

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Magdalena M. Knežević

**Diverzitet bakterija izolovanih iz korenskih
kvržica lucerke (*Medicago sativa* L.) i žutog
zvezdana (*Lotus corniculatus* L.) i njihov potencijal
za poboljšanje rasta biljaka**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Magdalena M. Knežević

**Diversity of bacteria isolated from root nodules of
alfalfa (*Medicago sativa* L.) and bird's-foot trefoil
(*Lotus corniculatus* L.) and their potential in plant
growth promotion**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

Mentori:

dr Olivera Stajković-Srbinović, viši naučni saradnik
Institut za zemljište

dr Tanja Berić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Dušica Delić, naučni savetnik
Institut za zemljište

dr Slaviša Stanković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Ivan Nikolić, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen na Institutu za zemljište, Odseku za mikrobiologiju. Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su sprovedena zahvaljujući finansiranju od strane Ministratsva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u okviru Ugovora o realizaciji i finansiranju naučno-istraživačkog rada NIO u 2020, 2021, i 2022. godini (br. ugovora 451-03-68/2022-14/200011; 451-03-9/2021-14/200011; 451-03-68/2020-14/200011)., kao i u okviru projekata „Proučavanje uticaja kvaliteta zemljišta i voda za navodnjavanje na efikasniju proizvodnju poljoprivrednih kultura i očuvanje životne sredine“ i „Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova Bacillus i Pseudomonas kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu“.

Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Dr Oliveri Stajković-Srbinović, višem naučnom saradniku Instituta za zemljište, na praktičnom i teorijskom znanju koje mi je prenela tokom zajedničkog rada u laboratoriji i tokom pisanja naučnih radova i ove disertacije. Zahvaljujem za sve korisne savete, ukazano poverenje, odličnu saradnju i podršku tokom eksperimentalnog i teorijskog dela izrade ove disertacije.

Prof. dr Tanji Berić, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, za ukazano poverenje, korisne savete i sugestije tokom pisanja naučnih radova i same disertacije. Zahvaljujem na lepoj saradnji, podršci, izdovojenom vremenu i uloženom trudu.

Prof. dr Slaviši Stankoviću, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, za uvođenje u naučno-istraživački rad još od master studija, a naročito što je od početka prepoznao moj trud i pružio mi mogućnost za bavljenjem naučno-istraživačkim radom. Zahvaljujem za preneto znanje, sve stručne i korisne savete, sadržajnu saradnju i kritičku ocenu doktorske disertacije.

Dr Dušici Delić, naučnom savetniku Instituta za zemljište, za ukazanu priliku da budem deo tima Odseka za mikrobiologiju, na nesebično podeljenom iskustvu i prenetom znanju, korisnim savetima i kritičkoj oceni doktorske disertacije.

Dr Ivanu Nikoliću, naučnom saradniku Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, za pomoć pri obradi rezultata i za korisne savete prilikom finalizacije ove disertacije.

Zahvalnost dugujem i dr Snežani Anđelković, višem naučnom saradniku Instituta za krmno bilje u Kruševcu, na saradnji i tome što je omogućila realizaciju oglada u polju.

Hvala svim kolegama iz Instituta za zemljište na kolegijalnosti i prijateljskoj atmosferi. Posebnu zahvalnost dugujem dr Aneti Buntić, naučnom saradniku Insituta za zemljište, na odličnoj saradnji tokom rada u laboratoriji, naučnim diskusijama i prijateljskom odnosu tokom svakodnevnog rada u kancelariji. Hvala i kolegama sa Odseka za agrohemiju Instituta za zemljište, Marini Jovković i Zoranu Diniću na pomoći prilikom izvođenja hemijskih analiza. Želim da se zahvalim i svim profesorima i mladim saradnicima Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta na kolegijalnosti i profesionalnom odnosu.

Zahvaljujem se mojoj porodici, Ikonićima i Marinčevićima na безусловnoj ljubavi, podršci i razumevanju koje mi svakodnevno pružaju. Hvala mom Zoranu na ljubavi, podršci i tome što uvek veruje u mene, a posebno kada je najpotrebnije.

Ovaj rad posvećujem mojim roditeljima Biljani i Milivoju

Diverzitet bakterija izolovanih iz korenskih kvržica lucerke (*Medicago sativa* L.) i žutog zvezdana (*Lotus corniculatus* L.) i njihov potencijal za poboljšanje rasta biljaka

Sažetak

Korenske kvržice leguminoza su bitan izvor bakterija koje mogu da poboljšavaju rast biljaka. U ovom istraživanju izolovano je ukupno 152 bakterijska izolata iz korenskih kvržica lucerke (*Medicago sativa* L.) i žutog zvezdana (*Lotus corniculatus* L.), od čega je 14% izolata iz lucerke i 23% iz zvezdana imalo sposobnost nodulacije iste biljne vrste pri reinokulaciji. Veći procenat izolata poreklom iz korenskih kvržica lucerke pokazao je sposobnost produkcije siderofora, dok je solubilizacija fosfata i produkcija indol sirćetne kiseline bila zastupljenija kod izolata iz zvezdana. Antifungalno dejstvo je pokazalo 17 izolata, pri čemu se izolat *B. mojavensis* L3 izdvojio kao najefikasniji protiv ispitivanih vrsta roda *Fusarium*. Genetička karakterizacija izolata je pokazala da nerizobijalni izolati iz obe biljne vrste većinom pripadaju rodu *Bacillus*. Rizobijalni izolati iz lucerke pripadali su rodu *Sinorhizobium* (*Ensifer*), a iz zvezdana rodu *Mesorhizobium*. Ogledi u saksijama pokazali su da izolati *Mesorhizobium* sp. (U1C, 754 i 631oz) tolerantni na pH 5 utiču na povećanje prinosa zvezdana u kiselom zemljištu, uz optimalni sadržaj mikro- i makroelemenata u biljnoj biomasi. Izolati *B. megaterium* DZK1BH i *Mesorhizobium* sp. 631oz su imali pozitivan uticaj na rast žutog zvezdana, ježevice i njihove smeše, takođe u kiselom zemljištu. U poljskom ogledu, sojevi *S. meliloti* L4 i *B. megaterium* DLK2Eh pozitivno su uticali na prinos lucerke, ježevice i njihove smeše u zemljištu sa povećanom koncentracijom teških metala (Ni, Cr i Pb). Istraživanje diverziteta bakterija iz korenskih kvržica žutog zvezdana i lucerke na teritoriji Srbije ukazalo je na postojanje autohtonih sojeva sa dobrim potencijalom za poboljšanje rasta biljaka, naročito u zemljištima niske produktivnosti.

Ključne reči: Korenske kvržice, *Medicago sativa* L., *Lotus corniculatus* L., promocija rasta biljaka, mikro- i makroelementi, rizobije, *Sinorhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Bacillus* spp., kisela zemjišta

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Mikrobiologija

Diversity of bacteria isolated from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and bird's-foot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) and their potential in plant growth promotion

Abstract

Root nodules of legume plants are an important source of bacteria that can improve plant growth. In this research, 152 bacterial isolates were obtained from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and bird's-foot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) and 14% of alfalfa and 23% of bird's-foot trefoil isolates nodulated appropriate plants during reinoculation. The higher percentage of alfalfa isolates produced siderophores, while the ability to solubilise phosphates and to produce indole acetic acid was prevalently represented in bird's-foot trefoil isolates. Antifungal activity was recorded for 17 isolates, with isolate *B. mojavensis* L3 as the most effective against examined *Fusarium* species. Genetic characterization of isolates showed that non-rhizobial isolates from both plant species mostly belong to the *Bacillus* genus. Rhizobial isolates from alfalfa belonged to the *Sinorhizobium* (*Ensifer*) and from bird's-foot trefoil to *Mesorhizobium* genus. Pot experiments showed that *Mesorhizobium* sp. isolates (U1C, 754 and 631oz), tolerant to pH 5, increased the yield of bird's-foot trefoil in acid soil, with the optimal content of micro- and macroelements in plant biomass. Isolates *B. megaterium* DZK1BH and *Mesorhizobium* sp. 631oz positively affected the growth of bird's-foot trefoil, orchardgrass and their mixture, also in acid soil. A field experiment showed the positive effect of isolates *S. meliloti* L4 and *B. megaterium* DLK2Eh on the yield of alfalfa, orchardgrass and their mixture in soil with increased concentration of heavy metals (Ni, Cr and Pb). Research of bacterial diversity within the root nodules of bird's-foot trefoil and alfalfa in Serbia indicated the presence of autochthonous strains with good potential for improving plant growth, especially in soils of low productive characteristics.

Keywords: Root nodules, *Medicago sativa* L., *Lotus corniculatus* L., plant growth promotion, micro- and macroelements, rhizobia, *Sinorhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp., *Bacillus* spp., acid soils

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Microbiology

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Leguminozne biljke.....	1
1.2. Uloga rizobijalnih bakterija u formiranju korenskih kvržica.....	2
1.3. Bakterije korenskih kvržica lucerke i žutog zvezdana.....	5
1.4. Bakterijski mehanizmi poboljšanja rasta biljaka.....	7
1.5. Značaj bakterija korenskih kvržica u poljoprivredi.....	10
1.6. Poboljšanje rasta biljaka na zemljištima niskih produktivnih sposobnosti.....	11
1.7. Istraživanja bakterija korenskih kvržica žutog zvezdana i lucerke na području Republike Srbije.....	13
2. CILJEVI RADA	15
3. MATERIJAL I METODE	16
3.1 Materijal.....	16
3.1.1. Hranljivi medijumi za gajenje bakterija i gljiva.....	16
3.1.2. Reagensi za bojenje po Gramu.....	17
3.1.3. Hranljivi medijumi za određivanje produkcije enzima.....	17
3.1.4. Medijumi za određivanje PGP osobina bakterija.....	18
3.1.5. Podloge za gajenje biljaka.....	19
3.1.6. Rastvori za rad sa DNK.....	19
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Uzorkovanje biljnog materijala.....	20
3.2.2. Izolacija i preliminarna karakterizacija bakterija korenskih kvržica.....	20
3.2.3. Testiranje osobina izolata da poboljšavaju rast biljaka <i>in vitro</i>	21
3.2.4. Testiranje tolerancije izolata na nepovoljne uslove sredine.....	21
3.2.5. <i>In vitro</i> skrining antagonističke aktivnosti izolata.....	22
3.2.5.1. Metoda dualne kulture.....	22
3.2.5.2. Test produkcije HCN.....	22
3.2.5.3. Kvalitativno određivanje produkcije hidrolitičkih enzima.....	22
3.2.6. Testiranje efikasnosti azotofiksacije.....	22
3.2.7. Metode rada sa DNK.....	23
3.2.7.1. Izolacija genomske DNK.....	23
3.2.7.2. Umnožavanje fragmenata DNK metodom PCR.....	23
3.2.7.3. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu.....	25
3.2.7.4. Filogenetska analiza.....	25
3.2.8. Postavke <i>in vivo</i> ogleda.....	26
3.2.8.1. Uticaj bakterijske inokulacije na rast i nutritivni sastav žutog zvezdana u kiselom zemljištu (ogled u saksijama I).....	26

3.2.8.2. Uticaj bakterijske inokulacije na rast i nutritivni sastav žutog zvezdana, ježevice i njihove smeše u kiselom zemljištu (ogled u saksijama II).....	26
3.2.8.3. Uticaj bakterijske inokulacije na rast i nutritivni sastav lucerke, ježevice i njihove smeše (ogled u polju)	26
3.2.9. Hemijske i fizičke analize zemljišta	27
3.2.9.1. Hemijske analize zemljišta.....	27
3.2.9.2. Osnovne hemijske analize zemljišta	27
3.2.9.3. Dodatne hemijske analize zemljišta	27
3.2.9.4. Fizičke analize zemljišta	28
3.2.10. Hemijske analize biljnog materijala	28
3.2.11. Statističke analize	28
4. REZULTATI	29
4.1. Hemijske analize zemljišta	29
4.2. Izolacija i preliminarna karakterizacija bakterija korenskih kvržica.....	30
4.2.1. Određivanje uticaja abiotičkih faktora na rast izolata	30
4.3. Testiranje osobina izolata da promovišu rast biljaka <i>in vitro</i>	31
4.4. <i>In vitro</i> skrining antifungalne aktivnosti izolata.....	36
4.5. Kvalitativno određivanje produkcije hidrolitičkih enzima.....	38
4.6. Testiranje efikasnosti azotofiksacije rizobijalnih izolata	40
4.7. Identifikacija bakterijskih izolata	42
4.8. Uticaj bakterijske inokulacije na rast i nutritivni sastav žutog zvezdana u kiselom zemljištu (ogled u saksijama I)	49
4.9. Uticaj bakterijske inokulacije na rast i nutritivni sastav žutog zvezdana, ježevice i njihove smeše u kiselom zemljištu (ogled u saksijama II).....	56
4.10. Uticaj bakterijske inokulacije na rast i nutritivni sastav lucerke, ježevice i njihove smeše (ogled u polju)	62
5. DISKUSIJA	67
6. ZAKLJUČCI	75
7. LITERATURA	77
8. PRILOZI.....	98

1. UVOD

1. UVOD

1.1. Leguminozne biljke

Leguminozne biljke ili leguminoze (familija Fabaceae) su od velikog ekonomskog i ekološkog značaja, a pripada im oko 5% svih poznatih biljnih vrsta. Familija Fabaceae obuhvata oko 700 rodova sa preko 20.000 vrsta rasprostranjenih širom sveta, od kojih se mnoge koriste za ljudsku i stočnu ishranu, ili kao lekovite i ukrasne biljke (Hasanuzzaman et al., 2020). Posle trava (familija Poaceae), leguminoze su jedna od najvažnijih biljnih grupa za ljudsku ishranu, kao što su soja, kikiriki, grašak, pasulj i drugo, zbog visokog sadržaja proteina,. Osim toga, ove biljke se najviše koriste za stočnu ishranu i smatraju se neophodnim za održavanje zdravlja životinja, kao i kvaliteta životinjskog mesa i mleka (FAO, 2016).

Neke od najznačajnijih vrsta leguminoza koje se koriste za stočnu ishranu pripadaju rodovima *Lotus* i *Medicago* (Ovalle et al., 2015) (Slika 1). Takođe, ove biljne vrste često se uzgajaju u mešavinama sa travama kao što je *Dactylis glomerata* L., *Bromus biebersteinii* L., *Poa pratensis* L., *Festuca arundinacea* L. i *Lolium perenne* L., radi povećanja profitabilnost i održivosti sistema ispaše (Sanderson et al., 2005). Prisustvo korova u smešama značajno je manje u odnosu na samostalne useve leguminoza i trava, zbog većeg potencijala za kompeticiju sa korovskim biljkama (Sanderson et al., 2013). Ježevica (*Dactylis glomerata* L.) je višegodišnja trava koja u smešama sa leguminozama predstavlja poželjnu alternativu za visoki vijuk (*Festuca arundinacea* L.), zbog manje kompetitivnosti prema leguminozama. Smanjena kompetitivnost ove trave omogućava njeno uspešno gajenje na našem području u smešama sa leguminozama, pre svega lucerkom (Ćupina et al., 2014). Zbog svoje povoljne strukture, veoma je pogodna za ishranu stoke u vidu sena, kako u samostalnoj formi, tako i u mešavini sa lucerkom (Aiken et al., 2020). Ova trava može da raste i na zemljištima niske plodnosti, ali vrhunac svog proizvodnog potencijala dostiže na zemljištima koja su bogata azotom. U odnosu na trave sličnih upotrebnih vrednosti, formiranje useva ježevice je najlakše ostvarivo (Casler et al., 2019).



Slika 1. Biljke žutog zvezdana (levo) (preuzeto iz: <https://www.feedipedia.org>) i lucerke (desno) (preuzeto iz: <https://www.britannica.com>)

Rod *Lotus* se sastoji od preko 200 vrsta koje tolerišu različite uslove plodnosti, vlage i pH zemljišta (Larsen, 1958). Hranljiva vrednost biljaka ovog roda je visoka, dok je njena najznačajnija osobina kao stočne hrane to što ne izaziva nadimanje kod stoke prilikom ispaše (Swanson, et al., 1990; Casler et al., 2019). Količina azota koji se može fiksirati od strane ove biljne vrste može dostići i do 200 kg ha⁻¹, prilikom efikasne simbioze sa rizobijalnim bakterijskim vrstama (Vučković et al., 2006). Takođe, ova biljna vrsta se može koristiti za ishranu stoke u vidu smeše sa travama, a poželjna je i kao predusev za gajenje različitih neleguminoznih biljaka zbog obogaćivanja zemljišta azotom tokom procesa azotofiksacije (Hunt et al., 2014). Žuti zvezdan (*Lotus corniculatus* L.) je pionirska biljka koja kolonizuje marginalna i zagađena zemljišta i najčešće je korišćena vrsta roda *Lotus* za obnovu kontaminiranih lokacija. Žuti zvezdan ima sposobnost da raste na alkalnim ili kiselim zemljištima i pokazuje visok stepen tolerancije na povišene koncentracije aluminijuma i mangana,

kao i na salinitet. Takođe, spontano se može javiti na različitim zemljištima bogatim teškim metalima, što ukazuje na njegovu visoku prilagodljivost ovakvim zemljištima (Sujkowska-Rybkowska et al., 2020).

Među vrstama roda *Medicago*, lucerka (*Medicago sativa* L.) se trenutno uzgaja na površini od preko 45 miliona hektara u svetu (Mielmann, 2013). Zbog visokog i kvalitetnog prinosa, lucerka je najvažnija biljna vrsta za ishranu stoke. Lucerka predstavlja dobar izvor ugljenih hidrata, proteina (15-22%), minerala i vitamina (Mielmann, 2013). Lucerka se zbog svojih osobina, kao što su brzo rastući korenov sistem i visoki prinosi u nadzemnoj biomasi koristi i kao model biljka za remedijaciju kontaminiranog zemljišta (Tussipkan & Manabayeva, 2022; Ju et al., 2020). U zemljištima sa niskim pH i nedostatkom hranljivih materija dolazi do smanjenja prinosa, veka trajanja useva i smanjene konkurentnosti lucerke protiv korova (Caddel et al., 2004). Lucerka najbolje uspeva na neutralnim do slabo kiselim zemljištima (pH 6,6 - 7,5), a njen nedostatak je slaba tolerancija na niske pH vrednosti zemljišta. Relativna tolerancija glavnih krmnih leguminoza na kiselost zemljišta je sledeća: lucerka (*Medicago sativa* L.) < bela detelina (*Trifolium repens* L.) < kuglasta detelina (*Trifolium incarnatum* L.) < crvena detelina (*Trifolium pratense* L.) < žuti zvezdan (*Lotus corniculatus* L.) (Horrocks & Vallentine, 1999). Kako je žuti zvezdan značajno tolerantiji na kiselost zemljišta nego lucerka, može imati potencijal za upotrebu na zemljištima gde kiselost ograničava postojanost useva lucerke.

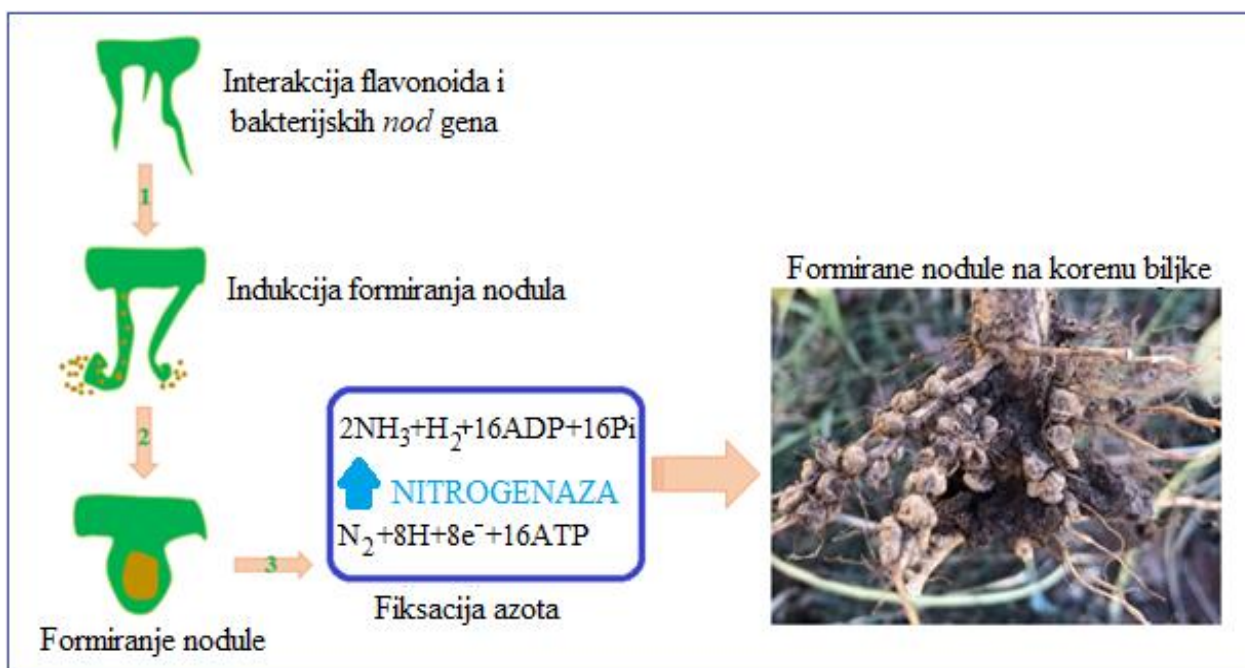
1.2. Uloga rizobijalnih bakterija u formiranju korenskih kvržica

Rizobije su zemljišne bakterije koje imaju sposobnost da na korenima leguminoznih biljaka formiraju korenske kvržice (nodule) u kojima se odvija proces azotofiksacije. Ove bakterije nazivaju se još i simbiozni fiksatori azota, i mogu vršiti azotofiksaciju samo u uslovima formiranja simbioze sa leguminozama (Garrity et al., 2004; Lindström & Mousavi 2019). Pod rizobijama se podrazumevaju vrste rodova *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Mesorhizobium* i *Bradyrhizobium*. U okviru korenskih kvržica osim rizobija, otkriven je veliki broj drugih vrsta nenodulišućih (nerizobijalnih) bakterija (*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Nocardia* spp., *Serratia* spp. i druge).

Uspostavljanje simbioze između rizobija i leguminoza je visoko specifična interakcija, tako da samo određene vrste rizobija mogu efikasno nodulisati određene vrste biljaka. Tokom ovih interakcija, biljka na korenovom sistemu razvija korenske kvržice ili nodule (Gourion et al., 2015). Korenske kvržice obezbeđuju povoljno okruženje za bakterije, gde su zaštićene od nepovoljnih uslova okoline (van Rhijn & Vanderleyden 1995; Webster et al., 1997; Dent & Cocking, 2017). Biljke snabdevaju bakterije hranljivim materijama (pretežno dikarboksilnim kiselinama), dok za uzvrat dobijaju redukovane forme azota od bakterija. Iako je azot najzastupljeniji element u atmosferi, biljke mogu da koriste samo amonijačne i nitratne forme ovog elementa (NH_4^+ i NO_3^-). Azot je limitirajući element za rast i razvoj biljaka i koristi se u procesima sinteze nukleinskih kiselina, aminokiselina, proteina i drugih važnih biomolekula kao što je adenoizin-trifosfat (ATP). Osim toga, azot je i jedan od glavnih komponenti hlorofila, biljnog pigmenta koji je najvažniji u procesu fotosinteze.

Formiranje nodula je indukovano lučenjem flavonoidnih jedinjenja od strane leguminoza u rizosferu, gde ona aktiviraju transkripciju bakterijskih *nod* gena koji proizvode lipohitoooligosaharidni signal neophodan za razvoj korenskih kvržica (Oldroyd et al., 2011). Prepoznavanje između biljnih flavonoida i bakterijskih Nod proteina (koji su kodirani *nod* genima) je odgovorno za definisanje specifičnosti simbioze biljke i rizobije (Wang et al., 2018a). Infekcija korenova leguminoza rizobijalnim bakterijama može se odvijati intra- ili interćelijskim putem. Infekcija intraćelijskim putevima podrazumeva pojavu infekcije na korenskim dlačicama, gde se formira infektivna nit (engl. IT - „infection thread“). Infektivna nit se izdužuje sve do primordijalnih ćelija nodula. Ovakav tip infekcije je najčešći u simbiozi između rizobija i leguminoza, određen je biljnom vrstom i može se destiti i na mestima korena gde bočni korenovi izlaze kroz epidermalne pukotine ili između epidermalne ćelije korena i susedne korenske dlačice (Gualtieri & Bisseling, 2000; Vega-Hernández et al., 2001). Najmanje 25% svih rodova leguminoza može biti inficirano rizobijalnim vrstama, nezavisno od formiranja IT. Rizobije koje ulaze u biljnu ćeliju domaćina su okružene membranom

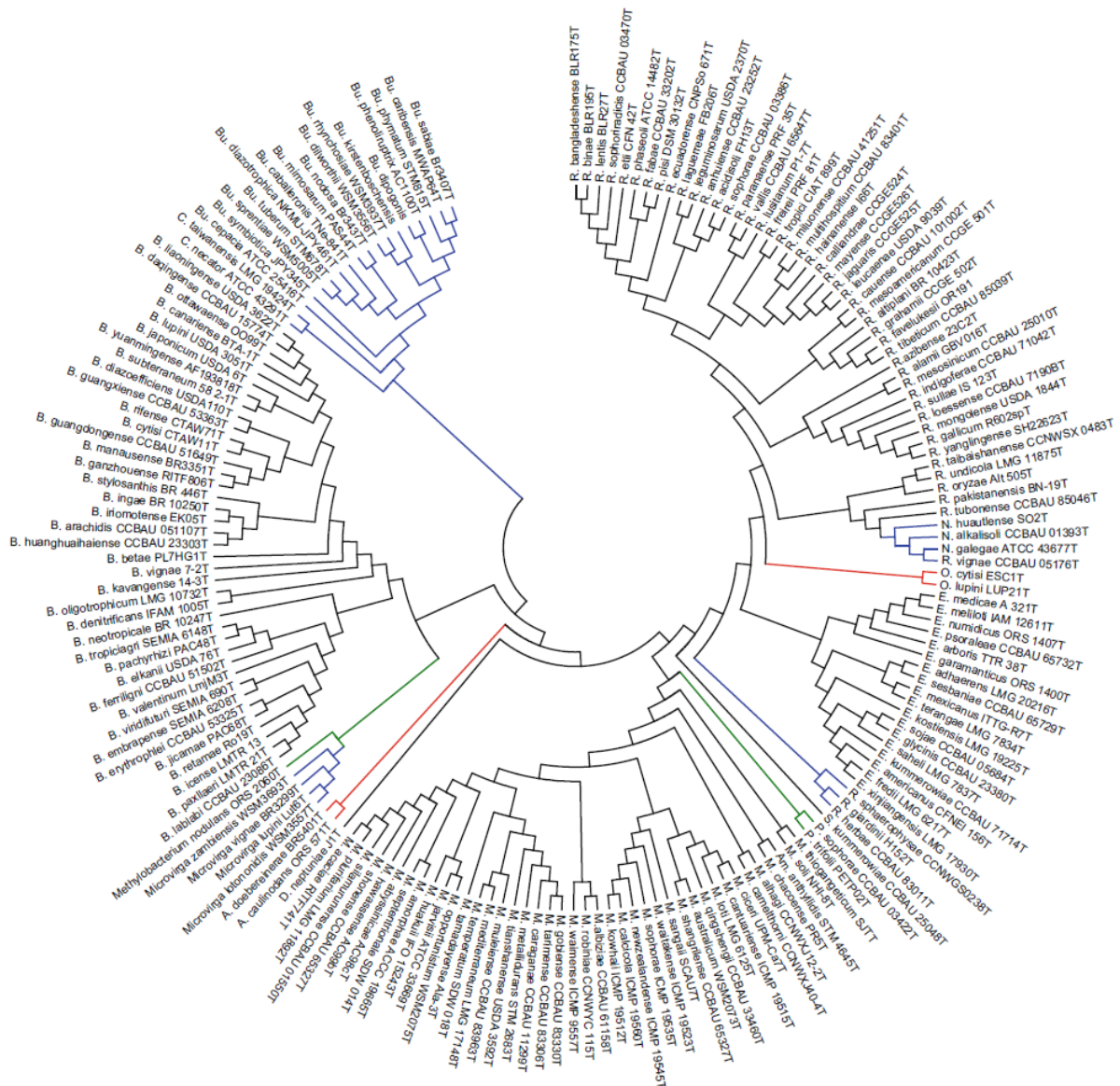
koja potiče od domaćina koja se naziva peribakteroidna membrana ili membrana simbiozoma (Sprent, 2007). Ovaj novi ćelijski kompartiment formiran od intracelularnih bakterija (bakteroida) zatvorenih membranom simbiozoma naziva se simbiozom. Bakterije se mogu deliti unutar simbiozoma, a celi simbiozomi se takođe mogu deliti unutar ćelije domaćina, pri čemu se obe ove vrste deobe vrše sinhrono ili ne. Nakon što prestane deoba rizobija, bakterije se diferenciraju u bakteroide koji fiksiraju azot. Simbiozom je osnovna jedinica nodula za fiksiranje azota, a azot fiksiran u bakteroidima se transportuje u citoplazmu biljke domaćina, gde se asimiluje i transportuje ka ostatku biljke (Hinde & Trautman, 2002). Za efektivnu azotofiksaciju neophodno je i prisustvo bakterijske nitrogenaze, enzima koji omogućavaju konverziju azota iz N_2 oblika u NH_3 , uz potrošnju 16 molekula ATP-a (Fischer, 1994) (Slika 2). Formirani amonijak predstavlja oblik azota koji leguminozne biljke mogu koristiti. Ovakav način azotofiksacije naziva se i biološka fiksacija azota. Azotofiksacija ostvarena simbiozom između rizobija i leguminoza učestvuje sa oko 20% u ukupnoj biološkoj fiksaciji N (Lodwig & Poole 2003; O’Gara and Shanmugam 1976).



Slika 2. Formiranje korenskih kvržica (preuzeto i modifikovano iz Sheoran et al., 2021)

Pored fiksacije azota u simbiozi sa leguminozama, dokazano je da rizobijalne vrste mogu interagovati sa korenskim sistemom neleguminoznih biljaka bez formiranja nodula (Mehboob et al., 2009). Uprkos tome što ne mogu da izazovu nodulaciju, rizobijalne vrste mogu ući u korenov sistem različitih neleguminoznih biljaka na mestu nicanja bočnih korena ili na mestima površinskog oštećenja korenovog sistema. Nakon što uđe u korenov sistem biljaka, rizobija prodire u ćelije korteksa mladih bočnih korenova (Cocking et al., 1995). Proizvodnja specifičnih rizobijalnih litičkih enzima kao što su celulaze, amilaze i pektinaze mogla bi biti osnova efikasnosti prodiranja rizobija u sistem korteksa korena. Mehanizmi između rizobija i neleguminoza potrebni za uspešnu kolonizaciju ostvaruju se razmenom različitih signalnih molekula (Santi et al., 2013). Pokazano je da različite vrste neleguminoza mogu da luče fenolna jedinjenja (vanilin i isovanilin) koja indukuju transkripciju rizobijalnih *nod* gena (Le Strange et al., 1990; Reddy et al., 2007). Kako se na mestima rasta i oštećenja korena luče povećane količine ovih jedinjenja, rizobije iz rizosfere dobijaju signal o mestima ulaska u koren neleguminoza (Rinaudi & Giordano, 2010). Na ovaj način rizobijalne vrste mogu kolonizovati i korenski sistem neleguminoznih biljaka, bez formiranja nodula.

Trenutna taksonomija rizobijalnih bakterija koje imaju sposobnost da vrše nodulaciju u okviru reda Rhizobiales otkriva njihovu širu raznolikost i obuhvata 13 rodova sa 159 vrsta (Tak et al. 2017). Neki od najznačajnijih predstavnika ovog reda sa sposobnošću nodulacije prikazani su na Slici 3.



Slika 3. “Neighbour-joining” filogenetsko stablo na osnovu sekvenci za 16S rRNK najpoznatijih nodulišućih rizobijalnih vrsta (preuzeto iz Tak et al. 2017)

Pored rizobijalnih vrsta, u korenskim kvržicama leguminoznih biljka potvrđeno je prisustvo i drugih bakterija koje nemaju sposobnost nodulacije (Soares et al., 2020). Nenodulišuće bakterije korenskih kvržica najčešće pripadaju vrstama rodova *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Enterobacter*, *Erwinia* i *Serratia* (Lodewyckx et al., 2002; Dudeja et al., 2011; Soares et al., 2020).

Vrste roda *Bacillus* su široko rasprostranjene u prirodi, nalaze se u vazduhu, vodi, i zemljištu (Nicholson, 2002). Jedna od najistaknutijih karakteristika vrsta roda *Bacillus* je sposobnost formiranja endospora koje pružaju visoku otpornost na nepovoljne uslove spoljašnje sredine (zračenje, suša, UV svetlost i toplota), omogućavajući ovim bakterijama da prežive u nepovoljnim uslovima tokom produženog perioda u stanju mirovanja (Nicholson, 2002). Rod *Bacillus* obuhvata više od 280 vrsta, do kojih su najpoznatije vrste *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. cereus* i *B. thuringiensis* (Gupta et al., 2020). Vrste ovog roda osim povoljnih osobina koje ih čine bakterijama koje poboljšavaju rast biljaka (engl. PGP – „plant growth promoting“ bakterije) (*B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. velezensis*, *B. safensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis*), mogu imati i osobine

koje ih čine patogenima čoveka ili životinja (*B. cereus* i *B. anthracis*) (Ansari & Ahmad, 2019; Dahmani et al., 2020; Wang et al., 2020; Kazerooni et al., 2021; Enosi Tuipulotu et al., 2021). Zbog širokog spektra fizioloških karakteristika i sposobnosti da proizvode različite enzime, antibiotike i metabolite, vrste roda *Bacillus* se koriste u mnogim medicinskim, farmaceutskim, poljoprivrednim i industrijskim procesima (Celandroni et al., 2019).

Rod *Pseudomonas* trenutno sadrži 202 vrste, što ga čini rodnom Gram-negativnih bakterija koji sadrži najveći broj vrsta (Özen & Ussery, 2012). Vrste ovog roda široko su zastupljene u svim delovima životne sredine, uključujući vodu, zemljište i korenske kvržice različitih leguminoznih biljaka. Osim u korenskim kvržicama žutog zvezdana i lucerke, prisustvo vrsta roda *Pseudomonas* je detektovano unutar korenskih kvržica leguminoznih biljaka kao što su *Medicago lupulina* L., *Brassica napus* L., *Phaseolus vulgaris* L. i *Sophora alopecuroides* L. (Kong et al., 2017; Jiménez-Gómez et al., 2020; Lally et al., 2017; Tapia-García et al., 2020; Zhao et al., 2013). Vrste ovog roda mogu imati ulogu u poboljšanju rasta biljaka (*P. fluorescens*, *P. putida* i *P. protegens*), dok neke vrste (*P. syringae*) mogu biti i patogeni biljaka (Passera et al., 2019; Xin et al., 2018).

1.3. Bakterije korenskih kvržica lucerke i žutog zvezdana

Razumevanje mikrobioma korenskih kvržica leguminoza i ispitivanje njihovih značajnih PGP osobina, ima važnu biotehnološku primenu. Pokazano je da bakterije korenskih kvržica leguminoza mogu povećati prinose useva, ukloniti zagađivače, inhibirati patogene i proizvesti veće količine fiksiranog azota (Dudeja et al., 2011). Da bi se omogućila primena pravilno selektovanih bakterija, neophodno je razumevanje mikrobioma nodula kao i razumevanje mehanizma ulaska i funkcija nenodulišućih bakterija (Wigley et al., 2017).

Tabela 1. Bakterijske vrste detektovane u korenskim kvržicama lucerke

Bakterije detektovane u korenskim kvržicama lucerke		Referenca	
Rizobijalne bakterije	<i>S. meliloti</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	Wang et al., 2018b; Ilyas et al., 2022; Kang et al., 2019; Torres Tejerizo et al., 2016; Martínez-Hidalgo et al., 2022; Stajković-Srbinić et al., 2012
	<i>S. medicae</i>	<i>R. tibeticum</i>	
	<i>S. arbores</i>	<i>R. radiobacter</i>	
	<i>R. favelukesii</i>	<i>R. rosettiformans</i>	
	<i>R. gallicum</i>	<i>R. yanglingense</i>	
Nenodulišuće bakterije	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Serratia plymuthica</i>	Noori et al., 2018; Ilyas et al., 2022; Aroua et al., 2019; Martínez-Hidalgo et al., 2020; Noori et al., 2021; Lai et al., 2015; Khalifa et al., 2016; Khalifa & Almalki, 2015; Martínez-Hidalgo et al., 2022
	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	<i>Enterobacter cloacae</i>	
	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Oceanobacillus caeni</i>	
	<i>Micromonospora</i> sp.	<i>Variovorax paradoxus</i>	
	<i>Micromonospora noduli</i>	<i>Achromobacter spanium</i>	
	<i>Micromonospora taraxaci</i>	<i>Paenibacillus medicaginis</i>	
	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	
	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>B. altitudinis</i>	
	<i>Ohtaekwangia</i> sp.	<i>B. altitudinis</i> ,	
	<i>Kineosporia</i> sp.	<i>B. cereus</i> ,	
	<i>Novosphingobium</i> sp.	<i>B. dabaoshanensis</i>	
	<i>Aquabacterium</i> sp.	<i>B. licheniformis</i>	
	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>B. safensis</i>	
	<i>Kosakonia cowanii</i>	<i>B. siamensis</i>	
	<i>Shinella</i> sp.	<i>B. simplex</i>	
	<i>Bosea</i> sp.	<i>B. stercoris</i>	
<i>Dyadobacter</i> sp.	<i>B. subtilis</i>		
<i>Ochrobactrum anthropi</i> ,	<i>B. tequilensis</i>		
<i>Streptomyces sparsogenes</i>	<i>B. zhangzhouensis</i>		
<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.		
<i>Streptomyces naganishii</i>	<i>B. megaterium</i>		

Mikrobiom korenskih kvržica lucerke, pored tipa zemljišta u kom biljka raste određen je i genotipom same biljke (Crosbie et al., 2021). Rizobijalne vrste koje najčešće indukuju formiranje kvržica na korenima lucerke pripadaju rodu *Sinorhizobium* (*S. meliloti* i *S. medicae*), dok je takođe zabeležena i nodulaciona sposobnost nekih vrsta roda *Rhizobium* (Torres et al., 2011; Tabares-da Rosa et al., 2019). Rezultati istraživanja pokazuju da, pored rhizobijalnih vrsta, korenske kvržice lucerke sadrže i raznolik skup drugih nenodulišućih vrsta, u nekim slučajevima učestalosti čak i do >50% (Wigley et al., 2017). Prisustvo nerizobijalnih bakterija u korenskim kvržicama leguminoza potencijalno je selektivno regulisano od strane biljke domaćina (Zgad Zaj et al., 2015). Na primer, vrste roda *Bacillus* su zastupljene u više od 0,5% ukupnih sekvenci dobijenih sekvenciranjem ukupne bakterijske DNK iz korenskih kvržica lucerke (Wigley et al., 2017). U Tabeli 1 su navedene rizobijalne i nenodulišuće bakterije detektovane u korenskim kvržicama lucerke.

Autohtone populacije rizobija generalno variraju u svojoj simbioznoj efikasnosti i kompetitivnosti za nodulaciju biljke domaćina, gde stepen tolerancije rizobija na abiotske faktore sredine ima značajnu ulogu. Rizobijalne vrste koje najčešće nodulišu biljke žutog zvezdana pripadaju rodu *Mesorhizobium* (Tabela 2) (Lorite et al., 2016).

Tabela 2. Bakterijske vrste detektovane u korenskim kvržicama žutog zvezdana

Bakterije detektovane u korenskim kvržicama lucerke		Referenca	
Rizobijalne bakterije	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>M. erdmanii</i>	Reeve et al., 2014; Crosbie et al., 2021; Marcos-García et al., 2017; Lorite et al., 2016
	<i>M. jarvisii</i>	<i>M. tianshanense</i>	
	<i>M. albiziae</i>	<i>M. japonicum</i>	
Nenodulišuće bakterije	<i>Rhodococcus</i> spp.	<i>Geobacillus</i> spp.	Ampomah & Huss-Danell, 2011; Ríos-Ruiz et al., 2019; Muresu et al., 2022
	<i>Phyllobacterium loti</i>	<i>Paenibacillus</i> spp	
	<i>Actinoplanes</i> sp.	<i>Ancylobacter</i> sp.	
	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	
	<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Inquilinus</i> sp.	
	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>Oerskovia</i> sp.	
	<i>Phyllobacterium</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	

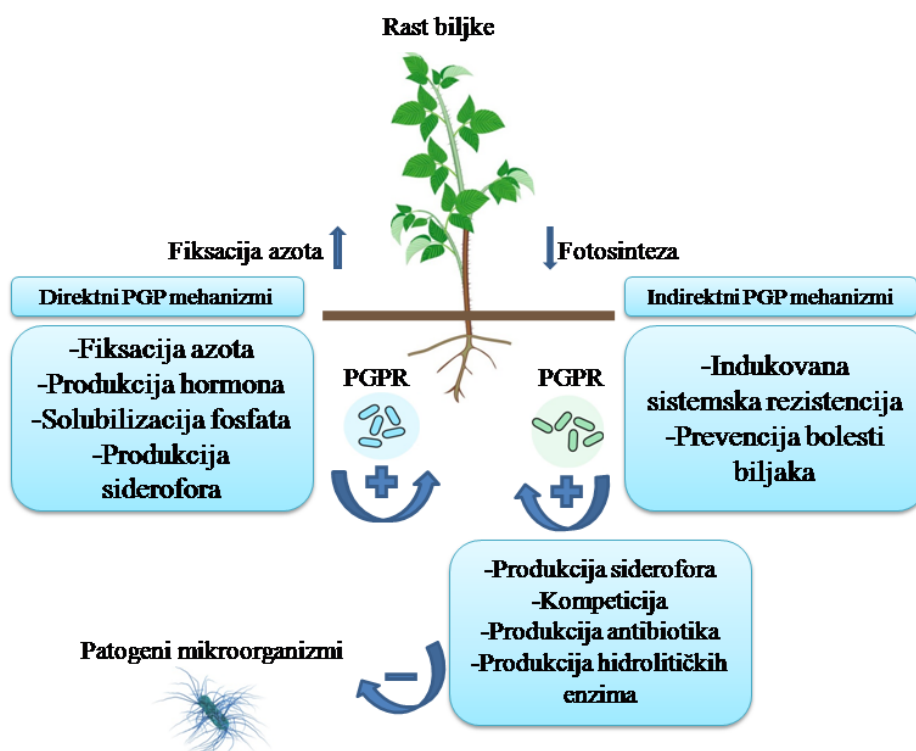
Osim rizobijalnih vrsta, dokazana je i sposobnost vrsta *Rhodococcus* spp., *Geobacillus* spp. i *Paenibacillus* spp. da nodulišu žuti zvezdan (Ampomah & Huss-Danell, 2011), dok je zabeleženo i prisustvo drugih nenodulišućih vrsta (Tabela 2). Iako je zastupljenost ovih vrsta relativno niska unutar korenskih kvržica (oko 6,5%), otkriće da neke nerizobijalne vrste mogu indukovati nodulaciju žutog zvezdana govori o značaju istraživanja bakterijskog diverziteta unutar nodula (Ampomah & Huss-Danell, 2011). Pojava velikog broja nenodulišućih vrsta roda *Bacillus* u korenskim kvržicama ukazuje na njihovu potencijalnu ulogu u poboljšanju aktivnosti i funkcije simbiozoma (Crosbie et al., 2021). Pokazano je i da se u okviru korenskih kvržica *Lotus parviflorus* L. nalazi veći procenat nenodulišućih bakterijskih vrsta u odnosu na druge vrste roda *Lotus* (Soares et al., 2020). Filogenetska istraživanja *nodA* gena u vrstama *Pseudomonas* sp. i *Burkholderia* sp. koje su nodulisale leguminozu *Robinia pseudoacacia* pokazala su visok stepen sličnosti sekvence ovog gena sa vrstom *Mesorhizobium septentrionale* i ukazala na mogućnost horizontalnog genskog transfera *nodA* između različitih bakterijskih vrsta (Shiraishi et al., 2010).

Identifikacija na osnovu sekvence gena za 16S rRNK i dalje je osnov klasifikacije bakterija. Međutim, blisko srodne vrste bakterija najčešće se ne mogu razlikovati samo na osnovu sekvence ovog gena. Zbog toga se druge genske sekvence, kao što su sekvence “housekeeping” gena, koriste kao filogenetski molekularni markeri u taksonomskim studijama (Gomila et al., 2015). “Housekeeping” geni se nalaze po definiciji u svim bakterijskim genomima i evoluiraju brže od gena za 16S rRNK i stoga predstavljaju markere sa većom moći diskriminacije u odnosu na gene za 16S rRNK (Keim, 2005). U ovim slučajevima, sekvenciranje “housekeeping” gena kao što su *atpD* (ATP sintaza F1, β -subjedinica), *gyrB* (DNK giraza, B subjedinica), *recA* (rekombinaza A), *rpoB* (RNA polimeraza, β -subjedinica) i *trpB* (triptofansintaza, β -subjedinica) ili *tuf* (elongacioni faktor EF-

Tu) može pružiti bolju rezoluciju u determinaciji bakterija do nivoa vrste (Rong & Huang, 2014; Draganić et al., 2017).

1.4. Bakterijski mehanizmi poboljšanja rasta biljaka

Mehanizmi kojima bakterije mogu poboljšati rast biljaka mogu biti direktni ili indirektni (Slika 4). Neki od direktnih mehanizama pomoću kojih bakterije poboljšavaju rast biljaka jesu proizvodnja biljnih hormona (auksin, citokinin, etilen) ili drugih hemijskih supstanci (lipo-hito-oligosaharidi), solubilizacija neorganskih fosfata, poboljšanje unosa biljnih hranljivih materija menjanjem morfologije korena, proizvodnja siderofora, itd. (Antoun & Prevost, 2005; Vessey, 2003). Indirektni mehanizmi, koji čine biokontrolu u užem smislu, uključuju poboljšanje rasta biljaka kroz supresiju i inhibiciju rasta patogena, parazitizam ili kompeticiju za nutrijente i prostor sa patogenima, ili preko indukovanja sistemske rezistencije u biljkama (Gopalakrishnan et al., 2015).



Slika 4. Najčešći mehanizmi delovanja PGP bakterija

Rizobijalne bakterije su široko proučavane zbog njihove simbiotske povezanosti sa leguminozama i sposobnosti fiksacije azota. Međutim, neki članovi rodova *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* i *Sinorhizobium* su sposobni da promovišu rast i razvoj biljaka i putem biohemijskih ili fizioloških mehanizama koji nisu vezani za fiksaciju azota (Boiero et al., 2007). Oni su sposobni da regulišu rast biljaka kroz proizvodnju i oslobađanje različitih metabolita kao što su fitohormoni, siderofore, ACC deaminaze, antibiotici, HCN i drugo (Ahmad et al., 2019; Boiero et al., 2007; Chandra et al., 2007; Saghafi et al., 2019; Serova et al., 2019; Vargas et al., 2009).

Smatra se da je osim fiksacije azota najvažniji direktni mehanizam kojim rizobijalne vrste promovišu rast biljaka sinteza različitih tipova fitohormona (Zahir et al., 2004). Proizvodnja auksina, citokinina, giberelina (GA) i abscisinske kiseline (ABA) je relativno česta karakteristika bakterija (Bhattacharjee et al., 2012; Boiero et al., 2007; Ferreira et al., 2020). Poznato je da bakterije koje proizvode hormone mogu poboljšati rast biljaka kolonizacijom semena ili korena (Chandra et al., 2007; Humphry et al., 2007; Mishra et al., 2006). Sposobnost bakterija da proizvode biljne hormone je različita, a tip i količina hormona varira u zavisnosti od bakterijske vrste (Boiero et al., 2007; Humphry et al., 2007). Jedan soj je najčešće sposoban da proizvede jedan ili više različitih fitohormona.

Pored rizosfernih bakterija, algi i gljiva, bakterije korenskih kvržica su dokazane kao jedan od glavnih proizvođača indol-3-sirćetne kiseline (IAA, najvažniji biljni hormoni tipa auksina) (Boiero et al., 2007; Pandey & Maheshwari 2007). Indol-3-sirćetna kiselina (proizvod metabolizma L-triptofana) je uključena u kontrolu ćelijske deobe, diferencijacije tkiva, dok rizobije koje proizvode IAA mogu indukovati povećanje koncentracije aminokiselina u biljnim tkivima (Jaiswal et al., 2021). Među rizobijalnim vrstama, *Sinorhizobium meliloti*, *Bradirhizobium* sp. i *Rhizobium* sp. ističu se kao producenti visokih koncentracija IAA (Kanaan & Al-Barhavee, 2021; Datta & Basu, 2000; Kiruthika & Arunkumar, 2021). Neke vrste koje pripadaju rodovima *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Serratia* su takođe prepoznati kao proizvođači IAA.

Još jedan značajan metabolit koji proizvode bakterije korenskih kvržica je enzim 1-aminociklopropan-1-karboksilazna (ACC) deaminaza. Ovaj enzim smanjuje nivo etilena (koji je povišen u biljnim tkivima tokom stresnih uslova) u biljkama, pretvaranjem prekursora etilena (ACC) u amonijak i α -ketobutirat (Orozco-Moskueda et al., 2019). Prvi dokaz koji dokumentuje prisustvo ACC deaminaze u rizobijama (*R. leguminosarum* i *R. hedisari*) dali su Ma et al. (2003). Pored toga, proizvođači ACC deaminaze pronađeni su i među sojevima *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Mesorhizobium* i *Bradyrhizobium* (Ma et al., 2003; Piromyou et al., 2017; Saghafi et al., 2019).

