. ISPITIVANJE EFEKTA INOKULACIJE NA PARAMETRE PRINOSA BILJKE

5.4.1. Sorta Engleskog ljulja

Ispitivanja su vršena na sorti engleskog ljulja Calibra.

5.4.2. Varijante ogleđa

Pre setve engleskog ljulja u posude je uneto po 50 ml inokuluma:

- *Pseudomonas* sp. (10^8 ćelija u ml)
- *Bacillus* sp. (10^9 ćelija u ml)
- *Streptomyces* sp. (10^9 ćelija u ml)
- *Trichoderma asperellum* (10^8 ćelija u ml)
- Kontrola – bez inokulacije

Za potrebe istraživanja korišćene su Mičerlihove posude, zapremine 10 litara. Na dno suda stavljen je šljunak granulacije od 6 do 11 mm koji je imao ulogu drenaže i sudovi su dopunjeni zemljištem do 2 cm ispod vrha suda. Na inokulisanu površinu zemljišta zasejano je po 0,1 g semena Engleskog ljulja (*Lolium perenne* Calibra).

5.4.3. Tip zemljišta

Zemljište koje je korišćeno u ogledu je neutralne do slabo-bazno (pH u KCl je 7,59) reakcije, sa visokim sadržajem azota (0,3%), dobro snabdeveno karbonatima, fosfatima i kalijumom (Tab.2).

Tabela.2. Fizičko-hemijske karakteristike zemljišta

Zemljište	pH		Humus	N	CaCO ₃	mg P ₂ O ₅	mg K ₂ O
	u vodi	u KCl	%	%	%	u 100 g	u 100 g
černozem	8,11	7,59	4,51	0,3	3,53	20,89	19,68

5.4.4. Ispitivanje uticaja izolata na klijanje semena i dužinu klice

U laboratorijskim uslovima ispitivan je uticaj inokulanata na klijanje semena i dužinu klice. Pre inokulacije je izvršena sterilizacija semena 70%-nim etanolom i 0,1% rastvorom HgCl₂ i ispiranje sterilnom vodom. Zatim su semena potopljena u toku 3 sata u inokulum, nakon čega su postavljeni na filter-hartiju na naklijavanje.

Po 100 semena engleskog ljujla inokulisanih odgovarajućim izolatom naklijavano je u tami, na 22°C. Očitavanja su vršena nakon 5 i 14 dana.

5.4.5. Ispitivani parametri prinosa

U toku godine, uzimana su tri otkosa (proleće, leto, jesen) i pri tome su određivani sledeći parametri prinosa:

- Dužina nadzemnog dela biljke (cm)
- Dužina korena (cm)
- Prinos zelene mase nadzemnog dela biljke po otkosu (t ha⁻¹)
- Prinos suve mase nadzemnog dela biljke po otkosu (t ha⁻¹)

5.4. STATISTIČKA OBRADA DOBIJENIH REZULTATA

Statistička obrada podataka izvršena je korišćenjem programa STATISTIKA 10 (Hamburg, Nemačka). Značajnost razlike između primenjenih tretmana određena je na osnovu Fišerovog LSD testa.

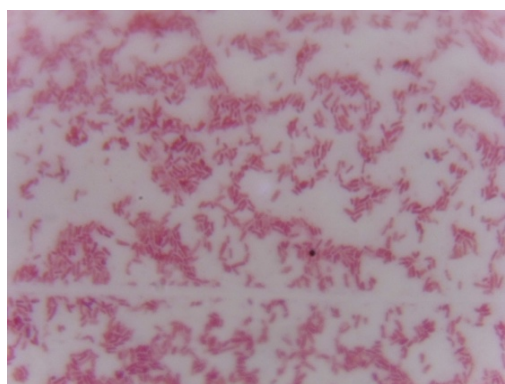
Sve fotografije u radu su originalne.

6. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

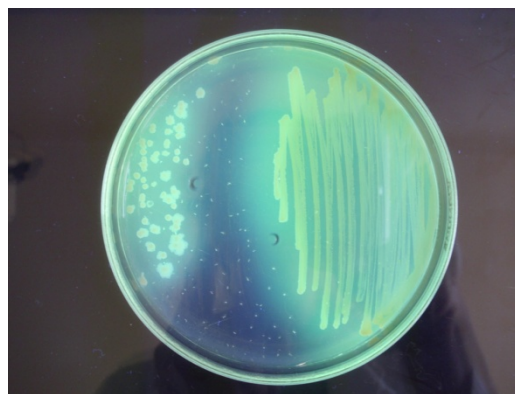
6.1.KARAKTERIZACIJA MIKROORGANIZAMA IZ RIZOSFERE ENGLESKOG LJULJA

6.1.1. Morfološke karakteristike ćelije i kolonije *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. i *Trichoderma asperellum*

Bakterije roda *Pseudomonas* su štapićaste, veličine 0,7-1 μm x 0,2 – 4 μm , gramnegativne, aerobne. Nemaju kapsulu i ne stvaraju spore (Tabela 3) (Slika 5). Kolonije ovih bakterija rastu na podlozi King B, okruglog su oblika i srednje veličine. Profil kolonije je blago ispupčen, površina sjajna i glatka (Tabela 4) (Slika 6). Položaj kolonije na podlozi je površinski, boja krem, ivica kolonije je ravna, blago zupčasta, struktura homogena. Kod sva tri izolata (P1, P12, P9) utvrđena je sposobnost produkcije pigmenta fluorescina. Nijedan od ispitivanih izolata nije produkovao plavo-zeleni pigment (piocijanin).



Slika 5. *Pseudomonas* sp. P12



Slika 6. Kolonija *Pseudomonas* sp.P12

Tabela 3. Morfološke karakteristike ćelija izolata

Izolati	Oblik ćelije	Pokretljivost	Ćelijski zid	Spore
P1	štapićaste	Da	G ⁻	Nema
P12	štapićaste	Da	G ⁻	Nema
P9	štapićaste	Da	G ⁻	Nema
B1	štapićaste	Da	G ⁺	Centralne
B3	štapićaste	Da	G ⁺	Centralne
B6	štapićaste	Da	G ⁺	Centralne
A1	končaste	-	G ⁺	U lancima
A2	končaste	-	G ⁺	U lancima
A3	končaste	-	G ⁺	U lancima
<i>Trichoderma asperellum</i>	Končast, septiran	-	-	konidije

P1,P12,P9 – izolati roda *Pseudomonas*; B1,B3,B6 – izolati roda *Bacillus*; A1,A2,A3 – izolati roda *Streptomyces*;

Bakterije roda *Bacillus* su štapićastog oblika, veličine oko 0,3 – 2,2 μm x 1,2 – 7,0 μm, gram pozitivne (Slika 7). Formiraju spore koje su centralne. Kolonije rastu na L-agaru. Okruglog su oblika, srednje veličine. Profil je ravan a površina glatka do blago naborana. Položaj na podlozi je površinski. Ivica kolonije je ravna do talasasta, struktura homogena, boja krem do svetlo žuta (Slika 8).

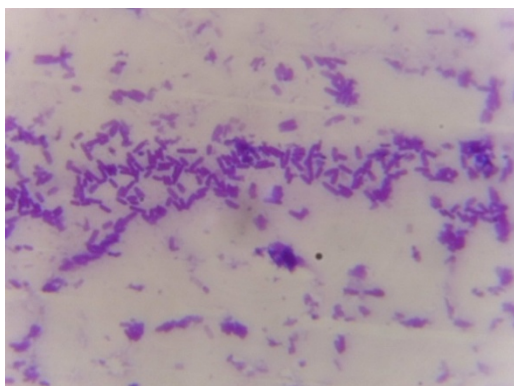
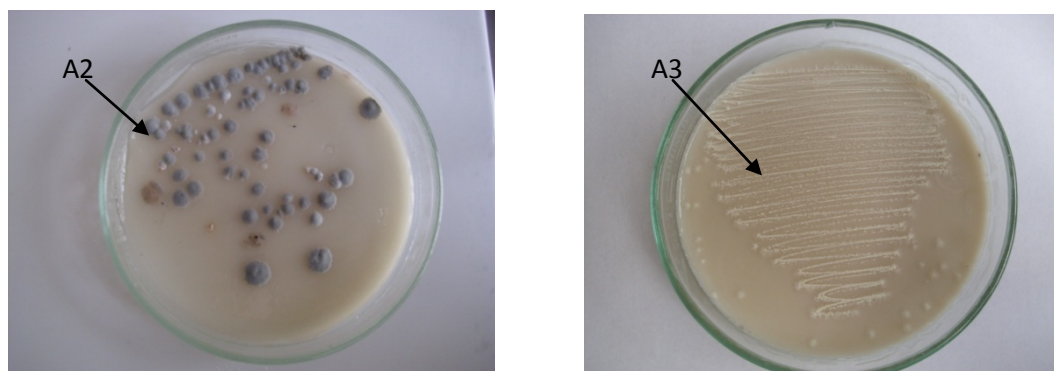
Slika 7. *Bacillus* sp.B1Slika 8. Kolonija *Bacillus* sp.B1

Tabela 4. Morfološke karakteristike kolonije izolata

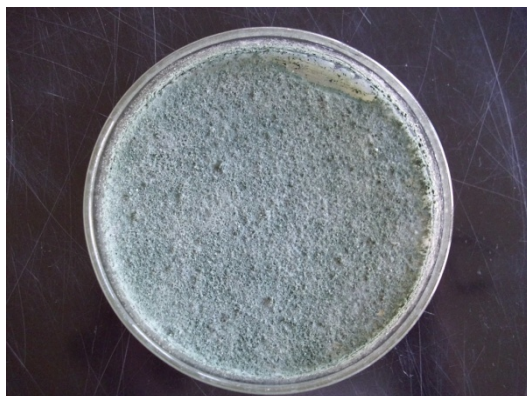
Izolati	Oblik kolonije	Ivica kolonije	Površina kolonije	Boja kolonije	Položaj kolonije
P1	Okrugao	Ravna	Glatka-sjajna	Krem	Površinski
P12	Okrugao	Zupčasta	Glatka	Krem	Površinski
P9	Okrugao	Zupčasta	Glatka-Sjajna	Krem	Površinski
B1	Nepravilan	Talasasta	Naborana	Svetlo žuta	Površinski
B3	Okrugao	Ravna	Naborana	Svetlo žut	Površinski
B6	Nepravilan	Talasasta	Naborana	Krem	Površinski
A1	Okrugao-nepravilan	Zupčasta	Rapava	Tamno zelena	Površinski
A2	Okrugao-nepravilan	Talasasta	Rapava	Svetlo plava	Površinski
A3	Okrugao-nepravilan	Talasasta	Rapava	Bela	Površinski
<i>Trichoderma asperellum</i>	Okrugao	Končasta	Rastresita	Zelena	Površinski

P1,P12,P9 – izolati roda *Pseudomonas*; *B1,B3,B6* – izolati roda *Bacillus*; *A1,A2,A3* – izolati roda *Streptomyces*;

Ćelije roda *Streptomyces* su končaste, gram pozitivne. Kolonije su čvrste konzistencije, okrugle do nepravilnog oblika, sa talasastom ivicom, rapave površine, različitih boja. Formiraju supstratni, nadsupstratni i vazdušni micelijum, na kome se stvaraju spore u nizovima (Slika 9).

Slika 9. Kolonije izolata roda *Streptomyces* sp.

Trichoderma asperellum ima septiranu hifu. Stvara zelenkast micelijum, a konidije su okrugle i liče na plod maline (Slika 10).



Slika 10. *Trichoderma asperellum*

6.1.2. Fiziološke osobine izolata

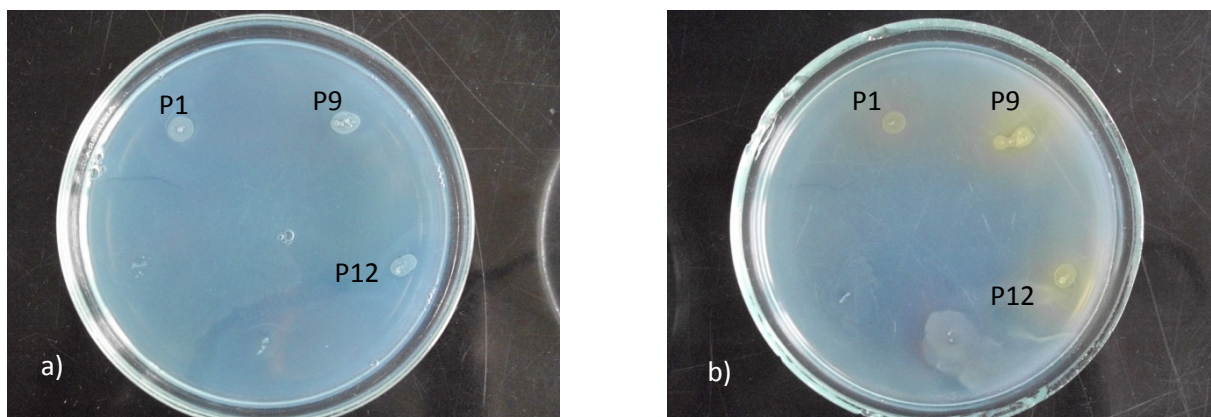
Mikroorganizmi su u svojoj životnoj sredini neprekidno izloženi čestim i brzim promenama spoljašnjih uslova što se odražava na brzinu rasta i broj jedinki u populaciji.

U ovim istraživanjima ispitivan je odnos izolovanih mikroorganizama prema različitim izvorima ugljenika. Takođe ispitivan je i uticaj temperature, koncentracije vodonikovih jona, NaCl, teških metala, antibiotika i pesticida na rast i preživljavanje izolata.

Korišćenje različitih izvora ugljenika

U svojoj ishrani bakterije koriste veoma različite izvore ugljenika. Za ispitivanje odnosa izolovanih mikroorganizama prema izvoru ugljenika korišteni su sledeći šećeri: glukoza, galaktoza, fruktoza, saharoza, laktoza i ksiloza.

Utvrđeno je da izolati roda *Pseudomonas* kao izvor ugljenika koriste sve ispitivane šećere, osim laktoze (Tabela 5).



Slika 11. Korišćenje različitih izvora šećera

(a) laktoza; negativna reakcija; (b)- saharoza; pozitivna reakcija

Izolati roda *Bacillus* kao izvor ugljenika koristili su glukozu, fruktozu i ksilozu. Izolat B6 nije koristio ksilozu.

Tabela 5. Rast na različitim šećerima

Izolati	Glukoza	Galaktoza	Fructoza	Saharoza	Laktoza	Ksiloza
P1	+	+	+	+	-	+
P12	+	+	+	+	-	+
P9	+	+	+	+	-	+
B1	+	-	+	-	-	+
B3	+	-	+	-	-	+
B6	+	-	+	-	-	-
A1	+	+	+	+	-	+
A2	+	+	-	-	+	-
A3	+	+	+	+	-	+

+ pozitivna reakcija; - negativna reakcija

Aktinomicete A1 i A3 kao izvor ugljenika koristile su sve šećere osim laktoze, dok je izolat A2 koristio glukozu, galaktozu i laktozu.

Uticaj kiselosti, osmotskog pritiska i temperature na rast izolata

Kiselost (pH reakcija) je jedan od najvažnijih hemijskih činilaca spoljašnje sredine. Za svaku vrstu mikroorganizama postoji optimalna koncentracija vodonikovih jona. Acidofilni mikroorganizmi za svoje razviće zahtevaju kiselu, neutrofilni neutralnu a alkalofilni baznu sredinu.

Ispitivan je uticaj različitih koncentracija vodonikovih jona na izolate i to: pH 4, 5, 6 i 7. Na podlozi čija je pH bila 4, nijedan izolat nije rastao. Na pH 5, svi izolati roda *Pseudomonas*, kao i aktinomicete A1 i A2, su rasli. Na podlogama čija je pH bila 6 i 7, svi izolati su imali optimalan rast (Tabela 6).

Tabela 6. Odnos izolata prema različitim vrednostima pH, koncentracijama NaCl i temperaturi

Izolati	pH podloge				NaCl (%)			T (°C)				
	4	5	6	7	3	5	7	3	13	28	37	45
P1	-	++	++	++	++	++	-	+	++	++	++	+
P12	-	++	++	++	++	++	-	+	++	++	++	+
P9	-	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	+
B1	-	-	++	++	++	++	++	-	++	++	++	+
B3	-	-	++	++	++	++	-	-	++	++	++	+
B6	-	-	++	++	++	++	+	-	++	++	++	+
A1	-	++	++	++	++	++	+++	-	++	++	++	-
A2	-	++	++	++	++	++	+	-	+	++	++	-
A3	-	-	++	++	++	+	+	-	+	++	++	-

- ne raste; + minimalan rast; ++ optimalan rast; +++ obilan rast

Osmotski pritisak je jedan od veoma promenljivih faktora spoljašnje sredine koji utiče na život mikroorganizama. U zemljišnom rastvoru nalaze se mnoga mineralna, organska i organsko-mineralna jedinjenja, koloidne disperzije, kao i izvesna količina rastvorenih gasova. Osmotski pritisak zemljišnog rastvora se povećava sa povećanjem koncentracije hemijskih jedinjenja i stepena njihove disocijacije, a smanjuje sa povećanjem sadržaja vode. Usvajanje vode iz zemljišnog rastvora od strane mikroorganizama moguće je jedino ako je osmotski pritisak u ćeliji mikroorganizama veći od osmotskog pritiska zemljišnog rastvora.

Uticaj osmotskog pritiska na rast izolata ispitan je dodavanjem različitih količina NaCl.

Na podlogama koje su sadržavale 3% i 5% NaCl, svi izolati su imali optimalan rast (Tabela 6). Na podlozi sa 7% NaCl optimalan rast imali su izolati P9 i B1. Na istoj podlozi minimalan rast utvrđen je kod izolata aktinomiceta A2 i A3, dok je obilan, stimulisan rast utvrđen kod izolata A1.

Temperatura je važan fizički faktor spoljašnje sredine za mikroorganizme. Toplota zemljišta utiče na rast i razmnožavanje mikroorganizama jer mikroorganizmi direktno zavise od temperature spoljne sredine s obzirom da nemaju sposobnost toplotne regulacije svoje ćelije. Optimalne temperature na kojima se mikroorganizmi razvijaju i rastu veoma su različite i kreću se od 0 do 75°C. Svaki mikroorganizam ima svoju optimalnu, minimalnu i maksimalnu temperaturu za rast. Prema optimalnim temperaturama za rast svi mikroorganizmi se mogu podeliti na psihrofile, koji zahvaljujući otpornosti njihovih enzima, transportnom sistemu elektrona i mehanizmu sinteze proteina, žive na temperaturi ispod 16°C, mezofilne koji najbolje rastu na temperaturama između 28-38°C i termofilne koji žive na temperaturama iznad 50°C.

Izolati roda *Pseudomonas* su imali optimalan rast na temperaturama 13, 28 i 37°C (Tabela 6). Na temperaturama 3 i 45°C utvrđen je minimalan rast ovih bakterija.

Kod izolata roda *Bacillus* na temperaturama 13, 28 i 37°C rast je bio optimalan. Utvrđeno je potpuno odsustvo rasta na 3°C, dok je na 45°C rast bio minimalan.

Rast sva tri izolata roda *Streptomyces* je izostao na temperaturi od 3 i 45°C. Na temperaturama 13, 28 i 37°C rast je bio optimalan za izolat A1. Izolati A2 i A3 imali su optimalan rast na temperaturama 28 i 37°C, dok je na temperaturi od 13°C utvrđen minimalan rast.

Uticaj teških metala na rast izolata

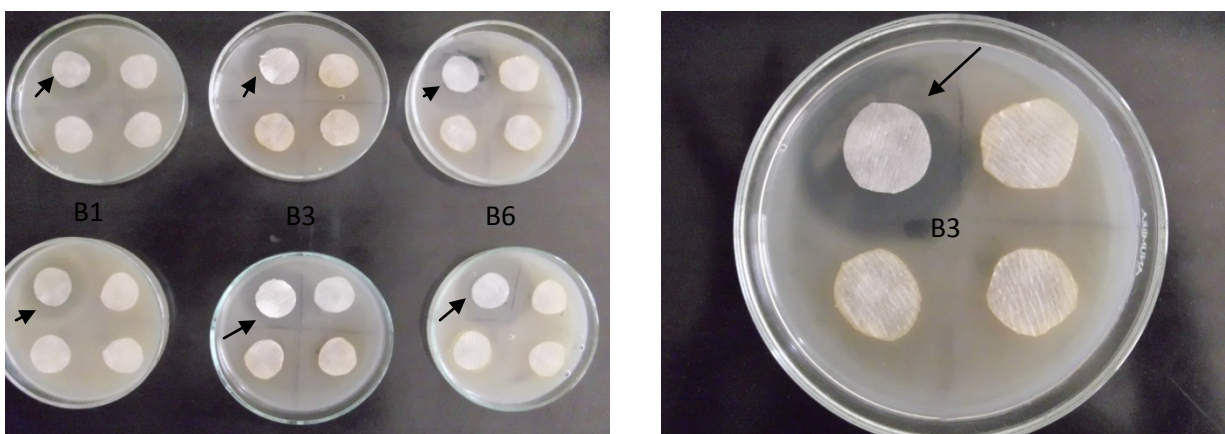
Utvrđeno je da ispitivane koncentracije rastvora metala nisu imale inhibitorno dejstvo ni na jedan izolat, osim kadmijuma, koji je pri koncentraciji 10^{-2} mol/dm³ inhibitorno delovao na izolate *Bacillus*-a (Tabela 7).

Tabela 7. Uticaj teških metala na rast izolata

	Mangan			Kadmijum			Olovo		
mol/dm^3	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}
Izolati									
P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	-	-	-	++	-	-	-	-	-
B3	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
B6	-	-	-	++	-	-	-	-	-
A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- Bez zone; + zona od 1-5mm; ++ zona od 5-10mm; +++ zona veća od 10 mm;

Najveća zona izmerena je kod izolata B3, gde je zona inhibicije bila veća od 10 mm (Slika 12).

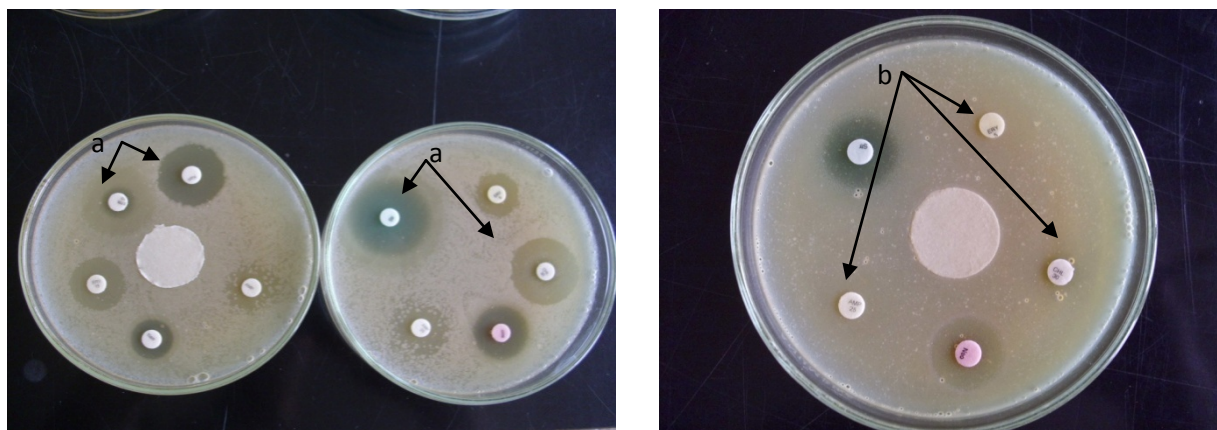


Slika 12. Uticaj metala kadmijuma na rast izolata roda *Bacillus*
(zone inhibicije rasta)

Uticaj antibiotika na rast izolata

Za ispitivanje rezistentnosti izolata na antibiotike korišteni su diskovi sa određenim antibioticima u različitim koncentracijama. Efekat primene antibiotika na rast izolata bio je različit, a zavisio je od vrste izolata, vrste i koncentracije antibiotika.

Na antibiotik Ampicilin, na koncentracije 10 i 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, bili su rezistentni sojevi P1, P12 i B3 (Tabela 8). Sojevi A1 i A3 su bili rezistentni na manju koncentraciju. Najveća zona inhibicije utvrđena je kod sojeva P9 i A2 pri koncentraciji od 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Slika 13).



Slika 13. Uticaj različitih antibiotika na rast izolata *Bacillus* sp. B3
(a- zona inhibicije; b- bez zone inhibicije)

Antibiotik neomicin, koncentracije 10 i 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$, inhibitorno je delovao na sve izolate (Tabela 8). Najveće zone inhibicije su izmerene kod sva tri izolata aktinomiceta. Najmanje zone inhibicije izmerene su kod izolata P9.

Utvrđeno je da antibiotik eritromicin u koncentracijama 5 i 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ nema inhibitorno dejstvo na sojeve pseudomonasa. Najveća zona inhibicije izmerena je kod izolata A2 pri koncentraciji antibiotika od 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Tabela 8. Otpornost izolata na antibiotike

Izolati	Amp.1 0*	Amp.2 5	Neo.1 0	Neo.3 0	Ery. 5	Ery.1 5	Str.1 0	Str.30 0	Chl .	Kan .
P1	-	-	+	++	-	-	+	++	-	++
P12	-	-	+	++	-	-	+	+++	+	+++
P9	+	++	+	+	-	-	+	++	+	+
B1	+	+	+	++	+	++	+	+	++	++
B3	-	-	+	++	+	+	+	+	+	++
B6	+	+	+	++	+	++	++	+++	+++	++
A1	-	+	+++	+++	+	+	++	+++	+	+++
A2	+	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++
A3	-	+	+++	+++	+	+	++	+++	+	+++

*Amp.- ampicilin; Neo.-neomicin; Ery.-eritrimicin; Str.-streptomycin; Chl.-hloramfenimkol; Kan.- kanamicin;

- bez zone inhibicije; + zona od 1-5mm; ++ zona od 5 -10 mm; +++ zona veća od 10 mm;

Streptomycin, koncentracije 10 i 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$, inhibitorno je delovao na sve izolate, pri čemu je veća koncentracija ovog antibiotika snažnije delovala. Najveće zone inhibicije utvrđene su kod izolata P12, B6, A1, A2 i A3. Kod izolata A2, streptomycin je snažno delovao i svojom manjom koncentracijom.

Hloramfenikol i kanamicin, koncentracije 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$, imali su inhibitorno dejstvo na sve izolate, osim antibiotika hloramfenikol na izolat P1, gde je utvrđena rezistentnost. Najveće zone inhibicije utvrđene su kod izolata B6, kod antibiotika hloramfenikol, i izolata P12, A1, A2 i A3, kod antibiotika kanamicin.

Uticaoj pesticida na rast izolata

Uticaoj pesticida na mikroorganizme u zemljištu može biti inhibitoran, stimulativan ili bez efekta. Ako se koriste po propisu, većina pesticida ima mali efekat na mikroorganizme u zemljištu. Prema nameni dele se na insekticide, mikrobroicide i herbicide.

Za ispitivanje uticaja pesticida na izolate odabrana su tri herbicida, koji se primenjuju na širokolisne korove. To su herbicidi: metribuzin, oksifluorfen i bentazon. Ispitivan je uticaj preporučene doze, doze koja je 10 i 100 puta veća od preporučene.

Utvrđeno je da preporučene doze ispitivanih herbicida nisu imale inhibitorni uticaj na rast izolata (Tabela 9).

Herbicid Metribuzin, inhibitorno je delovao na rast izolata P9, B1 i A3 koncentracijom deset puta većom od preporučene (Slika 14 a). Zone inhibicije rasta su bile prečnika do 5 mm. Koncentracija sto puta veća od preporučene inhibitorno je delovala na rast svih izolata. Zone inhibicije rasta bile su prečnika do 5mm, osim kod izolata B3, gde je izmerena zona inhibicije bila veća od 5mm.

Tabela 9. Uticaj pesticida na rast izolata

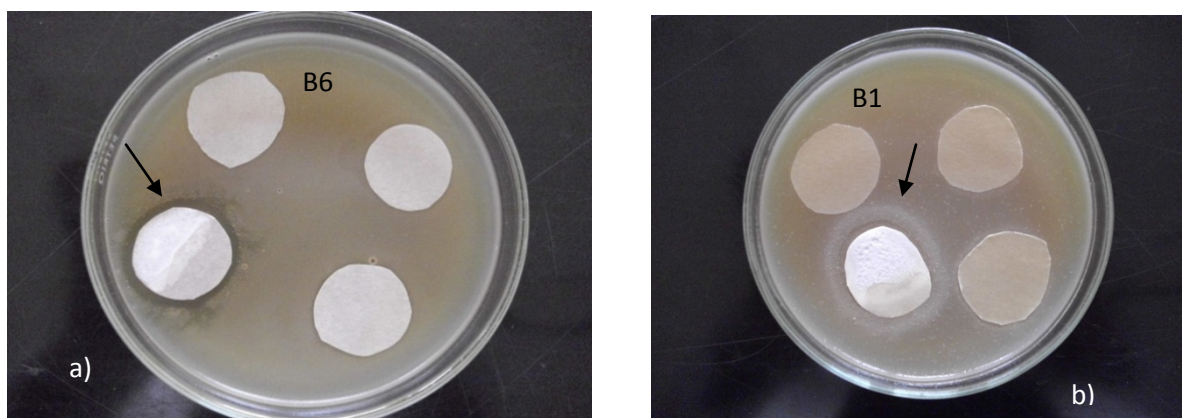
Izolati	Metribuzin			Oksifluorfen			Bentazon		
	Prep.*	10x	100x	Prep.	10x	100x	Prep.	10x	100x
P1	-	+	+	-	+	++	-	+	+
P12	-	+	+	-	+	+	-	+	++
P9	-	-	+	-	+	++	-	-	+
B1	-	-	+	-	-	+	-	-	***
B3	-	+	++	-	+	++	-	-	-
B6	-	+	+	-	-	+	-	+	+
A1	-	+	+	-	+	+	-	-	+
A2	-	+	+	-	+	+	-	-	+
A3	-	-	+	-	+	+	-	+	+

*Prep.- preporučena koncentracija; 10x – koncentracija deset puta veća od preporučene; 100x – koncentracija sto puta veća od preporučene

- bez zone inhibicije; + zona inhibicije od 1-5mm; ++ zona inhibicije veća od 5 mm; *** stimulacija rasta

Herbicid oksifluorfen pri koncentraciji deset puta većoj od preporučene, inhibirao je rast svih izolata osim izolata B1 i B6. Zone inhibicije su bile prečnika do 5mm. Pri koncentraciji sto

puta većoj od preporučene, inhibiran je rast svih izolata. Najveće zone inhibicije izmerene su kod izolata P1, P9 i B3 (veće od 5 mm).



Slika 14. Uticaj pesticida na rast izolata

(a- metribuzin, zona inhibicije rasta ; b- bentazon, zona stimulacije rasta)

Herbicid Bentazon je pri koncentraciji deset puta većoj od preporučene inhibitorno delovao samo na izolate P1, P12, B6 i A3. Prečnik zone inhibicije bio je do 5mm. Koncentracijom sto puta većom od preporučene, bentazon je inhibitorno uticao na rast svih izolata, osim izolata B3 i B1. Najveća zona inhibicije izmerena je kod izolata P12. Kod izolata B1, oko diska uočen je intezivniji rast izolata, što znači da je herbicid pri ovoj koncentraciji stumulisao rast bakterija (Slika 14 b).

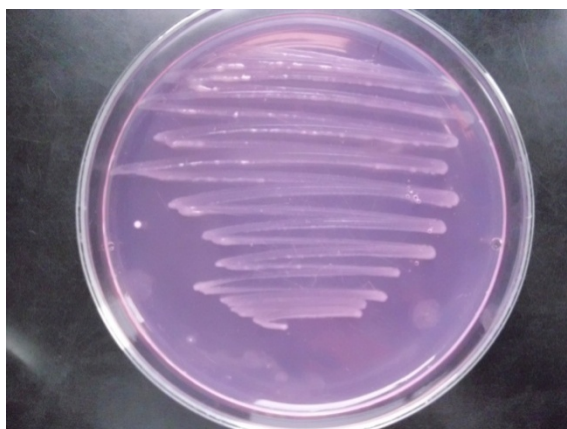
6.1.3. Biohemijske osobine izolata

Biohemijske osobine su karakteristika svake vrste, te je ispitivanje ovih osobina vrlo efikasan način za identifikaciju mikroorganizama.

Neki mikroorganizmi imaju sposobnost sinteze i oslobađanja ekstracelularnih enzima, (egzoenzima) kojima razgrađuju molekule proteina, lipida, polisaharida i dr. Mikroorganizmi koji proizvode egzoenzime se nalaze u zemljištu i vrlo su važni za procese razgradnje organskih materija. Važni egzoenzimi su ureaze, proteaze, lipaze, amilaze, pektinaze i celulaze.

Produkcija ureaze i želatinaze

Ureaza (E.C. 3.5.1.5) je kompleksan enzim koji katališe hidrolizu uree u amonijak i ugljendioksid. Ovaj enzim omogućava mnogim zemljišnim mikroorganizmima (gljivama, kvascima, aktinomicetama, cijanobakterijama, bakterijama) da koriste ureu kao izvor azota (Hasan, 2000; Toffanin i sar., 2002). Ureolitičke bakterije zahvaljujući enzimu ureazi razlažu ureu na NH_4^+ i ugljen-dioksid, dovodeći do alkalizacije hranljive podloge. U ovim istraživanjima utvrđeno je da svi ispitivani izolati produkuju ureazu i razlažu ureu do amonijaka i ugljen-dioksida, osim gljive *Trichoderma asperellum* (Tabela 10). Pojava crvenkaste boje indikatora u hranljivoj podlozi dokaz je razgradnje ureje (Slika 15).



Slika 15. Produkcija ureaze (*Pseudomonas* sp. P9)

Neke bakterije sintetišu ekstracelularne proteaze koje razgrađuju proteine do peptida. Peptidi mogu biti dalje razgrađeni do aminokiselina ekstracelularnim peptidazama ili transporotovani u ćeliju. Bakterije roda *Pseudomonas* i *Bacillus*, kao i aktinomicete sintetišu ekstracelularne proteaze. Proteolitička sposobnost bakterija testira se na podlogama koje sadrže želatin.



Slika 15. Produkcija želatinaze

U ovim istraživanjima utvrđeno je da svi izolati roda *Bacillus* i svi izolati aktinomiceta imaju sposobnost da hidrolizuju želatin (Tabela 10) (Slika 16). Izolat P12 je jedini izolat iz roda *Pseudomonas* koji vrši hidrolizu želatina, dok ostala dva soja nemaju tu sposobnost.

