

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Snežana M. Dimitrijević

**PRIMENA NOVIH SOJEVA BAKTERIJA U  
PROIZVODNJI KOMPOSTA I ZA GAJENJE  
ULJANIH VRSTA SA POBOLJŠANIM  
BIOLOŠKIM SVOJSTVIMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Snežana M. Dimitrijević

**APPLICATION OF NEW STRAINS OF  
BACTERIA IN COMPOST PRODUCTION  
AND FOR THE CULTIVATION OF OIL  
SPECIES WITH IMPROVED  
BIOLOGICAL PROPERTIES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

**MENTOR:**

---

Dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

**ČLANOVI KOMISIJE:**

---

Dr Dušan Antonović, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

---

Dr Marija Milić, naučni saradnik,  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

---

Dr Dragoja Radanović, naučni savetnik,  
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“

---

Dr Dubravka Bigović, naučni saradnik,  
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“

**DATUM ODBRANE:**

---

## ZAHVALNICA

*Neizmernu zahvalnost u izradi ove disertacije dugujem svom mentoru, profesorki dr Suzani Dimitrijević-Branković, na strpljivom i pažljivom usmeravanju u radu uz čiju sam nesebičnu pomoć i veliku podršku, tokom rada uspela da prevaziđem sve prepreke na koje sam nailazila, što je za mene od neprocenjivog značaja.*

*Podjednako se zahvaljujem profesoru dr Dušanu Antonoviću na diskusijama i korisnim sugestijama koji su doprineli kvalitetnijem istraživanju i pisanju ovog rada.*

*Bilo je zadovoljstvo sarađivati sa njim.*

*Posebno se zahvaljujem dr Dragoji Radanoviću i dr Dubravki Bigović na korisnim savetima i sugestijama tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem dr Mariji Milić koja mi je svojim znanjem, sugestijama i velikim iskustvom pružila nesebičnu pomoć u svim segmentima naučno-istraživačkog rada a posebno tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Veliko hvala kolegama sa Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Beogradu kao i kolegama sa Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu koji su učestvovali u izradi eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije i koji su doprineli kvalitetnijem istraživanju i oblikovanju ovog rada.*

*Zahvaljujem se dr Mirjani Rajilić-Stojanović na pomoći u identifikaciji sojeva.*

*Zahvaljujem se profesorki dr Svetlani Antić-Mladenović sa Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu na korisnim savetima i sugestijama kao i na pomoći u izradi eksperimentalnog dela ovog rada.*

*Veliku zahvalnost dugujem svojim roditeljima za sve godine mog školovanja, na veri, ljubavi i podršci koju su mi pružili.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem svojoj porodici na beskrajnoj ljubavi i veri da ću istrajati u svojim zamislima. Pre svega mom Saletu za безусловnu ljubav, razumevanje i tehničku podršku prilikom izrade ove disertacije. Hvala mojim divnim dečacima Petru i Stefanu za strpljenje i veliku ljubav koju su mi pružili.*

*Najlepše vam hvala!*

# Primena novih sojeva bakterija u proizvodnji komposta i za gajenje uljanih vrsta sa poboljšanim biološkim svojstvima

## Rezime

Mešani otpad od lekovitog bilja je kompostiran sa dodatkom novih bakterijskih sojeva koji pripadaju rodovima *Streptomyces*, *Paenibacillus*, *Bacillus* i *Hymenobacter*. Kompostiranje je praćeno određivanjem hemijskih i bioloških parametara, uključujući C / N odnos, gubitak organske materije, sadržaj fosfora i kalijuma, kao i oslobađanja CO<sub>2</sub> i dehidrogenazne aktivnosti tokom 164 dana. Pronađeno je da izabrani mezofilni bakterijski sojevi imaju potencijal da značajno redukuju period razgradnje mešanog biljnog otpada od oko 6 meseci do oko 2,5 meseca. Na osnovu merenja indeksa klijanja četiri biljke (*Fagopirum esculentum*, *Thymus vulgaris*, *Cynara scolimus* i *Lavandula officinalis*) klijavost i rast korena ispitanih biljaka je bio poboljšan inokulisanom kompostom. Indeks klijavosti svih testiranih vrsta na zrelom inokulisanom kompostu je bio u proseku 60% veći u poređenju sa kontrolnim (netretiranim) kompostom.

U cilju proučavanja uticaja bakterija koje stimulišu rast biljaka (PGPB), a koje pripadaju rodu *Streptomyces* sp., *Paenibacillus* sp. i *Hymenibacter* sp., na sadržaj masnog ulja u uljanom lanu (*Linum usitatissimum* L.), kao i u crnom kimu (*Nigella sativa* L.), sprovedeni su dvogodišnji terenski eksperimenti. PGPB je primenjen tokom setve biljaka. Ekstrakcija ulja iz semena vršena je natkritičnim CO<sub>2</sub>. Dodavanje PGPB značajno povećava sadržaj masnih kiselina C18: 1 (od 16,06 ± 0,03% do 16,97 ± 0,03%) i C18: 3 (od 42,97 ± 0,2% do 45,42 ± 0,5%) u uljanom lanu i C18: 2 (od 52,68 ± 0,50% do 57,11 ± 0,40%) i C20: 2 (od 4,34 ± 0,02% do 4,54 ± 0,03%) u ulju crnog kima. Utvrđeno je da je sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida i karotenoida, kao i antioksidativne aktivnosti merene FRAP metodom, veći u ulju iz semena biljaka tretiranih sa PGPB, u poređenju sa odgovarajućim netretiranim uzorcima. Upotreba PGPB-a povećava nutritivne osobine biljaka, što predstavlja odličan izvor za dobijanje vrednih sastojaka funkcionalnih namirnica.

**Ključne reči:** kompostiranje, biljni otpad, mezofilne bakterije, indeks klijanja, stimulacija rasta biljaka, fitotoksičnost, *Nigella sativa* L, *Linum usitatissimum* L, bakterije koje stimulišu rast biljaka (PGPB), sadržaj masnih kiselina, antioksidativna aktivnost

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Biohemijsko-inženjerstvo i biotehnologija

**UDK:**

## **Application of new strains of bacteria in compost production and for the cultivation of oil species with improved biological properties**

### **Abstract**

Mixed medicinal plant waste was composted with addition of novel bacterial strains belonging to the genera *Streptomyces*, *Paenybacillus*, *Bacillus* and *Hymenobacter*. The composting was followed by assessment of chemical and biological parameters including C / N ratio, loss of organic matter, phosphorous and potassium content as well as CO<sub>2</sub> generation and dehydrogenase activity during 164 days. The selected mesophilic bacterial starters had a potential to significantly reduce the period of mixed herb waste decomposition, from about 6 months to about 2,5 months. Based on the seed germination index of four plants (*Fagopirum esculentum*, *Thymus vulgaris*, *Cynara scolimus* and *Lavandula officinalis*) the germination and radial root growth of the investigated plants was improved by the inoculated compost. The germination index of all tested species on the mature inoculated composts was in average 60% higher compared to the control compost. The research indicates that the mesophilic starter addition into the herbs waste can contribute to the speed of waste decomposition and lead to the improvement of biofertilization effect of the obtained compost.

In order to study the influence of plant growth promoting bacteria (PGPB) belonging to the *Streptomyces* sp., *Paenibacillus* sp. and *Hymenibacter* sp, on fixed oil content of Flaxseed as well as Black cumin, a two years' field experiments were conducted. The PGPB was applied during seedtime of plants. The extraction of oil from seeds was performed with a CO<sub>2</sub> supercritical extraction. The addition of PGPB significantly increase the content of C18:1 (from 16,06 ± 0.03% to 16,97 ± 0.03%) and C18:3 (from 42,97 ± 0,2% to 45,42 ± 0,5%) in Flaxseed oil and C18:2 (from 52,68 ± 0.50% to 57,11 ± 0,40%) and C20:2 (from 4,3 ± 0,02% to 4,54 ± 0,03%) in Black cumin seed oil. The content of total polyphenols, flavonoids and carotenoids, as well as antioxidant activity measured by FRAP assay, was found to be greater in the oil from the seed of plant treated with the PGPB, compared to the respective non-treated samples. The use of PGPB enhances the plants nutritive properties, these are representing a great source for obtaining of valuable functional foods ingredients.

**Key words:** composting, herbs waste, mesophilic bacteria, germination index, plant growth stimulation, phytotoxicity, *Nigella sativa*, *Linum usitatissimum*, plant growth promoting bacteria (PGPB), fatty acids content, antioxidative activity

**Scientific area:** Technological engineering

**Scientific discipline:** Biochemical Engineering and Biotechnology

**UDC:**

# SADRŽAJ

UVOD.....	1
TEORIJSKI DEO.....	5
1. BAKTERIJE KOJE STIMULIŠU RAST BILJAKA (PGPB) I NJIHOVA UPOTREBA KAO BIOFERTILIZATORA .....	5
1.1. Bakterije koje stimulišu rast biljaka .....	5
1.2. Biofertilizatori .....	6
1.3. Mehanizam delovanja bakterija na stimulaciju rasta biljaka .....	10
1.3.1. Fiksiranje azota .....	10
1.3.2. Pospešivanje rastvaranja fosfata .....	11
1.3.3. Vezivanje gvožđa.....	11
1.3.4. Proizvodnja fitohormona.....	12
1.3.5. Insekticidno delovanje .....	12
1.3.6. Antimikrobno delovanje .....	12
2. KOMPOSTIRANJE.....	13
2.1. Parametri za praćenje napredovanja u procesu kompostiranja .....	15
2.1.1. Temperatura .....	16
2.1.2. Sadržaj vlage.....	16
2.1.3. Aeracija .....	17
2.1.4. Odnos ugljenika prema azotu (C / N) .....	17
2.1.5. Veličina čestice .....	18
2.1.6. Poroznost.....	19
2.1.7. Promene pH vrednosti tokom kompostiranja.....	19
2.1.8. Hranljivi elementi .....	19
2.2. Stabilnost i zrelost komposta.....	19
2.3. Izvori i oblici ugljenika u zemljištu.....	22
2.4. Ugljeni hidrati u biljnom materijalu.....	22
2.4.1. Struktura i uloga celuloze .....	22
2.4.2. Uloga hemiceluloze.....	23
2.4.3. Pektinske supstance .....	24
2.5. Enzimska aktivnost kao parametar praćenja procesa kompostiranja.....	24
2.5.1. Nikotinamid-nukleotid-oksido-reduktaze (Piridin-dehidrogenaze) .....	24
2.5.2. L-glutamat: NAD (P) <sup>+</sup> -oksido-reduktaza ili glutamat-dehidrogenaza (NAD P <sup>+</sup> ) .....	25
2.5.3. Aktivnost dehidrogenaze u zemljištu .....	25



2.5.4. Faktori stimulacije aktivnosti dehidrogenaze.....	26
2.5.5. Faktori inhibicije dehidrogenaze.....	28
2.6. Biljni otpad nastao u toku prerade lekovitog bilja .....	28
2.7. Uticaj mikroorganizama na proces kompostiranja.....	31
2.7.1. Mešovite kulture mikroorganizama za ubrzavanje kompostiranja .....	34
2.7.2. Aerobni i anaerobni mikroorganizmi .....	34
2.7.3. Korišćene vrste i karakteristike mikroorganizama.....	35
2.7.3.1. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	35
2.7.3.2. <i>Hymenobacter</i> sp.....	38
2.7.3.3. <i>Paenibacillus chitinolyticus</i> .....	39
2.7.3.4. <i>Streptomyces</i> sp.....	40
3. Nutritivne i funkcionalne osobine odabranih uljanih biljnih vrsta .....	42
3.1. Uljani lan ( <i>Linum usitatissimum</i> ) .....	42
3.2. Crni kim ( <i>Nigella sativa</i> ).....	43
3.3. Karakteristike masnih kiselina uljanih vrsta .....	45
3.4. Esencijalne masne kiseline.....	46
3.5. Polifenoli i flavonoidi biljnih vrsta .....	47
CILJ RADA .....	48
EKSPERIMENTALNI DEO .....	49
4. MATERIJALI I OPREMA .....	49
4.1. Materijali .....	49
4.1.1. Bakterijski izolati korišćeni u radu: .....	49
4.1.2. Biljna semena korišćena u radu: .....	49
4.1.3. Biljni otpad.....	49
4.2. Hemikalije i reagensi:.....	50
4.3. Oprema .....	51
5. METODE.....	52
5.1. Metode za pripremu uzoraka.....	52
5.1.1. Identifikacija korišćenih sojeva i njihovo pripremanje za kompostiranje.....	52
5.1.2. Priprema sojeva za ispitivanje uticaja na kultivaciju crnog kima i uljanog lana .....	53
5.1.3. Ispitivanje kompatibilnosti sojeva metodom klijavosti.....	53
5.1.4. Biohemijski profil sojeva - Test API- ZIM.....	54
5.1.5. Pripremanje biljnog otpada za kompostiranje .....	55
5.1.6. Pripremanje biljnog materijala za kultivaciju uljanog lana i crnog kima.....	56

5.2. Ispitivanje sposobnosti rasta odabranih bakterijskih sojeva na ISP1 agarnim pločama sa dodatkom 1%, 5% i 10% biljnog otpada .....	57
5.3. Metode za praćenje procesa kompostiranja .....	57
5.3.1. Određivanje pH reakcije komposta.....	57
5.3.2. Određivanje koncentracije ukupnih šećera u ekstraktu komposta .....	58
5.3.3. Određivanje ukupnog sadržaja organske materije .....	59
5.3.4. Određivanje suve materije .....	60
5.3.5. Određivanje sadržaja ukupnog ugljenika, azota, fosfora i kalijuma .....	60
5.3.6. Određivanje enzimske aktivnosti dehidrogenaze.....	61
5.3.7. Određivanje sadržaja CO <sub>2</sub> .....	62
5.3.8. Ispitivanje stabilnosti komposta metodom klijavosti .....	63
5.4. Agronomska metoda gajenja uljanih vrsta .....	63
5.5. Natkritična ekstrakcija (NKE) masnih ulja iz semena crnog kima i uljanog lana sa CO <sub>2</sub> .....	65
5.6. Analiza masnih ulja dobijenih natkritičnom ekstrakcijom sa CO <sub>2</sub> primenom gasne hromatografije.....	66
5.6.1. Pripremanje metil estara.....	66
5.6.2. Analitička gasna hromatografija (GC/FID) .....	66
5.6.3. Gasna hromatografija / masena spektrometrija (GC/MS).....	67
5.7. Određivanje antioksidanasa u uljima .....	67
5.7.1. Ekstrakcija ulja za određivanje antioksidanasa.....	67
5.7.2. Određivanje ukupnih polifenola.....	67
5.7.3. Određivanje flavona i flavonola.....	68
5.7.4. Određivanje karotenoida .....	69
5.7.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti.....	70
5.7.6. FRAP metoda.....	70
5.7.7. Statistička analiza.....	71
6. REZULTATI I DISKUSIJA .....	72
6.1. Kvalitativno ispitivanje celulolitičke aktivnosti i sposobnost rasta na biljnom otpadu bakterija korišćenih za kompostiranje.....	72
6.2. Izbor sojeva za ispitivanja fitostimulatornog efekta putem određivanja indeksa klijavosti semena (GI) crnog kima i uljanog lana .....	74
6.3. Biohemijske i enzimske karakteristike odabranih sojeva za gajenje crnog kima i uljanog lana .....	75
6.4. Kompatibilnost bakterijskih sojeva.....	77
6.5. Monitoring procesa kompostiranja.....	77

6.5.1. Fizičko-hemijske karakteristike mešanog biljnog otpada pre procesa kompostiranja .....	78
6.5.2. Promene fizičko-hemijskih karakteristika biljnog materijala tokom procesa kompostiranja .....	79
6.5.2.1. Praćenje temperature i sadržaja vlage u kompostu .....	80
6.5.2.2. pH komposta .....	81
6.5.2.3. Sadržaj ugljenih hidrata rastvorljivih u vodi .....	81
6.5.2.4. Sadržaj organske materije (OM) u kompostu .....	82
6.5.2.5. Ukupni sadržaj ugljenika i azota, C / N odnos .....	83
6.5.2.6. Sadržaj kalijuma i fosfora u kompostu .....	85
6.5.2.7. Dehidrogenazna aktivnost i sadržaj oslobođenog CO <sub>2</sub> u kompostu .....	86
6.5.2.8. Fitotoksičnost kompostnog materijala .....	88
6.6. Agronomski parametri gajenja crnog kima i uljanog lana sa tretmanom sa bakterijskim inokulumom .....	89
6.7. Prinos masnog ulja ekstrahovanog sa natkritičnim CO <sub>2</sub> .....	92
6.8. Hemijski sastav masnih kiselina u ulju crnog kima i uljanog lana .....	92
6.9. Sadržaj polifenola, flavonoida i karotenoida u ulju crnog kima i uljanog lana .....	94
6.10. Antioksidativna svojstva ulja crnog kima i uljanog lana .....	97
7. ZAKLJUČAK .....	100
LITERATURA .....	103
PRILOG 1 .....	121
Prikaz GC/FID analize .....	121
PRILOG 2 .....	124
Rezultati GC/FID i GC/MS analize masnog ulja lana i crnog kima .....	124
PRILOG 3 .....	125
Spisak skraćenica korišćenih u disertaciji .....	125
Biografija .....	126

---

## UVOD

Biološka đubriva ili biofertilizatori su proizvodi koji sadrže korisne mikroorganizme koji imaju sposobnost da pomažu razvoju korenovog sistema i boljem klijanju semena. Mogu da kolonizuju rizosferu i da stimulišu rast biljaka, između ostalog, i kroz povećano snabdevanje biljaka esencijalnim hranljivim elementima.

Mnogi mikroorganizmi mogu biti izolovani iz različitih okruženja. Većina njih se nalazi u rizosferi i često je povezana sa krenom biljaka. Rizosfera je zona zemljišta koja okružuje koren i nalazi se pod njegovim direktnim uticajem. To je jedinstvena zona koja se odlikuje intenzivnom biološkom, hemijskom, biohemijskom i mikrobiološkom aktivnošću kao i brojnošću mikroorganizama ( $10^{11}$  CFU g<sup>-1</sup>) uzrokovanom velikom količinom organske materije (Bhardwaj i sar., 2014; Huang i sar., 2014).

Ove rizobakterije podstiču rast biljaka i mogu se koristiti u poljoprivredi. Mnoge vrste proizvode antimikrobna jedinjenja koja su korisna u medicini ili kao pesticidi, a njihovi enzimi mogu se koristiti za bioremedijaciju ili za proizvodnju vrednih hemikalija.

Bakterije koje stimulišu rast biljaka, poznatije kao PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*) mogu podstaći njihov rast, povećati prinos, smanjiti infekciju fitopatogenima, ali i smanjiti osetljivost biljke na stres, bez prenosa patogenosti (van Loon i Bakker, 2005; Lugtenberg i Kamilova, 2009).

PGPB imaju potencijal da doprinesu razvoju održivih poljoprivrednih sistema (Schippers i sar., 1995), a funkcionišu na tri različita načina (Glick, 1995): sintetišu određene supstance za biljke (Dobbelaere i sar., 2003; Zahir i sar., 2004), olakšavaju usvajanje određenih hraniva iz zemljišta i štite biljke od bolesti (Lucas i sar., 2004).

Neki mikroorganizmi imaju pozitivan efekat na rast biljaka naročito rizobakterije kao što su *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces fulvissimus*, *Aspergillus candidus*, *Lactobacillus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, mnoge *Bacillus* vrste, kao što je *Bacillus amiloliquefaciens*, *Bacillus megatherium* i *Paenibacillus* sp. (Chen, 2006). Veštačka inokulacija sa odabranim efektivnim mikroorganizmima uzrokuje bolje efekte u procesu poljoprivredne proizvodnje.

Odabrani mikroorganizmi mogu se koristiti za pripremu višefunkcionalnih biofertilizatora, čime se zamenjuje upotreba značajne količine mineralnih đubriva u poljoprivredi (Gaid, 2009). Dodatna vrednost đubriva zavisi od karakteristika korišćenih mikrobioloških vrsta, a od posebnog značaja je uključivanje vrsta koje poseduju sposobnost

kontrole biljnih patogena. Ova sposobnost može biti zasnovana na proizvodnji antibiotika, hidrolitičkih enzima kao što su hitinaze, proteaze, amilaze ili glukanaze (Mehta i sar., 2014).

Zahvaljujući nekim mikroorganizmima koji su u stanju da konvertuju organsku materiju, agroindustrijski otpad se može iskoristiti kao dragoceni resurs za proizvodnju biljnih đubriva ili komposta. Prilikom mikrobne aktivnosti, smanjuje se C / N odnos u otpadnom materijalu (kompostu) što može pogodovati proizvodnoj sposobnosti zemljišta. Mikroorganizmi održavaju protok hranljivih materija u zemljištu (Novinsak i sar., 2008; Umsakul i sar., 2010).

Praksa u poljoprivredi kao i u industrijskom procesuiranju ukazuje da agroindustrijski otpad pre treba posmatrati kao potencijalni hranljivi supstrat nego kao otpad. S obzirom da agroindustrijski otpad ima visok sadržaj organskih materija i biogenih elemenata, može da se koristi za poboljšanje plodnosti zemljišta.

Kompostiranje, odnosno, biološka transformacija otpada, predstavlja jedan od ekološki prihvatljivih rešenja za zbrinjavanje organskog otpada koji najčešće nastaje iz domaćinstava i agroindustrije. Nastali kompost je proizvod kontrolisane biooksidacije čvrstog heterogenog organskog supstrata koji se može koristiti za obogaćivanje zemljišta humusnim materijama i za stimulaciju rasta biljnih kultura. Dodatna vrednost primene mikrobni kultura u procesu kompostiranja je u tome što one mogu same po sebi pozitivno uticati na rast biljnih kultura na koje se primenjuje dobijeni kompost.

Agroindustrijski otpad sastoji se od kompaktne lignoceluloze, delimično kristalne strukture, koja se sastoji od linearne kristalisane polisaharidne celuloze i nekristalne hemiceluloze i lignina. Celuloza je sastavljena od linearnog polimernog lanca koji se sastoji od niza hidroceluloznih jedinica i glukoznih lanaca. Jedinice hidroceluloze su vezane  $\beta$ -1,4 glukozydnim vezama, čineći kristalnu strukturu koja se može rastaviti na više samostalnih monomernih šećera. Druga važna komponenta strukture lignoceluloze je hemiceluloza, koja je sačinjena od različitih polisaharida, npr. ksiloze, galaktoze, manoze, arabinoze.

Glukoza je, kao i celuloza, prisutna u velikim količinama u agroindustrijskom otpadu. Budući da su hemiceluloza i celuloza prisutni u zidu ćelije mora se koristiti efektivan i ekonomičan metod kako bi se odvojile od zida ćelije i to primenom različitih vidova predtretmana kao što su fizički, hemijski i biološki (Poonam i Ashok, 2009).

Lignin je povezan sa hemicelulozom i celulozom u ćelijskom zidu, te se s toga ponaša kao barijera sprečavajući proces transformacije ugljenih hidrata. Lignocelulozni materijali poljoprivrednog porekla čine više od 60% biomase biljaka proizvedenog godišnje kroz proces fotosinteze. Ovaj ogromni resurs je potencijalni i obnovljivi izvor biogoriva,

biođubriva, životinjske hrane i hemijskih sirovina. Lignoceluloza može biti supstrat za proizvodnju poboljšanih proizvoda, kao biogoriva, biohemijskih elemenata, biopesticida, biopromotera i čak može sam biti proizvod nakon biotransformacije (kompost, biomasa) (Poonam i Ashok, 2009).

Biljni otpad koji nastaje u procesu proizvodnje i prerade preko 90 vrsta lekovitog bilja u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, je specifičan zbog samog sastava bilja koje sadrže znatne količine antimikrobnih supstanci. Neke od ovih komponenti mogu da uspore proces razlaganja biljnog otpada usled smanjivanja brojnosti i aktivnosti prisutnih mikroorganizama. Zbog toga je značajna primena odabranih mikrobnih kultura koje mogu da vrše transformaciju ovog biljnog materijala i da skrate vreme kompostiranja.

Agroindustrijski otpad može u procesima biotransformacije da se prevede u novi proizvod – kompost, koji će se dalje koristiti za reciklažu i poboljšanje plodnosti zemljišta, čime se zamenjuju u upotrebi značajne količine mineralnih đubriva (Poonam i Ashok, 2009).

Funkcionalna hrana igra važnu ulogu u odnosu između ishrane i zdravlja. Semena mnogih biljaka se pojavljuju kao važan sastojak funkcionalne hrane. Mogu se koristiti za ekstrakciju različitih grupa jedinjenja kao što su trigliceridi, masne kiseline, polifenoli, fitosteroli i tokoferoli. Mnoga biljna semena sadrže hemijska jedinjenja sa biološkim i funkcionalnim svojstvima kao što su polinezasićene masne kiseline (PUFA) omega 3 grupe. Ljudski organizam nije u stanju da ih sam sintetiše, te je stoga neophodno njihovo unošenje hranom.

Uljani lan među svim uljanim vrstama ima najveći sadržaj esencijalnih masnih kiselina omega-3 (alfa-linolenske kiseline od 45-55%) kao i omega-6 (linolne kiseline). Pored toga što je jedan od najbogatijih izvora alfa-linolenske kiseline, seme uljanog lana je suštinski izvor visokokvalitetnih proteina i vlakana i značajan izvor fenolnih jedinjenja (Yu, 2005; Oomah, 2001; Pengilly, 2003).

Seme crnog kima sadrži žućkasto masno ulje koje je bogato proteinima, aminokiselinama, nezasićenim masnim kiselinama (uglavnom linolnom i oleinskom), zasićenim masnim kiselinama, alkaloidima, taninima, saponinima, mineralima (Ramadan, 2007). Ulje crnog kima je takođe bogat izvor esencijalnih masnih kiselina, kao i polifenolnih jedinjenja. Koristi se za lečenje malignih, kardiovaskularnih i plućnih bolesti, reumatizma, alergija, raznih vrsta dermatitisa (Burits i Bucar, 2000). Posедуje antialergijska, antiinflamatorna, antivirusna i antikancerogena svojstva (Randhawa, 2008). Takođe, seme crnog kima je bogat izvor antioksidanasa (Machmudah, 2015).

Smatra se da ishrana semenima ovih biljnih vrsta, može pomoći u sprečavanju mnogih hroničnih bolesti, dijabetesa, kardiovaskularnih oboljenja i raka (Randhawa i Alghamdi, 2011). Imaju široku upotrebu u raznim granama industrije, naročito u prehrambenoj industriji i farmaciji.

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitan uticaj inokulacije smešom prirodnih izolata bakterija i streptomiceta na kompostiranje biljnog otpada nastalog tokom procesa proizvodnje i prerade lekovitog bilja u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“. U Institutu se godišnje dobije oko 25 tona biljnog otpada kao nus proizvoda. Prema važećem zakonu o upravljanju otpadom („Sl. glasnik RS“, br. 36/2009 i 88/2010) ovako nastao otpad potrebno je skladištiti, tretirati i odlagati na način kojim se ne ugrožava zdravlje ljudi i životna sredina.

U cilju povećanja brzine kompostiranja korišćene su celulolitičke bakterije izolovane iz šumskog zemljišta i morskih sedimenata: *Streptomyces spororaveus* CKS2, *Streptomyces microflavus* CKS6, *Streptomyces fulvissimus* CKS7, *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, *Hymenobacter* sp. CKS3, *Bacillus amyloliquefaciens ssp. plantarum* PPM3 i *Bacillus altitudinis* PPT1. Odabrani sojevi mikroorganizama su deo kolekcije katedre za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu.

Definisan je hemijski sastav biljnog otpada pre procesa kompostiranja, kao i uslovi za kompostiranje (temperatura, vlaga, dužina trajanja procesa koji se prati fizičko-hemijskim i biološkim parametrima).

Ispitana je enzimaska aktivnost izolata i međusobna kompatibilnost između sojeva, kao i njihov uticaj na brzinu kompostiranja. Za procenu zrelosti i kvaliteta komposta za njegovu dalju upotrebu u poljoprivredi, ispitana je njegova fitotoksičnost.

U nastavku istraživanja ispitana je upotreba odabranih sojeva *Streptomyces* sp., *Paenibacillus* sp. i *Hymenobacter* sp. u tretmanu zemljišta pri kultivaciji odabranih biljnih uljanih vrsta – uljanog lana i crnog kima. Definisana je koncentracija inokuluma za tretman zemljišta i ispitan je njihov uticaj na agronomske parametre pri gajenju, u odnosu na kontrolu, u periodu od 6 meseci vegetacije bez primene hemijskih sredstava i uz ručno kontrolisanje korova. Utvrđen je uticaj različite koncentracije inokuluma na sastav masnih ulja uljanog lana i crnog kima, dobijenih natkritičnom ekstrakcijom sa CO<sub>2</sub> iz semena, u odnosu na kontrolu kao i na antioksidativna svojstva i ukupan sadržaj polifenola, flavonoida i karotenoida.

## TEORIJSKI DEO

### 1. BAKTERIJE KOJE STIMULIŠU RAST BILJAKA (PGPB) I NJIHOVA UPOTREBA KAO BIOFERTILIZATORA

Problemi povezani sa upotrebom hemijskih đubriva su dugotrajni štetni uticaji na plodnost zemljišta, produktivnost tla i bezbednost životne sredine (Kannaiyan, 2000). Zato je potrebno tražiti alternativne izvore đubriva kao što su biološka đubriva ili biofertilizatori.

Biofertilizatori su mikrobiološki preparati koji sadrže žive ćelije bakterija, modrozelenih algi ili gljivica, koje efikasno fiksiraju atmosferski azot, rastvaraju nerastvorni fosfat u tlu ili razgrađuju celulozni organski otpad. To su proizvodi koji imaju sposobnost da pretvaraju nutritivno važne elemente, nedostupne u raspoloživom obliku, putem bioloških procesa (Vessey, 2003; Chen, 2006).

#### 1.1. Bakterije koje stimulišu rast biljaka

Mikroorganizmi korisni za biljke su interesantni za primenu u poljoprivredi, bilo kao biofertilizatori ili kao biopesticidi, kao i za primenu u bioremedijaciji (Berg, 2009; Lugtenberg i Kamilova, 2009). Bakterije koje žive slobodno u zemljištu, a pozitivno utiču na rast biljaka najčešće to čine kolonizovanjem korena biljaka. Istraživanja ovih bakterija su se bitno proširila od uvođenja termina PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) ili PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*) koji ukazuju na njihov značaj kao bakterija koje stimulišu rast biljaka (Kloepper i Schroth, 1978). Različite PGPR se danas koriste širom sveta u cilju povećanja biljne proizvodnje (Burd i sar., 2000). Nalaze se u rizosferi koja je veoma važna zemljišna zona za interakciju biljke i mikroorganizama (Burr i Caesar, 1984). Prema odnosima sa biljkama, PGPR se mogu podeliti u dve grupe: simbiotske bakterije i one koje su slobodne u rizosferi (Khan, 2005). PGPR se takođe mogu podeliti u dve grupe prema mestu gde su locirane: 1) PGPR koje žive unutar biljne ćelije, formiraju kvržice (nodule) i locirane su unutar tih specijalizovanih struktura, i 2) PGPR koje žive van biljnih ćelija i ne formiraju nodule, ali ipak promovišu biljni rast (Gray i Smith, 2005).

Neki rizosferni mikroorganizmi mogu biti neutralni ili štetni u odnosu na rast biljaka, dok drugi podržavaju svoje domaćine (Welbaum i sar., 2004; Raaijmakers i sar., 2008).



Nakon rizosferne kolonizacije, endofiti mogu kolonizovati različite biljne organe (James i sar., 2002; Compant i sar., 2005b, 2008a). Endofiti predstavljaju podgrupu rizobakterijskih zajednica, koji imaju sposobnost da uđu u unutrašnjost korena svojih domaćina kada se kolonizuju (Hallmann i Berg, 2007). Različite mikrobiološke zajednice su pronađene u različitim biljnim organima kao što su koren, stablo, lišće, cvetovi, kao i plodovi i seme (Sessitsch i sar., 2002; Berg i sar., 2005b).

Bakterijske ćelije prvo kolonizuju rizosferu nakon inokulacije zemljišta (Gamalero i sar., 2003). Kolonizacija se tada može javiti na celoj površini nekih rizodermalnih ćelija, a bakterije mogu čak i da razviju mikrokolonije ili biofilme (Benizri i sar., 2001).

Hranljivi sastojci u korenovom sistemu privlače štetne rizobakterije, kao i korisne i neutralne bakterije, gljivice i druge organizme u tlu. Shodno tome, PGPB mora biti visoko konkurentna za uspešno kolonizovanje zone korena.

Neke bakterije poput sojeva *Bacillus amiloliquefaciens* FZB42 (Chen i sar., 2007) ili *P. fluorescens* PF-5 (Paulsen i sar., 2005) poseduju velike klastere gena koji su odgovorni za sekreciju antibiotika i siderofora, kao i za detoksikaciju (što je takođe potrebno tokom kolonizacije). Time se delimično objašnjava njihova efikasna kolonizacija biljaka domaćina.

Nekoliko studija je potvrdilo da biljke imaju različite endofitske zajednice (Berg i sar., 2005b) i da su endofitske bakterije uglavnom proistekle iz rizosfere (Sessitsch i sar., 2002; Hardoim i sar., 2008). Dobro je poznato da se endofiti mogu sistemski širiti unutar biljke i kolonizovati stabljike i lišće (Hardoim i sar., 2008). Nekoliko studija navodi da neke endofitske bakterije kolonizuju cveće, voće i seme (Hallmann, 2001).

## **1.2. Biofertilizatori**

Biljke za svoj rast zahtevaju veći broj hranljivih elemenata među kojima su za poljoprivrednu praksu najznačajnija tri. To su azot, fosfor i kalijum, koje biljka usvaja iz zemljišta u koje se oni unose uglavnom u vidu mineralnih đubriva. Biološka fiksacija azota nudi ekonomski atraktivan i ekološki prihvatljiv način za povećanje obezbeđivanja biljaka ovim hranljivim elementom pomoću mikroorganizama.

Biofertilizatore su identifikovali holandski naučnici 1888. godine i nakon toga „Nobbe i Hiltner“ su proizveli prvi biofertilizator pod trgovačkim imenom „Nitragin“, 1895. godine u Sjedinjenim Američkim Državama (Borkar, 2015).

U biofertilizatore spada velika populacija specifične grupe korisnih mikroorganizama koji se aseptično inkorporiraju u sterilne nosače kao što su treset, lignit ili ugalj. Takav materijal se pakuje i prodaje poljoprivrednicima za poboljšanje produktivnosti zemljišta. Biofertilizatori predstavljaju jeftin, ekološki prihvatljiv, izvor hranljivih elemenata za biljke (Borkar, 2015).

Biofertilizatori pospešuju fiksaciju azota, rastvorljivost fosfata, oksidaciju sumpora i pomažu u pristupačnosti drugih makro i mikro elemenata. Time oni, povećavaju vegetativni rast, ukupnu suhu materiju, prinos i kvalitet proizvoda. Biofertilizatori su inputi zemljišta koji se koriste u poljoprivredi za održavanje i povećanje plodnosti zemljišta. Mogu se koristiti kod proizvodnje svih vrsta voća, žitarica, povrća, travnjaka, ukrasnih biljaka i slično (Borkar, 2015).

Poljoprivrednici širom sveta sve više se okreću ka biološkoj poljoprivredi, jer se susreću sa opasnim posledicama primene visokih doza mineralnih đubriva i njihovim visokim troškovima. Biološka poljoprivreda ima za cilj očuvanje prirodne i ekološke ravnoteže u skladu sa standardima zaštite životne sredine (Borkar, 2015).

Biofertilizatori, koji se često nazivaju i bioinokulanti, mikrobiološke kulture ili bakterijska đubriva su grupisani u različite kategorije, u zavisnosti od tipa aktivnosti koju vrši mikrobiološki agens (Borkar, 2015):

- Biofertilizatori za fiksiranje azota, kao što su: *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, cijanobakterije i *Azolla*
- Biofertilizatori za poboljšanje pristupačnosti fosfora
- Biofertilizatori za poboljšanje pristupačnosti kalijuma
- Biofertilizatori za oksidaciju sumpora
- Biofertilizatori koji razgrađuju organski otpad
  
- Biofertilizatori za fiksiranje azota:

*Rhizobium* je gram-negativna bakterija tla koja fiksira atmosferski azot u biljke kroz korenske nodule. *Rhizobium* formira simbiotski odnos sa određenim biljkama i fiksira azot iz vazduha u amonijak, koji deluje kao prirodno đubrivo. Postoji 67 rizobijum vrsta.

Rod *Azotobacter* otkrio je 1901. godine holandski mikrobiolog i botaničar Martinus Beijerinck. Odabrao je i opisao vrstu *Azotobacter chroococcum*.

*Azotobacter* je aerobna, ovalna ili sferična bakterija koja igra važnu ulogu u azotnom ciklusu u prirodi, vezujući atmosferski azot, koji je nepristupačan za biljku i koji se oslobađa

u obliku amonijum jona u zemljište. To je gram-negativna bakterija, pronađena u neutralnim i alkalnim zemljištima (Gandora i sar., 1998; Martyniuk i Martyniuk, 2003). *Azotobacter chroococcum* se široko koristi za proizvodnju biofertilizatora.

Khosravi i sar. (1998), Yadav i sar. (2000) i Arafa i sar. (2009) su proučavali efekat inokulacije azotobakterijumom kao biološkim đubrivom na rast i prinos pšenice i zaključili su da je *A. chroococcum* imao značajne efekte na sadržaj suve materije i razvoj korenovog sistema. Rezultati su takođe pokazali da se umesto azotnog đubriva može primeniti *A. chroococcum*, *Streptomyces* sp., *B. megatherium*, *P. fluorescens*, *A. candidus* koje su izolovane iz rizosfere različitih biljaka i izabrane kao biofertilizatori jer poseduju mnoge poželjne osobine i imaju potencijal za biološku kontrolu biljnih patogena. Pored sposobnosti *A. chroococcum* da poveća sadržaj azota, sve vrste mogu da proizvode hormon rasta IAA (indol sirćetna kiselina) i druge fitohormone (Abdel-Ghany i sar., 2010).

Cijanobakterije predstavljaju grupu bakterija koje dobijaju svoju energiju putem fotosinteze. Cijanobakterije se mogu naći u skoro svakom kopnenom i vodenom staništu kao što su okeani, sveža voda, vlažna tla, privremeno vlažno kamenje u pustinji, pa čak i na antarktičkim stenama (Stewart i Falconer, 2008).

Pored vrsta *Azotobacter* i vrste *Azospirillum*, kao slobodne azotofiksirajuće bakterije, imaju sposobnost da u zoni rizosfere sintetišu neke biološki aktivne supstance koje pojačavaju razvoj korena (Chen, 2006).

*Azospirillum* može da kolonizuje, promoviše rast i povećava prinos brojnih biljnih vrsta (Bashan i Levanoni, 1990; Bashan, 1993; Okon i Labander-Gonzales, 1994; Bashan i Holguin, 1995) usled sposobnosti azotofiksacije iz atmosfere, koja poboljšava sintezu auksina i giberelina, stimuliše rast korena i na taj način, apsorbuje vodu i hranljive materije, što dovodi do povećanja produktivnosti mnogih useva. Poredeći efikasnost procesa fiksacije azota, nađeno je da je *Azospirillum* tri puta efikasniji od *Azotobacter* vrsta (Chen, 2006).

- Biofertilizatori za poboljšanje pristupačnosti fosfora

Fosfor je važan hranljivi element u proizvodnji useva i igra značajnu ulogu u mnogim fiziološkim i biohemijskim aktivnostima kao što su ćelijska deoba, fotosinteza, metabolizam šećera, transport hranljivih materija unutar biljke, prenos genetskih karakteristika iz jedne generacije u drugu i regulisanje ukupnog metabolizma biljke (Tandon, 1987; Armstrong, 1988; Theodorou i Plakton, 1993). Fiksirani oblici fosfora u kiselim zemljištima su aluminijum i gvožđe fosfati, dok su u neutralnim i alkalnim zemljištima teško rastvorljivi trikalcijum fosfati. Egamberdiyeva i sar. (2000), su proučavali rast pšenice, kukuruza i

pamuka primenom bakterija koje pospešuju rastvaranje fosfata. Njihov rezultat ukazuje na to da su bakterije za pospešivanje rastvaranja fosfata sposobne da mobilišu više fosfora u zemljištu pristupačnog biljci i poboljšaju rast biljke u poređenju sa standardnim tretmanom bez bakterijske inokulacije. Bakterije za koje je poznato da pospešuju rastvaranje fosfata pripadaju vrstama: *Bacillus polymyxa*, *B. megetherium* var. *phospheticum*, *B. megetherium* var. *serratia*, *B. circulens*, *Pseudomonas striata*, *P. liquefaciens*, *Achromobacter* spp., *Arthrobacter* spp. (Borkar, 2015):

Vrste gljiva koje su pogodne za solubilizaciju fosfata su: *Penicillium digitatum*, *Aspergillus awamori*, *A. fumigatus*, *P. liliacinum*, *Cephalosporium* sp., *Trichoderma* sp. *Actinomicetes*, *Streptomyces* sp., *Nocardia* sp. dok kvasci koji se najčešće koriste za ovu namenu pripadaju rodovima *Rhodotorula* sp., *Schwanniomuces occidentalis* (Borkar, 2015):

- Biofertilizatori za poboljšanje pristupačnosti kalijuma

Kalijum je jedan od najvažnijih biogenih elemenata u višim biljkama. On igra važnu ulogu u rastu i razvoju biljaka. Aktivira enzime, održava ćelijski turgor, poboljšava fotosintezu, pomaže u transportu šećera i pomaže usvajanju azota i bitan je za sintezu proteina. Pored metabolizma biljke, kalijum poboljšava kvalitet useva povećava otpornost na bolesti i pomaže biljci da bolje izdrži stres. Avakyan i sar. (1986) i Li (1994) su izolovali kalijum solubilizirajuću bakteriju iz zemlje i stena i identifikovali je kao *B. mucilagenosus* na bazi morfoloških i fizioloških svojstava.

- Biofertilizatori za oksidaciju sumpora

Sumpor je neophodan element za mnoge biljne funkcije. To je strukturalna komponenta proteina i peptida i različitih enzima. Bakterije koje pripadaju porodicama *Thiobacteriaceae*, *Beggiatoaceae* i *Achromatiaceae*, poznate kao bezbojne sumporne bakterije, imaju sposobnost da oksiduju redukovani neorganski sumpor.

- Biofertilizatori koji razgrađuju organski otpad

Velike količine neiskorišćenih ili nedovoljno iskorišćenih resursa biomase kao što su ostaci poljoprivrede i šumarstva, industrijski i urbani organski otpad, može poslužiti kao sirovina za pripremu komposta, specijalno dizajniranog za potrebe određenih useva.

