

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Vera M. Karličić

**BAKTERIJE STIMULATORI BILJNOG
RASTA KAO POTENCIJAL U
EKOREMEDIJACIJI OŠTEĆENIH
ZEMLJIŠTA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Vera M. Karličić

**PLANT GROWTH PROMOTING
BACTERIA AS A POTENTIAL IN
DEVASTATED SOILS
ECOREMEDIATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

POLJOPRIVREDNI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU

MENTOR:

Dr Vera Raičević, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Blažo Lalević, vanredni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Vesna Golubović-Ćurguz, vanredni profesor
Šumarski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Jelena Jovičić-Petrović, docent
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Filis Molina, naučni saradnik
Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

Istraživanja u okviru disertacije su finansirana iz sredstava projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije “Biodiverzitet kao potencijal u ekoremedijacionim tehnologijama oštećenih ekosistema” (TR 31080) i međunarodnog projekta “Advancing Research in Agricultural and Food Sciences at Faculty of Agriculture” (AREA, 316004).

Veliku zahvalnost dugujem mentoru, prof. dr Veri Raičević na ukazanoj prilici, razumevanju, motivaciji i ohrabrenju kao i na uloženom trudu prilikom realizacije doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Blaži Laleviću na pomoći tokom eksperimentalnog dela i savetima koji su doprineli unapređenju ove teze.

Želim da izrazim veliku zahvalnost prof. dr Vesni Golubović Ćurguz za sve sugestije tokom pisanja doktorata, ali i za pomoć prilikom eksperimentalnog rada.

Veliko hvala docentu dr Jeleni Jovičić-Petrović na trudu, vremenu i pažnji posvećenoj od samog početka izrade teze.

Takođe, veliku zahvalnost dugujem i dr Filis Morina za sve sugestije prilikom pisanja doktorata.

Hvala kolegama sa Katedre za ekološku mikrobiologiju, posebno Danki Radić bez koje bi ovaj posao bio mnogo teži.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Smilji Teodorović i Dejanu Laziću na pruženoj pomoći vezanoj za molekularne metode.

Najveću zahvalnost dugujem mojim roditeljima, sestri i bratu, a posebno mom supruhu i našem Mihajlu.

Autor

BAKTERIJE STIMULATORI BILJNOG RASTA KAO POTENCIJAL U EKOREMEDIJACIJI OŠTEĆENIH ZEMLJIŠTA

REZIME

Savremena poljoprivredna proizvodnja se zasniva na primeni mineralnih đubriva i hemijskih sredstava za zaštitu bilja. Pored toga što ove mere značajno poskupljuju proizvodnju i smanjuju kvalitet proizvoda, one uzrokuju i čitav niz negativnih posledica po životnu sredinu i zdravlje ljudi. Porastom svesti o opasnostima koje sa sobom nosi konvencionalna poljoprivreda, raslo je i interesovanje za alternativna rešenja kojima bi proizvodnja hrane bila pomerena u smeru održivosti. Jedan od načina da se redukuje zavisnost od hemijskih sredstava u poljoprivredi je upotreba bakterija stimulatora biljnog rasta (*Plant growth promoting bacteria*, PGPB).

Zemljišni mikroorganizmi koji čine ovu grupu imaju sposobnost da pomoću različitih mehanizama stimulišu rast biljaka, povećaju produkciju biomase i prinosa. Ovakvi efekti su uočeni i istraživani duži niz godina, što je dovelo do porasta primene bakterijskih inokulata u poljoprivrednoj proizvodnji. Rezultati postignuti primenom bakterija stimulatora biljnog rasta u proizvodnji hrane doveli su do porasta interesovanja za njihovu primenu i u šumarstvu, hortikulturi, remedijaciji i rekultivaciji.

Cilj ovog istraživanja je bila izolacija i karakterizacija PGP sojeva koji imaju sposobnost da stimulišu rast biljaka gajenih u siromašnim zemljištima i zemljištima opterećenim visokim sadržajem organskih zagađivača. Stimulacijom rasta biljaka u devastiranim, zagađenim područjima ove bakterije ubrzavaju procese njihovog oporavka, revegetacije i uključivanja u širi ekosistem.

Mikroorganizmi su izolovani iz poljoprivrednog, šumskog zemljišta i dva tipa deposola. Ispitivano poljoprivredno zemljište (Kisač, Republika Srbija) je namenjeno organskoj proizvodnji, dok je šumsko zemljište (Nova Varoš, Republika Srbija) uzorkovano u oblasti koja pripada prvoj zoni zaštite. Deposol uzorkovan iz urbane sredine (Tivat, Republika Crna Gora) se odlikovao prisustvom organskih zagađivača (PAH, PCB, organokalajna jedinjenja). Deposol iz RB Kolubara (Lazarevac, Republika Srbija) je nastao kao posledica rudarske aktivnosti i pokriva velike površine namenjene za rekultivaciju.

Iz uzoraka su izolovani predstavnici roda *Bacillus* sp., koji je jedan od najznačajnijih PGPB rodova. Takođe je izolovano i nekoliko predstavnika diazotrofa. Nakon dobijanja čistih kultura izvršena je karakterizacija dobijenih izolata u odnosu na ispoljavanje glavnih PGP mehanizama (produkcija amonijaka, auksina, ACC deaminaze, siderofora i solubilizacija fosfata). Antagonistički efekat izolata prema biljnim patogenima je ispitan u konfrontacijskom testu sa *Botrytis cinerea* i *Pythium aphanidermatum*. Takođe je utvrđena i sposobnost izolata da kolonizuju površinu semena, korena i unutrašnjih tkiva korena. Sposobnost površinske i endofitne kolonizacije se smatra ključnom za ispoljavanje PGP efekata u uslovima koji nisu kontrolisani i u kojima na interakcije između biljaka i bakterija utiče veliki broj (a)biotičkih faktora.

Na osnovu ispoljenih direktnih i indirektnih PGP osobina i sposobnosti površinske i endofitne kolonizacije korena odabrana su četiri izolata (Z-I ARV, 10_ARV, D5 ARV, P1 ARV). Molekularna identifikacija izolata je izvršena umnožavanjem i sekvencioniranjem sekvence *gyr B* gena. Poređenjem dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka izolati su identifikovani kao: *Serratia liquefaciens*, *Ensifer adhaerens*, *Bacillus amyloliquefaciens* i *Pseudomonas putida*.

Nakon utvrđivanja PGP osobina odabranih izolata kroz biohemijske analize, postavljen je niz *in vivo* ogleda. Testiran je uticaj pojedinačnih izolata i njihovog mešanog inokuluma na rast slačice (*Sinapis alba* L.), pšenice (*Triticum vulgare* L.), crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) i suncokreta (*Helianthus annuus* L.) gajenih u deposolu rudnika. Rezultati ovih testova su pokazali sposobnost izolata da povećaju visinu biljaka, dužinu korena i biomasu biljaka nakon dvonedelnog tretmana.

Uticaj pojedinačnih izolata i njihovog mešanog inokuluma na rast crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) praćen je u još dva ogleda koja su trajala tri meseca. Postavljeni su ogledi u deposolu iz rudnika i deposolu iz gradske sredine. Rezultati dobijeni nakon tri meseca trajanja ogleda pokazuju da inokulacija biljaka gajenih u deposolu rudnika nije statistički značajno uticala na poboljšanje njihovog rasta. Inokulacija biljaka gajenih u deposolu kontaminiranom organskim zagađivačima je značajno stimulisala biljni rast. Izolat *B. amyloliquefaciens* D5 ARV je doveo do povećanja ukupne biomase za 71%, a *P. putida* P1 ARV za 49%.

Uticaj PGPB na rast drvenastih vrsta je testiran na bagremu (*Robinia pseudoacacia* L.), platanu (*Platanus x acerifolia* (Aiton) Willd.), belom boru (*Pinus sylvestris* L.) i smrči (*Picea abies* L. Karst). Za ovaj ogled korišćen je mešani inokulum odabranih izolata, a kao supstrat korišćen je deposol iz rudnika. Nakon osam meseci eksperimentalnog perioda, dobijeni rezultati pokazali su značajnu stimulaciju rasta platana (povećanje visine, prečnika vrata korena i ukupne biomase (82%) u odnosu na neinokulisanu, negativnu kontrolu. Inokulacija sadnica bagrema je dovela do statistički značajnog povećanja visine biljaka i biomase nadzemnog dela (20%), dok je efekat inokulacije belog bora bio vidljiv kroz povećanje biomase nadzemnog dela (30%) u odnosu na kontrolne biljke. Inokulacija smrče nije dovela do stimulacije rasta sadnica.

Bakterijski sojevi izolovani i okarakterisani u okviru ove disertacije imaju sposobnost da PGP osobine na osnovu kojih su odabrani ispolje i u ogledima sa biljkama. Njihova uloga je naročito značajna za rast i razviće biljaka u nepovoljnim supstratima sa niskim sadržajem organske materije, azota, fosfora i kalijuma (deposol iz rudnika) i sa visokim sadržajem organskih zagađivača (deposol iz gradske sredine). Stimulacijom rasta biljaka u ovakvim supstratima, odabrani sojevi su potvrdili svoj ekoremedijacioni potencijal i opravdanost primene u cilju pospešivanja rekultivacije osiromašenih prostora i remedijacije zagađenih zemljišta.

Ključne reči: bakterije stimulatori biljnog rasta, produkcija auksina, siderofore, solubilizacija fosfata, *Serratia liquefaciens*, *Ensifer adhaerens*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas putida*, oštećeni ekosistemi

Naučna oblast: Mikrobiologija

Uža naučna oblast: Ekološka mikrobiologija

UDK: 579.64:628.516(043.3)

PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA AS A POTENTIAL IN DEVASTATED SOILS ECOREMEDIATION

ABSTRACT

Modern agriculture is based on mineral fertilizers and use of synthetic chemicals in plant protection. Such agricultural practice is expensive and lower down food quality, and represent a major threat to environmental and human health. The tendency towards more sustainable alternatives grew simultaneously with the awareness of conventional agriculture negative impact. Plant growth promoting bacteria (PGPB) represent a promising alternative to chemicals employed in agricultural practice.

Plant growth promoting bacteria are soil microorganisms that use numerous mechanisms which stimulation of plant growth, biomass and yield production. The effects of PGPB have been studied for a long period of time. The results obtained by crop inoculation ensured application of PGPBs in agriculture. Nowadays, there is a constant increase of the interest for PGPB application in forestry, horticulture, remediation and recultivation activities.

The aim of this thesis was to isolate and characterize PGP strains with the ability to promote plant growth in nutrient-deficient and soils contaminated with organic pollutants. The processes of devastated and contaminated land recovery are accelerated by PGPB influences on plant growth.

Isolation was conducted from agricultural and forestry soil, and two types of deposols in order to obtain ecologically and physiologically diverse populations of microorganisms. Agricultural soil was sampled from the areas used for organic farming, while forest soil was sampled from a protected area. Deposols sampled from urban zone were contaminated with organic pollutants (PAH, PCB, organotins), while deposols from coal-mine Kolubara cover huge areas scheduled for recultivation.

The members of *Bacillus* sp., as one of the most important PGPB roads, were isolated from the samples. In addition, a few representatives of diazotrophs were isolated. After isolation and purification the isolates were examined for the presence of main PGP features (production of ammonia, auxines, ACC deaminase, siderophores and solubilization of phosphates). Dual test with *Botrytis cinerea* and *Pythium*

aphanidermatum was used for screening antagonistic activities of obtained isolates. The isolates were examined for the ability to colonize seed and root surface and root inner tissues. This is one of the main characteristics that determine the PGPB effectiveness in uncontrolled conditions, where plant-bacteria interactions modify a whole spectra of (a)biotic factors.

Four isolates were chosen (Z-I ARV, 10_ARV, D5 ARV, P1 ARV) based on the presence of (in)direct PGP features, and the ability to colonize root surface and inner tissues. Molecular identification was performed by multiplication and *gyr B* gene sequencing. The obtained sequences were compared with sequences from GenBank database. Isolates were identified as: *Serratia liquefaciens*, *Ensifer adhaerens*, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas putida*.

After screening for PGP features, *in vivo* experiments were performed, using deposols as substrates. The first *in vivo* experiment tested the influence of single strains and their consortia on early the growth of mustard (*Sinapis alba* L.), wheat (*Triticum vulgare* L.), red clover (*Trifolium pretense* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.). The obtained results confirmed the beneficial effects of applied isolates on plant height, root length and biomass production after two-weeks experiment.

The influence of single strain and their consortia on red clover growth (*Trifolium pretense* L.) was examined through two additional experiments which lasted for three months. The experiments were set up in deposols. After three months, inoculation showed no stimulative influence on plants grown in deposols from the coal-mine. On the other hand, the inoculation of red clover grown in deposols contaminated with organic polutants significantly stimulated plant growth. Isolate *B. amyloliquefaciens* D5 ARV was the most efficient as evidenced by 71% higher biomass production, while inoculation with *P. putida* P1 ARV caused 49% higher biomass production production compared to control plants.

PGPB effects on woody plants were tested on Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.), London plane (*Platanus x acerifolia* (Aiton) Willd.), Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). This experiment was set up in coal-mine deposols and plants were inoculated with the consortia of selected isolates. After an eight-month experimental period, results showed significant stimulation of London plane growth; inoculation increased plant height, root collar

diameter and total biomass (82%) of London plane in comparison with negative control. Black locust inoculation increased plant height and shoot biomass by 20%, while Scots pine inoculation increased shoot biomass by 30% compared to control plants. No significant PGPB effects on seedling growth of Norway spruce were observed.

Bacterial strains isolated and characterized in this dissertation manifested their PGP characteristics both in laboratory and *in vivo*. Moreover, PGPBs stimulate plant growth in unfavourable substrates with low organic matter, nitrogen, phosphorus, and potassium content (coal-mine deposols) and with high organic contaminants content (urban area deposols). Plant growth stimulation in such substrates confirmed ecoremediation potential of selected strains and justify their application in devastated land recultivation and contaminated soil remediation.

Key words: plant growth promoting bacteria, auxine production, siderophores, phosphates solubilization, *Serratia liquefaciens*, *Ensifer adhaerens*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas putida*, devastated ecosystems

Scientific field: Microbiology

Scientific discipline: Microbial ecology

UDK: 579.64:628.516(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Zemljište kao stanište mikroorganizama	3
2.2. Rizosfera.....	8
2.3. Bakterije stimulatori biljnog rasta	11
2.4. Mehanizmi delovanja bakterija stimulatora biljnog rasta	14
2.4.1. Direktni mehanizmi.....	15
2.4.2. Indirektni mehanizmi	21
2.5. Primena bakterija stimulatora biljnog rasta	23
2.6. Ekoremedijacioni potencijal bakterija stimulatora biljnog rasta	28
3. CILJ	30
4. MATERIJAL I METODE	31
4.1. Hemijske karakteristike zemljišta	31
4.2. Mikrobiološka karakterizacija zemljišta	32
4.3. Izolacija bakterija	33
4.3.1. Morfološke karakteristike ćelija.....	33
4.4. Mehanizmi stimulacije biljnog rasta - Direktni mehanizmi	33
4.4.1. Produkcija amonijaka.....	33
4.4.2. Produkcija indolsirćetne kiseline (IAA).....	34
4.4.3. 1-aminociklopropan-1-karboksilat (ACC) deaminazna aktivnost	35
4.4.4. Produkcija siderofora	36
4.4.5. Rastvorljivost fosfata	37
4.5. Mehanizmi stimulacije biljnog rasta - Indirektni mehanizmi	38
4.5.1. Antifungalna aktivnost izolata	38
4.5.2. Produkcija cijanovodonične kiseline	38
4.5.3. Produkcija litičkih enzima (lipaze, proteaze, celulaze, β -glukozidaze, N-acetil- β -glukozaminidaze)	39
4.6. Sposobnost površinske i endofitne kolonizacije	40
4.7. Biohemijska identifikacija izolata	41
4.8. Molekularna identifikacija	42

4.9. Ekološke karakteristike izolata.....	44
4.10. <i>In vivo</i> ogledi	45
4.10.1. Uticaj inokulacije na rast ratarskih kultura	45
4.10.2. Uticaj inokulacije na rast drvenastih vrsta	47
4.11. Statistička obrada podataka	48
5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	49
5.1. Hemijske karakteristike zemljišta	50
5.2. Mikrobiološke karakteristike zemljišta	51
5.3. Izolacija bakterija iz zemljišta	53
5.4. Direktni mehanizmi stimulacije biljnog rasta	56
5.5. Indirektni mehanizmi stimulacije biljnog rasta	65
5.6. Površinska kolonizacija semena i korena biljaka PGP izolatima.....	74
5.7. Endofitna kolonizacije korena PGP izolatima	78
5.8. Biohemijska identifikacija izolata	83
5.9. Molekularna identifikacija izolata.....	84
5.10. Ekološke osobine izolata	89
5.10.1. Rast izolata pri različitim temperaturama	89
5.10.2. Rast izolata pri različitim pH vrednostima sredine	90
5.10.3. Rast izolata pri različitim koncentracijama NaCl	91
5.10.4. Rast izolata pri različitim koncentracijama teških metala.....	93
5.10.5. Otpornost izolata na prisustvo ampicilina i tetraciklina.....	98
5.11. Uticaj inokulacije PGP bakterijama na rast biljaka	99
5.11.1. Uticaj inokulacije PGP bakterijama na rast ratarskih kultura	101
5.11.2. Uticaj inokulacije PGP bakterijama na rast drvenastih vrsta	119
6. ZAKLJUČAK	129
7. LITERATURA	134
8. BIOGRAFIJA	169
9. PRILOZI	170

1. UVOD

Primena mineralnih đubriva i hemijskih sredstava za zaštitu bilja je sastavni deo savremene poljoprivredne proizvodnje. Njihova upotreba obezbeđuje adekvatne prinose što je imperativ koji nameće konstantan porast svetske populacije. Sa druge strane, poljoprivredna proizvodnja je među najvećim zagađivačima životne sredine, a jedan od razloga je, upravo, primena hemijskih sredstava. Unos hemikalija uzrokuje čitav niz negativnih posledica po kvalitet proizvoda, zdravlje ljudi i životnu sredinu, u prvom redu zemljište i vodu.

Sa porastom svesti o neobnovljivosti i ograničenosti resursa kakvo je zemljište i opasnostima koje sa sobom nosi konvencionalna poljoprivreda, raslo je i interesovanje za alternativna rešenja. Jedno od tih rešenja su bakterije stimulatori biljnog rasta (*Plant growth promoting bacteria*, PGPB).

PGPB su grupa zemljišnih bakterija, u najvećem broju prisutnih u rizosferi, koje poboljšavaju ishranu biljaka, regulišu njihov hormonski status, poboljšavaju otpornost na abiotičke stresove i pomažu u odbrani protiv biljnih štetočina i bolesti. Korisni efekti ovih mikroorganizama eksploatišu se već više od 100 godina u poljoprivrednoj proizvodnji. Porast ekološke svesti doveo je do toga da se u brojnim zemljama, kroz zakonsku regulativu i finansijsku podršku, podstiču proizvođači koji uvode bioinokulate u svoju proizvodnu praksu. Kao rezultat takve politike beleži se stalni rast vrednosti tržišta bioinokulata. Dobri rezultati primene u poljoprivredi su preporuka PGPB i u drugim sferama ljudske delatnosti, poput šumarstva, hortikulture, bioremedijacije i rekultivacije.

PGPB stimulišu biljni rast pomoću velikog broja direktnih i indirektnih mehanizama. Direktni mehanizmi omogućavaju bolju snabdevenost mikro i makronutrijentima, dok produkcijom hormona i stimulacijom sinteze biljnih hormona regulišu procese u samoj biljci.

Termin "indirektni mehanizmi" obuhvata širok spektar PGPB delovanja kojima se suzbijaju biljni patogeni. Najčešći indirektni mehanizmi su kompeticija za mesto u određenoj ekološkoj niši i produkcija antibiotika i drugih metabolita koji deluju na patogene agense ili njihove litičke enzime.

Rezultati navedenih mehanizama su povećanje klijavosti, stimulacija rasta, razvoja i nodulacije korena, stimulacija rasta nadzemnog dela biljke, povećanje biomase biljke, težine semena i prinosa. Ovakvi efekti primene PGPB su od naročitog značaja za biljke gajene u siromašnim zemljištima, slabog mikrobnog diverziteta, kao i zemljištima kontaminiranim organskim i neorganskim zagađivačima. U takvim situacijama inokulacija se ne odražava stimulativno samo na rast biljke već pospešuje i procese fitoremedijacije i ozdravljenja zemljišta.

Prednost upotrebe bioinokulata je u tome što, kao stalni stanovnici zemljišta, ne predstavljaju opasnost kakvu sa sobom nosi primena mineralnih đubriva i pesticida. Takođe, kao bitna prednost ističe se ekonomski aspekt obzirom da primena biofertilizatora ili biopesticida pojeftinjuje proizvodnju, ne zahtevajući značajna ulaganja.

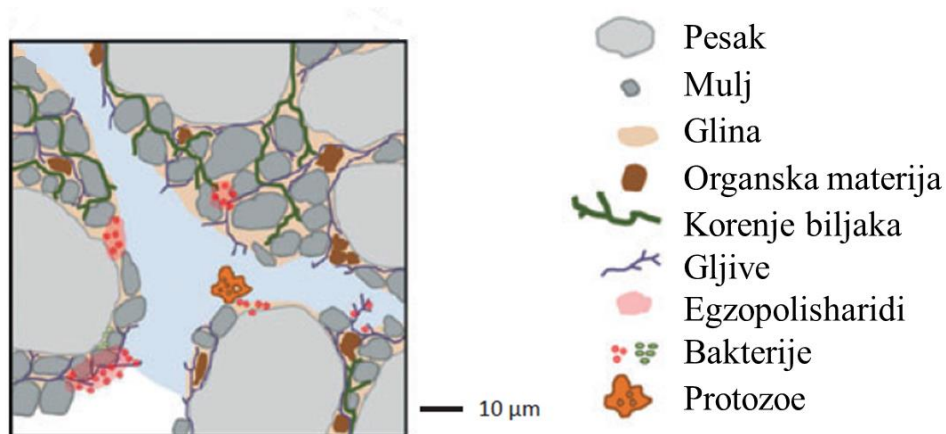
Međutim, na putu ka masovnijoj upotrebi PGPB u biljnoj proizvodnji stoje brojna ograničenja. Efikasnost PGPB inokulata zavisi od velikog broja faktora poput sposobnosti kolonizacije površine i unutrašnjih tkiva korena biljaka, sposobnosti da se izbore sa kompetitivnom autohtonom mikroflorom, od sastava korenskih eksudata, tipa zemljišta, vlažnosti, sadržaja nutrijenata, koncentracije teških metala, mikrobnog diverziteta, interakcije biljke i bakterije, genotipa biljke itd. Danas se ova ograničenja mogu prevazići pažljivim odabirom sojeva, inokulacijom u kontrolisanim uslovima, tehnološkim inovacijama baziranim na pronalaženju odgovarajućeg nosača i formulacije bioinokulata.

Najveći broj istraživanja PGPB je pratio uticaj na stimulaciju rasta ratarskih kultura. Proširenjem znanja o mehanizmima delovanja i efektima inokulacije, PGPB su počele da se primenjuju i u šumarstvu, hortikulturi i bioremedijaciji. Istraživanja u ovim oblastima su oskudna i predstavljaju izazov za istraživače.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Zemljište kao stanište mikroorganizama

Zemljište predstavlja životnu sredinu u kojoj se mikroorganizmi snabdevaju ugljenikom, vodom i energijom i gde različite kombinacije fizičkih, hemijskih i biotičkih karakteristika određuju i usmeravaju njihov rast i aktivnosti. Osnovna karakteristika zemljišta, kao staništa mikroorganizama, je izuzetna heterogenost koja omogućava raznovrsnost živog sveta. Zemljište predstavlja stanište sačinjeno od velikog broja mikrohabitata u kojima abiotički uslovi variraju na mikrometarskom nivou (Garbeva et al., 2004). Agregati zemljišnih čestica formiraju trodimenzionalnu mrežu pora ispunjenu vazduhom i vodom. Prostor oivičen mikroagregatima naseljavaju zemljišni mikroorganizmi aktivno učestvujući u njihovom povezivanju u veće strukture (Slika 1). Tako se osnovne čestice stvorene spajanjem gline i humusa međusobno povezuju različitim organskim polimerima, glomalinom, ekstracelularnim polisaharidima, hifama gljiva i korenjem biljaka (Hartel, 2004; Chenu i Cosentino, 2011).



Slika 1. Zemljište kao stanište mikroorganizama na nivou mikroagregata (Oades, 1984)

Mikroorganizmi u zemljištu su “nevidljiva većina” koja čini veliki deo genetskog diverziteta. Procenjuje se da 1 g zemljišta sadrži do milijardu bakterijskih ćelija, više desetina hiljada taksona i oko 200 m hifa gljiva (Roesch et al., 2007). Ogroman “skriveni” diverzitet doprinosi ukupnoj zemljišnoj biomasi i usko je povezan sa biodiverzitetom nadzemnih ekosistema (Fierer et al., 2009). Zemljišni mikroorganizmi predstavljaju značajan deo ukupne biomase na Zemlji sa 10^3 - 10^4 kg ha⁻¹ (Fierer et al., 2007).

Diverzitet mikrobnih zajednica u zemljištu neophodan je za zdrav rast biljaka, odvijanje geohemijskih ciklusa i, konačno, za zdravlje naše planete (Ortiz-Castro et al., 2009). Mikrobne zajednice u zemljištu su odgovorne za stabilizaciju i transformaciju zemljišne organske materije, a samim tim za kvalitet i plodnost zemljišta (Usman et al., 2016). U šumskim zemljišnim ekosistemima uloga mikroorganizama kao aktivnih razlagača organske materije doprinosi globalnom kruženju ugljenika (Baldrian et al., 2012). Ovo je od posebnog značaja ako se zna da se samo u zemljištima četinarskih šuma nalazi 20% ukupnog zemljišnog organskog ugljenika (Tarnocai et al., 2009).

Među zemljišnim mikroorganizmima, najbrojnije su bakterije čija se brojnost kreće u opsegu od 10^6 - 10^9 g⁻¹ (Vieira i Nahas, 2005). Bakterije naseljavaju unutrašnjost zemljišnih agregata, površinu mineralnih, organskih čestica, biljne i životinjske ostatke. Kao akvatični organizmi, zauzimaju delove koji su ispunjeni vodom ili prekriveni vodenim filmovima (Vos et al., 2013). U mikroporama koje naseljavaju, bakterije su zaštićene od iznenadnih promena nivoa vlage i predatora, ali su, takođe, suočene sa ograničenim resursima (Ranjard i Richaume, 2001). Tip zemljišta, tekstura, sadržaj organske materije, pH vrednost utiču na strukturu zajednice bakterija. Obično ih u glinovitim zemljištima ima više, dok su peskovita zemljišta manje pogodno stanište za bakterije (Hamarashid et al., 2010).

Zahvaljujući velikom funkcionalnom biodiverzitetu zemljišni mikroorganizmi (Quince et al., 2008) su integralan deo svih procesa koji se dešavaju u zemljištu (Hartmann et al., 2015). Učestvuju u pedogenezi i agregaciji čestica, a mikrobiološke zajednice se mogu smatrati glavnim arhitektama zemljišta (Rajendhran i Gunasekaran, 2008). Tokom formiranja zemljišta mikrobne populacije su odgovorne za biološke transformacije i formiranje stabilnih i labilnih rezervoara ugljenika, azota i drugih nutrijenata, što olakšava kasnije zasnivanje biljnih zajednica (Schulz et al., 2013).

Takođe, upravljanje nutrijentima kroz održivo korišćenje mikrobnih resursa zemljišta predstavlja preduslov za uspešnu poljoprivrednu proizvodnju (Kiflu i Beyene, 2013). Identifikacija i kvantifikacija zemljišnih mikroorganizama može biti jedan od načina određivanja statusa zemljišnih nutrijenata (Zhang et al., 2002), što može pomoći njihovom održavanju i poboljšanju produktivnosti useva (Asadu et al., 2015).

Sagledavanje pravog stanja mikrobnog diverziteta je značajno sa stanovišta utvrđivanja veze između raznovrsnosti zajednice, njene strukture i funkcije u ekosistemu. Takođe, razumevanje strukture i funkcije zemljišnih mikrobnih zajednica je ključno za predviđanje odgovora ekosistema na promene uslova životne sredine u budućnosti (Baldrian et al., 2012). Zahvaljujući razvoju molekularnih metoda, danas znamo da se sva znanja o mikroorganizmima baziraju na malom delu njihovog ukupnog diverziteta. Procenjuje se da standardna laboratorijska praksa omogućava gajenje samo 1% bakterija koje naseljavaju zemljište (Glick, 2012). Iako postoji veliki broj metoda koje se koriste za proučavanje mikroorganizama, nemogućnost preslikavanja ključnih aspekata iz životne sredine je osnovna prepreka za uspešno gajenje u laboratorijskim uslovima (Stewart, 2012).

Biodiverzitet u zemljištu je značajan faktor koji doprinosi zdravlju ljudi, kvalitetu vazduha, vode i hrane. Loša praksa upravljanja zemljištem i promene životne sredine na globalnom nivou, smanjuju biodiverzitet, a time i ugrožavaju ove prednosti. Istraživanja pokazuju da se biodiverzitet zemljišta može održavati i delimično obnavljati upravljanjem na održiv način. Promocija ekološke složenosti i otpornosti zemljišnog biodiverziteta kroz unapređenje prakse upravljanja predstavlja nedovoljno iskorišćen resurs (Wall et al., 2015).

Antropogene aktivnosti, kao što je intenzivna poljoprivredna proizvodnja, utiču na smanjenje diverziteta mikroorganizama, a time i ukupnog biodiverziteta (De Vries et al., 2013). Smanjenje biološke raznolikosti u zemljištu može oslabiti brojne ekosistemske funkcije, kao što je ishrana biljaka i kruženje elemenata. Visoki prinosi u intenzivnoj poljoprivrednoj proizvodnji se postižu primenom mineralnih đubriva za čiju proizvodnju se troši ogromna količina energije (npr. industrija Haber-Bosch procesa troši 5% proizvodnje prirodnog gasa na svetu). Takođe, intenzivna poljoprivredna proizvodnja je zavisna od neobnovljivih rezervi minerala fosfora. Međutim, ogromna količina nutrijenata ostaje neiskorišćena, ispira se i doprinosi zagađenju vodenih

ekosistema. Uprkos visokim ulaganjima intenzivna poljoprivredna proizvodnja nije u mogućnosti da poboljša prinos nekoliko glavnih useva (kukuruz, pšenica, pirinač) već je konstatovana njihova stagnacija širom sveta (Moore i Lobell, 2015; Li et al., 2016).

Konvencionalna biljna proizvodnja nosi sa sobom opasnosti od ispiranja nitrata i fosfata u površinske i podzemne vode, kontaminacije zemljišta teškim metalima (Wuana i Okieimen, 2011). Uticaj agrotehničkih mera na aktivnost i biodiverzitet mikroorganizama je različit. Način obrade zemljišta direktno utiče na stanje mikrobne populacije (Hartmann et al., 2015) dovodeći do smanjenja diverziteta pri intenzivnoj obradi (Silva et al., 2013). Sa druge strane, primena plodoređa, organskih đubriva i zaoravanje žetvenih ostataka povećava mikrobiološku aktivnost (Habig i Swanepoel, 2015). Neki pesticidi mogu stimulisati rast mikroorganizama, dok drugi imaju depresivne efekte ili nemaju efekta. Tako npr. karbofuran stimuliše brojnost roda *Azospirillum* sp. u poplavljenim i nepoplavljenim zemljištima, butahlor smanjuje populaciju roda *Azospirillum*, a primena diurona i hlorprofama ne utiče na brojnost ovog roda u zemljištu (Lo, 2010). Pesticidi i njihovi metaboliti izazivaju sve veću zabrinutost zbog potencijalnog štetnog uticaja na životnu sredinu, životinjski svet i zdravlje ljudi. Pesticidi koji se primenjuju u savremenoj poljoprivrednoj proizvodnji su uzrok lošeg kvalitete vode i životne sredine u nekim zemljama EU (European Parliament EU, 2010). Većina pesticida se razlaže zahvaljujući mikrobnim zajednicama u zemljištu za koje pesticidi predstavljaju izvore ugljenika i energije. Zemljišni mikroorganizmi učestvuju u procesima koji su ključni za dugoročnu održivost agroekosistema (Nannipieri et al., 2003). Sve ovo ukazuje da savremena poljoprivredna proizvodnja mora tražiti rešenja u boljem iskorišćavanju biljno-mikrobnih interakcija u ishrani biljaka ali i borbi protiv štetočina i bolesti (Garnett i Godfray, 2012).

Akumulacija teških metala u zemljištu je toksična za mikroorganizme i utiče na smanjenje njihove aktivnosti (Ali i Vidhale, 2013). Ipak, dugoročno izlaganje ovim i drugim zagađivačima može dovesti do povećanja broja rezistentnih mikroorganizama (Ceylan i Uğur, 2012). Sutton et al. (2013) su zabeležili da kontaminacija dizel gorivom značajno menja sastav i smanjuje diverzitet mikrobne zajednice u odnosu na nekontaminirano zemljište. Suprotno ovim rezultatima, Peng et al. (2015) su zabeležili povećanje diverziteta mikrobne zajednice u zemljištu kontaminiranom sirovom naftom. Mukherjee et al. (2014) su utvrdili da kontaminacija PAH-ovima utiče na redukciju

mikrobnog diverziteta ali i na povećanje njihove aktivnosti. Ova pojava ukazuje na sposobnost određenih grupa autohtonih mikroorganizama da organske zagađivače uključe u svoje metaboličke procese kao izvore ugljenika.

Zagađenje životne sredine, ubrzana erozija zemljišta, kao i spiranje mineralnih đubriva i pesticida u površinske i podzemne vode, kao i nepravilan tretman otpada predstavljaju ozbiljan ekološki i socijalni problem u celom svetu. Pokazalo se da rešavanje ovih problema hemijskim i fizičkim metodama ne daje zadovoljavajuće rezultate bez primene mikrobioloških metoda i tehnologija (Singh et al., 2011).

Površine namenjene rudarstvu odlikuje potpuna destrukcija prirodnih ekosistema, ukljanjanje vegetacije, plodnih slojeva zemljišta, njihovo trajno zatrpavanje, acidifikacija zemljišta, erozija, zagađenje vazduha i voda (Rakić et al., 2011). Uklanjanjem zemljišta ukanjaju se i zajednice mikroorganizama koje ga naseljavaju. Usled nedostatka ili niskog sadržaja organske materije na ovim prostorima uslovi za rast mikroorganizama su veoma nepovoljni (Singh i Singh, 2006), a često izostaje bilo kakva biološka aktivnost. Nakon eksploatacije ovakva područja postaju u toj meri devastirana, da je njihova jedina buduća namena pretvaranje u deponije. Kroz procese tehničke i biološke rekultivacije se nastoji obnoviti ekosistem u skladu sa novonastalim uslovima i prirodnim okruženjem. Pošumljavanjem terena (pionirske, autohtone vrste) i dodavanjem organske materije (seno, malč, kompost) podstiče se mikrobna aktivnost i ubrzava proces prirodne sukcesije (Tischew et al., 2008).

Istraživanja su pokazala da je sastav mikrobnih zajednica nakon završene eksploatacije izmenjen. Rekultivisani prostori se odlikuju manjim diverzitetom i biomasom, manjom aktivnošću dehidrogenaze i β -glukozidaze u odnosu na netaknuto zemljište. Diverzitet se povećava sa oporavkom ekosistema, ali je njegov sastav izmenjen (Quadros et al., 2016). Proces revegetacije je jedan od važnih načina koji doprinosi uspostavljanju ekosistema, a razvoj spontane vegetacije ima veliki uticaj na oporavak mikrobnih populacija (Hamidović et al., 2013). Međutim, još uvek se jako malo zna o funkcionalnom diverzitetu i metaboličkim aktivnostima mikroorganizama rudničkih zemljišta (Chodak et al., 2009).

Stanje mikrobnog diverziteta je pokazatelj zdravlja i kvaliteta zemljišta (Nagendran et al., 2014). Biodiverzitet je ključan za stabilnost ekosistema i uticaji koji doprinose njegovom smanjenju imaju dalekosežne posledice (Wertz et al., 2007). Održiva poljoprivreda ukazuje na mikrobne populacije kao instrument koji pokreće fundamentalne procese odgovorne za stabilnost i produktivnost agroekosistema (Singh et al., 2011). Pokazalo se da inokulacija sa efikasnim mikroorganizmima poboljšava kvalitet zemljišta, prinos i kvalitet useva. Osnova primene mikrobnih populacija kao alata u agrobiotehnologiji je poznavanje biljno-mikrobnih interakcija. Održivost sistema biljka-zemljište se može postići uravnoteženim i efikasnim biogeohemijskim kruženjem nutrijenata čime se smanjuje njihovo ispiranje (Barea et al., 2013). Veće korišćenje mikroorganizama u poljoprivrednim sistema bi moglo omogućiti smanjenje upotrebe mineralnih đubriva, pesticida i vode bez smanjenja prinosa (Andrews et al., 2010).

Najvažnija ekološka sredina u zemljištu, u kojoj se uspostavljaju različite biljno-mikrobne interakcije je rizosfera. Efekti biljaka na fizičke, hemijske i biološke karakteristike zemljišta su najočigledniji u ovoj zoni, gde oslobođeni biljni eksudati, zajedno sa biljno-mikrobnim interakcijama, dovode do razlika u sastavu mikrobnih populacija, sadržaju ugljenika, povećavaju dostupnost ključnih nutrijenata za rast biljaka i doprinose očuvanju rezerve vode. Koren biljaka izlučuje širok spektar jedinjenja (ugljeni hidrati, aminokiseline, sekundarni metaboliti) pomoću kojih privlači mikroorganizme i vrši njihov izbor u rizosferi (Huang et al., 2014). Mikroorganizmi u rizosferi preko različitih mehanizama utiču na rast i zdravlje biljaka. Brojnost mikrobnih vrsta u rizosferi varira od hiljadu do milion (Nihorimbere et al., 2011), a interakcije i asocijacije između korena i zemljišnih mikroorganizama su specijalizovane kroz koevolucione procese (Walker et al., 2011).

Najvažnija ekološka sredina u zemljištu, u kojoj se uspostavljaju različite biljno-mikrobne interakcije je rizosfera.

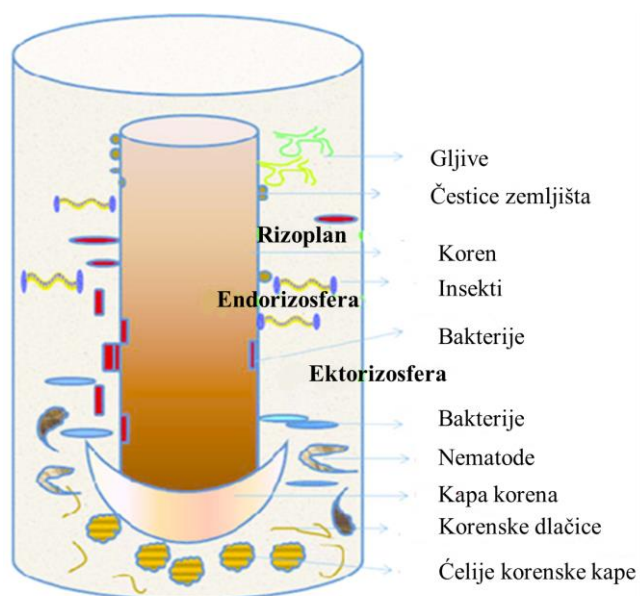
2.2. Rizosfera

Rizosfera može biti definisana kao zona zemljišta koja okružuje koren i nalazi se pod njegovim direktnim uticajem. To je jedinstvena zona koja se odlikuje intenzivnom biološkom, hemijskom, mikrobiološkom (>30,000 prokariotskih vrsta) i biohemijskom

aktivnošću kao i brojnošću mikroorganizama (10^{11} CFU g⁻¹) uzrokovanom velikom količinom organske materije (Bhardwaj et al., 2014; Huang et al., 2014). Ona je ekosistem sa ogromnim protokom energije (Barriuso et al., 2008).

Rizosfera se sastoji iz tri zone (Slika 2):

1. Endorizosfere koja obuhvata tkiva korena, uključujući endodermis i kortikalne slojeve uz endodermis;
2. Rizoplane koji obuhvata površinu korena sa česticama zemljišta i pričvršćenim mikroorganizmima i sastoji se od epidermisa, kortikalnih slojeva uz epidermis i mucilaginog polisaharidnog sloja i
3. Ektorizosfere koja obuhvata zemljište neposredno uz koren.



Slika 2. Dijagram rizosfere (Prashar et al., 2013)

Bogatstvo organske materije privlači mikroorganizme koji mogu imati koristan, neutralan ili štetan efekat na biljku (Souza et al., 2015). Rizosfera je glavno stanište korisnih mikroorganizama, poput PGPB, a obilje organske materije privlači i patogene mikroorganizme koji, da bi kolonizovali biljna tkiva, moraju prevazići mehanizme odbrane biljke (strukturne barijere, toksične materije). Prisustvo patogenih populacija deluje stimulatивно na populacije bakterija sa biokontrolnim odlikama (Bakker et al., 2013). Rizosferu naseljavaju i saprofitni mikroorganizmi koji obavljaju vitalne procese

poput razgradnje i mineralizacije organske materije i ključni su za dinamiku procesa u zemljištu (Nihorimbere et al., 2011).

Struktura bakterijskih zajednica u rizosferi je pod uticajem različitih biotičkih i abiotičkih faktora. Biljka je najvažniji faktor koji određuje dominantne bakterijske populacije u rizosferi. Vrsta, sorta, starost biljaka, karakteristike korena i korenski eksudati utiču na raznovrsnost i dominantnost određenih bakterijskih vrsta u rizosferi (MacDonald et al., 2004). Mikrobiološki procesi u ovoj zoni se odvijaju pod direktnim uticajem korenovog sistema jer biljka, tokom svog života, luči velike količine korenskih eksudata koji predstavljaju izvor energije i ugljenika za stanovnike rizosfere (Souza et al., 2015). Sa stanovišta mikroorganizama koji naseljavaju ovu zonu, koren obezbeđuje sve što zemljištu nedostaje. Korenskim eksudatima u zemljište dospevaju joni, voda, enzimi, primarni i sekundarni metaboliti. Procenjuje se da se 10-44% ugljenika usvojenog u procesu fotosinteze izlučuje kroz eksudate (Souza et al., 2015).

Sastav korenskih izlučevina čine: ugljeni hidrati (glukoza, fruktoza, arabinoza, galaktoza, maltoza, manoza, saharoza, ksiloza, rafinoza, ramnoza, riboza, oligosaharidi), aminokiseline (α -alanin, β -alanin, arginin, cistein, glicin, triptofan), organske i masne kiseline (askorbinska, limunska, fumarna, jabučna, linolinska, linoleinska, oleinska, palmitinska), enzimi (amilaze, peroksidaze, fenolaze, fosfataze, proteaze), proteini, polisaharidi, steroli, flavonoidi i nukleotidi i brojna druga jedinjenja (Uren, 2007; Huang et al., 2014).

Obilje organske materije prisutno u rizosferi čini ovu zonu najnaseljenijim delom zemljišta. Prisustvo gljiva je 10-20 puta, a bakterija 2-20 puta veće nego u okolnom zemljištu (Morgan et al., 2005). Na brojnost i raznovrsnost mikrobnih populacija prisutnih u rizosferi utiče vrsta, starost biljke, uslovi spoljašnje sredine (fizičko-hemijske osobine zemljišta) i antropogeni uticaji (Wertz et al., 2007; Cavaglieri et al., 2010; Vos et al., 2013). Biljke sastavom svojih eksudata utiču na pH vrednost rizosfere i vrše selekciju i pospešuju proliferaciju bakterija koje najviše odgovaraju njihovim zahtevima (Saharan i Nehra, 2011) stvarajući tako specifičnu sredinu smanjenog diverziteta (Solano et al., 2006).

Rizosferni mikroorganizmi uspostavljaju različite međusobne interakcije i interakcije sa biljkom (Prashar et al., 2013). Interakcije koje se uspostavljaju među zemljišnim mikroorganizmima su kompeticija za resurse, antagonizam koji uključuje

izlučivanje antagonističkih metabolita (antibiotici, toksini, isparljive supstance, biosurfaktanti) i ekstracelularnih enzima koji degradiraju ćelijski zid (hitinaze, β -1,3-glukanaze). Interakcije između PGPB i rizobija povećavaju nodulaciju, dok interakcije između PGPB i mikoriznih gljiva povećavaju efikasnost mikorizacije (Huang et al., 2014).

Eksudati su medijatori interakcija na relacijama biljka-biljka, biljka-mikroorganizmi i biljka-fauna. Ove interakcije variraju u zavisnosti od uslova spoljašnje sredine. Tako u uslovima optimalne obezbeđenosti azotom, odnos leguminoza i rizobija se može okarakterisati kao neutralan. Nedostatak azota indukuje sekreciju flavonoida koji privlače rizobije inicirajući stvaranje simbiotske veze (Huang et al., 2014). Na sastav eksudata utiče i prisustvo pojedinih mikrobnih vrsta. Rudrappa et al. (2008) su uočili da infekcija *Arabidopsis thaliana* sa *Pseudomonas syringae* pv.tomato indukuje povećano lučenje jabučne kiseline koja stimuliše kolonizaciju korena sa *Bacillus subtilis* FB17, PGPB koja poseduje mehanizam indukcije sistemske rezistencije.

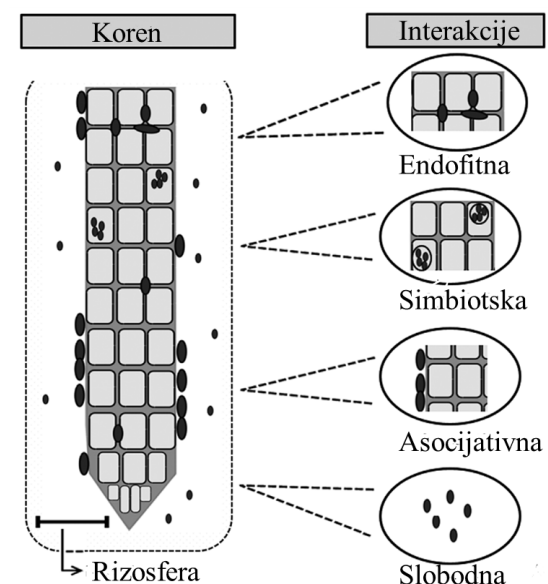
Interakcije između biljaka i mikroorganizama se uspostavljaju kroz proizvodnju signalnih jedinjenja poput indolnih i fenolnih jedinjenja. Od indolnih jedinjenja značajan je biljni hormon auksin koji proizvodi 80% bakterija prisutnih u rizosferi, a čiji efekat na rast biljaka varira od stimulativnog do patogenog. Flavonoidi su signalni molekuli koji iniciraju stvaranje simbioze između leguminoza i simbiotskih azotofisatora, dok je jabučna kiselina odgovorna za privlačenje PGPB (Huang et al., 2014). Eksudati biljaka privlače i patogene populacije čije prisustvo u rizosferi dovodi do selekcije bakterija sa biokontrolnim odlikama (Bakker et al., 2013).

Korisni mikroorganizmi označeni kao bakterije stimulatori biljnog rasta predstavljaju stalne stanovnike rizosfere i svoj uticaj ispoljavaju kroz poboljšanje dostupnosti nutrijenata, produkciju fitohormona ili inhibiciju patogena.

2.3. Bakterije stimulatori biljnog rasta

Bakterije stimulatori biljnog rasta su heterogena grupa korisnih mikroorganizama koji stupaju u simbiotske, slobodne i asocijativne interakcije sa biljkama (Slika 3; Souza et al., 2015). Simbiotske bakterije su prve privukle pažnju, a poslednjih godina raste

interesovanje za inokulate bazirane na upotrebi asocijativnih PGPB kako u poljoprivredi tako i u šumarstvu (Dominguez-Nuñez et al., 2015; Yegorenkova et al., 2016).



Slika 3. Interakcije između korena i korisnih zemljišnih bakterija (Souza et al., 2015)

Procenjuje se da 2-5% rizosfernih bakterija pripada grupi PGPB. Među njima su najzastupljeniji predstavnici roda *Bacillus* (Kumar et al., 2012a). Pored njih tu su i rodovi *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Beijerinckia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Rhizobium* spp., *Frankia* spp., *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. (Vessey, 2003; Hayat et al., 2010; Glick, 2012).

Primena mikroorganizmima u poljoprivredi sa ciljem povećanja prinosa može se pratiti vekovima unazad. Još pre nove ere zapaženo je da dodavanje zemljišta na kom su gajene leguminoze drugim zemljištima dovodi do povećanja plodnosti i prinosa (Nautiyal i Tilak, 2010). Sve do kraja XIX veka korišćen je ovaj način „prirodne inokulacije“. Prvi patent pod nazivom „Nitragin“ baziran na sojevima *Rhizobium* sp. pojavio se 1896. godine i vremenom je praksa inokulacije leguminoznih biljaka postala uobičajena agrotehnička mera u ratarskoj proizvodnji. Inokulacija sa nesimbioznim bakterijama, poput *Azotobacter* sp., je intenzivno korišćena 1930-ih i 1940-ih u Rusiji ali je vremenom napuštena. Istraživanja o zemljišnim mikroorganizmima, posebno

bakterijama sa stimulativnim dejstvom na rast biljaka, intenzivirana su sedamdesetih godina XX veka (Kloepper i Schroth, 1978; Suslow et al., 1979).

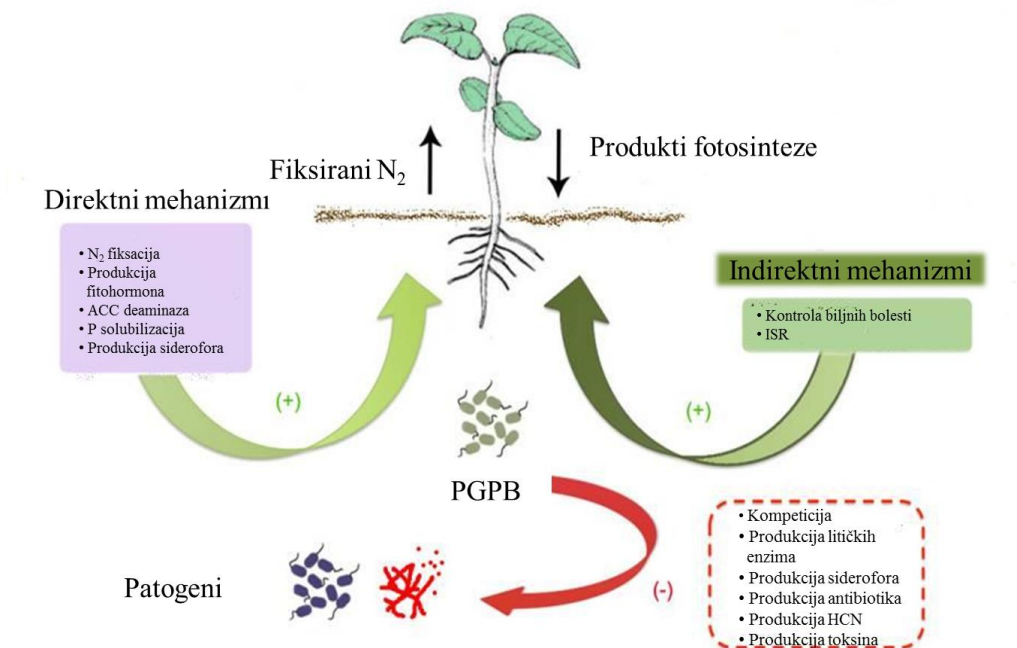
Termin *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* je prvi uveden i odnosio se na bakterije koje naseljavaju rizosferu (Kloepper i Schroth, 1978). Kako bi se obuhvatili stanovnici ostalih ekoloških niša došlo je do promene u *Plant Growth Promoting Bacteria* (Bashan i Holguin, 1998). Ovu heterogenu grupu čine bakterije koje ispoljavaju koristan efekat na rast, kvalitet i zdravlje biljaka (Glick, 2012) i najčešće se dele na: a) bakterije stimulatore biljnog rasta; b) bakterije sa biokontrolnom ulogom; c) bakterije koje (in)direktno regulišu rast biljaka u uslovima stresa (*Plant stress homeoregulating bacteria*- PSHB) (Sgroy et al., 2009).

Inokulacija sa PGPB pokazala se kao dobra alternativa mineralnim đubrivima kojom se postiže održavanje stabilnih prinosa (Hungria et al., 2013) uz istovremeno smanjenje zagađenja životne sredine (Souza et al., 2015). Smatra se da njihova primena poseduje potencijal da smanji i/ili potpuno zameni upotrebu mineralnih đubriva i pesticida (Gupta et al., 2015).

Danas na tržištu postoji veliki broj proizvoda baziranih na upotrebi PGPB. Preparati namenjeni za borbu protiv biljnih bolesti označeni su kao bioprotektanti, oni koji poboljšavaju dostupnost nutrijenata su biofertilizatori, dok su biostimulatori na bazi mikroorganizama koji produkuju biljne hormone (Saharan i Nehra, 2011). Upotreba ovakvih preparata utiče na poboljšanje zdravlja i biološke ravnoteže zemljišta, smanjenje zagađenja i povećanje plodnosti (Tilak et al., 2005). Uz to, niska cena proizvodnje, jednostavna primena i uključivanje u poljoprivrednu proizvodnju bez dodatnih ulaganja u opremu čine da potražnja za ovim proizvodima bude u stalnom porastu. Najrazvijenije zemlje, poput članica EU (Common Agricultural Policy), USA, Japana, Kine i Indije, nastoje da kroz svoju zakonsku regulativu i stimulativna sredstva ohrabre upotrebu mikrobioloških inokulata. Procenjuje se da će tržišna vrednost ovih proizvoda u Evropi 2017. god. dostići 4,5 milijarde dolara (García-Fraile et al., 2015).

