

Bjelić, D., Mrkovački, N., Marinković, J., Tintor, B., Grahovac, N.

## EFFECT OF *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* ON THE MICROBIAL ABUNDANCE IN MAIZE RHIZOSPHERE

**Summary:** The aim of this study was to examine the effect of *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on the microbial abundance in maize rhizosphere. Field trial was established on chernozem soil at Rimski Šančevi experiment field of Institute of Field and Vegetable Crops in Novi Sad. The experimental object was the rhizosphere under maize hybrid NS 6010. Applied strains, as well as their combinations, stimulated the microbial abundance in maize rhizosphere. This research has shown that introduction of microorganisms in the soil intensifies the microbial processes, accelerates the mineralization and creates larger amount of plant nutrients. Application of microorganisms in maize production could reduce the use of chemical fertilizers and pesticides, and thus the soil pollution.

**Key words:** *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis*, maize, microbial abundance, *Pseudomonas fluorescens*

## UTICAJ *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas fluorescens* NA BROJNOST MIKROORGANIZAMA U RIZOSFERI KUKURUZA

**Rezime:** Cilj ovih istraživanja bio je da se ispita uticaj sojeva *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas fluorescens* na brojnost mikroorganizama u rizosferi kukuruza. Ogljed je postavljen na zemljištu černoziem na oglednom polju Rimski Šančevi, Instituta za ratarstvo i povrtarstvo. Ispitivana je rizosfera kukuruza hibridom kukuruza NS 6010. Primenjeni sojevi, kao i njihove kombinacije, delovali su stimulatивно na brojnost mikroorganizama u rizosferi kukuruza. Ova istraživanja ukazuju da se unošenjem izabranih mikroorganizama na zemljište mikrobiološki procesi intenziviraju, ubrzava se mineralizacija i stvara se veća količina biljnih hraniva. Primenom mikroorganizama u proizvodnji kukuruza smanjila bi se upotreba hemijskih sredstava, uključujući đubriva i pesticide, a time i zagađenje zemljišta.

**Ključne reči:** *Azotobacter chroococcum*, brojnost mikroorganizama, *Bacillus subtilis*, kukuruz, *Pseudomonas fluorescens*

### 1. UVOD

Rezultat povezanosti pedogenetskih i mikrobioloških svojstava zemljišta daje efektivnu i potencijalnu plodnost tog zemljišta. Svaki tip zemljišta odlikuje karakteristična mikroflora koja se menja u zavisnosti od ekoloških činilaca, primenjenih agrotehničkih mera, biljne vrste, prisustva teških metala, kao i međusobnog odnosa mikrobne populacije [11]. Govedarica i sar.[5] utvrdili su da određivanje brojnosti i enzimatske aktivnosti može da posluži kao siguran pokazatelj plodnosti zemljišta.

Broj mikroorganizama u rizosferi je 10 pa i 100 veći u odnosu na okolno zemljište. Rizosfera obuhvata zonu zemljišta uz koren biljke (uključujući tkivo i samu površinu korena) koja je pod direktnim uticajem njegovih izlučevina i predstavlja područje odvijanja složenih interakcija između mikroorganizama, biljaka i zemljišta.

Mikroorganizmi koji naseljavaju ovu zonu, prema njihovoj aktivnosti, mogu biti podeljeni na: mikroorganizme koji povećavaju dostupnost hraniva za biljke, fitostimulatore – stimulišu rast, uglavnom

putem proizvodnje biljnih hormona, rizosferne, razlažu organske polutante i biopesticide – izazivaju bolesti, uglavnom putem proizvodnje antibiotika, antifungalnih metabolita [16].

Različitim tehnikama izolacije, iz rizosfere različitih biljnih vrsta izolovani su i identifikovani mnogi mikroorganizmi [1, 10]. Ovi mikroorganizmi, kao i kod nas, koriste se za pripremu mikrobioloških preparata koji se primenjuju u cilju povećanja biljaka hranivima, promocije rasta i zaštite od fitopatogenih mikroorganizama. Primenom ovih preparata ispoljila je pozitivan efekat kod ratarskih i povrtarskih biljnih vrsta [6, 8, 12]. Ovo posebno je opravdana kod vrsta koje se gajuju na velikim površinama kao što je kukuruz. Mnogi mikroorganizmi poboljšavaju hranjivost, ali i zdravstvena svojstva zemljišta, te se njihovo unošenje razmatra kao alternativa ili dopuna smanjenoj upotrebi hemijskih sredstava u poljoprivredi. Mikroorganizmi koji se najčešće koriste u proizvodnji mikrobioloških preparata pripadaju rodovima *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* i dr.