Za kompostiranje se pripremaju specijalni mikrobiološki anaerobni ili aerobni starteri od 6-8 različitih mikroorganizama uključujući i aktinomicete. Bakterije rastu do postizanja

titra od  $10^9$ - $10^{10}$  CFU/mL i mešaju se u odgovarajućoj proporciji u skladu sa procesom kompostiranja. Dodaje se oko 5–10% v/v mešane mikrobiološke kulture na izabrani organski nosač i kompostira se anaerobno ili aerobno na određenoj optimalnoj temperaturi i pH, 25–60 dana. U takvom kompostu, dodate bakterije su i dominantne vrste.

Kompostiraju se ostaci od prerade voća i vinove loze, poljoprivrednih, industrijskih i šumskih ostataka. Takvi komposti se prodaju na tržištu kao komercijalni proizvodi.

Dok tradicionalne procedure kompostiranja traju od 4 do 8 meseci za proizvodnju gotovog komposta, brze metode kompostiranja nude mogućnosti za skraćenje perioda obrade do tri nedelje.

### **1.3. Mehanizam delovanja bakterija na stimulaciju rasta biljaka**

Mnogi mikroorganizmi mogu podsticati rast useva direktno putem biološke azotofiksacije, rastvaranjem fosfata, produkcijom fitohormona indol-3-sirćetne kiseline (IAA), i oslobađanjem siderofora koje omogućavaju vezivanje gvožđa kao i antimikrobnim delovanjem. Oni takođe mogu pružiti zaštitu od insekata i fitopatogena, uključujući bakterije, gljivice, nematode i viruse. Ovo se postiže proizvodnjom raznih antimikrobnih jedinjenja i pokretanjem preosetljivog odbrambenog odgovora biljke.

#### **1.3.1. Fiksiranje azota**

Atmosferski azot ( $N_2$ ) je relativno inertan i mora biti fiksiran u upotrebljivu hemijsku formu pre inkorporiranja u aminokiseline, nukleotide i druge metabolite. Pošto eukarioti nemaju sposobnost vezivanja azota, njegova bioraspoloživost u zemljištu je često glavni ograničavajući faktor za rast biljaka, a poljoprivrednici rutinski primenjuju azotna đubriva kako bi osigurali produktivnost useva. Komercijalno azotno đubrivo može da dovede do zagađenja zemljišta, izaziva emisiju ugljen-dioksida i doprinosi globalnom zagađenju što ima negativan uticaj na zdravlje ljudi. Njegovi efekti se mogu smanjiti inokulacijom polja ili useva sa mikroorganizmima, uključujući i neke vrste *Paenibacillus*, koji fiksiraju azot u korenima biljaka ili oko njega.

### 1.3.2. Pospešivanje rastvaranja fosfata

Pored azota i fosfor je element koji ograničava rast biljaka i produktivnost. Od ukupnog sadržaja fosfora u zemljištu, samo 0,1% postoji u rastvorljivom obliku koji može absorbirati koren biljaka. Ostatak formira nerastvorljive mineralne komplekse, ili je imobilizovan u organskoj materiji. Mineralna fosforna đubriva se stoga koriste za ishranu gajenih biljaka na većini poljoprivrednih zemljišta, ali ona su skupa i mogu negativno da utiču na životnu sredinu (Sharma i sar., 2013).

Za razliku od azota, fosforno đubrivo se dobija od stena koje sadrže fosfate. Od primenjenog fosfata u zemljištu, biljka obično koristi manje od 30% mineralnog đubriva, pri čemu se ostatak uključuje u neorganske mineralne komplekse unutar zemljišta.

Kao što je slučaj i sa azotom, primena mineralnog fosfatnog đubriva se može smanjiti inokulacijom polja sa mikroorganizmima koji rastvaraju fosfor.

Mikroorganizmi koji pospešuju rastvaranje fosfora koriste različite mehanizme koji omogućavaju biljkama dostupnost fosfora, a glavna metoda je proizvodnja organske kiseline (naročito glukonske kiseline). Takve kiseline mogu direktno rastvarati mineralni fosfor putem anjonske razmene jona helatnih metala.

Genomske analize ukazuju da većina *Paenibacillus* sojeva mogu rastvoriti fosfor kroz proizvodnju glukonske kiseline.

### 1.3.3. Vezivanje gvožđa

Kao i fosfor, gvožđe se nalazi u zemljištu uglavnom u mineralnom, i često biološki nedostupnom obliku. Naročito u alkalnim zemljištima, gvožđe se formira uglavnom u nerastvornom  $Fe^{3+}$  obliku, koji ne mogu lako koristiti ni mikroorganizmi niti biljke. Većina mikroorganizama stoga redukuje  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$  koristeći ferireduktaze ili ga solubilizuje pomoću ekstracelularnih  $Fe^{3+}$  helatatora sa niskom molekulskom masom koji se nazivaju siderofore (Raza i Shen, 2010). Rastvorljivi  $Fe^{3+}$  sideroforski kompleksi su dostupni biljkama kao i mikroorganizmima (Hayat i sar., 2012), koji poseduju specifične membranske receptore i transportuju se u ćelije (Wen i sar., 2011).

Tri vrste siderofora su klasifikovane na osnovu njihovih funkcionalnih grupa, koje su kateholati, hidroksamati i alfa-hidroksi karbolati (Hertlein i sar., 2014).

#### **1.3.4. Proizvodnja fitohormona**

Biljni hormon rasta – auksin je ključni regulator ekspresije i razvoja gena tokom života biljke, učestvujući u ćelijskoj deobi, razviću i starenju. Postoji više klasa auksina, ali prva identifikovana je indol-3-sirćetna kiselina (IAA) (Delker i sar., 2008). Poznato je da stimuliše izduživanje ćelije.

Smatra se da proizvodnja IAA kod *Paenibacillus* vrsta stimuliše rast biljaka (Patten i sar., 2013).

Citokinini su druga važna grupa fitohormona, a prisutni su u malim količinama u biološkim uzorcima. Njihov efekat na biljke je povećanje ćelijske deobe, kao i razviće korena i korenskih dlačica.

Veliki broj radova pokazao je da PGPR takođe proizvode gibereline. Dobbelaere i sar. (2003) su numerisali preko 89 do sada poznatih giberelina. Gotovo sve vrste bakterija sintetizuju etilen. Etilen je regulator biljnog rasta koji utiče na razne načine na biljni rast i razviće.

#### **1.3.5. Insekticidno delovanje**

Pojedine vrste roda *Paenibacillus* su pokazale da ubijaju larve insekata štetočina (Sharma i sar., 2013) i larve leptira.

#### **1.3.6. Antimikrobno delovanje**

Mnoge vrste mikroorganizama takmiče se sa drugim mikroorganizmima kroz proizvodnju širokog spektra antimikrobnih jedinjenja.

Njihova izolovana antimikrobna jedinjenja mogu biti korisna za kontrolu fitopatogenih mikroorganizama, što dovodi do smanjenja upotrebe hemijskih biocida koji mogu imati negativne efekte na životnu sredinu.

Antimikrobna sredstva uključuju peptide, enzime i isparljiva organska jedinjenja. Antimikrobni peptidi su izuzetno značajni za biokontrolu u poljoprivredi.

## 2. KOMPOSTIRANJE

Kompostiranje je kontrolisani, biološki, aerobni proces transformacije i stabilizacije čvrstog organskog otpada mikroorganizmima, u cilju dobijanja proizvoda – komposta, u kojoj je organska komponenta delimično mineralizovana i humificirana. To je metod za reciklažu raznih organskih nus produkata pri čemu nastaje hemijski stabilan materijal, koji može da se koristi kao izvor hranljivih materija i za poboljšanje strukture zemljišta (Castaldi i sar., 2005).

Kompost dobijen iz obrade agroindustrijskog otpada je pouzdaniji zato što potiče od unapred izabranog materijala sa definisanim sastavom.

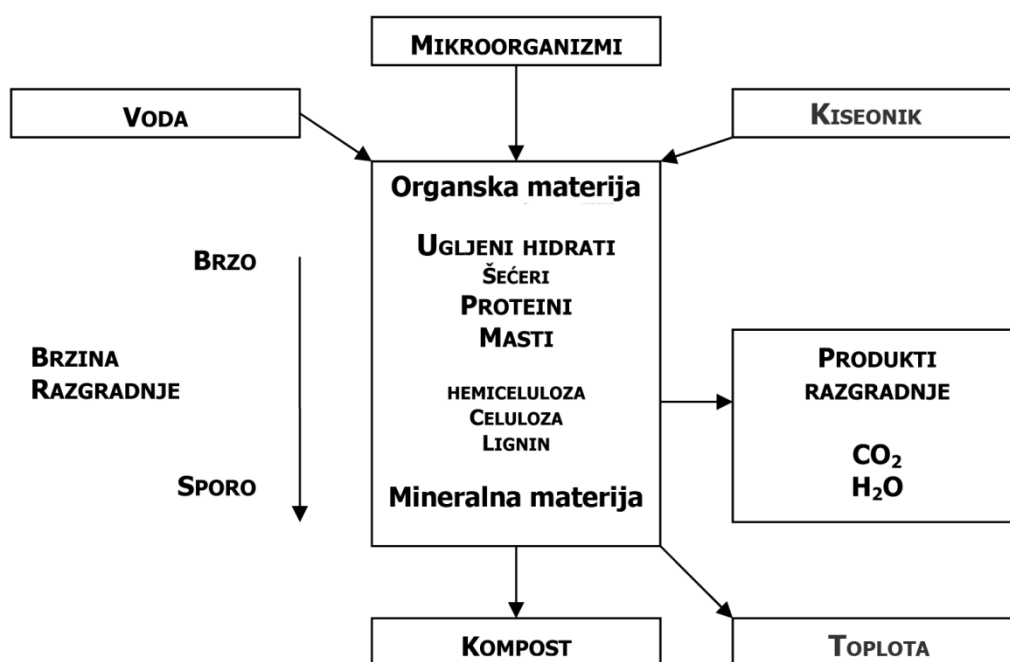
Kompostiranje se može izvesti na različite načine. Prema U.S. Composting Council (1997) postoji 5 različitih tehnologija kompostiranja (Thompson, 2001):

- kompostni materijal je nezaštićen od atmosferskih uticaja, sakupljen na običnu gomilu, pasivan proces bez prevrtanja i mešanja gomile, bez podešavanja C / N odnosa, stepena aeracije, pH vrednosti, vlažnosti i temperature, a vreme kompostiranja je 12–14 meseci;
- kompostni materijal je nezaštićen od atmosferskih uticaja, pravilno postavljen u dugačkim naslagama nalik na nasipe, aktivan proces sa prevrtanjem i mešanjem kompostne mase, s konvektivnom aeracijom, s početnim podešavanjem C / N odnosa, kontrolom vlažnosti i temperature, a vreme kompostiranja je 2–12 meseci;
- kompostni materijal je zaštićen od atmosferskih uticaja (prekrivanjem ili na drugi način), sakupljen je na gomile ili se nalazi u tunelskim prostorima, aktivan proces sa statičnom strukturom kompostne mase, s aeracijom, s početnim podešavanjem C / N odnosa, kontrolom vlažnosti, mešanjem i dodavanjem vode, kontrolom temperature, uduvavanjem vazduha, a vreme kompostiranja je 2–6 meseci;
- kompostni materijal je zaštićen od atmosferskih uticaja (prekrivanjem ili na drugi način), postavljen je u dugačke ograđene (betonirane, zidane, obložene) prostore nalik na rovove ili bazene, aktivan proces sa prevrtanjem kompostne mase, s mehaničkim prozračivanjem, s početnim podešavanjem C / N odnosa, kontrolom vlažnosti, mešanjem i dodavanjem vode, kontrolom temperature, uduvavanjem vazduha, a vreme kompostiranja je 2–5 meseci;



- kompostni materijal je zaštićen od atmosferskih uticaja, postavljen je u zatvorene tunele ili komore, aktivan proces sa prevrtanjem kompostne mase, s početnim podešavanjem C / N odnosa, kontrolom vlažnosti, mešanjem i dodavanjem vode, kontrolom temperature, uduvavanjem vazduha, a vreme kompostiranja je 2–4 meseca.

Na slici 2.1 prikazana je uopštena šema procesa kompostiranja.



**Slika 2.1.** Šema procesa kompostiranja

Proces kompostiranja obuhvata tri faze:

- inicijalna faza (mezofilna),
- faza porasta temperature (termofilna faza),
- faza hlađenja i sazrevanja.

Tokom prve faze kompostiranja dolazi do povećanja temperature i do oslobađanja CO<sub>2</sub>. Podloga se smanjuje usled degradacije šećera i belančevina pod uticajem mezofilnih mikroorganizama (Hellmann i sar., 1997; Schloss i sar., 2003; Zeng i sar., 2011).

U drugoj fazi, termofilnoj, dolazi do povećanja temperature u kompostu iznad 40 °C i mezofilni mikroorganizmi su zamenjeni termofilnim (Pedro i sar., 2003). Na temperaturi iznad 55 °C uništavaju se mnogi mikroorganizmi koji mogu biti humani ili biljni patogeni.

Temperature preko 65 °C ubijaju mnoge oblike mikroorganizama, ubrzavaju razgradnju proteina, masti i složenih ugljenih hidrata poput celuloze i hemiceluloze koji su glavni strukturni molekuli u biljkama.

Treća faza počinje sa smanjenjem temperature i rashlađivanjem kompostne gomile i mezofilni mikroorganizmi se ponovo javljaju u konačnoj fazi sazrevanja preostale organske materije.

Opstanak mezofilnih bakterija u kompostiranju velikih količina biljnog otpada može biti pod znakom pitanja zbog potencijalne termofilne faze razvoja. Međutim, istraživanja López-González i sar. (2015), pokazala su da većina mezofilnih mikroorganizama mogu da prežive termofilnu fazu i čim temperatura opadne, ove bakterije počinju opet aktivno da rastu. Štaviše u fazi hlađenja termofilni mikroorganizmi nestaju, a mezofilni nastavljaju razgradnju polimernih komponenata koje nisu razgrađene u biooksidativnoj fazi. Vredi napomenuti da neki sojevi koji su korišćeni u ovom radu se mogu naći i u kompostu istraživača López-González i sar. (2015).

## **2.1. Parametri za praćenje napredovanja u procesu kompostiranja**

Kompostiranje je prioritetan ekološki metod kojim se organski otpad svodi na organsko đubrivo. U toku procesa kompostiranja na kvalitet i stabilnost komposta utiču različiti parametri. Glavni faktori u kontroli kompostiranja su parametri okoline (temperatura, vlažnost, pH, aeracija) i parametri podloge (C / N odnos, veličina čestice i sadržaj hranljivih materija). Svi prirodni organski materijali s vremenom se razlože. Pod prirodnim uslovima, proces razlaganja može da traje od nekoliko meseci do godinu dana pa i više, u zavisnosti od klimatskih uslova. Međutim, prirodni proces se može ubrzati tako što se kontrolišu pojedini faktori procesa. Istraživanjima su izdvojeni važniji faktori:

- temperatura,
- sadržaj vlage,
- aeracija,
- odnos ugljenika prema azotu (C / N),
- veličina čestice,
- poroznost,
- promene pH vrednosti tokom kompostiranja,
- hranljivi elementi,
- prisustvo i uticaj mikroorganizama.

### **2.1.1. Temperatura**

Temperatura je osnovni parametar za kompostiranje. Male varijacije u temperaturi mogu da utiču na mikrobiološku aktivnost biomase i mogu biti dramatičniji nego male promene u vlažnosti, pH ili C / N odnosa. Termofilna aktivnost je najveća između 50 °C i 60 °C. (Schulze, 1962).

Do porasta temperature tokom procesa kompostiranja dolazi usled odigravanja egzotermnih reakcija povezanih sa respiratornim metabolizmom mikroorganizama. Postoji uzajamni odnos između temperature i kiseonika koji se utroši. Što je viša temperatura, veća je potrošnja kiseonika, pa je time i razlaganje brže. Povećanje temperature, koje nastaje kao rezultat mikrobiološke aktivnosti, može se primetiti u roku od nekoliko sati posle formiranja gomile. Temperatura gomile između 32 °C i 60 °C ukazuje na brzi proces kompostiranja. Temperatura iznad 60 °C smanjuje aktivnost mnogih korisnih organizama. Prema tome, optimalni raspon za kompostiranje je od 32 °C do 60 °C. Temperatura kompostnog materijala karakteristično prati tok brzog povećanja između 55 °C i 60 °C i ostaje tako visoka, blizu termofilnog nivoa, nekoliko nedelja. Temperatura postepeno pada na vrednost temperature vazduha okoline. Rast i pad temperature tokom procesa kompostiranja zavise od materijala koji se kompostira, od metoda kompostiranja i od raspoloživosti vode koja isparavanjem hladi materijal koji se kompostira (Ristić i Vuković, 2006).

### **2.1.2. Sadržaj vlage**

Vlaga je ključni faktor koji utiče na mikrobiološku aktivnost (Anastasi i sar., 2005). Optimalni sadržaj vlage je između 50% i 70% (Crawford, 1983).

Vlaga u kompostnoj masi ima važnu ulogu za metabolizam mikroorganizama, a indirektno učestvuje u snabdevanju materijala kiseonikom. Mikroorganizmi mogu da koriste samo one organske molekule koji su rastvoreni u vodi. Sadržaj vlage između 40% i 60% obezbeđuje odgovarajuću vlažnost bez sprečavanja aeracije.

Ako sadržaj vlage padne ispod 40%, bakterijska aktivnost biće usporena, a potpuno se prekida ako padne ispod 15%. Sa druge strane, ako sadržaj vlage pređe 60%, dolazi do ispiranja hranljivih elemenata, zapremina vazduha se redukuje, stvara se neprijatan miris (zbog anaerobnih uslova) i sam proces razlaganja se usporava. Kada dođe do ovakvog stanja, gomilu treba mešati. Ovim se omogućava normalizovanje cirkulacije vazduha, materijal postaje rastresitiji za bolju dreniranost i vazdušno sušenje. Dodavanje suvog materijala kao

što je slama, strugotina ili zreli kompost može, takođe, popraviti ovaj problem sa prekomernom vlagom.

Ako je gomila isuviše suva, potrebno je dodati vodu. Mnogo efikasnija praksa je mešati gomilu i ponovo navlažiti materijal. Izvesni materijali odbijaju vodu ili je apsorbuju samo svojom površinom. Optimalan sadržaj vlage sirovog materijala treba da bude u rasponu od 50% do 60%, u zavisnosti od veličine čestica, raspoloživih hranljivih elemenata i fizičkih karakteristika.

### **2.1.3. Aeracija**

Aeracija se definiše kao najvažniji faktor u sistemu kompostiranja. Aeracijom se postiže obogaćivanje svežim vazduhom centra kompostne gomile, gde nedostaje kiseonik. Brzo aerobno razlaganje dešava se samo uz prisustvo dovoljne količine kiseonika. Aeracija se vrši prirodnim putem kada se vazduh zagrejan aktivnošću mikroba diže kroz gomilu, a njega zamenjuje nešto hladniji svež vazduh iz okoline. Inicijalno mešanje materijala obično unosi dovoljno vazduha za početak kompostiranja. Potrebe za kiseonikom su veće prvih nekoliko nedelja. Na kretanje vazduha kroz kompostnu gomilu utiču poroznost i vlažnost materijala. Ukoliko se gomila meša, prevrće, dolazi do pojačane aeracije u kompostnoj gomili, a time i veće mikrobiološke aktivnosti što dovodi do željenog cilja – bržeg kompostiranja (Thompson, 2001).

### **2.1.4. Odnos ugljenika prema azotu (C / N)**

Ugljenik i azot su sastavni delovi organskog otpada koji mogu lako da poremete proces kompostiranja ako se nalaze u nedovoljnim ili prekomernim količinama ili pak, kada je odnos C / N nepovoljan. Mikroorganizmi u kompostu koriste ugljenik kao energetski izvor, dok azot koriste za sintezu proteina. Odnos ova dva elementa u organskom otpadu treba približno da bude 30 delova ugljenika prema 1 delu azota. Optimalan C / N odnos kompostne mase treba da bude od 20:1 do 35:1 (Hubbe i sar., 2010). C / N odnos veći od ove vrednosti usporava razgradnju organske materije. A manji od optimalne dovodi do gubitka azota. Četinarska šuška, strugotina i slama su dobar izvor ugljenika. Ukoliko se održava stalan C / N odnos 30:1, mikroorganizmi mogu da razlože organski materijal vrlo brzo. Pri visokom C / N odnosu sadržaj azota je mali i razlaganje se usporava. Sa druge strane, pri niskom C / N odnosu, sadržaj azota je visok i on će najverovatnije da se izgubi u atmosferi u formi amonijačnog

gasa. Ovo obično dovodi do problema sa neprijatnim mirisom. Većina materijala za kompostiranje nema ovaj idealan C / N odnos od 30:1, tako da se moraju mešati različiti materijali da bi se on postigao.

Opšte je poznato da krupni, osušeni materijal sadrži vrlo malo azota. Na primer, drveni otpadni materijali su sa visokim sadržajem ugljenika. Sa druge strane, zeleni materijal, kao što su lišće i stajnjak, sadrži relativno visok sadržaj azota. Pravilno mešanje ugljenika i azota pomaže da se obezbede dovoljno visoke temperature kompostiranja kako bi proces mogao efikasno da se odvija. Mešanje materijala, da bi se postigao radni C / N odnos, predstavlja veštinu u kompostiranju.

Kako kompostiranje odmiče, C / N odnos se postepeno smanjuje od 30 : 1 do 10-15 : 1 za gotov proizvod (Rashad i sar., 2010.) Ovo se dešava kao posledica razgradnje organskih jedinjenja od strane mikroorganizama, gde se dve trećine ugljenika izbacuje kao ugljendioksid. Preostala trećina se ugrađuje zajedno sa azotom u ćelije mikroorganizama, a kasnije oslobađa za dalju upotrebu nakon smrti ćelije. Iako je dostizanje C / N odnosa od oko 30:1 glavni cilj u planiranju operacije kompostiranja, ovaj odnos je potrebno prilagoditi kada je u pitanju biodostupnost hranljivih elemenata u materijalu. Veći deo azota u razgradivim materijama je lako dostupan. Jedan deo ugljenika, međutim, može biti vezan u jedinjenjima koja su visoko rezistentna biološkoj degradaciji.

### **2.1.5. Veličina čestice**

Optimalna stopa veličine čestice je u opsegu 1,25–5 cm (Choi, 1999; Nakasaki i sar., 1993). Relativno mala početna veličina čestice pomaže brzu razgradnju pružajući veću površinu za mikrobnu aktivnost (Das i sar., 1996). Međutim ukoliko je veličina čestice premala dolazi do inhibicije cirkulacije vazduha kroz gomilu, smanjuje se slobodan vazdušni prostor u sistemu i smanjuje se difuzija kiseonika (Haug i sar., 1993).

Mikrobiološka aktivnost se odvija na površini čestica materijala koji se kompostira. Površina materijala koji se kompostira može biti povećana seckanjem na manje delove. Povećavanjem površine omogućava se mikroorganizmima da razgrade više materijala, da se brže razmnožavaju i stvore veću toplotu. Što više ima manjih čestica, veća će biti biološka aktivnost i brzina kompostiranja. Neke materijale, npr. strugotinu, ne treba usitnjavati. Danas postoje različiti uređaji koji mogu da samelju ili iseckaju kompostni materijal pre deponovanja na gomilu za kompostiranje.

### **2.1.6. Poroznost**

Poroznost se odnosi na prostor između čestica u kompostnoj gomili. Ako materijal nije zasićen vodom, ovi prostori su delimično ispunjeni vazduhom koji snabdeva kiseonikom organizme razlagače. Ako dođe do zasićenosti kompostne gomile vodom, smanjuje se prostor za vazduh a time dolazi do usporavanja procesa kompostiranja.

### **2.1.7. Promene pH vrednosti tokom kompostiranja**

Kompostiranje može da se efikasno sprovodi pri različitim pH vrednostima, a da se ozbiljno ne ugrozi proces. Optimalna pH vrednost za mikrobnu aktivnost je između 6,5 i 8,0 (Christian i sar., 1997).

Sam proces kompostiranja dovodi do velikih promena u materijalu pri razlaganju organske materije koje su praćene i promenama u pH vrednostima. Na primer, oslobađanje organskih kiselina može privremeno ili lokalno da snizi pH, a time i poveća kiselost. S druge strane, proizvodnja amonijaka iz azotnih jedinjenja može prouzrokovati oslobađanje neprijatnih mirisa, takođe se povećava pH, tj. alkalnost materijala tokom početnih stadijuma kompostiranja, što može da poboljša proces jer je u alkalnoj sredini kontrolisan rast patogenih gljivica koje vole kisele uslove rasta (Saidi i sar., 2008). Ali bez obzira na merenja pH vrednosti u početnom materijalu, krajnji proizvod – kompost će uvek biti sa stabilnim pH, koji je neutralan.

### **2.1.8. Hranljivi elementi**

Odgovarajući nivoi fosfora i kalijuma takođe su važni za proces kompostiranja i normalno se nalaze u poljoprivrednim organskim ostacima, naročito u stajnjaku ili u životinjskim ostacima koji se mogu naći na farmama (Benito i sar., 2003).

## **2.2. Stabilnost i zrelost komposta**

Kvalitet i stabilnost komposta u potpunosti zavisi od polaznih sirovina koje se kompostiraju (Ranalli i sar., 2001; Benito i sar., 2003).

U toku procesa kompostiranja različiti parametri, uključujući C / N odnos, temperatura, pH, sadržaj vlage i prisustvo potencijalnih patogena koriste se za procenu

kvaliteta i stabilnosti komposta (Steger i sar., 2007; Erickson i sar., 2009; Al-Turki, 2010; Fourti i sar., 2011; Sanmanee i sar., 2011).

Procena stabilnosti komposta pre njegove upotrebe je od suštinskog značaja za reciklažu organskog otpada na poljoprivrednom zemljištu. Glavni uslov za bezbedno korišćenje komposta u zemljištu je stepen stabilnosti ili zrelosti komposta koji podrazumeva stabilan sadržaj organske materije i odsustvo fitotoksičnih jedinjenja, patogenih biljaka i životinja. Zrelost je povezana sa potencijalnim rastom biljaka ili fitotoksičnost (Iannotti i sar., 1993), a stabilnost je često u vezi sa mikrobiološkom aktivnošću komposta.

Zrelost komposta se odnosi na stepen razgradnje fitotoksičnih supstanci proizvedenih tokom aktivne faze kompostiranja (Wu i sar., 2000). Fitotoksičnost i nezrelost komposta je vezana za prisustvo organskih kiselina, amonijaka i etilen-oksida u ranim fazama procesa kompostiranja (Hue i sar., 1995). Kao rezultat mikrobiološke aktivnosti nastaje proizvodnja CO<sub>2</sub> i oslobađanje toplote (Iannotti i sar., 1993; Conti i sar., 1997). Zrelost komposta karakteriše i indeks klijavosti semena u ekstraktu komposta – biološka metoda za procenu stepena zrelosti komposta (Iglesial-Jimenez i Perez-Garcia, 1992). Zrelost komposta određuje i indeks humifikacije (Inbar i sar., 1993). Fitotoksičnost komposta je u kasnijim fazama procesa kompostiranja uslovljena proizvodnjom, amonijaka i etilenoksida (Mathur i sar., 1993; Tam i Tiquia, 1994; Tiquia i sar., 2002). Test klijavosti semena je široko prihvaćen za ocenu fitotoksičnosti i stabilnosti komposta (Tiquia i sar., 1996; Zucconi i sar., 1981). Obim fitotoksičnosti usled nedovoljnog kompostiranja može se uzeti kao pokazatelj hemijske nestabilnosti komposta (Wu i Ma, 2001). Međutim, zbog selektivne toksičnosti različitih materijala za kompostiranje prema semenima različitih vrsta biće potrebno da se izaberu vrste koje su osetljive na određeni materijal za kompostiranje i koje mogu da se koriste za procenu stabilnosti komposta (Bernal i sar., 1998).

Fizičke karakteristike kao što su boja, miris i temperatura su opšte karakteristike o postignutoj fazi raspadanja, ali daju malo informacija o stepenu sazrevanja. Stabilizacija sazrevanja podrazumeva formiranje nekih huminskih materija i stepen, tj. indeks humifikacije organske materije je opšte prihvaćen kao kriterijum zrelosti. Nezreo kompost sadrži fitotoksične supstance kao što su fenolne kiseline i isparljive masne kiseline, amonijak, etilen oksid (Kirchmann i Widen, 1994).

Kalifornijski savet za kvalitet komposta (CCQC) je razvio numerički „Indeks zrelosti“ koji koristi standardne metode laboratorijskih ispitivanja za ocenu zrelosti komposta (Compost Maturity Index, 2001).

Kao početna tačka za procenu u CCQC Indeksa zrelosti koristi se odnos C : N. Uzorak komposta mora imati C : N odnos jednak ili manji od 25 : 1 da bi se smatrao dovoljno zrelim za dalje ispitivanje. Ako uzorak komposta prođe taj početni test, onda se šalje na dva seta testova. Testovi iz grupe A mere da li je došlo do adekvatnog raspadanja merenjem ugljendioksida, uvođenjem kiseonika. Testovi iz grupe B direktno mere u uzorku potencijalne količine fitotoksičnih jedinjenja, kao što je amonijak. Ili se alternativno, posredno oceni da li uzorak ima fitotoksična jedinjenja merenjem klijavosti semena (Compost Maturity Index, 2001).

Postoje tri kategorije gotovog komposta: veoma zreo, zreo i nezreo i odnose se na komposte sa sledećim karakteristikama koje su date u tabeli 2.1.

**Tabela 2.1.** Kategorije komposta sa osobinama (Compost Maturity Index, 2001).

<b>Veoma zreo</b>	<b>Zreo</b>	<b>Nezreo</b>
Dobro osušen kompost	Osušen kompost	Neosušen kompost
Bez mirisa	Mala je verovatnoća proizvodnje neprijatnih mirisa	Može proizvesti neprijatne mirise
Nema daljeg razlaganja	Minimalan sadržaj N	Značajan sadržaj N
Bez potencijalne toksičnosti	Mala potencijalna toksičnost	Visoka potencijalna toksičnost

Na osnovu prethodnih osobina i u zavisnosti od kategorije, kompost može da se iskoristi za različite namene koje su date u sledećoj tabeli 2.2.

**Tabela 2.2.** Finalne upotrebe komposta na osnovu Indeksa zrelosti (Compost Maturity Index, 2001).

<b>Veoma zreo</b>	<b>Zreo</b>	<b>Nezreo</b>
Zemljište za uzgoj biljaka u saksijama	U polju (pašnjaci, seno)	Poboljšanje osobina jalovih zemljišta
Alternativni gornji sloj tla	U vinogradima	Dodatak organskih materija osiromašenim zemljištima
Prekrivanje busenja trave	Prekrivanje redova useva	Sirovina za nov kompost



### 2.3. Izvori i oblici ugljenika u zemljištu

Zemljište sadrži veliki izvor organskih materija, od prostih šećera pa sve do kompleksnih ugljenih hidrata, proteina, masti, voskova i organskih kiselina.

U zemljištu mogu biti prisutna tri osnovna oblika ugljenika:

- elementarni ugljenik,
- neorganski ugljenik,
- organski ugljenik.

### 2.4. Ugljeni hidrati u biljnom materijalu

Lignoceluloza je glavni strukturni materijal biljnih organa. Na nano nivou, lignoceluloza je kompozitni materijal koji se sastoji od tri kompleksna biopolimera, od kristalnih vlakana celuloze koja su povezana sa hemicelulozom (uglavnom ksilanom), ugrađenih u ligninu, složenom i heterogenom fenolnom makromolekulu. Pektinske supstance spadaju u poliuronide koji se nalaze u rastvornom ili nerastvornom obliku skoro u svim biljkama.

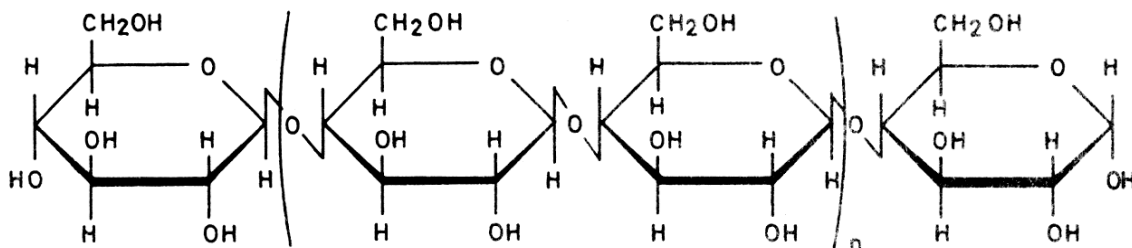
#### 2.4.1. Struktura i uloga celuloze

Struktura lignoceluloze ima važnu ulogu tokom kompostiranja biljnog otpada pošto je sastavni deo biljnih ćelija. Većina poljoprivredne lignocelulozne biomase se sastoji od 10–25% lignina, 20–30% hemiceluloze i 40–50% celuloze (Anwar i sar., 2014).

Prisustvo lignina čini celulozne materijale otpornije na biodegradaciju. Lignin je trodimenzionalan polimer koji se sastoji od supstituisanih fenilpropanskih jedinica povezanih preko različitih tipova veze. Lignin peroksidaza je enzim koji razgrađuje lignin i klasifikuje se kao fenoloksidaza. Različite vrste gljiva igraju različite uloge u degradaciji biomase. *Basidiomycetes* su najefikasniji degradatori lignoceluloznog materijala. Gljive bele truleži su najefikasniji degradatori lignina. Gljive braon truleži (porodica *Basidiomycetes*), koje uglavnom razgrađuju polisaharidne komponente drveta, mogu ubrzati propadanje lignina stvaranjem kanala u biomasi kroz reakcije hidroksilacije i demetilacije.

Celuloza (slika 2.2) je najrasprostranjeniji prirodni polisaharid koji predstavlja osnovnu supstancu zidova ćelija biljaka. Ima veliku mogućnost korišćenja kao obnovljivi

izvor ugljenih hidrata, za proizvodnju bioloških proizvoda i bioenergije (Rubin, 2008). Tako se u drvetu nalazi oko 50% celuloze, cementirane ligninom. Pamučno vlakno je skoro čista celuloza (90% do 99%).



**Slika 2.2.** Šematski prikaz celuloze

(<http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/carbohydrates.htm>.)

Molekuli celuloze su linearni polimeri koji se sastoje od jedinica D-glukoze međusobno povezanih β-1,4-glikozidnim vezama (Zhang i sar., 2006; Zhang i sar., 2004).

Parcijalnom hidrolizom polisaharida celuloze pod dejstvom enzima celulaze nastaje celobioza, osnovna jedinica celuloze. Molekul celobioze čine dva molekula D-glukoze povezana β-glikozidnom vezom.

Molekuli celuloze se javljaju u obliku dugih nizova pri čemu se više njih ređa paralelno i povezuje stvaranjem mnogobrojnih vodoničnih veza i van der Valsovih sila. U celuloznom vlaknu se naizmenično ređaju pravilni, kristalni delovi, sa amorfni. Kristalni delovi daju veliku mehaničku čvrstinu i nerastvornost vlakana, dok do bubrenja i reakcione sposobnosti dolazi usled prisustva amornih delova niza. Molekul celuloze je veoma stabilan sa vremenom polu-života od nekoliko miliona godina za spontano razlaganje usled raskidanja β-glikozidnih veza, što potvrđuje da se u prirodi degradacija celuloze odvija pod dejstvom enzima (Zhang i sar., 2006).

#### 2.4.2. Uloga hemiceluloze

Hemiceluloze spadaju u heteropolisaharide jer su sačinjene od raznih monosaharida. One kod biljaka prate celulozu. Za razliku od nje one lakše podležu hidrolizi, pri čemu nastaju D-galaktoza, D-ksiloza, D-arabinoza, uronske kiseline, a ponekad i D-manoza i D-glukoza. U zavisnosti od sastava, nose različite nazive (manani, galaktani, ksilani, arabani, itd.). U svakoj od tih vrsta hemiceluloze nalaze se razni monosaharidi ali oni koji preovlađuju daju naziv (Piletić i Milić, 1989).

### **2.4.3. Pektinske supstance**

Glavni monosaharid koji ulazi u sastav pektinskih supstanci je D-galakturonska kiselina, dok se u manjim količinama nalaze i neki drugi monosaharidi (L-arabinoza, D-galaktoza).

Rastvori pektinskih supstanci imaju izrazita koloidna svojstva.

U današnje vreme su poznati neki enzimi koji deluju na pektinske supstance i razlažu glikozidne veze između ostataka D-galakturonske kiseline. Smeša pektolitičkih enzima se proizvodi u industrijskom obimu i služi za bistrenje voćnih sokova i vina (Piletić i Milić, 1989).

## **2.5. Enzimska aktivnost kao parametar praćenja procesa kompostiranja**

U oksidoreduktaze spada veliki broj enzima, koji katalizuju oksidacije različitih organskih jedinjenja. Njihova uloga u metabolizmu i u tehnologiji je veoma važna, jer iz oksido-redukcionih procesa živi organizmi dobijaju energiju za zadovoljavanje svojih vitalnih i drugih potreba, energiju za svoju egzistenciju.

Prema vrsti jedinjenja koje se oksidiše, oksidoreduktaze se dele na nekoliko podgrupa u zavisnosti na koju funkcionalnu grupu deluju (alkoholnu, aldehidnu ili keto, amino primarnu i sekundarnu) ili koje deluju na redukovane NAD ili NADP kao davaoce, itd.

Svi enzimi ove grupe sadrže koenzim ili prostetsku grupu, koja u toku oksido-redukcije prima ili daje vodonikove atome ili elektrone. Dok je broj enzima ove grupe veliki, samo nekoliko koenzima i prostetskih grupa učestvuju u oksidativnim procesima. Znači, različiti enzimi imaju iste koenzime (Kendereški, 1986).

### **2.5.1. Nikotinamid-nukleotid-oksidoreduktaze (Piridin-dehidrogenaze)**

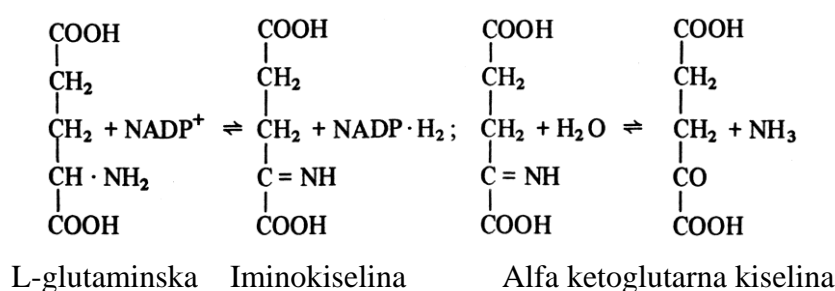
U grupu piridin-dehidrogenaza ili oksidoreduktaza sa  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$  kao akceptorima vodonika spada veliki broj enzima koji reaguju sa raznim organskim jedinjenjima od kojih oduzimaju vodonik, koji time ujedno i aktiviraju. Pojam aktivacije vodonika uveo je u biohemiju Wieland.

Dehidrogenaze su takvi enzimi, koji deluju na određene atome vodonika unutar nekog organskog molekula i osposobljavaju ih za prenos na akceptore – druge organske molekule, koji se pri tome redukuju. Supstrati, koji otpuštaju vodonik i elektrone, oksidišu se. Pošto je izvršena

primopredaja vodonika, oksidisani metabolit i redukovani prenosilac odvajaju se od dehidrogenaze i dehidrogenaza se oslobađa za novu reakciju (Kendereški, 1986).

### 2.5.2. L-glutamat: NAD (P)<sup>+</sup>-oksidoreduktaza ili glutamat-dehidrogenaza (NAD P<sup>+</sup>)

To je enzim, koji deluje na granici metabolizma belančevina i ugljenih hidrata. Katalizuje pretvaranje L-glutaminske u odgovarajuću iminokiselinu; posle te reakcije iminokiselina se spontano hidrolizuje i pretvara u odgovarajuću alfa-ketokiselinu i amonijak (slika 2.3) (Kendereški, 1986):



**Slika 2.3.** Reakcija NADP<sup>+</sup> sa L-glutaminskom kiselinom

U ovom enzimskom sistemu mogu kao aktivna grupa da učestvuju i NAD i NADP. I prvi i drugi deo reakcije su reverzibilni. U prisustvu dehidrogenaze amonijak može reduktivnom aminacijom da prevede alfa-ketoglutarnu kiselinu u L-glutaminsku kiselinu. Ova reakcija ima vrlo veliki fiziološki značaj, jer zahvaljujući upravo njoj u mikroorganizmima i u biljnom svetu vrši se asimilacija amonijaka. To su glavna vrata kroz koja neorganski azot, iz zemlje prelazi u biljna tkiva, ulazi u sastav glutaminske kiseline i dalje se zatim inkorporira u druge aminokiseline i belančevine (Kendereški, 1986).

### 2.5.3. Aktivnost dehidrogenaze u zemljištu

Od svih enzima u zemljištu dehidrogenaze su jedne od najvažnijih, a koriste se kao pokazatelj ukupne mikrobiološke aktivnosti zemljišta (Quilchano i Maranon, 2002; Gu i sar., 2009; Salazar i sar., 2011).

Dehidrogenaze igraju značajnu ulogu u biološkoj oksidaciji organskih materija za prenos vodonika iz organskih supstrata na neorganski akceptor. Atomi vodonika su uključeni u reduktivnim procesima biosinteze (Wolińska i Stępniewska, 2012).

Dehidrogenaze su osnovni deo enzimskog sistema svih živih mikroorganizama. Služe kao indikator mikrobiološkog redoks-sistema i mogu se smatrati kao dobra mera mikrobiološke oksidativne aktivnosti u zemljištu (Benito i sar., 2003).

#### **2.5.4. Faktori stimulacije aktivnosti dehidrogenaze**

Najvažniji faktori koji stimulišu aktivnost dehidrogenaze su:

- Vlažnost zemljišta
- Aeracija zemljišta
- Sadržaj organske materije
- pH vrednost zemljišta
- Temperatura
- Uticaj doba godine na aktivnost dehidrogenaze

- Vlažnost zemljišta

Vlažnost zemljišta snažno utiče na mikrobnu aktivnost zemljišta. Enzimska aktivnost dehidrogenaze je veća ukoliko je veća i vlažnost zemljišta. Najveći stres za mikroorganizme zemljišta je suša. Pokazano je u brojnim studijama da na aktivnost dehidrogenaze značajno utiče sadržaj vode i da ona pada sa smanjenjem vlažnosti zemljišta. Primećeno je da su više vrednosti dehidrogenaze u poplavljenim zemljištima (Zhao i sar., 2010; Weaver i sar., 2012).

- Aeracija zemljišta

Brzina difuzije kiseonika se obično smatra najkritičnijim regulatorom mikrobiološke aktivnosti. Pretpostavlja se da smanjenje sadržaja vlage u zemljištu prouzrokuje povećanje brzine difuzije kiseonika. Istraživanjima je potvrđeno da aktivnost enzima dehidrogenaze indirektno zavisi od aeracije zemljišta (Wolińska i Bennicelli, 2010).

- Sadržaj organske materije

Neki autori su ukazali na pozitivnu korelaciju enzimske aktivnosti sa sadržajem organske materije. Viši nivo organske materije može da obezbedi dovoljno podloge za veću mikrobnu biomasu i veću proizvodnju enzima (Chodak i Niklińska, 2010; Moeskops i sar., 2010).