Gvožđe je važno u procesu fotosinteze i disanja, ali generalno je količina dostupnih Fe^{3+} jona niska u aerobnom okruženju, kako pri niskim tako i pri visokim pH vrednostima zemljišta (Masalha et al., 2000). Siderofore su mali, helirajući agensi visokog afiniteta za gvožđe, koji formiraju rastvorljive komplekse sa Fe^{3+} i mogu se uneti u ćelije aktivnim transportom (Neilands, 1993). Bakterije korenskih kvržica su sposobne da proizvode više različitih tipova siderofora: karboksilate (rizobaktin, citrat i antranilat), katehole, dihidroksamate (rizobaktin 1021 i vicibaktin) i trihidroksamate (Carson et al., 2000; Datta & Chakrabartty, 2014). Proizvodnja katehola ili karboksilata je sporadična i najčešće je specifična za soj. Siderofore tipa dihidroksamata su uglavnom karakteristika vrsta roda *Sinorhizobium*, a trihidroksamata roda *Rhizobium* (Carson et al., 2000). Prvi dokaz o sposobnosti rizobija da proizvede siderofore tipa dihidroksamata dali su Storey et al., (2006). Rizobaktin je prvi hemijski okarakterisan tip siderofora proizveden od soja *S. meliloti* (Storey et al., 2006). Mnoge studije su pokazale sposobnost *Serratia* sp. da proizvodi siderofore, sa vrstom *S. marcescens* kao najistaknutijim proizvođačem (Khilias et al., 2016; Dhar Purkaiastha et al., 2018; Cleto et al., 2021). Vrste roda *Pseudomonas* su takođe poznate po proizvodnji siderofora. Siderofore koje sintetiše *P. aeruginosa* posreduju u antagonističkom efektu ovog izolata protiv gljive *Rhizoctonia solani* (Sasirekha & Srividya, 2016). Takođe, utvrđeno je da siderofore koje sintetišu vrste roda *Pseudomonas* povećavaju dužinu izdanaka i korena, broj zrna i sadržaj gvožđa u stabljici, listu i semenu kukuruza (Sah et al., 2017).

Fosfor (P) je jedan od glavnih makroelemenata neophodnih za rast i razvoj biljaka. Međutim, fosfor se u zemljištu često se nalazi u nerastvorljivom obliku, kao $Ca_3(PO_4)_2$ u alkalnim zemljištima, ili kao fosfat Al i Fe u kiselim zemljištima. Sposobnost da se fosfati (organski i neorganski) pretvore u oblik koji je dostupan biljkama je važno svojstvo mnogih PGP bakterija, uključujući bakterije korenskih kvržica (rizobijalne i nerizobijalne). I kod biljaka i kod mikroorganizama, glavni mehanizam solubilizacije P je izlučivanje vodoničnih jona, proizvodnja organskih kiselina i biosinteza kisele fosfataze (Arcand & Schneider, 2006; Bais et al., 2006). Proizvodnja neorganskih i organskih kiselina snižava pH vrednost zemljišnog rastvora, pri čemu se iz $Ca_3(PO_4)_2$ oslobađa fosfor. Enzimska solubilizacija fosfata se odvija tokom mineralizacije organskih fosfata. Vrste roda *Pseudomonas*, kao što su *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. fragi*, *P. putida* i *Pseudomonas* sp. su dobri solubilizatori fosfata (Selvakumar et al., 2009).

Indukovana sistemska rezistencija (ISR) je stanje biljke stimulisane da izazove njen odbrambeni odgovor, kroz proizvodnju odbrambenih enzima biljaka, fenola, flavonoida ili drugih fitoaleksina (Das et al., 2017). Brojne vrste rizobijalnih bakterija mogu da izazovu sistemska rezistenciju proizvodnjom biostimulativnih agenasa (Arfaoui et al., 2006; Rabie, 1998). Pokazano je da pojedinačne ćelijske komponente bakterija mogu da indukuju ISR: lipopolisaharidi, flagele, ciklični lipopeptidi, homoseriniski laktoni, acetoin i butandiol (Lugtenberg & Kamilova 2009).

Antagonistički efekat protiv patogena ugavnom je uslovljen sintezom hidrolitičkih enzima koji utiču na razaranje ćelijskog zida fitopatogenih gljiva ili produkcijom antibiotika (Khan et al., 2018). Jedan od najčešćih hidrolitičkih enzima među vrstama roda *Bacillus* (kao što su *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amiloliquifaciens* i *B. stearothermophilus*) su amilaze (Gopinath et al., 2017). Proizvodnja amilaze od strane *Bacillus* sp. ima snažan antifungalni efekat na *Aspergillus flavus* koji proizvodi aflatoksin (Sapkota et al., 2019). Pektinaze razgrađuju kompleksni pektin do molekula monogalakturonske kiseline, koji se mogu transformisati u polisaharide (Schmitz et al., 2019). Potvrđeno je da *B. subtilis* može da proizvodi pektinolitičke enzime (Kaur & Gupta, 2017). Hitin je drugi najzastupljeniji biopolimer u prirodi, sastavljen od ponavljajućih jedinica N-acetil-D-glukozamina, koji se nalaze u insektima i gljivama (Martínez-Zavala et al., 2020). Glavna uloga bakterijskih hitinaza je u antifungalnom dejstvu. Hitinaze deluju kao agensi za biokontrolu protiv fitopatogenih gljiva koje sadrže hitin, pošto je hitin glavni sastojak ćelijskih zidova gljiva (Lagner & Göhre, 2016). Među vrstama *Bacillus*, dokazano je da *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis* i *B. licheniformis* mogu proizvoditi hitinaze (Martínez-Zavala et al., 2020). Nedavno su proteaze identifikovane kao glavni mikolitički enzimi sa značajnom ulogom u biokontroli gljiva. Indukujući hidrolizu peptidnih veza u proteinima koji se nalaze u ćelijskim membranama gljiva, proteolitički enzimi koje sintetišu bakterije izazivaju lizu gljivičnih ćelija što dovodi do ćelijske smrti (Ji et al., 2020). *Bacillus* spp. su među najznačajnijim proizvođačima proteaza, priznatih po tome što proizvode neutralne i alkalne proteolitičke enzime, koji su otporni na ekstremne temperature, pH i oksidirajuće agense (Contesini et al., 2018). Vrste iz roda *Serratia* potencijalno mogu imati jaku celulolitičku aktivnost (Cano-Ramirez et al., 2016). Takođe, vrste koje pripadaju rodu *Bacillus* često imaju složen i multifunkcionalan sistem celulaze (Khan et al., 2018). Proizvodnja različitih sekundarnih metabolita koji su toksični za druge mikroorganizme dokumentovana je i u slučaju rizobijalnih bakterija i to: antibiotika (bakteriocina) cijanovodonika (HCN) i mikolitičkih enzima (Arfaoui et al., 2006; Bardin et al., 2004; Chandra et al., 2007; Deshwal et al., 2003; Kumar et al., 2011).

Cijanovodonik (HCN) je sekundarni metabolit koji sintetišu različite vrste bakterija. HCN ometa snabdevanje ćelije energijom tako što inhibira transport elektrona, što dovodi do smrti izložene ćelije. Takođe, utvrđeno je da mnoge antagonističke vrste *Pseudomonas* proizvode HCN sa antimikrobnim delovanjem širokog spektra (Michelsen & Stougaard, 2012). Iako HCN ima veliki potencijal u biokontroli, nekoliko studija je sugerisalo da postoji nedostatak korelacije nivoa proizvedenog HCN sa efektima biokontrole *in vitro* (Abd El-Rahman et al., 2019). Međutim, primećeno je da HCN ima indirektan uticaj na povećanje dostupnosti hranljivih materija bakterijama i biljkama, tako što je uključen u geohemijske procese zemljišta (kao što je helacija metala) (Rijavec & Lapanje, 2016). Poznato je da bakterije koje se koriste u biokontroli, kao što su vrste koje pripadaju rodovima *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Bacillus* i *Pseudomonas*, proizvode HCN (Alemu, 2016).

Istraživanje koje su sproveli Krnjaja i autori (2005) pokazalo je da su vrste iz roda *Fusarium* (uključujući *F. proliferatum*, *F. oxysporum* i *F. graminearum*) preovlađujući gljivični patogeni izolovani iz zaraženog semena lucerke, koji izazivaju nekrozu korena i infekciju nadzemnog dela biljke. Istraživanje Gill et al. (2018) pokazalo je da bi osetljivost lucerke na bolest izazvanu *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* mogla biti povezana sa smanjenjem efikasnosti regulacije puteva biosinteze lignina. Određene vrste PGP bakterija imaju sposobnost inhibicije rasta fitopatogenih gljiva uz pomoć sinteze antifungalnih jedinjenja, kao što su lipopeptidi ili antibiotici (Khan et al., 2018). Dokazano je da proizvodnja biološki aktivnih jedinjenja kao što su antimikrobni lipopeptidi (AML) iz porodica surfaktina, iturina i fengicina, imaju značajan potencijal u borbi protiv biljnih patogena. Lipopeptidi koje sintetišu *Bacillus* vrste izražavaju svoj antifungalni efekat protiv fitopatogenih gljiva prodiranjem u ćelijske membrane, formiranjem jonskih pora i izazivanjem osmotske neravnoteže ćelijske membrane (Knight et al., 2018). Takođe, vrste iz roda *Pseudomonas* su prepoznate kao agensi biološke kontrole zbog njihove sposobnosti da sintetišu antibiotike (fenazine) i hidrolitičke enzime (Panpatte et al., 2016). Do danas je poznato preko 100 biološki aktivnih fenazina koje sintetišu uglavnom vrste rodova *Pseudomonas* i *Streptomyces* (McDonald et al., 2001).

1.5. Značaj bakterija korenskih kvržica u poljoprivredi

Tokom prethodnih godina površine pod lucerkom i pašnjacima se nisu značajno menjale, dok je pad prinosa (izražen u tonama) uočljiv tokom 2021. godine, što ukazuje na potrebu uvođenja novih i efikasnijih đubriva (Zavod za statistiku Republike Srbije). Najčešći tip đubriva koja se koriste za đubrenje poljoprivrednih površina su mineralna đubriva, gde se na ovaj način đubri oko 66,86% ukupnih poljoprivrednih površina (Agencija za zaštitu životne sredine). Međutim, njihova neprikladna i nekontrolisana upotreba može dovesti do značajnih gubitaka prinosa useva, kao i zagađenja zemljišta i vode (Adeemoie et al. 2009). Takođe, prekomerna upotreba mineralnih đubriva može dovesti do promene fizičko-hemijskih (poremećene adsorpcija jona i mobilizacija biogenih elemenata zemljišta) i mikrobioloških (smanjenja biodiverziteta autohtonih vrsta mikroorganizama) osobina zemljišta, koje se najviše ogledaju u smanjenju plodnosti zemljišta. Osim negativnog uticaja na životnu sredinu, ekonomska isplativost primene mineralnih đubriva postaje sve veći problem za poljoprivredne potrošače. Cene mineralnih đubriva skočile su za 133,4% u prvom kvartalu 2022. godine, u odnosu na isti kvartal prethodne godine (Zavod za statistiku Republike Srbije).

Organska poljoprivreda je sistem upravljanja proizvodnjom koji promovise i unapređuje zdravlje agro-ekosistema, uključujući biodiverzitet, biološke cikluse i biološku aktivnost zemljišta (FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, 1999). Ovo se postiže korišćenjem, gde je moguće, agronomskih, bioloških i mehaničkih metoda, za razliku od korišćenja hemijskih preparata i đubriva, kako bi se ispunila specifična funkcija unutar sistema. Primena inokulanata baziranih na efikasnim PGP sojevima ima najveći značaj u organskoj poljoprivrednoj proizvodnji. Uvidom u Listu registrovanih sredstava i za ishranu biljaka i oplemenjivača zemljišta koja se mogu koristiti u organskoj proizvodnji, može se zaključiti da trenutno na tržištu Srbije postoje 103 registrovana mikrobiološka đubriva, od čega je najveći broj na bazi vrsta rodova *Bacillus* i *Azotobacter*. Kako se manje od 45% ovih đubriva proizvodi u Republici Srbiji, a u skladu sa rastućim interesovanjem poljoprivrednih proizvođača da konvencionalnu poljoprivrednu praksu zamene ogranskom proizvodnjom, neophodno je usvršavanje postojećih kao i formulisanje novih preparata sa potencijalno širim spektrom biljnih vrsta na koje mogu da budu primenjene.

Da bi se obezbedila zdrava hrana i životna sredina i da bi se smanjila upotreba hemijskih đubriva i sredstava za zaštitu biljaka, neophodno je zdravo biološko rešenje u biljnoj proizvodnji. Inokulanti na bazi rizobijalnih bakterija kao i bezbednih nerizobijalnih bakterijskih vrsta, osim na povećanje prinosa kroz promociju rasta tretiranih biljaka, utiču na plodnost zemljišta i produktivnost biljaka na zdrav način, poboljšavajući nutritivni sastav biljaka, fiziologiju i otpornost useva i zaštitu useva od različitih vrsta fitopatogenih mikroorganizama. Primena inokulanata na bazi rizobijalnih vrsta u cilju promocije rasta leguminoza, kao i opšteg zdravlja i nutritivnog sastava useva je korišćena u Srbiji (Buntić et al., 2018; Stajković-Srbinović et al., 2020; Delić et al., 2016; Stajković-Srbinović et al., 2021). Osnovna strategija za poboljšanje rasta leguminoza kao što su lucerka i žuti zvezdan najviše se oslanja na postizanje adekvatnog ranog razvoja zdravog korenovog sistema, kako bi se obezbedilo usvajanje svih esencijalnih nutijenata. Strategije zasnovane na bakterijama koje poboljšavaju produktivnost, optimizuju fiksaciju azota, čuvaju kvalitet zemljišta i povećavaju koncentraciju azota u zemljištu se postižu kroz rizobijalnu inokulaciju. Potreba za rizobijalnim sojevima sa PGP osobinama, koji su ujedno tolerantni na nepovoljne uslove životne sredine je evidentna, kao i značaj istraživanja raznovrsnosti nativnih sojeva koji bi se mogli koristiti kao efiksani inokulanti (Altier et al., 2013).

U poslednje vreme, istraživanja se baziraju i na primeni nerizobijalnih PGP bakterija u cilju povećanja klijavosti, prinosa i kvaliteta useva kako leguminoznih tako i neleguminoznih biljnih vrsta (Abulfaraj & Jalal, 2021; Buntić et al., 2019; Knežević et al., 2021b; Rakić et al., 2021; Jiménez-Gómez et al., 2018). Mogućnost formiranja efektivne interakcije između biljne vrste i rizobija smatra se jednim od ograničavajućih faktora u primeni PGP rizobija na neleguminozne biljne vrste (Maier et al., 2019). Međutim, kako PGP rizobije mogu da kolonizuju i korenje neleguminoza, njihova primena je u poslednje vreme usmerena na promovisanje rasta različitih vrsta trava, pirinča, kukuruza, zelene salate, bibera i paradajza (Flores-Felix et al., 2013). Primena inokulanta na bazi rizobija je od

posebnog značaja za povrće koje se konzumira sirovo, kako je primena ovih inokulanta bezbedna po zdravlje ljudi. Inokulanti na bazi korisnih bakterija koje deluju kao agensi koji istovremeno promovišu rast biljaka i deluju kao antagonisti fitopatogenih gljiva su obećavajuća alternativa primeni hemijskih supstanci (Allaga et al., 2020).

1.6. Poboljšanje rasta biljaka na zemljištima niskih produktivnih sposobnosti

Bakterije korenskih kvržica mogu biti korisne u procesu poboljšanja proizvodnje useva na zemljištima niskih proizvodnih sposobnosti (Naseer et al., 2019). Povećanje plodnosti zemljišta uz korišćenje sojeva tolerantnih na nepovoljne uslove životne sredine i sa određenim PGP osobinama može biti isplativa zamena za đubrivo koje se koristi u konvencionalnoj poljoprivredi. Takođe, uticaj bakterijske inokulacije na nutritivni sastav biljaka, uključujući i sadržaj mikro- i makroelementa, od velike je važnosti. Pored postizanja optimalnog prinosa biljaka u kiselim zemljištima ili zemljištima sa povećanom koncentracijom teških metala, postizanje adekvatnog sastava biljnog materijala, koji će ući u lanac ishrane i koristiti se za ishranu ljudi ili životinja je od velike važnosti.

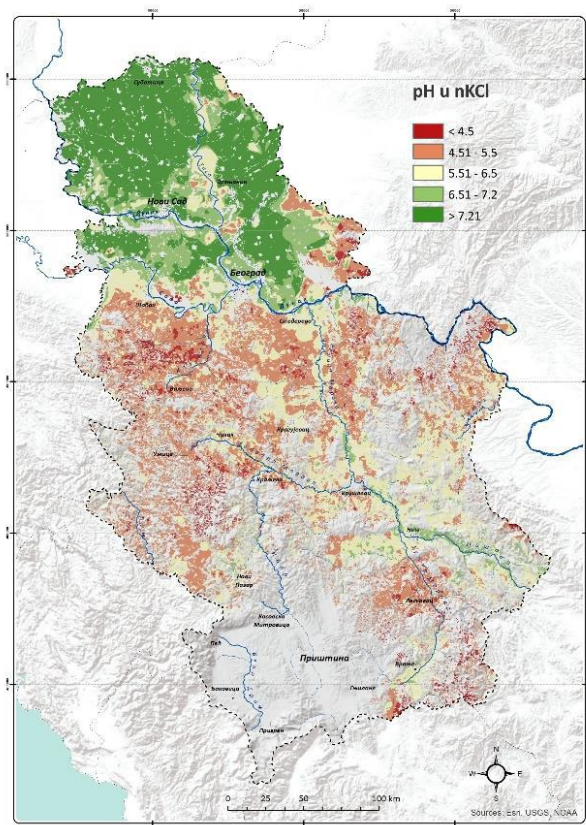
Nedostatak ili previsoka koncentracija mikro- i makroelemenata može dovesti do poremećaja u rastu biljaka i smanjene produktivnosti. Iako je bor (B) esencijalni element za rast i razvoj vaskularnih biljaka, nedovoljni ili toksični nivoi B u zemljištu mogu izazvati probleme sa prinosom i kvalitetom mnogih useva. (Camacho-Cristobal et al., 2005). Bakar (Cu) je još jedan element neophodan za biljke, čija neuravnotežena koncentracija može poremetiti brojne fiziološke procese u biljkama, kao što su fotosintetski transport elektrona ili odgovor na oksidativni stres (Yruela, 2005). Nedostatak gvožđa (Fe) je široko rasprostranjen fenomen koji ima negativan uticaj na aktivnost fotosintetičke mašinerije u biljnom tkivu, što posledično uzrokuje smanjenje biljnog rasta i prinosa (Lopez-Millan et al., 2013). Mangan (Mn) je važan mikroelement za rast biljaka i esencijalni kofaktor za kompleks fotosintetičke mašinerije (Alejandro et al., 2020). Nikl (Ni) je još jedan esencijalni biljni mikroelement koji deluje kao aktivator enzima i može biti ključni element za zaštitu biljaka od stresnih uslova (Fabiano et al., 2015). Cink (Zn) je mikroelement neophodan za sve biljke sa ključnom ulogom u rastu, razvoju i odbrani biljaka od patogena (Cabot et al., 2019). Pored Zn, mikroelementi kao što su Mn, Cu i Fe imaju ulogu u odbrani biljaka od patogena (Cabot et al., 2019).

Kalcijum (Ca) je esencijalni makroelement sa dvostrukom funkcijom, kao strukturna komponenta ćelijskih zidova i membrana i kao intracelularni signalizator (Thor, 2019). Kalijum (K) u biljnim ćelijama deluje kao aktivator važnih enzima u procesima transporta šećera, metabolizama azota i ugljenika i fotosinteze, i neophodan je za optimalan rast biljaka (Xu et al., 2020). Magnezijum (Mg) je još jedan makroelement neophodan za rast biljaka, sa dominantnom ulogom u procesu fotosinteze gde deluje kao kofaktor enzima i sastavni deo hlorofila a i b (Hauer-Jakli & Tränkner, 2019). Fosfor (P) je esencijalni makroelement koji utiče na razvoj korena, rast biljaka i produktivnost useva, sa značajnom ulogom u metaboličkim funkcijama biljaka, kao i komponenta nukleinskih kiselina i koenzima (Siedliska et al., 2021).

Teški metali su među najvažnijim zagađivačima životne sredine, čija je povećana koncentracija u zemljištu najčešće prouzrokovana antropogenim aktivnostima. Teški metali koji su prisutni u poljoprivrednom zemljištu na indirektan način dovode do zagađenja vode i poljoprivrednih useva. Akumulacija teških metala u biljnim tkivima može dovesti do oštećenja proteina i DNK, smanjivanja produkcije enzima ili do narušavanja strukture membrane (Hasan et al., 2017). Bioremedijacija se odnosi na upotrebu živih organizama (najčešće mikroorganizama) za uklanjanje zagađivača ili neželjenih supstanci iz zemljišta ili vode (Lidder & Sonnino, 2012). Bioremedijacija je obećavajuća tehnologija, dostupna za obnavljanje zemljišta zagađenog teškim metalima (Ojuederie & Babalola, 2017). Leguminoze se smatraju pionirskim vrstama koje igraju važnu ulogu u uspostavljanju ponovne vegetacije zemljišta zagađenih teškim metalima. To je ekološki prihvatljiva i isplativa tehnologija, koja je u poslednjih nekoliko decenija preferirana u odnosu na tradicionalne metode remedijacije. Zemljišne bakterije (najčešće iz rodova *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Arthrobacter*) igraju važnu ulogu u detoksikaciji zemljišta kontaminiranog teškim metalima (Mishra et al., 2017). Zbog toga se intenzivno istražuje eksploatacija rizosfernih i bakterija korenskih kvržica

sa sposobnošću smanjenja efekta toksičnosti metala po biljku (Mosa et al., 2016). Koncentracije teških metala u biljkama koje se uzgajaju u zemljištima sa povišenim koncentracijama metala mogu se smanjiti primenom određenih PGP bakterija (Dary et al., 2010). Pored direktnih i indirektnih pozitivnih efekata na poboljšanje rasta biljaka i povećanje ukupne biljne biomase, bakterije korenskih kvržica takođe mogu doprineti smanjenju fitotoksičnosti metala. Zbog efektivne fiksacije azota u korenskim kvržicama leguminoza povećavaju se ukupne dostupne forme azota u zemljištu, koje će biti dostupne i biljnoj vrsti zasejanoj na zagađenom zemljištu nakon leguminoza. Istraživanja koja se tiču uloga različitih vrsta bakterija u promovisanju rasta leguminoznih biljaka koje se koriste za fitostabilizaciju ili revegetaciju zemljišta kontaminiranih teškim metalima u prethodnih nekoliko godina postaju sve brojnija (Oubohssaine et al., 2022). Promenom bioraspoloživosti metala u zemljištu (kroz zakiseljavanje, helaciju, kompleksiranje, precipitaciju i redoks reakcije), PGP bakterije tolerantne na teške metale mogu poboljšati klijavost semena na zemljištima kontaminiranim teškim metalima (Delić et al., 2022; Li et al., 2019). Interferencija između ovih bakterija i korena biljaka takođe može smanjiti toksičnost metala. Smanjenje uticaja fitotoksičnosti metala kao i gljivičnih infekcija na klijanje semena i rani rast rasada korišćenjem bakterija može biti jedan od pristupa u remedijaciji zemljišta (mikrobijalna bioremedijacija).

Zemljišta sa pH vrednošću ispod 5,5 smatraju se kiselim zemljištima (Sumner, 2005). Zakiseljavanje zemljišta može rezultirati ograničenim unosom azota i povećanjem koncentracije NH_4^+ jona, što može nepovoljno uticati na rast većine biljnih vrsta (Sumner et al., 1991). Pored toga, u zemljištima sa pH ispod 6, simbiotski odnos između rizobija i leguminoza je poremećen, što može rezultirati neefikasnom nodulacijom i fiksacijom azota (Sumner et al., 1991). Nizak pH zemljišta remeti razmenu signala između biljke domaćina i rizobija i smanjuje mogućnost formiranja nodula do 90%, što dovodi do smanjenja prinosa i kvaliteta biljaka (Ferguson et al., 2013). Kako kisela zemljišta zauzimaju više od 3,95 milijardi ha zemljišta u svetu, pronalaženje rešenja za ograničenja u proizvodnji useva na ovim zemljištima je neophodno (Sumner & Noble, 2003). U Srbiji se 43% ukupnih obradivih zemljišta smatra visoko kiselim do kiselim, 20% kiselim ka slabo kiselim i 35% slabo kiselim ka neutralnim (Slika 5). Poređenja radi, samo 2% obradivih zemljišta se smatra alkalnim (Ličina et al., 2011).



Slika 5. Indikatorski prikaz zastupljenosti kiselosti na području Republike Srbije (preuzeto iz: Izveštaj o stanju zemljišta u Republici Srbiji 2015)

Primena sojeva rizobija koji su tolerantni na uslove niskog zemljišnog pH na leguminoze koje se uzgajaju u kiselim zemljištima, može poboljšati simbiotske performanse i efikasnost nodulacije (Ferguson et al., 2013). Na dostupnost mikro- i makroelementata za biljku utiču fizičko-hemijske osobine zemljišta, uključujući i pH vrednosti zemljišta (Dinić et al., 2019). Niska pH zemljišta utiče na dostupnost mikroelemenata, prvenstveno utičući na njihov adsorpcioni potencijal i rastvorljivost (Fageria et al., 2014). U kiselim zemljištima, pored nedostatka mnogih biogenih elemenata (P, K, Ca, Mg, B, Zn), često se nalaze i visoke koncentracije toksičnih oblika Fe, Mn i Ni (Uexküll & Mutert, 1995; Voigt & Staley, 2004). Poznato je da se pored povećanja koncentracije azota, rizobijalnom inokulacijom može poboljšati i usvajanje drugih hranljivih materija, kao što su P i K u slučaju pirinča, graška, sočiva i leblebije, kao i Mg i Ca u pasulju (Biswas et al., 2000; Aryal et al., 2003; Adnan et al., 2016). Prema tome, inokulacija rizobijama može pomoći u postizanju optimalne ravnoteže ovih hranljivih materija u biljkama koje se uzgajaju na kiselim zemljištima.

1.7. Istraživanja bakterija korenskih kvržica žutog zvezdana i lucerke na području Republike Srbije

Na području Srbije vrste roda *Lotus*, najčešće žuti zvezdan (*Lotus corniculatus* L.), su široko zastupljene za ishranu stoke. Po prinosu i zastupljenosti, žuti zvezdan se smatra jednom od najznačajnijih višegodišnjih leguminoza u Srbiji, posle lucerke i crvene deteline (Stevović et al., 2017; Đukić et al., 2007). Smatra se da je i diverzitet ove biljne vrste najveći upravo na teritoriji Srbije i Bosne i Hercegovine, zbog agroklimatskih uslova regiona koji su pogodni za njen rast (Vučković et al., 2006). Postoji vrlo ograničen broj istraživanja koja su se bavila uticajem bakterijske inokulacije na parametre rasta i nutritivnog sastava žutog zvezdana na teritoriji Srbije. Stevović et al. (2017) ispitali su uticaj inokulacije žutog zvezdana sa *M. loti* na prinos i kvalitet semena ove biljne vrste. Takođe, Jarak et al. (2007) pratili su uticaj inokulacije semena žutog zvezdana sa *R. loti*, *Azotobacter*

chroococcum i *Actinomyces* sp. i uticaj na klijavost semena *in vitro*. Ispitivan je i sadržaj mikro- i makroelemenata u biljnom materijalu ove vrste na našem području (Vučković et al., 2006), ali ova istraživanja nisu podrazumevala bakterijsku inokulaciju biljaka. Vasić et al. (2019) pokazali su da su vrste rodova *Fusarium*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Mucor*, *Sclerotinia*, *Bipolaris* i *Rhizoctonia* najčešći gljivični patogeni žutog zvezdana na teritoriji Srbije. Postoji nekoliko istraživanja u našoj zemlji koja su se bavila poboljšanjem otpornosti biljaka žutog zvezdana na različite faktore spoljašnje sredine (Nikolić et al., 2013; Nikolić et al., 2007; Nikolić i Mitić, 2005). Međutim, proučavanje diverziteta autohtonih sojeva i njihove upotrebe za poboljšanje rasta ove biljne vrste, posebno u zemljištima niskih produktivnih sposobnosti, su ograničene.

Istraživanja rizobija na teritoriji Srbije datiraju još od sredine prošlog veka (Vojinović & Petrović, 1961). U odnosu na žuti zvezdan, za bakterijsku inokulaciju lucerke postoji značajno veći broj istraživanja na našem području. Delić et al. (2010a, b; 2013a, b; 2007) ispitivali su uticaj inokulacije lucerke sa različitim sojevima *S. meliloti* i *Sinorhizobium* sp. na paramete rasta i sadržaj azota u biljnom materijalu. Ispitivanja bakterijskog diverziteta rizobijalnih i nerizobijalnih vrsta poreklom iz kvržica lucerke takođe su rađena (Stajković-Srbinović et al., 2012; Stajković et al., 2009). Uticaj rizobijalnih (*S. meliloti*) i nerizobijalnih izolata (*Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Azotobacter chroococcum* i *Enterobacter* sp.) iz korenskih kvržica lucerke na rast ove biljne vrste ispitivan je u poljskim ogledima (Stajković-Srbinović et al., 2017). Postoje podaci i o uticaju rizosfernih izolata lucerke na klijavost semena ove biljne vrste u uslovima povećane koncentracije Cr (Knežević et al., 2021b). Slično kao i u slučaju žutog zvezdana, Krnjaja et al. (2005) definisali su najčešće gljivične izazivače bolesti lucerke na našem području. Ispitivanja primene rizobijalnih bakterija (*Ensifer medicae* i *E. meliloti*) tolerantnih na uslove niskog pH na poboljšanje rasta lucerke u kiselom zemljištu (pH 4.4) takođe postoje (Stajković-Srbinović et al., 2015a). Buntić et al. (2019; 2021) istraživali su nove formulacije tečnih đubriva za lucerku bazirane na nativnim rizobijalnim sojevima, dok je značaj rizobijalnih inokulanta poreklom sa teritorije Srbije istaknut od strane Delić et al. (2016).

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da je selekcija nativnih bakterija sa teritorije naše zemlje nepohodna u cilju dobijanja inokulanata za poboljšanje rasta žutog zvezdana i lucerke, gajenih samostalno i u smešama sa različitim vrsta trava. Istraživanja diverziteta bakterija korenskih kvržica, kako u pogledu osobina značajnih za poboljšanje rasta biljaka, tako i u pogledu genetičkog diverziteta, od velike su važnosti za pravilnu selekciju ovih bakterija.

2. CILJEVI RADA

2. CILJEVI RADA

Obzirom na značaj žutog zvezdana i lucerke u našoj zemlji, kao i ograničen broj istraživanja diverziteta i potencijala primene bakterija iz korenskih kvržica ovih biljnih vrsta, a naročito žutog zvedana, ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Izolacija bakterija, rizobijalnih i nenodulišućih, iz kvržica žutog zvezdana (*Lotus corniculatus* L.) sa različitih lokaliteta na teritoriji Republike Srbije, kao i iz korenskih kvržica lucerke (*Medicago sativa* L.).
2. Određivanje efikasnosti fiksacije azota rizobijalnih izolata.
3. Ispitivanje osobina izolata koje imaju ulogu u poboljšavanju rasta biljaka, kao što su sposobnost produkcije indol-3-sirćetne kiseline, siderofora, sposobnost solubilizacije neorganskih fosfata, njihovog antagonističkog dejstva prema odabranim fitopatogenim gljivama, kao i ispitivanje tolerancije izolata na nepovoljne uslove sredine.
4. Identifikacija i genetička determinacija odabranih bakterijskih izolata.
5. Selekcija izolata i ispitivanje njihove sposobnosti da promovišu rast biljaka lucerke, žutog zvezdana i ježevice, uključujući i nepovoljne uslove zemljišta, pod polukontrolisanim uslovima - u saksijama, i u poljskom ogledu.

3. MATERIЈAL I METODE

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Materijal

3.1.1. Hranljivi medijumi za gajenje bakterija i gljiva

Hranljivi agar (HA)

HA Medijum baza	41,3g
dH ₂ O	1000 ml

Hranljivi bujon (HB)

HB Medijum baza	23,3g
dH ₂ O	1000 ml

Kvašćev manitni bujon - Yeast mannitol bujon (YMB)

Manitol	10g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄	0,2g
NaCl	0,1g
CaCO ₃	0,2g
Kvašćev ekstrakt	5g
dH ₂ O	1000 ml

Kvašćev manitni agar - Yeast mannitol agar (YMA)

YMB sa dodatkom 15 g agara na 1000ml.

Kvašćev manitni agar + Congo Red (YMA)

YMA sa dodatkom 2,5 ml 1% rastvora Congo Red na 1000 ml podloge.

King B (KB) agar

King's medijum B baza	43 g
Glicerol	10 ml
dH ₂ O	1000 ml

King B (KB) bujon

Tripton	10g
Pepton1	10g
KCl	0,2g
MgSO ₄	1,5g
K ₂ HPO ₄	1,5g
Glicerol	10ml
dH ₂ O	1000 ml

Krompir-dekstrozni agar - Potato Dextrose Agar (PDA)

PDA	39 g
dH ₂ O	1000 ml

3.1.2. Reagensi za bojenje po Gramu

Lugolov rastvor

Kristalni jod	1 g
Kalijum jodid	2 g
dH ₂ O	300 ml

Kristal violet

Kristal violet	2 g
Etanol 96%	20 ml
Amonijum oksalat	0,8 g
dH ₂ O	80 ml

Safranin

Safranin	0,25 g
Etanol 96%	10 ml
dH ₂ O	100 ml

3.1.3. Hranljivi medijumi za određivanje produkcije enzima

Za testiranje hidrolitičke aktivnosti izolata korišćen je osnovni medijum:

Osnovni medijum za određivanje produkcije hidrolitičkih enzima

K ₂ HPO ₄	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,2 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1000 ml

u koji su na 1000 ml podloge dodati:

- Za produkciju amilaza: 10 g skroba;
- Za produkciju celulaza: 10 g carboksimethyl celuloze (CMC);
- Za produkciju pektinaza: 5 g pektina;
- Za produkciju hitinaza: 10 g hitina poreklom iz ljuštura račića;
- Za produkciju lipaza: 10 ml 1% Tween 80 na 1000 ml.

Skim milk agar

K ₂ HPO ₄	7 g
KH ₂ PO ₄	3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
Kvašćev ekstrakt	12 g
Agar	15 g
dH ₂ O	900 ml

Nakon sterilizacije u podlogu je dodato 100 ml obranog mleka

Rastvor KI za bojenje podloga

KI	2 g
I	1 g
dH ₂ O	300 ml

3.1.4. Medijumi za određivanje PGP osobina bakterija

Pikovskaya agar

Glukoza	10 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
NaCl	0,2 g
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,1 g
KCl	0,2 g
Kvaščekv ekstrakt	0,5 g
MnSO ₄ ×H ₂ O	0,002 g
FeSO ₄ ×H ₂ O	0,002 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1000 ml

Rastvori za Chromeazurol (CAS) agar

FeCl rastvor

FeCl ₃ ×6H ₂ O	0,0027 g
12M	83 µl
koncentrovanaHCl	
dH ₂ O	10 ml

HDTMA rastvor

HDTMA	0,073 g
dH ₂ O	40 ml

CAS rastvor

CAS	0,065 g
dH ₂ O	50 ml

Rastvor 1

FeCl rastvor	9 ml
HDTMA rastvor	40 ml
CAS rastvor	50 ml

Rastvor 2

PIPES	30,24 g
dH ₂ O	750 ml
Agar	15 g

Podesiti pH Rastvora 2 na 6,8 dodavanjem oko 12 g 50% NaOH

Rastvori 1 i 2 se pojedinačno sterilišu na 121°C tokom 15 minuta u autoklavu a zatim sjedine.

Podloga se razlije u Petri šolje, a nakon stezanja se polovina sadržaja Petri šolje iseče sterilnim skalpelom, gde se izlije odgovarajuća podloga za rast bakterija.

Salkowski reagens

0.5M FeCl ₃	1 ml
35% HClO ₄	50 ml

3.1.5. Podloge za gajenje biljaka

Jensen medijum

CaHPO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
FeCl ₃	0,1 g
Rastvor mikroelemenata	1 ml
Agar	8 g
dH ₂ O	1000 ml
ØN (kontrola sa azotom): Jensen medijum + 50 mg KNO ₃	
Ø (kontrola bez azota: Jensen medijum + 5 mg KNO ₃)	

Rastvor mikroelemenata

Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,05 g
Na ₂ B ₄ O ₇ ×10H ₂ O	0,05 g
FeCl ₃	0,05 g
Co(NO ₃) ₂ ×6H ₂ O	0,05 g
3CdSO ₄ ×8H ₂ O	0,05 g
CuSO ₄	0,05 g
ZnSO ₄	0,05 g
MgSO ₄	0,05 g
dH ₂ O	1000 ml
Rastvor podesiti na pH= 7	

Fiziološki rastvor

NaCl	8,5 g
dH ₂ O	1000 ml

3.1.6. Rastvori za rad sa DNK

Bufer za alkalnu izolaciju DNK

10% SDS	2,5 ml
1M NaOH	5 ml
MiliQ ddH ₂ O	92,5 ml

1% agarozni gel

TBE (0,5×)	280 ml
Agarozna	2,8 g

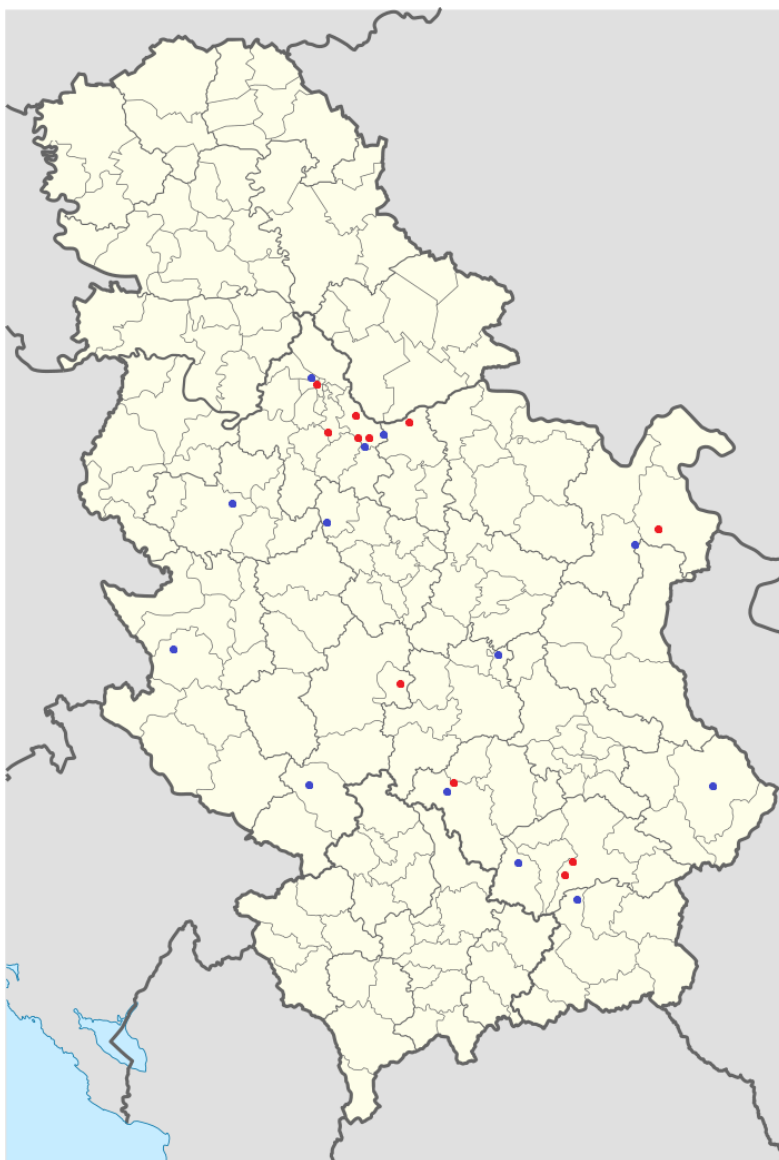
10 ×TBE bufer

89Mm TRIS baza	107,8 g
89Nm Borna kiselina	55 g
2,5Mm EDTA	9,3 g
dH ₂ O	1000 ml

3.2. Metode

3.2.1. Uzorkovanje biljnog materijala

Uzorkovanje biljnog materijala izvršeno je tokom 2018. i 2019. godine tokom faze cvetanja biljaka u kasno proleće i rano leto. Materijal je uzorkovan sa 24 lokacije kultivisanih i divljih površina na području Srbije (Slika 6). Cele biljke lucerke i žutog zvezdana uzorkovane su iskopavanjem bloka zemljišta koji okružuje biljku (oko 20 cm dubine). U cilju prevencije oštećenja korenskih kvržica i sasušenja biljaka, ovako uzorkovani materijal transportovan je u laboratoriju u zatvorenim plastičnim kesama u roku od 24h od trenutka uzorkovanja radi izolacije bakterija iz korenskih kvržica.



Slika 6: Lokaliteti uzorkovanja korenskih kvržica zvezdana i lucerke (plavim tačkama na mapi su obeležena mesta uzorkovanja biljaka žutog zvezdana, a crvenim lucerke)

3.2.2. Izolacija i preliminarna karakterizacija bakterija korenskih kvržica

Sa prikupljenog biljnog materijala je najpre odstranjen višak zemlje sa korenova. Zatim su korenovi isprani tekućom vodom u cilju uklanjanja preostale zemlje sa korenskih kvržica. Korenske kvržice su pažljivo odstranjene sa korena biljaka. Odvojene kvržice su površinski sterilisane potapanjem u 96% alkohol tokom par sekundi, zatim u rastvor 0.1% HgCl_2 tokom 3 do 5 minuta i finalno isprane sterilisanom destilovanom vodom 5 do 6 puta (Vincent, 1970). U cilju provere

sterilnosti korenskih kvržica, svaka kvržica je potopljena u 1 ml sterilne destilovane vode, iz čega je zatim 100 µl vode zasejano na hranljivu podlogu i inkubirano tokom 7 dana. Korenske kvržice smatrane su površinski sterilisanim ukoliko na hranljivoj podlozi nije došlo do pojave rasta mikroorganizama. Nakon sterilizacije, svaka pojedinačna korenska kvržica je zdrobljena sterilnim nožem u sterilnoj staklenoj Petri šolji, a zatim je sadržaj kvržice zahvaćen sterilisanom ezom navlaženom fiziološkim rastvorom i zasejan na odgovarajuće hranljive medijume metodom išarane ploče. U cilju izolacije *Bacillus* spp. korišćen je hranljivi agar (HA), za *Rhizobium* spp. YMA sa dodatkom Congo red, a za *Pseudomonas* spp. KB agar. Ovako zasejene Petri šolje inkubirane su 7 - 14 dana na 28 °C. Nakon dobijanja čistih kultura, praćena je i reakcija po Gramu prema standardnom protokolu, a pripremljeni preparati su posmatrani pod mikroskopom i fotografisani.

3.2.3. Testiranje osobina izolata da poboljšavaju rast biljaka *in vitro*

Testiranje sposobnosti produkcije auksina (indol-3-sirćetne kiseline) izvršeno je u kvašćevom manitnom bujonu (YMB) za rizobijalne izolate, odnosno hranljivom bujonu (HB) za *Bacillus* spp. i tečnom KB medijumu za *Pseudomonas* spp. Izolati su gajeni u tečnoj podlozi tokom 24-48h, nakon toga kulture su centrifugirane (5 min na 15000 rpm) i u 1ml supernatanta je dodato 2 ml Salkowski reagensa (sa HClO₄) (Gordon & Weber, 1951). Nakon 25 minuta inkubacije u mraku optička gustina rastvora je izmerena spektrofotometrijski na 530nm. Koncentracija produkovanog IAA je određena na osnovu standardne krive IAA (0, 10, 50, 100µg ml⁻¹).

Sposobnost izolata da produkuju siderofore određena je na CAS agaru (Milagres et al., 1999). U Petri šolje je najpre izliven CAS agar. Nakon stezanja CAS agara polovina podloge je sterilnim skalpelom odstranjena i dopunjena odgovarajućom podlogom za rast bakterija (YMA, HA ili KB agar). Izolati su zatim sterilnom ezom zasejani na spoju CAS agara i hranljive podloge za rast. Petri šolje su inkubirane na 28°C tokom 14 dana, a promena boje CAS agara iz plave u žutu tumačena je kao pozitivan rezultat. Dijametar promene boje meren je od mesta ivice izrasle kolonije do mesta promene boje i izražen je u mm.

Sposobnost izolata da vrše solubilizaciju neorganskih fosafata ispitana je na Pikovskaya medijumu (Pikovskaya, 1948). Izolati su zasejani ubodnim potezom u medijum, a Petri šolje su inkubirane tokom 14 dana na 28°C. Pojava prosvetljenih halo zona oko mesta uboda tumačena je kao pozitivan rezultat. Dijametar halo zona meren je u mm, od mesta ivice izrasle kolonije do ivice halo zone.

Testovi za praćenje produkcije IAA, siderofora i sposobnosti solubilizacije fosfata izvedeni su u 3 nezavisna ponavljanja.

3.2.4. Testiranje tolerancije izolata na nepovoljne uslove sredine

Sposobnost izolata da tolerišu različite uslove pH (4; 5; 6; 7; 8; 9 i 10), koncentracije NaCl (0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6%) i temperature (4, 16, 28, 45 i 60 °C) testirana je metodom „replica-plating“, na YMA podlozi za rizobijalne izolate i na hranljivom agaru za ostale izolate. Prekonoćne kulture bakterija su zasejane na odgovarajuće podloge i inkubirane tokom 5-7 dana na 28 °C (ili na drugim temperaturama u slučaju određivanja tolerancije na temperaturu), nakon čega je detektovan njihov rast. Rast izolata upoređen je sa rastom na kontrolnim podlogama (pH:7; t=28 °C i 0,3% NaCl), a svaki test je urađen u 3 ponavljanja. U cilju provere tolerancije značajnih rizobijalnih izolata na uslove niske pH na čvrstom medijumu, urađena je i provera u tečnom medijumu. Kulture su gajene u tečnom YMB medijumu tokom 24h na 28 °C, na orbitalnom šejkeru do OD_{600nm}=0,4. Po 1 ml ovako gajene kulture zasejan je u 29 ml YMB različitih pH vrednosti, a zatim inkubiran tokom 72h na 28 °C, na orbitalnom šejkeru. Spektrofotometrom merena je OD na 600nm nakon 24, 48 i 72h (Igiehon et al., 2019). Test je urađen u tri ponovka. Vrednosti OD ukazivale su na sposobnost rasta izolata u medijumu definisanih pH vrednosti.

3.2.5. *In vitro* skrining antagonističke aktivnosti izolata

3.2.5.1. Metoda dualne kulture

Antagonistički efekat bakterijskih izolata protiv *Fusarium oxysporum* (izolovan sa zaražene biljke lucerke), *Fusarium proliferatum* i *Fusarium graminearum* je testiran na krompir-dekstroznom agaru (PDA). Gljive korišćene za testiranje antagonističke aktivnosti izolata gajene su na PDA podlozi tokom 72h na 28 °C, odakle su sterilno isečeni čepovi micelije (prečnika oko 2 mm) za dalju upotrebu. U centar Petrijeve šolje postavljen je čep micelije gljiva, a 15 µl prekonocne bakterijske kulture (približno 10⁶ CFU ml⁻¹) inokulisano je približno 1 cm od ivica Petrijeve šolje (na četiri strane Petrijeve šolje). Na isti način testirana je antifungalna aktivnost supernatanta bez bakterijskih ćelija (cell freesupernatant - CFS). Supernatant je pripremljen centrifugiranjem (13000 rpm, 5 min) prekonocnih bakterijskih kultura i filtriranjem kroz filter centrifuge Millipore (0,22 µm). Petri posude su zatim inkubirane na 28 °C, a rezultati su očitani nakon 7 dana inkubacije. Nakon inkubacije, prečnik rasta kolonije gljiva meren je u milimetrima i poređen sa kontrolom bez bakterija. Testovi su urađeni u 3 ponavljanja, a antagonistička aktivnost bakterijskih izolata određena je na osnovu sledeće jednačine (Ogbebor & Adekunle, 2005):

$$\text{Inhibicija (\%)} = \frac{\text{poluprečnik rasta gljive u kontroli} - \text{poluprečnik rasta gljive u tretmanu}}{\text{poluprečnik rasta gljive u kontroli}} \times 100$$

3.2.5.2. Test produkcije HCN

Produkcija cijanovodonika (HCN) testirana je pomoću Cyantesmo indikatorskog papira (Machery-Nagel GmbH&Co., Nemačka). Izolati su zasejani na hranljivi medijum metodom išarane ploče, a delić Cyantesmo papira (2 cm) zalepljen je za unutrašnju stranu poklopca Petri šolje pomoću lepljive trake. Petri šolje su inkubirane na 28 °C tokom 7-14 dana, a promena boje Cyantesmo papira u tamno sivu tumačena je kao pozitivan rezultat.

3.2.5.3. Kvalitativno određivanje produkcije hidrolitičkih enzima

Produkcija hidrolitičkih enzima kao što su celulaze, amilaze, proteaze, lipaze, hitinaze i pektinaze testirana je *in vitro* na Petri šoljama sa čvrstim podlogama koje su sadržale odgovarajući supstrat. Svi testovi izvedeni su u tri nezavisna ponavljanja. Po 10 µl prekonocne bakterijske kulture naneto je na odgovarajuće podloge, a Petri šolje su zatim inkubirane tokom 7-14 dana na 28 °C. Nakon inkubacije, podloge su prelivene rastvorom KI, a formirane halo zone oko kolonija tumačene su kao pozitivan rezultat.

3.2.6. Testiranje efikasnosti azotofiksacije

Testiranje efikasnosti rizobijalnih izolata za fiksaciju azota izvršeno je inokulacijom semena žutog zvezdana i lucerke odgovarajućim bakterijskim inokulumima. Semena biljaka su površinski sterilisana kratkim potapanjem u 96% etanol tokom par sekundi, a zatim u 2% HgCl₂ tokom 3-5 min i finalno su isprana sterilnom destilovanom vodom 5 do 6 puta (Vincent, 1970). Ovako sterilisana semena (3 semena po epruveti) su postavljena u bacto epruvete sa 30 ml Jensenove podloge za rast biljaka. Epruvete su postavljene u svetlosnu vitrinu pod režimom neonskog osvetljenja 16/8h: dan/noć i prosečnom temperaturom od 25 °C danju i 17°C noću. Nakon prokljavanja semena (oko 5-6 dana) broj biljaka u svakoj epruveti je sveden na jedan i inokulisan je sa po 0,5 ml tečne bakterijske kulture (48h stara kultura, gajena u YMB). Osim tretmana sa bakterijskim inokulumima, postavljena je i kontrola bez inokulacije (Ø), kao i kontrola sa azotom (ØN: sa dodatkom 50 µg KNO₃ na litar Jensenove podloge). Ogled je prekinut 48 dana od trenutka inokulacije, biljke su izvađene iz epruveta i izmerena je dužina korena, visina biljaka, kao i masa nadzemnog dela biljke nakon sušenja na 65-70 °C. Procenat azota u ovako osušenoj biljnoj masi je određen na CNS analizatoru.