2.4. Mehanizmi delovanja bakterija stimulatora biljnog rasta

Bakterije stimulatori rasta biljaka utiču na biljke nizom direktnih i indirektnih mehanizama (Slika 4).



Slika 4. Direktni i indirektni mehanizmi PGPB (García-Fraile et al., 2015)

Njihov uticaj na biljni rast proizilazi iz specifičnih interakcija koje se uspostavljaju između odgovarajuće biljne vrste, kultivara ili genotipa i bakterijske vrste ili soja (Mehta et al., 2015). Razlika između ove dve grupe mehanizama nije uvek jasno vidljiva, ali se, po pravilu, indirektni mehanizmi odvijaju izvan biljke, dok se direktni mehanizmi odvijaju unutar biljke i direktno utiču na njen metabolizam (Siddikee et al., 2010).

Kroz direktne i indirektno mehanizme PGPB ubrzavaju klijanje, stimulišu rast korena, nadzemnog dela, štite od bolesti i abiotičkih stresova (Glick, 2012; Bhardwaj et al., 2014). Pored neposrednog uticaja na biljni rast ove bakterije imaju i glavnu ulogu u transformaciji organske materije u zemljištu kao i u agregaciji zemljišnih čestica čime posredno utiču na dostupnost nutrijenata biljci (Johansen i Binnerup, 2002).

2.4.1. Direktni mehanizmi

Direktnim mehanizmima PGPB povećavaju dostupnost hranljivih elemenata (biološka fiksacija azota, solubilizacija fosfata, produkcija siderofora) i regulišu hormonski status biljaka (produkcija auksina, giberelina, citokinina).

Biološka fiksacija azota (BNF). Azot je jedan od glavnih biljnih nutrijenata i biljke ga usvajaju u formi nitrata i amonijaka. Njegova niska dostupnost usled velikih gubitaka emisijom i ispiranjem je ograničavajući faktor u poljoprivrednim ekosistemima. Zbog toga bakterije sa sposobnošću da fiksiraju atmosferski azot do amonijaka, forme koja je dostupna biljkama, imaju ključnu ulogu u agroekosistemima. BNF predstavlja ekonomski i ekološki prihvatljivu alternativu azotnim mineralnim đubrivima.

U zavisnosti od odnosa bakterije sa biljkom, azotofiksatori se dele na: simbiotske (*Allorhizobium* sp., *Azorhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp., *Methylobacterium* sp., *Sinorhizobium* sp., *Ensifer* sp., *Frankia* sp.), slobodne (*Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Nostoc* sp., *Anabaena* sp.) i asocijativne (*Azospirillum* sp., *Pseudomonas* sp., *Derrisia* sp.).

Biološka fiksacija azota se smatra važnim mehanizmom PGPB jer direktno snabdeva biljku azotom. Sojevi azotofiksatornih bakterija se nalaze na tržištu kao biofertilizatori i poslednjih 20 godina se smatraju važnom komponentom održive poljoprivrede (Goswami et al., 2015).

Solubilizacija fosfata. Fosfor je neophodan nutrijent za svaku živu ćeliju i sastavni je deo važnih makromolekula kao što su ATP, fosfolipidi, enzimi i nukleinske kiseline. U zemljištu je prisutan u nerastvorljivom mineralnom (apatit, hidroksiapatit i oksipatit) i organskom obliku (inositol fosfati, fosfomonoestri, fosfodiestri, fosfotriestri) (Khan et al., 2007). Iako je ovaj esencijalni makronutrijent prisutan u zemljištu u dovoljnoj količini (400-1200 mg kg⁻¹), najveći deo se nalazi u nerastvorljivoj formi dok se udeo rastvorljivog fosfora kreće u opsegu od 0,08-0,25% (Gamalero i Glick, 2011). Stoga se kao obavezna agrotehnička mera primenjuje unos fosfora kroz mineralna đubriva. Nedostatak ove mere je brza apsorpcija fosfora od strane minerala ili precipitacija sa Fe³⁺ i Al³⁺ jonima u kiselim zemljištima, kao i Ca²⁺ jonima u alkalnim zemljištima (Marra et al., 2011). Procenjuje se da 75-90% ovako

unetog fosfora nije iskorišćeno od strane biljke (Gamalero i Glick, 2011). Reverzibilnost ovih procesa je izuzetno niska. Biljke usvajaju fosfor isključivo u obliku jona ortofosforne kiseline (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}) čija je optimalna dostupnost pri pH vrednosti od oko 6,5 (Bhattacharyya i Jha, 2012).

Grupa bakterija označena kao fosfat solubilizujuće bakterije (*Phosphate solubilizing bacteria*, PSB) poseduje sposobnost da nerastvorljivi fosfor prevede u rastvorljivu formu i time ga učine dostupnim. PSB ovo postižu sintezom organskih kiselina niske molekulske mase (karboksilne kiseline). Ove kiseline vezuju fosfat svojim hidroksil i karboksil grupama i smanjuju pH vrednost sredine čime utiču na veze u nerastvorljivim formama. Dodatni mehanizmi delovanja su oslobađanje H^+ jona, produkcija helatora i neorganskih kiselina, fosfataza kao i egzopolisaharida (Vessey, 2003; Yi et al., 2008). Takođe, PBS u blizini biljke povećavaju efikasnost azotofiksacije, dostupnost drugih esencijalnih nutrijenata (Fe, Zn...) i produkuju regulatore biljnog rasta (Afzal i Bano, 2008).

Otkrivanje mutualističke veze između PBS i biljaka je podstaklo razvoj novih tehnologija poput korišćenja PBS kao biofertilizatora. Komercijalizacija PSB je počela još 50-ih godina prošlog veka (Kudashev, 1956; Krasilnikov, 1957). Primena mikroorganizama sa sposobnošću rastvaranja fosfata može doprineti smanjenju korišćenja fosfatnih đubriva. Primećeno je da je efikasnost ove grupe bakterija najizraženija prilikom koinokulacije sa mikoriznim i nemikoriznim gljivama (Babana i Antoun 2006), kao i bakterijama drugačijih fizioloških karakteristika, poput azotofiksatora (Valverde et al., 2006; Matias et al., 2009). Među najznačajnijim predstavnicima bakterija koje poseduju ovu osobinu su predstavnici rodova *Rhizbium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* i *Serratia* (Souza et al., 2015).

Produkcija siderofora. Gvožđe je esencijalan mikronutrijent za rast biljaka i iako ga ima dovoljno u zemljištu njegova asimilacija od strane živih organizama je izuzetno niska (10^{-7} - 10^{-23} M pri pH 3,5 i 8,5). Najčešće forme u kojima se nalazi su hidroksidi, oksihidroksidi i oksidi (Gamalero i Glick, 2011). Kako bi obezbedili dovoljnu količinu ovog nutrijenta, biljke i mikroorganizmi (gljive i bakterije) sintetišu i koriste helatore male molekulske mase (< 1000 Da), odnosno siderofore (Ali i Vidhale, 2013). Molekuli siderofora su peptidi koji sadrže lateralne lance i funkcionalne grupe visokog afiniteta prema feri jonima (Ahmed i Holmström, 2014). Prema funkcionalnoj

grupi i strukturi siderofore se klasifikuju kao kateholati, hidroksamati i karboksilati (Ahmed i Holmström, 2014). Neke siderofore su klasifikovane kao fenoli (jersiniabaktin) dok piroverdini, produkovani od strane *Pseudomonas* vrsta sadrže i hidroksamat i kateholat funkcionalnu grupu (Pérez-Miranda et al., 2007). Kateholate proizvode bakterije poput *Agrobacterium tumefaciens*, *Paracoccus denitrificans* i *Erwinia carotovora* (Ali i Vidhale, 2013). Hidroksamate proizvode i gljive i bakterije, karboksilate zigomicete i bakterije poput *Rhizobium meliloti* i *Staphylococcus hyicus* (Pérez-Miranda et al., 2007). Do sada je poznato više od 500 različitih tipova siderofora od kojih je 270 strukturno okarakterisano (Ahmed i Holmström, 2014).

Siderofore formiraju komplekse sa jonima gvožđa koji uz pomoć receptora na ćelijskoj membrani dospevaju u unutrašnjost ćelije (Ali i Vidhale, 2013). Siderofore na rast biljaka deluju direktno tako što obezbeđuju gvožđe, ali i indirektno, tako što smanjuju količinu dostupnog gvožđa patogenim mikroorganizmima. Tortora et al. (2011) su zabeležili da inokulacija jagode sa *A. brasilense* koji proizvode siderofore smanjuje simptome bolesti izazvane *Colletotrichum acutatum*.

Inokulacija biljaka bakterijama koje proizvode siderofore dovodi do stimulacije rasta i povećanja prinosa (Ali i Vidhale, 2013). Sposobnost izolata *Pseudomonas* sp. GRP3A da proizvode siderofore dovela je do stimulacije rasta korena zlatnog pasulja, rasta nadzemnog dela biljke i povećanja biomase nadzemnog dela (Sharma i Johri, 2003). *Micrococcus yunnanensis* YIM 65004 i *Stenotrophomonas chelatiphaga* LPM-5 su stimulisali produkciju biomase uljane repice i povećali sadržaj gvožđa u biljnim tkivima (Ghavami et al., 2017). *P. fluorescens* CRPF9 koji se odlikovao produkcijom siderofora je značajno stimulisao rast korena pšenice i korena i nadzemnog dela zlatnog pasulja (Katiyar i Goel, 2004).

Na biosintezu siderofora u biljkama i mikroorganizmima, pre svega, utiče dostupnost gvožđa i u uslovima visoke koncentracije gvožđa, ne dolazi do sinteze siderofora (Machuca i Milagres, 2003). Siderofore formiraju stabilne komplekse i sa ostalim teškim metalima, poput Cd, Cu, Ni, Pb i Zn, što omogućava njihovu asimilaciju od strane korena i primenu u bioremedijaciji (Ahmed i Holmström, 2014; Hansda et al., 2014). Siderofore ublažavaju fitotoksičnost teških metala apsorbujući ih kroz metaboličke procese ili pasivnim putem (Hansda et al., 2014).

Produkcija auksina. Do sada je opisano nekoliko tipova auksina u prirodi, a najviše je izučavana indol-3-sirćetna kiselina (IAA). IAA utiče na deobu, elongaciju, diferencijaciju ćelija, stimuliše klijanje semena, utiče na fotosintezu, stvaranje pigmenata, biosintezu različitih metabolita i otpornost na stresne uslove (Gamalero i Glick, 2011). Inokulacija biljke PGP bakterijama koje proizvode IAA dovodi do razvoja korenovog sistema kroz elongaciju primarnih i stvaranje lateralnih i adventivnih korenova, povećanja visine nadzemnog dela, površine listova i biomase (Çakmakçı et al., 2007; Malhotra i Srivastava, 2009; Puente et al., 2010; Glick, 2012). Stimulacija razvoja korena je od velike koristi za mlade biljke jer ih čini stabilnijim, pričvršćenijim za podlogu i povećava njihovu sposobnost usvajanja vode i nutrijenata.

Veliki broj zemljišnih bakterija (~ 80%), kako patogenih tako i korisnih, poseduje sposobnost produkcije auksina (Gupta et al., 2015). Sposobnost sinteze IAA poseduju predstavnici rodova *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azospirillum*, *Serratia*, *Bacillus* i *Azotobacter* (Ahemad i Kibret, 2014).

Biohemijski putevi kojima korisni i patogeni mikroorganizmi sintetišu auksine se razlikuju. Patogene bakterije proizvode IAA od triptofana kao prekursora, preko indolacetamida kao međuproizvoda, dok korisne bakterije sintetišu IAA uglavnom preko drugog, takođe triptofan zavisnog puta, gde kao proizvod katalize triptofana od strane triptofan transaminaze nastaje indolpiruvinska kiselina (Patten i Glick, 2002). Gen koji kodira sintezu indolpiruvat dekarboksilaze, koja katališe ključni korak u sintezi IAA kod korisnih bakterija, je *ipdc* gen (Patten i Glick, 2002). Biosinteza auksina je pod uticajem brojnih faktora poput pH vrednosti sredine, osmotskog stresa, sadržaja ugljenika kao i sastava korenskih eksudata. Malhotra i Srivastava (2009) su pokazali da stres poput nedostatka makronutrijenata (N, C, P) može biti okidač za IAA sintezu. Pored nutritivnog stresa, prisustvo kiseonika je važan faktor u biosintezi IAA (Malhotra i Srivastava, 2009).

Smatra se da bakterije proizvode auksin, hormon koji njihove ćelije ne mogu koristiti, zbog njegovog značaja za odnos između biljaka i bakterija. Auksini stimulišu razvoj korena, što dovodi do povećanja količine dostupnih hranljivih materija i veće količine korenovih eksudata oslobođenih u rizosferu (Patten i Glick, 2002). Za indukovanje stimulativnog efekta dovoljna je mala količina egzogenog IAA (između 10^{-10} i 10^{-12} M), dok povećane koncentracije mogu dovesti do inhibicije biljnog rasta

(Gamalero i Glick, 2011). Efektivna koncentracija bakterijskog auksina zavisi od biljne vrste, osetljivosti biljnog tkiva, faze rasta (Glick, 2012) kao i količine endogenog auksina (Husen et al., 2009).

Produkcija giberelina. Giberelini regulišu deobu ćelija i njihovu elongaciju, rast korena, klijanje semena, izduživanje stabla, cvetanje, plodonošenje i odlaganje starenja biljnih organa (Gamalero i Glick, 2011). Sposobnost produkcije giberelina je primećena kod brojnih rodova poput *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Rhizobium*, *Burkholderia* i *Xanthomonas*. Istraživanja rađena sa PGPB koje proizvode gibereline potvrđuju stimulatívno dejstvo ovih bakterija na biomasu biljaka (Gamalero i Glick, 2011). Kang et al. (2012) su pokazali da inokulacija krastavca sa *Acinetobacter calcoaceticus* koji proizvode gibereline dovodi do značajnog povećanja visine i ukupne biomase biljke.

Produkcija citokinina. Uloga ovih hormona u biljnoj ćeliji ogleda se kroz promociju deobe ćelija, prekid mirovanja uspavanih pupoljaka, aktivaciju klijanja semena, razvoj korena i stabla, podsticanje grananja, kontrolu apikalne dominacije nadzemnog dela, akumulaciju hlorofila, starenje listova i odlaganje starenja (Bashan i Bashan, 2010; Gamalero i Glick, 2011). Otkriveno je da neke *Bradyrhizobium* vrste koriste citokinine kao alternativu za Nod faktor pri procesu nodulacije (Bashan i Bashan, 2010). Sposobnost produkcije ovog hormona je utvrđena kod brojnih PGPB rodova poput *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Proteus* i *Pseudomonas* (Gamalero i Glick, 2011).

Arkhipova et al. (2005) su zabeležili da inokulacija zelene salate sa *B. subtilis* koji proizvode citokinine dovodi do povećanja sadržaja citokinina u biljnim tkivima i povećanja biomase nadzemnog dela i korena. Takođe, Arkhipova et al. (2007) su utvrdili da inokulacija bakterijama koje proizvode citokinine stimuliše rast nadzemnog dela i smanjuje odnos koren : nadzemni deo u biljkama izloženim suši. Citokinini su uključeni u inficiranje korenskih dlačica i stvaranje nodula (Frugier et al., 2008), a pozitivna veza između citokinina i sposobnosti *Rhizobia* da stvaraju nodule je primećena kod nekoliko leguminoznih biljaka (Gamalero i Glick, 2011).

Produkcija etilena. Etilen učestvuje u regulaciji različitih faza u životu biljke poput sazrevanja plodova, starenja cvetova i listova, ali reguliše i odgovor biljke na biotičke i abiotičke stresove (Lucy et al., 2004; Ahemad i Kibret, 2014). Etilen se u biljci akumulira kao odgovor na abiotički i biotički stres kao što su ekstremne temperature, jaka svetlost, poplave, suša, visok intenzitet svetlosti, povišena koncentracije soli i polutanata kao i različitih štetočina i patogena (Gamalero i Glick, 2011; Ahemad i Kibret, 2014). Tokom većeg dela života biljke, produkcija etilena je minimalna. Infekcija leguminoza sa *Rhizobium* spp. dovodi do povećanja nivoa etilena u tkivima blizu mesta infekcije (Glick, 2012). Količina etilena produkovna prilikom ovih procesa je mala, dok povećane koncentracije mogu inhibirati proces infekcije i nodulacije (Ma et al., 2002), dovesti do inhibicije rasta korena, opadanja listova, smanjenja prinosa, uvenuća i starenja biljke (Glick et al., 1999; Bhattacharyya i Jha, 2012).

U sintezi etilena učestvuju tri enzima: a) S-adenozil-L-metionin (SAM) sintetaze koji katališe prevođenje metionina do SAM, b) 1-aminociklopropan-1-karboksilna kiselina (ACC) sintetaze koja reguliše hidrolizu SAM do ACC i 5'-metiltioadenozina i c) ACC oksidaze koja metaboliše ACC do etilena, ugljen-dioksida i cijanida (Gamalero i Glick, 2011). Enzim ACC deaminaza degradira prekursor etilena, ACC, do amonijaka i α -ketobutirata i tako smanjuje količinu etilena u biljci. Smatra se da se kontrolisanjem koncentracije etilena u biljci može značajno poboljšati poljoprivredna proizvodnja (Gamalero i Glick, 2011). Iqbal et al. (2012) su pokazali da inokulacija sočiva sa *Pseudomonas* sp. koji produkuje ACC deaminazu povećava broj nodula, biomasu i prinos. Inokulacija biljaka kikirikija gajenih u zaslanjenom zemljištu sa *P. fluorescens* koji produkuje ovaj enzim dovela je do povećanja prinosa (Saravanakumar i Samiyappan, 2007).

Neki od rodova kod kojih je utvrđeno prisustvo ovog enzima su *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Pseudomona* i *Serratia* (Ahemad i Kirbet, 2014).

Pored navedenih direktnih, PGPB ispoljavaju i čitav niz mehanizama pomoću kojih posredno stimulišu biljni rast.

2.4.2. Indirektni mehanizmi

Primena zemljišnih mikroorganizama u borbi protiv biljnih bolesti je jedna od alternativa hemijskim sredstvima zaštite (Compant et al., 2005). Inokulacija PGPB je pristup koji je primenljiv i u organskoj poljoprivredi. Suzbijanjem biljnih patogena PGPB indirektno stimulišu rast biljaka. Ovi mehanizmi se ogledaju kroz dve strategije delovanja: suzbijanje patogena i indukovanje sistemske rezistentnosti (ISR) biljke (Ahemad i Kibret, 2014). Suzbijanje patogena se postiže uspostavljanjem kompeticijskih odnosa za mesto i hranu kao i produkcijom brojnih metabolita koji deluju mikrobicidno ili mikrobistatički.

Kompeticija. Preduslov za uspešnu borbu protiv biljnih patogena je kolonizacija rizosfere koja zavisi od sposobnosti PGPB da koriste specifične uslove sredine i da se prilagode promenama tih uslova (Compant et al., 2005). Sinteza antagonističkih molekula koji su deo *quorum sensing*-a, degradacija organskih jedinjenja i/ili oduzimanje mikronutrijenata neophodnih za rast patogena (Fe) su neki od mehanizama koje PGPB koriste za sticanje prednosti u ovoj ekološkoj niši (Gamalero i Glick, 2011). Takođe, stvaranje intimne veze sa biljkom je jedan od načina na koji mikroorganizmi obezbeđuju mesto u rizosferi (Nihorimbere et al., 2011). Često ovi mikroorganizmi stvaraju na površini korena mikrokolonije ili biofilme, a sam proces kolonizacije inicira biljka lučenjem signalnih molekula (Berg, 2009). Sposobnost brzog rasta, sinteze vitamina B1, izlučivanja NADH dehidrogenaze i bakterijskih lipopolisaharida doprinosi kolonizaciji biljnih tkiva od strane PGPB (Compant et al., 2005).

Produkcija antibiotika. Mehanizam kojim se najčešće PGPB bore protiv biljnih patogena je produkcija ovih metabolita (Lucy et al., 2004). Produkcija antibiotika je odlika predstavnika rodova *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., i *Stenotrophomonas* sp. (Gupta et al., 2015).

Produkcija cijanovodonične kiseline. Produkcija isparljivih sekundarnih metabolita sa biokontrolnim osobinama može delovati pozitivno na suzbijanje bolesti biljaka. Produkcija HCN je odlika *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., i *Serratia* sp. (Sharma et al., 2013; Ahemad i Kibret, 2014). Najčešći prekursor za nastanak HCN je glicin mada i druge amino kiseline stimulišu njegovu produkciju. Novija saznanja pokazuju da

bakterije koje imaju sposobnost produkcije HCN ubrzavaju rast biljka, procenat klijavosti, brzinu klijavosti, povećavaju biljnu biomasu i usvajanje nutrijenata (Saharan i Nehra, 2011). Produkcijom HCN se može smanjiti rast biljaka što je značajno u borbi protiv korova (Kremer i Souissi, 2001).

Produkcija litičkih enzima. Brojne PGPB deluju hiperparazitski, napadajući patogene lučenjem enzima koji degradiraju ćelijski zid (fosfataze, dehidrogenaze, hitinaze, proteaze, celulaze, lipaze, β -glukozidaze, N-acetil- β -glukozaminidaze, β -1,3-glukanaze, β -1,4-glukanaze) ili degradiraju njihove litičke enzime time presecajući put njihovog dejstva pomoću proteaza (Glick, 2012; Sharma, 2012; Gupta et al., 2015). PGPB koje sintetišu jedan ili više ovih enzima imaju značajno mesto u biokontroli velikog broja biljnih patogena poput *Botrytis cinerea*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* (Glick, 2012).

Pored navedenih mehanizama, utvrđeno je da pojedine PGPB imaju sposobnost detoksifikacije i degradacije faktora virulencije, degradacije *quorum-sensing* signala patogena, čime se blokira ekspresija brojnih gena povezanih sa virulencijom (Compant et al., 2005).

Indukovana sistematska rezistencija (ISR). Prisustvo pojedinih PGPB u rizosferi aktivira ISR koja čini biljku rezistentnom na patogene bakterije, gljive i viruse. ISR je slična sistematski stečenoj rezistenciji koja se javlja kada biljka aktivira svoje odbrambene mehanizme kao odgovor na infekciju od strane patogena (Gupta et al., 2015). Najveći broj PGPB aktivira ISR preko signalnih puteva koje regulišu jasmonat i etilen, dok neke koriste salicilnu kiselinu, pioverdin, i/ili ciklične lipopeptidne surfaktante (Gamalero i Glick, 2011). Odbrambeni mehanizmi uključeni u ISR aktivirani od strane PGPB najčešće dovode do jačanja ćelijskog zida i promena u fiziologiji domaćina koje rezultuju produkcijom defanzivnih jedinjenja poput peroksidaza, hitinaza, fitoaleksina i fitoenol oksidaza (Bakker et al., 2007; Gamalero i Glick, 2011).

2.5. Primena bakterija stimulatora biljnog rasta

Izazovi sa kojima se suočava savremena poljoprivredna praksa su konstantna potreba za povećanjem prinosa i briga o kvalitetu i zdravstvenoj bezbednosti hrane. Proizvodnja mineralnih đubriva zahteva potrošnju velike količine energije, doprinoseći na taj način zagađenju vazduha, vode i zemljišta. Međutim, 60 - 90% ukupno primenjenih đubriva je izgubljeno, dok biljke iskoriste samo 10 - 40% (Bhardwaj et al., 2014) pri čemu je njihova primena štetna za zdravlje čoveka i životnu sredinu. Pored toga, primena mineralnih đubriva se negativno odražava i na mikrobne zajednice u zemljištu. Dokazano je da visoke količine dostupnog azota redukuju azotofiksaciju i kolonizaciju biljaka od strane PGPB u prirodnim uslovima (Jha et al., 2013).

Jedan od načina za poboljšanje uslova za gajenje biljaka, koji se smatra ekološki i ekonomski opravdanim, je korišćenje zemljišnih mikroorganizama kao zamena za mineralna đubriva i hemijska sredstva zaštite (Gamalero i Glick, 2011; Gupta et al., 2015). Primena bakterijskih inokulata je sastavni deo održive poljoprivredne prakse, naročito u organskoj proizvodnji (García-Fraile et al., 2015). Efekti primene PGPB na useve su: povećanje klijavosti, stimulacija rasta i razvoja korena, nadzemnog dela biljke, ukupne biomase biljke, težine semena i povećanje prinosa (Ahemad i Kirbet, 2014). Inokulacija utiče i na povećanje težine korena, nadzemnog dela i listova u ranim fazama rasta (Çakmakçı et al., 2006). Takođe, prisustvo ovih bakterija poboljšava fizičke, hemijske i biološke osobine zemljišta kao i njegovu plodnost (Bhardwaj et al., 2014).

Literaturni podaci navode stimulatívne efekte inokulacije na pirinač, pšenicu, spanać, kukuruz, cerealije, krompir, šećernu repu, rotkvice, soju i grašak (Pal, 1998; Urashima i Hori, 2003; Afzal i Bano, 2008; Farzana et al., 2009; Bhattacharyya i Jha, 2012; Sharma et al., 2013; Prathap i Kumari, 2015; Yegorenkova et al., 2016). Navedeni efekti, zajedno sa porastom ekološke svesti i stimulatívnim merama doveli su do uspostavljanja razvijenog tržišta mikrobioloških preparata, bioinokulata (García-Fraile et al., 2015).

U pogledu upotrebe bioinokulanata prednjače razvijenije zemlje. Prema navodima García-Fraile et al. (2015) u USA i Kanadi najveći broj proizvoda je namenjen inokulaciji leguminoza. U Brazilu se najveća količina preparata na bazi

bakterija iskoristi u proizvodnji pasulja, kukuruza, pirinča, šećerne repe, soje, šargarepe, paradajza, pamuka, krmnog bilja, citrusa i eukaliptusa. U Argentini, Paragvaju, Boliviji, Urugvaju više od 70% soje se inokuliše sa *Bradyrhizobium* sp. U Rusiji se bioinokulati najviše koriste u proizvodnji pšenice, ječma, šargarepe i kupusa. Evropa se odlikuje izuzetno razvijenim tržištem bioinokulata što je posledica stimulatívne politike. Takođe, i zemlje poput Japana, Kine, Indije nastoje da kroz propise stimulišu održivu poljoprivredu, a u okviru nje i upotrebu mikrobioloških inokulata (García-Fraile et al., 2015).

Proučavanje interakcija između drvenastih kultura i PGPB je počelo 80-ih, 90-ih godina prošlog veka (Chanway, 1997). Inokulacija drvenastih biljaka povećava produkciju biomase, visinu biljaka, površinu nadzemnog dela, težinu korena, ubrzava rast korena, brzinu klijanja semena, povećava površinu lista, sadržaj hlorofila, magnezijuma, azota, proteina u listu, povećava toleranciju biljke na sušu, prisustvo soli i teških metala (Jing et al., 2007; Puente et al., 2010). PGPB poseduju sposobnosti da povećaju preživljavanje tek presađenih sadnica kao i da stimulišu stvaranje veza sa simbiotskim azotofiksatorima (Bent et al., 2001; Barriuso et al., 2008; Nadeem et al., 2014).

Jedan od najznačajnijih pozitivnih efekta bakterija stimulatora rasta biljaka je ubrzavanje rasta i regeneracije korenovog sistema. Brz rast korena je od velike koristi za mlade sadnice jer povećava njihovu sposobnost da se pričvrste za tlo i obezbede vodu i nutrijente čime se pospešuje prevazilaženje transplantacionog šoka (Mallik i Williams, 2008). Ovaj efekat je veoma značajan za drvenaste sadnice namenjene pošumljavanju, jer uspeh pošumljavanja zavisi od kvaliteta sadnica (Puente et al., 2010). Jedan od načina da se poboljša kvaliteta sadnica je uvođenje PGPB u rasadničarsku praksu bilo pojedinačno ili kroz koinokulaciju sa mikoriznim gljivama (Gamalero et al., 2010; Pereira i Castro, 2014).

Na porast interesovanja za bakterije u šumarstvu uticalo je i otkriće njihovog stimulatívanog uticaja na formiranje mikorize (*Mycorrhization helper bacteria*, MHB) (Kurth et al., 2013). Mada se PGPB i MHB tretiraju zasebno, brojni podaci ukazuju na preklapanja u pogledu predstavnika (Frey-Klett et al., 2007; Shilev et al., 2007; Rigamonte et al., 2010) i jasnu granicu između ove dve grupe nije moguće postaviti. Literaturni navodi naglašavaju i potencijalne koristi od sinergističkih odnosa

uspostavljenih koinokulacijom mikoriznih gljiva i PGPB (Gamalero et al., 2010). Rezultati eksperimenata izvedenih u laboratorijskim uslovima, uslovima staklenika i otvorenog polja potvrđuju opravdanost korišćenja bakterijskih inokulata u šumarstvu (Chanway et al., 2000; Probanza et al., 2002; Karlidag et al., 2007).

Kao i poljoprivredna proizvodnja, i šumska rasadničarska praksa se oslanja na upotrebu mineralnih đubriva i pesticida. Domínguez-Núñez et al. (2015a) su uočili da tretman koji kombinuje smanjenu fertilizaciju mineralnim đubrivima i inokulaciju sa PGPB ima pozitivan uticaj na rast sadnica, usvajanje nutrijenata i može biti dobar način za poboljšanje kvaliteta sadnica u rasadnicima.

Uticaj PGPB je najviše ispitan na rodovima *Pinus*, *Picea*, *Tsuga*, *Pseudotsuga*, *Quercus* i *Eucalyptus* (Chanway, 1997; Mafia et al., 2009; Ribeiro i Cardoso, 2012). Rezultati nekih od novijih publikacija iz ove oblasti dati su u Tabeli 1.

Međutim, za masovnu upotrebu PGPB treba prevazići nekoliko ograničenja koja predstavljaju izazov za dalja istraživanja. Rezultati dobijeni u laboratoriji se mogu znatno razlikovati od rezultata dobijenih u prirodnim uslovima (Glick et al., 1999; Mallik i Williams, 2008; Kumar et al., 2014). Činjenica je da su interakcije između PGPB i biljaka pod velikim uticajem uslova spoljašnje sredine, stoga, izolat sa PGP karakteristikama može ispoljiti čitav spektar efekata na biljku, od korisnih, neutralnih do patogenih u zavisnosti od faktora sredine (Belimov et al., 2007; Husen et al., 2011).

Sastav zemljišta, temperatura, relativna vlažnost, sastav korenskih eksudata, prisustvo rekombinantnih plazmida i interakcije sa ostalim organizmima utiču na opstanak PGPB u rizosferi. Sposobnost PGPB da prežive i kolonizuju rizosferu, prepoznaju signale, nutrijente i toksine koji se ovde emituju (Malhotra i Srivastava, 2009) ključna je za postizanje stimulacije biljnog rasta. Od sposobnosti da nađu svoje mesto u ovoj izuzetno kompetitivnoj sredini zavisi i sposobnost ispoljavanja korisnog efekta na rast biljaka (Whipps, 2001; Rincón et al., 2008).

Tabela 1. Uticaj PGPB na drvenaste vrste

PGPB	Biljka	Benefit	Izvor
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Morus alba</i> L.	inhibicija patogena, stimulacija rasta	Ji et al., 2010
<i>Azotospirillum brasilense</i>	<i>Eucalyptus globules</i> Labill.	klijanje semena, stimulacija ranog rasta sadnica, porast biomase korena	Puente et al., 2010
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	stimulacija rasta, porast ukupne biomase	Hao et al., 2012
<i>Azotobacter chroococcum</i> ; <i>Bacillus megaterium</i> ; <i>B. circulans</i> ; <i>B. licheniformis</i> ; <i>B. pumilus</i> ; <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Pinus sylvestris</i> L.; <i>Picea abies</i> L. Karst	stimulacija rasta	Gujaničić et al., 2012
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Thuja plicata</i> Donn.	stimulacija rasta, povećan sadržaj N u listovima	Anand i Chanway, 2013
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Pinus contorta</i> var. <i>latifolia</i> (Dougl.) Engelm.	stimulacija rasta, uspješnije preživljavanje, povećan sadržaj N u listovima	Anand et al., 2013
<i>Azotobacter chroococcum</i> ; <i>Streptomyces</i> sp.	<i>Ulmus pumila</i> L.; <i>Robinia pseudoacacia</i> L.; <i>Acer dasycarpum</i> Ehrh.	stimulacija rasta	Hajnal-Jafari et al., 2014
<i>Bacillus licheniformis</i> ; <i>Aeromonas hydrophila</i> ; <i>Pseudomonas putida</i> ; <i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.; <i>Pinus sylvestris</i> L.	stimulacija rasta	Karličić et al., 2015
<i>Mesorhizobium</i> sp.	<i>Betula pubescens</i> Ehrh.	stimulacija rasta, porast biomase korena	Sousa et al., 2015
<i>Pseudomonas putida</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Corylus avellana</i> L.	stimulacija rasta, povećanje zapremine korena, porast ukupne biomase	Rostamikia et al., 2016

Jedna od strategija da se obezbedi opstanak PGPB u rizosferi je rano uspostavljanje korisnih endofitnih PGPB zajednica unutar korenovog sistema (Forchetti et al., 2007). Mnoge PGPB su sposobne da endofitno kolonizuju biljne organe i prilagode se uslovima ove specifične niše, a da pri tome ne izazovu štetne posledice po biljku (Compant et al., 2005). Korisne endofite se redovno javljaju u prirodi, imaju sposobnost da prođu kroz korteks korena, prevaziđu endodermis i dospeju do vaskularnog sistema, kolonizuju ga kao i ostale organe (cvet, plod, list, stablo, seme), utičući pozitivno na rast, produktivnost i zdravstveno stanje biljke (Kim et al., 2012). Biljka domaćin štiti endofite od uticaja spoljašnje sredine i kompeticije ostalih mikrobnih zajednica (Forchetti et al., 2007). Takođe, smatra se da autohtone mikrobne zajednice izolovane iz rizosfere odgovarajuće biljke mogu biti efikasnije u promociji rasta date biljke od primene stranih izolata (Forchetti et al., 2007; Mahalakshmi i Reetha, 2009; Kumar et al., 2014). Razlog za to je bolja adaptiranost domaće mikroflore na konkretne uslove sredine (Mayak et al., 2004).

Većina proizvoda na tržištu je bazirana na korišćenju pojedinačnih sojeva (Figueiredo et al., 2010) ali savremene tendencije naglašavaju ekološke prednosti mešanih bakterijskih populacija. Primenom preparata na bazi više izolata se mogu postići sinergistički efekti i dobiti bolji rezultati u odnosu na primenu pojedinačnih sojeva (Raičević et al., 2010). Primer toga je koinokulacija sa azotofiksatorima i bakterijama koje solubilizuju fosfor. Na ovaj način se postiže izbalansirana ishrana biljaka i bolji prinos ječma (Belimov et al., 1995), soje (Abdalla i Omar, 2001) i pšenice (Galal, 2003), dok je inokulacija sa *Rhizobium*, *Pseudomonas* i *Bacillus*, uticala na povećanje produktivnosti kikirikija (Mathivanan et al., 2014).

Za uspešnu primenu bioinokulata neophodno je izabrati i adekvatan nosač koji obezbeđuje sigurnu sredinu za bakterije prilikom skladištenja i nakon aplikacije. Danas su u upotrebi različiti materijali, od gline, talka, treseta, vermikulita, perlita, zeolita, komposta, do nosača na bazi polimera, poput alginata, koji inkapsuliraju bakterije unutar svog matriksa i postepeno ih otpuštaju u zemljište tokom procesa degradacije (García-Fraile et al., 2015).

Uspešna primena bioinokulata u poljoprivrednoj proizvodnji je podstakla dalja istraživanja PGPB koja su dovela do toga da postanu deo novih, održivih ekoremedijacionih tehnologija.

2.6. Ekoremedijacioni potencijal bakterija stimulatora biljnog rasta

Degradacija zemljišta kao posledica ljudske aktivnosti svakodnevna je pojava (Ishida et al., 2009). Sposobnost PGPB da stimulišu rast biljaka u siromašnim i kontaminiranim supstratima, povećaju otpornost na (a)biotičke stresove, i stepen preživljavanja nakon presađivanja omogućila je njihovu primenu u šumarstvu, hortikulturi, fitoremedijaciji, bioremedijaciji i rekultivaciji degradiranih područja (Pereira i Castro, 2014). Projekti reforestacije i rekultivacije zahtevaju sadni materijal visokog kvaliteta, sposoban da se adaptira i preživi nepovoljne uslove sredine (Davis i Jacobs, 2005). Inokulacija zemljišta sa PGPB povećava stepen preživljavanja i kvalitet sadnica, naročito ako se supstrat karakteriše niskom mikrobiološkom aktivnošću (Chanway, 1997; Dominguez-Nuñez et al., 2015). Inokulacija korisnim bakterijama se može vršiti i na terenu i u rasadniku. Spaepen et al. (2009) smatraju da korišćenje ove tehnike u rasadnicima indukuje energičan rast sadnica pružajući predispozicije za bolje rezultate u polju.

Rizoremedijacija je pristup kojim se uspostavljanjem sinergističkih odnosa između biljke i mikrobnih zajednica u rizosferi ubrzava proces oporavka zemljišta zagađenog neorganskim i organskim zagađivačima (Makris et al., 2009). Od posebnog značaja za proces rizoremedijacije su PGPB koje proizvode auksine, amonijak, ACC deaminazu (Singh et al., 2015). U uslovima povećane koncentracije ukupnih ugljovodonika nafte (TPHs), inokulacija nekoliko vrsta trava sa PGP *Pseudomonas* sp. UW3 i *Pseudomonas putida* UW4 je dovela do porasta biomase biljaka (Gurska et al., 2009). Inokulacija *Arabidopsis* sp. sa *Pseudomonas putida* PML2 je rezultirala bržom degradacijom polihlorovanih bifenila (Narasimhan et al., 2003). Huang et al. (2004) su zabeležili povećanje tolerancije *Festuca arundinacea* na prisustvo policikličnih aromatičnih ugljovodonika nakon inokulacije sa *Azospirillum brasilense*. Rezultat ovakvog delovanja PGPB je ubrzan proces degradacije organskih zagađivača. PGPB ubrzavaju proces uklanjanja teških metala povećanjem njihove dostupnosti i stimulacijom produkcije biomase biljaka (Hansda et al., 2014). Inokulacija uljane repice *Pseudomonas chlororaphis* SZY6, *Azotobacter vinelandii* GZC24 i *Microbacterium lactium* YJ7 je stimulisala rast korena u uslovima povećane koncentracije bakra (He et

al., 2010). Ma et al. (2009) su zabeležili povećanu akumulaciju nikla i hroma u tkivima korena i stabla uljane repice inokulisane sa *Achromobacter xylosoxidans* Ax10.

Poslednjih godina je postalo jasno da je "zelena revolucija" dostigla svoje granice u povećanju prinosa ali i neželjenim efektima po životnu sredinu (Steffen et al., 2015). Da bi poljoprivreda odgovorila na zahteve kao što je proizvodnja bezbedne hrane uz ekološku održivost potreban je revolucionaran pristup (Foley et al., 2011). U skladu sa ovim izazovom, Bender et al. (2016) predlažu "*underground* revoluciju" odnosno revoluciju "ispod zemlje", koja će integrisati znanja o tome kako biološki sistemi i zemljišni biodiverzitet funkcionišu u upravljanje agroekosistema. Da bi se postigli maksimalni efekti strategija upravljanja se mora primeniti na više nivoa, a pre svega na poboljšanje opšteg biodiverziteta u zemljištu i uticaj na određene ekosistemске procese koji su korisni za održivu, kratkoročnu i dugoročnu proizvodnju hrane (Bender et al., 2016).

U ove strategije se uklapa i iskorišćavanje biljno-mikrobnih interakcija i PGPB u cilju bezbedne proizvodnje hrane, ali i primene u ekoremedijacionim tehnologijama. Diverzitet zemljišnih bakterija, pored značajnih ekosistemskih uloga, može imati i praktičnu primenu u poljoprivredi, bioremedijaciji i istraživanju novih biohemikalija za upotrebu u medicini i industriji.

3. CILJ RADA

Primena PGPB inokulata predstavlja aktuelan pravac u sklopu održive proizvodnje. Njihovom primenom se nastoji da se smanji zavisnost savremene poljoprivredne proizvodnje od primene hemijskih proizvoda (mineralna đubriva i pesticidi). Rezultati postignuti u poljoprivrednoj proizvodnji, doveli su do porasta interesovanja za primenu ovih organizama u šumarstvu, hortikulturi, remedijaciji zagađenih i rekultivaciji devastiranih područja.

Ciljevi disertacije izvedeni su iz polazne hipoteze da zemljišne bakterije imaju sposobnost stimulacije rasta biljaka i da tu sposobnost mogu ispoljiti i u oštećenim zemljišnim ekosistemima, i na taj način postaju značajna komponenta u ekoremedijacionim tehnologijama.

Cilj disertacije je ispitivanje mogućnosti primene odabranih bakterijskih izolata iz grupe PGPB u ekoremedijacionim tehnologijama siromašnih supstrata i zemljišta sa visokim sadržajem organskih zagađivača.

Polazeći od toga da je moguća primena samo identifikovanih i precizno okarakterisanih bakterijskih izolata cilj doktorske disertacije je stvaranje kolekcije identifikovanih zemljišnih bakterijskih izolata što podrazumeva ispitivanje biohemijskih karakteristika i primenu molekularnih metoda identifikacije.

U cilju izbora izolata iz grupe PGPB ispitivana je sposobnost identifikovanih izolata bakterija da produkuju amonijak, auksin, ACC deaminazu, sideroforu, sposobnost da rastvaraju neorganske fosfate kao i antagonističko dejstvo prema *Botrytis cinerea* i *Pythium aphanidermatum*.

Cilj disertacije je ispitivanje uticaja odabranih izolata bakterija sa PGP efektima na parametre rasta ratarskih i drvenastih biljnih vrsta. Prva karika uspešne inokulacije je sposobnost kolonizacije korena biljaka i zbog toga je kao cilj postavljeno ispitivanje površinske i unutrašnje kolonizacije korena biljaka (slačica, pšenica, crvena detelina i suncokret). Sagledavajući značaj drvenastih biljnih vrsta u rekultivaciji siromašnih supstrata, kao i činjenice da u našoj zemlji, koliko je poznato, nisu vršena ovakva istraživanja za cilj disertacije je postavljeno ispitivanje uticaja PGPB u *in vivo* uslovima na smrču (*Picea abies* L. Karst), beli bor (*Pinus sylvestris* L.), bagrem (*Robinia pseudoacacia* L.) i platan (*Platanus x acerifolia* (Aiton) Willd.).

4. MATERIJAL I METODE

Za izolaciju bakterija stimulatora biljnog rasta korišćeni su:

- Poljoprivredno zemljište uzorkovano sa salaša Karaman (Kisač, Republika Srbija, 45° 22' 34" SGŠ, 19° 46' 14" IGD) na kome je u vreme uzorkovanja organski gajen kineski kupus (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*);
- Šumsko zemljište uzorkovano u sastojini smrče (*Picea abies* L.) u okviru Specijalnog rezervata prirode Uvac (Nova Varoš, Republika Srbija, 43° 27' 29" SGŠ, 19° 54' 17" IGD);
- Deposol iz gradske sredine (deposol I) uzorkovan sa površina gradskog parka (Tivat, Republika Crna Gora, 42° 26' 07" SGŠ, 18° 41' 28" IGD) koji karakteriše povećan sadržaj organskih zagađivača poput policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH), polihlorovanih bifenila (PCB) i organokalajnih jedinjenja (Jovičić Petrović et al., 2014; Karličić et al., 2014);
- Deposol rudnika (deposol II) uzorkovan sa odlagališta u okviru D polja RB Kolubara (Lazarevac, Republika Srbija, 44° 24' 43" SGŠ, 20° 22' 08" IGD).

Svi uzorci su uzeti iz površinskog sloja (0-30 cm) slobodnog zemljišta i transportovani u sterilnim kesama za uzorkovanje u laboratoriju Katedre za ekološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu.

4.1. Hemijske karakteristike zemljišta

Hemijska karakterizacija uzoraka je izvršena u Laboratoriji za agrohemiju i fiziologiju biljaka Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Određene su osnovne hemijske osobine zemljišta:

- aktivna (pH u H₂O) i supstituciona (pH u 1M KCl) kiselost;
- sadržaj organskog ugljenika (Tjurin, modifikacija Simakov-a, 1957);
- sadržaj ukupnog azota po Kjeldahl (Bremner i Keeney, 1965);
- sadržaj pristupačnih oblika azota (NH₄⁺-N i NO₃⁻-N) destilacijom sa vrelom vodenom parom iz nKCl ekstrakta (za nitratni azot korišćena je Devardova legura);
- sadržaj pristupačnih oblika P, K (Al-metod, Egner, 1960).

4.2. Mikrobiološka karakterizacija zemljišta

Nakon uzimanja uzoraka iz površinskog sloja (0-30 cm) i pripreme kompozitnog uzorka, izvršene su mikrobiološke analize u laboratoriji Katedre za ekološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu.

Mikrobiološka karakterizacija zemljišta izvršena je metodama razređenja i selektivnih mikrobioloških podloga. Razređenje uzoraka je vršeno u sterilnoj vodovodskoj vodi. Utvrđen je ukupan broj bakterija, gljiva, aktinomiceta, ukupnih i sporogenih amonifikatora i brojnost slobodnih azotofiksatora. Broj ukupnih bakterija je određen na 10 puta razblaženom tripton sojinom agaru (10% TSA, Torlak, Srbija), gljiva na krompir dekstroznom agaru (PDA; Merck, Nemačka), aktinomiceta na skrobno-amonijačnom agaru (SKA) sastava: skrob, 10 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 1 g; NaCl, 1 g; KNO_3 , 1 g; CaCO_3 , 3 g; H_2O , 1000 ml.

Broj ukupnih amonifikatora je određen na meso-peptonskom agaru (MPA, Torlak, Srbija). Broj sporogenih amonifikatora je utvrđen na MPA, a zasejavanju je prethodilo zagrevanje odgovarajućeg razređenja na 80°C u trajanju od 10 minuta. Broj slobodnih azotofiksatora je određen na Fjodorovom medijumu sledećeg sastava: K_2HPO_4 , 0,3 g; manit, 20 g; CaHPO_4 , 0,2 g; agar, 16 g; MgSO_4 , 0,3 g; mikroelementi, 1 ml; NaCl, 0,5 g; FeCl_3 , 0,1 g; CaCO_3 , 0,2 g; H_2O , 1000 ml. Mikroelementi za Fjodorov medijum se pripremaju prema recepturi: H_3BO_4 , 0,5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, 5 g; KJ, 5 g; NaBr, 5 g; ZnSO_4 , 0,2 g; $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 0,3 g; H_2O , 1000 ml.

Ukupan broj bakterija, ukupnih i sporogenih amonifikatora je određen nakon inkubacije u trajanju od pet dana na 30°C , gljiva nakon sedam dana inkubacije na 25°C , dok je inkubacija aktinomiceta trajala deset dana na 30°C (Binder, Nemačka). Broj slobodnih azotofiksatora određen posle dva dana na 30°C . Broj mikroorganizama izražen je na gram suvog zemljišta. Vlaga je određena sušenjem na 105°C u trajanju od 2 sata (Binder, Nemačka).

4.3. Izolacija bakterija

Morfološki različite kolonije bakterija, pikirane sa MPA ploča i ploča sa Fjodorovom podlogom su prečišćene metodom iscrpljivanja. Provera čistoće kultura vršena je nakon svakog presejavanja posmatranjem mikroskopskih preparata (Nikon Eclipse 50i, Japan).

Dobijene čiste kulture su čuvane na kosom MPA i Fjodorovom agaru na 4°C do daljeg testiranja. U dalja istraživanja uključena su i četiri izolata Katedre za ekološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu (P1 ARV, T1 ARV, T6 ARV, T10 ARV).

4.3.1. Morfološke karakteristike ćelija

Mikromorfološke karakteristike (oblik ćelija, bojenja po Gramu, prisustvo spora i kapsula, pokretljivost ćelija) određene su za svaki izolat iz formirane kolekcije. Metodom posmatranja rasta na dubokom agaru nakon zasejavanja ubodnom ezom određena je pokretljivost ćelija.

4.4. Mehanizmi stimulacije biljnog rasta- Direktni mehanizmi

4.4.1. Produkcija amonijaka

Sposobnost izolata da produkuju amonijak utvrđena je zasejavanjem bakterijske kulture u 10 ml peptonske vode (Torlak, Srbija) uz inkubaciju na 30°C u trajanju od 72h. Nakon inkubacije, 0,5 ml Nessler reagensa (Alfapanon, Srbija) je dodato u epruvete. Očitavanje promene boje izvršeno je 5 minuta kasnije. Pojava žute ili braon boje značava pozitivnu reakciju i potvrđuje sposobnost izolata da produkuje amonijak.

4.4.2. Produkcija indolsirćetne kiseline (IAA)

Sposobnost produkcije indolsirćetne kiseline (IAA) je utvrđena kolorimetrijskom metodom (Patten i Glick, 2002). Sveže kulture su zasejane u 5 ml M9 medijuma sastava:

M9 soli	200 ml
1M MgSO ₄	2 ml
20% glukoza	20 ml
1M CaCl ₂	0,1 ml
H ₂ O	1000 ml

M9 soli su pripremljene prema sledećoj recepturi:

Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	64 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NaCl	2,5 g
NH ₄ Cl	5 g
Destilovana voda	1000 ml

Inkubacija je trajala 24h pri temperaturi od 30°C i 150 rpm (Biosan ES-20, Letonija) nakon čega je 0,5 ml ovog inokuluma preneto u 9 ml M9 medijuma obogaćenog sa 100 µg ml⁻¹ l-triptofana (Sigma Aldrich, USA) i inkubirano na 30°C/72h/150rpm. Po završetku inkubacije, 2 ml bakterijske suspenzije je centrifugirano pri 6000 x g, 15 minuta (Mini Spin, Eppendorf, Germany). Zatim je 1 ml supernatanta prenet u staklenu epruvetu i pomešan sa 2 ml Salkowski reagensa, homogenizovan u vorteksu i inkubiran u mraku, na sobnoj temperaturi u trajanju od 25 minuta.

Očitavanje apsorbance vršeno je na 540 nm (T70 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments LTD). Dobijene vrednosti su upoređene sa vrednostima standardne krive IAA, a količina proizvedene IAA je izražena u µg ml⁻¹.

Salkowski reagens ima sledeći sastav:

95-98% H ₂ SO ₄	150 ml
0,5 M FeCl ₃ x 6H ₂ O	7,5 ml
H ₂ O	250 ml

Rastvor l-triptofana, koncentracije 1 mg ml⁻¹, pripremljen je u destilovanoj vodi, sterilisan kroz filter promera 0,2 µm (Sarstedt, Nemačka) i dodat u podlogu do postizanja finalne koncentracije od 100 µg ml⁻¹ l-triptofana.

Standardna kriva IAA je konstruisana rastvaranjem 10 mg sintetičke IAA (Sigma Aldrich, USA) u 10 ml acetona. Ovako pripremljen rastvor je razblažen u M9 medijumu do koncentracija od 5, 10, 20, 50, 100 µg ml⁻¹. U 1 ml svakog pojedinačnog rastvora dodato je 2 ml Salkowski reagensa. Nakon inkubacije od 25 minuta na sobnoj temperaturi izvršeno je očitavanje na 540 nm.

4.4.3. 1-aminociklopropan-1-karboksilat (ACC) deaminazna aktivnost

ACC deaminazna aktivnost određena je na osnovu sposobnosti izolata da koriste ACC kao izvor azota. Ova osobina je utvrđena praćenjem rasta izolata na Dworkin-Foster (DF) podlozi u kom je ACC predstavljao jedini izvor azota.

Sastav DF hranljive podloge je:

KH ₂ PO ₄	4 g	CuSO ₄	50 µg
Na ₂ HPO ₄	6 g	MoO ₃	10 µg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g	Glukoza	2 g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	1 mg	glukuronska kiselina	2 g
H ₃ BO ₃	10 µg	limunska kiselina	2 g
MnSO ₄	10 µg	agar	20 g
ZnSO ₄	70 µg	H ₂ O	1000 ml

Bakterijske kulture su osvežene zasejavanjem u 5 ml TSB i inkubirane od 24-48h na 30°C pri 150 rpm (Biosan ES-20, Letonija). Nakon inkubacije bakterijske suspenzije su centrifugirane 6000 x g, 10 minuta (Mini Spin, Eppendorf, Germany), isprane sterilnim 0,1M MgSO₄ i resuspendovane u sterilnom 0,1M MgSO₄.

Ovako pripremljene bakterijske suspenzije zasejane su u vidu kapi na Petri kutije sa DF medijumom u koji je dodat 3 mM ACC. Prethodno je 3 mM rastvor ACC-a (Sigma Aldrich, USA) pripremljen, sterilisan kroz 0,2 µm filter i čuvan na - 20 °C do upotrebe. Neposredno pre dodavanja u DF podlogu, rastvor je otopljen na sobnoj temperaturi.