Tabela 10. Produkcija ekstracelularnih enzima

Izolati	Ureaza	Želatinaza	Proteaza	Lipaza	Amilaza	Pektinaza	Celulaza
P1	+	-	-	+	-	-	-
P12	+	+	-	+	-	-	+
P9	+	-	-	-	-	-	+
B1	+	+	-	+	-	-	-
B3	+	+	-	+	+	-	-
B6	+	+	-	+	+	-	+
A1	+	+	-	+	-	-	+
A2	+	+	+	-	-	-	+
A3	+	+	-	+	-	-	+
<i>Trichoderma asperellum</i>	-	/	/	/	+	-	+

+ pozitivna reakcija; - negativna reakcija

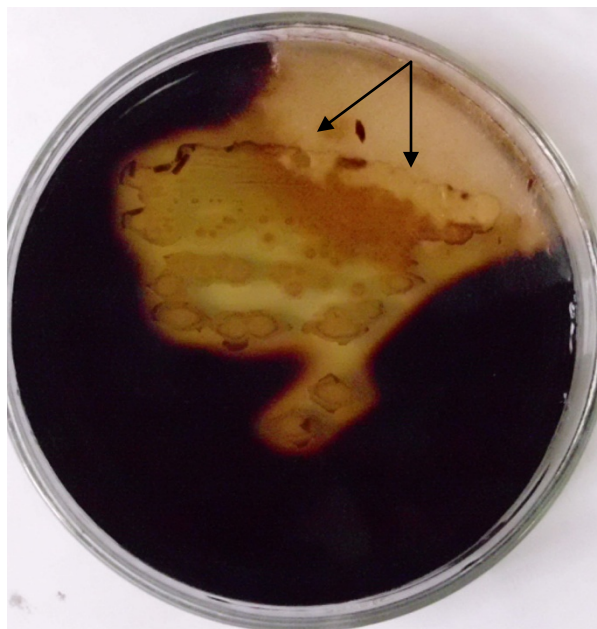
Produkcija lipaze i amilaze

Lipidolitičke bakterije imaju sposobnost da stvaraju lipazu koja razlaže masti na glicerol i masne kiseline.

Svi ispitivani izolati, osim izolata P9 i A2, pokazali su sposobnost razlaganja masti, odnosno produkcije ekstracelularnih lipaza (Tabela 10).

Sposobnost bakterija da vrše hidrolizu skroba do oligosaharida i maltoze zasniva se na njihovoj sposobnosti da sintetišu jedan specifičan egzoenzim, amilazu. Neke bakterije imaju sposobnost da hidrolizuju skrob, a druge ne, te je određivanje ove metaboličke karakteristike važno za njihovu karakterizaciju.

Sposobnost da hidrolizuju skrob imali su izolati iz roda *Bacillus*, B3 i B6, dok kod ostalih izolata nije utvrđena pozitivna reakcija (Slika 17). Takođe, za gljivu *Trichoderma asperellum* utvrđena je sposobnost da produkuje amilazu (Tabela 10).



Slika 17. Produkcija amilaze izolata *Bacillus* sp.B3 (zona aktivnosti amilaze)

Produkcija pektinaze i celulaze

Pektinolitski mikroorganizmi sintetišu enzime pektinaze koji vrše razlaganje pektina. U aerobnim uslovima transformaciju vrše gljive i bakterije, dok u anaerobnim samo bakterije.

Nijedan ispitivani izolat nije imao sposobnost razlaganja pektina, odnosno sposobnost sinteze enzima pektinaze (Tabela 10).

Transformacija celuloze predstavlja vrlo značajan proces u zemljištu. S obzirom da najveći deo celokupne sveže organske materije otpada na ovaj polisaharid njegova razgradnja je od presudnog značaja za stvaranje humusa. Raznovrsni mikroorganizmi imaju sposobnost razgradnje celuloze u zemljištu. U ovim istraživanjima najveću celulaznu aktivnost pokazali su izolati aktinomiceta (Tabela 10). Obezbojene zone oko kolonije-dokaz celulazne aktivnosti (Slika 18).

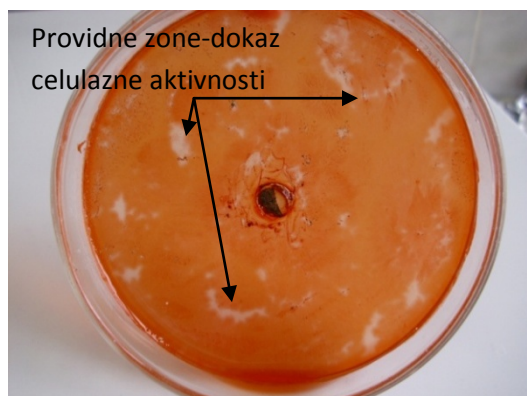


Slika 18. Produkcija celulaze

a) *Streptomyces* sp. A2; b) *Streptomyces* sp. A1

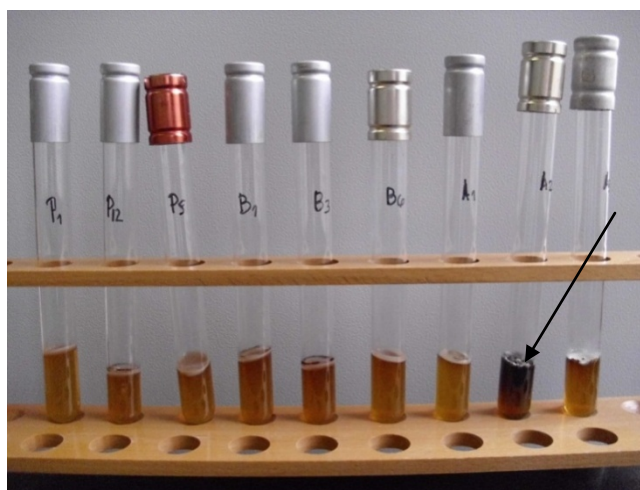
Pojedini izolati iz rodova *Pseudomonas* i *Bacillus* (P12, P9 i B6) su takođe pokazali celulaznu aktivnost, ali je ona bila slabija u odnosu na izolate aktinomiceta. Kod izolata P1, B1 i B3 ona nije utvrđena (Tabela 10).

Utvrđeno je da *Trichoderma asperellum* produkuje celulazu, ali ne i pektinazu (Slika 19).

Slika 19. Produkcija celulaze kod *Trichoderma asperellum*

Produkcija proteaze

Kao krajnji produkt katabolizma proteina, peptida i amonokiselina od strane bakterija može da se izdvoji gas vodonik-sulfid (H_2S). Ovaj gas u reakciji sa jonima gvožđa formira crni, nerastvorljivi talog (FeS).



Slika 20. Produkcija vodonik-sulfida (crni talog)

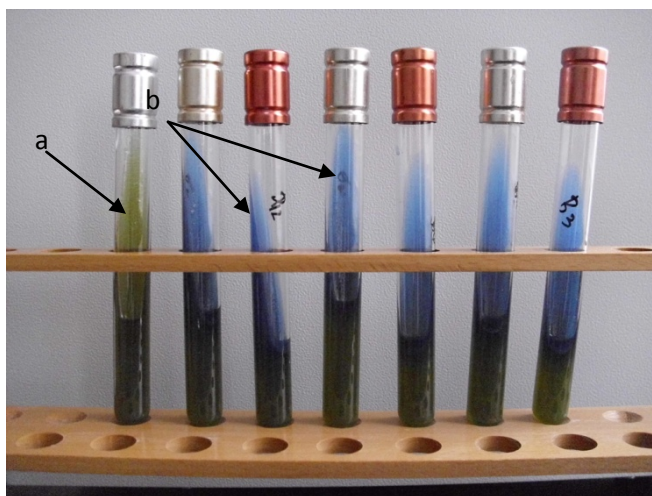
U ovim istraživanjima samo je kod jednog izolata aktinomiceta (A2) utvrđeno oslobađanje vodonik-sulfida u vidu stvaranja crnog taloga gvožđa-sulfida, FeS (Tab 10) (Slika 20).

Korišćenje citrata

Za transport molekula kroz citoplazmatičnu membranu u ćeliju neophodni su specifični membranski proteinski kompleksi označeni kao permeaze. Nakon ulaska u ćeliju mali molekuli bivaju uključeni u ćelijski metabolizam i iskorišćeni kao izvor energije ili kao gradivni elementi za sintezu specifičnih ćelijskih makromolekula.

Neke bakterije su sposobne da kao izvor energije koriste citrate, zahvaljujući posedovanju specifičnih enzimskih sistema za njihov transport i katabolizam.

Promena boje podloge iz zelene u plavu služi kao dokaz da mikroorganizam koristi citrate za izvor energije. U ovim istraživanjima svi izolati roda *Pseudomonas* i *Bacillus*, kao i jedan izolat aktinomiceta (A1), su imali sposobnost da koriste citrate iz podloge, dok kod ostala dva izolata aktinomiceta ta sposobnost nije bila utvrđena (Slika 21).



Slika 21. Sposobnost korišćenja citrate
(a-kontrola; b-izolati)

Uticaj izolata na rast pojedinih gljiva

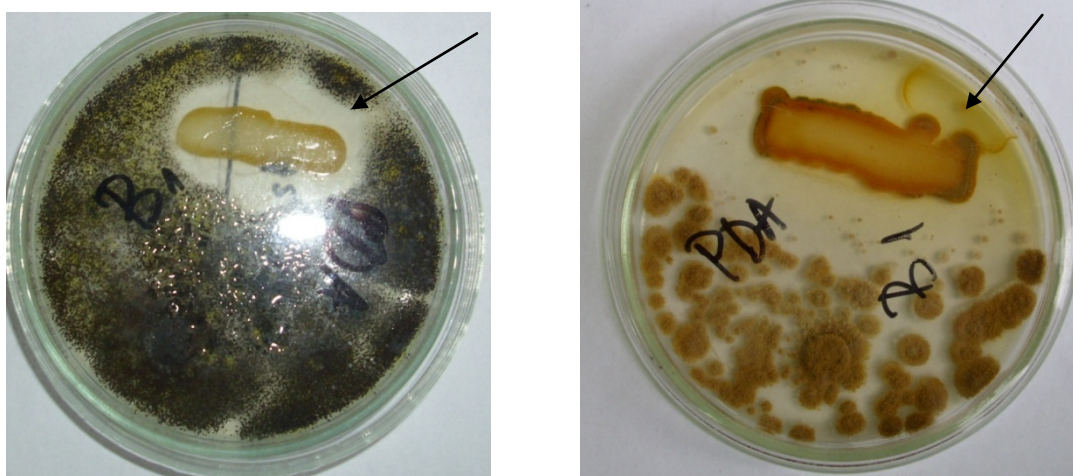
Utvrđeno je da ispitivani izolati nisu imali inhibitorno dejstvo na rast gljiva, osim jednog izolata roda *Bacillus* i gljive *Trichoderma asperellum* (Tabela 11).

Tabela 11. Inhibitorni uticaj izolata i gljive *Trichoderma asperellum* na rast pojedinih gljiva

Izolati \ Gljive	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Sclerotinium sclerotiorum</i>
P1	-	-	-	-
P12	-	-	-	-
P9	-	-	-	-
B1	+	-	+	-
B3	-	-	-	-
B6	-	-	-	-
A1	-	-	-	-
A2	-	-	-	-
A3	-	-	-	-
<i>Trichoderma asperellum</i>	+	+	+	+

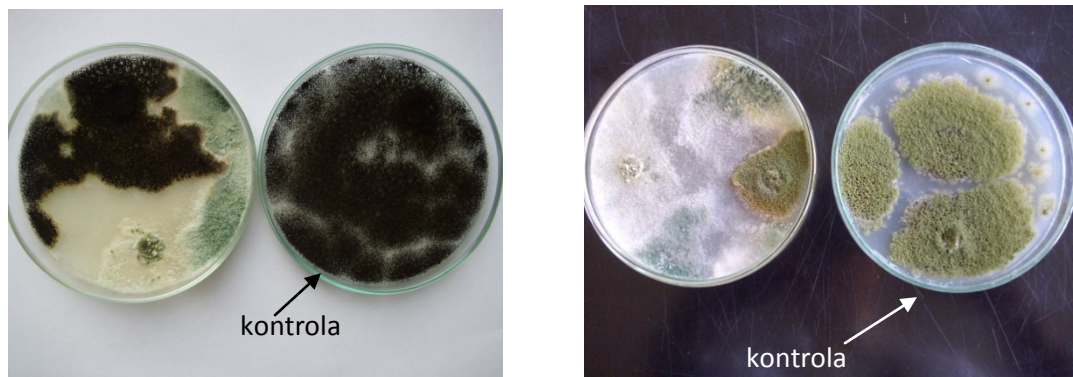
+ inhibitorni uticaj na rast gljive; - bez uticaja na rast gljive

Izolat B1 je inhibitorno delovao na *Fusarium* sp. i *Aspergillus flavus*. Rast *Fusarium* sp. bio je za 52,8%, a rast *Aspergillus flavus* za 60% slabiji u ogleđnoj petri kutiji u odnosu na rast gljive u kontrolnoj (Slika 22).



Slika 22. Antagonistički odnosi izolata B1 i gljiva (*Aspergillus flavus*, *Fusarium* sp.) (zone inhibicije rasta)

Trichoderma asperellum je pokazala antagonistički odnos prema gljivama *Fusarium* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* i *Sclerotinium sclerotiorum*. (Slika 23). Svojim brzim rastom, *Trichoderma asperellum* je onemogućila rast i razvoj gljiva, dok su se u kontrolnoj petri-kutiji nesmetano širile po celoj površini.



Slika 23. Antagonizam gljive *Trichoderma asperellum* prema *Aspergillus niger* i *Fusarium* sp.

6.1.4. Plant growth promotion (PGP) osobine

Od PGP osobina ispitivane su: produkcija indol-sirćetne kiseline (IAA), egzopolisaharida, siderofora, HCN i sposobnost rastvaranja organskih i neorganskih jedinjenja fosfora.

Produkcija indol-sirćetne kiseline (IAA)

Svi izolati su produkovali indol-sirćetnu kiselinu u podlozi u kojoj nije bio dodat L-triptofan. Produkcija IAA se kretala u rasponu od 0,71 – 16,93 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Kao najbolji producent IAA pokazao se izolat B6 (*Bacillus* sp.) (Tabela 12). Najslabiji producenti bili su izolati aktinomiceta.

Kod svih izolata produkcija IAA u podlozi sa dodatkom L-triptofana bila je veća od one u podlozi u kojoj nije bio dodat.

Nakon 24 h, u podlozi u kojoj je bilo dodato 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ L-triptofana, produkcija IAA kretala se u rasponu od 3,18 – 19,75 $\mu\text{g ml}^{-1}$, pri čemu je najmanja količina produkovane IAA utvrđena kod izolata P1. Najveća količina produkovane IAA utvrđena je kod izolata B3- 19,75 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Nakon 48 h, u istoj podlozi, produkcija IAA se kretala u rasponu od 26,89 do 5,11 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Najveća količina produkovane IAA utvrđena je kod izolata B3, a najmanja kod izolata P9.

Tabela 12. Produkcija Indol-sirćetne kiseline (IAA) ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

Produkcija IAA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)						
	24 h (L triptofan $\mu\text{g ml}^{-1}$)			48h (L triptofan $\mu\text{g ml}^{-1}$)		
Izolati	0	200	500	0	200	500
P1	1,93	3,18	3,25	7,06	7,68	11,00
P12	2,42	5,39	7,07	5,32	12,82	12,93
P9	2,61	4,96	6,61	4,89	5,11	8,07
B1	3,25	4,60	6,43	3,78	9,71	10,03
B3	12,07	19,75	20,53	16,93	26,89	31,71
B6	3,72	5,96	7,50	6,93	13,43	15,00
	Nakon 7 dana			Nakon 14 dana		
A1	0,71	0,96	1,07	1,36	5,64	1,21
A2	1,86	1,82	2,82	2,32	2,68	3,61
A3	0,71	0,75	2,78	1,75	2,28	6,03

Nakon 24 h, u podlozi u kojoj je bilo dodato $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ L-triptofana, produkcija IAA kretala se u rasponu od $3,25 - 20,53 \mu\text{g ml}^{-1}$, pri čemu je najmanja količina produkovane IAA utvrđena kod izolata P1, a najveća kod izolata Bacillus-a, B3.

Nakon 48 h, u istoj podlozi, produkcija IAA se povećala. Količina produkovane IAA kretala se u rasponu od $8,07 - 31,71 \mu\text{g ml}^{-1}$. Najveća količina utvrđena je kod izolata B3, a najmanja kod P1.

Produkcija IAA kod izolata aktinomiceta bila je manja nego kod izolata rodova *Pseudomonas* i *Bacillus*, i kretala se u rasponu od $0,71$ do $6,03 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Nakon 7 dana, u podlozi gde je dodato $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ L-triptofana, najveća količina produkovane IAA utvrđena je kod izolata A2- $1,82 \mu\text{g ml}^{-1}$, a najmanja kod izolata A3- $0,75 \mu\text{g ml}^{-1}$. Nakon 14 dana, količina produkovane IAA se povećala. Najveća količina IAA je utvrđena kod izolata A1- $5,64 \mu\text{g ml}^{-1}$, a najmanja kod A3- $2,28 \mu\text{g ml}^{-1}$.

U podlozi u kojoj je dodato $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ L-triptofana, nakon 7 dana, utvrđeno je da je najbolji producent IAA bio izolat A3 ($2,78 \mu\text{g ml}^{-1}$), a najslabiji A1 ($1,07 \mu\text{g ml}^{-1}$). Nakon 14 dana, količina produkovane IAA se povećala. Najveća količina je utvrđena kod izolata A3- $6,03 \mu\text{g ml}^{-1}$, a najmanja kod izolata A1- $1,21 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Produkcija siderofora, cijanovodonika (HCN) i egzopolisaharida

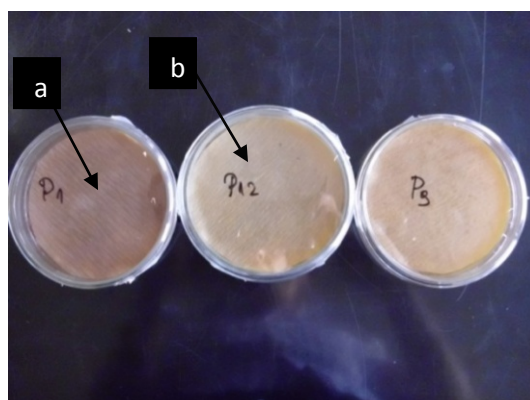
Najveći producenti siderofora bili izolati roda *Pseudomonas*. Kod izolata P1 i P9, izmerene su zone veće od 20 mm, dok je kod izolata P12 širina zone bila nešto manja (Tabela 13). Zone promene boje iz plave u narandžastu dokaz su sposobnosti izolata da produkuje siderofore (Slika 24).



Slika 24. Produkcija siderofora

Kod izolata roda *Bacillus* nije utvrđena sposobnost produkcije siderofora. Kod aktinomiceta, izolat A2, produkuje siderofore. Širina zone bila je do 5 mm.

Produkcija **cijanovodonika** utvrđena je kod svih izolata iz roda *Bacillus* (Tabela 13). Najslabiji producenti bili su izolati aktinomiceta. Samo izolat A3 je produkovao HCN. Kod izolata roda *Pseudomonas*, za izolate P1 i P9 je utvrđeno da produkuju ovaj gas (Slika 25).



Slika 25. Produkcija cijanovodonika

(a- promena boje diska iz žute u braon dokaz produkcije HCN; b-bez promene boje)

Produkcija **egzopolisaharida** je utvrđena kod svih izolata roda *Bacillus*. Kod izolata aktinomiceta nije utvrđena sposobnost produkcije egzopolisaharida, a kod izolata P12 produkcija je bila slaba (Tabela 13).

Tabela 13. Produkcija siderofora, HCN, egzopolisaharida, rastvaranje organskog i neorganskog P

Izolati	Siderophore ^a	HCN ^b	Egzopolisaharidi ^c	Neorganski P ^d	Organski P ^d
P1	+++	+	+	+	+
P12	++	-	+-	-	+
P9	+++	+	+	-	+
B1	-	+	+	+	+
B3	-	+	+	+	-
B6	-	+	+	-	+
A1	-	-	-	-	+
A2	+	-	-	-	+
A3	-	+	-	-	-

^a širina zone : + 0-5 mm; ++ 5-20 mm; +++ ≥ 20 mm

^b + produkuje; - ne produkuje

^c + produkuje egzopolisaharide; +- oskudna produkcija egzopolisaharida; - ne produkuje egzopolisaharide

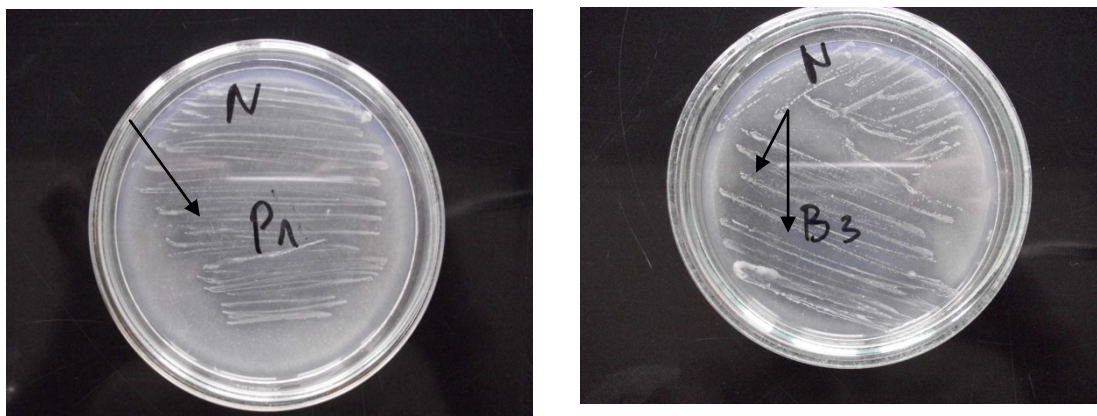
^d + pozitivna reakcija; - negativna reakcija

Sposobnost razlaganja organskih i neorganskih jedinjenja fosfora

Teško rastvorljiva neorganska jedinjenja fosfora, koja se nalaze u zemljištu, postaju pristupačna biljkama nakon prevođenja u rastvorljiva jedinjenja. U tom procesu mikroorganizmi imaju nezamenljivu ulogu.

Većina ispitivanih izolata nije rastvarala fosfate. Jedini izolati koji su rastvarali fosfate su jedan izolat iz roda *Pseudomonas*, P1, i dva izolata roda *Bacillus*, B1 i B3 (Tabela 13). Providna

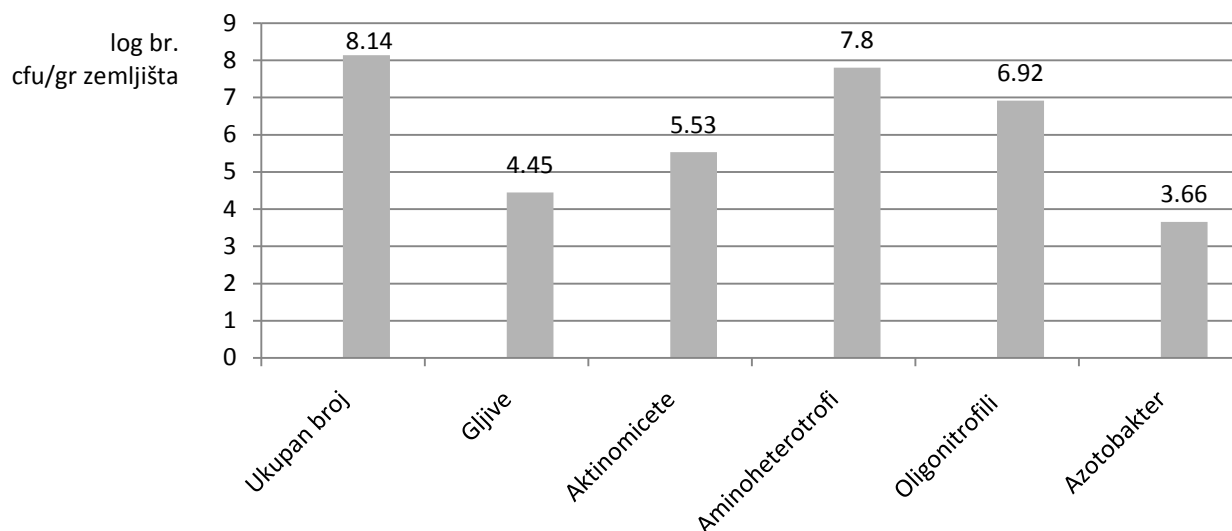
zona oko kolonija dokaz je sposobnosti mikroorganizma da rastvara fosfate (Slika 26). Utvrđeno je da svi izolati produkuju fosfolipazu, osim izolata iz roda *Bacillus*, B3 (Tabela 13).



Slika 26. Solubilizacija fosfora

6.2. MIKROBIOLOŠKE KARAKTERISTIKE ZEMLJIŠTA PRE INOKULACIJE I SETVE

Brojnost ispitivanih grupa mikroorganizama u zemljištu pre inokulacije i setve bila je relativno visoka (Grafik 1).



Grafik.1. Brojnost mikroorganizama u zemljištu pre setve i inokulacije

Ukupan broj mikroorganizama, brojnost aminoheterotrofa i oligonitrofila kretala se u milionima ćelija u gramu apsolutno suvog zemljišta. Brojnost aktinomiceta kretala se u stotinama hiljada, a brojnost gljiva u desetinama hiljada u gramu apsolutno suvog zemljišta. Najmanja brojnost utvrđena je za rod *Azotobacter*, čija se brojnost kretala u hiljadama.

Dehidrogenazna aktivnost u ispitivanom zemljištu bila je niska, 302,85 mg TPF g⁻¹ zemljišta.

6.3.EFEKAT INOKULACIJE NA BROJNOST MIKROORGANIZAMA U RIZOSFERI ENGLESKOG LJULJA

Efekat primene mikroorganizama u biljnoj proizvodnji zavisi od biljne vrste, vrste mikroorganizama, količine i vrste đubriva, vremena i mesta uzorkovanja. Primenom bakterija u biljnoj proizvodnji povećava se broj i enzimatska aktivnost mikroorganizama što povećava proizvodnu sposobnost zemljišta (Govedarica, 1986; Cvijanović, 2002).

Na osnovu utvrđenih fiziološko-biohemijskih osobina i PGP svojstava, za ispitivanje efekta introdukcije izolata na brojnost i aktivnost mikroorganizama u rizosferi engleskog ljulja, odabrani su sojevi P12 (*Pseudomonas* sp.), B1 (*Bacillus* sp.), A3 (*Streptomyces* sp.) i gljiva *Trichoderma asperellum*.

6.3.1. Efekat inokulacije na brojnost i aktivnost mikroorganizama u prvoj godini istraživanja

Brojnost mikroorganizama

Ispitivan je uticaj primene inokulanata na ukupan broj mikroorganizama, broj gljiva, aktinomiceta, aminoheterotrofa i azotobaktera, nakon prvog i trećeg košenja. Primenjeni mikroorganizmi su različito uticali na broj ispitivanih grupa mikroorganizama. Nakon prvog košenja, broj ispitivanih grupa mikroorganizama u odnosu na kontrolu se povećao u svim varijantama. (Tabela 14).

Tabela 14. Efekat inokulacije na broj mikroorganizama u rizosferi engleskog ljulja nakon I otkosa

Varijante	Broj mikroorganizama u gramu apsolutno suvog zemljišta					
	Ukupan br. (10 ⁶)	Gljive (10 ⁴)	Aktinomicete (10 ⁵)	Aminoheterotrofi (10 ⁶)	Oligonitrofilni (10 ⁵)	Azotobakter (10 ²)
<i>Pseudomonas</i> sp. P12	37.16 ^a	11.87 ^b	6.69 ^{cb}	14.12 ^c	244,86 ^a	118.93 ^b
<i>Bacillus</i> sp. B1	30.84 ^d	27.6 ^a	8.29 ^{ab}	29.23 ^b	131,44 ^{ab}	130.06 ^a

<i>Streptomyces</i> sp. A3	33.45 ^b	3.67 ^c	4.88 ^{dc}	8.98 ^d	146,86 ^{ab}	55.07 ^c
<i>Trichoderma asperellum</i>	30.73 ^d	3.84 ^c	8.53 ^a	38.46 ^a	114,46 ^b	49.08 ^d
Kontrola	20.54 ^c	3.55 ^c	3.93 ^d	4.0 ^e	97,54 ^b	37.52 ^e

* Vrednosti sa različitim slovnim oznakama u superskriptu se prema Fišerovom testu statistički značajno razlikuju za $P < 0,05$

U ovim istraživanjima, nakon prvog otkosa, ukupan broj mikroorganizama kretao se od 20, 54 do 37, 16 x 10⁶. Najbolji efekat na povećanje ukupnog broja mikroorganizama imala je primena inokulacije *Pseudomonas* sp. P12. U ostalim varijantama je takođe došlo do statistički značajnog povećanja ukupnog broja mikroorganizama.

Ukupan broj gljiva kretao se od 3,55 do 27,6x 10⁴. Primena izolata *Bacillus* sp. B1 imala je najbolji efekat na povećanje broja gljiva. U varijanti gde je bio primenjen izolat *Pseudomonas* sp. P12 takođe je utvrđeno statistički značajno povećanje broja gljiva. U ostalim varijantama povećanje broja gljiva u odnosu na kontrolu nije bilo statistički značajno.

U ovim istraživanjima broj aktinomiceta kretao se od 3,55 do 8,29 x 10⁵. Na brojnost aktinomiceta najviše je uticala primena bacilusa i trihoderme. U varijanti gde je bio primenjen izolat *Streptomyces* sp. A3 utvrđeno je povećanje broja aktinomiceta, ali to povećanje nije bilo statistički značajno.

Broj aminoheterotrofa kretao se od 4,0 do 29,23 x 10⁶. Najbolji efekat na povećanje broja aminoheterotrofa imala je primena *Bacillus* sp. B1 i *Trichoderma asperellum*. U ostalim varijantama je takođe utvrđeno statistički značajno povećanje broja aminoheterotrofa.

Broj oligonitrofila kretao se od 97,5 do 244,86 x 10⁵. Na brojnost oligonitrofila pozitivno je uticala primena svih inokulanata, ali je samo u varijanti sa primenjenim pseudomonasom utvrđeno statistički značajno povećanje brojnosti.

U ovim istraživanjima broj azotobaktera se kretao od 37,52 do 130,06 x 10². Najbolji efekat na brojnost azotobaktera dala je primena *Bacillus* sp. B1 i *Pseudomonas* sp. P12. U ostalim varijantama je takođe utvrđeno statistički značajno povećanje broja azotobaktera.

U proseku, nakon I košenja, najbolji efekat na brojnost ispitivanih grupa mikroorganizama imala je primena bakterija *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1, kao i gljive *Trichoderma asperellum*. U proseku, primenjeni inokulanti najviše su uticali na povećanje broja aminoheterotrofa i azotobaktera, a najslabiji efekat utvrđen je kod ukupnog broja mikroorganizama.

Nakon trećeg košenja, utvrđeno je da su primenjeni inokulanti različito uticali na ispitivane grupe mikroorganizama (Tabela 15).

Tabela 15. Efekat inokulacije na broj mikroorganizama u rizosferi Engleskog ljulja nakon III otkosa

Varijante	Broj mikroorganizama u gramu apsolutno suvog zemljišta					
	Ukupan br. (10 ⁶)	Gljive (10 ⁴)	Aktinomicete (10 ⁵)	Aminoheterotrofi (10 ⁶)	Oligonitrofilni (10 ⁵)	Azotobakter (10 ²)
<i>Pseudomonas</i> sp. P12	42.97 ^b	8.6 ^a	19.77 ^d	42.97 ^b	325,4 ^a	165.54 ^d
<i>Bacillus</i> sp. B1	25.72 ^c	7.02 ^a	21.87 ^c	21.03 ^c	106,68 ^c	229.26 ^a
<i>Streptomyces</i> sp. A3	23.15 ^d	2.57 ^c	21.43 ^{cd}	18.85 ^d	221,92 ^b	210.02 ^c
<i>Trichoderma asperellum</i>	56.30 ^a	4.96 ^b	6.62 ^b	73.51 ^a	116,87 ^c	223.52 ^b
Kontrola	13.88 ^e	3.78 ^{cb}	14.03 ^a	13.25 ^c	118,44 ^c	133.15 ^e

* Vrednosti sa različitim slovnim oznakama u superskriptu se prema Fišerovom testu statistički značajno razlikuju za $P < 0,05$

Nakon trećeg otkosa, ukupan broj mikroorganizama kretao se od 13,88 do 56,30 x 10⁶. Svi primenjeni inokulanti su imali pozitivan efekat na povećanje ukupnog broja mikroorganizama. Najbolji efekat postignut je primenom pseudomonasa i trihoderme.

Broj gljiva kretao se od 3,78 do 8,6 x 10⁴. Najbolji efekat na broj gljiva imala je primena *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1. U varijanti gde je bila primenjena aktinomiceta utvrđeno je smanjenje broja gljiva, ali to smanjenje nije bilo statistički značajno.

Na povećanje brojnosti aktinomiceta najviše je uticala primena *Bacillus* sp. B1 ($21,87 \times 10^5$) i *Streptomyces* sp. A3 ($21,43 \times 10^5$). U varijanti gde je bila primenjena trihoderma ($6,62 \times 10^5$) utvrđeno je statistički značajno smanjenje broja aktinomiceta.

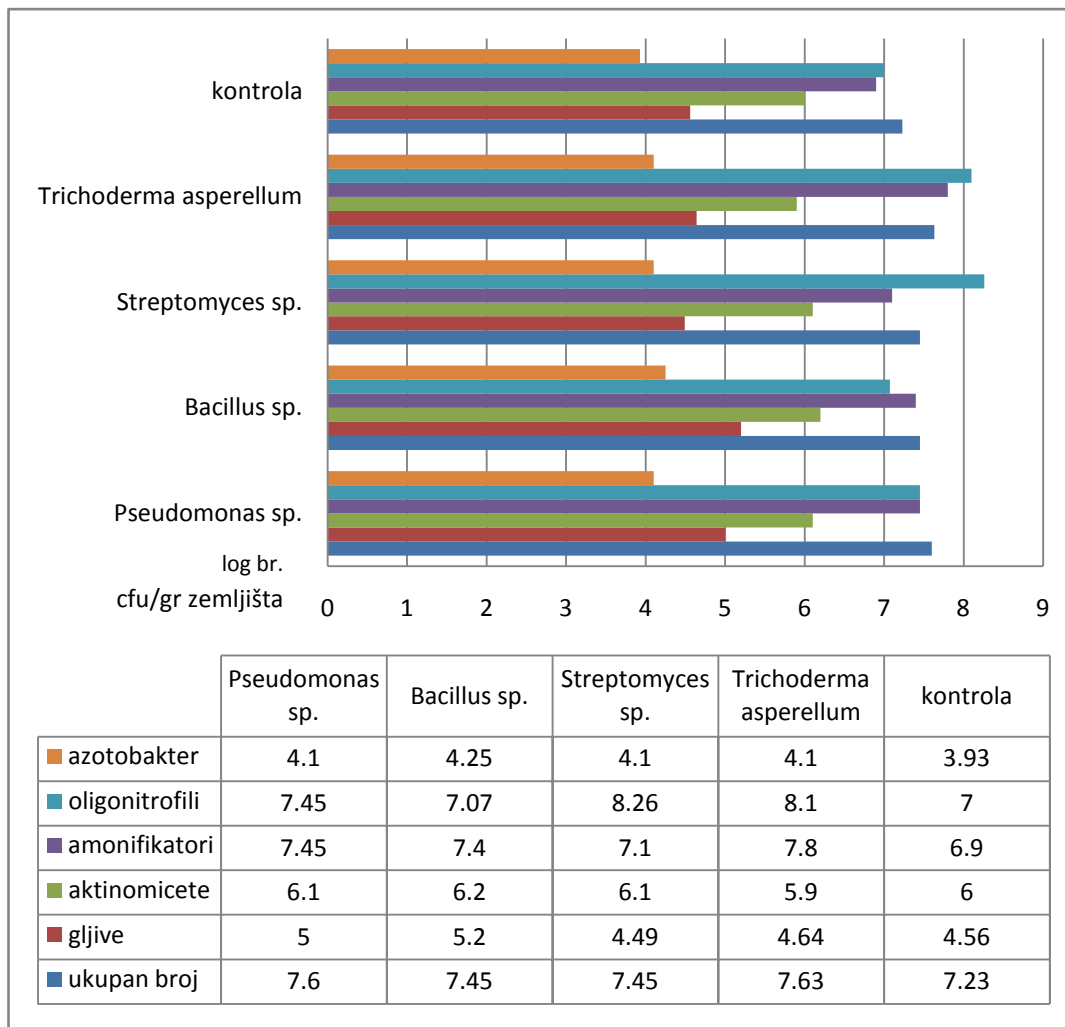
Na brojnost aminoheterotrofa svi primenjeni inokulanti su imali pozitivan uticaj. Najbolji efekat postignut je primenom gljive *Trichoderma asperellum* ($73,51 \times 10^6$) i bakterije *Pseudomonas* sp. P12 ($42,97 \times 10^6$).