3.2.7. Metode rada sa DNK

3.2.7.1. Izolacija genomske DNK

Izolacija ukupne genomske DNK iz bakterijskih izolata izvršena je razmućivanjem pojedinačne kolonije svežih bakterijskih kultura sa hranljivog medijuma u ependorf epruvetu (RNK/DNK free) koja je sadržala 20 µl pufera za alkalnu izolaciju DNK. Nakon toga sadržaj je centrifugiran na 13000 rpm tokom 5 sekundi, zagrejan u termobloku (BioSan Cooling-Heating Thermostat CH-100) na 95 °C tokom 15 minuta, a zatim ponovo centrifugiran na 13000 rpm tokom 5 sekundi. Nakon centrifugiranja dodato je 180µl PCR-grade dH₂O i sadržaj je ponovo centrifugiran na 13000 rpm tokom 5 minuta, nakon čega su ependorf epruvete odložene na -20 °C do trenutka korišćenja.

3.2.7.2. Umnožavanje fragmenata DNK metodom PCR

Reakcione smeše za PCR sastojale su se od 25 µl PCR master mixa (2×PCR TaqNova-RED, Bliirt), po 0,5 µl prajmera (forward i reverse u koncentraciji od 10 µmol l⁻¹), 1 µl izolovane DNK i 23 µl vode (PCR-grade dH₂O). Sve PCR reakcije su vršene u Ependorf Mastercycler Personal PCR aparatu. Sekvence DNK prajmera korišćenih za identifikaciju izolata i detekciju kodirajućih gena za produkciju antibiotika prikazane su u Tabeli 3.

Tabela 3. Sekvence DNK prajmera korišćenih za identifikaciju izolata i detekciju kodirajućih gena za produkciju antibiotika

Prajmer	Genski produkt	Sekvenca prajmera 5'-3'	Gen	Očekivana dužina amplifikona (bp)	Referenca
FENDf FENDr	Fengicin	GGCCCGTTCTCTAAATCCAT GTCATGCTGACGAGAGCAAA	<i>fenD</i>	269	Mora et al., 2011
SRFAf SRFAr	Surfaktin	TCGGGACAGGAAGACATCAT CCACTCAAACGGATAATCCTGA	<i>srfAA</i>	201	Mora et al., 2011
ITUCf ITUCr	Iturin C	GGCTGCTGCAGATGCTTTAT TCGCAGATAATCGCAGTGAG	<i>ituC</i>	647	Mora et al., 2011
SPASf SPASr	Subtilin	GGTTTGTGGATGGAGCTGT GCAAGGAGTCAGAGCAAGGT	<i>spaS</i>	566	Mora et al., 2011
BACf BACr	Bacilizin	CAGCTCATGGGAATGCTTTT CTCGGTCCTGAAGGGACAAG	<i>bacA</i>	498	Mora et al., 2011
BMYBf BMYBr	Bacilomicin	GAATCCCGTTGTTCTCCAAA GCGGGTATTGAATGCTTGTT	<i>bmyB</i>	370	Mora et al., 2011
PHZef PHZEr	Fenazin	GAAGGCGCCAACCTTCGYATCAA GCCYTCGATGAAGTACTCGGTGTG	<i>phzE</i>	450	Schneemann et al., 2011
P ₀ P ₆	16S rRNK	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG CTACGGCTACCTTGTACGA	<i>16S rRNA</i>	1500	Oro et al., 2020.
tufGPF tufGPR	Elongacioni faktor Tu	ACGTTGACTGCCAGGACAC GATACCAGTTACGTCAGTTGTACGGA	<i>tuf</i>	790	Draganić et al., 2017
GyrB-F GyrB-R	β- subjedinica DNK giraze	MGGCGGYAAGTTCGATGACAAAYTC TRATBKCAGTCARACCTTCRCGSGC	<i>gyrB</i>	480	Sarkar & Guttman, 2004
gyrB01-F gyrB02-R	β- subjedinica DNK giraze	TAARTTYGAYGAYAACTYTAYAAAAGT CMCCYTCCACCARGTAMAGTT	<i>gyrB</i>	610	Brady et al., 2008
RecA6 RecA555	Protein koji učestvuje u rekombinaciji i reparaciji DNK	CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT	<i>recA</i>	549	Martens et al., 2007

Molekularna identifikacija izolata urađena je na osnovu umnožavanja dela gena za 16S rRNA uz pomoć P₀ i P₆ prajmerskog para. Dodatna molekularna identifikacija pojedinih izolata podrazumevala je umnožavanje *housekeeping* gena koji kodiraju elongacioni faktor Tu (*tuf*), β-subjedinicu DNK giraze (*gyrB*) i rekombinacioni protein (*recA*). Umnožavanje *tuf* gena izvršeno je tufGPF i tufGPR prajmerima (Draganić et al., 2017), dok je umnožavanje *gyrB* gena rađeno pomoću GyrB-F/GyrB-R ili gyrB01-F/gyrB02-R prajmerskog para (Sarkar & Guttman, 2004; Brady et al., 2008). Za amplifikaciju *recA* gena korišćen je prajmerski par RecA6/RecA555 (Martens et al., 2007). Temperaturni profili za umnožavanje 16S rRNK, *gyrB*, *tuf* i *recA* genskih regiona prikazani su u Tabeli 4.

Tabela 4. PCR programi za umnožavanje 16S rRNK, *gyrB*, *tuf* i *recA* gena

Umnožavanje DNK sekvenci za 16S rRNK (P ₀ /P ₆ prajmerski par)			
	Temperatura	Trajanje	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94 °C	90 sekundi	
Denaturacija	94 °C	30 sekundi	
Hibridizacija (1-5 ciklusa)	60 °C	30 sekundi	
Hibridizacija (6-10 ciklusa)	55 °C	30 sekundi	35
Hibridizacija (11-35 ciklusa)	50 °C	30 sekundi	
Elongacija	72 °C	30 sekundi	
Finalna elongacija	72 °C	10 minuta	
Finalna elongacija	60 °C	10 minuta	
Umnožavanje DNK sekvenci za elongacioni faktor Tu (tufGPF/tufGPR prajmerski par)			
	Temperatura	Trajanje	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95 °C	8 minuta	
Denaturacija	95 °C	30 sekundi	
Hibridizacija	55 °C	1 minut	35
Elongacija	72 °C	30 sekundi	
Finalna elongacija	72 °C	10 minuta	
Umnožavanje DNK sekvenci za β-subjedinicu DNK giraze (gyrB01-F/gyrB02 prajmerski par)			
	Temperatura	Trajanje	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95 °C	5 minuta	
Denaturacija	95 °C	1 minut	
Hibridizacija	55 °C	2 minuta	3
Elongacija	72 °C	1 minut	
Denaturacija	95 °C	30 sekundi	
Hibridizacija	55 °C	75 sekundi	30
Elongacija	72 °C	75 sekundi	
Finalna elongacija	72 °C	7 minuta	
Umnožavanje DNK sekvenci za protein koji učestvuje u rekombinaciji i reparaciji DNK (RecA6/RecA555 prajmerski par)			
	Temperatura	Trajanje	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95 °C	5 minuta	
Denaturacija	94 °C	45 sekundi	
Hibridizacija	60 °C	1 minut	32
Elongacija	74 °C	30 sekundi	
Finalna elongacija	72 °C	5 minuta	

PCR programi korišćeni za umnožavanje gena za produkciju antibiotika dati su u Tabeli 5. Umnožavanje gena za fengicin, surfaktin, iturin C, subtilin, bacilizin i bacilomicin rađeno je po protokolu Mora et al. (2011), a za fenazin po Schneemann et al. (2011).

Tabela 5. PCR programi za umnožavanje kodirajućih gena za produkciju antibiotika

Umnožavanje DNK sekvenci za fengicin (FENDf/FENDr), surfaktin (SRFAf/SRFAr), iturin C (ITUCf/ITUCr), subtilin (SPASf/SPASr) i bacilizin (BACf/BACr)			
	Temperatura	Trajanje	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95 °C	4 minuta	
Denaturacija	94 °C	1 minut	
Hibridizacija	58 °C	1 minuta	40
Elongacija	70 °C	1 minut	
Finalna elongacija	70 °C	5 minuta	
Umnožavanje DNK sekvenci za bacilomicin (BMYBf/ BMYBr)			
	Temperatura	Trajanje	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95 °C	4 minuta	
Denaturacija	94 °C	1 minut	
Hibridizacija	55 °C	1 minuta	40
Elongacija	70 °C	1 minut	
Finalna elongacija	70 °C	5 minuta	
Umnožavanje DNK sekvenci za fenazin (PHZEf/PHZEr)			
	Temperatura	Trajanje	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94 °C	2 minuta	
Denaturacija	94 °C	1 minut	
Hibridizacija	54 °C	1 minut	36
Elongacija	72 °C	2 minuta	
Finalna elongacija	72 °C	7 minuta	

3.2.7.3. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Elektroforeza DNK amplifikovane PCR metodom je sprovedena na horizontalnom agaroznom gelu. Gelovi za elektroforezu su pravljani otapanjem agaroze u $0,5 \times$ TBE puferu. Pufer $0,5 \times$ TBE korišćen je i za elektroforezu. Na gel je nanošeno 7 μ l ispitivanih uzoraka, a elektroforeza se odvijala na 1% agaroznim gelovima i tekla je pri konstantnom naponu od 100 V u trajanju od 90 min. Nakon završetka elektroforeze gelovi su potopljeni u rasvor etidijum-bromida i držani u mraku tokom 15 minuta. Gelovi su posmatrani na UV transiluminatoru, a veličina amplifikovanih DNK fragmenata je determinisana u odnosu na DNK fragmente poznatih veličina (FermentasMassRuler DNA Ladder: 100 – 10000 bp). Ovako dobijeni PCR produkti su prečišćavani kitom za prečišćavanje (ThermoScientific™ GeneJET PCR Purification Kit) po proizvođačkoj specifikaciji i sekvencirani komercijalnim uslugama Macrogen Europe B.V. (Amsterdam, Holandija).

3.2.7.4. Filogenetska analiza

Identifikacija bakterijskih izolata izvršena je poređenjem dobijenih sekvenci sa sekvencama deponovanim u NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank bazi podataka uz pomoć BLAST funkcije. Dobijene sekvence izolata, kao i sekvence referentnih sojeva su zatim podvrgnute CLUSTAL W poravnanju i ručnoj obradi u BioEdit 7.2 softveru. Na isti način su poravnate i trimovane na istu dužinu i sekvence *housekeeping* gena koje su se koristile za formiranje konkatemernih sekvenci. „Neighbor-joining“ filogenetska stabla su konstruisana u MEGA 11.0 programu korišćenjem Tamura-3-parametra za izračunavanje genetičkih distanci.

3.2.8. Postavke *in vivo* ogleda

3.2.8.1. Uticaj bakterijske inokulacije na rast i nutritivni sastav žutog zvezdana u kiselom zemljištu (ogled u saksijama I)

Ogled u saksijama postavljen je tokom 2018. godine u stakleniku Instituta za zemljište. Cilj ogleda bilo je praćenje uticaja bakterijske inokulacije na prinos i nutritivni sastav žutog zvezdana (*Lotus corniculatus* L.) u kiselom zemljištu. Kao inokulanti korišćene su prekončne kulture ($\approx 10^9$ CFU/ml) 4 soja *Mesorhizobium* sp. (631oz, U1C, 1M12 i 754). Zemljište koje je korišćeno za ogled uzorkovano je iz Šiljakovca (opština Barajevo) i za njega je urađena hemijska analiza koja je podrazumevala određivanje osnovnih hemijskih i fizičkih parametara, sadržaja azota, kao i sadržaja mikro- i makroelemenata. Ogled je postavljen tako što je svaka saksija napunjena sa 730 g šljunka i 1570 g zemlje. Trideset semena žutog zvezdana stavljeno je u svaku saksiju napunjenu zemljom i inokulisano odgovarajućim bakterijskim inokulumom nanošenjem 1 ml inokuluma ($\approx 10^9$ CFU/ml) na svako seme. Primljeni su sledeći tretmani: T1: *Mesorhizobium* sp. 1M12; T2: *Mesorhizobium* sp. U1C; T3: *Mesorhizobium* sp. 631oz; T4: *Mesorhizobium* sp. 754; Ø: bez đubrenja i bez inokulacije (negativna kontrola) i ØN: sa đubrenjem (preporučena doza đubriva N: 60 kg ha⁻¹, P: 100 kg ha⁻¹ i K: 100 kg ha⁻¹) i bez inokulacije. Posle nanošenja inokuluma, seme je prekriveno tankim slojem zemlje. Eksperiment je postavljen sa tri ponavljanja za svaki tretman u potpuno randomizovanom sistemu, a saksije su čuvane u stakleniku Instituta tokom dve sezone (godine). Biljni materijal je sakupljen pre perioda cvetanja biljaka, dva puta u prvoj sezoni i tri puta u drugoj sezoni ogleda, izmerena je suva masa svakog otkosa i određen je sadržaj azota, kao mikro- i makroelemenata u biljnom materijalu.

3.2.8.2. Uticaj bakterijske inokulacije na rast i nutritivni sastav žutog zvezdana, ježevice i njihove smeše u kiselom zemljištu (ogled u saksijama II)

Ogled u saksijama postavljen je tokom 2019. godine u stakleniku Instituta za zemljište. Cilj ogleda bilo je praćenje uticaja bakterijske inokulacije na prinos i nutritivni sastav žutog zvezdana (*Lotus corniculatus*), ježevice (*Dactylis glomerata* L.), kao i njihove smeše u kiselom zemljištu. Kao inokulanti korišćene su prekončne kulture ($\approx 10^9$ CFU/ml) sojeva *B. megaterium* DZK1Bh i *Mesorhizobium* sp. 631oz. Za postavku ogleda korišćeno je zemljište uzorkovano iz Varne (opština Šabac) za koje je urađena hemijska i fizička analiza. Svaka saksija napunjena je sa 730 g šljunka i 1570 g zemlje. U slučaju monokulture žutog zvezdana u svaku saksiju je zasejano po 30 semena, u slučaju monokulture ježevice po 20 semena, dok je u slučaju smeše zasejano 20 semena žutog zvezdana i 10 semena ježevice. Semena su zatim inokulisana bakterijskim kulturama ($\approx 10^9$ CFU/ml) na sledeći način T1: *B. megaterium* DZK1BH; T2: *Mesorhizobium* sp. 631oz; T3: *B. megaterium* DZK1BH + *Mesorhizobium* sp. 631oz; Ø: bez đubrenja i bez inokulacije (negativna kontrola) i ØN: sa đubrenjem (doza đubriva N: 60 kg ha⁻¹, P: 100 kg ha⁻¹ i K: 100 kg ha⁻¹) i bez inokulacije. Svaki tretman postavljen je u 3 nezavisna ponavljanja, a ogled je praćen tokom 7 nedelja, nakon čega su biljke posečene, izmerena je suva masa biljaka i određen je sadržaj azota, kao i mikro- i makroelemenata.

3.2.8.3. Uticaj bakterijske inokulacije na rast i nutritivni sastav lucerke, ježevice i njihove smeše (ogled u polju)

Ogled u polju postavljen je tokom 2019. godine u Kruševcu, na parceli Instituta za krmno bilje. Cilj ogleda bilo je praćenje uticaja bakterijske inokulacije na prinos i sastav mikro- i makroelemenata leguminozne i neleguminozne biljne vrste, kao i njihove smeše. Od biljnih vrsta korišćene su lucerka (*Medicago sativa* L., 42K) i ježevica (*Dactylis glomerata* L., K24) u vidu monokultura, kao i njihova smeša, dok su kao inokulanti korišćeni *S. meliloti* L4 (efikasan soj rizobija specifičan za lucerku, iz kolekcije Instituta za zemljište) i *B. megaterium* DLK1Bh (ovaj rad). Za

inokulaciju su korišćene prekonoćne bakterijske kulture ($\approx 10^9$ CFU/ml). Ogljed se sastojao iz 12 tretmana, a svaki tretman je postavljen u 3 ponavljanja na parcelama veličine 1m^2 (Tabela 6).

Tabela 6. Prikaz tretmana korišćenih za postavku ogljeda u polju

Biljna vrsta	Inokulant
Lucerka Ježevica Smeša (lucerka+ježevica)	Kontrola (bez inokulacije)
Lucerka Ježevica Smeša (lucerka+ježevica)	<i>S. meliloti</i> L4
Lucerka Ježevica Smeša lucerka+ježevica	<i>B. megaterium</i> DLK1Bh
Lucerka Ježevica Smeša (lucerka+ježevica)	<i>S. meliloti</i> L4 + <i>B. megaterium</i> DLK1Bh

Za tretmane sa monokulturom lucerke zasejano je 2g semena lucerke po parceli, sa monokulturom ježevice 4g semena, a za smešu zasejano je 2,6g semena lucerke i 0,6g semena ježevice. Takođe, zbog različite veličine semena ovih biljnih vrsta korišćena je različita količina inokulanta i to: za lucerku 0,2 ml kulture *S. meliloti* L4 i *B. megaterium* DLK1Bh i po 0,1 ml u koinokulaciji; za ježevicu 2 ml kulture *S. meliloti* L4 i *B. megaterium* DLK1Bh i po 1ml u koinokulaciji, a za smešu 1,5 ml kulture *S. meliloti* L4 i *B. megaterium* DLK1Bh i po 0,75ml u koinokulaciji. U okviru parcela, semena su sejana u redovima na rastojanju od 20 cm razdaljine. Tokom dve godine trajanja ogljeda skinuta su 4 otkosa za koje je izmerena suva masa, određen je sadržaj azota, kao i mikro- i makroelemenata u biljnom materijalu.

3.2.9. Hemijske i fizičke analize zemljišta

3.2.9.1. Hemijske analize zemljišta

Za svaki lokalitet sa koga je uzorkovan biljni materijal, kao i za uzorke zemljišta koja su korišćena za postavku ogljeda u saksijama i polju, rađene su osnovne hemijske analize zemljišta koje su obuhvatile određivanje pH zemljišta, sadržaja CaCO_3 , K_2O , P_2O_5 , kao i sadržaja organske materije (SOM), dok su za uzorke zemljišta koji su se koristili za postavljanje ogljeda u saksijama i polju urađene i dodatne fizičke i hemijske analize. Priprema uzorka za hemijsku analizu urađena je primenom standardne metode SRPS ISO 11464:2004. Uzorci zemljišta iz poljskog ogljeda i ogljeda u saksijama osušeni su na vazduhu i samleveni u mlinu (sito 2 mm).

3.2.9.2. Osnovne hemijske analize zemljišta

Određivanje pH zemljišta izvršeno je primenom standardne metode SRPS ISO 10390:2007. Određivanje lako-pristupačnog fosfora i kalijuma u zemljištu urađeno je primenom AL – metode, (Riehm, 1958). Sadržaj organske materije određen je na osnovu sadržaja ukupnog i neorganskog ugljenika. Sadržaj ukupnog ugljenika određen je suvim sagorevanjem po standardnoj metodi SRPS ISO 10694:2005, a sadržaj neorganskog izračunat je na osnovu sadržaja karbonata, čiji je sadržaj određen po standardnoj metodi SRPS ISO 10693:2005. Sadržaj azota u zemljištu određen je na aparatu za suvo sagorevanje Elementar Vario EL III - CNS (CNS analizator), primenom standardne metode SRPS ISO 13878:2005.

3.2.9.3. Dodatne hemijske analize zemljišta

Ukupni sadržaj elemenata određen je primenom metode određivanja elemenata u tragovima (As, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Mn, Ni i Zn) sa indukovanom kuplovanom plazmom – atomska emisiona

spektrometrija, (ICP – AES) ekstrahovanih carskom vodom, na instrumentu ICP- OES ThermoCAP 6300 duo. Određivanje pristupačnih formi Cu, Fe, Mn, i Zn urađeno je prema standardu SRPS ISO 14870:2005 na instrumentu ICP- OES ThermoCAP 6300 duo. Određivanje pristupačnih formi Ca i Mg izvršena je na instrumentu ICP- OES ThermoCAP 6300 duo (Thomas, 1982).

3.2.9.4. Fizičke analize zemljišta

Sadržaj vode u uzorku zemljišta određen je primenom standardne metode SRPS ISO 11465:2002. Određivanje mehaničkog sastava zemljišta obavljeno je po metodi Hadžić et al. (1997).

3.2.10. Hemijske analize biljnog materijala

Biljni materijal iz poljskog ogleda i ogleda u saksijama je osušen do konstantne mase na 70 °C, fino usitnjen i razoren koncentrovanom HNO₃ i 30% H₂O₂. Adekvatnim razblaženjima rastvor je pripremljen za analizu na instrumentu ICP- OES ThermoCAP 6300 duo. Na ovaj način određena je koncentracija mikro- (As, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Mn, Fr, Ni i Zn) i makro- (Ca, Mg, P i K) elemenata u biljnom materijalu. Ukupan sadržaj N u biljnom materijalu je određen suvim sagoravanjem instrumentom Elementar Vario EL III – CNS (CNS analizator).

3.2.11. Statističke analize

PGP osobine, antifungalna aktivnost, proizvodnja enzima kao i efekat tretmana na parametre rasta biljaka i koncentraciju mikro- i makroelemenata u biljnom materijalu procenjeni su analizom varijanse (ANOVA-statistički program COSTAT), a Duncan test višestrukog opsega je korišćen za testiranje razlika između srednjih vrednosti. Korelacije između definisanih parametara analizirane su SPSS 16.0 programom.

4. REZULTATI

4. REZULTATI

4.1. Hemijske analize zemljišta

U Tabeli 7 su prikazane osnovne hemijske analize zemljišta iz kog je uzorkovan biljni materijal (korenovi) lucerke i žutog zvezdana u cilju izolacije bakterija iz korenskih kvržica. Po pH reakciji zemljišta (na osnovu vrednosti dobijenih u KCl), uzorci PZN i PZR1 izdvojili su se kao kiselo do jako kiselo zemljište. Uzorci zemljišta PLR2 i DZR3 imali su kiselu reakciju, dok su se uzorci NBGL, PLR1 i ZR7 izdvojili po slabo kiseloj reakciji (tumačeno po Šestić et al., 1969). Prema sadržaju karbonata, uzorci su varirali od bezkarbonatnih do srednje ka jako karbonatnim. Sadržaj K_2O i P_2O_5 varirao je od niskog do visokog, a sadržaj azota i organske materije uglavnom je pokazao srednje vrednosti.

Tabela 7. Osnovni hemijski parametri zemljišta iz koga je uzorkovan biljni materijal (korenske kvržice)

Uzorak zemljišta	pH (KCl)	pH (H ₂ O)	pH reakcija zemljišta	CaCO ₃ (%)	K ₂ O (mg/100g)	P ₂ O ₅ (mg/100g)	N (%)	Sadržaj organske materije (%)
DLM1 (lucerka)	7,48	8,12	Alkalna	9,94	8,06	16,73	0,17	3,83
DLK1 (lucerka)	7,28	8,08	Alkalna	4,47	46,59	22,88	0,19	3,93
DLK2 (lucerka)	7,19	8,02	Neutralna ka alkalnoj	1,34	17,76	2,99	0,22	3,54
SM (lucerka)	6,42	7,32	Neutralna ka slabo kiseloj	0,55	23,42	4,99	0,17	4,11
MKL (lucerka)	7,01	7,55	Neutralna	0,92	26,72	7,92	0,16	2,96
NBGL (lucerka)	6,05	7,10	Slabo kisela	0,12	19,12	12,41	0,18	3,13
ALX (lucerka)	6,99	7,99	Neutralna	6,25	18,78	9,63	0,16	3,85
PLK1 (lucerka)	6,99	7,78	Neutralna	0,54	23,64	5,35	0,17	3,65
PLK2 (lucerka)	7,01	7,68	Neutralna	0,27	29,09	39,32	0,17	3,89
PLK3 (lucerka)	6,50	7,49	Slabo kisela ka neutralnoj	0,09	26,95	37,34	0,17	3,8
PLR1 (lucerka)	6,02	6,85	Slabo kisela	-	42,29	31,31	0,20	4,05
PLR2 (lucerka)	5,12	6,17	Kisela	-	30,96	5,93	0,21	3,56
DZK1 (zvezdan)	6,73	7,47	Neutralna	0,27	34,69	2,66	0,14	5,03
DZM1 (zvezdan)	7,21	7,70	Alkalna ka neutralnoj	0,71	39,12	3,66	0,10	5,37
DZR2 (zvezdan)	7,33	7,64	Alkalna	19,70	16,47	8,90	0,11	6,26
DZR3 (zvezdan)	4,94	6,34	Kisela	-	22,35	0,81	0,19	3,11
ZR7 (zvezdan)	5,98	6,97	Slabo kisela	1,02	17,98	17,60	0,16	2,99
PZN (zvezdan)	4,12	5,67	Kisela ka jako kiseloj	-	14,62	2,63	0,18	3,36
PZR1 (zvezdan)	4,52	6,08	Kisela ka jako kiseloj	-	19,77	1,59	0,14	2,68

-: nije detektovano prisutvo CaCO₃ u uzorku

4.2. Izolacija i preliminarna karakterizacija bakterija korenskih kvržica

Kako postoji znatno manji i ograničen broj studija koje su se bavile bakterijskim diverzitetom bakterija iz korenskih kvržica žutog zvezdana u odnosu na lucerku, pogotovo na teritoriji Srbije, više pažnje posvećeno je izolaciji i determinaciji bakterija poreklom iz korenskih kvržica žutog zvezdana. U Tabelama 8. i 9. su navedeni izolati iz ove studije, kao i neki od izolata iz prethodnih istraživanja Odseka za mikrobiologiju Instituta za zemljište, koji su u svrhe istraživanja diverziteta takođe ispitani.

U ovom istraživanju ukupno je izolovano 152 bakterijska izolata iz korenskih kvržica lucerke i žutog zvezdana, od čega 64 iz kvržica lucerke i 88 iz kvržica žutog zvezdana. Na osnovu morfologije kolonija, kao i Gram reakcije svi izolati su preliminarno okarakterisani kao rizobijalni (sluzave kolonije, G-) ili nerizobijalni (najčešće mat kolonije pravinog oblika, G+ili G-, veći štapići) (Slika7, Prilozi 1 i 2). Izolati koji su imali sposobnost nodulacije (Prilozi 1 i 2) pri reinokulaciji biljke domaćina okarakterisani su kao rizobijalni, dok su ovoj grupi pridruženi i izolati koji nisu imali sposobnost nodulacije, ali su se po drugim posmatranim karakteristikama mogli definisati kao rizobijalni. Preliminarna karakterizacija izolata na osnovu morfologije kolonija i Gram reakcije, kao i pojave fluorescencije na KB medijumu pokazala je da je od ukupnog broja izolata iz lucerke 40 potencijalno pripada rizobijalnim vrstama, a 24 ostalim vrstama. U slučaju izolata iz korenskih kvržica žutog zvezdana, 30 izolata su preliminarno okarakterisani kao rizobijalni, a 58 kao nerizobijalni.



Slika 7. Uobičajena morfologija kolonija i Gram reakcija: levo nerizobijalni izolat, desno rizobijalni izolat (foto M. Knežević)

4.2.1. Određivanje uticaja abiotičkih faktora na rast izolata

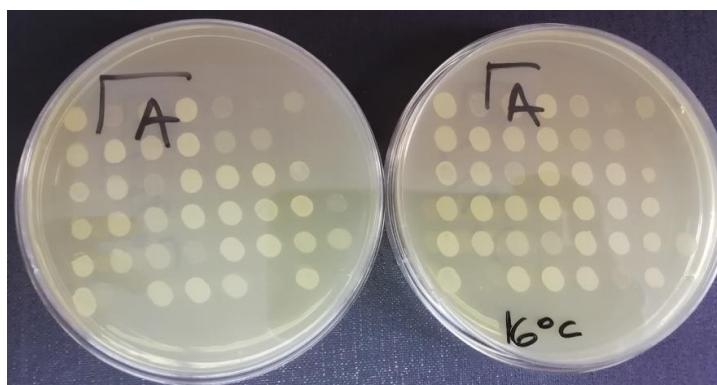
U cilju ispitivanja otpornosti na nepovoljne uslove sredine, testirana je tolerancija izolata na uslove različite pH vrednosti, koncentracije NaCl i temperature. Izolati su pokazali različit stepen tolerancije na nepovoljne uslove u zavisnosti od toga da li su rizobijalni ili nerizobijalni, kao i u zavisnosti od porekla (korenske kvržice lucerke ili žutog zvezdana). Rezultati tolerancije izolata na nepovoljne uslove sredine prikazani su kao Prilozi 3-8.

Samo 8% nerizobijalnih izolata iz lucerke pokazalo je toleranciju na najnižu testiranu pH vrednost (pH 4), a 50% pokazalo je toleranciju na pH 5. Na pH 9 detektovan je rast 45% izolata, dok je na najvišoj testiranoj pH (pH 10) mogao da raste samo jedan nerizobijalni izolat (L3). Rizobijalni

izolati poreklom iz lucerke pokazali su bolju toleranciju na najnižu pH vrednost (25%), a 60% je raslo na podlozi sa pH 5. Takođe, rast rizobijalnih izolata na pH 9 bio je sličan kao i u slučaju nerizobijalnih izolata (33%), a na pH 10 nije detektovan rast. Nerizobijalni izolati poreklom iz žutog zvezdana pokazali su daleko bolju toleranciju na najnižu testiranu pH vrednost (38%) u odnosu na izolate iz lucerke. Veći procenat izolata imao je sposobnost rasta na pH 5 (69%). U odnosu na izolate iz lucerke, nerizobijalni izolati iz žutog zvezdana pokazali su manju toleranciju na pH 9 (28%), dok je na najvišem testiranom pH detektovan rast samo 4 izolata. U odnosu na izolate iz lucerke, veći procenat rizobijalnih izolata iz žutog zvedana imao je sposobnost rasta na pH 4 (37%) i na pH 5 (80%). Međutim, manji broj izolata rastao je na pH 9 (31%), dok je na pH 10 detektovan rast samo izolata DZM1Em.

Svi nerizobijalni izolati iz lucerke bili su tolerantni na koncentracije NaCl od 0,5 do 3%. Na koncentraciji NaCl od 4% nije detektovan rast samo jednog izolata, dok je na podlogama sa 5% i 6% NaCl raslo 46% i 33% nerizobijalnih izolata, redom. Rizobijalni izolati pokazali su dobar rast na nižim koncentracijama NaCl. Pri koncentraciji 4% NaCl detektovan je rast 48% izolata, na 5% NaCl raslo je 13% izolata, dok su pri najvećoj tesiranoj koncentraciji rasla samo 2 izolata. Nerizobijalni izolati iz žutog zvezdana imali su slabiji rast na većim koncentracijama NaCl, u poređenju sa izolatima iz lucerke. Pri koncentraciji NaCl od 5% raslo je 33% izolata, a pri koncentraciji NaCl od 6% samo 15% izolata. Rast rizobijalnih izolata poreklom iz žutog zvezdana bio je ograničen visokim koncentracijama NaCl. Pri koncentraciji NaCl od 4%, rasla su samo 2 izolata, dok pri većim koncentracijama NaCl nije detektovan rast ovih izolata. Za izolate L3 i DZK1Bh testiran je rast i na koncencracijama NaCl do 10%, na kojima su pokazali dobar rast.

Nije detektovan rast nerizobijalnih izolata iz lucerke na 4 °C, dok je procenat rasta ovih izolata na 16 °C i 45 °C bio 29% i 20%, redom. Na najvišoj testiranoj temperaturi (60 °C) detektovan je slab rast samo izolata L3. Takođe, rizobijalni izolati poreklom iz lucerke nisu rasli na najnižoj i najvišoj testiranoj temperaturi (4 °C i 60 °C). Detektovan je rast 40% izolata na temperaturi od 16 °C i 15% na 45 °C. Procenat rizobijalnih izolata poreklom iz žutog zvezdana koji su imali sposobnost rasta na 16 °C bio je 20%, a na 45 °C samo 8%, što je bilo manje u poređenju sa rizobijalnim izolatima iz lucerke. Na najnižoj i najvišoj temperaturi nije detektovan rast rizobijalnih i nerizobijalnih izolata iz lucerke. Veliki procenat nerizobijalnih izolata iz žutog zvezdana pokazao je sposobnost rasta na 16 °C, čak 83%, dok su na 45 °C mogla da rastu samo 3 izolata (Slika 8).



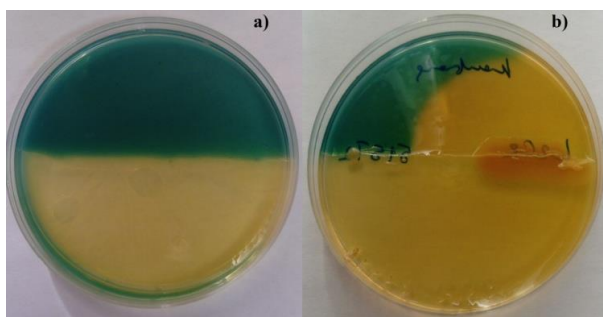
Slika 8. Rast nerizobijalnih izolata iz žutog zvezdana na temperaturi od 16°C, određen metodom „replica-plating“ (foto M. Knežević)

4.3. Testiranje osobina izolata da promovišu rast biljaka *in vitro*

Od ukupno testirana 152 izolata iz korenskih kvržica lucerke i žutog zvezdana, 30 je pokazalo sposobnost produkcije siderofora, 23 sposobnost solubilizacije fosfata i 81 sposobnost produkcije indol-3-sirćetne kiseline. Samo 7 izolata (4 poreklom iz korenskih kvržica lucerke: L1, LG, Luc2, L2Cr i tri iz žutog zvezdana: DZK1Bh, DZK1Jh i ZR7Dh) posedovalo je sve 3 testirane PGP osobine.

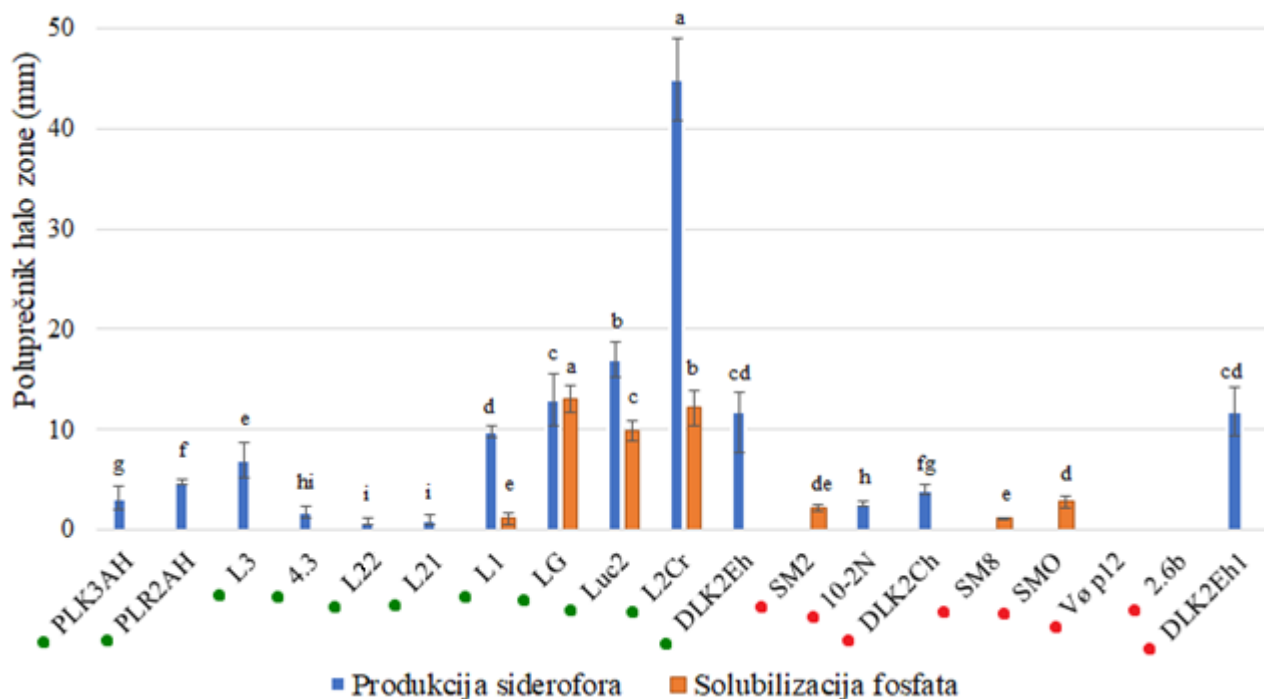
Produkcija siderofora detektovana je kod 22% izolata iz korenskih kvržica lucerke, koji su većinom pripadali nerizobijalnim izolatima (11 izolata), dok je od rizobijalnih samo 3 izolata

pokazalo sposobnost produkcije siderofora (Prilog 9). Najveća produkcija siderofora zabeležena je za izolat L2Cr, sa poluprečnikom formirane halo zone od $44,83 \pm 4,07$ cm (Slika 9). Takođe, izolat Luc2 dao je halo zone veće u odnosu na ostale izolate ($17,00 \pm 1,73$ mm). Vrednosti poluprečnika halo zone za ostale izolate kretale su se u opsegu od $0,83 \pm 0,29$ (izolat L20) do $13,00 \pm 2,56$ cm (izolat LG).



Slika 9. Promena boje CAS agara iz zelene u žutu usled produkcije siderofora (a: neinokulisana podloga, b: izolat L2Cr, foto M. Knežević)

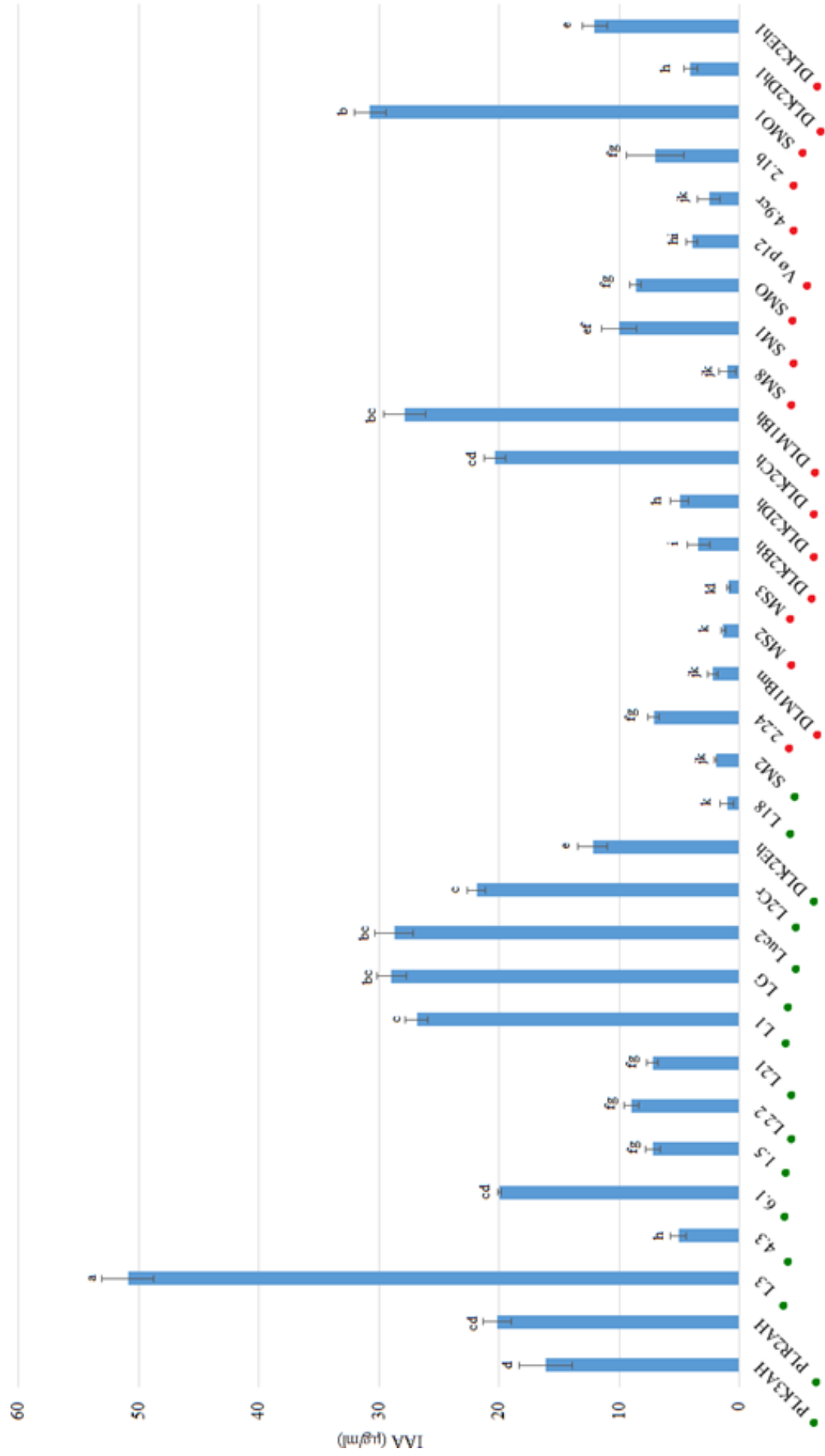
Od testiranih izolata iz korenskih kvržica lucerke, samo 7 (11%) je pokazalo sposobnost solubilizacije fosfata (4 nerizobijalnih i 3 rizobijalna izolata). Najveće vrednosti zabeležene su za izolat LG ($13,00 \pm 1,32$ mm poluprečnik halo zone) (Slika 10, Prilog 9). Od preostalih izolata sa mogućnošću solubilizacije fosfata, izolat L2Cr produkovao je halo zonu poluprečnika $12,17 \pm 1,76$ mm, dok je najniža vrednost zabeležena za izolat SM8 ($1,13 \pm 0,09$ mm).



a-i: Vrednosti označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$). Crvenim oznakama su obeleženi rizobijalni izolati, a zelenim nerizobijalni.

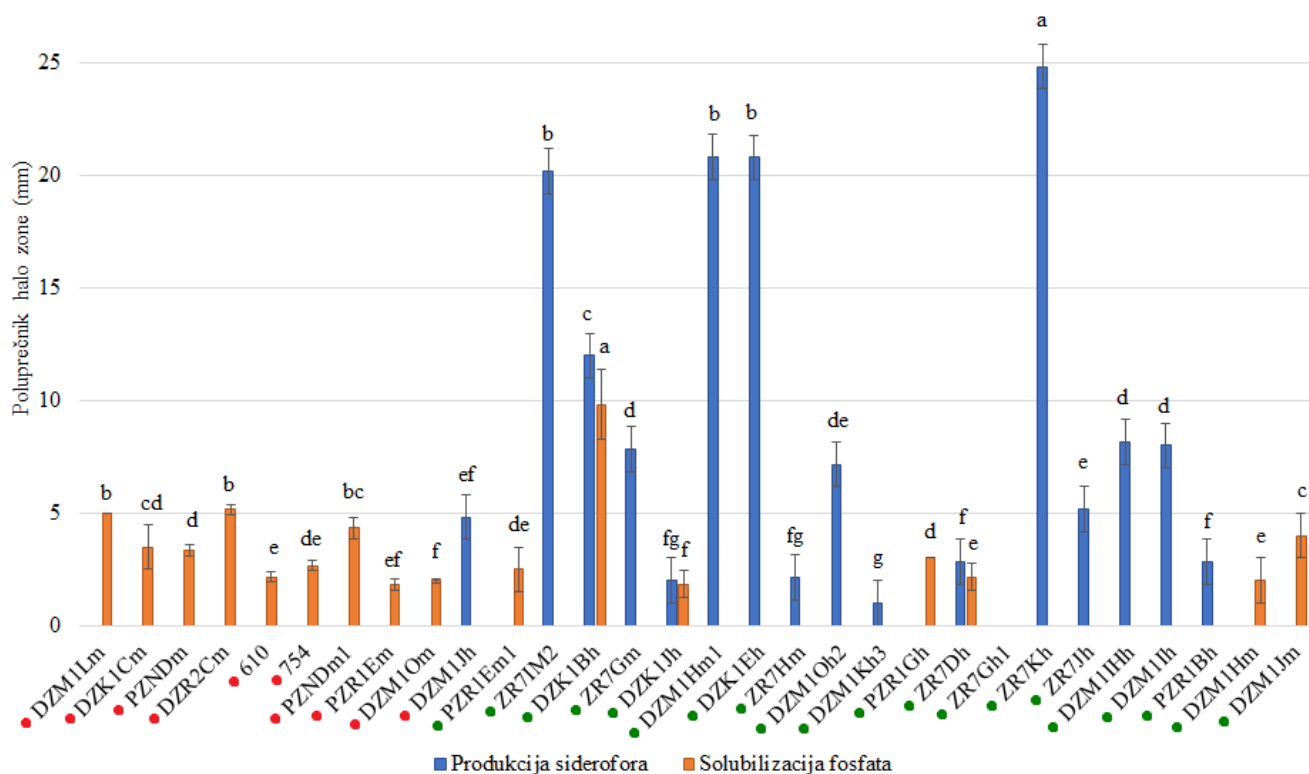
Slika 10. Sposobnost izolata iz lucerke da produkujju siderofore i solubilizuju fosfate

Preko 50% izolata iz korenskih kvržica lucerke pokazalo je određen nivo produkcije IAA. Vrednosti produkovane IAA za izolate iz korenskih kvržica lucerke kretale su se od $1,02 \pm 0,70$ (izolat SM8) do $50,87 \pm 2,16$ $\mu\text{g ml}^{-1}$ (izolat L3). Osim izolata L3 kao dobri producenti IAA izvojili su se i izolati LG, Luc2, SMO1 i DLM1Bh (Slika 11). U slučaju produkcije IAA, pokazalo se da približno isti broj rizobijalnih (17) i nerizobiljanih (15) izolata ima sposobnost produkcije ovog jedinjenja, iako su vrednosti za rizobijalne izolate bile generalno manje.



a-1: Vrednosti označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$). Crvenim oznakama su obeleženi rizobijalni izolati, a zelenim nerizobijalni.
Slika 11. Sposobnost izolata iz lucerke da produkuje indol-3-sirćetnu kiselinu

Od 88 testiranih izolata poreklom iz kvržića žutog zvezdana, samo 17% pokazalo je sposobnost produkcije siderofora (Slika 12, Prilog 10). Slično kao u slučaju izolata iz kvržića lucerke, kod izolata poreklom iz zvezdana, veći procenat nerizobijalnih izolata produkovao je siderofore (15 izolata), u odnosu na rizobijalne (1 izolat). Najveći poluprečnik formirane halo zone na CAS agaru koji je ukazivao na najznačajni potencijal produkcije siderofora zabeležen je za izolat ZR7Kh (24,83±2,36 mm), dok su se vrednosti za ostale testirane izolate kretale u opsegu od 1,00 mm (izolat DZM1Kh3) do 20,17±2,75 mm (izolat ZR7Im2).

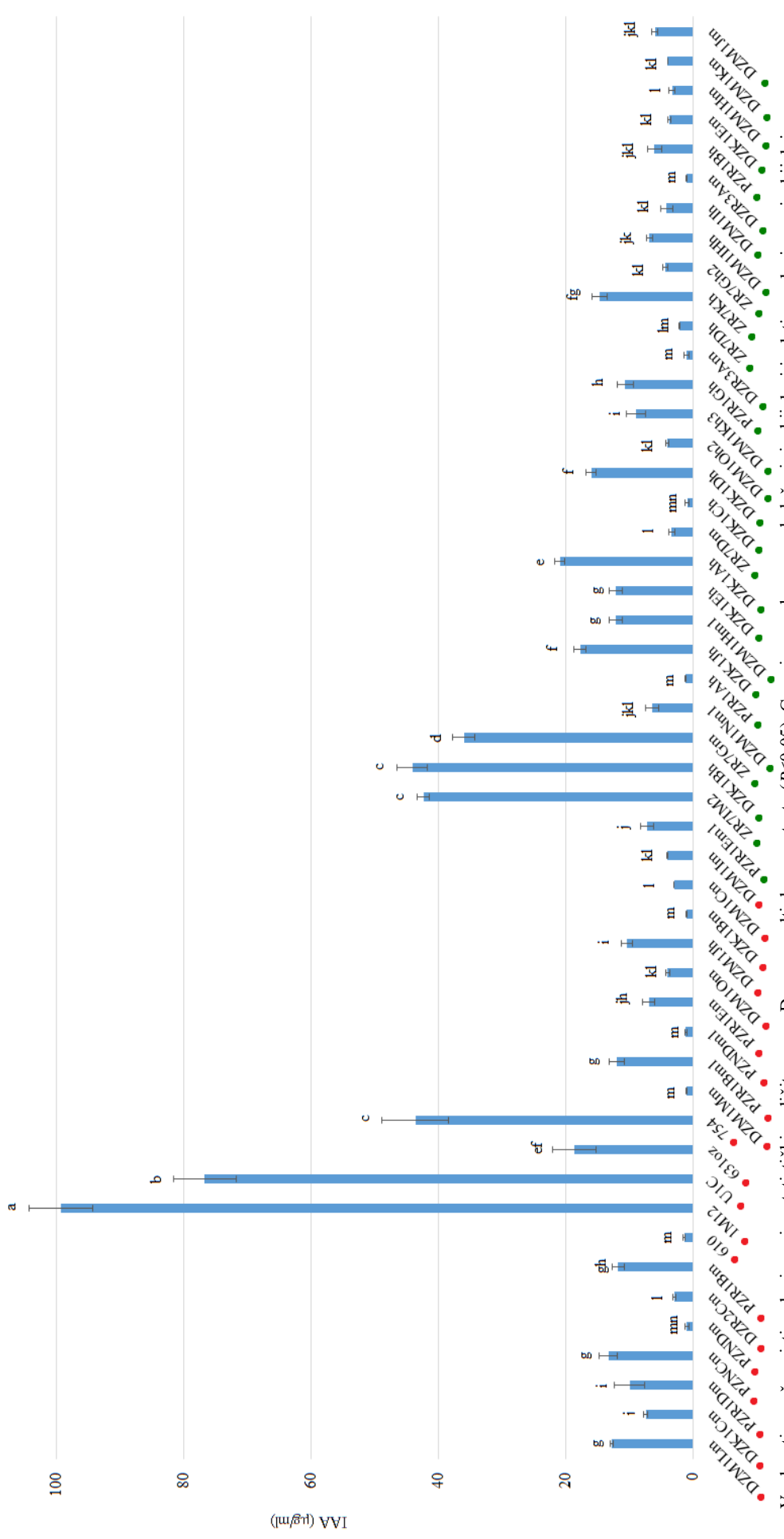


a-g: Vrednosti označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$). Crvenim oznakama su obeleženi rizobijalni izolati, a zelenim nerizobijalni.