Cilj ovih istraživanja bio je da se ispita efekat inokulacije sojevima *Azotobacter*, *Bacillus* i *Pseudomonas* na dinamiku populacije rizosfernih mikroorganizama tokom vegetacije kukuruza.

## 2. MATERIJAL I METOD RADA

Ogled je postavljen na zemljištu tipa černoze na oglednom polju Rimski Šančevi, Instituta za ratarstvo i povrtarstvo. Ispitivano je rizosferno zemljište pod hibridom kukuruza NS 6010. U ovim istraživanjima korišćene su tri vrste rizobakterija: *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas fluorescens*. Inokulacija je izvršena tečnim kulturama pomenutih sojeva, gustine ćelija  $10^9$  u ml. Primenjene su sledeće varijante ogleda, u četiri ponavljanja: (I) *Azotobacterchroococcum*,(II) *Bacillus subtilis*,(III) *Pseudomonas fluorescens*, (IV) *Azotobacter chroococcum*+ *Bacillus subtilis*, (V) *Azotobacter*

varijantu - kontrolu, dok je u drugom i trećem roku smanjen. Najbolji efekat na ukupan broj mikroorganizama postignut je inokulacijom sa *Azotobacter chroococcum* i *Pseudomonas fluorescens* (V) (Tab. 1).

Mnogi istraživači zapazili su pozitivan efekat *Azotobacter*-a i *Bacillus*-a na brojnost mikroorganizama u rizosferi kukuruza. Takode je utvrđena pozitivna korelacija ukupnog broja mikroorganizama, broja amonifikatora, azotobaktera i slobodnih azotofiksatora u zemljištu i rizosferi, kao i negativna korelacija broja gljiva sa prinom kukuruza i pšenice [15]. U istraživanjima Đorđević i sar. [4] inokulacija kukuruza sa *Bacillus*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas* i *Flavobacterium* izazvala je povećanje ukupnog broja mikroorganizama, dužine biljke, mase suve materije, sadržaja ukupnog fosfora u biljci kukuruza, biomase C i P i aktivnosti alkalne fosfataze.

Tabela 1. Ukupan broj mikroorganizama u rizosferi kukuruza ( $10^7$  g<sup>-1</sup> apsolutno suvog zemljišta)

Vreme uzorkovanja (A)	Varijanta inokulacije (B)								
	Kontrola	I	II	III	IV	V	VI	VII	Prosek I-VII
1	213,12	155,02	216,83	240,38	235,28	237,10	204,99	207,50	<b>213,87</b>
2	225,93	208,78	116,98	235,90	211,62	251,79	270,19	176,87	<b>210,30</b>
3	197,54	139,00	127,59	179,86	200,24	242,11	119,70	237,71	<b>178,03</b>
<b>Prosek</b>	<b>212,20</b>	<b>167,6</b>	<b>153,80</b>	<b>218,71</b>	<b>215,71</b>	<b>243,67</b>	<b>198,29</b>	<b>207,36</b>	
			LSD	A	B	AxB			
			0,05	38,06	62,15	107,65			
			0,01	50,52	82,49	142,88			

*chroococcum*+ *Pseudomonas fluorescens*,(VI) *Pseudomonas fluorescens*+ *Bacillus subtilis*,(VII) *Azotobacter chroococcum*+ *Bacillus subtilis*+ *Pseudomonas fluorescens*. *Azotobacter chroococcum* pripremljen je u Fjodorovoj podlozi, *Bacillus subtilis* u hranljivom agaru i *Pseudomonas fluorescens* u King B podlozi. Netretirano seme poslužilo je kao kontrola. Uzorci rizosfernog zemljišta za mikrobiološke analize uzeti su tri puta u toku vegetacije (jun, jul i oktobar). Ukupan broj mikroorganizama određivan je na zemljišnom agaru (razređenje  $10^7$ ), broj gljiva na krompir-dekstroznom agaru (razređenje  $10^4$ ), broj pseudomonasa na King B podlozi (razređenje  $10^6$ ), broj aerobnih sporogenih i asporogenih bakterija na hranljivom agaru (razređenje  $10^6$ ) i broj azotobaktera na Fjodorovoj podlozi (razređenje  $10^7$ ) [7]. Broj mikroorganizama preračunat je na 1.0 g apsolutno suvog zemljišta. Svi dobijeni rezultati obrađeni su statističkom metodom analize varijanse.