Mikroorganizmi ubrzavaju razgradnju organske materije, što se ogleda u oslobađanju CO<sub>2</sub> iz rizosfere, tako da je dehidrogenaza u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem organske materije. Takođe je primećeno povećanje dehidrogenaze sa većim brojem mikroorganizama.

- pH vrednost zemljišta

Generalno enzimi imaju tendenciju da se njihova aktivnost povećava s povećanjem pH zemljišta. Međutim, studija izvedena po (Włodarczyk i sar., 2002), ukazuje da je maksimalna aktivnost dehidrogenaze na pH=7,1. Slično je dokazano u radu (Ros i sar., 2003), gde je optimum za delovanje dehidrogenaze zabeležen kod pH=7,6–7,8. Pretpostavlja se da pH može da utiče na nivo enzima dehidrogenaze na tri različita načina (Shuler i Kargi, 2001):

- Promenom u jonskom obliku aktivnih mesta enzima, što posledično utiče na aktivnost enzima i stoga na brzinu reakcije,
- Menjanjem trodimenzionalnog oblika enzima,
- Uticajem na promenu podloge za enzim.

- Temperatura

Poznato je da se brzina enzimske katalize generalno povećava sa povećanjem temperature do nepovoljne temperature na kojoj enzim postaje denaturisan i samim tim njegova aktivnost se smanjuje (Wolińska i Stępniewska, 2011).

U nekim istraživanjima je pronađeno da dehidrogenaza pokazuje najvišu aktivnost na temperaturi zemljišta od 28 °C do 30 °C.

- Uticaj doba godine na aktivnost dehidrogenaze

Dehidrogenaze pripadaju enzimima koji prikazuju jake fluktuacije u svojoj aktivnosti u zavisnosti od doba godine. Istraživanja (Yuan i Yue, 2012), navode da je najviši nivo dehidrogenaze u jesen, a najniži u zimu. Istraživanja Wolińska i Stępniewska, (2011) pokazuju da je nivo dehidrogenaze najveći u maju (96%), a vrlo visok nivo je primećen i u julu.

### **2.5.5. Faktori inhibicije dehidrogenaze**

Najvažniji faktori inhibicije dehidrogenaze su:

- Dubina tla
- Đubrenje pesticidima
- Prisustvo teških metala

- Dubina tla

Najviši nivo dehidrogenaze je primećen u površinskom sloju (od 0–20 cm), dok je u najdubljem delu profila (od 40–60 cm) aktivnost dehidrogenaze smanjena za 95% u odnosu na površinski sloj.

- Đubrenje pesticidima

Đubrenje pesticidima ima snažan negativan uticaj na aktivnost dehidrogenaze.

- Prisustvo teških metala

Teški metali iako su prirodni sastojci zemljišta, mogu imati dugoročne štetne posledice na ekosistem i na biološke procese u zemljištu. Teški metali smanjuju aktivnost enzima interakcijom sa ferment-supstrat kompleksom, denaturacijom proteina enzima ili u interakciji sa protein aktivnim grupama.

Smanjenje enzimske aktivnosti u zemljištu treba da se smatra nepovoljnim u smislu plodnosti zemljišta, jer zemljište dobrog kvaliteta sa visokim sadržajem organske materije pokazuje visoku enzimsku aktivnost.

Aktivnost enzima dehidrogenaze je važan i jedan od najosetljivijih bioindikatora koji se odnose na kvalitet i plodnost zemljišta.

### **2.6. Biljni otpad nastao u toku prerade lekovitog bilja**

Primarnom preradom lekovitog bilja u toku tehnološkog procesa u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ nastaje suvi otpad u vidu krupnijeg ili sitnijeg praška. U toku postupka ekstrakcije bilja sa rastvaračima: mešavinom alkohola i vode i mešavinom propilenglikola i vode, nastaje vlažni otpad sa krupnijim frakcijama bilja.

Godišnje se u Institutu generiše oko 26 tona suvog biljnog otpada i najmanje oko 1500 kg vlažnog otpada nastalog u postupku ekstrakcije.

Prema definiciji, supstance biljnog porekla jesu sve biljke u celini ili delovima, u neprerađenom, suvom ili svežem stanju, kao i određeni eksudati koji nisu podvrgnuti specifičnim postupcima prerade (Zakon o lekovima i medicinskim sredstvima br. 30/2010. i 107/2012.). Termin „biljne droge“ je sinonim za termin „supstance biljnog porekla“ koji se koristi u legislativi Evropske Unije za biljne lekove (Ph. Eur. 7.0). Biljna droga je, kako to zahteva Ph. Eur. 7.0, precizno definisana pomoću botaničkog naučnog imena, u skladu sa binarnom nomenklaturom (rod, vrsta i autor)

Pod pojmom prerade biljnih sirovina podrazumevaju se tehnološki procesi usitnjavanja (mlevenje i seckanje), uklanjanje organskih i neorganskih nečistoća, prosejavanje, pri čemu se dobija usitnjena biljna sirovina.

Biljne sirovine prema biljnim delovima koji se koriste u procesu prerade možemo svrstati u nekoliko grupa:

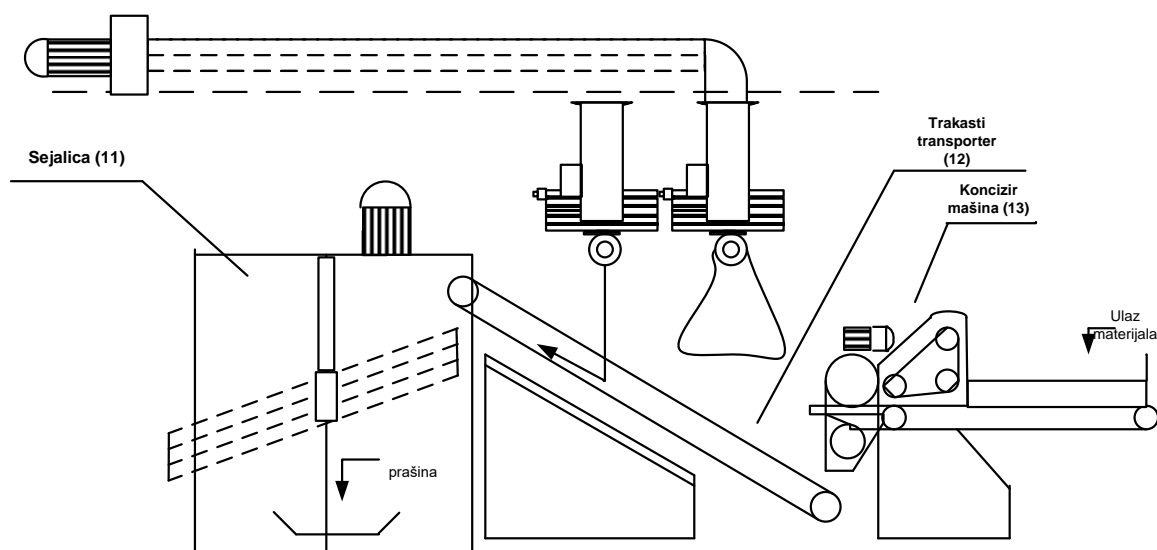
- Cvetovi
- Listovi
- Herbe
- Plodovi
- Semena
- Koreni, rizomi
- Kore
- Ostalo (specifični i/ili kombinovani delovi biljaka)

Tehnološka linija za seckanje i prosejavanje vrši usitnjavanje biljnih sirovina i frakcionisanje usitnjene biljne sirovine prema definisanom zahtevu specifikacije za određenu biljnu sirovinu. Sastoji se od sledećih mašina: mašine za seckanje (koncizir mašina), trakastog transportera i sejalice (slika 2.4).

Biljna sirovina doprema se ručnim paletarima iz magacina biljnih sirovina. Radnik-operater stavlja biljnu sirovinu na pokretnu traku seckalice, koja ga prenosi do mesta na kome su postavljeni noževi. Kombinovanim kretanjem noževi usitnjavaju biljnu sirovinu koja se potom kosim transporterom usipa na sejalicu. Sejalica je snabdevena sistemom sita, pomoću koje se odvajaju frakcije željenog stepena usitnjenosti. Između sita se izdvaja frakcija željenog stepena usitnjenosti. Sitnija frakcija (frakcija manja od 0.30 mm) koja



prolazi kroz sito u vidu prašine se sakuplja kao biljni otpad, dok se krupnija frakcija ponovo vraća u proces seckanja.



**Slika 2.4.** Tehnološka linija za seckanje i prosejavanje. Tehnološki projekat 152/2014, odeljenje primarne prerade Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“

Mašina za seckanje (ili koncizir mašina) je mašina za usitnjavanje biljne sirovine rezanjem koja u svom sastavu ima kućište u kome su smešteni noževi i dva trakasta transportera pomoću kojih se usipa biljna sirovina. Trakasti transporteri su sastavljeni od jednog dužeg transportera kojim se biljna sirovina transportuje i jednog manjeg koji ima ulogu sabijanja biljnog materijala do usta mašine. Trakasti transporteri su sistemom klinastog remenja i zupčastih prenosnika povezani na motor mašine za seckanje.

Transportna traka je napravljena od gume. Pošto traka zbog vlažnosti, promenom temperature i istežanja menja svoju dužinu, zatezanje se vrši preko jednog od bubnjeva. Tako se sprečava klizanje gume.

Kosi trakasti transporter se sastoji iz beskrajne trake namenjene transportu biljnog materijala od koncizir mašine do sejalice, izrađena je od gume sa reljefnim izgledom kako bi se materijal zadžavao dok se kreće ka vrhu. Pokretanje se vrši pomoću dva bubnja, gornji bubanj je snabdeven motorom dok je donji bubanj pokretan u svom ležištu i njime se zateže traka.

Sejalica je mašina za fracionisanje biljne sirovine i opremljena je sistemom ravnih sita koja osciluju u horizontalnoj ili kosoj ravni. Sito je razapeto na drveni okvir i obešeno o

nosač. Osovinom, koja je vezana sa elektromotorom, ram je vezan za ekscentar koji pri obrtanju dovodi do oscilatornih kretanja.

Usitnjavanjem biljne sirovine nastaju frakcije različitih veličina koje mogu da se podele prema Ph. Jug. IV na: grubo sečene droge (6 mm), polusitno sečene droge (3 mm), sitno sečene droge (2 mm), grub prašak (0,75 mm), sitan prašak (0,3 mm) i vrlo sitan prašak (0,15 mm).

Magnetni separatori su sastavni delovi mašine za seckanje i sejalice kojima se uklanjaju metalne primese postavljeni na ulazu i izlazu biljnih sirovina u tehnološku liniju. Magnetne primese se zadržavaju na magnetnim pločama separatora a potom mehanički uklanjaju sa istih. Na ovaj način se štite biljne droge od onečišćenja i linija od kvarova.

Specifičnost otpada od lekovitog bilja se ogleda u njegovom sastavu koji je karakterističan zbog prisustva različitih aktivnih jedinjenja, polifenola, flavonoida, karotenoida, saponina, tanina, alkaloida i drugih jedinjenja.

## **2.7. Uticaj mikroorganizama na proces kompostiranja**

Preduslov za formiranje komposta je uključivanje različitih mikroorganizama u proces kompostiranja.

Najaktivniji mikroorganizmi u procesu kompostiranja su bakterije, gljive i aktinomicete. Ovi mikroorganizmi su prisutni u ostacima hrane, zemljištu, lišću, otpacima trave. Različite vrste mikroorganizama su aktivne u različitim fazama kompostiranja. Mezofilni mikroorganizmi vrše razlaganje organske materije i povećavaju temperaturu, čime ograničavaju uslove za sopstveni opstanak, ali istovremeno stvaraju uslove za razvoj termofilnih populacija. Bakterije su uglavnom najbrojnije u kompostnoj gomili i razgrađuju lako dostupna jedinjenja (proteine, ugljene-hidrate). Takođe, prisutne su i azotofiksirajuće bakterije koje vezuju atmosferski azot i inkorporiraju ga u ćelijsku masu. Gljive imaju važnu ulogu u kompostiranju i to u fazi sušenja komposta, pošto one podnose uslove sa malo vlage bolje nego bakterije. Takođe, neke gljive imaju enzimske sisteme koji učestvuju u razlaganju lignina i hitina. Aktinomicete učestvuju u razlaganju aromatičnih jedinjenja, steroida, fenola i drugih složenih organskih molekula (Neklyudov i sar., 2006).

Organski otpad obezbeđuje hranu (azot i ugljenik) neophodnu mikroorganizmima da bi efikasno vršili razlaganje. Toplota koja se stvara povećava temperaturu u kompostnoj gomili do 70 °C. Ovo povećanje temperature dovodi do pojačanog isparavanja vode koja se u

hladnijim danima može videti kao magla koja se diže sa kompostne gomile. Približavanjem procesa kraju (posle nekoliko meseci do godinu dana, a i više, u zavisnosti od kompostnog materijala i načina praćenja procesa) temperatura kompostne gomile se ponovo približava temperaturi okolnog vazduha.

Kompostiranjem dolazi do smanjivanja zapremine kompostnog materijala. Do ove redukcije dolazi zbog oslobađanja CO<sub>2</sub>, vode i drugih gasova u atmosferu. Dalje smanjivanje dolazi sa pretvaranjem inicijalne kompostne mase u kompost, u kome ne može da se prepozna struktura početnog materijala. Krajnji proizvod, kompost, sastavljen je od mikroorganizama i beskičmenjaka, njihovih skeleta i produkata razlaganja i organske materije koju ovi organizmi nisu mogli da razgrade. Zreli kompost ima mnoge karakteristike humusa, koji je organski deo zemljišta.

Brzina kojom se kompost stvara kao i temperatura tokom kompostnog procesa zavise od mnogih faktora o kojima je diskutovano ranije. Po završetku kompostiranja, kompostna gomila se smanji zapreminski za 20–60%, sadržaj vlage je ispod 40%, a težina je smanjena 50%. pH vrednost dobijenog komposta je oko 7, znači neutralna, a odnos ugljenika prema azotu (C / N) treba da je manji od početne vrednosti C / N odnosa u kompostu. Karakterističan, nepoželjan miris, koji se redovno javlja u početnom materijalu, menja se u miris koji podseća na miris zemlje.

Organski supstrat, sredstva za bubrenje i aditivi koji se koriste u kompostiranju su uglavnom izvedeni iz biljnog materijala. Lignoceluloza se sastoji od polisaharida kao što su celuloza, hemiceluloza i fenolnog polimera lignina. Stoga, sposobnost mikroorganizama da asimiliraju organske materije zavisi od njihove sposobnosti da proizvedu potrebne enzime za degradaciju komponenti materijala koji se kompostira, odnosno, celuloze, hemiceluloze i lignina. Složeniji supstrat, zahteva široki i sveobuhvatniji sistem enzima. Dejstvom mikroorganizama, složena organska jedinjenja se degradiraju do manjih molekula, koji zatim mogu biti korišćeni od strane mikroorganizama.

Mnogi organizmi, gljive, bakterije, beskičmenjaci kao i kišne gliste igraju važnu ulogu tokom kompostiranja.

Oni konvertuju organski otpad u dragocene resurse kao što su biljna hraniva i povećavaju produktivnost zemljišta (Zeinhom i sar., 2010). Sitni beskičmenjaci kao što su grinje, stonoge, insekti, mokrice, kišne gliste i puževi primarni su agensi fizičkog razlaganja. Oni rasturaju otpad i transportuju mikroorganizme sa jednog mesta na drugo.

Brzina kojom se organski materijal razlaže zavisi od vrste razlagača i tipa organskog materijala koji se kompostira kao i od metoda kompostiranja.

Različiti razlagači „napadaju“ različit organski materijal pod različitim temperaturnim režimom, a što je različitija mikrobna populacija, bolji su rezultati. Ako uslovi sredine postanu nepovoljni za određenog razlagača, taj organizam izumire ili se premešta u mnogo povoljniji deo gomile.

Mikroorganizmi kao što su bakterije, gljive i aktinomicete smatraju se najvećim razlagačima i uzročnicima povišenja temperature koja nastaje u kompostnom procesu.

Stotine vrsta gljiva su u stanju da razgrađuju lignocelulozu. Uglavnom postoje tri vrste gljiva koje žive na ostacima drveća koje prvenstveno razgrađuju jednu ili više komponenti drveta. To su gljive meke truleži (*Ascomycetes* i *Fungi imperfecti*), gljivice braon truleži (*Basidiomycetes*) i gljive bele truleži. *Ascomycetes* i *Fungi imperfecti* mogu efikasno da razlažu celulozu, ali razgradnja lignina teče polako i nepotpuno. *Basidiomycetes* generalno pokazuju sklonost ka ugljenohidratnim komponentama drveta, dok je razgradnja lignina uglavnom ograničena. Gljive bele truleži sposobne su da razgrađuju i lignin i celulozu. U većini zemljišta, 80% gljivične populacije pripada rodovima *Aspergillus* i *Penicillium*. Međutim, najviše proučavane su gljive *Trichoderma* i *Phanerochaete* (IARI, 2013).

Celulolitične bakterije su svuda u prirodi. Pod odgovarajućim uslovima bakterije razgrađuju celulozu i stoga mnogi bakterijski sojevi su poznati po tome da detaljno modifikuju i rastvaraju lignocelulozne strukture. Ali njihova sposobnost da mineralizuju lignin je ograničena (IARI, 2013).

*Sporocitophage* su dominantni celulolitični mikroorganizmi u svim procesima kompostiranja. *Cellulomonas* i *Citophaga* su mezofilne aerobne bakterije sposobne da razgrađuju celulozu. Više od jedne polovine ispitanih *Bacillus spp.* proizvodi vanćelijske celulaze. Mezofilni aerobni i anaerobni oblici *Bacillus* vrsta kao što su: *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. brevis*, *B. firmus*, *B. circulans*, *B. megaterium* i *B. cereus* su poznati po sposobnosti razgradnje celuloze i hemiceluloze (IARI, 2013).

Aktinomicete izolovane iz tla i srodnih materijala pokazuju primarnu biodegradativnu aktivnost, luče niz ekstracelularnih enzima i pokazuju sposobnost da metabolišu teške (složene) molekule. Termofilne *Thermoactinomyces*, *Streptomyces* i *Thermomonospora* su prisutne u suvim, toplim zemljištima, gde su visoke koncentracije soli i pH sredine. Iako aktinomicete mogu razgraditi celulozu i modifikovati strukturu lignina, njihova sposobnost da mineralizuju lignin je ograničena. Nedavni izveštaji ukazuju na ulogu *Streptomyces sp.* u delignifikaciji pirinčane slame što je čini veoma osetljivom na degradirajuće enzime.

### 2.7.1. Mešovite kulture mikroorganizama za ubrzavanje kompostiranja

Iako gljive, bakterije i aktinomicete igraju jedinstvene i važne uloge tokom kompostiranja, mešovite kulture mikroorganizama povećavaju brzinu razgradnje lignoceluloze zbog njihove sinergističke aktivnosti kroz korišćenje međuproizvoda razgradnje (IARI, 2013).

Na IARI (Indian Agricultural Research Institute) u Nju Delhiju, razvijena je mešovita kultura od četiri gljiva na osnovu njihovog potencijala za produkciju enzima koji razgrađuju lignocelulozu. Kultura od četiri gljivične kulture koju čine *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma viride*, *Phanerochaete chrysosporium* i *Aspergillus avamori* je korišćena za kompostiranje pirinčane slame u perforiranim jamama. Prototip je razvijen za povećanje biomase gljiva komposta od raznolikog poljoprivrednog otpada npr. pirinčana slama, otpad od soje, prosa, ostataka kukuruza i stočne hrane, slačice. Termofilne gljivične kulture *A. nidulans*, *Scitalidium thermophilum* i *Humicola* sp. su veoma efikasne u razgradnji mešanog otpada od soje i pirinča tokom letnjih meseci (IARI, 2013).

### 2.7.2. Aerobni i anaerobni mikroorganizmi

Aerobni mikroorganizmi su poželjniji za kompostiranje, u odnosu na anaerobne. Žive u sredinama gde je nivo kiseonika veći od 5%. U svežem vazduhu ima približno 21% kiseonika. Ovi mikroorganizmi su mnogo povoljniji jer obezbeđuju brzo i efikasno kompostiranje.

Nasuprot ovim organizmima, anaerobni mikroorganizmi se razvijaju kada u kompostnoj gomili nedostaje kiseonik. Razlaganje putem anaerobnih mikroorganizama naziva se fermentacija. Anaerobni uslovi su nepoželjni u kompostnoj gomili. Neki od proizvoda anaerobnog razlaganja (vodonik-sulfid i drugi) stvaraju neprijatan miris. Pored toga, anaerobnim procesom se stvaraju kiseline i alkoholi koji su štetni za biljke.

Od svih mikroorganizama, aerobne bakterije su najvažniji inicijatori razlaganja i porasta temperature u kompostnoj gomili. Psihrofilne bakterije su aktivne na nižim temperaturama od 5 °C. Mezofilne bakterije su najaktivnije na temperaturama između 10 i 15 °C, da bi na temperaturama od 50 °C i više, najviše došle do izražaja termofilne bakterije. Naravno, između ovih graničnih vrednosti postoje mnogi sojevi bakterija.

Početa temperatura kompostne gomile je slična temperaturi okolnog vazduha. Ako je temperatura kompostne gomile niža od 21 °C, psihrofilne bakterije počinju razlaganje.

Njihova aktivnost stvara neznatnu toplotu i prouzrokuje povećanje temperature kompostne gomile koja sada pogoduje aktivnosti mezofilnih bakterija. Zahvaljujući aktivnosti mezofilnih bakterija dolazi do bržeg razlaganja i povećanja temperature kompostne gomile, pa se stvaraju uslovi za razvoj termofilnih bakterija u kompostnoj gomili. Kasnije, sa smanjivanjem termofilnih bakterija u kompostnoj gomili, dolazi i do snižavanja temperature, tako da mezofilne bakterije ponovo postaju dominantne.

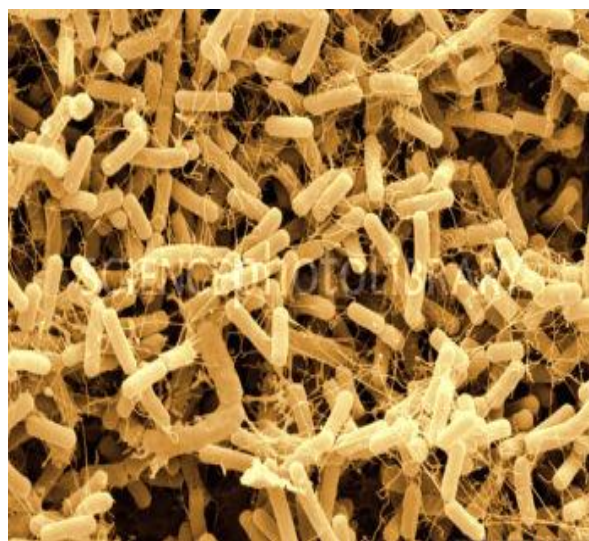
Prednost visokih temperatura jeste u tome što dolazi do uništavanja semena korova i patogenih organizama koji prouzrokuju bolesti kod biljaka i ljudi. Sa druge strane, umerena temperatura omogućava razvoj aerofilnih bakterija koje su najefikasniji razlagači. Mnogi razlagači su uništeni na temperaturama iznad 60 °C. Rast i pad temperature tokom procesa kompostiranja zavise od materijala koji se kompostira, od metode kompostiranja i od raspoloživosti vode koja isparavanjem hladi materijal koji se kompostira.

### **2.7.3 Korišćene vrste i karakteristike mikroorganizama**

Korišćene vrste mikroorganizama u ovom radu su *Bacillus amyloliquefaciens*, *Hymenobacter* sp., *Paenibacillus chitinolyticus*, *Streptomyces* sp.

#### **2.7.3.1. Bacillus amyloliquefaciens**

*Bacillus amyloliquefaciens* (slika 2.5) je bakterija koju je 1943. godine izolovao Fukumota, kao pripadnika roda *Bacillus*.



**Slika 2.5.** *Bacillus amyloliquefaciens*

<https://www.indiamart.com/proddetail/bacillus-amyloliquefaciens-11427341691.html>

*B. amyloliquefaciens* je Gram pozitivna, katalaza pozitivna, aerobna, štapićasta bakterija. Stanište joj je zemlja. Formira otporne endospore kada su uslovi nepovoljni koje se raznose sa prašinom.

Može da raste u prisustvu 10% NaCl, a na otpatcima krompira, fermentiše laktozu pri čemu se proizvodi kiselina.

Ćelije su pokretne pomoću peritrihalnih flagela. Ovalne spore su smeštene ili u centru ili paracentralno u sporangiji koja nije naduvana. Optimalna temperatura za rast je od 30 °C do 40 °C. Rasta nema ispod 15 °C ili iznad 50 °C. Bakterija je izolovana iz zemljišta, i pri industrijskoj fermentaciji amilaze. Koriste citrate kao izvor ugljenika (Priest i sar., 1987).

*Bacillus amyloliquefaciens* proizvodi ekstracelularne:

- amilaze,
- proteaze,
- celulaze.

- Amilaze

Amilaze su enzimi koji katalizuju delimičnu ili potpunu hidrolizu skroba do glukoze i oligosaharida manje molekulske mase (Knežević-Jugović, 1998).

Svrstavaju se u karbohidrolaze (hidrolizuju O-glikozilna jedinjenja) koje se nalaze u podgrupi glikozidaza koje spadaju u grupu hidrolaza. Predstavnicima ove grupe enzima su  $\alpha$ -amilaze,  $\beta$ -amilaze, glukoamilaze, pululanaze i izoamilaze.

Za industrijsku primenu ovih enzima od izuzetnog značaja su temperaturni optimum i termostabilnost enzima, pa se industrijski važne  $\alpha$ -amilaze dele na termostabilne i termolabilne. Termostabilne bakterijske amilaze se koriste u deterdžentima i u prvoj fazi hidrolize skroba – likvefakciji, koja se odvija na ekstremno visokim temperaturama, dok se termolabilne amilaze, uglavnom iz biljaka i plesni, koriste u drugoj fazi hidrolize skroba – saharifikaciji, ali i u pekarskoj, pivarskoj i sličnim industrijama. Alfa amilaza iz *B. amyloliquefaciens* se često koristi pri hidrolizi skroba.

- Proteaze

Proteaze predstavljaju veliku grupu enzima koji katalizuju hidrolizu peptidne veze u molekulima proteina i peptida pri čemu ih razlažu na proizvode manje molekulske mase.

Reakcija hidrolize je reverzibilna, pa proteaze mogu, pod određenim uslovima, da katalizuju i povratnu reakciju sinteze peptida uz izdvajanje vode.

- Celulaze

Celulaze su grupa enzima koji katalizuju hidrolizu  $\beta$ -1,4-glikozidne veze u molekulu celuloze. Poznato je da se biljna biomasa sastoji uglavnom od tri polimera: celuloza, hemiceluloza i lignin, pored kojih se nalazi i manje pektinskih materija. Potencijalne primene celulaza i uopšte enzima lignoceluloznog kompleksa u industriji su enormne. Jedan od najperspektivnijih enzimskih procesa je hidroliza biljne biomase pomoću celulaza u cilju dobijanja glukoze koja se može koristiti direktno kao proizvod za životinjsku i humanu primenu ili kao polazna sirovina za proizvodnju etanola, metanola, butanola, aminokiselina, organskih kiselina, biogoriva i mnogih drugih korisnih proizvoda.

Celulaze su multienzimski kompleks koji se sastoji od tri različita enzima (Xu i sar., 2007; Tebeka i sar., 2009) i to:

- endoglukanaze ili celulaze u užem smislu (endo  $\beta$ -1,4-D-glukan glukanohidrolaze),
- egzoglukanaze ili celobiohidrolaze ( $\beta$ -1,4-D-glukan celobiohidrolaze) i
- $\beta$ -glukozidaze ili celobiazе ( $\beta$ -D-glukozid glukohidrolaze).

Celulaze imaju malu primenu u prehrambenoj industriji uglavnom zbog nedostatka aktivnog enzimskog preparata koji bi se proizvodio ekstracelularno na ekonomičan način. Koriste se u pekarstvu, proizvodnji piva, sokova, preradi voća i povrća.

Upotrebom celulaza pored pektinaza u tehnološkim procesima proizvodnje vina ili sokova iz južnog voća povećava se količina, kvalitet i stabilnost proizvoda. Upotrebom ovih enzima u vinarstvu olakšava se i povećava brzina filtracije. Može se spomenuti i njihova primena, uz fosfolipaze i lipaze, za dobijanje ulja iz maslina, palminih koštica i drugih.

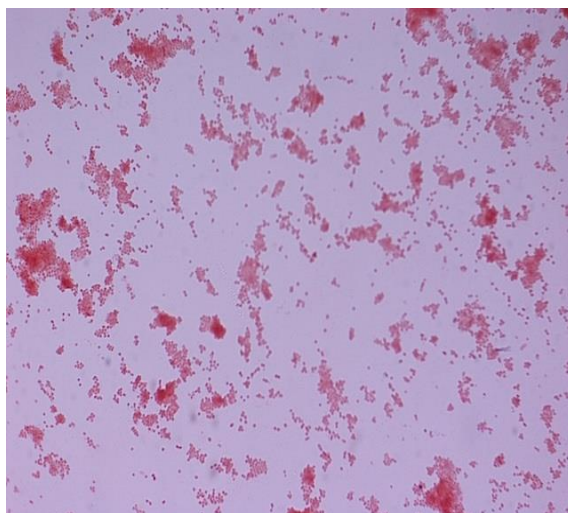
*Bacillus amyloliquefaciens* sintetizuje antibiotik barnase. Barnase je bakterijski protein koji se sastoji od 110 amino kiselina koje ispoljavaju ribonukleaznu aktivnost. Sam antibiotik je letalan za ćeliju kada nije prisutan njegov inhibitor barstar. Inhibitor se vezuje za ribonukleazni centar, i time sprečava oštećenja ćelijske RNK koje bi izazvao barnase,. Barnase ne poseduje disulfidne veze, niti zahteva divalentne katjone, niti nepeptidne komponente da bi se vezao (Buckle i sar., 1994).



### 2.7.3.2. *Hymenobacter sp.*

Rod *Hymenobacter* se sastoji od obligantnih aeroba, crveno pigmentisanih Gram negativnih bakterija. Crveni pigment potiče od karotenoida.

Bakterije su izolovane iz različitih okruženja, iz Antarktika, Mediterana, iz vazduha, iz ozračenog mesa (Aharon, 2006).



**Slika 2.6.** *Hymenobacter psychrotolerans*

S obzirom da *Hymenobacter* rodovi žive u suvom i hladnom okruženju, adaptirane su na stresan život.

Ćelije su štapićastog oblika, ne formiraju spore, produkuju u vodi rastvoran blago ružičasti pigment (slika 2.6). Ćelije nisu pokretne. Rastu u prisustvu 0–0,15% NaCl, pH=5–10, (optimalni 7) i na temperaturi od 4–28 °C (optimalna 18 °C).

One su oksidaza i katalaza pozitivne, redukuju nitrate, bez stvaranja gasa. Ne produkuju indol iz triptofana. Osetljive na bacitracin, hloramfenikol, eritromicin, gentamicin, kanamicin, penicilin G, vankomicin.

Razgranate masne kiseline dominiraju u membranama *Hymenobacter* vrsta, ali su fosforilizovane grupe neindeintifikovane (Aharon, 2006).

Najznačajnija morfološka karakteristika *Hymenobacter sp.* jeste njihova crvena boja, koja je posledica prisustva karotenoida.

Karotenoidi pripadaju grupi izoprenoida, koje proizvode mnoge bakterije, gljive, i fotosintetske eukariote. Karotenoidi se formiraju postepenom kondenzacijom 5 izoprena, monomer koga proizvode mnogi mikroorganizmi, za biosintezu različitih steroida, i

hopanoida, lipida, izoprenoidnih hinona, mnogih sekundarnih metabolita, i ostalih manje poznatih jedinjenja (Aharon, 2006).

Karotenoidi imaju različite uloge zavisno od tipa karotenoida, organizma, i ćelijske strukture. Najbolje su izučena njihova antioksidativna svojstva, koja su rezultat delokalizacije dvostruke veze, koja štiti lipidne membrane i proteine (Aharon, 2006).

### 2.7.3.3. *Paenibacillus chitinolyticus*

*Paenibacillus* je relativno nov rod. Naime, detaljnijim ispitivanjima, rod *Bacillus* je podeljen u 12 rodova, među kojima se našao i *Paenibacillus* tek od 90-ih godina XX veka.

Metode identifikacije bakterija često uključuju ispitivanje morfoloških i fizioloških karakteristika, analizu metilestara masnih kiselina, analizu i molekularne tehnike bazirane na istraživanju specifičnih prajmera. Parcijalno sekvencioniranje pomoću 16S rRNK kodirajućeg gena se koristi u detaljnijem ispitivanju različitosti ova dva roda. Komparativna 16S rRNK analiza sekvence pokazuje da ovi mikroorganizmi predstavljaju filogenetski drugačiju grupu i dokazuje samo veliku povezanost sa *Bacillus subtilis* (Ash i sar., 1991).

Naziv ovog roda potiče od reči „*paene*“, što na latinskom znači „skoro“, dakle, bukvalan naziv je „skoro bacilus“.

Prirodno se nalaze u rizosferi i na korenu plodonosnih biljaka kao što su pšenica, kukuruz, ječam, šećerna trska, na drveću kao što je bor i na naslagama ispod mora (Lal, 2009).

Rod *Paenibacillus* sadrži mnoštvo vrsta za koje je poznato da podstiču rast biljaka uključujući kukuruz, tikvu (Fürnkranz i sar., 2012), rižu (de Souza i sar., 2014) i mnoge druge. Kao i druge bakterije koje podstiču rast, oni to postižu kroz različite aspekte. Utiču direktno na rast biljaka proizvodeći indol-3-sirćetnu kiselinu (IAA) i druge auksin fitohormone, rastvaranjem nepristupačnog fosfora u obliku koji može biti unet u koren biljke, a neke vrste mogu vezati atmosferski azot. Pored toga, *Paenibacillus* pomaže u kontroli fitopatogena izazivanjem indukovane sistemske rezistencije (ISR) i/ili proizvodnjom različitih biocidnih supstanci.

Ćelije su Gram pozitivne, aerobne, pokretne, pojavljuju se same ili u paru. Elipsoidne spore se formiraju u nadutoj sporangiji. Kolonije na agaru nisu pigmentisane, glatke su, okrugle. Rastu u opsegu 28–30 °C, minimum od 5–10 °C, maksimum 35–40 °C. Do rasta dolazi na pH=5,6–5,7, sa 3% NaCl (Kuroshima i sar., 1996).

*Paenibacillus* vrste su oksidaza negativne, ne redukuju nitrata u nitrite, hidrolizuju alginat, dok beta glukane ne. Iz šećera proizvode kiseline. Izolovani su iz zemlje (Kuroshima i sar., 1996).

*Paenibacillus chitinolyticus* sintetizuje enzim hitinazu. Kao i celuloza, hitin pripada grupi biopolimera koji su relativno rezistentni na degradaciju.

Hitinaze pripadaju grupi glikozidnih hidrolaza, koje katalizuju degradaciju hitina. Ovi enzimi imaju sposobnost hidrolize hitina do njegovih oligomera, i monomer N- acetil- $\beta$ - D- glukozamina. Kao i celuloza, hitin pripada grupi biopolimera koji su relativno rezistentni na degradaciju.

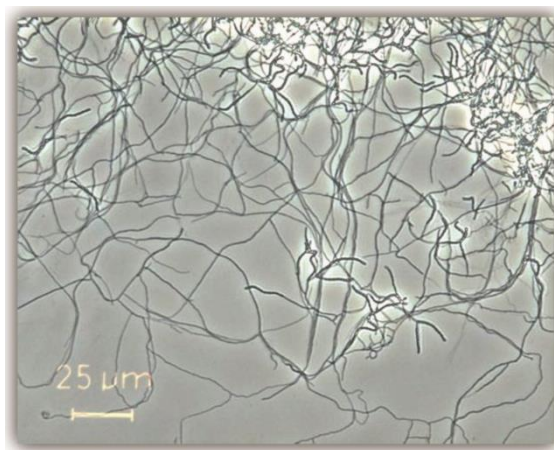
*Paenibacillus chitinolyticus* proizvodi velike količine hitinaza, u medijumu koji sadrži hitin kao jedini izvor ugljenika. Hitinolitička aktivnost kulture dostiže maksimum nakon 72 h. Enzim pokazuje optimalnu aktivnost na 37 °C, i pH 5–7. Hitinooligosaharidi dominiraju pri enzimskoj hidrolizi, ukazujući da je enzim endohitinaza.

Enzim sa ovakvim karakteristikama može biti koristan pri tretmanu đubreta, hitinosaharidnim proizvodima.

#### 2.7.3.4. *Streptomyces* sp.

*Streptomyces* je najveći rod familija *Actinobacteria* i predstavlja sastavni deo mikrobiološke zajednice rizosfere, čineći 10% od ukupnog broja mikroorganizama u zemljištu.

Rod *Streptomyces* čine aerobne, Gram-pozitivne, filamentozne bakterije. Supstratna micelija ovih bakterija je veoma razgranata, a vazдушna micelija formira lanac od 3 i više bespolnih spora (Prescott i sar., 2002), (slika 2.7).



Slika 2.7. *Streptomyces* sp.

Aktinomicete predstavljaju veoma dobre razlagače organske materije, naročito pektina, hitina i lignina (Janssen, 2006). Pored uloge u mineralizaciji organske materije, aktinomicete imaju sposobnost sinteze antibiotika kojim brane svoje izvore hrane.

Neke vrste iz roda *Streptomyces* grade simbiotske asocijacije sa biljkama i gljivama (Poole i sar., 2001; Maier i sar., 2004), dok druge imaju sposobnost da prodru u tkivo biljaka ili gljiva, pri čemu izazivaju različite poremećaje i oboljenja (Loria i sar., 2006). Simbiotski odnosi sa azotofiksatorima i biljkama mogu biti, ili podstaknuti ili inhibirani prisustvom aktinomiceta (Tokala i sar., 2002). Aktinomicete inhibiraju sposobnost azotofiksatora da stimulišu proces nodulacije.

Aktinomicete imaju ulogu biokontrole štetnih mikroorganizama, jer svojim antibioticima inhibiraju rast patogena, čime indirektno pospešuju rast biljke (Crawford i sar., 1993; Yuan i Crawford, 1995; Xiao i sar., 2002; Errakhi i sar., 2007).

### 3. Nutritivne i funkcionalne osobine odabranih uljanih biljnih vrsta

Uljani lan i crni kim su značajne uljane vrste zbog svojih nutritivnih i funkcionalnih osobina.

#### 3.1. Uljani lan (*Linum usitatissimum*)

Uljani lan je jednogodišnja biljka iz familije *Linaceae*. Latinski naziv ima značenje „vrlo korisno“.



**Slika 3.1.** Lan: seme (a) i čaura (b)

Korenov sistem je vretenast i prodire u zemljište do 1 m, ali se većina bočnih korenova obrazuje u sloju dubine do 30 cm. Stablo je člankovito, tanko, uspravno, elastično, zeljasto i plavičastozeleno sa voštanom prevlakom i u sredini prazno. Visina stabla uljanog lana je 30-60 cm. List je jednostavne građe (kratka peteljka i glatka, gola, tanka liska). Cvetovi su dvopolni, petodelni plavih, belih ili crvenkastih kruničnih listića. Lan je samooplodna biljka. Broj cvetova na stablu zavisi od razgranatosti lana. Plod lana je višesemena loptasta čaura, na vrhu zašiljena, prečnika 5-9 mm. Podeljena na pet komora, a u svakoj komori se razvijaju do dva semena. Seme je pljosnato, povijeno pri vrhu, sa jedne strane zaobljeno, sa druge suženo. Obavijeno je semenjačom. Dužina semena je 4-7 mm, širina do 2 mm. U sastav semena ulaze glatka, sjajna, smeđa, žuta ili zelenkasta semenjača, sloj slabo razvijenog endosperma i klica sa dva kotiledona u kojima se nalaze rezervne hranljive materije. Prema krupnoći semena sorte se dele na sitnosemene (tekstilne), sa masom semena 3-6,5 g i krupnosemene (uljane) sa masom 1000 semena 6,6-13 g. Seme ima veliku hranljivu, energetska i vitaminsku vrednost. Kod uljanih sorti u semenu se nalazi 38-47% ulja, 18-24% ukupnih proteina, 21,5-35,4% ukupnih šećera,



6,5-6,8% celuloza, 2,3-3,5% mineralnih soli (kalcijum, fosfor i gvožđe) i oko 6,5% vode. Seme je bogato vitaminima rastvorljivim u ulju (A, D, E i K) i vitaminima grupe B (tiamin, riboflavin, niacin) (Glamočlija i sar., 2015).

Zahvaljujući svom sastavu laneno seme se pojavljuje kao važan sastojak hrane jer daje ulje bogato omega-3 masnim kiselinama, proteinima i ligninima, ugljenim hidratima i značajan je izvor fenolnih jedinjenja (Oomah, 2001; Pengilly, 2003). Od svih masnih kiselina u semenu lana 53% čini  $\alpha$ -linolenska kiselina  $\omega$ -3 (ALA); 17% je linolna kiselina,  $\omega$ -6 (LA); 19% oleinska kiselina, 3% stearinska kis. i 5% palmitinska (Simopoulos, 2002).

Ishrana bogata lanenim uljem može pomoći u sprečavanju mnogih bolesti kao što su hronične, kardiovaskularne i maligne. Koristi se za lečenje određenih infekcija, ulkusa, migrene, poremećaja pažnje, glaukoma, psorijaze, emfizema, lupusa, hiperaktivnosti i napada panike (Harper i sar., 2006). Laneno ulje može smanjiti ukupni LDL-holesterol i povišenu glukozu u krvi i smanjiti rizik od koronarnih srčanih bolesti i moždanog udara.

Laneno seme zbog svih nutritivnih i funkcionalnih svojstava koje ima čini da zadovoljava osnovne potrebe u ljudskoj ishrani i održavanju zdravlja. Laneno seme se koristi i za proizvodnju lekova i Evropska farmakopeja propisuje kvalitet semena. Evropska agencija za lekove propisuje laneno seme – Lini semen kao biljni lek i kao tradicioalni biljni lek. Biljni lekovi na bazi semena lana se primenjuju za lečenje zatvora (opstipacije) ili u uslovima kada je otežano pražnjenje creva (defekacija). Tradicionalni biljni lek, koji sadrži sluzi iz semena lana koristi se za ublažavanje blagih gastrointestinalnih smetnji.

### 3.2. Crni kim (*Nigella sativa*)

Crni kim (slika 3.2) je jednogodišnja zeljasta biljka iz familije ljućica (*Ranunculaceae*).