Slika 12. Sposobnost izolata iz žutog zvezdana da produkuju siderofore i solubilizuju fosfate

Slično kao i u slučaju produkcije siderofora, zabeležen je mali procenat izolata koji imaju sposobnost solubilizacije fosfata (18%). Izolat DZK1Bh izdvojio se kao najznačajniji producent siderofora, sa poluprečnikom formirane halo zone od 9,83±1,53mm (Slika 12). Nakon izolata DZK1Bh, izolati DZM1Lm, DZR2Cm i PZNDm1 izdvojili su se kao značajni producenti siderofora, u odnosu na druge izolate.

Preko 55% izolata iz korenskih kvržića žutog zvezdana imalo je sposobnost produkcije IAA koje su se kretale u opsegu vrednosti od 1,00±0,10 do 99,37±5,05 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Slika 13, Prilog 10). U odnosu na nerizobijalne, rizobijalni izolati pokazali su se kao bolji producenti IAA, sa 21 izolatom sa sposobnošću produkcije IAA (od ukupno 30). Najveće koncentracije IAA zabeležene su za izolat 1M12, praćene izolatom U1C (76,70±4,92 $\mu\text{g ml}^{-1}$).



a-n: Vrednosti označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$). Crvenim oznakama su obeleženi rizobijalarni izolati, a zelenim nerizobijalarni.

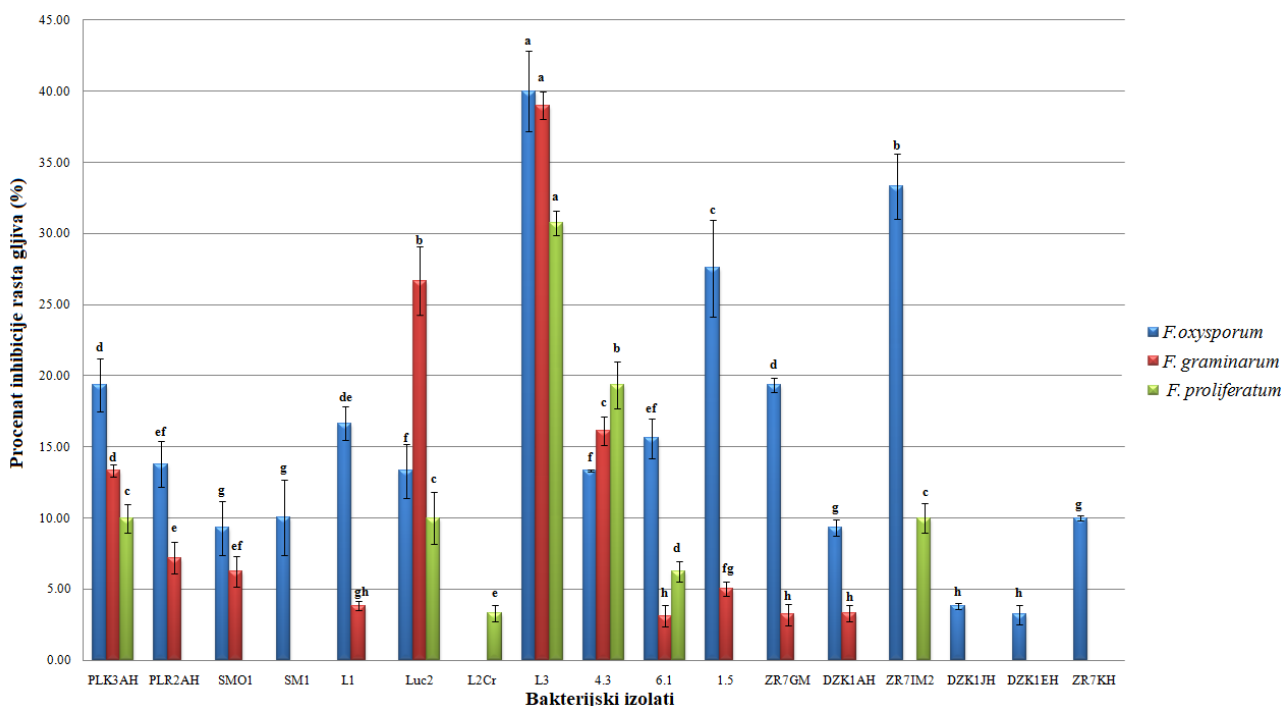
Slika 13. Spособnost izolata iz žutog zvezdana da produkuju indol-3-sircetnu kiselinu

Generalno, veći procenat izolata poreklom iz kvržica lucerke pokazao je sposobnost produkcije siderofora, dok su se izolati poreklom iz kvržica žutog zvezdana pokazali kao zastupljeniji solubilizatori fostafa i producenti IAA. Produkcija siderofora i sposobnost solubilizacije fosfata bile su zastupljenije osobine nerizobijalnih izolata poreklom iz obe biljne vrste. Produkcija IAA bila je većinski zastupljena kod rizobijalnih izolata iz kvržica žutog zvezdana, dok je u slučaju izolata iz lucerke procentualna zastupljenost producenata IAA bila vrlo slična između rizobijalnih i nerizobijalnih izolata.

4.4. In vitro skrining antifungalne aktivnosti izolata

Od svih testiranih izolata, samo 17 je pokazalo antifungalno dejstvo prema bar jednom fungalnog patogenu (*F. oxysporum*, *F. graminearum* ili *F. proliferatum*) (Slika 14). Izolati koji su preliminarno okarakterisani kao rizobijalni nisu pokazali antifungalno dejstvo. Izolati iz korenskih kvržica lucerke generalno su pokazali bolje antifungalno dejstvo, sa 11 izolata koji su inhibirali rast makar jedne gljive. Od 11 izolata, njih 90% imalo je efekat na inhibiciju rasta *F. oxysporum*, 73% na *F. graminearum* i 55% na *F. proliferatum*. Takođe, izolati iz lucerke imali su najveći antifungalni efekat prema *F. oxysporum*, a zatim prema *F. graminearum* i *F. proliferatum*.

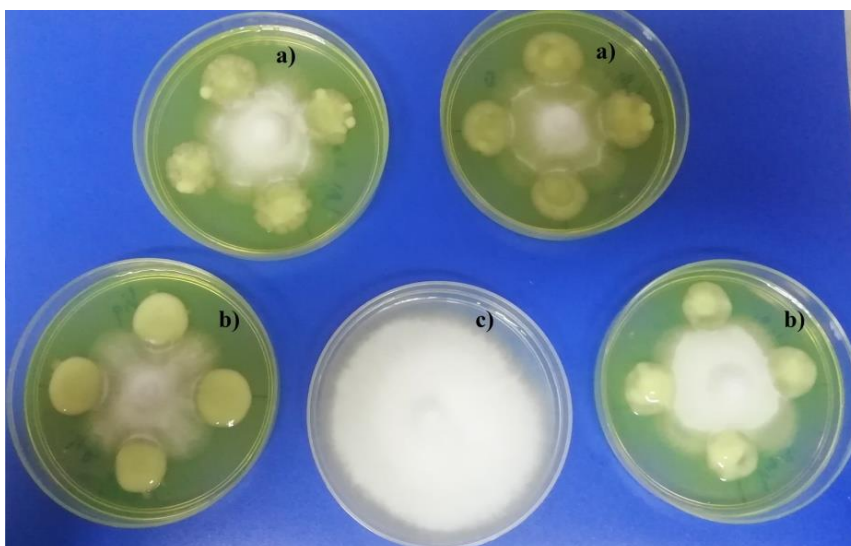
Od svih testiranih izolata, L3 je pokazao najbolji antifungalni efekat, sa procentom inhibicije rasta većim od 30% prema svim testiranim fungalnim patogenima. Takođe, L3 je jedini izolat koji je u formi supernatanta uticao na rast testiranih gljiva sa procentom inhibicije od 27,71%±2,17; 21,18%±3,9 i 13,31%±1,4 za *F. oxysporum*, *F. graminearum* i *F. proliferatum*, redom. Izolat 1.5 pokazao je dobar inhibitorski efekat na rast *F. oxysporum* (28%), slab efekat na rast *F. graminearum* (5%) i nije imao efekta na rast *F. proliferatum*.



a-g: Vrednosti označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$).

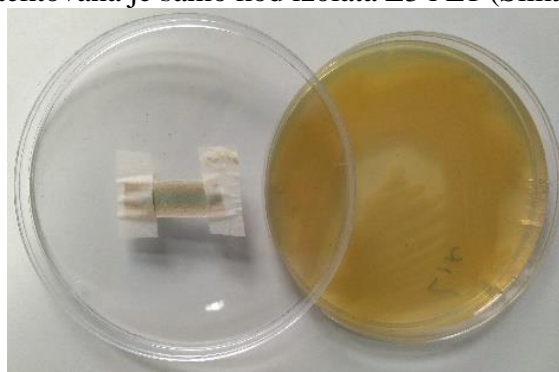
Slika 14. Antifungalni potencijal izolata prema *F. oxysporum*, *F. graminearum* i *F. proliferatum*

Od izolata koji su preliminarno okarakterisani kao pripadnici roda *Pseudomonas*, izolat Luc2 inhibirao je rast *F. graminearum* za 27%; *F. oxysporum* za 13% i *F. proliferatum* za 10% , dok je izolat L1 pokazao manje značajan inhibitorski efekat (Slika 15).



Slika 15. Inhibični efekat izolata a) Luc2 i b) L1 na c) *F. graminearum* (foto M. Knežević)

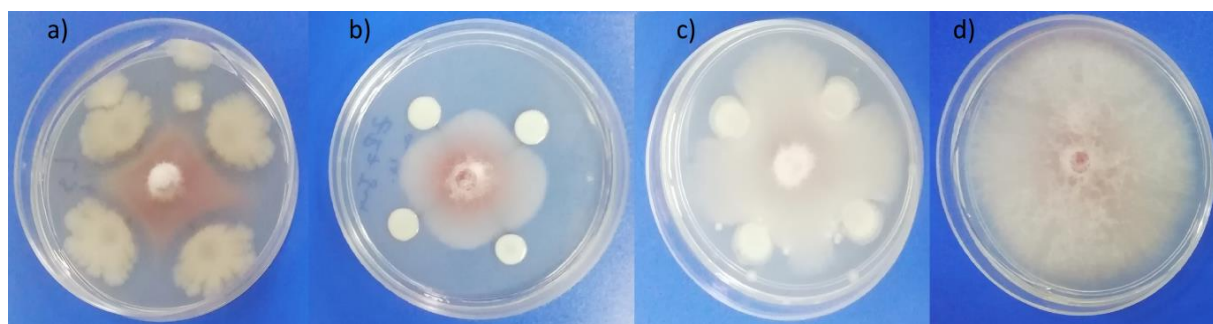
Inhibični efekat izolata 4.3 protiv *F. proliferatum* bio je slabiji od dejstva izolata L3, ali je njegova antifungalna aktivnost bila značajna u poređenju sa drugim testiranim izolatima. Iako izolati L21 i L22 nisu imali direktnog uticaja na inhibiciju rasta testiranih gljiva; gustina micelije *F. oxysporum* bila je smanjena pod dejstvom ovih izolata, u odnosu na kontrolu. Od svih testiranih izolata, produkcija HCN detektovana je samo kod izolata L3 i L1 (Slika 16).



Slika 16. Produkcija HCN detektovana za izolat L1 (foto M. Knežević)

Od izolata iz korenskih kvržica žutog zvezdana, samo 6 izolata pokazalo je antifungalno dejstvo. Svi su imali efekat na inhibiciju rasta *F. oxysporum*, dva na *F. graminearum* i jedan na *F. proliferatum*. Izolat ZR7Im2 pokazao je naznačajnije antifungalno dejstvo na *F. oxysporum*, sa procentom inhibicije rasta od 33%. Takođe, ovo je jedini izolat iz korenskih kvržica žutog zvezdana koji je pokazao delovanje protiv *F. proliferatum* (10%).

Na osnovu rezultata *in vitro* testiranja antifungalne aktivnosti, izolati L3, ZR7Im2, 1.5 i Luc2 mogu se izdvojiti kao potencijalno dobri antagonisti testiranih vrsta roda *Fusarium* (Slika 17).



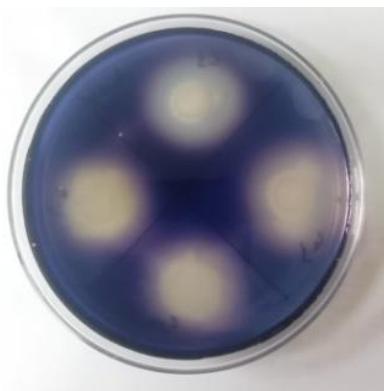
Slika 17. Inhibični efekat izolata a) L3, b) ZR7Im2 i c) 1.5 na d) *F. oxysporum* (preuzeto iz Knežević et al., 2021a)

Od 17 testiranih izolata sa antifungalnom aktivnošću, PCR analiza pokazala je da 5 izolata poseduje gene za produkciju antibiotika koji potencijalno imaju ulogu u njihovom antagonističkom delovanju. Svih 5 izolata sa prisustvom gena za produkciju antibiotika su izolati iz korenskih kvržica lucerke, dok prisustvo ovih gena nije detektovano kod izolata iz žutog zvezdana. Pokazano je da izolat L3 poseduje gene za produkciju fengicina, surfaktina i iturina C. Pristustvo gena za produkciju bacilizina pokazano je kod izolata 4.3, dok su izolati L1, Luc2 i L2Cr posedovali gene za produkciju fenazina.

4.5. Kvalitativno određivanje produkcije hidrolitičkih enzima

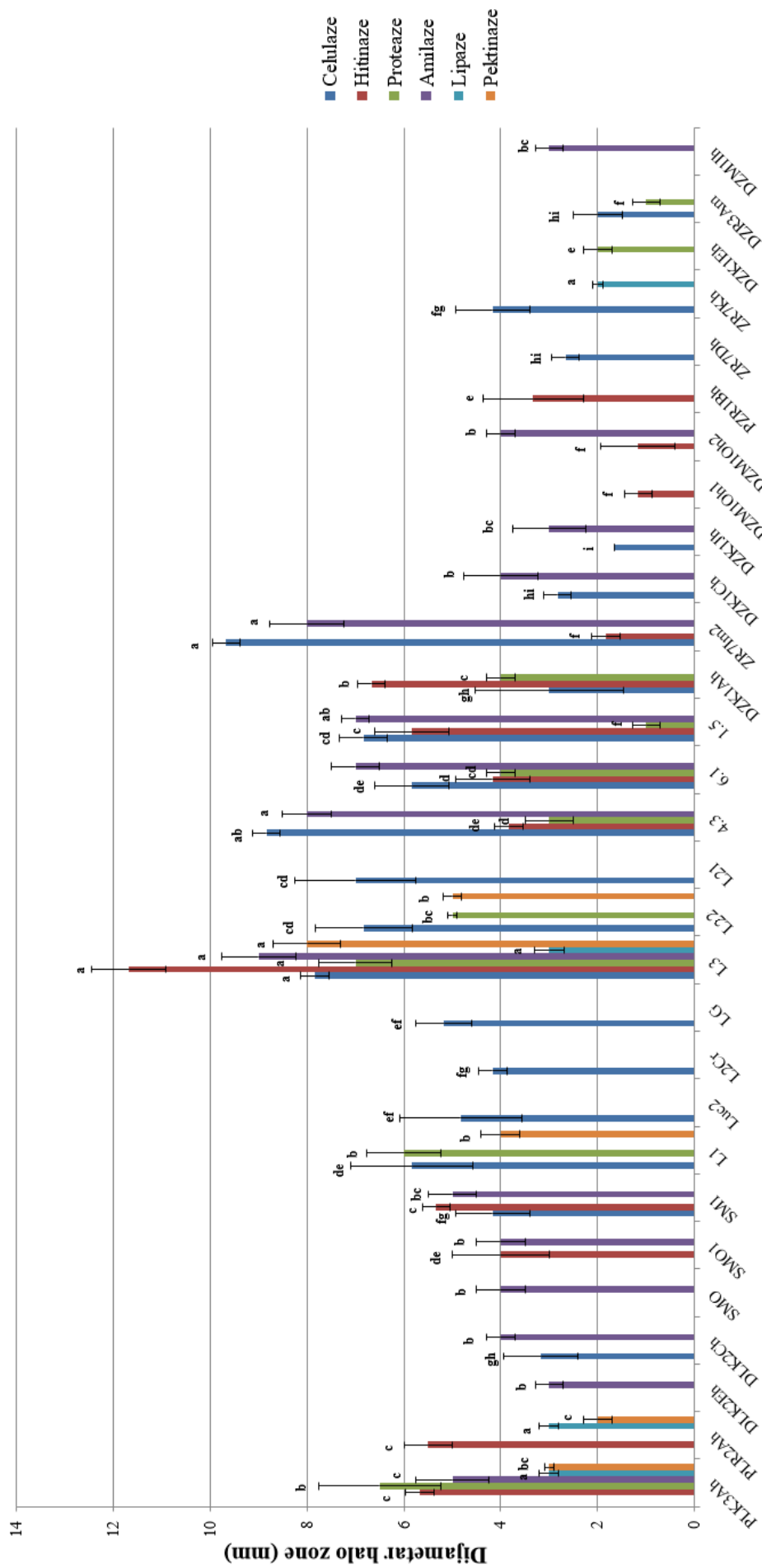
Ukupno 29 izolata pokazalo je mogućnost produkcije hidrolitičkih enzima kao što su celulaze, hitinaze, proteaze, amilaze, lipaze ili pektinaze, od čega 17 izolata iz korenskih kvržica lucerke i 12 izolata iz žutog zvezdana. Kao i u slučaju testiranja antifungalnog efekta, izolati koji su preliminarno okarakterisani kao rizobijalni nisu pokazali sposobnost produkcije hidrolitičkih enzima.

Od svih izolata sa sposobnošću produkcije hidrolitičkih enzima, izolat L3 izdvojio se kao najznačajniji za produkciju svih navedenih enzima. Izolat L3 formirao je halo zonu veličine $11.67 \pm 0,77$ mm na podlozi sa dodatkom hitina, što je bilo značajno više od ostalih izolata. Takođe, halo zone koje je ovaj izolat formirao na podlogama sa skrobom ($9 \pm 0,76$ mm) i pektinom ($8 \pm 0,69$ mm) bile su značajno veće u poređenju sa ostalim izolatima. Kao najznačajniji za produkciju lipaza od izolata iz lucerke izvojili su se i izolati PLK3Ah i PLR2Ah (sa halo zonama od $3 \pm 0,21$ mm), dok su se izolati 4.3 i 1.5 izdvojili za produkciju celulaza i amilaza ($8,33 \pm 0,29$ mm i $7 \pm 0,28$ mm, redom) (Slika 18).



Slika 18. Produkcija amilaza na medijumu sa skrobom (L3: gore, 4.3: desno, 1.5: dole i 6.1: levo) (foto M. Knežević)

Od 12 izolata iz žutog zvezdana, ZR7Im2 je pokazao najznačajniju produkciju celulaza ($9.67 \pm 0,28$ mm) i amilaza ($8 \pm 0,76$ mm), dok se izolat ZR7Kh izdvojio po produkciji lipaza ($2 \pm 0,1$ mm) (Slika 19). Generalno, izolati iz lucerke pokazali su bolji potencijal za produkciju hidrolitičkih enzima, u poređenju sa izolatima iz korenskih kvržica žutog zvezdana. Takođe, u slučaju izolata iz lucerke, primećeno je da veći broj izolata (64%) ima sposobnost istovremene produkcije više hidrolitičkih enzima, u poređenju sa izolatima iz žutog zvezdana (58%).



a-g: Vrednosti za svaki pojedinačni enzim označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$).

Slika 19. Sposobnost izolata za produkciju hidrolitičkih enzima

4.6. Testiranje efikasnosti azotofiksacije rizobijalnih izolata

Od 72 izolata koji su u ovom istraživanju preliminarno okarakterisani kao rizobijalni, njih 29 pokazalo je sposobnost nodulacije lucerke ili žutog zvezdana. Devet izolata poreklom iz kvržica lucerke imalo je sposobnost nodulacije ove biljne vrste, dok je 20 izolata iz kvržica žutog zvezdana nodulisalo biljke žutog zvezdana u epruvetama. Efikasnost izolata u fiksaciji azota praćena je preko parametara procenta azota u nadzemnom delu biljke, suve mase nadzemnog dela biljke, kao i visine biljaka. Takođe, praćena je i dužina korena biljaka.

U pogledu visine nadzemnog dela biljaka, inokulacija biljaka lucerke izolatima 10-2BM i DLM1Bm dala je najveće visine biljaka ($17,91\text{cm}\pm 0,39$ i $17,29\text{cm}\pm 1,10$ redom), sa vrednostima koje se nisu statistički razlikovale od kontrole sa azotom ($17\text{cm}\pm 0,11$) (Tabela 8). Visina biljaka tretiranih izolatima GPD2 bila je jednaka kontroli bez inokulacije. Biljke inokulisane sojevima 10-2BM i DLM1Bm bile su tamno zelene boje, u odnosu na kontrolne biljke koje su bile zeleno-žute boje (Slika 16). Vrednosti za ostale izolate kretale su se u rasponu vrednosti između kontrole bez inokulacije i kontrole sa azotom. Na dužinu korena inokulisanih biljaka lucerke, najznačajniji efekat imali su izolati GPD2 i 2-1, koji se nisu razlikovali od kontrole sa azotom.

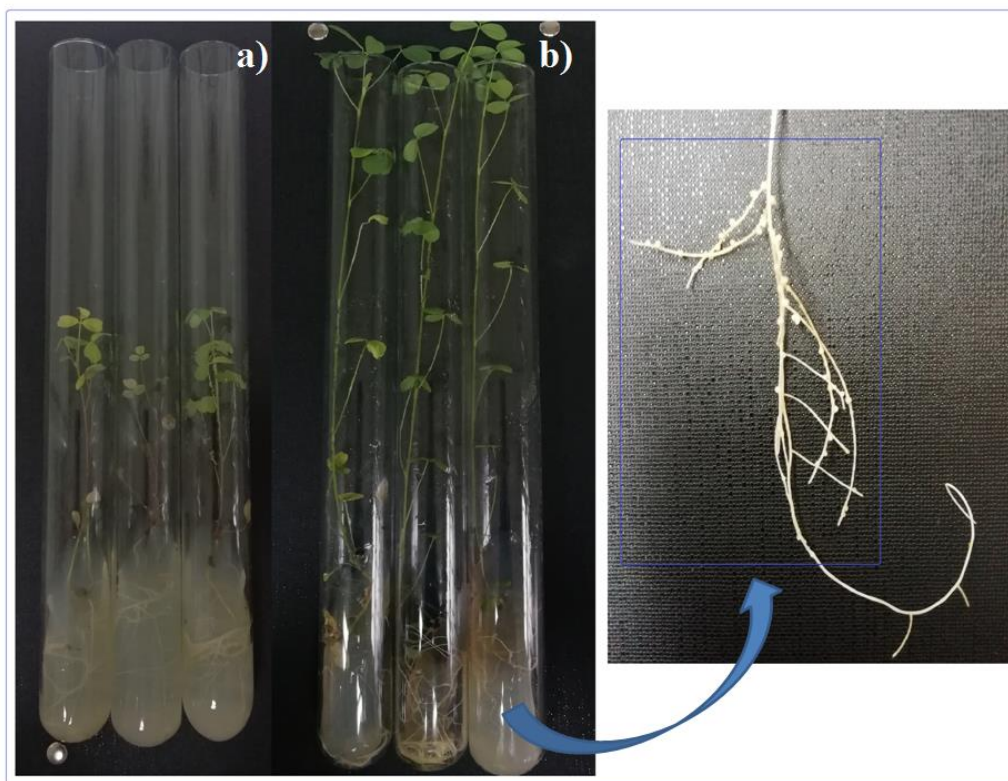
Tabela 8. Parametri azotofiksacije rizobijalnih izolata iz lucerke (*M. sativa*)

Izolat	Visina biljke (cm)	Dužina korena (cm)	SDW (mg)	N (%)
GNOV4	$14,12\pm 0,57^{\text{de}}$	$12,43\pm 0,97^{\text{cdef}}$	$15,75\pm 0,24^{\text{abc}}$	$2,93\pm 0,18^{\text{bc}}$
GPD2	$10,02\pm 2,69^{\text{f}}$	$17,02\pm 1,83^{\text{a}}$	$10,12\pm 0,12^{\text{de}}$	$3,44\pm 0,15^{\text{a}}$
10-2BM	$17,91\pm 0,39^{\text{a}}$	$10,51\pm 0,50^{\text{ef}}$	$15,38\pm 3,24^{\text{abc}}$	$2,12\pm 0,23^{\text{f}}$
GV2-1	$14,77\pm 0,63^{\text{cd}}$	$13,66\pm 0,66^{\text{bcd}}$	$15,96\pm 1,94^{\text{ab}}$	$2,53\pm 0,12^{\text{de}}$
2.24	$13,09\pm 1,45^{\text{de}}$	$14,22\pm 0,78^{\text{bc}}$	$10,43\pm 1,16^{\text{de}}$	$2,22\pm 0,08^{\text{ef}}$
2-1	$15,24\pm 1,17^{\text{bcd}}$	$15,74\pm 0,76^{\text{ab}}$	$12,78\pm 0,79^{\text{bcd}}$	$2,09\pm 0,10^{\text{f}}$
2.3R	$14,47\pm 0,57^{\text{de}}$	$13,25\pm 2,25^{\text{cd}}$	$12,55\pm 0,77^{\text{cd}}$	$2,71\pm 0,56^{\text{cd}}$
10-2N	$12,04\pm 1,96^{\text{ef}}$	$12,61\pm 0,91^{\text{cde}}$	$9,78\pm 0,22^{\text{de}}$	$2,66\pm 0,14^{\text{cd}}$
DLM1Bm	$17,30\pm 1,10^{\text{ab}}$	$11,43\pm 2,33^{\text{def}}$	$16,49\pm 0,51^{\text{a}}$	$3,00\pm 0,5^{\text{bc}}$
Ø	$17,00\pm 0,11^{\text{abc}}$	$17,87\pm 1,33^{\text{a}}$	$17,11\pm 1,85^{\text{a}}$	$3,09\pm 0,58^{\text{b}}$
Ø	$10,00\pm 2,00^{\text{f}}$	$10,05\pm 0,14^{\text{f}}$	$9,17\pm 3,17^{\text{e}}$	$1,62\pm 0,11^{\text{g}}$

a-g: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range test ($P\leq 0,05$); SDW: suva nadzemna masa biljaka

Suva masa nadzemnog dela biljaka smatra se najvažnijim parametrom efikasnosti azotofiksacije rizobijalnih sojeva (Hungria & Bohrer, 2000). Iako se rizobijalni izolati mogu okarakterisati kao neefikasni za azotofiksaciju (kriterijum po Pochon, 1954), inokulacija izolatima GNOV4, GV2-1, 10-2BM i DLM1Bm indukovala je vrednosti SDW koje se nisu razlikovale od kontrole sa azotom (Tabela 8). Neinokulisane biljke (Ø) imale su najmanji prinos suve nadzemne mase, dok su se vrednosti za ostale izolate kretale u opsegu od $9,77\pm 0,22$ mg (10-2N) do $12,78\pm 0,79$ mg (2-1).

Inokulacija svim izolatima koji su okarakterisani kao potencijalno rizobijalni imala je pozitivan uticaj na povećanje procenta azota u biljkama lucerke, u odnosu na neinokulisanu kontrolu. Od izolata iz lucerke, izolat GPD2 indukovao je najveći procenat azota ($3,44\%\pm 0,15$) u nadzemnom delu biljke, koji je bio 2 puta veći u odnosu na neinokulisanu kontrolu (Tabela 8). Izolati GNOV4 i DLM1Bm nisu se razlikovali u pogledu sadržaja azota u biljkama lucerke od kontrole sa azotom, što takođe ukazuje na njihov potencijal azotofiksacije. Na korenima biljaka inokulisanim sojevima GPD2, GNOV4 i DLM1Bm zabeleženo je prisustvo aktivnih korenskih kvržica (krupnije kvržice roze boje) (Slika 20). Vrednosti sadržaja azota za druge izolate kretale su se između vrednosti kontrole bez inokulacije (Ø) i kontrole sa azotom (ØN).



Slika 20. Levo: neinokulisane biljke (a) i biljke inokulisane izolatom DLM1Bm (b), desno: formirane korenske kvrčice lucerke (*M. sativa*) (foto M. Knežević)

Visina biljaka žutog zvezdana inokuliranih sa svim izolatima bila je veća u odnosu na kontrolu bez inokulacije ($6,21 \pm 0,34$ cm). Najveća vrednost za visinu biljaka zabeležena je u slučaju kontrole sa azotom ($19,81 \pm 1,60$ cm). Kao izolati koji su imali najveći uticaj na ovaj parametar izdvojili su izolati DZR2Dm, DZR2Cm, DZM1Mm i DZM1Lm, sa visinom biljaka većom od 15 cm. Dužina korena kretala se od $9,07 \pm 1,39$ cm (izolat DZM1Jm) do $17,41 \pm 1,49$ cm (izolat DZR2Dm).

Suva nadzemna masa biljaka inokuliranih svim izolatima bila je veća od mase neinokuliranih biljaka, a vrednosti su se kretale od $4,97 \pm 0,39$ mg (\emptyset) do $22,30 \pm 2,35$ mg ($\emptyset N$). Devet izolata dalo je vrednosti suve nadzemne mase koje su bile 2,5 puta veće od neinokulirane kontrole (vrednosti SDW u Tabeli 13 označene zelenim). Inokulacija izolatima DZM1Lm i DZR2Cm indukovala je vrednosti suve nadzemne mase koje su bile jednake kontroli sa azotom ($21,30 \pm 2,10$ mg i $19,86 \pm 1,44$ mg, redom).

Inokulacija svim izolatima koji su okarakterisani kao potencijalno rizobijalni imala je pozitivan uticaj na povećanje procenta azota u biljnom materijalu, visinu biljaka, kao i na povećanje suve nadzemne mase biljaka (Tabela 9). Najveći procenat azota dobijen je inokulacijom izolatima PZNDm1 ($4,12 \pm 0,02\%$) i DZR2Dm ($4,01 \pm 0,07$), dok je inokulacija izolatima DZM1Lm, PZR1Em, DZM1Jm, DZM1Mm i DZM1Om dala gotovo iste vrednosti ovog parametra.

Tabela 9. Parametri azotofiksacije rizobijlanih izolata iz žutog zvezdana (*L. corniculatus*)

Isolat	Visina biljke (cm)	Dužina korena (cm)	SDW (mg)	N (%)
DZR2Cm	16,90±0,35 ^b	13,72±1,29 ^{bcd}	19,86±1,44 ^{ab}	3,01±0,14 ^{de}
DZM1Lm	15,23±0,55 ^{bcd}	11,25±0,83 ^{defg}	21,30±2,10 ^a	3,88±0,13 ^b
DZM1Mm	15,42±0,10 ^{bcd}	11,03±1,89 ^{efg}	17,87±0,67 ^{bc}	3,84±0,14 ^{bc}
PZNDm	9,12±0,06 ⁱ	9,55±2,00 ^g	10,21±1,89 ^{gh}	2,76±0,23 ^{defg}
DZM1Om	9,44±0,01 ^{hi}	10,21±0,21 ^g	9,98±0,02 ^{gh}	3,95±0,14 ^b
DZK1Em	10,72±0,20 ^{ghi}	10,36±2,64 ^{fg}	9,78±1,80 ^{gh}	2,44±0,25 ^g
DZM1Cm	10,32±0,13 ^{ghi}	9,45±0,36 ^g	10,14±1,26 ^{gh}	3,07±0,11 ^d
DZM1Hm	11,22±0,71 ^{ghi}	11,49±1,71 ^{defg}	10,39±3,18 ^{gh}	2,62±0,12 ^{fg}
DZM1Nm	12,03±0,03 ^{efg}	10,04±1,47 ^g	11,09±0,90 ^g	3,55±0,30 ^c
DZM1Im	11,79±0,21 ^{fgh}	15,27±1,99 ^{abc}	7,70±0,70 ^h	2,70±0,49 ^{efg}
PZR1Em	16,27±1,26 ^{bc}	15,62±0,63 ^{ab}	16,43±0,88 ^{cd}	3,93±0,21 ^b
DZM1Km	13,97±0,98 ^{def}	10,53±1,29 ^{fg}	12,29±2,35 ^{efg}	2,69±0,11 ^{efg}
DZM1Jm	10,71±0,36 ^{ghi}	9,07±1,39 ^g	14,54±0,46 ^{de}	3,93±0,09 ^b
DZK1Bm	10,23±3,19 ^{ghi}	9,40±0,85 ^g	7,72±0,35 ^h	2,12±0,29 ^h
DZK1Cm	13,74±2,04 ^{def}	12,87±0,65 ^{cdef}	14,08±0,31 ^{def}	2,94±0,27 ^{def}
PZNCm	10,47±0,71 ^{ghi}	11,42±2,58 ^{defg}	11,73±0,25	3,10±0,50 ^d
PZR1Dm	9,93±2,63 ^{ghi}	9,12±0,88 ^g	10,06±0,71 ^{gh}	3,07±0,06 ^d
PZR1Bm	9,93±1,31 ^{ghi}	10,78±0,68 ^{fg}	14,07±2,75 ^{def}	2,79±0,10 ^{defg}
DZR2Dm	17,09±2,09 ^b	17,41±1,49 ^a	17,80±1,60 ^{bc}	4,01±0,07 ^b
PZNDm1	14,12±0,52 ^{cde}	13,55±0,56 ^{bcd}	16,59±1,05 ^{cd}	4,12±0,02 ^b
ØN	19,81±1,60 ^a	14,25±0,25 ^{bc}	22,30±2,35 ^a	5,10±0,13 ^a
Ø	6,21±0,34 ⁱ	9,96±0,10 ^g	4,97±0,39 ⁱ	1,15±0,03 ⁱ

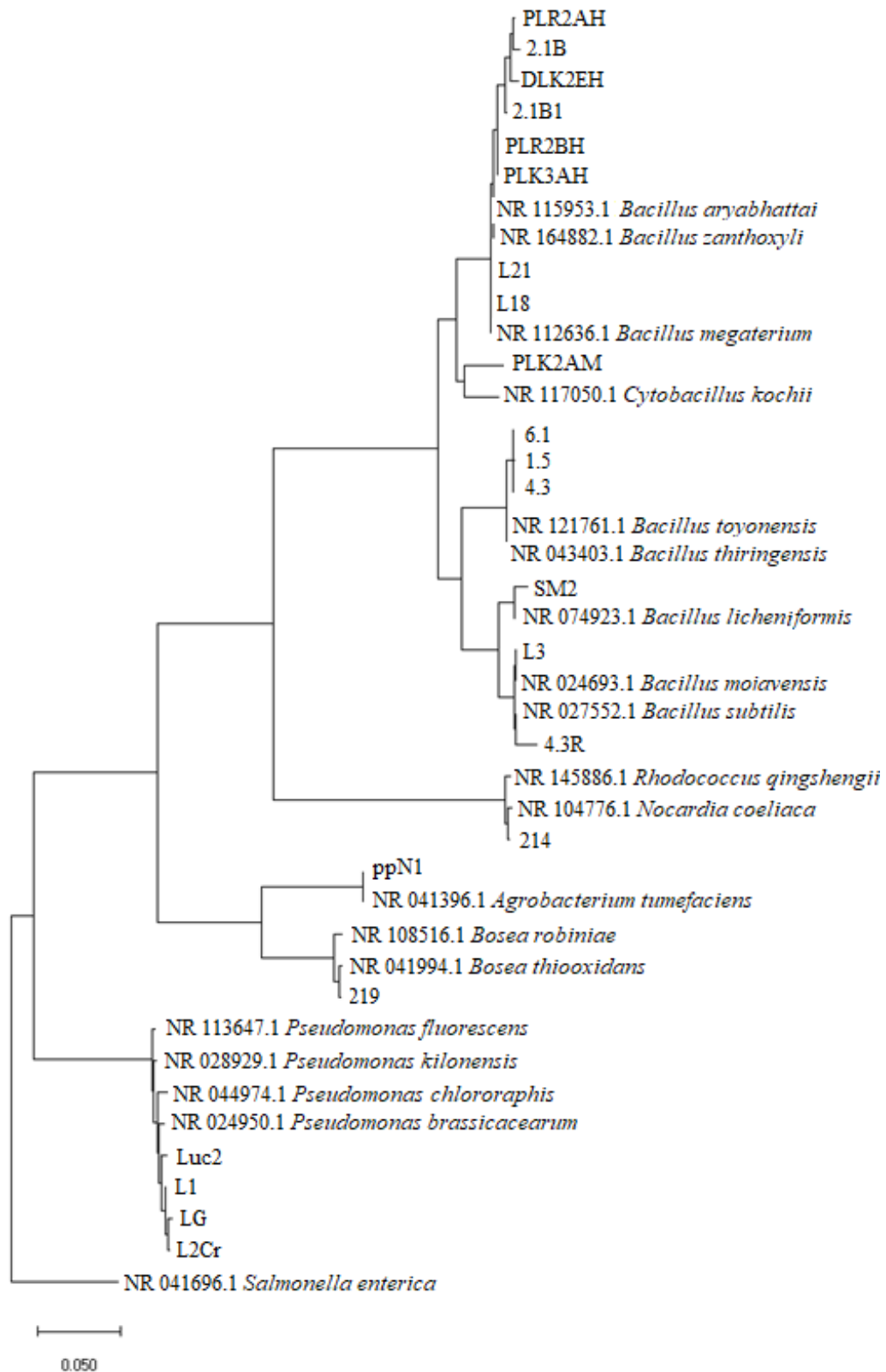
a-g: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$); Vrednosti SDW obeležene zelenim su 2,5 puta veće od kontrole bez inokulacije; SDW: suva nadzemna masa biljaka

4.7. Identifikacija bakterijskih izolata

U ovom istraživanju ukupno 80 izolata iz kvržica lucerke i žutog zvezdana je odabrano za molekularnu identifikaciju. Od 80 determinisanih izolata, 36 (24 nerizobijalna i 12 rizobijalnih) bili su izolati iz korenskih kvržica lucerke i 44 (17 nerizobijalnih i 27 rizobijalnih) iz žutog zvezdana. Izolati su odabrani na osnovu svojih PGP osobina, antifungalnog potencijala ili efikasnosti azotofiksacije. Takođe, u molekularnu determinaciju uključeni su i izolati koji pripadaju kolekciji Instituta za zemljište, a izolovani su ranije iz kvržica lucerke ili žutog zvezdana (izolati L4, L5, 1MNKsv, 2MNK, 1MNKnod, 613, 617, 607, 611, 615, 6291, 602v, 616, 604 i 608). Izolati su determinisani pomoću BLASTn analize obrađenih parcijalnih sekvenci gena za 16S rRNK. Za pojedine izolate koji na osnovu sekvenci gena za 16S rRNK nisu mogli biti determinisani do nivoa vrste urađena je i analiza drugih gena (za *Bacillus* spp. *tuf* gena, za rizobijalne izolate *recA* gena, a za *Pseudomonas* spp. i *Serratia* spp. *gyrB* gena). Tabela prikaz svih determinisanih izolata dat je u Prilogu 11.

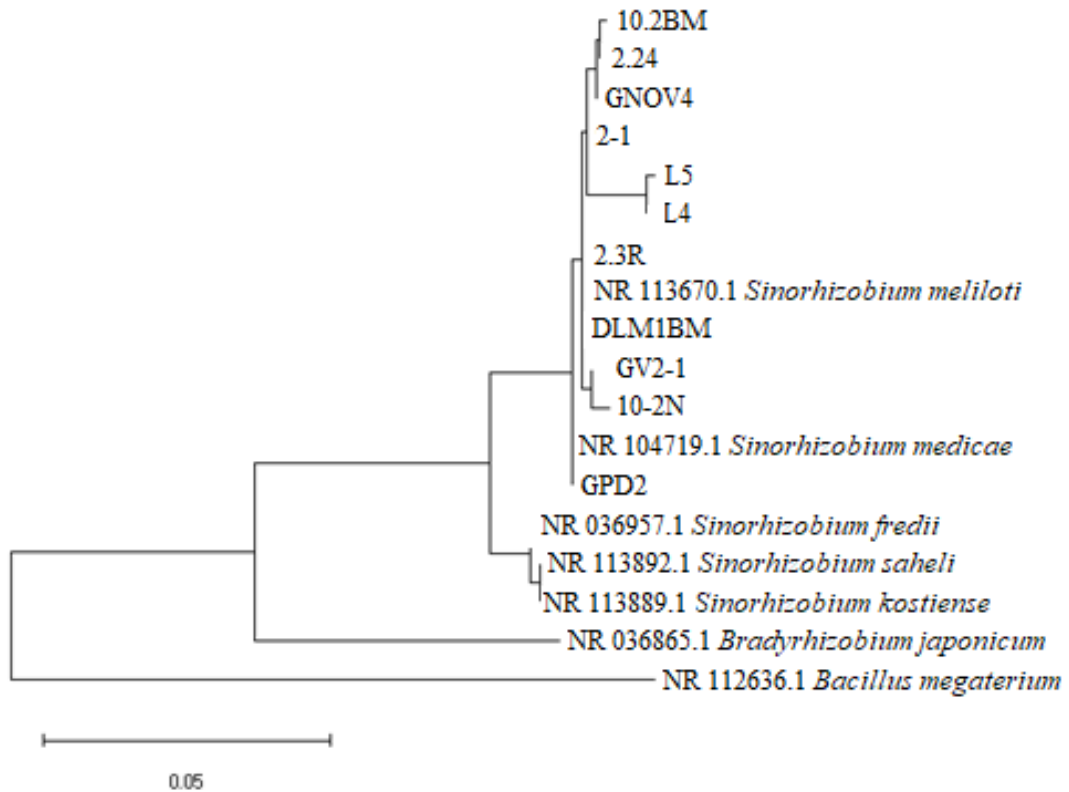
Nerizobijalni izolati poreklom iz kvržica lucerke većinom su bili okarakterisani kao *Bacillus* spp. (Slika 21). Osim ovih vrsta, izolati su determinisani i kao pripadnici vrsta rodova *Serratia*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Bosea* i *Agrobacterium* (Prilog 11). Analiza sekvenci *gyrB* gena za vrste roda *Serratia* (ZR7Im2 i ZR7Gm) omogućila je njihovu determinaciju do nivoa vrste *Serratia plymuthica*.

Analiza sekvenci *gyrB* gena za vrste roda *Pseudomonas* ukazala je na sličnost sa vrstom *Pseudomonas brassicacearum*. Međutim, nizak procenat sličnosti ukazao je na potrebu dodatne analize drugih gena u slučaju *Pseudomonas* spp.



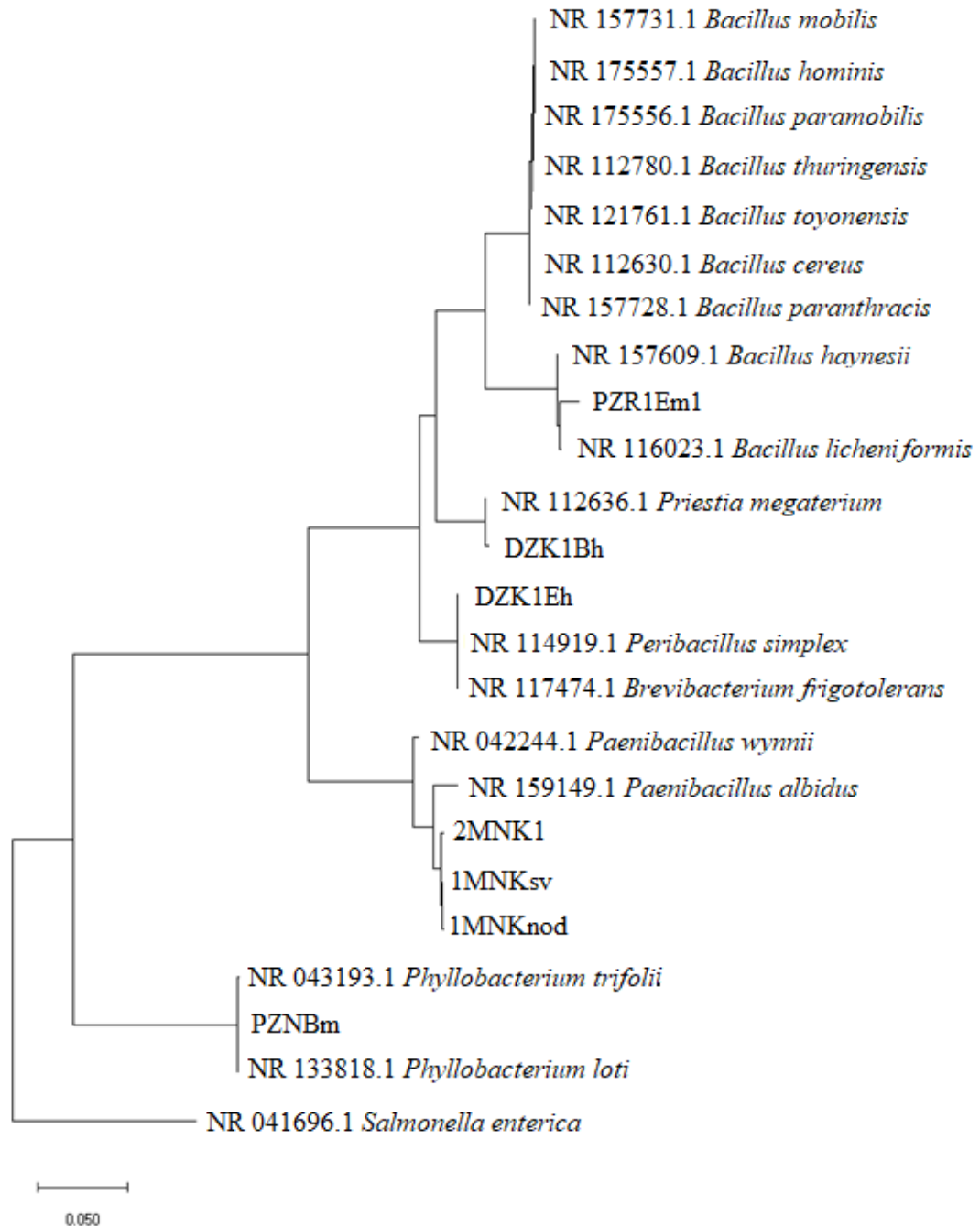
Slika 21. „Neighbour-joining“ filogenetsko stablo konstruisano na osnovu parcijalnih sekvenci gena za 16S rRNK. Osamnaest uporednih (*Bacillus* spp., *Rhodococcus* spp., *Nocardia* spp., *Boreia* spp. i *Pseudomonas* spp.) sojeva su preuzeti iz NCBI baze. *Salmonella enterica* je korišćena za ukorenjavanje stabla.

Rizobijalni izolati iz lucerke okarakterisani su kao pripadnici roda *Sinorhizobium* (*Ensifer*) (Slika 22). U korenskim kvržicama lucerke detektovano je i prisustvo jednog izolata okarakterisanog kao *Mesorhizobium* sp. (Prilog 11). Dodatna analiza sekvenci *recA* gena omogućila je bolju determinaciju pojedinih *Sinorhizobium* spp. izolata do nivoa vrste.