Broj oligonitrofila kretao se od 116,87 do $325,84 \times 10^5$. Unošenjem *Pseudomonas* sp. P12 i *Streptomyces* sp. A3 postignut je najbolji efekat na broj oligonitrofila, dok primena ostalih inokulanata nije dovela do statistički značajnih razlika.

Primena *Bacillus* sp. B1 i gljive *Trichoderma asperellum* imala najbolji efekat na broj azotobaktera. U ostalim varijantama je takođe utvrđeno statistički značajno povećanje broja azotobaktera.

Nakon trećeg otkosa, primenom *Pseudomonas* sp. P12 postignut je najbolji efekat na povećanje brojnosti najvećeg broja ispitivanih grupa mikroorganizama. Takođe je i primena *Bacillus* sp. B1 i gljive *Trichoderma asperellum* dala dobre rezultate. Primena inokulanata je najviše uticala na povećanje ukupnog broja mikroorganizama, aminoheterotrofa i azotobaktera, dok je najslabiji efekat postignut kod aktinomiceta.

Na kraju prve godine istraživanja, u proseku, primenom bakterije *Bacillus* sp. B1 i gljive *Trichoderma asprellum* postignut je najbolji efekat na brojnost najvećeg broja ispitivanih grupa mikroorganizama (Grafik 2).



Grafik 2. Uticaj primene inokulanata na brojnost mikroorganizama (prosek) u toku I godine

Primena inokulanata najviše je uticala na povećanje ukupnog broja mikroorganizama, broja aminoheterotrofa i gljiva u odnosu na kontrolu, dok je najslabiji efekat postignut kod broja aktinomiceta.

Dehidrogenazna aktivnost

Na dehidrogenaznu aktivnost mikroorganizama u rizosferi engleskog ljulja primenjeni inokulanti su imali različit efekat (Tabela 16).

Nakon prvog otkosa, na povećanje dehidrogenazne aktivnosti najviše je uticala primena bakterije *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1. U varijanti gde je bila primenjena gljiva *Trichoderma asperellum* utvrđeno je statistički značajno smanjenje dehidrogenazne aktivnosti.

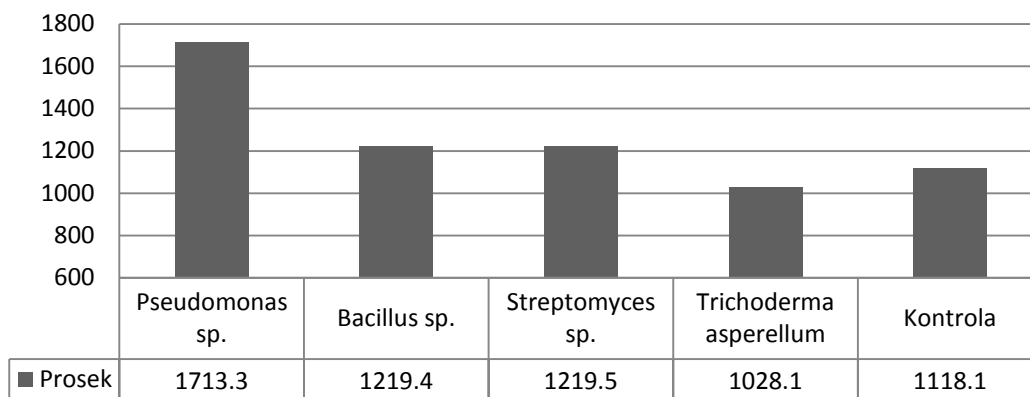
Tabela 16. Dehidrogenazna aktivnost rizosfernog zemljišta nakon I i III otkosa (TPF g⁻¹ zemljišta)

Varijante	I otkos	III otkos	Prosek
<i>Pseudomonas</i> sp. P12	1684,75 ^b	1741,9 ^a	1713,3
<i>Bacillus</i> sp. B1	1478,73 ^b	960,0 ^c	1219,4
<i>Streptomyces</i> sp. A3	1121,95 ^c	1317,1 ^b	1219,5
<i>Trichoderma asperellum</i>	750,47 ^a	1305,7 ^b	1028,1
Kontrola	1152,4 ^c	1083,83 ^c	1118,1

* Vrednosti sa različitim slovnim oznakama u superskriptu se prema Fišerovom testu statistički značajno razlikuju za $P < 0,05$

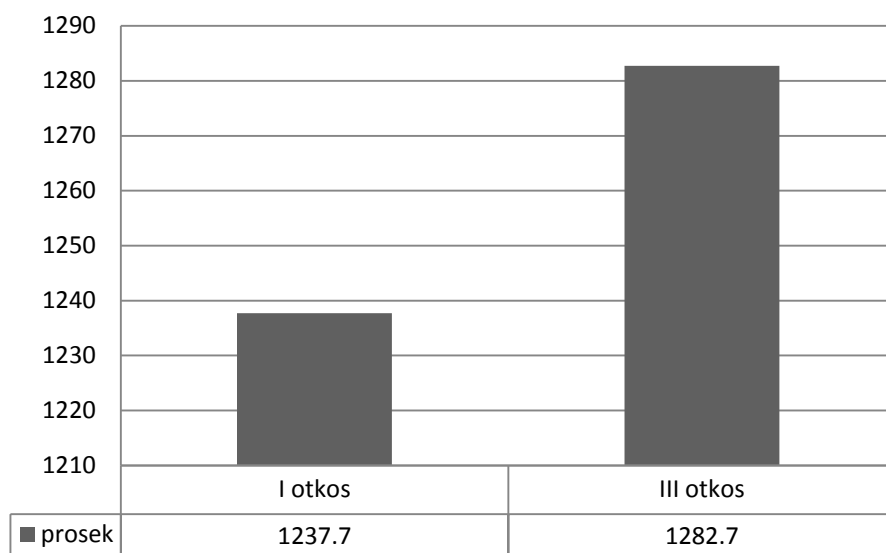
Nakon trećeg otkosa, najbolji efekat na povećanje dehidrogenazne aktivnosti imala je primena *Pseudomonas* sp. P12 i *Streptomyces* sp. A3, dok je u varijanti gde je bio primenjen *Bacillus* sp. B1 utvrđeno smanjenje dehidrogenazne aktivnosti, ali to smanjenje nije bilo statistički značajno.

U proseku, dehidrogenazna aktivnost je bila najveća u varijanti gde je primenjen *Pseudomonas* sp. P12, a najmanja u varijanti sa primenjenom gljivom (Grafik 3).



Grafik 3. Uticaj inokulacije na aktivnost dehidrogenaze u rizosferi engleskog ljulja (TPF g⁻¹ zemljišta) (prosek)

Na dehidrogenaznu aktivnost uticao je i period uzorkovanja. Veća dehidrogenazna aktivnost utvrđena nakon trećeg otkosa, odnosno na kraju vegetacionog perioda biljke (Grafik 4).



Grafik 4. Prosečna dehidrogenazna aktivnost nakon I i III otkosa

Praćenje brojnosti mikroorganizama introdukovanih grupa u rizosferi engleskog ljulja

Na kraju prve godine istraživanja, nakon trećeg otkosa, određivana je brojnost mikroorganizama introdukovanih grupa. U odnosu na kontrolu, najveće povećanje brojnosti mikroorganizama utvrđeno je za rod *Streptomyces*, a najslabije za bakterije roda *Bacillus* (Tabela 17).

Tabela 17. Brojnost mikroorganizama introdukovanih grupa

Grupe mikroorganizama	Broj mikroorganizama u gramu zemljišta	
	Kontrola	Varijanta
<i>Pseudomonas</i> sp.	$5,42 \times 10^3$	$7,77 \times 10^3$
<i>Bacillus</i> sp.	$1,87 \times 10^4$	$2,81 \times 10^4$
<i>Streptomyces</i> sp.	$1,45 \times 10^4$	$6,84 \times 10^4$
<i>Trichoderma asperellum</i>	$17,54 \times 10^3$	$19,04 \times 10^3$

6.3.2. Efekat inokulacije na brojnost i aktivnost mikroorganizama u drugoj godini istraživanja

Brojnost mikroorganizama

Efekat primene inokulanata na ispitivane grupe mikroorganizama u drugoj godini istraživanja nakon prvog i trećeg otkosa bio je različit (Tabela 18).

Tabela 18. Efekat inokulacije na broj mikroorganizama u rizosferi engleskog ljulja nakon I otkosa

Varijante	Broj mikroorganizama u gramu apsolutno suvog zemljišta					
	Ukupan br. (10^6)	Gljive (10^4)	Aktinomicete (10^5)	Aminoheterotrofi (10^6)	Oligonitrofilni (10^5)	Azotobakter (10^2)
<i>Pseudomonas</i> sp. P12	76,71 ^a	10,56 ^{ab}	8,52 ^{bc}	53,24 ^a	60,33 ^b	177,57 ^{ab}
<i>Bacillus</i> sp. B1	34,76 ^b	14,9 ^a	7,80 ^{bc}	6,38 ^c	73,77 ^b	223,45 ^a
<i>Streptomyces</i> sp. A3	32,08 ^b	9,7 ^{ab}	20,15 ^a	4,48 ^c	55,21 ^{ab}	182,8 ^{ab}
<i>Trichoderma asperellum</i>	58,27 ^a	6,9 ^b	6,13 ^c	72,83 ^b	84,33 ^b	193,47 ^{ab}
kontrola	25,74 ^b	5,3 ^b	15,9 ^{ab}	4,54 ^c	25,75 ^a	162,83 ^b

* Vrednosti sa različitim slovnim oznakama u superskriptu se prema Fišerovom testu statistički značajno razlikuju za $P < 0,05$

Ukupan broj mikroorganizama kretao se od 25,74 do 76,71 x 10^6 . Najbolji efekat na povećanje ukupnog broja mikroorganizama imala je primena inokulacije *Pseudomonas* sp. P12 i gljive *Trichoderma asperellum*. U ostalim varijantama je takođe došlo povećanja ukupnog broja mikroorganizama, ali to povećanje nije bilo statistički značajno.

Na povećanje broja gljiva najbolje rezultate dala je primena *Bacillus* sp. B1 (14,9 x 10^4). U ostalim varijantama povećanje broja gljiva u odnosu na kontrolu nije bilo statistički značajno.

Na brojnost aktinomiceta najviše je uticala primena *Streptomyces* sp. A3 ($20,15 \times 10^5$). U varijanti gde je bila primenjena *Trichoderma asperellum* utvrđeno je statistički značajno smanjenje broja aktinomiceta. U varijantama sa primenjenim bacilusom i pseudomonasom utvrđeno je povećanje broja aktinomiceta, ali to povećanje nije bilo statistički značajno.

Broj aminoheterotrofa kretao se od 4,48 do $72,83 \times 10^6$. Najbolji efekat na povećanje broja aminoheterotrofa imala je primena *Pseudomonas* sp. P12 ($53,24 \times 10^6$) i *Trichoderma asperellum* ($72,83 \times 10^6$). U ostalim varijantama nije došlo do statistički značajnih promena brojnosti aminoheterotrofa u odnosu na kontrolu.

Broj oligonitrofila kretao se od 25,75 do $84,33 \times 10^6$. Na brojnost oligonitrofila pozitivno je uticala primena svih inokulanata. Najbolji efekat imala je primena *Bacillus* sp. B1 i gljive *Trichoderma asperellum*.

Najbolji efekat na brojnost azotobaktera dala je primena bakterije *Bacillus* sp. B1 ($223,45 \times 10^2$). U ostalim varijantama je takođe utvrđeno povećanje broja azotobaktera, ali to povećanje nije bilo statistički značajno.

Nakon prvog otkosa, u proseku na povećanje brojnosti najvećeg broja ispitivanih grupa mikroorganizama najviše je uticala primena *Bacillus* sp. B1 i gljive *Trichoderma asperellum*. Primenjeni inokulanti su u proseku najviše uticali na povećanje ukupnog broja mikroorganizama i broja aminoheterotrofa, a najslabiji efekat postignut je kod aktinomiceta i azotobaktera.

Nakon trećeg otkosa utvrđeno je da je primena pojedinih inokulanata značajno uticala na promenu brojnosti ispitivanih grupa mikroorganizama.

Svi primenjeni inokulanti su pozitivno uticali na ukupan broj mikroorganizama (Tabela 19). Najbolji efekat imala je primena *Pseudomonas* sp. P12 ($90,61 \times 10^6$) a najslabiji primena *Streptomyces* sp. A3 ($21,33 \times 10^6$).

Tabela 19. Efekat inokulacije na broj mikroorganizama u rizosferi engleskog ljulja nakon III otkosa

Varijante	Broj mikroorganizama u gramu apsolutno suvog zemljišta					
	Ukupan	Gljive	Aktinomicete (10^5)	Aminoheterotrofi	Oligonitrofilni (10^5)	Azotobakter

	br. (10^6)	(10^4)		(10^6)		(10^2)
<i>Pseudomonas</i> sp. P12	90,61 ^a	14,13 ^{bc}	22,44 ^a	32,42 ^b	450,53 ^a	151,7 ^a
<i>Bacillus</i> sp. B1	30,51 ^b	10,77 ^{bc}	8,08 ^a	54,75 ^b	267,9 ^{ab}	91,99 ^{ab}
<i>Streptomyces</i> sp. A3	21,33 ^b	17,06 ^{bc}	10,24 ^a	17,91 ^b	156,11 ^{ab}	72,51 ^{bc}
<i>Trichoderma asperellum</i>	41,42 ^b	5,92 ^c	19,44 ^a	23,67 ^b	141,6 ^b	25,36 ^c
kontrola	15,77 ^c	20,11 ^{ab}	7,87 ^a	30,59 ^b	149,05 ^b	54,64 ^{bc}

* Vrednosti sa različitim slovnim oznakama u superskriptu se prema Fišerovom testu statistički značajno razlikuju za $P < 0,05$

Brojnost gljiva u vaijantama bila je manja u odnosu na kontrolu. Broj gljiva se kretao od 5,92 do $20,11 \times 10^4$, koliko je bilo u kontrolnoj varijanti. U varijanti sa primenjenom trihodermom utvrđeno je statistički značajno smanjenje broja gljiva. U ostalim varijantama smanjenje broja gljiva nije bilo statistički značajno.

Broj aktinomiceta se kretao od 7,87 do $22,44 \times 10^5$. Najbolji efekat na brojnost aktinomiceta imala je primena *Pseudomonas* sp. P12, ali to povećanje nije bilo statistički značajno. U ostalim varijantama je takođe došlo do povećanja broja aktinomiceta, ali bez statističkog značaja.

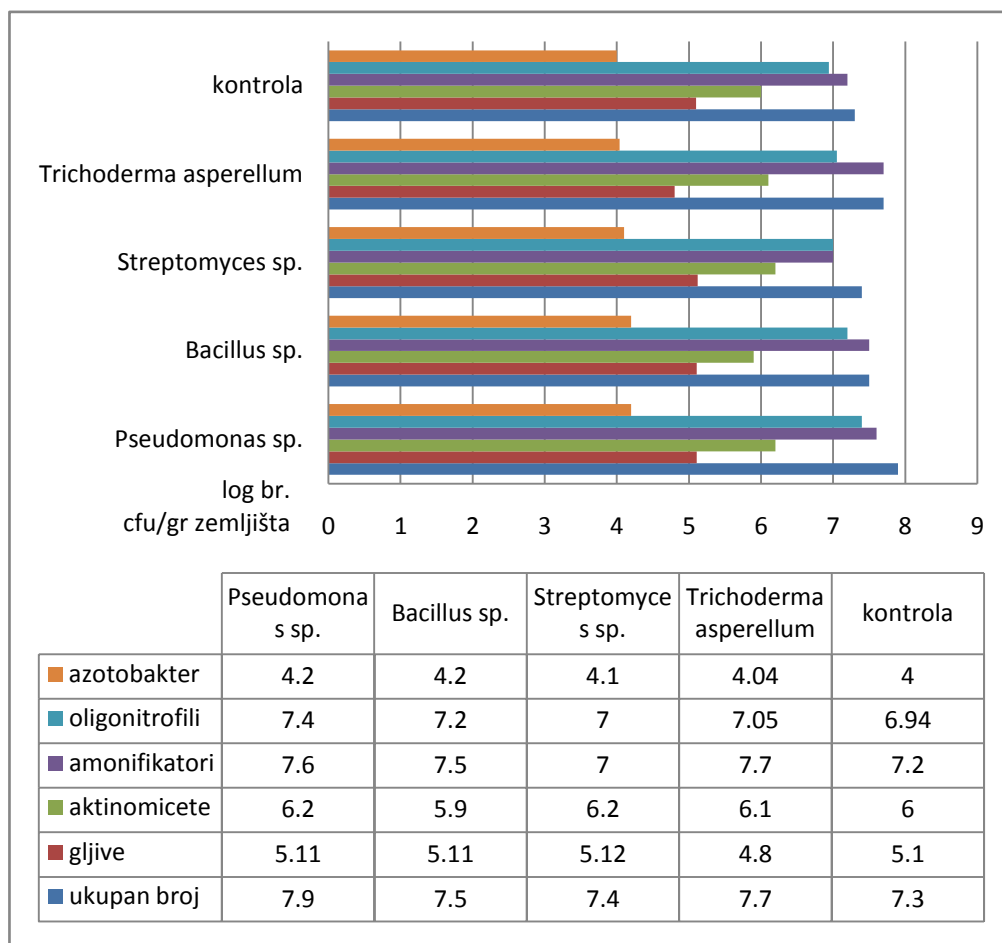
Primena inokulanata nije imala statistički značajan uticaj na brojnost aminoheterotrofa. Najbolji efekat ispoljila je primena *Bacillus* sp. B1 ($54,75 \times 10^6$), a najslabiji primena aktinomicete ($17,91 \times 10^6$).

Broj oligonitrofila kretao se od 141,6 do $450,53 \times 10^5$. Primena *Pseudomonas* sp. P12 najviše je uticala na povećanje broja oligonitrofila. U ostalim varijantama, iako je došlo do povećanja ili smanjenja brojnosti oligonitrofila, te promene nisu bile statistički značajno.

Broj azotobaktera kretao se od 25,36 do $151,7 \times 10^2$. Na statistički značajno povećanje brojnosti azotobaktera uticala je primena samo *Pseudomonas* sp. P12, dok u ostalim varijantama nije utvrđena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

Nakon trećeg otkosa, primena bakterije *Pseudomonas* sp. P12 imala je najbolji efekat na povećanje broja ispitivanih grupa mikroorganizama. Najslabiji efekat postignut je primenom aktinomicete. Primenjeni inokulanti su najviše uticali na povećanje ukupnog broja mikroorganizama

U proseku, u drugoj godini istraživanja, primena *Pseudomonas* sp. P12 i gljive *Trichoderma asperellum*, je imala najveći efekat na brojnost različitih grupa mikroorganizama (Grafik 5). Primena inokulanata najviše je uticala na povećanje ukupnog broja mikroorganizama i oligonitrofila. Inokulanti su imali najslabiji efekat na povećanje broja gljiva.



Grafik 5. Uticaj primene inokulanata na brojnost mikroorganizama (prosek) u toku II godine

Dehidrogenazna aktivnost

Na dehidrogenaznu aktivnost primenjeni inokulanti ispoljili su pozitivan efekat (Tabela 20). Nakon prvog otkosa, na povećanje dehidrogenazne aktivnosti najviše je uticala primena *Streptomyces* sp. A3. U varijanti sa primenjenom trihodermom, utvrđeno je smanjenje dehidrogenazne aktivnosti, ali to smanjenje nije bilo statistički značajno.

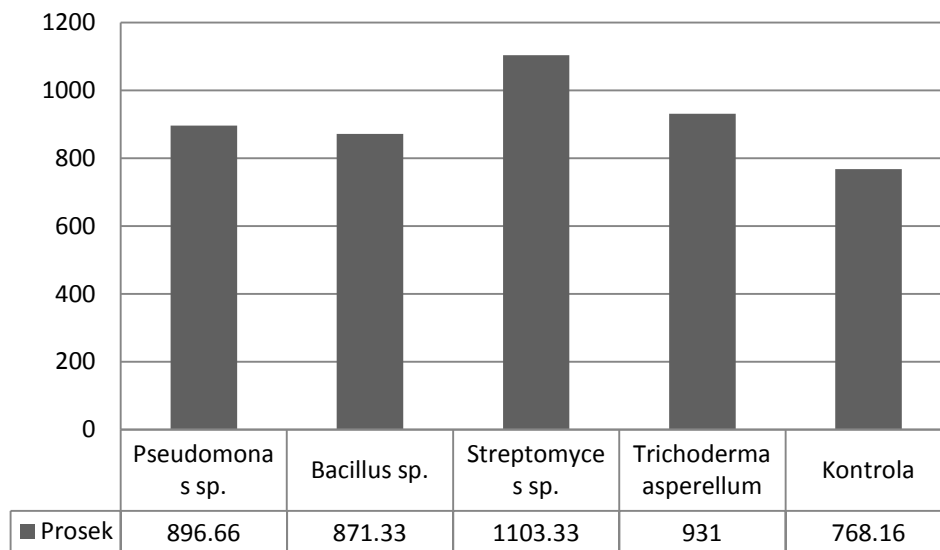
Tabela 20. Dehidrogenazna aktivnost rizosfernog zemljišta nakon I i III otkosa (TPF g⁻¹ zemljišta)

varijante	I otkos	III otkos	Prosek
<i>Pseudomonas</i> sp. P12	874,0 ^{bc}	919,33 ^a	896,66
<i>Bacillus</i> sp. B1	931,33 ^b	811,33 ^a	871,33
<i>Streptomyces</i> sp. A3	1232,33 ^a	975,33 ^a	1103,33
<i>Trichoderma asperellum</i>	602,67 ^d	955,33 ^a	931,0
Kontrola	758,0 ^{bcd}	778,33 ^a	768,16

* Vrednosti sa različitim slovnim oznakama u superskriptu se prema Fišerovom testu statistički značajno razlikuju za $P < 0,05$

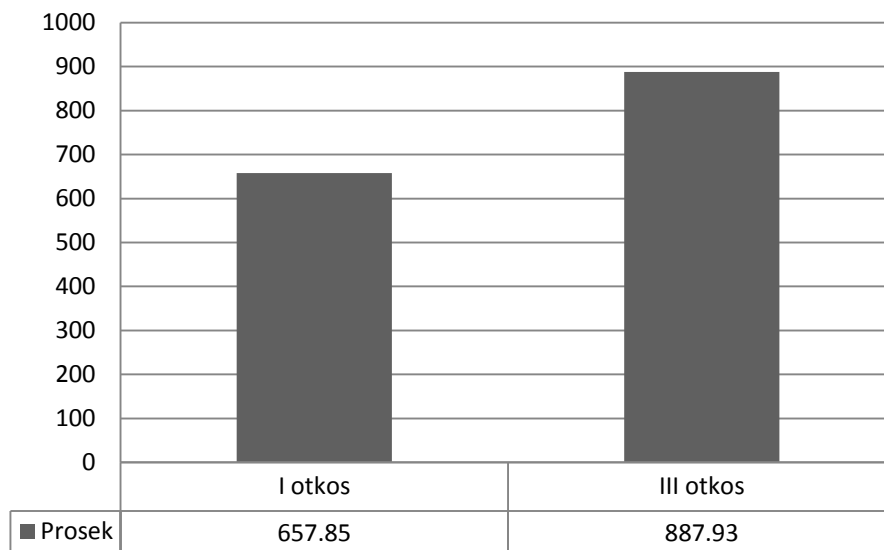
Nakon trećeg otkosa, u svim varijantama utvrđeno je povećanje dehidrogenazne aktivnosti, ali te promene nisu bile statistički značajne. Najveća dehidrogenazna aktivnost utvrđena je u varijanti gde je bila primenjena aktinomiceta.

U proseku, na povećanje dehidrogenazne aktivnosti u drugoj godini istraživanja, najviše je uticala primena *Streptomyces* sp. A3, a najslabiji efekat postignut je primenom bakterije *Bacillus* sp. B1 (Grafik 6).



Grafik 6. Uticaj inokulacije na aktivnost dehidrogenaze u rizosferi engleskog ljujla (TPF g⁻¹ zemljišta) (prosek)

Prosečna dehidrogenazna aktivnost u toku druge godine istraživanja, bila je veća nakon trećeg otkosa u odnosu na prosečnu dehidrogenaznu aktivnost nakon prvog otkosa (Grafik 7).



Grafik 7. Prosečna dehidrogenazna aktivnost nakon I i III otkosa (TPF g⁻¹ zemljišta)

6.3.3. Efekat inokulacije na brojnost i aktivnost mikroorganizama u trećoj godini istraživanja

Brojnost mikroorganizama

Nakon prvog otkosa, primenjeni tretmani uticali su pozitivno na ukupan broj mikroorganizama, ali te promene nisu bile statistički značajne (Tabela 21). Ukupan broj mikroorganizama kretao se od 29,11 do 69,36 x 10⁶. U varijanti u kojoj je bio primenjen *Streptomyces* sp. A3 utvrđeno je najveće povećanje ukupnog broja mikroorganizama.

Tabela 21. Efekat inokulacije na broj mikroorganizama u rizosferi engleskog ljulja nakon I otkosa

Varijante	Broj mikroorganizama u gramu apsolutno suvog zemljišta					
	Ukupan br. (10 ⁶)	Gljive (10 ⁴)	Aktinomicete (10 ⁵)	Aminoheterotrofi (10 ⁶)	Oligonitrofi li (10 ⁵)	Azotobakter (10 ²)
<i>Pseudomonas</i> sp. P12	54,83 ^a	5,17 ^b	31,03 ^a	108,6 ^a	159,45 ^{ab}	118,51 ^b
<i>Bacillus</i> sp. B1	57,54 ^a	6,3 ^b	29,17 ^a	53,6 ^{bc}	179,73 ^a	388,24 ^a
<i>Streptomyces</i> sp. A3	69,36 ^a	7,01 ^{ab}	41,03 ^a	73,25 ^{ab}	136,37 ^{bc}	198,71 ^b
<i>Trichoderma asperellum</i>	33,98 ^a	13,59 ^a	28,89 ^a	36,53 ^c	113,83 ^c	169,89 ^b
Kontrola	29,11 ^a	3,83 ^b	35,24 ^a	39,83 ^c	112,62 ^c	145,56 ^b

* Vrednosti sa različitim slovnim oznakama u superskriptu se prema Fišerovom testu statistički značajno razlikuju za $P < 0,05$

Na brojnost gljiva pozitivno je uticala primena svih inokulanata. U varijanti gde je bila primenjena gljiva *Trichoderma asperellum* (13,59 x 10⁴) utvrđeno je statistički značajno povećanje broja gljiva. U ostalim varijantama povećanje broja gljiva nije bilo statistički značajno.

Bro aktinomiceta kretao se od 28,89 do 41,03 x 10⁵. Primenjeni inokulanti uticali su na povećanje broja aktinomiceta, ali promene nisu bile statistički značajne. Najveće povećanje broja aktinomiceta utvrđeno je u varijanti gde je bila primenjena aktinomiceta.

Na brojnost aminoheterotrofa najviše je uticala primena *Pseudomonas* sp. P12 ($108,6 \times 10^6$) i *Streptomyces* sp. A3 ($73,25 \times 10^6$). U ostalim varijantama promene nisu bile statistički značajne.

Broj oligonitrofila kretala se od $112,62$ do $179,73 \times 10^5$. Primena *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1 najviše je uticala na povećanje broja oligonitrofila. U ostalim varijantama nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu.

Primena *Bacillus* sp. B1 imala je najbolji efekat na povećanje broja azotobaktera. U ovoj varijanti broj azotobaktera bio je $388,24 \times 10^2$, dok je u kontrolnoj varijanti brojnost azotobaktera bila $145,56 \times 10^2$. U ostalim varijantama nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu.

Nakon prvog otkosa, u proseku, primena *Bacillus* sp. B1 i *Streptomyces* sp. A3 uticala je na povećanje brojnosti najvećeg broja ispitivanih grupa mikroorganizama. Primenjeni inokulanti najviše su uticali na povećanje broja gljiva i ukupnog broja, dok je najslabiji efekat postignut kod oligonitrofila.

Nakon trećeg otkosa, primena *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B3 je imala najbolji efekat na ukupan broj mikroorganizama (Tabela 22). Ukupan broj mikroorganizama kretao se od $5,07$ do $214,06 \times 10^6$. U ostalim varijantama povećanje ukupnog broja mikroorganizama nije bilo statistički značajno.

Tabela 22. Efekat inokulacije na broj mikroorganizama u rizosferi engleskog ljulja nakon III otkosa

Varijante	Broj mikroorganizama u gramu apsolutno suvog zemljišta					
	Ukupan br. (10^6)	Gljive (10^4)	Aktinomicete (10^5)	Aminoheterotrofi (10^6)	Oligonitrofil (10^5)	Azotobakter (10^2)
<i>Pseudomonas</i> sp. P12	214,06 ^a	42,46 ^a	21,22 ^a	213,17 ^a	163,64 ^{ab}	163,63 ^{ac}
<i>Bacillus</i> sp. B1	151,03 ^b	20,24 ^b	28,03 ^a	151,04 ^{ab}	224,22 ^a	73,96 ^b
<i>Streptomyces</i> sp. A3	6,39 ^c	7,11 ^{bc}	18,49 ^a	94,56 ^{bc}	142,9 ^{bc}	197,29 ^c

<i>Trichoderma asperellum</i>	7,82 ^c	3,91 ^c	14,08 ^a	74,31 ^c	68,05 ^c	228,79 ^c
Kontrola	5,07 ^c	10,15 ^{bc}	10,99 ^a	86,24 ^{bc}	75,25 ^c	86,66 ^{ab}

* Vrednosti sa različitim slovnim oznakama u superskriptu se prema Fišerovom testu statistički značajno razlikuju za $P < 0,05$

Na broj gljiva najbolje je uticala primena *Pseudomonas* sp. P12 ($42, 46 \times 10^4$), gde je utvrđeno statistički značajno povećanje broja gljiva u odnosu na kontrolu. Najslabiji efekat utvrđen u varijanti sa primenjenom trihodermom ($3,91 \times 10^4$), ali to smanjenje broja gljiva nije bilo statistički značajno.

Broj aktinomiceta kretao se od 10,99 do $28,03 \times 10^5$. Primenjeni inokulanti su pozitivno uticali na broj aktinomiceta, ali to povećanje nije bilo statistički značajno ni u jednoj varijanti. Primena *Bacillus* sp. B1 imala je najbolji, a primena trihoderme najslabiji efekat na broj aktinomiceta.

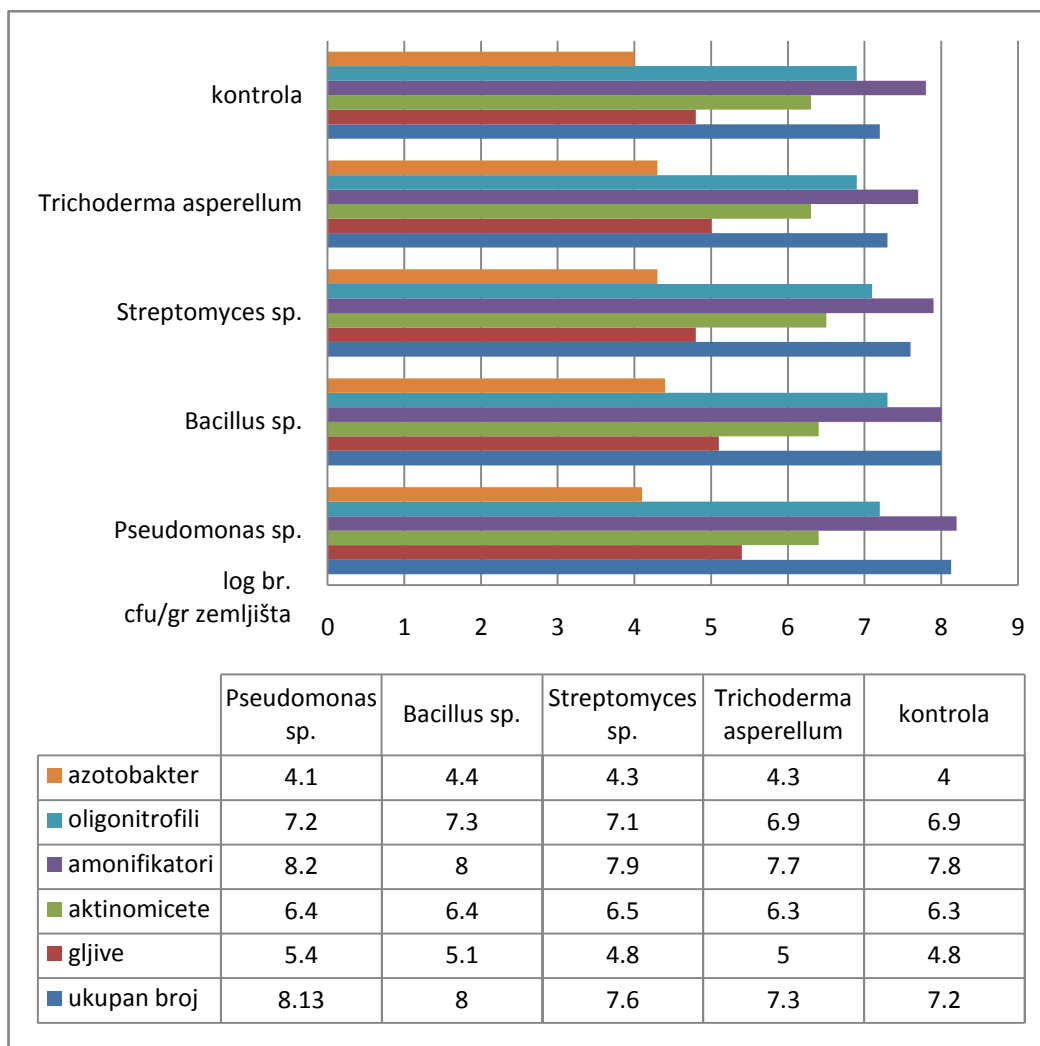
Na brojnost aminoheterotrofa i oligonitrofila najbolje je uticala primena *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1. U ostalim varijantama povećanje brojnosti aminoheterotrofa i oligonitrofila nije bilo statistički značajno.