## 3. REZULTATI I DISKUSIJA

Brojnost ispitivanih grupa mikroorganizama zavisila je od roka uzimanja i primenjenih varijanti inokulacije. U proseku, u svim varijantama inokulacije ukupan broj mikroorganizama povećan je u prvom roku uzorkovanja u odnosu na neinokulisano

Broj azotobaktera u proseku je povećan u prvom i drugom roku uzorkovanja u poređenju sa kontrolom, dok je u trećem roku smanjen. Najveće povećanje dobijeno je u varijanti (IV) - *Azotobacter chroococcum* + *Bacillus subtilis* i to povećanje je statistički značajno (Tab. 2). Slični rezultati – povećana brojnost azotobaktera usled primene *Azotobacter chroococcum* + *Bacillus subtilis* (IV) – dobijeni su u istraživanjima Bjelić et al. [2]. Inokulacijom kukuruza sa *Azotobacter chroococcum* i *Bacillus megatherium* dobijeno je povećanje ukupnog broja mikroorganizama, amonifikatora, azotobaktera i smanjenje broja gljiva. Ispitivane vrste pojedinačno ili u smeši uticale su i na povećanje prinosa kod ispitivanih hibrida kukuruza [6]. Cvijanović i sar.[3] pokazali su da bakterizacijom semena kukuruza smešom diazotrofa *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum lipoferum*, *Klebsiella planticola* i *Beijerinckia dervi* u kombinaciji sa različitim dozama mineralnog đubriva dolazi do povećanja ukupnog broja mikroorganizama, broja azotobaktera, aktivnosti dehidrogenaze, prinosa i sadržaja ukupnog azota.

Broj gljiva u proseku je značajno viši u prvom roku uzimanja u poređenju sa drugim i trećem. Broj gljiva statistički je značajno smanjen u varijanti (III) - *Pseudomonas fluorescens* (Tab. 3). Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima [2].

Tabela 2. Broj azotobaktera u rizosferi kukuruza ( $10^2 \text{ g}^{-1}$  apsolutno suvog zemljišta)

Vreme uzorkovanja (A)	Varijanta inokulacije (B)								
	Kontrola	I	II	III	IV	V	VI	VII	Prosek I-VII
1	137,61	161,10	180,53	125,71	152,31	136,68	142,53	139,93	<b>148,40</b>
2	112,17	118,46	111,13	116,53	130,64	122,73	116,53	132,25	<b>121,18</b>
3	147,38	113,15	132,80	133,17	166,21	135,69	139,46	139,55	<b>137,15</b>
<b>Prosek</b>	<b>132,39</b>	<b>130,90</b>	<b>141,49</b>	<b>125,14</b>	<b>149,72</b>	<b>131,70</b>	<b>132,84</b>	<b>137,24</b>	
			LSD	A	B	AxB			
			0,05	10,34	16,89	29,25			
			0,01	13,73	22,42	38,83			

Mrkovački i sar.[13]su takođe ustanovili povećanje ukupnog broja mikroorganizama i broja azotobaktera, a smanjenje broja gljiva tokom vegetacije šećerne repe nakon tretiranja sa različitim sojevima *Azotobacter chroococcum*.

Rezultati istraživanja pokazali su da je broj aerobnih sporogenih bakterija značajno veći u prvom roku uzorkovanja u odnosu na preostala dva roka. U pro-seku, statistički značajno povećanje brojnosti aerobnih sporogenih bakterija dobijeno je u varijanti (III) - *Pseudomonas fluorescens* (Tab. 5), kao kod broja gljiva.

Tabela 3. Broj gljiva u rizosferi kukuruza ( $10^4 \text{ g}^{-1}$  apsolutno suvog zemljišta)

Vreme uzorkovanja (A)	Varijanta inokulacije (B)								
	Kontrola	I	II	III	IV	V	VI	VII	Prosek I-VII
1	21,47	18,60	22,24	11,43	19,29	21,88	13,34	16,48	<b>17,61</b>
2	6,67	9,87	11,11	6,75	7,40	4,91	10,40	8,57	<b>8,43</b>
3	10,77	13,85	6,08	4,23	7,88	10,13	10,28	9,72	<b>8,88</b>
<b>Prosek</b>	<b>13,00</b>	<b>14,11</b>	<b>13,14</b>	<b>7,47</b>	<b>11,52</b>	<b>12,31</b>	<b>11,34</b>	<b>11,59</b>	
			LSD	A	B	AxB			
			0,05	2,92	4,76	8,25			
			0,01	3,87	6,32	10,95			