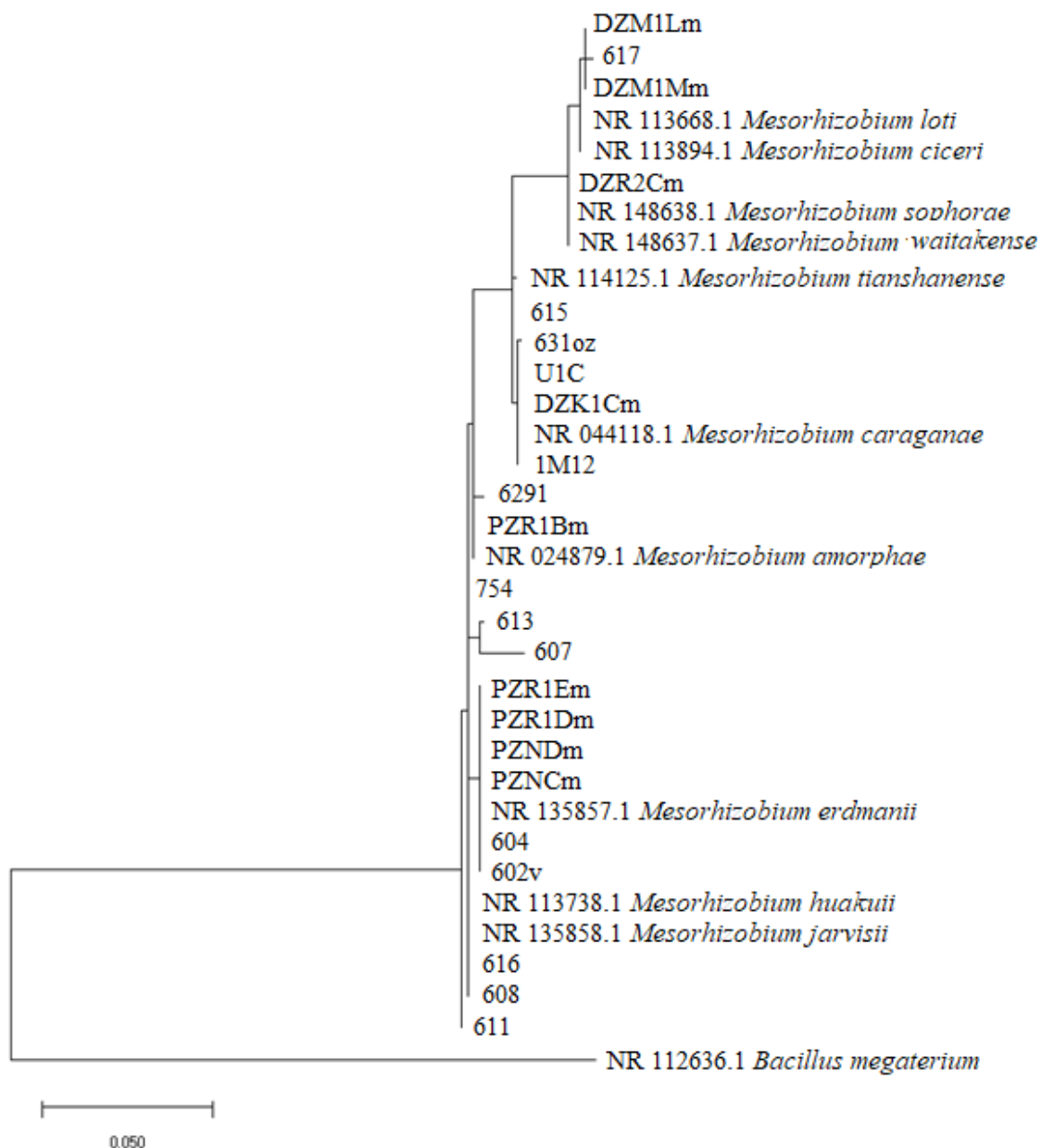
Slika 22. „Neighbour-joining“ filogenetsko stablo konstruisano na osnovu parcijalnih sekvenci gena za 16S rRNK. Pet uporednih *Sinorhizobium* spp. sojeva, kao i *Bradyrhizobium japonicum* su preuzeti iz NCBI baze. *B. megaterium* je korišćen za ukorenjavanje stabla.

Slično kao u slučaju izolata iz lucerke, nerizobijalni izolati iz žutog zvezdana identifikovani su pretežno kao *Bacillus* spp. (Slika 23). Takođe, detektovano je i prisustvo vrsta rodova *Paenibacillus* i *Pseudomonas* (Prilog 11). Analiza sekvenci *tuf* gena bila je značajna za precizniju determinaciju vrsta roda *Bacillus*. U odnosu na nerizobijalne izolate iz lucerke, determinisani izolati iz žutog zvezdana pokazali su manju raznovrsnost.



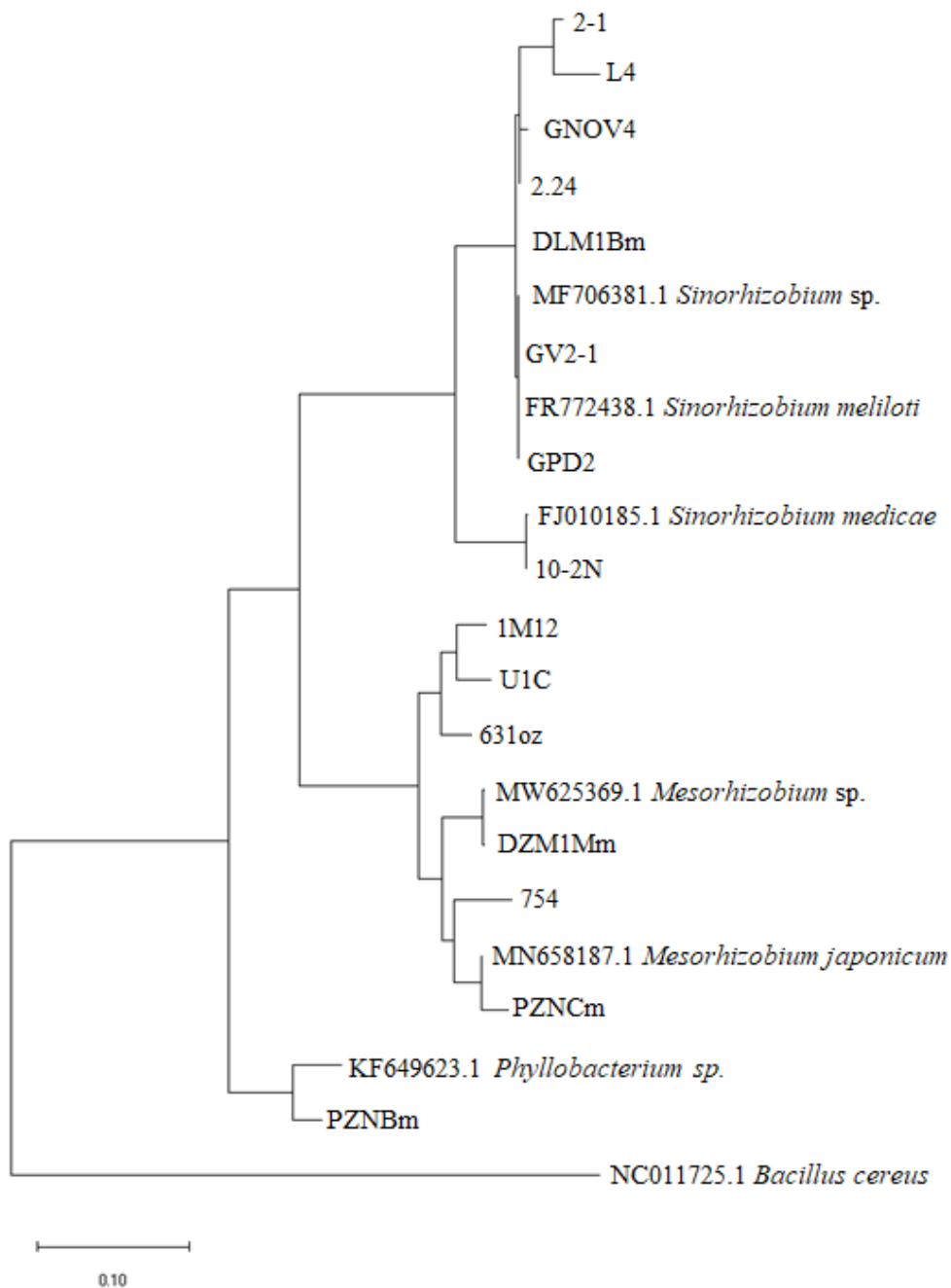
Slika 23. „Neighbour-joining“ filogenetsko stablo konstruisano na osnovu parcijalnih sekvenci gena za 16S rRNK. Šesnaest uporednih sojeva su preuzeti iz NCBI baze. *Salmonella enterica* je korišćena za ukorenjavanje stabla.

Svi rizobijalni izolati poreklom iz korenskih kvrčica žutog zvezdana determinisani su kao *Mesorhizobium* spp. (Slika 24). Na osnovu sekvenci gena za 16S rRNK izolati su determinisani pretežno do nivoa roda.



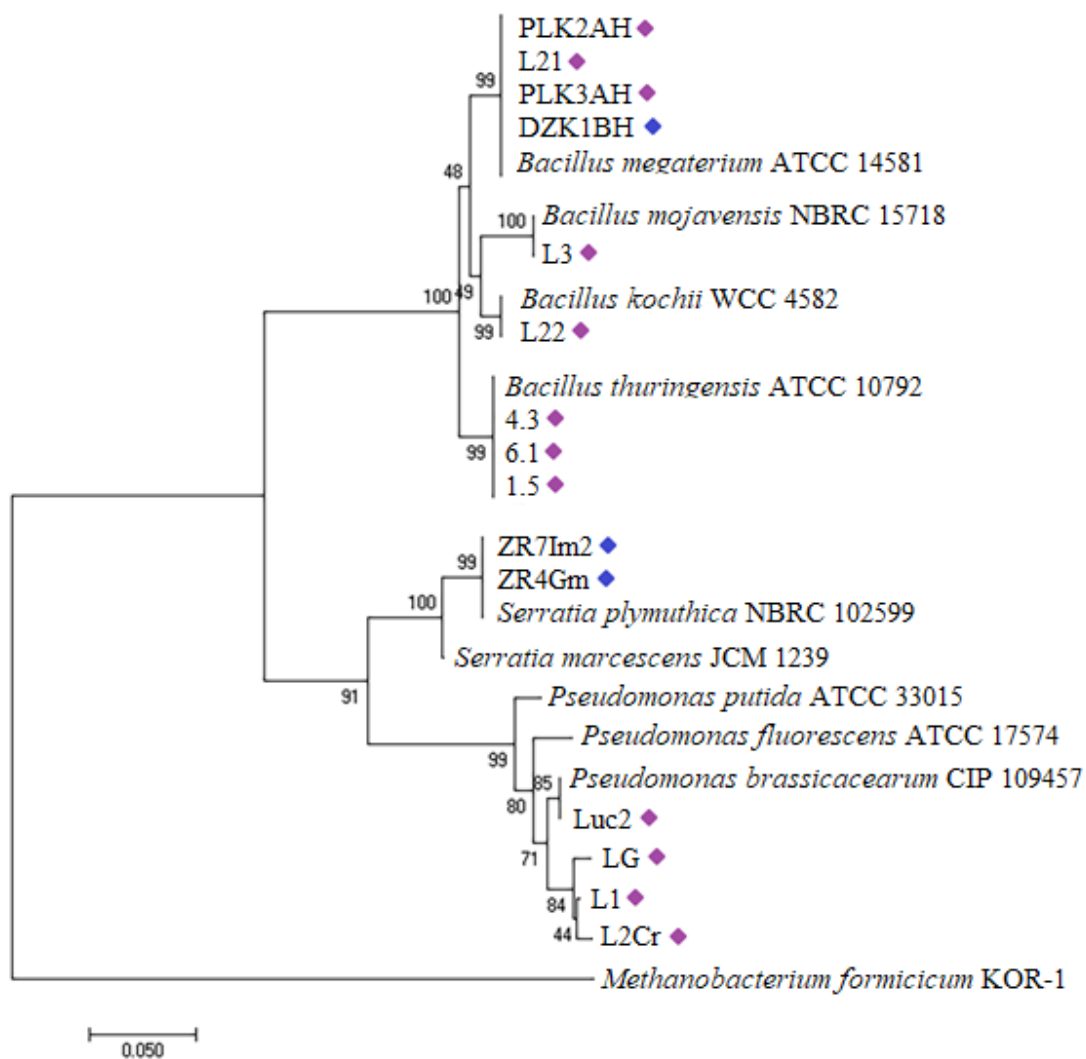
Slika 24. „Neighbour-joining“ filogenetsko stablo konstruisano na osnovu parcijalnih sekvenci gena za 16S rRNK. Deset uporednih *Mesorhizobium* spp. sojeva su preuzeti iz NCBI baze. *B. megaterium* je korišćen za ukorenjavanje stabla.

Dodatnom analizom sekvenci *recA* gena za vrste roda *Mesorhizobium* nije bilo moguće sa sigurnošću determinisati pojedine izolate do nivoa vrste (Slika 25).



Slika 25. „Neighbour-joining“ filogenetsko stablo konstruisano na osnovu parcijalnih sekvenci *recA* gena. Šest uporednih sojeva su preuzeti iz NCBI baze. *B. cereus* je korišćen za ukorenjavanje stabla.

Na osnovu sekvenci za 16S rRNK za sve izolate i sekvenci *tuf* (za *Bacillus* spp.) ili *gyrB* gena (za *Pseudomonas* spp. i *Serratia* spp.) konstruisano je konkatemerno filogenetsko stablo koje je dalo bolju rezoluciju za nerizobijalne izolate od značaja (poreklom iz lucerke i žutog zvezdana) (Slika 26). Vrste roda *Bacillus* bile su podjednako zastupljene u obe biljne vrste, dok su *Serratia* spp. bili karakteristični za žuti zvezdan, a *Pseudomonas* spp. za korenske kvržice lucerke.



Slika 26. Konkatemerno „Neighbour-joining“ filogenetsko stablo konstruisano na osnovu parcijalnih sekvenci gena za 16S rRNK i parcijalnih sekvenci *tuf* gena za izolate *Bacillus* spp. i *gyrB* za *Pseudomonas* spp. i *Serratia* spp. Četiri uporedna *Bacillus* spp., tri *Pseudomonas* spp. i dva *Serratia* spp. soja su preuzeti iz NCBI baze. *Methanobacterium formicicum* je korišćen za ukorenjavanje stabla. Plavim oznakama su obeleženi izolati poreklom iz kvrčica žutog zvezdana, a ljubičastim iz lucerke (preuzeto i modifikovano iz Knežević et al., 2021a).

4.8. Uticaj bakterijske inokulacije na rast i nutritivni sastav žutog zvezdana u kiselom zemljištu (ogled u saksijama I)

Analiza fizičko-hemijskih parametara zemljišta koje je korišćeno za postavljanje ogleda pokazala je da zemljište ima kiselu reakciju sa pH vrednošću 5,4 (Tabela 10). Procenat organske materije u zemljištu bio je 3,77%, zemljište je bilo bogato P i K, dok u uzorku zemljišta nisu detektovani karbonati. Odnos Ca:Mg (3,3), u poređenju sa vrednostima datim od strane Edwards (2018), pokazalo je da je sadržaj izmenjivog Ca u ispitivanom zemljištu bio nizak, u odnosu na sadržaj izmenjivog Mg. Na osnovu analize granulometrijskog sastava teksturna klasa zemljišta je bila LG (laka glina) (Hadžić et al., 1997).

Tabela 10. Fizičko-hemijski parametri zemljišta korišćenog za ogled

Fizičko-hemijski parametar	
pH	5,4
Sadržaj organske materije SOM (%)	3,77
N (%)	0,20
CaCO ₃ (%)	-
P ₂ O ₅ (mg 100 g ⁻¹)	18,66
K ₂ O (mg 100 g ⁻¹)	51,91
Ca (mg 100 g ⁻¹)	387
Mg (mg 100 g ⁻¹)	71
Krupan pesak (>0,2 mm) %	2
Sitan pesak (0,2-0,02mm) %	35,5
Prah (0,02-0,002 mm) %	24,2
Glina (<0,002mm) %	38,3
Sitan pesak + prah (>0,02 mm) %	62,5

Koncentracije ukupnih i pristupačnih mikroelemenata u zemljištu korišćenom za postavljanje eksperimenta prikazane su u Tabeli 11. U ispitivanom uzorku zemljišta, ukupne koncentracije As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn bile su ispod maksimalnih dozvoljenih koncentracija (MDK) prema Službenom glasniku Republike Srbije (1994), kao i Mn prema Schulin et al., (2010). Ukupna koncentracija Co je bila nešto iznad MDK, prema Službenom glasniku Republike Srbije (2019). Rezultati su pokazali da su Fe i Mn najzastupljeniji elementi u ispitivanom zemljištu. Prema Barrett et al. (2017), koncentracija dostupnog (DTPA ekstrakcija) Fe u ispitivanom zemljištu je bila veoma visoka. Koncentracija Mn je bila srednja, Zn niska, a sadržaj Cu je bio visok.

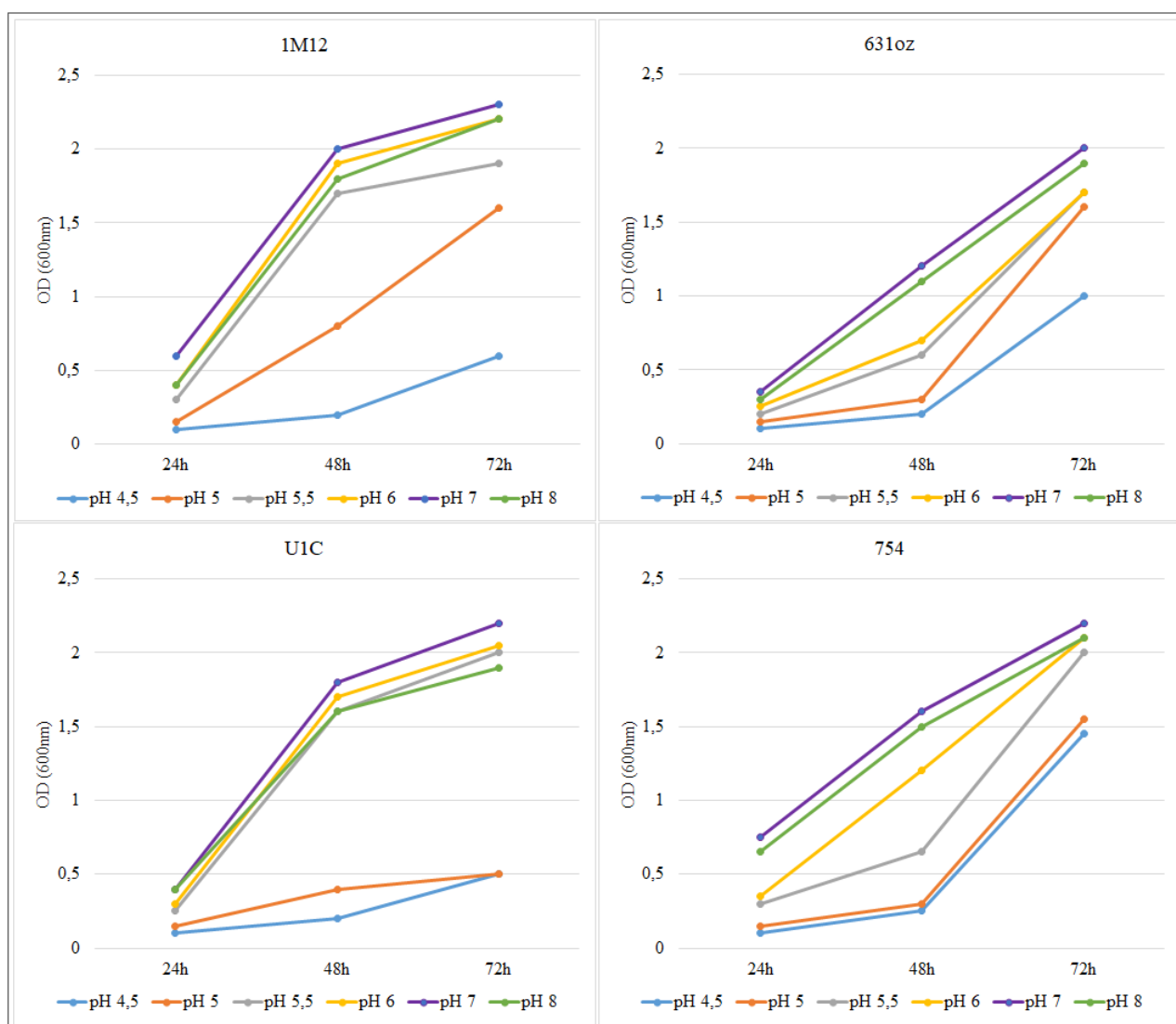
Tabela 11. Koncentracija ukupnih i pristupačnih mikroelemenata u zemljištu

Mikroelementi (mg kg ⁻¹)	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Ukupni mikroelementi	4,47	0,30	12,97	43,28	17,43		639,91	38,32	26,51	72,65
Pristupačni mikroelementi	0,13	0,06	0,11	<0,01	3,04	91,55	22,49	1,27	2,96	1,49
MDK* (mg kg ⁻¹)	25	3	-	100	100	-	-	50	100	300

*MDK: maksimalne dozvoljene koncentracije mikroelemenata u zemljištu prema Službenom glasniku Republike Srbije (1994).

Četiri izolata (1M12, U1C, 631oz i 754) koja su prema ranijim istraživanjima Instituta za zemljište okarakterisana kao efikasna u azotofiksaciji, dok su u ovom radu pokazala poželjne PGP karakteristike i toleranciju na uslove niske pH, su odabrana za ogled u saksijama radi utvrđivanja njihovog uticaja na poboljšanje rasta žutog zvezdana. Takođe, u testu tolerancije na niske pH vrednosti u tečnom medijumu koji je urađen radi potvrde testa na čvrstom medijumu potvrđena je

njihova sposobnost rasta na pH 4,5 i 5. Vrednosti OD na najnižim testiranim pH rasle su kroz 24, 48 i 72 h za sva 4 izolata.



Slika 27. Rast odabranih *Mesorhizobium* sp. izolata u tečnom medijumu na različitim pH vrednostima

Svi odabrani izolati identifikovani su kao vrste roda *Mesorhizobium* na osnovu sekvenci gena za 16S rRNK. Dodatna analiza sekvenci *recA* gena potvrdila je determinaciju na osnovu sekvenci za 16S rRNK i sva 4 izolata okarakterisana su kao *Mesorhizobium* sp. (Prilog 11).

Rezultati za suhu masu nadzemnog dela (SDW) biljaka žutog zvezdana za prvu (dva otkosa) i drugu godinu (tri otkosa) ogleđa prikazani su u Tabeli 12. Svi primenjeni bakterijski tretmani povećali su SDW biljaka žutog zvezdana u obe sezone, osim tretmana sa *Mesorhizobium* sp. 1M12. U prvoj godini ogleđa, zbir SDW dva otkosa bio je najveći za biljke tretirane *Mesorhizobium* sp. 754 (6,11 g saksija⁻¹). Nije bilo značajne razlike između ovog tretmana i tretmana sa *Mesorhizobium* sp. U1C, *Mesorhizobium* sp. 631oz i kontrole sa azotom (ØN). Najniže vrednosti SDW zabeležene su za kontrolni tretman Ø (1,18 g saksija⁻¹). Tokom druge godine ogleđa, ukupna SDW biljaka u svim tretmanima bila je veća u poređenju sa prvom godinom ogleđa. Vrednosti SDW u biljkama tretiranim azotom (ØN) i svim bakterijskim tretmanima (osim tretmana sa *Mesorhizobium* sp. 1M12) bile su veće od kontrole. Tretmani sa *Mesorhizobium* sp. 754 i *Mesorhizobium* sp. U1C dali su najviše vrednosti SDW biljaka tokom obe godine praćenja ogleđa. Vrednosti SDW biljaka tretiranih sa *Mesorhizobium* sp. 1M12 bile su slične vrednostima dobijenim u netretiranim kontrolnim biljkama (Ø).

Tabela 12. Suva nadzemna masa (SDW) biljaka žutog zvezdana (*L. corniculatus*) inokuliranih različitim sojevima *Mesorhizobium* sp.

Tretman		Suva nadzemna masa (g saksiji ⁻¹)			
		Otkos			Suma
		1	2	3	
Prva godina ogleđa	<i>Mesorhizobium</i> sp. 1M12	1,35±0,28 ^{bc}	3,55±0,64 ^{ab}		4,90 ^{bc}
	<i>Mesorhizobium</i> sp. U1C	1,58±0,12 ^b	3,77±0,11 ^a		5,35 ^{ab}
	<i>Mesorhizobium</i> sp. 631oz	1,42±0,17 ^{bc}	3,79±0,51 ^a		5,21 ^{ab}
	<i>Mesorhizobium</i> sp. 754	1,97±0,16 ^a	4,14±0,38 ^a		6,11 ^a
	Ø	1,18±0,12 ^c	2,88±0,38 ^b		4,06 ^c
	ØN	1,52±0,04 ^b	4,34±0,56 ^a		5,61 ^{ab}
Druga godina ogleđa	<i>Mesorhizobium</i> sp. 1M12	2,00±0,2 ^{bc}	1,74±0,13 ^b	3,04±0,16 ^b	6,78 ^b
	<i>Mesorhizobium</i> sp. U1C	3,35±0,24 ^a	3,77±0,27 ^a	4,87±0,28 ^a	11,99 ^a
	<i>Mesorhizobium</i> sp. 631oz	2,33±0,91 ^b	4,01±0,73 ^a	4,37±0,48 ^a	10,71 ^a
	<i>Mesorhizobium</i> sp. 754	2,30±0,64 ^b	3,97±0,63 ^a	4,92±0,75 ^a	11,18 ^a
	Ø	1,24±0,1 ^c	1,93±0,31 ^b	2,83±0,26 ^b	6,00 ^b
	ØN	3,98±0,35 ^a	4,24±0,92 ^a	4,83±1,34 ^a	13,06 ^a

a-c: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$); Ø- kontrola bez inokulacije, ØN-kontrola sa azotom.

Procenat azota u biljnom materijalu je određen za svaki otkos i izračunata je prosečna vrednost za svaki tretman za prvu i drugu godinu ogleđa (Tabela 13). Svi bakterijski tretmani imali su pozitivan uticaj na povećanje procenta azota u biljnom materijalu tokom druge godine praćenja ogleđa, dok su vrednosti za procenat azota u biljkama tretiranim sa *Mesorhizobium* sp. 1M12 i *Mesorhizobium* sp. 754 bile slične vrednostima ovog parametra kod neinokuliranih biljaka. Tokom prve godine ogleđa, inokulacija biljaka sa *Mesorhizobium* sp. 631oz i kontrolni tretman sa azotom (ØN) dali su najveće prosečne vrednosti procenta azota (3,86% i 3,92%, redom). Tokom druge godine praćenja ogleđa, inokulacija sa *Mesorhizobium* sp. 1M12 dala je najveće vrednosti za procenat azota u biljnom materijalu (4,19%), dok je procenat azota u svim ostalim inokuliranim tretmanima bio sličan vrednostima za kontrolu sa azotom (ØN) i veći od neinokulirane kontrole (Ø).

Tabela 13. Procenat azota u biljkama žutog zvezdana (*L. corniculatus*) inokulisanih različitim sojevima *Mesorhizobium* sp.

Tretman	N (%)				
	Otkos			Prosečna vrednost	
	1	2	3		
Prva godina ogleda	<i>Mesorhizobium</i> sp. 1M12	3,36±0,18 ^b	3,78±0,24 ^a	3,57±0,02 ^b	
	<i>Mesorhizobium</i> sp. U1C	3,54±0,26 ^b	3,75±0,03 ^a	3,64±0,19 ^{ab}	
	<i>Mesorhizobium</i> sp. 631oz	3,86±0,05 ^a	3,76±0,20 ^a	3,81±0,10 ^a	
	<i>Mesorhizobium</i> sp. 754	3,40±0,11 ^b	3,64±0,12 ^a	3,52±0,11 ^b	
	Ø	3,61±0,04 ^b	3,52±0,03 ^a	3,56±0,03 ^b	
	ØN	3,92±0,11 ^a	3,76±0,19 ^a	3,84±0,15 ^a	
Druga godina ogleda	<i>Mesorhizobium</i> sp. 1M12	4,83±0,04 ^a	4,00±0,16 ^a	3,76±0,21 ^a	4,19±0,09 ^a
	<i>Mesorhizobium</i> sp. U1C	4,37±0,17 ^{bc}	4,03±0,11 ^a	3,28±0,12 ^b	3,89±0,08 ^b
	<i>Mesorhizobium</i> sp. 631oz	4,02±0,43 ^{cd}	4,02±0,11 ^a	3,39±0,12 ^b	3,81±0,13 ^b
	<i>Mesorhizobium</i> sp. 754	4,51±0,21 ^{ab}	4,03±0,12 ^a	3,39±0,29 ^b	3,98±0,12 ^b
	Ø	3,76±0,03 ^d	3,34±0,02 ^b	3,37±0,04 ^b	3,49±0,01 ^c
	ØN	4,47±0,19 ^{ab}	4,04±0,42 ^a	3,26±0,05 ^b	3,93±0,11 ^b

a-d: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$).

Ukupan azot (mg saksija⁻¹) u biljkama koje su bile inokulisane bakterijskim tretmanima bio je veći u poređenju sa neinokulisanom kontrolom, tokom obe godine praćenja ogleda (Tabela 14). Tokom obe godine ogleda, tretman biljaka sa *Mesorhizobium* sp. 1M12, rezultirao je najmanjim usvajanjem azota, sa vrednostima koje nisu bile veće od neinokulisanih biljaka.

Tabela 14. Usvajanje ukupnog azota u biljkama žutog zvezdana (*L. corniculatus*) inokulisanih različitim sojevima *Mesorhizobium* sp.

Tretman	Ukupan N (mg saksiji ⁻¹)	
	Godina ogleda	
	1	2
<i>Mesorhizobium</i> sp. 1M12	175,43±28,67 ^{bc}	284,58±20,52 ^b
<i>Mesorhizobium</i> sp. U1C	195,18±10,36 ^{ab}	459,78±26,73 ^a
<i>Mesorhizobium</i> sp. 631oz	198,92±30,39 ^{ab}	409,27±89,48 ^a
<i>Mesorhizobium</i> sp. 754	214,95±11,27 ^a	446,47±91,06 ^a
Ø	143,57±17,97 ^c	210,47±6,22 ^b
ØN	224,69±12,77 ^a	510,44±84,82 ^a

a-c: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$).

Bakterijski tretmani su uticali na koncentraciju mikroelemenata u obe sezone eksperimenta, u poređenju sa netretiranom kontrolom (Tabela 15). Efekat na koncentraciju mikroelemenata je zavisio od tretmana i sezone. Vrednosti za koncentraciju **B** (tokom obe godine ogleda) varirale su od 6,94 (*Mesorhizobium* sp. U1C) do 32,42 mg kg⁻¹ (ØN), za **Cu** od 7,69 (*Mesorhizobium* sp. 754) do 10,99 mg kg⁻¹ (ØN), za **Fe** od 95,51 mg kg⁻¹ (*Mesorhizobium* sp. 631oz) do 388,25 mg kg⁻¹ (Ø), za **Mn** od 24,36 (*Mesorhizobium* sp. 1M12) do 46,27 mg kg⁻¹ (ØN), za **Ni** od 1,90 (*Mesorhizobium* sp. 1M12) do 3,77 mg kg⁻¹ (Ø), a za **Zn** od 38,98 (*Mesorhizobium* sp. 1M12) do 50,66 mg kg⁻¹ (*Mesorhizobium* sp. 631oz). Tokom prve godine ogleda, koncentracije svih mikroelemenata u inokulisanim tretmanima bile su uglavnom manje u odnosu na kontrolu. Kontrolni tretman (bez bakterijske inokulacije i dodatka azota) imao je najveću koncentraciju **Cu**, **Fe** i **Mn** (9,96; 388,25 i 36,72 mg kg⁻¹, redom), dok je koncentracija **B** bila najviša u biljkama tretiranim sa *Mesorhizobium* sp. 631oz. Koncentracija **Ni** je bila najveća u neinokulisanim biljkama i kontroli sa azotom (ØN).

Tretman sa *Mesorhizobium* sp. 631oz je pokazao najveće vrednosti za **Zn** u biljnom materijalu tokom prve godine ogleđa.

Tokom druge godine ogleđa, koncentracije **B**, **Cu** i **Ni** su bile smanjene u svim tretmanima sa bakterijskom inokulacijom, dok je koncentracija **Mn** bila povećana u poređenju sa neinokulisanim kontrolom (Tabela 15). U poređenju sa prvom godinom ogleđa, koncentracija **B** bila je povećana u svim tretmanima tokom druge godine (osim u biljkama tretiranim sa *Mesorhizobium* sp. 1M12). Najveća koncentracija **B** zabeležena je za kontrolni tretman. Tokom druge godine ogleđa, koncentracija **Cu** u biljkama tretiranim azotom (ØN) nije pokazala značajnu razliku u odnosu na kontrolu (Ø) i imala je najveće vrednosti. U poređenju sa prvom godinom, koncentracija **Fe** bila je smanjena u svim tretmanima u drugoj godini. Izuzetak je bio tretman sa *Mesorhizobium* sp. U1C, koji je pokazao iste koncentracije **Fe** u obe sezone, sa najvišim vrednostima među tretmanima (169,75 mg kg⁻¹) tokom druge godine ogleđa. Koncentracija **Mn** je bila najveća za ØN. U neinokulisanim biljkama (Ø), kao i u onim tretiranim azotom (ØN), koncentracija **Ni** bila je značajno veća u poređenju sa bakterijskim tretmanima. Među biljkama koje su bile tretirane bakterijskim tretmanima, najveće vrednosti za koncentraciju **Ni** zabeležene su za tretmane *Mesorhizobium* sp. U1C i *Mesorhizobium* sp. 754.

Tabela 15. Koncentracija mikroelemenata u biljkama žutog zvezdana (*L. corniculatus*) inokulisanih različitim sojevima *Mesorhizobium* sp.

Tretman	Mikroelementi (mg kg ⁻¹)					
	Prva godina ogleđa					
	B	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
<i>Mesorhizobium</i> sp. 1M12	13,46±3,16 ^d	8,15±0,24 ^{cd}	196,45±5,69 ^d	30,97±0,8 ^d	2,97±0,20 ^c	40,28±0,23 ^d
<i>Mesorhizobium</i> sp. U1C	6,94±2,44 ^e	8,56±0,21 ^{bc}	169,53±16,60 ^d	33,38±0,73 ^{bc}	3,14±0,06 ^b	40,74±0,68 ^d
<i>Mesorhizobium</i> sp. 631oz	32,93±3,25 ^a	9,15±0,66 ^b	252,32±14,32 ^c	32,22±0,01 ^{cd}	2,76±0,07 ^d	50,15±0,70 ^a
<i>Mesorhizobium</i> sp. 754	24,89±2,53 ^b	7,69±0,27 ^d	272,09±17,93 ^c	33,93±1,29 ^b	3,53±0,01 ^a	42,73±1,41 ^c
Ø	19,85±2,22 ^c	9,96±0,53 ^a	388,25±34,39 ^a	36,72±0,76 ^a	3,70±0,10 ^a	45,72±0,65 ^b
ØN	24,55±1,77 ^b	8,41±0,11 ^{cd}	346,49±2,98 ^b	33,88±0,56 ^b	3,31±0,05 ^b	43,45±0,84 ^c
Druga godina ogleđa						
<i>Mesorhizobium</i> sp. 1M12	8,49±0,29 ^d	8,07±0,51 ^b	96,17±4,83 ^c	24,36±0,20 ^e	1,90±0,11 ^e	38,98±0,3 ^a
<i>Mesorhizobium</i> sp. U1C	21,93±0,80 ^c	8,81±0,30 ^b	169,75±8,69 ^a	31,97±2,88 ^d	2,79±0,12 ^c	50,00±1,57 ^a
<i>Mesorhizobium</i> sp. 631oz	27,24±1,85 ^b	8,43±0,20 ^b	95,51±0,21 ^c	38,11±0,41 ^b	2,35±0,02 ^d	50,66±2,36 ^a
<i>Mesorhizobium</i> sp. 754	27,06±3,85 ^b	8,87±0,49 ^b	111,08±7,84 ^b	35,32±2,29 ^c	2,77±0,13 ^c	49,16±5,58 ^a
Ø	31,14±1,69 ^a	9,99±0,36 ^a	105,20±7,54 ^{bc}	32,45±0,23 ^d	3,77±0,02 ^a	47,41±1,13 ^a
ØN	32,42±2,16 ^a	10,99±1,23 ^a	106,15±2,42 ^{bc}	46,27±0,30 ^a	3,56±0,14 ^b	47,53±1,11 ^a

a-d: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$).

Usvajanje mikroelemenata tokom obe godine ogleđa zavisilo je od tretmana (Tabela 16). Generalno, najveće vrednosti za usvajanje svih mikroelemenata tokom obe godine praćenja ogleđa zabeležene su za biljke tretirane azotom (ØN). U toku prve godine, svi bakterijski tretmani imali su pozitivan uticaj na usvajanje mikroelemenata, sa vrednostima koje nisu bile manje od onih zabeleženih za neinokulisane biljke (osim u slučaju tretmana *Mesorhizobium* sp. 1M12 za usvajanje Fe). Tokom druge godine ogleđa, zabeležen je sličan trend pozitivnog uticaja bakterijskih tretmana na usvajanje mikroelemenata, osim u slučaju tretmana sa *Mesorhizobium* sp. 1M12 na koncentracije B i Ni.

Tabela 16. Usvajanje mikroelemenata kod biljaka žutog zvezdana (*L. corniculatus*) inokuliranih različitim sojevima *Mesorhizobium* sp.

Tretman	Mikroelementi ($\mu\text{g saksija}^{-1}$)					
	Prva godina ogleda					
	B	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
<i>Mesorhizobium</i> sp. 1M12	67,50±24,24 ^{bc}	39,91±5,43 ^a	966,82±174,92 ^d	152,35±27,17 ^c	14,49±1,62 ^c	197,79±32,05 ^b
<i>Mesorhizobium</i> sp. U1C	37,07±12,97 ^c	45,82±1,57 ^a	907,37±95,91 ^d	178,59±5,83 ^{abc}	16,82±0,51 ^{bc}	218,00±6,17 ^{ab}
<i>Mesorhizobium</i> sp. 631oz	172,83±36,52 ^a	47,46±4,04 ^a	1320,24±231,28 ^c	167,92±21,72 ^{bc}	14,35±1,60 ^c	261,10±31,05 ^a
<i>Mesorhizobium</i> sp. 754	151,44±4,78 ^a	46,93±1,76 ^a	1658,02±19,69 ^b	207,03±7,33 ^a	21,60±1,51 ^a	260,77±10,48 ^a
Ø	79,19±1,98 ^b	40,28±7,08 ^a	1552,00±63,01 ^b	148,09±21,26 ^c	14,88±1,47 ^c	183,91±20,23 ^b
ØN	144,56±22,43 ^a	49,34±5,08 ^a	2031,33±173,72 ^a	198,89±21,08 ^{ab}	19,45±2,03 ^{ab}	255,09±27,63 ^a
Druga godina ogleda						
<i>Mesorhizobium</i> sp. 1M12	57,68±6,10 ^d	54,57±0,51 ^c	653,63±79,87 ^d	165,12±10,60 ^c	12,88±0,20 ^d	264,19±17,09 ^b
<i>Mesorhizobium</i> sp. U1C	258,81±12,85 ^{bc}	103,94±5,21 ^b	2008,29±207,91 ^a	376,66±25,46 ^b	32,90±1,62 ^b	590,11±29,79 ^a
<i>Mesorhizobium</i> sp. 631oz	293,10±67,46 ^b	90,18±16,85 ^b	1022,76±199,28 ^c	408,48±81,85 ^b	25,16±5,00 ^{bc}	544,35±118,78 ^a
<i>Mesorhizobium</i> sp. 754	297,69±11,28 ^b	98,53±11,95 ^b	1232,31±129,62 ^{bc}	392,05±43,54 ^b	30,77±3,99 ^{bc}	542,72±34,36 ^a
Ø	187,94±12,44 ^c	60,24±2,17 ^c	634,44±42,50 ^d	195,80±4,70 ^c	22,76±0,62 ^c	286,10±11,33 ^b
ØN	423,63±89,31 ^a	143,65±32,70 ^a	1386,31±277,99 ^b	604,04±119,39 ^a	46,52±9,47 ^a	620,82±124,54 ^a

a-d: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$).

Koncentracija makroelemenata (tokom obe godine praćenja ogleda) varirala je od 14,22 (*Mesorhizobium* sp. 1M12) do 21,09 g kg⁻¹ (ØN) za **Ca**, od 26,55 (*Mesorhizobium* sp. U1C) do 30,53 g kg⁻¹ (*Mesorhizobium* sp. 754), za **K** od 3,63 (*Mesorhizobium* sp. 1M12) do 5,21 g kg⁻¹ (Ø) za **Mg**, i od 3,99 (*Mesorhizobium* sp. U1C) do 5,23 g kg⁻¹ (*Mesorhizobium* sp. 1M12) za **P** (Tabela 17). Slično, kao i u slučaju mikroelemenata, koncentracija makroelemenata zavisila je od tretmana i godine ogleda. U prvoj godini, koncentracije makroelemenata u inokuliranim tretmanima uglavnom se nisu razlikovale od kontrolne. Tretmani sa *Mesorhizobium* sp. U1C i *Mesorhizobium* sp. 754 imali su najveće vrednosti za **Ca** (20,24 i 18,50 g kg⁻¹, redom) u prvoj godini ogleda. Tretmani sa *Mesorhizobium* sp. 631oz i ØN indukovali su vrednosti za koncentraciju **K** značajno veću od ostalih tretmana. Najniže vrednosti za **Mg** i **P** su zabeležene za tretmansa *Mesorhizobium* sp. 1M12 i za neinokulisane biljke (Ø).

Tokom druge godine ogleda u inokuliranim tretmanima u poređenju sa neinokulisanom kontrolom, koncentracije **Ca** i **Mg** su se smanjile, dok je koncentracija **K** bila povećana (Tabela 17). Koncentracije **Ca** i **Mg** bile su značajno veće u ØN i Ø, u odnosu na bakterijske tretmane. Tretmani sa *Mesorhizobium* sp. 631oz i *Mesorhizobium* sp. 754 dali su najveće koncentracije **K** u biljnom materijalu. Tretman sa *Mesorhizobium* sp. 1M12 izazvao je najveću koncentraciju **P** u biljnom materijalu, u poređenju sa drugim tretmanima. Tokom druge godine, koncentracija **K** bila je smanjena u svim tretmanima u odnosu na prvu godinu ogleda. Takođe, koncentracija **Ca** se smanjila u svim bakterijskim tretmanima, a povećala se u Ø i ØN. U tretmanima sa *Mesorhizobium* sp. 1M12 i *Mesorhizobium* sp. U1C, koncentracija **Mg** bila je smanjena u odnosu na prvu godinu ogleda. Koncentracija **P** je bila veća u drugoj godini kod svih primenjenih tretmana.

Tabela 17. Koncentracija makroelemenata u biljakama žutog zvezdana (*L. corniculatus*) inokulisanim različitim sojevima *Mesorhizobium* sp.

Tretman	Makroelementi (g kg ⁻¹)			
	Prva godina ogleda			
	Ca	K	Mg	P
<i>Mesorhizobium</i> sp. 1M12	16,30±1,53 ^c	33,89±1,37 ^c	4,02±0,25 ^b	3,24±0,29 ^c
<i>Mesorhizobium</i> sp. U1C	20,24±1,43 ^a	35,85±0,95 ^{bc}	4,67±0,23 ^a	3,43±0,15 ^{abc}
<i>Mesorhizobium</i> sp. 631oz	18,03±0,21 ^{bc}	38,18±0,78 ^a	4,37±0,06 ^{ab}	3,58±0,05 ^{ab}
<i>Mesorhizobium</i> sp. 754	18,50±0,61 ^{ab}	35,51±0,18 ^{bc}	4,43±0,08 ^{ab}	3,32±0,19 ^{bc}
Ø	17,33±1,41 ^{bc}	34,21±2,23 ^c	4,15±0,39 ^b	3,18±0,12 ^c
ØN	17,95±0,36 ^{bc}	37,67±0,31 ^{ab}	4,31±0,1 ^{ab}	3,64±0,03 ^a
Druga godina ogleda				
<i>Mesorhizobium</i> sp. 1M12	14,22±0,39 ^c	27,47±0,09 ^{bc}	3,63±0,08 ^c	5,23±0,31 ^a
<i>Mesorhizobium</i> sp. U1C	17,92±0,95 ^b	26,55±0,73 ^c	4,63±0,34 ^b	3,99±0,30 ^c
<i>Mesorhizobium</i> sp. 631oz	16,60±0,60 ^b	29,81±0,54 ^a	4,49±0,24 ^b	4,35±0,13 ^{bc}
<i>Mesorhizobium</i> sp. 754	16,89±0,82 ^b	30,53±0,83 ^a	4,46±0,22 ^b	4,45±0,14 ^b
Ø	20,96±0,23 ^a	28,60±0,99 ^b	5,21±0,03 ^a	4,13±0,15 ^{bc}
ØN	21,09±1,90 ^a	27,43±0,43 ^{bc}	4,98±0,46 ^a	4,12±0,19 ^{bc}

a-c: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$).

Usvajanje makroelemenata bilo je uslovljeno godinom ogleda, kao i tretmanom. Svi primenjeni bakterijski tretmani uticali su na povećanje usvajanja makroelemenata i kretali su se u opsegu vrednosti neinokulisane kontrole i kontrole sa azotom (Tabela 18). Izuzetak je bio tretman sa *Mesorhizobium* sp. 1M12, kod kog je zabeleženo smanjenje usvajanja Ca, u odnosu na netretiranu kontrolu u drugoj godini ogleda. Takođe, utvrđene su pozitivne korelacije između parametara SDW i usvajanja mikro- i makroelemenata (osim za Fe) (Prilog 12).

Tabela 18. Usvajanje makroelemenata kod biljaka žutog zvezdana (*L. corniculatus*) inokulisanih različitim sojevima *Mesorhizobium* sp.

Tretman	Makroelementi (mg saksiji ⁻¹)			
	Prva godina ogleda			
	Ca	K	Mg	P
<i>Mesorhizobium</i> sp. 1M12	79,32±7,77 ^{bc}	165,73±21,19 ^{bc}	19,60±2,26 ^{bc}	15,77±1,58 ^{bc}
<i>Mesorhizobium</i> sp. U1C	108,32±8,55 ^a	191,83±7,04 ^{ab}	24,97±1,47 ^a	18,34±0,96 ^{ab}
<i>Mesorhizobium</i> sp. 631oz	93,86±11,38 ^{ab}	198,65±22,73 ^{ab}	22,73±2,71 ^{ab}	18,66±2,60 ^{ab}
<i>Mesorhizobium</i> sp. 754	112,92±4,52 ^a	217,02±14,61 ^a	27,08±1,49 ^a	20,26±0,39 ^a
Ø	70,24±14,24 ^c	138,50±25,86 ^c	16,84±3,61 ^c	12,86±2,03 ^c
ØN	105,41±11,45 ^a	220,84±18,97 ^a	25,30±2,84 ^a	21,35±0,09 ^a
Druga godina ogleda				
<i>Mesorhizobium</i> sp. 1M12	96,29±4,31 ^d	186,29±14,08 ^b	24,57±1,23 ^b	35,58±4,62 ^{bc}
<i>Mesorhizobium</i> sp. U1C	212,04±22,025 ^b	313,88±26,39 ^a	54,86±6,74 ^a	47,20±5,83 ^{ab}
<i>Mesorhizobium</i> sp. 631oz	178,19±37,90 ^{bc}	319,65±65,12 ^a	48,31±10,67 ^a	46,68±9,79 ^{ab}
<i>Mesorhizobium</i> sp. 754	189,95±42,27 ^{bc}	342,49±69,47 ^a	50,18±11,22 ^a	49,90±10,40 ^{ab}
Ø	126,48±3,04 ^{cd}	172,56±8,39 ^b	31,42±0,76 ^b	24,89±0,91 ^c
ØN	275,04±57,17 ^a	358,07±70,70 ^a	64,91±13,53 ^a	53,81±10,71 ^a

a-c: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$).

4.9. Uticaj bakterijske inokulacije na rast i nutritivni sastav žutog zvezdana, ježevice i njihove smeše u kiselom zemljištu (ogled u saksijama II)

Na osnovu PGP osobina, molekularne karakterizacije, kao i sposobnosti da raste u uslovima niskog pH, izolat *B. megaterium* DZK1Bh izabran je kao nerizobijalni inokulant za postavljanje ovog oglada. Takođe, zbog istih karakteristika, izolat *Mesorhizobium* sp. 631oz izabran je kao rizobijalni inokulant. Izolati nisu pokazali međusobni antagonistički efekat i okarakterisani su kao kompatibilni za koinokulaciju biljaka žutog zvezdana i ježevice, kao i njihove smeše. Ogled je postavljen u stakleniku Instituta za zemljište tokom 2019. godine i praćen je tokom jedne sezone (Slika 28).



Slika 28. Ogled u saksijama sa žutim zvezdanom (*L. corniculatus*), ježevicom (*D. glomerata*) i njihovom smešom (foto M. Knežević)

Zemljište koje je korišćeno za postavljanje oglada je imalo kiselu reakciju, bilo je srednje opterećeno organskom materijom i kalijumom, dok je sadržaj azota i fosfora bio nizak (Tabela 19). Kao u slučaju prvog oglada u saksijama, nizak pH zemljišta posmatran je kao parametar zemljišta niske produktivne sposobnosti.

Tabela 19. Hemijski parametri zemljišta korišćenog za ogled

Hemijski parametar	
pH	5,37
Sadržaj organske materije SOM (%)	3,35
CaCO ₃ (%)	0,27
P ₂ O ₅ (mg 100 g ⁻¹)	6,62
K ₂ O (mg 100 g ⁻¹)	13,3
N (%)	0,12

U ispitivanom uzorku zemljišta, ukupne koncentracije As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn bile su ispod maksimalnih dozvoljenih koncentracija (MDK) prema Službenom glasnik Republike Srbije (1994 i 2019), kao i Mn prema Schulin et al. (2010) (Tabela 20).

Tabela 20. Koncentracija ukupnih mikroelemenata u zemljištu

Mikroelementi	As	Cd	Co	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
	(mg kg ⁻¹)								
Ukupni mikroelementi	4,55	0,55	9,61	31,4	8,01	506	20,5	20,0	58,4
MDK* (mg kg ⁻¹)	25	3	-	100	100	-	50	100	300

*MDK: maksimalne dozvoljene koncentracije mikroelemenata u zemljištu, prema Službenom glasniku Republike Srbije (1994).

Inokulacija žutog zvezdana i ježevice rizobijalnim (*Mesorhizobium* sp. 631oz) i nerizobijalnim izolatima (*B. megaterium* DZK1Bh), kao i njihovom koinokulacijom (*B. megaterium* DZK1Bh + *Mesorhizobium* sp. 631oz), imala je pozitivan uticaj na povećanje sveže i suve mase nadzemnog dela biljaka (Tabela 21). Vrednosti za suhu nadzemnu masu kretale su se u opsegu od 0,62±0,05 (Ø) do 1,13±0,18 g saksija⁻¹ (*B. megaterium* + *Mesorhizobium* sp.) u slučaju biljaka žutog zvezdana i od 1,66±0,17 (Ø) do 2,50±0,29 g saksija⁻¹ (*B. megaterium* + *Mesorhizobium* sp.) u slučaju ježevice. Vrednosti sveže i suve mase obe biljne vrste bile su značajno veće u inokulisanim tretmanima, u poređenju sa neinokulisanim kontrolom. U slučaju inokulacije biljaka žutog zvezdana, sva 3 bakterijska tretmana imala su isti efekat na suhu nadzemnu masu biljaka, dok je u slučaju ježevice bolji efekat na prinos zabeležen za tretmane *Mesorhizobium* sp. i za *B. megaterium* + *Mesorhizobium* sp. Procenat azota u biljkama žutog zvezdana bio je relativno ujednačen i kretao se od 3,58±0,06% (Ø) do 3,98±0,01% (ØN). Procenat azota u biljkama žutog zvezdana inokulisanim izolatima *Mesorhizobium* sp. i *B. megaterium* bio je značajno veći u poređenju sa tretmanom njihovom koinokulacijom (*B. megaterium* + *Mesorhizobium* sp.) i neinokulisanim kontrolom (Ø). U slučaju ježevice, najveći procenat azota u biljnom materijalu zabeležen je u kontroli sa azotom 3,49±0,09% (ØN), dok je u slučaju bakterijskih tretmana, tretman izolatom *B. megaterium* indukovao najznačajniji procenat azota (3,09±0,18%) u biljnom materijalu.