**Slika 3.2.** Crni kim: seme (a) i čaura (b)

U narodu je poznat kao čurukot, crno seme, crni kumin, crnjika hrapava i mačkovi brkovi. Ova biljka naraste do 40 cm i ima manje ili više razgranato stablo obraslo sitnim dlačicama. Listovi su svetlozeleni, trostruko perasto deljeni, nazubljeni, smešteni naizmenično na stablu. Cvetovi se nalaze na vršnim granama biljke, boje od mlečno bele, preko bledo ljubičaste do tamno plave. U zavisnosti od vremenskih uslova cvetanje je od maja do septembra. Plodovi su čaure u kojima se nalazi sitno crno seme, plišane površine i blago aromatičnog mirisa. Seme može zadržati klijavost 3-4 godina. Crni kim je biljka koja vodi poreklo iz predela istočnog Mediterana, odnosno sa područja aridne klime koju odlikuju periodi dužih letnjih suša. U spontanoj flori kim raste od prostora Grčke do Irana tako da i gajene forme u takvim agroekološkim uslovima daju seme najboljeg hemijskog sastava. Odlikuje je kratak vegetacioni period, mala biljna masa, pogodni semenski parametri kvaliteta. Na prinos i kvalitet pri gajenju semena crnog kima značajno utiču pojedine agrotehničke mere, prvenstveno vreme i gustina setve (Abdolrahimi i sar., 2012; Koli, 2013).

Ova biljka predstavlja jednu od najstarijih fitoterapeutskih biljaka. Nađeno je da je korišćena još u Starom Egiptu za poboljšanje varenja, protiv prehlada, glavobolja, infekcija i zubobolja. Za crni kim je prorok Muhamed tvrdio da „leči sve osim smrti“. Kroz vekove koristili su ga mnogi poznati lekari i fitoterapeuti. Ova biljka spominje se u Bibliji i Hadithu. Njegova lekovita svojstva poznata su vekovima, a o tome svedoče zapisi, kao i staklena boca ulja iz grobnice faraona Tutankamona. Korišćen je kao začim, protiv alergija, upala, za jačanje imuniteta. Seme i ulje crnog kima smatraju se prirodnim antibiotikom. Na istoku se koristi za lečenje alergija, bronhitisa, astme i hroničnog kašlja, neurodermatitisa, menstrualnih tegoba, depresija i želudačnih tegoba, reumatizma, groznice, gripa i ekcema (Burits i Bucar, 2000). Seme crnog kima sadrži žućkasto masno ulje koje je bogato proteinima, aminokiselinama, nezasićenim masnim kiselinama (uglavnom linolna kiselina 50-60% i oleinska kiselina 20%), zasićenim masnim kiselinama (palmitinska i stearinska, oko 30%), vitaminima, taninima, alkaloidima, saponinima i mineralima (Ramadan, 2007).

Postoji na stotine zdravstvenih dobiti semena i ulja crnog kima. Smatra se da zbog sinergije njegovih sastojaka ovo ulje ima gotovo čudesnu isceljujuću moć (Ahmad i sar., 2013). Pojedina istraživanja su dokazala da seme i ulje crnog kima značajno smanjuju nivo holesterola i glukoze u krvi (Bamosa i sar., 1997; Zaoui i sar., 2002; Mohtashami i Entezari, 2016). U prethodnom periodu sproveden je veliki broj istraživanja lekovitosti crnog kima (oko 21.900 rezultata pretrage na Scholar.google, 2016a), a mnoga od njih usmerena su na njegovo antikancerogeno delovanje (oko 7.940 rezultata pretrage na Scholar.google, 2016b). Zahvaljujući timohinonu i fitosterolima, koji imaju antitumorska svojstva, crni kim je odlično

sredstvo za prevenciju svih vrsta kancera (Menounos i sar., 1986; Nergiz i Ötles, 1993; Randhawa i Alghamdi, 2011). Seme i ulje crnog kima kod nas se najčešće koristi u ishrani, farmaciji i kozmetici. U ishrani, seme se koristi u pekarstvu pri izradi hleba, keksa i drugih peciva. Seme se može dodavati i u jela, jer nema posebnu aromu. Ulje je pogodno za salate. U farmaciji i medicini njegova upotreba je u prethodnom periodu bila predmet brojnih istraživanja i studija. Crni kim ima jako neutrofilno dejstvo, aktivator je interferona, supstanci koje održavaju imuni status organizma. Crni kim štiti zdrave ćelije i sprečava razvoj malignih ćelija (Randhawa i Alghamdi, 2011). U istraživanjima je pronađeno da seme crnog kima predstavlja najbolji izvor antioksidanasa (Machmudah i sar., 2015; Yu i sar., 2005).

Ulje crnog kima postaje sve popularnije pa je i prodaja sve rasprostranjenija. Na našem tržištu sve su više prisutni seme i ulje crnog kima uvezeni iz Indije i pojedinih bliskoistočnih zemalja (Sirija, Irak, Turska, Iran, Egipat, Pakistan, Kina, Liban).

Ulje crnog kima se koristi kao antiseptik i lokalni anestetik. Pokazuje širok spektar farmakoloških aktivnosti (hepatoprotektiv, antiinflamatorno, antigljivično i antibakterijsko delovanje). Zaključak važnijih farmakoloških i fitohemijskih ispitivanja je da izolovanje sastojaka iz crnog kima može dovesti do „novih“ molekula i proizvodnje „novih“ biljnih lekova (Sultana i sar., 2015).

### **3.3. Karakteristike masnih kiselina uljanih vrsta**

Poznato je preko 1000 različitih masnih kiselina koje su prirodne komponente masti, ulja i drugih sličnih jedinjenja (Gunstone i Norris, 1983). Ove masne kiseline mogu imati različite dužine alkil lanaca (sa obično 10 ili više C-atoma) i 0-6 dvostrukih veza cis ili trans izomerije i mogu sadržati mnoštvo funkcionalnih grupa duž alkil lanaca (Gunstone i sar., 2007b).

Od ukupnog broja, 20–25 vrsta masnih kiselina su široko rasprostranjene u prirodi. One ulaze u sastav masti i ulja koji nalaze veliku upotrebu u ljudskoj ishrani i hemijskoj industriji za proizvodnju sapuna, deterdženata, proizvoda za ličnu negu, maziva, boja i odnedavno biodizela. Najveći izvori biljnih ulja su uljani usevi (soja, uljana repica i suncokret) koji se uzgajaju u relativno umerenim klimatskim uslovima. Drugi veliki izvori su palma, kokos i maslina koji se uzgajaju u tropskim i toplim klimama (O'Brien i sar., 2000). Ulja se dobijaju iz uljarica mehaničkim presovanjem ili korišćenjem rastvarača za ekstrakciju (n-heksana). Seme koje ima visok sadržaj ulja, prvo se mehanički ekstrahuje ceđenjem dok se ne smanji sadržaj ulja u semenu za 60%, a onda se nastavlja ekstrakcija rastvaračem.



Na osnovu prisustva dvostruke veze, masne kiseline se dele na zasićene i nezasićene.

Zasićene masne kiseline ne sadrže dvostruke veze, niti druge funkcionalne grupe duž lanca, osim karboksilne i ugljenikovi atomi, pored međusobnih, grade veze samo sa vodonikom, (osim u COOH grupi).

Najrasprostranjenije zasićene masne kiseline su miristinska (C14:0), palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0), arahinska (C20:0) i dr.

Nezasićene masne kiseline poseduju jednu, ili više dvostrukih veza u osnovnom ugljeničnom lancu (mono- i polinezasićene). Na ugljenikovim atomima koji obrazuju dvostruku vezu, pored vodonika, vezuju se i različite funkcionalne grupe. U zavisnosti od položaja koji vodonikovi atomi pri tome zauzimaju, razlikuju se cis i trans konfiguracija.

Najrasprostranjenije nezasićene masne kiseline su: palmitoleinska (C16:1); oleinska (C18:1); linolna (LA),  $\omega$ -6 (C18:2);  $\alpha$ -linolenska (ALA),  $\omega$ -3 (C18:3); arahidonska (C20:4); eruka (C22:1) i dr.

### **3.4. Esencijalne masne kiseline**

Masne kiseline koje su neophodne čoveku, a koje on ne može da sintetiše, nazivaju se esencijalnim i zato se moraju unositi hranom ili putem suplemenata. To su linolna (LA),  $\omega$ -6 i  $\alpha$ -linolenska kiselina (ALA),  $\omega$ -3. Mogu se naći u velikim količinama u biljkama i ribljem ulju, a u organizmu se prvenstveno koriste za sintezu hormona, koji regulišu krvni pritisak, nivo masti u krvi, utiču na imuni sistem i odbranu organizma od infekcija, sastavni su deo membranskih lipida i prekursori prostaglandina. Ove kiseline poseduju dvostruke veze na  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 ugljenikovom atomu. U čovečjem telu ne postoji mehanizam za sintezu upravo tih veza. Posledica deficita esencijalnih masnih kiselina je usporen rast, dermatitis, renalna hipertenzija, oštećenje reproduktivnih sposobnosti, poremećaj u radu srca i cirkulaciji, defekti u razvoju mozga, poremećaju aktivnosti mitohondrija, poremećen balans vode i dr.

Primarni izvori Alfa-linolenske kiseline (ALA),  $\omega$ -3 su morski plodovi, naročito masne ribe iako se nalaze u manjim količinama u drugim hranama životinjskog porekla. Svetska zdravstvena organizacija kao i mnoge druge organizacije preporučuju upotrebu masnih riba jednom do dvaput nedeljno, kako bi se osigurao unos  $\omega$ -3 masnih kiselina sa priznatim zdravstvenim prednostima (WHO, 2014). Međutim, postoji zabrinutost u pogledu održivosti ribe, a trenutne zalihe, morske i gajene ribe, verovatno neće biti dovoljne za ljudske potrebe (Roberts, 2014). To je povećalo interesovanje za dobijanje  $\omega$ -3 masnih kiselina iz biljaka. Izvori ALA

uključuju zelena biljna tkiva, ulje uljane repice, ulje soje (u kojem ALA čini 10% ukupnih masnih kiselina) i ulje od semena uljanog lana (u kojem ALA čini 50% masnih kiselina).

Prosečan unos ALA u ljudskoj ishrani, u Evropi, Australiji i Severnoj Americi kreće se od 0,6 do 2,3 g dnevno kod odraslih muškaraca i 0,5–1,5 g dnevno kod odraslih žena (Hulshof i sar., 1999; Ollis i Mayer, 1999; Kris-Etherton i sar., 2000; Innis i Elias, 2003).

### **3.5. Polifenoli i flavonoidi biljnih vrsta**

Poliofenolna jedinjenja u biljnim ekstraktima pokazuju antioksidativno delovanje. Antioksidansi su supstance koje su prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat koji se oksiduje i značajno usporavaju oksidaciju tog supstrata (Halliwell, 1990). Poznato je više od osam hiljada fenolnih jedinjenja različitih struktura. Najzastupljenije su fenolne kiseline, flavonoidi, flavanoli, izoflavoni, tanini, antocijani. Ova jedinjenja pored antioksidativnih poseduju i antimutagena, antikancerogena, antiinflamatorna i antimikrobna svojstva i smanjuju rizik od kardiovaskularnih oboljenja.

Prema mestu nastajanja antioksidanti se dele na endogene koji nastaju u ljudskom organizmu i egzogene koji se unose putem lekova ili hrane. Najvažnija grupa prirodnih egzogenih antioksidanata su fenolna jedinjenja.

Poliofenolna jedinjenja ispoljavaju antioksidativnu aktivnost na više načina:

- predajom H atoma, vezivanjem slobodnih kiseonikovih i azotnih radikala,
- heliranjem prooksidativnih metalnih jona ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ),
- aktiviranjem antioksidacijskih enzima,
- inhibicijom prooksidativnih enzima (NADH oksidaza, ksantinoksidaza, lipoksigenaza).

Flavonoidi predstavljaju biljne pigmente rasprostranjene u svim biljnim organima zelenih biljaka. Rastvorljivi su u vodi i mogu biti žute, crvene ili ljubičaste boje. Sastoje se od dva benzenova prstena. Iz biljaka je izolovano preko tri hiljade flavonoida koji su podeljeni u 12 klasa. Najzastupljeniji su: flavoni, izoflavoni, flavononi, flavanoli, katehini, anticijanidini i dr. Njihova uloga u biljkama je višestruka i ponašaju se kao antioksidansi, inhibitori enzima, fotosenzibilizatori i imaju antikancerogene osobine (Lajšić i Grujić-Injac, 1998). Povećan unos flavonoida može da ima prooksidativnu aktivnost, prouzrokuje mutagene procese i inhibira ključne enzime u metabolizmu hormona (Skibola i Smith, 2000).

## CILJ RADA

Osnovni cilj ovog rada je ispitivanje uticaja inokulacije, smešom prirodnih izolata bakterija i streptomiceta, na kompostiranje biljnog otpada nastalog tokom procesa proizvodnje i prerade lekovitog bilja kao i uticaj izabranih sojeva pri gajenju uljanog lana i crnog kima na nutritivna i funkcionalna svojstva masnih ulja.

Specifični ciljevi disertacije se mogu podeliti na tri grupe koje obuhvataju:

- Utvrđivanje uticaja bakterijskih sojeva na tretman biljnog otpada u procesu kompostiranja u cilju smanjenja perioda razlaganja i dobijanja visokokvalitetnog organskog đubriva – komposta
- Određivanje uticaja različite koncentracije mešane mikrobiološke kulture tokom inokulacije zemljišta na agronomske karakteristike gajenog uljanog lana i crnog kima
- Ispitivanje efikasne primene različitih koncentracija izabranih sojeva *Streptomiceta*, *Paenibacilusa* i *Himenobacteria* tokom kultivacije uljanog lana i crnog kima koja se ogleda u poboljšanju nutritivnih i funkcionalnih svojstava masnih ulja iz semena ovih biljaka kroz povećan sadržaj esencijalnih masnih kiselina naročito omega-3, povećanje antioksidativne aktivnosti i sadržaja polifenolnih jedinjenja.

## EKSPERIMENTALNI DEO

### 4. MATERIJALI I OPREMA

#### 4.1. Materijali

##### 4.1.1. Bakterijski izolati korišćeni u radu:

- *Bacillus altitudinis* PPT1
- *Bacillus amyloliquefaciens ssp. plantarum* PPM3
- *Hymenobacter psychrotolerance* CKS3
- *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1
- *Streptomyces fulvissimus* CKS7
- *Streptomyces microflavus* CKS6
- *Streptomyces spororaveus* CKS2

##### 4.1.2. Biljna semena korišćena u radu:

- *Cynara scolimus*
- *Fagopirum esculentum*
- *Lavandula officinalis*
- *Linum usitatissimum*
- *Nigella sativa*
- *Thymus vulgaris*

##### 4.1.3 Biljni otpad

Materijal koji je korišćen u eksperimentu je otpad nastao tokom procesa proizvodnje i prerade lekovitog bilja u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Beogradu, 2012. godine. Identifikovano je ukupno 25.225 kg otpada biljnog porekla. U ukupnoj količini preovlađuje otpad nakon prerade lekovitog bilja u pogonima Instituta u količini od 20.925 kg i oko 4300 kg otpada nastalog u postupku ekstrakcije.

## 4.2. Hemikalije i reagensi:

- aceton (CENTROHEM, Srbija)
- agar (TORLAK, Srbija)
- aluminijum – hlorid (MERCK, Nemačka)
- kazein hidrolizat (TORLAK, Srbija)
- destilovana voda
- etanol 100%-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (ZORKA FARMA, Srbija)
- fenol- C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH (LAHEMA, Češka)
- fenoltalein (ZORKA FARMA, Srbija)
- Folin&Ciocalteu's phenol reagens (SIGMA – ALDRICH, Švajcarska)
- galna kiselina (SIGMA – ALDRICH, Nemačka)
- glacijalna sirćetna kiselina (BETA HEM, Srbija)
- gvožđe (II) sulfat heptahidrat FeSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O (LANCH – NER, Češka)
- gvožđe-hlorid heksahidrat FeCl<sub>3</sub>x6H<sub>2</sub>O (ANALYTIKA, Češka)
- hlorovodonična kiselina (LA CHEMA, Češka)
- hlorovodonična kiselina HCl (ZORKA PHARMA, Srbija)
- kalijum – dihromat (HEMIKA, Hrvatska)
- kvaščevev ekstrakt (TORLAK, Srbija)
- kvercetin dihidrat (SIGMA – ALDRICH, Švajcarska)
- metanol (LANCH – NER, Češka)
- n – Heksan (CARLO ERBA REAGENTS, Francuska)
- natrijum – acetat (ZDRAVLJE, Srbija)
- natrijum – karbonat anhidrovani (CENTROHEM, Srbija)
- natrijum-hidroksid–NaOH (CENTROHEM, Srbija)
- Sumporna kiselina (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (ZORKA PHARMA, Srbija)
- TRIS (hidroksimetil) – aminometan (ACROS ORGANICS, New Jersey, SAD)
- Whatman No.1 filter papir (SIGMA-ALDRICH, Nemačka)
- 1,3,5- trifenilformazan (TPF) (SIGMA – ALDRICH, Švajcarska)
- 2,3,5- trifeniltetrazolium hlorid (TTC), 0,3% rastvor (SIGMA – ALDRICH, Švajcarska)
- 2,4,6 – Tri – (2 – pyridyl) – s – triazin (SIGMA – ALDRICH, Švajcarska)
- 2,2 – difenil – 1 – pikrilhidrazil fosfat (SIGMA – ALDRICH, Nemačka)

### 4.3. Oprema

- Analitička vaga (KERN&Sohn GmbH, Tip ABS 220-4)
- Autoklav (Sutjeska, Srbija)
- Centrifuga (SigmaRmodel2-16, Shropshire, Velika Britanija)
- Gasni hromatograf modela 7890A Agilent Technologies
- Homogenizator (IKA, SAD)
- Orbitalna tresilica (KS 4000i control, IKAR, Werke GmbH & Co. KG, Nemačka)
- Peć za žarenje, (SNOL, Litvanija)
- PH metar (InoLab pH 720, Nemačka)
- Sistem za natkritičnu ekstrakciju NKE Autoclave Engineers SCE Screeing System (SAD)
- Sušnica, Fabrika medicinskih uređaja i instrumenata „Sutjeska“, Srbija
- Termokonduktometrijski detektor za elementarnu analizu (Elementar Vario EL III element analyzer, Nemačka)
- Termostat za rast mikroorganizama, „Memmert“, Nemačka
- Ultrazvučno vodeno kupatilo, „EiRo-Vep“, Niš, Srbija
- UV/VIS Spektrofotometar (Ultrospec 3300 pro – Amersham Biosciences, Australija)
- Vakuum pumpa, (V-700), „BÜCHI“, Švajcarska
- Vlagomer (KERN, MLS\_A Version 3.1)
- Vorteks (REAX 7000, Heidolph, Schwabach, Nemačka)

## 5. METODE

### 5.1. Metode za pripremu uzoraka

U okviru metoda za pripremu uzoraka ubrajaju se: identifikacija sojeva i njihovo pripremanje za kompostiranje, pripremanje sojeva za ispitivanje uticaja na kultivaciju crnog kima i uljanog lana, ispitivanje kompatibilnosti sojeva metodom klijavosti, biohemijski profil sojeva-Test API- ZIM, pripremanje biljnog otpada za kompostiranje i pripremanje biljnog materijala za kultivaciju uljanog lana i crnog kima.

#### 5.1.1. Identifikacija korišćenih sojeva i njihovo pripremanje za kompostiranje

U radu je ispitan uticaj inokulacije smešom prirodnih izolata bakterija i streptomiceta na kompostiranje biljnog otpada nastalog tokom procesa proizvodnje i prerade lekovitog bilja u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“. Korišćeni izolati predstavljaju deo kolekcije mikroorganizama mikrobiološke laboratorije Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu.

Korišćeni izolati su:

- *Streptomyces spororaveus* CKS2
- *Streptomyces microflavus* CKS6
- *Streptomyces fulvissimus* CKS7
- *Hymenobacter psychrotolerance* CKS3
- *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1
- *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* PPM3
- *Bacillus altitudinis* PPT1

Izolati su dobijeni iz uzoraka šumskog zemljišta i morskih sedimenata sa različitim hidrolitičkim potencijalom. Sojevi su identifikovani prema najbližim vrstama zasnovanim na morfološkim karakteristikama i sekvenci gena koji kodira 16S rRNA (broj pristupa genom KP715850-KP715856) koji je bio viši od 99% za sve vrste, sa izuzetkom soja CKS3 (sa 98% sličnosti sa najbližim Himenobacter vrstama) i naznačeni su kao: *Streptomyces spororaveus* CKS2, *Streptomyces microflavus* CKS6, *Streptomyces fulvissimus* CKS7, *Hymenobacter* sp. CKS3, *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* PPM3 i *Bacillus altitudinis* PPT1.

Kulture bakterija su zasejane na tečnoj ISP1 podlozi. Titar bakterija je  $10^6$ – $10^7$  mL<sup>-1</sup>.

Potrebni reagensi za ISP1 bujon:

- Hidrolizat kazeina 5,0 g L<sup>-1</sup>
- Kvašćev ekstrakt 3,0 g L<sup>-1</sup>
- Destilovana voda 1 L

Postupak:

Odmerene aktivne supstance za podlogu su kuvane na vodenom kupatilu do potpunog rastvaranja. Zatim su prohladene podloge izliveno u erlenmajere po 50 mL i sterilisane u autoklavu 20 min. na 121 °C. Nakon sterilizacije, podloge su prohladene i vršeno je zasejavanje po 2 mL odabranih mikroorganizama. Zasejane podloge u erlenmajerima su inkubirane na tresilici 24 h, na 30 °C, pri brzini od 150 rpm.

Umnožene ćelije ispitivanih sojeva u podlozi su odmerene u jednakim količinama po 20 mL i pomešane u odgovarajuću menzuru ili stakleni sud. Tako napravljen miks od sveže pripremljenih sojeva je korišćen u koncentraciji od 2% za inokulaciju uzoraka od 10 kg biljnog otpada koji je obeležen u daljem radu oznakom IC. Uzorak koji je izdvojen kao kontrola nije tretiran inokulumom i obeležen je kao CC.

### **5.1.2. Priprema sojeva za ispitivanje uticaja na kultivaciju crnog kima i uljanog lana**

Korišćeni su sledeći izolati:

- *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1,
- *Hymenobacter* sp. CKS3,
- *Streptomyces fulvissimus* CKS7.

Kulture su pripremljene u ISP1 bujonu dok se ne dostigne titar 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. Tečne kulture su pomešane u odnosima jednake zapremine u ISP medijumu i dobijena mešana populacija korišćena je za inokulaciju zemljišta u različitoj koncentraciji (1 mL L<sup>-1</sup> i 7 mL L<sup>-1</sup> po 1 m<sup>2</sup> tla) za kultivaciju *L. usitatissimum* i *N. sativa*.

### **5.1.3. Ispitivanje kompatibilnosti sojeva metodom klijavosti**

Test za ispitivanje klijavosti semena je korišćen za određivanje kompatibilnosti sojeva. Korišćeno je 5 mL razblaženih mešanih tečnih kultura (razblaženje koncentracije 1



mL pune kulture u 1 L destilovane vode), za vlaženje sterilizovanog filter papira (Whatman No.1) u staklenoj petri posudi. Za kontrolu je korišćeno 5 mL destilovane vode. Indeks klijanja (GI) izračunat je korišćenjem 25 semena *L. usitatissimum* i *N. sativa*, sa tri ponavljanja. Semenima je bilo dozvoljeno da klijaju 72 sata na 25 °C u mraku. Posle tog vremena je izmerena dužina korena i broj iskljalih semena. Indeks klijanja (GI) je izračunat korišćenjem poznate jednačine:

$$GI (\%)=100 \times G/Gc \times L/Lc \quad (5.1)$$

gde su G i L klijavost i dužina korena uzoraka ispitanih semena tretiranih sa bakterijskim inokulumom, dok su Gc i Lc klijavost i dužina korena semena tretiranih destilovanom vodom (kontrola).

#### **5.1.4. Biohemijski profil sojeva - Test API- ZIM**

Enzimske aktivnosti izolata bile su okarakterisane sa API ZIM-test trakama (bioMerieux) prema uputstvima proizvođača. API-ZIM test daje mogućnost da se odredi prisustvo enzima iz grupa: fosfataza, esteraza, amino peptidaza, proteaza i glikosil hidrolaza, u skladu sa procedurom predloženom od strane proizvođača. U 2 ml API medijuma se doda suspenzija sveže kulture mikoorganizama da bi se dobila zamućenost smeše 5-6 McFarlanda (*McFarland*). Potom je u svaki bunarčić (ima ih ukupno 19) API test trake dodato po 65 µL smeše. Zatim se test traka zatvara i ostavlja u termostatu (4,5 h, 30 °C). Nakon inkubacije, dodaju se redom, u svaki bunarčić, reagensi ZimA (*ZymA*) i ZimB (*ZymB*) kako bi se zaustavila reakcija i razvila boja tokom narednih 5 min. Ukoliko se razvije boja u bunarčiću, test je pozitivan. Intenzitet boje se upoređuje sa kontrolnom tablom koja se dobija od proizvođača i svakom bunarčiću se dodeljuje vrednost intenziteta boje od 1 do 5: reakcije niskog intenziteta (1), reakcije umerenog intenziteta (2-3) i reakcije visokog intenziteta (4-5).

Sposobnost solubilizacije mineralnih fosfata (MPS) detektovana je na agarnim pločama sa trikalcijum fosfatom. Preliminarno ispitivanje sposobnosti fiksiranja azota u čistim bakterijskim kulturama izvršeno je na polutvrdom malatnom medijumu bez N (Nfb).

### 5.1.5. Pripremanje biljnog otpada za kompostiranje

Za eksperiment su korišćene četiri manje drvene kutije tzv. kompostišta u kojima je postavljeno četiri uzoraka po 10 kg mešanog otpada lekovitog bilja dobijenog nakon prerade iz pogona i biljnog otpada nastalog u postupku ekstrakcije u odnosu (5:1). Kompostni materijal je delimično zaštićen od atmosferskih uticaja. Pod uticajem je spoljašne temperature od 15 °C do 35 °C. Na svakoj kutiji je ostavljen otvoren prostor na vrhu, za razmenu vazduha. Svake nedelje je dolivana voda po potrebi, a svake druge nedelje kompost se mešao prevrtanjem kako bi se omogućila aeracija. Tri uzorka su tretirana smešom izolata koji predstavljaju deo kolekcije mikroorganizama mikrobiološke laboratorije Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu. Uzorcima je dodato 2% inokuluma. Uzorak koji je izdvojen kao kontrola nije tretiran inokulumom. Nakon inokulacije uzorci su nakvašeni vodom (do sadržaja vlage 60%).

Uzorkovanje se vrši u različitim fazama kompostiranja 7., 20., 33., 61., 93., 128., 163. i 191. dana kompostiranja. Svaki uzorak je mešavina pet poduzoraka, uzetih sa pet različitih tačaka duž gomile i od vrha ka dnu gomile. Jedan subuzorak je uskladišten na -20 °C za dalje hemijske analize. Ekstrakti za hemijske analize dobijeni su ekstrakcijom uzorka komposta sa destilovanom vodom (1:10). Dobijeni ekstrakti su centrifugirani brzinom 4500 rpm, 10 minuta. Supernatant je korišćen kao uzorak u daljim analizama. Planirano vreme raspadanja otpada i praćenja procesa je oko 6 meseci.

Za potrebe ostvarenja cilja istraživanja, korišćeni su važeći Zakoni i podzakonska akta Republike Srbije i različita interna dokumenta Instituta za proučavanje lekovitog bilja „*Dr Josif Pančić*“ koja se odnose na biološki tretman organskog otpada. U cilju sagledavanja postojećeg stanja, izvršena je analiza vrste biljnog otpada i njihovih okvirnih količina, nastalih u procesu proizvodnje i prerade lekovitog bilja.

Agrohemijske analize biljnog otpada lekovitog bilja urađene su u laboratoriji za agrohemiju i fiziologiju biljaka, Instituta za zemljište i melioracije, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu – Zemunu. Rezultati su dati u tabeli 5.1.

**Tabela 5.1.** Agrohemijska analiza biljnog otpada nastalog u procesu proizvodnje i prerade lekovitog bilja u Institutu „Dr Josif Pančić“

Poreklo uzorka	Pepeo (%)	pH	Ukupni P (%)	Ukupni K (%)	Ukupni N (%)	Ukupni C (%)	C:N
UP-P	33,0	6,19	0,27	1,32	1,12	33,50	29,91:1
UP-S	7,90	5,63	0,33	1,67	1,64	46,02	28,06:1
UP-K	8,30	5,47	0,33	2,00	1,56	45,85	29,39:1
UP-M	21,5	5,97	0,25	1,79	1,39	39,26	28,24:1
UE	8,30	6,72	0,27	1,07	1,47	45,84	31,19:1
UP-G	65,90	5,73	0,20	0,50	0,98	17,06	17,41:1
UP-E	42,70	6,08	0,16	1,67	1,40	28,63	20,45:1

Uzorci iz pogona: UP-P– sitna prašina; UP-S– sitno seckani delovi; UP-K– krupno seckani delovi; UP-M– mešane frakcije; UE – Uzorak iz ekstrakcije; UP-G– gorke materije; UP-E– prašina od prerade rastavića-*Equiseti pulvis*

Prema podacima iz tabele 5.1. svi uzorci iz pogona (osim uzorka koji čine gorke materije u količini od 1.266 kg na godišnjem nivou) po svojim agrohemijskim osobinama predstavljaju pogodnu sirovinu za proizvodnju visokokvalitetnog komposta.

#### 5.1.6. Pripremanje biljnog materijala za kultivaciju uljanog lana i crnog kima

U istraživanju su korišćena semena sledećih biljnih vrsta: crni kim (*Nigella sativa* L.) i uljani lan (*Linum usitatissimum* L. var. *Vulgare* Boen.), koje se uzgajaju i umnožavaju na parcelama u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ iz Beograda, koje se nalaze u Pančevu, Vojvodina, Republika Srbija (44 ° 52'20" N, 20 ° 42'06 "E, 74 m nadmorske visine).

## **5.2. Ispitivanje sposobnosti rasta odabranih bakterijskih sojeva na ISP1 agarnim pločama sa dodatkom 1%, 5% i 10% biljnog otpada**

Potrebni reagensi za pripremanje ISP1 podloge:

- Hidrolizat kazeina            5,0 g L<sup>-1</sup>
- Kvašćev ekstrakt            3,0 g L<sup>-1</sup>
- Agar                            15,0 g L<sup>-1</sup>
- Destilovana voda            1 L

Postupak:

Odmerene aktivne supstance za podlogu se kuvaju na vodenom kupatilu dok se ne rastvore. Zatim se skuvana i prohlađena podloga izlije po 50 mL u erlenmajere u kojima je prethodno odmeren biljni uzorak od mešanog biljnog otpada u koncentracijama od 1%, 5% i 10%. Zatim se sterilizuje u autoklavu 40 min. na 121 °C. Nakon sterilizacije se prohladi i izliva u sterilne petri-šolje. Nakon hlađenja se vrši zasejavanje odabranih sojeva.

## **5.3. Metode za praćenje procesa kompostiranja**

U okviru metoda za praćenje procesa kompostiranja spadaju: određivanje pH reakcije komposta, određivanje koncentracije ukupnih šećera u ekstraktu komposta, određivanje ukupnog sadržaja organske materije, određivanje suve materije, određivanje sadržaja ukupnog ugljenika, azota, fosfora i kalijuma, određivanje enzimske aktivnosti dehidrogenaze i sadržaja CO<sub>2</sub> i ispitivanje stabilnosti komposta metodom klijavosti.

### **5.3.1. Određivanje pH reakcije komposta**

Optimalna pH vrednost za mikrobnu aktivnost je između 6,5 i 8,0 (Christian i sar., 1997). Sam proces kompostiranja dovodi do velikih promena u materijalu pri razlaganju organske materije koje su praćene i promenama u pH vrednostima. Na primer, oslobađanje organskih kiselina može privremeno ili lokalno da snizi pH a time i poveća kiselost. S druge strane, proizvodnja amonijaka iz azotnih jedinjenja u kasnijim fazama procesa kompostiranja praćena je oslobađanjem neprijatnih mirisa, pri čemu se povećava pH vrednost. Krajnji proizvod – kompost uvek će biti sa stabilnim pH, koji je neutralan.

Određivanje pH vrednosti vodenog ekstrakta komposta vrši se elektrometrijskim merenjem na pH-metru. Ekstrakt komposta je dobijen od 10 g uzoraka komposta koji je pomešan sa 100 mL destilovane vode (1:10 W/V, uzorak: voda) (Tiquia i Tam, 2002). Nakon 4 h ekstrakcije uzorci su filtrirani a zatim centrifugirani 10 min. brzinom 4500 rpm. Supernatant je korišćen za analize pH vrednosti kao i određivanje sadržaja ukupnih šećera.

### **5.3.2. Određivanje koncentracije ukupnih šećera u ekstraktu komposta**

Ova metoda ukazuje na proces postupne hidrolize polisaharida celuloze pod dejstvom enzima celulaze raskidanjem  $\beta$ -1,4-glukozidnih veza do nastajanja disaharida celobioze i daljom njegovom hidrolizom do izdvajanja glukoze. Takođe proces hidrolize celuloze prati i hidroliza hemiceluloze – heteropolisaharida pri čemu nastaju različiti monosaharidi.

Sadržaj ukupnih šećera se određuje po spektrofotometrijskoj metodi na UV/VIS spektrofotometru na 490 nm. Prinos izdvojenih ugljenih hidrata tokom hidrolize je određen fenol-sumpornom metodom (Albalasmeh, 2013), a rezultati su izraženi preko koncentracije glukoze ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) i preračunati na 1 L ( $\text{g L}^{-1}$ ).

Ova metoda se može koristiti i u slučajevima kada su uz šećer prisutni ostaci soli i proteina i u slučaju kada su šećeri zakačeni za polimer. Uz izuzetak određenih deoksi šećera, metoda je veoma opšta i može se primeniti za redukujuće i neredukujuće šećere, kao i mnoge druge vrste ugljenih hidrata uključujući i oligosaharide. Određivanje šećera se zasniva na merenju apsorpcije obojenog aromatičnog kompleksa koji se formira između fenola i ugljenih hidrata, na 490 nm. Količina prisutnog šećera se određuje upoređivanjem sa standardnom krivom, dobijenom uz pomoć spektrofotometra. Pod odgovarajućim uslovima, tačnost metode je  $\pm 2\%$ .

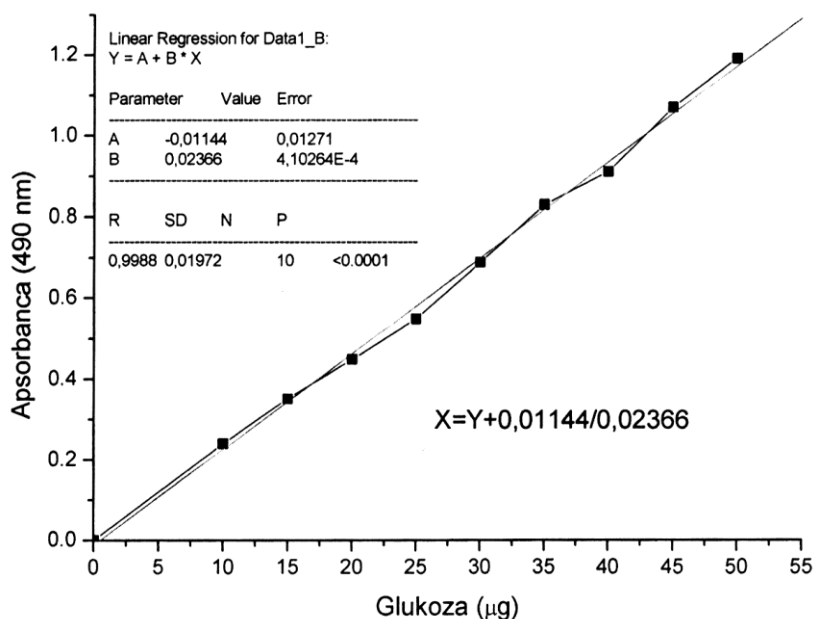
U slučaju kada spektrofotometar nije dostupan, metoda se izvodi kvalitativno, direktnim vizuelnim upoređivanjem boja uzoraka poznatih koncentracija.

Reagensi:

- 4% fenol: 40 g fenola rastvoriti u 1 L destilovane vode, čuvati do 6 meseci na sobnoj temperaturi,
- 96% sumporna kiselina,
- 1 mg  $\text{mL}^{-1}$  standardnog šećera (glukoza) u zatvorenim epruvetama.

Postupak:

Epruvete zapremine 10 mL se prvo isperu destilovanom vodom. Spektrofotometar se podešava na 490 nm. Kao slepa proba koristi se uzorak napravljen mešanjem 500  $\mu\text{L}$  4% fenola i 2,5 mL 96% sumporne kiseline. Standardna kriva se dobija merenjem apsorbance standardnog rastvora šećera, koncentracije 1 mg mL<sup>-1</sup>. Uzorak se odgovarajućom pipetom raspoređuje u 10 različitih suvih epruveta, u opsegu od 5  $\mu\text{L}$  do 50  $\mu\text{L}$ , dodaje 500  $\mu\text{L}$  4% fenola i 2,5 mL 96% sumporne kiseline i meri na 490 nm. Dobijena standardna kriva je prikazana na slici 5.1.



**Slika 5.1.** Standardna kriva za određivanje količine oslobođenih ugljenih hidrata preko koncentracije glukoze

Izmeri se zapremina uzorka ekstrakta nepoznatog šećera koja se želi ispitati i prenese u epruvetu. Dodaje se 500  $\mu\text{L}$  4% fenola i 2,5 mL 96% sumporne kiseline i meri apsorbance. Dobijene vrednosti apsorbance se ubacuju u dobijenu jednačinu standardne krive i izračunava koncentracija nepoznatog šećera.

### 5.3.3. Određivanje ukupnog sadržaja organske materije

Ukupni sadržaj organske materije se određuje po Thompsonovoj metodi (2001), žarenjem na 550 °C, pet sati, u peći za žarenje. Korišćeni su uzorci suve materije – komposta nakon sušenja u vakuum sušnici na 50 °C.

Određivanje sadržaja pepela i organske materije:

$$\text{Pepeo (\%)} = \frac{\text{neto masa pepela nakon žarenja na } 550^{\circ}\text{C(g)}}{\text{neto suvog uzorka (g)}} \times 100 \quad (5.2)$$

$$\text{Organska materija (\%)} = \left[ 1 - \frac{\text{neto masa pepela nakon žarenja na } 550^{\circ}\text{C(g)}}{\text{neto suvog uzorka (g)}} \right] \times 100 \quad (5.3)$$

#### 5.3.4. Određivanje suve materije

Suva materija uzorka određuje se primenom standardne metode sušenja na 105 °C do konstantne mase (Trajković i sar., 1983).

#### 5.3.5. Određivanje sadržaja ukupnog ugljenika, azota, fosfora i kalijuma

Ukupan sadržaj ugljenika i azota se određuje pomoću termokonduktometrijskog detektora za elementarnu analizu (Elementar Vario EL III element analyzer) (Bremner, 1965).

Kivete za sagorevanje (CuO, PbCrO<sub>4</sub>, aluminijumska i kvarcna vuna) i redukciju (bakarna žica, srebrna i kvarcna vuna) postavljene su na odgovarajuće temperature (sagorevanje 900 °C i redukcija 600 °C). Suvi biljni materijal (0,01 g) postavljen je u aluminijumsku foliju, a zatim u aparat.

U kiveti za sagorevanje, biljni materijal je sagoren do CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NO<sub>2</sub> i SO<sub>2</sub>. Sumporna jedinjenja su apsorbovana pomoću PbCrO<sub>4</sub> po izlasku iz kivete za sagorevanje. Isparljive halogene komponente su eliminisane iz smeše gasova pomoću srebrne vune. CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O i SO<sub>2</sub> su adsorbovani pomoću He, a preostali N<sub>2</sub> je detektovan pomoću TCD (detektor ukupnog ugljenika, engl. *Total Carbon Detector*).

Količina C i N u uzorku dobijena je pomoću standardnih kriva zavisnosti detektovanih vrednosti i apsolutnih količina ispitivanih elemenata u mg.

Sadržaj azota (TKN) je određen po mikro Kjeldahlovom digestivnom postupku, digestijom uzoraka sa koncentrovanom sumpornom kiselinom (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i smešom katalizatora (100:1:1000 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O/Se/K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Amonijak u Kjeldahlovim digestijama je određen titrimetrijski, nakon destilacije alkalne pare (Bremner, 1965).

Sadržaj fosfora je određen digestijom sa HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub> a zatim kolorimetrijskom metodom pomoću Bartonovog rastvora (AOAC, 2000). Kalijum je određen digestijom s HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub> i plamenim fotometrom (AOAC, 2000).

### 5.3.6. Određivanje enzimске aktivnosti dehidrogenaze

Procedura testa dehidrogenaze daje pouzdan indeks mikrobne aktivnosti u vezi sa specifičnim tretmanom zemljišta sa minimalnim vremenom, reagensom i opremom. Dehidrogenaze igraju značajnu ulogu u biološkoj oksidaciji organskih materija za prenos vodonika iz organskih supstrata na neorganski akceptor.

U metodi je korišćen reagens trifeniltetrazolium hlorid (TTC). Metoda je rađena po ISO standardu 23753-1.

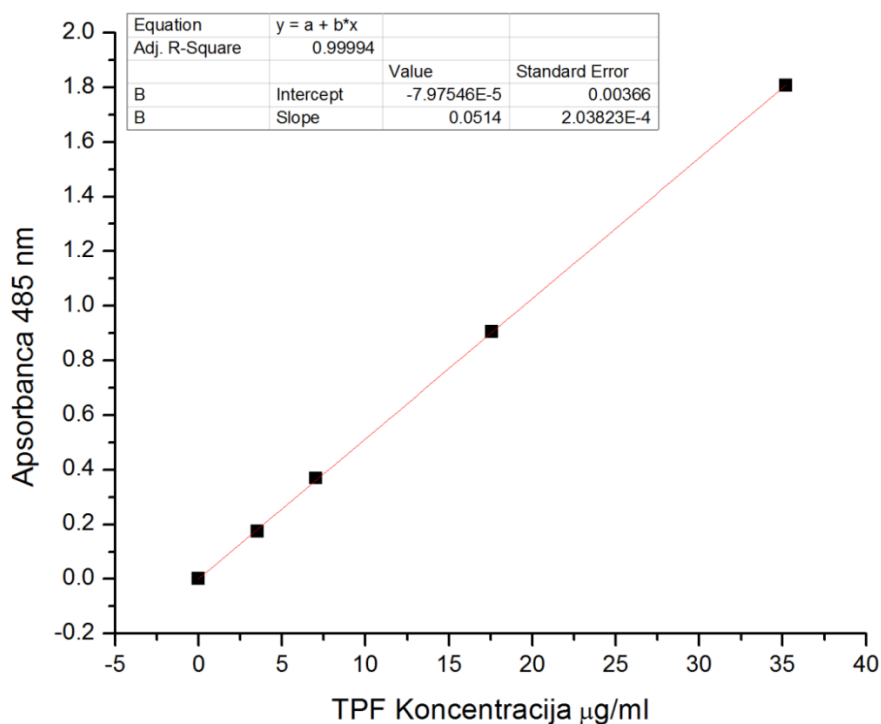
Procedura se izvodi u mraku sa uzorkom komposta od 5 g u koji se dodaje 5 mL 0,1 M Tris HCL pufera sa TTC-om. U uzorku, koji je kontrola, se dodaje 5 mL 0,1 M Tris HCL pufera. Epruvete koje su dobro zatvorene se inkubiraju 24 sata na 30 °C. Nakon inkubacije uzorcima se dodaje po 25 mL acetona. Uzorci se promešaju i ostave dva sata u mraku. Nakon prvog sata se još jednom promešaju. Posle toga se vrši filtriranje u polumraku i merenje apsorbance na 485 nm.