Pozitivnu kontrolu je postavljao DF medijum sa (NH₄)₂SO₄ kao izvorom azota, a negativnu kontrolu DF medijum bez azota. Pojava kolonija na DF medijumu u kom je ACC predstavljao jedini izvor azota nakon 48h inkubacije na 30°C je potvrda ACC deaminazne aktivnosti izolata (Husen et al., 2009).

4.4.4. Produkcija siderofora

Utvrđivanje sposobnosti izolata da produkuju siderofore izvršeno je na CAS agaru (Schwyn i Neilands, 1987). Za pripremu ovog medijuma potrebna su četiri rastvora:

1. Rastvor boje:

- a) 0,06g hrom azurol S (CAS; Fluka) rastvoreno je u 50 ml dH₂O,
- b) 0,0027g FeCl₃ x 6H₂O u 10ml 10mM HCl,
- c) 0,073g heksadeciltrimetilamonium bromid (HDTMA; Sigma) u 40ml dH₂O.

Cela količina rastvora a pomešana je sa 9 ml rastvora b, čime je dobijen rastvor indigo plave boje koji je dodat u rastvor c, polako, uz blago mešanje kako bi se izbegla pojava mehurića. Rastvor je autoklaviran (121°C/20 minuta) i ohlađen na 50°C.

2. Pufer rastvor (pH 5 – 6,8):

KH ₂ PO ₄	0,3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
H ₂ O	750 ml

U ovako pripremljen rastvor je dodato 30,24 g piperazin-N,N'-bis(2-etansulfonska kiselina) (PIPES; Sigma) i 15 g agara. Rastvor je autoklaviran (121°C/20 minuta) i ohlađen na 50°C.

M9 rastvor je sledećeg sastava:

Manitol	2 g	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,04 mg
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	1,2 mg	H ₃ BO ₃	1,4 mg
Trypton	3 g	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	1 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,493 g	MnSO ₄ x H ₂ O	1,17 mg
CaCl ₂	11 mg	H ₂ O	70 ml

Izvršeno je autoklaviranje na 121°C/20 minuta i hlađenje na 50°C.

3. Rastvor glukoze koncentracije 20% je pre upotrebe filtriran kroz 0,2 µm filter (Sarstedt, Nemačka).

Ovako pripremljeni rastvori, ohlađeni na 50°C su pomešani sledećim redosledom: pufer rastvor, M9 rastvor, rastvor glukoze i rastvor boje. Dobijena hranljiva podloga je razlivena u Petri kutije. Na podlogu je zasejano 2 µl sveže bakterijske kulture i inkubirano na 30°C u trajanju od 48-72h. Razvoj žuto-narandžastih zona oko kolonije ukazuje na sposobnost izolata da produkuje siderofore.

4.4.5. Rastvorljivost fosfata

Sposobnost izolata da rastvaraju neorganske fosfate je utvrđena zasejavanjem bakterijskih kultura na NBRIP medijum (National Botanical Research Institute's phosphate) sledećeg sastava:

Glukoza	10 g	Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
MgCl ₂ x6H ₂ O	5 g	Agar	20 g
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,25 g	H ₂ O	1000 ml
KCl	0,2 g	pH	7,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g		

Inkubacija je trajala 14 dana na 30°C. Pojava svetlih zona oko kolonija ukazuju na sposobnost izolata da solubilizuje neorganske fosfate. Indeks solubilizacije je utvrđen pomoću formule (Afzal i Bano, 2008):

$$SI = \frac{Ro + R}{Ro}$$

SI- solubilizacioni indeks

Ro- prečnik kolonije

R- prečnik svetle zone

4.5. Mehanizmi stimulacije biljnog rasta - Indirektni mehanizmi

4.5.1. Antifungalna aktivnost izolata

Antifungalna aktivnost izolata testirana je konfrontacijskim testom sa *Botrytis cinerea* i *Pythium aphanidermatum* (kulture iz kolekcije Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd). Za ove potrebe kulture patogena su gajene na PDA hranljivoj podlozi i odgajane sedam dana na 25°C. Disk prečnika 5 cm je uzet sa ivice sveže kolonije patogena i postavljen u sredinu Petri kutije. Na udaljenosti od 3 cm je zasejan bakterijski izolat u formi linije. Na kontrolnim Petri kutijama je zasejan samo biljni patogen. Inkubacija na 25°C je trajala dok rast patogena na kontrolnoj Petri kutiji nije završen. Nakon inkubacije zabeležen je rast patogena u kontroli i na Petri kutijama sa obe kulture. Ogled je izveden u tri ponavljanja, a procenat inhibicije je izračunat prema formuli predloženoj od strane Siripornvisal (2010):

$$I\% = \frac{ro - r}{ro} * 100$$

I%- procenat inhibicije patogena
 ro- poluprečnik kolonije patogena na kontrolnoj Petri kutiji
 r- poluprečnik kolonije patogena u konfrontacijskom testu

Antagonistička aktivnost izolata je procenjena prema stepenu inhibicije rasta micelije i klasifikacija bakterijskih izolata je izvršena prema Sookchaoy et al. (2009). Prema ovoj klasifikaciji izolati su podeljeni u grupe sa veoma visokom (I% > 75), visokom (I% = 61-75), umerenom (I% = 51-60) i niskom (I% < 51) antagonističkom aktivnošću.

4.5.2. Produkcija cijanovodonične kiseline

Produkcija cijanovodonične kiseline (HCN) je određena zasejavanjem svežih kultura, sterilnim štapićem za bris, na TSA hranljivu podlogu obogaćenu sa 4,4 g l⁻¹ glicina (Mahalakshmi i Reetha, 2009). Sterilan filter papir (Whatman No. 1), uronjen u vodeni rastvor 0,5% pikrinske kiseline i 2% Na₂CO₃, postavljen je na poklopac zasejane Petri kutije. Petri kutije su zatvorene parafilmom. Inkubacija je trajala sedam dana na 30°C nakon čega je konstatovano da li je došlo do promene boje filter papira. Pojava svetlo braon do tamno braon boje ukazuje na produkciju HCN-a.

4.5.3. Produkcija litičkih enzima (lipaze, β -glukozidaze, N-acetil- β -glukozaminidaze, proteaze, celulaze)

Kvalitativno određivanje lipaze, β -glukozidaze i N-acetil- β -glukozaminidaze je izvršeno uz pomoć API ZYM kita (BioMereux, Francuska), prema uputstvu proizvođača.

Produkcija proteaza (kazeinaza) je utvrđena na sterilnom mlečnom agaru (Chaiharn et al., 2008) sledećeg sastava:

Kazein	5 g
Ekstrakt kvasca	2,5 g
Glukoza	1 g
Agar	15 g
Obrano mleko u prahu	70 g
H ₂ O	1000 ml

Sveže bakterijske kulture su zasejane u vidu kapi (2 μ l) i inkubirane na 30°C u trajanju od 48h. Pojava čistih zona oko kolonije je pokazatelj proteolitske aktivnosti.

Produkcija celulaze je utvrđena zasejavanjem 2 μ l inokuluma sveže kulture na podlogu sa karboksimetil celulozom (CMC, Sigma Aldrich, USA) sastava:

CMC	10 g	NaNO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	5 g	FeSO ₄	0,01 g
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,25 g	Agar	20 g
CaCl ₂	0,2g	H ₂ O	1000 ml
MnSO ₄	0,1 g		

Nakon inkubacije od 48h, na 30°C razvijene kolonije su prelivene 0,1% rastvorom Congo red u 1M NaCl. Boja je po isteku 10-12 minuta isprana sa 1M NaCl. Pojava svetlih zona oko kolonija ukazuje na celulaznu aktivnost (Angsana et al., 2009).

4.6. Sposobnost površinske i endofitne kolonizacije

Na osnovu sposobnosti izolata da ispolje direktne i indirektne mehanizame koji stimulišu rast biljaka, izabrano je osam izolata: Z-I ARV; 2T ARV; 333 ARV; 10_ARV; NV5 ARV; D5 ARV; P1 ARV i T10 ARV. Utvrđena je i sposobnost površinske i endofitne kolonizacije korena odabranih izolata. Korišćena su semena sledećih biljnih vrsta: slačice (*Sinapis alba* L.), pšenice (*Triticum vulgare* L.), crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) i suncokreta (*Helianthus annuus* L.).

Sterilizacija semena je izvršena potapanjem u 70% etanol u trajanju od 2 minuta uz blago mešanje. Nakon toga seme je preneto u 2% rastvor NaOCl u trajanju od 15 minuta. Semena su, zatim, isprana sterilnom destilovanom vodom (5-10 x) i potopljena u rastvor koji sadrži 600 mg L⁻¹ penicilina i 250 mg L⁻¹ streptomicina u trajanju od 30 minuta. Nakon toga, semena su osušena u aseptičnim uslovima, u laminarnoj komori. Provera sterilnosti je izvršena postavljanjem suvih semena na hranljivu podlogu (MPA) i inkubiranjem na 30°C u trajanju od 48h. Odsustvo bakterijskog rasta je potvrda sterilnosti semena.

Inokulacija semena. Semena su inokulisana potapanjem u bakterijsku suspenziju u trajanju od 1h/25°C/100rpm, a zatim osušena u laminarnoj komori. Bakterijska suspenzija je pripremljena inokulacijom 10 ml meso-peptonskog bujona (MPB, Torlak, Srbija) i Fjodorovog medijuma odgovarajućim izolatom i inkubiranjem na 30°C u trajanju od 48-72 h. Nakon inkubacije ćelije su oborene centrifugiranjem na 6000 x g 15 minuta (Mini Spin, Eppendorf, Germany) i isprane 2 puta sterilnom destilovanom vodom. Pre same inokulacije brojnost ćelija je podešena na 10⁸ CFU ml⁻¹ (apsorbanca od 1 na 600 nm; T70 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments LTD).

Prisustvo određenog bakterijskog izolata na površini semena je utvrđeno standardnim mikrobiološkim metodama. Broj bakterija je izražen kao broj CFU po semenu.

Površinska kolonizacija korena. Inokulisana, osušena semena su aseptično preneti u epruvete sa sterilnim Hoagland rastvorom sledećeg sastava:

NH ₄ H ₂ PO ₄	1 mM	CuSO ₄ ·5H ₂ O	4 µM
KNO ₃	3 mM	Na ₂ MoO ₄	0,20 µM
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	2 mM	NaCl	0,5 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 mM	Na EDTA	45 µM
H ₃ BO ₃	25 µM	FeSO ₄ ·7H ₂ O	45 µM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5 µM	H ₂ O	1000 ml
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3,8 µM		

U svaku epruvetu je uneto po jedno seme i gajeno 14 dana na temperaturi od 25°C pri dužini dana od 12 h. Nakon dve nedelje, biljke su izvađene iz hranljivog rastvora. Koren je odvojen od nadzemnog dela i iskorišćen za utvrđivanje sposobnosti površinske i endofitne kolonizacije izolata. Broj ćelija izolata na površini korena biljaka je određen metodom razređenja i izražen je kao broj CFU g⁻¹ svežeg korena.

Endofitna kolonizacija korena. Koren je potopljen u 70% etanol 30 sekundi, a zatim u 0,1% HgCl₂ 3 minuta i finalno ispran sterilnom destilovanom vodom. Provera uspešnosti površinske sterilizacije korena izvršena je postavljanjem korena na Petri kutije sa MPA i inkubacijom od 48 h na 30°C. Sterilan koren je maceriran u aseptičnim uslovima. Broj ćelija u unutrašnjosti korena biljaka je određen metodom razređenja i izražen je kao broj CFU g⁻¹ svežeg korena.

4.7. Biohemijska identifikacija izolata

Izolati su biohemijski okarakterisani uz pomoć API20E (Z-I ARV), API20NE (10_ARV, P1 ARV) i API50CHB (D5 ARV) (BioMérieux, Francuska) prema uputstvu proizvođača. Rezultati su analizirani uz pomoć softvera APIWeb, Version-1.1.0.

4.8. Molekularna identifikacija

Molekularna identifikacija izolata je izvršena sekvencioniranjem produkata dobijenih amplifikacijom sekvence *gyr B* gena, koja kodira subjedinicu B DNA giraze (topoizomeraze tip II) i poređenjem sekvenci sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka.

Ekstrakcija hromozomalne DNK. DNK je ekstrahovana iz sveže kulture dobijene gajenjem izolata u MPB podlozi u trajanju od 24-48h/30°C/150 rpm. Ekstrakcija hromozomalne DNK je izvršena pomoću komercijalnog ZR Soil Microbe DNA MiniPrep Kit-a (Zymo Research, USA) prema uputstvu proizvođača.

Lančana reakcija polimeraze (PCR). Lančana reakcija polimeraze (PCR) je izvedena na termosajkleru (Kyrtec, Australia) u radnoj zapremini od 50 µl koja se sastojala od: 10 µl reakcionog pufera (5XKAPA2G Buffer A, KapaBiosystems, UK), 1 µl dNTP (KapaBiosystems, UK), 0,2 µl HotStart DNA Polymerase (KapaBiosystems, UK), po 1,25 µl svakog prajmera (100 pmol µl⁻¹, Metabion International, Nemačka), 1 µl DNK i odgovarajuće količine Rnase-free vode (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf). U svakoj PCR reakciji kao negativna kontrola korišćena je smeša svih reagenasa potrebnih za umnožavanje, a umesto DNK uzorka dodata RNase-free voda. Praimeri korišćeni za amplifikaciju su prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2. Parovi prajmera korišćeni za amplifikaciju fragmenata *gyr B* gena

Parovi prajmera	Sekvenca (5'–3')	Izolati
gyr-320	TAARTTYGAYGAYAACTCYTAYAAAG T(R=A or G; Y=C or T)	Z-I ARV (Dauga, 2002)
rgyr-1260	CMCCYTCCACCARGTAMAGTTC (R=A or G; Y=C or T; M=A or C)	
UP-1EgyrB	CAGGAAACAGCTATGACCAYGSNGGN GGNAARTTYRA	D5 ARV, 10_ARV (Yamamoto et al., 2000)
modUP2r	TGTAAAACGACGGCCAGTCCRTCNA TCNGCRTCNGTCAT	
UP-1E gyrB	CAGGAAACAGCTATGACCAYGSNGGN GGNAARTTYRA	P1 ARV (Yamamoto et al., 2000)
APrU gyrB	TGTAAAACGACGGCCAGTGCNGGRTC YTTYTCYTGRCA	

Reakcija je izvršena pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija na 94°C u trajanju od 3 minuta je praćena sa 30 ciklusa koji se sastoje od denaturacije na 94°C u trajanju od 1 minuta, hibridizacije na 57°C u trajanju od 1 minuta i elongacije na 72°C u trajanju od 2 minuta. Finalna elongacija je izvršena pri 72°C u trajanju od 7 minuta (Ribeiro i Cardoso, 2012).

Vizuelizacija PCR produkata obavljena je razdvajanjem na 1% agaroznom gelu rastvaranjem agaroze u 1 x TBE puferu (Fermentas, Litvanija). Količina od 5 µl PCR produkata je pomešana sa 0,5 µl Midori Green boje (Nippon Genetics Europe GmbH) i uneta u bunariće. Očekivana veličina fragmenata je iznosila ~ 1000 bp. Određivanje veličine produkta izvršeno je poređenjem sa odgovarajućim markerom (Nippon Genetics Europe GmbH). Elektroforeza je izvedena pri konstantnoj struji od 100 V u trajanju od 40 minuta u aparatu za horizontalnu elektroforezu (Advance, Mupid-One, Japan). Fragmenti su posmatrani u komori transiluminatora (Nippon Genetics Europe GmbH). Prisustvo jednog DNK fragmenata očekivane dužine označeno je kao pozitivna reakcija. PCR produkti su sekvencionirani na ABI 3730XL Sequencer-u (MacroGen, Inc., Seul, Koreja) u oba smera. Prajmeri korišćeni za sekvenciranje prečišćenog proizvoda su prikazani u Tabeli 3.

Tabela 3. Parovi prajmera korišćeni za sekvenciranje

Parovi prajmera	Sekvenca (5'–3')	Izolati
gyr-320	TAARTTYGAYGAYAACTCYTAYAAAGT (R=A or G; Y=C or T)	Z-I ARV
rgyr-1260	CMCCYTCCACCARGTAMAGTTC (R=A or G; Y=C or T; M=A or C)	
M13R-pUC	CAGGAAACAGCTATGAC	D5 ARV, 10_ARV, P1 ARV
M13-FP	TGTAAAACGACGGCCAGT	

Poravnavanje sekvenci je izvršeno uz pomoć Clustal W 2.0 algoritma (Larkin et al., 2007) i MEGA5 softvera (Tamura et al., 2011). Dobijene sekvence su upoređene sa poznatim 16S rRNA sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA). Konsenzusi nukleotidnih sekvenci su deponovani u GenBank bazi podataka gde su im dodeljeni pristupni brojevi (GenBank Accession Number).

4.9. Ekološke karakteristike izolata

Uticaj temperature na izolate. Odnos dobijenih izolata prema temperaturi sredine ispitan je gajenjem na MPA podlozi i inkubiranjem na odgovarajućoj temperaturi. Praćen je rast pri temperaturama od 4, 10, 30, 35, 40, 45, 50, 55 i 60°C.

Uticaj pH vrednosti na izolate. Za ispitivanje rasta izolata pri različitim pH vrednostima korišćena je MPA podloga čija je pH vrednost pre autoklaviranja podešena dodavanjem 1M rastvora HCl ili 1M rastvora NaOH. Ispitan je rast pri sledećim pH vrednostima: 3,5; 4; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0; 8; 8,5; 9; 9,5; 10; 10,5 i 11. Formiranje kolonija na podlogama sa odgovarajućom pH vrednošću nakon 48-72 h inkubacije pri 30°C je smatrano pozitivnim rezultatom.

Uticaj natrijum-hlorida na izolate. Odnos dobijenih izolata prema sadržaju soli ispitan je na MPA podlozi u koju je pre autoklaviranja dodat NaCl do finalnih koncentracija: 3, 5 i 7%. Formiranje kolonija na ovim podlogama nakon 48-72 h inkubacije pri 30°C smatrano je pozitivnim rezultatom.

Uticaj teških metala na izolate. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) teških metala je utvrđena na Mueller-Hinton (Merck, USA) medijumu uz pomoć 96-ćelijskih mikrotitar ploča. U Mueller-Hinton medijum je po autoklaviranju dodat Cu^{+2} , Cr^{+6} i Cd^{+2} u koncentraciji od 20 mM. Metali su dodati u obliku $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ i $\text{CdCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, USA). U prvi red 96-ćelijske mikrotitar ploče je dodato 100 µl ovako pripremljenog Mueller-Hinton medijuma, a u sve ostale ćelije po 50 µl sterilne destilovane vode. U dugi red 96-ćelijske mikrotitar ploče je dodato 50 µl rastvora iz prvog reda. Nakon toga je u svaku narednu ćeliju dodato 50 µl rastvora iz prethodne. Ovako je postignut gradijent koncentracija od 20 mM do 0,15 mM. Svaka ćelija mikrotitar ploče je inokulisana sa 100 µl suspenzije odgovarajućeg bakterijskog izolata. Nakon inkubacije u trajanju od 48-72 h pregledane su ćelije mikrotitar ploče i na osnovu pojave замуćenja konstatovano je prisustvo ćelijskog rasta. Sadržaj prve ćelije u seriji razređenja u kojoj nije zabeležen rast je zasejan na MPA podlogu i inkubiran 24-72 h. Pojava kolonija na hranljivoj podlozi bila je pokazatelj inhibitornog dejstva odgovarajuće količine teškog metala.

Otpornost izolata na prisustvo ampicilina i tetraciklina. Otpornost izolata na antibiotike je utvrđena uz pomoć diskova sa 10 µg ampicilina i 30 µg tetraciklina (BD BBL, USA). Bakterijske kulture su osvežene zasejavanjem u MPB i inkubiranjem na 30°C u trajanju od 24-48 h. Po završenoj inkubaciji, 50 µl suspenzije je preneto u 5 ml sterilnog 0,9% NaCl rastvora i homogenizovano pomoću vorteksa. Suspenzija je sterilnim štapićem za bris naneta na površinu MPA. Diskovi antibiotika su postavljeni po sušenju suspenzije. Inkubacija je trajala 18-24 h na 30°C nakon čega je izmeren prečnik zone u kojoj je izostao rast bakterija. Procena osetljivosti ili rezistentnosti izolata je izvršena na osnovu smernica datih od strane proizvođača.

4.10. *In vivo* ogledi

Na osnovu rezultata dobijenih nakon ogleda koji su uključivali produkciju amonijaka, IAA, siderofora, rastvorljivost fosfata i antifungalnu aktivnost izabrana su četiri izolata (Z-I ARV, 10_ARV, D5 ARV i P1 ARV) i njihov konzorcijum za praćenje uticaja na rast biljaka.

4.10.1. Uticaj inokulacije na rast ratarskih kultura

Priprema inokuluma. Bakterijske kulture stare 24 h presejane su u 10 ml odgovarajućeg medijuma (MPB ili Fjodorov medijum). Nakon inkubacije od 48-72 h na temperaturi od 30°C bakterijskim kulturama je inokulisano 100 ml istog medijuma. Inkubacija je trajala 48-72 h na temperaturi od 30°C. Po inkubaciji ćelije su oborene centrifugiranjem u trajanju od 10 minuta pri 6000 x g (5804 R, Eppendorf, Germany), a zatim isprane 2x sterilnom destilovanom vodom. Konačan broj bakterija je podešen sterilnom destilovanom vodom na 10⁸ CFU ml⁻¹. Pripremljeni su inokulumi pojedinačnih bakterijskih kultura i njihovog konzorcijuma u odnosu 1:1:1:2 (Z-I ARV: D5 ARV: P1 ARV: 10_ARV).

U ogledu su korišćeni sledeći tretmani:

Z-I ARV: Seme inokulisano suspenzijom izolata Z-I ARV;

10_ARV: seme inokulisano suspenzijom izolata 10_ARV;

D5 ARV: Seme inokulisano suspenzijom izolata D5 ARV;

P1 ARV: Seme inokulisano suspenzijom izolata P1 ARV;

MIX: Seme inokulisano mešavinom napravljenom u odnosu 1:1:1:2 (10_ARV);

KDP: negativna kontrola;

KFP: pozitivna kontrola.

Semena slačice (*Sinapis alba* L.), pšenice (*Triticum vulgare* L.), crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) i suncokreta (*Helianthus annuus* L.) su pripremljena i inokulisana na način opisan u poglavlju 4.6. Posejana su u plastične posude napunjene sa 0,5 kg deposola II, iz rudarskog basena RB Kolubara (Srbija). Negativnu kontrolu (KDP) predstavlja neinokulisano seme gajeno u deposolu II. Pozitivnu kontrolu (KFP) predstavlja neinokulisano seme gajeno u komercijalnom supstratu (Floradur®Plant Universal, FloraGard, Nemačka). Ogled je trajao 15 dana u laboratorijskim uslovima, pri intenzitetu svetlosti od oko $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (MH Philips 600W), dužini dana od 12h i temperaturi od $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Svaki tretman je izveden u pet ponavljanja. Na kraju ogleda su zabeleženi podaci o visini biljke, dužini korena i ukupnoj suvoj biomasi.

Uticaj bakterijskih kultura na rast crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) utvrđen je i gajenjem u trajanju od 3 meseca. Postavljena su dva nezavisna ogleda, u prvom je kao supstrat korišćen deposol II, iz RB Kolubara, a u drugom deposol I, iz urbane sredine, kontaminiran organskim zagađivačima (Tivat, Crna Gora). Tretmani korišćeni u ova dva ogleda su bili isti kao već opisani, sa tom razlikom što je u ogledu u kom je kao supstrat korišćen deposol I kontaminiran organskim zagađivačima negativna kontrola (KDG) postavljena u tom supstratu. Sterilna semena crvene deteline su nakon sušenja i inokulisanja posejana u plastične posude napunjene sa 0,5 kg deposola I ili deposola II. Ogledi su izvedeni u kontrolisanim uslovima ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, dužina dana od 12 h, $24 \pm 2^\circ\text{C}$). Tokom trajanja eksperimenta, biljke su košene tri puta, na 3 cm od površine zemlje, približno svaki 25. dan. Pre svakog košenja je zabeležena visina biljaka. Suva biomasa je merena nakon svakog košenja. Na kraju ogleda je zabeležena i dužina korena biljaka. Ogled je postavljen u tri ponavljanja.

4.10.2. Uticaj inokulacije na rast drvenastih vrsta

Priprema inokuluma. Bakterijske kulture stare 24 h presejane su u 10 ml MPB ili Fjodorov medijuma. Nakon inkubacije od 48-72 h na temperaturi od 30°C dobijene suspenzije su prenete u 100 ml istog medijuma i inkubirane isti vremenski period. Proces prebacivanja je zatim ponovljen u 1000 ml podloge uz iste uslove inkubacije. Po inkubaciji ćelije su oborene centrifugiranjem u trajanju od 10 minuta pri $6000 \times g$ i isprane 2x sterilnom destilovanom vodom. Konačan broj bakterija je podešen sterilnom destilovanom vodom na 10^8 CFU ml⁻¹. Ovako dobijeni pojedinačni inokulumi su pomešani u odnosu 1:1:1:2 (Z-I ARV:D5 ARV:P1 ARV:10_ARV).

U ogledu su korišćeni sledeći tretmani:

D+B: deposol II sa mešanim inokulumom odabranih izolata;

KDP: negativna kontrola;

KFP: pozitivna kontrola.

Za praćenje uticaja bakterija na rast drvenastih vrsta odabrane su jednogodišnje sadnice bagrema (*Robinia pseudoacacia* L.) i platana (*Platanus x acerifolia* (Aiton) Willd.) sa golim korenovim sistemom i dvogodišnje, kontejnerski gajene sadnice belog bora (*Pinus sylvestris* L.) i smrče (*Picea abies* L. Karst). Sadnice smrče, belog bora i bagrema su dobijene iz šumskog rasadnika JP Srbijašuma (Požega, Srbija), a sadnice platana iz šumskog rasadnika Vikumak (Iđoš, Srbija).

Za vreme sezone mirovanja (februar) sadnice slične visine i prečnika vrata korena su presađene u plastične kese zapremine 1 dm³ (smrča, beli bor, bagrem) i 3 dm³ (platan) napunjene deposolom II, dok je 1/3 sadnica presađena u kese sa Floradur supstratom (Floradur®Plant Universal, FloraGard, Nemačka). Polovina sadnica gajenih u deposolu II je početkom vegetacione sezone (mart) inokulisana dodavanjem 100 ml inokuluma na površinu supstrata. Neinokulisane sadnice gajene u komercijalnom Floradur supstratu su predstavljale pozitivnu kontrolu (KFP). Neinokulisane sadnice gajene u deposolu II su predstavljale negativnu kontrolu (KDP). Kontrole su zalivene sa 100 ml sterilne destilovane vode. Svaki od tretmana je predstavljen sa 20 sadnica. Inokulacija je ponovljena, na isti način, 12 nedelja nakon što je izvedena prvi put. Eksperiment je izveden na otvorenom, u dvorištu Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Prva merenja visine sadnica i prečnika vrata korena su

obavljena 18 nedelja nakon prve inokulacije, a na kraju vegetacionog perioda (Oktobar), sadnice su izvađene iz supstrata i zabeleženi su sledeći parametri rasta: visina biljaka, prečnik vrata korena i suva biomasa nadzemnog dela i korena.

4.11. Statistička obrada podataka

Rezultati su analizirani jednofaktorskom i dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA). U svim eksperimentima u kojima je bilo neophodno, za naknadna poređenja korišćen je test najmanje značajne razlike na nivoima 1% i 5%. Za statističku obradu podataka je korišćen SPSS 22 softverski paket (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Istraživanja u okviru ove disertacije su ukazala na mikrobni diverzitet u prirodnim i agroekosistemima. Poznata je uloga zemljišnih mikroorganizama u procesima kruženja materije i energije i stimulaciji rasta biljaka, ali još uvek se malo zna o njihovim interakcijama, dok se njihova raznolikost i dalje potcenjuje. Mikroorganizmi stimulatori rasta biljaka se u najvećem broju nalaze u rizosferi i utiču, ne samo na poboljšanje rasta biljaka, već i na otpornost biljaka na biotički i abiotički stres (Glick, 2012). Zemljište predstavlja dragocen rezervoar mikrobnih populacija i u okviru ovih istraživanja je izvršena izolacija bakterijskih populacija iz poljoprivrednog, šumskog zemljišta i dva deposola sa ciljem primene u ekoremedijacionim tehnologijama. Imajući u vidu da se mikrobni diverzitet smanjuje intenzivnim korišćenjem zemljišta, što može uticati na smanjenje otpornosti mikrobnih zajednica na stres (Ding et al., 2013), u istraživanja je uključeno zemljište koje nije pod direktnim antropogenim uticajem poput šumskog zemljišta (prva zona zaštite Specijalnog rezervata prirode Uvac, Republika Srbija, sastojina smrče), kao i poljoprivredno zemljište namenjeno organskoj proizvodnji.

U istraživanjima su korišćena i zemljišta nastala direktnim antropogenim uticajem. Jedan od uzoraka deposola potiče iz urbane sredine (Tivat, Republika Crna Gora) i karakteriše se povećanim sadržajem organskih zagađivača poput policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH), polihlorovanih bifenila (PCB) i organokalajnih jedinjenja (Jovičić-Petrović et al., 2014; Karličić et al., 2014). Poznato je da prisustvo organskih zagađivača favorizuje proliferaciju onih mikrobnih populacija koje su uključene u procese njihove degradacije (Mukherjee et al., 2014), kao i da kontaminirana zemljišta predstavljaju glavne izvore bakterija koje obavljaju procese bioremedijacije (Jovičić-Petrović et al., 2014). Drugi uzorak deposola je uzorkovan sa odlagališta u okviru D polja površinskog kopa RB Kolubara (Lazarevac, Republika Srbija) sa površina bez prisustva vegetacije. Rekultivacija površina na kojima je završena eksploatacija je uglavnom vršena pošumljavanjem pionirskim vrstama poput crnog bora, belog bora, bagrema (Karličić et al., 2016).

Diverzitet mikroorganizama je od ključne važnosti za održavanje zdravlja i kvaliteta zemljišta (Nagendran et al., 2014). Gubitak mikrobnog diverziteta smanjuje multifunkcionalnost ekosistema i negativno utiče na pružanje ekosistemskih usluga, poput regulacije klime, plodnosti zemljišta, proizvodnje hrane i vlakana u kopnenim ekosistemima (Delgado-Baquerizo et al., 2016).

5.1. Hemijske karakteristike zemljišta

Na osnovu hemijskih analiza uzoraka zemljišta utvrđene su razlike u pogledu sadržaja humusa, esencijalnih makronutrijenata (N, P, K) i pH vrednosti (Tabela 4). Na osnovu pH vrednosti, ispitivana zemljišta spadaju u jako kisela ($< 4,51$ u 1M KCl), slabo kisela ($5,51-6,50$ u 1M KCl), neutralna ($6,51-7,20$ u 1M KCl) i slabo alkalna ($>7,21-8,2$ u 1M KCl). Poznato je da je pH zemljišta u korelaciji sa različitim biološkim i hemijskim karakteristikama zemljišta. Tako je dostupnost fosfora ograničena u kiselim i alkalnim zemljištima. To je posledica formiranja, u vodi nerastvorljivih, fosfatnih jedinjenja sa Fe^{3+} i Al^{3+} u kiselim, odnosno, Ca^{2+} u alkalnim zemljištima (Marra et al., 2011). Takođe, dostupnost gvožđa u kiselim i baznim zemljištima je izuzetno niska (Gamalero i Glick, 2011). Hemijske karakteristike zemljišta direktno utiču na strukturu mikrobnih zajednica (Hartmann et al., 2015).

Tabela 4. Hemijske karakteristike zemljišta

Uzorci	CaCO ₃ %	pH (H ₂ O)	pH (KCl)	Humus %	Ukupan N %	P ₂ O ₅ mg 100 g ⁻¹	K ₂ O mg 100 g ⁻¹
Poljoprivredno zemljište	0,7	8,3	7,47	3,68	0,252	30,8	41,8
Šumsko zemljište	0,5	4,9	3,96	2,85	0,363	0,2	17,4
Deposol I	1,2	7,25	7,08	3,62	0,197	26,8	19,7
Deposol II	0,1	7,25	6,2	0,15	0,018	0,4	10,4

Poljoprivredno, šumsko zemljište i deposol I se odlikuju visokim sadržajem humusa, za razliku od deposola II koji sadrži 0,15%. Prema sadržaju ukupnog azota, poljoprivredno i šumsko zemljište su dobro obezbeđeni, srednje obezbeđen je deposol I, dok je deposol II siromašan. Poljoprivredno zemljište i deposol I se odlikuju veoma visokim sadržajem pristupačnog fosfora, dok vrlo nizak sadržaj imaju šumsko zemljište i deposol II. Sadržaj lakopristupačnog kalijuma u poljoprivrednom zemljištu je vrlo visok, u šumskom zemljištu i deposolu I optimalan, dok je u deposolu II nizak. Prema sadržaju kalcijum-karbonata, korišćena zemljišta su označena kao slabo karbonatna.

Rezultati osnovnih hemijskih analiza pokazuju da postoje velike razlike između supstrata odabranih za *in vivo* oglede. Deposol II se odlikuje niskim sadržajem humusa, neutralnom reakcijom sredine, deficitom azota, fosfora i kalijuma, što ga kvalifikuje kao sredinu koja nije povoljna za rast biljaka. Nasuprot tome, deposol I, sa stanovišta rasta biljaka, poseduje pogodne hemijske karakteristike.

5.2. Mikrobiološke karakteristike zemljišta

Mikrobiološke analize ispitivanih zemljišta imale su za cilj utvrđivanje diverziteta pojedinih fizioloških i sistematskih grupa mikroorganizama, imajući u vidu da mikrobni diverzitet predstavlja važan indeks zdravlja zemljišta kao ekosistema (Entry et al., 2008).

Mikrobiološke analize ukazuju da postoje razlike u brojnosti osnovnih fizioloških grupa mikroorganizama. Razlike su utvrđene kroz brojnost ukupnih bakterija, gljiva, aktinomiceta, ukupnih i sporogenih amonifikatora i ukupnih azotofiksatora (Tabela 5).

Najveća brojnost bakterija, gljiva i aktinomiceta je konstatovana u poljoprivrednom zemljištu i deposolu I, što je u skladu sa rezultatima hemijskih analiza koji karakterišu ova dva zemljišta kao plodnija, u odnosu na ostale. Visok sadržaj humusa u ovim zemljištima je doprineo većoj brojnosti mikrobnih populacija. Kisela reakcija sredine šumskog zemljišta (pH 4,9) može biti jedan od uzroka koji je doveo do toga da, i pored visokog sadržaja humusa, zasupljenost ukupnih bakterija, gljiva i amonifikatora bude niža u odnosu na poljoprivredno zemljište i deposol I. Istraživanja Nagendran et al. (2014) su ukazala da između vlažnosti zemljišta i sadržaja organske

materije postoji pozitivna korelacija sa brojnošću kolonija bakterija (CFU) dok je uočena negativna korelacija između pH i CFU. Najmanja brojnost ukupnih bakterija ($0,41 \times 10^7$ CFU g⁻¹), gljiva ($0,01 \times 10^6$ CFU g⁻¹) i aktinomiceta ($3,34 \times 10^4$ CFU g⁻¹) je zabeležena u deposolu II, koji je odlikuje niskim sadržajem humusa (0,15%). Brojnost azotofiksatora predstavlja značajan indikator biogenosti i plodnosti zemljišta. Najveći broj ove grupe mikroorganizama je zabeležen u šumskom ($4,73 \times 10^4$ CFU g⁻¹) i poljoprivrednom zemljištu ($2,23 \times 10^4$ CFU g⁻¹).

Tabela 5. Mikrobiološke osobine zemljišta (CFU g⁻¹)

Uzorci	Ukupne			Amonifikatori		Ukupni azotofiksatori x 10 ⁴
	Bakterije x 10 ⁷	Gljive x 10 ⁶	Aktinomicete x 10 ⁵	Ukupni x 10 ⁵	Sporogeni x 10 ⁵	
Poljoprivredno zemljište	8,52	5,21	8,73	67,21	10,23	2,23
Šumsko zemljište	0,29	0,11	5,65	0,53	0,24	4,73
Deposol I	1,47	4,12	8,21	51,95	0,82	0,82
Deposol II	0,41	0,01	3,43	0,73	0,65	0,24

Na brojnost mikroorganizama u zemljištu utiče veliki broj faktora kao što su temperatura, vlaga, prisustvo soli, hemikalija, sadržaj organske materije, prisustvo vegetacije i vrste biljaka koje ga naseljavaju (Garbeva et al., 2004; Singh i Singh, 2006; Vos et al., 2013).

Biljke preko korenovog sistema luče veliku količinu jedinjenja, naročito onih koja su bogata ugljenikom (Souza et al., 2015), a neophodna su za uspostavljanje biljno - mikrobnih interakcija u rizosferi (Neumann i Römhald, 2007). Eksudati predstavljaju izvor hranljivih materija za mikroorganizme i njihovim lučenjem biljke obezbeđuju one nutrijente koji su im neophodni, a kojih nema dovoljno u zemljištu (Souza et al., 2015). Fluks ugljenika predstavlja ključnu determinantu u funkcionisanju rizosfere, s obzirom da veliki procenat ugljenika usvojenog u procesu fotosinteze dospe u ovaj deo zemljišta putem korenskih eksudata (Nihorimbere et al., 2011; Glick, 2014; Souza et al., 2015).

Prisustvo različitih organskih jedinjenja (eksudati i mucigel) koje oslobađa koren omogućava izuzetnu mikrobiološku aktivnost u rizosferi. Velika brojnost i diverzitet mikrobnih populacija, ima za posledicu, povratno, stimulaciju rasta korena i

cele biljke. U principu, mikroorganizmi predstavljaju posrednike, odnosno vezu između biljaka i zemljišta (Lynch, 1990). Površine sa kojih je uzorkovano poljoprivredno, šumsko zemljište i deposol I se odlikuju prisustvom vegetacije, dok su površine pod deposolom II bez biljnog pokrivača što može objasniti razlike u mikrobiološkim osobinama. Takođe, nepovoljni uslovi sredine, kao što su ekstremne temperature, suša, povećan sadržaj soli ili teških metala smanjuju brojnost bakterija (Glick, 2012).

Konkurencija za nutrijente u rizosferi je veoma visoka, stoga su mikroorganizmi razvili različite strategije preživljavanja koje dovode do niza antagonističkih i sinergističkih interakcija, kako međusobno tako i sa biljkama (Nihorimbere et al., 2011; Huang et al., 2014). Mikrobni i biljni diverzitet u zemljištu doprinosi postojanju raznovrsnih interakcija koje su ključne za stimulaciju rasta biljaka, a samim tim i za sanaciju oštećenih zemljišta (Hryniewicz i Baum, 2011). Istraživanja su pokazala da raznovrsnost bakterijskih populacija modulira interakcije na relaciji biljka - zemljište, a time poboljšava i rast biljaka (Weidner et al., 2015).

5.3. Izolacija bakterija iz zemljišta

Cilj doktorske disertacije je formiranje kolekcije bakterijskih populacija porekom iz različitih zemljišnih ekosistema, što podrazumeva njihovu izolaciju, determinaciju i identifikaciju. U nastojanju da se dobijeni izolati primene u ekoremedijacionim tehnologijama, za cilj istraživanja je postavljena izolacija bakterija koje pripadaju grupi stimulatora biljnog rasta, prvenstveno predstavnika roda *Bacillus* i slobodnih azotofiksatora. Udeo bakterija stimulatora rasta biljaka u ukupnoj populaciji rizosfernih bakterija jako nizak (2-5%), a među njima su najzastupljeni članovi roda *Bacillus* (Kumar et al., 2012b). Izolacija bakterija iz grupe slobodnih azotofiksatora vezana je za sposobnost fiksacije azota i njihov uticaj na rast biljaka kao biofertilizatora, čime se olakšava proces ekoremedijacije oštećenih zemljišta.

Nakon inkubacije odabrane su morfološki različite kolonije sa odgovarajućih hranljivih podloga, MPA i Fjodorovog agara. Višestrukim presejavanjem na MPA podlogu dobijene su čiste kulture, ukupno 35 izolata, od kojih je iz poljoprivrednog zemljišta izolovano pet, šumskog šest, deposola I dvanaest, i deposola II dvanaest. Na Fjodorovom agaru dobijena su dva izolata iz poljoprivrednog (15aN ARV i 18N ARV),

jedan izolat iz šumskog zemljišta (NV2 ARV) i dva iz deposola I (333 ARV i 10_ARV). Čistoća kultura je proverena mikroskopski (Nikon Eclipse 50i, Japan).

Nakon prečišćavanja formirana je kolekcija čistih kultura od 40 izolata kojoj su dodata četiri izolata iz kolekcije Katedre za ekološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Mikroskopskim posmatranjem ćelija konstatovano je da kolekciju čine, u najvećem broju sporogeni izolati (38). Bojenjem bakterija po Gramu, konstatovano je da je 38 izolata Gram-pozitivno, a šest Gram-negativno. Sposobnost formiranja kapsule je primećena samo kod jednog izolata (333 ARV), dok je većina izolata (34) bila pokretna (Tabela 6). Mikroskopske analize su pokazale da se najveći broj izolata odlikuje osobinama karakterističnim za rod *Bacillus* (Gram-pozitivne, sporogene ćelije štapićastog oblika) čime je i ispunjen osnovni cilj ove faze. Bitna odlika roda *Bacillus* je sposobnost sporulacije koja njegove predstavnike čini otpornim na uslove spoljašnje sredine (Ramirez i Kloepper, 2010).

Primenu bakterija kao biostimulatora, biofertilizatora i biokontrolnih agensa u održivoj poljoprivredi opisali su brojni istraživači (Ryan et al., 2009; Bhardwaj et al., 2014; Gupta et al., 2015), a povećanje površina oštećenog zemljišta u svetu stimuliše dalja istraživanja u ovoj oblasti. Pored predstavnika roda *Bacillus* među značajnije PGPB rodove u rizosferi spadaju i *Pseudomonas* kao i predstavnici fam. *Rhizobiaceae* poput *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Shinorhizobium*, *Rhizobium* (Ahemad i Kibret, 2014; Gupta et al., 2015).

Na osnovu direktnih i indirektnih mehanizama izvršena je karakterizacija i selekcija izolata dalje primenjenih u cilju postizanja stimulacije biljnog rasta.

Tabela 6. Morfološke karakteristike ćelija

Poreklo izolata	Oznaka izolata	Oblik ćelija	Bojenje po Gramu	Prisustvo spora	Prisustvo kapsula	Pokretljivost ćelija
Poljoprivredno zemljište	3N ARV	štapićast	+	+	-	-
	6N ARV	štapićast	+	+	-	+
	7N ARV	štapićast	+	+	-	+
	8N ARV	štapićast	+	+	-	+
	15aN ARV	štapićast	+	+	-	+
	18N ARV	štapićast	+	+	-	-
	19D ARV	štapićast	+	+	-	-
Šumsko zemljište	NV1 ARV	štapićast	+	+	-	-
	NV2 ARV	okrugao	-	-	-	+
	NV3 ARV	štapićast	+	+	-	+
	NV4 ARV	štapićast	+	+	-	+
	NV5 ARV	štapićast	+	+	-	+
	NV6 ARV	štapićast	+	+	-	-
	NV7 ARV	štapićast	+	+	-	-
Deposol I	Z-I1 ARV	štapićast	-	-	-	+
	Z-I ARV	štapićast	-	-	-	+
	Z-H ARV	štapićast	+	+	-	-
	Z-6k ARV	štapićast	+	+	-	+
	CSP ARV	štapićast	+	+	-	+
	G1SP ARV	štapićast	+	+	-	+
	GSP ARV	štapićast	+	+	-	-
	2TSB ARV	štapićast	+	+	-	+
	O3 ARV	štapićast	+	+	-	+
	2T ARV	štapićast	+	+	-	-
	E ARV	štapićast	+	+	-	-
	F ARV	štapićast	+	+	-	+
	333 ARV	štapićast	-	-	+	+
	10_ARV	štapićast	-	-	-	+

Poreklo izolata	Oznaka izolata	Oblik ćelija	Bojenje po Gramu	Prisustvo spora	Prisustvo kapsula	Pokretljivost ćelija
Deposol II	1 ARV	štapićast	+	+	-	-
	2 ARV	štapićast	+	+	-	-
	4 ARV	štapićast	+	+	-	+
	5 ARV	štapićast	+	+	-	+
	6 ARV	štapićast	+	+	-	+
	7 ARV	štapićast	+	+	-	-
	8 ARV	štapićast	+	+	-	+
	D1 ARV	štapićast	+	+	-	+
	D2 ARV	štapićast	+	+	-	+
	D3 ARV	štapićast	+	+	-	-
	D5 ARV	štapićast	+	+	-	+
	D6 ARV	štapićast	+	+	-	-
Katedra za EM	P1 ARV	štapićast	-	-	-	+
	T1 ARV	štapićast	+	+	-	+
	T6 ARV	štapićast	+	+	-	+
	T10 ARV	štapićast	+	+	-	+

5.4. Direktni mehanizmi stimulacije biljnog rasta

Direktni mehanizmi stimulacije rasta biljaka povećavaju rast snabdevanjem biljka neophodnim nutrijentima ili sintezom hormona. Tokom istraživanja izolati su testirani na sposobnost ispoljavanja pet osnovnih direktnih mehanizma stimulacije biljnog rasta (produkcija amonijaka, IAA, ACC deaminaze, siderofora i rastvorljivost fosfata). Od početnog broja izolata, sposobnost ispoljavanja najmanje jednog direktnog mehanizma je zabeležena kod 38 sojeva, dok izolati 18N ARV, Z-6k ARV, E ARV, 1 ARV, 2 ARV i 7 ARV nisu pokazali prisusvo ni jednog od testiranih mehanizama (Tabela 7).

Tabela 7. Direktni mehanizmi stimulacije rasta biljaka testiranih izolata

Poreklo izolata	Oznaka izolata	Produkcija				Rastvorljivost fosfata (SI)
		NH ₃	IAA µg ml ⁻¹	ACC	Siderofore	
Poljoprivredno zemljište	3N ARV	-	1,7 ± 0,3	-	+	-
	6N ARV	+	0,4 ± 0,1	-	-	-
	7N ARV	+	0,8 ± 0,1	-	-	2,33 ± 0,45
	8N ARV	+	0,8 ± 0,2	-	-	-
	15N ARV	+	0,4 ± 0,1	-	-	-
	19 D ARV	+	0,5 ± 0,02	-	-	-
Šumsko zemljište	NV1 ARV	+	4 ± 0,2	-	-	2,11 ± 0,25
	NV2 ARV	+	5,6 ± 0,4	-	+	-
	NV3 ARV	+	3,8 ± 0,4	-	+	2,14 ± 0,15
	NV4 ARV	+	4 ± 0,3	-	+	-
	NV5 ARV	+	8 ± 0,4	-	-	1,5 ± 0,15
	NV6 ARV	+	2,4 ± 0,3	-	-	-
	NV7 ARV	+	1,1 ± 0,2	-	-	-
Deposol I	Z-I1 ARV	+	9,6 ± 0,2	-	+	2,25 ± 0,32
	Z-I ARV	+	8,4 ± 0,3	-	+	2,6 ± 0,30
	Z-H ARV	+	0,5 ± 0,1	-	-	-
	CSP ARV	-	2,6 ± 0,3	-	-	-
	G1SP ARV	+	2 ± 0,2	-	-	-
	GSP ARV	-	1,8 ± 0,3	-	-	-
	2TSB ARV	+	0,8 ± 0,1	-	-	-
	O3 ARV	+	1,1 ± 0,2	-	-	-
	2T ARV	+	10,5 ± 0,5	-	-	-
	F ARV	+	0,4 ± 0,1	-	-	-
	333 ARV	-	26,4 ± 0,5	-	+	2,11 ± 0,22
	10_ARV	+	44,5 ± 0,5	-	+	2,33 ± 0,30
Deposol II	4 ARV	+	1,4 ± 0,2	-	-	-
	5 ARV	+	-	-	-	-
	6 ARV	+	-	-	-	-
	8 ARV	+	0,4 ± 0,1	-	-	2,22 ± 0,25
	D1 ARV	+	0,8 ± 0,1	-	-	-
	D2 ARV	+	1,1 ± 0,15	-	-	-
	D3 ARV	+	0,5 ± 0,07	-	-	2,27 ± 0,28
	D5 ARV	+	1,5 ± 0,3	-	+	-
Katedra EM	D6 ARV	+	1,8 ± 0,2	-	-	-
	P1 ARV	+	1,2 ± 0,1	-	+	2,7 ± 0,25
	T1 ARV	-	1,4 ± 0,1	-	-	-
	T6 ARV	+	4 ± 0,2	-	+	-
	T10 ARV	-	1,4 ± 0,3	-	-	2,5 ± 0,3

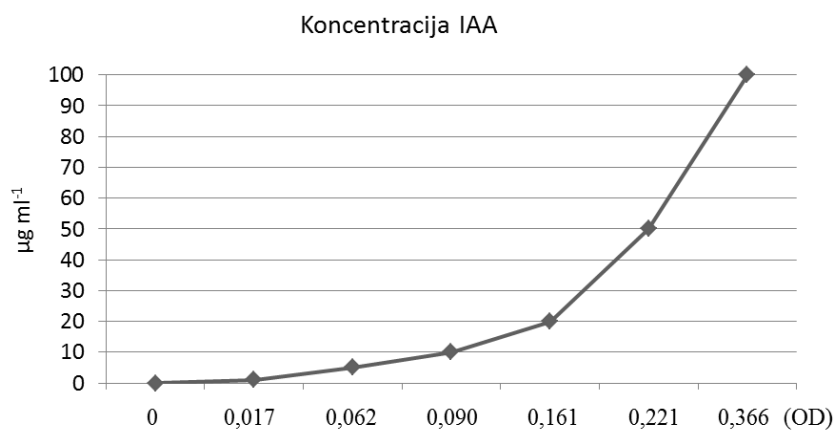
(+) prisustvo; (-) odsustvo mehanizma; (SI) Solubilizacioni indeks n=3

Sposobnost bakterija da transformišu azot iz organske materije do amonijaka predstavlja značajan mehanizam u kruženju azota. Proizvodnjom egzoenzima, kao što su proteaze, mikroorganizmi povećavaju dostupnost azota biljkama. Polazeći od toga da je azot ograničavajući faktor za rast biljaka, posebno u ranim fazama života (Hanley i Fenner, 1997) i da amonifikacija predstavlja značajan proces u ishrani biljaka, jasno je zašto je jedan od najvažnijih PGP mehanizama, produkcija NH_3 (Gamalero i Glick, 2011). Od 44 testirana izolata 32 su pokazala pozitivnu reakciju u ovom testu, što potvrđuje brojna ranija istraživanja da veliki broj zemljišnih bakterija ima sposobnost amonifikacije. Ova sposobnost, nije zabeležena kod izolata 3N ARV, CSP ARV, GSP ARV, 333 ARV, T1 ARV i T10 ARV. Svi izolati poreklom iz šumskog zemljišta i deposola II su produkovali NH_3 (Tabela 7). Kvantifikacija produkcije amonijaka u ovim istraživanjima nije rađena, ali literaturni podaci pokazuju da najveći broj izolata produkuje 4-4,5 mmol ml^{-1} NH_3 (Dutta et al., 2015).

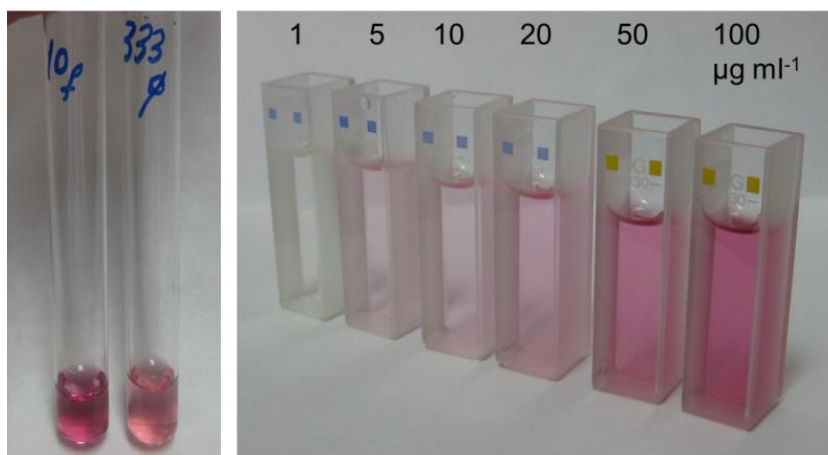
Auksin ima veliki uticaj na mikrobno-biljne interakcije, zbog čega njihova produkcija predstavlja jedan od najzastupljenijih PGPB mehanizama i često je prvi korak u selekciji PGP izolata (Gamalero i Glick, 2011). Uticaj bakterija u rizosferi biljaka je u velikoj meri rezultat produkcije fitohormona, odnosno, auksina (Patten i Glick, 2002). U prirodi se auksini javljaju u nekoliko oblika, a najrasprostranjenija je indol-3-sirćetna kiselina i ova dva pojma se veoma često izjednačavaju (Glick, 2012). Glavni prekursor u sintezi auksina je triptofan, a glavni izvor ove aminokiseline u prirodnim uslovima su korenski eksudati (Malhotra i Srivastava, 2009). Laboratorijska ispitivanja su potvrdila da povećanje sadržaja triptofana doprinosi povećanju produkcije auksina kod bakterija (Patten i Glick, 2002; Sivasakthi et al., 2014).