Najbolji efekat na broj azotobaktera postignut je primenom *Streptomyces* sp. A3 ($197,29 \times 10^2$) i *Trichoderma asperellum* ($228,79 \times 10^2$). Primena *Bacillus* sp. B1 imala je najslabiji efekat na broj azotobaktera ($73,96 \times 10^2$). U ostalim varijantama nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu.

U proseku, nakon trećeg otkosa, na povećanje brojnosti ispitivanih grupa mikroorganizama najviše je uticala primena *Bacillus* sp. B1 i *Pseudomonas* sp. P12. Najslabiji efekat postignut je primenom *Streptomyces* sp. A3. Primenjeni inokulanti najviše su uticali na povećanje ukupnog broja mikroorganizama i oligonitrofila, dok je najslabiji efekat postignut kod aminoheterotrofa.

Na kraju treće godine istraživanja, u proseku, primenom bakterija *Bacillus* sp. B1 i *Pseudomonas* sp. P12 postignut je najbolji efekat na povećanje broja svih ispitivanih grupa mikroorganizama. Najlošiji efekat postignut je primenom trihoderme. Primenjeni inokulanti su u

proseku najviše uticali na povećanje ukupnog broja mikroorganizama i broja azotobaktera (Grafik 8).



Grafik 8. Uticaj primene inokulanata na brojnost mikroorganizama u toku III godine

Dehidrogenazna aktivnost

Na dehidrogenaznu aktivnost mikroorganizama nakon prvog otkosa najviše je uticala primena *Pseudomonas* sp. P12, gde je utvrđeno statistički značajno povećanje dehidrogenazne aktivnosti (Tabela 23). U ostalim varijantama nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu. Najslabiji efekat utvrđen je u varijanti gde je bila primenjena trihoderma.

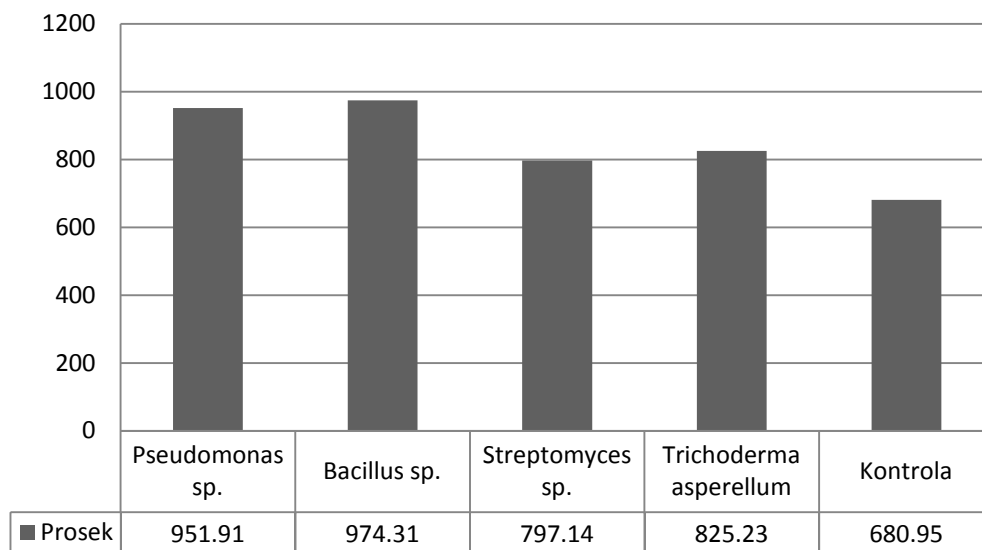
Tabela 23. Dehidrogenazna aktivnost rizosfernog zemljišta nakon I i III otkosa (TPF g⁻¹ zemljišta)

Varijante	I otkos	III otkos	Prosek
<i>Pseudomonas</i> sp. P12	1240,95 ^a	662,85 ^a	951,91
<i>Bacillus</i> sp. B1	899,05 ^{ab}	1049,52 ^a	974,31
<i>Streptomyces</i> sp. A3	913,33 ^{ab}	680,95 ^a	797,14
<i>Trichoderma asperellum</i>	829,52 ^b	820,95 ^a	825,23
kontrola	854,28 ^b	507,62 ^a	680,95

* Vrednosti sa različitim slovnim oznakama u superskriptu se prema Fišerovom testu statistički značajno razlikuju za $P < 0,05$

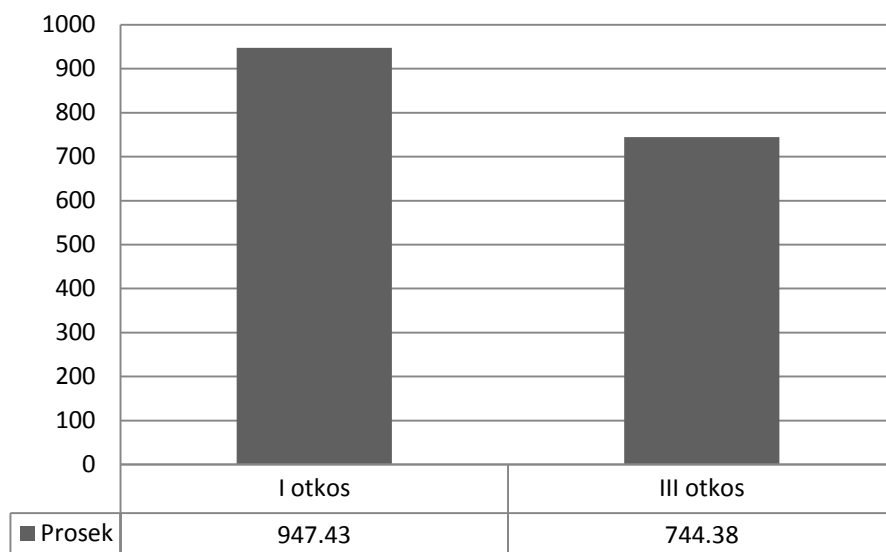
Nakon trećeg otkosa, u svim varijantama je došlo do povećanja dehidrogenazne aktivnosti, ali te promene nisu bile statistički značajne. Na dehidrogenaznu aktivnost nakon trećeg otkosa najviše je uticala primena *Bacillus* sp. B1. Najslabiji efekat postignut je primenom *Pseudomonas* sp. P12.

U proseku, u trećoj godini istraživanja, najveća dehidrogenazna aktivnost bila je u varijanti sa primenjenom bakterijom *Bacillus* sp. B1, a najslabija u kontrolnoj posudi (Grafik 9).



Grafik 9. Uticaj inokulacije na aktivnost dehidrogenaze u rizosferi engleskog ljuja (TPF g⁻¹ zemljišta) (prosek)

Za razliku od prve dve godine istraživanja, u trećoj godini istraživanja prosečna dehidrogenazna aktivnost bila je veća nakon prvog otkosa u odnosu na vrednost utvrđenu nakon trećeg otkosa (Grafik 10).



Grafik 10. Prosečna dehidrogenazna aktivnost nakon I i III otkosa (TPF g⁻¹ zemljišta)

Praćenje brojnosti mikroorganizama introdukovanih grupa u rizosferi engleskog ljulja

Nakon treće godine istraživanja, nakon trećeg otkosa, određivana je brojnost mikroorganizama introdukovanih grupa. U odnosu na kontrolu, najveće povećanje brojnosti mikroorganizama utvrđeno je kod gljive *Trichoderma* sp. i bakterija *Pseudomonas* sp., dok je kod roda *Bacillus* povećanje bilo najslabije (Tabela 24).

Tabela 24. Brojnost mikroorganizama introdukovanih grupa

Inokulanti	Broj mikroorganizama u gramu zemljišta	
	Kontrola	Varijanta

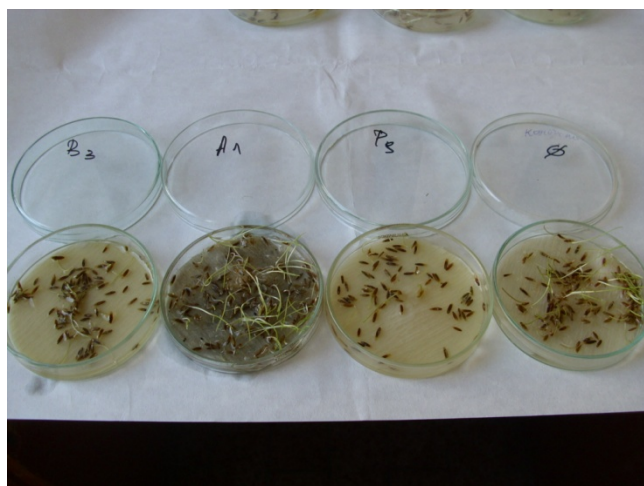
<i>Pseudomonas</i> sp.	$5,00 \times 10^3$	$9,97 \times 10^3$
<i>Bacillus</i> sp.	$2,0 \times 10^4$	$3,23 \times 10^4$
<i>Streptomyces</i> sp.	$2,90 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4$
<i>Trichoderma asperellum</i>	$16,89 \times 10^4$	$19,4 \times 10^3$

6.4. UTICAJ INOKULACIJE NA KLIJANJE, RAST I PRINOS ENGLESKOG LJULJA

6.4.1. Uticaj inokulacije semena na klijavost i dužinu klice

U laboratorijskim uslovima, primenjeni tretmani imali su različiti uticaj na klijavost semena engleskog ljulja (Tabela 25).

Pet dana nakon inokulacije, najveći procenat klijavosti (97%) utvrđen je u varijanti sa primenjenom *Trichoderma asperellum*. U varijanti u kojoj je bio primenjen *Pseudomonas* sp. P12 procenat klijavosti bio je najmanji (11%).



Slika 27. Klijavost nakon pet dana

Na dužinu korenka klice i stabaočeta, najveći uticaj imala je primena *Streptomyces* sp. A3. Primena bakterija *Bacillus* sp. B1 i *Pseudomonas* sp. P12, u odnosu na kontrolu, imala negativan uticaj na dužinu korenka klice i stabaočeta (Tabela 25) (Slika 27).

Tabela 25. Procenat klijavosti, dužina korenka i stabaočeta klice, nakon 5 dana

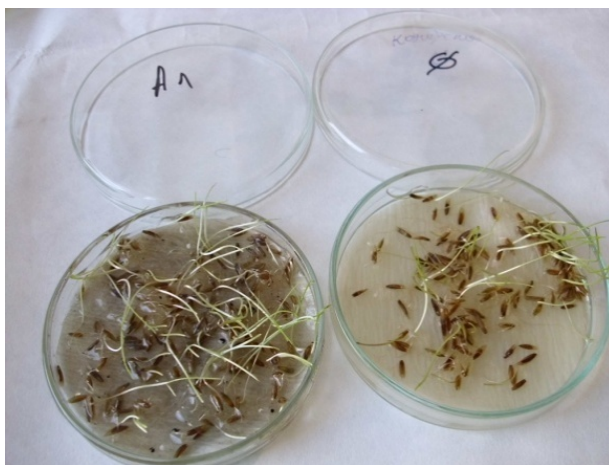
Mikrobiološka varijanta	Procenat klijavosti semena	Dužina korenka klice (mm)	Dužina stabaočeta klice (mm)
<i>Pseudomonas</i> sp. P12	11,0	1,0	13,0
<i>Bacillus</i> sp. B1	18,0	3,0	14,0
<i>Streptomyces</i> sp. A3	96,0	45,0	34,0
<i>Trichoderma asperellum</i>	97,0	40,0	22,0
kontrola	94,0	43,0	30,0

Nakon 14 dana, u varijanti gde je primenjena gljiva *Trichoderma asperellum*, utvrđen je najveći procenat klijavosti semena (Tabela 26). U ostalim varijantama je takođe utvrđen visok procenat klijavosti semena.

Tabela 26. Procenat klijavosti, dužina korenka i stabaočeta klice, nakon 14 dana

Mikrobiološka varijanta	Procenat klijavosti semena	Dužina korenka klice (mm)	Dužina stabaočeta klice (mm)
<i>Pseudomonas</i> sp. P12	89,0	6,0	90,0
<i>Bacillus</i> sp. B1	90,0	4,0	70,0
<i>Streptomyces</i> sp. A3	97,0	55,0	88,0
<i>Trichoderma asperellum</i>	98,0	44,0	80,0
Kontrola	96,0	47,5	83,0

Na dužinu korenka najbolje je uticala varijanta gde je bila primenjena aktinomiceta *Streptomyces* sp. A3 (Slika 28). Varijante, u kojima su bile primenjene bakterije *Bacillus* sp. B1 i *Pseudomonas* sp. P12, negativno su uticale na dužinu korenka klice.



Slika 28. Klijavost nakon 14 dana

Za razliku od dužine korenka klice, na dužinu stabaoaceta najviše je uticala primena bakterije *Pseudomonas* sp. P12 i aktinomicete *Streptomyces* sp. A3. Najslabiji rezultat bio je u varijanti sa primenjenom bakterijom *Bacillus* sp. B1.

6.4.2. Uticaj inokulacije na masu sveže i suve materije; dužinu nadzemnog dela i korenca engleskog ljulja

Prva godina istraživanja

U prvoj godini ogleđa, nakon prvog otkosa utvrđeno je statistički značajno povećanje prinosa sveže i suve mase engleskog ljulja u varijantama gde je primenjen *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1 (Tabela 27). Efekat primene *Streptomyces* sp. A3 i *Trichoderma asperellum* je bio približno jednak i u odnosu na kontrolu nije bilo značajnih razlika.

Tabela 27. Prinos u prvoj godini istraživanja (t ha⁻¹)

		Kontrola	<i>Pseudomonas</i> sp. P12	<i>Bacillus</i> sp. B1	<i>Streptomyces</i> sp. A3	<i>Trichoderma</i> <i>asperellum</i>
I otkos	Sveža masa	2,33 ^a	7,33 ^b	5,0 ^b	2,43 ^a	2,5 ^a
	Suva masa	1,03 ^a	2,66 ^b	2,33 ^b	1,2 ^a	1,4 ^a
II otkos	Sveža masa	3,0 ^a	3,67 ^a	3,33 ^a	4,0 ^a	3,67 ^a
	Suva masa	1,0 ^b	1,1 ^b	1,11 ^b	1,67 ^a	1,1 ^b
III otkos	Sveža masa	12,0 ^a	13,0 ^a	15,0 ^a	13,0 ^a	12,3 ^a
	Suva masa	6,0 ^a	7,0 ^a	6,5 ^a	6,3 ^a	6,2 ^a

Ukupan prinos	Sveža masa	17,33 ^b	24,0 ^a	23,33 ^a	19,43 ^b	18,47 ^b
	Suva masa	8,03 ^c	10,76 ^a	9,94 ^{ab}	9,17 ^{bc}	8,7 ^{abc}

* Vrednosti sa različitim slovnim oznakama u superskriptu se prema Fišerovom testu statistički značajno razlikuju za $P < 0,05$

Nakon drugog otkosa u svim varijantama došlo je do povećanja prinosa sveže i suve mase biljke, a u varijanti sa *Streptomyces* sp. A3 povećanje prinosa suve materije je bilo statistički značajno.

Nakon trećeg otkosa u svim varijantama utvrđeno je povećanje prinosa sveže i suve mase engleskog ljulja, ali to povećanje nije bilo statistički značajno. U proseku najbolji efekat postignut je primenom *Bacillus* sp. B1, dok je najslabiji efekat utvrđen u varijanti gde je primenjena *Trichoderma asperellum*. Na kraju prve godine, u svim varijantama utvrđeno je povećanje ukupnog prinosa sveže i suve mase materije. Ukupan prinos sveže mase bio je najveći u varijanti sa primenjenim bakterijama *Pseudomonas* sp. P12, (24 t ha⁻¹) i *Bacillus* sp. B1 (23,3 t ha⁻¹). Najslabiji efekat postignut je primenom gljive *Trichoderma asperellum* (18,47 t ha⁻¹). Na prinos suve materije takođe je najviše uticala primena bakterija *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1, a najslabije primena gljive *Trichoderma asperellum*.

Najveće procentualno povećanje prinosa sveže i suve mase biljaka utvrđeno je nakon prvog otkosa, i to u varijantama gde su bili primenjeni *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1 (Tabela 28).

Tabela 28. Procentualno povećanje prinosa u I godini istraživanja

Povećanje prinosa u odnosu na kontrolu (%)		<i>Pseudomonas</i> sp. P12	<i>Bacillus</i> sp. B1	<i>Streptomyces</i> sp. A3	<i>Trichoderma asperellum</i>
I otkos	Sveža masa	214,52	114,6	4,3	7,3
	Suva masa	158,2	126,2	16,5	35,9
II otkos	Sveža masa	22,3	11	33,3	22,3
	Suva masa	10,0	11,0	67,0	10,0
III otkos	Sveža masa	8,3	25,0	8,3	2,5
	Suva masa	16,6	8,3	5,0	3,3
Ukupan prinos	Sveža masa	38,5	34,6	12,1	6,6
	Suva masa	33,9	23,8	14,2	8,3

Nakon drugog otkosa, najbolji efekat na prinos sveže i suve materije utvrđen je u varijanti gde je primenjena aktinomiceta *Streptomyces* sp. A3. U ovoj varijanti prinos sveže materije povećao se za 33,3%, a prinos suve materije za 67%, u odnosu na kontrolu .

Najlošiji efekat na prinos sveže i suve materije utvrđen je nakon trećeg otkosa. Prinos sveže mase biljaka inokulisanih pseudomonasom bio je za 8,3% veći u odnosu na kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 16,6%. Prinos sveže materije biljaka inokulisanih bacilusom bio je za 25% veći u odnosu na kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 8,3%. U varijanti gde je primenjen *Streptomyces* sp. A3 prinos sveže materije biljaka povećao se za 8,3%, a prinos suve materije za 5%. U varijanti sa *Trichoderma asperellum*, utvrđeno je povećanje sveže materije za 2,5%, a suve materije za 3,3% .

Na ukupni prinos sveže i suve mase engleskog ljulja najbolji efekat imala je primena *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1 . Prinos sveže mase biljaka inokulisanih sa *Pseudomonas* sp. P12 bio je za 38,5% veći u odnosu na kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 33,9% . Prinos sveže materije biljaka inokulisanih sa *Bacillus* sp. B1 bio je za 34,6% veći u odnosu na kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 23,8%. Efekat primene *Streptomyces* sp. A3 je bio slabiji. Prinos sveže materije biljaka bio je za 12,1% veći u odnosu na kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 14,2%. Efekat primene *Trichoderma asperellum* bio je najslabiji. Prinos sveže materije biljaka bio je za 6,6% veći u odnosu na kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 8,3% .

Nakon prvog otkosa na dužinu nadzemnog dela biljke i korena, stimulativni uticaj imali su svi primenjeni tretmani, ali je najbolji efekat postignut primenom *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1. U ovim varijantama je nakon prvog otkosa utvrđeno statistički značajno povećanje dužine nadzemnog dela. Najslabiji efekat imala je primena gljive *Trichoderma asperellum* (Tabela 29).

Tabela 29. Dužina nadzemnog dela (nadz.) i korena engleskog ljulja (cm) u I godini istraživanja

otkos	Biljka	kontrola	<i>Pseudomonas</i> sp. P12	<i>Bacillus</i> sp. B1	<i>Streptomyces</i> sp. A3	<i>Trichoderma</i> <i>asperellum</i>
I	Nadz.	10,5 b	19,0 ^a	18,5 ^a	11,5 ^b	11,0 ^b
	Koren	3,0 b	5,0 ^a	4,5 ^{ab}	3,75 ^{ab}	3,75 ^{ab}
II	Nadz.	10,75 a	12,0 ^a	11,75 ^a	11,5 ^a	11,0 ^a
	Koren	2,5 a	4,0 ^a	4,0 ^a	3,5 ^a	3,0 ^a

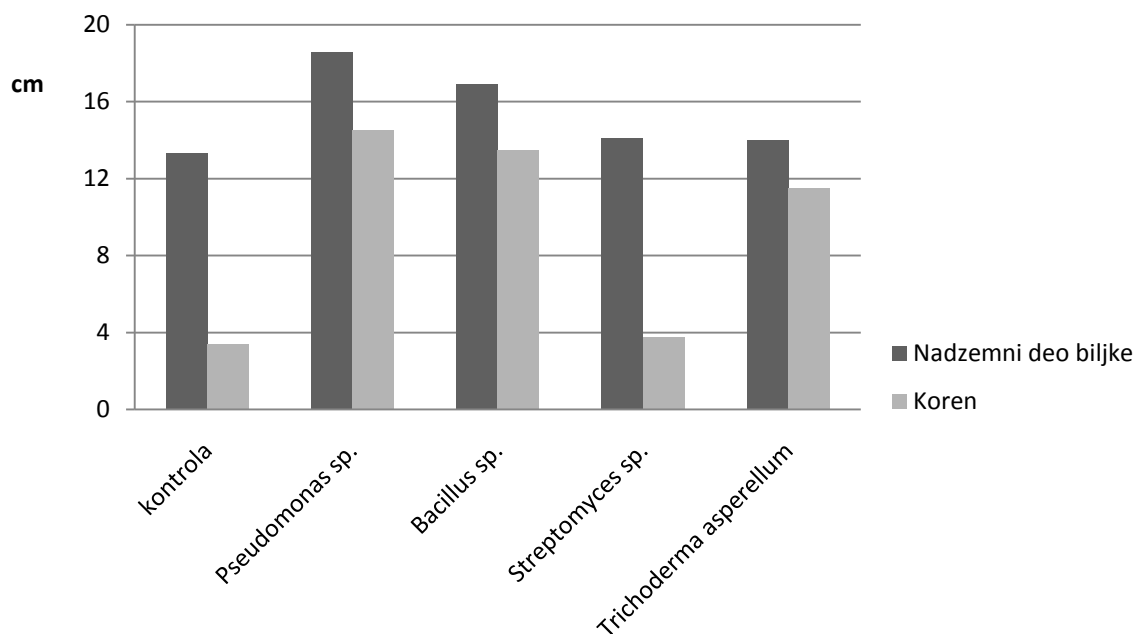
III	Nadz.	18,75 b	25,0 ^a	20,5 ^b	19,25 ^b	20,0 ^b
	Koren	4,75 a	5,5 ^a	5,0 ^a	4,0 ^a	4,75 ^a
Prosek	Nadz.	13,3	18,6	16,9	14,1	14,0
Prosek	Koren	3,4	14,5	13,5	3,75	11,5

* Vrednosti sa različitim slovnim oznakama u superskriptu se prema Fišerovom testu statistički značajno razlikuju za $P < 0,05$

Nakon drugog otkosa, utvrđeno je da su primenjeni tretmani pozitivno uticali na dužinu nadzemnog dela i korena biljke, ali te promene nisu bile statistički značajne.

Nakon trećeg otkosa, najbolji uticaj na dužinu nadzemnog dela biljke i korena imala je primena bakterije *Pseudomonas* sp. P12, dok je u varijanti gde je bila primenjena aktinomiceta utvrđen najslabiji efekat.

U proseku, dužina nadzemnog dela i korena biljke bila je najveća u varijanti gde je bio primenjen *Pseudomonas* sp. P12, a najmanja u kontrolnoj posudi (Grafik 11).



Grafik 11. Uticaj inokulacije na dužinu nadzemnog dela i korena biljke u I godini istraživanja

Druga godina istraživanja

Primena inokulanata u toku druge godine različito je uticala na prinos sveže i suve materije engleskog ljulja.

Nakon prvog otkosa, u odnosu na kontrolu utvrđeno je statistički značajno povećanje sveže mase u svim varijantama (Tabela 30). Najbolji efekat postignut je u varijanti gde je bila primenjena bakterija *Pseudomonas* sp. P12. Do statistički značajnog povećanja mase suve materije došlo je u varijantama gde su bile primenjene bakterije *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1.

Tabela 30. Prinos u drugoj godini istraživanja (t ha⁻¹)

		Kontrola	<i>Pseudomonas</i> sp. P12	<i>Bacillus</i> sp. B1	<i>Streptomyces</i> sp. A3	<i>Trichoderma</i> <i>asperellum</i>
I otkos	Sveža masa	3,0 ^a	8,0 ^b	6,3 ^{bc}	6,6 ^{bc}	6,6 ^{bc}
	Suva masa	0,86 ^c	1,8 ^a	1,0 ^c	1,5 ^{ab}	1,16 ^c
II otkos	Sveža masa	5,33 ^c	8,0 ^b	8,0 ^b	9,0 ^a	8,0 ^b
	Suva masa	2,66 ^a	5,0 ^{cb}	4,3 ^c	6,0 ^b	4,0 ^c
III otkos	Sveža masa	8,00 ^c	8,6 ^{cb}	9,0 ^{cb}	11,0 ^{ab}	11,7 ^a
	Suva masa	1,6 ^b	1,63 ^b	1,63 ^b	2,0 ^{ab}	2,2 ^a
Ukupan prinos	Sveža masa	16,3 ^b	24,6 ^a	23,3 ^a	26,6 ^a	26,3 ^a
	Suva masa	5,12 ^b	8,7 ^a	6,9 ^a	9,5 ^a	7,36 ^a

* Vrednosti sa različitim slovnim oznakama u superskriptu se prema Fišerovom testu statistički značajno razlikuju za $P < 0,05$

Nakon drugog otkosa, u svim varijantama utvrđeno je statistički značajno povećanje prinosa sveže materije biljke. Najveće povećanje utvrđeno je u varijanti gde je bila primenjena bakterija *Bacillus* sp. B1. Suva masa materije povećala se u svim varijantama, a najveće povećanje utvrđeno je u varijantama gde su bile primenjene bakterije *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1.

Prinos sveže materije biljke nakon trećeg otkosa u svim varijantama je povećan, a najveće povećanje mase utvrđeno je u varijantama sa primenjenom gljivom *Trichoderma asperellum* i bakterijom *Bacillus* sp. B1. Prinos suve materije u trećem otkosu bio je najveći u varijanti gde je bila primenjena gljiva *Trichoderma asperellum*.

Na kraju druge godine, utvrđeno je da je primena inokulanata imala pozitivan uticaj na prinos sveže i suve materije. Primena bakterija *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1 imala je

najveći uticaj na povećanje prinosa sveže i suve materije biljke , a najslabiji efekat postignut je u varijanti sa primenjenom gljivom *Trichoderma asperellum*.

Najveće procentualno povećanje prinosa sveže i suve mase biljaka utvrđeno je nakon prvog otkosa, i to u varijantama gde su bili primenjeni *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1 (Tabela 31).

Tabela 31. Procentualno povećanje prinosa u II godini istraživanja

Povećanje prinosa u odnosu na kontrolu (%)		<i>Pseudomonas</i> sp. P12	<i>Bacillus</i> sp. B1	<i>Streptomyces</i> sp. A3	<i>Trichoderma asperellum</i>
I otkos	Sveža masa	166,7	120,0	110,0	120,0
	Suva masa	109,3	74,4	16,2	34,8
II otkos	Sveža masa	50,1	68,8	50,1	50,1
	Suva masa	87,9	125,6	61,6	50,4
III otkos	Sveža masa	7,5	37,5	12,5	46,25
	Suva masa	1,9	25,0	1,9	37,5
Ukupan prinos	Sveža masa	51	63	42,9	61,34
	Suva masa	64	85,5	34,8	43,75

Nakon drugog otkosa, najbolji efekat na prinos sveže i suve materije utvrđen je u varijanti gde su bile primenjene bakterije *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1. U ovim varijantama prinos sveže materije povećao se za 50,1%, odnosno 68,8%, a prinos suve materije za 87,9%, odnosno 125,6 % u odnosu na kontrolu .

Najslabiji efekat na prinos sveže i suve materije utvrđen je nakon trećeg otkosa. Prinos sveže mase biljaka inokulisanih pseudomonasom bio je za 7,5 % veći u odnosu na kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 1,9%. Prinos sveže materije biljaka inokulisanih bacilusom bio je za 37,5% veći u odnosu na kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 25%. U varijanti sa *Trichoderma asperellum*, utvrđeno je najveće povećanje sveže materije za 46,25%, a suve materije za 37,5% . U varijanti gde je bila primenjena aktinomiceta *Streptomyces* sp. A3 prinos sveže materije biljaka povećao se za 12,5%, a prinos suve materije za 1,9%.

Na ukupni prinos sveže i suve mase engleskog ljulja najbolji efekat imala je primena *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1. Prinos sveže mase biljaka inokulisanih sa *Pseudomonas* sp. P12 bio je za 51% veći u odnosu na kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 64% . Prinos sveže materije biljaka inokulisanih *Bacillus* sp. B1 bio je za 63% veći u odnosu na

kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 85,5%. Efekat primene *Trichoderma asperellum* na prinos sveže materije biljaka bio je dobar. Prinos sveže materije bio je za 61,34% veći u odnosu na kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 43,75%. Efekat primene *Streptomyces* sp. A3 je bio slabiji. Prinos sveže materije biljaka bio je za 42,9% veći u odnosu na kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 34,8% .

U drugoj godini istraživanja, nakon sva tri otkosa, utvrđeno je da su svi primenjeni inokulanti pozitivno uticali na dužinu nadzemnog dela i korena biljke (Tabela 32).

Tabela 32. Dužina nadzemnog dela (nadz.) i korena engleskog ljujla (cm) u II godini istraživanja

otkos	Biljka	kontrola	<i>Pseudomonas</i> sp. P12	<i>Bacillus</i> sp. B1	<i>Streptomyces</i> sp. A3	<i>Trichoderma</i> <i>asperellum</i>
I	Nadz.	12,0 ^a	23,0 ^c	21,0 ^{cb}	21,5 ^c	19,5 ^b
	Koren	3,75 ^a	5,0 ^a	4,5 ^a	4,0 ^a	3,45 ^a
II	Nadz.	17,0 ^a	23,5 ^b	22,0 ^{cb}	22,0 ^{cb}	21,5 ^c
	Koren	4,0 ^a	4,75 ^a	4,75 ^a	4,0 ^a	4,5 ^a
III	Nadz.	19,5 ^a	24,5 ^{cb}	26,0 ^b	23,5 ^c	22,75 ^c
	Koren	4,75 ^a	5,0 ^a	5,5 ^a	4,17 ^a	4,75 ^a
Prosek	Nadz.	16,2	23,7	23,0	22,3	21,25
Prosek	Koren	4,2	4,9	4,9	4,0	4,23

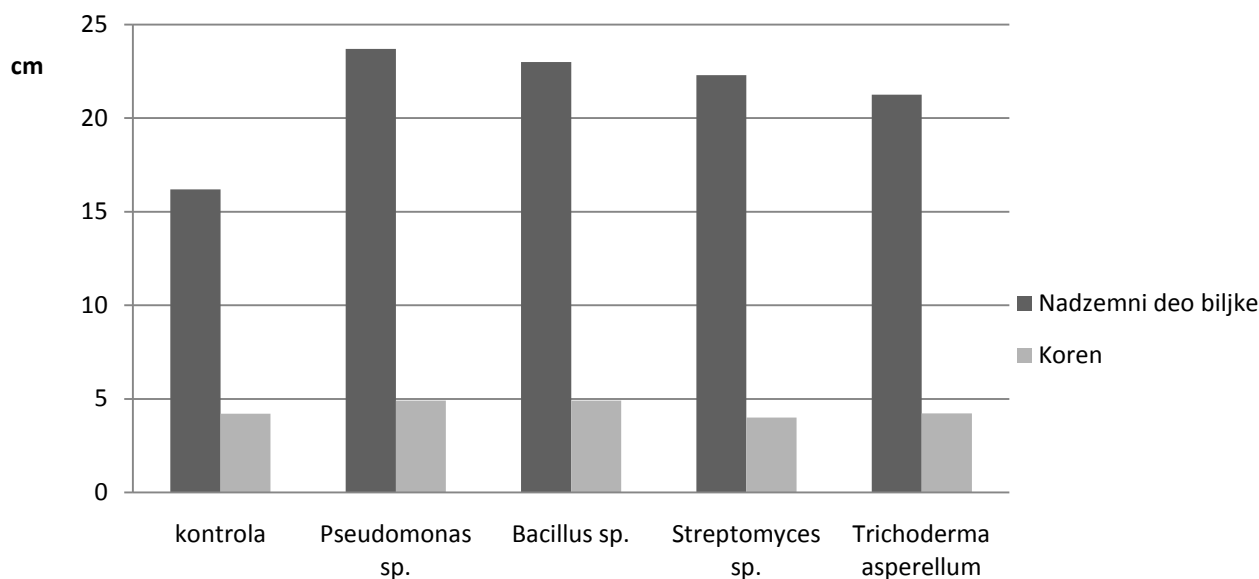
* Vrednosti sa različitim slovnim oznakama u superskriptu se prema Fišerovom testu statistički značajno razlikuju za $P < 0,05$

Nakon prvog otkosa, u svim varijantama utvrđeno je statistički značajno povećanje dužine nadzemnog dela biljke. Najbolji efekat postignut je primenom *Pseudomonas* sp. P12 i *Streptomyces* sp. A3. Najslabiji efekat imala je primena gljive *Trichoderma asperellum*. Na dužinu korena, nijedan primenjeni tretman nije statistički značajno uticao.

Nakon drugog otkosa, utvrđeno je da je u svim varijantama došlo do statistički značajnog povećanja dužine nadzemnog dela biljke. Najbolji efekat imala je primena bakterije *Pseudomonas* sp. P12, a najslabiji primena gljive *Trichoderma asperellum*. Primenjeni tretmani nisu statistički značajno uticali na promenu dužine korena.

Nakon trećeg otkosa, u svim varijantama je došlo do statistički značajnog povećanja dužine nadzemnog dela biljke. Primena *Bacillus* sp. B1 imala je najbolji efekat na dužinu nadzemnog dela, a najslabiji efekat imala je opet primena gljive *Trichoderma asperellum*. Na dužinu korena, nijedan primenjeni tretman nije statistički značajno uticao.

U proseku, primenom bakterija *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1 postignut je najbolji efekat na povećanje dužine nadzemnog dela i korena biljke (Grafik 12).



Grafik 12. Uticaj inokulacije na dužinu nadzemnog dela i korena biljke u II godini istraživanja

Treća godina istraživanja

Primena inokulanata u toku treće godine imala je različiti efekat na prinos sveže i suve materije engleskog ljujla (Tabela 33).

Nakon prvog otkosa, u svim varijantama došlo je do statistički značajnog povećanja prinosa sveže materije. Najveće povećanje prinosa utvrđeno je u varijanti sa primenjenim *Pseudomonas* sp. P12. Na prinos suve materije takođe je najviše uticala primena *Pseudomonas* sp., a najslabije *Bacillus* sp. B1.