Metodu je predložio SAD savet za kompostiranje (1997), koja se zasniva na Glathe i Thalmann (1970) metodi. Kao standard se koristi 1,3,5-trifenilformazan (TPF).

Za izračunavanje standardne krive se koristi 0,1 g TPF koji se rastvori u 10 mL acetona. Odmeri se 0,5 mL tog rastvora i razblaži acetonom do 50 mL. U četiri epruvete se odmeri prethodno pripremljen rastvor redom 1 mL, 2 mL, 5 mL i 10 mL i dopuni acetonom do 30 mL, u petoj epruveti se odmeri samo 30 mL acetona koji služi kao slepa proba. Meri se apsorbancija na spektrofotometru na 485 nm. Dobijene vrednosti apsorbancije se ubacuju u dobijenu jednačinu standardne krive i izračunava se enzimska aktivnost dehidrogenaze.

Dobijena standardna kriva je prikazana na slici 5.2.





**Slika 5.2.** Standardna kriva koncentracije TPF-a (1,3,5- trifenilformazan)

Dehidrogenazna aktivnost se izračunava preko sledeće jednačine:

$$a = \frac{(\rho_{cs} - \rho_{bs}) \times V \times 100}{m \times DM \times t} \times \text{razblaženje} \quad (5.4)$$

$a$  - enzimaska aktivnost ( $\mu\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$ )

$\rho_{cs}$  - prosečna koncentracija TPF-a u uzorku ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

$\rho_{bs}$  - prosečna koncentracija TPF-a u slepoj probi ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

$V$  – zapremina rastvora (pufer + rastvarač = 2,5 mL pufera + 12,5 mL acetona = 15 mL)

$m$  – masa uzorka (2,5 g)

$DM$  – procenat suve materije u uzorku

$t$  – vreme inkubacije (24 h)

### 5.3.7. Određivanje sadržaja $\text{CO}_2$

Metoda za određivanje sadržaja  $\text{CO}_2$  se izvodi po postupku koji su dali Iannotti i sar. (1993). Ovom metodom prati se gubitak ugljenika tokom procesa kompostiranja nastao kao rezultat mikrobiološke aktivnosti.

2,5 g suvog uzorka komposta se inkubira tri dana na sobnoj temperaturi na 25 °C u mraku, u dobro zatvorenoj posudi sa epruvetom u kojoj je odmereno 1 M NaOH poznate zapremine od 2 mL. Posuda se zatvori parafilmom. Nakon inkubacije nastali CO<sub>2</sub> se određuje titracijom NaOH sa 1 M HCl.

### **5.3.8. Ispitivanje stabilnosti komposta metodom klijavosti**

Procena stabilnosti komposta pre njegove upotrebe je od suštinskog značaja. Fitotoksičnost i nezrelost komposta je vezana za prisustvo organskih kiselina, amonijaka i etilen-oksida u ranim fazama procesa kompostiranja (Hue i sar., 1995). Zrelost komposta karakteriše i indeks klijavosti semena u ekstraktu komposta – biološka metoda za procenu stepena zrelosti komposta (Iglesial-Jimenez i Perez-Garcia, 1992).

Test klijavosti semena je široko prihvaćen za ocenu fitotoksičnosti i stabilnosti komposta (Tiquia i sar., 1996; Zucconi i sar., 1981).

Ovom metodom se ispituje klijavost semena na vodenim ekstraktima komposta (1:10). Rezultati se upoređuju sa kontrolnim uzorkom semena čija se klijavost ispituje na destilovanoj vodi. Ovom metodom je planirano postavljanje na klijanje po 25 semena 4 različite lekovite biljke (*Thymus vulgaris*, *Lavandula officinalis*, *Cynara scolimus*, *Fagopirum esculentum*), sa trajanjem inkubacije od 72 sata, na 25 °C, u mračnim uslovima. Semena su postavljena na duplom filter papiru u staklenim petri šoljama. Filter papir je navlažen sa 5 mL ekstrakta (1:10) ili destilovane vode (kontrola). Rezultati su izraženi kao procenat klijavosti semena na ekstraktu komposta u odnosu na klijavost semena u destilovanoj vodi. GI je izračunat korišćenjem jednačine (5.1).

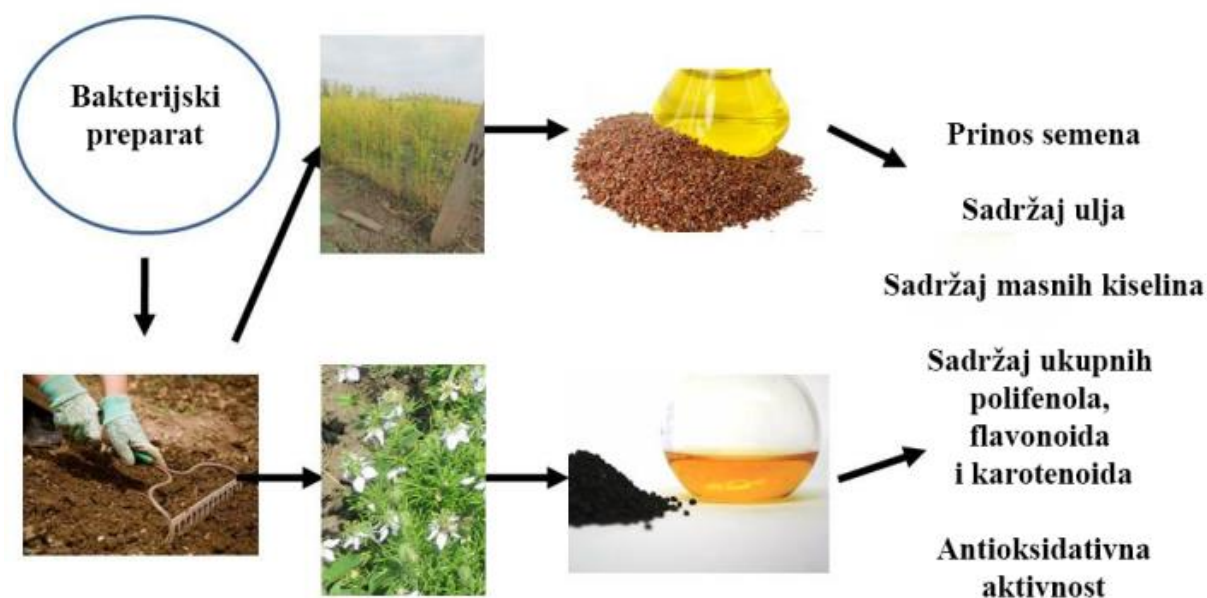
### **5.4. Agronomska metoda gajenja uljanih vrsta**

Ogled je postavljen u nasumičnom kompletnom projektu bloka sa četiri replikacije. Svaka parcela se sastojala od 4 reda, 50 cm odvojene i 5 m dužine (obrađena površina iznosila je 2,5 m<sup>2</sup> – dva srednja reda). Korišćene uljane vrste u ogledu su uljani lan (*L. usitatissimum*) i crni kim (*N. sativa*). Vrste su bile postavljene sredinom aprila i dostigle zrelost početkom avgusta. Pre i posle setve, zemljište se tretira samo jednom sa bakterijskim inokulumom u toku celog vegetacionog perioda (slika 5.3). Uzorci su obeleženi na sledeći način: (N1, *N. sativa* – kontrola; N2, *N. sativa* sa bakterijskim inokulumom koncentracije 1

mL L<sup>-1</sup>; N3, *N. sativa* sa bakterijskim inokulumom koncentracije 7 mL L<sup>-1</sup>; L1, *L. usitatissimum* – kontrola; L2, *L. usitatissimum* sa bakterijskim inokulumom koncentracije 1 mL L<sup>-1</sup>; L3, *L. usitatissimum* sa bakterijskim inokulumom koncentracije 7 mL L<sup>-1</sup>). Nisu korišćene hemikalije za zaštitu bilja, a korovi su kontrolisani ručno.

Biljni materijal je sakupljen i uzorkovan nakon završetka vegetacionog perioda sredinom avgusta tokom 2015. i 2016. godine.

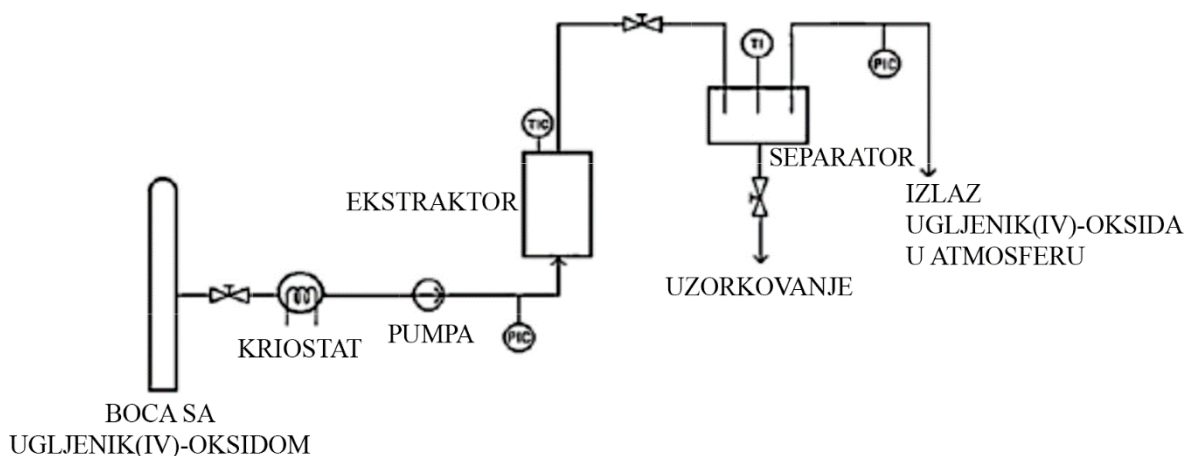
Berba semena crnog kima se obavlja u fazi tehnološke zrelosti semena u momentu kada čaure promene boju iz ljubičasto-zelene u zemljano-branon, u tom momentu otpadaju tzv. „brkovi“ i seme „zvecka“ u čaurama zbog njegovog odvajanja od placente. U našim agroekološkim uslovima u zavisnosti od vremenskih prilika, berba semena najčešće se obavlja u toku avgusta. Berba se obavlja u ranim jutarnjim časovima u cilju, što manjeg rastura semena. Na malim površinama berba je dvofazna. Zrele čaure se ručno odsecaju, naknadno dosušuju u platnenim vrećama, a izdvajanje semena je ručno ili žitnim vršalicama). Stabla se odsecaju na visini najnižih čaura. Ako se koristi semenski materijal iz komercijalne proizvodnje, seme se uzima iz krupnijih, zdravih čaura. Jednofaznu berbu treba obaviti kada je vlažnost semena ispod 11%. Niska vlažnost dovodi do problema prilikom ekstrakcije ulja, što može dovesti do smanjenja kvaliteta ulja.



**Slika 5.3.** Šematski prikaz primene i uticaja PGPB-a na prinos semena i sastav masnih ulja, uljanog lana i crnog kima

## 5.5. Natkrična ekstrakcija (NKE) masnih ulja iz semena crnog kima i uljanog lana sa CO<sub>2</sub>

Natkrična ekstrakcija (NKE) masnog ulja je izvršena u sistemu za NKE Autoclave Engineers SCE Screening System (SAD) (slika 5.4) na 300 bara i 40 °C. Za ekstrakciju je korišćeno oko 15 g mlevenog biljnog semena, dok je prosečna brzina protoka CO<sub>2</sub> bila 0,44 kg h<sup>-1</sup>. Prinos iz ekstrakcije izračunat je nakon potrošnje približno 127 g CO<sub>2</sub> pri čemu je biljni materijal iscrpljen.



**Slika 5.4.** Šema postrojenja za NKE iz semena uljanog lana i crnog kima na nižem pritisku

Aparatura prikazana na slici 5.4. pogodna je za rad na pritiscima do 45 MPa i temperaturama do 238 °C. Tečni CO<sub>2</sub> iz boce sa sifonom prvo prolazi kroz kriostat da bi se sprečilo njegovo isparavanje, a zatim ulazi u pumpu visokog pritiska za tečnosti (MiltonRoy, Francuska) izlaznog pritiska do 45 MPa sa mogućnošću podešavanja protoka u opsegu od 50–500 mL h<sup>-1</sup>. CO<sub>2</sub> se uvodi u ekstraktor i komprimuje do željenog pritiska na željenoj temperaturi. Ekstraktor radne zapremine 150 mL je prethodno ispunjen biljnim materijalom (biljnim semenima crnog kima i uljanog lana). Nakon postizanja željenih vrednosti pritiska i temperature, počinje kontinualno proticanje CO<sub>2</sub> kroz sistem. Rastvoreni ekstrakt se odvaja u separatoru (staklena epruveta). CO<sub>2</sub> se iz sistema ispušta u atmosferu, a njegova utrošena masa se meri pomoću vage na kojoj je smeštena boca.

## **5.6. Analiza masnih ulja dobijenih natkritičnom ekstrakcijom sa CO<sub>2</sub> primenom gasne hromatografije**

Primenom analitičke gasne hromatografije i gasne hromatografije / masene spektrometrije urađena je analiza metil estara masnih ulja uljanog lana i crnog kima.

### **5.6.1. Pripremanje metil estara**

Pažljivo se doda 2 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u 125 mL mešavine benzena i apsolutnog metanola MeOH u odnosu (1:3). Odmeri se 1.0 g masnog ulja (semena uljanog lana i crnog kima) u erlenmajer od 125 mL u kojem je prethodno odmereno 60 mL smeše benzena i apsolutnog metanola sa H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Postavi se na kondenzator i kondenzuje 2,5 h. Nakon toga u levku za odvajanje od 250 mL, doda se 100 mL H<sub>2</sub>O. Ekstrakcija se vrši sa 50 mL čistim petroletrom (30–60°) i ispere sa dodatkom 20 mL vode do oslobađanja kiselina. Suši se sa anhidrovanim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i rastvarač se uparava na vodenom kupatilu. Metil estri se čuvaju u zatvorenim posudama u frižideru. Kao antioksidans može da se doda 0,05% hidrohinon. Analizira se što je pre moguće.

### **5.6.2. Analitička gasna hromatografija (GC/FID)**

GC/FID analiza testiranih uzoraka metil estara masnih ulja (FAME) izolovanih iz semena uljanog lana i crnog kima obavljena je na gasnom hromatografu modela 7890A Agilent Technologies, koji je opremljen sa injektorom za split-splitless i automatskim uzorkivačem tečnosti (ALS), koji je priključen na kolonu HP-5MS (30 m • 0,25 mm, debljina filma od 0,25 µm) i ugrađen u plamensko-jonizacijski detektor (FID). Protok nosivog gasa (H<sub>2</sub>) iznosio je 1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura injektora bila je 250 °C, temperatura detektora 300 °C, dok je temperatura kolone bila linearno programirana od 40-260 °C (brzinom od 4° min<sup>-1</sup>), i držala se izotermalno na 260 °C narednih 15 minuta. Rastvori ispitanih uzoraka u n-heksanu (15 µL mL<sup>-1</sup>) su zapravo injektirani ALS-om (2 µL, u odnosu 1:30). Izveštaji o površinskom procentu, dobijeni kao rezultat standardne obrade hromatograma, su korišćeni kao osnova u cilju kvantifikacije.

### **5.6.3. Gasna hromatografija / masena spektrometrija (GC/MS)**

Isti hromatografski uslovi kao oni koji su navedeni za GC/FID su korišćeni za analizu GC / MS, koristeći sistem HP G 1800C serije II GCD (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA (USA)). Umesto vodonika, helijum se koristi kao nosivi gas. Transferna linija je zagrevana na 260 °C. Maseni spektri su nabavljeni u El režimu (70 eV), u opsegu od 40-450 Da. Uzorci su ubrizgani ALS (2 µL, u odnosu 1:30).

Sadržaji su identifikovani upoređivanjem njihovih masenih spektara sa onima iz Wiley275 i NIST / NBS biblioteka, koristeći različite pretraživače (PBM i NIST). Pored toga, eksperimentalne vrednosti za indekse zadržavanja određene su korišćenjem kalibriranog Automatizovanog Sistema za Masenu Spektralnu Dekonvoluciju i Identifikaciju softver sistema (AMDIS verzija 2.64.), u poređenju sa onima iz dostupne literature, (Adams, 2007) i korišćen kao dodatni alat za odobravanje nalaza MS.

## **5.7. Određivanje antioksidanasa u uljima**

Antioksidansi u uljima se određuju pomoću sadržaja polifenola, flavonoida i karotenoida. Za određivanje antioksidativne aktivnosti korišćena je FRAP metoda.

### **5.7.1. Ekstrakcija ulja za određivanje antioksidanasa**

Ekstrakti ulja za određivanje antioksidansa su pripremljeni korišćenjem metode J. Bernatoniena i sar. (2011) sa malim modifikacijama. 0,5 g ulja je ekstrahovano 3 puta sa po 2 mL 96% etanola. Dobijeni ekstrakti su sakupljeni, pomešani i dopunjeni rastvaračem do 10 mL. Dobijeni ekstrakt ulja je korišćen kao uzorak za određivanje polifenola, flavona, flavonola i karotenoida, kao i merenje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom (Milutinović i sar., 2013).

### **5.7.2. Određivanje ukupnih polifenola**

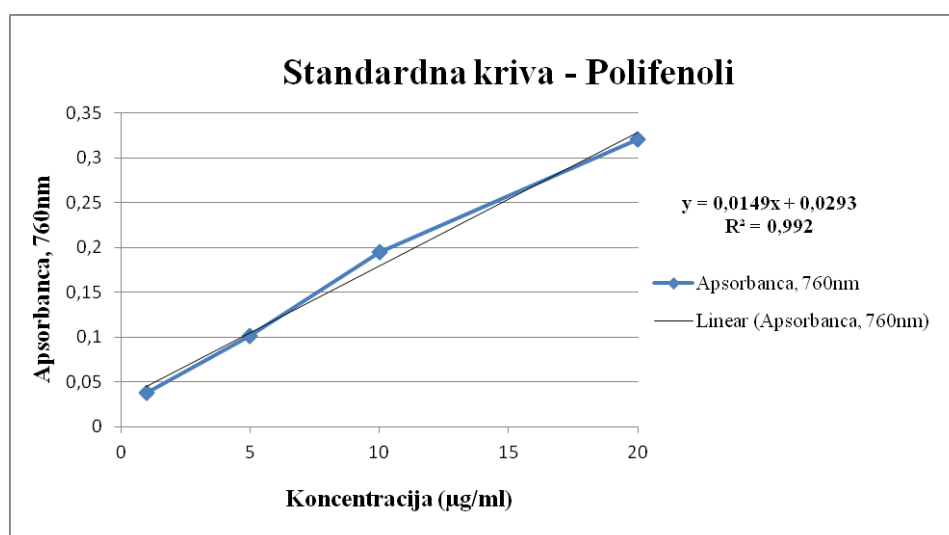
Ukupni polifenoli su određivani spektrofotometrijskom metodom na 760 nm (Bernatoniene i sar., 2011).

Postupak:

1 mL uzorka (ekstrakta) je oksidovan korišćenjem Folin Ciocalteu reagensa (200  $\mu\text{L}$ ), pa je dopunjen rastvorom natrijum–karbonata ( $75 \text{ gL}^{-1}$ ) do zapremine 10 mL. Nakon 2 h, suspenzija je centrifugirana 10 minuta na 5000 o/min, a absorbanca merena na talasnoj dužini 760 nm. Rezultati su dobijeni korišćenjem kalibracione krive galne kiseline i izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (GAE) u  $\mu\text{g}$  na 1 mL uzorka (ekstrakta).

Priprema standardne krive:

Za pripremu standardne krive (slika 5.5) korišćeno je po 1 mL vodenog rastvora galne kiseline različitih koncentracija (1, 5, 10, i 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) i oksidovano pomoću Folin Ciocalteu reagensa (200  $\mu\text{L}$ ), a zatim dopunjeno rastvorom natrijum-karbonata ( $75 \text{ g L}^{-1}$ ) do zapremine 10 mL. Nakon 2 h, suspenzija je centrifugirana 10 minuta na 5000 o/min, a absorbanca merena na talasnoj dužini 760 nm.



Slika 5.5. Standardna kriva za određivanje ukupnih polifenola

### 5.7.3. Određivanje flavona i flavonola

Sadržaj flavona i flavonola je određivan spektrofotometrijskom metodom na 425 nm (Bernatoniene i sar., 2011).

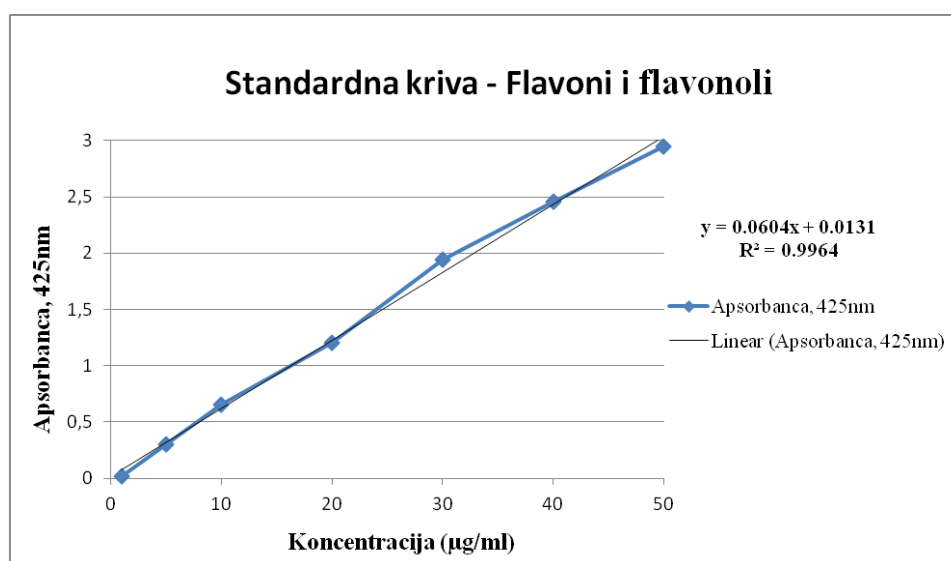
Postupak:

U 4,9 mL ekstrakta je dodato 100  $\mu\text{L}$  10% rastvora aluminijum–hlorida. Nakon 30 minuta, absorbanca je merena na talasnoj dužini 425 nm. Rezultati su dobijeni korišćenjem

kalibracione krive za kvercetin i izraženi kao ekvivalenti kvercetina (QE) u  $\mu\text{g}$  na 1mL uzorka (ekstrakta).

Priprema standardne krive:

Za pripremu standardne krive (slika 5.6) uzimano je po 4,9 mL alkoholnog rastvora kvercetina različitih koncentracija (1, 5, 10, 20 i 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) i dodato je 100  $\mu\text{L}$  10% rastvora aluminijum–hlorida. Nakon 30 minuta merena je absorbanca na talasnoj dužini 425 nm.



Slika 5.6. Standardna kriva za određivanje flavona i flavonola

#### 5.7.4. Određivanje karotenoida

Sadržaj karotenoida je određivan spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 440 nm, poređenjem dobijene ekstinkcije sa ekstinkcijom standardnog rastvora kalijum–dihromata (Bernatoniene i sar., 2011). Kalijum–dihromat standardni rastvor je pripremljen rastvaranjem 0.09 g kalijum–dihromata u 250 mL destilovane vode.

Postupak:

Apsorbanca etanolnih ekstrakata i standardnog rastvora kalijum–dihromata je merena na talasnoj dužini 440 nm, a kao slepa proba korišćen je 96% etanol.

Ekstinkcija 1 mL standardnog rastvora kalijum–dihromata odgovara ekstinkciji 0.00208 mg  $\beta$ -karotena. Ukupan sadržaj karotenoida je izražen kao sadržaj  $\beta$ -karotena ( $\mu\text{g g}^{-1}$  ulja), i izračunat po sledećoj formuli:



$$X = \frac{0.00208 \times A \times 25 \times 100}{A_1 \times a} \quad (5.5)$$

pri čemu su A i A<sub>1</sub> absorbanca uzorka i standardnog rastvora, redom, a *a* je masa uzorka u gramima.

### 5.7.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost pripremljenih ekstrakata je merena korišćenjem FRAP metode.

### 5.7.6. FRAP metoda

FRAP metoda se zasniva na redukciji gvožđe (III) – tripiridil triazin kompleksa [Fe (III) – TPTZ] do gvožđe (II) – tripiridil triazina [Fe (II) – TPTZ] pri kiselom pH. [Fe (II) – TPTZ] kompleks je intenzivno plavo obojen sa maksimumom absorbance na 593 nm (Milutinović i sar., 2013).

#### Potrebne hemikalije:

- 10 mmol L<sup>-1</sup> rastvor 2,4,6-tripiridil-s-triazina TPTZ rastvor: 0.031g TPTZ doda se u 10 mL 40 mmol L<sup>-1</sup> HCl
- 40 mmol L<sup>-1</sup> HCl (3.31 mL koncentrovane HCl se dopuni do 1 L)
- Acetatni pufer, pH 3,6 (6,4 mL 2 M rastvora natrijum-acetata i 93,6 mL 2 M rastvora sirćetne kiseline se dopuni u normalnom sudu do 1 L)
- 20 mmol L<sup>-1</sup> rastvora FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O: 0,054 g FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O doda se u 10 mL destilovane vode

FRAP radni rastvor je pripremljen neposredno pred upotrebu mešanjem:

- 25 mL acetatnog pufera, 300 mmol L<sup>-1</sup>, pH 3.6
- 2,5 mL TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina)
- 2,5 mL 20 mmol L<sup>-1</sup>, rastvora FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O

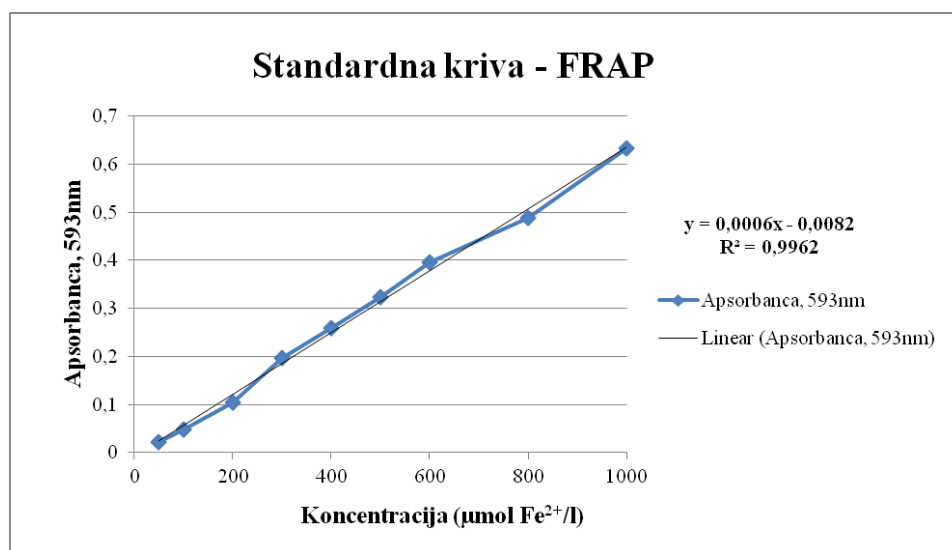
#### Postupak:

150 µL ekstrakta je dodato u 4,5 mL FRAP radnog rastvora i sadržaj je snažno promućkan. Posle 5 minuta merena je absorbanca rastvora na 593 nm, korišćenjem FRAP

radnog rastvora kao slepe probe. Rezultati su izraženi u  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ mL}^{-1}$  uzorka (ekstrakta) i izračunati su iz standardne krive.

Priprema standardne krive:

Za pripremu standardne krive uzimano je po 150  $\mu\text{L}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  različitih koncentracija (50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) i dodato u 4.5 mL radnog FRAP rastvora, a nakon 5 minuta merena je absorbanca na 593 nm. Iz očitanih vrednosti ekstinkcije i poznatih koncentracija konstruisana je kriva (slika 5.7).



Slika 5.7. Standardna kriva za FRAP metodu

### 5.7.7. Statistička analiza

Za statističku obradu rezultata korišćen je program Origin Pro 8 (OriginLab, Northampton, MA). Svi rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija tri nezavisna merenja. Podaci su analizirani korišćenjem analize varijanse (ANOVA), a Tukey-ov test se primenjuje za poređenje srednjih vrednosti sa nivoom od 0,01. Za sveobuhvatnu multivarijantnu statističku analizu korišćen je softver Canoco for Windows 4.5 (Lepš i Šmilauer, 2003).

## 6. REZULTATI I DISKUSIJA

Kao što je već napomenuto, eksperimentalni deo ovog rada se sastoji od tri dela:

1. Prvi deo se odnosi na ispitivanje određenih karakteristika novih sojeva bakterija, izolovanih iz prirodnih staništa sa ciljem da se utvrdi njihova pogodnost za primenu u procesu kompostiranja i u procesu gajenja uljanih biljnih kultura – crnog kima i uljanog lana. Ova ispitivanja obuhvataju kvalitativno utvrđivanje proizvodnje celulolitičkih enzima i sposobnost rasta na korišćenom biljnom otpadu, kao karakteristika koje mogu uticati na proces kompostiranja navedenog biljnog otpada. Za utvrđivanje pogodnosti primene u stimulaciji rasta biljnih kultura, neophodno je bilo utvrditi šira biohemijska svojstva odabranih sojeva, kako bi se sagledao potencijal fiksacije azota i solubilizacije fosfora, pre svega, ali i proizvodnja šireg spektra enzima koji mogu doprineti ovoj stimulaciji i eventualno, zaštiti od fitopatogena. Krajnja potvrda potencijala odabranih sojeva za fitostimulaciju je dobijena ispitivanjem njihovog uticaja na klijavost semena lana i crnog kima, pojedinačno i u kombinacijama.

2. Drugi deo eksperimentalnog rada se odnosi na praćenje procesa kompostiranja biljnog otpada primenom smeše odabranih sojeva kao inokulanata u pilot uslovima (polazna masa biljnog otpada je 10 kg). Važnost ovih ispitivanja se ogleda u tome što se, na osnovu praćenih parametara može utvrdi da li primenjeni sojevi doprinose skraćanju vremena kompostiranja (što ima ekonomski značaj) i poboljšanju kvaliteta dobijenog komposta, što je pokazano kroz povećanje fitostimulatornog dejstva dobijenog komposta.

3. Treći deo istraživanja se odnosi na uticaj odabranih sojeva bakterija na agronomске karakteristike u gajenju biljnih kultura crnog kima i lana kao i na njihova nutritivna svojstva. Pozitivan efekat korišćenih bakterija se pokazao kroz povećanje prinosa biljaka i posebno kroz povećanje sadržaja nezasićenih masnih kiselina kao i kroz povećanja biološki aktivnih komponenti (polifenola, flavonoida, karotenoida) u ulju dobijenom iz njihovog semena postupkom natkritične ekstrakcije.

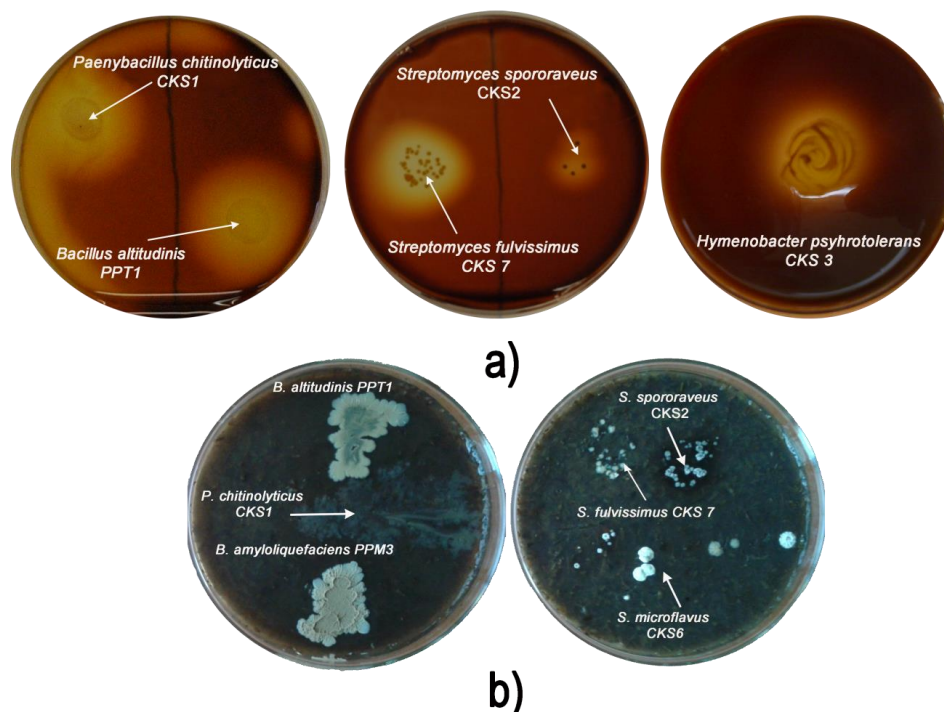
### **6.1. Kvalitativno ispitivanje celulolitičke aktivnosti i sposobnost rasta na biljnom otpadu bakterija korišćenih za kompostiranje**

Celulolitički enzimi igraju važnu ulogu u procesima prirodne degradacije u kojima se lignocelulozne biljke efikasno konvertuju u proizvode koji se mogu koristiti za rast bakterija.

Dodavanje celulolitičkih bakterija bi moglo povećati brzinu razgradnje biljnog materijala i proces kompostiranja. Međutim, očekuje se da nisu sve bakterije aktivne kod razgradnje biljnog materijala, jer mnoge biljne vrste sadrže tanine koji mogu da deluju antimikrobno na različite mikroorganizme (Siqueira i sar., 2012).

Zbog toga je veoma važno da se ispituju antimikrobna svojstva mešanog otpada lekovitog bilja na rast i aktivnost odabranih celulitičkih bakterija.

U cilju povećanja brzine procesa kompostiranja poželjno je da izabrani sojevi poseduju celulolitičku aktivnost. Kvalitativno ispitivanje na agarnim podlogama je uključivalo pet novih prirodnih izolata iz šumskog zemljišta (*Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, *Hymenobacter* sp. CKS3, *Streptomyces spororaveus* CKS2, *Streptomyces microflavus* CKS6, *Streptomyces fulvissimus* CKS7) i dva nova izolata iz morskih sedimenata: (*Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* PPM3i *Bacillus altitudinis* PPT1). Svi testirani sojevi su mezofilni sa optimalnom temperaturom rasta oko 28–30 °C (sa izuzetkom *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* PPM3 sa optimalnom temperaturom rasta 45 °C), i imaju antibakterijska i antifungalna svojstva. Preliminarni rezultati su pokazali da svi ispitivani sojevi pokazuju određeni stepen celulolitičke aktivnosti (slika 6.1a).



**Slika 6.1.** a) Celulolitička aktivnost odabranih sojeva na CMC agarnim pločama;  
b) sposobnost rasta odabranih sojeva na agarnim pločama koje sadrže ISP1 agar sa 10% mešanim otpadom lekovitog bilja

Dobijeni rezultati su pokazali da su sve izabrane bakterije mogle da rastu na agarnim pločama sa 1%, 5% i 10% mešanim biljnim otpadom. Sposobnost rasta na agarnim pločama sa 10% mešanim biljnim otpadom je prikazan na slici 6.1b.

Otpad od lekovitog bilja je pokazao posebno efekat stimulacije rasta za *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, *Bacillus amyloliquefaciens ssp. plantarum* PPM3 i *Bacillus altitudinis* PPT1.

Pošto izabrani celulolitički sojevi, koji su u stanju da rastu na otpadu lekovitog bilja, nisu pokazali međusobni antagonizam pri kompostiranju, formirana je mešavina jednakih količina ovih sedam bakterijskih sojeva.

## **6.2. Izbor sojeva za ispitivanja fitostimulatornog efekta putem određivanja indeksa klijavosti semena (GI) crnog kima i uljanog lana**

U cilju odabira sojeva za eksperimente u polju i ispitivanje fitostimulatornog delovanja bakterija na uljane kulture, prvo je ispitan uticaj primene različitih koncentracija bakterijskih sojeva (PPT1 – *Bacillus altitudinis*, CKS1 – *Paenibacillus chitinolyticus*, CKS3 – *Hymenobacter* sp., CKS7 – *Streptomyces fulvissimus*, PPM3 – *Bacillus amiloliquefaciens ssp. plantarum*) na indeks klijavosti (GI) semena crnog kima i uljanog lana. Opseg koncentracija se kretao od 0,5 mL L<sup>-1</sup> do 3 mL L<sup>-1</sup> inokuluma pojedinačnih bakterija (tabela 6.1 i 6.2). Prema Rashad i sar. (2010), efekat biofertilizacije je evidentan kod onih bakterijskih sojeva koji daju GI vrednosti iznad 100%. Na osnovu rezultata prikazanih u tabelama 6.1 i 6.2., može se uočiti da sojevi CKS1, CKS3 i CKS7, u svim koncentracijama daju vrednosti GI preko 100% za lan, dok je kod crnog kima, takav efekat pokazao samo soj CKS7. Soj PPM3 je pokazao blagi efekat inhibicije klijavosti u svim koncentracijama kod crnog kima a sa povećanjem koncentracije i kod lana. Soj PPT1 je dao dobre rezultate klijavosti u nižim koncentracijama ali je znatno inhibirao klijavost i lana i kima pri koncentraciji inokuluma od 3 mL L<sup>-1</sup>.

**Tabela 6.1.** Promena indeksa klijavosti (GI, %) za seme *N. sativa* pri različitim koncentracijama bakterijskih sojeva

Konc. (mL L <sup>-1</sup> )	Bakterijski soj	PPT1	CKS1	PPM3	CKS3	CKS7
	0.5		108,6	111,4	62,6	112,2
1		102,7	104,2	83,8	105,3	105,5
1.2		100,3	92,7	51,7	94,3	110,3
3		91,7	86,6	62,8	72,8	113,1

PPT1 – *Bacillus altitudinis*, CKS1 – *Paenybacillus chitinolyticus*, CKS3 – *Hymenobacter* sp., CKS7 – *Streptomyces fulvissimus*, PPM3 – *Bacillus amiloliquefaciens ssp. plantarum*.

**Tabela 6.2.** Promena indeksa klijavosti (GI, %) za seme *L.usitatissimum* pri različitim koncentracijama bakterijskih sojeva

Konc. (mL L <sup>-1</sup> )	Bakterijski soj	PPT-1	CKS-1	PPM-3	CKS-3	CKS-7
	0.5		104,7	124,1	102,6	108,3
1		101,7	101,4	89,2	102,4	106,8
1.2		104,1	104,6	76,7	102,5	108,0
3		65,4	109,8	61,6	103,7	109,3

PPT1 – *Bacillus altitudinis*, CKS1 – *Paenibacillus chitinolyticus*, CKS3 – *Hymenobacter* sp., CKS7 – *Streptomyces fulvissimus*, PPM3 – *Bacillus amiloliquefaciens ssp. plantarum*.

Imajući u vidu prikazane rezultate uticaja bakterijskih sojeva na indeks klijavosti crnog kima i uljanog lana, za dalja istraživanja su odabrana tri soja: CKS1 – *Paenibacillus chitinolyticus*, CKS3 – *Hymenobacter* sp. i CKS7 – *Streptomyces fulvissimus*.

### 6.3. Biohemijske i enzimske karakteristike odabranih sojeva za gajenje crnog kima i uljanog lana

Biohemijske i enzimske karakteristike odabranih sojeva su prikazane u tabeli 6.3.

**Tabela 6.3.** Biohemijske karakteristike PGPB.

Biohemijske karakteristike	<i>Paenibacillus</i> sp	<i>Hymenobacter</i> sp	<i>Streptomyces</i> sp.
	CKS 1	CKS 3	CKS 7
Ca-P rastvaranje	+	+	++
Nfb reakcija	+	+	-
Alkalne fosfataze	-	+	+
Kisele fosfataze	+	+	+
Napthol-AS-BI fosfohidrolaze	+	+	+
Esteraze	+	+	-
Esteraze lipaze	-	+	+
Lipaze	-	-	+
Leucin arilamidaze	-	+	+
Valine arilamidaze	-	+	+
Cistin arilamidaze	+	+	+
Tripsin	+	-	+
$\alpha$ -himotripsin	+	-	+
$\alpha$ -galaktozidaze	+	-	-
$\beta$ - galaktozidaze	-	-	+
$\beta$ -glukuronidaze	+	-	-
$\alpha$ -glukozidaze	-	-	+
$\beta$ - glukozidaze	+	-	+
N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaze	+	+	+
$\alpha$ -manozidaze	+	-	-
$\alpha$ -fukozidaze	-	-	+

Svi odabrani sojevi su bili u mogućnosti da rastvaraju trikalcijum fosfat koji pokazuje jasne halo zone oko njihovih bakterijskih kolonija. Takođe dva soja, CKS1 i CKS3, su dala pozitivne reakcije na Nfb medijumu, što ukazuje na njihove potencijalne sposobnosti fiksacije azota. API ZIM profil pokazuje veliki enzimski potencijal sva tri soja, posebno *Streptomyces fulvissimus* CKS7 koji je sposoban da reaguje sa 15 enzimskih supstrata od 19. S obzirom na značajan uticaj PGPB na opisane karakteristike crnog kima i uljanog lana moglo se pretpostaviti da mehanizmi delovanja mogu biti posledica enzimskih aktivnosti sojeva kao i sposobnosti rastvaranja fosfora (Burns i sar., 2013; Caldwell, 2005). U drugim istraživanjima je poznato da soj *S. fulvissimus* Act1433 kao i neki *Paenibacillus* sp. (Grady i sar., 2016) pokazuju stimulaciju rasta biljaka putem biološke fiksacije azota, fosfatne solubilizacije, proizvodnje fitohormona indol-3-sirćetne kiseline (IAA) i oslobađanjem siderofora koji omogućavaju apsorpciju gvožđa. Interesantno je da svi odabrani sojevi u ovom radu pokazuju aktivnost (N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaza), koji se smatra jednim od moćnih agenasa za poboljšanje rasta biljaka, kroz održavanje kontrole nad insektima,

fitopatogenima uključujući bakterije, gljivice, nematode i viruse (Grady i sar., 2016; Parham i Deng, 2000).