Indol-3-sirćetna kiselina (IAA) je glavni auksin kod biljaka koji kontroliše brojne fiziološke procese, uključujući izduživanje i deobu ćelija, diferencijaciju tkiva i odgovor na svetlo, gravitaciju i stresne uslove spoljašnje sredine (Gupta et al., 2015). Pored uticaja na stimulaciju biljnog rasta IAA može indukovati i transkripciju ACC sinteaze i tako stimulisati produkciju etilena (Glick, 2014).

Produkcija IAA je zabeležena kod 36 izolata (Tabela 7), a produkovane koncentracije IAA su određene na osnovu standardne krive (Grafik 1). Među njima su se, prema količinama koje produkuju u prisustvu 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ l-triptofana, izdvojili izolati 333 ARV i 10_ARV koji produkuju 26,40 odnosno 44,50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ IAA (Slika 5).



Grafik 1. Standardna kriva IAA u M9 medijumu



Slika 5. Produkcija IAA - izolati 10_ARV i 333 ARV (levo) u poređenju sa standardnom krivom (desno)

Podaci o tome koja je količina IAA dovoljna da izazove pozitivan efekat na rast biljaka se razlikuju. Teixeira et al. (2007) navode da je dovoljna količina od svega 0,7 µg ml⁻¹. Od izolata iz poljoprivrednog zemljišta, 3N ARV, 7N ARV i 8N ARV su pokazali sposobnost produkcije IAA > 0,7 µg ml⁻¹. Izolati iz šumskog zemljišta su se u pogledu produkcije ovog hormona pokazali kao efikasniji u odnosu na izolate koje su opisali Teixeira et al. (2007). Većina izolata iz deposola I je pokazala sposobnost produkcije većih količina IAA od 0,7 µg ml⁻¹, a jedini koji su produkovali niže koncentracije su Z-H ARV (0,5 µg ml⁻¹) i F ARV (0,4 µg ml⁻¹). Većina izolata koji vode poreklo iz deposola II su produkovali veće koncentracije (0,8; 1,1; 1,4; 1,5 i 1,8 µg

ml⁻¹ IAA). Izuzetak su izolati 8 ARV (0,4 µg ml⁻¹) i D3 ARV (0,5 µg ml⁻¹). Majeed et al. (2015) su zabeležili stimulativan efekat nekoliko PGPB izolata koji su produkovali niže koncentracije IAA od 0,7 µg ml⁻¹ u prisustvu 100 µg ml⁻¹ l-triptofana. Njihovi rezultati pokazuju da je inokulacija izolatima *Bacillus* sp. ARS4 (0,56 µg ml⁻¹ IAA) i *Stenotrophomonas rhizophila* ARS3 (0,27 µg ml⁻¹ IAA) dovela do stimulacije rasta, povećanja dužine korena i suve biomase pšenice (Majeed et al., 2015). Među izolatima testiranim u ovoj disertaciji najniža produkovana koncentracija iznosila je 0,4 µg ml⁻¹ IAA koju su produkovali 6N ARV, 15 N ARV, F ARV, 8 ARV.

Inokulacija sa *Azotospirillum brasilense*, koji je produkovao 11 µg ml⁻¹ IAA, je dovela do stimulacije rasta sadnica *Eucalyptus globulus*. U ovom slučaju, masa nadzemnog dela je povećana za 86% dok je masa korena povećana za 54% (Puente et al., 2010). Među izolatima testiranim u ovoj disertaciji, sličnu produkciju IAA je pokazao samo 2T ARV (10,5 µg ml⁻¹), dok su ostali izolati, izuzev 333 ARV i 10_ARV, produkovali znatno niže koncentracije (Tabela 7).

Odgovor biljke na prisustvo IAA varira od vrste do vrste. Njihova osetljivost na iste količine zavisi od biljnog tkiva (manja količina auksina je potrebna korenu od nadzemnog dela) kao i od faze razvoja biljke. Količina hormona koju biljka sintetiše može biti izmenjena usled prisustva egzogenog, bakterijskog hormona (Spaepen i Vanderleyden, 2011). Nivo endogenog auksina određuje pozitivnu ili inhibitornu ulogu egzogenih izvora auksina. Ako ukupna količina auksina u biljnim tkivima ne prevazilazi gornju granicu hormona karakterističanu za datu fazu razvoja, onda će efekat biti stimulativan, dok u suprotnom IAA ispoljava inhibitorni efekat na rast biljke (Patten i Glick, 2002; Husen et al., 2009; Glick, 2012). Dubeikovsky et al. (1993) su zabeležili dvojako dejstvo *Pseudomonas fluorescens* BSO53 koji se odlikuje visokom produkcijom IAA. Primena ovog soja dovela je do stimulacije rasta korena sadnica crne ribizle, ali je inhibirala razvoj korena reznica trešnje. Razlog tome je endogeni nivo auksina. Sadnice crne ribizle su imale niži sadržaj ovog hormona i njegov egzogeni dodatak je stimulisao rast, dok su se kod trešnje egzogene i endogene količine auksina pokazale kao prevelike i rezultirale su inhibicijom.

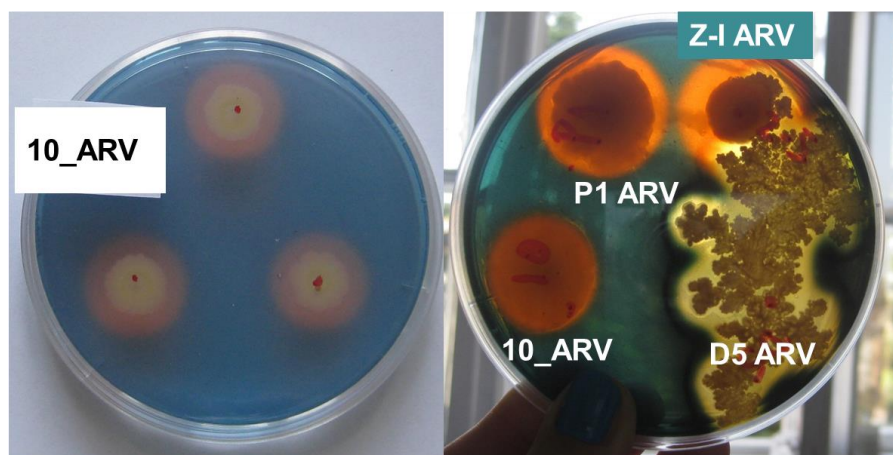
Stimulativni efekti inokulacije sojevima koji produkuju IAA su brojni, poput uticaja na visinu biljke, razvoj lateralnih i adventivnih korenova, nodulaciju korena, njegovu dužinu i zapreminu, na produkciju biomase, prinos, sadržaj nutrijenata u

biljnim tkivima i sadržaj hlorofila (Parvaiz, 2014). Inokulacija pšenice sa nekoliko izolata koji produkuju IAA (*B. megaterium*, *L. casei*, *B. subtilis*, *B. cereus* i *L. acidophilus*) je značajno stimulisala rast korena i nadzemnog dela biljke (Mohite, 2013). Stimulacija rasta korena poboljšava snabdevanje biljke nutrijentima (Ramos et al., 2008) omogućavajući rast u manje plodnim zemljištima (Khan i Doty, 2009). Bakterijska IAA "omekšava" ćelijski zid biljaka što dovodi do olakšanog lučenja eksudata i boljeg razvoja rizosfernih bakterija (Glick, 2012). Metabolički procesi poput fotosinteze i biosinteze različitih metabolita, otpornost na stresne uticaje sredine su, takođe, uslovljeni auksinima (Glick, 2012). Egamberdieva (2009) je zabeležila stimulativan uticaj inokulacije sa *P. aureantiaca* TSAU22, *P. extremorientalis* TSAU6 i *P. extremorientalis* TSAU20 koji su produkovali IAA na rast pšenice u uslovima povećane koncentracije soli (100 mM NaCl). *Bacillus* sp. JH 2-2 je pokazao sposobnost produkcije IAA i stimulacije rasta *Brassica juncea* L. u uslovima povišene koncentracije hroma (Shim et al., 2015).

Veliki broj PGPB ima sposobnost produkcije enzima 1-aminociklopropan-1-karboksilat deaminazu koji prekida put sinteze kojim se ACC oksiduje do etilena, ugljen-dioksida i cijanida uz pomoć enzima ACC oksidaze. ACC deaminaza utiče da se ACC konvertuje u amonijak i α -ketobutirat, smanjujući količinu etilena. Tokom svog života, biljke su izložene brojnim, stresovima (ekstremne temperature, visok intenzitet svetlosti, poplave, suša, prisustvo toksičnih metala i organskih zagađivača) na koje reaguju stvaranjem etilena koji smanjuje njihov rast. U ovakvim uslovima PGPB mogu smanjiti količinu etilena kroz delovanje ACC deaminaze. Ovaj mehanizam se smatra moćnim oružjem u smanjenju gubitaka u poljoprivredi izazvanih akumulacijom etilena (Gamalero i Glick, 2011). Brojne zemljišne bakterije sintetišu ACC deaminazu, ali među izolatima koji su testirani u ovom istraživanju nijedan nije pokazao sposobnost korišćenja ACC-a kao izvora azota za šta je neophodna produkcija ACC deaminaze (Tabela 7).

Za razliku od produkcije amonijaka i auksina, manji broj izolata imao je sposobnost produkcije siderofora. Od 44 testirana izolata, sposobnost produkcije siderofora je zabeležena kod 11. Od izolata izolovanih iz poljoprivrednog zemljišta, samo je 3N ARV pokazao ovu sposobnost. Tri od sedam izolata iz šumskog zemljišta su pokazali ovu sposobnost (NV2 ARV, NV3 ARV i NV4 ARV). Izolati iz deposola I koji

su pokazali pozitivnu reakciju u testu produkcije siderofora su Z-I ARV, Z-I ARV, 333 ARV i 10_ ARV (Slika), dok je samo jedan izolat poreklom iz deposola II (D5 ARV) bio pozitivan na prisustvo ovog mehanizma. Od izolata iz kolekcije Katedre za ekološku mikrobiologiju, sposobnost produkcije siderofora imaju izolati P1 ARV i T6 ARV (Tabela 7). Iako je gvožđe među najzastupljenijim elementima na zemlji, forma Fe^{+3} je slabo rastvorna i nedostupna biljkama i mikroorganizmima (Souza et al., 2015). Gvožđe (Fe) je važan mikronutrijent za biljke i mikroorganizme i učestvuje u biološkim procesima, kao što su fotosinteza, disanje, biosinteza hlorofila (Kobayashi i Nishizawa, 2012) i biološka fiksacija azota (Souza et al., 2015). Simptomi nedostatka gvožđa u biljnim tkivima su hlorotični listovi nastali kao posledica promena u strukturi hloroplasta (Römheld i Nikolić, 2006).



Slika 6. Produkcija siderofora na CAS agaru od strane izolata 10_ARV (levo) i P1 ARV, Z-I ARV, D5 ARV i 10_ARV (desno)

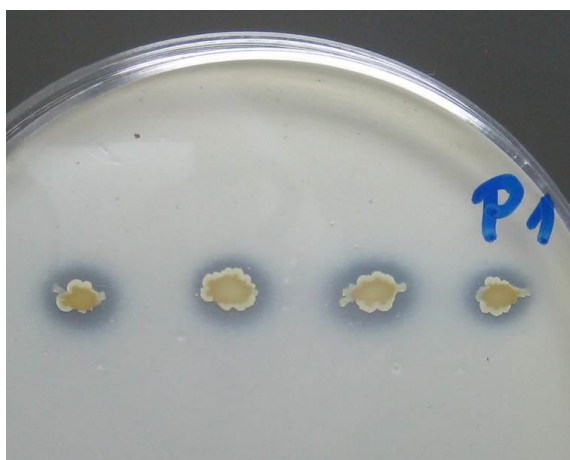
Jedan od načina kojim se biljke i bakterije snabdevaju ovim esencijalnim nutrijentom je produkcija molekula male molekulske mase i visokog afiniteta prema Fe^{+3} tj. siderofora (Gamalero i Glick, 2011).

Ekskrecijom siderofora bakterije stimulišu rast biljaka direktno, poboljšavajući ishranu biljaka ili indirektno, kroz smanjenje dostupnosti gvožđa fitopatogenima u biljnom okruženju. Za razliku od mikrobnih patogena, biljke nisu ugrožene bakterijskim usvajanjem gvožđa, već mogu koristiti Fe^{3+} - sideroforni bakterijski kompleks (Dimkpa et al., 2009). Tako su biljke zlatnog pasulja, gajene u uslovima nedostatka gvožđa, pokazale manje hlorotičnih simptoma i veći nivo hlorofila nakon inokulacije sa

Pseudomonas spp. GRP3 koji proizvodi siderofore (Sharma et al., 2003). Inokulacija *A. thaliana* sa *P. fluorescens* C7 koji sintetizira Fe-pioverdin kompleks je uticala na povećanje rasta i sadržaja gvožđa u biljnim tkivima (Vansuyt et al., 2007).

Fosfor je esencijalni nutrijent za biljke, ulazi u sastav nukleinskih kiselina, fosfolipida i ATP-a i ključni je element mnogih metaboličkih i biokemijskih puteva, kao što je biološka fiksacija azota i fotosinteza (Khan et al., 2007). Biljke iz zemljišnog rastvora usvajaju fosfor u obliku rastvorljivih jona H_2PO_4^- i HPO_4^{2-} , ali je, ipak, najveća količina fosfora u zemljištu prisutna u nerastvornom obliku (Souza et al., 2015) i nedostupna je biljkama. Bakterije ovaj problem prevazilaze uz pomoć karboksilnih kiselina koje omogućavaju prevođenje nerastvornih formi fosfata u rastvorne (Afzal et al., 2005) i na taj način obezbeđuju fosfor i biljkama.

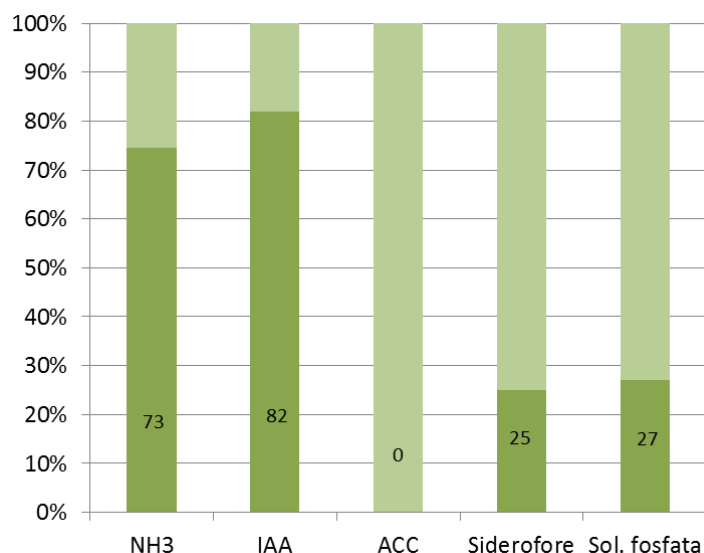
Od ukupnog broja testiranih izolata 12 je pokazalo sposobnost prevođenja nerastvorljivih fosfata u rastvorljive. Među izolatima iz poljoprivrednog zemljišta ova sposobnost je zabeležena kod 7N ARV. Izolati NV1 ARV, NV3 ARV i NV5 ARV, poreklom iz šumskog zemljišta, pokazali su prisustvo ovog mehanizma. Četiri izolata (Z-I1 ARV, Z-I ARV, 333 ARV i 10_ARV) iz deposola I su pokazala sposobnost prevođenja fosfata iz nerastvorljivog u rastvorljivi oblik. Od 12 izolata izolovanih iz deposola II, samo su 8 ARV i D3 ARV bili pozitivni, kao i P1 ARV i T10 ARV, izolati iz kolekcije Katedre za ekološku mikrobiologiju. Najveću sposobnost rastvorljivosti fosfata pokazali su izolati P1 ARV (Slika 7) i Z-I ARV sa solubilizacionim indeksima od 2,7 i 2,6, a najmanji solubilizacioni indeks (1,5) je zabeležen kod izolata iz šumskog zemljišta, NV5 ARV (Tabela 7).



Slika 7. Solubilizacija fosfata od strane izolata P1 ARV na NBRIP medijumu

Eksperimenti sa bakterijama koje solubilizuju fosfate su pokazali da njihovo prisustvo povećava prinos kukuruza (Pal, 1998) i cerealija (Öztürk et al., 2003; Afzal et al., 2005). Afzal i Bono (2008) su primetili da kombinacija *R. leguminosarum* Thal-8/SK8 i *Pseudomonas* spp. 54RB, koji solubilizuju fosfor, značajno povećava visinu, biomasu nadzemnog dela i prinos pšenice u odnosu na neinokulisanu kontrolu. Takođe je uočeno da je efekat ovog mešanog inokuluma isti kao i efekat postignut dodavanjem fosfora u vidu mineralnog đubriva. Poređenje tretmana u kojem su biljke inokulisane sa ova dva soja uz dodatak mineralnog fosfora sa tretmanima u kom su biljke inokulisane, ali bez dodatka đubriva, pokazuje da prisustvo mineralnog fosfora nije značajnije povećalo prinos pšenice (Afzal i Bono, 2008). Poređenjem sposobnosti solubilizacije fosfata, izražene kroz solubilizacioni indeks (SI), može se uočiti da su naši izolati P1 ARV i Z-I ARV većeg SI od izolata *R. leguminosarum* Thal-8/SK8 (SI=2,5), dok je u odnosu na *Pseudomonas* spp. 54RB (SI=4,1) njihova sposobnost solubilizacije znatno skromnija.

Među izolatima iz kolekcije, zastupljenost pet testiranih direktnih mehanizama se jako razlikovala od mehanizma do mehanizma (Grafik 2).



Grafik 2. Zastupljenost direktnih mehanizama stimulacije biljnog rasta među testiranim izolatima (%)

Kada se uzmu u obzir svi izolati testirani u ovom istraživanju, sposobnost produkcije amonijaka zabeležena je u 73% izolata, a sposobnost produkcije IAA je zabeležena u 82%. Sposobnost produkcije siderofora i solubilizacije neorganskih fosfata je bila zastupljena u sličnom procentu oko 26%. Većina izolata je pokazala sposobnost ispoljavanja dve ili više direktnih PGP osobina, 36 od početnih 44 izolata (Tabela 7). Pojava da jedan soj poseduje sposobnost ispoljavanja više mehanizama je uobičajena kod PGPB (Bhattacharyya i Jha, 2012). Sposobnost PGPB da istovremeno koriste više mehanizama, direktnih i indirektnih, u komunikaciji sa biljkom otežava precizno utvrđivanje mehanizma odgovornog za postignute efekte. Ipak, smatra se da je inokulacija sa PGPB koje imaju sposobnost da ispolje više PGP mehanizama, u praksi, povoljnija opcija (Imran et al., 2014).

5.5. Indirektni mehanizmi stimulacije biljnog rasta

Indirektni mehanizmi stimulacije rasta biljaka PGPB odnose se na smanjenje ili spečavanje štetnog uticaja jednog ili više fitopatogenih mikroorganizama. Glavni indirektni mehanizam stimulacije biljnog rasta podrazumeva delovanje bakterija kao biokontrolnih agensa (Glick, 2012.). U ovoj fazi ispitivanja cilj je bio da se utvrdi antifungalna aktivnost testiranih izolata prema *Botrytis cinerea* i *Pythium aphanidermatum*. Mnoge rizobakterije ispoljavaju antifungalnu aktivnost mehanizmima kao što su produkcija HCN, fenazina, pirolnitrina, 2,4-diacetylphloroglucinol, piroletrina, viskosinamida i tensina (Bhattacharyya i Jha, 2012.). Takođe, interakcija rizobakterija sa korenom može dovesti do otpornosti biljaka prema patogenim bakterijama, gljivama i virusima, preko indukovane sistemske rezistencije (ISR) (Lugtenberg i Kamilova, 2009; Figueiredo et al., 2010). ISR uključuje aktivaciju jasmonatnog i etilenskog signalnog puta koji aktiviraju mehanizme odbrane (zadebljanje ćelijskog zida, produkcija i akumulacija hitinaza, glukanaza, peroksidaza, fenolnih jedinjenja) protiv patogena (Compant et al., 2005; Figueiredo et al., 2010; Glick, 2012). Različita bakterijska jedinjenja, kao što su lipopolisaharidi, flagele, siderofore, lipopeptidi, 2,4-diacetylphloroglucinol, acetoin i 2,3-butandiol mogu izazvati ISR (Lugtenberg i Kamilova, 2009). Polazeći od toga da antifungalna aktivnost može

biti posledica brojnih interakcija, u ovim istraživanjima je ispitana sposobnost sinteze nekoliko litičkih enzima i HCN.

Od 44 testirana izolata, 22 su imala inhibitorno dejstvo na testirane fitopatogene (Tabela 8).

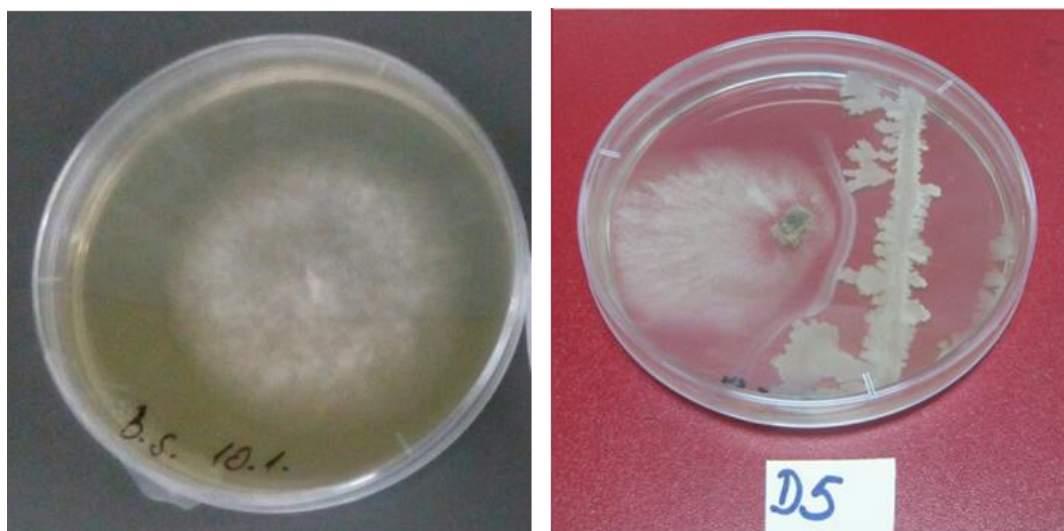
Tabela 8. Konfrontacijski test PGPB sojeva sa *B. cinerea* i *P. aphanidermatum*

Poreklo izolata	Oznaka izolata	Patogen	
		I%	
		<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>
Poljoprivredno zemljište	3N ARV	29 ± 1,2	33 ± 1,5
	7N ARV	55 ± 2,5	0
	15N ARV	44 ± 2,0	0
Šumsko zemljište	NV3 ARV	20 ± 1,0	19 ± 0,9
	NV4 ARV	50 ± 1,5	0
	NV5 ARV	63 ± 2,5	34 ± 1,5
	NV6 ARV	17 ± 0,8	0
	NV7 ARV	21 ± 1,2	0
Deposol I	Z-I ARV	61 ± 2,1	22 ± 1,2
	G1SP ARV	54 ± 2,5	12 ± 0,6
	GSP ARV	17 ± 1,0	29 ± 1,5
	O3 ARV	48 ± 1,5	33 ± 1,8
	2T ARV	70 ± 3,0	0
	F ARV	22 ± 1,5	35 ± 2,5
	333 ARV	53 ± 2,0	0
	10_ARV	20 ± 1,3	10 ± 0,5
Deposol II	4 ARV	37 ± 1,5	35 ± 1,7
	5 ARV	47 ± 2,0	24 ± 1,3
	7 ARV	52 ± 2,5	0
	D5 ARV	83 ± 3,5	42 ± 2,0
	D6 ARV	52 ± 1,7	20 ± 1,5
Katedra EM	P1 ARV	50 ± 1,5	0

I%- procenat inhibicije patogeni; n=5

Od izolata dobijenih iz poljoprivrednog zemljišta, tri su pokazala određen stepen inhibicije prema *B. cinerea*. Izolat 7N ARV je pokazao umerenu antagonističku aktivnost u konfrontacijskom testu sa *B. cinerea*, dok je aktivnost ostala dva izolata bila niska. Pet izolata dobijenih iz šumskog zemljišta je ispoljilo antagonističko delovanje prema ovom patogenu i od njih se kao najefikasniji pokazao izolat NV5 ARV (63%). Osam izolata iz deposola I je pokazalo antagonističko dejstvo prema *B. cinerea*, izolati G1SP ARV i 333 ARV su pokazali umeren, a izolati Z-I ARV i 2T ARV visok stepen inhibitornog dejstva, dok su preostali izolati pokazali nizak nivo antagonističke aktivnosti. Od 12 izolata dobijenih iz deposola II, pet je ispoljilo sposobnost inhibicije *B. cinerea*. Među njima su dva izolata (7 ARV i D6 ARV) pokazala umeren, a izolat D5 ARV (83%) veoma visok stepen antagonističke aktivnosti (Slika 8). Ovaj izolat je pokazao najveću sposobnost inhibicije patogena u odnosu na ostale testirane izolate u ovoj studiji. Od izolata iz kolekcije Katedre za ekološku mikrobiologiju samo je P1 ARV pokazao sposobnost inhibicije *B. cinerea*, ali je stepen njegove antagonističke aktivnosti označen kao nizak.

B. cinerea je široko rasprostranjen biljni patogen, izazivač sive plesni kod velikog broja biljaka (paradajz, jagoda, kruška, grožđe, malina itd.). Ova bolest napada plodove, stablo i cvetove i česta je u stakleničkim uslovima (O'Neill et al., 1997).



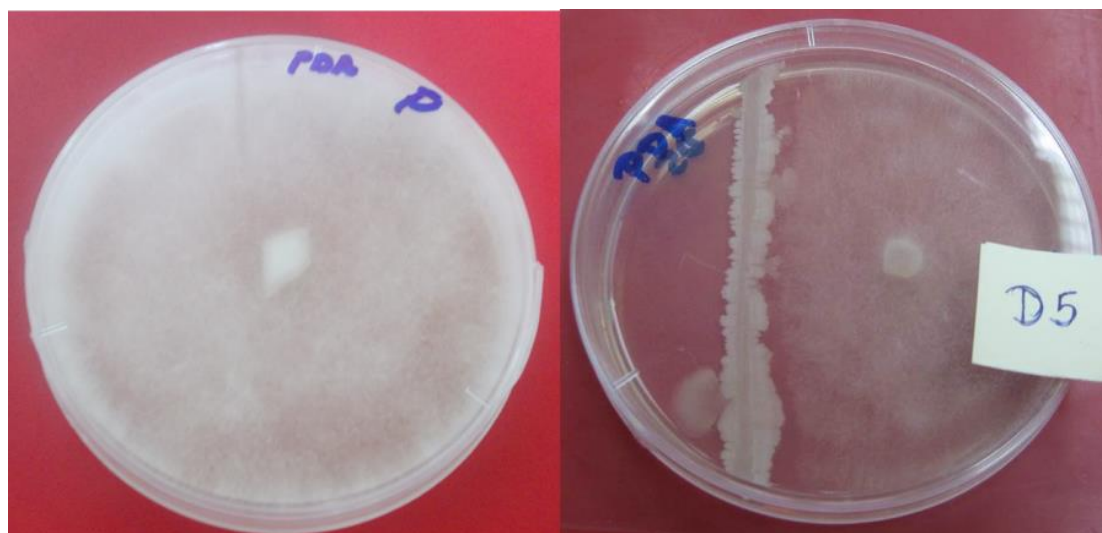
Slika 8. Uticaj izolata D5 ARV na *Botrytis cinerea* (desno) u odnosu na kontrolu (levo)

Najzastupljenija mera borbe protiv *B. cinerea* je primena fungicida na koju se godišnje potroši 10% svih sredstava koja se potroše na globalnom tržištu fungicida (Jovičić-Petrović, 2014). Upotreba fungicida podrazumeva poskupljenje proizvodnje, uticaj na kvalitet i zdravstveni aspekt plodova ali i na pojavu rezistentnosti (Hang et al., 2005) što nameće potrebu za alternativnim rešenjima poput upotrebe mikroorganizama sa antagonističkim delovanjem. Među antagonistima *B. cinerea* nalazi se veliki broj filamentoznih gljiva (Jovičić-Petrović, 2014), kvasaca (Siripornvisal, 2010), a među bakterijskim sojevima najviše pažnje su privukli predstavnici rodova *Pseudomonas* i *Bacillus*. Prednosti *Bacillus* sp. u odnosu na ostale biokontrolne agense su lako održavanje, mogućnosti primene u vidu inokuluma i spora i široki spektar antagonističkog delovanja (Forchetti et al., 2007).

Predstavnici vrste *B. amyloliquefaciens* su u literaturi poznati kao efektivni biokontrolni agensi zemljišnih patogena koji nanose štetu u postžetvenom periodu (Ahlem et al., 2012). Predstavnici ove i drugih vrsta iz roda *Bacillus* su zabeleženi kao antagonisti *B. cinerea* koji izaziva bolesti na kruški, breskvi, jagodi (Mari et al., 1996; Arrebola et al., 2010; Ahlem et al., 2012). Takođe, ispoljavaju antagonističko delovanje i prema *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium verticillioides*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Ahlem et al., 2012). Jedan od mehanizama kojim je objašnjeno ovakvo delovanje *B. amyloliquefaciens* je kompeticija za nutrijente (Mari et al., 1996). Hang et al. (2005) ističu da je bitan faktor za sprečavanje infekcije prisustvo antagonističkog organizma. Oni su pokazali da *B. subtilis* S1-0210 može biti efikasno sredstvo u borbi protiv *B. cinerea* koji izaziva pojavu sive plesni na jagodi. Ovaj izolat je pokazao visok stepen inhibicije u konfrontacijskom testu (80%) dok rezultati *in vivo* oglada pokazuju da je prisustvo antagonističkog agenta redukovalo pojavu bolesti. *B. subtilis* S1-0210 je ispoljio i antagonističko dejstvo (66%) prema *B. cinerea* izolovanog sa površine plodova kivija. Siripornvisal (2010) je testirao antagonističku ulogu *B. subtilis* BCB3-19 izolovanog iz rizosfere paradajza, protiv izazivača sive plesni. Ovaj izolat je inhibirao tri izolata *B. cinerea* za 56%. U poređenju sa navedenim literaturnim podacima može se zaključiti da među izolatima ispitanim u ovoj disertaciji ima onih koji poseduju značajan potencijal za suzbijanje *B. cinerea* (Tabela 8).

Rezultati dobijeni u konfrontacijskom testu sa *P. aphanidermatum* su pokazali slabiju sposobnost testiranih izolata da se izbore sa ovim patogenom (Tabela 8). Jedini izolat iz poljoprivrednog zemljišta koji je pokazao antagonističku aktivnost je 3N ARV i ta aktivnost je prema korišćenoj klasifikaciji označena kao niska. Dva izolata iz šumskog zemljišta (NV3 ARV, NV5 ARV) su inhibirala rast ovog patogena, ali je nivo njihove antagonističke aktivnosti označen kao nizak. Od izolata iz deposola I, šest izolata je pokazalo antagonističko delovanje, ali i u ovom slučaju, niskog nivoa. Od izolata iz deposola II četiri su ispoljila antagonističku aktivnost u konfrontacijskom testu sa *P. aphanidermatum*, među kojima je najveći procenat inhibicije rasta patogena (42%) pokazao izolat D5 ARV mada je i taj nivo antagonističke aktivnosti označen kao nizak (Slika 9). Nijedan izolat iz kolekcije Katedre za ekološku mikrobiologiju nije pokazao antagonističku aktivnost prema ovom patogenu.

P. aphanidermatum je biljni patogen širokog spektra domaćina, veoma rasprostranjen u zemljištu i vodi, svrstan u klasu *Oomycetes* (Nzungize et al., 2012). *Pythium* vrste spadaju među najdestruktivnije biljne patogene koji dovode do velikih gubitaka u poljoprivredi (Jeyaseelan et al., 2012). Prouzrokuju smanjenje prinosa semena, poleganje ponika, truljenje korena i stabljika, truljenje plodova za vreme gajenja, skladištenja i transporta (Al-Sheikh, 2010).



Slika 9. Uticaj izolata D5 ARV na *Pythium aphanidermatum* (desno) u odnosu na kontrolu (levo)

Hemijske mere borbe nose sa sobom iste problem kao i u slučaju *B. cinerea*. Ključna tačka u biološkoj kontroli ovog patogena je njegova osetljivost na kompeticiju i antagonizam tokom saprofitne faze (Martin i Loper, 1999). Među antagonistima visokog potencijala za biološku kontrolu ističu se *P. fluorescens* i *Bacillus* sp. (Jeyaseelan et al., 2012). Elazzazy et al. (2012) su naveli *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* i *P. aeruginosa* kao efikasne antagoniste *P. aphanidermatum*. Njihovo prisustvo je inhibiralo rast patogena od 38% do 78%. Pored toga, *in vivo* ogled u kome je seme krastavca inokulisano sa ova tri izolata, je pokazao da je samo prisustvo *B. amyloliquefaciens* i *P. aeruginosa* umanjilo štetno dejstvo patogena. Izolat koji se u našem slučaju pokazao kao najefikasniji je D5 ARV (42%), a dodatna *in vivo* istraživanja su potrebna da bi se potvrdilo da soj efikasno suzbija bolesti izazvane *P. aphanidermatum*.

Biološke mere borbe zasnovane na indirektnim PGP mehanizmima se sve više promovišu kao sigurna i održiva alternativa hemijskim sredstvima za zaštitu bilja (Siripornvisal, 2010). Bakterije stimulatori biljnog rasta različitim mehanizmima suzbijaju biljne patogene. Ova aktivnost se najčešće ispoljava kroz produkciju brojnih metabolita koji deluju inhibitorno ili letalno na izazivače bolesti ili inaktiviraju enzime uključene u patogenezu. Najčešće su to litički enzimi koji degradiraju ćelijski zid patogena (Gupta et al., 2015). Antagonistički efekti ispoljeni u ovoj studiji mogu biti posledica jednog ili kombinacije više različitih mehanizama. Pored litičkih enzima predstavnici roda *Bacillus* su poznati po produkciji velikog broj metabolita koji imaju antifungalno dejstvo poput bacitracina, gramicidina S, polimiksina, mikobacilina, bacilomicina, fungistatina itd. (Jeyaseelan et al., 2012). Produkcija isparljivih sekundarnih metabolita poput cijanovodonične kiseline je značajan mehanizam suzbijanja bolesti biljaka.

Kako bi se utvrdilo da li je neki od navedenih mehanizama uključen u antagonističko delovanje testiranih izolata, izvršen je niz biohemijskih testova u kojima su testirani izolati koji su inhibirali rast *B. cinerea* za $\geq 50\%$ (Tabela 9).

Tabela 9. Sposobnost PGP izolata da proizvode litičke enzime i HCN

Poreklo izolata	Oznaka izolata	Produkcija					
		lipaza	Na β	β -glu	proteaza	celulaza	HCN
Poljoprivredno zemljište	7N ARV	-	-	-	+	-	-
Šumsko zemljište	NV4 ARV	-	-	-	+	-	-
	NV5 ARV	-	-	-	+	-	+
Deposol I	Z-I ARV	+	+	+	+	-	-
	G1SP ARV	-	+	-	-	-	-
	2T ARV	-	-	-	-	-	-
	333 ARV	+	+	+	+	-	-
Deposol II	7 ARV	+	-	-	-	-	-
	D5 ARV	-	-	-	+	+	-
	D6 ARV	+	-	-	-	-	-
Katedra EM	P1 ARV	-	+	+	-	-	-

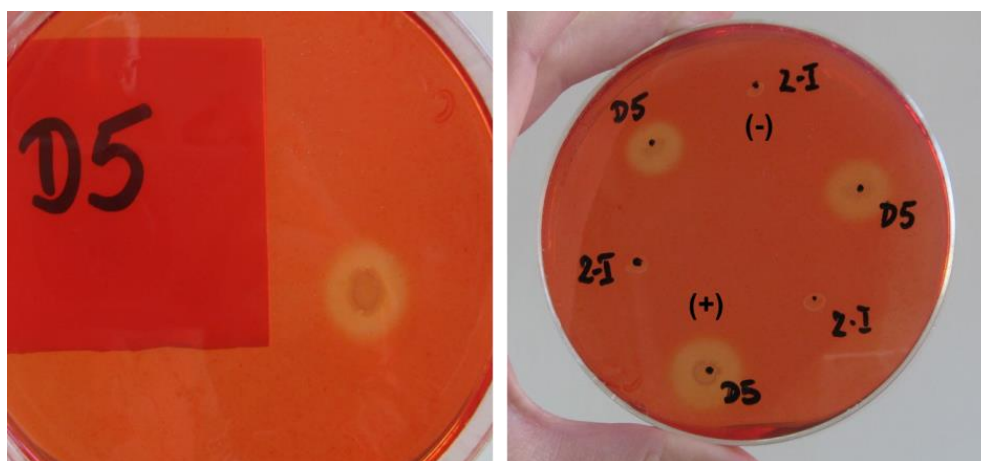
(+) prisustvo; (-) odsustvo osobine; (Na β) N-acetil- β -glukozaminidaza; (β -glu) β -glukozidaza.

Izolati 7N ARV i NV4 ARV koji su pokazali umeren, odnosno, nizak nivo antagonističke aktivnosti (Tabela 8) su pokazali sposobnost produkcije proteaze. Izolat NV5 ARV je pored ovog enzima proizvodio i cijanovodoničnu kiselinu i pokazao je visoku antagonističku aktivnost prema *B. cinerea* (Tabela 8) za šta može biti zaslužno upravo prisustvo HCN. Izolat Z-I ARV iz deposola I je pokazao sposobnost produkcije čitavog niza enzima poput lipaze, N-acetil- β -glukozaminidaze, β -glukozidaze i proteaze (Slika 10) što može biti razlog njegove visoke antagonističke aktivnosti.



Slika 10. Produkcija proteaze od strane izolata Z-I ARV na mlečnom agaru

Za razliku od njega, izolat 2T ARV koji je, takođe, pokazao visoku antagonističku aktivnost prema *B. cinerea* nije pokazao sposobnost produkcije nijednog od ispitivanih litičkih enzima. Od izolata iz deposola I, sposobnost produkcije većeg broja enzima pokazao je i 333 ARV (lipaza, N-acetil- β -glukozaminidaza, β -glukozidaza, proteaza) koji je inhibirao rast patogena za 53%, pokazavši tako umerenu antagonističku aktivnost. Izolati iz deposola II 7 ARV i D6 ARV, umerene antagonističke aktivnosti, su produkovali lipazu, dok je izolat D5 ARV, pored proteaze jedini od testiranih izolata pokazao sposobnost produkcije celulaze (Slika 11). Izolat iz kolekcije Katedre za ekološku mikrobiologiju P1 ARV je pokazao sposobnost produkcije N-acetil- β -glukozaminidaze i β -glukozidaze.



Slika 11. Produkcija celulaze od strane izolata D5 ARV (levo) i razlika u odnosu na celulazu negativan izolat Z-I ARV (desno) na podlozi sa CMC

Bakterije stimulatori biljnog rasta su poznate po lučenju različitih hidrolitičkih enzima kojima razlažu veliki broj organskih polimera poput hitina, celuloze i hemiceluloze. Neki od ovih enzima su uključeni u antagonističke mehanizme prema fitopatogenim gljivama. Od posebnog značaja su hitinaze koje imaju ulogu u razgradnji polisaharida - hitina (Kavroulakis et al., 2006). Hitin čini 22 - 44% ćelijskog zida gljiva i stoga je esencijalan za strukturni integritet hifa (Jovičić-Petrović, 2014). Pored endohitinaza i egzohitinaza, u hitinolitičke enzime spada i N-acetil- β -glukozaminidaza (Sharma, 2012). Enzimski profili testiranih izolata su pokazali prisustvo ovog enzima, sposobnog da degradira hitin, kod četiri izolata (Z-I ARV, G1SP ARV, 333 ARV, P1 ARV) koji takođe inhibiraju i rast *B. cinerea* za $\geq 50\%$ (Tabela 8). Literaturni podaci

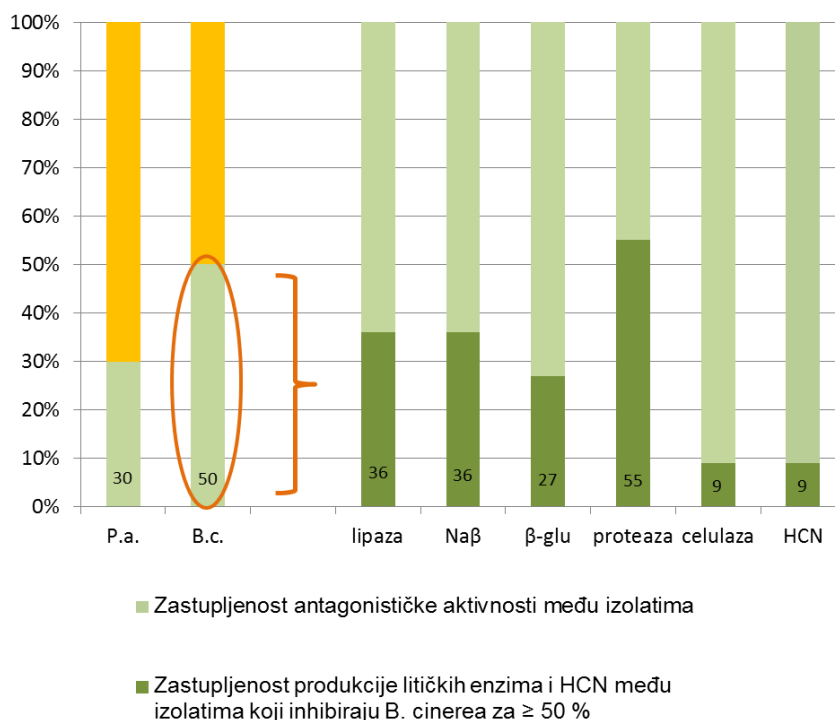
navode značaj hitinaza u borbi protiv biljnih patogena. Tako hitinaze koje proizvodi *Serratia plymuthica* HRO-C48 dovode do inhibicije rasta *B. cinerea* (Frankowski et al., 2001). Od značaja za antifungalno dejstvo PGPB je i produkcija β -glukozidaza koje, takođe, učestvuju u degradaciji ćelijskog zida (Mucha et al., 2006). Tri izolata testirana u ovom radu su pokazala pozitivan odgovor u testu produkcije β -glukozidaza (Z-I ARV, 333 ARV i P1 ARV).

Cijanovodoničnu kiselinu, isparljivi antibiotik, proizvode brojne PGPB (Ahemad i Kibret, 2014) i značajan je faktor u kontroli biljnih patogena (Sharma et al., 2013). Od izolata testiranih ovoj disertaciji HCN je proizvodio samo NV5 ARV, izolovan iz šumskog zemljišta. Ovaj izolat je pokazao visoku antagonističku aktivnost prema *B. cinerea*, dok je rast *P. aphanidermatum* inhibirao za 34%.

Antifungalna aktivnost testiranih izolata može biti i posledica stvaranja siderofora, koje su zabeležene kao značajan mehanizam u kontroli *Pythium* i *Fusarium* vrsta i uključene su u aktiviranje ISR (Özyilmaz i Benlioglu, 2013). Od jedanaest izolata koji su imali sposobnost produkcije siderofora, osam je pokazalo određen nivo antagonističke aktivnosti, a među njima su i izolati Z-I ARV, 333 ARV, NV4 ARV, D5 ARV i P1 ARV koji su pokazali sposobnost inhibicije rasta *B. cinerea* za $\geq 50\%$ (Tabela 8).

Antifungalna aktivnost izolata može biti rezultat i sinergističkih interakcija metabolita. Sposobnost *Bacillus* vrsta da proizvode čitav spektar antimikrobnih supstanci čine ih jednim od najmoćnijih antagonista biljnim patogenima (Siripornvisal, 2010). Najčešće su to peptidi ili antibiotici koji izazivaju abnormalnosti u rastu micelije (Hang et al., 2005). Dakle, postoji čitav niz jedinjenja koja su uključena u biološku borbu i postoji mogućnost da ispitivani sojevi ispoljavaju i neka od dodatnih antagonističkih svojstava koja nisu obuhvaćena ovim istraživanjem.

Sumiranjem rezultata vidi se da je od 44 testirana izolata sposobnost inhibicije rasta *B. cinerea* pokazalo 22, a kod *P. aphanidermatum* ovu sposobnost ispoljila je trećina izolata. Od izolata koji su pokazali sposobnost inhibicije rasta *B. cinerea*, najveći broj je proizvodio proteaze dok je sposobnost produkcije celulaza kao i HCN zabeležena samo kod jednog izolata (Grafik 3).



(P. a.)- *P. aphanidermatum*; (B. c.)- *B. cinerea*; (Naβ) N-acetil-β-glukozaminidaza; (β-glu) β-glukozidaza

Grafik 3. Zastupljenost antagonističke aktivnosti prema *P. aphanidermatum* i *B. cinerea* među testiranim izolatima i zastupljenost produkcije litičkih enzima i HCN među izolatima koji inhibiraju *B. cinerea* (%)

5.6. Površinska kolonizacija semena i korena biljaka PGP izolatima

Jedan od najčešćih načina inokulacije biljnih vrsta sa PGPB je inokulacija semena potapanjem u suspenziju bakterija. Bez obzira na to da li ispoljavaju direktne i indirektne mehanizme, sposobnost bakterija da se zadrže i kolonizuju površinu semena je preduslov za kasnija PGP delovanja (Compant et al., 2005). Izolati pričvršćeni za površinu semena kasnije kolonizuju koren (Suslow i Schroth, 1982) i njegovu bližu okolinu, a neki ispoljavaju i sposobnost endofitne kolonizacije.

Cilj ove faze istraživanja je utvrđivanje sposobnosti izolata da se pričvrste za površinu semena, kolonizuju površinu korena i prodru u unutrašnja tkiva korena.

Ispitivanja su rađena sa: Z-I ARV; 2T ARV; 333 ARV; 10_ARV; NV5 ARV; D5 ARV; P1 ARV i T10 ARV, izolatima odabranim na osnovu ispoljenih direktnih i indirektnih PGP mehanizama. Broj ćelija na površini semena prikazan je u Tabeli 11.

Tabela 10. Površinska kolonizacija semena (10^6 CFU seme⁻¹)

Oznaka izolata	Slačica	Pšenica	Crvena detelina	Suncokret	Prosek
NV5 ARV	0,53	0,60	1,25	11,20	3,40
Z-I ARV	0,80	0,60	2,00	520,00	130,85
2T ARV	0,41	0,40	1,11	12,14	3,52
333 ARV	0,50	0,40	3,05	2,03	1,50
10_ARV	2,00	3,50	25,30	3,50	8,58
D5 ARV	0,80	1,80	80,00	122,00	51,15
P1 ARV	0,60	1,80	2,00	700,00	176,10
T10 ARV	0,70	0,50	1,32	3,00	1,38
Prosek	0,79	1,20	14,50	171,73	

Svi testirani izolati su pokazali sposobnost kolonizacije površine semena ispitivanih biljaka. Brojnost ćelija na površini semena slačice se kretala od 10^5 - 10^6 CFU, a najbrojniji sa 2×10^6 CFU je bio izolat 10_ARV. Ovaj izolat je dobro kolonizovao i seme pšenice ($3,5 \times 10^6$ CFU). Brojnost ćelija na površini semena crvene deteline se kretala od 10^6 - 10^7 CFU, a izolat D5 ARV je bio najbojniji sa 8×10^7 CFU. Brojnost ćelija na površini suncokreta se kretala od 10^6 - 10^8 CFU, a najbrojniji sa 7×10^8 CFU je bio izolat P1 ARV.

Pet od testiranih osam izolata je pokazalo najveću brojnost na semenu suncokreta. Ovakav rezultat i nije iznenađujući, s obzirom da broj ćelija koje se zadrže na semenu zavisi i od njegove veličine (Suslow i Schroth, 1982). Na broj ćelija koje kolonizuju površinu semena utiče i genotip biljke, pH vrednost semena i pre-tretman fungicidima (Mahaffee i Backman, 1993). PGPB pričvršćene za površinu semena koriste ugljene hidrate i amnokiseline oslobođene u procesu klijanja i pričvršćuju se za koren (Kloepper et al., 1991; Choi et al., 2004). Za kolonizaciju korena od velikog značaja su i bakterije koje prilikom inokulacije kolonizuju unutrašnjost semena u toku faze imbibicije (Choi et al., 2004).

Kako bi se utvrdila sposobnost izolata da sa semena kolonizuju površinu korena, deo inokulisanih semena je dve nedelje gajen u sterilnom Hoagland rastvoru (Slika 12). Nakon tog perioda, koren je odvojen od nadzemnog dela i utvrđeno je prisustvo izolata na površini korena (Tabela 11).

Brojnost izolata NV5 ARV se na površini korena kretala od 10^6 - 10^9 CFU g⁻¹. Najniža sposobnost površinske kolonizacije korena je zabeležena na korenu crvene deteline, a najviša na korenu suncokreta. Upravo je na površini semena suncokreta zabeležen najveći broj ćelija ovog izolata (Tabela 10). Veličina početne populacije NV5 ARV je uvećana za 100 (slačica, suncokret) do 1000 puta (pšenica).

Tabela 11. Površinska kolonizacija korena (10^7 CFU g⁻¹ svežeg korena)

Oznaka izolata	Slačica	Pšenica	Crvena detelina	Suncokret	Prosek
NV5 ARV	8,75	15,21	0,70	170,50	48,79
Z-I ARV	12,00	600	0,23	154,00	191,56
2T ARV	8,65	3,00	1,52	13,40	6,64
333 ARV	0,51	7,52	2,04	11,00	5,27
10_ARV	0,67	5,00	2,10	25,00	8,19
D5 ARV	10,30	42,00	17,00	240,00	77,33
P1 ARV	25,00	1000	0,05	260,00	321,26
T10 ARV	9,13	25,00	1,82	132,40	42,09
Prosek	9,38	212,22	3,18	125,79	

Izolat Z-I ARV je kolonizovao površinu korena u broju koji se kretao u opsegu od 10^6 - 10^9 CFU g⁻¹. Najniža brojnost je zabeležena kod crvene deteline, zatim slačice, a najviša na površini korena pšenice i suncokreta. U odnosu na broj ćelija prisutan na semenu, na površini korena je zabeleženo od 10 (suncokret) do 10 000 (pšenica) puta više ćelija Z-I ARV, dok je brojnost zabeležena na korenu crvene deteline slična brojnosti na površini semena. Izolat 2T ARV je na površini korena zastupljen u broju od 10^7 CFU g⁻¹ (slačica, pšenica, crvena detelina) do 10^8 CFU g⁻¹ (suncokret). Veličina početne populacije je kod ovog izolata uvećana za 10 (crvena detelina, suncokret) do 100 (slačica, pšenica) puta. Izolat 333 ARV je najnižu brojnost ispoljio na korenu slačice (10^6 CFU g⁻¹), a najvišu na korenu suncokreta (10^8 CFU g⁻¹), a veličina njegove populacije je uvećana 10 (slačica, crvena detelina) do 100 puta (pšenica, suncokret). Brojnost izolata 10_ARV na korenu slačice i crvene deteline je ostala na nivou brojnosti početne populacije, tj. brojnosti zabeležene na površini semena. Na površini semena pšenice je zabeleženo veće prisustvo ovog izolata u odnosu na površinu korena slačice, a veličina populacije je uvećana 10 puta. Izolat 10_ARV je najveću sposobnost

površinske kolonizacije pokazao na korenu suncokreta (10^8 CFU g⁻¹), gde je brojnost početne populacije uvećana 100 puta. Brojnost ćelija izolata D5 ARV na površini korena slačice, pšenice i crvene deteline je bila reda veličina 10^8 CFU g⁻¹, a na površini korena suncokreta 10^9 CFU g⁻¹. Brojnost ćelija ovog izolata je, dve nedelje po inokulaciji, uvećana za 10 (crvena detelina) do 1000 (slačica) puta.



Slika 12. Suncokret (*Helianthus annuus* L., levo), crvena detelina (*Trifolium pretense* L., sredina) i pšenica (*Triticum vulgare* L., desno) u Hoagland rastvoru

Izolat P1 ARV je pokazao sposobnost kolonizacije korena većine biljaka na kojima je testiran. Takođe je zabeležen i porast brojnosti početne populacije ovog izolata od 10 (suncokret) do 10000 (pšenica) puta. Brojnost izolata P1 ARV je bila manja na korenu crvene deteline u odnosu na brojnost na površini semena. Brojnost izolata T10 ARV se na površini korena kretala od 10^7 - 10^9 CFU g⁻¹, a veličina početne populacije je uvećana za 10 (crvena detelina) do 1000 (pšenica, suncokret) puta.

Najveći broj izolata, šest od testiranih osam, pokazao je najveću brojnost na površini korena suncokreta, što je u saglasnosti sa rezultatima površinske kolonizacije semena (Tabela 10). Pored toga, izolat Z-I ARV i P1 ARV su se istakli prema sposobnosti površinske kolonizacije korena pšenice. Prosečna brojnost izolata na površini korena testiranih biljaka ističe P1 ARV, Z-I ARV, D5 ARV, NV5 ARV i T10 ARV u pogledu sposobnosti površinske kolonizacije korena (Tabela 11).