Tabela 33. Prinos u trećoj godini istraživanja (t ha⁻¹)

		Kontrola	<i>Pseudomonas</i> sp. P12	<i>Bacillus</i> sp. B1	<i>Streptomyces</i> sp. A3	<i>Trichoderma</i> <i>asperellum</i>
I otkos	Sveža masa	22,0 ^b	40,9 ^a	27,2 ^c	29,0 ^c	27,5 ^c
	Suva masa	6,0 ^b	9,0 ^a	6,0 ^b	6,5 ^b	7,0 ^b
II otkos	Sveža masa	15,7 ^d	19,9 ^a	14,3 ^d	5,6 ^c	9,0 ^b
	Suva masa	4,2 ^c	7,0 ^b	5,5 ^{bc}	2,2 ^a	4,4 ^c
III otkos	Sveža masa	22,5 ^b	36,3 ^d	44,0 ^d	19,2 ^c	34,9 ^d
	Suva masa	3,1 ^d	8,9 ^b	14,4 ^a	3,8 ^d	5,8 ^c
Ukupan prinos	Sveža masa	60,2 ^d	97,1 ^a	85,5 ^b	53,8 ^e	71,4 ^c
	Suva masa	13,3 ^c	24,9 ^b	25,9 ^b	12,5 ^c	17,2 ^a

* Vrednosti sa različitim slovnim oznakama u superskriptu se prema Fišerovom testu statistički značajno razlikuju za $P < 0,05$

Nakon drugog otkosa u varijanti sa primenjenom bakterijom *Pseudomonas* sp. P12 utvrđeno je najveće povećanje prinosa sveže i suve materije biljke. Najslabiji efekat postignut je primenom *Streptomyces* sp. A3, gde je bilo utvrđeno statistički značajno smanjenje prinosa sveže i suve materije biljke.

Prinos sveže i suve materije nakon trećeg otkosa bio je najveći u varijanti sa primenjenim *Bacillus* sp. B1. Primena *Streptomyces* sp. A3 imala je negativan efekat na prinos sveže i suve materije biljke. U ovoj varijanti je utvrđeno statistički značajno smanjenje prinosa sveže materije. Smanjenje prinosa suve materije u ovoj varijanti nije bilo statistički značajno.

Na kraju treće godine utvrđeno je da je na povećanje ukupnog prinosa sveže i suve materije najviše uticala primena *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1. Najslabiji efekat na prinos sveže i suve materije engleskog ljulja utvrđen je u varijanti gde je bio primenjen *Streptomyces* sp. A3. U ovoj varijanti utvrđeno je statistički značajno smanjenje ukupnog prinosa sveže materije.

Najveće procentualno povećanje prinosa sveže i suve mase biljaka utvrđeno je nakon prvog otkosa, i to u varijantama gde su bili primenjeni *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1 (Tabela 34).

Tabela 34. Procentualno povećanje prinosa u III godini istraživanja

Povećanje prinosa u odnosu na kontrolu (%)		<i>Pseudomonas</i> sp. P12	<i>Bacillus</i> sp. B1	<i>Streptomyces</i> sp. A3	<i>Trichoderma</i> <i>asperellum</i>
I otkos	Sveža masa	85,9	23,6	31,8	25,0
	Suva masa	50,0	0	8,3	16,6

II otkos	Sveža masa	26,7	-8,9	-64,3	-42,7
	Suva masa	66,6	30,9	-47,6	4,8
III otkos	Sveža masa	61,3	95,5	-14,7	55,1
	Suva masa	187,1	364,5	22,6	87,1
Ukupan prinos	Sveža masa	61,3	42	-10,6	18,6
	Suva masa	87,2	94,7	-6,0	29,3

Najlošiji efekat na prinos sveže i suve materije utvrđen je nakon drugog otkosa. Najbolji efekat na prinos sveže i suve materije utvrđen je u varijanti gde je bila primenjena bakterija *Pseudomonas* sp. P12. U ovoj varijanti prinos sveže materije povećao se za 26,7%, a prinos suve materije za 66,6% u odnosu na kontrolu. Najlošiji efekat postignut je primenom *Streptomyces* sp. A3.

Nakon trećeg otkosa, prinos sveže mase biljaka inokulisanih bacilusom bio je za 95,5% veći u odnosu na kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 364,5%. Prinos sveže materije biljaka inokulisanih *Pseudomonas* sp. P12 bio je za 61,3% veći u odnosu na kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 187,1%. U varijanti sa *Trichoderma asperellum* utvrđeno je povećanje sveže materije za 55,1%, a suve materije za 87,1%. U varijanti gde je bila primenjena aktinomiceta *Streptomyces* sp. A3 prinos sveže materije biljaka smanjio se za 14,7%, a prinos suve materije povećao za 22,6%.

Na ukupni prinos sveže i suve mase engleskog ljujla najbolji efekat imala je primena *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1. Ukupan prinos sveže mase biljaka inokulisanih sa *Pseudomonas* sp. P12 bio je za 61,3% veći u odnosu na kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 87,2%. Prinos sveže materije biljaka inokulisanih sa *Bacillus* sp. B1 bio je za 42%, a prinos suve materije za 94,7% veći u odnosu na kontrolu. Prinos sveže materije biljaka inokulisanih *Trichoderma asperellum* bio je za 18,6% veći u odnosu na kontrolu, dok je prinos suve materije bio veći za 29,3%. Efekat primene *Streptomyces* sp. A3 u trećoj godini imao je negativan efekat na prinos sveže i suve materije. Prinos sveže materije biljaka bio je za 10,6%, a prinos suve materije za 6,0% manji u odnosu na kontrolu.

U trećoj godini istraživanja, primenjeni inokulanti različito su uticali na dužinu nadzemnog dela i korena engleskog ljujla (Tabela 35).

Tabela 35. Dužina nadzemnog dela (nadz.) i korena engleskog ljlja (cm) u III godini istraživanja

otkos	Biljka	kontrola	<i>Pseudomonas</i> sp. P12	<i>Bacillus</i> sp. B1	<i>Streptomyces</i> sp. A3	<i>Trichoderma</i> <i>asperellum</i>
I	Nadz.	24,0 ^c	34,5 ^a	28,5 ^d	29,0 ^d	26,5 ^b
	Koren	3,85 ^b	6,34 ^a	3,5 ^b	4,1 ^b	4,3 ^b
II	Nadz.	26,7 ^{cb}	34,0 ^b	25,9 ^c	14,75 ^a	27,7 ^{cb}
	Koren	1,9 ^{ab}	2,7 ^{ab}	3,16 ^b	1,1 ^a	3,4 ^b
III	Nadz.	32,0 ^d	39,16 ^a	28,7 ^d	23,3 ^c	33,6 ^d
	Koren	4,0 ^a	4,5 ^a	3,75 ^a	3,16 ^a	4,0 ^a
Prosek	Nadz.	27,5	35,9	27,7	22,35	29,2
Prosek	Koren	3,25	4,5	3,45	2,8	3,9

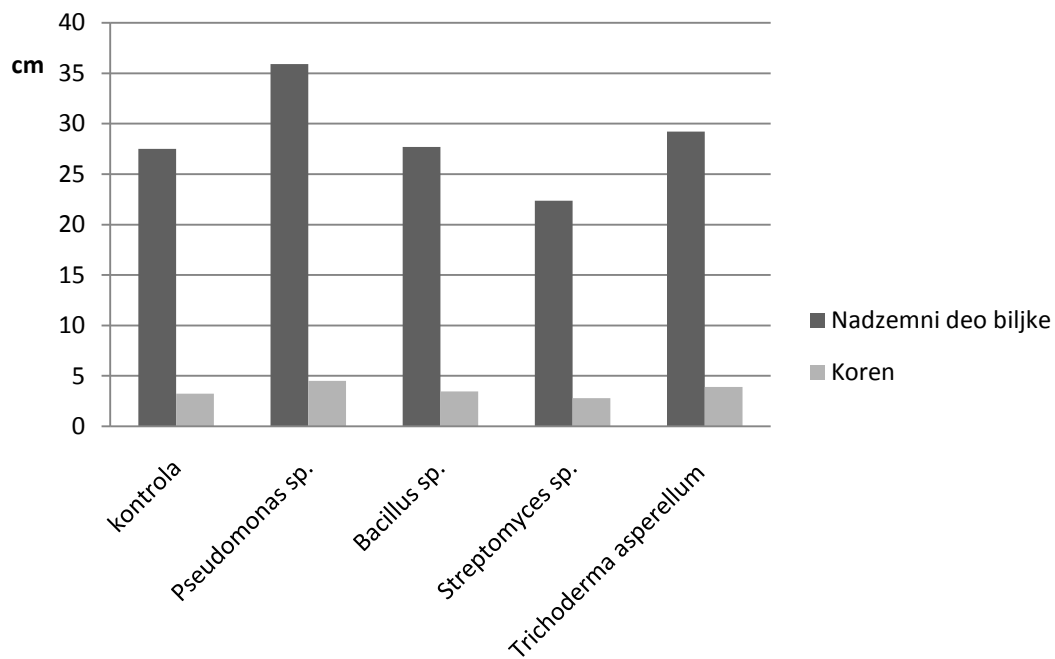
* Vrednosti sa različitim slovnim oznakama u superskriptu se prema Fišerovom testu statistički značajno razlikuju za $P < 0,05$

Nakon prvog otkosa, najveća dužina nadzemnog dela biljke utvrđena je u varijanti gde je bila primenjena bakterija *Pseudomonas* sp. P12. I u ostalim varijantama utvrđeno je statistički značajno povećanje dužine nadzemnog dela biljke. Samo je primena bakterije *Pseudomonas* sp. P12 dovela do statistički značajnog povećanja dužine korena biljke.

Nakon drugog otkosa, u varijantama gde su bili primenjeni *Pseudomonas* sp. P12 i *Trichoderma asperellum*, utvrđeno je povećanje dužine nadzemnog dela biljke, ali to povećanje nije bilo statistički značajno. U varijanti sa primenjenom aktinomicetom *Streptomyces* sp. A3 utvrđeno je statistički značajno smanjenje dužine nadzemnog dela. Primenjeni tretmani nisu statistički značajno uticali na promenu dužine korena biljke.

Nakon trećeg otkosa, utvrđeno je da je primena *Pseudomonas* sp. P12 imala pozitivan efekat na povećanje dužine nadzemnog dela engleskog ljlja, dok je u varijanti gde je bila primenjena aktinomiceta *Streptomyces* sp. A3 utvrđeno statistički značajno smanjenje. Promene u dužini korena u svim varijantama, nakon trećeg otkosa, nisu bile statistički značajne.

U proseku, i u trećoj godini istraživanja, biljke u varijanti gde je bio primenjen *Pseudomonas* sp. P12, su imale najduži nadzemni deo biljke i koren (Grafik 13). Primena *Streptomyces* sp. A3 imala je negativan uticaj na rast i razvoj biljke, te je u ovoj varijanti u odnosu na kontrolu došlo do smanjenja dužine nadzemnog dela i korena biljke.



Grafik 13. Uticaj inokulacije na dužinu nadzemnog dela i korena biljke u III godini istraživanja

7. DISKUSIJA

7.1. Karakterizacija mikroorganizama iz rizosfere engleskog ljulja

Prilikom ispitivanja mikroorganizama sa potencijalnim PGP osobinama, najčešće se izvode sledeći biohemijski testovi: produkcija biljnih hormona (auksina, giberelina i citokinina); produkcija ACC-deaminaze; solubilizacija fosfata; produkcija siderofora; test za ispitivanje sposobnosti fiksiranja azota; i sposobnost produkcije enzima za degradaciju ćelijskog zida raznih biljnih patogena (hitinaza) (Ogram, 2000; Prosser, 2002). Međutim, rezultati dobijeni u laboratorijskim uslovima, ne moraju važiti i za gnotobiotičke, poljske uslove. Utvrđeno je da pojedini PGP mikroorganizmi u laboratorijskim uslovima ispolje neku osobinu, ali ne i u rizosferi biljke.

Pseudomonas sp.

U ovim istraživanjima iz rizosfere engleskog ljulja izolovano je dvanaest bakterija za koje je smatrano da pripadaju rodu *Pseudomonas*. Izdvojene su one kolonije koje su pod UV svetlošću (365nm) fluorescirale. Kolonije su nekoliko puta rekultivisane na King-B podlozi, da bi se dobile čiste kulture. Kolonije su bile okrugle, krem boje sa ravnom, do blago zupčastom ivicom, glatke i sjajne. Nakon bojenja po Gramu, utvrđeno je da su bakterije Gram- negativne, štapićaste, bez spora. Sve izdvojene kolonije su na osnovu morfoloških karakteristika kolonije razvrstane u tri grupe. Za dalja istraživanja odabran je po jedan reprezentativan predstavnik iz svake grupe (P1, P9, P12).

Za ispitivanje odnosa izolata prema izvoru ugljenika, odabrano je šest šećera (glukoza, galaktoza, fruktoza, saharoza, laktoza, ksiloza). Jedna od taksonomskih karakteristika bakterija roda *Pseudomonas* jeste da oni ne fermentišu glukozu, već da je oksiduju u aerobnim uslovima. U ovim istraživanjima, sva tri izolata su oksidovala glukozu, kao i galaktozu, fruktozu, saharozu i ksilozu, što se manifestovalo promenom boje podloge iz plave u žutu. Nijedan izolata nije oksidovao laktozu. Ovo je u skladu sa rezultatima istraživanja Blažević et al. (1972) gde je

utvrđeno da od petnaest izolata *P. fluorescens* nijedan izolat nije oksidovao laktozu. Slično ovim rezultatima, u radu Gangwar and Kaur (2009), izolati *P. fluorescens* nisu oksidovali laktozu, ali je zato pozitivna reakcija utvrđena kod glukoze i saharoze. Takođe, Maleki et al. (2010) navode da su izolati roda *Pseudomonas* oksidovali arabinozu, trehalozu i galaktozu. Za razliku od ovih istraživanja, u radu Mehnaz et al. (2009), od sedam ispitivanih izolata bakterija roda *Pseudomonas*, samo je jedan izolat oksidovao saharozu, arabinozu i ksilozu, a šest izolata je oksidovalo samo šećer manozu. U istraživanjima Rubin et al. (2012) ispitivani izolat *P. fluorescens* nije oksidovao glukozu, laktozu, dekstrozu i saharozu. Karnwal (2009) navodi da su svih trideset izolata kao izvor ugljenika koristili glukoze, manitol, fruktozu, arabinozu, trehalozu, ksilozu i škrob.

Sva tri izolata roda *Pseudomonas* su imala optimalan rast na podlogama čija je pH bila 5, 6 i 7, dok na podlozi sa pH 4, nijedan izolat nije rastao. Za razliku od ovih istraživanja, Mehnaz et al. (2009) su utvrdili da je od sedam ispitivanih izolata, 4 imalo optimalan rast na pH 11, a tri na pH 3.

Na podlogama sa 3% i 5% NaCl, svi izolati su imali optimalan rast, dok je na podlozi sa 7% NaCl optimalan rast imao samo izolat P9. Slično ovim rezultatima, u radu Karagoz et al. (2012), od 17 ispitivanih izolata roda *Pseudomonas*, svi izolati su imali optimalan rast na podlozi sa 3 i 5% NaCl, a samo jedan izolat je rastao i na podlozi sa 7% NaCl. Mehnaz et al. (2009) su utvrdili da je od sedam ispitivanih izolata, šest izolata raslo na podlozi sa 5% NaCl.

Svi izolati su imali optimalan rast na temperaturama 13, 28 i 37°C, a minimalan rast utvrđen je na temperaturama 3 i 45°C. Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima Nathan et al. (2011) gde je utvrđeno da je od 14 ispitivanih izolata roda *Pseudomonas*, polovina rasla na temperaturi od 41°C, a svi su imali optimalan rast na 4°C. U radu Blažević et al. (1972), od 52 izolata roda *Pseudomonas*, 19 izolata je raslo na temperaturi 4°C, 20 na temperaturi 42°C, a svi su imali optimalan rast na temperaturi od 35°C.

Na rast ispitivanih izolata nijedan od primenjenih metala (Mn, Cd i Pb) nije imao inhibitorski uticaj. Slično ovim rezultatima, u radu Đurić et al. (2011), na ispitivane izolate *Pseudomonas* sp. najtoksičniji efekat imala je primena žive i kadmijuma, a najslabiji efekat imala je primena cinka.

Primenjeni antibiotici su različito uticali na rast izolata. Utvrđena je potpuna rezistentnost izolata P1 i P12 na antibiotike ampicilin (10 i 25 i.j.) i eritromicin (5 i 15 i.j.), i izolata P9 na

antibiotik eritromicin (5 i 15 i.j.). Na ispitivane izolate najveći inhibitorni uticaj imala je primena antibiotika streptomycin (300i.j.), kanamicin i neomicin (30i.j.). U ovim slučajevima izmerene su zone inhibicije veće od 5 i 10 mm. Kod ostalih antibiotika, zone inhibicije bile su manje od 5 mm. Ovo je u skladu sa istraživanjima Blažević et al. (1972), gde je od petnaest izolata *P. fluorescens*, 12 bilo osetljivo na antibiotik kanamicin, a čak 14 izolata je pokazalo rezistentnost prema hloramfenikolu. U istraživanjima Đurić et al. (2011), ispitivani izolati su pokazali različitu rezistentnost prema antibioticima, a što je zavisilo od koncentracije i vrste antibiotika. Nijedan od ispitivanih izolata nije rastao na podlozi sa 100 µg/ml gentamicina, a najveća rezistentnost pokazana je prema ampicilinu. Takođe u radu Mehnaz et al. (2009), ispitivani izolati su pokazali različitu rezistentnost prema antibioticima. Od sedam izolata, četiri je bilo rezistentno na tetraciklin (25 µg/ml), pet na streptomycin (100 µg/ml) i četiri na gentamicin (25 µg/ml). U istraživanjima Gangwar and Kaur (2009), jedan izolat je bio rezistentan prema penicilinu i oksitetraciklinu, dok je rast drugog izolata bio inhibiran u prisustvu hloramfenikola, penicilina, gentamicina, streptomicina i oksitetraciklina.

Prilikom ispitivanja uticaja različitih pesticida na rast izolata roda *Pseudomonas*, utvrđeno je da preporučene koncentracije sva tri pesticida nemaju inhibitorno delovanje. Koncentracije sva tri pesticida deset puta veće od preporučene, inhibitorno su uticale na rast svih izolata, osim izolata P9, kod koga je pri ovoj koncentraciji, utvrđena rezistentnost na pesticid metribuzin i bentazon. Koncentracija ispitivanih pesticida sto puta veća od preporučene, inhibirala je rast izolata roda *Pseudomonas*.

Pri ispitivanju biohemijskih osobina, utvrđeno je da sva tri izolata produkuju enzim ureazu, što je potvrđeno pojavom crvenkaste boje indikatora u hranljivoj podlozi. Želatinozna aktivnost, koja se manifestuje otapanjem želatina, utvrđena je samo kod izolata P12. Ni kod jednog izolata nije utvrđena sposobnost produkcije vodonik-sulfida, što je detektovano odsustvom mrke boje filter papira, niti enzima amilaze i pektinaze, što se uočava odsustvom providnih zona oko aktivnih kolonija. Sposobnost razlaganja lipida utvrđena je kod izolata P1 i P12, a celulazna aktivnost kod izolata P12 i P9. Svi izolati su koristili citrat kao izvor energije, što je u skladu sa rezultatima istraživanja Sakthivel and Karthikeyan (2012) i Joseph et al. (2007). Slično rezultatima ovih istraživanja, u istraživanjima Karagoz et al. (2012), nijedan od sedamnaest izolata nije hidrolizovao skrob, za razliku od istraživanja Arwiyanto et al. (2007), koji tvrdi da je sposobnost hidrolize skroba specifična osobina svih gram negativnih bakterija.

Takođe i u radu Sakthivel and Karthikeyan (2012) od 35 izolata roda *Pseudomonas* nijedan nije hidrolizovao skrob, a osamnaest njih je razlagalo želatin. Za razliku od ovih istraživanja, u radu Joseph et al. (2007) svi ispitivani izolati roda *Pseudomonas* su proizveli vodonik-sulfid, enzime amilazu i želatinazu. U istraživanjima Meera and Balabaskar (2012), od 35 izolata *P. fluorescens* svi su imali sposobnost razlaganja želatina, a ni kod jednog izolata nije utvrđena aktivnost enzima amilaze. Maleki et al. (2010) navode da su kod izolata roda *Pseudomonas* utvrdili aktivnost enzima želatinaze, dok je aktivnost pektinaze izostala. U istraživanjima Nathan et al. (2011), od četrnaest ispitivanih izolata, kod sedam izolata je utvrđena želatinozna aktivnost. Soesanto et al. (2011) su ispitivali biohemijske karakteristike jednog izolata *Pseudomonas fluorescens* P60, i utvrdili da izolat ima sposobnost produkcije enzima želatinaze i amilaze, ali ne i lipaze. Rubin et al. (2012) navode da je ispitivani izolat *P. fluorescens* imao sposobnost produkcije ureaze, želatinoze, amilaze i lipaze. U istraživanjima Đurić et al. (2011), polovina ispitivanih izolata imala je ureaznu aktivnost, dok želatinozna, pektinazna i celulazna aktivnost nije utvrđena ni kod jednog izolata. U istim istraživanjima od tri ispitivana izolata, kod dva izolata je utvrđena sposobnost produkcije enzima lipaze. Ahmad et al. (2005) navodi da nijedan od jedanaest izolata *Pseudomonas* sp. nije proizveo vodonik-sulfid, što je u skladu sa rezultatima ovih istraživanja. U radu Yoshikawa et al. (1974) *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* je pokazala celulaznu aktivnost. Međutim, utvrđeno je da nemaju svi sojevi *P. fluorescens* sposobnost produkcije celulaze.

U mnogobrojnim dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da se bakterije roda *Pseudomonas* mogu uspešno koristiti u suzbijanju bolesti izazvanih patogenim gljivama (Pant and Mukhopadhyay, 2001). U ovim istraživanjima ispitivana je sposobnost produkcije materija koje bi delovale inhibitory na rast gljiva. Utvrđeno je da nijedan od izolata nije bio u antagonističkom odnosu sa ispitivanim gljivama. Za razliku od ovih rezultata, u istraživanjima Đurić et al. (2011) tri od šest izolata je pokazalo antagonističko delovanje prema ispitivanim gljivama. Meka and Balabaskar (2012) navode da su svih 35 ispitivanih izolata imala inhibitory dejstvo na rast gljive *S. orizae*, pri čemu je maksimalna inhibicija bila 93,3%. Takođe, u radu Rubin et al. (2012) utvrđen je antagonistički uticaj ispitivanih izolata *P. fluorescens* na rast gljiva *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternate* i *Erysiphe cruciferarum*.

U ovim istraživanjima ispitivane su i pojedine PGP-osobine izolata. Utvrđeno je da sva tri izolata proizvode indol-sirćetnu kiselinu (IAA) u podlozi bez dodatka L-triptofana. U tom

slučaju, najveća produkcija IAA utvrđena je kod izolata P9. U podlogama sa dodatim L-triptofanom (200 i 500 L triptofan $\mu\text{g/ml}$), nakon 24 i 48h, najveća produkcija IAA utvrđena je kod izolata P12, u oba slučaja. Sva tri izolata produkuju siderofore, pri čemu su najveći producenti siderofora izolati P1 i P9, gde je nakon pet dana izmerena širina zone bila veća od 20 mm. Produkcija HCN i egzopolisaharida utvrđena je kod izolata P1 i P9, dok je kod izolata P12 utvrđena oskudna produkcija egzopolisaharida i potpuno odsustvo produkcije HCN-a. Sva tri izolata razlažu organska jedinjenja fosfora, dok je sposobnost razlaganja neorganskih jedinjenja fosfora utvrđena samo kod izolata P1. Slično ovim rezultatima, u istraživanjima Joseph et al. (2007), svi izolati su produkovali IAA, a 26 izolata od 35 je produkovalo siderofore. U istraživanjima Gangwar and Kaur (2009) izolati roda *Pseudomonas* su u odnosu na izolate roda *Bacillus* i *Azotobacter* bili veći producenti siderofora i IAA. Takođe i u radu Sakthivel and Karthikeyan (2012), svi izolati roda *Pseudomonas* su bili veći producenti IAA u odnosu na izolate roda *Bacillus*, *Azotobacter* i *Azospirillum*. Arwiyanto et al. (2007) su utvrdili da fluorescentni pseudomonasi imaju sposobnost da vezuju jone Fe. Prema Philson and Llinas (1981), *P. fluorescens* formira siderohrom feribactin i pijoverdin na podlozi sa citratom i EDTA. Osim što ima sposobnost da vezuje Fe, *P. fluorescens* može da vezuje i druge jone, posebno u nepovoljnim uslovima. O'Sullivan and O'Gara (1992) su utvrdili da kompeticija za supstrat između *Pseudomonas* sp. sa patogenima zavisi pre svega od raspoloživih hranljivih materija u zemljištu. U istraživanjima Đurić et al. (2011), od šest ispitivanih izolata *Pseudomonas* sp. pet izolata je produkovalo IAA, kod polovine je utvrđena sposobnost produkcije siderofora, a nijedan izolat nije produkovao HCN. U istim istraživanjima, polovina ispitivanih izolata je razlagalo neorganska jedinjenja fosfora. Bhatia et al. (2008) su utvrdili da je od deset ispitivanih izolata roda *Pseudomonas*, tri izolata produkovalo siderofore, dva HCN, šest izolata je produkovalo IAA, a tri je solubilizovalo fosfate.

Na osnovu morfoloških, fiziološko-biohemijskih, kao i PGP osobina koje su izolati pokazali, te na osnovu rezultata mnogobrojnih dosadašnjih istraživanja, može se pretpostaviti da izolati P1 i P9 verovatno pripadaju vrsti *Pseudomonas putida*, a izolat P12 *Pseudomonas fluorescens*. Detaljnija karakterizacija biće izvršena metodama molekularne biologije [sekvenciranje 16S rDNA, ITS regiona (intergenic 16S-23S internally transcribed spacer regions) HKG (house keeping genes: rpoB, rpoD, gyrB, recA, carA...)].

***Bacillus* sp.**

Iz rizosfere engleskog ljulja izdvojeno je, na osnovu morfoloških karakteristika kolonija, dvadeset bakterija za koje je smatrano da pripadaju rodu *Bacillus*. Izdvojene kolonije su nekoliko puta rekultivisane na L-agaru, da bi se dobile čiste kolonije. Kolonije su nepravilne sa talasastim ivicama i okrugle sa ravnim ivicama, površinske i naborane. Imaju Gram-pozitivne, štapićaste ćelije koje formiraju spore. Svi izolati su na osnovu morfoloških karakteristika razvrstani u grupe, a potom je za dalje ispitivanje odabrano tri reprezentativna izolata (B1, B3 i B6).

Sva tri izolata *Bacillus* sp. su oksidovala glukozu, fruktozu, a izolati B1 i B3 još i ksilozu. Nijedan od ispitivanih izolata nije koristio galaktozu, saharozu i laktozu. Slično ovim rezultatima, u istraživanjima Gangwar and Kaur (2009), sva tri ispitivana izolata roda *Bacillus* su kao izvor ugljenika koristili glukozu, dva od njih galaktozu, a po jedan izolat je koristio manitol, galaktozu i ksilozu. Takođe, Joo et al. (2007) su utvrdili da je od sedam izolata *Bacillus* sp. samo jedan izolat koristio galaktozu i ksilozu kao izvor ugljenika, svi su koristili glukozu, a nijedan galaktozu.

Svi ispitivani izolati roda *Bacillus* imali su optimalan rast na podlozi pH 6 i 7, a na podlogama sa pH 4 i 5 nijedan izolat nije rastao. Osmotski pritisak je takođe uticao na rast ovih izolata. Utvrđeno je da su svi izolati imali optimalan rast na podlogama koja je sadržavala 3 i 5% NaCl, dok je na podlozi sa 7% NaCl optimalan rast imao samo izolat B1, minimalan rast izolat B6, a izolat B3 nije rastao na ovoj podlozi. U odnosu na temperaturu, svi izolati su ispoljili istu sposobnost. Svi izolati su imali optimalan rast na temperaturi od 13, 28 i 37 °C, minimalan rast utvrđen je na temperaturi 45°C, a nijedan izolat nije rastao na temperaturi od 3°C. Slično ovim rezultatima, Myeong-Hoon et al. (2007) su utvrdili da su izolati *Bacillus* sp. imali optimalan rast na podlogama pH 6-9, da je minimalan rast bio na pH 5 i pH 10. U istraživanjima Karagoz et al. (2012), utvrđeno je da je optimalna koncentracija NaCl za rast izolata *Bacillus* sp. iznosila 5 i 7%.

Uticaj teških metala na rast izolata *Bacillus* sp. bio je različit, i zavisio je od vrste i koncentracije metala. Samo je kadmijum imao inhibitorski uticaj na rast ispitivanih izolata, i to u svojoj najvećoj koncentraciji, gde su izmerene zone inhibicije bile veće od 5 (B1 i B6) i 10 mm (B3). Slično ovim istraživanjima, u radu Joseph et al. (2007) ispitivana je tolerancija izolata

bacilusa prema teškim metalima: živa, kobalt, kadmijum, bakar, olovo, cink i hrom. Utvrđeno je da su uzolati bili najosetljiviji prema kadmijumu, živi i kobaltu, a da su najveću otpornost pokazali prema olovu.

U ovim istraživanjima ispitivana je i otpornost izolata na određene antibiotike. Utvrđeno je da su antibiotici neomicin (30 i.j.), eritromicin (15i.j.), streptomycin (300 i.j.), hloramfenikol i kanamicin imali najveće inhibitorno dejstvo na rast izolata. Izolat B3 pokazao je potpunu rezistentnost na antibiotik ampicilin (10 i 25 i.j.). Najveća zona inhibicije izmerena je za antibiotike streptomycin (300i.j.) i hloramfenikol kod izolata B6. Najslabiji uticaj na rast izolata imali su antibiotici ampicilin, neomicin (10i.j.) i eritromicin (5i.j.). Slično ovim istraživanjima, i u radu Joo et al. (2007) od sedam izolata *Bacillus* sp. samo je jedan izolat bio rezistentan na antibiotik kanamicin i novobiocin. Takođe u istraživanjima Gangwar and Kaur (2009), jedan izolat je bio rezistentan na hloramfenikol i ampicilin, dok drugi nije.

Ispitivani pesticidi različito su uticali na izolate. Preporučene doze pesticida nisu uticale na rast izolata, a najveće inhibitorno dejstvo utvrđeno je pri koncentraciji 100 puta većoj od preporučene kod metribuzina i oksifluorfena. Pesticid bentazon je najslabije uticao na rast izolata. Pri koncentraciji 100 puta većoj od preporučene utvrđeno je i stimulatívno dejstvo na rast izolata B1.

Utvrđeno je da svi izolati *Bacillus* sp. imaju sposobnost produkcije enzima ureaza, želatinaza, lipaza, i da kao izvor energije mogu koristiti citrat. Izolati B3 i B6 hidrolizuju skrob, a samo izolat B6 razlaže celulozu. Nijedan od ispitivanih izolata ne produkuje vodonik-sulfid i enzim pektinazu. Slično ovim rezultatima, Joseph et al. (2007) su utvrdili da su svih četrdeset izolata *Bacillus* sp. hidrolizovali skrob i želatin, i koristili citrat kao izvor energije. Takođe, u istim istraživanjima je utvrđeno da nijedan izolat nije produkovao vodonik-sulfid, što je uskladu sa rezultatima istraživanja ovog rada. U radu Karagoz et al. (2012) od 23 izolata roda *Bacillus*, četrnaest izolata je hidrolizovalo skrob. Mishra et al. (2010) navode da izolati *Bacillus* sp. produkuju enzime ureazu i želatinazu, ali da ne koriste citrate. Za razliku od ovih istraživanja, Sakthivel and Karthikeyan (2012) su utvrdili da svi ispitivani izolati bacilusa hidrolizuju skrob i želatin, nijedan ne produkuje ureazu, a od 30 izolata, 17 koristi citrat kao izvor energije.

Upotreba antibiotik-produkujućih bakterija u kontroli fitopatogenih gljiva, u poslednje vreme tema je mnogobrojnih istraživanja (Raaijmakers et al., 2002). Prednosti ovakvog načina supresije patogenih gljiva u odnosu na primenu hemijskih sredstava su brojna. U ovim

istraživanjima ispitivan je odnos izolata prema pojedinim gljivama. Utvrđeno je da postoji antagonistički odnos između izolata B1, i to prema gljivama *Fusarium* sp. i *Aspergillus flavus*. Ostali izolati nisu pokazali inhibitorno dejstvo na rast gljiva. I u radu Calvo et al. (2010) ispitivan je odnos izolata bacilusa prema gljivama *Rhizoctonia solani* i *Fusarium solani*, i pri tom je utvrđeno da je od 47 ispitivanih izolata, 45 inhibitorno uticalo na rast *R. solani*, a 41 na *F. solani*. Slične rezultate dobili su i Asaka and Shoda (1996), koji su utvrdili da *Bacillus subtilis* RB14 inhibitorno utiče na rast *R. solani*. U istraživanjima Matar et al. (2009), od četrnaest ispitivanih izolata bacilusa, šest je imalo antagonistički efekat na *F. oxysporum*.

Najveći producent IAA je izolat B3, gde su izmerene količine IAA bile i do 3 puta veće u odnosu na ostale izolate. Najveća količina produkovane IAA izmerena je nakon 48 h u varijantigde je bilo dodato 500 µg/ml L-triptofana. U odnosu na izolate *Pseudomonas* sp., izolati bacilusa su u proseku bili bolji producenti IAA. Ovo je u skladu sa rezultatima Gangwar and Kaur (2009), koji su takođe utvrdili veću produkciju IAA kod izolata bacilusa u odnosu na pseudomonase. Međutim, u istraživanjima Sakthivel and Karthikeyan (2012) utvrđena je veća produkcija IAA kod izolata pseudomonasa u odnosu na izolate bacilusa. U istraživanjima Joseph et al. (2007), svih četrdeset izolata roda *Bacillus* je produkovalo IAA.

Svi ispitivani izolati roda *Bacillus* su produkovali HCN i egzopolisaharide, a nijedan nije produkovao siderofore. Sposobnost da solubilizuju fosfate imaju izolati B1 i B3, a sposobnost da razlažu organska jedinjenja fosfora utvrđena je kod izolata B1 i B6. Za razliku od ovih istraživanja, u radu Joseph et al. (2007) nijedan izolat bacilusa nije produkovao cijanovodonik, a samo je 5 od ukupno 40 ispitivanih izolata produkovalo siderofore. U istraživanjima Wahyudi et al. (2011), svih 12 izolata bacilusa su produkovali siderofore, a 11 izolata je i vršilo solubilizaciju foafata. Calvo et al. (2010) navode da je od 47 izolata bacilusa, 25 izolata je rastvaralo fosfate. Prema rezultatima istraživanja Mishra et al. (2010), izolat bacilusa je solubilizovao trikalcijum fosfate, ali nije utvrđena produkcija siderofora. U radu Gangwar and Kaur (2009) od tri izolata bacilusa, dva izolata su produkovala siderofore.

Na osnovu morfoloških, fiziološko-biohemijskih i PGP osobina koje su izolati pokazali, kao i na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja u zemlji i u svetu, može se pretpostaviti da izolati B1, B3 i B6, verovatno pripadaju vrsti *Bacillus subtilis*. Determinacija izolata biće izvršena molekularnim metodama.

Actinomycetes

U ovim istraživanjima ispitivane su morfološke, biohemijske i PGP osobine aktinomiceta iz rizosfere engleskog ljulja. Kolonije aktinomiceta su končaste, okrugle ili nepravilnog oblika sa talasastim ivicama, hrapave površine, različitih boja. Od svih opisanih kolonija aktinomiceta, za dalja istraživanja odabrana su tri reprezentativna izolata (A1, A2, A3).