#### 6.4. Kompatibilnost bakterijskih sojeva

Određivanjem indeksa klijavosti GI semena crnog kima i uljanog lana sa ispitanim sojevima CKS1, CKS3 i CKS7 pri najoptimalnijoj koncentraciji od 1 mL L<sup>-1</sup> potvrđena je visoka kompatibilnost između sojeva. Indeks klijavosti semena GI sa tri kombinacije soja kod crnog kima je 120,2% a kod uljanog lana 161,9% (tabela 6.4) i znatno je veći u poređenju sa individualnom primenom soja, pa čak i sa dve kombinacije soja kod obe biljke. Pošto su sva tri soja pokazala međusobno visoku kompatibilnost, formirana je mešavina jednakih količina sojeva za kultivaciju uljanog lana i crnog kima.

**Tabela 6.4.** Promena indeksa klijavosti (GI, %) za semena *N. sativa* i *L.usitatissimum*.

Biljka	Bakterijski soj											
	CKS1	CKS3	CKS7	CKS7	CKS1+	CKS3	CKS1+	CKS3	CKS7+	CKS7	CKS3+	CKS1+
<i>L. usitatissimum</i>	101,4±1.0 <sup>a</sup>	102,4±1.2 <sup>a</sup>	106,8±0.8 <sup>b</sup>	105,5±1.4 <sup>ab</sup>	101,5±1.1 <sup>a</sup>	133,2±1.7 <sup>c</sup>	161,9±1.1 <sup>d</sup>					
<i>N. sativa</i>	104,2±1.1 <sup>a</sup>	105,3±1.1 <sup>a</sup>	105,5±1.2 <sup>a</sup>	108,7±0.9 <sup>b</sup>	107,4±1.3 <sup>b</sup>	115,1±1.0 <sup>c</sup>	120,2±1.6 <sup>d</sup>					

CKS1–*Paenybacillus chitinolyticus*, CKS3 – *Hymenobacter* sp., CKS7 – *Streptomyces fulvissimus*: (statistički značajna razlika u zadanom redosledu pojedinih biljaka obeležena je različitim slovom (p<0.01))

#### 6.5. Monitoring procesa kompostiranja

Praćenje procesa kompostiranja je obuhvatalo određivanja sledećih parametara: temperature i sadržaja vlage u kompostu, pH komposta, sadržaj ugljenih hidrata rastvorljivih u vodi, sadržaj organske materije (OM) u kompostu, ukupni sadržaj ugljenika i azota, C / N odnos, sadržaj kalijuma i fosfora u kompostu, dehidrogenazne aktivnost (DH-ase) i sadržaj oslobođenog CO<sub>2</sub> u kompostu i fitotoksičnost kompostnog materijala.



### 6.5.1. Fizičko-hemijske karakteristike mešanog biljnog otpada pre procesa kompostiranja

Pre postavljanja eksperimenta kompostiranja, ispitani su određeni hemijski parametri otpadnog bilja prikazani u tabeli 6.5.

**Tabela 6.5.** Agrohemijska analiza mešanog biljnog otpada nastalog tokom proizvodnje i prerade lekovitog bilja u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u 2012. godini i sadržaj pojedinačnog biljnog otpada

Klase biljnog otpada		Sadržaj biljnog otpada (%)				
SH		74,06				
E		17,05				
SG ( <i>Valeriane radix, Primulae radix, Gentianae radix</i> )		5,00				
SE ( <i>Equiseti herba</i> )		3,90				
Srednje vrednosti fizičko-hemijskih parametara mešanog biljnog otpada						
Pepeo (%)	pH	Ukupni P (%)	Ukupni K (%)	Ukupni N (%)	Ukupni C (%)	C / N
26,80±21,95	5,97±0,42	0,26±0,06	1,42±0,51	1,37±0,23	36,60±10,97	26,38±5,27

SH - ostale biljne droge, E - otpad iz ekstrakcije, SG – otpad nastao nakon prerade gorkih droga, SE – otpad nastao nakon prerade rastavića

U tabeli 6.5 su prikazani agrohemijski parametri uzorka mešanog biljnog otpada koji je nastao mešanjem četiri velike grupe: E – otpad nastao nakon ekstrakcije, SG – otpad koji čine gorke biljne droge (valerijana, jagorčevina i lincura), SE – otpad nakon prerade rastavića i SH – ostale biljne droge.

Prema podacima iz tabele 6.5, uzorak mešanog biljnog otpada po svojim agrohemijskim osobinama predstavlja pogodnu sirovinu za proizvodnju visokokvalitetnog komposta.

### 6.5.2. Promene fizičko-hemijskih karakteristika biljnog materijala tokom procesa kompostiranja

Proces kompostiranja je praćen fizičko-hemijskim i biološkim parametrima kao što su: temperatura i sadržaj vlage u kompostu, pH komposta, sadržaj ugljenih hidrata rastvorljivih u vodi, sadržaj organske materije (OM) u kompostu, ukupni sadržaj ugljenika i azota, C / N odnos, sadržaj kalijuma i fosfora u kompostu, dehidrogenazna aktivnost (DH-ase) i sadržaj oslobođenog CO<sub>2</sub> u kompostu i fitotoksičnost kompostnog materijala. Promene hemijskih parametara su dati u tabeli 6.6.

**Tabela 6.6** Promene u glavnim hemijskim parametrima tokom perioda kompostiranja u kompostnoj mešavini sa bakterijskim inokulumom (IC) i bez bakterijskog inokuluma (CC): pH vodenog ekstrakta (1:10); OM – sadržaj organske materije; RŠV – rastvorljivi šećeri u vodenom ekstraktu komposta (1:10); TC – ukupni sadržaj ugljenika; TKN – ukupni sadržaj azota (Kieladal), C / N odnos

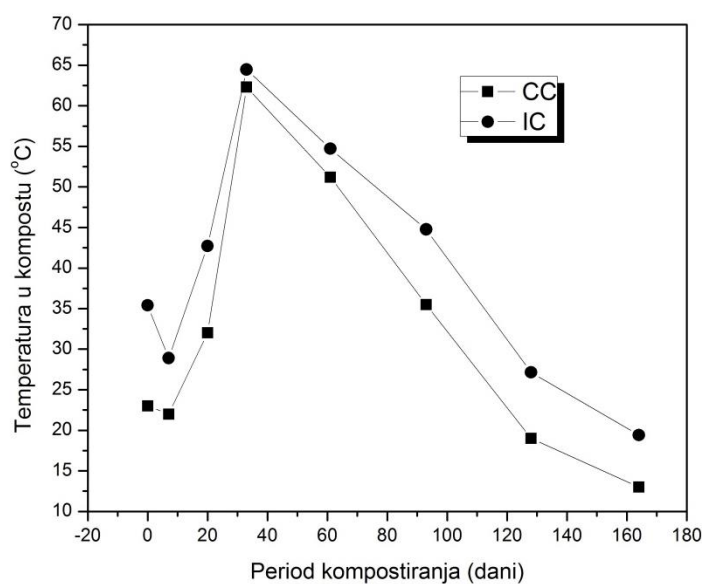
Vreme kompostiranja (dani)		0	7	20	33	61	93	128	164
pH	IC	6,18±0,12	5,56±0,12	7,49±0,15	7,39±0,22	8,14±0,25	7,89±0,18	7,66±0,25	7,77±0,13
	CC	6,54±0,12	6,71±0,24	7,43±0,13	7,47±0,18	8,09±0,17	7,89±0,18	7,75±0,21	7,76±0,12
OM (%)	IC	87,02±1,12	75,21±1,28	70,95±1,26	69,04±1,93	67,83±2,01	65,37±2,02	62,03±1,17	60,01±1,08
	CC	87,32±1,01	75,13±1,13	74,07±2,02	70,22±1,81	66,49±1,75	64,94±2,02	63,34±1,45	61,87±1,18
RŠV(%)	IC	1,53±0,05	2,20±0,040	0,54±0,02	0,28±0,030	0,25±0,02	0,19±0,03	0,11±0,01	0,07±0,01
	CC	1,53±0,05	1,90±0,020	0,56±0,05	0,32±0,020	0,22±0,03	0,13±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01
TC (%)	IC	50,47±0,80	43,62±0,40	41,15±0,50	40,04±0,20	39,34±0,40	37,91±0,70	35,97±0,20	34,80±0,30
	CC	50,64±0,80	43,57±0,60	42,96±0,90	40,72±1,02	38,56±0,70	37,66±0,40	36,73±0,50	35,88±0,50
TKN (%)	IC	1,36±0,16	1,83±0,15	2,18±0,12	1,95±0,13	2,04±0,14	2,32±0,11	2,37±0,13	2,42±0,11
	CC	1,36±0,12	1,46±0,14	2,07±0,11	2,29±0,12	2,24±0,11	2,39±0,13	2,09±0,12	2,23±0,11
C / N	IC	37,11±1,12	23,83±1,020	18,87±1,36	20,53±1,12	19,28±1,44	16,34±1,21	15,18±1,23	14,38±1,03
	CC	37,24±1,14	29,84±1,24	20,75±1,52	17,78±1,64	17,21±1,23	15,75±1,03	17,57±1,32	16,09±1,22

### 6.5.2.1. Praćenje temperature i sadržaja vlage u kompostu

Temperatura je jedan od najvažnijih parametara za procenu stabilnosti komposta i takođe je pod uticajem mikrobne aktivnosti tokom kompostiranja (Tiquia i Tam, 2002). Temperatura kompostne gomile zavisi od različitih faktora kao što su: vrsta materijala koji se kompostira, sadržaja vlage materijala, postupka kompostiranja, spoljašnje temperature (Tiquia i Tam, 2002). U ovoj studiji, temperatura kompostnog materijala na početku kompostiranja bila je od 23 °C do 35 °C. U toku kompostiranja (33. dana) temperatura dostiže maksimalnu vrednost od 62,3 °C u uzorku IC i na kraju procesa dostiže vrednost od 13 °C do 20 °C (slika 6.2). Na osnovu merenja unutrašnje temperature komposta, može se reći da su procesi u uzorku koji je obeležen sa IC i u kontroli koja je obeležena sa CC na početku i na kraju procesa više mezofilni, a u toku procesa termofilni.

Rezultati praćenja promene temperature u ovim ispitivanjima, tokom procesa kompostiranja su prikazani na slici 6.2.

Sadržaj vlage u uzorcima na početku procesa varira od 55% do 70% i na kraju procesa pada ispod 50%.

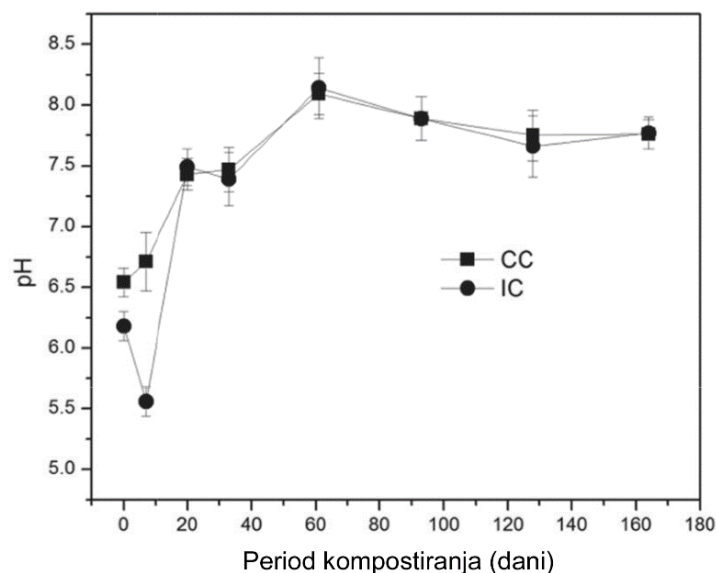


**Slika 6.2** Promena temperature u kompostnoj mešavini

● IC uzorak sa 2% inokuluma, ■ CC kontrola bez inokuluma.

### 6.5.2.2. pH komposta

Promena pH vrednosti u kompostu, tokom perioda praćenja, je prikazana na slici 6.3.



**Slika 6.3.** Promena pH vodenog ekstrakta (1:10) tokom perioda kompostiranja:

● IC uzorak sa 2% inokuluma, ■ CC kontrola bez inokuluma.

Početna pH vrednost uzoraka je 6,19–6,54. Tokom prve nedelje kompostiranja pH vrednost je pala na 5,56 za IC, ali ne i za kontrolu CC. Posle prve nedelje pH vrednost se povećava kod oba komposta (slika 6.3). Inicijalni pad pH je vezan sa nastajanjem organskih kiselina u početnoj fazi procesa kompostiranja (Khan i sar., 2009). Posle 61. dana, pH je bio blizu 8,0 za obe vrste komposta. Ovo povećanje pH je verovatno posledica oslobađanja amonijaka i drugih alkalnih jedinjenja koji su oslobođeni tokom mineralizacije proteina, aminokiselina i peptida. pH vrednosti su bile između 7,5 i 8,0 od 93. dana do završetka procesa.

Slične rezultate promene pH vrednosti kompostne mase su dobili Khan i saradnici (2009) tokom kompostiranja otpada zelenog čaja i pirinčanih mekinja.

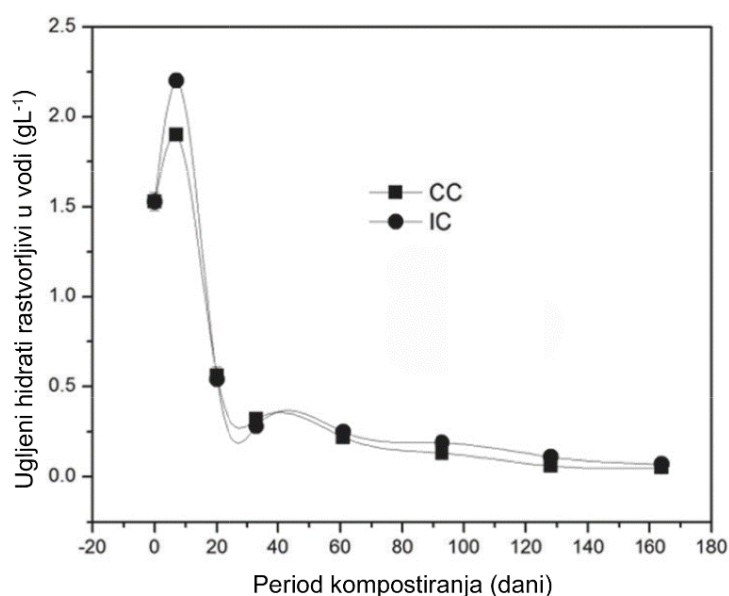
### 6.5.2.3. Sadržaj ugljenih hidrata rastvorljivih u vodi

Kvantifikacija rastvorljivih šećera u vodi u periodu kompostiranja pokazala je da postoji značajno povećanje tokom prvih sedam dana kompostiranja (slika 6.4).

Primećen je pad do 61. dana posle čega je koncentracija šećera relativno konstantna u obe vrste komposta. Značajna razlika u sadržaju šećera između uzorka IC i kontrole CC je

primećena samo na drugom uzimanju uzorka (7. dana). Veći sadržaj u vodi rastvorljivih šećera u prvim danima kompostiranja u uzorku komposta IC je pokazatelj pojačane aktivnosti bakterijskog startera u odnosu na prirodnu mikrofloru u kontroli CC. U prethodnim istraživanjima utvrđeno je da *P. chitinolicus* CKS1 proizvodi egzoglukanazu (Mihajlovski i sar., 2015). Pored toga streptomicete CKS6 i CKS7 poseduju jaku aktivnost beta-glukozidaze u skladu sa API-ZIM testom. Ovakav efekat mikrobiološkog startera je očekivan s obzirom da svi izabrani sojevi proizvode enzim iz grupe celulaza i doprinose razgradnji biljnog otpada i povećanju rastvorljivih šećera u vodi.

Na kraju procesa sadržaj rastvorljivih šećera je bio 0,05% i 0,07% za IC i CC redom (slika 6.4). U oba komposta sadržaj rastvorljivih šećera dostigao je nivo karakterističan za zreo kompost (Said-Pullicino i sar., 2007).

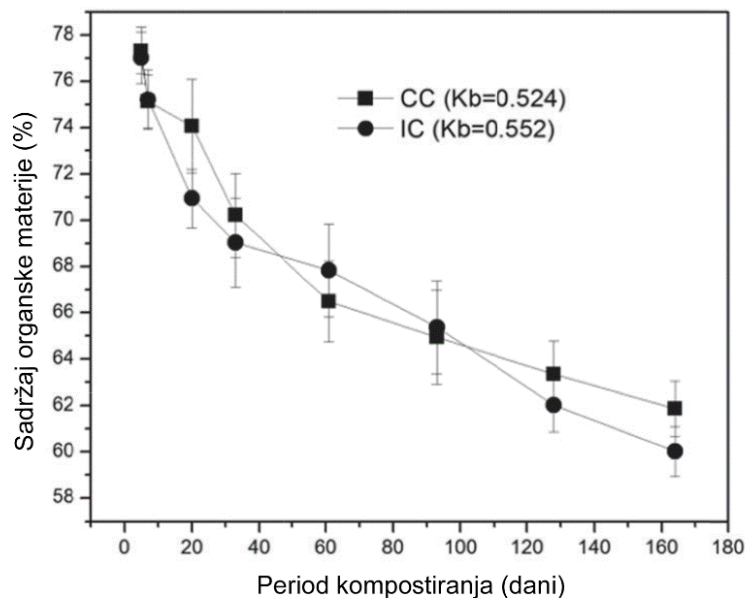


**Slika 6.4.** Promena u vodi rastvorljivih šećera u vodenom ekstraktu (1:10) komposta.

● IC uzorak sa 2% inokuluma, ■ CC kontrola bez inokuluma.

#### 6.5.2.4. Sadržaj organske materije (OM) u kompostu

Za razliku od rastvorljivih šećera u vodi, organska materija (OM) postepeno opada tokom procesa kompostiranja. Početni sadržaj organske materije u mešavini za kompostiranje je 87,62%. Oštar pad je primećen u oba uzorka IC i u kontroli CC do 20. dana procesa i postepeni pad je nastavljen sve do 61. dana procesa kompostiranja (slika 6.5). Posle 93. dana organska materija je dostigla vrednost od 60% u IC i 62% u CC kompostu.



**Slika 6.5.** Promena sadržaja organske materije.

● IC uzorak sa 2% inokuluma, ■ CC kontrola bez inokuluma.

#### 6.5.2.5. Ukupni sadržaj ugljenika i azota, C / N odnos

Početni sadržaj ugljenika (TC) u uzorku sa bakterijskim inokulumom je bio 50,64% (slika 6.6), a početni sadržaj azota (TKN) je bio 1,36% (slika 6.7).

Visok sadržaj ukupnog ugljenika (TC) i relativno nizak sadržaj azota (TKN) kao i C / N odnos od oko 37 (slika 6.8) je tipičan za lignocelulozni biljni materijal (Hubbe i sar., 2010). Preporuka je da kompostna mešavina treba da bude pripremljena tako da početni C / N odnos bude između 25 i 50. U višim C / N odnosima temperatura u kompostnoj gomili možda neće uspeti da raste, a ako je prenizak C / N odnos mešavina može da emituje neprijatne mirise (Hubbe i sar., 2010).

U istraživanjima Eiland i sar. (2001), ispitan je uticaj početnog C / N odnosa na hemijski i mikrobiološki sastav tokom dugotrajnog kompostiranja slame.

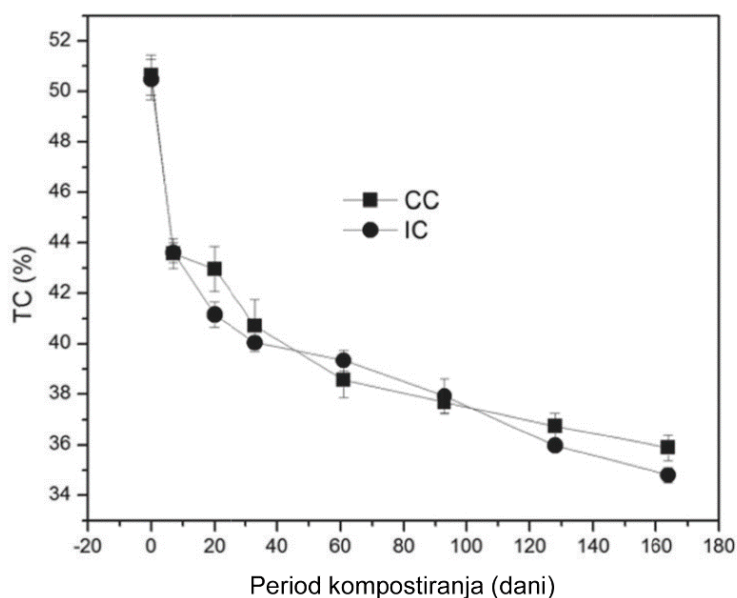
Pronađeno je da je kompost u toku tretmana kompostiranja slame sa vrednostima C / N odnosa od 11, 35 i 47 pokazao najbolje rezultate mikrobne aktivnosti, degradacije celuloze i hemiceluloze i formiranje veće količine nitratnog azota.

Tokom aerobnog procesa kompostiranja veliki deo ugljenika se usled delovanja mikroorganizama oslobađa u vidu ugljen dioksida, a ostatak se asimiluje kroz mikrobnim ćelijski metabolizam. Shodno tome, tokom kompostiranja otpada lekovitog bilja, sadržaj

ukupnog ugljenika se brzo smanjuje, dok se ukupni sadržaj azota povećava i shodno tome C / N odnos je smanjen.

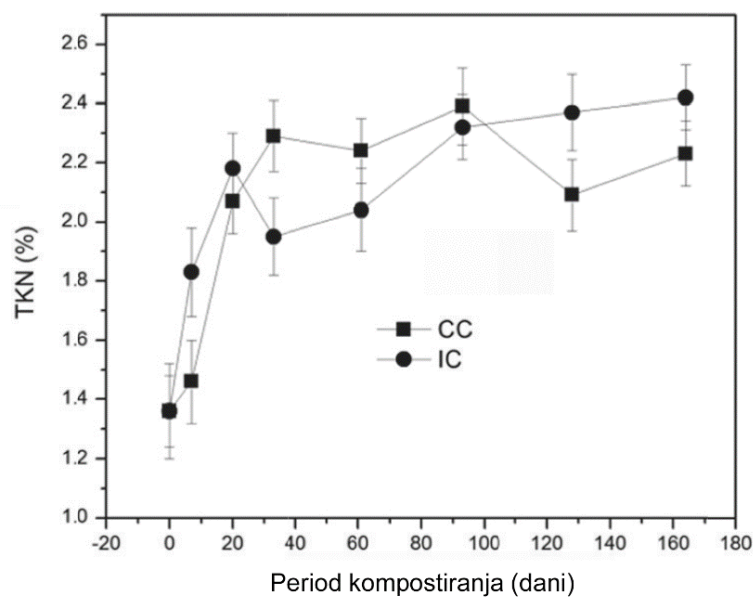
Završni C / N odnos na kraju procesa je dostigao vrednost od 16,09 i 14,38 za CC i IC uzorak redom (slika 6.8). Promena C / N odnosa karakteriše stabilnost komposta (Hubbe i sar., 2010) i ova vrednost se često koristi kao pokazatelj zrelosti komposta. Pošto C / N odnos zrelog komposta treba da bude od 15 do 25 (Rashad i sar., 2010), evidentno je da su oba komposta proizvedena u ovoj studiji dostigla zrelost.

Otpad od lekovitog bilja je bogat celulozom, hemicelulozom i ligninom, ali je siromašan azotom i supstrat se sporije razgrađuje. Relativno nizak početni sadržaj azota TKN u kompostnoj mešavini u kombinaciji sa blago alkalnim pH i relativno niskom temperaturom kompostiranja sprečava isparavanje i gubitak azota (Hubbe i sar., 2010). Primećeno povećanje TKN može se pripisati posledici razgradnje organskih jedinjenja (Said-Pullicino i sar., 2007). Pored toga, ukupan azot može biti povećan zahvaljujući aktivnosti bakterijama-azotofiksatorima. (Hubbe i sar., 2010; Rashad i sar., 2010). Porast ukupnog sadržaja azota u uzorcima komposta IC i CC na kraju procesa kompostiranja je bio primetan, ali nije bio statistički značajan.



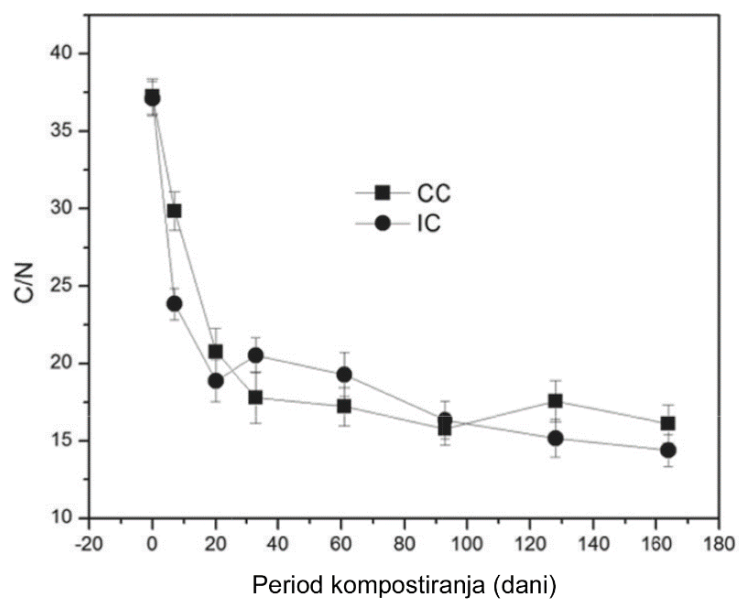
**Slika 6.6.** Promena sadržaja ukupnog ugljenika (TC).

● IC uzorak sa 2% inokuluma, ■ CC kontrola bez inokuluma.



**Slika 6.7.** Promena sadržaja ukupnog azota (TKN).

● IC uzorak sa 2% inokuluma, ■ CC kontrola bez inokuluma.



**Slika 6.8.** Promena C / N odnosa.

● IC uzorak sa 2% inokuluma, ■ CC kontrola bez inokuluma.

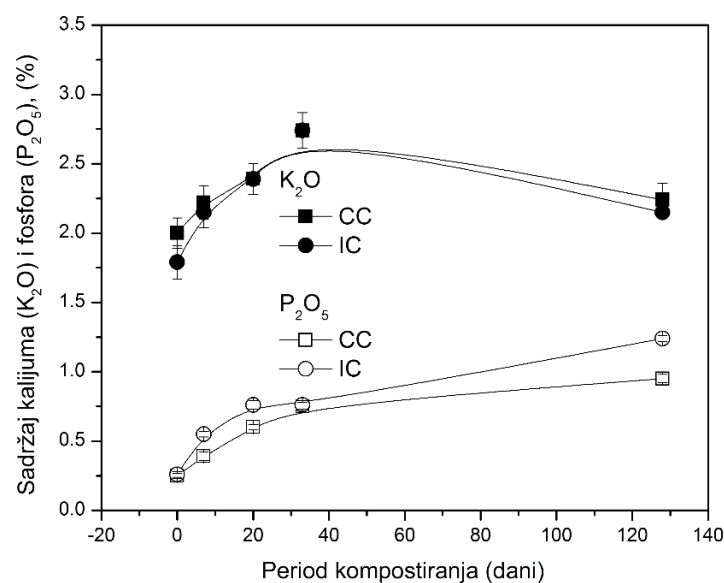
#### 6.5.2.6. Sadržaj kalijuma i fosfora u kompostu

U oba komposta CC i IC, kalijum se povećava u prvih 33. dana kompostiranja, nakon čega opada na vrednost koja je neznatno iznad početne (slika 6.9). Nasuprot tome fosfor se postepeno povećava tokom kompostiranja sa statistički značajnom razlikom između CC i IC, gde



je na kraju procesa kompostiranja ona bila najistaknutija. Moldes i saradnici (2007) su dobili sličan rezultat u promeni fosfora i kalijuma tokom kompostiranja komine grožđa. Fosfor je druga limitirajuća hranljiva materija pored azota u većini zemljišta. Veoma je značajan za ratarsku proizvodnju i učinjeni su mnogi pokušaji da se proizvede kompost sa povećanim sadržajem fosfora (Rashad i sar., 2010). Tokom procesa kompostiranja, oslobađanje organskih kiselina pomaže solubilizaciju nerastvornog fosfora. Dodatak azotofiksirajućih i fosfosolubilizacionih bakterija, može doprineti ovom procesu (Kumar, 2001; Meunchang i sar., 2005).

Preporučeni odnos ugljenika i fosfora je između 120 i 240 kada C / N odnos iznosi 30 (Hubbe i sar., 2010). Početna vrednost odnosa ugljenika i fosfora u otpadu od lekovitog bilja iznosi 152 za CC kompost i 146 za IC kompost i C / N odnos oko 37.



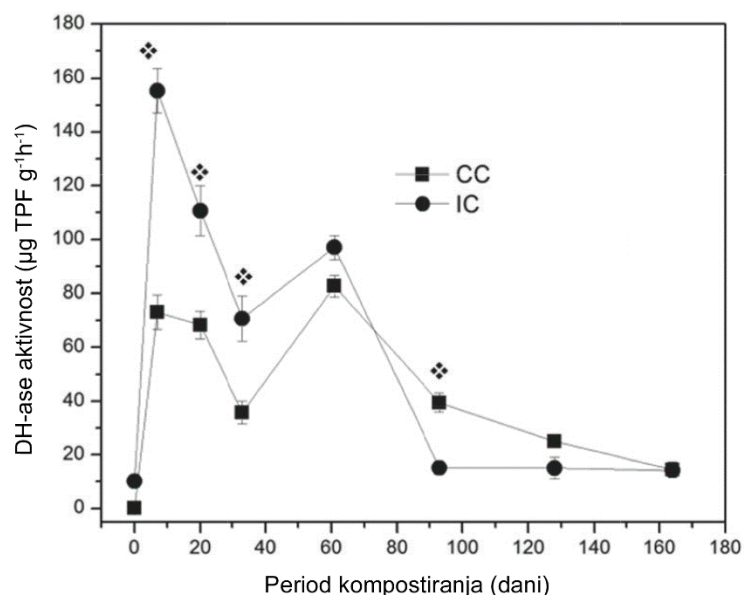
**Slika 6.9.** Promena sadržaja kalijuma i fosfora tokom perioda kompostiranja.

● IC uzorak sa 2% inokuluma, ■ CC kontrola bez inokuluma.

#### 6.5.2.7. Dehidrogenazna aktivnost i sadržaj oslobođenog CO<sub>2</sub> u kompostu

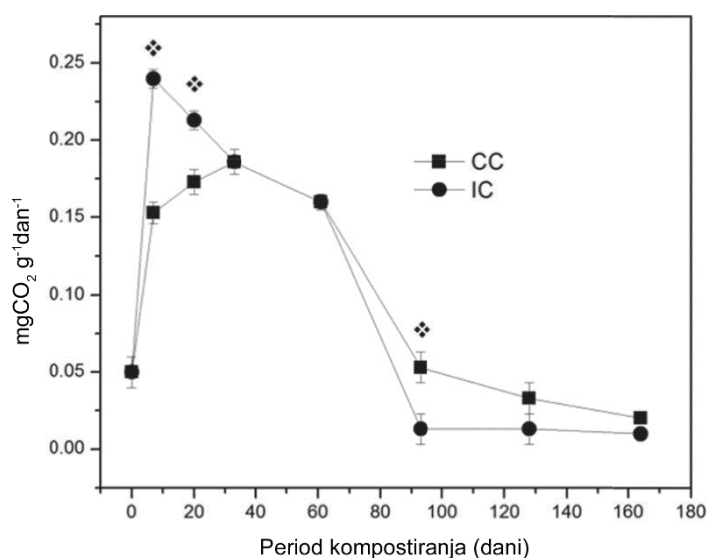
Dehidrogenazna aktivnost (aktivnost DH-ase) je mera ukupne biološke aktivnosti u kompostu i lak metod praćenja zrelosti komposta (Forster i sar., 1993). Vrednost aktivnosti DH-ase na početku procesa kompostiranja u uzorku IC je znatno veća nego u uzorku CC (slika 6.10). Ovo zapažanje ukazuje na efikasnost bakterijskog startera i njegovu sposobnost da pokrene i ubrza proces kompostiranja. Velika početna aktivnost DH-ase u kontroli CC ukazuje na visoku aktivnost prirodne mikroflore koja je doprinela i visokom sadržaju rastvorljivih šećera. Nakon prve nedelje, aktivnost DH-ase opada u oba uzorka IC i CC do 33. dana. Drugo povećanje aktivnosti DH-ase je primećeno 61. dana. To je verovatno posledica

povećanja temperature u ovom periodu kompostiranja i povećanja mikrobiološke aktivnosti u kompostu. Zatim aktivnost DH-ase opada do 93. dana na nivo koji se održava konstantno do kraja procesa bez značajne razlike između CC i IC. S obzirom na nizak sadržaj oslobođenog CO<sub>2</sub> na kraju procesa oba podatka ukazuju na stabilnost komposta (slika 6.11). Slični rezultati se mogu naći i u drugim studijama (Benito i sar., 2003).



**Slika 6.10.** Promena DH-ase aktivnosti,

- IC uzorak sa 2% inokuluma, ■ CC kontrola bez inokuluma.
- ❖ odnosi se na statistički značajnu razliku (P=0.01).



**Slika 6.11.** Promena oslobođenog CO<sub>2</sub> tokom perioda kompostiranja,

- IC uzorak sa 2% inokuluma, ■ CC kontrola bez inokuluma.
- ❖ odnosi se na statistički značajnu razliku (P=0.01).

### 6.5.2.8. Fitotoksičnost kompostnog materijala

Fitotoksičnost kompostnog materijala uzorka IC i kontrole CC je procenjena indeksom klijanja semena četiri vrste lekovitih biljaka:

timijan (*Thymus vulgaris*), lavanda (*Lavandula officinalis*), artičoka (*Cynara scolimus*) i heljda (*Fagopirum esculentum*) (tabela 6.7).

**Tabela 6.7.** Promena indeksa klijanja (GI) za semena heljde (*Fagopirum esculentum*), timijana (*Thymus vulgaris*), artičoke (*Cynara scolimu*) i lavande (*Lavandula officinalis*)

Vreme kompostiranja (dani)	<i>Fagopirum esculentum</i>		<i>Thymus vulgaris</i>		<i>Cynara scolimus</i>		<i>Lavandula officinalis</i>	
	IC (%)	CC (%)	IC (%)	CC (%)	IC (%)	CC (%)	IC (%)	CC (%)
7	60 ± 4 <sup>a</sup>	73 ± 6 <sup>a</sup>	25 ± 1 <sup>a</sup>	50 ± 2 <sup>a</sup>	11 ± 8 <sup>A</sup>	45 ± 5 <sup>a</sup>	30 ± 4 <sup>a</sup>	58 ± 5 <sup>a</sup>
20	20 ± 1 <sup>b</sup>	32 ± 1 <sup>b</sup>	21 ± 2 <sup>b</sup>	48 ± 3 <sup>b</sup>	35 ± 1 <sup>b</sup>	38 ± 1 <sup>b</sup>	16 ± 1 <sup>b</sup>	24 ± 1 <sup>b</sup>
33	67 ± 3 <sup>c</sup>	42 ± 3 <sup>c</sup>	64 ± 4 <sup>c</sup>	66 ± 6 <sup>c</sup>	80 ± 7 <sup>C</sup>	41 ± 2 <sup>c</sup>	37 ± 4 <sup>c</sup>	26 ± 3 <sup>c</sup>
61	68 ± 2 <sup>d</sup>	59 ± 2 <sup>d</sup>	88 ± 2 <sup>d</sup>	72 ± 6 <sup>d</sup>	105 ± 3 <sup>D</sup>	78 ± 3 <sup>d</sup>	75 ± 6 <sup>D</sup>	29 ± 3 <sup>d</sup>
93	84 ± 4 <sup>e</sup>	62 ± 5 <sup>e</sup>	96 ± 4 <sup>e</sup>	84 ± 8 <sup>e</sup>	121 ± 4 <sup>F</sup>	83 ± 4 <sup>f</sup>	83 ± 7 <sup>E</sup>	36 ± 2 <sup>e</sup>
128	102 ± 3 <sup>F</sup>	68 ± 5 <sup>f</sup>	128 ± 5 <sup>E</sup>	97 ± 4 <sup>f</sup>	163 ± 6 <sup>G</sup>	101 ± 6 <sup>g</sup>	89 ± 3 <sup>F</sup>	52 ± 3 <sup>f</sup>
164	122 ± 6 <sup>G</sup>	75 ± 4 <sup>g</sup>	175 ± 7 <sup>G</sup>	119 ± 3 <sup>g</sup>	190 ± 4 <sup>H</sup>	108 ± 3 <sup>h</sup>	106 ± 6 <sup>G</sup>	70 ± 6 <sup>g</sup>

CC-kompost bez inokuluma - kontrola; IC-kompost sa inokulumom, različite veličine slova označavaju statistički značajne razlike (P=0.01)

	Prihvatljive fitotoksičnosti,
	Biofertilizaciona aktivnost

Rezultati su pokazali da oba komposta imaju fitotoksičan efekat u prvim fazama kompostiranja (prve tri nedelje). Fitotoksičnost uzorka IC je bila veća u prvom i drugom merenju (7. i 22. dana) što može da ukazuje na intenzivniji proces razgradnje biljnog materijala. Već u trećem merenju (33. dana) fitotoksičnost uzorka IC je bila niža nego u kontroli CC i taj trend je ostao do kraja procesa kompostiranja. Posle 61. dana uzorak IC je pokazao karakter prihvatljivog i stabilnog komposta za tri testirane biljke (*Fagopirum esculentum*, *Tymus vulgaris*, *Lavandula officinalis*) sa GI iznad 66 (66 < GI < 100) (Rashad i dr. 2010). Artičoka (*C. scolimus*) je pokazala manju osetljivost na ekstrakt uzorka IC i imala je već 33. dana indeks klijavosti od 80 ± 7%, a efekat biofertilizacije već 61. dana GI = 105 ± 3% dok je na kraju procesa kompostiranja dostigla vrednost od 190 ± 3%. Zreo kompost IC se pokazao kao biofertilizator i za druge testirane biljke *T. vulgaris* (GI = 128 ± 5%), *F.*

*esculentum* (GI = 122 ± 6%), i za *L. officinalis* (GI = 106 ± 6%). Za razliku od IC, kompost CC-kontrola je pokazao umerenu fitotoksičnost posle 61. dana kompostiranja ali samo za timijan i artičoku. Na kraju kompostiranja ekstrakt zrelog komposta kontrole je pokazao biofertilizacioni efekat samo za ove dve biljne vrste (GI = 119 ± 3%) i (GI = 108 ± 3%). Osetljivost semena heljde i lavande na ekstrakt kontrolnog komposta, do kraja kompostiranja se ogleda u umerenoj fitotoksičnosti (GI = 75 ± 4% i GI = 70 ± 6%, redom). Ovaj rezultat pokazuje da je izbor biljnih vrsta za testiranje fitotoksičnosti veoma važan jer postoji razlika u njihovoj osetljivosti na komponente procesa razgradnje. Različita osetljivost različitih biljnih semena na istom kompostu je primećena i u radu drugih istraživača (Komilis i Tziouvaras, 2009). U ovom radu, test indeksa klijavosti GI je jasno pokazao razliku između CC i IC komposta kao i da je izabrani bakterijski starter značajno poboljšao kvalitet dobijenog komposta. Može se pretpostaviti da aktivnost odabranih bakterija doprinosi biofertilizacionom efektu dobijenog komposta (Mehta i sar., 2014).

Ovi rezultati pokazuju da je brzina kompostiranja (merena aktivnošću CO<sub>2</sub> i DH-ase), povećana dodatkom bakterijskog startera, i što je još važnije, dodavanje bakterijskog startera je imalo veliki uticaj na indeks klijavosti GI kod tri od četiri testirana semena lekovitog bilja.

Dodavanje bakterijskog startera transformisalo je kompost nastao iz otpada lekovitog bilja u vredan biofertilizator.

## **6.6. Agronomski parametri gajenja crnog kima i uljanog lana sa tretmanom sa bakterijskim inokulumom**

U istraživanju su korišćene biljne vrste: crni kim (*Nigella sativa* L.) i uljani lan (*Linum usitatissimum* L. var. *vulgare* Boen.) koje se gaje i umnožavaju na parcelama u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ iz Beograda sa lokacijom u Pančevu, Vojvodina, Republika Srbija (44°52'20"N; 20°42'06"E; 74 m.n.v.). Pre i nakon zasnivanja useva, zemljište je tretirano bakterijama, osim kontrole (L1, *L. usitatissimum* – kontrola; L2, *L. usitatissimum* sa bakterijskim inokulumom 1 mL L<sup>-1</sup>; L3, *L. usitatissimum* sa bakterijskim inokulumom 7 mL L<sup>-1</sup>; N1, *N. sativa* – kontrola; N2, *N. sativa* sa bakterijskim inokulumom 1 mL L<sup>-1</sup>, N3, *N. sativa* sa bakterijskim inokulumom 7 mL L<sup>-1</sup>). Biljni materijal je uzorkovan nakon završetka vegetacije u toku 2015. i 2016. godine. Ogled je zasnovan po potpuno slučajnom blok sistemu sa veličinom osnovnih parcela 10,0 m<sup>2</sup> (4,0 m x 2,5 m) u tri ponavljanja. Osnovna ili elementarna parcela poslužila je istovremeno i kao obračunska.

Setva je u dve godine istraživanja obavljena ručno na dubini od 1 cm. Kako bi se odredile pojedine morfološke osobine uzimano je po deset biljaka sa svake parcelice. Merena je visina biljaka (cm), broj čaura, masa cele biljke (g), masa korena (g) i dužina korena (cm). Prinos semena po hektaru ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) dobijen je odgovarajućim preračunavanjem prinosa sa elementarnih parcelica i vlažnosti semena (Filipović i sar., 2014).

U tabeli 6.8 su prikazani prinos, morfološki, i semenski parametri kvaliteta semena crnog kima i uljanog lana. Pozitivan uticaj primene bakterijskog preparata na visinu biljaka bio je primetan kod crnog kima, dok je u usevu uljanog lana L1 – kontrola u proseku biljka imala visinu 53,5 cm, dok su varijante L2 i L3 imale 52,3 cm odnosno 52,7 cm. Pozitivno dejstvo bakterijskog preparata kod obe ispitivane biljne vrste zabeleženo je kod broja čaura i mase cele biljke. Ostvareni rezultati bili su u skladu sa prethodno realizovanim istraživanjima (Toncer i Kizil, 2004; Khan i sar., 2005; Pospišil i sar., 2011; Rahimi i sar., 2011; Zajac i sar., 2012). Masa korena crnog kima imala je interval od 0,168 g (N1) do 0,264 g (N3), dok je masa korena uljanog lana imala istu tendenciju od najmanjih vrednosti od 0,267 g (N1) do 0,327 g (N3). Najduži koren je formiran u kontrolnim varijantama, što je u saglasnosti sa istraživanjima Abdel-Aziez i sar. (2014). Sličan odnos je zabeležen sa dužinom korena uljanog lana. Na siromašnijim i zemljištima lošije strukture koren uljanog lana radi boljeg ukorenjavanja i ishrane ima tendenciju bržeg i dubljeg rasta u odnosu na koren koji se razvija na plodnim i strukturnim zemljištima. Na formiranje visoke produkcije semena kao najboljom se pokazala varijanta N2 odnosno L2 gde je zemljište tretirano sa 1 mL L<sup>-1</sup> bakterijskog inokuluma. Kod crnog kima ostvarena je razlika između najvišeg N2 (290,1  $\text{kg ha}^{-1}$ ) i najmanjeg N1 (249,2  $\text{kg ha}^{-1}$ ) od 14,1%. U slučaju prinosa semena po hektaru uljanog lana razlika između najvišeg L2 (743,5  $\text{kg ha}^{-1}$ ) i najmanjeg prinosa L3 (585,8  $\text{kg ha}^{-1}$ ) je 21,2%. Generalno su ostvarene visoke vrednosti energije klijanja i ukupne klijavosti semena za obe biljne vrste. U odnosu na crni kim, kod uljanog lana je uočljivo povećanje vrednosti ukupne klijavosti u odnosu na energiju klijanja. Na kraju za sve ispitivane varijante utvrđene vrednosti ukupne klijavosti su veće od 90%. Najveću klijavost je ostvarila varijanta N2 odnosno L2 sa 96,0% ukupne klijavosti kod crnog kima i 98,3% kod uljanog lana.