Dobijeni rezultati pokazuju da je brojnost izolata koji su kolonizovali seme uvećana na površini korena u odnosu na broj ćelija na površini semena što je u skladu sa

literaturnim podacima. Brojnost izolata *P. polymyxa* E681 na površini semena krastavca je iznosila $3,3 \times 10^4$ CFU seme⁻¹ dok je na površini korena iznosila $2,8 \times 10^5$ CFU koren⁻¹. Brojnost istog izolata na površini korena ljute papričice je uvećana 100 puta (1×10^6 CFU koren⁻¹), na semenu i korenu pirinča zabeležena je slična brojnost populacije ($\sim 5 \times 10^4$ CFU), a brojnost populacije na korenu susama je uvećana 100 puta ($1,7 \times 10^5$ CFU koren⁻¹) u odnosu na broj ćelija na površini semena (Choi et al., 2004). Sposobnost kolonizacije površine korena suncokreta su pokazali i izolati *P. fluorescens* PICF7 i *P. fluorescens* PICF7^{Rf}, ali je njihova brojnost od $3,5 \times 10^7$ CFU g⁻¹ svežeg korena (Maldonado-González et al., 2012) bila niža od brojnosti izolata u ovoj studiji.

Kolonizacija korena i opstanak PGPB u rizosferi su neophodni za ispoljavanje stimulativnog efekta na biljni rast i kontrolu bolesti. Dutta et al. (2013) su utvrdili da je sposobnost *B. cereus* da kolonizuje koren duvana dovela do stimulacije rasta biljke, dok inokulacija lešnika istim izolatom nije dovela do kolonizacije korena pa je izostao i efekat na biljni rast. Kolnizacija korena zavisi od brojnih faktora, kao što su osobine izolata, sastav eksudata i abiotički uslovi (Bhattacharyya i Jha, 2012). Korenski eksudati dovode do promena u sastavu proteina ćelijskog zida PGPB (feritin, akril hidroperoksid reduktaza, 2-amino-3-ketobutyrate CoA ligaza) čime olakšavaju kolonizaciju korena (Dutta et al., 2013).

5.7. Endofitna kolonizacije korena PGP izolatima

Jedan od načina zemljišnih bakterija da se izbore za svoje mesto u kompetitivnoj sredini kakva je rizosfera je endofitna kolonizacija biljnih tkiva, u prvom redu tkiva korena (Chanway et al., 2000). Kolonizacijom tkiva se stvara intimna veza između bakterije i biljke pri čemu su bakterije zaštićene od stresova spoljašnje sredine i konkurentnih mikrobnih zajednica (Forchetti et al., 2007). Izolati testirani u ovoj disertaciji su pored sposobnosti da se pričvrste za površinu semena i kolonizuju površinu korena pokazali i sposobnost da prodru i nasele unutrašnja tkiva korena slačice, pšenice, crvene deteline i suncokreta (Tabela 12).

Tabela 12. Endofitna kolonizacija korena (10^3 CFU g⁻¹ svežeg korena)

Oznaka izolata	Slačica	Pšenica	Crvena detelina	Suncokret	Prosek
NV5 ARV	1,22	0,06	0,07	0,18	0,38
Z-I ARV	26,00	26,54	0,01	0,94	13,37
2T ARV	0,50	0,08	1,05	42,50	11,03
333 ARV	7,50	0,11	7,56	11,20	6,59
10_ARV	10,00	0,13	10,00	253,42	68,39
D5 ARV	0,90	0,40	0,10	1,25	0,66
P1 ARV	98,00	0,11	1,50	22,30	30,48
T10 ARV	0,50	13,50	0,03	0,85	3,72
Prosek	18,08	5,12	2,54	41,58	

Endofitni mikroorganizmi se mogu klasifikovati u tri glavne kategorije (Hardoim et al., 2008): obligatni endofiti su oni koji ne mogu da se razvijaju izvan biljaka i verovatno se prenose preko semena; fakultativni endofiti su oni mikroorganizmi koji slobodni žive u zemljištu ali će kolonizirati koren kada se za to ukaže prilika i većina PGPB pripada ovoj grupi; i pasivni endofiti koji neaktivno koloniziraju biljku, odnosno kolonizuju kada dođe do mehaničkog oštećenja korenovih dlaka.

Istraživanja u ovoj disertaciji su ukazala na razlike između testiranih izolata u odnosu na stepen endofitne kolonizacije, kao i da stepen kolonizacije zavisi i od biljne vrste. Najveća endofitna kolonizacija uočena je kod izolata 10_ARV, dok je najmanja kod izolata NV5 ARV (Tabela 12). Ispitivani izolati su endofitno najviše kolonizovali koren suncokreta, a najmanje crvene deteline. Istraživanja Berendsen et al. (2012) su pokazali da sastav korenskih eksudata određuje vrste koje mogu kolonizirati biljku domaćina, odnosno određena jedinjenja u eksudatu deluju kao signalni molekuli (limunska, jabučna, ćilibarna kiselina, benzoksazinoidi). Takođe, razlike u genotipu unutar iste biljne vrsta mogu uticati na endofitnu kolonizaciju (Hardoim et al., 2011).

Broj ćelija izolata NV5 ARV prisutnih u unutrašnjosti korena se kretao od 10^1 - 10^3 CFU g⁻¹. Najslabiju endofitnu kolonizaciju ovaj izolat je pokazao kod pšenice i crvene deteline, dok je u najvećoj meri kolonizovao unutrašnjost slačice. Brojnost izolata Z-I ARV se u unutrašnjosti korena kretala u opsegu od 10^1 - 10^4 CFU g⁻¹. Najveća brojnost je zabeležena u unutrašnjosti korena slačice i pšenice, dok je unutrašnjost korena suncokreta bila slabije kolonizovana iako je ovaj izolat pokazao

izuzetnu sposobnost kolonizacije površine korena suncokreta. Najniža brojnost je zabeležena kod crvene deteline, na čijem korenu je, takođe, zabeleženo najslabije prisustvo ćelija ovog izolata (Tabela 11). Izolat 2T ARV je imao najveću endofitnu kolonizaciju suncokreta (10^4 CFU g⁻¹), a najmanju pšenice. Ovaj izolat je i u testu sposobnosti površinske kolonizacije korena ispolji najveću brojnost na suncokretu. Izolat 333 ARV je pokazao prilično ujednačenu sposobnost kolonizacije korena testiranih vrsta i jedino je nešto niža brojnost zabeležena kod pšenice. Brojnost izolata 10_ARV se u unutrašnjosti korena kretala u opsegu od 10^2 - 10^5 CFU g⁻¹. Najveću brojnost ovaj izolat je imao u unutrašnjosti korena suncokreta. Izolat 10_ARV je kod suncokreta pokazao i najveću sposobnost površinske kolonizacije korena (Tabela 11). Izolat D5 ARV je pokazao ujednačenu sposobnost endofitne kolonizacije korena slačice, pšenice i crvene deteline (10^2 CFU g⁻¹), dok je kod suncokreta njegova brojnost bila veća (10^3 CFU g⁻¹). Isti trend je zabeležen i prilikom utvrđivanja sposobnosti površinske kolonizacije korena (Tabela 11). Izolat P1 ARV je u najmanjoj meri endofitno kolonizovao koren pšenice (10^2 CFU g⁻¹), iako je brojnost ovog izolata na površini korena pšenice bila reda veličina 10^{10} . Najveća brojnost je bila u korenu slačice i suncokreta (10^4 CFU g⁻¹). Iako su analize sposobnosti površinske kolonizacije korena crvene deteline ovim izolatom pokazale najlošije rezultate, ipak je taj broj ćelija bio dovoljan za endofitno kolonizovanje korena i postizanje brojnosti od 10^3 CFU g⁻¹. Izolat T10 ARV je endofitno kolonizovao koren u opsegu od 10^1 - 10^4 CFU g⁻¹. Najniža brojnost je zabeležena u korenu crvene deteline, a najveća u korenu pšenice.

Četiri izolata od testiranih osam (2T ARV, 333 ARV, 10_ARV i D5 ARV) su pokazali najveću brojnost u unutrašnjosti korena suncokreta, što je u saglasnosti sa rezultatima površinske kolonizacije korena (Tabela 11). Pored toga, izolati Z-I ARV, NV5 ARV i P1 ARV su u najvećoj meri endofitno kolonizovali slačicu. Izolat T10 ARV je bio najprisutniji u unutrašnjosti korena pšenice.

Prosečna zastupljenost izolata u unutrašnjosti korena testiranih biljaka ističe 10_ARV, P1 ARV, Z-I ARV, 2T ARV i 333 ARV kao najefikasnije u pogledu endofitne kolonizacije korena (Tabela 12) dve nedelje nakon inokulacije. Kim et al. (2012) su pokazali da bakterije u kratkom vremenskom periodu prodiru u unutrašnjost korena. Tako je *Burkholderia phytofirmans* PsJN kolonizovala koren divljeg prosa za samo tri dana, dok je brojnost nakon sedam dana dostigla red veličina 10^5 CFU. Izolat

10_ARV je ovu brojnost postigao u unutrašnjosti korena suncokreta, nakon dve nedelje i to je najveća zabeležena brojnost jednog izolata u unutrašnjosti korena u ovoj studiji (Tabela 12). *B. amyloliquefaciens* NBRISN13 je osam dana nakon inokulacije dostigao brojnost od 10^4 CFU g⁻¹ u korenu pirinča (Nautiyal et al., 2013). Choi et al. (2004) su zabeležili da se već 20h po inokulaciji formiraju kolonije na epidermisu korenka, a 72h po inokulaciji površina korena i njegova unutrašnja tkiva su kolonizovani sa *P. polymyxa* E681.

Bakterijske ćelije, po dospevanju u koren, putem ksilema naseljavaju više delove biljke, ali je ključna tačka u interakciji biljke sa PGPB endofitama upravo naseljavanje korena (Whipps, 2001). Istraživanja Guo et al. (2002) su pokazala da je dovoljan jedan dan izloženosti korena inokulumu da ćelije dospeju do nadzemnih delova biljke. Izolati *B. amyloliquefaciens* koje su koristili Reva et al. (2004) su pokazali različite sposobnosti kolonizacije korena ječma i uljane repice, četiri dana nakon inokulacije. Brojnost ćelija pojedinih sojeva se kretala od nekoliko ćelija do 10^5 - 10^6 CFU g⁻¹ svežeg korena, a zabeleženi su i izolati koji nisu pokazali sposobnost kolonizacije. Brojnost izolata testiranih u ovoj studiji brojnost je varirala u zavisnosti od biljne vrste. Brojnost pojedinih izolata (NV5 ARV, Z-I ARV, 2T ARV i T10 ARV) kretala se od nekoliko ćelija do 10^4 CFU g⁻¹ (Tabela 12). Sposobnost izolata testiranih u ovoj disertaciji da endofitno kolonizuju koren, izražena kroz njihovu brojnost po gramu svežeg korena, je u skladu sa navedenim literaturnim podacima.

Unutrašnja kolonizacija korena zavisi od brojnih faktora kao što su vrsta bakterijskog izolata, gustine inokuluma, genotipa biljke, faze razvoja biljke i uslova spoljašnje sredine (Rosenblueth i Martínez-Romero, 2006). Kolonizacija zavisi od sposobnosti bakterija stimulatora biljnog rasta da koriste specifične uslove sredine koji vladaju u rizosferi i sposobnosti korišćenja korenskih eksudata i mucigela kao izvora nutrijenata (Compant et al., 2005). Prema Jha et al. (2013) jedan od najvećih izazova u primeni endofitnih PGPB je usklađivanje genotipa, starosti biljke i njenih odbrambenih mehanizama sa odgovarajućom bakterijom. Kolonizacija zavisi i od sezonskih promena i prisustva vode u zemljištu i neophodno je obaviti brojna istraživanja u poljskim uslovima kako bi se postigao maksimalan efekat.

Gustina populacija endofita je obično niža nego što je to slučaj sa patogenim vrstama ili rizosfernim bakterijama (Rosenblueth i Martínez-Romero, 2006). U ovim

istraživanjima je brojnost populacija izolata prisutnih u unutrašnjosti korena, u najvećem broju slučajeva, manja u odnosu na brojnost na površini korena (Tabela 11, 12).

Stepen kolonizacije rizosfere PGPB nije uvek u vezi sa stepenom promocije rasta biljka. Kada PGPB direktno stimulišu rast biljaka stepen kolonizacije nije od presudnog značaja i često je prisustvo manjeg broja ćelija dovoljno za stimulativan uticaj, dok veći broj ćelija može dovesti do inhibicije rasta (Bent et al., 2001). Kada PGPB utiču na suzbijanje biljnih patogena, uglavnom je dobro da njihova brojnost bude što veća (Compant et al., 2005).

Cilj prethodnih istraživanja je bio da se nizom laboratorijskih testova odaberu najefikasniji izolati, odnosno izolati sa najupečatljivijim PGP karakteristikama. Na osnovu ovih kriterijuma izabrana su četiri PGP izolata (Z-I ARV, 10_ARV, D5 ARV i P1 ARV) koja su korišćena u daljem radu (Tabela 13).

Izolat Z-I ARV je pokazao sposobnost produkcije amonijaka, IAA, siderofora i jedan je od izolata koji su pokazali najveću sposobnost solubilizacije neorganskog fosfata. Ovaj izolat je pokazao visok stepen antagonizma prema *B. cinerea*, a istakao se i prema sposobnosti površinske i endofitne kolonizacije korena.

Glavna karakteristika po kojoj se ističe izolat 10_ARV je produkcija IAA. Pored toga, ovaj izolat je pokazao i sposobnost produkcije amonijaka, siderofora i solubilizacije neorganskog fosfata. Iako ne spada među izolate koji su u najvećem broju kolonizovali površinu korena odabranih biljaka, istakao se sposobnošću endofitne kolonizacije korena suncokreta (10^5 CFUg⁻¹).

Izolat D5 ARV produkuje amonijak, IAA i siderofore. Međutim, glavna osobina po kojoj se razlikuje od ostalih je veoma visoka antagonistička aktivnost ispoljena u konfrontacijskom testu sa *B. cinerea*. Iako je njegova antagonistička aktivnost prema *P. aphanidermatum*, prema klasifikaciji Sookchaoy et al. (2009) okarakterisana kao niska, ovaj izolat je pokazao najveći procenat inhibicije u odnosu na ostale testirane izolate. Prema sposobnosti površinske kolonizacije korena, ovaj izolat spada među izolate sa najvećom brojnošću, što nije slučaj sa endofitnom kolonizacijom.

Odabrani izolat P1ARV karakteriše se sposobnošću solubilizacije neorganskog fosfata, produkcije amonijaka, IAA i siderofora. Takođe, poseduje sposobnost inhibicije

B. cinerea i spada među izolate koji se ističu površinskom i endofitnom kolonizacijom korena.

Tabela 13. PGPB karakteristike izolata odabranih za dalja istraživanja

Oznaka izolata		Z-I ARV	10_ARV	D5 ARV	P1 ARV
Produkcija	NH ₃	+	+	+	+
	IAA µg ml ⁻¹	8,4	44,5	1,5	1,2
	Siderofore	+	+	+	+
Rastvorljivost fosfora (SI) %		2,6	2,33	/	2,7
Antagonizam	<i>B. cinerea</i>	61	20	83	50
	<i>P. aphanidermatum</i>	22	10	42	/
Površinska kolonizacija korena (CFU x 10 ⁸)		19,16	0,82	7,73	32,13
Endofitna kolonizacija (CFU x 10 ³)		13,37	68,39	0,66	30,48

5.8. Biohemijska identifikacija izolata

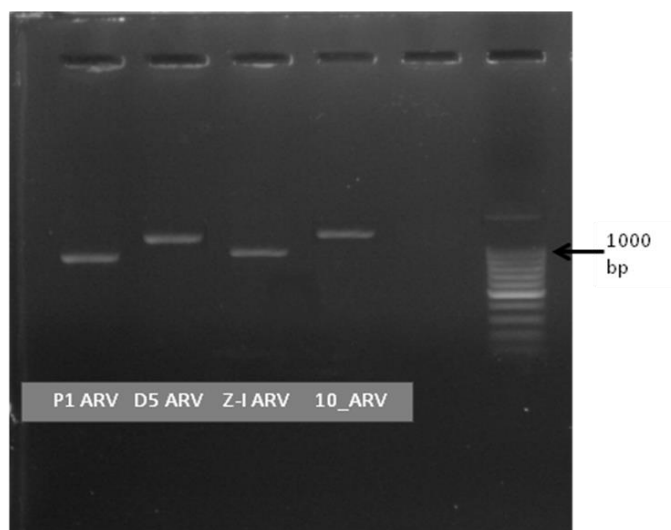
U grupi PGP bakterija nalaze se predstavnici različitih rodova kao što su *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, itd. (Bhattacharyya i Jha, 2012). U cilju određivanja taksonomske pripadnosti ispitivanih bakterijskih izolata izvršena je biohemijska karakterizacija izolata. Važan korak za efikasnu primenu PGPB je biohemijska identifikacija bakterijskih izolata. Biohemijska karakterizacija odabranih izolata i njihova identifikacija je izvršena uz pomoć API20E, API20NE i API50CH.

Nakon obrade u API Web bazi podataka biohemijski profil izolata Z-I ARV se pokazao kao najbliži predstavnicima roda *Serratia* i to *S. liquefaciens* (64,9%) i *S. marcescens* (35%). Ovaj izolat se odlikuje sposobnošću fermentacije glukoze, manitola, inozitola, sorbitola, saharoze, amigdalina i arabinoze. Negativne reakcije su zabeležene u testovima produkcije H₂S, oksidaze i ureaze, fermentacije ramnoze i melibioze i Voges-Proscauer testu. Izolat 10_ARV nakon pretrage baze podataka nije pokazao sličnost ni sa jednim izolatom. Osnovne karakteristike ovog izolata dobijene na osnovu

API20NE su: produkcija ureaze, proteaze, β -galaktozidaze, asimilacija glukoze, arabinoze, manoze, manitola, maltoze i malata. Negativne reakcije su zabeležene u testovima redukcije nitrata do nitrita, nitrata do azota, fermentacije glukoze i hidrolize eskulina. Biohemijski profil izolata D5 ARV je pokazao najviši stepen sličnosti sa *Bacillus amyloliquefaciens* (78,2%). Osnovne biohemijske osobine izolata su sposobnost fermentacije glukoze, fruktoze, manoze, celobioze, maltoze, inulina, d-rafinoze, d-turanoze, d-fukoza, l-fukoza, d-arabitola i l-arabitola. Negativne reakcije su zabeležene u testovima sa amigdalinom, eskulinom, melibiozom, saharozom, trehalozom, skrobom, glikogenom i ksilitolom. Izolat P1 ARV je pokazao najveću sličnost sa *Pseudomonas putida* biohemijskim profilom sa 99,5% podudarnosti. Ovaj izolat je pokazao sposobnost asimilacije glukoze, arabinoze, manoze, malate i produkcije arginin dihidrolaze. Izolat nije pokazao sposobnost redukcije nitrata do nitrita, nitrata do azota, fermentacije glukoze, hidrolize eskulina, produkcije ureaze, proteaze, β -galaktozidaze, kao ni asimilacije manitola.

5.9. Molekularna identifikacija izolata

Molekularne metode identifikacije su primenjene radi preciznije identifikacije odabranih bakterijskih izolata. Pored jednostavnosti i brzine, prednost molekularnih metoda je i u mogućnosti razlikovanja biohemijski veoma sličnih izolata. Metoda lančane reakcije polimeraze praćena sekvencioniranjem dobijenih produkata i poređenjem obrađenih sekvenci sa sekvencama u GenBank bazi podataka uspešno je primenjena u identifikaciji ispitivanih izolata. Nakon ekstrakcije DNK primenjena je amplifikacija sekvence *gyr B* gena. Ovaj gen kodira podjedinicu B proteina DNA giraze, tip II DNK topoizomerase. DNK giraza je nepohodna za DNK replikaciju i jedan je od univerzalnih bakterijskih enzima (Yamamoto i Harayama, 1995). Sekvenca ovog gena je korišćena u filogenetskim studijama *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Serratia* i *Ensifer* sp. (Van Houdt et al., 2005; Martens et al., 2007; Wang et al., 2007). Uz primenu odgovarajućih prajmera dobijena su četiri produkta (Slika 13) koja su sekvencionirana.



Slika 13. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera UP-1E gyrB/APrU gyrB (izolat P1 ARV, kolona 1), UP-1EgyrB/modUP2r (izolat D5 ARV, kolona 2), gyr-320/rgyr-1260 (izolat Z-I ARV, kolna 3), UP-1EgyrB/ modUP2r (izolat 10_ARV, kolona 4) i negativna kontrola (PCR smeša sa RNase-free vodom, kolona 5)

Konsenzus sekvence su deponovane u bazu podataka i dodeljeni su im pristupni brojevi (Tabela 14).

Tabela 14. GenBank pristupni brojevi odabranih PGPB izolata

Oznaka izolata	Vrsta	GenBank pristupni broj
Z-I ARV	<i>Serratia liquefaciens</i>	KT265088
10_ARV	<i>Ensifer adhaerens</i>	KT265086
D5 ARV	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KT265087
P1 ARV	<i>Pseudomonas putida</i>	KT265089

Elektroforetska analiza produkata dobijenih nakon amplifikacije sekvence *gyr B* gena pokazala je da su dobijeni fragmenti očekivane dužine od oko 1000 bp (*Serratia* sp., *Pseudomonas* sp.) i 1300 bp (*Ensifer* sp., *Bacillus* sp.). Reakcija je bila bez nespecifičnih bendova.

BLAST analiza sekvence izolata Z-I ARV dužine 911 bp pokazala je da izolat ima 99% i 100% nukleotidne identičnosti sa četiri izolata *Serratia liquefaciens*. Izolat Z-I ARV je izolovan iz deposola I koji je kontaminiran organskim zagađivačima (PAH, PCB, organokalajna jedinjenja), dok su izolati sa kojima je pokazao najveći stepen

sličnosti klinički izolati (CP011303.1, CP014017.1) i ATCC sojevi (CP006252.1, AJ300537.1). *Serratia* sp. spada u klasu *Gammaproteobacteria*, red *Enterobacteriales* čiji predstavnici su poznati kao PGPB od kojih su neki i u komercijalnoj upotrebi (Glick, 2012). Predstavnici ovog roda se odlikuju sposobnošću solubilizacije neorganskih fosfata, produkcije IAA, siderofora (Melo et al., 2011; Singh i Prakash, 2012), što su osobine ispoljene i od strane izolata Z-I ARV (Tabela 13). Predstavnici ovog roda proizvode ACC deaminazu i HCN (Ahemad i Kibret 2014), mada te osobine nisu zabeležene kod izolata korišćenog u ovoj studiji. *Serratia liquefaciens* je već okarakterisana kao efikasan biokontrolni agens (Sharma et al., 2014), a Z-I ARV soj je pokazao umerenu antagonističku aktivnost prema *B. cinerea* (Tabela 8) i sposobnost površinske i endofitne kolonizacije slačice, pšenice, crvene deteline i suncokreta (Tabela 12). Čelije *Serratia* sp. su pronađene i u tkivima pirinča (Rosenblueth i Martínez-Romero, 2006).

BLAST analiza sekvence izolata 10_ ARV, dužine 1073 bp pokazala je da izolat 10_ ARV ima najviši stepen nukleotidne identičnosti od 94% i 100% pokrivenosti sa jednim izolatom vrste *Ensifer adhaerens*. Izolat 10_ ARV je izolovan iz deposola I opterećenog visokim sadržajem organskih zagađivača. Izolat *Ensifer adhaerens* OV14, sa kojim je izolat 10_ ARV pokazao najviši stepen sličnosti je izolovan iz rizosfere krompira i uljane repice (Wendt et al., 2012). Rod *Ensifer* pripada fam. *Rhizobiaceae*, redu *Rhizobiales* i klasi *Alphaproteobacteria* i čine ga azotofiksatori koji stupaju u simbiotsku vezu sa leguminoznim biljkama (Martens et al., 2008). Ovaj rod se često u literaturi nalazi pod imenom *Sinorhizobium* (Martens et al., 2007). Ipak, prema odluci Internacionalnog komiteta za sistematiku prokariota *Ensifer* je pravilniji naziv (Young, 2010). Ova vrsta je opisana i kao predator Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija. *Ensifer adhaerens* nije obligatni parazit i lizu ćelija domaćina izaziva u medijumima niske nutritivne vrednosti pri pH od 6 do 6,5 (Casida, 1982). U poslednje vreme, ova vrsta je privukla pažnju otkrivanjem njenog potencijala u tehnologijama genetskih transformacija biljaka (Wendt et al., 2012; Rudder et al., 2014). *Ensifer adhaerens* je rizobakterija koja poseduje sposobnost transformacije krompira, duvana i *Arabidopsis* sp. (Rudder et al., 2014). U našim istraživanjima ova vrsta se istakla produkcijom od 44,5 µg ml⁻¹ IAA (Tabela 7). Ova osobina *Ensifer adhaerens* je već zabeležena u literaturi. Kim et al. (2011) su opisali soj koji je imao sposobnost produkcije 35,25 µg

ml⁻¹ IAA. Sposobnost *E. adhaerens* da podukuje auksin je potvrđena i od strane Kaur et al. (2014). Pored produkcije auksina, izolat korišćen u našim istraživanjima je pokazao i sposobnost produkcije amonijaka, siderofora i solubilizacije fosfata, što su osobine navedene i u literaturi (Kaur et al., 2014). Ovaj izolat je pokazao i sposobnost površinske i endofitne kolonizacije slačice, pšenice, crvene deteline, suncokreta (Tabela 11, 12). *E. adhaerens* naseljava koren pirinča a predstavnici roda *Ensifer* sp. su poznati kao stanovnici nodula leguminoza (Zhang et al., 2010; Xu et al., 2014).

BLAST analiza sekvence izolata D5 ARV dužine 1003 bp pokazala je da izolat ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (100%) i pokrivenosti (100%) sa tri izolata *Bacillus amyloliquefaciens*. Izolat D5 ARV je izolovan iz deposola II. Izolati *B. amyloliquefaciens* sa kojima je pokazao najviši stepen sličnosti potiču iz zemljišta (KF194283.1, HG328254.1, HM585075.1). *B. amyloliquefaciens* se odlikuje produkcijom IAA, giberelina, ACC deaminaze, pitaza, siderofora i sposobnošću solubilizacije neorganskih fosfata (Reva et al., 2004; Nautiyal et al., 2013; Sharma et al., 2013). Izolat D5 ARV je pokazao sposobnost produkcije amonijaka, IAA (1,5 µg ml⁻¹) i siderofora (Tabela 7), ali ne i sposobnost solubilizacije neorganskih fosfata. *B. amyloliquefaciens* je poznat kao efikasan biokontrolni agens, inhibitor *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfii*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum truncatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Colletotrichum musae* i *Fusarium verticillioides* (Whiteman i Stewart, 1998; Abdullah et al., 2008; Alvindia i Natsuaki, 2009; Ahlem et al., 2012; Sharma et al., 2013). Njegov antagonistički potencijal je potvrđen i ovom studijom u kojoj je izolat D5 ARV, pokazao veoma visoku antagonističku aktivnost protiv *B. cinerea* inhibirajući njegov rast za 83% (Tabela 8). D5 ARV se pokazao kao efikasniji od devet izolata *B. amyloliquefaciens* tkoje su testirali Ahlem et al. (2012). *B. amyloliquefaciens* D5 ARV je pokazao i sposobnost površinske i endofitne kolonizacije slačice, pšenice, crvene dateline i suncokreta (Tabela 12, 13). Čelije *Bacillus* sp. su pronađene u tkivima citrusa, šargarepe i kukuruza (Rosenblueth i Martínez-Romero, 2006).

BLAST analiza sekvence izolata P1 ARV dužine 856 bp pokazala je da izolat ima najviši stepen nukleotidne identičnosti 98% i 100% pokrivenosti sa četiri izolata *Pseudomonas putida*, dva izolata *Pseudomonas monteilii* i jednim izolatom *Pseudomonas plecoglossicida*. Izolat P1 ARV je izolovan iz deposola I, kontaminiranog

organskim zagađivačima, a izolati sa kojima je naš izolat pokazao najviši stepen sličnosti potiču iz zemljišta (KC189956.1, CP002870.1, D86005.1, CP010359.1) i zemljišta zagađenog metil-parationom (CP007620.1) i motornim uljima (CP006979.1, CP006978.1). Navedene vrste roda *Pseudomonas* su okarakterisane kao veoma slične, a razliku među njima je moguće napraviti na osnovu pojedinih ekoloških i biohemijskih karakteristika. Izolat P1 ARV je pokazao sposobnost rasta na 4°C što je odlika koju poseduje *P. putida*, dok *P. monteilii* i *P. plecoglossicida* ne poseduju tu osobinu (Nishimori et al., 2000; Dabboussi et al., 2002). Sposobnosti korišćenja D-manoze, kao izvora ugljenika, i aktivnost arilamidaze su osobine koje odlikuju *P. putida* (Dabboussi et al., 2002; Ocampo-Sosa et al., 2015). Ove osobine predstavljaju razliku između *P. putida* i *P. monteilii*. Biohemijska karakterizacija P1 ARV uz pomoć API 20NE i API ZYM kita pokazuje da ovaj izolat poseduje sposobnosti korišćenja D-manoze i produkcije arilamidaze. Sposobnost asimilacije L-arabinoze i D-manoze je karakteristika *P. putida* i predstavlja razliku između ovog soja i *P. plecoglossicida* (Nishimori et al., 2000). Rezultati API 20NE testa pokazuju da izolat P1 ARV poseduje sposobnost asimilacije L-arabinoze i D-manoze.

Utvrđene biohemijske karakteristike izolata P1 ARV uz rezultate molekularne identifikacije omogućavaju njegovu pouzdanu identifikaciju kao *P. putida*. *Pseudomonas* vrste spadaju u najznačajnije predstavnike PGPB grupe i njihove osobine su dobro ispitane (Patten i Glick, 2002; Meziane et al., 2005; Jha et al., 2009; Bhardwaj et al., 2014). *P. putida* je poznat kao PGPB soj sposoban da produkuje IAA, ACC deaminazu, siderofore, amonijak, da solubilizuje fosfate (Patten i Glick, 2002; Ahemad i Kibret, 2014). Sposobnost produkcije IAA i siderofora je zabeležena i kod izolata korišćenog u ovoj disertaciji (Tabela 7). Izolat P1 ARV nije pokazao sposobnost produkcije ACC deaminaze, ali se u odnosu na ostale izolate testirane u okviru ove studije pokazao najveću sposobnost solubilizacije fosfata. *P. putida* je značajan i u biokontroli biljnih patogena (Cawoy et al., 2015), a kao glavni mehanizmi njegovog delovanja navode se sposobnost produkcije siderofora i aktiviranje IRS (Meziane et al., 2005). Izolat korišćen u studiji okarakterisan je kao izolat slabe antagonističke aktivnosti prema *B. cinerea* (Tabela 8). Predstavnici ove vrste mogu da koloniziraju površinu korena biljaka, što je utvrđeno i kod izolata testiranog u ovoj studiji (Tabela 12). Izolat P1 ARV je pokazao sposobnost kolonizacije unutrašnjosti korena slačice,

pšenice, crvene deteline i suncokreta (Tabela 13). Čelije *P. putida* su pronađene i tkivima šargarepe i crnog bibera (Surette et al., 2003; Sheoran et al., 2015).

5.10. Ekološke osobine izolata

Razumevanje faktora životne sredine koji regulišu PGP aktivnosti bakterija je ključno za njihovu što efikasniju praktičnu primenu. Zbog toga je cilj ove faze disertacije ispitivanje odnosa odabranih izolata prema ekološkim faktorima. Uticaj sredine je praćen kroz utvrđivanje odnosa prema temperaturi, pH vrednosti sredine, sadržaju NaCl i sadržaju teških metala. Naime, na bakterije stimulare biljnog rasta, njihov odnos sa biljkama i krajnji efekat tog odnosa, u velikoj meri utiču faktori spoljašnje sredine. Različiti rezultati dobijeni u laboratoriji, stakleniku i nakon primene PGPB u prirodnim uslovima mogu se objasniti uticajem faktora spoljašnje sredine (Husen et al., 2011).

5.10.1. Rast izolata pri različitim temperaturama

Istraživanja su pokazala da između ispitivanih izolata u pogledu odnosa prema temperaturi postoje određene razlike (Tabela 15). Od testirana četiri, tri izolata (*S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV) su pokazala rast na temperaturama do 40°C. Izolat *B. amyloliquefaciens* D5 ARV, poreklom iz deposola II, pokazao je sposobnost rasta na temperaturi od 55°C. Ovaj izolat je pokazao rast na višoj temperaturi od *B. amyloliquefaciens* sks_bnj_1 čija je maksimalna temperatura rasta iznosila 45°C (Sharma et al., 2013). Jedan od bakterijskih rodova sa psihrofilnim vrstama je *Pseudomonas* (Raičević et al., 2010), rod kome pripada i izolat P1 ARV kod kog je 35°C bila maksimalna temperatura rasta. *E. adhaerens* 10_ARV je rastao na nešto nižoj temperaturi u odnosu na *E. arboris* koji raste do 43°C (Reeve et al., 2014).

Tabela 15. Rast PGPB izolata pri različitim temperaturama

Oznaka izolata	T (°C)							
	4	10	30	35	40	45	55	60
<i>S. liquefaciens</i> Z-I ARV	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. adhaerens</i> 10_ARV	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> D5 ARV	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. putida</i> P1 ARV	+	+	+	+	-	-	-	-

Široka ekološka valenca u odnosu na temperaturu je od velikog značaja za primenu bakterija u poljskim uslovima. Neke PGP osobine izolata su pod uticajem temperature. Jedna od njih je antagonizma prema biljnim patogenima, su zavisne od temperature. Ahlem et al. (2012) su u *in vitro* ogledima sa nekoliko izolata *B. amyloliquefaciens* i *B. cinerea* uočili da različiti izolati iste vrste postižu maksimalnu inhibiciju patogena pri različitim temperaturama. Za najveći broj izolata to je temperatura od 25°C.

Pored uticaja na PGP osobine, sposobnost tolerancije visokih temperatura ukazuje i na potencijal za biotehnoške aplikacije, označavajući ovakve izolate kao izvore termostabilnih enzima i drugih proizvoda interesantnih za industriju (Garbeva et al., 2003).

5.10.2. Rast izolata pri različitim pH vrednostima sredine

Bakterije spadaju u neutrofilne mikroorganizme, ali se, takođe, odlikuju i velikom sposobnošću prilagođavanja promenama pH vrednosti sredine. Vrednosti pH od 5 do 9 su odgovarale svim testiranim izolatima (Tabela 16). Minimalna pH vrednost pri kojoj je zabeležen bakterijski rast iznosila je 4 i to je karakteristika izolata iz deposola I *S. liquefaciens* Z-I ARV. Sposobnost rasta na 10,5 pokazali su samo izolati iz deposola I, *S. liquefaciens* Z-I ARV i *E. adhaerens* 10_ARV.

Tabela 16. Rast PGPB izolata pri različitim pH vrednostima

Oznaka izolata	pH												
	3,5	4	4,5	5	5,5	6	8	8,5	9	9,5	10	10,5	11
<i>S. liquefaciens</i> Z-I ARV	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>E. adhaerens</i> 10_ARV	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> D5 ARV	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>P. putida</i> P1 ARV	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Značaj utvrđivanja pH vrednosti sredine ogleda se kroz sposobnost PGPB da u različitoj meri ispolje direktne i indirektne mehanizme. Kisela reakcija sredine se negativno odražava na produkciju indol-3-sirćetne kiseline (Mohite, 2013). Ahlem et al. (2012) su zabeležili da izolat *B. amyloliquefaciens* pokazuje veći stepen inhibicije *B. cinerea* u neutralnoj i baznoj sredini, dok je pri kiseljoj reakciji sredine učinak biokontrolnog agensa bio manje efikasan.

Pored uticaja na ispoljavanje PGP mehanizama, veći opseg temperatura i pH vrednosti značajan i sa aspekta preživljavanja PGPB nakon inokulacije biljaka.

5.10.3. Rast izolata pri različitim koncentracijama NaCl

Značaj PGPB izolata sposobnih da se prilagode visokom sadržaju soli u zemljištu ogleda se kroz prizmu jednog od najvećih problema savremene poljoprivrede, a to je zaslanjivanje plodnih površina. PGPB koje u ovakvim uslovima ispoljavaju stimulatívno dejstvo mogu umanjiti efekte stresa koji po biljke izaziva povećan sadržaj soli (Qurashi i Nasim Sabri, 2012).

Odabrani izolati su pokazali da tolerišu 3% NaCl, dok sa povećanjem saliniteta opada i broj sojeva prilagođenih na ovaj stres (Tabela 17).

Tabela 17. Rast PGPB izolata pri različitim koncentracijama NaCl

Oznaka izolata	NaCl %		
	3	5	7
<i>S. liquefaciens</i> Z-I ARV	+	-	-
<i>E. adhaerens</i> 10_ARV	+	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> D5 ARV	+	+	-
<i>P. putida</i> P1 ARV	+	-	-

Jedini izolat koji je bio tolerantan na prisustvo 5% NaCl je *B. amyloliquefaciens* D5 ARV, izolat iz deposola II. Ovaj izolat je pokazao nižu toleranciju na prisustvo soli od *B. amyloliquefaciens* sks_bnj_1 koji je rastao pri koncentraciji od 10% (Sharma et al., 2013) i *B. amyloliquefaciens* NBRISN13 koji toleriše do 12% NaCl (Nautiyal et al., 2013).

Vrste roda *Ensifer* ne podnose koncentracije soli veće od 4% (Balkwil, 2006), dok pojedini predstavnici *P. putida* toleriše i 5% NaCl (Egamberdieva et al., 2015). Literaturni podaci ukazuju da neki izolati *Serratia* roda mogu rasti i pri 10% (Mendpara et al., 2013), što nije bio slučaj sa sojem ispitivanim u ovoj disertaciji.

Salinitet je jedan od faktora koji limitira rast i produktivnost biljaka usled otežanog usvajanja vode. Povećan sadržaj soli u zemljišnom rastvoru dovodi do pojave belih površina na vrhovima listova, slabijeg rasta korena i zakržljalosti cele biljke (Sen i Chandrasekhar, 2014) i izaziva toksične efekte usled nagomilavanja soli u biljnim tkivima (Rojas-Tapias et al., 2012). U novije vreme, metode molekularne manipulacije se uključuju u rešavanje problema povećanja saliniteta plodnog zemljišta kroz razvoj useva tolerantnih na NaCl (Nautiyal et al., 2013). Upotreba PGPB je takođe jedan od načina za ublažavanje efekata abiotičkih stresova (Dimkpa et al., 2009). Smatra se da je više od 800 miliona hektara širom sveta ugroženo porastom saliniteta (Munns i Tester, 2008). Visok sadržaj soli izaziva kod bakterija povećanu ekskreciju šećera i amino kiselina koji im pomažu da prežive ekstremno osmotski stres (Parida i Das, 2005). Inokulacija biljaka PGP bakterijama koje proizvode egzopolisaharide dovodi do smanjenja usvajanja soli i stimulacije rasta (Haggag et al., 2014). Stimulacija rasta korena i efektivne površine korena inokulacijom PGPB povećava usvajanje vode i nutrijenata. Shilev et al. (2012) su zabeležili pozitivan uticaj izolata *P. fluorescens* F i CECT 378 na prinos sveže biomase suncokreta (porast od 10%) u uslovima stresa

izazvanog prisustvom soli (0,6% NaCl). Nautiyal et al. (2013) su pokazali da izolat *B. amyloliquefaciens* NBRISN13 stimuliše rast i povećava toleranciju pirinča gajenog u hranljivom rastvoru i zemljištu na stres soli (1,2% NaCl). Slični rezultati su dobijeni sa *Azotospirillum* sp. i kukuruzom (Hamdia et al., 2004). Izolati *Azotobacter chroococcum* C5 i C9 koji su pokazali toleranciju 5,85% NaCl imali su sposobnost da utiču na rast kukuruza u uslovima povećane koncentracije soli (Rojas-Tapias et al., 2012).

B. amyloliquefaciens NBRISN13 je nakon deset dana rasta u uslovima povećane koncentracije NaCl (200 mM) ima sposobnost da utiče na povećanje dužine korena (3,2%), stabla (15,4%) i suve biomase biljke (11,7%) u odnosu na kontrolne, neinokulisane biljke (Nautiyal et al., 2013). Sadržaj soli je negativno uticao na rast biljke, ali je taj uticaj ublažen u prisustvu ovog izolata. Egamberd (2015) je zabeležio sposobnost IAA produkujućih *Pseudomonas putida* R4 i *Pseudomonas chlororaphis* R5 da smanje negativne efekte povišene koncentracije NaCl na klijance pamuka, njihovu visinu, dužinu korena i svežu biomasu.

5.10.4. Rast izolata pri različitim koncentracijama teških metala

Teški metali u visokim koncentracijama ispoljavaju toksičan efekat na celokupan živi svet. Prirodni izvor teških metala u zemljištu je matični supstrat. Pored prirodnih postoje i antropogeni izvori koji su vezani za razne ljudske delatnosti (rudarstvo, energetika i industrija). Jedna od posledica zavisnosti savremene poljoprivrede od unosa mineralnih đubriva i hemijskih sredstava je povećan sadržaj teških metala u zemljištu. Zagađenje zemljišta bakrom, olovom, cinkom i živom je često povezano sa upotrebom pesticida, dok se kroz mineralna đubriva unose kadmijum, živa i olovo (Wuana i Okieimen, 2011). Kompost, komunalni otpadni mulj, pa i stajnjak, takođe, mogu biti izvori kadmijuma, hroma, bakra, olova i žive (Wuana i Okieimen, 2011). Zemljišta opterećena visokim sadržajem teških metala nisu bezbedna za proizvodnju hrane i zahtevaju sanaciju. Proučavanjem osobina PGPB uočeno je da pored uticaja na ishranu i hormonski status biljke ove bakterije mogu promeniti i biodostupnost teških metala, uticati na promene metabolizma biljnih ćelija i povećati njihovu toleranciju na stres izazvan povećanom koncentracijom teških metala (Koo i Cho, 2009; Gamalero i Glick, 2011; Hansda et al., 2014). PGPB u uslovima kada je

zemljište kontaminirano teškim metalima zadržavaju sposobnost stimulacije biljnog rasta (Ma et al., 2011; Hao et al., 2012) i neretko povećavaju akumulaciju metala u biljnim tkivima pospešujući fitoremedijaciju (Fan et al., 2011).

U cilju bolje karakterizacije odabranih izolata i utvrđivanja njihove potencijalne primene u sredinama sa visokim sadržajem metala utvrđena je njihova otpornost na bakar, hrom i kadmijum, jedne od najznačajnijih zagađivača u prirodi (Ali i Vidhale, 2013). Za primenu PGPB u bioremedijacionim tehnologijama, jedan od važnih koraka je identifikacija mikroorganizama koji mogu preživeti u uslovima visoke koncentracije teških metala (Huang et al., 2016).

Sva četiri testirana izolata su pokazala sposobnost preživljavanja pri 0,15-10 mM Cu²⁺ (Tabela 18). Iako ne postoji koncentracija teških metala koja predstavlja granicu između rezistentnih i nerezistentnih sojeva, izolati koji su zadržali sposobnost rasta pri 1 mM bakra se mogu smatrati otpornim (Ceylan i Uğur, 2012). Svi testirani izolati mogu se označiti kao rezistentni na visoke koncentracije bakra.

Tabela 18. Rast PGPB izolata pri različitim koncentracijama bakra

Oznaka izolata	Koncentracija Cu ²⁺ (mM)							
	0,15	0,3	0,6	1,25	2,5	5	10	20
<i>S. liquefaciens</i> Z-I ARV	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>E. adhaerens</i> 10_ARV	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B.amyloliquefaciens</i> D5 ARV	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. putida</i> P1 ARV	+	+	+	+	+	+	+	-

Izolat *S. liquefaciens* Z-I ARV, poreklom iz deposola I, se pokazao kao otporniji na bakar od sojeva *Serratia* sp. koje su testirali Sarma et al. (2013), a koji vode poreklo iz sedimenta uzorkovanog iz rudnika uranijuma. U ovom slučaju, minimalna inhibitorna koncentracija najefikasnijih izolata, *S. marcescens* subsp. *sakuensis* DB-11 i DB-15 je iznosila 5 mM Cu²⁺. Ovaj rezultat je utoliko interesantniji jer rezistentnost na teške metale nije uobičajena osobina predstavnika fam. *Enterobacteriaceae* (Campos et al., 2013).

Sinorhizobium meliloti CCNWSX0020 je tolerantan na 1,4 mM bakra i prisustvo izolata je dovelo do povećanja biomase *Medicago lupulina* za 78,2% u prisustvu 100 mg kg⁻¹ bakra, povećavajući količinu akumuliranog bakra za 39,3% (Fan et al., 2011).

E. adhaerens 10_ARV, testiran u ovoj disertaciji, pokazao je sposobnost tolerancije znatno većih koncentracija bakra.

Izolat *B. amyloliquefaciens* je efikasniji od *B. licheniformis* KT87, izolovanog iz zemljišta rudnika magnetita, koji je pokazao sposobnost tolerancije 4 mM Cu²⁺ (Yu et al., 2014). Niazi et al. (2014) su zabeležili tolerantnost zemljišnog izolata *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5113 prema 10 mM bakra, što je nivo tolerantnosti koji je zabeležen i u ovoj studiji.

Najveća koncentracija bakra koju su tolerisali izolati *P. putida* opisani od strane Ceylan i Uğur (2012) je bila 1 mM Cu²⁺ dok je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) našeg izolata iznosila 5 mM Cu²⁺. Da PGPB mogu ispoljiti sposobnost stimulacije rasta biljaka pri povišenom sadržaju teških metala potvrđuju ogledi sa *Pseudomonas* sp. PsM6. Ovaj izolat je povećao težinu nadzemnog dela *Ricinus communis* za 15% i težinu korena za 18% uz istovremeni porast sadržaja bakra u tkivima biljke pri koncentraciji od 2,63 mM bakra (Rajkumar i Freitas, 2008). Izolati korišćeni u ovoj studiji su tolerisali znatno veće koncentracije bakra.

Prema Uredbi o programu sistemskog praćenja kvaliteta zemljišta, indikatorima za ocenu rizika od degradacije zemljišta i metodologiji za izradu remedijacionih programa (Sl. glasnik RS, br. 88/2010) granična vrednost bakra je 36 mg kg⁻¹ (0,6 mM) apsolutno suve materije, a remedijaciona 190 mg kg⁻¹ (3 mM). Izolati testirani u ovoj studiji su pokazali sposobnost tolerancije znatno većih koncentracija bakra što ukazuje da je moguća njihova primena u fitoremedijacionim i bioremedijacionim aktivnostima na supstratima kontaminiranim bakrom.

Ispitivani izolati su pokazali veću osetljivost na povišene koncentracije hroma (Tabela 19). Sva četiri testirana izolata su pokazala sposobnost rasta pri 0,15-0,3 mM Cr⁶⁺.

Tabela 19. Rast PGPB izolata pri različitim koncentracijama hroma

Oznaka izolata	Koncentracija Cr ⁶⁺ (mM)				
	0,15	0,3	0,6	1,25	2,5
<i>S. liquefaciens</i> Z-I ARV	+	+	+	-	-
<i>E. adhaerens</i> 10_ARV	+	+	+	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> D5 ARV	+	+	-	-	-
<i>P. putida</i> P1 ARV	+	+	+	+	-

Izolati iz deposola I, *S. liquefaciens* Z-I ARV i *E. adhaerens* 10_ARV su pokazali sposobnost rasta pri koncentracijama hroma od 0,15-0,6 mM. Ovo je znatno niža koncentracija od one koju su zabeležili Campos et al. (2013) koji su prilikom ispitivanja efikasnosti redukcije hroma od strane *S. marcescens* pokazali da ovaj izolat toleriše 2 mM Cr⁶⁺.

B. amyloliquefaciens D5 ARV se pokazao kao najosetljiviji sa MIC od 0,3 mM Cr⁶⁺. Kamala-Kannan i Lee (2008) su zabeležili nekoliko izolata *Bacillus* roda izolovanih iz sedimenta Sunčon zaliva (Južna Koreja) koji su tolerisali sadržaj Cr⁶⁺ do 1 mM (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*).

Prema tvrdnjama Ceylan i Uğur (2012) izolati koji rastu pri koncentraciji Cr⁶⁺ od 1 mM i većim se smatraju rezistentnim. U našem slučaju, samo *P. putida* P1 ARV je zadržao sposobnost rasta pri 1,25 mM Cr⁶⁺. *P. putida* sojevi opisani od strane ovih autori su tolerisali do 0,5 mM Cr⁶⁺, a kao najotporniji se pokazao *P. struzeri* čija MIC je iznosila 1 mM Cr⁶⁺. Izolati rezistentni na visoke koncentracije hroma mogu imati sposobnost njegove redukcije, a time i primenu u bioremedijaciji zemljišta i voda (Campos et al., 2013).

Prema Uredbi granična vrednost hroma u zemljištu iznosi 100 mg kg⁻¹ (2 mM), a remedijaciona 380 mg kg⁻¹ (7 mM). Rast izolata testiranih u ovoj studiji je inhibiran znatno nižim koncentracijama Cr⁶⁺ što sugerije da oni nisu adekvatan izbor za inokulaciju biljaka gajenih na ovakvim zemljištima.

Kadmijum je jedan od glavnih zagađivača životne sredine i toksičan je za biljke, životinje i ljude i jedan je od 126 prioritetnih zagađivača proglašanih od strane SAD-EPA. Ispitivanje sposobnosti tolerancije različitih koncentracija kadmijuma u hranljivom medijumu pokazalo je da *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV i *P. putida* P1 ARV tolerišu 5 mM Cd²⁺ (Tabela 20).

Tabela 20. Rast PGPB izolata pri različitim koncentracijama kadmijuma

Oznaka izolata	Koncentracija Cd ²⁺ (mM)						
	0,1	0,3	0,6	1,2	2,5	5	10
<i>S. liquefaciens</i> Z-I ARV	+	+	+	+	+	+	-
<i>E. adhaerens</i> 10_ARV	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> D5 ARV	+	+	-	-	-	-	-
<i>P. putida</i> P1 ARV	+	+	+	+	+	+	-

S. liquefaciens Z-I ARV je pokazala sposobnost preživljavanja pri 5 mM Cd^{2+} dok su Sharma et al. (2013) zabeležili sposobnost *S. marcescens* subsp. *sakuensis* DB-11 i *S. marcescens* subsp. *sakuensis* DB-15 da tolerišu 2 mM Cd^{2+} .

Izolat *B. amyloliquefaciens* D5 ARV se pokazao kao najosetljiviji sa MIC 0,3 mM Cd^{2+} za razliku od *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5113 koji je pokazao tolerantnost prema 10 mM Cd^{2+} (Niazi et al., 2014).

Uredba propisuje graničnu vrednost kadmijuma u zemljištu od 0,8 mg kg^{-1} (0,007 mM), a remedijaciona 12 mg kg^{-1} (0,01 mM). Izolati korišćeni u ovoj studiji su pokazali sposobnost tolerancije viših koncentracija kadmijuma čime imaju potencijal za remedijacione aktivnosti.

Praktični značaj ovakvih osobina PGPB se ogleda kroz njihovu sposobnost da zadrže stimulativno dejstvo na rast biljaka i umanje negativne posledice stresa izazvanog prisustvom zagađivača. Brojni literaturni navodi potvrđuju da PGPB zadržavaju sposobnost stimulacije rasta biljaka u uslovima kontaminacije teškim metalima (Koo i Cho, 2009; Hao et al., 2012; Hansda et al., 2014). U tom smislu predstavnici rodova *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mesorhizobium* i *Ensifer* su poznati kao značajni akteri u fitoremedijaciji zemljišta zagađenih hromom, niklom, živom i bakrom (Di Gregorio et al., 2006; Hansda et al., 2014).

Ma et al. (2009) su zabeležili povećanje biomase *Brassica juncea* za 15,45% i *Brassica oxyrrhina* za 17,5% u uslovima povećane koncentracije nikla nakon inokulacije sa *Pseudomonas* sp. SRS 8. Ovaj izolat je pokazao sposobnost tolerancije 7,8 mM nikla. Takođe, Koo i Cho (2009) ističu potencijal *Serratia* sp. SY5, poreklom iz zemljišta zagađenog naftom i teškim metalima, za povećanje efikasnosti fitoremedijacionih procesa. Pored toga što je ovaj soj uticao na povećanje rasta kukuruza u uslovima bez kontaminacije, izolat *Serratia* sp. SY5 je tu sposobnost zadržao i u uslovima kontaminacije kadmijumom pri tome značajno povećavši biomasu korena kukuruza. Izolat *A. tumefaciens* CCNWGS0286 kod kog su MIC za Cu^{2+} , Cd^{2+} i Cr^{6+} iznosile 2,8 mM, 0,5 mM i 1,6 mM je u prisustvu 9 mM cinka značajno stimulisao rast *Robinia pseudoacacia* (Hao et al., 2012) pokazavši sposobnost da zadrži PGP osobine i u prisustvu teških metala.