Ukupan sadržaj azota po saksiji, u slučaju obe biljne vrste, bio je povećan inokulacijom svim bakterijskim tretmanima (Tabela 21). Inokulacija žutog zvezdana svim tretmanima dovela je do povećanja ukupnog azota u odnosu na neinokulisane kontrole, dok su u slučaju ježevice tretmani izolatima *B. megaterium* i *B. megaterium* + *Mesorhizobium* sp. dali najveće vrednosti za ovaj parametar.

Tabela 21. Efekat inokulacije žutog zvezdana (*L. corniculatus*) i ježevice (*D. glomerata*) izolatima *B. megaterium* DZK1BH i *Mesorhizobium* sp. 631oz

Tretman	Žuti zvezdan				Ježevica			
	Sveža nadzemna masa (g saksija ⁻¹)	Suva nadzemna masa (g saksija ⁻¹)	N (%)	Ukupan sadržaj azota (mg saksija ⁻¹)	Sveža nadzemna masa (g saksija ⁻¹)	Suva nadzemna masa (g saksija ⁻¹)	N (%)	Ukupan sadržaj azota (mg saksija ⁻¹)
T1	5,00±0,77 ^{ab}	0,99±0,06 ^a	3,97±0,23 ^a	39,30±2,92 ^a	13,83±0,98 ^{ab}	2,07±0,17 ^{bc}	3,09±0,18 ^b	63,96±2,83 ^a
T2	5,84±1,05 ^a	1,09±0,11 ^a	3,86±0,16 ^a	42,07±5,94 ^a	11,45±1,10 ^b	2,24±0,15 ^{ab}	2,47±0,33 ^c	55,33±3,84 ^b
T3	5,83±1,39 ^a	1,13±0,18 ^a	3,64±0,03 ^b	41,13±6,21 ^a	16,05±1,34 ^a	2,50±0,29 ^a	2,48±0,14 ^c	62,00±5,21 ^a
Ø	3,49±0,55 ^b	0,62±0,05 ^b	3,58±0,06 ^b	22,20±1,22 ^b	11,69±2,01 ^b	1,66±0,17 ^d	2,12±0,06 ^d	35,19±4,52 ^c
ØN	6,04±0,41 ^a	1,21±0,27 ^a	3,98±0,01 ^a	48,16±10,35 ^a	13,51±1,38 ^{ab}	1,82±0,21 ^{cd}	3,49±0,09 ^a	63,52±5,81 ^a

T1: seme tretirano sa *B. megaterium* DZK1BH; T2: seme tretirano sa *Mesorhizobium* sp. 631oz; T3: seme tretirano sa *B. megaterium* DZK1BH i *Mesorhizobium* sp. 631oz; Ø: netretirana kontrola; NØ: NPK đubrenje bez inokulacije bakterijama; a-d: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$).

U odnosu na uticaj inokulacije na biljke žutog zvezdana i ježevice gajene u monokulturama, uticaj inokulacije je bio različit kada su u pitanju ove dve biljne vrste gajene u vidu smeše. Vrednosti suve nadzemne mase biljaka žutog zvezdana gajenih u smeši sa ježevicom su se kretale od 0,52±0,10 (Ø) do 0,87±0,34 g saksija⁻¹ (ØN) i bile su ekvivalentne (Tabela 22). Uticaj primenjenih bakterijskih tretmana na procenat i ukupan sadržaj azota u biljkama žutog zvezdana gajenih u smeši nije se

razlikovao od kontrole i kontrole sa azotom. U slučaju ježevice gajene u smeši sa žutim zvezdanom, vrednosti za suhu nadzemnu masu kretale su se od $1,63 \pm 0,31$ (\emptyset) do $2,64 \pm 0,51$ g saksija⁻¹ (*Mesorhizobium* sp.). Svi bakterijski tretmani nisu bili značajno različiti od kontrole sa azotom, a bili su veći od vrednosti dobijenih za neinokulisanu kontrolu. Od primenjenih bakterijskih tretmana, po vrednostima za procenat azota istakao se tretman *B. megaterium* ($2,27 \pm 0,13\%$) i nije se značajno razlikovao od kontrole sa azotom. Isti trend je zabeležen i u slučaju ukupnog sadržaja azota. Kada se smeša ove dve biljne vrste posmatra kao celina, može se primetiti da je ukupna suva masa nadzemnog dela biljaka, kao i ukupan sadržaj azota u biljnom materijalu, bio povećan u bakterijskim tretmanima u odnosu na neinokulisanu kontrolu.

Tabela 22. Efekat inokulacije smeše žutog zvezdana (*L. corniculatus*) i ježevice (*D. glomerata*) izolatima *B. megaterium* DZK1BH i *Mesorhizobium* sp. 631oz

Tretman	Žuti zvezdan iz smeše				Ježevica iz smeše				Smeša	
	Sveža nadzemna masa (g saksija ⁻¹)	Suva nadzemna masa (g saksija ⁻¹)	N (%)	Ukupan sadržaj azota (mg saksija ⁻¹)	Sveža nadzemna masa (g saksija ⁻¹)	Suva nadzemna masa (g saksija ⁻¹)	N (%)	Ukupan sadržaj azota (mg saksija ⁻¹)	Ukupna suva nadzemna masa (g saksija ⁻¹)	Ukupan sadržaj azota (mg saksija ⁻¹)
T1	2,69±0,26 ^{ab}	0,55±0,07 ^a	3,71±0,23 ^a	20,41±3,56 ^a	11,10±0,91 ^b	2,54±0,30 ^a	2,27±0,13 ^{ab}	57,66±3,82 ^a	3,09±0,34 ^a	78,08±5,77 ^a
T2	2,13±0,33 ^b	0,58±0,13 ^a	3,55±0,04 ^a	20,59±4,80 ^a	13,41±0,42 ^a	2,64±0,51 ^a	1,80±0,09 ^c	47,52±6,56 ^b	3,22±0,39 ^a	68,11±3,38 ^a
T3	3,01±0,43 ^a	0,62±0,18 ^a	3,74±0,35 ^a	23,19±5,78 ^a	11,62±0,51 ^b	2,34±0,24 ^a	2,12±0,14 ^b	49,61±2,21 ^b	2,96±0,08 ^a	72,80±5,00 ^a
Ø	2,53±0,31 ^{ab}	0,52±0,10 ^a	3,54±0,23 ^a	18,41±2,33 ^a	10,80±1,02 ^b	1,63±0,31 ^b	1,47±0,15 ^d	23,91±1,99 ^c	2,15±0,27 ^b	42,32±2,80 ^b
ØN	3,65±0,90 ^a	0,87±0,34 ^a	3,77±0,28 ^a	32,80±15,28 ^a	9,48±0,17 ^c	2,29±0,19 ^a	2,48±0,06 ^a	56,79±4,76 ^a	3,16±0,16 ^a	89,59±19,34 ^a

T1: seme tretirano sa *B. megaterium* DZK1BH; T2: seme tretirano sa *Mesorhizobium* sp. 631oz; T3: seme tretirano sa *B. megaterium* DZK1BH i *Mesorhizobium* sp. 631oz; Ø: netretirana kontrola; NØ: NPK dubrenje bez inokulacije bakterijama. a-d: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$).

Koncentracija mikroelemenata u biljnom materijalu zavisila je od biljne vrste i od načina gajenja (monokultura ili smeša). Rezultati sadržaja makroelemenata prikazani su u Tabeli 23. U slučaju biljaka žutog zvezdana primećeno je da isti tretmani većinom imaju isti uticaj na koncentraciju mikroelemenata, nezavisno od načina gajenja. Koncentracije **Co**, **Cr**, **Cu**, **Fe**, **Ni** i **Zn** bile su najveće u neinokulisanim biljkama, dok je koncentracija **Mn** bila najveća ($62,31 \text{ mg kg}^{-1}$) pod uticajem tretmana *B. megaterium* (žuti zvezdan u monokulturi). Koncentracije **Pb** bile su najveće pod dejstvom tretmana *Mesorhizobium* sp. i koinokulacijom *B. megaterium* + *Mesorhizobium* sp. i \emptyset u slučaju zvezdana kao monokulture, dok je u smeši najveća vrednost zabeležena u slučaju koinokulacije *B. megaterium* + *Mesorhizobium* sp. i \emptyset . Osim koncentracija **Mn**, **Ni** i **Pb** može se zapaziti trend smanjenja koncentracija mikroelemenata u biljkama žutog zvezdana (gajenih i u monokulturi i u smeši) pod uticajem bakterijske inokulacije. Tretman *B. megaterium* indukovao je najveće vrednosti koncentracije **Mn** u biljkama žutog zvezdana u monokulturi ($62,31 \text{ mg kg}^{-1}$) i u smeši ($63,84 \text{ mg kg}^{-1}$). U slučaju žutog zvezdana u monokulturi, vrednosti koncentracije **Ni** bile su najveće u *Mesorhizobium* sp., \emptyset i $\emptyset N$, a u smeši u neinokulisanoj kontroli ($5,33 \text{ mg kg}^{-1}$). U biljkama ježevice, koncentracije **Co** se nisu značajno razlikovale. Koncentracije **Pb** i **Zn** bile su najveće u neinokulisanoj kontroli, pri oba načina gajenja. U slučaju monokulture, koncentracija **Cu** bila je najveća za tretman *B. megaterium* + *Mesorhizobium* sp. i \emptyset , dok je u slučaju smeše najveća koncentracija ovog mikroelementa zabeležena za tretman *Mesorhizobium* sp. ($7,93 \text{ mg kg}^{-1}$). Koncentracija **Fe** u monokulturi ježevice bila je najveća za neinokulisanu kontrolu (174 mg kg^{-1}) i za tretman *Mesorhizobium* sp. ($157,94 \text{ mg kg}^{-1}$), u formi smeše. Tretman *Mesorhizobium* sp. indukovao je najveće koncentracije **Mn** u biljkama ježevice gajenih u smeši koje nisu bile značajno različite od \emptyset . Koncentracije **Mn** su bile najveće u kontroli sa azotom i u *Mesorhizobium* sp., u slučaju ježevice gajene u monokulturi. Za koncentracije **Ni** u biljnom materijalu nije se mogao uočiti jedinstven trend uticaja određenog tretmana. Kod ježevice najveće koncentracije **Ni** zabeležene su kod tretmana sa koinokulacijom *B. megaterium* + *Mesorhizobium* sp. i $\emptyset N$ (ježevica u monokulturi) i *Mesorhizobium* sp. i $\emptyset N$ (ježevica iz smeše).

Tabela 23. Koncentracija mikroelemenata u biljakama (*L. corniculatus*) i ježevice (*D. glomerata*) inokulisanim izolatima *B. megaterium* DZK1BH i *Mesorhizobium* sp. 631oz

Biljna vrsta	Tretman	Mikroelementi (mg kg ⁻¹)									
		Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn		
Zuti zvezda	T1	0,10±0,01 ^b	1,18±0,01 ^c	8,60±0,01 ^{bc}	151,06±7,19 ^d	62,31±2,56 ^a	3,86±0,03 ^c	1,08±0,00 ^b	48,26±2,77 ^c		
	T2	0,16±0,02 ^{ab}	1,40±0,02 ^b	9,86±0,00 ^{ab}	349,41±6,33 ^b	50,88±0,14 ^b	4,84±0,01 ^{ab}	1,42±0,01 ^a	59,96±4,15 ^b		
	T3	0,14±0,01 ^{ab}	1,64±0,06 ^{ab}	9,20±0,05 ^b	269,86±1,04 ^c	44,77±0,74 ^{bc}	4,53±0,02 ^b	1,49±0,10 ^a	53,18±3,96 ^{bc}		
	Ø	0,18±0,04 ^a	1,96±0,04 ^a	10,57±0,06 ^a	460,12±9,25 ^a	48,84±0,57 ^b	4,92±0,01 ^a	1,19±0,02 ^{ab}	70,55±2,14 ^a		
	ØN	0,15±0,06 ^{ab}	1,67±0,12 ^{ab}	10,02±0,0 ^{ab}	254,01±6,87 ^c	50,61±0,07 ^b	5,17±0,05 ^a	0,95±0,02 ^b	63,79±3,20 ^b		
	ØN	0,10±0,00 ^b	1,52±0,05 ^b	8,49±0,09 ^c	146,01±2,31 ^c	63,84±1,95 ^a	3,62±0,04 ^c	0,99±0,03 ^{bc}	47,50±2,98 ^c		
Zuti zvezdan iz smeše	T1	0,15±0,04 ^b	1,41±0,03 ^b	10,29±0,11 ^a	344,21±11,00 ^a	49,62±0,10 ^b	4,71±0,02 ^b	1,15±0,02 ^b	60,83±3,14 ^b		
	T2	0,13±0,02 ^b	1,44±0,04 ^b	9,79±0,08 ^b	257,94±12,01 ^b	42,86±1,35 ^b	4,25±0,01 ^{bc}	1,64±0,01 ^a	55,84±2,11 ^c		
	T3	0,25±0,03 ^a	1,86±0,04 ^a	10,53±0,06 ^a	363,28±3,98 ^a	62,10±0,55 ^a	5,33±0,04 ^a	1,42±0,05 ^a	75,79±4,12 ^a		
	Ø	0,13±0,01 ^b	1,41±0,03 ^b	8,63±0,06 ^c	255,34±3,13 ^b	48,23±0,83 ^b	4,99±0,05 ^b	0,95±0,03 ^{bc}	60,76±3,67 ^b		
	ØN	0,05±0,02 ^a	1,70±0,04 ^b	5,50±0,13 ^c	75,10±4,12 ^c	73,84±1,01 ^{bc}	2,03±0,07 ^b	0,30±0,01 ^b	48,43±2,17 ^{bc}		
	ØN	0,06±0,01 ^a	1,81±0,05 ^b	5,39±0,06 ^c	90,28±5,42 ^{bc}	77,45±0,90 ^a	1,89±0,03 ^{bc}	0,22±0,01 ^b	55,80±1,02 ^a		
Ježevica	T1	0,06±0,00 ^a	2,49±0,10 ^a	7,83±0,02 ^a	133,28±9,55 ^b	54,83±0,75 ^c	2,90±0,12 ^a	0,39±0,02 ^b	51,89±1,94 ^b		
	T2	0,09±0,01 ^a	2,69±0,09 ^a	7,03±0,02 ^{ab}	174,74±8,11 ^a	74,09±1,02 ^{bc}	2,63±0,08 ^{ab}	0,68±0,03 ^a	60,25±3,25 ^a		
	T3	0,05±0,00 ^a	1,68±0,07 ^b	6,13±0,07 ^b	96,26±4,17 ^{bc}	79,94±0,99 ^a	2,04±0,01 ^b	0,55±0,01 ^a	58,79±2,75 ^a		
	Ø	0,05±0,02 ^b	1,21±0,01 ^b	5,85±0,01 ^{bc}	82,09±5,64 ^{bc}	75,99±1,30 ^a	1,82±0,01 ^b	0,36±0,05 ^b	54,41±2,10 ^b		
	ØN	0,07±0,02 ^b	2,59±0,04 ^a	7,93±0,03 ^a	157,94±8,20 ^a	65,43±0,87 ^b	2,88±0,02 ^a	0,34±0,07 ^b	56,09±4,12 ^b		
	ØN	IGDM	1,49±0,02 ^b	6,33±0,05 ^b	92,96±5,83 ^b	61,61±1,12 ^b	2,04±0,07 ^b	0,22±0,02 ^b	50,05±3,97 ^b		
Ježevica iz smeše	T1	0,39±0,03 ^a	1,08±0,02 ^b	5,02±0,03 ^c	102,73±4,10 ^b	57,15±0,74 ^b	1,59±0,05 ^{bc}	3,48±0,09 ^a	86,26±4,03 ^a		
	T2	0,06±0,01 ^b	2,13±0,02 ^a	6,88±0,04 ^b	96,22±2,70 ^b	75,37±0,93 ^a	2,44±0,02 ^a	0,23±0,04 ^b	60,59±3,28 ^b		
	T3										
	Ø										
	ØN										
	ØN										

T1: seme tretirano sa *B. megaterium* DZK1BH; T2: seme tretirano sa *Mesorhizobium* sp. 631oz; T3: seme tretirano sa *B. megaterium* DZK1BH i *Mesorhizobium* sp. 631oz; Ø: netretirana kontrola; NØ: NPK dubrenje bez inokulacije bakterijama; a-d: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$); IGDM: vrednosti ispod granice detekcije metode.

Koncentracije makroelemenata bile su varijabilne u zavisnosti od tretmana, biljne vrste i načina gajenja biljaka (Tabela 24). Koncentracije **Ca** bile su veće u biljkama žutog zvezdana u odnosu na ježevicu, nezavisno od načina gajenja, dok su koncentracije **K**, **Mg** i **P** bile relativno ujednačene. Koncentracije **Ca** bile su smanjene u odnosu na kontrolu i kontrolu sa azotom kod žutog zvezdana gajenog u monokulturi. Koncentracije **K** u biljkama zvezdana bile su povećane u odnosu na Ø pri oba načina gajenja. U biljkama ježevice, koncentracije **K** bile su manje u odnosu na Ø (ježevica u monokulturi), dok je najviša vrednost u slučaju ježevice u smeši zabeležena za *B. megaterium*. Koncentracije **Mg** i **P** varirale su u zavisnosti od tretmana.

Tabela 24. Koncentracija makroelemenata u biljkama žutog zvezdana (*L. corniculatus*) i ježevice (*D. glomerata*) inokulisanih izolatima *B. megaterium* DZK1BH i *Mesorhizobium* sp. 631oz

Biljna vrsta	Tretman	Makroelementi (g kg ⁻¹)			
		Ca	K	Mg	P
Žuti zvezdan	T1	15,62±0,20 ^d	32,67±0,21 ^c	4,56±0,02 ^c	3,47±0,07 ^a
	T2	14,72±0,29 ^e	36,56±0,06 ^b	4,70±0,04 ^c	3,24±0,02 ^{ab}
	T3	16,33±0,02 ^c	40,53±0,13 ^a	5,04±0,0 ^b	3,47±0,09 ^a
	Ø	19,08±0,20 ^b	27,49±0,07 ^d	5,30±0,10 ^a	2,95±0,04 ^b
	ØN	19,59±0,08 ^a	22,70±0,10 ^e	4,93±0,05 ^b	3,31±0,01 ^{ab}
Žuti zvezdan iz smeše	T1	15,61±0,28 ^a	35,41±0,10 ^a	4,97±0,19 ^b	2,98±0,11 ^b
	T2	16,26±0,14 ^a	28,33±0,34 ^d	5,34±0,02 ^a	3,11±0,06 ^a
	T3	16,50±0,10 ^a	31,91±0,12 ^c	4,93±0,05 ^b	3,12±0,06 ^b
	Ø	16,90±0,13 ^a	32,07±0,07 ^c	4,90±0,18 ^b	2,81±0,01 ^c
	ØN	16,63±0,08 ^a	33,51±0,09 ^b	4,92±0,08 ^b	3,06±0,03 ^{bc}
Ježevica	T1	4,64±0,02 ^c	42,29±0,04 ^c	5,01±0,01 ^c	2,56±0,01 ^a
	T2	5,03±0,08 ^b	38,40±0,10 ^d	4,79±0,19 ^d	2,55±0,06 ^a
	T3	4,98±0,17 ^b	38,78±0,06 ^d	5,41±0,07 ^b	2,12±0,04 ^b
	Ø	6,82±0,04 ^a	53,92±0,02 ^a	5,93±0,06 ^a	2,22±0,01 ^{ab}
	ØN	6,70±0,10 ^a	44,83±0,24 ^b	5,97±0,02 ^a	2,44±0,04 ^a
Ježevica iz smeše	T1	4,79±0,04 ^c	49,79±0,04 ^a	5,34±0,02 ^a	1,77±0,01 ^c
	T2	4,74±0,02 ^c	39,68±0,18 ^d	4,77±0,05 ^b	2,15±0,05 ^{bc}
	T3	5,17±0,06 ^a	31,31±0,01 ^e	4,69±0,06 ^c	2,91±0,04 ^a
	Ø	4,99±0,10 ^b	46,33±0,12 ^b	5,29±0,09 ^a	2,42±0,01 ^b
	ØN	4,70±0,02 ^c	42,95±0,01 ^c	4,87±0,02 ^b	2,11±0,02 ^{bc}

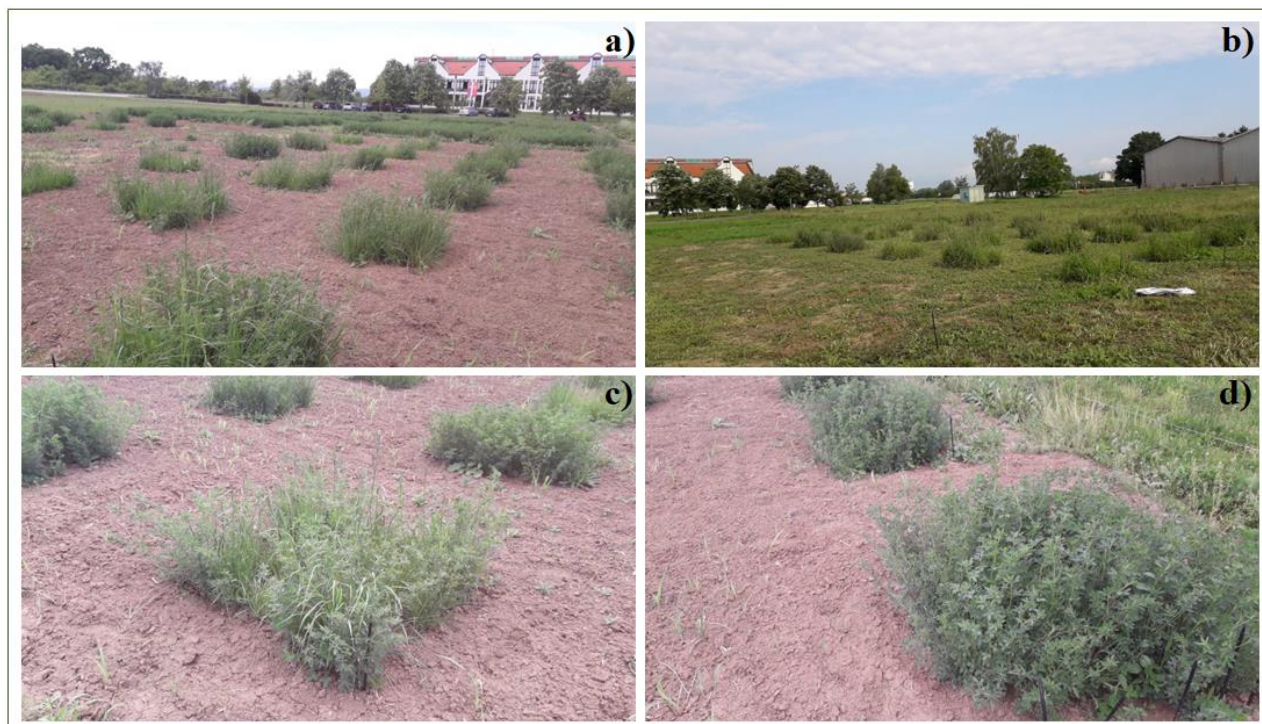
T1: seme tretirano sa *B. megaterium* DZK1BH; T2: seme tretirano sa *Mesorhizobium* sp. 631oz; T3: seme tretirano sa *B. megaterium* DZK1BH i *Mesorhizobium* sp. 631oz; Ø: netretirana kontrola; ØN: NPK đubrenje bez inokulacije bakterijama; a-d: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$).

4.10. Uticaj bakterijske inokulacije na rast i nutritivni sastav lucerke, ježevice i njihove smeše (ogled u polju)

Ogled u polju sa lucerkom, ježevicom i njihovom smešom postavljen je 2019. godine u Kruševcu, na parcelama Instituta za krmno bilje. Zbog malih prosečnih količina padavina i velikog broja dana sa temperaturama iznad proseka, kao i nemogućnosti kontrolisanja korova na parceli nije bilo moguće prikupiti prvi otkos tokom 2019. godine oglada i drugi tokom 2021. godine (Slika 29). Skidanje otkosa i prikupljanje biljne mase izvršeno je u toku 2020. (I i II otkos) i 2021. godine (I i III otkos).

Kao inokulanti su odabrani izolati *B. megaterium* DLK2Eh (izolovan u ovoj studiji) i *S. meliloti* L4 (izolat iz kolekcije Instituta za zemljište). Oba izabrana izolata poreklom su iz korenskih kvržica lucerke. Izolati su odabrani na osnovu povoljnih PGP karakteristika. Iako su izolati

okarakterisani kao *Pseudomonas* sp. (L1, L2Cr, LG i Luc2) pokazali bolje PGP osobine u odnosu na DLK2Eh, zbog nemogućnosti determinacije ovih izolata do nivoa vrste, izolat DLK2Eh izabran je kao nepatogeni inokulant grupe rizika 1.



Slika 29. Ogljed u polju: a) druga godina ogleda, b) treća godina ogleda, c) travna smeša (druga godina ogleda), d) lucerka smeša (druga godina ogleda) (foto S. Anđelković i M. Knežević)

Ogljed je postavljen na aluvijalnom zemljištu slabo kisele reakcije, teksturne klase laka glina (LG) (Tabela 25).

Tabela 25. Fizičko-hemijski parametri zemljišta korišćenog za ogled

Fizičko-hemijski parametar	
pH	6,20
Sadržaj organske materije SOM (%)	2,80
CaCO ₃ (%)	0,09
P ₂ O ₅ (mg 100 g ⁻¹)	6,69
K ₂ O (mg 100 g ⁻¹)	13,59
N (%)	0,20
Krupan pesak (>0,2 mm) %	0,7
Sitan pesak (0,2-0,02mm) %	38,6
Prah (0,02-0,002 mm) %	28,8
Glina (<0,002mm) %	31,9
<u>Sitan pesak + prah (>0,02 mm) %</u>	<u>60,7</u>

Zemljište je imalo nizak sadržaj P i K, dok su koncentracije Ni, Cr i Pb bile povišene (Tabela 26). Prema Službenom glasnik Republike Srbije (1994), dozvoljene koncentracije Ni, Cr i Pb su 50 mg kg⁻¹, 100 mg kg⁻¹ i 100 mg kg⁻¹, redom.

Tabela 26. Sadržaj mikroelemenata u uzorku zemljišta

Mikroelementi (mg kg ⁻¹)	As	Cd	Co	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
Ukupni mikroelementi	19,43	1,12	22,61	127,8	24,16	822,8	204	130	136
MDK (mg kg ⁻¹)	25	3	-	100	100	-	50	100	300

*MDK: maksimalne dozvoljene koncentracije mikroelemenata u zemljištu prema Službenom glasniku Republike Srbije (1994).

Rezultati merenja suve mase biljaka lucerke, ježevice i njihove smeše prikazani su u Tabeli 27. Vrednosti suve mase biljaka varirale su u zavisnosti od biljne vrste i otkosa. Bakterijski tretmani imali su pozitivan uticaj na povećanje suve biljne mase lucerke u sva 4 otkosa i dali su vrednosti suve biljne mase veće od neinokulisane kontrole. Najznačajniji efekat na povećanje suve mase imali su tretmani koinokulacijom i *S. meliloti* (I i II otkos 2020.), kao i *B. megaterium* i koinokulacijom (I otkos 2021. i III otkos 2021, redom). Suva masa lucerke gajene u monokulturi varirala je u zavisnosti od otkosa. Tretmani su tokom otkosa imali različit efekat na povećanje biljne mase, dok je prosečna vrednost za sva 4 otkosa prikupljena u toku 2 godine ogleda bila najveća pod dejstvom koinokulacije (744,60 g). Sličan efekat postignut je i inokulacijom sa *S. meliloti* (717 g), a vrednosti suve mase biljaka tretiranih sa *B. megaterium* (611,89 g) bile su veće od neinokulisane kontrole (Ø: 397,91 g).

Tabela 27. Suva nadzemna masa biljaka lucerke (*M. sativa*), ježevice (*D. glomerata*) i njihove smeše

Biljna vrsta	Tretman	Suva nadzemna masa (suma za 3 ponavljanja u okviru tretmana) (g)				Prosečna vrednost po otkosu tokom celog ogleda
		I otkos 2020.	II otkos 2020.	I otkos 2021.	III otkos 2021.	
Lucerka	Ø	489,00±25,00 ^c	490,50±10,50 ^c	444,40±12,00 ^{bc}	167,75±6,54 ^c	397,91
	T1	967,50±15,50 ^{ab}	1147,50±8,50 ^a	455,24±8,51 ^{bc}	298,57±17,50 ^{bc}	717,20
	T2	853,50±7,50 ^b	796,50±10,50 ^b	527,31±6,52 ^a	270,24±9,00 ^{bc}	611,89
	T3	1020,00±17,00 ^a	1083,00±47,00 ^a	500,97±6,56 ^b	374,41±12,51 ^a	744,60
Ježevica	Ø	534,00±9,00 ^c	547,50±4,50 ^c	403,71±7,50 ^b	255,70±6,01 ^{bc}	435,23
	T1	993,00±24,00 ^a	711,00±50,00 ^b	432,99±6,51 ^a	340,99±5,54 ^a	619,50
	T2	714,00±8,00 ^b	705,00±48,00 ^b	388,30±10,50 ^{bc}	339,42±5,54 ^a	536,68
	T3	1015,50±15,50 ^a	760,50±16,50 ^a	415,88±9,07 ^b	296,73±13,10 ^b	622,15
Smeša	Ø	1006,50±28,50 ^b	747,00±28,00 ^b	425,70±10,52 ^d	286,90±5,50 ^c	616,53
	T1	1078,50±5,50 ^a	774,00±20,00 ^{ab}	539,22±5,22 ^b	331,59±9,05 ^b	680,83
	T2	1006,50±28,50 ^b	858,00±20,00 ^a	582,62±6,01 ^a	481,89±15,04 ^{ab}	773,13
	T3	975,00±11,00 ^{bc}	730,50±7,50 ^b	515,12±7,51 ^c	512,24±8,51 ^a	683,22

T1: seme tretirano sa *Sinorhizobium meliloti* L4; T2: seme tretirano sa *B. megaterium* DLK2Eh; T3: seme tretirano sa *S. meliloti* L4 i *B. megaterium* DLK2Eh; Ø: netretirana kontrola; a-d: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$).

Vrednosti suve mase ježevice gajene u monokulturi varirale su u zavisnosti od otkosa, gde je III otkos (2021.) imao najniže vrednosti (Tabela 27). Bakterijski tretmani povećali su biljnu masu u odnosu na neinokulisane kontrolu u sva 4 otkosa. Tokom prva 2 otkosa (2020.) tretman sa koinokulacijom *S. meliloti* + *B. megaterium* dao je najveće vrednosti suve mase (1015,50±15,50 g i 760,50±16,50 g, redom). U I otkosu (2021.) najbolji efekat imao je tretman *S. meliloti* (432,99±6,51 g), dok u poslednjem otkosu nije postajala značajna razlika između tretmana *S. meliloti* i *B. megaterium* (340,99±5,54 g i 339,42±5,54 g, redom). Prosečna vrednost suve mase za celo trajanje ogleda, izražena po otkosu, ukazala je da su tretmani sa *S. meliloti* i *S. meliloti* + *B. megaterium* imali najznačajniji efekat na povećanje mase ježevice, dok je tretman *B. megaterium* takođe dao veće vrednosti u odnosu na neinokulisane kontrolu. Isti efekat zabeležen je i u slučaju lucerke gajene u monokulturi.

Biljna masa smeše bila je povećana primenom svih tretmana, u odnosu na neinokulisanu kontrolu (Tabela 27). U prvom otkosu najbolji efekat na povećanje prinosa imao je tretman rizobijalnim izolatom u tretmanu sa *S. meliloti* (1078,50±5,50 g). Tretman sa *B. megaterium* dao je najveće prinose u ostala tri otkosa. Isti tretman dao je najveće vrednosti suve mase biljne smeše posmatrajući prosečne vrednosti po otkosu, u toku trajanja oglada.

Vrednosti procenta azota u biljnom materijalu prikazane su u Tabeli 28. Procenat azota u biljnom materijalu varirao je od 2,95±0,08% do 4,44±0,05% u biljkama lucerke, od 1,02±0,09% do 2,43±0,09% u biljkama ježevice i od 1,07±0,06% do 3,58±0,38% u smeši. Efekti primenjenih tretmana bili su varijabilni u zavisnosti od biljne vrste i otkosa. Najbolji efekat na povećanje procenta azota u biljkama lucerke, u odnosu na neinokulisanu kontrolu, imali su tretmani sa *S. meliloti* (3,47±0,16% za I otkos 2020. i 4,44±0,05% za I otkos 2021.) i *S. meliloti* + *B. megaterium* (3,56±0,16% za II otkos 2020. i 3,28±0,07% za III otkos 2021). Takođe, tretman sa *S. meliloti* indukovao je najveći porast prosečne vrednosti procenta azota tokom celog trajanja oglada. Tretman sa *S. meliloti* dao je najveće vrednosti procenta azota u biljkama ježevice u I i II otkosu 2020. i u III 2021. (1,78±0,13%; 1,57±0,08% i 2,43±0,09%, redom). Tretman *S. meliloti* + *B. megaterium* indukovao je najveći porast prosečne vrednosti procenta azota za sve otkose u toku oglada (1,66%). U smeši, tretman *B. megaterium* indukovao je najveće vrednosti procenta azota u I i II otkosu 2020. i u I otkosu 2021. U III otkosu 2021. tretmani sa *S. meliloti* i *B. megaterium* dali su vrednosti jednake neinokulisanoj kontroli. Najbolji efekat na procenat azota u smeši gledajući prosečnu vrednost tokom celog oglada imao je tretman sa *B. megaterium*.

Tabela 28. Procenat azota u biljkama (*M. sativa*), ježevice (*D. glomerata*) i njihovoj travnoj smeši

Biljna vrsta	Tretman	N (%)				Prosečna vrednost po otkosu tokom celog oglada
		I otkos 2020.	II otkos 2020.	I otkos 2021.	III otkos 2021.	
Lucerka	Ø	3,11±0,17 ^c	3,01±0,21 ^b	3,11±0,10 ^c	2,95±0,08 ^b	3,05
	T1	3,47±0,16 ^a	3,31±0,07 ^a	4,44±0,05 ^a	3,27±0,07 ^a	3,62
	T2	3,15±0,07 ^{bc}	3,54±0,15 ^a	3,99±0,16 ^b	3,16±0,06 ^a	3,46
	T3	3,28±0,07 ^b	3,56±0,16 ^a	3,05±0,05 ^c	3,28±0,07 ^a	3,29
Ježevica	Ø	1,45±0,08 ^b	1,39±0,10 ^b	0,94±0,02 ^{bc}	2,31±0,01 ^a	1,60
	T1	1,78±0,13 ^a	1,57±0,08 ^a	0,87±0,08 ^c	2,43±0,09 ^a	1,58
	T2	1,53±0,18 ^b	1,33±0,03 ^b	1,02±0,09 ^b	2,41±0,11 ^a	1,57
	T3	1,41±0,10 ^b	1,63±0,08 ^a	1,29±0,05 ^a	2,29±0,12 ^a	1,66
Smeša	Ø	2,13±0,06 ^b	1,79±0,15 ^c	1,07±0,06 ^c	2,82±0,08 ^a	1,96
	T1	2,03±0,08 ^b	2,17±0,18 ^c	1,29±0,01 ^b	2,84±0,15 ^a	2,08
	T2	2,60±0,19 ^a	3,58±0,38 ^a	1,77±0,02 ^a	2,68±0,08 ^{ab}	2,66
	T3	2,47±0,08 ^a	3,00±0,31 ^b	1,36±0,06 ^b	2,61±0,01 ^b	2,36

T1: seme tretirano sa *S. meliloti* L4; T2: seme tretirano sa *B. megaterium* DLK2Eh; T3: seme tretirano sa *S. meliloti* L4 i *B. megaterium* DLK2Eh; Ø: netretirana kontrola; a-d: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$).

Rezultati određivanja koncentracije mikroelemenata u biljkama lucerke prikazani su u Prilogu 13. Koncentracija **Co** u biljkama lucerke bila je smanjena pod uticajem svih bakterijskih tretmana, u odnosu na neinokulisanu kontrolu. Sličan trend smanjenja koncentracije pod uticajem primenjenih tretmana zabeležen je i za koncentracije **Cr** i **Pb**. Koncentracije **Cu** su bile varijabilne i nije uočen jasan efekat bakterijskih tretmana na promenu koncentracije ovog mikroelementa. Koncentracije **Fe**, **Mn**, **Ni** i **Zn** takođe su bile varijabilne, ali se u prvom otkosu (2020.) može zapaziti smanjenje koncentracija ovih mikroelemenata pod uticajem primenjenih tretmana. U biljkama žutog zvezdana, koncentracije **Co** i **Pb** bile su smanjene pod uticajem svih tretmana, u odnosu na neinokulisanu kontrolu. Koncentracije **Cr**, **Cu** i **Ni** varirale su u zavisnosti od otkosa i načina gajenja ježevice, ali

su u prvom otkosu 2020. bile smanjene pod delovanjem svih tretmana, u odnosu na neinokulisanu kontrolu. Nije zapažen uticaj tretmana na koncentracije **Mn** i **Zn**, dok su koncentracije **Fe**, iako varijabilne, uglavnom bile smanjene pod uticajem tretmana. Uticaj tretmana na koncentracije mikroelemenata u smeši bio je varijabilan. Za koncentracije **Cr** i **Mn** zabeleženo je smanjenje pod uticajem tretmana, u odnosu na kontrolu. Koncentracije **Fe**, **Ni** i **Zn** nisu bile određene u primenjenim tretmanima. Uticaj tretmana na koncentracije **Co**, **Cu** i **Pb** takođe su bile varijabilne, ali se mogao uočiti trend povećanja u prvom otkosu 2020. i smanjenja u prvom otkosu 2021. i pretežnog smanjenja u prva tri otkosa, redom.

Koncentracije **Cr** i **Ni** u pojedinim otkosima bile su u opsegu vrednosti koje se smatraju povišenim ili toksičnim (Kabata-Pendias, 2010) (obeležene crvenim u Prilogu 13-15). U prvom otkosu 2020. u biljkama lucerke koncentracija **Cr** bila je u opsegu normalnih vrednosti samo u tretmanu *S. meliloti*, dok je u ostalim tretmanima bila iznad utvrđene granice. Takođe, u biljkama ježevice koncentracija ovog mikroelementa bila je povećana u neinokulisanoj kontroli i u tretmanu sa koinokulacijom *S. meliloti* + *B. megaterium* (I otkos 2020.) i u svim tretmanima u trećem otkosu 2021. Koncentracije **Cr** bila su povećane i u neinokulisanoj kontroli u slučaju smeše (I otkos 2020. i III otkos 2021), dok je koncentracija bila smanjena na normalne vrednosti primenom sva tri bakterijska tretmana. Koncentracija **Ni** bila je iznad dozvoljenih vrednosti jedino u biljkama lucerke u neinokulisanoj kontroli u prvom otkosu 2020. U ovom otkosu svi primenjeni bakterijski tretmani uticali su na smanjenje koncentracije **Ni**, koja je bila u granicama normale.

Kao i u slučaju mikroelemenata, koncentracije makroelemenata u biljnom materijalu varirale su u zavisnosti od biljne vrste, godine ogleđa i otkosa, kao i od primenjenog tretmana Prilog 16-18. U biljkama lucerke, koncentracije **Ca** i **P** bile su varijabilne i nije se mogao uočiti jasan uticaj tretmana na koncentracije ovih elemenata, dok su koncentracije **K** i **Mg** bile smanjene pod uticajem bakterijskih tretmana. U biljkama ježevice, koncentracije **Ca** i **Mg** bile su varijabilne ali smanjene u prvom otkosu 2020, dok su u istom otkosu koncentracije **K** bile povećane. Koncentracije **K** i **Mg** varirale su u travnoj smeši, a uticaj bakterijskih tretmana na smanjenje koncentracija **Ca** i **P** mogao se zapaziti u prvom otkosu 2020.

5. DISKUSIJA

5. DISKUSIJA

Imajući u vidu značaj žutog zvezdana i lucerke u našoj zemlji, ispitivanja raznovrsnosti bakterija korenskih kvržica ovih leguminoza, kako u pogledu genetičkog diverziteta, tako i na osnovu tolerancije na nepovoljne uslove sredine, PGP osobina i biokontrolnog potencijala su neophodna. Ovakva istraživanja daju uvid u potencijal primene autohtonih sojeva u vidu mikrobioloških đubriva u održivoj poljoprivrednoj praksi naše zemlje.

Brojna istraživanja su potvrdila raznovrsnost *Mesorhizobium* spp. prisutnih u korenskim kvržicama žutog zvezdana, kao što su *M. loti*, *M. tianshanense*, *M. chacoense*, *M. alhagi*, *M. jarvisii*, *M. erdmanii*, *M. huakuii*, *M. plurifarium*, *M. amorphae*, *M. helmanticense*, *M. norvegicum*, *M. olivaresii* i *M. septentrionale* (Lorite et al., 2010; Ampomah & Huss-Danell, 2011; Gossmann et al., 2012; Marcos-García et al., 2017; Lorite et al., 2018; Lorite et al., 2016; Kabdullayeva et al., 2020). U ovom istraživanju, u korenskim kvržicama žutog zvezdana detektovano je prisustvo različitih vrsta *Mesorhizobium* spp., kao što su *Mesorhizobium* sp., *M. erdmanii*, *M. japonicum*, *M. loti*, *M. jarvisii*, *M. tianshanense* i *M. caraganae*. Svi izolati poreklom iz zvezdana koji su imali sposobnost nodulacije, su bili okarakterisani kao pripadnici ovog roda. U istraživanjima drugih autora, unutar korenskih kvržica žutog zvezdana pronađene su i nerizobijalne vrste koje ne mogu da vrše nodulaciju, kao što su vrste koje pripadaju rodovima *Bacillus* i *Pseudomonas* (Ampomah & Huss-Danell, 2011; Lorite et al., 2018). Prisustvo nenodulišućih *Pseudomonas* spp. takođe se dovodi u vezu sa funkcionalnim korenskim kvržicama *Lotus burttii* L., dok se pojava negativne korelacije između brojnosti *Pseudomonas* spp. i *Rhizobium* spp. unutar iste kvržice može objasniti međusobnom kompeticijom ove dve vrste za kolonizaciju (Crosbie et al., 2021). U korenskim kvržicama žutog zvezdana u ovom istraživanju detektovano je prisustvo nenodulišućih vrsta koje su pripadale rodovima *Serratia*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Phylobacterium*, *Paenibacillus* i *Pseudomonas*. Vrste roda *Bacillus* (*B. megaterium*, *B. thuringensis/cereus* i *B. licheniformis*) istakle su se kao dominantni nerizobijalni izolati.

Veliki broj istraživanja bavio se diverzitetom rizobijalnih vrsta unutar korenskih kvržica lucerke širom sveta (Pellock et al., 2000; Timmers et al., 2000; Wang et al., 2018b; Liu et al., 2019; Segundo et al., 1999). U korenskim kvržicama lucerke vrste roda *Sinorhizobium* su najčešće detektovane bakterijske vrste. U našem istraživanju, rizobijalne vrste pripadale su takođe rodu *Sinorhizobium* (*Ensifer*), a *S. meliloti* izvio se kao najzastupljenija vrsta koja je nodulisala lucerku. Zanimljivo je što je u korenskim kvržicama lucerke detektovano prisustvo i jedne vrste roda *Mesorhizobium* čija sposobnost nodulacije lucerke pri reinokulaciji nije testirana. Od nenodulišućih bakterija, vrste rodova *Bacillus*, *Microbacterium*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, kao i mnoge druge su do sada detektovane u korenskim kvržicama lucerke (Khalifa et al., 2015; Stajković et al., 2009; Lai et al., 2015; Kisiel & Kepczyńska, 2016; Ilyas et al., 2022; Ramírez-Bahena et al., 2013). U ovom istraživanju, osim vrsta roda *Bacillus* (*B. megaterium*, *B. mojavensis*, *B. thuringensis*, *B. kochii*, *B. subtilis*), detektovano je i prisustvo vrsta rodova *Pseudomonas*, *Nocardia/Rhodococcus*, *Bosea* i *Agrobacterium*. Od nenodulišućih vrsta može se приметiti da su vrste rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* bile zastupljene u korenskim kvržicama obe biljne vrste, dok je prisustvo drugih rizobijalnih vrsta zavisilo od biljne vrste.

Analiza parcijalnih sekvenci 16S rRNK omogućila je identifikaciju izolata do nivoa roda. U slučaju rizobijalnih izolata, analiza dodatnih "housekeeping" gena pokazala je različitu rezoluciju za *Mesorhizobium* spp. i *Sinorhizobium* spp. Kod izolata iz roda *Sinorhizobium*, identifikacija je bila moguća do nivoa vrste (*S. meliloti* i *S. medicae*). Kako se vrste ovog roda međusobno značajno razlikuju, dok je sličnost unutar iste vrste veoma visoka (i do 100%), gen *recA* može se smatrati dobrim izborom za identifikaciju u okviru roda *Sinorhizobium* (Martens et al., 2007). Analiza sekvenci *recA* gena nije omogućila precizniju identifikaciju *Mesorhizobium* spp. u odnosu na 16S rRNK, zbog velikog procenta sličnosti različitih vrsta u okviru ovog roda. Zato bi ispitivanje više drugih "housekeeping" gena za identifikaciju *Mesorhizobium* spp. trebalo da bude tema budućih istraživanja. U slučaju nerizobijalnih vrsta, analiza *tuf* gena pokazala se kao pogodna za identifikaciju izolata *Bacillus* spp. do nivoa vrste. Ova analiza bila je naročito značajna za razdvajanje izolata gde analiza

sekvenci za 16S rRNK nije uspela da razdvoji vrste *B. thuringiensis* i *B. cereus*, što je i prethodno potvrđeno (Draganić et al. 2017). Vrsta *Serratia plymuthica* identifikovana je sa velikom sigurnošću na osnovu 16S rRNK (99,48%), a *gyrB* gen se pokazao kao adekvatan za potvrdu identifikacije sa maksimalnom sličnošću (100%). Vrste roda *Pseudomonas* nisu mogle sa sigurnošću da se identifikuju do nivoa vrste na osnovu analize sekvenci gena za 16S rRNK i *gyrB* gena, tako da njihova konačna determinacija ostaje predmet budućih istraživanja.

U ovom istraživanju, pokazano je da od 64 izolata iz lucerke, njih 14% ima sposobnost nodulacije pri reinokulaciji. Kod zvezdana, potvrđen je veći broj nodulišućih izolata (od 88 izolata, 23% je nodulisalo). U korenskim kvržicama određene biljne vrste, moguće je i prisutvo rizobijalnih vrsta koje ne moraju nužno imati sposobnost nodulacije korena te biljke, već mogu ući u korenske kvržice istim mehanizmom kao i nerizobijalne vrste. Khalid et al. (2020) su pokazali da samo 37,5% rizobija izolovanih iz *Arachis hypogaea* ima sposobnost nodulacije ove biljne vrste prilikom reinokulacije. Ovu pojavu objasnili su gubitkom bakterijskih *nifH* i *nodACD* gena. Suprotno tome, Farissi et al. (2014) pokazali su da čak 82% izolata iz korenskih kvržica lucerke ima sposobnost nodulacije pri reinokulaciji. U našem istraživanju detektovan je značajno veći broj izolata iz korenskih kvržica koji nisu imali sposobnost nodulacije, u odnosu na rizobijalne, nodulišuće sojeve. Svakako se uslovi sredine kao i kompatibilnost izolata sa biljkama ne mogu zanemariti kao bitni faktori koji utiču na sam proces nodulacije.

Ispitivanje efikasnosti azotofiksacije jedan je od ključnih koraka pri selekciji efikasnih sojeva koji bi se koristili kao inokulanti određenih vrsta leguminoza. Mezorizobijalni sojevi sa visokom efikasnošću u fiksaciji azota su identifikovani u mnogim studijama (Lorite et al., 2010; Sotelo et al., 2011). U našem istraživanju, 20 izolata pokazalo je sposobnost nodulacije žutog zvezdana, od čega je 9 okarakterisano kao visoko efikasni u azotofiksaciji, jer su ostvarili 2.5 puta veću SDW od kontrole (kriterijum Pochon-a, 1954). U slučaju izolata rizobija poreklom iz lucerke, iako je većina uticala na povećanje svih testiranih parametara u odnosu na kontrolu, u eksperimentu u kontrolisanim uslovima, po datom kriterijumu nijedan izolat nije bio efikasan u azotofiksaciji. Treba naglasiti da efikasnost azotofiksacije određenog soja, osim genotipa same bakterije, zavisi i od genotipa biljke, kao i međusobne interakcije bakterije i biljke domaćina (Delić, et al., 2013). Pretpostavljamo da bi veći broj lokaliteta i uzorkovanih korenskih kvržica lucerke doprineo otkrivanju većeg broja efikasnih izolata.