**Table 6.8.** Morfološke karakteristike, prinos i parametri kvaliteta semena *N. sativa* i *L. usitatissimum*.

	Visina biljke (cm)	Broj čaura	Cela sveža biljna masa (g)	Masa korena (g)	Dužina korena (cm)	Prinos semena po hektaru (kg ha <sup>-1</sup> )	Energija klijanja (%)	Ukupna klijavost (%)
N1	26,5±2,0	4,7±0,8	0,76±0,09	0,168±0,09 <sup>a</sup>	8,1±0,6	249,2±64,7	96,0±4,0	96,0±4,0
N2	28,6±2,3	5,4±0,6	0,83±0,18	0,234±0,05 <sup>b</sup>	8,0±0,5	290,1±98,3	94,7±3,1	96,0±2,7
N3	28,0±0,5	6,1±2,6	0,83±0,12	0,264±0,04 <sup>c</sup>	7,9±0,8	269,2±61,8	94,0±1,7	94,3±2,3
L1	53,5±3,7	27,1±9,7	3,90±1,98	0,267±0,07	7,5±1,2	692,1±130,8	86,7±17,1	90,0±13,0
L2	52,3±3,7	30,5±6,9	4,10±0,96	0,313±0,08	7,3±1,7	743,5±213,8	97,3±1,5	98,3±1,2
L3	52,7±5,3	30,9±8,3	4,40±1,31	0,327±0,06	7,8±0,3	585,8±66,4	91,3±10,9	92,0±9,9

L1, *L. usitatissimum* kontrola; L2, *L. usitatissimum* sa bakterijskim inokulumom 1 mL L<sup>-1</sup>; L3, *L. usitatissimum* sa bakterijskim inokulumom 7 mL L<sup>-1</sup>; N1, *N. sativa* kontrola; N2, *N. sativa* sa bakterijskim inokulumom 1 mL L<sup>-1</sup>, N3, *N. sativa* sa bakterijskim inokulumom 7 mL L<sup>-1</sup>. (statistički značajna razlika u datoj koloni pojedinačnih biljaka označena je različitim slovima (p<0.05))

## 6.7. Prinos masnog ulja ekstrahovanog sa natkritičnim CO<sub>2</sub>

Natkritična ekstrakcija masnog ulja iz semena crnog kima i uljanog lana sa CO<sub>2</sub> izvedena je u Autoclav inženjerskom skrining sistemu na 300 bara i 40 °C i dobijeno je masno ulje sa prinosom od 20% do 29%. Rezultati prinosa su dati u tabeli 6.9. Za ekstrakciju je korišćeno oko 15 g mlevenog biljnog semena dok je prosečna brzina protoka CO<sub>2</sub> bila oko 0,44 kg h<sup>-1</sup>. Prinos iz ekstrakcije je izračunat nakon potrošnje približno 127 g semena pri čemu je biljni materijal iscrpljen.

**Tabela 6.9.** Prinos masnih ulja izolovanih natkritičnom ekstrakcijom na 300 bara i 40 °C.

Uzorci	N1	N2	N3	L1	L2	L3
Prinos masnih ulja %	28,3 ± 0,1	26,9 ± 0,1	27,7 ± 0,2	20,8 ± 0,1	28,8 ± 0,2	25,0 ± 0,1

L1, *L. usitatissimum* – kontrola; L2, *L. usitatissimum* sa bakterijskim inokulumom 1 mL L<sup>-1</sup>; L3, *L. usitatissimum* sa bakterijskim inokulumom 7 mL L<sup>-1</sup>; N1, *N. sativa* – kontrola; N2, *N. sativa* sa bakterijskim inokulumom 1 mL L<sup>-1</sup>, N3, *N. sativa* sa bakterijskim inokulumom 7 mL L<sup>-1</sup>

Natkritična ekstrakcija (NKE) u poređenju sa drugim metodama ekstrakcije daje najniži prinos ekstrakcije, međutim predstavlja jednu od čistijih i efikasnijih metoda kod kojih je najčešće korišćeni rastvarač natkritični ugljendioksid (nkCO<sub>2</sub>). Njegove karakteristike su niska cena, dobra dostupnost, mogućnost korišćenja za ekstrakciju nepolarnih molekula iz biljnog materijala kao što su masne kiseline (Reverchon i De Marco, 2006). Proces ekstrakcije sa nkCO<sub>2</sub> omogućava dobijanje ekstrakata na umereno niskim pritiscima u opsegu 9–30 MPa i niskim temperaturama (40–50 °C), čime se sprečava termička degradacija lako isparljivih i termolabilnih jedinjenja koja se smatraju glavnim nosiocima antimikrobne i antioksidativne aktivnosti.

## 6.8. Hemijski sastav masnih kiselina u ulju crnog kima i uljanog lana

Pojedinačan sastav masnih kiselina u ulju dobijen je pomoću GC i GC/MS analize.

Sastav masnih kiselina u ulju crnog kima (*N. sativa*) i uljanog lana (*L. usitatissimum*) prikazan je u tabeli 6.10. Izražen je kao % masne kiseline na ukupan sadržaj masnih kiselina g/100g.

**Tabela 6.10.** Sastav masnih kiselina (GC/MS) u masnom ulju crnog kima (*N. sativa*) i uljanog lana (*L. usitatissimum*) izolovanih natkritičnom ekstrakcijom sa CO<sub>2</sub> (NKE) na 300 bara i 40 °C.

Fatty acid	N1	N2	N3	L1	L2	L3
C 12:0	0,54±0,03 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>b</sup>	0,20±0,03 <sup>b</sup>	0,24±0,01 <sup>a</sup>	0,12±0,02 <sup>b</sup>	0,15±0,02 <sup>b</sup>
C 14:0	0,17±0,02	0,17±0,03	0,18±0,02	0,05±0,01	0,04±0,01	0,05±0,01
C 16:0	10,81±0,20	10,99±0,20	11,01±0,10	6,36±0,04 <sup>a</sup>	5,95±0,03 <sup>b</sup>	5,96±0,02 <sup>b</sup>
C 16:1	0,14±0,02	0,15±0,02	0,15±0,03	0,12±0,03	0,10±0,01	0,11±0,03
C 18:0	3,10±0,02	3,06±0,02	3,04±0,02	5,34±0,05 <sup>a,b</sup>	5,41±0,03 <sup>b</sup>	5,24±0,03 <sup>a</sup>
C 18:1	25,97±0,20 <sup>a</sup>	23,05±0,10 <sup>b</sup>	21,71±0,30 <sup>c</sup>	16,06±0,03 <sup>a</sup>	16,97±0,03 <sup>b</sup>	16,50±0,05 <sup>c</sup>
C 18:2	52,68±0,50 <sup>a</sup>	55,70±0,35 <sup>b</sup>	57,11±0,40 <sup>b</sup>	26,96±0,20 <sup>a</sup>	25,95±0,30 <sup>a,b</sup>	25,19±0,40 <sup>b</sup>
C 18:3	N,D,	N,D,	N,D,	42,97±0,20 <sup>a</sup>	44,10±0,15 <sup>b</sup>	45,42±0,50 <sup>b</sup>
C 20:0	0,17±0,02	0,17±0,02	0,17±0,01	0,19±0,03	0,20±0,05	0,18±0,04
C 20:2	4,34±0,02 <sup>a</sup>	4,46±0,02 <sup>b</sup>	4,54±0,03 <sup>b</sup>	0,51±0,02	0,55±0,02	0,55±0,01

L1, *L. usitatissimum* – kontrola; L2, *L. usitatissimum* sa bakterijskim inokulumom 1 mL L<sup>-1</sup>; L3, *L. usitatissimum* sa bakterijskim inokulumom 7 mL L<sup>-1</sup>; N1, *N. sativa* – kontrola; N2, *N. sativa* sa bakterijskim inokulumom 1 mL L<sup>-1</sup>, N3, *N. sativa* sa bakterijskim inokulumom 7 mL L<sup>-1</sup> (statistički značajna razlika u zadanom redosledu pojedinih biljaka obeležena je različitim slovom (p<0.01)); N.D. – nije detektovan

Iz rezultata se vidi da je analizom ulja iz crnog kima sastav zasićenih masnih kiselina oko 14% (uglavnom Palmitinska C 16:0 i Stearinska C 18:0, 10-11%, i oko 3% redom). Sastav je sličan u sva tri uzorka N1, N2 i N3. Oleinske kiseline C 18:1 ima oko 21-26% i najviše u kontroli N1 (25,97%). Dominantna kiselina u ulju crnog kima je polinezasićena esencijalna masna kiselina – linolna C 18:2, čiji sastav iznosi od 52-58%. Pregledom rezultata možemo uočiti značajno povećanje linolne kiseline sa povećanjem koncentracije bakterija u uzorcima N2 (55,7%) i N3 (57,11%) u odnosu na kontrolu N1 (52,68%). U prethodnim istraživanjima se može videti da su sličan profil masnih kiselina dobili autori Piras i sar. (2013) koji su ispitivali hemijski sastav masnog ulja crnog kima koji je gajen u različitim oblastima Turske (Antalya, Aydin, Deniz) i u Italiji.



U ovom radu je dobijeno da je sadržaj linolne kiseline C 18:2 najveći u uzorku ulja N3 (57,11%) koji je dobijen sa većom koncentracijom bakterija ( $7 \text{ mL L}^{-1}$ ) i veći je od sadržaja iste masne kiseline u radu kod pomenutih autora kod kojih iznosi oko 55%.

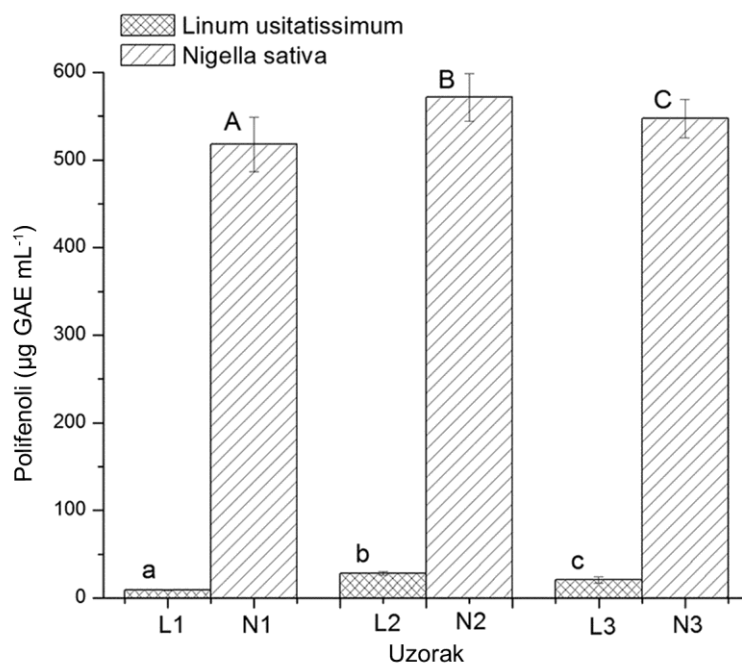
Sastav masnih kiselina u ulju lana (tabela 6.10) pokazuje da zasićenih masnih kiselina ima oko 12% (uglavnom palmitinske C 16:0 i stearinske C 18:0, od 6-7% i 5-6% redom). Sadržaj obe masne kiseline je u sva tri uzorka L1, L2, L3 vrlo sličan. Oleinske kiseline C 18:1 ima 16–17% i najviše u uzorku L2 (16.97%). Linolne kiseline C18:2 ima od 25–27%, a linolenske C 18:3 (42–46%). Kod oleinske i linolenske kiseline možemo da primetimo da je sadržaj masnih kiselina veći u uzorcima L2 i L3 nego u kontroli, a najveći sadržaj ima dominantna esencijalna masna kiselina – linolenska u uzorku L3 (45,42%).

Poredeći rezultate sadržaja masnih kiselina analizom ulja crnog kima i uljanog lana, možemo da primetimo da bakterije imaju jednak uticaj kod obe biljke na sastav esencijalnih masnih kiselina u ulju lana (linolenske C 18:3) i u ulju crnog kima (linolne kiseline C 18:2). Naime, njihov sadržaj se linearno povećava sa povećanjem koncentracije bakterija, pri čemu je najveći u uzorcima L3 i N3 gde je korišćena veća koncentracija bakterija ( $7 \text{ mL L}^{-1}$ ), a najmanji je u kontroli.

## **6.9. Sadržaj polifenola, flavonoida i karotenoida u ulju crnog kima i uljanog lana**

Prisustvo značajnih količina ukupnih polifenola i flavona u biljci bitno doprinosi ukupnom antioksidativnom delovanju biljke i njenim ekstraktima. Na osnovu dosadašnjih brojnih istraživanja dokazano je da na sadržaj polifenolnih jedinjenja utiču genotip, mesto, tehnika gajenja kao i razlika u zrelosti biljke (Orhan i sar., 2007). Spoljašnji faktori poput temperature, svetlosti, hranljivih materija u zemljištu i nadmorske visine imaju uticaj na fenilpropanoidni metabolizam biljke (Dixon i Paiva, 1995). Izolovanje polifenolnih jedinjenja iz masnog ulja semena lana i crnog kima vršeno je ekstrakcijom gde je korišćen etanol kao rastvarač. Analizirani su ekstrakti masnog ulja iz semena lana i crnog kima sa ciljem da se odredi uticaj koncentracije inokuluma mezofilnih bakterija koje su korišćene pri gajenju ovih biljaka, na antioksidativnu aktivnost kroz količinu ekstrahovanih fenolnih jedinjenja.

Kvantitativno određen sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima lana i crnog kima prikazan je na slici 6.12.



**Slika 6.12.** Uticaj različite koncentracije bakterijskog inokuluma

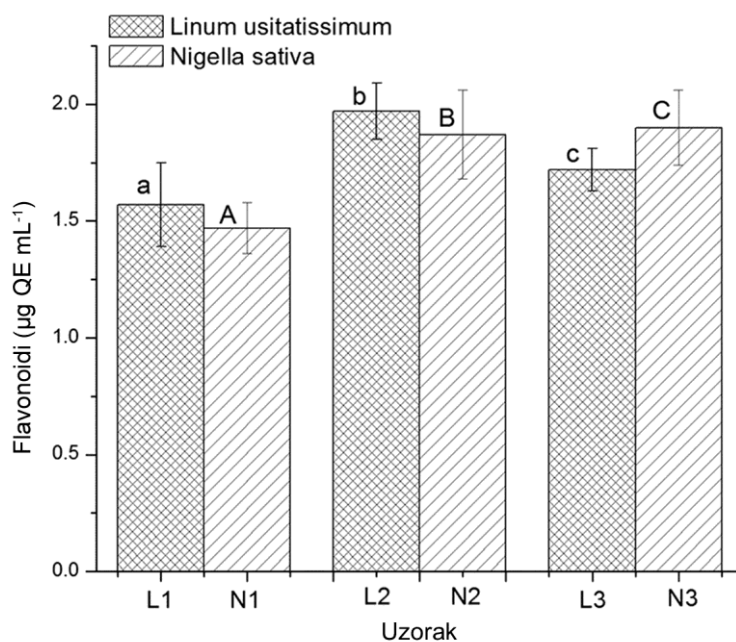
na ukupan sadržaj polifenola u masnom ulju *L. usitatissimum* i *N. sativa*:

L1 – kontrola; L2 – bakterijski inokulum 1 mL L<sup>-1</sup>; L3 – bakterijski inokulum 7 mL L<sup>-1</sup>;

N1 – kontrola; N2 – bakterijski inokulum 1 mL L<sup>-1</sup>; N3 – bakterijski inokulum 7 mL L<sup>-1</sup>

Sadržaj ukupnih polifenola kod lana se kreće od 9,44-28,33 µg GAE mL<sup>-1</sup> ekstrakta, dok je kod crnog kima ta vrednost skoro pedeset puta veća i iznosi između 517,9-571,6 µg GAE mL<sup>-1</sup> ekstrakta. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja ima ekstrakt crnog kima N2 (571,6 µg GAE mL<sup>-1</sup>), dobijen tretmanom sa manjom koncentracijom bakterijskog inokuluma u iznosu od 1 mL L<sup>-1</sup> vodenog rastvora.

Sa druge strane, ekstrakt lana sadrži 1,57-1,97 µg QE mL<sup>-1</sup> ukupnih flavonoida a kod crnog kima je utvrđeno da su te količine između 1,47-1,90 µg QE mL<sup>-1</sup> (slika 6.13), što je približno jednako u oba ekstrakta semena.



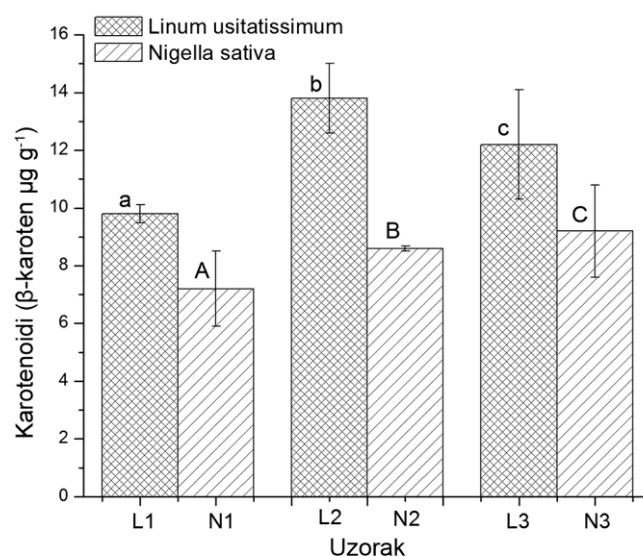
**Slika 6.13.** Uticaj različite koncentracije bakterijskog inokuluma

na ukupan sadržaj flavonoida u masnom ulju *L. usitatissimum* i *N. sativa*:

L1 – kontrola; L2 – bakterijski inokulum 1 mL L<sup>-1</sup>; L3 – bakterijski inokulum 7 mL L<sup>-1</sup>;

N1 – kontrola; N2 – bakterijski inokulum 1 mL L<sup>-1</sup>; N3 – bakterijski inokulum 7 mL L<sup>-1</sup>

Takođe sadržaj karotenoida je prikazan na slici 6.14. Primećen je sličan trend kao kod sadržaja polifenola i flavonoida. Sadržaj karotenoida je povećan u uzorku i lana i crnog kima koji su tretirani bakterijama u poređenju sa kontrolom. Pored toga, veće prisustvo karotenoida je bilo očiglednije u ekstraktu lana nego u ekstraktu crnog kima.



**Slika 6.14.** Uticaj različite koncentracije bakterijskog inokuluma na sadržaj karotenoida u masnom ulju *L. usitatissimum* i *N. sativa*:

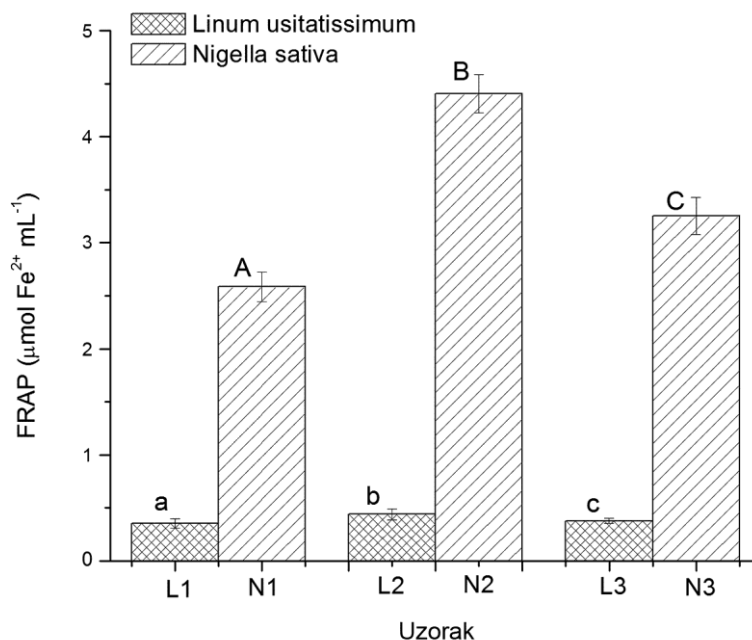
L1 – kontrola; L2 – bakterijski inokulum 1 mL L<sup>-1</sup>; L3 – bakterijski inokulum 7 mL L<sup>-1</sup>;  
 N1 – kontrola; N2 – bakterijski inokulum 1 mL L<sup>-1</sup>; N3 – bakterijski inokulum 7 mL L<sup>-1</sup>

Povećan sadržaj polifenola i flavonoida u uzorcima tretiranim sa bakterijama u poređenju sa odgovarajućim kontrolama ukazuje na to da upotreba bakterija tokom gajenja bilja pozitivno utiče na stvaranje većih količina bioaktivnih jedinjenja i njihovo oslobađanje u dobijenim ekstraktima. Pored toga nisu nađene značajne razlike između uzoraka gde su korišćene veće ili manje koncentracije bakterija. Ukupan sadržaj polifenola u ekstraktu crnog kima je bio veći u poređenju sa ekstraktom iz ulja crnog kima koja potiče iz Turske, što se može objasniti i korišćenjem različitih tehnika ekstrakcije (Kiralan i sar., 2014).

## 6.10. Antioksidativna svojstva ulja crnog kima i uljanog lana

FRAP metoda pripada grupi metoda kojima se određuju antioksidativna svojstva materijala koja se zasnivaju na transferu elektrona Fe<sup>3+</sup>-Fe<sup>2+</sup>. Ova metoda meri kapacitet antioksidanasa da redukuju prisutnu oksidativnu komponentu uz promenu boje koja se određuje spektrofotometrijski. Stepenn promene boje je proporcionalan koncentraciji antioksidanasa.

Dobijene FRAP vrednosti u ekstraktima crnog kima su iznosile redom 2,587  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ mL}^{-1}$ , 4,403  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ mL}^{-1}$  i 3,253  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ mL}^{-1}$  za N1, N2 i N3, redom (slika 6.15).



**Slika 6.15.** Uticaj različite koncentracije bakterijskog inokuluma

na antioksidativnu aktivnost (FRAP) u masnom ulju *L. usitatissimum* i *N. sativa*:

L1 – kontrola; L2 – bakterijski inokulum 1  $\text{mL L}^{-1}$ ; L3 – bakterijski inokulum 7  $\text{mL L}^{-1}$ ;

N1 – kontrola; N2 – bakterijski inokulum 1  $\text{mL L}^{-1}$ ; N3 – bakterijski inokulum 7  $\text{mL L}^{-1}$

Poredeći rezultate antioksidativne aktivnosti ekstrakta crnog kima izražene preko FRAP vrednosti i rezultate određivanja sadržaja ukupnih polifenola, može se uočiti direktna linearna zavisnost, odnosno veći sadržaj polifenola daje i veću FRAP vrednost.

Takođe, poredeći rezultate antioksidativne aktivnosti u ekstraktu lana izražene preko FRAP vrednosti, i rezultate određivanja ukupnog sadržaja flavona i karotenoida, i ovde se može takođe uočiti linearna zavisnost, odnosno, viši sadržaj flavona i karotenoida daje i višu FRAP vrednost.

Dobijene FRAP vrednosti za lan su iznosile redom 0,355  $\mu\text{molFe}^{2+} \text{ mL}^{-1}$  (L1), 0,440  $\mu\text{molFe}^{2+} \text{ mL}^{-1}$  (L2) i 0,378  $\mu\text{molFe}^{2+} \text{ mL}^{-1}$  (L3) ekstrakta.

Najveću FRAP vrednost kod uzoraka crnog kima je imao uzorak N2 (4,403  $\mu\text{molFe}^{2+} \text{ mL}^{-1}$ ) ekstrakta, koji je dobijen iz semena crnog kima koja je gajena sa mezofilnim bakterijama u koncentraciji od 1  $\text{mL L}^{-1}$ .

Takođe i kod lana najveću FRAP vrednost ispoljio je uzorak lana L2 ( $0,440 \mu\text{molFe}^{2+} \text{mL}^{-1}$ ) ekstrakta, koji je gajen na isti način.

U rezultatima se može uočiti da su najmanje vrednosti FRAP aktivnosti bile zastupljene u uzorcima kontrole lana  $0,355 \mu\text{molFe}^{2+} \text{mL}^{-1}$  (L1) i crnog kima  $2,587 \mu\text{molFe}^{2+} \text{mL}^{-1}$  (N1) ekstrakta, kod kojih nisu korišćene bakterije tokom gajenja.

Na osnovu rezultata antioksidativne aktivnosti u uzorcima ekstrakta lana i crnog kima izraženih preko FRAP vrednosti, može se zaključiti da uticaj bakterijskog inokuluma mezofilnih bakterija pri gajenju navedenih biljaka povećava antioksidativna svojstva masnih ulja dobijenih iz semena obe biljke pri čemu je ona veća kod semena onih biljaka dobijenih sa manjom koncentracijom bakterijskog inokuluma ( $1 \text{ mL L}^{-1}$ ).

Može se primetiti da seme crnog kima dobijeno gajenjem pri toj koncentraciji bakterija ima skoro deset puta veću vrednost FRAP aktivnosti od semena lana dobijenog gajenjem u istim uslovima.

## 7. ZAKLJUČAK

Predmet istraživanja u okviru ove doktorske disertacije odnosi se na ispitivanje uticaja inokulacije, smešom prirodnih izolata bakterija i streptomiceta, na kompostiranje biljnog otpada nastalog tokom procesa proizvodnje i prerade lekovitog bilja kao i uticaj izabranih sojeva pri gajenju uljanog lana i crnog kima na nutritivna i funkcionalna svojstva masnih ulja.

Na osnovu analize svih dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- Izvršena je identifikacija radnih mikroorganizama metodom sekvencioniranja 16s rRNK kodirajuće genomske sekvence koja je potvrdila da izolati pripadaju sojevima:
  - *Bacillus amyloliquefaciens ssp. plantarum* PPM3
  - *Bacillus altitudinis* PPT1
  - *Streptomyces spororaveus* CKS2
  - *Streptomyces microflavus* CKS 6
  - *Streptomyces fulvissimus* CKS 7
  - *Hymenobacter* sp. CKS3
  - *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1
- Svi testirani izabrani sojevi su mezofilni i proizvode celulolitičke enzime.
- Sve izabrane bakterije su mogle da rastu na agarnim pločama sa 1%, 5% i 10% mešanim biljnim otpadom.
- Izabrani sojevi nisu pokazali međusobni antagonizam i napravljena je mešavina jednakih količina svih sedam sojeva za kompostiranje sa kojom je tretiran biljni otpad sa 2% inokuluma.
- API ZYM test je pokazao veliki enzimski potencijal enzima sva tri odabrana soja (*Paenibacillus* sp., *Hymenobacter* sp., *Streptomyces* sp.) pri gajenju crnog kima i uljanog lana. Svi sojevi su bili u mogućnosti da rastvaraju trikalcijum fosfat i pokazuju aktivnost (N-acetil-  $\beta$ -glukozaminidaza), koji se smatra jednim od mogućih agenasa za poboljšanje rasta biljaka. Potvrđena je visoka komatibilnost između sojeva u smeši određivanjem indeksa klijavosti semena crnog kima (GI=120,2%) i lana (GI=161,9%).
- Ova studija pokazuje proces raspadanja stvarnog industrijskog otpada, nastalog mešanjem od preko 90 različitih vrsta lekovitog bilja. Dobijeni proizvod pokazuje karakteristike stabilnog komposta, prema svim fizičko-hemijskim i biološkim

parametrima. Pored toga, biofertilizacioni efekat testiranih lekovitih biljaka je bio u proseku 60% veći nego kod neinokulisanog komposta. Takav kompost se može koristiti u poljima i očekuje se da će povećati prinose lekovitih biljaka, tako da bi bio efikasan način valorizacije biljnog otpada u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ kao i u industrijama koje generišu sličan otpad.

- Proces kompostiranja, na osnovu merenja temperature u kompostnoj gomili, na početku i na kraju ima mezofilan karakter a u toku procesa termofilan sa maksimalnom izmerenom temperaturom od 62,3 °C.
- U različitim fazama procesa kompostiranja pH vrednost varira i dostiže na kraju procesa posle 93. dana stabilnu vrednost od 7,5-8,0 koja je karakteristična za zreo kompost.
- Povećan sadržaj rastvorljivih šećera u vodi na početku procesa, pokazatelj je pojačane aktivnosti bakterijskog startera. Na kraju procesa sadržaj rastvorljivih šećera opada i iznosi 0,05% u kompostu sa inokulumom i 0,07% u kontroli, što je pokazatelj zrelog komposta. Takođe i sadržaj organske materije postepeno opada tokom odigravanja procesa od početne vrednosti od 87,62% do 60% na kraju procesa.
- Visok sadržaj ukupnog ugljenika TC i nizak sadržaj azota TKN kao i visok C / N odnos je tipičan za lignocelulozni materijal. Završni C / N odnos dostiže vrednost od 16,09 u kompostu sa inokulumom i 14,38 u kontroli, što karakteriše stabilan i zreo kompost.
- DH-ase aktivnost na početku procesa kompostiranja u kompostu sa inokulumom ( $158 \mu\text{gTPF g}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) je veća u odnosu na kontrolu ( $75 \mu\text{gTPF g}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), i ukazuje na efikasnost bakterijskog startera i njegovu sposobnost da pokrene i ubrza proces kompostiranja.
- Primena bakterijskih startera u kompostiranju značajno poboljšava kvalitet komposta i smanjuje toksičnost komposta, što dokazuje indeks klijavosti GI semena odabranih biljnih vrsta.
- Dobijeni uzorci komposta sa i bez inokuluma su stabilni po svim fizičko-hemijskim i biološkim parametrima.
- Biofertilizacioni efekat na testiranom lekovitom bilju je bio znatno veći u inokulisanom kompostu nego u kontroli. Pozitivno dejstvo korišćenog bakterijskog preparata u koncentraciji od  $7 \text{ mL L}^{-1}$ , pri gajenju obe biljke, je zabeleženo



merenjem mase cele biljke, broja čaura i formiranjem visoke produkcije semena i njihove ukupne klijavosti.

- Analiza sastava masnih kiselina u masnom ulju crnog kima i uljanog lana izolovanog natkritičnom ekstrakcijom sa CO<sub>2</sub>, pokazuje da bakterije u koncentraciji od 7 mL L<sup>-1</sup> imaju pozitivan uticaj kod obe biljke na sastav esencijalnih masnih kiselina. U ulju lana sadržaj linolenske kiseline C18:3 (45,42%) je povećan u odnosu na kontrolu (42,97%) kao i u ulju crnog kima gde je sadržaj linolne kiseline C18:2 (57,11%) u odnosu na kontrolu N1 (52,68%).
- Primenom bakterijskog preparata u koncentraciji od 1 mL L<sup>-1</sup> u gajenju crnog kima i uljanog lana nađen je povećan sadržaj polifenolnih jedinjenja (najveći kod crnog kima 571,6 µg GAE mL<sup>-1</sup>), flavonoida i karotenoida kao i povećana antioksidativna aktivnost (najveća kod crnog kima 4,403 µmol Fe<sup>2+</sup> mL<sup>-1</sup>) u ekstraktima masnog ulja u odnosu na kontrolu. Pored toga nađeno je i veće prisustvo karotenoida u ekstraktu lana nego u ekstraktu crnog kima.
- Povećan sadržaj polifenola i flavonoida u uzorcima tretiranim sa bakterijama u poređenju sa odgovarajućim kontrolama ukazuje na to da upotreba bakterija tokom gajenja bilja pozitivno utiče na stvaranje većih količina bioaktivnih jedinjenja i njihovo oslobađanje u dobijenim ekstraktima. Pored toga nisu nađene značajne razlike između uzoraka gde su korišćene veće ili manje koncentracije bakterija.

Na osnovu dobijenih eksperimentalnih podataka i detaljnog literaturnog pregleda, naučni doprinos ove disertacije ogleda se u selekciji prirodnih izolata mikroorganizama koji poseduju željena svojstva u procesu kompostiranja i koji svojim produktima metabolizma dodatno mogu obogatiti nutritivnu vrednost samog komposta, i smanjiti period razlaganja otpada sa oko 6 meseci do 2,5 meseca. Kao krajnji proizvod očekuje se dobijanje visokokvalitetnog komposta koji bi se koristio kao organsko đubrivo, bogato hranljivim materijama, za poboljšanje strukture zemljišta i povećanje produktivnosti zemljišta.

Odabrane mešane mikrobiološke kulture se mogu upotrebljavati za tretman tokom inokulacije zemljišta pri gajenju uljanih vrsta uljanog lana i crnog kima. Primena različitih koncentracija izabranih sojeva *Streptomyces*, *Paenibacillus* i *Himenobacter* se ogleda u poboljšanju nutritivnih i funkcionalnih svojstava masnih ulja iz semena ovih biljaka kroz povećan sadržaj esencijalnih masnih kiselina naročito omega-3, povećanje antioksidativne aktivnosti i sadržaja polifenolnih jedinjenja.

## LITERATURA

- Abdel-Ghany B. F., Arafa Rawhia A. M., El-Rahmany T. A., El-Shazly M. M. Effect of Some Soil Microorganisms on Soil Properties and Wheat Production under North Sinai Conditions, *Journal of Applied Sciences Research*. 2010, 4(5), 559–579.
- Abdel-Aziez S. M., Eweda W. E., Girgis M. G. Z., Abdel-Ghany B. F. Improving the productivity and quality of black cumin (*Nigella sativa*) by using Azotobacter as N<sub>2</sub> biofertilizer. *Annals of Agricultural Sciences*. 2014, 59(1), 95–108.
- Abdolrahimi B., Mehdikhani P., Tappe A. H. G. The effect of harvest index, yield and yield components of three varieties of black seed (*Nigella sativa*) in different planting densities. *International Journal of Agricultural Sciences*. 2012, 2, 93–10.
- Adams R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry, 4th Ed., Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA. 2007.
- Aharon O. The Genera Rhodothermus, Thermonema, Hymenobacter and Salinibacter, *Prokaryotes*. 2006, 712–738.
- Ahmad A., Husain A., Mujeeb M., Khan, S. A., Najmi A.K., Siddique N.A., Damanhour Z.A., Anwar F. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific Journal of tropical biomedicine*. 2013, 3(5), 337–352.
- Albalasmeh A. A., Berhe A. A., Ghezzehei T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry, *Carbohydrate Polymers*. 2013, 97(2), 253–261.
- Al-Turki AI Quality assessment of commercially produced composts in Saudi Arabia market. *International Journal of Agricultural Research*. 2010, 5, 70–79.
- Anastasi A., Varese G. C., Marchisio V. F. Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia*. 2005, 97, 33–44.
- Anwar Z., Gulfraz M., Irshad M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bioenergy: A brief review. *Jurnal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2014, 7(2), 163–173.
- AOAC Official methods of analysis: association of official analytical chemist, EUA. In. 2000.

- Arafa Rawhia A. M., Abdel-Ghany B. F., Sidkey M. N., ElShazly, M. M. The Beneficial Use of Biofertilizers on Growth and yield of Wheat Plants Grown on Sandy Soil with or Without Nitrogen fertilization. *Egyptian Journal of biotechnology*. 2009, 32, 127–146.
- Armstrong D. C. Role of phosphorus in plants in: Better Crops with Plant Food. Potash and phosphate institute, Atlanta USA, 1988.
- Ash C., Farrow J., Wallbanks S., Collins M. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*. 1991, 13, 202–206.
- Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System software (AMDIS ver. 2.64.), National Institute of Standards and Technology (NIST), Standard Reference Data Program, Gaithersburg, MD (USA).
- Avakyan Z. A., Pivovarova T. A., Karavaiko G. I. Properties of a New Species, *Bacillus mucilaginosus*, *Microbiology*. 1986, 55, 477–482.
- Bamosa A. O., Ali B. A., Sowayan S. A. Effect of oral ingestion *Nigella sativa* seeds on some blood parameters. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 1997, 5, 126–129.
- Bashan Y. Potential Use of *Azospirillum* as Biofertilizer, *Turrialba*. 1993, 43, 286–291.
- Bashan Y., Holguin G. Inter-root movement of *Azospirillum brasilense* and subsequent root colonization of crop and weed seedlings growing in soil. *Microbial Ecology*. 1995, 29, 269–281.
- Bashan Y., Levanony H. Current Status of *Azospirillum* Inoculation Technology: *Azospirillum* as a Challenge for Agriculture, *Canadian Journal of Microbiology*. 1990, 36, 591–608.
- Benito M., Masaguer A., Moliner A., Arrigo N., Palma R. M. Chemical and microbiological parameters for the characterization of the stability and maturity of pruning waste compost. *Biology and Fertility of Soils*. 2003, 37, 184–189.
- Benizri E., Baudoin E., Guckert A., Root colonization by inoculated plant growth rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*. 2001, 11, 557–574.
- Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 84, 11–18.
- Berg G., Krechel A., Ditz M., Sikora R. A., Ulrich A., Hallmann J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic

- function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*. 2005b, 51, 215–229.
- Bernal M. P., Paredes C., Sanchez-Monedero M. A., Cegarra J. Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes. *Bioresource Technology*. 1998, 63, 91–99.
- Bernatoniene J., Masteikova R., Davalgiene J., Peciura R., Gauryliene R., Bernatoniene R., Majiene D., Lazauskas R., Civinskiene G., Velziene S., Muselik J., Chalupova Z. Topical application of *Calendula officinalis* (L.), Formulation and evaluation of hydrophilic cream with antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011, 5(6), 868–877.
- Borkar S. G. *Microbes as Biofertilizers and their Production Technology*, Woodhead Publishing India, New Delhi. 2015.
- Bhardwaj D., Ansari M. W., Sahoo R. K., Tuteja N. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*. 2014, 13, 1–10.
- Bremner J. M., Keeney D. R. Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite, *Analytica Chimica Acta*. 1965, 32(0), 485–495.
- Buckle A. M., Schreiber G, Fersht AR. “Protein-protein recognition: crystal structural analysis of a barnase-barstar complex at 2.0-Å resolution“. *Biochemistry*. 1994, 33(30), 8878–8889.
- Burd G., Dixon D. G., Glick B. R. Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology*. 2000, 46, 237–245.
- Burits M., Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*. 2000, 14, 323–328.
- Burns R. G., DeForest J. L., Marxsen J., Sinsabaugh R. L., Stromberger M. E., Wallenstein M. D., Weintraub M. N., Zoppini A. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*. 2013, 58, 6–234.
- Burr T. J., Caesar A. Beneficial plant bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences* 1984, 2, 1–20.
- Caldwell B. A., Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia*. 2005, 49, 637–644.
- Castaldi P., Alberti G., Merella R., Melis P. Study of the organic matter evolution during

- municipal solid waste composting aimed at identifying suitable parameters for the evaluation of compost maturity. *Waste Management*. 2005, 25, 209–213.
- Chen J. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. International Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use. 16–20. October, Thailand. 2006.
- Chen X. H., Koumoutsis A., Scholz R., Eisenreich A., Schneider K., Heinemeyer I., Morgenstern B., Voss B., Hess W.R., Reva O., Junge H., Voigt B., Jungblut P.R., Vater J., Süßmuth R., Liesegang H., Strittmatter A., Gottschalk G., Borriss R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*. 2007, 25, 1007–1014.
- Chodak M., Niklińska M. Effect of Texture and Tree Species On Microbial Properties of Mine Soils. *Applied Soil Ecology*. 2010, 46, 268–275.
- Choi K. Optimal operating parameters in the composting of swine manure with wastepaper. *Journal of Environmental Science and Health. Part B*. 1999, 34(6), 975–987.
- Christian A. H., Evanylo G. K., Green R. Compost: what is it and what's it to you? *Virginia Cooperative Extension Service Publication*. 1997, 452–231.
- Compant S., Kaplan H., Sessitsch A., Nowa J., Ait Bark E., Clément C. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiology Ecology*. 2008a, 63, 84–93.
- Compant S., Reiter B., Sessitsch A., Nowak J., Clément C., Ait Barka E. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005b, 71, 1685–1693.
- Compost Maturity Index, California Compost Quality Council, Nevada City, CA, 2001.
- Conti M., Arrigo N., Marelli H. Relationship of soil carbon light fraction, microbial activity, humic acid production and nitrogen fertilization in the decaying process of corn stubble. *Biology and Fertility of Soils*. 1997, 25, 75–78.
- Crawford D. L., Lynch J. M., Whipps J. M., Ousley M. A. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993, 59, 3899–3905.
- Crawford J. H. Composting of agricultural wastes – a review. *Process Biochemistry* 1983, 16, 14–18.
- Das K., Keener H. M. Process control based on dynamic properties in composting, moisture and compaction considerations. *The Science of Composting*. 1996, 116–125.

- De Souza R., Meyer J., Schoenfeld R., da Costa P. B., Passaglia L. M. P. Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with rice cropped in iron-stressed soils. *Annals of Microbiology*. 2014, 65, 951–964.
- Delker C., Raschke A., Quint M. Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta*. 2008, 227, 929–941.
- Dixon R. A., Paiva N. L., Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*. 1995, 7, 1085.
- Dobbelaere S., Vanderleyden J., Okon Y. Plant growthpromoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 2003, 22, 107–149.
- Egamberdiyeva D. D., Juraeve S., Poberejskaya O., Myachina P. T., Eryuhova L., Seydalieva, A. Aliev. Improvement of wheat and cotton growth and nutrient uptake by phosphate solubilizing bacteria. 26th Southern Conversation Tillage Conference. 2000.
- Eiland F., Klamer M., Lind A.-M., Leth M., Baath E. Influence of Initial C / N Ratio on chemical and Microbial Composition during Long Term Composting of Straw. *Microbiology Ecology*. 2001, 41, 272–280.
- Erickson M. C., Liao J., Ma L., Jiang X., Doyle M. P. Inactivation of Salmonella spp. In crow manure composts formulated to different initial C:N ratios. *Bioresource Technology*. 2009, 100, 5898–5903
- Errakhi R., Bouteau F., Lebrihi A., Barakate M. Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2007, 23, 1503–1509.
- Filipović V., Popović V., Glamočlija Đ., Jaramaz M., Jaramaz D., Anđelović S., Tabaković M. Genotype and soil type Influence on morphological characteristics, yield and oil content oil-flax. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2014, 20(1), 89–96.
- Forster J., Zech W., Würdinger E. Comparison of chemical and microbiological methods for the characterization of the maturity of composts from contrasting sources. *Biology and Fertility of Soils*. 1993, 16(2), 93–99.
- Fourti O., Jedidi N., Hassen A. Comparison of methods for evaluating stability and maturity of co-composting of municipal solid wastes and sewage sludge in semi-arid pedo-climatic condition. *Natural Science*. 2011, 3(2), 124–135.