Ispitivanja sposobnosti PGPB izolata da se prilagode povećanom sadržaju neorganskih zagađivača su značajna sa stanovišta njihovog uključivanja u

fitoremedijacione strategije (Koo i Cho, 2009). PGPB mogu uticati na povećanje dostupnosti (produkcija helatora, siderofora, organskih kiselina) i usvajanja teških metala od strane biljaka uz istovremeno smanjenje njihovog toksičnog efekta na biljku (Hansda et al., 2014). Smatra se da se najlakše do PGPB sojeva sa visokom tolerancijom prema sadržaju teških metala može doći izolacijom iz supstrata koji su njima kontaminirani (Trama et al., 2014).

5.10.5. Otpornost izolata na prisustvo ampicilina i tetraciklina

U cilju detaljnije karakterizacije izolata izvršeno je utvrđivanje njihove otpornosti na prisustvo antibiotika ampicilina i tetraciklina (Tabela 21).

Usled nedostatka smernica za procenu osetljivosti ili rezistentnosti izolata korišćenih u ovoj studiji korišćena su uputstva koje je dao proizvođač. Predstavnicima fam. *Enterobacteriaceae* se dele na rezistentne na ampicilin ukoliko je prečnik zone inhibicije ≤ 13 mm, srednje osetljive 14-17 mm, a osetljive ukoliko je prečnik zone inhibicije ≥ 18 mm. *Pseudomonas aeruginosa* i srodni sojevi se dele na rezistentne ukoliko je prečnik zone inhibicije ≤ 11 mm, srednje osetljiv 12-14 mm, a osetljivi ukoliko je prečnik zone inhibicije ≥ 15 mm. Rezultati predstavnika aerobnih, grampozitivnih štapića se mogu uporediti sa *Staphylococcus* ili *Enterococcus* spp. (CLSI, 2010). Prema uputstvu proizvođača, *Staphylococcus* spp. su rezistentni na ampicilin ukoliko je prečnik zone inhibicije ≤ 28 mm, a osetljivi ukoliko je prečnik zone inhibicije ≥ 29 mm, a u slučaju *Enterococcus* spp. rezistentni su ukoliko je prečnik zone inhibicije ≤ 16 mm, a osetljivi ukoliko je prečnik zone inhibicije ≥ 17 mm.

Tabela 21. Otpornost PGP izolata na ampicilin i tetraciklin

Oznaka izolata	Zone inhibicije (mm)	
	Ampicilin	Tetraciklin
<i>S. liquefaciens</i> Z-I ARV	20	26
<i>E. adhaerens</i> 10_ARV	10	30
<i>B. amyloliquefaciens</i> D5 ARV	30	0
<i>P. putida</i> P1 ARV	0	15

Predstavnici fam. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp. i *Enterococcus* spp. su rezistentni na tetraciklin ukoliko je širina zone ≤ 14 mm, srednje osetljivi pri 15-18 mm i osetljivi ≥ 19 mm.

Prema uputstvu proizvođača *S. liquefaciens* Z-I ARV se pokazao osetljivim na ampicilin i tetraciklin. *P. putida* P1 ARV je rezistentan na ampicilin i umereno osetljiv na tetraciklin. *E. adhaerens* 10_ARV se može smatrati rezistentnim na ampicilin, s obzirom na to da je zabeležena uska zona u kojoj je izostao rast. Široka zona inhibicije rasta je zabeležena u testu sa tetraciklinom ukazujući na osetljivost izolata na tetraciklin. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Rathore et al. (2015) koji su koristili *E. adhaerens* OV14. Širina zone zabeležena kod *B. amyloliquefaciens* D5 ARV ukazuje na njegovu osetljivost na ampicilin, dok izostanak zone inhibicije rasta ukazuje da je ovaj izolat rezistentan na tetraciklin. Pojedinačne kolonije unutar čiste zone, koje ukazuju na pojavu stečene rezistentnosti, kod ampicilina imali su izolati *S. liquefaciens* Z-I ARV i *B. amyloliquefaciens* D5 ARV, dok kod tetraciklina nisu zabeležene.

U studiji koju su izveli Kaur et al. (2014) najveći procenat testiranih *Ensifer* izolata je pokazao rezistentnost na ampicilin i tetraciklin. *P. putida* KT2440R i HB3267 (Molina et al., 2014) pokazali su se, takođe, kao rezistentan na prisustvo 10 mg ampicilina ali i 30 mg tetraciklina, po čemu se razlikuju od našeg soja.

5.11. Uticaj inokulacije PGP bakterijama na rast biljaka

Bakterije stimulatori biljnog rasta (PGPB) su grupa mikroorganizama koji koloniziraju koren biljaka i poboljšavaju njihov rast, bilo direktnim ili indirektnim mehanizmima (Ahemad i Kibret, 2014). Interakcije između biljaka i PGPB su pod velikim uticajem brojnih faktora spoljašnje sredine koji modifikuju korisne efekte PGPB u prirodnoj sredini. Ispitivanje uticaja inokulacije PGPB na rast biljaka je sprovedeno sa ciljem utvrđivanja mogućnosti primene odabranih izolata u ekoremedijaciji oštećenih zemljišta. Kao primeri oštećenih zemljišta korišćeni su deposol I i deposol II. Deposol II je okarakterisan kao siromašan supstrat sa niskim sadržajem humusa i slabom obezbeđenošću esencijalnim nutrijentima (Tabela 4). Deposol I sadrži visok sadržaj humusa (Tabela 4), ali se odlikuje i visokim sadržajem organskih zagađivača (PAH, PCB, organokalajna jedinjenja). Istraživanja ukazuju da

bakterijski izolati mogu pokazati različite efekte na biljku u laboratorijskim, odnosno kontrolisanim uslovima u odnosu na poljske uslove (Husen et al., 2011; Kumar et al., 2014).

Na osnovu rezultata dobijenih u prethodnim istraživanjima, za ispitivanje uticaja PGPB na rast biljaka odabrani su *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV (Tabela 13).

Ekoremedijacioni potencijal PGP sojeva i njihovog mešanog inokuluma je testiran kroz kratke, dvonedeljne oglede (Slika 14) sa ratarskim kulturama (*Sinapis alba* L., *Triticum vulgare* L., *Trifolium pretense* L. i *Helianthus annuus* L.) i višemesečne oglede na crvenoj detelini, bagremu, platanu, belom boru i smrči.



Slika 14. Uticaj izolata *S. liquefaciens* Z-I ARV na rast slačice (*Sinapis alba* L.) u deposolu II

Slačica, pšenica, crvena detelina i suncokret, pored značaja u ratarskoj proizvodnji, imaju i primenu u remedijaciji zagađenih zemljišta (Sverdrup et al., 2003; Shtangeeva et al., 2004; Tlustoš et al., 2006; Prasad, 2007). Bagrem i beli bor su vrste korišćene u bioremedijaciji RB Kolubara (Veselinović i Golubović-Ćurguz, 2001; Rakić et al., 2011). Platan je odabran kao jedna od najznačajnijih vrsta za urbane sredine, koja je, takođe, pogodna za fitoremedijaciju i pošumljavanje područja oštećenih rudarskom aktivnošću (Skousen i Zipper 2014; Kang et al., 2016). Smrča je odabrana kao predstavnik roda na kojem su, pored rodova *Pinus*, *Tsuga*, *Eucalyptus* najčešće vršena ispitivanja sa PGPB (Chanway et al., 2000; Mafia et al., 2009; Puente et al., 2010; Gujaničić et al., 2012; Ribeiro i Cardoso, 2012; Anand et al., 2013).

5.11.1. Uticaj inokulacije PGP bakterijama na rast ratarskih kultura

PGPB inokulacija može značajno uticati na klijavost semena i rast korena i nadzemnog dela u ranim fazama rasta (Çakmakçı et al., 2007). U cilju ispitivanja efekata inokulacije PGPB na rane faze rasta slačice (*Sinapis alba* L.), pšenice (*Triticum vulgare* L.), crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) i suncokreta (*Helianthus annuus* L.) postavljen je ogled u trajanju od dve nedelje.

Poređenje visina inokulisanih biljaka slačice (*Sinapis alba* L.) sa KDP pokazuje da nijedan od primenjenih inokuluma nije pokazao stimulativan uticaj (Tabela 22). Naprotiv, visine nadzemnog dela inokulisanih biljaka su bile značajno niže od biljaka koje su predstavljale KDP.

Tabela 22. Uticaj inokulacije na rast slačice (*Sinapis alba* L.)

Tretmani	Visina (cm)	Dužina korena (cm)	Ukupna suva biomasa (g)
<i>S. liquefaciens</i> Z-I ARV	6,30±1,20 ^b	3,18±1,12 ^d	0,48±0,05 ^{de}
<i>E. adhaerens</i> 10_ARV	5,41±1,14 ^{ab}	2,64±0,94 ^{cd}	0,4±0,05 ^{bc}
<i>B. amyloliquefaciens</i> D5	5,77±1,21 ^{ab}	2,54±1,04 ^{bc}	0,36±0,03 ^b
<i>P. putida</i> P1 ARV	5,66±1,53 ^{ab}	2,61±1,22 ^{cd}	0,43±0,04 ^{bcd}
MIX	5,04±1,08 ^a	1,96±0,74 ^{ab}	0,47±0,05 ^{cde}
KDP	7,69±1,33 ^c	1,89±0,74 ^a	0,23±0,02 ^a
KFP	10,18±1,68 ^d	2,93±0,88 ^{cd}	0,53±0,05 ^e
LSD _{0,01}	0,892	0,61	0,075

(MIX) inokulum sačinjen od *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV; (KDP) Kontrola u deposolu II; (KFP) Kontrola u Floradur®Plant Universal substratu;

Vrednosti prikazane u istoj koloni označene različitim slovima se značajno statistički razlikuju ($p < 0,001$) prema LSD testu, $n=5$.

Rezultati LSD testa pokazuju da između visina nadzemnog dela inokulisanih biljaka ne postoji statistički značajna razlika, dok su inokulisane biljke u odnosu na KFP značajno niže ($p < 0,01$).

Poređenje dužina korena slačice inokulisane sa *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *P. putida* P1 ARV i *B. amyloliquefaciens* D5 ARV sa KDP pokazuje da je inokulacija dovela do značajne stimulacije rasta korena ($p < 0,01$). Najveći uticaj na dužinu korena imao je inokulum *S. liquefaciens* Z-I ARV (3,18 cm). Slede klijanci inokulisani sa *E. adhaerens* 10_ARV, *P. putida* P1 ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i statistička analiza ovih rezultata pokazuje da među njima ne postoji značajna razlika. Dužina korena biljaka inokulisanih sa *S. liquefaciens* Z-I ARV je značajno veća od dužine korena biljaka inokulisanih sa *B. amyloliquefaciens* D5 ARV. Inokulacija mešanim inokulumom nije dovela do značajnih razlika u dužini korena u odnosu na KDP.

Poređenje dužina korena biljaka inokulisanih sa *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *P. putida* P1 ARV i *B. amyloliquefaciens* D5 ARV sa dužinom korena u KFP pokazuje da ne postoje statistički značajne razlike ($p < 0,01$). Dužina korena biljaka inokulisanih mešanim inokulumom je statistički značajno manja od dužine korena u KFP.

Poređenje ukupnih suvih biomasa inokulisanih biljaka sa KDP pokazuje da je inokulacija dovela do statistički značajne stimulacije produkcije biomase ($p < 0,01$). Najveći uticaj na produkciju biomase imala je inokulacija sa *S. liquefaciens* Z-I ARV, *P. putida* P1 ARV i mešanim inokulumom.

Poređenje ukupne suve biomase biljaka inokulisanih sa *S. liquefaciens* Z-I ARV i mešanim inokulumom sa KFP pokazuje da ne postoje značajne razlike ($p < 0,01$). Preostali inokulumi su doveli do produkcije statistički značajno manjih prinosa ukupne suve biomase u odnosu na KFP.

Utvrđen je efekat inokulacije PGP bakterijama na rast pšenice (*Triticum vulgare* L.) kroz uticaj na visinu, dužinu korena i ukupnu suhu biomasu (Tabela 23).

Poređenje visina inokulisanih biljaka sa KDP pokazuje da su svi primenjeni inokulumi imali stimulativan uticaj na rast biljaka. Najveći uticaj inokulacije na visinu biljaka postignut je primenom *B. amyloliquefaciens* D5 ARV, *S. liquefaciens* Z-I ARV, mešanim inokulumom i *E. adhaerens* 10_ARV, dok su biljke inokulisane sa *P. putida* P1 ARV bile značajno najniže.

Poređenje visina inokulisanih biljaka sa visinama u KFP pokazuje da su inokulisane biljke značajno niže ($p < 0,01$).

Poređenje dužina korena inokulisanih biljaka sa KDP pokazuje da je inokulacija dovela do značajne stimulacije rasta korena ($p < 0,01$). Rezultati LSD testa pokazuju da između dužina korena inokulisanih biljaka ne postoji statistički značajna razlika.

Poređenje rezultata inokulisanih biljaka sa KFP pokazuje da je dužina korena u pozitivnoj kontroli značajno veća od dužine korena inokulisanih biljaka.

Tabela 23. Uticaj inokulacije na rast pšenice (*Triticum vulgare* L.)

Tretmani	Visina (cm)	Dužina korena (cm)	Ukupna suva biomasa (g)
<i>S. liquefaciens</i> Z-I ARV	20,45±3,09 ^c	12,55±2,94 ^b	2,02±0,07 ^{cd}
<i>E. adhaerens</i> 10_ARV	19,35±2,47 ^c	11,82±2,31 ^b	1,88±0,09 ^b
<i>B. amyloliquefaciens</i> D5 ARV	21,02±2,59 ^c	13,5±2,22 ^b	2,07±0,12 ^d
<i>P. putida</i> P1 ARV	16,93±4,45 ^b	11,68±3,55 ^b	1,95±0,09 ^{bc}
MIX	19,73±3,17 ^c	11,78±2,69 ^b	2,47±0,12 ^f
KDP	14,05±3,68 ^a	9,52±3,24 ^a	1,30±0,16 ^a
KFP	28,85±4,15 ^d	16,12±2,57 ^c	2,28±0,13 ^e
LSD _{0,01}	2,312	1,896	0,281

(MIX) inokulum sačinjen od *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV; (KDP) Kontrola u deposolu II; (KFP) Kontrola u Floradur®Plant Universal supstratu;

Vrednosti prikazane u istoj koloni označene različitim slovima se značajno statistički razlikuju ($p < 0,001$) prema LSD testu, $n=5$

Poređenje suvih biomasa inokulisanih biljaka sa KDP pokazuje da je inokulacija dovela do statistički značajne stimulacije ($p < 0,01$). Najveći uticaj inokulacije na produkciju biomase postignut je primenom mešanog inokuluma (2,47 g). Slede biljke inokulisane sa *S. liquefaciens* Z-I ARV i *B. amyloliquefaciens* D5 ARV. Poređenje suve biomase biljaka inokulisanih mešanim inokulumom sa KFP pokazuje da je suva biomasa inokulisanih biljaka statistički značajno veća. Ostali primenjeni inokulumi su dali statistički značajno niže prinose biomase u odnosu na KFP.

Pored slačice i pšenice, praćen je i uticaj inokulacije na rast crvene deteline (*Trifolium pretense* L.). Poređenje visina biljaka inokulisanih sa *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i mešanim inokulumom sa KDP pokazuje da je inokulacija dovela do značajne stimulacije rasta biljaka (Tabela

24). Najveći uticaj inokulacije na visinu biljaka postignut je primenom *S. liquefaciens* Z-I ARV (8,28 cm). Slede biljke inokulisane mešanim inokulumom, *E. adhaerens* 10_ARV i *B. amyloliquefaciens* D5 ARV, čija visine se međusobno statistički značajno ne razlikuju. Inokulacija sa *P. putida* P1 ARV nije dovela do značajnih razlika u visini u odnosu na KDP.

Poređenje visina biljaka inokulisanih sa *S. liquefaciens* Z-I ARV sa visinama u KFP pokazuje da ne postoje statistički značajne razlike ($p < 0,01$). Visine biljaka inokulisanih preostalim inokulumima su statistički značajno manje u odnosu na visine biljaka u KFP.

Tabela 24. Uticaj inokulacije na rast crvene deteline (*Trifolium pretense* L.)

Tretmani	Visina (cm)	Dužina korena (cm)	Ukupna suva biomasa (g)
<i>S. liquefaciens</i> Z-I ARV	8,28±1,69 ^d	5,02±0,78 ^d	0,31±0,03 ^d
<i>E. adhaerens</i> 10_ARV	7,15±0,71 ^c	3,38±0,75 ^b	0,31±0,04 ^d
<i>B. amyloliquefaciens</i> D5	6,97±1,07 ^{bc}	3,59±1,03 ^{bc}	0,22±0,03 ^b
<i>P. putida</i> P1 ARV	6,32±0,66 ^{ab}	2,82±0,57 ^a	0,29±0,03 ^{cd}
MIX	7,47±0,99 ^c	3,93±0,89 ^c	0,25±0,03 ^{bc}
KDP	6,09±0,54 ^a	2,66±0,53 ^a	0,24±0,02 ^{bc}
KFP	8,31±0,86 ^d	4,70±0,84 ^d	0,16±0,03 ^a
LSD _{0.01}	0,669	0,529	0,053

(MIX) inokulum sačinjen od *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV; (KDP) Kontrola u deposolu II; (KFP) Kontrola u Floradur®Plant Universal substratu;

Vrednosti prikazane u istoj koloni označene različitim slovima se značajno statistički razlikuju ($p < 0,001$) prema LSD testu, $n=5$

Poređenje dužina korena biljaka inokulisanih sa *S. liquefaciens* Z-I ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV, *E. adhaerens* 10_ARV i mešanim inokulumom sa KDP pokazuje da je inokulacija dovela do značajne stimulacije rasta korena ($p < 0,01$). Najveći uticaj na dužinu korena imao je inokulum *S. liquefaciens* Z-I ARV (5,02 cm). Slede klijanci inokulisani sa mešanim inokulumom i *B. amyloliquefaciens* D5 ARV među kojima ne postoji statistički značajna razlika. Inokulacija sa *P. putida* P1 ARV nije dovela do značajnih razlika u dužini korena u odnosu na KDP.

Poređenje dužina korena biljaka inokulisanih sa *S. liquefaciens* Z-I ARV sa KFP pokazuje da ne postoje statistički značajne razlike ($p < 0,01$). Dužine korena biljaka inokulisanih preostalim inokulumima su statistički značajno manje u odnosu na dužine korena biljaka u KFP.

Poređenje ukupnih suvih biomasa biljaka inokulisanih sa *S. liquefaciens* Z-I ARV i *E. adhaerens* 10_ARV sa KDP pokazuje da je inokulacija dovela do značajne stimulacije ($p < 0,01$). Biomase biljaka inokulisanih preostalim primenjenim inokulumima se nisu značajno razlikovale od KDP. Poređenje rezultata dobijenih inokulacijom sa rezultatima u KFP pokazuje da je biomasa inokulisanih biljaka statistički značajno veća.

Poređenje visina biljaka suncokreta (*Helianthus annuus* L.) inokulisanih sa *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i mešanim inokulumom sa KDP pokazuje da je inokulacija dovela do značajne stimulacije rasta biljaka (Tabela 25). Inokulacija sa ostalim inokulumima nije dovela do značajnih razlika u visini u odnosu na KDP. Poređenje visina inokulisanih biljaka sa visinama u KFP pokazuje da su inokulisane biljke značajno niže.

Poređenje dužina korena inokulisanih biljaka sa KDP pokazuje da nijedan od primenjenih inokuluma nije pokazao stimulativan uticaj na rast korena. Dužine korena inokulisanih biljaka se nisu statistički značajno razlikovale od dužina u KFP, izuzev kod biljaka inokulisanih sa *S. liquefaciens* Z-I ARV koje su imale značajno manju dužinu korena od KFP.

Poređenje suvih biomasa inokulisanih biljaka sa KDP pokazuje da nijedan od primenjenih inokuluma nije pokazao stimulativan uticaj. Naprotiv, prisustvo inokuluma se negativno odrazilo na prinos biomase. Poređenje suvih biomasa inokulisanih biljaka sa biomasama u KFP pokazuje da su prinosi inokulisanih biljaka značajno niži ($p < 0,01$).

Stimulacija produkcije biomase nadzemnog dela suncokreta nije zabeležena ni u ogledu sa *P. fluorescens* PICF7 i *P. fluorescens* PICF7^{Rf} (Maldonado-González et al., 2012). *P. fluorescens* PICF7 i *P. fluorescens* PICF7^{Rf} su pokazali sposobnost kolonizacije korena suncokreta kao i izolati testiranih u ovoj studiji. Razlog za odsustvo stimulativnog efekta na rast suncokreta, pored nekompatibilnosti izolata i biljne vrste, može se tražiti i u činjenici da prevelika brojnost ćelija PGPB koje ispoljavaju direktne mehanizme može dovesti do inhibicije rasta (Bent et al., 2001).

Tabela 25. Uticaj inokulacije na rast suncokreta (*Helianthus annuus* L.)

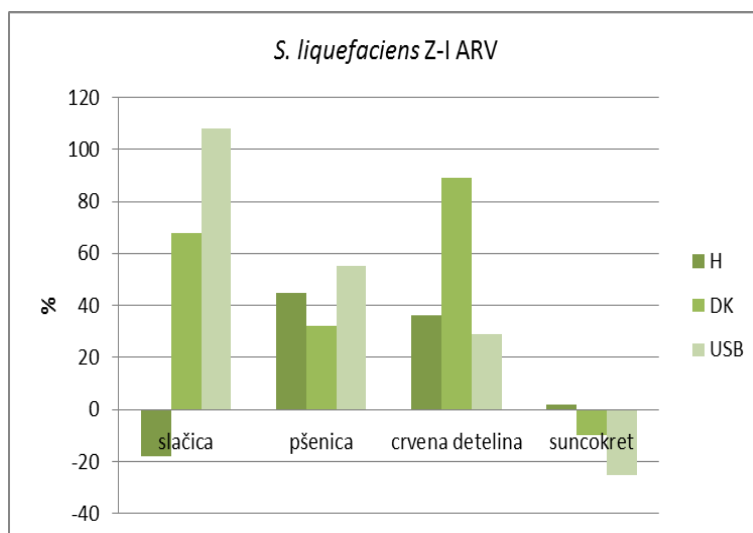
Tretmani	Visina (cm)	Dužina korena (cm)	Suva biomasa (g)
<i>S. liquefaciens</i> Z-I ARV	18,79±1,07 ^{ab}	6,48±1,00 ^a	2,28±0,05 ^a
<i>E. adhaerens</i> 10_ARV	18,53±1,63 ^a	6,91±1,34 ^{ab}	2,38±0,06 ^b
<i>B. amyloliquefaciens</i> D5	20,59±2,18 ^b	7,16±2,04 ^{abc}	2,87±0,06 ^d
<i>P. putida</i> P1 ARV	19,36±3,16 ^{ab}	8,34±3,44 ^c	2,72±0,05 ^c
MIX	20,12±1,67 ^b	7,50±1,36 ^{abc}	2,74±0,06 ^c
KDP	18,43±1,46 ^a	7,19±1,62 ^{abc}	3,03±0,05 ^e
KFP	24,79±3,17 ^c	7,97±2,73 ^{bc}	3,60±0,07 ^f
LSD _{0,01}	1,469	1,408	0,098

(MIX) inokulum sačinjen od *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV; (KDP) Kontrola u deposolu II; (KFP) Kontrola u Floradur®Plant Universal supstratu;

Vrednosti prikazane u istoj koloni označene različitim slovima se značajno statistički razlikuju ($p < 0,001$) prema LSD testu, $n=5$

Efekti inokulacije PGPB zavise od čitavog niza faktora poput karakteristika zemljišta, temperature, vlažnosti, sastava korenskih eksudata, interakcije sa autohtonom mikroflorom ali i izbora izolata, testirane biljne vrste, sorte i kultivara (Khalid et al., 2004; Malhotra i Srivastava, 2009; Montañez et al., 2012). Belimov et al. (2007) naglašavaju značaj uslova spoljašnje sredine koji modifikuju efekte PGPB. Bakterijski izolati mogu stimulatивно uticati na rast jedne biljne vrste dok na drugoj efekti izostaju. Ova varijabilnost efekata inokulacije pokazana je i u istraživanjima u ovoj disertaciji (Grafik 4-8).

Rezultati istraživanja pokazuju da je inokulacija sa *S. liquefaciens* Z-I ARV različito uticala na ispitivane biljne vrste ali i parametre rasta (Grafik 4). Ovaj izolat je stimulativno uticao na ispitivane biljne vrste, osim na suncokret. Stimulativan efekat je uočen na ispitivanim parametrima rasta, izuzev dužine korena i ukupne suve biomase kod suncokreta i visine biljke kod slačice i suncokreta.



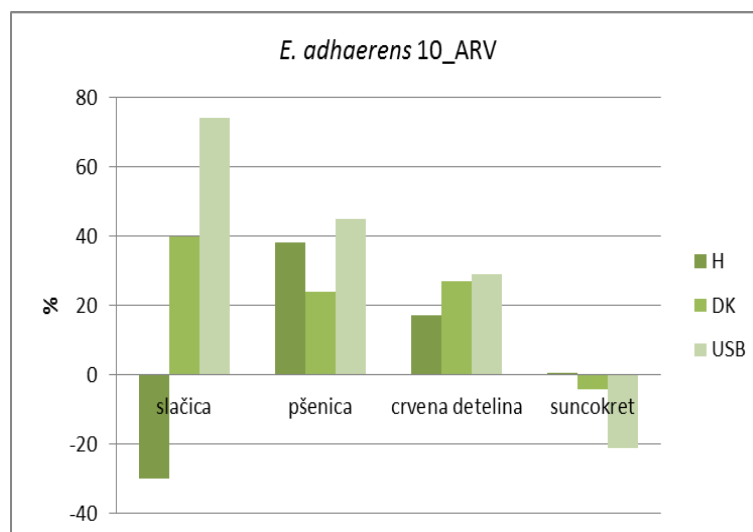
* X osu predstavlja KDP;

* negativne vrednosti odnose se na inhibiciju parametara rasta, H-visina biljaka, DK-dužina korena; USB-ukupna suva biomasa

Grafik 4. Uticaj inokulacije sa *S. liquefaciens* Z-I ARV na parametre rasta slačice (*Sinapis alba* L.), pšenice (*Triticum vulgare* L.), crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) i suncokreta (*Helianthus annuus* L.) izražen u %.

Slični rezultati dobijeni su i pri inokulaciji sa *E. adhaerens* 10_ARV, gde inokulacija nije imala efekat na visinu slačice i suncokreta, dužinu korena suncokreta i uticala na smanjenje ukupne suve biomase suncokreta (Grafik 5).

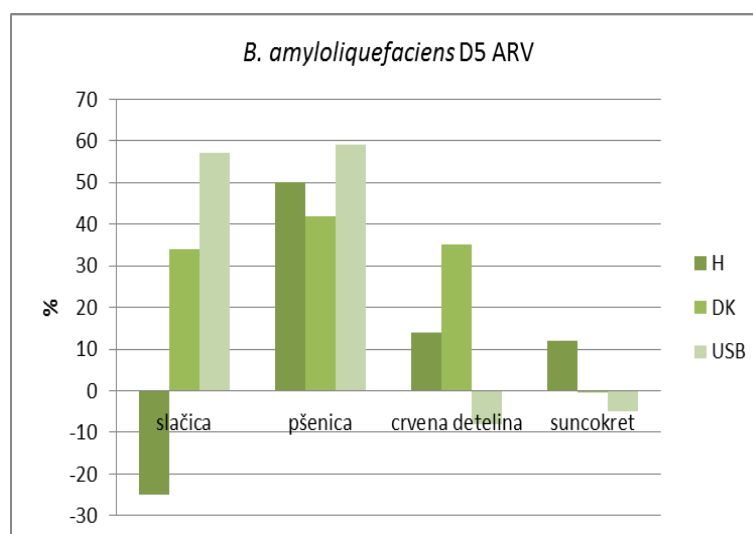
Inokulacija sa *B.amyloliquefaciens* D5 ARV je stimulisala rast korena, visinu biljke i ukupnu biomasu kod ispitivanih biljnih vrsta, osim visine biljke kod slačice, dužine korena kod suncokreta i ukupne biomase kod crvene deteline i suncokreta gde je smanjenje biomase iznosilo 8, odnosno 5% (Grafik 6).



* X osu predstavlja KDP;

* negativne vrednosti odnose se na inhibiciju parametara rasta, H-visina biljaka, DK-dužina korena; USB-ukupna suva biomasa

Grafik 5. Uticaj inokulacije sa *E. adhaerens* 10_ARV na parametre rasta slačice (*Sinapis alba* L.), pšenice (*Triticum vulgare* L.), crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) i suncokreta (*Helianthus annuus* L.) izražen u %.

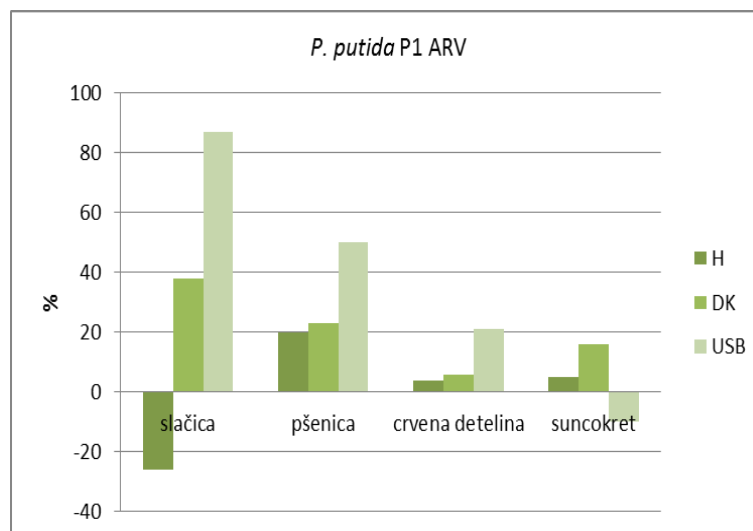


* X osu predstavlja KDP;

* negativne vrednosti odnose se na inhibiciju parametara rasta, H-visina biljaka, DK-dužina korena; USB-ukupna suva biomasa

Grafik 6. Uticaj inokulacije sa *B. amyloliquefaciens* D5 ARV na parametre rasta slačice (*Sinapis alba* L.), pšenice (*Triticum vulgare* L.), crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) i suncokreta (*Helianthus annuus* L.) izražen u %.

Inokulacija sa *P. putida* P1 ARV je stimulisala rast korena kod svih ispitivanih vrsta biljaka, izuzev kod crvene deteline; stimulisala je visinu biljaka kod pšenice i ukupnu biomasu kod slačice i pšenice (Grafik 7).

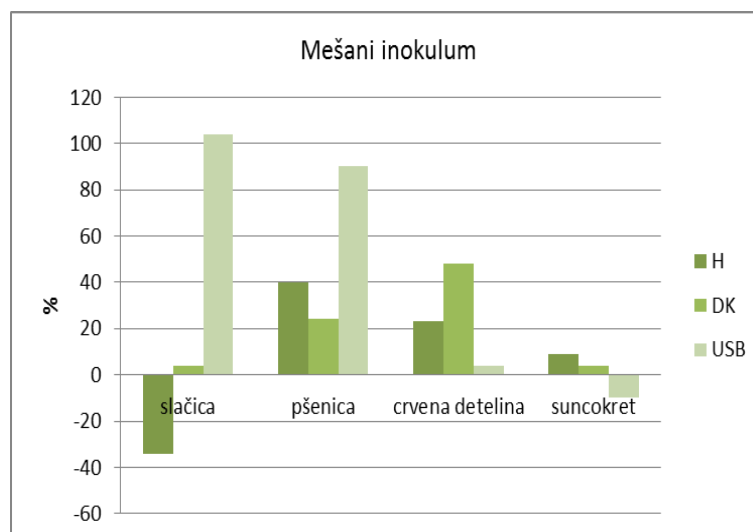


* X osu predstavlja KDP;

* negativne vrednosti odnose se na inhibiciju parametara rasta, H-visina biljaka, DK-dužina korena; USB-ukupna suva biomasa

Grafik 7. Uticaj inokulacije sa *P. putida* P1 ARV na parametre rasta slačice (*Sinapis alba* L.), pšenice (*Triticum vulgare* L.), crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) i suncokreta (*Helianthus annuus* L.) izražen u %.

Inokulacija sa mešanim inokulumom je stimulisala visinu biljke, rast korena i ukupnu biomasu kod ispitivanih biljnih vrsta, osim visine biljke kod slačice, dužine korena kod slačice i suncokreta i ukupne biomase kod crvene deteline i suncokreta (Grafik 8). Najmanji stimulativni efekat uočen je na suncokretu.



* X osu predstavlja KDP;

* negativne vrednosti odnose se na inhibiciju parametara rasta, H-visina biljaka, DK-dužina korena; USB-ukupna suva biomasa

Grafik 8. Uticaj inokulacije sa mešanim inokulumom na parametre rasta slačice (*Sinapis alba* L.), pšenice (*Triticum vulgare* L.), crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) i suncokreta (*Helianthus annuus* L.) izražen u %.

Varijabilnost efekata inokulacije PGPB najbolje se ogleda pri inokulaciji pšenice i suncokreta. Inokulacija pšenice PGPB primenjenim pojedinačno ili u formi mešanog inokuluma dovela je do stimulacije rasta klijanaca (Tabela 23; Grafik 4-8), dok je taj efekat kod suncoketa izostao, a zabeležen je i negativan uticaj inokulacije na produkciju biomase (Tabela 25; Grafik 4-8).

Različiti efekti koje su testirani izolati pokazali na različitim biljkama su u skladu sa rezultatima drugih istraživača. Tako su Malhotra i Srivastava (2009) zabeležili da inokulacija semena kineske šećerne trske sa *Azospirillum brasilense* SM, dve nedelje od setve, dovodi do poboljšanja razvoja korena, većeg broja lateralnih korenova i suve biomase biljke. Primena istog izolata na pasulj dovela je do stimulacije rasta korena, ali je izostao efekat na visinu biljaka. U slučaju kukuruza i pšenice uticaj na dužinu korena i stabla je izostao, ali je povećan broj bočnih korenova dok ječam i proso nisu reagovali na prisustvo bakterijskog inokuluma. Inokulacija sa *Bacillus* sp. BS2 je stimulisala visinu nadzemnog dela pasulja, patlidžana i paradajza dok na kupus i kelerabu nije imala efekat. Ovaj izolat je ispoljio stimulativan uticaj na dužinu korena svih testiranih vrsta izuzev na paradajz (Boruah i Kumar, 2003).

Prisustvo *P. flourescens* EMA-38 je različito delovalo na dve sorte kukuruza. Tako je 20 dana po inokulaciji sorte NK900 došlo do povećanja suve biomase nadzemnog dela, dok na sortu DK682 primenjeni inokulum nije imao efekat. Soj *P. flourescens* EMA-68 je pokazao drugačiji efekat: na NK900 nije delovao dok je kod DK682 doveo do značajnog povećanja suve biomase biljke (Montañez et al., 2012). Različit efekat inokulacije na sorte pšenice konstatovali su Khalid et al. (2004). Ove varijacije mogu biti posledica genetskih različitosti ali i činjenice da sorte, kultivari i varijeteti iste vrste luče različite eksudate koji mogu podržati ili ne podržati aktivnost inokuluma (Khalid et al., 2004). Jedan od načina prevazilaženja ovog problema je inokulacija izolatima izolovanim iz rizosfere ciljane biljke (Mahalakshmi i Reetha, 2009).

Khalid et al. (2004) su zabeležili da su najveći uticaj na elongaciju korena i biomasu pšenice (povećanje od 47%), dve nedelje po inokulaciji, ispoljili izolati koji su se odlikovali visokom produkcijom IAA ($> 21 \mu\text{g ml}^{-1}$). U ovim istraživanjima, dve nedelje nakon setve pšenice, izolat *E. adhaerens* 10_ARV, koji je odabran zbog visoke produkcije IAA ($44,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) je, takođe, uticao na povećanje biomase pšenice (45%). Ipak, veće povećanje biomase je zabeleženo kod biljaka inokulisanih sa *S. liquefaciens* Z-I ARV (55%), *B. amyloliquefaciens* D5 ARV (59%) i *P. putida* P1 ARV (50%) koji su produkovali daleko niže koncentracije IAA (Tabela 7).

U cilju izbora najefikasnijih izolata PGPB da stimulatívne efekte ispolje u oštećenim zemljištima i tako postanu alati za primenu u ekoremedijacionim tehnologijama postavljeni su ogledi sa crvenom detelinom (*T. pretense* L.) u deposolu II (Slika 15) i deposolu I.

U ogledu u kom je kao supstrat korišćen deposol II već nakon prvog košenja se uočavaju efekti inokulacije (Tabela 26). Poređenje visina biljaka inokulisanih mešanim, *E. adhaerens* 10_ARV i *P. putida* P1 ARV inokulumima sa KDP pokazuje da je inokulacija dovela do značajne stimulacije rasta biljaka ($p < 0,01$). Inokulacija sa *S. liquefaciens* Z-I ARV i *B. amyloliquefaciens* D5 ARV nije dovela do statistički značajnih razlika u visini u odnosu na KDP. Nakon drugog košenja, poređenje rezultata postignutih mešanim, *E. adhaerens* 10_ARV i *P. putida* P1 ARV inokulumima sa KDP pokazuje da je inokulacija dovela do značajne stimulacije rasta biljaka. Najveći uticaj na visinu crvene deteline imao je mešani inokulum (6,60 cm), dok su biljke inokulisane sa

E. adhaerens 10_ARV i *P. putida* P1 ARV značajno niže od visine biljaka inokulisanih mešanim inokulumom. Rezultati drugog košenja, takođe, pokazuju da inokulacija sa *S. liquefaciens* Z-I ARV i *B. amyloliquefaciens* D5 ARV nije dovela do značajnih razlika u visini u odnosu na KDP.



Slika 15. Uticaj izolata *P. putida* P1 ARV na rast crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) u odnosu na kontrolu u Floradur supstratu (levo) i kontrolu u deposolu II (desno)

Tabela 26. Uticaj inokulacije na visinu crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) u deposolu II

Tretman	Visina (cm)		
	I košenje	II košenje	III košenje
<i>S. liquefaciens</i> Z-I ARV	5,00±0,81 ^a	5,40±1,06 ^{ab}	5,34±0,80 ^{bc}
<i>E. adhaerens</i> 10 ARV	6,10±1,20 ^b	5,68±0,29 ^b	5,17±1,34 ^b
<i>B. amyloliquefaciens</i> D5 ARV	5,30±0,88 ^a	5,03±0,59 ^a	4,41±1,02 ^a
<i>P. putida</i> P1 ARV	6,08±0,72 ^b	5,60±0,77 ^b	5,66±0,86 ^c
MIX	6,45±0,90 ^b	6,60±0,69 ^c	4,87±0,88 ^b
KDP	5,38±0,59 ^a	5,10±0,26 ^a	5,15±1,07 ^b
KFP	7,40±0,84 ^c	8,95±1,28 ^d	9,09±2,02 ^d
LSD _{0,01}	0,456		

(MIX) inokulum sačinjen od *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV; (KDP) Kontrola u deposolu II; (KFP) Kontrola u Floradur®Plant Universal supstratu;

Vrednosti prikazane u istoj koloni označene različitim slovima se značajno statistički razlikuju ($p < 0,001$) prema LSD testu, $n=3$

Nakon trećeg košenja poređenje visina biljaka inokulisanih sa *P. putida* P1 ARV sa KDP pokazuje da je inokulacija dovela do značajne stimulacije rasta biljaka ($p < 0,01$). Biljke inokulisane sa *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV i mešanim inokulumom nisu pokazale značajne razlike u odnosu na KDP. Najmanja visina je zabeležena kod biljaka inokulisanih sa *B. amyloliquefaciens* D5 ARV, statistički značajno ispod visine biljaka u KDP. Visina inokulisanih biljaka je u sva tri košenja statistički značajno niža u odnosu na KFP.

Pored visine biljaka, tokom ova tri košenja su prikupljeni i podaci o biomasi nadzemnog dela dok je na kraju ogleda zabeležena i dužina korena biljaka (Tabela 27). Poređenje biomasa nadzemnog dela inokulisanih biljaka sa KDP pokazuje da nijedan od primenjenih inokuluma nije pokazao stimulativan uticaj na prinos biljaka u sva tri košenja. Rezultati LSD testa pokazuju da između biomasa inokulisanih biljaka ne postoji statistički značajna razlika. Biomase nadzemnog dela inokulisanih biljaka su statistički značajno niže u odnosu na KFP u sva tri košenja.

Tabela 27. Uticaj inokulacije na prinos biomase (g) i dužinu korena (cm) crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) u deposolu II

Tretman	Biomasa (g)			Dužina korena (cm)
	I košenje	II košenje	III košenje	
<i>S. liquefaciens</i> Z-I ARV	0,69±0,0	0,71±0,0	0,60±0,0	6,98±1,6
<i>E. adhaerens</i> 10 ARV	0,53±0,0	0,50±0,0	0,47±0,0	6,25±1,7
<i>B. amyloliquefaciens</i> D5 ARV	0,52±0,0	0,58±0,0	0,61±0,0	6,95±1,7
<i>P. putida</i> P1 ARV	0,72±0,0	0,73±0,0	0,60±0,0	7,23±1,4
MIX	0,54±0,0	0,57±0,0	0,72±0,0	6,74±1,5
KDP	0,74±0,0	0,71±0,0	0,49±0,0	7,67±2,0
KFP	2,14±0,1	1,69±0,1	4,23±0,0	12,03±2,
LSD _{0,01}	0,292			0,856

(MIX) inokulum sačinjen od *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV; (KDP) Kontrola u deposolu II; (KFP) Kontrola u Floradur®Plant Universal supstratu;

Vrednosti prikazane u istoj koloni označene različitim slovima se značajno statistički razlikuju ($p < 0,001$) prema LSD testu, $n=3$

Dužina korena biljaka, utvrđena na kraju eksperimenta, pokazuje da se biljke inokulisane sa *P. putida* P1 ARV, *S. liquefaciens* Z-I ARV i *B. amyloliquefaciens* D5 ARV statistički značajno ne razlikuju od KDP. Dužine korena biljaka inokuliranih sa *E. adhaerens* 10_ARV i mešanim inokulumom su statistički značajno niže od dužina u KDP. Dužina korena inokuliranih biljaka je statistički značajno manja u odnosu na KFP. Uticaj inokulacije na crvenu detelinu gajenu u deposolu II vidljiv je kroz parametar visine i taj uticaj slabi od prvog do trećeg košenja. Na samom kraju ogleda jedino je inokulacija *P. putida* P1 ARV imala efekat na visinu biljaka.

I u ogledu u kom je kao supstrat korišćen deposol I uticaj inokulacije je praćen kroz parametre visine (Tabela 28), suve biomase i dužine korena biljaka (Tabela 29).

Tabela 28. Uticaj inokulacije na visinu (cm) crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) u deposolu I

Tretman	Visina (cm)		
	I košenje	II košenje	III košenje
<i>S. liquefaciens</i> Z-I ARV	7,90±1,21 ^{bc}	6,50±1,54 ^b	8,60±0,96 ^{abc}
<i>E. adhaerens</i> 10 ARV	7,83±1,13 ^{bc}	6,75±1,47 ^b	9,00±0,66 ^{bc}
<i>B. amyloliquefaciens</i> D5 ARV	9,53±1,59 ^e	7,95±0,97 ^c	8,50±0,50 ^{ab}
<i>P. putida</i> P1 ARV	8,50±1,31 ^d	5,75±0,44 ^a	9,70±1,19 ^d
MIX	7,30±0,98 ^a	6,75±1,35 ^b	8,30±0,40 ^a
KDG	7,68±1,16 ^{ab}	6,75±1,11 ^b	9,00±0,45 ^{bc}
KFP	8,31±0,79 ^{cd}	8,95±1,28 ^d	9,10±0,77 ^c
LSD _{0,01}	0,506		

(MIX) inokulum sačinjen od *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV; (KDG) Kontrola u deposolu I; (KFP) Kontrola u Floradur® Plant Universal supstratu;

Vrednosti prikazane u istoj koloni označene različitim slovima se značajno statistički razlikuju ($p < 0,001$) prema LSD testu, $n=3$

Nakon prvog košenja, poređenje visina biljaka inokuliranih sa *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV sa KDG pokazuje da je inokulacija dovela do značajne stimulacije rasta biljaka ($p < 0,01$). Najveći uticaj inokulacije na visinu biljaka postignut je primenom *B. amyloliquefaciens* D5 ARV (9,53 cm). Inokulacija sa *E. adhaerens* 10_ARV, *S. liquefaciens* Z-I ARV i mešanim inokulumom nije dovela do statistički značajnih razlika u visini u odnosu na KDG. Visina biljaka

inokulisanih sa *B. amyloliquefaciens* D5 ARV je statistički značajno veća od visina u KFP.

Biljke inokulisane sa *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV i *P. putida* P1 ARV nisu pokazale značajne razlike u odnosu na KFP dok su biljke inokulisane sa mešanim inokulumom imale statistički značajno manje visine.

Visina biljaka inokulisanih sa *B. amyloliquefaciens* D5 ARV (7,95 cm), prilikom drugog košenja, je bila statistički značajno veća od visine u KDG. Inokulacija sa ostalim inokulumima se nije statistički značajno razlikovala od KDG u pogledu visine biljaka, izuzev biljaka inokulisanih sa *P. putida* P1 ARV koje su bile statistički značajno niže. Visina inokulisanih biljaka je statistički značajno niža u odnosu na KFP.

Nakon trećeg košenja poređenje visina biljaka inokulisanih sa *P. putida* P1 ARV (9,70 cm) sa KDG pokazuje da je inokulacija dovela do značajne stimulacije rasta biljaka ($p < 0,01$). Biljke inokulisane sa *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV i *B. amyloliquefaciens* D5 ARV nisu pokazale značajne razlike u odnosu na KDG. Visina biljaka inokulisanih sa mešanim inokulumom je značajno niža od visine biljaka u KDG. Visina biljaka inokulisanih sa *P. putida* P1 ARV je statistički značajno veća od biljaka u KFP.

Nakon prvog košenja, poređenje suvih biomasa biljaka inokulisanih sa *P. putida* P1 ARV, *S. liquefaciens* Z-I ARV i *B. amyloliquefaciens* D5 ARV inokulumima sa KDG pokazuje da je inokulacija dovela do značajnog povećanja prinosa. Najveći uticaj inokulacije na biomasu biljaka postignut je primenom *B. amyloliquefaciens* D5 ARV (1,33 g), zatim *P. putida* P1 ARV i *S. liquefaciens* Z-I ARV koji se međusobno nisu statistički značajno razlikovali. Inokulacija sa *E. adhaerens* 10_ARV i mešanim inokulumom nije dovela do statistički značajnih razlika u odnosu na KDG.

Rezultati drugog košenja su potvrdili stimulativan uticaj inokulacije sa *P. putida* P1 ARV i *B. amyloliquefaciens* D5 ARV na prinos biomase. Biljke inokulisane sa *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV i mešanim inokulumom nisu pokazale značajne razlike u odnosu na KDG. Poređenje suvih biomasa inokulisanih biljaka dobijenih nakon trećeg košenja sa KDG pokazuje da ne postoje statistički značajne razlike ($p < 0,01$). Sva tri košenja su pokazala da su suve biomase biljaka statistički značajno niže od suvih biomasa u KFP.

Tabela 29. Uticaj inokulacije na biomasu (g) i dužinu korena (cm) crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) u deposolu I

Tretman	Biomasa (g)			Dužina korena (cm)
	I košenje	II košenje	III košenje	
<i>S. liquefaciens</i> Z-I ARV	1,03±0,12 ^{bc}	0,85±0,09 ^{bc}	0,60±0,09 ^a	8,63±2,86 ^d
<i>E. adhaerens</i> 10 ARV	0,80±0,13 ^{ab}	0,47±0,10 ^a	0,72±0,03 ^a	6,87±1,07 ^{bc}
<i>B. amyloliquefaciens</i> D5 ARV	1,33±0,21 ^c	1,07±0,19 ^c	0,77±0,06 ^a	7,15±1,48 ^c
<i>P. putida</i> P1 ARV	1,07±0,19 ^{bc}	0,89±0,09 ^c	0,80±0,23 ^a	5,73±1,30 ^a
MIX	0,74±0,10 ^{ab}	0,53±0,08 ^{ab}	0,61±0,17 ^a	6,02±1,46 ^{ab}
KDG	0,67±0,06 ^a	0,50±0,03 ^{ab}	0,69±0,08 ^a	6,26±1,43 ^{abc}
KFP	2,14±0,19 ^d	1,69±0,10 ^d	4,23±0,44 ^b	12,03±2,63 ^e
LSD _{0,01}	0,351			0,896

(MIX) inokulum sačinjen od *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV; (KDG) Kontrola u deposolu I; (KFP) Kontrola u Floradur®Plant Universal supstratu;

Vrednosti prikazane u istoj koloni označene različitim slovima se značajno statistički razlikuju ($p < 0,001$) prema LSD testu, $n=3$

Poređenje dužina korena biljaka inokuliranih sa *S. liquefaciens* Z-I ARV sa KDG pokazuje da je inokulacija dovela do značajne stimulacije rasta korena ($p < 0,01$). Dužine korena biljaka inokuliranih ostalim inokulumima se nisu statistički značajno razlikovale od KDG. Dužina korena inokuliranih biljaka je statistički značajno manja u odnosu na KFP.

Rezultati predstavljenih ogleda pokazuju veću sposobnost odabranih PGPB da stimulišu rast biljaka u deposolu I u odnosu na deposol II. Ovi rezultati ukazuju da ispitivani izolati mogu ispoljiti stimulativan efekat na rast biljaka u zemljištima sa visokim sadržajem organskih zagađivača i na taj način interakcija biljaka-mikroorganizama se može iskoristiti u bioremedijaciji ovih zemljišta.

U deposolu II, koji je okarakterisan kao siromašan supstrat, izolati su pokazali stimulativan efekat samo u dvonedeljnim ogledima, dok je u dužem vremenskom periodu taj efekat izostao. Ovo ukazuje na potrebu popravljivanja karakteristika deposola II, pre svega kroz unos organske materije. Iako je u literaturi zabeleženo da siromašni supstrati podstiču ispoljavanje PGP efekata u punom izrazu (Egamberdieva, 2007), ipak

ovakvi uslovi mogu biti i uzrok antagonizma između biljaka i bakterija koje se bore za iste hranljive elemente.

U oglecima sa crvenom detelinom izolat *P. putida* P1 ARV je stimulativno uticao na rast biljaka, a u ogledu sa deposolom II efekat je vidljiv samo kroz parametar visine biljaka. Pri rastu u deposolu I ovaj izolat je uticao na biomasu biljke uvećavši ukupan prinos crvene deteline za 48% (Tabela 29). Slične efekte inokulacije sa predstavnicima roda *Pseudomonas* su zabeležili i drugi autori. Almaghrabi et al. (2013) su zabeležili stimulativan uticaj *P. putida* na biomasu 45 dana starih biljka paradajza. *Pseudomonas* sp. je pokazao stimulativan efekat na produkciju biomase korena pšenice, biomasu šećerne repe i spanaća (Çakmakçi et al., 2006).

Pored ovog izolata u ogledu sa deposolom I i izolat *B. amyloliquefaciens* D5 ARV je stimulativno uticao na rast biljaka i biomasa je povećana za 70% (Tabela 29). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima inokulacije slačice (*Sinapis alba* L.), pšenice (*Triticum vulgare* L.) i crvene dateline (*Trifolium pretense* L.) sa *B. amyloliquefaciens* (Grafik 6). Almaghrabi et al. (2013) su zabeležili stimulativan uticaj *B. amyloliquefaciens* na produkciju biomase paradajza. Stimulativan uticaj *B. amyloliquefaciens* je ispoljen kroz porast visine biljaka, suve mase nadzemnog dela i količine dobijenog semena (Sharma et al., 2013). Dawwam et al. (2013) su zabeležili stimulativan uticaj inokulacije sa *B. cereus* p31 na rast slatkog krompira. Nakon mesec dana ovaj izolat je doveo do povećanja visine nadzemnog dela za 87% i biomase nadzemnog dela za 39%. Predstavnik *Bacillus* roda korišćen u ovom radu, izolat *B. amyloliquefaciens* D5 ARV, takođe je pokazao stimulativan uticaj na crvenu detelinu gajenu u deposolu I, povećavši, nakon mesec dana od inokulacije, biomasu nadzemnog dela za 99%, a visinu za 24% u odnosu na neinokulisanu negativnu kontrolu. Literaturni podaci, takođe, navode stimulativni uticaj *Bacillus* sp. na povećanje prinosa pirinča, šećerne repe, pšenice i kukuruza (Çakmakçi et al., 2006).

Inokulacija sa *S. liquefaciens* Z-I ARV je stimulisala razvoj korena crvene deteline gajene u deposolu I. Efekat na rast korena u kontaminiranom supstratu je pokazao i izolat *Serratia* sp. SY5 koji je značajno stimulisao njegov rast i produkciju biomase pri povećanoj koncentraciji kadmijuma (Koo i Cho, 2009).

U tromesečnom ogledu sa crvenom detelinom u deposolu I inokulacija sa *E. adhaerens* 10_ARV je povećala biomasu za 67%. Istraživanja sa predstavnicima roda

Ensifer ukazuju stimulativan uticaj na pojavu nodula na korenu soje, biomasu nadzemnog dela i sadržaj azota u tkivima (Kaur et al., 2014). Ovi autori su, takođe, primetili i postojanje varijacija u stepenu efikasnosti između testiranih *Ensifer* sp. izolata.