Istraživanja diverziteta endofitnih bakterija u pogledu tolerancije na različite uslove životne sredine od velikog je značaja pri selekciji sojeva za primenu u staništima nepovoljnim za njihov rast. Kako je u Srbiji preko 1140 km² zemljišta zaslanjeno (Mrvić et al., 2013), testiranje tolerancije izolata na različite koncentracije NaCl od velike je važnosti pri selekciji inokuluma za ovu vrstu zemljišta. Farissi et al. (2014) su pokazali da je rast rizobijalnih izolata poreklom iz korenskih kvržica lucerke ograničen ili smanjen na koncentracijama NaCl većim od 2%. U našem istraživanju, većina izolata iz lucerke pokazala je sposobnost rasta na koncentraciji NaCl od 3%, dok je skoro 50% rizobijalnih izolata raslo pri koncentraciji NaCl od 4%. Takođe, Farissi et al. (2014) su detektovali rast pojedinih izolata i na koncentracijama NaCl od 10%, a sposobnost njihovog rasta su objasnili akumulacijom zaštitnih organskih osmolita (aminokiseline ili ugljeni hidrati) unutar bakterijskih ćelija, koje imaju ulogu u održavanju turgora ćelije. Od nerizobijalnih izolata poreklom iz lucerke, izolati *B. mojavensis* L3, *B. megaterium* PLK3Ah i PLR2Ah i *B. thuringensis* 4.3, 6.1 i 1.5 pokazali su toleranciju na najveće testirane koncentracije NaCl (6%). Izolat L3 je rastao pri koncentracijama NaCl čak i do 10%. Kim et al. (2015) pokazali su da vijabilnost ćelija *B. mojavensis* nije promenjena pri koncentracijama NaCl do 9%. U našem istraživanju, od nerizobijalnih izolata iz žutog zvezdana, izolat *B. megaterium* DZK1Bh imao je najbolji rast pri koncentraciji od 6% NaCl, dok je rast ovog izolata detektovan i pri koncentraciji od 10%. Akcay & Kaya (2019) dokazali su sposobnost ove vrste da raste i pri koncentracijama NaCl do 20%. Generalno, rizobijalni iz zvezdana bili su osetljiviji na koncentracije NaCl veće od 4%, u poređenju sa izolatima iz lucerke. Naše istraživanje je potvrdilo prisustvo pojedinih izolata otpornih na visoke koncentracije NaCl (i do 10%) iz korenskih kvržica lucerke i zvezdana na teritoriji Srbije.

Osim zaslanjenosti zemljišta, pH reakcija zemljišta predstavlja ograničavajući faktor za rast bakterija. Farissi et al. (2014) pokazali su da samo 11% rizobijalnih izolata iz korenskih kvržica lucerke može da preživi pri pH 4, što je manji broj u poređenju sa rezultatima našeg istraživanja (25%). U istom istraživanju rizobijalni izolati imali su najbolji rast pri pH od blago kisele ka alkalnoj, što je u skladu sa našim rezultatima, dok je na pH 9 u našem istraživanju zabeležen slabiji rast rizobijalnih izolata. Slični rezultati zabeleženi su i u istraživanju sprovedenom od strane Latrach et al. (2017). Od nerizobijalnih izolata iz lucerke, izolat *B. mojavensis* L3 pokazao je najbolju toleranciju na visoke pH vrednosti (pH 9). U našem istraživanju, nije se mogla uočiti korelacija za sve izolate između pH vrednosti zemljišta sa kog su kvržice uzorkovane i njihove tolerancije na te pH vrednosti. Ovo se može se objasniti pojavom da su uslovi sredine u rizosferi korena najčešće različiti od uslova u okolnom zemljištu (uključujući i pH vrednost zemljišta), zbog lučenja različitih supstanci od strane korenovog sistema (Hinsinger et al., 2003). *Mesorhizobium* spp. imaju važne PGP osobine koje im omogućavaju da ublaže biotički i abiotički stres i da poboljšaju rast biljaka u nepovoljnim uslovima životne sredine (Granada et al. 2014; Vieira et al. 2017; Sujkowska-Rybkowska et al., 2020). Nekoliko studija potvrdilo je da vrste roda *Mesorhizobium* mogu tolerisati nizak pH (Correa et al., 1999; Rickert et al., 2000; Brigido & Oliveira, 2012). Laranjo & Oliveira (2010) su pokazali da je *Mesorhizobium* sp. izolovan iz *L. corniculatus* bio tolerantan na stres kiselosti pri pH 5. Rejii et al. (2014) pokazali su da svi rizobijalni izolati poreklom iz kvržica žutog zvezdana imaju sposobnost rasta na pH između 5,5 i 9. U našem istraživanju, nerizobijalni izolati poreklom iz žutog zvezdana pokazali su bolju toleranciju na najniže testirane pH vrednosti u odnosu na izolate iz lucerke. Međutim, manji broj izolata rastao je na najvećim testiranim pH vrednostima. Ovi rezultati ukazali su da bi nerizobijalni izolati iz zvezdana bili pogodniji za primenu na kiselim zemljištima, u odnosu na izolate iz lucerke.

Slično kao i u našem istraživanju, Latrach et al. (2017) zaključili su da je rast rizobijalnih izolata iz lucerke najbolji pri temperaturi od 28 °C, dok je većina rizobija mogla da raste i do 37 °C. Visoke temperature utiču na procese formiranja i funkcionisanja nodula, a samim tim i na sposobnost fiksiranja azota. Najčešći problem je dehidracija i degradacija enzima metaboličkog puta bakterija na visokim temperaturama, dok na niskim temperaturama može doći i do nereverzibilne inaktivacije ekspresije *nod* gena. Ovo može biti razlog rezultata našeg istraživanja koji su ukazali na odsustvo rasta izolata iz lucerke i žutog zvezdana na temperaturi od 4 °C, kao i na 60 °C, sa izuzetkom nerizobijalnog izolata iz lucerke (*B. mojavensis* L3) čiji je slab rast zabeležen na temperaturi od 60 °C. Kim et al. (2015) su pokazali da je temperatura u opsegu od 20 do 50 °C optimalna za rast bakterija ove vrste, dok je tolerancija na više temperature takođe moguća. U našem istraživanju nerizobijalni izolati iz kvržica žutog zvezdana pokazali su osetljivost na visoke temperature (od 45 °C i 60 °C), ali su zato pokazali visok procenat rasta (83%) na niskoj temperaturi od 16 °C. U poređenju sa ovim izolatima, izolati iz lucerke su bili tolerantniji na temperaturu od 45 °C (15-20% izolata). Ovi rezultati pružaju mogućnost za dalju selekciju sojeva tolerantnih na ekstremne temperature.

Pored ispitivanja tolerancije na nepovoljne uslove životne sredine, ispitivanje diverziteta endofita u pogledu PGP osobina glavni je korak za pravilnu selekciju efikasnih bio-inokulanata. Proizvodnja indolnih jedinjenja i siderofora među *Mesorhizobium* spp. je detektovana u prethodnim istraživanjima (Granada et al. 2014; Menéndez et al., 2020). Takođe, *S. meliloti* je pokazao visok nivo proizvodnje IAA (612 µg ml⁻¹) (Kanaan & Al-Barhavi 2021). I za druge vrste rizobija, *Bradyrhizobium* spp. i *Rhizobium* spp, je pokazano da su efikasni proizvođači IAA (Kiruthika & Arunkumar, 2021). Takođe, bakterije korenskih kvržica su sposobne za proizvodnju različitih tipova siderofora (Carson et al. 2000, Datta et al. 2014). Sposobnost solubilizacije fosfata je važno svojstvo mnogih rizobijalnih i nerizobijalnih PGP bakterija (Halder & Chakrabarty 1993; Rodrigez et al., 2006). Nativni sojevi *P. putida* sposobni su za solubilizaciju fosfata i proizvodnju IAA, što posledično povećava masu korena i izdanaka biljke, kao i kvalitet biljnog etarskog ulja (Santoro et al., 2015). U našem istraživanju, veći procenat izolata poreklom iz korenskih kvržica lucerke (22%) pokazao je sposobnost produkcije siderofora, dok je za veći broj izolata iz korenskih kvržica žutog zvezdana (18%) pokazano da su solubilizatori fosfata i producenti IAA (55%). Nerizobijalni izolati poreklom iz obe biljne vrste pokazali su bolju sposobnost produkcije siderofora i solubilizacije fosfata, u odnosu

na rizobijalne. Produkcija IAA bila je većinski zastupljena kod rizobiljanih izolata iz korenskih kvržica žutog zvezdana, dok je u slučaju izolata iz lucerke procentualna zastupljenost producenata IAA bila vrlo slična između rizobijalnih i nerizobijalnih izolata, a izolat *Mesorhizobium* sp. 1M12 bio je najefikasniji producent IAA. Bakterije koje solubilizuju fosfate koriste se kao bioinokulanti i zamena za fosforna đubriva u zemljištima sa niskim procentom dostupnog fosfora (Prakash & Arora, 2019). Izolat *B. megaterium* DZK1Bh izdvojio se kao najbolji solubilizator fosfata. Das et al. (2016) su ukazali da vrste roda *Bacillus* izolovane iz rizosfere *Oriza sativa* L. proizvode siderofore, imaju sposobnost solubilizacije fosfata i proizvodnje IAA. Kang et al. (2014) i Abdelmoteleb & Gonzalez-Mendoza, (2020) takođe su dokazali sposobnost *B. megaterium* da vrši solubilizaciju fosfata i sugerisali njegovu primenu u formi bio-fertilizatora. Izolat ZR7Kh bio je najbolji producent siderofora iz žutog zvezdana. Ovaj izolat bio je poreklom iz iste korenske kvržice žutog zvezdana kao i izolati ZR7Gm i ZR7Im2, koji su okarakterisani kao *Serratia plymuthica*. Na osnovu morfologije kolonije, Gram bojenja, kao i sličnih PGP osobina može se pretpostaviti da i ovaj izolat pripada rodu *Serratia*. Poznato je da vrste roda *Serratia* kao što su *S. marcescens* i *S. plymuthica* produkuju siderofore (Weakland et al., 2020; Cleto et al., 2021). Rezultati ovog istraživanja ukazali su na postojanje diverziteta rizobijalnih i nerizobijalnih bakterija unutar korenskih kvržica zvezdana i lucerke u pogledu značajnih PGP osobina i ukazali na potencijal njihove primene u vidu bioinokulanta.

Hidrolitički enzimi koje proizvode endofitne ili rizosferne bakterije imaju veliki značaj u biokontroli različitih vrsta biljnih patogena (Jadhav et al., 2017; Mota et al., 2017). Takođe, bakterijski hidrolitički enzimi pomažu u razgradnji organske materije i time indirektno mogu uticati na promociju rasta biljaka (Durairaj et al., 2017). Egzo- i endohitinaze poreklom iz *B. subtilis* mogu imati veliki potencijal kao prirodni antagonisti fitopatogenih gljiva (*Aspergillus niger*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium solani* i *Rhizoctonia solani*) (Oztupuz et al. 2018). Pokazano je da *B. subtilis* sa sposobnošću produkcije hitinaza, celulaza, ksilanaza i pektinaza ispoljava antagonističko dejstvo prema *Fusarium* spp. u *in vitro* uslovima (Khan et al., 2018). Proteaza iz *Bacillus* sp. doprinela je smanjenju intenziteta bolesti na čili paprici izazvane gljivičnim patogenom *Ralstonia solanacearum* (Prihatiningsih et al., 2021). Huang et al. (2022) pokazali su da amilaza sintetisana od strane *B. cereus* može imati ulogu u kolonizaciji korena biljaka, kao i u biokontroli fitopatogene gljive *R. cerealis*. Dong et al. (2019) su potvrdili da *B. amyloliquefaciens* koji ima sposobnost produkcije celulaza, proteaza i IAA ima antagonistički efekat protiv *Magnaporthe oryzae*. Bacon & Hinton (2011) su ukazali da endofitni soj *B. mojavensis* izolovan iz zrna kukuruza pokazuje snažan inhibitorni potencijal protiv *Fusarium verticillioides*, a Mounia et al. (2014) su detektovali proizvodnju iturina, surfaktina i fengicina kod ove vrste. Krnjaja et al. (2005) i Vasić et al. (2019) istakli su vrste roda *Fusarium* kao jedne od najčešćih gljivičnih patogena biljaka lucerke i žutog zvezdana, te su vrste ovog roda i korišćene za ispitivanje antagonističkog potencijala u ovoj studiji. Izolat *B. mojavensis* L3 iz lucerke bio je efikasan protiv sve tri testirane vrste *Fusarium*. Kako je ovaj izolat bio i najbolji proizvođač svih testiranih litičkih enzima i posedovao je gene za proizvodnju iturina, surfaktina i fengicina, može se pretpostaviti da je produkcija ovih jedinjenja osnov njegovog antifungalnog delovanja. Imajući u vidu da ovi mehanizmi mogu imati aditivni efekat na PGP potencijal, dodatne osobine izolata L3 treba dalje istraživati. Takođe, ispitivanje antagonističkog delovanja ovog izolata prema drugim najčešćim gljivičnim patogenima dalo bi uvid u potencijal njegove primene u vidu bio-fungicida šireg spektra delovanja.

Rizobijalni izolati, tolerantni na pH 5, uključujući acidotolerantne *Mesorhizobium* sp., *Ensifer* spp. i *Rhizobium* sp. pokazali su potencijal da se koriste kao visoko efikasni inokulanti za povećanje prinosa leguminoza gajenih na kiselim zemljištima (Lindstrom and Milliniemi, 1987; Brígido et al., 2007; Stajković-Srbinić et al., 2015a,b). Stoga je u ogledu u saksijama sa kiselim zemljištem ispitan uticaj efikasnih sojeva *Mesorhizobium* sp. otpornih na niske vrednosti pH i sa drugim PGP osobinama, na prinos i koncentracije nutrienata žutog zvezdana. U dvogodišnjem ogledu, tretmani su povećali SDW biljaka žutog zvezdana u proseku za 59 do 72% u poređenju sa kontrolom. Porast SDW od gotovo 100% ostvaren je u tretmanu sa *Mesorhizobium* sp. U1C, dok se procenat azota u biljci nije razlikovao od tretmana mineralnim đubrenjem (ØN). Slično, tretman sa *Mesorhizobium* sp.

754, povećao je SDW za 86%, dok se procenat azota nije razlikovao od tretmana ØN. Sve ovo ukazuje na visoku efikasnost fiksiranja azota odabranih sojeva u kiselom zemljištu. Granada et al. (2014) su pokazali da inokulacija *L. corniculatus* nativnim rizobijalnim sojevima značajno povećava SDW biljaka i procenat azota u poređenju sa kontrolom sa đubrivom. Muleta et al. (2017) su pokazali da tretman sa rizobijalnim inokulantom značajno povećava sadržaj azota u biljkama soje koje se uzgajaju u kiselom zemljištu i sugerisali da je odabir rizobije otporne na nisku pH zemljišta jedna od strategija koja može značajno povećati performanse soje u ovim zemljištima. Stajković-Srbinić et al. (2015a) su pokazali da je inokulacija sa *R. leguminosarum* bv. *trifolii* značajno povećavala masu crvene deteline uzgajane u veoma kiselom zemljištu (pH 4,38), kao i sadržaj N, Mg, Fe, Mn i Cu u biljkama. Rezultati našeg istraživanja ukazali su da izolati sa PGP osobinama i koji su tolerantni na niske pH vrednosti, mogu biti pogodni za primenu u kiselim zemljištima.

Svi primenjeni bakterijski tretmani povećali su procenat azota u biljkama žutog zvezdana u poređenju sa netretiranom kontrolom. Takođe, usvajanje azota (mg saksija^{-1}) je povećano svim primenjenim bakterijskim tretmanima (osim 1M12), što ukazuje na njihovu efikasnost u fiksaciji azota. Procenat N u inokulisanim tretmanima kretao se od 3,52% (tretman 754) do 4,19% (tretman 1M12). Može se primetiti da su najveće vrednosti procenta azota zabeležene za tretman *Mesorhizobium* sp. 1M12 koji je imao najniže vrednosti SDW, u poređenju sa ostalim bakterijskim tretmanima. Razlog može biti pojava da usled povećanja biljne mase, koji je uzrokovan delovanjem bakterijske inokulacije, usvajanje elemenata ne prati proporcionalno rast biljke (“efekat razblaženja”). Ovo dovodi do veće koncentracije elemenata u biljkama sa manjim SDW vrednostima. Slična zapažanja data su i od strane drugih autora (Hungria et al. 2010., Song et al., 2020). *Mesorhizobium* sp. 1M12 bio jedan od najefikasnijih sojeva u azotofiksaciji pod optimalnim uslovima u epruvetama (Knežević et al., 2022). Niske vrednosti SDW biljaka tretiranih ovim izolatom mogu biti uzrokovane sporijom stopom rasta ovog soja na pH 4,5-5,5. Takođe, efikasnost azotofiksacije u eksperimentalnim uslovima može se značajno razlikovati od one u realnim uslovima zemljišta, na šta utiču različiti faktori životne sredine, kao što je tekstura zemljišta, vlažnost, eksudati korena i složene interakcije sa mikrobijalnom zajednicom zemljišta.

Koncentracije pojedinih mikro- i makroelemenata su bile povećane ili smanjene u zavisnosti od elementa ili otkosa u odnosu na kontrolu u ovom ogledu. Bez obzira na promene u koncentracijama nutrijenata, one su bile na optimalnom ili dovoljnom nivou (Kabata-Pendias, 2010). Sadržaj Fe u našim istraživanjima bio je veći od optimalnog, što je u skladu sa njegovim visokim sadržajem u korišćenom zemljištu (Kabata-Pendias, 2010). Vučković et al. (2006) su zabeležili niži sadržaj Zn u autohtonim populacijama biljaka žutog zvezdana sakupljenih u Srbiji i Bosni i Hercegovini u odnosu na naše istraživanje. Ista studija je pokazala i manji sadržaj Cu u poređenju sa našim rezultatima, dok su vrednosti za Fe i Mn generalno bile veće. Koncentracije makroelemenata bile su u skladu sa prethodnim istraživanjima (Kirsch & Jantzon, 2009). Takođe, rezultati do kojih su došli Vučković et al. (2006) bili su uporedivi sa našim za sadržaj Mg i Ca u autohtonim biljkama žutog zvezdana, dok su sadržaji P i K generalno viši u našem istraživanju. Pored toga, u proseku, sadržaj Ca, P i Mg je bio veći u našoj studiji od rezultata dobijenih od strane Koutsoukisa et al. (2019) za biljke žutog zvezdana koje se uzgajaju u Grčkoj. Naši rezultati su potvrdili da se prinos i sastav nutrijenata biljaka žutog zvezdana gajenih u kiselom zemljištu može poboljšati odabirom i primenom efikasnih nativnih mezorizobijalnih sojeva (tolerantnih na niske pH vrednosti), što ukazuje na njihovu potencijalnu upotrebu u formi bio-inokulanata za uzgoj žutog zvezdana u kiselom zemljištu.

Prvi ogled u saksijama potvrdio je pozitivan uticaj rizobijalne inokulacije na leguminozne biljke, u ovom slučaju žuti zvezdan. Ranije je potvrđeno da inokulacija različitim nerizobijalnim PGP bakterijama (*Bacillus* spp., *Klebsiella* spp., *Azotobacter* spp., itd.) može poboljšati rast nekih trava (kukuruz, pirinač, ježevica) i leguminoza (lucerka) (Stajković et al. 2009; Stajković-Srbinić et al. 2016; Noori et al. 2018). Takođe, rizobijalni sojevi mogu promovisati rast neleguminoznih biljaka, kao što su pšenica, pirinač, ječam itd. (Souza et al. 2013; Mehnoob et al. 2012). Kao što je prethodno napomenuto, smeše leguminoza i trava od velikog su značaja za stočnu ishranu. Zbog toga, drugi ogled u saksijama postavljen je u cilju praćenja uticaja inokulacije rizobijalnim i nerizobijalnim sojevima na rast i hemijski sastav biljaka žutog zvezdana, ježevice i njihove smeše u kiselom

zemljištu. Prinos (SDW) i ukupan sadržaj azota u obe ispitivane biljne vrste su povećani nakon tretmana sa *B. megaterium* DZK1BH i *Mesorhizobium* sp. 631oz, pojedinačno ili u koinokulaciji. Bakterijski tretmani su povećali SDW biljaka žutog zvezdana za 59%-83%, ježevice za 24%-50% i njihove smeše za 37%-49%, u poređenju sa kontrolom. Rezultati koji ukazuju da *B. megaterium* DZK1BH pozitivno utiče na rast žutog zvezdana, dok je *Mesorhizobium* sp. 631oz imao pozitivan efekat na ježevicu, što odgovara prethodnim studijama (Swarnalakshmi et al. 2020). Ranije je pokazano da nerizobialni sojevi *Klebsiella* sp. i *Kosakonia covanii* izolovani iz korenskih kvržica lucerke mogu značajno povećati rast lucerke i obezbediti adekvatan sadržaj azota u (Noori et al. 2018). Takođe, nerizobijalni endofitni sojevi *B. megaterium* iz kvržica lucerke su poboljšali rast lucerke u prisustvu i odsustvu rizobijalnog soja (Stajković et al., 2009). Sharma et al. (2017) su pokazali da konzorcijum koga čine *B. megaterium*, *P. fluorescens* i *A. chroococcum* značajno mogu poboljšati rast biljaka.

Najveći porast SDW zabeležen je u koinokulaciji, i to za ježevicu (50%) i žuti zvezdan (80%). Prethodno je pokazano da inokulacija ježevice sa *A. chroococcum* ili sa *A. chroococcum* + *B. megaterium* može značajno povećati SDW, takođe u kiselom zemljištu (Stajković-Srbinović et al., 2016). Khalifa & Almalki (2015) su pokazali da inokulacija sa *B. megaterium* koji solubilizuje fosfate i proizvodi hitinazu (izolovan iz korenskih kvržica lucerke) i *S. meliloti* imaju pozitivan efekat na rast drugih leguminoza. Inokulacija lucerke sa *B. megaterium* i sa *S. medicae* je poboljšala rast i povećala stepen tolerancije biljaka na visoke koncentracije soli (Chinnaswayi et al., 2018). U slučaju smeše žutog zvezdana i ježevice, prethodno je dokazano da inokulacija lucerke sa *R. meliloti* i ježevice sa *Beigerinckia* sp. i *Azospirillum* sp., povećava prinos biljne mešavine za 24,5% (Dragomir & Mojsuc, 2007). Slično, u našem istraživanju smo detektovali povećane SDW vrednosti nakon tretmana pojedinačnim izolatima ili koinokulacijom. Prinos (SDW) žutog zvezdana u mešavini bio je oko 50% manji u odnosu na SDW biljaka gajenih u monokulturi. Međutim, SDW ježevice u smeši bila je slična ili veća nego u monokulturi.

Poređenjem efekta inokulacije biljaka žutog zvezdana sa *Mesorhizobium* sp. 631oz u oba ogleđa u saksijama (sličnih hemijskih osobina zemljišta – kiselo zemljište) može se zaključiti da je ovaj izolat imao pozitivan uticaj na rast zvezdana u oba testirana zemljišta. Iako je prinos (SDW) žutog zvezdana pod uticajem inokulacije ovim izolatima bio manji u drugom ogleđu, u oba tipa zemljišta inokulacija je indukovala povećanje SDW u odnosu na kontrolu. Takođe, efekat ovog izolata na procenat azota u biljnom materijalu bio je veoma sličan u oba ogleđa. Ovo ukazuje na ujednačen efekat ovog izolata na povećanje sadržaja azota u biljkama zvezdana, u uslovima kiselog zemljišta. Takođe, u pogledu hemijskog sastava biljaka žutog zvezdana, mezorizobijalna inokulacija obezbedila je sadržaj mikro- i makroelemenata u biljnom materijalu koji je bio u dozvoljenim granicama (Kabata-Pendias, 2010).

Ogled u polju postavljen je u cilju praćenja efekta inokulacije lucerke, ježevice i njihove smeše izolatima iz korenskih kvržica lucerke na aluvijalnom zemljištu, sa povišenim koncentracijama Ni, Cr i Pb. Pokazano je da je nabolji efekat na ukupni prinos lucerke, ježevice i njihove smeše imao tretman koinokulacijom *S. meliloti* L4 + *B. megaterium* DLK2Eh. Procenat azota u biljkama lucerke, ježevice i njihove smeše varirao je u zavisnosti od tretmana i biljne vrste. Tretman sa *S. meliloti* L4 dao je najveće ukupne vrednosti procenta azota u biljkama lucerke, tretman sa *S. meliloti* L4 + *B. megaterium* DLK2Eh u biljkama ježevice, dok je najveći procenat azota u smeši zabeležen pod delovanjem tretmana sa *B. megaterium* DLK2Eh. Rezultati dvogodišnjeg ogleđa ukazali su da inokulacija lucerke sa *S. meliloti* povećava SDW, u odnosu na neinokulisane biljke što je u skladu sa rezultatima Delić et al. (2016). Khalifa & Almalki (2015) potvrdili su da inokulacija lucerke sa *B. megaterium* ili *S. meliloti* povećava dužinu korena, broj bočnih korenova i SDW, u poređenju sa neinokulisanim biljkama (u saksijama, pod gnotobiotičkim uslovima). Inokulacija biljaka italijanskog ljulja sa *S. meliloti* imala je pozitivan uticaj na rast lucerke koja je bila gajena kao sledeći usev na istom zemljištu (Delić et al., 2013a, Delić et al., 2012). Takođe, biljke lucerke inokulisane sa *S. meliloti* + *Bacillus* sp., imale su bolje parametre rasta i razvića korena, veći SDW, kao i broj korenskih kvržica, u poređenju sa neinokulisanom kontrolom (Guiñazú et al., 2009). Stajković-Srbinović et al. (2017) pokazali su da inokulacija lucerke sa *Sinorhizobium* + *Bacillus* spp. povećava SDW biljaka i

povećava procenat azota u inokulisanim biljkama, čije su vrednosti bile slične onim dobijenim u našem istraživanju. Chinnaswamy et al. (2018) pokazali su da inokulacija lucerke sa *S. medicae* + *B. megaterium* daje bolje vrednosti parametara rasta biljke (SDW) u poređenju sa samostalnom inokulacijom ovim sojevima. Takođe, u istom istraživanju pokazano je da inokulacija lucerke sa *B. megaterium* povećava tolerantnost biljaka na stres saliniteta. Takođe, Daur et al. (2018), utvrdili su da inokulacija lucerke sa *Bacillus* sp. povećava sadržaj azota u biljkama, SDW i visinu biljaka, kao i sadržaj hlorofila a i b. Dalje, pokazano je da inokulacija sa *B. megaterium* utiče na povećanje SDW i sadržaja hlorofila a i b u biljkama lucerke (Soltani Alikooyi et al., 2020).

Postoje podaci da je nivo fiksacije azota u biljkama u pozitivnoj korelaciji sa proizvodnjom bakterijske IAA (Defez et al., 2017). U našem istraživanju nerizobijalni izolati *B. megaterium* DZK1Bh (ogled u saksijama) i DLK2Eh (ogled u polju) proizvodili su IAA u *in vitro* uslovima. U ogledu u saksijama i poljskom ogledu inokulacija biljaka žutog zvezdana ili lucerke ovim izolatima dala je vrednosti sadržaja azota koje su bile u nivou inokulacije rizobijalnim azotofiksirajućim sojevima (631oz ili L4). Produkcija IAA od strane ovih nerizobijalnih sojeva mogla bi biti osnov povećanog sadržaja azota u tretiranim biljkama. Osim sadržaja azota, inokulacija IAA produkujućim bakterijama ima i indirektan efekat na povećanje nadzemne biomase biljaka, omogućavanjem unosa svih neophodnih hranljivih elemenata iz zemljišta (Emami et al., 2018). Dokazano je da produkcija IAA indirektno može uticati na povećanje usvajanja nutrijenata iz zemljišta kroz izduživanje korenovog sistema biljaka (Spaepen et al., 2007).

Koncentracije mikro- i makroelemenata u biljnom materijalu su varirale u zavisnosti od primenjenog tretmana, biljne vrste i godine ogleda. Primećeno je da je u biljkama lucerke (u prvoj godini ogleda) koncentracija Cr i Ni u kontroli bez inokulacije bila u opsegu povišenih do toksičnih. Pod dejstvom inokulacije lucerke sa *S. meliloti* L4 došlo je do smanjenja koncentracije Cr na dozvoljene vrednosti, dok su u slučaju Ni svi primenjeni tretmani smanjili koncentracije na nivo dozvoljenih vrednosti datim u Kabata-Pendias, 2010). Tretmani ježevice sa *S. meliloti* L4 i *B. megaterium* DLK2Eh indukovali su smanjenje koncentracije Cr na nivo dozvoljenih. Inokulacija lucerke bakterijskim sojevima koji proizvode IAA i siderofore pozitivno je uticala na parametare rasta biljaka u medijumima kontaminiranim teškim metalima (Yahaghi et al., 2019). Takođe, rast korena i/ili izdanaka lucerke bio je značajno stimulisan inokulacijom sa *B. filamentosus*. Ovi autori su pokazali da *B. filamentosus* i *B. cereus* nude veliki potencijal za promociju rasta biljaka i akumulacije metala, što ih čini dobrim kandidatima za primenu u zemljištima kontaminiranim teškim metalima. Slični rezultati dobijeni su u istraživanju Li et al. (2021), gde je utvrđeno da inokulacija lucerke sa *B. subtilis* indukuje povećanje usvajanja Cd, kao i povećanje SDW biljaka od 29,4%. Inokulacija lucerke sa *Paenibacillus mucilaginosus* + *S. meliloti* u zemljištu kontaminiranom Cu smanjila je akumulaciju Cu u tretiranim biljkama u poređenju sa kontrolom (Ju et al., 2020). Inokulacija lucerke sa *S. meliloti* i *Agrobacterium tumefaciens* poboljšala je fitoekstrakciju metala povećanjem rasta biljaka i antioksidativnih aktivnosti pod Cu/Zn stresom, što pruža novi pristup bioremedijaciji u zemljištu kontaminiranom teškim metalima (Jian et al., 2019).

Sessitsch et al. (2013) su sugerisali da bakterijska inokulacija različitih biljnih vrsta u zemljištima sa povećanom koncentracijom teških metala dovodi do povećanja biljne mase. Povećanje biljne mase u ovim uslovima su objasnili kroz produkciju bakterijskih jedinjenja kao što su IAA, siderofore i ACC deaminaze. Saran et al. (2020) su sugerisali da inokulacija različitim sojevima može povećati ili smanjiti usvajanje mikroelemenata u zavisnosti od bakterijske ili biljne vrste, kao i interakcije bakterijskog inokuluma sa postojećom mikroflorom zemljišta. U oba slučaja, autori su istakli važnost PGP osobina izolata i njihovu potencijalnu povezanost sa usvajanjem mikroelemenata. U našem istraživanju izolat *B. megaterium* DLK2Eh imao je pozitivan uticaj na povećanje prinosa obe biljne vrste korišćene u ogledu u polju (lucerka, ježevica i njihova smeša). Kako je ovaj izolat pokazao sposobnost produkcije IAA i siderofora, moguće je da su ove PGP osobine bile zaslužne za povećanje prinosa biljaka u zemljištu sa povećanom koncentracijom Ni, Cr i Pb. Osim uloge u biokontroli gljivičnih izazivača bolesti biljaka i indukovanju sistemske rezistencije biljaka, bakterijske siderofore mogu imati ulogu i u povećanju mobilnosti i biodostupnosti mikroelemenata iz zemljišta (Aznar & Dellagi, 2015). Pokazano je da osim helacije Fe, siderofore mogu imati afinitet

i za druge elemente kao što su Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb i Zn (Ahmed et al., 2014). Afinitet siderofora za ove elemente uslovljen je stabilnošću njihovog kompleksovanja sa određenim elementom. Takođe, u uslovima povećane koncentracije teških metala u zemljištu može doći do oksidativne degradacije IAA. Međutim, pokazano je da bakterijska inokulacija sojevima koji produkuju siderofore može smanjiti nivo degradacije IAA (Seneviratne & Vithanage, 2015). Mehanizam ove pojave još je nejasan i nedovoljno istražen, ali ukazuje na dvojakom ulogu inokulacije sojevima koji produkuju siderofore (chelacija Fe i drugih elemenata i indirektan efekat na koncentraciju IAA). Oba nerizobijalna izolata korišćena za postavku ogleada u saksijama i polju imala su sposobnost produkcije siderofora. Takođe, oba izolata imala su uticaj na usvajanje mikroelemenata u odnosu na neinokulisanu kontrolu. Može se pretpostaviti da su bakterijske siderofore bile jedan od mehanizama koji su omogućili poboljšanje nutritivnog sastava tretiranih biljaka.

Potvrđeno je da produkcija volatilnog jedinjenja N,N-dimetilheksadecilamina (DMHA) od strane bakterija (*S. meliloti* ili *P. fluorescens*) može indukovati odgovore biljke koji se aktiviraju u uslovima deficijencije Fe u zemljištu (Singh et al., 2022). Takođe, usvajanje Cu i Fe je u biljkama lucerke poboljšano inokulacijom sojevima *P. fluorescens* i *R. leguminosarum* koji produkuju siderofore (Singh et al., 2022). Poznato je da različite vrste *Pseudomonas* spp. i *Bacillus* spp. poboljšavaju rast biljaka u uslovima niske koncentracije biodostupnog Zn u zemljištu, a mehanizam povećavanja biodostupnosti ovog nutrijenta omogućen je sekvestracijom Zn uz pomoć siderofora (Kamran et al. 2017). Uticaj bakterijske inokulacije na održanje homeostaze Ni u biljkama najčešće je posredovan smanjenjem unosa teških metala i/ili povećanjem tolerancije biljaka na toksičnost jona metala (Singh et al., 2022). Inokulacija biljaka sa *Bacillus* spp. povećava sadržaj P i Ca i smanjuje akumulaciju Ni u biljkama koje se gaje u zemljištu kontaminiranom sa Cd. *Bacillus* spp. ublažavaju ovaj efekat stresa povećanjem sinteze amilaze i proteaze radi promovisanja rasta biljaka u zemljištu zagađenom teškim metalima (Pandey et al., 2013). Izolat *B. megaterium* DLK2Eh imao je sposobnost produkcije amilaze, što je potencijalno uslovljeno njegovim dobrom efektom na povećanje prinosa biljaka u zemljištu sa viškom Ni, Cr i Pb. Iako je evidentno da pod uticajem bakterijske inokulacije dolazi do regulacije biljnih gena koji učestvuju u usvajanju elemenata iz zemljišta, ostaje uglavnom nejasno koji bakterijski faktori indukuju regulaciju transkripcije u biljci, a samim tim i kako se regulacija pokreće na molekularnom nivou (Singh et al., 2022). Koncentracije makroelemenata bile su promenljive u zavisnosti od tretmana, biljne vrste i godine otkosa. Utvrđeno je da inokulacija lucerke sa konzorcijumom sojeva *B. cereus*, *B. altitudinis*, *Comamonas* sp. i *Stenotrophomonas maltophilia* ima pozitivan uticaj na usvajanje Ca, Mg, K i Na (Shahzad et al., 2020). Takođe, bakterijska inokulacija može uticati i na povećanje usvajanja P iz zemljišta koja su deficijentna u ovom elementu. Bakterije stimulišu usvajanje P kroz povećanje transkripcije gena koji kodiraju za membranske transportere P na još dovoljno neizučeni način (Singh et al., 2020).

Istraživanja bakterija iz korenskih kvržica žutog zvezdana i lucerke na teritoriji Srbije ukazalo je na postojanje diverziteta autohtonih sojeva sa dobrim potencijalom za poboljšanje rasta biljaka. Pokazano je da inokulacija rizobijalnim sojevima pozitivno utiče na prinos leguminoza (lucerka i žuti zvezdan), trava (ježevica) i njihove smeše. Od posebnog je značaja što je poboljšanje rasta ovih biljaka pod uticajem inokulacije bilo evidentno u zemljištima niske produktivne sposobnosti. Na osnovu ovoga, može se zaključiti da bi primena pravilno selektovanih PGP bakterija (rizobijalnih i nerizobijalnih) mogla značajno poboljšati rast leguminoza i neleguminoza u kiselim zemljištima. Dalja istraživanja biljaka, bakterija i zemljišta, kao neraskidive celine, trebalo bi da budu usmerena ka razumevanju složenih mehanizama kojima bakterije utiču na promenu nutritivnog sastava biljaka u različitim tipovima zemljišta. Razumevanje ovih mehanizama dovešće do otvaranja mogućnosti za formulisanje novih mikrobioloških preparata za poboljšanje rasta biljaka koji se na ekološki i ekonomski prihvatljiv način mogu koristiti u savremenoj poljoprivredi.

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

1. Sa 24 lokaliteta na teritoriji Srbije izolovana su 152 bakterijska izolata iz korenskih kvržica lucerke i žutog zvezdana, od čega 64 iz kvržica lucerke i 88 iz kvržica žutog zvezdana.
2. Od 72 izolata preliminarno okarakterisana kao rizobijalni, njih 29 pokazalo je sposobnost nodulacije lucerke ili žutog zvezdana, pri reinokulaciji.
3. Nerizobijalni izolati poreklom iz kvržica lucerke i zvezdana dominantno su pripadali rodu *Bacillus*. Izolati iz lucerke su okarakterisani i kao pripadnici rodova *Serratia*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Bosea* i *Agrobacterium*, a od izolata iz zvezdana, detektovano je i prisustvo vrsta iz rodova *Paenibacillus* i *Pseudomonas*.
4. Rizobijalni izolati iz žutog zvezdana identifikovani su kao pripadnici roda *Mesorhizobium*, a iz lucerke kao *Sinorhizobium medicae* i *S. meliloti*.
5. Rizobijalni izolati (GNOV4, 10-2BM, GV2-1 i DLM1Bm) iz lucerke dali su vrednosti suve nadzemne mase (SDW) i procenta azota značajno veće od neinokulisane kontrole. Devet izolata iz žutog zvezdana su okarakterisani kao visoko-efikasni u azotofiksaciji (na osnovu SDW) i sa značajno većim procentom azota u odnosu na neinokulisanu kontrolu.
6. Nerizobijalni izolati iz žutog zvezdana pokazali su bolju toleranciju na najniže testirane pH vrednosti i manju toleranciju na najviše testirane pH vrednosti, u odnosu na izolate iz lucerke. Veći procenat rizobijalnih izolata iz žutog zvezdana imao je sposobnost rasta na najnižim testiranim pH vrednostima. Nerizobijalni izolati iz žutog zvezdana imali su slabiji rast na većim koncentracijama NaCl, u poređenju sa izolatima iz lucerke. Nisu primećene značajne razlike u tolerantnosti izolata na različite temperature u zavisnosti od biljne vrste iz koje su izolovani.
7. Produkcija siderofora detektovana je kod 22% izolata iz lucerke i 17% izolata iz zvezdana (većinom nerizobijalni izolati). Od testiranih izolata iz lucerke, samo 11% je pokazalo sposobnost solubilizacije fosfata, a iz zvezdana 18%. Preko 50% izolata iz lucerke (53%) i iz žutog zvezdana (55%) pokazalo je određen nivo produkcije IAA.
8. Od svih testiranih izolata, samo 17 nerizobijalnih je pokazalo antifungalno dejstvo prema bar jednom fungalnog patogenu (*F. oxysporum*, *F. graminearum* ili *F. proliferatum*). Izolat *B. mojavensis* L3 pokazao je najbolji antifungalni efekat, sa procentom inhibicije rasta većim od 30% prema svim testiranim patogenima. Pokazano je da isti izolat poseduje gene za produkciju fengicina, surfaktina i iturina C.
9. Ukupno 29 izolata (nerizobijalnih) pokazalo je mogućnost produkcije hidrolitičkih enzima kao što su celulaze, hitinaze, proteaze, amilaze, lipaze i pektinaze (17 izolata iz lucerke i 12 iz žutog zvezdana). Izolat *B. mojavensis* L3 izdvojio se kao najznačajniji jer je proizveo sve navedene enzime.
10. Svi primenjeni bakterijski tretmani povećali su SDW biljaka žutog zvezdana, u ogledu u polukontrolisanim uslovima u kiselom zemljištu (pH 5,4). Tretmani sa *Mesorhizobium* sp. 754 i *Mesorhizobium* sp. U1C dali su najveće vrednosti SDW. Takođe, svi bakterijski tretmani imali su pozitivan uticaj na povećanje procenta azota u biljkama žutog zvezdana tokom druge godine ogleda, dok je procenat azota u prvoj godini bio veći od neinokulisanih biljaka samo pri inokulaciji sa *Mesorhizobium* sp. 631oz. Bakterijski tretmani su uticali na koncentraciju

mikro- i makroelemenata u zavisnosti od tretmana i sezone i njihov sadržaj je bio zadovoljavajući.

11. Inokulacija žutog zvezdana i ježevice pojedinačnim rizobijalnim (*Mesorhizobium* sp. 631oz) i nerizobijalnim izolatima (*B. megaterium* DZK1Bh), kao i njihovom koinokulacijom, imala je pozitivan uticaj na povećanje SDW zvezdana gajenog u polukontrolisanim uslovima, u kiselom zemljištu (pH 5,37). Ukupan sadržaj azota, u slučaju obe biljne vrste, bio je povećan inokulacijom svim bakterijskim izolatima. Koncentracije mikro- i makroelemenata u biljnom materijalu zavisile su od biljne vrste i od načina gajenja (monokultura ili smeša) i bile su u opsegu zadovoljavajućih.
12. Inokulacija lucerke, ježevice i njihove smeše izolatima *B. megaterium* DLK2Eh i *S. meliloti* L4 i koinokulacija ovim izolatima imala je pozitivan uticaj na povećanje suve biljne mase u ogledu u polju, u zemljištu sa povećanom koncentracijom Ni, Cr i Pb. Najbolji efekat na povećanje procenta azota u biljkama lucerke, u odnosu na neinokulisane kontrole, imali su tretmani sa *S. meliloti* i koinokulacija.
13. Koncentracije mikro- i makroelemenata varirale su u zavisnosti od biljne vrste, godine ogleda i otkosa, kao i od primenjenog tretmana. Koncentracije Co, Cr, Ni i Pb u biljnom materijalu bile su smanjene pod uticajem svih bakterijskih tretmana, u odnosu na neinokulisane kontrole.
14. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na postojanje autohtonih sojeva u zemljištima Srbije koji pozitivno utiču na prinos lucerke, žutog zvezdana, ježevice i njihove smeše u zemljištima niskih produktivne osobina, a posebno u kiselim zemljištima. Odabrani sojevi predstavljaju potencijalne bio-inokulante koji bi se koristili u poljoprivrednoj proizvodnji ispitivanih biljnih kultura.

7. LITERATURA

7. LITERATURA

- Abd El-Rahman, A. F., Shaheen, H. A., Abd El-Aziz, R. M., Ibrahim, D. S. S. (2019). Influence of hydrogen cyanide-producing rhizobacteria in controlling the crown gall and root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 29, 41.
- Abdelmoteleb, A., Gonzalez-Mendoza, D. (2020). Isolation and Identification of Phosphate Solubilizing *Bacillus* spp. from *Tamarix ramosissima* Rhizosphere and Their Effect on Growth of *Phaseolus vulgaris* Under Salinity Stress. Geomicrobiology Journal, 1-8.
- Abulfaraj, A., Jalal, R. (2021). Use of plant growth-promoting bacteria to enhance salinity stress in soybean (*Glycine max* L.) plants. Saudi Journal of Biological Science, 28(7), 3823-3834.
- Adesemoye, A. O., Torbert, H. A., Kloepper, J. W. (2009). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. Microbial Ecology, 58, 921-929.
- Adnan, M., Shah, Z., Arif, M., Khan, M., Mian, I., Sharif, M., Alam, M., Basir, A., Ullah, H., Inayat-ur-Rahman, Saleem, N. (2016). Impact of rhizobial inoculum and inorganic fertilizers on nutrients (NPK) availability and uptake in wheat crop. Canadian Journal of Soil Science, 96(2), 169-176.
- Agencija za zaštitu životne sredine. (2015). Izveštaj o stanju zemljišta u Republici Srbiji. http://www.sepa.gov.rs/download/zemljiste/Zemljiste_2015.pdf.
- Ahmad, M., Nadeem, S. M., Zahir, Z. A. (2019). Plant-Microbiome interactions in agroecosystem: An application. In Microbiome in plant health and disease. Springer, Singapore, pp. 251-291.
- Ahmed, E., Holmström, S. J. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. Microbiological Biotechnology, 7(3), 196-208.
- Aiken, G. E., Henning, J. C., Rayburn, E. (2020). Management strategies for pastures, beef cattle, and marketing of stocker-feeder calves in the Upper South: The I-64 Corridor. Management Strategies for Sustainable Cattle Production in Southern Pastures, 227-264.
- Akçay, K., Kaya, Y. (2019). Isolation, characterization and molecular identification of a halotolerant *Bacillus megaterium* CTBMEG1 able to grow on halogenated compounds. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 33(1), 945-953.
- Alejandro, S., Höller, S., Meier, B., Peiter, E. (2020). Manganese in Plants: From Acquisition to Subcellular Allocation. Frontiers in Plant Science, 11.
- Alemu, F. (2016). Isolation of *Pseudomonas fluorescens* from rhizosphere of faba bean and screen their hydrogen cyanide production under in vitro study, Ethiopia. American Journal of Life Sciences, 4(2), 13-19.
- Allaga, H., Bóka, B., Poór, P., Nagy, V. D., Szűcs, A., Stankovics, I., Takó, M., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Kredics, L., Körmöczi, P. A. (2020). Composite Bioinoculant Based on the Combined Application of Beneficial Bacteria and Fungi. Agronomy 10, 1-19.
- Altier, N., Beyhaut, E., Pérez, C. (2013). Root Nodule and Rhizosphere Bacteria for Forage Legume Growth Promotion and Disease Management. Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity, 167-184.
- Ampomah, O. Y., Huss-Danell, K. H. (2011). Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden. Systematic and Applied Microbiology, 34, 267-275.

- Ansari, F. A., Ahmad, I. (2019). Fluorescent *Pseudomonas* -FAP2 and *Bacillus licheniformis* interact positively in biofilm mode enhancing plant growth and photosynthetic attributes. *Scientific Reports*, 9, 4547.
- Antoun, H., Prevost, D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, New York, NY, pp 1-38.
- Arcand, M. M., Schneider, K. D. (2006). Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78:791-807.
- Arfaoui, A., Sifi, B., Boudabous, A., Hadrami, I. E., Chérif, M. (2006). Identification of *Rhizobium* isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, the causal agent of Fusarium wilt of chickpea. *Journal of Plant Pathology*, 88:67-75.
- Aroua, I., Abid, G., Souissi, F., Mannai, K., Nebli, H., Hattab, S., Borgi, Z., Jebara, M. (2019). Identification of two pesticide-tolerant bacteria isolated from *Medicago sativa* nodule useful for organic soil phytostabilization. *International Microbiology*, 22(1), 111-120.
- Aryal, U. K., Xu, H.L., Fujita, M. (2003). Rhizobia and AM fungal inoculation improve growth and nutrient uptake of bean plants under organic fertilization. *Journal of Sustainable Agriculture*, 21(3), 27-39.
- Aznar, A., Dellagi, A. (2015). New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: What can we learn from animals? *Journal of Experimental Botany*, 66(11), 3001-3010.
- Bacon C. W., Hinton D. M. (2011). *Bacillus mojavenensis*: Its Endophytic Nature, the Surfactins, and Their Role in the Plant Response to Infection by *Fusarium verticillioides*. In: *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 233-266.
- Bardin, S. D., Huang, H. C., Pinto, J., Amundsen, E. J., Erickson, R. S. (2004). Biological control of Pythium damping-off of pea and sugar beet by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Canadian Journal of Botany*, 82(3), 291-296.
- Barrett, W., Jones, N., Chu, P., Pohlman, K., Coleman, G., Poole, H., Go, D., Spiva, C., Grith, L., Zwiep, J. (2017). Micronutrients. In: *Agronomy Handbook, Soil and Plant Analysis Resource Handbook*. Midwest laboratories, INC., Omaha, NE, USA.
- Bhattacharjee, R. B., Jourand, P., Chaintreuil, C., Dreyfus, B., Singh, A., Mukhopadhyay, S. N. (2012). Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SN10 promote rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. *Biology and Fertility of Soils*, 48(2), 173-182.
- Biswas, J. C., Ladha, J. K., Dazzo, F. B., Yanni, Y. G., Rolfe, B. G. (2000). Rhizobial Inoculation Influences Seedling Vigor and Yield of Rice. *Journal of Agronomy*, 92, 880.
- Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassan, F., Luna, V. (2007). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 874-880.
- Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Vancanneyt, M., Swings, J., Coutinho, T. (2008). Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Systematic and Applied Microbiology*, 31, 447-460.

- Brígido, C., Oliveira, S. (2012). Most acid-tolerant chickpea mesorhizobia show induction of major chaperone genes upon acid shock. *Microbial Ecology*, 65(1), 145-153.
- BuntiĆ, A., Stajković-Srbinović, O., Knežević, M., Kuzmanović, Đ., Rasulić, N., DeliĆ, D. (2018). Development of liquid rhizobial inoculants and pre-inoculation of alfalfa seeds. *Archives of Biological Sciences*, 71(2), 379-387.
- BuntiĆ, A., Stajković-Srbinović, O., Knežević, M., Kuzmanović, Đ., Rasulić, N., Kuzmanović, Đ., Dimitrijević-Branković, S., DeliĆ, D. (2019). The effect of bacterial isolates from rhizosphere soils on wheat and barley seed germination. *Zemljište i biljka*, 68(2), 1-12.
- BuntiĆ, A., Stajković-Srbinović, O., Knežević, M., Rasulić, N., Ugrenović, V., Kuzmanović, D., DeliĆ, D. (2021). Efficiency of alfalfa seed priming and rhizobial-based liquid inoculants in an Eutric Cambisol. *Zemdirbyste-Agriculture*, 108(4), 339-346.
- Cabot, C., Martos, S., Llugany, M., Gallego, B., Tolrà, R., Poschenrieder, C. A. (2019). Role for Zinc in Plant Defense Against Pathogens and Herbivores. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1171.
- Caddel, J. L., Zhang, H., Wise, K. (2004). Responses of Alfalfa, Red Clover, and White Clover to Soil pH and Lime Treatments. *Forage and Grazinglands*, 2(1), 1-8.
- Camacho-Cristóbal, J. J., Rexach, J., González-Fontes, A. (2005). Boron in plants: deficiency and toxicity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(10), 1247-55.
- Cano-Ramírez, C., Santiago-Hernández, A., Rivera-Orduña, F. N., García-Huante, Y., Zúñiga, G., Hidalgo-Lara, M. E. (2016). Expression, purification and characterization of an endoglucanase from *Serratia proteamaculans* CDBB-1961, isolated from the gut of *Dendroctonus adjunctus* (Coleoptera: Scolytinae). *AMB Express*, 6, 63.
- Carson, K. C., Meyer, J. M., Dillworth, M.J. (2000). Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 11–21.
- Casler, M., Undersander, D. (2019). Identification of Temperate Pasture Grasses and Legumes. *Horse Pasture Management*, 11-35.
- Celandroni, F., Vecchione, A., Cara, A., Mazzantini, D., Lupetti, A., Ghelardi, E. (2019). Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotic formulations. *PLoS One*, 14(5), e0217021.
- Chandra, S., Choure, K., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K. (2007). Rhizosphere competent *Mesorhizobium loti* MP6 induces root hair curling, inhibits *Sclerotinia sclerotiorum* and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 124-130.
- Chinnaswamy, A., Coba de la Peña, T., Stoll, A., de la Peña Rojo, D., Bravo, J., Rincón, A., Lucas, M. M., Pueyo, J. J. (2018). A nodule endophytic *Bacillus megaterium* strain isolated from *Medicago polymorpha* enhances growth, promotes nodulation by *Ensifer medicae* and alleviates salt stress in alfalfa plants. *Annals of Applied Biology*, 172, 295-308.
- Cleto, S., Haslinger, K., Prather, K. L. J., Lu, T. K. (2021). Natural combinatorial genetics and prolific polyamine production enable siderophore diversification in *Serratia plymuthica*. *BMC Biology*, 19, 46.
- Cocking, E. C., Kothari, S. L., Batchelor, C. A., Jain, S., Webster, G., Jones, J., Jotham, J., Davey, M. R. (1995). Interaction of Rhizobia with Non-Legume Crops for Symbiotic Nitrogen Fixation Nodulation. In: *Azospirillum VI and Related Microorganisms*. NATO ASI Series (Series G: Ecological Sciences), vol 37. Springer, Berlin, Heidelberg.