Ispitivane aktinomicete oksidovale su glukozu i galaktozu. Izolati A1 i A3 su oksidovali i fruktozu, saharozu i ksilozu, ali nisu laktozu, za razliku od izolata A2. Slično ovim rezultatima, u radu Suneetha et al. (2011) utvrđeno je da su izolati aktinomiceta koristili glukozu, ksilozu, laktozu, kao izvor energije, a da nijedan izolat nije koristio saharozu. Takođe, u radu Abbas (2006), ispitivani izolati aktinomiceta su koristili fruktozu, galaktozu, glukozu, saharozu, ali ne i ksilozu. U istraživanjima Georg et al. (1964), od dvanaest izolata aktinomiceta, svi su oksidovali glukozu, a samo polovina ksilozu. Za razliku od ovih istraživanja, u radu Varghese et al. (2012) utvrđeno je da je najveći broj izolata (94,44%) aktinomiceta iz kiselog zemljišta koristio ksilozu kao izvor energije, a najmanji broj laktozu. U radu Moncheva et al. (2002), dva od šest ispitivanih izolata, su koristili saharozu, dok su svi izolati koristili galaktozu i ksilozu. Svi ovi rezultati ukazuju na to da aktinomicete koriste različite šećere kao izvor energije, i da u tom smislu nisu specifično vezane za određeni izvor. Strzelczyk (1981) je utvrdio nespecifičnost aktinomiceta prema izvoru ugljenika.

Aktinomicete su brojnije u neutralnim i alkalnim zemljištima. U radu Williams i Wellington (1982), brojnost aktinomiceta u kiselom zemljištu bila je niska. Milošević i sar.(2003) su utvrdili da je zastupljenost aktinomiceta najveća u zemljištu čija je vrednost pH od umereno alkalne do neutralne, dok je u kiselom zemljištu zastupljenost ove grupe mikroorganizama mala. Svi ispitivani izolati imali su optimalan rast na podlozi pH 6 i 7, dva izolata rasla su i na podlozi pH 5, dok nijedan izolat nije rastao na podlozi čija je pH bila 4. Ovi rezultati su u skladu sa Abbas (2006) koji je utvrdio da je optimalna pH za rast aktinomiceta 7-8. Izolati aktinomiceta imali su optimalan rast na podlogama sa 3 i 5% NaCl. Na podlozi sa 7%NaCl dva izolata (A2 i A3) su imala minimalan rast, dok je rast izolata A1 na ovoj podlozi bio stimulisan. Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima Abbas (2006). On je u svom radu utvrdio veliku toleranciju

aktinomiceta prema koncentraciji NaCl. Pojedini izolati rasli su na podlogama koje su imale od 0-20 % NaCl. Za razliku od ovih istraživanja, u radu Moncheva et al. (2002), optimalan rast aktinomiceta utvrđen je na podlogama koje su sadržavale manji procenat NaCl (1,5; 3 i 5 %), dok na podlogama sa 7, 15 i 20 % NaCl nije utvrđen rast aktinomiceta.

Ispitivani izolati aktinomiceta imali su optimalan rast na temperaturi 28 i 37°C, nešto slabiji na temperaturi 13°C. Na temperaturama od 3 i 45 °C, nijedan izolat nije rastao. Ovo je u skladu sa istraživanjima Suneetha et al. (2011), koji su takođe utvrdili optimala rast aktinomiceta na temperaturi od 37°C, a minimalan rast ili potpuno odsustvo rasta na temperaturama od 4 i 45 °C. Abbas (2006) je utvrdio da je optimalna temperatura rasta aktinomiceta 25-28°C. U istraživanjima Moncheva et al. (2002), od šest ispitivanih izolata aktinomiceta, svi su rasli na temperaturi 25°C, samo jedan izolat je rastao na temperaturi od 37°C, a nijedan na temperaturi 50°C.

Utvrđeno je da su dva izolata (A1 i A3) bila rezistentna na jedan antibiotik u svojoj najslabijoj koncentraciji, ampicilin (10 i.j.). U ostalim slučajevima, izolati su pokazali različit stepen osetljivosti prema antibiotiku, što se manifestovalo kroz različite širine zone inhibicije. Najšira zona inhibicije izmerena je kod diskova sa streptomycinom (300i.j.), kanamicinom, neomicinom, a potom kod diskova sa hloramfenikolom, eritromicinom, streptomycinom (10i.j.). Najslabiji efekat na rast aktinomiceta imala je primena ampicilina i eritromicina. Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima Abbas (2006), koji je takođe utvrdio osetljivost aktinomiceta prema neomicinu i streptomycinu, a rezistentnost prema penicilinu i hlorotetraciklinu.

Svi izolati aktinomiceta produkuju ureazu, želatinazu i celulazu, a ne produkuju amilazu i pektinazu. Izolat (A2) produkuje vodonik-sulfid, a za dva izolata (A1 i A3) je utvrđena produkcija enzima lipaze. Za razliku od ovih istraživanja, u radu Moncheva et al. (2002), nijedan od šest ispitivanih izolata aktinomiceta nije hidrolizovao želatin, polovina je produkovala ureazu, a četiri izolata su razlagala skrob. U istraživanjima Abbas (2006), izolati su pokazali sposobnost razlaganja skroba i lipida, ali ne i uree. Prema Gerencser and Slack (1967), od devet ispitivanih izolata aktinomiceta, četiri je hidrolizovalo želatin, sedam je razlagalo skrob, a samo dva izolata su produkovala vodonik-sulfid. Istraživanja Alam et al. (2004) potvrdila su da izolati aktinomiceta mogu da produkuju celulazu i da pri tom razlažu celulozu na prostije šećere. U ovim istraživanjima svi izolati pokazali celulaznu aktivnost. Međutim, ispitivanje većeg broja izolata aktinomiceta dao bi bolji uvid u celulaznu aktivnost aktinomiceta. U istraživanjima

Jeffrey and Azrizal (2007) gde je ispitivan znatno veći broj izolata aktinomiceta (282), samo je 37,6% izolata razlagalo celulozu. Celulaznu aktivnost dva izolata aktinomiceta, od pet izolovanih, utvrdili su i Gopalakrishnan et al. (2011).

U ovom radu ispitivane su i pojedine PGP osobine izolata aktinomiceta. Utvrđeno je da su izolati aktinomiceta znatno slabiji producenti IAA u odnosu na izolate bakterija roda *Pseudomonas* i *Bacillus*. Izolati su produkovali veću količinu IAA u medijumu sa dodatim L-triptofanom. Količina produkovane IAA od strane izolata rasla je sa vremenom, tako da su izmerene veće vrednosti količine IAA nakon četrnaest dana u odnosu na vrednosti koje su izmerene nakon sedam dana od postavljanja ogleada. Slično ovim rezultatima, u istraživanjima Khamna et al. (2010), ispitivana je sposobnost produkcije aktinomiceta izolovanih iz rizosfere različitih biljaka. Utvrđeno je da je od 270 izolata, trideset produkovalo IAA. I u ovim istraživanjima, bolja produkcija IAA bila je u podlozi gde je bio dodat L-triptofan. U radu Gopalakrishnan et al. (2011), od pet ispitivanih izolata, četiri je produkovalo IAA, od kojih je jedan izolat produkovao značajnu količinu IAA.

Za ispitivane izolate utvrđeno je da ne solubilizuju neorganske fosfate, samo je po jedan izolat produkovao siderofore (A2) i vodonik-cijanid (A3), a dva izolata (A1 i A2) su razlagala organski fosfor. U istraživanjima Gopalakrishnan et al. (2011), svih pet ispitivanih izolata je pokazalo sposobnost produkcije siderofora, pri čemu su izmerene zone bile u opsegu 4-6 mm, a kod jednog izolata zona je bila širine veće od 7mm. U istom radu, svi ispitivani izolati su produkovali HCN. U istraživanjima Khamna et al. (2010) 17% od ukupnog broja ispitivanih izolata je produkovalo siderofore na hrom-azurool podlozi. Prema Hamdali et al. (2008), od osam ispitivanih izolata aktinomiceta, pet je produkovalo IAA, a svi izolati su produkovali siderofore.

Različite boje kolonija izolata sugerišu da raspoložemo različitim grupama aktinomiceta. Međutim, Lo et al (2002) navode da aktinomicete koje imaju različitu boju kolonije mogu pripadati istom rodu ukoliko imaju iste ostale morfološke i fiziološke karakteristike.

Trichoderma asperellum

Trichoderma asperellum ima septiranu hifu i formira konidije. Kolonija je okrugla sa končastom ivicom, rastresite površine, zelene boje. Utvrđeno je da nema sposobnost da razlaže ureu i pektin, ali zato produkuje amilazu i celulazu. Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima Chahal et al. (1996) i Baig (2005), koji su utvrdili celulaznu aktivnost gljive *Trichoderma*

asperellum. Takođe, *Trichoderma asperellum* je pokazala antagonistički odnos prema gljivama *Fusarium* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* i *Sclerotinium* sp. Ovi rezultati su u skladu sa brojnim rezultatima (De Ceuster and Hoitink 1999; Tondje et al. 2007), koji potvrđuju sposobnost gljive da različitim mehanizmima uspori ili u potpunosti inhibira rast i razvoj patogenih gljiva.

Rezultati istraživanja u ovom radu ukazuju na činjenicu da na osobine izolata, koje ispoljava u određenim uslovima, utiče više faktora, kao što su: ekološki uslovi koji vladaju u zemljištu, vrsta biljke iz čije je rizosfere izolovan, ali i genotip ispitivanog mikroorganizma. Zato je za kompletnu karakterizaciju izolata, pored fenotipske (određivanje morfoloških, fizioloških i biohemijskih osobina, serotipizacija, kompozicija ćelijskog zida, rezistentnost prema antibioticima, toleratnost prema teškim metalima), neophodno uraditi i molekularnu determinaciju, koja obuhvata analizu genomske DNK, tj. genotipsku karakterizaciju.

7.2. Efekat inokulacije na brojnost i dehidrogenaznu aktivnost mikroorganizama u rizosferi engleskog ljlja

U ovim istraživanjima praćen je uticaj unetih izolata na brojnost pojedinih fizioloških i taksonomskih grupa mikroorganizama.

Ukupan broj mikroorganizama u određenom ekosistemu može se smatrati jednim od glavnih pokazatelja njegove biogenosti. Mnogi autori smatraju da se na osnovu kvantitativnih razlika ukupnog broja mikroorganizama mogu prosuditi svojstva tla te njegova potencijalna i efektivna plodnost (Kalinović,1975; Insam, 2001; Jarak i Hajnal, 2006). Pod ukupnim brojem mikroorganizama se podrazumeva ustvari ukupan broj bakterija koje izrastu na zemljišnom agaru (Govedarica i Jarak, 1999). Ovi mikroorganizmi su neophodni za kruženje elemenata i od njihove aktivnosti zavise nadzemni ekosistemi (Van der Heiden et al., 1998; Ovreas, 2000). Na brojnost i aktivnost mikroorganizam utiču svojstva zemljišta, biljna vrsta, međusobni odnosi mikrobne populacije i dr.(Milošević i sar., 1997). U zavisnosti od tipa zemljišta ukupan broj bakterija se kreće od nekoliko stotina hiljada do nekoliko stotina miliona u gramu zemljišta (Govedarica i Jarak, 1995).

U ovim istraživanjima ukupan broj mikroorganizama kretao se od 5,07- 214,06 x 10⁶ apsolutno suvog zemljišta. Svi primenjeni tretmani su u toku tri godine istraživanja, i nakon

prvog i trećeg otkosa, pozitivno uticali na ukupan broj mikroorganizama, pri čemu je utvrđeno da je primena *Pseudomonas* sp. P12, *Trichoderma asperellum* i *Bacillus* sp. B1 imala najbolji efekat. Najbolji efekat postignut je u trećoj godini istraživanja, gde je ukupan broj mikroorganizama u varijanti sa primenjenom bakterijom *Pseudomonas* sp. P12 bio čak četrdeset puta veći. Ovo je u skladu sa rezultatima istraživanja Cvijanović et al. (2012) koji su utvrdili da je ukupan broj mikroorganizma bio veći u zemljištu inokulisanih varijanti. Slično, Nannipieri et al. (2003) su utvrdili pozitivan uticaj primene *Pseudomonas* sp. na ukupan broj bakterija i enzimatsku aktivnost u zemljištu. U radu Stamenov et al. (2012) utvrđen je pozitivan efekat primene *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus* sp. na ukupan broj mikroorganizama. U radu Anđelković (2012) efekat primenjenih inokulanata na ukupan broj mikroorganizama zavisio je od godine, roka uzimanja, tipa zemljišta, sorte lucerke, kao i mikrobnog inokulanta.

Gljive spadaju u heterotrofne mikroorganizme koji zahvaljujući svom diferenciranom enzimatskom sistemu imaju značajnu ulogu u zemljištu, budući da imaju sposobnost razgradnje raznovrsnih organskih supstrata. Na brojnost i aktivnost gljiva u zemljištu utiču fizičko-hemijska svojstva zemljišta, obrada zemljišta, biljna vrsta i dr. (Govedarica i sar., 1996.; Jarak i sar. 1997b). Veoma su rasprostranjeni u rizosferom zemljištu biljaka (Jarak i sar., 2008).

Primenjeni mikrobnii inokulanti su različito uticali na broj gljiva u rizosferi engleskog ljlja. U prvoj godini istraživanja, najbolji efekat postignut je primenom bakterija *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1, dok u ostalim varijantama povećanje nije bilo statistički značajno. U drugoj godini nakon prvog otkosa, u svim varijantama je utvrđeno povećanje broja gljiva, pri čemu je najveća brojnost gljiva utvrđena u varijanti sa primenjenom bakterijom *Bacillus* sp. B1. Nakon trećeg otkosa, u varijanti gde je bila primenjena *Trichoderma asperellum* utvrđeno je statistički značajno smanjenje broja gljiva. U trećoj godini najbolji efekat na broj gljiva nakon prvog i trećeg otkosa imala je primena bakterije *Pseudomonas* sp. P12 i gljive *Trichoderma asperellum*. Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima Nacamulli et al. (1997) i Schwieger and Tebbe (2000) gde je utvrđeno da introdukovani PGP mikroorganizmi mogu izazvati promene u brojnosti gljiva, ali i ne moraju. U radu Stamenov et al. (2012b) primena *Bacillus* sp. imala je pozitivan efekat na broj gljiva u rizosferi. Takođe Puppi et al. (1994), Amora-Lazcano et al. (1998) i Artursson et al. (2006) navode da je primenom inokulacije u rizosferi došlo do povećanja kako gljiva tako i drugih grupa mikroorganizama. U radu Anđelković (2012), primenjeni

inokulanti (*Rhizobium meliloti*, *Azotobacter chroococcum* и *Streptomyces* sp.) su u zavisnosti od tipa zemljišta, sorte biljke, različito uticali na broj gljiva.

Aktinomicete su heterotrofni mikroorganizmi sa razvijenim enzimatskim sistemom koji im omogućuje iskorištavanje različitih, kako jednostavnih organskih molekula (organske kiseline, šećeri), tako i kompleksnih (proteini, polisaharidi) (Alexander, 1977). Naročito im je značajna sposobnost da razlažu humus, hitin, celulozu i druge materije koje su znatno otpornije na mikrobiološku razgradnju. Aktinomicete predstavljaju grupu mikroorganizama koja je obično široko rasprostranjena u zemljištu. Po zastupljenosti u mnogim zemljištima su odmah iza pravih bakterija (Takisawa et al., 1993), pri čemu najveći broj vrsta pripada rodu *Streptomyces* (Goodfellow and Simpson, 1987).

Primenjeni mikrobnii inokulanti različito su uticali na broj aktinomiceta. Utvrđeno je da je primena gljive *Trichoderma asperellum* imala negativan uticaj na brojnost aktinomiceta, u prvoj godini nakon trećeg otkosa i u drugoj godini, nakon prvog otkosa. Ovakvi rezultati mogu da ukazuju na antagonistički odnos između inokulanta i autohtonih aktinomiceta. Pozitivan efekat imala je primena *Pseudomonas* sp. P12, *Bacillus* sp. B1 i gljive *Trichoderma asperellum* u prvoj godini istraživanja, nakon prvog otkosa, kada je utvrđeno statistički značajno povećanje broja aktinomiceta. U ostalim uzorkovanjima, promene u brojnosti aktinomiceta nisu bile statistički značajne. Ovi rezultati su u skladu sa Hajlan (2010), gde je utvrđen različit efekat primene mikrobnih inokulanata (*Azotobacter chroococcum* soj 84, *Azospirillum lipoferum* soj 2, *Klebsiella planticola* soj 4, *Beijerinckia derox* soj 4, *Anabena azolla* soj 1, *Nostoc comune* soj 1) na brojnost aktinomiceta, pri čemu je većina ispitivanih varijanti dovela do statistički značajnog smanjenja brojnosti aktinomiceta u rizosfernom zemljištu. Međutim, znatno veći broj istraživanja ukazuje da se na broj aktinomiceta primenom inokulanata može pozitivno uticati. Gharib et al. (2009) ističu pozitivan efekat primene *Phaseolus vulgaris* L., *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* i *Azotobacter chroococcum* na povećanje broja aktinomiceta u rizosfernom zemljištu. Przybulewska¹ and Sienicka (2008) navode da je nakon unošenja aktinomiceta u zemljište došlo do povećanja brojnosti ovih mikroorganizama. Takođe u radu Stamenov et al. (2011b), primenjeni mikrobiološki inokulanti (*Azotobacter chroococcum*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, *Streptomyces* sp.) su pozitivno uticali na povećanje brojnosti aktinomiceta i u kiselom zemljištu.

Aminoheterotrofi obuhvataju veliku grupu bakterija, gljiva i aktinomiceta koji učestvuju u procesu amonifikacije tj. procesu razgradnje proteina do amonijaka. Raznovrsnost i nespecifičnost aminoheterotrofa je razlog da je ova grupa mikroorganizama u zemljištu brojna. Za ovu grupu mikroorganizama je zajedničko da imaju sposobnost stvaranja ekstracelularnih proteolitičkih enzima koji uzrokuju hidrolitičku razgradnju velikih proteinskih lanaca na manje jedinice, koje ćelija može usvojiti. Prema Alexanderu (1977) broj ovih mikroorganizama u površinskim horizontima se kreće od 10^5 do 10^7 po gramu zemljišta, a njihov broj zavisi od količine i vrste supstrata, tipa zemljišta i uslova koji tu vladaju.

U ovim istraživanjima inokulanti su pozitivno uticali na brojnost aminoheterotrofa. U prvoj i drugoj godini istraživanja, primena gljive *Trichoderma asperellum* i izolata *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1, je imala najveći uticaj na brojnost aminoheterotrofa. U trećoj godini u varijantama gde su bile primene aktinomiceta *Streptomyces* sp. A3 i izolata *Pseudomonas* sp. P12 utvrđeno je najveće povećanje broja aminoheterotrofa. Ovo je u skladu sa rezultatima Hajnal (2010) gde je takođe utvrđen pozitivan uticaj primene inokulanata na broj aminoheterotrofa u rizosferi kukuruza. Za razliku od ovih rezultata, u istraživanjima Anđelković (2012) uvrđen je negativan uticaj inokulacije *Rhizobium meliloti*, *Azotobacter chroococcum* и *Streptomyces* sp. na broj aminoheterotrofa.

Oligonitrofilni su grupa slobodnih azotofiksatora koji koriste male količine nitrata i amonijačnog azota. U ovu grupu spadaju bakterije iz rodova *Azospirillum*, *Derris* i *Beijerinckia*. U zemljištima neutralne i blago kisele reakcije u jednom gramu ih ima nekoliko stotina hiljada a količina fiksiranog azota iznosi 20-60 kg (Jarak i Čolo, 2007).

U prvoj godini istraživanja, primena izolata *Pseudomonas* sp. P12 i gljive *Trichoderma asperellum* imala je najbolji efekat na broj oligonitrofila. U ostalim varijantama nije utvrđeno statistički značajno povećanje broja oligonitrofila. U drugoj i trećoj godini istraživanja, primena izolata *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1, kao i gljive *Trichoderma asperellum* dovela je do najvećeg povećanja broja ovih mikroorganizama. U ostalim varijantama, iako je došlo do povećanja broja oligonitrofila, promene nisu bile statistički značajne. Introdikovani mikroorganizmi su očigledno pozitivno uticali na broj oligonitrofila. Slično ovim rezultatima, Milić i sar. (2004) su primenom mikrobnih inokulanata uticali pozitivno na broj oligonitrofila u rizosferi pasulja. Takođe, u radu Hajnal (2010) introdukcija smeše mikroorganizama (*Azotobacter chroococcum* soj 84, *Azospirillum lipoferum* soj 2, *Klebsiella planticola* soj 4,

Beijerinckia derx soj 4, *Anabena azolla* soj 1, *Nostoc comune* soj 1) dovela je do povećanja broja oligonitrofila u rizosferi kukuruza. U radu Stamenov et al. (2012), primena gljive *Trichoderma asperellum* imala je pozitivan efekat na ukupan broj bakterija, aminoheterotrofa, ali i oligonitrofila.

Rod *Azotobacter* je najviše ispitivan od svih slobodnih azotofiksatora i jedan je od najznačajnijih rodova iz ove grupe mikroorganizama. Azotobakter se nalazi u neutralnim do slabo alkalnim zemljištima, u vodenim sredinama, u rizosferi biljaka i filosferi. Brojnost i aktivnost azotobaktera zavisi prvenstveno od pH reakcije, sadržaja humusa i lakopristupačnog fosfora (Govedarica i Jarak, 1995b). Plodna zemljišta karakteriše visoka brojnost azotobaktera. U istraživanjima Jarak i sar. (1998) brojnost azotobaktera bila je najveća u zemljištu koje je imalo najpovoljnija hemijska svojstva. Brojnost azotobaktera je veoma niska u zemljištu veće kiselosti (Čolo i Jarak, 2005), a prema rezultatima Boswell (1954), u kiselom zemljištu nema azotobaktera.

Brojnost azotobaktera u ovim istraživanjima menjala se u zavisnosti od primenjenih tretmana i godine. U prvoj godini istraživanja, svi primenjeni tretmani su statistički značajno uticali na povećanje broja azotobaktera. Najbolji efekat, nakon oba uzorkovanja, imala je primena bakterija roda *Bacillus*. U drugoj godini istraživanja, primena *Bacillus* sp. B1 i *Pseudomonas* sp. P12, dovela je do statistički značajnog povećanja broja azotobaktera. U ostalim varijantama promene u brojnosti azotobaktera nisu bile statistički značajne. U trećoj godini, nakon prvog otkosa, samo je primena *Bacillus* sp. B1 dovela do statistički značajnog povećanja broja azotobaktera. U ostalim varijantama, promene nisu bile statistički značajne. Nakon trećeg otkosa, samo u varijantama gde su bile primenjene aktinomiceta *Streptomyces* sp. A3 i gljiva *Trichoderma asperellum* utvrđeno je statistički značajno povećanje broja azotobaktera. Slično ovim istraživanjima, u radu Stamenov et al. (2012) primena *Bacillus* sp. imala je pozitivan uticaj na povećanje brojnosti azotobaktera. U radu Anđelković (2012), broj azotobaktera se statistički značajno povećao samo u varijantama gde je bio primenjen polivalentni inokulum koji je sadržavao azotobakter.

Dehidrogenaze su enzimi koji katalizuju reakciju odvajanja vodonika od različitih organskih jedinjenja tipa ugljenih hidrata, organska kiselina, alkohola, amino kiselina i njegovo prenošenje do kiseonika (aerobne dehidrogenaze) ili do organskih jedinjenja (anaerobne dehidrogenaze). Dehidrogenazna aktivnost u zemljištu je pokazatelj biološke aktivnosti mikrobne

populacije u zemljištu, jer su u zemljištu dehidrogenaze uglavnom mikrobiološkog porekla. Veća aktivnost dehidrogenaze ukazuje na veći intezitet disanja, odnosno na intezivniju mineralizaciju sveže organske materije.

U prvoj godini istraživanja, nakon prvog i trećeg otkosa, primenjeni inokulanti su pozitivno uticali na dehidrogenaznu aktivnost. Samo je nakon prvog otkosa, u varijanti gde je bila primenjena *Trichoderma asperellum* došlo do statistički značajnog smanjenja dehidrogenazne aktivnosti. U drugoj godini, nakon prvog otkosa, svi primenjeni tretmani pozitivno su uticali na dehidrogenaznu aktivnost, osim što je primena gljive dovela do smanjenja ali to nije bilo statistički značajno. Smanjenje dehidrogenazne aktivnosti u varijanti gde je introdukovana gljiva *Trichoderma asperellum*, ukazuje na antagonizam između ove gljive i autohtonih mikroorganizama. Nakon trećeg otkosa, primena inokulanata je takođe pozitivno uticala, ali te promene nisu bile statistički značajne. Kao i u prvoj i drugoj godini, i u trećoj godini primenjeni tretmani su doveli do povećanja dehidrogenazne aktivnosti, ali to povećanje nije bilo statistički značajno. Samo je primena *Pseudomonas* sp. P12 nakon prvog otkosa uticala na statistički značajno povećanje dehidrogenazne aktivnosti. Utvrđeno je da je u prvoj i drugoj godini dehidrogenazna aktivnost bila veća nakon trećeg otkosa, odnosno na kraju vegetacionog perioda biljke, dok je u trećoj godini ona bila veća nakon prvog otkosa. Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima Beresteckij et al.(1983), Jarak i sar. (1997) i Milošević et al. (1997) , koji su utvrdili povećanje dehidrogenazne aktivnosti pri bakterizaciji čistim kulturama ili njihovim mešavinama. Takođe u radu Cvijanović (2002) utvrđeno je statistički značajno povećanje dehidrogenazne aktivnosti pri bakterizaciji semena kukuruza. Za razliku od ovih istraživanja, u radu Hajnal (2010) inokulacija nije dovela do povećanja dehidrogenazne aktivnosti u rizosfernom zemljištu kukuruza. Ni jedna od ispitivanih mikrobioloških smeša nije ispoljila stimulativan efekat u odnosu na kontrolnu varijantu, koja nije bila inokulisana. To ukazuje na činjenicu da je autohtona mikrobna populacija imala veću metaboličku aktivnost u odnosu na introdukovane mikroorganizme.

Unošenjem mikroorganizama kao inokulanata u zemljište postoji mogućnost da isti utiču na autohtone mikroorganizme, ali isto tako i da inokulanti budu izloženi njihovom uticaju. Kao rezultat složenih uslova koji vladaju u zemljištu, introdukovani i autohtoni mikroorganizmi mogu stupiti u različite odnose: simbiozne, antagonističke ili neutralne. U zavisnosti od toga brojnost i aktivnost određenih grupa mikroorganizama može biti stimulisana, inhibirana ili introdukovani

mikroorganizmi mogu i da ne ostvare nikakav uticaj na strukturu autohtone populacije. Otuda i proizilazi potreba za izučavanjem strukture i aktivnosti mikrobne rizosfere nakon primene inokulanata (Dobbelaere et al., 2003).

7.3. Brojnost mikroorganizama introdukovanih vrsta u rizosferi engleskog ljulja

U ovim istraživanjima, na kraju prve i treće godine istraživanja, određivana je brojnost mikroorganizama introdukovanih grupa u rizosferi engleskog ljulja. Brojnost ovih grupa mikroorganizama u odnosu na kontrolu povećao se u svim varijantama, i to zahvaljujući onim mikroorganizmima koji su nakon introdukcije uspjeli da se adaptiraju na nove uslove. Samim tim inteziviraju se mikrobiološki procesi zbog kojih je i vršena aplikacija mikroorganizama (Dobbelaere et al., 2003). Bakterijske suspenzije stoga uvek sadrže veći broj ćelija, od 10^8 – 10^9 ćelija/ml inokuluma. Nakon introdukovanja ovako gustog inokuluma, zbog kompeticije sa autohtonim mikroorganizmima, kao i uslova koji vladaju u zemljištu, broj mikroorganizama će se brzo smanjiti sve do broja koji će biti u ravnoteži sa svojom okolinom. U sterilnom zemljištu, gde su uklonjeni svi autohtoni mikroorganizmi, brojnost unetih mikroorganizama će se održati na 10^7 – 10^8 ćelija/g zemljišta nedeljama. U ovim istraživanja, u odnosu na kontrolu, do najvećeg povećanja brojnosti mikroorganizama introdukovanih grupa imala je *Trichoderma* sp. i *Streptomyces* sp., a potom mikroorganizmi roda *Pseudomonas* sp., dok je najmanje povećanje utvrđeno kod mikroorganizama roda *Bacillus*.

7.4. Uticaj inokulacije na klijavost, dužinu klice i parametre prinosa engleskog ljulja

Proces unošenja korisnih mikroorganizama, direktno u zemljište ili indirektno preko površine semena odnosno klijanaca, a sa ciljem da se stimuliše rast i razviće biljaka, označava se kao inokulacija. Mikroorganizmi koji promovišu rast i razviće biljaka snabdevanjem biljaka lakodostupnim fosforom, sumporom, azotom, produkcijom biljnih hormona (auksina, gibberelina, citokinina) nazivaju se biofertilizatori. Mikroorganizmi koji promovišu rast biljaka putem kontrole fitopatogenih mikroorganizama nazivaju se biopesticidi. Primena PGP mikroorganizama kao biofertilizatora i /ili biopesticida u proizvodnji različitih biljaka omogućuje bolje iskorišćenje potencijala za razvoj kako biljaka tako i mikroorganizama (Frame, 2005; Avis et al., 2008).

Uloga rizosfernih mikroorganizama jeste da mineralizuju organska azotna jedinjenja do amonijačnog i nitratnog jona, ugljenohidrate do ugljen-dioksida i vode, dok neki mikroorganizmi rastvaraju soli fosfora, kalijuma, magnezijuma, kalcijuma i tako stvaraju biljne asimilative. Veliki broj rizosfernih mikroorganizama proizvodi materije rasta kao što je giberelin (*Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*), auksin (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, aktinomicete, gljive). Zahvaljujući takvoj aktivnosti rizosferni mikroorganizmi se mogu i praktično primenjivati. U poslednjih nekoliko decenija brojne rizobakterije uključujući *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Trichoderma* pokazale su stimulativan efekat na rast biljaka (Berg, 2009).

U ovim istraživanjima primenjeni izolati su različito uticali na klijavost semena, dužinu stabaoceta i korenka klice, kao i na prinos sveže i suve materije biljke i visinu biljke engleskog ljulja.

Utvrđeno je da je najbolji efekat na klijavost semena, nakon pet i četrnaest dana, imala primena gljive *Trichoderma asperellum*, dok je negativan efekat na klijavost imala primena *Bacillus* sp. B1 i *Pseudomonas* sp. P12. Na dužinu stabaoceta i korenka, nakon oba merenja, najbolje je uticala primena aktinomicete, dok je primena bakterija *Bacillus* sp. B1 i *Pseudomonas* sp. P12 imala negativan efekat. Negativan efekat primene izolata roda *Bacillus* i *Pseudomonas* na klijavost semena engleskog ljulja, mogao bi biti posledica sposobnosti ovih bakterija da produkuju vodonik-cijanid, gas koji u većoj količini inhibira klijavost i rast korena biljke. Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima Heydari et al. (2008), koji su utvrdili inhibitorni uticaj primene cijanovodonik produkujućih pseudomonasa na klijavost pšenice i raži. Takođe u istraživanjima Alstrom and Burns (1989), pseudomonasi koji su produkovali vodonik-cijanid, inhibirali su razvoj pasulja. Za razliku od ovih istraživanja, Niranjana et al. (2004) navode da je primena *P. fluorescens* imala pozitivan efekat na klijanje semena žitarice proso. Takođe, u istraživanjima Shaukat et al. (2006) bakterizacija (*Azospirillum*, *Pseudomonas* i *Azotobacter*) semena suncokreta i pšenice imala je pozitivan efekat na klijavost i dužinu klice. U istraživanjima Gravel et al. (2007) utvrđen je pozitivan efekat primene *Trichoderma* sp. i *Pseudomonas* sp. na klijavost semena. Jarak i sar. (2007a) ističu da su najbolji rezultati na rast klice i visinu biljaka lucerke ostvareni primenom združenih kultura rizobiuma, azotobaktera i aktinomiceta.

Na prinos sveže i suve materije biljke, u ovim istraživanjima, najbolji efekat imala je primena bakterija *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1. Najveći prinos bio je u trećoj godini istraživanja, a najmanji u prvoj godini. Primena *Streptomyces* sp. A3 i *Trichoderma asperelum* dalo je takođe pozitivne rezultate, osim u trećoj godini, kada je primena aktinomicete imala negativni efekat na prinos sveže i suve materije biljke. Na dužinu nadzemnog dela i korena biljke, najbolji efekat imala je primena *Bacillus* sp. B1 i *Pseudomonas* sp. P12, u toku sve tri godine istraživanja. Kao i u slučaju prinosa, u trećoj godini istraživanja, primena aktinomicete imala je negativan efekat na dužinu nadzemnog dela i korena biljke. Ovo ukazuje na činjenicu da je u rizosfernom zemljištu došlo do kompeticije između introdukovane aktinomicete i autohtonih mikroorganizama. Takva interakcija ima za rezultat smanjenje ili izostanak efekta promocije biljnog rasta. Pozitivan efekat primene bakterizacije na prinos trave utvrđen je i u istraživanjima Dragomir et al. (2007), koji su u toku dve godine ispitivali uticaj inokulacije na suhu materiju ježevice (*Dactylis glomerata* L.). Za inokulaciju korišćeni su sojevi bakterija roda *Beijerinckia* i *Azospirillum*, kao i njihova smeša. Nakon prve godine najbolji efekat na povećanje suve materije biljke imala je primena bakterija roda *Beijerinckia*, a nakon druge godine najbolji efekat postignut je primenom smeše bakterija roda *Beijerinckia* i *Azospirillum*. Razlike nisu bile statistički značajne. Rennie et al. (1983) su utvrdili da primena bakterija iz roda *Bacillus* pozitivno utiče na visinu i prinos trave, što je i u skladu sa rezultatima ovih istraživanja. Ratti et al. (2001) su utvrdili da primena arbuskularnih mikoriznih gljiva *Glomus aggregatum* i PGPR *Bacillus polymyxa* i *Azospirillum brasilense* povećavaju biomasu i sadržaj fosfora kod aromatične trave palmarosa (*Cymbopogon martinii*). U istraživanjima Seldim et al. (1984) primena *Bacillus azotofixans* pozitivno je uticala na dužinu korena trave, što potvrđuju i rezultati ovog rada. Takođe, u istraživanjima Biswas et al. (1994) unošenje *Azotobacter* i *Azospirillum* pozitivno utiče na rast i jednogodišnjih i višegodišnjih trava. Bouton et al. (1979) navode da primena *A. brasilense* ima pozitivan efekat na masu suve materije tropske trave. U istraživanjima Smith et al. (1978) inokulacijom *A. brasilense* povećan je prinos sveže materije trave *Panicum maximum* za 80% i za 61% kod trave *Digitaria decumbens*. Pozitivan uticaj primenjenih azotofiksirajućih mikroorganizama na visinu trave utvrdili su Okon and Kapulnik (1986). Korhonen et al. (1986) su utvrdili da primena azotofiksirajućih bakterija kod trave i žitarica ima pozitivan efekat na rast i razvoj biljke.