Bakterijski inokulanti mogu doprineti povećanju efikasnosti agronomske proizvodnje kroz smanjenje troškova proizvodnje i smanjenje zagađenja životne sredine, a efikasni inokulati mogu smanjiti upotrebu mineralnih đubriva (Souza et al 2015). Sa tog aspekta inokulacija je jedna od najvažnijih održivih praksi u poljoprivrednoj proizvodnji, a mikroorganizmi postaju ključ ekološke strategije za integrisano upravljanje nutrijentima, sprečavanje bolesti i štetočina, u cilju smanjenja upotrebe hemikalija u poljoprivredi (Bhattacharyya et al., 2016).

Efekti interakcije biljaka sa testiranim izolatima u ovim istraživanjima su različiti. Efikasnost inokulacije zavisi od karakteristika inokulanta, ali na uspeh inokulacije snažno utiče i sastav korenskih eksudata kao i sposobnost bakterijske kolonizacije korena (Souza et al., 2015) što doprinosi ispoljavanju različitih efekata u odnosu na biljnu vrstu. Dobijeni rezultati u ovim istraživanjima su u skladu sa rezultatima drugih istraživača koji ukazuju na to da efekti PGPB zavise od prirode samog izolata, njegove populacije, koncentracije inokuluma, ali i interakcije biljka-bakterija (Dobbelaere et al.; 2002; Sahin et al., 2004; Çakmakçı et al., 2006). Zdravlje zemljišta, tip zemljišta, sadržaj nutrijenata, toksične koncentracije metala, vlažnost zemljišta, mikrobni diverzitet, kao i poremećaji u zemljištu uzrokovani njegovim upravljanjem su važani faktori koji utiču na efikasnost inokulacije (Souza et al., 2015).

U cilju dobijanja i primene efikasnog bioinokulanta u ekoremedijacionim tehnologijama treba uzeti u obzir brojne faktore. Detaljna proučavanja složenih interakcija bakterija stimulatora biljnog rasta mogu doprineti boljem razumevanju interakcija biljka-zemljište (Weidner et al., 2015).

5.11.2. Uticaj inokulacije PGP bakterijama na rast drvenastih vrsta

In vivo eksperimenti sa drvenastim vrstama su trajali osam meseci, kao supstrat korišćen je deposol II, a cilj ovih istraživanja je ispitivanje uticaja inokulacije PGP izolatima na rast odabranih drvenastih vrsta (Slika 16). U ovom ogledu je praćen efekat mešanog bakterijskog inokuluma (*S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV) na rast bagrema (*Robinia pseudoacacia* L.), platana (*Platanus x acerifolia* (Aiton) Willd.), belog bora (*Pinus sylvestris* L.) i smrče (*Picea abies* L. Karst).

Rodovi *Picea* i *Pinus* su među najčešćim predstavnicima drvenastih vrsta sa kojima su vršeni ovakvi eksperimenti (Chanway, 1997; Mafia et al., 2009; Anand et al., 2013). Tako su istraživanja Barriuso et al. (2008) ukazala da inokulacija PGPB *Pinus pinea* doprinosi poboljšanju rasta biljke i boljoj stopi preživljavanja sadnica što predstavlja značajan potencijal u pošumljavanju. O uticaju PGPB na rast bagrema nema puno podataka (Hao et al., 2012), a beli bor i bagrem su među najčešćim vrstama korišćenim u rekultivaciji deposola RB Kolubara (Rakić et al., 2011).



Slika 16. Uticaj inokulacije mešanim inokulumom na rast bagrema (*Robinia pseudoacacia* L.), platana (*Platanus x acerifolia* (Aiton) Willd.), belog bora (*Pinus sylvestris* L.) i smrče (*Picea abies* L. Karst) u deposolu II; sadnice na početku ogleda (levo) i sadnice u vreme prvog merenja (desno)

Bagrem (*Robinia pseudoacacia* L.) je pionirska vrsta koja traži peskovito i rastresito zemljište, ne podnosi vlagu, hladovinu i glinovito tlo. Veoma je otporna vrsta pogodna za sprečavanje erozije, rekultivaciju, fitremedijaciju (Monfared et al., 2013). Istraživanja Ahn et al. (2007) su pokazala da inokulacija sa mikroorganizmima koji imaju PGP sposobnosti može doprineti brzjoj revegetaciji nepolodnih zemljišta i goleti.

Sadnice korišćene za postavljanje ogleda su bile uniformne i odlikovale su se istim visinama i prečnicima vrata korena (Tabela 30). Najveća visina biljaka izmerena u julu je zabeležena kod inokulisanih sadnica (61,13 cm). Njihovo poređenje sa KDP pokazuje da su inokulisane sadnice značajno više ($p < 0,05$). Poređenje sa KFP pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u visinama sadnica.

Najveća visina izmerena u oktobru je, takođe, zabeležena kod inokulisanih sadnica (76,65 cm). Rezultati drugog merenja pokazuju da su inokulisane sadnice statistički značajno više od KDP. Visina inokulisanih sadnica se statistički značajno ne razlikuje od visina u KFP.

Prečnik vrata korena inokulisanih sadnica izmeren u julu i oktobru se statistički značajno ne razlikuje od kontrolnih sadnica u KDP. Poređenje sa KFP pokazuje da je prečnik vrata korena inokulisanih sadnica, u oba merenja značajno manji (Tabela 30).

Tabela 30. Uticaj inokulacije na visinu (cm) i prečnik vrata korena (cm) bagrema (*Robinia pseudoacacia* L.)

Mesec	Visina (cm)			Prečnik vrata korena (cm)		
	Februar	Jul	Oktobar	Februar	Jul	Oktobar
Tretman						
D+B	32,17±6,37 ^a	61,13±8,04 ^b	76,65±11,99 ^b	0,51±0,12 ^a	0,68±0,15 ^a	0,92±0,16 ^a
KDP	31,09±7,50 ^a	47,26±10,59 ^a	64,61±13,79 ^a	0,55±0,13 ^a	0,67±0,14 ^a	0,84±0,18 ^a
KFP	32,48±6,74 ^a	58,90±8,98 ^b	72,05±8,10 ^b	0,57±0,23 ^a	0,83±0,23 ^b	1,04±0,18 ^b
LSD _{0,05}	5,966			0,107		

(D+B) deposol II sa mešanim inokulumom odabranih izolata; (KDP) Kontrola u deposolu II; (KFP) Kontrola u Floradur®Plant Universal substratu. Rezultati su izraženi kao prosek ± standardna devijacija. U tabeli su prikazane i vrednosti najmanje značajne razlike na nivou 5%; n = 20

Platan (*Platanus x acerifolia* (Aiton) Willd.) je vrsta koja nema posebnih zahteva prema osobinama zemljišta. Otporna je na niske temperature, sušu, otrovne gasove i prašinu. Prilagođava se ograničenom prostoru za razvoj korena i nezaobilazan je deo zelenila gradova Severne Amerike i Evrope. Pored ove namene pogodna je i za rekultivaciju i za fitoremedijaciju (Skousen i Zipper 2014; Kang et al., 2016).

Sadnice korišćene za postavljanje ogleda su se odlikovale istim visinama i prečnicima vrata korena (Tabela 31). Poređenje visina inokulisanih biljaka, izmerenih u julu mesecu, sa KDP pokazuje da su inokulisane sadnice značajno više na nivou značajnosti od 0,05 ukazujući na stimulativan efekat inokulacije. Visine inokulisanih biljaka se nisu statistički značajno razlikovale od biljaka u KFP.

Rezultati merenja izvršenog u oktobru pokazuju da su inokulisane biljke statistički značajno više od KDP. Tada je visina inokulisanih sadnica bila statistički značajno niža od visina sadnica u KFP.

Prečnik vrata korena inokulisanih sadnica je statistički značajno veći od prečnika kontrolnih sadnica u KDP. Poređenje sa KFP pokazuje da je prečnik vrata korena inokulisanih sadnica značajno manji (Tabela 31).

Tabela 31. Uticaj inokulacije na visinu (cm) i prečnik vrata korena (cm) platana (*Platanus x acerifolia* (Aiton) Willd.)

Mesec	Visina (cm)			Prečnik vrata korena (cm)		
	Februar	Jul	Oktobar	Februar	Jul	Oktobar
Tretman						
D+B	19,98±4,31 ^a	37,00±5,11 ^b	42,60±4,88 ^b	0,30±0,05 ^a	0,57±0,07 ^b	0,68±0,07 ^b
KDP	19,33±3,55 ^a	28,43±5,03 ^a	32,33±4,65 ^a	0,27±0,07 ^a	0,40±0,08 ^a	0,47±0,08 ^a
KFP	19,35±4,12 ^a	39,55±6,05 ^b	47,43±5,98 ^c	0,30±0,04 ^a	0,71±0,15 ^c	0,77±0,13 ^c
LSD _{0,05}	3,105			0,056		

(D+B) deposol II sa mešanim inokulumom odabranih izolata; (KDP) Kontrola u deposolu II; (KFP) Kontrola u Floradur®Plant Universal supstratu. Rezultati su izraženi kao prosek ± standardna devijacija. U tabeli su prikazane i vrednosti najmanje značajne razlike na nivou 5%; n = 20

Uticaj inokulacije na visinu i prečnik vrata korena je praćen i na dvogodišnjim sadnicama belog bora (*Pinus sylvestris* L.). Ovo je pionirska vrsta koja podnosi širok spektar klimatskih i zemljišnih uslova. Najbolji rast pokazuje na peskovitim i šljunkovitim zemljištima. Koristi se za stabilizaciju peskovitih supstrata, rekultivaciju i fitoremedijaciju (Placek et al., 2016).

Sadnice korišćene za postavljanje oglada su se odlikovale uniformnim visinama i prečnicima vrata korena (Tabela 32). Poređenje visina inokulisanih biljaka izmerenih u julu i oktobru, sa KDP pokazuje da ne postoje statistički značajne ($p < 0,05$). Poređenje sa KFP takođe pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u visinama sadnica izmerenim u julu i oktobru.

Prečnik vrata korena inokulisanih sadnica izmeren u julu i oktobru (Tabela 32) se statistički značajno ne razlikuje od KDP kao ni od sadnica u KFP.

Tabela 32. Uticaj inokulacije na visinu (cm) i prečnik vrata korena (cm) belog bora (*Pinus sylvestris* L.)

Mesec	Visina (cm)			Prečnik vrata korena (cm)		
	Februar	Jul	Oktobar	Februar	Jul	Oktobar
Tretman						
D+B	9,05±1,78 ^a	16,88±3,42 ^a	18,63±2,86 ^a	0,29±0,09 ^a	0,41±0,10 ^a	0,49±0,10 ^a
KDP	8,33±2,27 ^a	14,90±3,04 ^a	17,90±2,77 ^a	0,24±0,09 ^a	0,34±0,10 ^a	0,43±0,13 ^a
KFP	7,98±2,41 ^a	15,68±4,68 ^a	17,40±4,60 ^a	0,26±0,11 ^a	0,39±0,14 ^a	0,42±0,14 ^a
LSD _{0,05}	2,042			0,071		

(D+B) deposol II sa mešanim inokulumom odabranih izolata; (KDP) Kontrola u deposolu II; (KFP) Kontrola u Floradur®Plant Universal supstratu. Rezultati su izraženi kao prosek ± standardna devijacija. U tabeli su prikazane i vrednosti najmanje značajne razlike na nivou 5%; n = 20

Uticaj inokulacije PGPB konzorcijumom je praćen i na smrči (*Picea abies* L. Karst). Ova vrsta podnosi kiselo zemljište dok joj suva, siromašna zemljišta i zagađen vazduh ne pogoduju. Pored upotrebe u šumarstvu interesantna je za primenu u fitoremedijaciji (Placek et al., 2016) i jedna je od drvenastih vrsta na kojima je najčešće ispitivan uticaj inokulacije PGP bakterijama.

Za postavljanje oglada korišćene su sadnice koje su se odlikovale uniformnim visinama i prečnicima vrata korena (Tabela 33). Poređenje visina inokulisanih biljaka izmerenih u julu i oktobru sa KDP pokazuje da ne postoje statistički značajne razlike

($p < 0,05$). Visina inokuliranih sadnica izmerena u julu i oktobru mesecu je bila statistički značajno niža od visine sadnica u KFP.

Prečnik vrata korena inokuliranih sadnica izmeren u julu (0,34 cm) se statistički značajno nije razlikovao prečnika zabeleženih u KDP. U oktobru mesecu, prečnik vrata korena inokuliranih biljaka je bio statistički značajno niži od KDP. Poređenje sa KFP pokazuje da se prečnik vrata korena inokuliranih sadnica značajno ne razlikuje u julu i oktobru.

Tabela 33. Uticaj inokulacije na visinu (cm) i prečnik vrata korena (cm) smrče (*Picea abies* L. Karst)

Mesec	Visina (cm)			Prečnik vrata korena (cm)		
	Februar	Jul	Oktobar	Februar	Jul	Oktobar
Tretman						
D+B	17,13±2,40 ^a	20,65±3,65 ^a	22,10±2,45 ^a	0,27±0,08 ^a	0,34±0,08 ^a	0,38±0,08 ^a
KDP	17,25±4,90 ^a	21,98±5,95 ^{ab}	22,85±4,84 ^a	0,28±0,11 ^a	0,37±0,13 ^a	0,45±0,13 ^b
KFP	17,75±4,59 ^a	23,70±4,32 ^b	26,50±4,11 ^b	0,30±0,12 ^a	0,39±0,11 ^a	0,41±0,13 ^{ab}
LSD _{0,05}	2,703			0,069		

(D+B) deposol II sa mešanim inokulumom odabranih izolata; (KDP) Kontrola u deposolu II; (KFP) Kontrola u Floradur®Plant Universal supstratu. Rezultati su izraženi kao prosek ± standardna devijacija. U tabeli su prikazane i vrednosti najmanje značajne razlike na nivou 5%; n = 20

Na kraju oglada, pored visine i prečnika vrata korena, izmerena je i suva biomasa nadzemnog dela (Tabela 34) i korena (Tabela 35).

Tabela 34. Uticaj inokulacije na biomasu nadzemnog dela (g) sadnica

Vrsta	Tretman			LSD _{0,05}
	D+B	KDP	KFP	
<i>Robinia pseudoacacia</i>	10,83±3,18 ^b	8,91±3,04 ^a	13,65±2,21 ^c	1,801
<i>Platanus x acerifolia</i>	4,34±0,65 ^b	2,47±0,98 ^a	7,28±3,46 ^c	1,336
<i>Pinus sylvestris</i>	3,60±0,82 ^c	2,73±1,36 ^b	2,05±0,86 ^a	0,660
<i>Picea abies</i>	3,17±1,20 ^a	3,7±1,92 ^a	6,54±2,79 ^b	1,312

(D+B) deposol II sa mešanim inokulumom odabranih izolata; (KDP) Kontrola u deposolu II; (KFP) Kontrola u Floradur®Plant Universal supstratu. Rezultati su izraženi kao prosek ± standardna devijacija. U tabeli su prikazane i vrednosti najmanje značajne razlike na nivou 5%; n=20

Poređenje suvih biomasa nadzemnog dela sadnica bagrema, platana i belog bora sa KDP pokazuje da je biomasa inokulisanih sadnica statistički značajno veća što ukazuje na stimulativan efekat mešanog inokuluma. Biomasa inokulisanih sadnica bagrema i platana je bila značajno manja od biomase u KFP. Biomasa inokulisanih sadnica bora je bila značajno veća od biomase u KFP.

Suva biomasa nadzemnog dela sadnica smrče se nije statistički značajno razlikovala od kontrole u KDP dok je u odnosu na KFP bila statistički značajno niža.

Jedan od parametara rasta koji je služio kao pokazatelj uticaja inokulacije je biomasa korena (Tabela 35).

Tabela 35. Uticaj inokulacije na biomasu korena (g) sadnica

Vrsta	Tretman			F test	LSD _{0,05}
	D+B	KDP	KFP		
<i>Robinia pseudoacacia</i>	6,40±2,90 ^a	5,53±1,72 ^a	15,06±9,01 ^b	$p<0,001$	3,493
<i>Platanus x acerifolia</i>	2,35±0,94 ^b	1,23±0,91 ^a	3,73±2,69 ^c	$p<0,001$	1,091
<i>Pinus sylvestris</i>	3,31±1,28 ^a	2,97±1,38 ^a	2,10±1,99 ^a	$p=0,053$	Nije značajno
<i>Picea abies</i>	1,16±0,60 ^a	2,56±2,09 ^a	6,30±3,45 ^b	$p<0,001$	1,488

(D+B) deposol II sa mešanim inokulumom odabranih izolata; (KDP) Kontrola u deposolu II; (KFP) Kontrola u Floradur®Plant Universal supstratu. Rezultati su izraženi kao prosek ± standardna devijacija. U tabeli su prikazane i vrednosti najmanje značajne razlike na nivou 5%; n = 20

Poređenje suvih biomasa korena inokulisanih biljaka bagrema, bora i smrče sa KDP pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika. Suve biomase korena inokulisanih sadnica bagrema, platana i smče su statistički značajno niže od KFP. Kod sadnica platana, biomasa korena inokulisanih biljaka je bila značajno veća u odnosu na KDP.

Kao i u ogledima sa ratarskim kulturama tako i rezultati dobijeni u ovim ogledima pokazuju različite efekte inokulacije na rast biljaka. Inokulacija bagrema sa PGPB stimulatивно je uticala na visinu biljaka i biomasu i dovela do povećanja težine nadzemnog dela za 20%. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Hajnal-Jafari et al. (2014) koji su utvrdili da je inokulacija bagrema sa *Azotobacter chroococcum* nakon 180 dana dovela do povećanja visine sadnica. Hao et al. (2012) su zabeležili porast

dužine i težine nadzemnog dela i korena sadnica bagrema nakon samo 45 dana od inokulacije sa PGP *Agrobacterium tumefaciens*.

Najbolji efekat inokulacije je zabeležen kod platana gde je došlo do stimulacije svih parametara rasta. Poređenje inokulisanih i neinokulisanih sadnica platana gajenih u deposolu II pokazuje da je inokulacija uticala na porast biomase nadzemnog dela (75%) i korena (90%). Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima o uticaju PGPB na listopadne vrste. Rodriguez-Barrueco et al. (1991) su zabeležili 90% povećanje biomase hrasta inokulisanog sa *Azospirillum brasilense*. Karlidag (2007) je uočio da inokulacija jabuke sa *Bacillus* sp. i *Microbacterium* sp. dovodi do većeg prirasta sadnica. *Azotobacter chroococcum* je stimulisao rast sibirskog bresta (*Ulmus pumila*) dovodeći do povećanja visine i većeg prečnika vrata korena u odnosu na neinokulisane biljke. Inokulacija srebrnolisnog javora (*Acer dasycarpum*) neznatno je uticala na povećanje visine (5%) ali je prečnik vrata korena bio veći za 93% (Hajnal-Jafari et al., 2014). Inokulacija sadnica breze sa *Mesorhizobium* sp. je nakon sedam meseci ogleda dovela do povećanja biomase za 60% (Sousa et al., 2015). Rostamikia et al. (2016) su pokazali stimulativno dejstvo mešanog inokuluma *P. putida*, *B. subtilis* i *E. cloacae* na sadnice leske. Primenjeni inokulum je doveo do porasta visine sadnica za 57,19% i prečnika vrata korena za 49,48%. Kod sadnica platana primena mešanog inokulum je u većoj meri stimulisala rast u širinu povećavši prečnik vrata korena za 45% dok je visina nadzemnog dela povećana za 32% u odnosu na neinokulisanu kontrolu.

Inokulacija belog bora je dovela do povećanja biomase nadzemnog dela za 30%, dok na ostale parametre rasta nije uticala. Slični rezultati su zabeleženi nakon inokulacije belog bora sa konzorcijumom *Azotobacter chroococcum* i nekoliko predstavnika *Bacillus* sp. (Gujaničić et al., 2012) gde je inokulacija dovela do porasta biomase korena za 25%.

Odgovarajući inokulum primenjen na četinarske vrste može dati veoma dobre rezultate. Tako je inokulacija *Pinus pinea* sa *B. pumilus* i *B. licheniformis* dovela je do povećanja ukupne biomase za 83%, odnosno, za 145% nakon pet meseci gajenja. Zanimljivo je da su sadnice izložene mešanom inokulumu ova dva soja pokazale nešto niži prinos biomase (71%), kao i manju visinu, površinu korena i nadzemnog dela u odnosu na pojedinačne inokulate (Probanza et al., 2002). Do drugačijih rezultata su došli Bent et al. (2001) koji su primetili da *Pseudomonas fluorescens* M20 i

Paenobacillus polymyxa L6 daju slične rezultate bilo da su primenjeni pojedinačno ili u mešanom inokulumu na *Pinus contorta*.

U cilju utvđivanja efekata inokulacije na rast sadnica gajenih u supstratu siromašnom azotom Anand i Chanway (2013) su inokulisali *Thuja plicata* sa *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R. Nakon 13 meseci gajenja zabeležili su porast biomase nadzemnog dela za 46%. Slični rezultati su dobijeni i nakon inokulisanja *Pinus contorta* istim izolatom (Anand et al., 2013) što je u skladu sa rezultatima ove studije. Supstrat u kom su biljke gajene nije sterilisan i ispoljavanje stimulativnog efekta primenjenog inokuluma četiri i osam meseci po postavljanju oglada potvrđuje sposobnost izolata da se prilagode uslovima konkretne niše i izbore za svoje mesto sa prisutnim mikrobnim populacijama. Ipak, poređenje rezultata postignutih inokulacijom sa parametrima rasta sadnica koje su predstavljale pozitivnu kontrolu pokazuje da iako je inokulacija u većini slučajeva stimulisala biljni rast, to nije bilo dovoljno za postizanje efekata koje obezbeđuje supstrat optimalnog sadržaja nutrijenata.

Na posmatrane parametre rasta sadnica smrče, inokulacija mešanim inokulumom nije uticala stimulatивно i biomasa inokulisanih biljaka je smanjena za 30%. Za razliku od mešanog inokuluma korišćenog u našim istraživanjima, Chanway et al. (2000) su zabeležili pozitivan uticaj *Bacillus polymyxa* S20-R na jednogodišnje sadnice hibridne smrče (*Picea glauca x engelmannii*). U ovom slučaju je, nakon 17 meseci oglada u polju, biomasa sadnica povećana za 82%. Međutim, inokulacija istih sadnica sa *Pseudomonas fluorescens* Sw1-RN rezultirala je smanjenjem biomase biljke za 31%, što je efekat sličan zabeleženom u našem ogledu. Rezultati oglada predstavljenih u ovoj disertaciji kao i rezultati Chanway et al. (2000) naglašavaju važnost odabira adekvatnog inokuluma. Jedan od razloga izostanka stimulativnog efekta pri inokulaciji smrče i rasta u siromašnim supstratima leži i u činjenici da ova vrsta ne podnosi siromašne supstrate.

Rezultati predstavljenih *in vivo* oglada pokazuju različit uticaj inokulacije na drvenaste vrste što je u skladu sa literaturnim podacima. Inokulacija platana dovela je do stimulacije rasta. Inokulacija smrče PGPB se negativno odrazila na biljni rast. Faktori koji utiču na efekte inokulacije su brojni (biljna vrsta, genotip biljke, faza rasta, supstrat, interakcija biljka-bakterija, uslovi životne sredine itd.) i moraju biti uzeti u obzir kako bi postignuti efekti bili optimalni. Za uspostavljanje i održavanje PGP

efekata neophodno je da unete bakterije imaju sposobnost razmnožavanja i uspostavljanja svojih populacija u konkretnim uslovima. Na ovu sposobnost u velikoj meri utiče tip zemljišta, njegove odlike, prisutne biljne vrste i autohtona mikroflora (Vieira i Nahas, 2005; Çakmakçi et al., 2006).

Predstavnici autohtone mikroflore modifikuju efekte PGPB. Bent i Chanway (1998) su zabeležili da je sposobnost *Paenobacillus polymyxa* Pw-2 da stimuliše rast *Pinus contorta* znatno umanjena ukoliko je u supstratu prisutan zemljišni izolat *Curtobacterium flaccumfaciens* PF322. Prisustvo ovog izolata nije uticalo na efekte inokulacije sa *Paenobacillus polymyxa* L6. Efekti PGPB mogu biti znatno umanjeni u prisustvu neke druge rizobakterije i PGPB predstavnika (Bent et al., 2001). Ovakva zapažanja su zabeležena u nekoliko studija (Chiarini et al., 1998; Siciliano i Germida, 1998; Bent et al., 2001) koje pokazuju da kombinacija PGPB ne mora nužno dovesti do sinergističkih već i do kompetitivnih odnosa.

Chanway et al. (2000) napominju da efikasnost PGPB u stimulaciji rasta drvenastih vrsta može zavisi i od osobina krajnje lokacije i da se odnosi između PGPB izolata i mesta presađnje moraju uzeti u obzir. Pravilan izbor bakterijskog inokuluma može rezultirati stimulacijom rasta biljke i u drugoj godini po inokulaciji (Chanway et al., 2000).

Upotreba pesticida i mineralnih đubriva je nezaobilazna kako u poljoprivredi tako i u rasadnicima koji se bave proizvodnjom šumskog i hortikulturnog sadnog materijala. Ekonomski i ekološki aspekt ovih mera su naglasili potrebu za alternativnim rešenjem. Inokulacija šumskih sadnica PGPB pre presađnje na konačno odredište se smatra jeftinom, lakom procedurom koja smanjuje upotrebu hemijskih sredstava, povećava kvalitet sadnica, sposobnost adaptacije na nove uslove sredine, stepen njihovog preživljavanja i otpornost na (a)biotičke stresove (Chanway 1997, Dominguez-Nuñez et al., 2015).

Biljno-mikrobne interakcije u rizosferi su determinante zdravlja biljaka, njihove produktivnosti i plodnosti zemljišta (Souza et al., 2015). Bakterije stimulatori biljnog rasta mogu poboljšati rast biljaka i zaštititi ih od bolesti i abiotičkih stresova kroz širok spektar mehanizama. Rezultati ovih istraživanja ukazuju na to da odabrani izolati, kao što je mešani inokulum za inokulaciju platana u siromašnom supstratu, kao što je deposol iz RB Kolubara doprinosi bržem biološkom oporavku površina na kojima se

ovaj supstrat nalazi. Različiti efekti inokulacije biljaka dobijeni u ogledima u okviru ove disertacije ističu specifičnost odnosa biljka-bakterija i potvrđuju činjenicu da ne postoji univerzalan inokulum. Proučavanje osobina PGPB pokazuje da ova grupa rizosfernih bakterija poseduje ogroman potencijal za rešavanje brojnih problema savremenog društva. One predstavljaju alternativu mineralnim đubrivima i pesticidima, smanjuju negativne posledice abiotičkih stresova i ubrzavaju fitoremedijaciju. Nova saznanja vezana za osobine i efekte PGPB šire krug njihove primene od poljoprivrede ka šumarstvu, hortikulturi i ekoremedijacionim tehnologijama.

Buduća istraživanja u ovoj oblasti, bazirana na molekularnom i biotehnološkom pristupu, doprineće povećanju naših znanja o biologiji rizosfere i tako pomoći integrisanom upravljanju mikrobnim zemljišnim populacijama. Korišćenje bioinokulanata, pojedinačnih izolata ili mešanih populacija može biti efikasan pristup za smanjenje štetnog uticaja stresa na rast biljaka, povećanje prinosa ali i ekonomski i ekološki opravdan pristup u remedijaciji oštećenih ekosistema. Sve ovo u velikoj meri doprinosi boljem razumevanju interakcija na relacijama biljka – zemljište - mikrobne zajednice.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata eksperimentalnih istraživanja može se zaključiti sledeće:

1. Osnovne hemijske analize zemljišta su pokazale razlike među ispitivanim zemljištima u pogledu pH vrednosti, sadržaja humusa, pristupačnih formi azota, fosfora i kalijuma. Poljoprivredno, šumsko zemljište i deposol I se odlikuju visokim sadržajem humusa, dok se deposol II odlikuje niskim sadržajem. Za razliku od ostalih zemljišta, deposol II se odlikuje niskim sadržajem N, P, K.

2. Na osnovu mikrobioloških analiza zemljišta može se zaključiti da su na brojnost bakterija, gljiva, aktinomiceta, ukupnih i sporogenih amonifikatora i slobodnih azotofiksatora, uticale hemijske karakteristike zemljišta, antropogeni faktori i prisustvo biljnog pokrivača. Najveća brojnost mikroorganizama je zabeležena u poljoprivrednom zemljištu, koje se odlikuje visokim sadržajem humusa, alkalnom reakcijom sredine, pokriveno je vegetacijom i koristi se u organskoj poljoprivrednoj proizvodnji. Najmanja brojnost je u deposolu II, koji se odlikuje niskim sadržajem humusa, odsustvom vegetacije i nastao je kao rezultat rudarske aktivnosti.

3. Iz ispitivanih uzoraka zemljišta formirana je kolekcija od 40 izolata, po sedam iz poljoprivrednog i šumskog zemljišta, četrnaest iz deposola I i dvanaest iz deposola II.

4. Od izolata koji su činili kolekciju, 38 je posedovalo bar jedno PGP svojstvo. Najzastupljeniji mehanizmi direktne stimulacije rasta ispitivanih izolata su bili produkcija amonijaka i indol-3-sirćetne kiseline što ukazuje na to da veliki broj izolata utiče direktnim mehanizmima na rast biljaka.

5. Testiranje antagonističke aktivnosti izolata je pokazalo da među izolatima koji čine kolekciju postoje izolati sa visokom (NV5 ARV, Z-I ARV i 2T ARV) i veoma visokom (D5 ARV) antagonističkom aktivnošću prema *Botrytis cinerea* i da kao takvi predstavljaju potencijalne biokontrolne agense. Svi izolati iz kolekcije su pokazali nizak stepen inhibicije rasta *Pythium aphanidermatum*.

6. Ispitivani izolati su se razlikovali u odnosu na biohemijske karakteristike. Izolati koji su inhibirali rast *B. cinerea* za ≥ 50 % su pokazali sposobnost da proizvode litičke enzime. Izolat NV5 ARV, visoke antagonističke aktivnosti prema *B. cinerea*, pored aktivnosti proteaze pokazao je i sposobnost produkcije HCN. Izolat Z-I ARV, visoke antagonističke aktivnosti, proizvodio je lipazu, β -glukozidazu, N-acetil- β -

glukozaminidazu i proteazu. Izolat 2T ARV pokazao je visoku antagonističku aktivnost prema *B. cinerea*, ali nije produkovao nijedan od testiranih litičkih enzima, pa je moguće da ispoljava neki dodatni mehanizam delovanja (kompeticija, produkcija antibiotika). Veoma visoku antagonističku aktivnost je pokazao izolat D5 ARV koji je produkovao proteazu i celulazu.

7. Na osnovu direktnih i indirektnih mehanizama za dalja istraživanja odabrani su PGP izolati Z-I ARV; 2T ARV; 333 ARV; 10_ARV; NV5 ARV; D5 ARV; P1 ARV i T10 ARV koji su imali sposobnost kolonizacije površine semena slačice (*Sinapis alba* L.), pšenice (*Triticum vulgare* L.), crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) i suncokreta (*Helianthus annuus* L.). Najveću prosečnu brojnost su imali izolati P1 ARV ($1,76 \times 10^8$ CFU) i Z-I ARV ($1,3 \times 10^8$ CFU). Svi izolati su pokazali sposobnost kolonizacije površine korena biljaka, a najveću prosečnu brojnost su imali P1 ARV i Z-I ARV ($3,21 \times 10^9$, odnosno $1,92 \times 10^9$ CFU g⁻¹). Testirani izolati su pokazali sposobnost endofitne kolonizacije korena slačice, pšenice, crvene deteline i suncokreta. Najveću prosečnu brojnost su imali izolati 10_ARV ($6,8 \times 10^4$ CFU g⁻¹), P1 ARV (3×10^4 CFU g⁻¹), Z-I ARV ($1,3 \times 10^4$ CFU g⁻¹) i 2T ARV ($1,1 \times 10^4$ CFU g⁻¹). Brojnost izolata na površini semena i korena i u unutrašnjosti korena je varirala u zavisnosti od biljne vrste i izolata. Brojnost PGP izolata u unutrašnjosti korena je niža od brojnosti na površini korena. Sposobnost kolonizacije izolata na semenu i korenu testiranih biljaka predstavlja prvi korak za uspešnu inokulaciju.

8. Biohemijska karakterizacija API20E, API20NE i API50CH testovima je omogućila identifikaciju izolata P1 ARV do nivoa vrste (*Pseudomonas putida*), izolata Z-I ARV i D5 ARV do nivoa roda (*Serratia* sp., *Bacillus* sp.) dok za izolat 10_ARV nije dobijena informacija o identifikaciji.

9. Precizna identifikacija do nivoa vrste je izvršena umnožavanjem sekvence *gyr* B gena. Molekularne metode su omogućile pouzdanu identifikaciju izolata Z-I ARV kao *Serratia liquefaciens*, 10_ARV kao *Ensifer adhaerens*, izolata D5 ARV kao *Bacillus amyloliquefaciens* i izolata P1 ARV kao *Pseudomonas putida*.

10. Testiranje odnosa odabranih PGP izolata prema ekološkim karakteristikama, pokazalo se da najveći broj izolata raste pri temperaturi od 40°C, dok *Bacillus amyloliquefaciens* D5 ARV raste i na temperaturi od 55°C. Samo je *Pseudomonas putida* P1 ARV rastao do maksimalne temperature od 35°C. Odabrani izolati su u

odnosu na pH vrednosti sredine pokazali optimalan rast pri pH od 5-9. Najšira amplituda je zabeležena kod izolata *S. liquefaciens* Z-I ARV (pH 4-10,5). Svi testirani izlati mogu da rastu pri koncentraciji NaCl od 3%. Jedini izolat koji je mogao da raste pri koncentraciji NaCl od 5% je *B. amyloliquefaciens* D5 ARV. Svi izolati tolerišu koncentraciju bakra od 10 mM. *P. putida* P1 ARV je pokazao sposobnost tolerancije 1,25 mM Cr⁶⁺. Od testiranih izolata, sposobnost tolerancije i do 5 mM kadmijuma su pokazali *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV i *P. putida* P1 ARV. Sposobnost PGPB da tolerišu povećane koncentracije teških metala ukazuje na potencijal za primenu u remedijaciji.

11. Ispitivanjem uticaja inokulacije sa odabranim izolatima PGP bakterija, na rast slačice (*Sinapis alba* L.), pšenice (*Triticum vulgare* L.), crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) i suncokreta (*Helianthus annuus* L.) u ranim fazama rasta uočeno je da uspeh inokulacije zavisi od bakterijskog izolata i testirane biljne vrste što ukazuje na značaj biljno-mikrobnih interakcija u inokulaciji. Takođe, uočen je različit uticaj u zavisnosti od ispitivanog parametra rasta. Inokulacija slačice (*Sinapis alba* L.) sa *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *P. putida* P1 ARV i *B. amyloliquefaciens* D5 ARV je statistički značajno stimulisala rast korena. Inokulacija slačice odabranim PGP izolatima i njihovim mešanim inokulumom je statistički značajno stimulisala produkciju biomase. Inokulacija slačice sa *S. liquefaciens* Z-I ARV je imala najveći uticaj na dužinu korena (3,18 cm) i ukupnu suhu biomasu (0,48 g). Inokulacija pšenice (*Triticum vulgare* L.) odabranim PGP izolatima i njihovim mešanim inokulumom je statistički značajno stimulisala visinu, dužinu korena i suhu biomasu pšenice. Najveći uticaj na produkciju biomase je imao mešani inokulum (2,47 g). Inokulacija crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) sa *S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i mešanim inokulumom je statistički značajno stimulisala visinu biljaka i dužinu korena. Inokulacija crvene deteline sa *S. liquefaciens* Z-I ARV je imala najveći uticaj na visinu (8,28 cm) i dužinu korena (5,02 cm). Inokulacija crvene deteline sa *S. liquefaciens* Z-I ARV i *E. adhaerens* 10_ARV je statistički značajno stimulisala produkciju biomase. Inokulacija suncokreta (*Helianthus annuus* L.) sa mešanim inokulumom i *B. amyloliquefaciens* D5 ARV je statistički značajno stimulisala visinu biljaka. Inokulacija odabranim PGP sojevima nije imala stimulativan efekat na dužinu korena i produkciju biomase.

12. Odabrani PGP bakterijski izolati su stimulisali rast crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) gajene u periodu od tri meseca u deposolu koji se odlikuje povećanim sadržajem organskih zagađivača (PAH, PCB i organokalajna jedinjenja). Efekti inokulacije zavise od testiranog bakterijskog izolata i praćenog parametra rasta. Takođe, razlike u efikasnosti su uočene između prvog, drugog i trećeg košenja.

Najefikasniji izolati su *S. liquefaciens* Z-I ARV, *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV, dok izolat *E. adhaerens* 10_ARV nije pokazao efikasnost. Ovi rezultati ukazuju da između izolata postoje razlike u mehanizmima stimulacije rasta biljaka. Statistički značajan uticaj inokulacije na stimulaciju rasta crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) gajene u deposolu sa visokim organskim opterećenjem ukazuje da primena izolata *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV ima veliki potencijal u ekoremedijacionim tehnologijama. Statistički značajno povećanje rasta korena (8,63 cm), kao rezultat inokulacije sa *S. liquefaciens* Z-I ARV dodatno ukazuje na značaj ovog izolata.

Ispitivani izolati su različito uticali na parametre rasta crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) gajene u deposolu sa visokim sadržajem organskih zagađivača. Tako, inokulacija crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) sa *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV statistički značajno stimuliše visinu biljaka i biomasu dok *S. liquefaciens* Z-I ARV statistički značajno stimuliše rast korena (8,63 cm). Rezultati pokazuju da uspeh inokulacije zavisi i od reakcije biljke na PGP mehanizme.

Uočene su razlike pri inokulaciji, između prvog, drugog i trećeg košenja i parametara rasta. Tako *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV statistički značajno stimulišu visinu biljaka i biomasu nakon prvog i drugog košenja dok rezultati trećeg košenja pokazuju da inokulacija crvene deteline nije stimulisala produkciju biomase. Ovi rezultati ukazuju na neophodnost nastavka istraživanja u pravcu praćenja preživljavanja inokulisanih PGPB u zemljištu, ali ukazuju i na složene interakcije između mikroorganizama-biljaka-zemljišta.

Odabrani PGP izolati nisu pokazali sposobnost stimulacije rasta crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) gajene u u deposolu iz RB Kolubara koji se odlikuje niskim sadržajem humusa, azota, fosfora i kalijuma. Ovi rezultati ukazuju da uspeh inokulacije zavisi od hemijskih karakteristika zemljišta.

13. Odabrani PGP izolati su stimulatивно uticali na rast bagrema (*Robinia pseudoacacia* L.), platana (*Platanus x acerifolia* (Aiton) Willd.) i belog bora (*Pinus sylvestris* L.). Inokulacija bagrema mešanim inokulumom PGP izolata je statistički značajno stimulisala visinu sadnica i produkciju biomase nadzemnog dela, dok je inokulacija platana statistički značajno stimulisala sve ispitivane parametre rasta (visina, prečnik vrata korena, suva biomasa nadzemnog dela, suva biomasa korena). Inokulacija belog bora mešanim inokulumom PGP izolata je statistički značajno stimulisala produkciju biomase nadzemnog dela. Inokulacija bagrema je povećala biomasu nadzemnog dela za 22%, platana za 76% i belog bora za 32%. Inokulacija mešanim inokulumom PGP izolata je stimulisala produkciju biomase korena platana za 91%. Inokulacija smrče (*Picea abies* L. Karst) mešanim inokulumom PGP izolata je negativno uticala na biljni rast i produkciju biomase, što potvrđuje ranije navode da uspeh inokulacije zavisi od kompatibilnosti biljne vrste i bakterijskog izolata.

14. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji ukazuju na moguću primenu izolata PGPB u bioremedijacionim tehnologijama zemljišta sa visokim sadržajem organskih zagađivača kao i iskorištavanja rudničkih deposola. Iskorišćavanje interakcija između crvene deteline (*Trifolium pretense*) i *B. amyloliquefaciens* D5 ARV, *P. putida* P1 ARV i *S. liquefaciens* Z-I ARV predstavlja veliki potencijal u ekoremedijaciji zemljišta sa visokim sadržajem organskih zagađivača. Takođe, porast biomase nadzemnog dela (76%) i korena (91%) platana (*Platanus x acerifolia* (Aiton) Willd.), inokulisanog sa mešanim inokulumom (*S. liquefaciens* Z-I ARV, *E. adhaerens* 10_ARV, *B.s amyloliquefaciens* D5 ARV i *P. putida* P1 ARV) pri rastu na deposolu iz RB Kolubara, ukazuje da odabrani izolati mogu doprineti bržem biološkom oporavku površina na kojima se ovaj supstrat nalazi i mogu naći primenu u revegetaciji rudničkih deposola.

Ovi rezultati ukazuju da identifikovani i okarakterisani izolati, koji ispoljavaju PGP mehanizme i imaju sposobnost kolonizacije korena biljaka predstavljaju potencijal za primenu u ekoremedijacionim tehnologijama. Takođe, formirana kolekcija bakterija sa PGP efektima može poslužiti za dalja naučna istraživanja i razumevanje složenih biljno-mikrobnih interakcija. Bolje razumevanje složenih interakcija biljka-zemljište-mikrobne zajednice doprineće optimizaciji procesa inokulacije i povećati mogućnosti za njihovu uspešnu primenu u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji, šumarstvu i ekoremedijacionim tehnologijama.

7. LITERATURA

- Abdalla, M. H., Omer, S. A. (2001): Survival of *Rhizobia/Bradirhizobia* and a rock phosphate solubilizing fungus *Aspergillus niger* on various carriers from some agroindustrial wastes and their effect on nodulation and growth of fababean and soybean. *Journal of Plant Nutrition* 24: 261-272.
- Abdullah, M. T., Ali, N. Y., Suleman, P. (2008): Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection* 27: 1354-1359.
- Ahmed, E., Holmström, S. J. M. (2014): Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology* 7: 196-208.
- Ahn, T. S., Ka, J. O., Lee, G. H., Song, H. G. (2007): Microcosm Study for Revegetation of Barren Land with Wild Plants by Some Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17: 52-57.
- Ali, S. S., Vidhale, N. N. (2013): Bacterial siderophore and their application: A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2: 303-312.
- Almaghrabi, O. A., Massoud, S. I., Abdelmoneim, T. S. (2013): Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences* 20: 57-61.
- Al-Sheikh H. (2010): Two pathogenic species of *Pythium*: *P. aphanidermatum* and *P. diclinum* from a wheat field. *Saudi Journal of Biological Sciences* 17: 347-352.
- Andrews, M., Hodgei, S., Raven, J. A. (2010): Positive plant microbial interactions. *Annals of Applied Biology* 157: 317-320.
- Angsana, R., Warinthorn, S., Annop, N., Pawinee, C. (2009): Combination effect of pH and acetate on enzymatic cellulose hydrolysis. *Journal of Environmental Sciences* 21: 965-970.
- Afzal, A., Ashraf, M., Asad, S. A., Farooq, M. (2005): Effect of phosphate solubilizing microorganisms on phosphorus uptake, yield and yield traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) in rainfed area. *International Journal of Agriculture and Biology* 7: 207-209.

- Afzal, A., Bano, A. (2008): Rhizobium and Phosphate Solubilizing Bacteria Improve the Yield and Phosphorus Uptake in Wheat (*Triticum aestivum*). International Journal of Agriculture and Biology 7: 207-209.
- Ahemad, M., Kibret, M. (2014): Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University-Science 26: 1-20.
- Ahlem, H., Mohammed, E., Badoc, A., Ahmed, L. (2012): Effect of pH, temperature and water activity on the inhibition of *Botrytis cinerea* by *Bacillus amyloliquefaciens* isolates. African Journal of Biotechnology 11: 2210-2217.
- Alvindia, D. G., Natsuaki, K. T. (2009): Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. Crop Protection 28: 236-242.
- Anand, R., Chanway, C. P. (2013): N₂-fixation and growth promotion in cedar colonized by an endophytic strain of *Paenibacillus polymyxa*. Biology and Fertility of Soils 49: 235-239.
- Anand, R., Grayston, S., Chanway, C. (2013): N₂-Fixation and Seedling Growth Promotion of Lodgepole Pine by Endophytic *Paenibacillus polymyxa*. Microbial Ecology 66: 369-374.
- Arkhipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., Kudoyarova, G. R. (2005): Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. Plant and Soil 272: 201-209.
- Arkhipova, T. N., Prinsen, E. A., Veselov, S. U., Martinenko, E. V., Melentiev, A. I., Kudoyarova, G. R. (2007): Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. Plant and Soil 292: 305-315.
- Arrebola, E., Sivakumar, D., Bacigalupo, R., Korsten, L. (2010): Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. Crop Protection 29: 369-377.
- Asadu, C. L. A., Nwafor, I. A., Chibuike, G. U. (2015): Contributions of Microorganisms to Soil Fertility in Adjacent Forest, Fallow and Cultivated Land Use Types in Nsukka, Nigeria. International Journal of Agriculture and Forestry 5: 199-204.

- Babana, A. H., Antoun, H. (2006): Effect of Tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Mali. *Plant and Soil* 287: 51-58.
- Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J., van Loon, L. C. (2007): Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97: 239-243.
- Bakker, P. A. H. M., Berendsen, r. L., Doornbos, r. F., Wintermans, P. C. A., Pieterse, C. M. J. (2013): Therhizosphererevisited:rootmicrobiomics. *Frontiers in plant science* 4: 1-7.
- Baldrian, P., Kolařík, M., Stursová, M., Kopecký, J., Valášková, V., Větrovský, T., Zifčáková, L., Snajdr, J., Rídl, J., Vlček, C., Voříšková, J. (2012): Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *The ISME Journal* 6: 248-258.
- Balkwill, D. L. (2006): Genus VI Ensifer Casida 1982. In: Brenner, D. J., Krieg, N. R. (Eds.), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part 3*, pringer Science & Business Media, pp. 354-363.
- Barea, M. J., Pozo, J. A., López-Ráez, R., Aroca, J. M., Ruíz-Lozano, N., Ferrol, R., Azcónand C., Azcón-Aguilar (2013): Arbuscular Mycorrhizas and their Significance in Promoting Soil-Plant System Sustainability against Environmental. In: González-López, J. (Ed.), *Beneficial Plant-microbial Interactions Ecology and Applications*, CRC Press, pp. 353-387.
- Barriuso, J., Solano, R. B., Santamaría, C., Daza, A., Gutiérrez Mañero, F. J. (2008): Effect of inoculation with putative plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus* spp. on *Pinus pinea* growth, mycorrhization and rhizosphere microbial communities. *Journal of Applied Microbiology* 105: 1298-309.
- Bashan, Y., Holguin, G. (1998): Proposal for the Division of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria into Two Classifications: Biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1225-1228.
- Bashan, Y., Bashan, L. E. (2010): How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth- A Critical Assessment. *Advances in Agronomy* 108: 77-136.

- Belimov, A. A., Kojemiakov, P. A., Chuvarliyeva, C. V. (1995): Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing bacteria. *Plant and Soil* 17: 29-37.
- Belimov, A. A., Dodd, I. C., Safronova, V. I., Hontzeas, N., W. J. Davies W. J. (2007): *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. *Journal of Experimental Botany* 58: 1485-1495.
- Bender, F. S., Wagg, C., Van der Heijden, M. G. A. (2016): An Underground Revolution: Biodiversity and Soil Ecological Engineering for Agricultural Sustainability. *Trends in Ecology & Evolution* 31: 440-452.
- Bent, E., Chanway, C. P. (1998): The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 44: 980-988.
- Bent, E., Tuzun, S., Chanway, C. P., Enebak, S. (2001): Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 793-800.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., Bakker, P. A. H. M. (2012): The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* 8: 478-486.
- Berg, G. (2009): Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84: 11-18.
- Bhattacharyya, P. N., Jha, D. K. (2012): Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1327-1350.
- Bhattacharyya, P. N., Goswami, M. P., Bhattacharyya, L. H. (2016): Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: A review. *Journal of Phytology* 8: 26-41.
- Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., Tuteja, N. (2014): Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories* 13: 1-10.

- Boruah, H. P. D., Kumar, B. S. D. (2003): Rhizoctonia wilt suppression of brinjal (*Solanum melongena* L.) and plant growth activity by *Bacillus* BS2. Indian Journal of Experimental Botany 41: 627-631.
- Bremner, J. M., Keeney, D. R. (1965): Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. Analytica chimica acta 32: 485-495.
- Çakmakçı, R., Dönmez, F., Aydın, A., Sahin, F. (2006): Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. Soil Biology and Biochemistry 38: 1482-1487.
- Çakmakçı, R., Erat, M., Erdogan, U., Figen Dönmez, M. (2007): The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 170: 288-295.
- Campos, V., Moraga, R., Fernandez, I., Yanez, F., Valenzuela, A., Mondac, M. A. (2013): Reduction of hexavalent chromium by *Serratia marcescens* immobilized on active carbon and their potential use in bioremediation. Gayana 77: 60-63.
- Casida, L. E. (1982): *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. International Journal of Systematic Bacteriology 32: 339-345.
- Cavaglieri, L., Orlando, J., Etcheverry, M. (2010): Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. Microbiological Research 164: 391-399.
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., Pauw, E. D., Thonart, P., Ongena, M. (2015): Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyoliquefaciens*. Microbial Biotechnology 8: 281-295.
- Chanway, C. P. (1997): Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. Forest Science 43: 99-112.
- Chanway, C. P., Shishido, M., Nairn, J., Jungwirth, S., Markham, J., Xiao, G., Holl, F. B. (2000): Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. Forest Ecology and Management 133: 81-88.
- Chaihan, M., Chunchaleuchanon, S., Kozo, A., Lumyong, S. (2008): Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. KMITL Science and Technology Journal 8: 18-23.

- Chenu, C., Cosentino, D. (2011): Microbial regulation of soil structural dynamics. In: Ritz, K., Young, I. (Eds.), *The Architecture and Biology of Soils: Life in Inner Space* CABI, Wallingford, pp. 37-70.
- Chodak, M., Pietrzykowski, M., Niklinska, M. (2009): Development of microbial properties in a chronosequence of sandy mine soils. *Applied Soil Ecology* 41: 259-268.
- Ceylan, O., Uğur, A. (2012): Bio-monitoring of heavy metal resistance in *Pseudomonas* and *Pseudomonas* related genus. *Journal of biological and environmental sciences* 6: 233-242.
- Chiarini, L., Bevivino, A., Tabacchioni, S., Dalmastri, C. (1998): Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 81-87.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2010). Approved guideline M45-A2. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. 2nd ed., CLSI, Wayne, Pa.
- Choi, O., Kim, J., Ryu, C. M., Park, C. S. (2004): Colonization and Population Changes of a Biocontrol Agent, *Paenibacillus polymyxa* E681, in Seeds and Roots. *The Plant Pathology Journal* 20: 97-102.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., Barka, E. A. (2005): Minireview Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4951-4959.
- Dabboussi, F., Hamze, M., Singer, E., Geoffroy, V., Meyer, J. M., Izard, D. (2002): *Pseudomonas mosselii* sp. nov., a novel species isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 363-376.
- Dauga, C. (2002): Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of *Enterobacteriaceae*: a model molecule for molecular systematic studies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 531-547.
- Davis, A. S., Jacobs, D. F. (2005): Quantifying root system quality of nursery seedlings and relationship to outplanting performance. *New Forest* 30: 295-311.

- Dawwam, G. E., Elbeltagy, A., Emara, H. M., Abbas, I. H., Hassan, M. M. (2013): Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural Science* 58: 195-201.
- Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Reich, P. B., Jeffries, T. C., Gaitan, J. J., Encinar, D., Berdugo, M., Campbell, C. D., Singh, B. K. (2016): Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature communications* 7: 10541.
- De Vries, F. T., Thébault, E., Liiri, M., Birkhofer, K., Tsiafouli, M. A., Bjørnlund, L., Jørgensen, H. B., Brady, M. V., Christensen, S., Ruiter, P. C., d'Hertefeldt, T., Frouz, J., Hedlund, K., Hemerik, L., Gera Hol, W. H., Hotes, S., Mortimer, A. R., Setälä, H., Sgardelis, S. P., Uteseny, K., Van der Putten, W. H., Wolters, V., Bardgett, R. D. (2013): Soil food web properties explain ecosystem services across European land use systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 110: 14296–14301.
- Di Gregorio, S., Barbafieri, M., Lampis, S., Sanangelantoni, A. M., Tassi, E., Vallini, G. (2006): Combined application of Triton X-100 and *Sinorhizobium* sp. Pb002 inoculum for the improvement of lead phytoextraction by *Brassica juncea* in EDTA amended soil. *Chemosphere* 63: 293-299.
- Dimkpa, C., Weinand, T., Asch, F. (2009): Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment* 32: 1682-1694.
- Ding, G.C., Piceno, Y.M., Heuer, H., Weinert, N., Dohrmann, A.B., Carrillo, A., Andersen, G.L., Castellanos, T., Tebbe, C.C., Smalla, K. (2013): Changes of soil bacterial diversity as a consequence of agricultural land use in a semi-arid ecosystem. *PLoS One* 8(3): e59497.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., Vanderleyden, J. (2002): Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils* 36: 284–297.
- Dominguez-Nuñez, J. A., Medina, M., Berrocal-Lobo, M., Anriquez, A., Albanesi, A. (2015): The combined effects of *Pseudomonas fluorescens* CECT 844 and the black truffle co-inoculation on *Pinus nigra* seedlings. *iForest - Biogeosciences and Forestry* 8: 624-630.