Najveći broj pseudomonasa dobijen je u prvom roku uzorkovanja i to povećanje je značajno veće u odnosu na drugi i treći rok, slično variranju brojnosti gljiva tokom vegetacije. Najbolji efekat na broj

Najveće povećanje brojnosti aerobnih asporogenih bakterija postignuto je u drugom roku uzorkovanja i to povećanje je značajno veće u poređenju sa trećim rokom. Najveći broj aerobnih asporogenih bakterija

Tabela 4. Broj pseudomonasa u rizosferi kukuruza ( $10^4 \text{ g}^{-1}$  apsolutno suvog zemljišta)

Vreme uzorkovanja (A)	Varijanta inokulacije (B)								
	Kontrola	I	II	III	IV	V	VI	VII	Prosek I-VII
1	68,60	77,39	87,74	84,23	90,70	99,12	83,78	75,46	<b>85,49</b>
2	77,95	65,86	59,90	77,29	78,10	79,89	51,45	84,11	<b>70,94</b>
3	71,84	69,92	78,32	74,26	40,04	80,54	78,06	68,96	<b>70,01</b>
<b>Prosek</b>	<b>72,80</b>	<b>71,06</b>	<b>75,32</b>	<b>78,59</b>	<b>69,61</b>	<b>86,52</b>	<b>71,10</b>	<b>76,18</b>	
			LSD	A	B	AxB			
			0,05	11,45	18,71	32,40			
			0,01	15,20	24,83	43,00			

pseudomonasa ostvaren je inokulacijom sa *Azotobacter chroococcum*+ *Pseudomonas fluorescens* - V, kao što je bio slučaj kod ukupnog broja mikroorganizama (Tab. 4). U našim prethodnim istraživanjima, inokulacijom kukuruza sa istim sojevima u polukontrolisanim uslovima [2] najveći efekat na broj pseudomonasa postignut je u varijanti (III) - *Pseudomonas fluorescens*.

dobijen je u varijanti (V) - *Azotobacter chroococcum*+ *Pseudomonas fluorescens*, u kojoj je dobijen i najveći ukupan broj i broj pseudomonasa (Tab. 6). Proučavajući efekat primene *Azotobacter*-a u proizvodnji kukuruza Jarak i sar.[9] zaključili su da primena *Azotobacter chroococcum* pored povećanja brojnosti mikroorganizama, doprinosi i povećanju prinosa zrna kod ispitivanih hibrida kukuruza (Tisa, NS 5010, NS 444 ultra).

Tabela 5. Broj aerobnih sporogenih bakterija u rizosferi kukuruza ( $10^6$  g<sup>-1</sup> apsolutno suvog zemljišta)

Vreme uzorkovanja (A)	Varijanta inokulacije (B)								
	Kontrola	I	II	III	IV	V	VI	VII	Prosek I-VII
1	74,42	65,82	78,09	87,91	98,20	117,86	77,04	101,13	<b>89,44</b>
2	73,71	75,02	64,38	125,14	62,72	86,57	53,94	51,51	<b>74,18</b>
3	65,49	71,34	50,37	80,86	76,98	75,06	42,32	56,95	<b>64,84</b>
Prosek	<b>71,21</b>	<b>70,73</b>	<b>64,28</b>	<b>97,97</b>	<b>79,3</b>	<b>93,16</b>	<b>57,77</b>	<b>69,86</b>	
			LSD	A	B	AxB			
			0,05	15,64	25,55	44,25			
			0,01	20,76	33,91	58,73			

Tabela 6. Broj aerobnih asporogenih bakterija u rizosferi kukuruza ( $10^6$  g<sup>-1</sup> apsolutno suvog zemljišta)

Vreme uzorkovanja (A)	Varijanta inokulacije (B)								
	Kontrola	I	II	III	IV	V	VI	VII	Prosek I-VII
1	85,06	80,98	88,33	76,29	99,38	91,49	73,97	129,66	<b>91,44</b>
2	100,08	79,35	120,25	118,31	102,06	146,24	69,18	90,97	<b>103,77</b>
3	44,47	78,96	32,28	63,36	39,21	65,32	72,48	78,17	<b>61,40</b>
Prosek	<b>76,54</b>	<b>79,76</b>	<b>80,29</b>	<b>85,99</b>	<b>80,22</b>	<b>101,02</b>	<b>71,88</b>	<b>99,6</b>	
			LSD	A	B	AxB			
			0,05	18,74	30,61	53,01			
			0,01	24,88	40,62	70,36			

#### 4. ZAKLJUČAK

Inokulacijom je povećan ukupan broj mikroorganizama, broj azotobaktera, pseudomonasa, aerobnih sporogenih i asporogenih bakterija, dok je broj gljiva smanjen.