Rezultati istraživanja ukazuju na veliki potencijal primene mikroorganizama u proizvodnji engleskog ljulja. Da bi se inokulacijom postigao što bolji efekat na rast i prinos engleskog ljulja, neophodno je izolovati što veći broj mikroorganizama iz rizosfere trava, utvrditi njihovu efikasnost na poboljšanje rasta biljke i pronaći najadekvatniji način njihove primene. Dalja istraživanja svakako bi trebala obuhvatiti proučavanje uzajamnog odnosa primenjenih mikroorganizama i engleskog ljulja, kao i interakcije inokulanata sa autohtonim mikroorganizmima u poljskim uslovima, da bi se optimizirao način i vreme primene inokulanata.

8. ZAKLJUČAK

Rezultati trogodišnjih istraživanja ukazuju na sledeće zaključke:

Na osnovu morfoloških karakteristika kolonije i ćelije, izolati P1, P12 i P9, pripadaju rodu *Pseudomonas*, izolati B1, B3 i B6 rodu *Bacillus*, a izolati A1, A2, A3 rodu *Streptomyces*.

- Na podlozi sa glukozom rasli su svi izolati, a na podlozi sa galaktozom izolati roda *Pseudomonas* i *Streptomyces*. Izolat A2 nije rastao na podlozi sa fruktozom. Na podlozi sa saharozom rasli su svi izolati roda *Pseudomonas* i izolati A1 i A3, a sa laktozom samo izolat A2. Izolati B6 i A2 nisu rasli na podlozi sa ksilozom.
- Na podlogama čija je pH 5, 6, 7 utvrđen je optimalan rast svih izolata osim izolata roda *Bacillus* i A3. Na podlozi pH4, nijedan izolat nije rastao.
- Na podlogama sa 3 i 5 % NaCl, utvrđen je optimalan rast svih izolata. Na podlozi sa 7% NaCl utvrđeno je potpuno odsustvo rasta izolata P1, P12 i B3, a kod izolata A1, utvrđen je intezivniji rast.
- Na temperaturi od 13, 28 i 37°C utvrđen je optimalan rast skoro svih izolata, a minimalan rast ili potpuno odsustvo rasta pri temperaturi od 3 i 45°C.
- Primenjeni metali nisu uticali na rast izolata. Samo je primena kadmijuma, pri koncentraciji od 10^{-2} mol/dm³ inhibirala rast svih izolata roda *Bacillus*.
- Primenjeni antibiotici različito su uticali na izolate. U proseku, izolati P1 i P12 su pokazali najveću otpornost na primenjene antibiotike, dok su izolati B1, B3, A1 i A3 bili najosetljiviji na njihovo delovanje.
- Preporučene doze pesticida nisu uticale na rast izolata. U proseku, izolati P9 i B1 su pokazali najveću otpornost na delovanje većih koncentracija pesticida, dok su izolati P1 i P12 bili najosetljiviji.
- Svi ispitivani izolati produkuju ureazu, a ne produkuju pektinazu.
- Želatinazu produkuju izolati roda *Bacillus*, *Streptomyces* i izolat P12. Samo izolat A2 produkuje proteazu. Lipazu produkuju izolati roda *Bacillus* i izolati P1, P12, A1 i A3. Amilazu produkuju izolati B3 i B6. Celulazna aktivnost utvrđena je kod svih izolata roda *Streptomyces* i izolata P9, P12 i B2.

- Citrat kao izvor energije koriste izolati roda *Pseudomonas*, *Bacillus* i izolat A1.
- Samo je kod izolata B1 utvrđen antagonistički odnos prema gljivama *Aspergillus flavus* i *Fusarium* sp.
- Produkcija IAA kod svih izolata rasla je sa povećanjem koncentracije L-triptofana i vremena inkubacije. U proseku, kao najbolji producent IAA pokazao se izolat B3.
- Sposobnost produkcije siderofora utvrđena je kod svih izolata roda *Pseudomonas*.
- Kod izolata P1, P3, B1, B3, B6 i A3 utvrđena je sposobnost produkcije HCN-a.
- Egzopolisaharide produkuju svi izolati roda *Pseudomonas* i *Bacillus*.
- Sposobnost da razlažu neorganska jedinjenja fosfora utvrđena je kod izolata P1, B1 i B3, a organska jedinjenja fosfora razlažu izolati roda *Pseudomonas*, B1, B3, A1 i A2.

Primenjena *Trichoderma asperellum* pokazala je sledeće biohemijske osobine:

- Gljiva ne produkuje ureazu i pektinazu, ali produkuje amilazu i celulazu.
- Utvrđen je antagonistički odnos gljive *Trichoderma asperellum* prema svim primenjenim gljivama.

Brojnost pojedinih sistematskih i fizioloških grupa mikroorganizama kao i enzimatska aktivnost u rizosferi engleskog ljulja, zavisila je od primenjenih inokulanata.

- Na ukupan broj mikroorganizama i broj gljiva, u proseku, najviše je uticala primena izolata *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1.
- Najveća brojnost aktinomiceta utvrđena je na varijantama gde su bili primenjeni izolati *Pseudomonas* sp. P12 i *Streptomyces* sp. A3.
- Na brojnost aminoheterotrofa, najbolji efekat imala je primena izolata *Pseudomonas* sp. P12 i gljive *Trichoderma asperellum*.
- Najveća brojnost oligonitrofila bila je u varijanti gde je primenjen izolat *Streptomyces* sp. A3.
- Brojnost azotobaktera u rizosferi engleskog ljulja povećala se u odnosu na kontrolu u svim varijantama. U proseku, najbolji efekat na povećanje broja azotobaktera imala je primena izolata *Bacillus* sp. B1 i gljive *Trichoderma asperellum*.

- Na povećanje dehidrogenazne aktivnosti najviše je uticala primena izolata *Pseudomonas* sp. P12 i *Streptomyces* sp. A3.

Inokulacija je imala pozitivan uticaj na klijavost, svežu i suhu masu biljke, visinu i dužinu korena biljaka.

- Primena gljive *Trichoderma asperellum* i izolata *Streptomyces* sp. A3 delovala je pozitivno na klijavost, dužinu korenka i stabaoca klice, dok su izolati *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1 imali negativan uticaj na ove parametre.
- Primenjeni mikroorganizmi uticali su pozitivno na povećanje prinosa sveže i suve materije biljke. U proseku, najbolji efekat na prinos sveže i suve materije imala je primena izolata *Pseudomonas* sp. P12 , *Bacillus* sp. B1.
- Visina nadzemnog dela i dužina korena, u proseku bila je najveća na varijantama gde su bili primenjeni izolati *Pseudomonas* sp. P12 i *Bacillus* sp. B1.

Rezultati istraživanja su pokazali da se korišćenjem PGP mikroorganizama biljka obezbeđuje neophodnim hranivima, što opravdava njihovu primenu i u proizvodnji krmnih trava.

9. LITERATURA

Abbas, I.H. (2006): A Biological and Biochemical Studies of Actinomycetes Isolated from Kuwait Saline Soil-Kuwait. *Journal of Applied Science Research*, 2(10): 809-815

Adesemoye, A.O., Obini, M., Ugoji, E.O. (2008): Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 423-426.

Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S. (2005): Screening of free-living rhizospheric bacteria for multiple plant growth promoting activities. *Microbial.Res.*, 36: 1-9.

Ahmad, R., Arshad,M., Khalid, A., Zahir, Z.A. (2008): Effectiveness of organic-/bio-fertilizer supplemented with chemical fertilizers for improving soil water retention, aggregate stability, growth and nutrient uptake of maize (*Zea mays L.*). *J. Sustain. Agri.*, 31(4): 57-77.

Alagawadi, A.R., Gaur, A.C. (1992): Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphatesolubilizing bacteria on yield of sorghum (*Sorghum bicolor (L.) Moench* in dry land. *Trop. Agric.*, 69: 347-350.

Alam, M.Z., Manchur, M.A.,Anwar, M.N. (2004): Isolation, purification, characterization of cellulolytic enzymes produced by the isolate *Streptomyces omiyaensis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(10): 1647–53

Alami, Y., Achouak, W., Marol, C., Heulin, T. (2000): Rhizosphere soil aggregation and plant growth-promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl Environ Microbiol*, 66: 3393–3398.

Aldesuquy HS, Mansour FA, Abo-Hamed SA (1998): Effect of the culture filtrates of *Streptomyces* on growth and productivity of wheat plants. *Folia Microbiologica*, 43: 465-470.

Alexander, M. (1961): *Introduction to soil microbiology*, Toppen Co. Ltd., Tokyo, 5:470.

Alexander, M. (1977.) : *Introduction to Soil Microbiology*. John Wiley and Sons, New York.

Alstrom, S., Burns, R.G. (1989): Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology and Fertility of Soil*, 7: 232-238.

Amora-Lazcano, E., Vazquez, M.M., Azcon, R. (1998): Response of nitrogen-transforming microorganisms to arbuscular mycorrhizal fungi. *Biology and Fertility of Soils*, 27: 65-70.

Andelković, S. (2012): Uticaj rizobiuma, azotobaktera i aktinomiceta na produktivna svojstva lucerke (*Medicago sativa L.*) , *Doktorska disertacija*, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1993): The metabolic quotient for CO₂ (q CO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 25: 393-395.

Andrews JH, Harris RF. (2000): The ecology and biogeography of microorganisms of plant surfaces. *Annu Rev Phytopathol.*, 38:145–180.

Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R., Lalonde, R. (1998): Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on nonlegumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil*, 204:57-67.

Antoun, H., Klopper, J. W. (2001): Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), in: *Encyclopedia of Genetics*. Brenner, S. and Miller, J.H., eds., Academic Press, N.Y., 1477-1480.

Artursson V, Finlay R, Jansson J (2006): Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*, 8: 1–10.

Arwiyanto, T., Maryudani, N., Azizah, N. (2007): Sifat-sifat Fenotipik *Pseudomonas fluorescens*. *Agensia Pengendalian Hayati Penyakit Lincat pada Tembakau Temanggung*. *J. Biodiversitas*, 8(2):147-151.

Asaka, O., Shoda, M. (1996): Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4081-4085.

Asghar, H., Z. Zahir, M. Arshad, Khaliq, A. (2002): Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica juncea* L. *Bio. Fertility Soil*, 35: 231-237.

Aslantas, R., R. Cakmakçı, Fiahin, F. (2007): Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple trees growth and fruit yield under orchard conditions. *Sci. Hortic.*, 111: 371-377.

Astrom, S., Burns, R.G. (1989): Cyanide production by rhizosphere bacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biol. Fertil. Soils.*, 7:232–238.

Avis, J.T., Gravel, V., Antoun, H., Russell J., Tweddell, J.R. (2008): Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology & Biochemistry*, 40:1733–1740.

Babalola, O.O., Osir, E.O., Sanni, A.I., Odhiambo, G.D., Bulimo, W.D. (2003): Amplification of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic (ACC) deaminase from plant growth promoting rhizobacteria in Strigainfested soil. *Afr. J. of Biotechnol.*, 2:157-160.

Baca. B.E., Elmerich, C. (2007): Microbial production of plant hormones. In: Elmerich C, Newton WE (eds) Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Springer, Dordrecht, 113–143.

Baig, M.M.V. (2005): Cellulolytic enzymes of *Trichoderma asperellum* produced on banana agro-wastw: Optimisation of culture medium and conditions. JSIR, 64: 57-60.

Barazani, O., Friedman, J. (1999): Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria. J. Chem. Ecol., 25: 2397-2406.

Barbieri, P., Zanelli, T., Galli, E., Zanetti, G. (1986): Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. FEMS Microbiol. Lett., 36: 87-90.

Barea, J.M., Novarro, E., Montoya, E. (1976): Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. J.App. Bacteriology, 40: 129-136.

Bar-Ness, E., Chen, Y., Hader, Y., Marschner, H., Romheld, H. (1991): Siderophores of *Pseudomonas putida* as an Iron Source for Dicot and Monocot Plants. In: Iron Nutrition and Interaction in Plants, Chen, Y. and Y. Hader (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 271-281.

Barriuso, J., Pereyra M.T., Lucas Garcia, J.A., Megias, M., Gutierrez Maner, F.J., Ramos, B. (2005): Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus*- *Pinus* sp. Microb Ecol., 50: 82-89.

Barriuso, J., Solano, B.R. (2008): Ecology, Genetic Diversity and Screening strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). Journal of Plant nutrition, 1-17.

Beattie, G. (2006): Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances, In: Plant-associated bacteria, Gnanamanickam, S. (Ed.), 1-56.

Begonia, M.F.T., Kremer, R.J. (1994): Chemotaxis of deleterious rhizobacteria to velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medik.) seeds and seedlings. FEMS Microbiol. Ecol., 15:227-236.

Belimov, A.A., Safranova, V.I., Sergeeva, T.A., Egorova, T.N., Matveyeva V.A. (2001): Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. Can J. Microbiol., 47: 642-652.

Belimov, A., Dodd, I. C., Safranova, V. I., Hontzeas, N., Davies, W. J. (2007): *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato, Journal of Experimental Botany, 58, 6, 1485–149.

Benizri, E., Baudoin, E., Guckert, A. (2001): Root colonization by inoculated plant growth promoting rhizobacteria. *Biocontrol. Sci. Technol.*, 11: 557-574.

Bent, E., Tuzun, A., Chanway, C.P., Enebak, S. (2001): Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.*, 47: 793-800.

Beresteckij, O.A., Visjuk, F. (1983): Azotofiksirajuscaja aktivnost u rizosfere i na koniaja nebobovih rastenij. *Izv. AN SSSR. Ser. Biol.*, 1: 544-55.

Berg, G. (2009): Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 11-48.

Bergman, B., Johansson, C., Söderbäck, E. (1992): The Nostoc-Gunnera symbiosis. *New Phytol.* 122: 379–400.

Beyer, L., Wachendorf, C., Koebbemann, C. (1993): A simple wet chemical extraction procedure to characterize soil organic matter. Application and recovery rate. *Comm Soil Sci Plant Anal.*, 24:1645–1663.

Bhatia, V. S., Singh, P., Wani, S. P., Chauhan, G. S., Kesava Rao, A. V. R., Mishra, A. K., Srinivas K. (2008). Analysis of Potential Yields and Yield Gaps of Rainfed Soybean in India Using CROPGRO Soybean Model. *Agriculture and Forest Meteorology*, 148: 1252–1265.

Bhattacharjee, S., Lee, L.Y., Oltmanns, H., Cao, H., Veena Cuperus, J., Gelvin, S.B. (2008): AtImpa-4, an Arabidopsis importin α isoform, is preferentially involved in Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Cell*, 20: 2661–2680.

Biswas, B.C., Tewatia, R.C., Prasad, N., Das, S. (1994): Biofertilizers in Indian Agriculture. Fertilizer Association of India, New Delhi, India, 1–43.

Blazevic, J.D., Marilyn, H., Koepcke, John, M. M.(1973): Incidence and Identification of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in the Clinical Laboratory. *Applied Microbiology*, 107-110.

Boddey, R. M., Dobereiner, J. (1988): Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. *Plant Soil*, 108: 53-65.

Borie, F., Zunino, H., Martínez, L. (1989): Macromolecule P-associations and inositol phosphates in some Chilean volcanic soils of temperate regions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 20: 1881-1894.

Boswell, J.G. (1954): The microbiology of acid soils, The University, Sheffield.

Bottini, R., Cassan, F., and Piccoli, P. (2004): Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 497–503.

Bouton, J.H., Smith, R.L., Schank, S.C., Burton, G.W., Tyler, M.E., Littell, R.C., Gallaher, R.N., Quesenberry, K.H. (1979): *Crop Science*, 19:12

Bowen, G. D., Rovira, A. D. (1999): The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.*, 66: 1-102.

Broadbent, P., Baker, K. F., Franks, N., Holla, D. (1977): Effect of *Bacillus spp.* on increased growth of seedling in steamed and in non-treated soil. *Phytopathology*, 67 :1027-34.

Broeckling, C.D., Broz, A.K., Bergelson, J., Manter, D.K., Vivanco, J.M. (2008): Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Applied Environmental Microbiology*, 74: 738–744.

Burns, R.G. (1982): Extracellular enzyme-substrate interactions in soils. In: *Microbes in their natural environments*, Cambridge Un., 249-298.

Burr, T. J., Caesar, A. (1984): Beneficial plant bacteria. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2: 1-20

Çakmakçı, R., Kantar, F. , Algur, O.F. (1999): Sugar beet and barley yields in relation to *Bacillus polymyxa* and *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* inoculation. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 162: 437-442.

Calvo, P., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E. and Zúñiga, D. (2010): Characterisation of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from Andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. *Brazilian J. Microbiol.* 41:899 -906.

Carrillo-Castañeda, G., Juárez Muños, J., Peralta-Videa, J.R., Gomez, E., Tiemann, K.J., Duarte-Gardea, M., Gardea-Torresdey, J.L. (2002): Alfalfa growth promotion by bacteria grown under iron limiting conditions. *Adv. Environ. Res.* 6: 391–399.

Cattelan, A.J., Hartel, P.G. , Fuhrmann, J.J. (1999): Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63: 1670-1680.

Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M. (1996): Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. *Phaseoli*. *Plant and Soil* 184: 311-321.

Chakraborty, U., Chakraborty, B., Basnet, M. (2006): Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. *Journal of Basic Microbiology*, 46 (Suppl 3): 186 – 195.

Chalal, P.S., Chalal, D.S., Le, G.B.B. (1996): Production of cellulase in solid state fermentation with *Trichoderma reesei* MCG80 on wheat straw, *App.Biochem.Biotechnol.*, 57: 433-442.

Chen, Y. P., Rekha, P.D., Arunshen, A.B., Lai, W. A., Young, C.C. (2006): Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.*, 34: 33-4

Cherif, M. , Benhamou, N. (1990): Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma sp.* on *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis- lycopersici. *Phytopathol*, 80: 1406-1414.

Chet, I., Harman, G.E., Baker, R. (1981): *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium spp.* *Microb. Ecol*, 7: 29-38.

Coley-Smith, J.R., Ridout, C.T., Christine, M.M., Lynch, J. M. (1991): Control bottom rot disease lettuce (*Rhizoctonia solani*) using preparations of *Trichoderma viride*, *T. harzianum* or tolclofos-methyl. *Plant. Pathol*, 40: 359-366.

Čolo, J., Jarak, M. (2006): Primjena bakterizacije i kalcifikacije u proizvodnji lucerke i djeteline na kiselim zemljištima. Radovi, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Sarajevu, XVIII Naučno-stručni skup poljoprivrede i prehrambene industrije, Vol II, Broj 51/1, Neum. 107-115.

Compant, S., Van der Heijden, M. G. A., Sessitsch, A. (2010): Climate change effects in beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiology Ecology*, 73, 197–214.

Cote. G. L., Krull. L. H. (1988): *Carbohvd. Res.*. 181, 143-52.

Cross, A.F., Schlesinger, W.H. (1995): A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. *Geoderma* 64: 197-214.

Cvijanović, G. (2002): Uticaj diazotrofa na prinos i mikrobiološku aktivnost u zemljištu kod kukuruza, pšenice i soje , Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Cvijanović, G., Dozet, G., Djukić, V., Đorđević, S., Puzić, G. (2012): Microbial activity of soil during the inoculation of soya bean with symbiotic and free-living nitrogen-fixing bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 11(3): 590-597.

De Ceuster, T.J.J, Hoitink, H.A.J. (1999): Prospects for composts and biocontrol agents as substitutes for methyl bromide in biological control of plant diseases. *Compost Science and Utilization*. 7:6-15.

De Freitas, J.R., Germida, J.J. (1990): Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat. *Can. J. Mic.*, 36: 265-272.

De Souza, J.T., Bailey, B.A., Pomella, A.W.V., Erbe, E.F., Murphy, C.A., Bae, H., Hebbar, H.P (2008): Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. *Biological Control*, 46 : 36–45.

Delagarde, R., Peyraud, J.L., Delaby, L., Faverdin, P. (2000): Vertical distribution of biomass, chemical composition and pepsin - cellulase digestibility in a perennial ryegrass sward: interaction with month of year, regrowth age and time of day. *Animal Feed Science and Technology*, 84: 49-68.

Dennis, C. , Webster, J. (1971): Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57: 363-369.

Djuric, S., Pavic, A. , Jarak, M. , Pavlovic, S. , Starovic, M. , Pivic, R. , Josic, D. (2011): Selection of indigenous fluorescent pseudomonad isolates from maize rhizospheric soil in Vojvodina as possible PGPR. *Rom Biotechnol Lett.* 16: 6580-6590.

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., (2001): Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust J Plant Physiol*, 28: 871–879.

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. (2003): Plant growth- promoting effects of diazotrophs in the rizosphere, *Crit.Rev.Plant Sci.*, 22: 107-149.

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. (2003): Plant growthpromoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 22: 107-149.

Döbereiner, J., Reis, V.M., Paula, M.A., Olivares, F. (1993): Endophytic diazotrophs in sugarcane, cereals and tuber plants. In: *New horizons in nitrogen fixation*.

Đorđević, S., Govedarica, M., Milošević, N., Jakovljević, M. (2000): Uticaj bakterijske inokulacije na biomasu C, P i aktivnost fosfataza u rizosferi kukuruza. *Eko-konferencija*, 27-30. septembar, Novi Sad, Serbia, 359-364.

Dragomir, C., Moisuc, A. (2007): Bacterial inoculation effect upon yield capacity in alfalfa and orchard grass, *Lucrări Științifice, Facultatea de Agricultură USAMVB Timișoara*, 38: 275-278.

Duijff, B.J., W.J. Kogel, P.A., Bakker , H.M., Schippers, B. (1994): Influence of pseudobactin 358 on the iron nutrition of barley. *Soil Biol. Biochem.*, 26: 1681-1688.

Đukić, D. (2002): *Biljke za proizvodnju stočne hrane*. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.

Egamberdiyeva, D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils, *applied soil ecology*, 36 :184-189.

El Mohandes, M. A. O. (1999): The use of associative diazotrophs with different rates of nitrogen fertilization and compost to enhance growth and N₂-fixation of wheat. *Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cairo*, 50: 729-753.

Elad, Y., David, D.R., Levi, T., Kapat, A., Kirshner, B. (1999): *Trichoderma harzianum* T-39-mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. *Modern fungicides and antifungal compounds II*, Andover, Hants, UK: Intercept., 459-467.

El-Tarabily, K.A. (2008): Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant and Soil*, 308:161-174.

Estrada-de los Santos, P., Bustillos-Cristales, R., Caballero- Mellado, J. (2001): Burkholderia, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl Environ Microbiol*, 67: 2790–2798.

Flaishman, M. A., Eyal, A., Zilberstein, C., Voisard, C., Hass, D. (1996): Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide producing strains of *Pseudomonas putida*. *Mol. Plant- Microbe Interact*, 9 :642-645.

Foth, H.D., Ellis, B.G. (1997): *Soil Fertility*. 2nd Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida. 290 .

Frame, J. (2005): *Forage legumes for temperate grassland*, Science Publishers, Inc., Enfield (NH), USA-Plymouth, UK, 13-17.

Freney, J.R., Melville G.E., Williams, C.H. (1975): Soil organic matter fractions as sources of plant-available sulphur *Soil Biol. Biochem.*, 7: 217–221.

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

Frommel, M.I., Nowak, J., Lazarovits, G. (1993): Treatment of potato tubers with a growth promoting *Pseudomonas sp.*: Plant growth responses and bacterium distribution in the rhizosphere. *Plant Soil*, 150: 51-60.

Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernández, A., Jiménez-Salgado, T., Wang, E. T., Martínez-Romero, E., Caballero-Mellado, J. (2001): Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51: 1305–1314.

Fuentes-Ramírez, L.E., Caballero-Mellado, J. (2006): Bacterial biofertilizers. In: Z.A. Siddiqui (ed). PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Netherlands, 143-172.

Fulkerson, W.J., Donaghy, D.J. (2001): Australian Journal of Experimental Agriculture, 41. 261-275.

Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., et al. (2004), Nitrogen cycles: Past, present, and future, Biogeochemistry, 70(2): 53– 226.

Gangwar, M., Kaur, G. (2009): Isolation and characterization of endophytic bacteria from endorhizosphere of sugarcane and ryegrass. The Internet Journal of Microbiology, 7(1).

Garbeva, P., Van Veen, J. A., Van Elsas, J. D. (2003): Predominant *Bacillus spp.* in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE, Microb Ecol., 45:302–316.

Garcia de Salamone, I.E., Hynes, R.K., Nelson, L.M. (2001): Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. Can. J. Microbiol., 47: 404–411.

García, J.A.L., Probanza, A., Ramos, B., Palomino, M.R., Mañero, F.J.G. (2004): Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. Agronomie for Sustainable Development, 24 (Suppl 4): 169-176.

Gerencser, M. A., Slack, J. M. (1967): Isolation and characterization of *Actinomyces propionicus*. J. Bacteriol., 94:109–115.

Gerhardt, P., Murray, R.G.E. , Wood, W.A. , Krieg, N.R. (1994): Methods for General and Molecular Bacteriology. ASM Press, Washington, D.C.

Getha, K., Vikineswary, S., Wong, W.H., Seki, T., Ward, A., Goodfellow, M. (2005): Evaluation of *Streptomyces sp.* strain g10 for suppression of Fusarium wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 32(1): 24-32.

Gharib, A.A., Shahen, M.M., Ragab, A.A. (2009): Influence of Rhizobium Inoculation combined with Azotobacter chroococcum and Bacillus megaterium var phosphaticum on growth, nodulation, yield and quality of two snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. Proceedings of the 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture, 3-5 November 2009, Cairo, Egypt. Vol. IV, 650-661.

Ghosh, S., Sengupta, C., Maiti, T.K., Basu, P.S. (2008): Production of 3-indolylacetic acid in root nodules and culture by a Rhizobium species isolated from root nodules of the leguminous pulse *Phaseolus mungo*. Folia Microbiol. 53: 351–355.

Glick, B. R. (1995): The enhancement of plant growth by freelifving bacteria. Canadian Journal of Microbiology, 41: 109-117.

Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J., Duan, J. (2007): Promotion of plant growth by ACC deaminase-containing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.*, 119: 329-339.

Glick, B.R., Jacobson, C.B. Schwarze, M.M.K., Pasternak, J.J. (1994): 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can. J. Microbiol.*, 40: 911-915.

Glick, B.R., Penrose, D.M., Li, J. (1998): A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.*, 190: 63-68.

Goldstein, A.H., Krishnaraj, P.U. (2007): Phosphate solubilizing microorganisms vs. phosphate mobilizing microorganisms: What separates a phenotype from a trait? In: E. Velazquez, C. Rodríguez-Barrueco (eds). *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Springer, 203-213.

Goodfellow, M., Simpson, K.E. (1987): Ecology of Streptomycetes. *Front Appl. Microbiol.*, 2: 97-125.

Gopalakrishnan, S., Pande, S., Sharma, M., Humayun, P., Kiran, B.K., Sandeep, D., Vidya, M.S., Deepthi, K., Rupela, O. (2011). Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for biological control of Fusarium wilt of chickpea. *Crop Prot* 30:1070-1078.

Gordon, S.A., Weber, R.P. (1951): Colorimetric estimation of indole-acetic acid. *Plant Physiology.*, 26: 192-195.

Govedarica, M., Jarak, M. (1999a) : Mikrobiologija zemljišta, Poljoprivredni fakultet, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Govedarica, M., Jarak, M. (1999b): Praktikum iz mikrobiologije. Poljoprivredni Fakultet, Novi Sad.

Govedarica, M., Jarak, M., Milošević, N. (1996.): Uloga mikroorganizama u zemljištu i proizvodnji voća. U : Mikrobiologija voća i proizvoda od voća. Ed. Škrinjar, M. Et al., tehnološki fakultet, Novi Sad, pp. 49-64.

Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, H.J. (2007): Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA) *Soil Biology and Biochemistry*, 39 : 1968-1977.

Greaves, M.P., Webley, D.M. (1965): A study of the breakdown of organic phosphates by microorganisms from the root region of certain pasture grasses. *J. Applied Bacteriology*, 28: 454-465.

Grichko, V.P. , Glick, B.R. (2001): Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol. Biochem.*, 39: 11-17.

Gutierrez-Manero, F.J., B. Ramos-Solano, A. Probanza, J. Mehouchi, F.R. Tadeo , Talon, M. (2001): The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.*, 111: 206-211.

Gyaneshwar, P., G. N. Kumar, L. J. Parekh, Poole, P. S. (2002): Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil*, 245: 83-93.

Hajnal-Jafari, T. (2010): Uticaj inokulacije na prinos i mikrobiološku aktivnost u zemljištu pod usevom kukuruza. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Halda-Alija, L. (2003): 16S rRNA sequencing of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 49: 781–787.

Halder, A.K., Mishra, A.K., Chakarbarthy, P.K. (1991): Solubilization of inorganic phosphates by *Bradyrhizobium* . *Ind. J. Exp. Biol.*, 29 : 28–31.

Hamdali,H., Hafidi, M., Virolle, M.J., Ouhdouch, Y. (2012): Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , 24(11):2565-2575

Hannaway, D. (1999): Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.). A Pacific Northwest Extension Publication. Oregon State University, Washington State University, University of Idaho PNW, 503, 1-20.

Hanson, L.E. , Howell,C.R. (2004): Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathol.*, 94: 171-176.

Hariprasad, P., Niranjana, S.R. (2009): Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant Soil*, 316:13–24.

Harman, G. E., Howell, C. R. , Viterbo, A. , Chet, I., Lorito, M. (2004): *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Rev. Microbiol.*, 2:43-56.

Harman, G.E., Chet, I., Baker, R. (1980): *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium spp.* or *Rhizoctonia solani*. *J. Phytopathol*, 70: 1167-1172.

Hayes, J.E., Richardson, A.E., Simpson, R.J. (2000): Components of organic phosphorus in soil extracts that are hidrolized by phytase and acid phosphatase. *Biology and Fertility of soil*, 32:279-286.

Heydari, S., Moghadam, P.R., Arab, S.M. (2008): Hydrogen cyanide production ability by *Pseudomonas Fluorescence* bacteria and their inhibition potential on weed. Proceedings of the Competition for Resources in a Changing World: New Drive for Rural Development, October 7-9, Hohenheim, Germany.

Hiifte, M., Woestyne, M.V., Verstraete, W. (1994): Role of Siderophores in Plant Growth Promotion and Plant Protection by Fluorescent *Pseudomonads*. In: Biochemistry of Metal Micronutrients in the Rhizosphere. Manthey, J.A., D.E. Crowley and D.G. Luster (Eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, FL., USA., 81-92.

Hilali, A., Prevost, D., Broughton, W.J., Antoun, H. (2001): Effects de l'inoculation avec des souches de *rhizobium leguminosarum biovar trifolii* sur la croissance du ble dans deux sols du Maroc, *Can. J. Microbial*, 47: 590-593.

Hiltner, L. (1904): Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, 98:59–78

Holguin, G., C.L. Patten, Glick, B.R. (1999): Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. *Biol. Fert. Soils*, 29: 10-23.

Howell, C. R. (1998): The role of antibiosis in biocontrol. In G. E. Harman & C. P. Kubicek (eds.), *Trichoderma and Gliocladium*, 2:173-84.

Howell, C.R. (2003): Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87: 4-10.

Howie, W.J., Echandi, E. (1983): Rhizobacteria: influence of cultivar and soil type on plant growth and yield of potato. *Soil Biol. Biochem.* 15: 127–132.

Hubbard, C. E. (1992): *Grasses*. Ed. 3. – Penguin Books, London., 476.

Hugh, R, Leifson, E. (1953): The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J Bacteriol.*, 66(1):24–26.

Huss-Danell, K. (1997): Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. *Tansley Review No. 93. New Phytologist* 136, 375-405.

Hussin, A.S.M., Farouk, A-E., Greiner, R., Salleh, H.M., Ismail, A.F. (2007): Phytate-degrading enzyme production by bacteria isolated from Malaysian soil. *World J. Microb. Biot.*, 23:1653-1660.

Idriss, E. E. S., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T., Borriss, R. (2002): Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 45 contributes to its plantgrowth- promoting effect. *Microbiology*, 148:2097-2109.

Ilic, S.B., Konstantinovic, S.S., Todorovic, Z.B., Lazic, M.L., Veljkovic, V.B., Jokovic, N., Radovanovic, B.C. (2007): Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. *Microbiology*, 76:421-428.

Insam, H. (2001): Developments in soil microbiology since the mid 1960's, *Geoderma* 100, 389-402.

James, E. K., Olivares, F. L. (1997): Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. *Crit Rev Plant Sci*, 17: 77-119.

Jarak, M., Čolo, J. (2007): Mikrobiologija zemljišta. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.

Jarak, M., Đurić, S. (2004): Praktikum iz mikrobiologije. Univerzitetu Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.

Jarak, M., Đurić, S., Đukić, D. (2007): Uticaj inokulacije na klijanje i početni rast i razvoj lucerke i crvene deteline, *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad*, 42 (1): 415-421.

Jarak, M., Hajnal, T. (2006): Ukupan broj mikroorganizama, broj gljiva i azotobaktera u sabijenom i rastresitom zemljištu. *Traktori i pogonske mašine*, 11: 5: 37-40.

Jarak, M., Jević, M., Đurić, S. (2008): Zastupljenost končastih gljiva i aktinomiceta u rizosferi pšenice gajene na zemljištu različite sabijenosti. *Traktori i pogonske mašine*, 13(2):99 -104.

Jarak, M., Jević, M., Đurić, S., Jakovljević, J. (2006): Primena združene inokulacije u proizvodnji graška, *Letopis naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta, God. 30 (1): 53-59.*

Jarak, M., Protić, R., Govedarica, M., Milošević, N., Đurić, N. (1997b): Mikrobiološka aktivnost u zemljištu pod pšenicom inokulisanom diazotrofima, *Zbornik naučnih radova*, 3.br.1: 39-45.

Jarak, M., Srećković, M., Govedarica, M., Milošević, N. (1998): Mikrobiološka aktivnost u zemljištu pod kruškom, dunjom i jabukom, *Jugosl.Voćar.*, 32, br.121-122: 119-126.

Jeffrey, L.S.H., Azrizal, A.M. (2007) . Screening for cellulase activities in actinomycetes isolated from different location in Malaysia *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 35:153-8.

Jević, M. (2006): Efekat primene rizobia i aktinomiceta u proizvodnji graškom Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

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

Juhke, E.M., Mathre, D.E., Sands, D.C. (1989): Relationship between seed inoculum density and rhizosphere colonization of density and rhizosphere colonization of spring wheat. *Soil Biol. Biochem.* 21: 591-595.

Kahkonen, M.A., Wittmann, C., Kurola, J., Illvsnemi, H., Salkinoja-salonen, M.S. (2002): Microbial activity in boreal forest soil in cold climate. *Boreal Environment Research*, 6:19-28.

Kalinović, D. (1975): Sezonska dinamika mikropopulacije nekih prirodnih i antropogenih tala Slavonije i Baranje. Magistarski rad, Beograd.

Karagoz, K., Ates, F., Kotan, R., Cakmakci, K. (2012): Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from the rhizosphere of gravine grown in alkaline and acidic soils. *Eur J Soil Biol*, 50: 144-150.

Karnwal, A. (2009): Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice exudates. *Journal of Plant Pathology*, 91(1):61-63.

Kasing, A. (1995): Cellulase production, *Practical Biotechnology*

Kastori, R., Petrović, N., Maksimović, I. (2005): Uloga azota u životnim procesima biljaka. (In: Kastori R. (Ed): Azot, agrohemijski, agrotehnički, fiziološki i ekološki aspekti). Pog. u monografiji, 117-151.