- Fürnkranz M., Adam E., Müller H., Grube M., Huss H., Winkler J. Promotion of growth, health and stress tolerance of Styrian oil pumpkins by bacterial endophytes. *European Journal of Plant Pathology*. 2012, 134, 509–519.
- Gaind S., Nain L., Patel V. B. Quality evaluation of co-composted wheat straw, poultry droppings and oil seed cakes. *Biodegradation*. 2009, 20, 307–317.
- Gamalero E., Lingua G., Berta G., Lemanceau P. Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. *Agronomie*. 2003, 23, 407–418.
- Gandora V., Gupta R. D., Bhardwaj K. K. R. Abundance of *Azotobacter* in Great Soil Groups of North-West Himalayas, *Journal of the Indian Society of Soil Science*. 1998, 46(3), 379–383.
- Glamočlija Đ., Janković S., Popović V., Filipović V., Kuzevski J., Ugrenović V. Alternativne ratarske biljke u konvencionalnom i organskom sistemu gajenju. Institut za primenu nauke u poljoprivredi, Beograd, Srbija, 2015.
- Glathe H., Thalmann D. Über die mikrobielle Aktivität und ihre Beziehungen zu Fruchtbarkeitsmerkmalen einiger Ackerböden unter besonderer Berücksichtigung der Dehydrogenaseaktivität (TTC Reduktion) III. Mikrobiologische Untersuchungen an Proben von Freilandversuchen auf Bieden mit unterschiedlichen Fruchtbarkeitsmerkmale. *Z. Bakteriologie*. 1970, 124(1), 37–55.
- Glick B. R. The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 1995, 41, 109–117.
- Grady E. N., MacDonald J., Liu L., Richman A., Yuan Z.-C. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*. 2016, 15, 203.
- Gray E. J., Smith D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*. 2005, 37, 395–412.
- Gu Y., Wag P., Kong C. Urease, Invertase, Dehydrogenase and Polyphenoloxidase Activities In Paddy Soils Influenced By Allelopathic Rice variety. *European Journal of Soil Biology*. 2009, 45, 436–441.
- Gunstone F. D., Norris F. *Lipids in Foods: Chemistry, Biochemistry and Technology*, Pergamon Press, Oxford, England, 1983.
- Gunstone F. D., Harwood J. L., Dijkstra A. J. *The Lipid Handbook with CDROM, Third Edition*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2007b.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods in Enzymology*. 1990, 186, 1–85.

- Hallmann J. Plant interactions with endophytic bacteria. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom, 2001.
- Hallmann J., Berg B. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. Springer, Berlin Heidelberg, 2007.
- Hardoim P. R., van Overbeek L. S., Elsas J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*. 2008, 16, 463–471.
- Harper C. R., Edwards M. J., DeFilippis A. P., Jacobson T. A. Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty acids in humans. *Journal of Nutrition* 2006, 136, 83–87.
- Haug R. T. The Practical Handbook of Compost Engineering. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1993.
- Hayat R., Ahmed I., Sheirdil R. A. An overview of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. Springer, Berlin, 2012.
- Hellmann B., Zelles L., Palojarvi A., Bai Q. Emission of climaterlevant trace gases and succession of microbial communities during open-windrow composting. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997, 63, 1011–1018.
- Hertlein G., Müller S., Garcia-Gonzalez E., Poppinga L., Süßmuth R. D., Genersch E. Production of the catechol type siderophore bacillibactin by the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLOS ONE*. 2014, 9 (9), e108272.
- <http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/carbohydrates.htm>.
- <https://www.indiamart.com/proddetail/bacillus-amyloliquefaciens-11427341691.html>
- Huang X. F., Chaparro J. M., Reardon K. F., Zhang R., Shen Q., Vivanco J. M. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*. 2014, 92, 267–275.
- Hubbe M. A., Nazhad M., Sánchez C. Composting as a way to convert cellulosic biomass and organic waste into high-value soil amendments: A review. *Bioresources*. 2010, 5(4), 2808–2854.
- Hue N. V., Liu J. Predicting compost stability. *Compost Science and Utilization*. 1995, 3, 8–15.
- Hulshof K. F., van Erp-Baart M. A., Anttolainen M., Becker W., Church S. M., Couet C. Intake of fatty acids in western Europe with emphasis on trans fatty acids: the TRANSFAIR Study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 1999, 53, 143–57.
- Iannotti D. A., Pang T., Toth B. L., Elwell D. L., Keener H. M., Hoitink H. A. J. A quantitative respirometric method for monitoring compost stability. *Compost Science and Utilization*. 1993, 1, 52–65.



- IARI, Microorganisms in the Conversion of Agricultural Wastes to Compost, Division of Microbiology, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, 2013.
- Iglesial-Jimenez E., Perez-Garcia V. Determination of maturity indices for city refuse composts. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 1992, 38, 331–343.
- Inbar Y., Hadar Y., Chen Y. Recycling of cattle manure: the composting process and characterization of maturity. *Journal of Environmental Quality*, 1993, 22, 857–863.
- Innis S. M., Elias S. L. Intakes of essential n – 6 and n – 3 polyunsaturated fatty acids among pregnant Canadian women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003, 77, 473–478.
- ISO standard 23753-1
- James E. K., Gyaneshwar P., Manthan N., Barraquio W. L., Reddy P. M., Ianetta P. P. M., Olivares F. L., Ladha J. K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2002, 15, 894–906.
- Janssen P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72, 1719–1728.
- Kannaiya S. Biofertilizer Technology and Quality Control, Publication Directorate, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India, 2000, 256.
- Kendereški S. Osnovi enzimologije, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 1986.
- Khan A. G. Role of soil microbes in the rhizosphere of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2005, 18, 355–364.
- Khan M., Ueno K., Horimoto S., Komai F., Tanaka K., Ono Y. Physicochemical, including spectroscopic, and biological analyses during composting of green tea waste and rice bran. *Biology and Fertility of Soils*. 2009, 45(3), 305–313.
- Khan M. B., Yasir T. A., Aman M. Growth And Yield Comparison Of Different Linseed (*L. usitatissimum* L) Genotypes Planted At Different Row Spacing. *International Journal of Agriculture & Biology*. 2005, 7, 515–517.
- Khosravi H., Rastin N. S. Mohammadi M. Effect of *Azotobacter* inoculation as a biological fertilizer on growth and yield of wheat. *Soil and Water Journal*. 1998, 12, 6(1-8), 111.
- Kiralan M., Özkan G., Bayrak A. Ramadan M. F., Physicochemical properties and stability of black cumin (*Nigella sativa*) seed oil as affected by different extraction methods. *Industrial Crops and Products*. 2014, 57, 52–58.

- Kirchmann H., Widen P. Separately collected organic household wastes. *Swedish Journal of Agricultural Research*. 1994, 24, 3–12.
- Kloepper J. W., Schroth M. N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Gibert-Clarey Tours*. 1978.
- Knežević-Jugović Z. *Enzimsko inženjerstvo*. Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 1998.
- Koli S. A. Effect of variety and plant spacing on seed yield and yield attributes of black cumin (*Nigella sativa* L.). Master thesis. Department of Agricultural Botany, Sher-e-Bangla Agricultural University (SAU), Dhaka, Bangladesh, 2013.
- Komilis D. P., Tziouvaras I. S. A statistical analysis to assess the maturity and stability of six composts. *Waste Management*. 2009, 29(5), 1504–1513.
- Kris-Etherton P. M., Taylor D. S., Yu-Poth S., Huth P., Moriarty K., Fishell V. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000, 71, 179–188.
- Kumar V., Singh K. P. Enriching vermicompost by nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Bioresource Technology*. 2001, 76, 173–175.
- Kuroshima K., Sakane T., Takata R., Yokota A. *Bacillus ehimensis* sp. nov. and *Bacillus chitinolyticus* sp. nov., New Chitinolytic Members of the Genus *Bacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1996, 46, 76–80.
- Lajšić S., Grujić-Injac B. Hemija prirodnih proizvoda, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 1998.
- Lal S., Tabacchioni S. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. *Indian Journal of Microbiology*. 2009, 49, 2–10.
- Lepš J., Šmilauer P. *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO*. Cambridge University Press, Cambridge. 2003.
- Li Y. F. The Characteristics and Function of Silicate Dissolving Bacteria Fertilizer, *Soil and Fertilizer*. 1994, 2, 48–49.
- López-González J. A., Suárez-Estrella F., Vargas-García M. C., López M. J., Jurado M. M., Moreno J. Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: Studies upon its structure, functionality and biodiversity. *Bioresource Technology*. 2015, 175(0), 406–416.
- Loria R., Kers J., Joshi M. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annual Review of Phytopathology*. 2006, 44, 469–487.
- Lucas G. J. A., Probanza A., Ramos B., Colon Flores J. J., Gutierrez Manero F. J. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) on biological nitrogen fixation,

- nodulation and growth of *Lupinus albus* I. cv. Multolupa. *Engineering in Life Sciences*. 2004, 7, 1–77.
- Lugtenberg B., Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 2009, 63, 541–556.
- Machmudah S., Shiramizu Y., Goto M., Sasaki M. Hirose T., Extraction of *Nigella sativa* L. using Supercritical CO<sub>2</sub>: A Study of Antioxidant Activity of the Extract. *Separation Science and Technology*. 2015, 40, 1267–1275.
- Maier A., Riedlinger J., Fiedler H.-P., Hampp R. Actinomycetales bacteria from a spruce stand: characterization and effects on growth of root symbiotic, and plant parasitic soil fungi in dual culture. *Mycological progress*. 2004, 3, 129–136.
- Martyniuk S., Maryniuk M. Occurrence of *Azotobacter* Spp. in Some Polish Soil, *Polish Journal of Environmental Studies*, 2003, 12(3), 371–374.
- Mathur S. P., Owen G., Dinel H., Schnitzer M. Determination of compost biomaturity. I. Literature review. *Biological Agriculture and Horticulture*. 1993, 10, 87–108.
- Mehta C. M., Palni U., Franke-Whittle I. H., Sharma A. K. Compost: Its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. *Waste Management*. 2014, 34, 607–622.
- Menounos P., Staphylakis K., Gegiou D. The sterols of *Nigella sativa* seed oil. *Phytochemistry*. 1986, 25(3), 761–763.
- Meunchang S., Panichsakpatana S., Weaver R. Inoculation of sugar mill by-products compost with N<sub>2</sub>-fixing bacteria. *Plant and Soil*. 2005, 271, 219–225.
- Mihajlovski K., Carević M., Dević M., Šiler-Marinković S., Rajilić-Stojanović M., Dimitrijević-Branković S. Lignocellulosic waste material as substrate for Avicelase production by a new strain of *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2015, 104, 426–434.
- Milutinović M. D., Šiler-Marinković S. S., Antonović D. G., Mihajlovski K. R., Pavlović M. D., Dimitrijević-Branković S. I. Antioksidativna svojstva sušenih ekstrakata iz otpadne espresso kafe, *Hemijska Industrija*. 2013, 67(2), 261–267.
- Moeskops B., Buchan D., Sleutel S., Herawaty L., Husen E., Saraswati R., Setyorini D., De Neve S. Soil Microbial Communities and Activities Under Intensive Organic and Conventional Vegetable Farming In West Java, Indonesia. *Applied Soil Ecology*. 2010, 45, 112–120.
- Mohtashami A., Entezari M. H. Effects of *Nigella sativa* supplementation on blood parameters and anthropometric indices in adults: A systematic review on clinical trials. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2016, 21(1), 1–9.

- Moldes A., Vázquez M., Domínguez J., Díaz-Fierros F., Barral M. Evaluation of mesophilic biodegraded grape marc as soil fertilizer. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2007, 141(1), 27–36.
- Nakasaki K., Yaguchi H., Sasaki Y., Kubota H. Effect of pH control composting of garbage. *Waste Management and Research*. 1993, 11(2), 117–25.
- Neklyudov D., Fedotov G. N., Ivankin A. N. Intensification of Composting Processes by Aerobic Microorganisms: A Review, Moscow State Forest University, 2006.
- Nergiz, C., Ötles, S. Chemical composition of *Nigella sativa* L. seeds. *Food chemistry*. 1993, 48(3), 259–261.
- Novinsak A., Surette C., Allain C., Filion M. Application of molecular technologies to monitor the microbial content of biosolids and composted biosolids. *Water Science and Technology*. 2008, 57, 471–477.
- O'Brien R., Farr W., Wan P. Introduction to Fats and Oils Technology (second edition). AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 2000.
- Okon Y., Labandera-Gonzalez C. Agronomic Applications of *Azospirillum*: An Evaluation of 20 Years Worldwide Field Inoculation, *Soil Biology and Biochemistry*. 1994, 26, 1591–1601.
- Ollis T. E., Meyer B. J., Howe P. R. Australian food sources and intakes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 1999, 43, 346–55.
- Oomah D. B. Flaxseed as a functional food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2001, 81, 889–894.
- Orhan D. D., Hartevioğlu A., Küpeli E. Yesilada E. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits. *Journal of ethnopharmacology*. 2007, 112, 394–400.
- Parham J. A., Deng S. P. Detection, quantification and characterization of  $\beta$ -glucosaminidase activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 2000, 32, 1183–1190.
- Patten C. L., Blakney A. J. C., Coulson T. J. D. Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. 2013, 39, 395–415.
- Paulsen I. T., Press C. M., Ravel J., Kobayashi D. Y., Myers, G. S. A., Mavrodi D. V., DeBoy R. T., Seshadri R., Ren Q., Madupu R., Dodson R. J., Durkin A. S., Brinkac L. M., Daugherty S. C., Sullivan S. A., Rosovitz M. J., Gwinn M. L., Zhou L., Schneider

- D. J., Cartinhour S. W., Nelson W. C., Weidman J., Watkins K., Tran K., Khouri H., Pierson E. A., Pierson III L. S., Thomashow L. S., Loper, J. E. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology*. 2005, 23, 873–878.
- Pedro M. S., Haruta S., Nakamura K., Hazaka M., Ishii M., Igarashi Y. Isolation and characterization of predominant microorganism during decomposition of waste materials in a field-scale composter. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2003, 95, 368–373.
- Pengilly N. L. Traditional food and medicinal uses of, axseed. Flax: the genus *Linum*. Springer-Verlag. Berlin, 2003, 252–267.
- Piletić M. V., Milić B. Lj. Organska hemija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, 1989.
- Piras A., Rosa A., Marongiu B., Porcedda S., Falconieri D., Dessì M. A., Ozcelik B., Koca U. Chemical composition and in vitro bioactivity of the volatile and fixed oils of *N. sativa* L. extracted by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*. 2013, 46, 317–323.
- Poole E. J., Bending G. D., Whipps J. M., Read D. J. Bacteria associated with *Pinus sylvestris*–*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation in vitro. *New Phytologist*. 2001, 151, 743–751.
- Poonam S. nee' N., Ashok P. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation. Springer, Berlin Heidelberg, 2009.
- Pospišil M., Pospišil A., Butorac J., Škevin D., Kraljić K., Obranović M., Brčić M. Yield and yield components of investigated linseed cultivar in Northwest Croatia. In *46th Croatian and 6th International Symposium on Agriculture*. Opatija, Croatia, 2011, 728–731.
- Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A. Bacteria: The high G+ C Gram Positives. The McGraw-Hill Companies, New York, 2002.
- Priest F. G., Goodfellow M., Shute L. A., Berkeley R. C. W. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov. nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1987, 37, 69–71.
- Quilchano C., Maraňon T. Dehydrogenase Activity In Mediterranean Forest Soils. *Biology & Fertility of Soils*. 2002, 35, 102–107.

- Raaijmakers J. M., Paulitz T. C., Steinberg C., Alabouvette C., Moëgne-Loccoz Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*. 2008, 321, 341–361.
- Rahimi M., Zarei M. A., Arminian A. Selection criteria of flax (*L. usitatissimum* L) for seed yield, yield components and biochemical compositions under various planting dates and nitrogen. *African Journal of Agricultural Research*. 2011, 6(13), 3167–3175.
- Ramadan M. F., Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.): an overview. *International Journal of Food Science & Technology*. 2007, 42, 1208–1218.
- Ranalli G., Botturea G., Taddei P., Garavni M., Marchetti R., Sorlini G. Composting of solid and sludge residues from agricultural and food industries bioindicators of monitoring and compost maturing. *Journal of Environmental Science and Health*. 2001, 36, 415–436.
- Randhawa M. A. Black seed, *Nigella sativa*, deserves more attention. *Journal of Ayub Medical College*. 2008, 20, 1–2.
- Randhawa M. A., Alghamdi M. S. Anticancer activity of *Nigella sativa* (black seed) – a review. *The American journal of Chinese medicine*. 2011, 39(06), 1075–1091.
- Rashad F. M., Saleh W.D., Moselhy M. A. Bioconversion of rice straw and certain agro-industrial wastes to amendments for organic farming systems: 1. Composting, quality, stability and maturity indices. *Bioresource Technology*. 2010, 101(15), 5952–5960.
- Raza W., Shen Q. Growth, Fe<sup>3+</sup> reductase activity, and siderophore production by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 under differential iron conditions. *Current Microbiology*. 2010, 61, 390–395.
- Reverchon E., De Marco I. Supercritical extraction and fractionation of natural matter, *Journal of Supercritical Fluids*. 2006, 38, 146–166.
- Ristić M., Vuković M. Upravljanje čvrstim otpadom – Tehnologije prerade i odlaganja čvrstog otpada, Tehnički fakultet u Boru, Univerzitet u Beogradu, 2006.
- Roberts C. Feeding the world on fish. [http://www.fhf.org.uk/meetings/meet\\_2010/2010-03-16\\_roberts.pdf](http://www.fhf.org.uk/meetings/meet_2010/2010-03-16_roberts.pdf). (pristupljeno 06/11/2014).
- Ros M., Hernandez M., Garcia C. Soil Microbial Activity After Restoration of a Semiarid Soil By Organic Amendments. *Soil Biology & Biochemistry*. 2003, 35, 463–469.
- Rubin E. M. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 2008, 454 (7206), 841–845.

- Saidi N., Cherif M., Jedidi N., Fumio M., Boudabous A., Hassen A. Evolution of biochemical parameters during composting of various waste compost. *African Journal of Science and Research*. 2008, 4, 332–341.
- Said-Pullicino D., Erriquens F. G., Gigliotti G. Changes in the chemical characteristics of water-extractable organic matter during composting and their influence on compost stability and maturity. *Bioresource Technology*. 2007, 98(9), 1822–1831.
- Salazar S., Sanchez L., Alvarez J., Valverde A., Galindo P., Igual J., Peix A., Santa-Regina I. Correlation Among Soil Enzyme Activities Under Different Forest System Management Practices. *Ecological Engineering*. 2011, 37, 1123–1131.
- Sanmanee N., Panishkan K., Obsuwan K., Dharmvanij S. Study of compost maturity during humification process using UVspectroscopy. *Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology*. 2011, 80, 403–405.
- Schippers B., Scheffer R. J., Lugtenberg B. J. J., Weisbeek P. J. Biocoating of seed with plant growth promoting rhizobacteria to improve plant establishment. *Outlook on Agriculture*. 1995, 24, 179–185.
- Schloss P. D., Hay A. G., Wilson D. B., Walker L.P. Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting. *FEMS Microbiology Ecology*. 2003, 46, 1–9.
- Schulze K. L. Continuous thermophilic composting. *Journal of Applied Microbiology*. 1962, 10, 108–22.
- Sessitsch A., Reiter B., Pfeifer U., Wilhelm E. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*. 2002, 39, 23–32.
- Sharma S. B., Sayyed R. Z., Trivedi M. H., Gobi T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*. 2013, 2, 1.
- Shuler M., Kargi F. *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. Prentice-Hall Incorporation, Englewood Cliffs, New Jersey, USA, 2001.
- Simopoulos A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2002, 56, 365–379.
- Siqueira C. F. d. Q., Cabral D. L. V., Peixoto Sobrinho T. J. d. S., de Amorim E. L. C., de Melo J. G., Araújo T. A. d. S., de Albuquerque U. P. Levels of Tannins and Flavonoids in Medicinal Plants: Evaluating Bioprospecting Strategies. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, 7.

- Skibola C. F., Smith M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake, *Free Radical Biology and Medicine*. 2000, 375–383.
- Steger K., Sjogren A. M., Jarvis A., Jansson J. K., Sundh I. Development of compost maturity and Actinobacteria populations during full-scale composting of organic household waste. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, 103, 487–498.
- Stewart I., Falconer I. R. Cyanobacteria and Cyanobacterial Toxins. Academic Press. 2008.
- Sultana S., Muhammad A. F., Akhtar N., Iqbal A., Nazar H., Ur Rehman R. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2015, 4(4), 103–160.
- Tam N. F. Y., Tiquia S.M. Assessing toxicity of spent pig litter using a seed germination technique. *Resources Conservation and Recycling*. 1994, 11, 261–274.
- Tandon H. L. S. Phosphorus Research and Agriculture Production in India, Fertilizer development and consultation organization, New Delhi, 1987, 160.
- Tebeka I. R., Silva A. G., Petri D. F. Hydrolytic activity of free and immobilized cellulase, *Langmuir*. 2009, 25, 1582–1587.
- Theodorou M. E., Plaxton W. C. Metabolic Adaptations of Plant Respiration to Nutritional Phosphate Deprivation, *Plant Physiology*. 1993, 101, 339–344.
- Thompson W. H., Leege P. B., Millner P. D., Watson M. E. Test Methods for the Examination of Composting and Compost. The United States Composting Council Research and Education Foundation, The United States Department of Agriculture, USA, 2001.
- Tisdale S. L., Nelson W. L., Beaton J. D. Soil Fertility and Fertilizers, MacMillan Publ., New York, 1985, 754.
- Tiquia S. M., Tam N. F. Y. Characterization and composting of poultry litter in forced-aeration piles. *Process Biochemistry*. 2002, 37, 869–880.
- Tiquia S. M., Tam N. F. Y., Hodgkiss I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution*. 1996, 93, 249–256.
- Tokala R. K., Strap J. L., Jung C. M., Crawford D. L., Salove M. H., Deobald L. A., Bailey J. F., Morra M. J. Novel plant–microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68, 2161–2171.
- Toncer O., Kizil S. Effect of seed rate on agronomic and technologic characters of *N. sativa* L. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2004, 6(3), 529–532.
- Trajković J., Mirić M., Baras J., Šiler S. Analize životnih namirnica, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 1983, 96–98.



- U.S. Composting Council, Dehydrogenase. In: Legee P. B., Thompson W. H. Test methods for the examination of composting and compost. U.S. Composting Council, Bethesda, Md. 1997.
- Umsakul K., Dissara Y., Srimuang N. Chemical physical and microbiological changes during composting of the water hyacinth. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2010, 13, 985–992.
- van Loon L. C., Bakker P. A. H. M. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2005.
- Vessey J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*. 2003, 255, 571–586.
- Weaver M., Zablotowicz R., Krutz L., Bryson C., Locke M. Microbial and Vegetative Changes Associated With Development of a Constructed Wetland. *Ecological Indicators*. 2012, 13, 37–45.
- Welbaum G., Sturz A. V., Dong Z., Nowak J. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2004, 23, 175–193.
- Wen Y., Wu X., Teng Y., Qian C., Zhan Z., Zhao Y. Identification and analysis of the gene cluster involved in biosynthesis of paenibactin, a catecholate siderophore produced by *Paenibacillus elgii* B69. *Environmental Microbiology*. 2011, 13, 2726–2737.
- Włodarczyk T., Stępniewski W., Brzezińska M. Dehydrogenase Activity, Redox Potential, and Emissions of Carbon Dioxide and Nitrous Oxide From Cambisols Under Flooding Conditions. *Biology & Fertility of Soils*, 2002, 36, 200–206.
- Wolińska A., Bennicelli R. Dehydrogenase Activity Response to Soil Reoxidation Process Described as Varied Condition of Water Potential, Air Porosity and Oxygen Availability. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2010, 19, 651–657.
- Wolińska A., Stępniewska Z. Dehydrogenase Activity in the Soil Environment. Dehydrogenases, InTech, United Kingdom, 2012.
- Wolińska A., Stępniewska Z. Microorganisms Abundance and Dehydrogenase Activity As a Consequence of Soil Reoxidation Process, Research Singpost, Kerala, India, 2011.
- World Health Organisation. Population nutrient intake goals for preventing dietrelated chronic diseases. [http://www.who.int/nutrition/topics/5\\_population\\_nutrient/en/index13.html](http://www.who.int/nutrition/topics/5_population_nutrient/en/index13.html). (pristupljeno 06/11/2014).
- Wu L., Ma L. Q. Effects of sample storage on biosolids compost stability and maturity evaluation. *Journal of Environmental Quality*. 2001, 30, 222–228.

- Wu L., Ma L. Q., Martinez G. A. Comparison of methods for evaluating stability and maturity of biosolids compost. *Journal of Environmental Quality*. 2000, 29, 424–429.
- Xiao K., Samac D. A., Kinkel L. L. Biological control of Phytophthora root rots on alfalfa and soybean with Streptomyces. *Biological Control*. 2002, 23, 285–295.
- Xu Q., Adney W., Ding S.-Y., Michael H. *Cellulases For Biomass Conversion*, in *Industrial Enzymes*. Springer Netherlands, 2007, 35–50.
- Yadav K. S., Singh D. P., Sunita S., Neeru N., Lakshminarayana K., Suneja S., Narula N. Effect of *Azotobacter chroococcum* on yield and nitrogen economy in wheat (*Triticum aestivum*) under field conditions. *Environment-and-Ecology*. 2000, 18(1), 109–113.
- Yu L. L., Zhou K. K., Parry J. Antioxidant properties of cold-pressed black caraway, carrot, cranberry, and hemp seed oils. *Food Chemistry*. 2005, 91, 723–729.
- Yuan W. M., Crawford D. L. Characterization of Streptomyces lydicus WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995, 61, 3119–3128.
- Yuan B., Yue D. Soil Microbial and Enzymatic Activities Across a Chronosequence of Chinese Pine Plantation Development On The Loess Plateau of China. *Pedosphere*. 2012, 22, 1–12.
- Zahir Z. A., Arshad M., Frankenberger W. T. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy*. 2004, 81, 97–168.
- Zajac T. O. A., Klimek-Kopyra A., Kulig B. Biological determinants of plant and crop productivity of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Acta Agrobotanica*. 2012, 65(4), 3–14.
- Zaoui A., Cherrah Y., Mahassini N., Alaoui K., Amarouch H., Hassar M. Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine*. 2002, 9(1), 69–74.
- Zeinhom E. A., Elhadary R., Elashry A. Integrating GIS and MCDM to deal with landfill site selection. *International Journal of Engineering and Technology*. 2010, 10, 32–42.
- Zeng G., Yu Z., Chen Y., Zhang J., Li H., Yu M., Zhao M. Response of compost maturity and microbial community composition to pentachlorophenol (PCP)-contaminated soil during composting. *Bioresource Technology*. 2011, 102, 5905–5911.
- Zhang Y.-H. P., Himmel M. E., Mielenz J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology advances*. 2006, 24(5), 452–481.
- Zhang Y.-H. P., Lynd L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non complexed cellulase systems. *Biotechnology and bioengineering*. 2004, 88(7), 797–824.

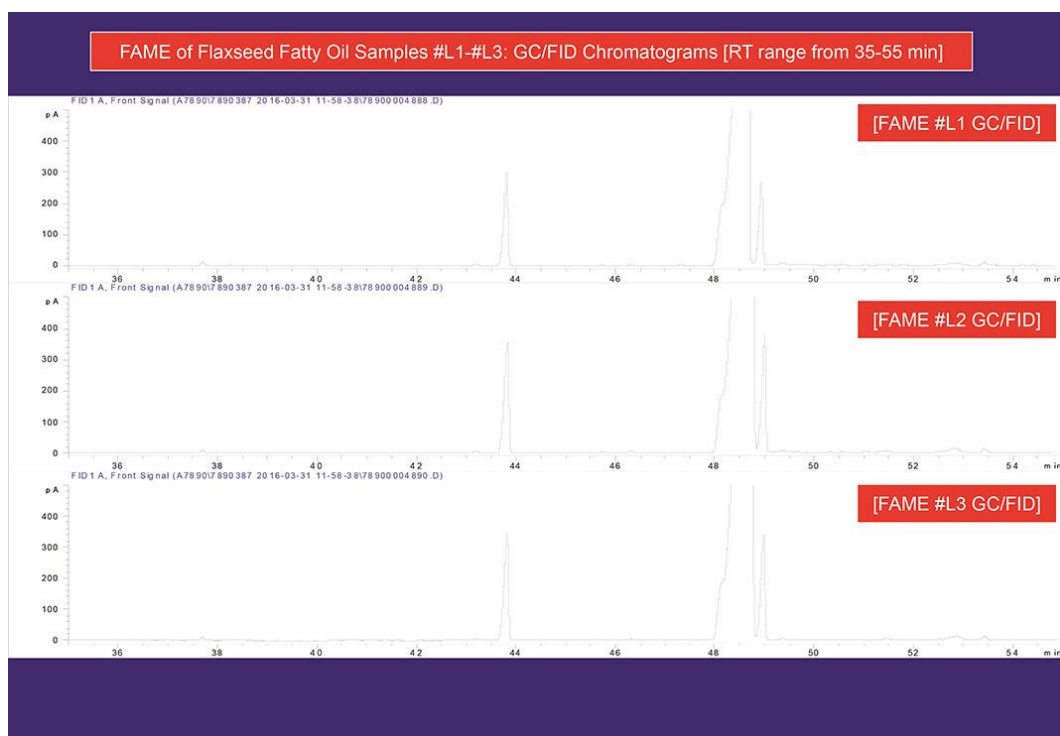
- Zhao B., Chen J., Zhang J., Qin S. Soil Microbial Biomass and Activity Response To Repeated Drying-Rewetting Cycles Along a Soil Fertility Gradient Modified By Long-Term Fertilization Management Practices. *Geoderma*. 2010, 160, 218–224.
- Zuconi F., Pera A., Forte M., deBertoldi M. Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle*. 1981, 22, 54–57.

# PRILOG 1

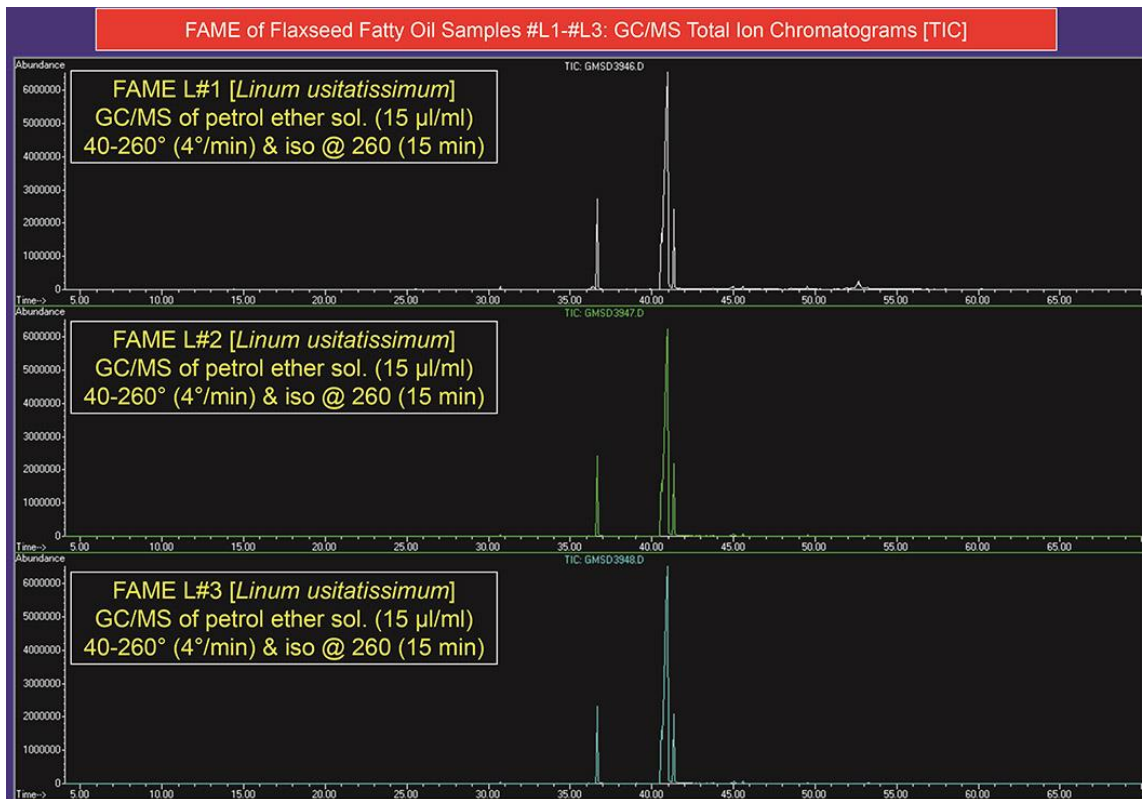
## Prikaz GC/FID analize



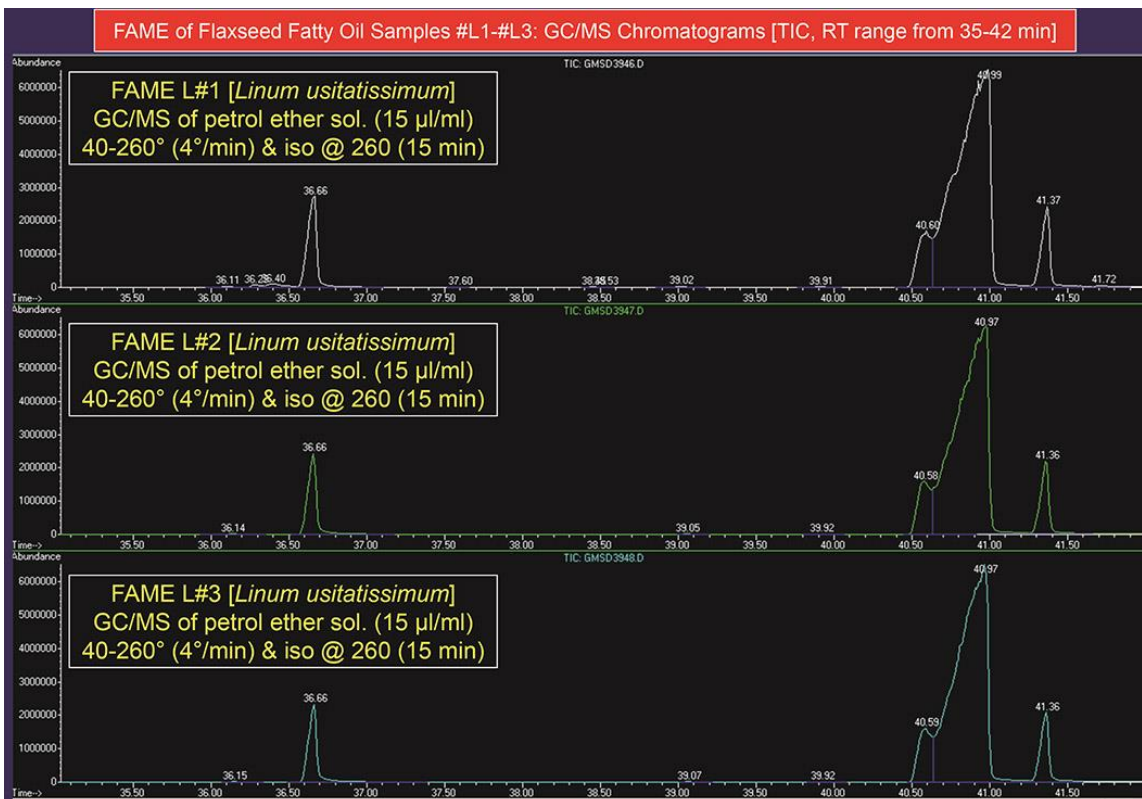
Slika P-1.1. GC/FID analiza metil estara uljanog lana.



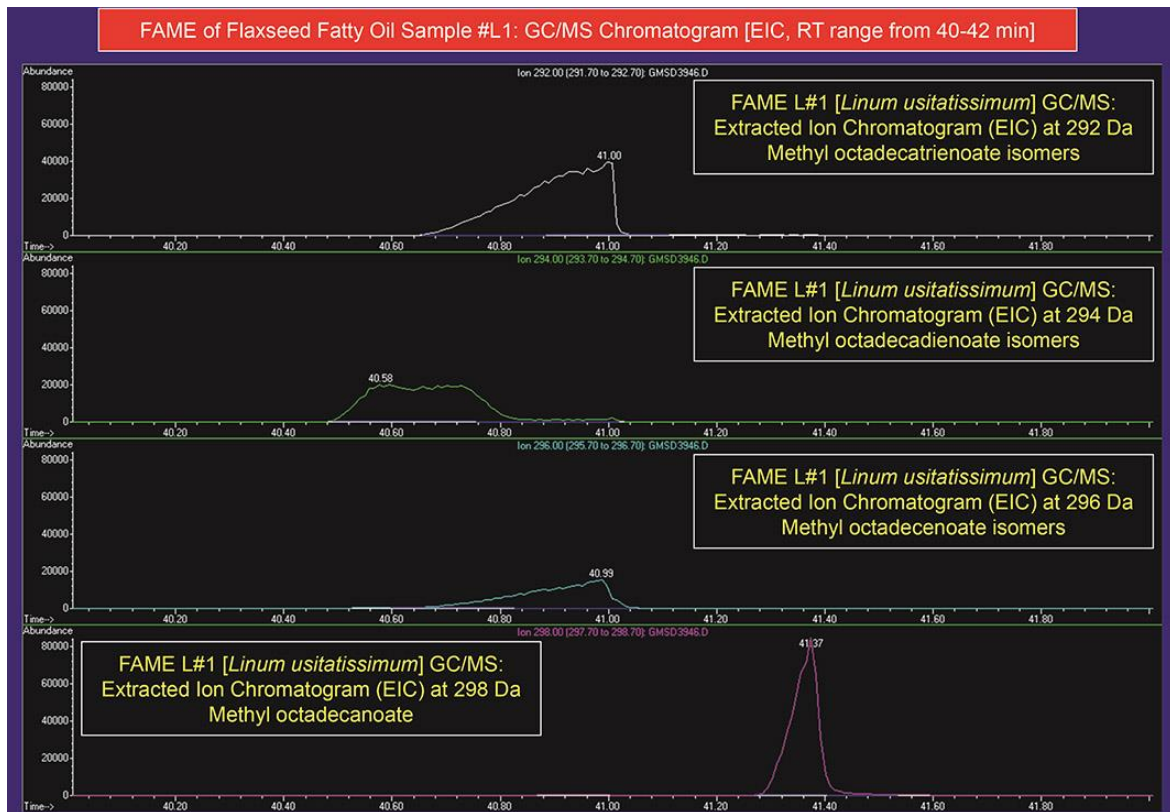
Slika P-1.2. GC/FID analiza metil estara uljanog lana  
(vremenski interval 35–55 minuta).



Slika P-1.3. GC/MS analiza metil estara uljanog lana.



Slika P-1.4. GC/MS analiza metil estara uljanog lana  
(vremenski interval 35–42 minuta).



Slika P-1.5. GC/MS analiza metil estara uljanog lana  
(vremenski interval 40–42 minuta).





### PRILOG 3

#### Spisak skraćenica korišćenih u disertaciji

- **ALA** – alfa linolenska kiselina
- **CC** – kompost kontrola bez inokuluma
- **CKS1** – *Paenibacillus chitinolyticus*
- **CKS2** – *Streptomyces spororaveus*
- **CKS3** – *Hymenobacter psychrotolerance*
- **CKS6** – *Streptomyces microflavus*
- **CKS7** – *Streptomyces fulvissimus*
- **DHA** – dehidrogenazna aktivnost
- **FAME** – metil estri masnih kiselina
- **FRAP** – antioksidativni potencijal neutralizacije jona gvožđa  
(*Ferric Reducing-Antioxidant Power*)
- **GAE** – ekvivalenti galne kiseline (*Gallic Acid Equivalents*)
- **GC/FID** – gasna hromatografija
- **GC/MS** – gasna hromatografija / masena spektrometrija
- **IC** – kompost sa inokulumom
- **LA** – linolna kiselina
- **nkCO<sub>2</sub>** – natkritični ugljen-dioksid
- **NKE** – natkritična ekstrakcija
- **OM** – organska materija
- **PPM3** – *Bacillus amyloliquefaciens ssp. plantarum*
- **PPT1** – *Bacillus altitudinis*
- **RŠV** – rastvorljivi šećeri u vodi



## Biografija

Snežana (Milivoje) Dimitrijević je rođena 17.02.1973. godine, u Pančevu, gde je završila osnovnu školu kao nosilac Vukove diplome. Medicinsku školu u Beogradu, odsek za farmaceutске tehničare, završila je 1992. godine sa odličnim uspehom. Osnovne studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na odseku za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju upisala je školske 1992/1993. Diplomirala je 23. marta 1999. godine. Diplomski rad pod nazivom „Proizvodnja monoacilglicerola na palminom ulju pomoću lipaze iz *Penicillium cyclopium* BGAL1“ odbranila je sa ocenom 10. Doktorske akademske studije, na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija, upisala je školske 2011/2012. Ispite na doktorskim studijama položila je sa prosečnom ocenom 9,58 a oktobra 2013. godine odbranila je sa ocenom 10 i Završni ispit pod nazivom: „Iskorišćenje otpada iz proizvodnje i prerade lekovitog bilja za dobijanje komposta primenom odabranog konzorcijuma prirodnih izolata bakterija i streptomiceta“ pred komisijom u sastavu: Dr Suzana Dimitrijević-Branković, Dr Slavica Šiler-Marinković, Dr Dušan Antonović.

U periodu od 2000–2001. godine zaposlena je u Jugostroj-u u Beogradu, gde je završila pripravnički staž. U periodu od 2004–2006. godine radila u preduzeću Alfa-medical u Beogradu. Od 2008. godine je zaposlena u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Beogradu.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Снежана Димитријевић

Број индекса 4004/2011

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Примена нових сојева бактерија у производњи компоста и за гајење угљаних врста са побољшаним биолошким својствима.

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 17.04.2018.

S. Dimitrijević

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Снежана Димитријевић

Број индекса 4004/2011

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада Примена нових сојева бактерија у производњи компоста и за гајење  
уљаних врста са побољшаним биолошким својствима

Ментор проф. др Сузана Димитријевић-Бранковић, редовни професор  
Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 17.04.2018.

S. Dimitrijević

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Примена нових сојева бактерија у производњи компоста и за гајење уљаних врста са побољшаним биолошким својствима.

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 17.04.2018.

Потпис аутора