Najveći ukupan broj mikroorganizama, broj azotobaktera, gljiva, pseudomonasa i aerobnih sporogenih bakterija dobijen je u prvom roku uzimanja, dok je najveći broj aerobnih asporogenih bakterija postignut u drugom roku.

Broj ispitivanih mikroorganizama opada tokom vegetacije i to smanjenje je statistički značajno za broj gljiva, pseudomonasa i aerobnih sporogenih bakterija.

Najveći ukupan broj, broj pseudomonasa i aerobnih asporogenih bakterija dobijen je u varijanti(V) - *Azotobacter chroococcum* + *Pseudomonas fluorescens*.

Najveći broj azotobaktera postignut je inokulacijom sa *Azotobacter chroococcum* and *Bacillus subtilis* (IV). Najmanji broj gljiva i najveći broj aerobnih asporogenih bakterija dobijen je u varijanti (III) - *Pseudomonas fluorescens*.

#### 5. LITERATURA

[1] Bashan, Y., Holguin, G., Lifshitz, R. (1993): *Isolation and Characterization of Plant Growth -*

*Promoting Rhizobacteria*. In: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B.R. & Thompson, J.E. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.

[2] Bjelić, D., Mrkovački, N., Jarak, M., Jošić, D., Đalović, I. (2010): *Effect of PGPR on The Early Growth of Maize and Microbial Abundance in Rhizosphere*. *Contemporary Agriculture* 59(3-4): 339-345.

[3] Cvijanović, G., Milošević, N., Jarak, M. (2007): *The Importance of Diazotrophs as Biofertilizers in: The Maize and Soybean Production*. *Genetika* 39: 395-404.

[4] 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.

[5] Govedarica, M., Jarak, M., Milošević, N., Manojlović, S. (1992): *Uloga mikroorganizama u savremenoj biljnoj proizvodnji*. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo 20: 95-103.

[6] Govedarica, M., Jeličić, Z., Stojnić, N., Hajnal, T., Milošević, D. (2001): *Effectiveness of Azotobacter chroococcum and Bacillus megatherium in Corn*. *Soil and Plant* 50: 57-64.

[7] Jarak, M., Đurić, S. (2007): *Praktikum iz mikrobiologije*. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

[8] Jarak, M., Đurić, S., Savin, L., Čolo, J. (2009): *Uticaj primene biofertilizatora na prinos ječma i mikrobiološku aktivnost u zemljištu*. *Traktori i pogonske mašine* 14: 77-81.

- [9]Jarak, M., Jeličić, Z., Kuzevski, J., Mrkovački, N., Đurić, S. (2011): *The Use of Azotobacter in Maize Production: The Effect on Microbiological Activity of Soil, Early Plant Growth and Grain Yield*. Contemporary Agriculture 60 (1-2): 80-85.
- [10]Lalande, R., Bissonnette, N., Coutlee, D., Antoun, H. (2011): *Identification of Rhizobacteria from Maize and Determination of Their Plant Growth Potential*. Plant and Soil 115: 7-11.
- [11]Milošević, N., Govedarica, M., Jarak, M. (1999): Soil microorganisms: An important factor of agroecological systems. Soil and Plant, 48(2): 103-110.
- [12]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, 89-98.
- [13]Mrkovački, N., Mezei, S., Čačić, N., Kovačev, L. (2007): *Efekat primene različitih tipova inokulacije šećerne repe*. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo 43:201-207.
- [14]Mrkovački, N., Čačić, N., Kuzevski, J., Kovačev, L., Mezei, S., Nagl, N., Bjelić, D. (2010): *Uticaj načina primene Azotobacter chroococcum na mikroorganizme u rizosferi i prinos šećerne repe*. Ratarstvo i povrtarstvo, 43: 201-207.
- [15]Sarić, Z., Milić, V., Jarak, M., Govedarica, M. (1983): *Uticaj organskih ostataka na mikrobiološke promene i plodnost zemljišta*. Zbornik radova Poljoprivrednog fakulteta 13: 147-165.
- [16]Somers, E., Vanderleyden, J., Srinivasan, M. (2004): *Rhizosphere Bacterial Signaling: A Love Parade Beneath Our Feet*. Critical Reviews in Microbiology 30: 205-240.