- Dubeikovsky, A. N., Mordukhova, E. A., Kochetkov, V. V, Polikarpova, F. Y., Boronin, A. M. (1993): Growth promotion of black currant softwood cuttings by recombinant strain *Pseudomonas fluorescens* BSP53a synthesizing and increased amount of indole-3-acetic acid. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 1277-1281.
- Dutta, S., Rani, T. S., Podile, A. R. (2013): Root Exudate-Induced Alterations in *Bacillus cereus* Cell Wall Contribute to Root Colonization and Plant Growth Promotion. *Plos one* 8: e78369.
- Dutta, J., Handique, P.I., Thaku, D. (2015): Assessment of Culturable Tea Rhizobacteria Isolated from Tea Estates of Assam, India for Growth Promotion in Commercial Tea Cultivars. *Frontiers in Microbiology* 6: 1-13.
- Egamberdieva, D. (2007): The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology* 36: 184–189.
- Egamberdieva, D. (2009): Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. *Acta Physiologiae Plantarum* 31: 861–864.
- Egamberdieva, D., Jabborova, D., Hashem, A. (2015): *Pseudomonas* induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to *Fusarium* root rot through the modulation of indole-3-acetic acid. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22: 773–779.
- Egner, H., Riehm, H., Domingo, W. R. (1960): Untersuchungen über die chemische bodenanalyse als Grundlage für die Beurteilung des Nährstoff-zustandes der Böden: II. chemische Extraktionsmethoden zur Phosphor und Kaliumbestimmung. *Kungliga lantbrukshögskolans annaler* 26: 199-215.
- Elazzazy, A. M., Almaghrabi, O. A., Moussa, T. A. A., Abdelmoniem, T. S. (2012): Evaluation of some Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) to Control *Pythium aphanidermatum* in Cucumber plants. *Life Science Journal* 9: 3147-3153.
- Entry, J. A., Mills, D., Mathee, K., Jayachandran, K., Sojka, R. E., Narasimhan, G. (2008): Influence of irrigated agriculture on soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology* 40: 146-154.
- Fan, L. M., Ma, Z. Q., Liang, J. Q., Li, H. F., Wang, E. T., Wei, G. H. (2011): Characterization of a copper-resistant symbiotic bacterium isolated from *Medicago lupulina* growing in mine tailings. *Bioresource Technology* 102: 703-709.

- Farzana, Y., Saad, R. O. S., Kamaruzaman, S. (2009): Growth and storage root development of sweet potato inoculated with rhizobacteria under glasshouse conditions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3: 1461-1466.
- Figueiredo, M. V. B., Seldin, L., Araujo, F. F., Mariano, R. L. R. (2010): Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. In: Maheshwari, D. K. (Ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 21-43.
- Fierer, N., Breitbart, M., Nulton, J., Salamon, P., Lozupone, C., Jones, R., Robeson, M., Edwards, R. A., Felts, B., Rayhawk, S., Knight, R., Rohwer, F., Jackson, R. B. (2007): Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7059-7066.
- Fierer, N., Strickland, M. S., Liptzin, D., Bradford, M. A., Cleveland, C. C. (2009): Global patterns in belowground communities. *Ecology Letters* 12: 1238-1249.
- Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauma, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnson, M., Mueller, N. D., O'Connell, C., Ray, D. K., West, P. C., Balzer, C., Bennett, E. M., Carpenter, S. R., Hill, J., Monfreda, C., Polasky, S., Rockstrom, J., Sheehan, J., Siebert, S., Tilman, D., Zaks, D. P. M. (2011): Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478: 337-342.
- Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D., Abdala, G. (2007): Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 1145-1152.
- Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmidt, R., Berg, G., Bahl, H. (2001): Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Archives of Microbiology* 176: 421-426.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J., Tarkka, M. (2007): The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* 176: 22-36.
- Frugier, F., Kosuta, S., Murray, J. D., Crespi, M., Szczyglowski, K. (2008): Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends in Plant Science* 13: 115-120.
- Galal, Y. G. M. (2003): Assessment of nitrogen availability to wheat (*Triticum aestivum* L.) from inorganic and organic N sources as affected by *Azospirillum brasilense*

- and *Rhizobium leguminosarum* inoculation. Egyptian Journal of Microbiology 38: 57-73.
- Gamalero, E., Berta, G., Massa, N., Glick, B. R., Lingua, G. (2010): Interactions between *Pseudomonas putida* UW4 and *Gigaspora rosea* BEG9 and their consequences for the growth of cucumber under salt-stress conditions. Journal of Applied Microbiology 108: 236-245.
- Gamalero, E., Glick, B. R. (2011): Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. In: Maheshwari, Dinesh, K. (Eds.), Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management, Springer-Verlag, Berlin, pp. 17-46.
- Garbeva, P., Van Veen, J. A., Van Elsas, J. D. (2003): Predomnant *Bacillus* spp. in Agricultural Soil under Different Management Regimes Detected via PCR-DGGE. Microbial Ecology 45: 302-316.
- Garbeva, P., Van Veen, J. A., Van Elsas, J. D. (2004): Microbial diversity in soil: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. Annual Review of Phytopathology 42: 243-270.
- García-Fraile, P., Menéndez, E., Rivas, R. (2015): Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. AIMS Bioengineering 2: 183-205.
- Garnett, T., Godfray, C (2012): Sustainable intensification in agriculture. Navigating a course through competing food system priorities, Food Climate Research Network and the Oxford Martin. Programme on the Future of Food, University of Oxford, UK.
- Ghavami, N., Alikhani, H. A., Pourbabaei, A. A., Besharati, H. (2017): Effects of two new siderophore-producing rhizobacteria on growth and iron content of maize and canola plants. Journal of Plant Nutrition 40: 736-746
- Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G., Penrose, D. M. (1999): Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London.
- Glick, B. R. (2010): Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. Biotechnology Advances 28: 367–374.
- Glick, B. R. (2012): Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Hindawi Publishing Corporation Scientica 2012: 1-15.

- Glick, B. R. (2014): Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* 169: 30-39.
- Goswami, D., Parmar, S., Vaghela, H., Dhandhukia, P., Thakker, J. (2015): Describing *Paenibacillus mucilaginosus* strain N3 as an efficient plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Cogent Food & Agriculture* 1: 1-13.
- Gujaničić, V., Golubović-Ćurguz, V., Raičević, V., Lalević, B., Spasojević, I., Kiković, D. (2012): Effects of biofertilization on spruce (*Picea abies* L. Karst) and pine seedlings (*Pinus sylvestris* L.) growth in deposol. In: Proceedings of the International Scientific Conference Forests in future-sustainable use, risks and challenges. Belgrade, Serbia, pp. 461-467.
- Guo, X., Van Lersel, M. W., Chen, J., Brackett R. E., Beuchat, L. R. (2002): Evidence of association of salmonellae with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3639-3643.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., Singh, V. (2015): Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Microbial and Biochemical Technology* 7: 96-102.
- Gurska, J., Wang, W. X., Gerhardt, K. E., Khalid, A. M., Isherwood, D. M., Huang, X. D., Glick, B. R., Greenberg, B. M. (2009): Three year field test of a plant growth promoting rhizobacteria enhanced phytoremediation system at a land farm for treatment of hydrocarbon waste. *Environmental Science & Technology* 43: 4472–4479.
- Habig, J., Swanepoel, C. (2015): Effects of Conservation Agriculture and Fertilization on Soil Microbial Diversity and Activity. *Environments* 2: 358-384.
- Haggag, W. M., Hussein, M. M., Mehanna, H. M., El-Moneim, DA. (2014): Bacteria Polysaccharides Elicit Resistance of Wheat Against Some Biotic and Abiotic Stress. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 50: 292-298.
- Hajnal-Jafari, T., Jarak, M., Đurić, S., Stamenović, D., Orlović, S. (2014): The effect of microbial inocula on the growth of black locust, eiberian elm and silver maple seedlings. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke* 127: 15-22.

- Hamarashid, N. H., Othman, M. A., Hussain, M. A. H. (2010): Effects of soil texture on chemical compositions, microbial populations and carbon mineralization in soil. The Egyptian journal of experimental biology (Botany) 6: 59-64.
- Hamdia, M. A. E. S., Shaddad, M. A. K., Doaa, M. M. (2004): Mechanisms of salt tolerance and interactive effects of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions. Plant Growth Regulation 44: 165-174.
- Hamidović, S., Čolo, J., Kiković, D., Krivošej, Z., Lalević, B., Milinković, M. (2013): Plant and microbial diversity in coal mine-affected soil in “Kakanj” (Bosnia and Herzegovina). Zaštita materijala 54: 403-408.
- Hang, N. T. T., Oh, S. O., Kim, G. H., Hur J. S., Koh, Y. J. (2005): *Bacillus subtilis* S1-0210 as a Biocontrol Agent against *Botrytis cinerea* in Strawberries. The Plant Pathology Journal 21: 59-63.
- Hansda, A., Kumar, V., Usmani, A. A. Z. (2014): Phytoremediation of heavy metals contaminated soil using plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A current perspective. Recent Research in Science and Technology 6: 131-134.
- Hao, X., Xie P., Johnstone, L., Miller, S. J., Rensing, C., Weia, G. (2012): Genome Sequence and Mutational Analysis of Plant-Growth-Promoting Bacterium *Agrobacterium tumefaciens* CCNWGS0286 Isolated from a Zinc-Lead Mine Tailing. Applied and Environmental Microbiology 78: 5384-5394.
- Hanley, M. E., Fenner, M. (1997): Seedling growth of four fire-following Mediterranean plant species deprived of single mineral nutrients. Functional Ecology 11: 398–405.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Van Elsas, J. D. (2008): Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends in Microbiology 16: 463–471.
- Hardoim, P. R., Andreote, F. D., Reinhold-Hurek, B., Sessitsch, A., Van Overbeek, L. S., Van Elsas, J. D. (2011): Rice root-associated bacteria: Insights into community structures across 10 cultivars. FEMS Microbiology Ecology 77: 154-164.
- Hartel P. G. (2004): The soil habitat. In: Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G., Zuberer, D. A. (Eds.), Principles and applications of soil microbiology, 2nd edition, Prentice Hall, New Jersey, pp. 26-53.

- Hartmann, M., Frey, B., Mayer, J., Mader, P., Widmer, F. (2015): Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *The ISME Journal* 9: 1177–1194.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. (2010): Soil Beneficial Bacteria and Their Role in Plant Growth Promotion: A Review. *Annals of Microbiology* 60: 579-598.
- He, L. Y., Zhang, Y. F., Ma, H. Y., Su, L. N., Chen, Z. J., Wang, Q. Y. (2010): Characterization of copper resistant bacteria and assessment of bacterial communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants. *Applied Soil Ecology* 44: 49-55.
- Hryniewicz, K., Baum, C. (2011): The Potential of Rhizosphere Microorganisms to Promote the Plant Growth in Disturbed Soils. In: Malik, A., Grohmann, E. (Eds.), *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development, Strategies for Sustainability*, Chapter 2: Environmental Protection Strategies for Sustainable Development. Springer Netherlands, pp. 35-64.
- Huang, X. D., El-Alawi, Y., Penrose, D. M., Glick, B. R., Greenberg, B. M. (2004): A Multi-Process Phytoremediation System for Removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Contaminated Soils. *Environmental Pollution* 130: 465-476.
- Huang, X. F., Chaparro, J. M., Reardon, K. F., Zhang, R., Shen, Q., Vivanco, J. M. (2014): Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany* 92: 267-275.
- Huang, J., Liu, Z., Li, S., Xu, B., Gong, Y., Yang, Y., Sun, H. (2016): Isolation and engineering of plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas aeruginosa* for enhanced cadmium bioremediation. *The Journal of General and Applied Microbiology* 62: 258-265.
- Hungria, M., Nogueira, M. A., Araujo, R. S. (2013): Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: Strategies to improve sustainability. *Biology and Fertility of Soils* 49: 791-801.
- Husen, E., Wahyudi, A. T., Suwanto, A., Saraswati, R. (2009): Soybean seedling root growth promotion by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase- producing *Pseudomonads*. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 10: 19-25.

- Husen, E., Wahyudi, A. T., Suwanto, A., Giyanto (2011): Soybean Response to 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase-Producing *Pseudomonas* under Field Soil Conditions. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6: 273-278.
- Iqbal, M. A., Khalid, M., Shahzad, S. M., Ahmad, M., Soleman, N. (2012): Integrated use of *Rhizobium leguminosarum*, plant growth promoting rhizobacteria and enriched compost for improving growth, nodulation and yield of lentil (*Lens culinaris* Medik). *Chilean Journal of Agricultural Research* 72: 104-110.
- Imran, A., Saadalla, M. J. A., Khan, S. U., Mirza, M. S., Malik, K. A., Hafeez, F. Y. (2014): *Ochrobactrum* sp. Pv2Z2 exhibits multiple traits of plant growth promotion, biodegradation and N-acyl-homoserine-lactone quorum sensing. *Annals of Microbiology* 64: 1797-1806.
- Ishida, T. A., Nara, K., Ma, S., Takano, T., Liu, S. (2009): Ectomycorrhizal fungal community in alkaline-saline soil in northeastern China. *Mycorrhiza* 19: 329-335.
- Jeyaseelan, E. C., Tharmila, S., Niranjana, K. (2012): Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. against *Pythium aphanidermatum* isolated from tomato damping off. *Archives of Applied Science Research* 4: 1623-1627.
- Jha, B. K., Pragash, M. G., Cletus, J., Raman, G., Sakthivel, N. (2009): Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 573-581.
- Ji, X., Lu, G., Gai, Y., Gao, H., Lu, B., Kong, L., Mu, Z. (2010): Colonization of *Morus alba* L. by the plantgrowth-promoting and antagonistic bacterium *Burkholderia cepacia* strain Lu10-1. *BMC Microbiology* 10: 1-12.
- Jing, Y., He, Z., Yang, X. (2007): Role of soil *Rhizobacteria* in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 8: 192-207.
- Johansen, J. E., Binnerup, S. J. (2002): Contribution of Cytophaga-like bacteria to the potential of turnover of carbon, nitrogen, and phosphorus by bacteria in the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Microbial Ecology* 43: 298-306.

- Jovičić-Petrović, J. (2014): Gljive iz agroindustrijskog otpada kao antagonisti fitopatogenim gljivama. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Republika Srbija.
- Jovičić-Petrović, J., Karličić, V., Radić, D., Jovanović, Lj., Kiković, D., Raičević, V. (2014): Microbial Biodiversity in PAH and PCB Contaminated Soil as a Potential for in Situ Bioremediation. In: Proceedings of the 9th Conference on Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems. Venice/Istanbul, pp. 1-10.
- Kamala-Kannan, S., Lee, K. J. (2008): Metal tolerance and antibiotic resistance of *Bacillus* species isolated from Sunchon Bay sediments, South Korea. *Biotechnology* 7: 149-152.
- Kang, S. M., Khan, A. L., Hamayun, M., Shinwaei, Z. K., Kim, Y-H., Joo, G. J., Lee, I. J. (2012): *Acientobacter calcoaceticus* ameliorated pant growth and influenced gibberellins and functional biochemical. *Pakistan Journal of Botany* 44: 365-372.
- Kang, W., Bao, J., Zheng, J., Xu, .F, Wang, L. (2016). Potential of woody plants from a Tonglushan ancient copper spoil heap for phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation* 25:0.
- Karličić, V., Jovičić-Petrivić, J., Radić, D., Lalević, B., Raičević, V., Jovanović, Lj. (2014): In situ bioremediation of soil polluted with organotin substances. In: Proceedings of the Soil 2014: Planning and and land use and landfills in terms of sustainable development and new remediation technologies. Zrenjanin, pp. 43-50.
- Karličić, V., Radić, D., Jovičić Petrović, J., Golubović-Ćurguz, V., Kiković, D., Raičević, V. (2015): Inoculation of *Robinia pseudoacacia* L. and *Pinus sylvestris* L. seedlings with plant growth promoting bacteria causes increased growth in coal mine overburden. In: Proceedings of the International conference Reforestation Challenges. Belgrade, Serbia, pp. 42-49.
- Karličić, V., Golubović-Ćurguz, V., Raičević, V. (2016): The alleviation of reforestation challenges by beneficial soil microorganisms, *Reforesta* 1: 238-260.
- Karlidag, H., Esitken, A., Turan, M., Sahin, F. (2007): Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. *Scientia Horticulturae* 114: 16-20.

- Katiyar, V., Goel, R. (2004): Improved Plant Growth from Seed Bacterization Using Siderophore Overproducing Cold Resistant Mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbial Biotechnology* 14: 653-657.
- Kaur, H., Sharma, P., Kaur, N., Gill, B. S. (2014): Tapping of native *Bradyrhizobium* and *Ensifer* sp. diversity for functional traits in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Legume Research* 37: 651-657.
- Kavroulakis, N., Padopoulou, K. K., Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C. (2006): Cytological and other aspects of pathogenesis-related gene expression in tomato plants grown on a suppressive compost. *Annals of Botany* 98: 555-564.
- Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z. A. (2004): Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology* 96: 473-480.
- Khan, M. S., Zaidi, A. Wani, P. A. (2007): Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – A review. *Agronomy for Sustainable Development* 27: 29-43.
- Khan, Z., Doty, S. (2009): Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. *Plant Soil* 322: 197-207.
- Kiflu, A., Beyene, S. (2013): Effects of different land use systems on selected soil properties in south Ethiopia. *Journal of Soil Science and Environmental Management* 4: 100-107.
- Kim, W. I., Cho, W. K., Kim, S. N., Chu, H., Ryu, K. Y., Yun, J. C., Park, C. S. (2011): Genetic Diversity of Cultivable Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 777-790.
- Kim, S., Lowman, S., Hou, G., Nowak, J., Flinn, B., Mei, C. (2012): Growth promotion and colonization of switchgrass (*Panicum virgatum*) cv. Alamo by bacterial endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Biotechnology for Biofuels* 5: 37.
- Kloepper, J. W., Schroth, M. N. (1978): Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Gilbert-Clairey, Tours, France. pp. 879-882.
- Kloepper, J. W., Zablotowicz, R., Tipping, E. M., Lifshitz, R. (1991): Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: Keister, D. L.,

- Cregan, B. P. (Eds.), The rhizosphere and plant growth, Kluwer Academic Publisher, pp. 315-326.
- Kobayashi, T., Nishizawa, N. K. (2012): Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 63: 131-152.
- Koo, S. Y., Cho, K. S. (2009): Isolation and Characterization of a Plant Growth-Promoting *Rhizobacterium*, *Serratia* sp. SY5. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 1431-1438.
- Krasilnikov, N. A. (1957): On the role of soil micro-organism in plant nutrition. *Microbiologia* 26: 659-72.
- Kremer, R. J., Souissi, T. (2001): Cyanide Production by Rhizobacteria and Potential for Suppression of Weed Seedling Growth. *Current Microbiology* 43: 182-186.
- Kudashev, I. S. (1956): The effect of phosphobacterin on the yield and protein content in grains of autumn wheat, maize and soybean. *Doklady Akademii Nauk* 8: 20-23.
- Kumar, A., Kumar, A., Devi, S., Patil, S., Payal, C., Negi, S. (2012a): Isolation, screening and characterization of bacteria from rhizospheric soils for different plant growth promotion (pgp) activities: an in vitro study. *Recent Research in Science and Technology* 4: 1-5.
- Kumar, P., Dubey, R.C., Maheshwari, D. K. (2012b): *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research* 167: 493-499.
- Kumar, K., Madhuri, K., Murugan, V., Sakthivel, K., Anantharaj, A., Singh, A. K., Gautam, R. K., Roy, S. D. (2014): Growth enhancement in vegetable crops by multifunctional resident plant growth promoting rhizobacteria under tropical Island Ecosystem. *African Journal of Microbiological Research* 8: 2463-2448.
- Kurth, K., Zeitler, K., Feldhahn, L., Neu, T. R., Weber, T., Křišťůfek, V., Wubet, T., Herrmann, S., Buscot, F., Tarkka, M. T. (2013): Detection and quantification of a mycorrhization helper bacterium and a mycorrhizal fungus in plant-soil microcosms at different levels of complexity. *BMC Microbiology* 13: 1-10.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.

- Li, X., Liu, N., You, L., Ke, X., Liu, H., Huang, M., Waddington, S. R. (2016): Patterns of Cereal Yield Growth across China from 1980 to 2010 and Their Implications for Food Production and Food Security. *Plos one* 11: 1-18.
- Lo C. C. (2010): Effect of pesticides on soil microbial community. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 45: 348-359.
- Lucy, M., Reed, E., Glick, B. R. (2004): Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 1-25.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009): Plant-growth-promoting rhizobacteria *Annual Review of Microbiology* 63: 541-556.
- Lynch, J. M. (1990): Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. In: Lynch, J.M. (Ed.), *The rhizosphere*. John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp. 1-10.
- Ma, W., Penrose, D. M., Glick, B. R. (2002): Strategies used by rhizobia to lower plant ethylene levels and increase nodulation. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 947-954.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Freitas, H. (2009): Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. *Chemosphere* 75: 719-725.
- Ma, Y., Prasad, M. N. V., Rajkumar, M., Freitas, H. (2011): Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soil. *Biotechnology Advances* 29: 248-58.
- MacDonald, L. M., Paterson, E., Dawson, L. A., McDonald, A. J. S. (2004): Short-term effects of defoliation on the soil microbial community associated with two contrasting *Lolium perenne* cultivars. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 489–498.
- Machuca, A., Milagres, A. M. F. (2003): Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters in Applied Microbiology* 36: 177-181.
- Mafia, R. G., Alfenas, A. C., Ferreira, E. M., Binoti, D. H. B., Machado, G., Mafia, V., Mounter, A. H. (2009): Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and *Eucalyptus* species. *Revista Árvore* 33: 1-9.

- Mahalakshmi, S., Reetha, D. (2009): Assessment of plant growth promoting activities of bacterial isolates from the rhizosphere of tomato (*Lycopersicon esculenum* L.). Recent Research in Science and Technology 1: 26-29.
- Mahaffee, W., Backman, P. A. (1993): Effects of seed factors on spermosphere and rhizosphere colonization by cotton by *Bacillus subtilis* GB08. Phytopathology 83: 1120-1125.
- Majeed, A., Abbasi, M. K., Hameed, S., Imran, A., Rahim, N. (2015): Isolation and characterization of plantgrowth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. Frontiers in Microbiology 6: 198.
- Maldonado-González, M. M., García-Carneros, A., Prieto, P., Lucena-Lucena, N., Molinero-Ruiz, L., and Mercado-Blanco, J. (2012): Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* PICF7 as potential biocontrol agent against *Plasmopara halstedii* in sunflower. In: Poster presented at The 18th International Sunflower Conference, Asociación Argentina de Girasol, Buenos Aires.
- Makris, K. C., Sarkar, D., Datta, R. (2009): Coupling indigenous biostimulation and phytoremediation for the restoration of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated sites. Journal of Environmental Monitoring. 12: 399-403.
- Malhotra, M., Srivastava, S. (2009): Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. European Journal of Soil Biology 45: 73-80.
- Mari, M., Guizzardi, M., Pratella, G. C. (1996): Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. Biological Control 7: 30-37.
- Marra, L. M., De Oliveira, S. M., Soares C. R. F. S., Moreira, F. M. S. (2011): Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. Scientia Agricola (Piracicaba, Brazil) 68: 603-609.
- Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M., Willems, A. (2007): Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 489-503.
- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P., Willems, A. (2008): Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former

- Sinorhizobium*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 200-214.
- Martin, F. N., Loper, J. E. (1999): Soilborne diseases caused by *Pythium* spp: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. Critical Reviews in Plant Sciences 18: 111-181.
- Mathivanan, S., Chidambaram, AL. A., Sundramoorthy, P., Baskaran, L., Kalaikandhan, R. (2014): Effect of Combined Inoculations of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on the Growth and yield of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 3: 1010-1020.
- Matias, S. R., Pagano, M. C., Carvalho-Muzzi, F., Oliveira, C. A., Almeida-Carneiro, A., Horta, S. N., Scotti, M. R. (2009): Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. European Journal of Soil Biology 45: 259-266.
- Mayak, S., Tirosh, T., Glick, B. R. (2004): Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiology and Biochemistry 42: 565-572.
- Melo, M. R., Flores, N. R., Murrieta, S. V., Tovar, A. R., Zúñiga, A. G., Hernández, O. F., Mendoza, A. P., Pérez, N. O., Dorantes, A. R. (2011): Comparative plant growth promoting traits and distribution of rhizobacteria associated with heavy metals in contaminated soils. International Journal of Environmental Science and Technology 8: 807-816.
- Mehta, P., Walia, A., Kulshrestha, S., Chauhan A., Shirkot, C. K. (2015): Efficiency of plant growth-promoting P-solubilizing *Bacillus circulans* CB7 for enhancement of tomato growth under net house conditions. Journal of Basic Microbiology 55: 33-44.
- Mendpara, J., Parekh, V., Vaghela, S., Makasana, A., Kunjadia, P. D., Sanghvi, G., Vaishnav, D., Dave, G. S. (2013): Isolation and characterization of high salt tolerant bacteria from agricultural soil. European Journal of Experimental Biology 3: 351-358.

- Meziane, H., Van Der Sluis, I., Van Loon, L. C., Höfte, M., Bakker, P. A. (2005): Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology* 6: 177-185.
- Mohite, B. (2013): Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 13: 638-649.
- Molina, L., Udaondo, Z., Duque, E., Fernandez, M., Molina-Santiago, C., Roca, A., Porcel, M., Torre, J., Segura, A., Plesiat, P., Jeannot, K., Ramos, J. L. (2014): Antibiotic resistance determinants in a *Pseudomonas putida* strain isolated from a hospital. *Plos one* 9: 1-11.
- Monfared, H. S., Matinzadeh, M., Shirvany, A., Amiri, G. Z., Fard, R. M., Rostami, F. (2013): Accumulation of heavy metal in *Platanus orientalis*, *Robinia pseudoacacia* and *Fraxinus rotundifolia*. *Journal of Forestry Research* 24: 391-395.
- Montañez, A., Rodríguez Blanco, A., Barlocco, C., Beracochea, M., Sicardi, M. (2012): Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology* 58: 21-28.
- Moore, F. C., Lobell, D. B. (2015): The fingerprint of climate trends on European crop yields. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 2670-2675.
- Morgan, J. A. W., Bending, G. D., White, P. J. (2005): Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56: 1729-1739.
- Mucha, J., Dahm, H., Strzelczyk, E., Werner, A. (2006): Synthesis of enzymes connected with mycoparasitism by ectomycorrhizal fungi. *Archives of Microbiology* 185: 69-77.
- Munns, R., Tester, M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Mukherjee, S., Juottonen, H., Siivonen, P., Quesada, C. L., Tuomi, P., Pulkkinen, P., Yrjala, K. (2014): Spatial patterns of microbial diversity and activity in an aged creosote-contaminated site. *The ISME Journal* 8: 2131-2142.

- Mallik, M. A. B., Williams, R. D. (2008): Plant growth promoting rhizobacteria and mycorrhizal fungi in sustainable agriculture and forestry. In: Zeng, R. S., Mallik, A. U., Luo, S. M. (Eds.), *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*, Springer, New York, pp. 321-345.
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., Ashraf, M. (2014): The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances* 32: 429-448.
- Nagendran, A. N., Deivendran, S., Prabavathi, S. (2014): Diversity of Soil Microbes under Different Ecosystem Landuse Patterns. *Journal of Applied & Environmental Microbiology* 2: 90-96.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. (2003): Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54: 655-670.
- Narasimhan, K., Basheer, C., Bajic, V. B., Swarup, S. (2003): Enhancement of plant-microbe interactions using a rhizosphere metabolomics-driven approach and its application in the removal of polychlorinated biphenyls. *Plant Physiology* 132: 146-153.
- Nautiyal, C. S., TiIak, K. V. B. R. (2010): Exploitation of Rhizobacteria to Improve Soil, Plant, Human and the Environment. In: Johri J. K. (Ed.), *Recent Advances in Biopesticides*, New India Publishing, pp. 117-154.
- Nautiyal, C. S., Srivastava, S., Chauhan, P. S., Seem, K., Mishra, A., Sopory, S. K. (2013): Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 66: 1-9.
- Neumann, G., Römheld, V. (2007): The release of root exudates as affected by the plant physiological status. In: Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. (Eds.), *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, 2nd Edition., CRC Press, pp. 23-72.
- Niazi, A., Manzoor, S., Asari, S., Bejai, S., Meijer, J. (2014): Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5113: A rhizobacterium that improves plant growth and stress management. *Plos one* 9: 1-15.

- Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., Thonart, P. (2011): Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 15: 327-337.
- Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K., Wakabayashi, H. (2000): *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 83-89.
- Nzungize, J. R., Lyumugabe, F., Busogoro J. P., Baudoin, J. P. (2012): *Pythium* root rot of common bean: biology and control methods: A review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 16: 405-413.
- Oades, J. M. (1984): Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant and Soil* 76: 319-337.
- Ocampo-Sosa, A. A., Guzmán-Gómez, L. P., Fernández-Martínez, M., Román, E., Rodríguez, C., Marco, F., Vila, J., Martínez-Martínez, L. (2015): Isolation of VIM-2-Producing *Pseudomonas monteilii* Clinical Strains Disseminated in a Tertiary Hospital in Northern Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* February 59: 1334-1336.
- O'Neill, T. M., Shtienberg, D., Elad, Y. (1997): Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81: 36-40.
- Ortiz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., López-Bucio, J. (2009): The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior* 4: 701-712.
- Öztürk, A., Caglar, O., Sahin, F. (2003): Yield response of wheat and barley to inoculation of plant growth promoting rhizobacteria at various levels of nitrogen fertilization. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 166: 1-5.
- Özyilmaz, U., Benlioglu, K. (2013): Enhanced Biological Control of *Phytophthora* Blight of Pepper by Biosurfactant-Producing *Pseudomonas*. *The Plant Pathology Journal* 29: 418-426.
- Pal, S.S. (1998): Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. *Plant and Soil* 198: 169-177.
- Parida, O. A. K., Das, A. B. (2005): Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.

- Parvaiz, M. (2014): Response of Maize to salt stress a critical review. *International Journal of Healthcare Sciences*. 1: 13-25.
- Patten, C. L., Glick, B. R. (2002): Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3795-3801.
- Peng, M., Zi, X., Wang, Q. (2015): Bacterial Community Diversity of Oil-Contaminated Soils Assessed by High Throughput Sequencing of 16S rRNA Genes. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12: 12002-12015.
- Pereira, S. I. A., Castro, P. M. L. (2014): Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. *Ecological Engineering* 73: 526-535.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., Fernández, F. J. (2007): O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods* 70: 127-131.
- Placek, A., Grobelak, A., Kacprzak, M. (2016): Improving the phytoremediation of heavy metals contaminated soil by use of sewage sludge. *International journal of phytoremediation* 18: 605-618.
- Prasad, M. N. V. (2007): Sunflower (*Helianthus annuus* L.) – a potential crop for environmental industry. *Helia* 30: 167-174.
- Prashar, P., Kapoor, N., Sachdeva, S. (2013): Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 13: 63-77.
- Prathap, M., Kumari, B. D. R. (2015): Critical review on plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 6: 1-4.
- Probanza, A., Lucas Garcia, J. A., Ruiz Palomino, M., Ramos, B., Gutiérrez Mañero, F. J. (2002): *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Applied Soil Ecology* 20: 75-84.
- Puente, M. L., Garcia, J. E., Pathauer, P., Peticari, A. (2010): Inoculation with *Azospirillum brasilense* is a useful tool in *Eucalyptus globules* management. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental* 8: 124-130.

- Quadros, P. D., Zhalnina, K., Davis-Richardson, A. G., Drew, J. C., Menezes, F. B., Camargo, F. A. O., Triplett, E. V. (2016): Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. *Applied Soil Ecology* 98: 195-203.
- Quince, C., Curtis, T. P., Sloan, W. T. (2008): The rational exploration of microbial diversity. *The ISME Journal* 2: 997-1006.
- Qurashi, A. W., Nasim Sabri, A. (2012): Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Brazilian Journal of Microbiology* 43: 1183-1191.
- Rajendhran, J., Gunasekaran, P. (2008): Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnology Advances* 26: 576-590.
- Rajkumar, M., Freitas, H. (2008): Influence of metal resistant-plant growth promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere* 71: 834-842.
- Rakić, A., Filipović, V., Rakić, I., Racić, Z., Vasiljević, V., Obradović, D. (2011): Rekultivacija odlagališta pepela i šljake PD RB Kolubara i TE Veliki Crljeni – Izvođenje radova na terenu. In: *Proceedings of the II International Symposium Mining 2011- Mining present state and future prospects and sustainable development*. Vrnjačka Banja, Serbia, pp. 552-555.
- Raičević, V., Lalević, B., Kljujev, I., Petrović, J. (2010): *Ekološka mikrobiologija*. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Rostamikia, Y., Kouchaksaraei, M. T., Asgharzadeh, A., Rahmani, A. (2016): The effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on growth and physiological characteristics of *Corylus avellana* seedlings. *ECOPERSIA* 4: 1471-1479.
- Ramirez, C. A., Kloepper, J. W. (2010): Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. *Biology and Fertility of Soils* 46: 835-844.
- Ramos, S. B., Barriuso, J., Gutierrez Mañero, F. J. (2008): Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In: Ahmad, I., Pichtel, J., Hayat, S. (Eds.), *Plant-Bacteria Interactions: Strategies and Techniques to Promote Plant Growth*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 41-54.

- Ranjard, L., Richaume, A. S. (2001): Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology* 152: 707-716.
- Rathore, D. S., Lopez-Vernaza, M. A., Doohan, F., Connell, D. O., Lloyd, A., Mullins, E. (2015): Profiling antibiotic resistance and electrotransformation potential of *Ensifer adhaerens* OV14; a non-*Agrobacterium* species capable of efficient rates of plant transformation. *FEMS Microbiological Letters* 362: 1-8.
- Reeve, W., Tian, R., Bräu, L., Goodwin, L., Munk, C., Detter, C., Tapia, R., Han, C., Liolios, K., Huntemann, M., Pati, A., Woyke, T., Mavrommatis, K., Markowitz, V., Ivanova, N., Kyrpides, N., Willems, A. (2014): Genome sequence of *Ensifer arboris* strain LMG 14919T; a microsymbiont of the legume *Prosopis chilensis* growing in Kosti, Sudan. *Standards in Genomic Sciences* 9: 473-483.
- Reva, O. N., Dixelius, C., Meijer, J., Priest, F. J. (2004): Taxonomic characterization and plant colonization abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 249-259.
- Ribeiro, C. M., Cardoso, E. J. B. N. (2012): Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiological Research* 167: 69-78.
- Rigamonte, T. A., Pylro, V. S., Duarte, G. F. (2010): The role of mycorrhization helper bacteria in the establishment and action of ectomycorrhizae associations. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 832-840.
- Rincón, A., Valladares, F., Gimeno, T. E., Pueyo, J. J. (2008): Water stress responses of two Mediterranean tree species influenced by native soil microorganisms and inoculation with a plant growth promoting rhizobacterium. *Tree Physiology* 28: 1693-1701.
- Rodriguez-Barrueco, C. E., Cervantes, N. S., Subbarao, N. S., Rodriguez-Caceres, E. (1991): Growth promoting effect of *Azospirillum brasilense* on *Casuarina cunninghamiana* Miq. Seedlings. *Plant and Soil* 135: 121-124.
- Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K., Kent, A. D., Daroub S. H., Camargo, F. A., Farmerie, W. G., Triplett, E. W. (2007): Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal* 1: 283-290.

- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., Bonilla, R. (2012): Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology* 6: 264-272.
- Römheld, V., Nikolić, M. (2006): Iron. In: Barker, A. V., Pilbeam, D. J. (Eds.), *Handbook of Plant Nutrition*. Taylor & Francis Group, LLC, pp. 329-350.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E. (2006): Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 19: 827-837.
- Rudder, S., Doohan, F., Creevey, C. J., Wendt, T., Mullins, E. (2014): Genome sequence of *Ensifer adhaerens* OV14 provides insights into its ability as a novel vector for the genetic transformation of plant genomes. *BMC Genomics* 15: 1-17.
- Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Paré, P. W., Bais, H. P. (2008): Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology* 148: 1547–1556.
- Ryan, P. R., Dessaux, Y., Thomashow, L. S., Weller, D. M. (2009): Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant Soil* 321: 363-383.
- Saharan, B. S., Nehra, V. (2011): Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research* 2011: 1-30.
- Sahin, F., Çakmakçı, R., Kantar, F. (2004): Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant and Soil* 265: 123-129.
- Saravanakumar, D., Samiyappan, R. (2007): ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogaea*) plants. *Journal of Applied Microbiology* 102: 1283-1292.
- Sarma, B., Acharya, C., Joshi, S. R. (2013): Characterization of Metal Tolerant *Serratia* spp. isolates from sediments of uranium ore deposit of domiasiat in Northeast India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 1-8.
- Schulz, S., Brankatschk, R., Dumig, A., Kogel-Knabner, I., Schlöter, M., Zeyer, J. (2013): The role of microorganisms at different stages of ecosystem development for soil formation. *Biogeosciences* 10: 3983-3996.

- Schwyn, B., Neilands, J. B. (1987): Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56.
- Sen, S., Chandrasekhar, C. N. (2014): Effect of PGPR on growth promotion of rice (*Oryza sativa* L.) under salt stress. *Asian Journal of Plant Science and Research* 4: 62-67.
- Sgroy, V., Cassán, F., Masciarelli, O., Papa, M. F. D., Lagares, A., Luna, V. (2009): Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 371-381.
- Sharma, A., Johri, B. N. (2003): Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting fluorescent *Pseudomonas* strain GRP3A in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Microbiological Research* 158: 77-81.
- Sharma, A., Johri, B. N., Sharma, A. K., Glick, B. R. (2003): Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology and Biochemistry* 35: 887-894.
- Sharma, R. (2012): A brief review on mechanism of *Trichoderma* fungus use as biological control agents. *International Journal of Inovations and Bio-Sciences* 2: 200-210.
- Sharma, S. K., Ramesh, A., Johri, B. N. (2013): Isolation and characterization of Plant Growth-Promoting *Bacillus amyloliquefaciens* Strain sks_bnj_1 and its influence on Rhizosphere Soil Properties and Nutrition of Soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Journal of Virology and Microbiology* 2013: 1-19.
- Sharma, P. K., Fu, J., Zhang, X., Fristensky, B., Sparling, R., Levin, D. B. (2014): Genome features of *Pseudomonas putida* LS46, a novel polyhydroxyalkanoate producer and its comparison with other *P. putida* strains. *AMB Express* 4:37.
- Sheoran, N., Nadakkakath, A. V., Munjal, V., Kundu, A., Subaharan, K., Venugopal, V., Rajamma, S., Eapen, S. J., Kumar, A. (2015): Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemo-profiling of its antimicrobial volatile organic compounds. *Microbiological Research* 173: 66-78.
- Shilev, S., López, A. F., Prieto, M. S., Puebla, E. D. S. (2007): Induced protein profile changes in arsenate tolerant and sensitive *Pseudomonas fluorescens* strains. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management* 15: 221-226.

- Shilev, S., Sancho, E. D., Benlloch-Gonzalez, M. (2012): Rhizospheric bacteria alleviate salt-produced stress in sunflower. *Journal of Environmental Management* 95: 37-41.
- Shim, J., Kim, J. W., Shea, P. J., Oh, B. T. (2015): IAA production by *Bacillus* sp. JH 2-2 promotes Indian mustard growth in the presence of hexavalent chromium. *Journal of Basic Microbiology* 55: 652-658.
- Shtangeeva, I., Laiho, J. V. P., Kahelin, H., Gobran, G. R. (2004): Improvement of Phytoremediation Effects with Help of Different Fertilizers. *Soil Science and Plant Nutrition* 50: 885-889.
- Siciliano, S. D., Germida, J. J. (1998): Biolog analysis and fatty acid methyl ester profiles indicate that pseudomonad inoculants that promote phytoremediation alter the root-associated microbial community of *Bromus biebersteinii*. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1717-1723.
- Siddikee, M. A., Chauhan, P. S., Anandham, R., Han, G. H., Sa, T. (2010): Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 1577-1584.
- Silva, A. P., Babujia, L. C., Matsumoto, L. S., Guimaraes, M. F., Hungria, M. (2013): Bacterial Diversity Under Different Tillage and Crop Rotation Systems in an Oxisol of Southern Brazil. *The Open Agriculture Journal* 7: 40-47.
- Simakov, V. N. (1957): The use of phenylthranilic acid in the determination of humus by Tyurin's method. *Pochvovedenie* 8: 72-73.
- Singh, A. N., Singh, A. N. (2006): Experiments on ecological restoration of coal minespoil using native trees in a dry tropical environment, India: a synthesis. *New Forests* 31: 25-39.
- Singh, J. S., Pandey, V. C., Singh, D. P. (2011): Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 140: 339-353.
- Singh, M., Prakash, N. T. (2012): Characterisation of Phosphate Solubilising Bacteria in Sandy Loam Soil Under Chickpea Cropping System. *Indian Journal of Microbiology* 52: 167-173.

- Singh, R., Lal, S., Dixit, V. K. (2015): Rhizoremediation Approaches: A Sustainable Perspectives for Remediation of PAHs Compounds Assisted with PGPR. Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences Rhizoremediation Approaches 5: 3067-3082.
- Siripornvisal, S. (2010): Biocontrol Efficacy of *Bacillus subtilis* BCB3-19 against Tomato Gray Mold. KMITL Science and Technology Journal 10: 37-44.
- Sivasakthi, S., Usharani, G., Saranraj, P. (2014): Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPB) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. African Journal of Agricultural Research 9: 1265-1277.
- Skousen, J., Zipper, C. E. (2014): Post-mining policies and practices in the Eastern USA coal region. International Journal of Coal Science & Technology 1: 135-151.
- Solano, R. B., Iglesia, P. M. T., Probanza, A., Lucas Garcia, J. A., Megias, M., Gutierrez Manero, F. J. (2006): Screening for PGPR to improve growth of *Cistus ladanifer* seedlings for reforestation of degraded mediterranean ecosystems. Plant and Soil 287: 59-68.
- Sookchaoy, K., Panthachode, S., Thipchu, J. (2009): Screening of *Trichoderma* spp. for *Phytophthora* root and foot rot on *Citrus sinensis* biocontrol. In: Proceedings of the International Conference on the Role of Universities in Hands-On Education. Chiang-Mai, Thailand, pp. 356-362.
- Sousa, N. R., Franco, A. R., Ramos, M. A., Oliveira, R. S., Castro, P. M. L. (2015): The response of *Betula pubescens* to inoculation with an ectomycorrhizal fungus and a plant growth promoting bacterium is substrate-dependent. Ecological Engineering 81: 439-443.
- Souza, R., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. P. (2015): Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genetics and Molecular Biology 38: 401-419.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. (2009): Plant Growth-promoting actions of rhizobacteria. Advances in Botanical Research 51: 283-320.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. (2011): Auxin and Plant-Microbe Interactions. Cold Spring Harbor Laboratory Press 3: 1-14.
- Steffen, W., Richardson, K., Rockstrom, J., Cornell, S. E., Fetzer, I., Bennett, E., M., Biggs, R., Carpenter, S. R., Vries, W., Wit, A. A., Folke, C., Gerten, D., Heinkle, J., Mace, G. M., Persson, L. M., Ramanathan, V., Meyers, B., Sorlin, S. (2015):

- Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science* 347: 1-17.
- Stewart, E. J. (2012): Growing unculturable bacteria. *Journal of Bacteriology* 194: 4151-4160.
- Sutton, N. B., Maphosa, F., Morillo, J. A., Al-Soud, W. A., Langenhoff, A. A., Grotenhuis, T., Rijnaarts, H. H. M., Smidt, H. (2013): Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 619-630.
- Surette, M. A., Sturz, A. V., Lada, R. R., Nowak, J. (2003): Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): Their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and Soil* 253: 381-390.
- Suslow, T. V., Kloepper, J. W., Schroth, M. N., Burr, T. J. (1979): Beneficial bacteria enhance plant growth Rhizobacteria. *California Agriculture* 33: 15-17.
- Suslow, T. V., Schroth, M. N. (1982): Rhizobacteria of sugar beets: Effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology* 77: 199-206.
- Sverdrup, L. E., Krogh, P. H., Nielsen, T., Kjær, C., Stenersen, J. (2003): Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), ryegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*). *Chemosphere* 53: 993-1003.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tarnocai, C., Canadell, J. G., Schuur, E. A. G., Kuhry, P., Mazhitova, G., Zimov, S. (2009): Soil organic carbon pools in the Northern circumpolar permafrost region. *Global Biogeochemical Cycles* 23: 1-11.
- Teixeria, D. A., Alfenas, A. C., Mafia, R. G., Ferreira, E. M., Siqueira, L., Maffia, L. A., Mounteer, A. H. (2007): Rizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 118-123.
- Tilak, K. V. B. R., Ranganayaki, N., Pal, K. K., De, R., Saxena, A. K., Nautiyal, S. C., Mittal, S., Tripathi, A. K., Johri, B. N. (2005): Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current science* 89: 136-150.

- Tischew, S., Kirmer, A., Lorenz, A. (2008): Alternative restoration strategies in former lignite mining areas of eastern Germany. In: Barthlott, W., Linsenmair, K.E., Porembski, S. (Eds.), Biodiversity: Structure and Function. Eolss Publishers, Paris, pp. 1-10.
- Tlustoš, P., Száková, J., Hrubý, J., Hartman, I., Najmanová, J., Nedělník, J., Pavlíková, D., Batysta, M. (2006): Removal of As, Cd, Pb, and Zn from contaminated soil by high biomass producing plants. *Plant soil and environment* 52: 413-423.
- Trama, B., Fernandes, J. D. S., Labuto, G., Oliveira, J. C. F., Viana-Niero, C., Pascon, R. C., Vallim, M. A. (2014): The Evaluation of Bioremediation Potential of a Yeast Collection Isolated from Composting. *Advances in Microbiology* 4: 796-807.
- Tortora, M. L., Díaz-Ricci, J. C., Ro, R. (2011): *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology* 193: 275-286.
- Urashima, Y., Hori, K. (2003): Selection of PGPR which promotes the growth of spinach. *Soil Science and Plant Nutrition* 74: 157-162.
- Uren, N. C. (2007): Types, amounts and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In: Pinto, R. Z., Varanini, P. N. (Eds.), *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-21.
- Usman, S., Muhammad, Y., Chiroman, M. A. (2016): Roles of soil biota and biodiversity in soil environment-A concise communication. *Eurasian Journal of Soil Science* 5: 255-265.
- Valverde, A., Burgos, A., Fiscella, T., Rivas, R., Velazquez, E., Rodriguez-Barrueco, C., Cervantes, E., Chamber, M., Igual, J. M. (2006): Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. *Plant and Soil* 287: 43-50.
- Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J. F., Curie, C., Lemanceau, P. (2007): Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 441-447.

- Van Houdt, R. V., Moons, P., Jansen, A., Vanoirbeek, K., Michiels, C. W. (2005): Genotypic and phenotypic characterization of a biofilm-forming *Serratia plymuthica* isolate from a raw vegetable processing line. FEMS Microbiology Letters 246: 265-272.
- Veselinović, M., Golubović-Ćurguz, V. (2001): Recultivation by afforestation of deposols. Zemljište i biljka 50: 201-210.
- Vessey, J. K. (2003): Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255: 571-586.
- Vieira, F. C. S., Nahas, E. (2005): Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. Microbiological Research 160: 197-202.
- Vos, M., Wolf, A. B., Jennings, S. J., Kowalchuk, G. A. (2013): Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. FEMS Microbiology Reviews 37: 936-954.
- Walker, V., Bertrand, C., Bellvert, F., Moe`nne-Loccoz¹, Y., Bally, R., Comte, G. (2011): Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. New Phytologist 189: 494-506.
- Wall, D. H., Nielsen, U. N., Six, J. (2015): Soil biodiversity and human health. Nature DOI: 10.1038/nature15744
- Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J., Kasai, H. (2007): Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 1846-1850.
- Weidner, S., Koller, R., Latz, E., Kowalchuk, G., Bonkowski, M., Scheu, S., Jousse, A. (2015): Bacterial diversity amplifies nutrient-based plant–soil feedbacks. Functional Ecology 29: 1341-1349.
- Wendt, T., Doohan, F., Mullins, E. (2012): Production of *Phytophthora* infestans resistant potato (*Solanum tuberosum*) utilising *Ensifer adhaerens* OV14. Transgenic Research 21: 567-578.
- Wertz S., Degrange V., Prosser J. I., Poly F., Commeaux C., Guillaumaud N., Le Roux, X. (2007): Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and

- resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environmental Microbiology* 9: 2211-2219.
- Whipps, J. M. (2001): Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511.
- Whiteman, S. A., Stewart, A. (1998): Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation on irradiated grape leaf tissues by the antagonistic bacterium *Serratia liquefaciens*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 26: 325-330.
- Wuana, R. A., Okieimen, F. E., (2011): Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *International Scholarly Research Network ISRN Ecology* 2011: 1-20.
- Yamamoto, S., Harayama (1995): PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1104-1109.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A., Harayama, S. (2000): Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146: 2385-2394.
- Yegorenkova, I. V., Tregubova, K. V., Burygin, G. L., Matora, L. Y., Ignatov, V. V. (2016): Assessing the efficacy of co-inoculation of wheat seedlings with the associative bacteria *Paenibacillus polymyxa* 1465 and *Azospirillum brasilense* Sp245. *Canadian Journal of Microbiology* 62: 279-285.
- Yi, Y., Huang, W., Ge, Y. (2008): Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 1059-1065.
- Yu, H., Li, Y., Zhang, C., Liu, H., Liu, J., Zheng, W., Kang, X., Leng, X., Zhao, K., Gu, Y., Zhang, X., Xiang, Q., Chen, Q. (2014): Culturable Heavy Metal-Resistant and Plant Growth Promoting Bacteria in V-Ti Magnetite Mine Tailing Soil from Panzhihua, China. *Plos one* 9: 1-8.
- Young, J. M. (2010): *Sinorhizobium* versus *Ensifer*: may a taxonomy subcommittee of the ICSP contradict the Judicial Commission. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 1711-1713.

- Xu L, Zhang Y, Wang L, Chen W, Wei G. (2014): Diversity of endophytic bacteria associated with nodules of two indigenous legumes at different altitudes of the Qilian Mountains in China. *Systematic and Applied Microbiology* 37: 457-465.
- Zhang, J. E., Liu, W. G., Hu, G. (2002): The relationship between quantity index of soil microorganisms and soil fertility of different land use systems. *Soil and Environmental Science* 11: 140-143.
- Zhang, X., Qiu, F., Sun, L., Ma, X., Jiang, R., Song, W. (2010): Phylogenetic analysis of endophytic *Ensifer adhaerens* isolated from rice roots. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology* 16: 779-783.

8. BIOGRAFIJA

Vera M. Karličić je rođena 22. 06. 1983. godine u Novoj Varoši. Osnovnu i srednju školu je završila Novoj Varoši. Diplomirala je 2007. godine na Šumarskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na odseku za Pejzažnu arhitekturu i hortikulturu. Osnovne studije je završila sa prosečnom ocenom svih položenih ispita 8,88 i ocenom 10 na diplomskom radu: „Uticaj indolsirćetne kiseline na ožiljavanje zelenih reznica zimocveta (*Chimonanthus praecox* (L.) Link)“. Master studije na studijskom programu Zaštita životne sredine u poljoprivredi, na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, je završila 2010. godine sa prosečnom ocenom 10,00 i ocenom 10 na master radu: „Biološki potencijal otpadnog mulja iz RB Kolubara“. Godine 2010. upisala je doktorske akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu, studijski program Zemljište i melioracije, uža naučna oblast Ekološka mikrobiologija. Godine 2011. izabrana je u zvanje istraživača saradnika na Katedri za ekološku mikrobiologiju. Izvodi praktičnu nastavu na predmetima Osnovi mikrobiologije zemljišta i Mikrobiologija.

Učestvovala je na nacionalnom projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije i međunarodnom projektu AREA (Advancing Research in Agricultural and Food Sciences at Faculty of Agriculture, University of Belgrade).

9. PRILOZI

Prilog 1

Izjava o autorstvu

Potpisana: Vera M. Karličić

Broj indeksa ili prijava doktorske disertacije: 10/31

IZJAVLJUJEM

Da je doktorska disertacija pod naslovom BAKTERIJE STIMULATORI BILJNOG RASTA KAO POTENCIJAL U EKOREMEDIJACIJI OŠTEĆENIH ZEMLJIŠTA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova
- da su rezultati korektno navedeni
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu,

Prilog 2

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Vera M. Karličić

Broj indeksa ili prijava doktorske disertacije: 10/31

Studijski program: Zemljište i melioracije

Naslov rada: Bakterije stimulatori biljnog rasta kao potencijal u ekoremedijaciji oštećenih zemljišta

Mentor: Dr Vera Raičević

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu. Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu,

Prilog 3**Izjava o autorstvu**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku “Svetozar Marković” da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom “Bakterije stimulatori biljnog rasta kao potencijal u ekoremedijaciji oštećenih zemljišta” koja je moje autorsko delo. Disertaciju sa svim prilogima sam predala u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje. Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo-nekomercijalno
3. Autorstvo-nekomercijalno-bez prerađivanja
4. Autorstvo-nekomercijalno-deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo-bez prerađivanja
6. Autorstvo-deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

U Beogradu,