Kavadia, A., Vayenas, D.V., Pavlou, S., Agelisa, G. (2011): Dynamics of a Free-Living Nitrogen-Fixing Bacteria Population Lacking of Competitive Advantage Towards an Antagonistic Population. *The Open Environmental Engineering Journal*, 4: 190-198.

Kennedy, I. R., Choudhury, A. T. M., Kecskes, M. L. (2004): Nonsymbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promoting be better exploited. *Soil Biol. Biochem.*, 36: 1229-1244

Khakipour, N., Khavazi, K., Mojallali, H., Pazira, E., Asadirahmani, H. (2008): Production of Auxin hormone by Fluorescent *Pseudomonads*. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 4 (Suppl 6): 687-692.

Khamna, S., Yokota, A., John, F. P., Lumyong, S. (2010): Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *EurAsian Journal of BioSciences*, 4:23-32

Khandelwal, S.R., Manwar, A.V., Chaudhari, B.L., Chincholkar, S.B. (2002): Siderophoregenic bradyrhizobia boost yield of soybean. *Appl. Biochem. Biot.* 102-103, 155-168.

Kim, K.Y., D. Jordan, Donald, G.A.M. (1998): Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fert. Soil*, 26: 79-87.

Kincses, I., Sipos, M. (2008): The effect of bacteria fertilizers on the nitrogen amount extracted by the yield of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on the different soil types, *Analele Universității din Oradea, Fascicula: Protecția Mediului*, Vol. XIII

King, E.O., Ward, M.K., Randey D.E. (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44:301-307.

Kirchhof, G., Reis, V.M., Baldani, J.I., Eckert, B., Döbereiner, J., Hartmann, A. (1997): Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant and Soil*, 194: 45-55.

Kleifeld, O. , Chet, I. (1992): Trichoderma – plant interaction and its effect on increased growth response. *Plant Soil*, 144: 267–272.

Kloepper J.W., Reddy M.S., Rodriguez-Kabana R., Kokalis-Burelle N., Martinez- Ochoa N., Vavrina CS. (2004): Application of Rhizobacteria in transplant production and yield enhancement. *Acta Horticulturae*, 631: 217-229.

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.

Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. , Schroth, M. (1980): *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current Microbiology*, 4: 317-320.

Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N. (1980): Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286:885–86.

Klose, S., Moore, J.M., Tabatai, M.A. (1999): Arylsulfatase activity biomass in soils as affected by cropping systems. *Biology and Fertility Soils*, 29:46-54.

Knežević-Vukčević, J., Simić, D. (1997): *Metode u mikrobiologiji I: praktikum i laboratorijski dnevnik*, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu.

Kojic, M., Venturi, V. (2001): Regulation of *rpoS* Gene Expression in *Pseudomonas*: Involvement of a TetR Family Regulator. *J. Bacteriol.*, 183: 3712-3720.

Kokalis-Burelle, N., Vavrina, C.S., Roskopf, E.N., Shelby, R.A. (2002): Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant Soil*, 238:257-266.

Korhonen T. K., Nurmiäho-Lassila E., Laakso T., Haahtela K. (1986): Adhesion of fimbriated nitrogenfixing enteric bacteria to root grasses and cereals. *Plant Soil*, 90: 59-69.

Kouchi, H., Shimomura, K., Hata, S., Hirota, A., Wu, G.J., Kumagai, H., Tajima, S., Suganuma, N., Suzuki, A., Aoki, T., (2004): Large-scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res* , 11: 263–274

Kremer, R.J., Souissi, T. (2001): Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. *Current Microbiol*, 43: 182–186.

Kuffner, M., Puschenreiter, M., Wieshammer, G., Gorfer, M., Sessitsch, A. (2008): Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil*, 304: 35-44.

Kumar, N.R., Arasu, V.T., Gunasekaran, P. (2002): Genotyping of antifungal compounds producing plant promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. *Current Science*, 82:1463-1466.

Kumar, V., Narula, N. (1999): Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum*, *Biology and Fertility Soil* 27: 301-305.

Landers, D.H., David M.B., Mitchell, M.J. (1983): Analysis of organic and inorganic sulfur constituents in sediments, soils and water *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 14: 245–256

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

Lapinskas, P.J., Brown, S., Leesnitzer, L.M., Blanchard, S., Swanson, C., Cattley, R.C., (2005): Role of PPAR α in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology*, 207(1):149–163.

Lata, Saxena, A.K., Tilak, K.V.B.R. (2002): Biofertilizers to augment soil fertility and crop production. In *Soil Fertility and Crop Production Science Publishers, USA*. Edited by Krishna KR, 279–312.

Lenhard, G. (1956): The dehydrogenase activity in soil as a measure of activity of soil microorganisms, *Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenkd.*, 73, 1-11.

Li, H., Johnson, P., Stepanova, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R. (2004): Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis*. *Dev. Cell*, 7: 193–204.

Liu, M., Gonzales, J.E., Willis, L.B., Walker, G.C. (1998): A novel screening method for isolating exopolysaccharide- deficient mutans. *Applied Environmental Microbiology*, 64:4600-4602.

Lo, C. T., Nelson, E. B. , Harman, G. E. (1996): Biological control of turfgrass diseases with a rhizosphere competent strain of *Trichoderma harzianum*. *Pl. Dis*, 80: 736-741.

Loper, J.E., Schroth, M.N. (1986): Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, 76: 386-389.

Loper, J.E., Gross, H. (2007): Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 265-278.

Lorito, M., Woo, S. L., Scala, F. (2004): Le biotecnologie utili alla difesa sostenibile delle piante: i funghi. In *Agroindust.*, 3: 181-195.

Lucas García, J.A., Domenech, J., Santamaría, C., Camacho, M., Daza, A., Gutiérrez Mañero, F.J. (2004): Growth of forest plants (pine and holm-oak) inoculated with rhizobacteria: relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere. *Environmental and Experimental Botany*, 52 (3): 239–251.

Lucille, K., Georg, G., Robertstad, W., Sherry, A. B. (1964): Identification of species of actinomyces *journal of bacteriology*. 88:2:477-490.

Lucy, M., E. Reed, Glick, B.R. (2004): Applications of free-living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 86: 1-25.

Ma, J.F., Ryan, P.R., Delhaize, E. (2001): Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci*, 6:273–278.

Macek, T., Mackova, M., Kas, J. (2000): Research review paper: exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances*, 18: 23–34.

Mäder, P., Fliebach, A., Dubois, D., Gunst, L., Fried, P. , Niggli, U. (2002): Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science*, 296: 1694 – 1697.

Maleki, M., Mostafae, S., Mokhtarnejad, L., Farzaneh, M. (2010): Characterization of *Pseudomonas fluorescens* strain CV6 isolated from cucumber rhizosphere in Varamin as a potential biocontrol agent. *AJCS*, 4(9):676-683.

Marschner, P., Crowley, D., Yang, C.H. (2004): Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil*, 261: 199–208.

Marschner, P., Yang, C.H., Lieberei, R., Crowley, D.E. (2001): Soil and plant specific effect on bacterial community composition in the rhizosphere, *Soil biology and Biochemistry*, 33:1437-1445.

Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, O., Mengel, K. (2000): The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol. Fertil. Soils*, 30: 433-439.

Matar, S.M., El-Kazzaz, S.A., Wagih, E.E., El-Diwany, A.I., Moustafa, H.E., Abo-Zaid, G.A., Abd-Elsalam, H.E., Hafez, E.E. (2009): Antagonistic and inhibitory effect of *Bacillus subtilis* against certain plant pathogenic fungi I. *Biotechnology*, 8(1): 53-61.

Mayak, S., Tirosh, T., Glick, B.R. (2004): Plant growth-promoting that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci.*, 166:525–530.

McCully, M. E., (2001): Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Functional Plant Biology*, 28:983-990.

McCully, M.E. (2001): Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's review. *Aust. J. Plant Physiol.*, 28: 983–990.

McInroy, J.A., Klopper, J.W. (1995): Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*, 173:337-342.

Meera, T., Balabaskar, P. (2012): Isolation and characterization of *Pseudomonas fluorescens* from rice fields. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*, 2 (1) January-April:113-120.

Mehnaz, S., Weselowski, B., Aftab, F., Zahid, S., Lazarovits, G., Iqbal, J. (2009): Isolation, characterization, and effect of fluorescent pseudomonads on micropropagated sugarcane. *Canadian Journal of Microbiology*, 55: 1007–1011.

Menkina, R.A. (1961): Rol *Bacillus megaterium* var phosphaticum u pitanju rastenja. Mikroorganizmi i efektivnoje plodprodije počv. Akademii Nauk. SSSR. 238-245.

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

Milić, V., Jarak, M., Mrkovački, N., Milošević, N., Govedarica, M., Đurić, S., Marinković, J. (2004): Primena mikrobioloških đubriva i ispitivanje bioloških aktivnosti u cilju zaštite zemljišta (Pregledni rad), *Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo*, 40: 153-169.

Milošević, N., Govedarica, M. (2001): Mogućnost primene biofertilizatora u proizvodnji ratarskih neleguminoznih biljaka. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo*, 35:53-65.

Milošević, N., Govedarica, M., Jarak, M. (1997) : Mikrobiološka aktivnost – važno svojstvo u određivanju plodnosti zemljišta. *Act herbiological*, 5: 1: 79-85.

Milošević, N., Govedarica, M., Jeličić, Z., Protić, R., Kuzevski, J., Krstanović, S. (2003): Mikrobni inokulanti kao biofertilizatori: testiranje, mogućnosti i značaj u održivoj poljoprivredi. *Zbornik naučnih radova, XVII Savetovanje agronoma, veterinara i tehnologa, Beograd*, 9: 89-98.

Milošević, N., Govedarica, M., Kuzevski, J., Jarak, M., Krstanović, S. (1997): Field testing of *Azotobacter chroococcum* affectiveness in suger beet. *Biological Nitrogen Fixation for the 21 st Century*, (Elmerich et al., eds), *Curent Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, 31:414.

Milošević, N., Govedarica, M., Ubavić, M., Hadžić, V., Nešić, Lj. (2003): Mikrobiološke karakteristike zemljišta- osnova za kontrolu plodnosti, *Zb. Radova, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad*, 39: 93-99

Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L. (2006): Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. *Crop Protection*, 25:468-475.

Mirza, M.S., Mehnaz, S., Normand, P., Prigent-Combaret, C., Moëgne-Loccoz, Y., Bally, R., Malik, K.A. (2006): Molecular characterization and PCR detection of a nitrogenfixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biol. Fertil. Soils*, 43:163–170.

Mishra, R. K., Prakash, O., Alam, M., Dikshit, A. (2010): Influence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the productivity of *Pelargonium graveolens* L. *Herit. Recent Research in Science and Technology*, 2(5): 53-57.

Moncheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V., Nikolova, S.A., Bogatzevska, N. (2002): Characteristics of soil actinobacteria from Antarctica. *J. Culture Collections*. 3:3-14.

Morvan-Bertrand, A., Boucaud, J., Le Saos, J., Prud'homme, M.P. (2001): Roles of the fructans from leaf sheaths and from the elongating leaf bases in the regrowth following defoliation of *Lolium perenne* L. *Planta*, 213:109-120.

Mrkovački, N., Čačić, N., Kuzevski, J., Kovačev, L., Mezei, S., Nagl, N., Bjelić, D. (2010): Uticaj načina primene *Azotobacter chroococcum* na mikroorganizme u rizosferi i prinos šećerne repe. *Ratar. Povrt. / Field Veg. Crop Res.*, 47: 599-606.

Mrkovački, N., Milić, V. (2001): Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application. *Ann. Microbiol.*, 51: 145-158.

Mullen, M.D. (2005): Phosphorus in soils: biological interactions. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, 3:210-215.

Myeong-Hoon, J., Sung-Ho, H., Yong-Soo, H., Ji-Yeon, K. (2007): Isolation, Identification, and Characterization of Bacillus strains from the Traditional Korean Soybean-fermented Food, Chungkookjang. *J. Appl. Biol. Chem.*, 50(4):202-210.

Nacamulli, C., Bevivino, A., Dalmastri, C., Tabacchioni, S., Chiarini L. (1997): Perturbation of maize rhizosphere following seed bacterization with Burkholderia cepacia MCI 7. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 23: 183-193.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. (2003): Microbial diversity and soil functions, *Eur. J. Soil Sci.*, 54:665-670.

Nathan, P., Rathinam, X., Kasi, M., Rahman, Z. A., Subramaniam, S. (2011): A pilot study on the isolation and biochemical characterization of Pseudomonas from chemical intensive rice ecosystem. *African Journal of Biotechnology*, 10(59): 12653-12656.

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

Nelson, A. D., Bavbeev, L.E., Gjepnema, J., Rusell, S.A., Powelson, R., Evans, H.J., Seidlev, R.J. (1976): Nitrogen fixation associated with grasses in Oregon. *Can. J. Microbiology*, 22: 523-530.

Neseby, D.C., Lynch, J.M. (2001): Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing, overproducing and nonproducing *Pseudomonas fluorescens* F113 in the rhizosphere of pea. *Microb. Ecol.*, 42: 193-200.

Nihorimbere, V., Marc Ongena, M., Smargiassi, M., Thonart, P. (2011): Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol Agron Soc Environ.*, 15:327-337.

Niranjan-Raj, S., N.P. Shetty, Shetty, H.S. (2004): Seed-bio-priming with *Pseudomonas fluorescens* isolates, enhances growth of pearl millet plants and induce resistance against downy mildew. *Int. J. Pest Manage.*, 50: 41-48.

Nolan, R.D., Cross, T. (1988): Isolation and screening of actinomycetes. *Actinomycetes in biotechnology*. Orlando: Academic Press.

Oberson, A., Friesen, D.K.K., Rao, I.M., Buechler, S., Frossard, E. (2001): Phosphorus transformations in an Oxisol under contrasting land-use systems: the role of the soil microbial biomass, *Plant Soil*, 237:197-210.

Ogram, A.V. (2000): Soil molecular ecology at age 20: Methodological challenges for the future. *Soil Biology and Biochemistry*, 32:1499-1504.

Okon, Y., Kapulnik, Y. (1986): Development and function of Azospirillum inoculated roots. *Plant and Soil*, 90:3-16.

Oliveira, C.A., Alves, V.M.C., Marriel, I.E., Gomes, E.A., Scotti, M.R., Carneiro, N.P., Guimaraes, C.T., Schaffert, R.E., Sá, N.M.H. (2009): Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biol. Biochem.*, 41: 1782-1787.

Oliveira, F.L., Ferreira, E.M., Pampulha, M.E. (1997): Nitrogen fixation, nodulation and yield of clover plants co-inoculated with root-colonizing bacteria. *Symbiosis*, 23: 35-42.

Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., Sahin, F. (2006): Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae*, 111 (suppl 1): 38-43.

Oskay, M., Tamer, A.U., Azeri, C. (2004): Antibacterial activity of some Actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 3, 9: 441- 446.

O'Sullivan, O'Gara, F. (1992): Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.*, 56: 662-676.

Ovreas, L. (2000): Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters*, 3:236-251.

Ownley, B. H., Weller, D. M., Thomashow, L. S. (1992): Influence of in situ and in vitro pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathology*, 82:178-184.

Ozbay, N., Newman, S. E. (2004): Biological Control with *Trichoderma* Spp. With Emphasis on *T. harzianum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7 (4): 478-484.

Pal, S.S. (1998): Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. *Plant Soil*, 198: 169-177.

Pant, R., Mukhopadhyay, A. N. (2001): Integrated management of seed and seedling rot complex of soybean. *Indian Phytopathology*, 54: 346-350.

Papavizas, G.C. (1985): *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Review of Phytopathol*, 23: 23-54.

Patten, C.L. Glick, B.R. (2002): Role of *pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ.l Microb.*, 68:795–3801.

Patten, C.L., Glick, B.R. (2002): Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Can J Microbiol*, 48: 635–642.

Paul, E.A., Clark, F.E. (1989): *Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press Inc., San Diego, CA, 273 .

Paulitz, T.C., Belanger, R.R. (2001): Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 39: 103-133.

Pavis , N., Boucaud , J., Prud'homme, M. P. (2001): Fructans and fructan-metabolizing enzymes in leaves of *Lolium perenne*. *New Phytologist* 150:97-109.

Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W.J. (2000): Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 180–201.

Peters, G.A., Meeks, J.C. (1989): The *Azolla–Anabaena* symbiosis: basic biology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40: 193–210.

Philson, S.B., Llinás, M. (1982): Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens*. I. Isolation and characterization. *J Biol Chem*. 25;257(14):8081–8085.

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

Poshon,J.,Tardieux,P.(1962): *Tehniques d’analyse en microbiologie du sol*, Paris.

Prosser, J.I. (2002): *Plant and Soil*, 244:9-17.

Przybulewska, K., Sienicka, K. (2008): Microorganisms development and atrazine decay under field conditions after inoculation with microorganisms isolated from long-term herbicide experiments. *Ecological chemistry and engineering*, 15 (4): 501-511.

Pulz, O., Grass, W. (2001): Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65: 635–648.

Puppi, G., Azcon, R., Hoflich, G. (1994): Managment of positive interactions of arbuscular mycorrhizal fungi with essential groups of soil microorganisms. In: *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*, 201-215.

Raaijmakers, J.M., Vlami, M., de Souza J.T. (2002): Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81: 537-547.

Rajmakers, J.M., Timothy, C. P., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moëgne-Loccoz, Y. (2009): The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms, *Plant Soil*, 321:341–361.

Ratti, N., Kumar, S., Verma, H. N., Gautam, S. P. (2001): Improvement in bioavailability of tricalcium phosphate to *Cymbopogon martinii* var. *motia* by rhizobacteria, AMF and azospirillum inoculation, *Microbiol Res.*, 156: 145-149.

Reddy, M.S., Rahe, J.E. (1989): Growth effects associated with seed bacterization not correlated with populations of *Bacillus subtilis* inoculant in onion seedling rhizospheres. *Soil Biol. Biochem.*, 21: 373-378.

Reed, J.W., Capage, M., Walker, G.C. (1991): *Rhizobium melioli* *exoG* and *exoJ* mutations affect the *exoX-exoY* system for modulation of exopolysaccharide production. *Journal of Bacteriology*, 173: 3776-3788.

Reed, M.L.E, Glick, B.R. (2005): Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can. J. Microbiol.*, 51 : 1061-1069.

Reiter, B., Pfeifer, U, Schwab, H., and Sessitsch, A. (2002): Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:2261-2268.

Rennei, R.J. (1981): A single medium for the isolation of acetylene reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can.J.Microbiol.*, 27, 1: 8-14.

Rennie, R. J., Rennie, D. A. (1983): Techniques for quantifying N₂ fixation in association with nonlegumes under field and green-house conditions. *Can. J. Microbiol.*, 29:1022–1035.

Rezzonico, F., Zala, M., Keel, C, Duffy, B., Moëgne-Loccoz, Y., Défago, G. (2007): Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? *New Phytol.*, 173:861-872.

Rhee, Y.Y. H., Yah, Y.C., Hong, S. W. (1987) : Relative contributions of fungi and bacterial to soil carboxymethylcellulose activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 19:479-481.

Richardson, A. E., Hadobas, P. A. (1997):Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Can J Microbiol*, 43:509-516.

Richardson, A.E. (2001): Prospects for using soil micro-organisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 897–906.

Robertson, G. P., Groffman, P. (2007): Nitrogen transformations. *Soil Microbiology, Biochemistry, and Ecology*, 341-364

Roco, A., Perez, L. M. (2001): In vitro biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaria alternata* in the presence of growth regulators. *Electronic J. Biotechnol.* 4 (2).

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

Rokhzadi, A., Asgharzadeh, A., Darvish, F., Nour-Mohammadi, Majidi, E. (2008): Influence of plant growth-promoting rhizobacteria on dry matter accumulation and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under field conditions. *Am-Euras. J. Agric. Environ. Sci.*, 3(2): 253–257.

Rosello-Mora, R., Amann, R. (2001): The species concept for prokaryotes, *FEMS Microbiological review*, 25:39-67.

Rosswall, T. (1976): The internal nitrogen cycle between microorganisms, vegetation and soil. In *Nitrogen, phosphorus and sulfur-global cycles*, *Ecological Bulletins*, 157-167.

Roy, N., Chakrabarty, P.K. (2000): Effect of aluminum on the production of siderophore by *Rhizobium* sp. (*Cicer arietinum*). *Curr. Microbiol.*, 41:5-10.

Rubin, D.G., Rajendra, S., Priti, B.B., Devendera Singh, R. (2012). Assessment of the role of *Pseudomonas fluorescens* as biocontrol agent against fungal plant pathogens. *International research journal of pharmacy*, 3(4): 178-180.

Ruiz-Lozano, J. M., Bonfante, P. (2001): Intracellular Burkholderia strain has no negative effect on the symbiotic efficiency of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Plant Growth Regul.*, 34:347–352.

Sahebani, N., Hadavi, N. (2008): Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biol. Biochem.*, 40: 2016–2020.

Sahin, F., Cakmakci, R. , Kantar, F. (2004): Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant and Soil*, 265: 123-129.

Sakthivel, N., Gnanamanickam, S. S. (1987): Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of sheath rot disease and for enhancement of grain yield in rice (*Oryza sativa* L.). *App. Env. Microbiol.*, 51(9):2056-2059.

Sakthivel, U., Karthikeyan, B. (2012): Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) from the rhizosphere of *coleus forskohlii* grown soil *International Journal of Recent Scientific Research*, 3, 5:288 – 296.

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

Salisbury, F.B. (1994): The Role of Plant Hormones. In: Plant-Environment Interactions, 39-81.

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

Scher, F. M., Baker, R. (1982): Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium wilt* pathogens. Phytopathology 72: 1567–1573.

Scher, F.M., Kloepper, J.W., Singleton, C.A. (1985): Chemotaxis of fluorescent *Pseudomonas spp.* to soybean seed exudates in vitro and in soil. Can. J. Microbiol., 31: 570-574.

Schulten, H.R., Schnitzer, M. (1999): The chemistry of soil organic nitrogen, a review, Biology and Fertility of Soils , 26: 1-15.

Schwieger, F., Tebbe, C.C. (2001): Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizosphere of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*)-Linking of 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 66: 3556-3565.

Shah, Z., Shah, S.H., Peoples M.B., Schwenke G.D., Herriedge, D.F. (2003): Crop residue and fertilizer N effects on nitrogen fixation and yields of legume-cereal rotations and soil organic fertility. Field Crops Res., 83: 1-11.

Shalau Microbiology (2000): Handbook of Microbiological culture media. 87.

Sharma, A., Johri, B. N. (2003): Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron depriving conditions, Microbiol Res ,158 : 243-248.

Shaukat, K., Affrasayab, S., Hasnain, S. (2006): Growth responses of *Triticum aestivum* to plant growth promoting rhizobacteria used as a biofertilizer. Res. J. Microbiol., 1: 330-338.

Shedova, E., Lipasova, V., Velikodvorskaya, G., Ovadis, M., Chernin, L., Khmel, I. (2008): Phytase activity and its regulation in a rhizospheric strain of *Serratia plymuthica*. Folia Microbiol., 53:110-114.

Shoebitz, M., Ribaudó, C.M., Pardo, M.A., Cantore, M.L., Ciampi, L., Curá, J.A. (2009): Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. Soil Biol. Biochem., 41:1768–1774.

Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., Hussain Sheikh, I., Khan, A. (2006): Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World J. Microb. Biot.*, 22: 641–650.

Sikora, S. (1990) : Mikrobiološke karakteristike antropogenih tala zapadne Slavonije. Magistarski rad. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Singh, S, Kapoor, K. K. (1999) : Inoculation with phosphate-solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. *Biol. Fertil. Soils.*, 28: 139-144.

Sivan, A., Chet, I. (1989): The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathol*, 79: 198-203.

Smith, L. J., Paul, E. A. (1990): The significance of soil microbial biomass estimations. *Soil Biochemistry*. Vol. 6 Bollag J. M, Stotzky G (eds). Marcel Dekker, New York, 357-396.

Smith, R.L., Schank, S.C., Bouton, J.H, Quesenberry, K.H. (1978) *Ecological Bulletin*, Stockholm, 26: 380.

Smith, S.E., Read, D.J. (1997): *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London.

Soares, F., Silva Sousa, C., Silva Garrido M., Perez, J.O. (2007): Production of streptomycete inoculum in sterilized rice, *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)*, 64 ,6.

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.

Soesanto, L., Mugiastuti,E., Rahayuniati, R.F. (2011): Morphological and Physiological features of *Pseudomonas fluorescens* P60. Presented in: The 4th International Seminar of Indonesian Society for Microbiology, 22-24 June 2011, Udayana University, Denpasar, Bali.

Somers, E., Vanderleyden, J., Srinivasan, M. (2004): Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.*, 30: 205-235.

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.

Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Vanderleyden, J. (2008): Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil*, 312:15–23.

Stamenov, D. (2009): Mikroorganizmi u kiselim zemljištima: brojnost, aktivnost i efekat inokulanata. Magistarska teza. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Stamenov, D., Jarak, M., Đurić, S., Andjelković, S., Hajnal-Jafari, T. (2011a): The effect of *Trichoderma asperellum* on the yield and number of microorganisms in the rhizosphere of english ryegrass. Proceedings (Currently on the CD) of 7. Th Balkan congress of microbiology, 25-29.10.2011., Beograd

Stamenov, D., Jarak, M., Đurić, S., Hajnal-Jafari, T. (2011b): The increase of microbiological activity of acid soil by means of inoculation and liming, *Economics of agriculture*, 58, 1, 201-211.

Stamenov, D., Jarak, M., Đurić, S., Hajnal-Jafari, T. (2012a). Microbial inoculation effect on the Yield of English Ryegrass and Number of Rhizospheric Microorganisms, Scientific Conference Ecosystems and their functions, Banska Bystrica, Slovakia, 66-70.

Stamenov, D., Jarak, M., Đurić, S., Milošev, D., Hajnal Jafari, T. (2012b): The use of plant growth promoting Rhizobacteria in the production of English Ryegrass, *Plant, Soil and Environment*, 58 (10): 477-480.

Stamenov, D., Jarak, M., Đurić, S., Hajnal-Jafari, T., Andelković, S. (2012c): The Effect of Azotobacter and Actinomycetes on the Growth of English Ryegrass and Microbiological Activity in Its Rhizosphere, Book of Abstract, International symposium Trends in the European Agriculture development, May 17-18, 2012., Timisoara, Romania.

Stevenson, F. J., Cole, M. A. (1999): *Cycles of soil*. Second Edition. John Wiley & Sons, London, 428.

Stevović, V., Đukić, D., Đurović, D., Mandić, L. (2005): Liming to be applied to enhancing lucerne yield and quality potential. Proceedings of the Union of Scientist- Rousse, book 3, Agrarians and Veterenary medicines Sciences, 5:17-20.

Strzelczyk, A.B. (1981): Stone. In: *Microbial Biodeterioration, Economic Microbiology*, Academic Press, London, 6:61-80.

Sturz, A.V., Christie, B. R., Matheson, B. G., Arsenault, W. J., and Buchanan, N. A., (1999): Endophytic communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens, *Plant Pathol.*, 48:360-369.

Sudha, S.N., Jayakumar, R., Sekar, V. (1999): Introduction and expression of the cry1Ac gene of *Bacillus thuringiensis* in a cereal associated bacterium, *Bacillus polymyxa*. *Curr. Microbiol.*, 38:163-167.

Sundara B., Natarajan V., Hari K. (2002): Influence of phosphorous solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorous and sugarcane and sugar yields. *Field Crop Res.*, 77: 43-49.

Suneetha, V., Karthick, R., Prathusha, K. (2011): Isolation and identification of *Streptomyces* ST1 and ST2 strains from Tsunami affected soils: Morphological and biochemical studies *Journal of Oceanography and Marine Science*, 2(4): 96-101.

Suzuki, S., Yamamoto, K., Okuda, T., Nishio, M., Nakanishi, N., Komatsubara, S (2000): Selective isolation and distribution of *Actinomadura rugatobispora*. strains in soil. *Actinomycetologic*.

Swain, M.R., Naskar, S.K., Ray, R.C. (2007): Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of Yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. *Pol. J. Microbiol.*, 56: 103–110.

Takisawa, M., Colwell, R.R., Hill, R.T. (1993): Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 997–1002.

Thalman, A. (1968): Zur Methodik der Bestimmung der dehydrogenase aktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch. Forsch.*, 21: 249-257.

Tondje, P.R., Roberts, D.P., Bon, M.C. and others (2007): Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biological Control*. 43:202-212.

Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdynseva, T.A., Netrusov, A.I. (2006): Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl. Biochem. Micro.*, 42:117–126.

Uchida, R. (2000): Essential Nutrients for Plant Growth: Nutrient Functions and Deficiency Symptom. From: *Plant Nutrient Management in Hawaii's Soils, Approaches for Tropical and Subtropical Agriculture*. J. A. Silva and Uchida, eds. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa, 31-55.

Umarov, M.M. (1985): Značenje nesimiotičeskoj azotifiksacii v balanse azota v počve. *Izv. AN SSSR Ser. biol.*, 1:92-105.

Upadhyay, R., Strobel, G., Coval, S., Clardy, J. (1991): Fijiensin, the first phytotoxin from *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of black sigatoka disease. *Experientia*, 47:982-984.

Van der Haiden, M.G.A., Klinoromos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R.(1998): Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity, *Nature*, 396: 69-72.

Van Overbeek, L.S., Van Vee, J.A., Van Elsas, J.D. (1997): Induced reporter gene activity, enhanced stress resistance, and competitive ability of a genetically modified *Pseudomonas fluorescens* strain released into a field plot planted with wheat, *App.viron.Microbiol.*, 63:1965-1973.

Varghese, R., Nishamol, S., Suchithra, R., Jyothy, S., Mohamed Hatha, Dr. A.A. (2012): Distribution and Antibacterial Activity of Actinomycetes from Shola Soils of Tropical Montane Forest in Kerala, South India, *Journal of Environment*, 1, 3: 93-99.

Vassilev, Vassileva, M. , Nikolaeva, I. (2006): Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 137–144.

Velusamy, P., Immanuel, J.E., Gnanamanickam, S.S., Thomashow, L. (2006): Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4-diacetylphloroglucinol. *Can. J. Microbiol.*,52: 56-65.

Verma, S.C., Ladha, J.K., Tripathi, A.K. (2001): Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J . Biotechnol.*, 91: 127–141.

Vessey, J. K., (2003): Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, *Plant Soil*, 255: 571-586.

Vitousek, P.M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C.B., Grimm, N.B., Howarth, R.W., Marino, R., Martinelli, L., Rastetter, E.B., Sprent, J.I (2002): Toward an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry*, 57: 1–45.

Vivas, A., Barea, J.M., Biro, B., Azcon, R. (2006): Effectiveness of autochthonous bacterium and mycorrhizal fungus on *Trifolium* growth, symbiotic development and soil enzymatic activities in Zn contaminated soil. *J Appl Microbiol.*, 100:587–598.

Voisard, C., Keel, C., Haas, D., Défago, G. (1989): Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.*, 8: 351–358.

Wahyudi, A.T., Astuti, R.P., Widyawati, A., Meryandini, A., Nawangsih, A.A. (2011): Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3(2): 34-40.

Wakelin, S.A., Warren, R.A., Harvey, P.R., Ryder, M.H.P. (2004): Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils*, 40: 36–43.

Walker, N. (1979): *Soil Microbiology*. John Wiley and Sons, Inc., NY.

Wang, R., Guegler, K., LaBrie, S.T., Crawford, N.M. (2000): Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes that are induced by nitrate. *Plant Cell*, 12: 1491–1510.

Wang, Y., Brown, H.N., Crowley, D.E., Szaniszlo, P.J. (1993): Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. *Plant Cell and Environment*, 16: 579–585.

Weller, D.G., Thomashow, L.S. (1993): Use of rhizobacteria for biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*, 4: 306–311.

Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden Gardner, B.B., Thomashow, L.S. (2002): Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40:308–348.

Whipps, J.M. (2001): Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Expt. Bot.* 52: 487–511.

Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J. (1998): Prokaryote the unseen majority, *Proceedings of the national Academy of Sciences of the USA*, 95:6578–6583.

Williams, J. R., Jones, C. A., Dyke, P. T. (1984): A modeling approach to determining the relationship between erosion and soil productivity. *Trans. ASAE*, 27(1): 129–144.

Williams, S.T., Wellington, E.M.H. (1982): *Actinomycetes. Chemical and Microbiological Properties*. Am.Soc. Agronomy and Soil Sci.Soc. of America, 969–987.

Winkelman, G., Dreschel, H. (1999): *Microbial Siderophores (Chapter 5)*. *Environmental Biotechnology (II edition)*.

Wollum, A.G. (1982): Cultural methods for soil microorganisms, *Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological properties- Agronomy monograph 9 (2nd Edition)*.

Xie, H., Pasternak, J.J., Glick, B.R. (1996): Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. *Current Microbiology*, 32:67–71.

Xu, X. M., Jeffries, P., Pautasso, M., Jeger, M. J. (2011): Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice: a review. *Phytopathology*, 101:1024–1031.

Yanni Y.G. , El-Fattah F.K.A. (1999): Towards integrated biofertilization management with free living and associative dinitrogen fixers for enhancing rice performance in the Nile delta. *Symbiosis*, 27:319–331.

Yoshida, S., Shirata, A., Hiradate, S. (2002): Ecological characteristics and biological control of mulberry anthracnose. *JARQ*, 36: 89-95.

Yoshikawa T., Suzuki,H., Nisizawa, K. (1974): Biogenesis of Multiple Cellulase Components of *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. *J. Biochem.*, 75(3):531-540.

Zahir, Z.A., Arshad, M., Frankenberger, W.T. (2004): Plant growth promoting rhizobacteria: application and perspectives in agriculture. *Adv. Agron.*, 81: 96-168.

Zhou, X., Xu, S., Liu, L., Chen, J. (2007): Degradation of cyanide by *Trichoderma* mutants constructed by restriction enzyme mediated integration (REMI). *Biores Technol.*, 98:2958–2962.

www.ohsu.edu/xd/education

BIOGRAFIJA

Dragana Stamenov je rođena 23.10.1978. godine u Dižonu, u Francuskoj. Osnovnu školu završila je u Orlovatu, a Gimnaziju u Zrenjaninu, sa odličnim uspehom.

Biološki fakultet u Beogradu upisuje 1998. godine, a svoje studije nastavlja na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu 2000. godine, gde i završava studije 2003. godine sa prosečnom ocenom 9,14 i ocenom 10 na diplomskom radu.

Školske 2003/04. godine upisuje magistarske studije na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, smer: mikrobiologija. Od februara 2004. godine je stipendista Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine. U toku magistarskih studija položila je sve ispite sa prosečnom ocenom 9,86. Magistarski rad pod naslovom: " Mikroorganizmi u kiselim zemljištima: brojnost, aktivnost i efekat inokulanata" odbranila je na dan 08.06.2009.

Školske 2009/2010. godine upisala je doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu. Od februara 2010. godine stipendista je Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

Do sada je objavila velik broj naučnih radova. Učestvovala je na brojnim skupovima, simpozijumima i kongresima regionalnog i međunarodnog karaktera. Na Poljoprivrednom fakultetu, pored izrade magistarskog rada i doktorske teze, bila je angažovana i u vođenju studentskih vežbi kao i na projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

Govori engleski i služi se francuskim jezikom.

Udata je i ima ćerku Lanu.