- Contesini, F. J., Melo, R. R., Sato, H. H. (2018). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3), 321-334.
- Correa, O. S., Rivas, E. A., Barneix, A. J. (1999). Cellular envelopes and tolerance to acid pH in *Mesorhizobium loti*. *Current Microbiology*, 38(6), 329-334.
- Crosbie, D. B., Mahmoudi, M., Radl, V., Brachmann, A., Schloter, M., Kemen, E., Marín, M. (2021). The microbiome of *Lotus* nodules varies with plant health in a species-specific manner. *BioRxiv - Microbiology*.
- Ćupina, B., Erić, P., Antanasović, S., Krstić, D., Cabilovski, R., Manojlović, M., Lombnaes, P. (2014). Yield and quality of alfalfa in mixture with grasses in agroecological conditions of Vojvodina. *Letopis Naucnih Radova Poljoprivrednog Fakulteta*, 38(1), 200-209.
- Dahmani, M. A., Desrut, A., Moumen, B., Verdon, J., Mermouri, L., Kacem, M., Coutos-Thévenot, P., Kaid-Harche, M., Bergès, T., Vriet, C. (2020). Unearthing the Plant Growth-Promoting Traits of *Bacillus megaterium* RmBm31, an Endophytic Bacterium Isolated from Root Nodules of *Retama monosperma*. *Frontiers in Plant Sciences*, 11, 124.
- Dary, M., Perez, M. A. C., Palomares, A. J., Pajuelo, E. (2010). *In situ* phytostabilisation of heavy metalpolluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Material*, 177, 323-330.
- Das, K., Prasanna, R., Saxena, A.K. (2017). Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia Microbiologica*, 62(5), 425-435.
- Das, S., Jean, J. S., Chou, M. L., Rathod, J., Liu, C. C. (2016). Arsenite-oxidizing bacteria exhibiting plant growth promoting traits isolated from the rhizosphere of *Oryza sativa* L.: Implications for mitigation of arsenic contamination in paddies. *Journal of Hazardous Materials*, 302, 10-18.
- Datta, B., Chakrabartty, P.K. (2014). Siderophore biosynthesis genes of *Rhizobium* sp. isolated from *Cicer arietinum* L.. *3 Biotech*, 4, 391-401.
- Datta, C., Basu, P. S. (2000). Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*. *Microbiology Research*, 155(2), 123-127.
- Daur, I., Saad, M., Eida, A., Ahmad, S., Shah, Z., Ihsan, M., Muhammad, Y., Sohrab, S., Hirt, H. (2018). Boosting Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Production with Rhizobacteria from Various Plants in Saudi Arabia. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Defez, R., Andreozzi, A., Bianco, C. (2017). The Overproduction of Indole-3-Acetic Acid (IAA) in Endophytes Upregulates Nitrogen Fixation in Both Bacterial Cultures and Inoculated Rice Plants. *Microbial Ecology*, 74(2), 441-452.
- Delić D., Stajković-Srbinović, O., Živković, S., Protić, N., Rasulić, N., Kuzmanović, Đ., Simić, A. (2012). Growth promotion of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum lam.*) by application of plant growth promoting Rhizobacteria. *Zaštita bilja*, 63(2), 93-99.
- Delić, D., Stajković, O., Kuzmanović, Đ., Rasulić, N., Mićanović, D., Radović, J., Tomić, Z. (2010a). Nitrogen fixation of *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis: a five-year field trial. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 26, 601-609.
- Delić, D., Stajković, O., Miličić, B., Kuzmanović, Đ., Rasulić, N., Radović, J., Tomić, Z. (2007). Effectives of different strains of *Sinorhizobium meliloti* on alfalfa (*Medicago sativa* L.) biomass yield. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 23, 601-607.
- Delić, D., Stajković, O., Radović, J., Stanojković, A., Kuzmanović, Đ., Rasulić, N., Miličić, B. (2010b). Genotypic differences in symbiotic N₂ fixation of some alfalfa (*Medicago sativa* L.)

- genotypes. In: Sustainable Use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding, pp. 79-84, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Delić, D., Stajković-Srbinović, O., Buntić, A. (2022). Hazards and Usability of Coal Fly Ash. In: Advances in Understanding Soil Degradation. Innovations in Landscape Research. Springer, Cham, pp. 571-608.
- Delić, D., Stajković-Srbinović, O., Knežević-Vukčević, J. (2016). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) and *Sinorhizobium meliloti*: prospects of using rhizobial inoculants in Serbia. *Botanica Serbica*, 40 (1), 13-19.
- Delić, D., Stajković-Srbinović, O., Kuzmanović, Đ., Rasulić, N., Maksimović, S., Radović, J., Simić, A. (2013a). Influence of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Alfalfa, *Medicago sativa* L. yield by Inoculation of a Preceding Italian Ryegrass, *Lolium multiflorum* Lam. In: Breeding strategies for sustainable forage and turf grass improvement. Springer, Dordrecht.
- Delić, D., Stajković-Srbinović, O., Radović, J., Kuzmanović, Đ., Rasulić, N., Simić, A., Knežević-Vukčević, J. (2013b). Differences in symbiotic N₂ fixation of alfalfa, *Medicago sativa* L. cultivars and *Sinorhizobium* spp. strains in field conditions. *Romanian Biotechnological Letters*, 18 (6), 8743-8750.
- Dent, D., Cocking, E. (2017). Establishing symbiotic nitrogen fixation in cereals and other non-legume crops: The Greener Nitrogen Revolution. *Agriculture & Food Security*, 6(1).
- Deshwal, V. K., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K. (2003). Isolation of plant growth-promoting strains of *Bradyrhizobium* (*Arachis*) sp. with biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut. *Current Science*, 443-448.
- Dhar Purkayastha, G., Mangar, P., Saha, A., Saha, D. (2018). Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea. *PLoS ONE*, 13(2).
- Dinić, Z., Maksimović, J., Stanojković-Sebić, A., Pivić, R. (2019). Prediction models for bioavailability of Mn, Cu, Zn, Ni and Pb in soils of Republic of Serbia. *Agronomy* 9, 856.
- Dong, Y., Li, H., Rong, S., Xu, H., Guan, Y., Zhao, L., Chen, W., He, X., Gao, X., Chen, R., Li, L., Xu, Z. (2019). Isolation and evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* RDX5 as a potential biocontrol agent against *Magnaporthe oryzae*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 408-418.
- Draganić, V., Lozo, J., Biočanin, M., Dimkić, I., Garalejić, E., Fira, Đ., Stanković, S., Berić, T. (2017). Genotyping of *Bacillus* spp. isolate collection from natural samples. *Genetika*, 49, 445-456.
- Dragomir, C., Moisuc, A. (2007). Bacterial inoculation effect upon yield capacity in alfalfa and orchardgrass. *Lucrări Științifice, Facultatea de Agricultură USAMVB Timișoara* 38, 275-278.
- Dudeja, S., Giri, R., Saini, R., Suneja-Madan, P., Kothe, E. (2011). Interaction of endophytic microbes with legumes. *Journal of Basic Microbiology*, 52(3), 248-260.
- Đukić, D., Lugić, Z., Vasiljević, S., Radović, J., Katić, S., Stojanović, I. (2007). Domaće sorte višegodišnjih leguminoza - Nastanak i kvantitativna svojstva. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo*, 44(1), 7-19.
- Durairaj, K., Velmurugan, P., Park, J. H., Chang, W. S., Park, Y. J., Senthilkumar, P., Choi, K. M., Lee, J. H., Oh, B. T. (2017). Potential for plant biocontrol activity of isolated *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus stratosphericus* strains against bacterial pathogens acting through both induced plant resistance and direct antagonism. *FEMS Microbiology Letters*, 364(23).

- Edwards, A. C. (2018). Interpreting Soil Test Results: What do all the Numbers Mean? 3rd edition. *Soil Use Manage*, 34, 164-165.
- Emami, S., Alikhani, H., Pourbabaei, A., Etesami, H., Motashare Zadeh, B. Sarmadian, F. (2018). Improved growth and nutrient acquisition of wheat genotypes in phosphorus deficient soils by plant growth-promoting rhizospheric and endophytic bacteria. *Soil Science and Plant Nutrition*, 64(6), 719-727.
- Enosi Tuipulotu, D., Mathur, A., Ngo, C., Man, S. (2021). *Bacillus cereus*: Epidemiology, Virulence Factors, and Host-Pathogen Interactions. *Trends in Microbiology*, 29(5), 458-471.
- Fabiano, C. C., Tezotto, T., Favarin, J. L., Polacco, J. C., Mazzafera, P. (2015). Essentiality of nickel in plants: a role in plant stresses. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Fageria, N. K., Nascente, A. S. (2014). Management of Soil Acidity of South American Soils for Sustainable Crop Production. *Advances in Agronomy*, 221–275.
- FAO. (2016). Grassland Index. A searchable catalogue of grass and forage legumes. FAO, Rome, Italy.
- FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. (1999). <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius>.
- Farissi, M., Bouizgaren, A., Faissal, A., Mustapha, F., Ghoulam, C. (2014). Isolation and screening of rhizobial strains nodulating alfalfa for their tolerance to some environmental stresses. *Pacesetter Journal of Agricultural Research*, 2(2), 9-19.
- Ferguson, B. J., Lin, M. H., Gresshoff, P. M. (2013). Regulation of legume nodulation by acidic growth conditions. *Plant Signaling and Behavior*, 8(3), e23426.
- Ferreira, N. S., Matos, G. F., Meneses, C. H., Reis, V. M., Rouws, J. R., Schwab, S., Baldani, J. I., Rouws, L. F. M. (2020). Interaction of phytohormone-producing rhizobia with sugarcane mini-setts and their effect on plant development. *Plant and Soil* 451(1), 221-238.
- Fischer, H.M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiological Reviews*, 58, 352-386.
- Flores-Félix, J., Menéndez, E., Rivera, L., Marcos-García, M., Martínez-Hidalgo, P., Mateos, P., Martínez-Molina, E., Velázquez, M., García-Fraile, P., Rivas, R. (2013). Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176(6), 876-882.
- Garrity, G. M, Bell, J. A., Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the Prokaryotes, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second edition. Springer-Verlag, New York, pp. 1-399.
- Gill, U. S., Uppalapati, S. R., Gallego-Giraldo, L., Ishiga, Y., Dixon, R. A., Mysore, K. S. (2018). Metabolic flux towards the (iso)flavonoid pathway in lignin modified alfalfa lines induces resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*. *Plant, Cell and Environment*, 41(9), 1997-2007.
- Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., García-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L., Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, 5(4), 355-377.
- Gopinath, S.C., Anbu, P., Arshad, M. K., Lakshmipriya, T., Voon, C. H., Hashim, U., Chinni, S. V. (2017). Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *Biomed Research International*, 1272193.

- Gordon, S.A. Weber, R. P. (1951). Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. *Plant Physiology*, 26, 192-195.
- Gossmann, J. A., Markmann, K., Brachmann, A., Rose, L. E., Parniske, M. (2012). Polymorphic infection and organogenesis patterns induced by a *Rhizobium leguminosarum* isolate from *Lotus* root nodules are determined by the host genotype. *New Phytologist*, 196, 561-573.
- Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., Stacey, G. (2015). *Rhizobium*-legume symbioses: The crucial role of plant immunity. *Trends in Plant Science*, 20, 186-194.
- Granada, C. E., Strochein, M., Vargas, L. K., Bruxel, M., Sá, E. L. S. de, Passaglia, L. M. (2014). Genetic diversity and symbiotic compatibility among rhizobial strains and *Desmodium incanum* and *Lotus* spp. plants. *Genetics and Molecular Biology*, 37(2), 396-405.
- Gualtieri, G., Bisseling, T. (2000). The evolution of nodulation. *Plant Molecular Biology*, 42, 181-194.
- Guiñazú, L. B., Andrés, J. A., Del Papa, M. F., Pistorio, M., Rosas, S. B. (2009). Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. *Biology and Fertility of Soils*, 46(2), 185-190.
- Gupta, R., Patel, S., Saini, N., Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5753-5798.
- Hadžić, V., Belić, M., Nešić, L. (1997). Determination of the mechanical composition (texturally gravimetric) of the soil. In: *Methods of Research and Determination of Physical Properties of the Soil*. JDPZ: Novi Sad, Serbia, pp. 17-32.
- Halder, A. K., Chakrabarty, P. K. (1993). Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiologica*, 38, 325-330.
- Hasan, M. K., Cheng, Y., Kanwar, M. K., Chu, X.-Y., Ahammed, G. J., Qi, Z.-Y. (2017). Responses of Plant Proteins to Heavy Metal Stress - A Review. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Hasanuzzaman, M., Araújo, S., Gill, S. (2020). *The Plant Family Fabaceae*. Springer, Sinagapore.
- Hauer-Jákli, M., Tränkner, M. (2019). Critical Leaf Magnesium Thresholds and the Impact of Magnesium on Plant Growth and Photo-Oxidative Defense: A Systematic Review and Meta-Analysis From 70 Years of Research. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Hinde, R., Trautman, D. A. (2002). Symbiosomes. In: *Symbiosis: Mechanisms and Model Systems*. Dordrecht: Staempfli Publishers Ltd., pp. 209-220.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., & Jaillard, B. (2003). Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil*, 248(1/2), 43-59.
- Horrocks, R. Vallentine, J. (1999). Soil Fertility and Forage Production. *Harvested Forages*, 187-224.
- Huang, Q., Liu, H., Zhang, J., Wang, S., Liu, F., Li, C., Wang, G. (2022). Production of extracellular amylase contributes to the colonization of *Bacillus cereus* 0-9 in wheat roots. *BMC Microbiology*.
- Humphry, D. R., Andrews, M., Santos, S. R., James, E.K., Vinogradova, L. V, Perin, L., Reis, V. M., Cummings, S. P. (2007). Phylogenetic assignment and mechanism of action of a crop growth promoting *Rhizobium radiobacter* strain used as a biofertilizer on graminaceous crops in Russia. *Antonie Leeuwenhoek*, 9, 105-113.

- Hungria, M., Bohrer, T. R. J. (2000) Variability of Nodulation and Dinitrogen Fixation Capacity among Soybean Cultivars. *Biology and Fertility of Soils*, 31, 45-52.
- Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E. M., Pedrosa, F. O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331, 413-425.
- Hunt, S. R., MacAdam, J. W., Reeve, J. R. (2014). Establishment of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) pastures on organic dairy farms in the Mountain West USA. *Organic Agriculture*, 5(1), 63-77.
- Igiehon, N., Babalola, O., Aremu, B. (2019). Genomic insights into plant growth promoting rhizobia capable of enhancing soybean germination under drought stress. *BMC Microbiology*, 19 (1).
- Ilyas, N., Yang, Y., Zhang, C., Singh, R. P., Yu, Q., Yuan, Y., You, X., Li, Y. (2022). Temporal Dynamics and variation in the alfalfa root nodule and rhizosphere microbial communities of coastal sand and lawn soil. *Journal of Plant Interactions*, 17(1), 173-182.
- Izveštaj o stanju zemljišta u Republici Srbiji 2015. http://www.sepa.gov.rs/download/zemljiste/Zemljiste_2015.pdf.
- Jadhav, H. P., Shaikh, S. S., Sayyed, R. Z. (2017). Role of hydrolytic enzymes of rhizoflora in biocontrol of fungal phytopathogens: An overview. *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation*, 183-203.
- Jaiswal, S., Mohammed, M., Ibny, F., Dakora, F. (2021). Rhizobia as a Source of Plant Growth-Promoting Molecules: Potential Applications and Possible Operational Mechanisms. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4.
- Jarak, M., Đuri, S., Jević, M. (2007). Uticaj pojedinačnih i združenih inokulanata na klijanje i početni rast žutog zvezdana. *Letopis naučnih radova*, 41-46.
- Ji, Z. L., Peng, S., Chen, L. L., Liu, Y., Yan, C., Zhu, F. (2020) Identification and characterization of a serine protease from *Bacillus licheniformis* W10: A potential antifungal agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 594-603.
- Jian, L., Bai, X., Zhang, H., Song, X., Li, Z. (2019). Promotion of growth and metal accumulation of alfalfa by coinoculation with *Sinorhizobium* and *Agrobacterium* under copper and zinc stress. *PeerJ*, 7, p.e6875.
- Jiménez-Gómez, A., Flores-Félix, J., García-Fraile, P., Mateos, P., Menéndez, E., Velázquez, E., Rivas, R. (2018). Probiotic activities of *Rhizobium laguerreae* on growth and quality of spinach. *Scientific Reports*, 8(1).
- Jiménez-Gómez, A., Saati-Santamaría, Z., Kostovcik, M., Rivas, R., Velázquez, E., Mateos, P.F., Menéndez, E., García-Fraile, P. (2020). Selection of the Root Endophyte *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 as Plant Growth Promoter for *Brassica napus* L. *Crops. Agronomy*, 10, 1788.
- Ju, W., Jin, X., Liu, L., Shen, G., Zhao, W., Duan, C., Fang, L. (2020). Rhizobacteria inoculation benefits nutrient availability for phytostabilization in copper contaminated soil: Drivers from bacterial community structures in rhizosphere. *Applied Soil Ecology*, 150, 103450.
- Kabata-Pendias, A. (2010). Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press, Boca Raton.
- Kabdullayeva, T., Crosbie, D., Marín, M. (2020). *Mesorhizobium norvegicum* sp. nov., a rhizobium isolated from a *Lotus corniculatus* root nodule in Norway. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 388-396.

- Kamran, S., Shahid, I., Baig, D. N., Rizwan, M., Malik, K. A., Mehnaz, S. (2017). Contribution of zinc solubilizing bacteria in growth promotion and zinc content of wheat. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2593.
- Kanaan, I. I., Al-Barhawe, N. I. K. (2021). Isolation, Characterization and Optimization of Wild Type *Sinorhizobium meliloti* to Produce High Concentrations of Indole Acetic Acid. *Iraqi Journal of Science*, 1415-1422.
- Kang, S. M., Radhakrishnan, R., You, Y. H., Joo, G. J., Lee, I. J., Lee, K. E., Kim, J. H. (2014). Phosphate Solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 Regulates Endogenous Plant Carbohydrates and Amino Acids Contents to Promote Mustard Plant Growth. *Indian Journal of Microbiology*, 54, 427-433.
- Kang, W., Xu, L., Jiang, Z., Shi, S. (2019). Genetic diversity and symbiotic efficiency difference of endophytic rhizobia of *Medicago sativa*. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 68-83.
- Kaur, S. J., Gupta, V. K. (2017). Production of pectinolytic enzymes pectinase and pectin lyase by *Bacillus subtilis* SAV-21 in solid state fermentation. *Annals of Microbiology*, 67, 333-342.
- Kazerooni, E., Maharachchikumbura, S., Adhikari, A., Al-Sadi, A., Kang, S., Kim, L., Lee, I. (2021). Rhizospheric *Bacillus amyloliquefaciens* Protects *Capsicum annuum* cv. *geumsugangsan* From Multiple Abiotic Stresses via Multifarious Plant Growth-Promoting Attributes. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- Keim, P. (2005). Bacterial pathogens. *Microbial Forensics*, 99-107.
- Khalid, R., Zhang, X. X., Hayat, R., Ahmed, M. (2020). Molecular characteristics of rhizobia isolated from arachis hypogaea grown under stress environment. *Sustainability*, 12(15), 6259.
- Khalifa, A. Y., Almalki, M. A. (2015). Isolation and characterization of an endophytic bacterium, *Bacillus megaterium* BMN1, associated with root-nodules of *Medicago sativa* L. growing in Al-Ahsaa region, Saudi Arabia. *Annals of Microbiology*, 65, 1017-1026.
- Khalifa, A. Y., Alsyeeh, A. M., Almalki, M. A., Saleh, F. A. (2016). Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(1), 79-86.
- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., Sanders, E. R., Kaplan, D., Hirsch, A. M. (2018). Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Khilyas, I. V., Shirshikova, T. V., Matrosova, L., Sorokina, A. V., Sharipova, M. R., Bogomolnaya, L., M. (2016). Production of Siderophores by *Serratia marcescens* and the Role of MacAB Efflux Pump in Siderophores Secretion. *BioNanoScience*, 6, 480-482
- Kim, K. M., Liu, J., Go, Y. S., Kang, J. S. (2015). Characterization of *Bacillus mojavensis* KJS-3 for the promotion of Plant Growth. *Journal of Life Science*, 25(8), 910-916.
- Kirsch, W., Jantzon, H. (2009). Einsäuerungsgemische von kartoffeln und leguminosen (Stoppelklee und ackerbohnen) und Ihr Futterwert für das schwein. *Zeitschrift Für Tierernährung Und Futtermittelkunde*, 4(3), 284-291.
- Kiruthika, S., Arunkumar, M. (2021). A Comprehensive Study on IAA production by *Bradyrhizobium japonicum* and *Bacillus subtilis* and its Effect on *Vigna radiata* Plant Growth. *Indian Journal of Agricultural Research*, 55(5), 570-576.

- Kisiel, A., Kępczyńska, E. (2016). *Medicago truncatula* Gaertn. as a model for understanding the mechanism of growth promotion by bacteria from rhizosphere and nodules of alfalfa. *Planta*, 243, 1169-1189.
- Knežević, M., Berić, T., Buntić, A., Delić, D., Nikolić, I., Stanković, S., Stajković-Srbinić, O. (2021a). Potential of root nodule nonrhizobial endophytic bacteria for growth promotion of *Lotus corniculatus* L. and *Dactylis glomerata* L. *Journal of Applied Microbiology*, 131(6), 2929-2940.
- Knežević, M., Berić, T., Buntić, A., Jovković, M., Avdović, M., Stanković, S., Delić, D., Stajković-Srbinić, O. (2022). Native *Mesorhizobium* strains improve yield and nutrient composition of the common bird's-foot trefoil grown in an acid soil. *Rhizosphere*, 21, 100487.
- Knežević, M., Stajković-Srbinić, O., Assel, M., Milić, M., Mihajlovski, K., Delić, D., Buntić, A. (2021b). The ability of a new strain of *Bacillus pseudomycooides* to improve the germination of alfalfa seeds in the presence of fungal infection or chromium. *Rhizosphere*, 18, p.100353.
- Knight, C. A., Bowman, M. J., Frederick, L., Day, A., Lee, C., Dunlap, C. A. (2018). The first report of antifungal lipopeptide production by a *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* strain. *Microbiological Research*, 216, 40-46.
- Kong, Z., Deng, Z., Glick, B. R., Wei, G., Chou, M. (2017). A nodule endophytic plant growth-promoting *Pseudomonas* and its effects on growth, nodulation and metal uptake in *Medicago lupulina* under copper stress. *Annals of Microbiology*, 67, 49-58.
- Koutsoukis, C., Roukos, C., Demertzis, P., Kandrelis, S., Akrida-Demertzi, K. (2019). The variation of the chemical composition of the main plant species in a subalpine grassland in northwestern Greece. *Legume Science*, 1(1), e23.
- Krnjaja, V., Lević, J., Ivanović, M., Tomić, Z. (2005). Virulence of *Fusarium* species to alfalfa seedlings. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, (108), 167-171.
- Kumar, H., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K. (2011). Effect of plant growth promoting rhizobia on seed germination, growth promotion and suppression of *Fusarium* wilt of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Crop Protection*, 30(11), 1396-1403.
- Lai, W. A., Hameed, A., Lin, S. Y., Hung, M. H., Hsu, Y. H., Liu, Y. C., Shahina, M., Shen, F. T., Young, C. C. (2015). *Paenibacillus medicaginis* sp. nov. a chitinolytic endophyte isolated from a root nodule of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(11), 3853-3860.
- Lally, R. D., Galbally, P., Moreira, A. S., Spink, J., Ryan, D., Germaine, K. J., Dowling, D. N. (2017). Application of Endophytic *Pseudomonas fluorescens* and a Bacterial Consortium to *Brassica napus* Can Increase Plant Height and Biomass under Greenhouse and Field Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2193.
- Langner, T., Göhre, V. (2016). Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Current Genetics*, 62(2), 243-54.
- Laranjo, M., Oliveira, S. (2010). Tolerance of *Mesorhizobium* type strains to different environmental stresses. *Antonie van Leeuwenhoek*. 99(3), 651-662.
- Larsen, K. (1958). Cytotaxonomical studies in Lotus. IV. Some case of polyploidy. *Botanisk Tidsskrift*, 54, 44-56
- Latrach, L., Mouradi, M., Farissi, M., Bouizgaren, A., Ghoulam, C. (2017). Physiological characterization of rhizobial strains nodulating alfalfa (*Medicago sativa*) isolated from soils of Southeastern Morocco. *Applied Journal of Environmental Engineering Science*, 3(4), 353-364.

- Le Strange, K. K., Bender, G. L., Đordjević, M. A., Rolfe, B. G., Redmond, J. W. (1990). The *Rhizobium* strain NGR234 *nodDI* gene product responds to activation by simple phenolic compounds vanillin and isovanillin present in wheat seedling extracts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3, 214-220.
- Li, Q., Xing, Y., Fu, X., Ji, L., Li, T., Wang, J., Chen, G., Qi, Z., Zhang, Q. (2021). Biochemical mechanisms of rhizospheric *Bacillus subtilis* - facilitated phytoextraction by alfalfa under cadmium stress – Microbial diversity and metabolomics analyses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 212, 112016.
- Li, Y., Zeng, J., Wang, S., Lin, Q., Ruan, D., Chi, H., Zheng, M., Chao, Y., Qiu, R., Yang, Y. (2019). Effects of cadmium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria and *Funneliformis mosseae* on the cadmium tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *International Journal of Phytoremediation*, 22(5), 451-458.
- Ličina, V., Nešić, L., Belić, M., Hadžić, V., Sekulić, P., Vasin, J., Ninkov, J. (2011). The soils of Serbia and their degradation. *Ratarstvo i Povrtarstvo*, 48(2), 285-290.
- Lidder, P., Sonnino, A. (2012). Biotechnologies for the Management of Genetic Resources for Food and Agriculture. *Advances in Genetics*, 1-167.
- Lindström, K., Mousavi, S. (2019). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314-1335.
- Lindstrom, K., Myllyniemi, H. (1987). Sensitivity of red clover rhizobia to soil acidity factors in pure culture and in symbiosis. *Plant and Soil*, 98, 353-362.
- Lista registrovanih sredstava za ishranu biljaka i oplemenjivača zemljišta koja se mogu koristiti u organskoj proizvodnji. <https://serbiaorganica.info/azurirane-liste-sredstava-za-zastitu-i-ishranu-bilja-i-oplemenjivaca-zemljista-za-organsku-proizvodnju-2>.
- Liu, Y. S., Geng, J. C., Sha, X.-Y., Zhao, Y. X., Hu, T. M., Yang, P. Z. (2019). Effect of *Rhizobium* symbiosis on low-temperature tolerance and antioxidant response in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R. B., Taghavi, S., Mezgeay, M., der Lelie, D. (2002). Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, 583-606.
- Lodwig, E. M., Poole, P. S. (2003). Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22, 37-38.
- López-Millán, A. F., Grusak, M. A., Abadía, A., Abadía, J. (2013). Iron deficiency in plants: an insight from proteomic approaches. *Frontiers in Plant Science*, 25(4), 254.
- Lorite, M. J., Flores-Félix, J. D., Peix, Á., Sanjuán, J., Velázquez, E. (2016). *Mesorhizobium olivaresii* sp. nov. isolated from *Lotus corniculatus* nodules. *Systematic and Applied Microbiology*, 557-561.
- Lorite, M. J., Munoz, S., Olivares, J., Soto, M. J., Sanjuán, J. (2010). Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate *Lotus* spp. in saline soils of Granada, Spain. *Applied Environmental Microbiology*, 76, 4019-4026.
- Lorite, M., Estrella, M., Escaray, F., Sannazzaro, A., Videira e Castro, I., Monza, J., Sanjuán, J., León-Barrios, M. (2018). The Rhizobia-Lotus Symbioses: Deeply Specific and Widely Diverse. *Frontiers in Microbiology*, 9.

- Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009). Plant growth promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556.
- Ma, W., Sebestianova, S. B., Sebestian, J., Burd, G. I., Guinel, F. C., Glick, B. R. (2003). Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83(3), 285-291.
- Marcos-García, M., Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M., Mateos, P., Peix, Á., Velazquez, E., Rivas, R. (2017). *Mesorhizobium helmanticense* sp. nov., isolated from *Lotus corniculatus* nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(7), 2301-2305.
- Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M., Willems, A. (2007). Multi locus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 489-503.
- Martínez-Hidalgo, P., Flores-Félix, J. D., Velázquez, E., Brau, L., Trujillo, M. E., Martínez-Molina, E. (2020). High taxonomic diversity of *Micromonospora* strains isolated from *Medicago sativa* nodules in western Spain and Australia. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(1), 126043.
- Martínez-Hidalgo, P., Humm, E.A., Still, D.W., Shi, B., Pellegrini, M., de la Roca, G., Veliz, E., Maymon, M., Bru, P., Huntemann, M., Clum, A., Palaniappan, K., Varhese, N., Mukherjee, S., Reddy, S., Daum, C., Ivanova, N. N., Kyrpidis, N. C., Shapiro, N., Eloë-Fadrosh, E., Hirsch, A. M. (2022). *Medicago* root nodule microbiomes: insights into a complex ecosystem with potential candidates for plant growth promotion. *Plant and Soil*, 471, 507-526.
- Martínez-Zavala, S. A., Barboza-Pérez, U. E., Hernández-Guzmán, G., Bideshi, D.K., Barboza-Corona, J. E. (2020). Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: Phylogeny, Modular Structure, and Applied Potentials. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3032.
- Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, O., Mengel, K. (2000). The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility of Soils*, 30, 433-439.
- Mayer, E., Dörr de Quadros, P., Fulthorpe, R. (2019). *Plantibacter flavus*, *Curtobacterium herbarum*, *Paenibacillus taichungensis*, and *Rhizobium selenitireducens* endophytes provide host-specific growth promotion of *Arabidopsis thaliana*, basil, lettuce, and bok choy plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 85, e00383-19.
- McDonald, M., Mavrodi, D. V., Thomashow, L. S., Floss, H. G. (2001). Phenazine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: branchpoint from the primary shikimate biosynthetic pathway and role of phenazine-1, 6-dicarboxylic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 9459-9460.
- Mehboob, I., Naveed, M., Zahir, Z. A. (2009). Rhizobial association with non-legumes: mechanisms and applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28(6), 432-456.
- Mehboob, I., Naveed, M., Zahir, Z. A., Ashraf, M. (2012). Potential of rhizobia for sustainable production of non-legumes. In: *Crop production for agricultural improvement*. Springer, Netherlands, pp 659-704.
- Menéndez, E., Pérez-Yépez, J., Hernández, M., Rodríguez-Pérez, A., Velázquez, E., León-Barrios, M. (2020). Plant Growth Promotion Abilities of Phylogenetically Diverse *Mesorhizobium* Strains: Effect in the Root Colonization and Development of Tomato Seedlings. *Microorganisms*, 8(3), 412.
- Michelsen, C. F., Stougaard, P. (2012). Hydrogen cyanide synthesis and antifungal activity of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* In5 from Greenland is highly dependent on growth medium. *Canadian Journal of Microbiology*, 58(4), 381-90.
- Mielmann, A. (2013). The utilisation of lucerne (*Medicago sativa*): A review. *British Food Journal*, 115(4):590-600.

- Milagres, A. M., Machuca, A., Napoleão, D. (1999). Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1), 1-6.
- Mishra, J., Singh, R., Arora, N. K. (2017). Alleviation of Heavy Metal Stress in Plants and Remediation of Soil by Rhizosphere Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Mishra, R. P. N., Singh, R. K., Jaiswal, H. K., Kumar, V., Maurya, S. (2006). *Rhizobium*-Mediated Induction of Phenolics and Plant Growth Promotion in Rice (*Oryza sativa* L.). *Current Microbiology*, 52, 383-389.
- Mora, I., Cabrefiga, J., Montesinos, E. (2011). Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *International Microbiology*, 14, 213-223.
- Mosa, K.A., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M., Dhankher, O. P. (2016). Potential Biotechnological Strategies for the Cleanup of Heavy Metals and Metalloids. *Frontiers in Plant Sciences*, 7, 303.
- Mota, M. S., Gomes, C. B., Souza Júnior, I. T., Moura, A. B. (2017). Bacterial selection for biological control of Plant Disease: Criterion Determination and validation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(1), 62-70.
- Mounia, Y., Noreddine, K. C., Laid, D., Insaf, B., Mounira, K. A., Hlne, C., Philippe, T. (2014). Antifungal activity and bioactive compounds produced by *Bacillus mojavensis* and *Bacillus subtilis*. *African Journal of Biotechnology*, 8, 476-484.
- Mrvić, V., Antonović, G., Čakmak, D., Perović, V., Maksimović, S., Saljnikov E., Nikoloski, M. (2013). Pedological and pedogeochemical map of Serbia. In the Proceedings: “The 1st International Congresson Soil Science XIII National Congress in Soil Science Soil Science Society of Serbia”. September 23-26th, 2013, Belgrade, Serbia.
- Muleta, D., Ryder, M. H., Denton, M. D. (2017). The potential for rhizobial inoculation to increase soybean grain yields on acid soils in Ethiopia. *Soil Science and Plant Nutrition*, 1-11.
- Muresu, R., Porceddu, A., Concheri, G., Stevanato, P., Squartini, A. (2022). Legumes of the Sardinia Island: Knowledge on symbiotic and endophytic bacteria and interactive software tool for plant species determination. *Plants*, 11(11), 1521.
- Naseer, I., Ahmad, M., Nadeem, S. M., Ahmad, I., Zahir, Z. A. (2019). Rhizobial inoculants for sustainable agriculture: Prospects and applications. In: *Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment*. Springer, Cham, pp 245-283.
- Neilands, J. B. (1993). Siderophores. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 302, 1-3.
- Nicholson, W. (2002). Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 410-416.
- Nikolić, R., Mitić, N. (2005). Analysis of Morphological Traits of Bird's Foot Trefoil Plants cv. Bokor Transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Genetika*, 37, 33-38.
- Nikolić, R., Mitić, N., Ninković, S., Nešković, M. (2007). Efficient genetic transformation of *Lotus corniculatus* L. using a direct shoot regeneration protocol, stepwise hygromycin B selection, and a super-binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Archives of Biological Sciences*, 59(4), 311-317.
- Nikolić, R., Zdravković-Korać, S., Ninković, S., Dragičević, M., Miljuš-Đukić, J., Banović, B., Bohanec, B., Savić, J., Mitić, N. (2013). Fertile transgenic *Lotus corniculatus* resistant to the non-selective herbicide phosphinothricin. *Annals of Applied Biology*, 3 (163), 475-493.
- Noori, F., Etesami, H., Najafi Zarini, H., Khoshkholgh-Sima, N. A., Hosseini Salekdeh, G., Alishahi, F. (2018). Mining alfalfa (*Medicago sativa* L.) nodules for salinity tolerant non-rhizobial bacteria to

- improve growth of alfalfa under salinity stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 129-138.
- Noori, F., Etesami, H., Noori, S., Forouzan, E., Salehi Jouzani, G., Malboobi, M. A. (2021). Whole genome sequence of *Pantoea agglomerans* ANP8, a salinity and drought stress-resistant bacterium isolated from alfalfa (*Medicago sativa* L.) root nodules. *Biotechnology Reports*, 9, 29:e00600.
- O’Gara, F., Shanmugam, K. T. (1976). Regulation of nitrogen fixation by Rhizobia. Export of fixed N₂ as NH₄⁺. *Biochimica et Biophysica Acta*, 437, 313-321.
- Ogbebor, N., Adekunle, A. T. (2005). Inhibition of conidial germination and mycelial growth of *Corynespora cassiicola* (Berk and Curt) of rubber (*Hevea brasiliensis* muell. Arg.) using extracts of some plants. *African Journal of Biotechnology*, 4(9), 996-1000
- Ojuederie, O. B., Babalola, O. O. (2017). Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 4, 14(12), 1504.
- Oldroyd, G., Murray, J., Poole, P., Downie, J. (2011). The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *The Annual Review of Genetics*, 45(1), 119-144.
- Oro, V., Knežević, M., Dinić, Z., Delić, D. (2020). Bacterial Microbiota Isolated from Cysts of *Globodera rostochiensis* (Nematoda: Heteroderidae). *Plants*, 9(9), p.1146.
- Orozco-Mosqueda, M., Duan, J., Di Bernardo, M., Zetter, E., Campos-García, J., Glick, B., Santoyo, G. (2019). The Production of ACC Deaminase and Trehalose by the Plant Growth Promoting Bacterium *Pseudomonas* sp. UW4 Synergistically Protect Tomato Plants Against Salt Stress. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Oubohssaine, M., Sbabou, L., Aurag, J. (2022). Native Heavy Metal-Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria Improves *Sulla spinosissima* (L.) Growth in Post-Mining Contaminated Soils. *Microorganisms*, 10, 838.
- Ovalle, C., Espinoza, S., Barahona, V., Gerding, M., Humphries, A., del Pozo, A. (2015). Lucerne and other perennial legumes provide new options for rain fed livestock production in the Mediterranean-climate region of Chile. *Ciencia e investigación agraria*, 42(3), 14-14.
- Özen, A. I., Ussery, D. W. (2012). Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*? *Microbial Ecology*, 63(2), 239-48.
- Oztopuz, O., Sarigul, N., Liaqat, F., Park, R.-D., Eltem, R. (2018). Chitinolytic *Bacillus subtilis* Ege-B-1.19 as a biocontrol agent against mycotoxigenic and phytopathogenic fungi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 44(3): 323-331.
- Pandey, P., Maheshwari, D. K. (2007). Two-species microbial consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. *Current Science*, 92, 1137-1141.
- Pandey, S., Ghosh, P. K., Ghosh, S., De, T. K., Maiti, T. K. (2013). Role of heavy metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities. *Journal of Microbiology*, 51, 11-17.
- Panpatte, D. G., Jhala, Y. K., Shelat, H. N., Vyas, R. V. (2016). *Pseudomonas fluorescens*: a promising biocontrol agent and PGPR for sustainable agriculture, In: *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*, Springer, New Delhi.
- Passera, A., Compant, S., Casati, P., Maturo, M., Battelli, G., Quaglino, F., Antonielli, L., Salerno, D., Brasca, M., Toffolatti, S., Mantegazza, F., Delledonne, M. Mitter, B. (2019). Not Just a Pathogen? Description of a Plant-Beneficial *Pseudomonas syringae* Strain. *Frontiers in Microbiology*, 10.

- Pellock, B. J., Cheng, H. P., Walker, G. C. (2000). Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *Journal of Bacteriology*, 182(15), 4310-4318.
- Pikovskaya, R.I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 17, 362-370.
- Piromyou, P., Greetatorn, T., Teamtisong, K., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Teaumroong, N. (2017). Potential of Rice Stubble as a Reservoir of Bradyrhizobial Inoculum in Rice-Legume Crop Rotation. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(22), e01488-17.
- Pochon, J. (1954). *Manuel technique D'Analyse Microbiologique du sol*. Masson et Cie, Paris.
- Prakash, J., Arora, N. K. (2019). Phosphate-solubilizing *Bacillus* sp. enhances growth, phosphorus uptake and oil yield of *Mentha arvensis* L. *3 Biotech*, 9(4), 126.
- Prihatiningsih, N., Asnani, A., Djatmiko, H. (2021). Extracellular protease from *Bacillus subtilis* B315 with antagonistic activity against bacterial wilt pathogen (*Ralstonia solanacearum*) of chili. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(3).
- Rabie, G. H. (1998). Induction of fungal disease resistance in *Vicia faba* by dual inoculation with *Rhizobium leguminosarum* and vesiculararbuscular mycorrhizal fungi. *Mycopathologia*, 141, 159-166.
- Rakić, T., Pešić, M., Kostić, N., Andrejić, G., Fira, Đ., Dželetović, Ž., Stanković, S., Lozo, J. (2021). Rhizobacteria associated with *Miscanthus x giganteus* improve metal accumulation and plant growth in the flotation tailings. *Plant and Soil*, 462(1-2), 349-363.
- Ramírez-Bahena, M. H., Tejedor, C., Martín, I., Velázquez, E., Peix, A. (2013). *Endobacter medicaginis* gen. nov., sp. nov., isolated from alfalfa nodules in an acidic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 1760-1765.
- Reddy, P. M., Rendón-Anaya, M., Soto del Río, M. D., Khandual, S. (2007). Flavonoids as Signaling Molecules and Regulators of Root Nodule Development. *Dynamic Soil, Dynamic Plant*, 1(2), 83-94.
- Reeve, W., Sullivan, J., Ronson, C., Tian, R., Brau, L., Davenport, K., Goodwin, L., Chain, P., Woyke, T., Lobos, E., Hunterman, M., Pati, A., Mavoromatis, K., Markowitz, V., Ivanova, N., Kyrpides, N. (2014). Genome sequence of the *Lotus corniculatus* microsymbiont *Mesorhizobium loti* strain R88B. *Stand in Genomic Sci* 9, 3.
- Rejii, M., Mahdhi, M., Domínguez-Núñez, J.A., Mars, M. (2014). The phenotypic, phylogenetic and symbiotic characterization of rhizobia nodulating *Lotus* sp. in Tunisian arid soils. *Annals of Microbiology*, 64, 355-362.
- Rickert, A. A., Soria, M. A., Correa, O. S. (2000). The adaptive acid response in *Mesorhizobium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 475-480.
- Riehm, H. (1958). Die Ammoniumlaktatessigsäure - Methode zur bestimmung der leichtlöslichen phosphorsure in karbonathaltigen boden. *Agrochimica*, 3(1), 49-65.
- Rijavec, T., Lapanje, A. (2016). Hydrogen Cyanide in the Rhizosphere: Not Suppressing Plant Pathogens, but Rather Regulating Availability of Phosphate. *Frontiers in Microbiology*, 18(7), 1785.
- Rinaudi, L. V., Giordano, W. (2010). An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*, 304(1), 1-11.
- Ríos-Ruiz, W. F., Valdez-Núñez, R. A., Bedmar, E. J., Castellano-Hinojosa, A. (2019). Utilization of Endophytic Bacteria Isolated from Legume Root Nodules for Plant Growth Promotion. In: *Field Crops: Sustainable Management by PGPR. Sustainable Development and Biodiversity*. Springer, Cham.

- Rodriguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilisation and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287, 15-21.
- Rong, X., Huang, Y. (2014). Multi-locus sequence analysis. *Methods in Microbiology*, 221-251.
- Saghafi, D., Ghorbanpour, M., Ajirloo, H. S., Lajayer, B. A. (2019). Enhancement of growth and salt tolerance in *Brassica napus* L. seedlings by halotolerant *Rhizobium* strains containing ACC-deaminase activity. *Plant physiology reports*, 24(2), 225-235.
- Sah, S., Singh, N., Singh, R. (2017). Iron acquisition in maize (*Zea mays* L.) using *Pseudomonas* siderophore. *3 Biotech* 7, 121.
- Sanderson, M. A., Brink, G., Stout, R., Ruth, L. (2013). Grass–Legume Proportions in Forage Seed Mixtures and Effects on Herbage Yield and Weed Abundance. *Journal of Agronomy*, 105, 1289-1297.
- Sanderson, M. A., Soder K. J., Muller, L.D., Klement, K. D., Skinner R. H, Goslee, S. C. (2005). Forage mixture productivity and botanical composition in pastures grazed by dairy cattle. *Agronomy Journal*, 97, 1465-1471.
- Santi, C., Bogusz, D., Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, 111(5), 743-767.
- Santoro, M. V., Cappellari, L. R., Giordano, W., Banchio, E. (2015). Plant growth-promoting effects of native *Pseudomonas* strains on *Mentha piperita* (peppermint): an *in vitro* study. *Plant Biology*, 17(6), 1218-26.
- Sapkota, S., Khadka, S., Gautam, A., Maharjan, R., Shah, R., Dhakal, S., Panta, O. P., Khanal, S., Poudel, P. (2019). Screening and Optimization of Thermo-Tolerant *Bacillus* Sp. for Amylase Production and Antifungal Activity. *Journal of Institute of Science and Technology*, 24(1), 47-56.
- Saran, A., Imperato, V., Fernandez, L., Gkorezis, P., d'Haen, J., Merini, L., Vangronsveld, J. Thijs, S. (2020). Phytostabilization of Polluted Military Soil Supported by Bioaugmentation with PGP-Trace Element Tolerant Bacteria Isolated from *Helianthus petiolaris*. *Agronomy*, 10(2), 204.
- Sarkar, S. F., Guttman D. S. (2004). Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1999-2012.
- Sasirekha, B., Srividya, S. (2016). Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. *Agriculture and Natural Resources*, 50(4), 250-256.
- Schmitz, K., Protzko, R., Zhang, L., Benz, J. P. (2019). Spotlight on fungal pectin utilization-from phytopathogenicity to molecular recognition and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(6), 2507-2524.
- Schneemann, I., Wiese, J., Kunz, A. L., Imhoff, J. F. (2011). Genetic Approach for the Fast Discovery of Phenazine Producing Bacteria. *Marine Drugs* 9, 772-789.
- Schulin, R., Johnson, A., Frossard, E. (2010). Trace Element-Deficient Soils. In: *Trace Elements in Soils*, Blackwell Publishing Ltd.
- Segundo, E., Martinez-Abarca, F., Dillewijn, P., Fernandez-Lopez, M., Lagares, A., Martinez-Drets, G., Niehaus, K., Puhler, A., Toro, N. (1999). Characterisation of symbiotically efficient alfalfa-nodulating rhizobia isolated from acid soils of Argentina and Uruguay. *FEMS Microbiology Ecology*, 28(2), 169-176.
- Selvakumar, G., Joshi, P., Nazim, S., Mishra, P. K., Bisht, J. K., Gupta, H. S. (2009). Phosphate solubilization and growth promotion by *Pseudomonas fragi* CS11RH1 (MTCC 8984), a

- psychrotolerant bacterium isolated from a high altitude Himalayan rhizosphere. *Biologia*, 64(2), 239-245.
- Seneviratne, M., Vithanage, M. (2015). The Role of Siderophores on Plants under Heavy Metal Stress: A View from the Rhizosphere. *Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences*, 4(3).
- Serova, T., Tsyganova, A., Tikhonovich, I., Tsyganov, V. (2019). Gibberellins Inhibit Nodule Senescence and Stimulate Nodule Meristem Bifurcation in Pea (*Pisum sativum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W., Fallmann, K. Puschenreiter, M. (2013). The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 60, 182-194.
- Šestić, S., Glintić, M., Manojlović, S. (1969). Priručnik za sistemsku kontrolu plodnosti zemljišta i upotrebu đubriva, Beograd. Centar za unapređivanje poljoprivredne proizvodnje SR Srbija i poslovno udruženje proizvođača veštačkih đubriva „Agrohemija Beograd“, 67-80.
- Shahzad, A., Bano, A., Siddiqui, S. (2020). Effect of bacterial consortium on alfalfa (*Medicago sativa* L.) plant nutrient uptake and antioxidant enzymes at different levels of oily sludge. *Israel Journal of Plant Sciences*, 67(3-4), 158-170.
- Sharma, R., Paliwal, J. S., Chopra, P., Dogra, D., Pooniya, V., Bisaria, V. S., Swarnalakshmi, K., Sharma, S. (2017). Survival, efficacy and rhizospheric effects of bacterial inoculants on *Cajanus cajan*. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 240, 244-252.
- Sheoran, S., Kumar, S., Kumar, P., Meena, R. S., Rakshit, S. (2021). Nitrogen fixation in maize: breeding opportunities. *Theoretical and Applied Genetics*, 134(5), 1263-1280.
- Shiraishi, A., Matsushita, N., Hougetsu, T. (2010). Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(5), 269-274.
- Siedliska, A., Baranowski, P., Pastuszka-Woźniak, J., Zubik, M., Krzyszczak, J. (2021). Identification of plant leaf phosphorus content at different growth stages based on hyperspectral reflectance. *BMC Plant Biology*, 21(1), 28.
- Singh, S., Wu, X., Shao, C. Zhang, H. (2022). Microbial enhancement of plant nutrient acquisition. *Stress Biology*, 2(1), 589-593.
- Sluzbeni glasnik Republike Srbije, br.30 od 20. Aprila 2018 i 64 od 6. Septembra 2019. Uredba o granicnim vrednostima zagadjujucih, stetnih i opasnih materija u zemljistu.
- Sluzbeni glasnik Republike Srbije, br.23 od 18. Marta 1994. Pravilnik o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu i vodi za navodnjavanje i metodama njihovog ispitivanja
- Soares, R., Trejo, J., Lorite, M., Figueira, E., Sanjuán, J., Videira e Castro, I. (2020). Diversity, Phylogeny and Plant Growth Promotion Traits of Nodule Associated Bacteria Isolated from *Lotus parviflorus*. *Microorganisms*, 8(4), 499.
- Soltani Alikooyi, M., Sourki, A. A., Kiyani, S., Dehkordi, M. M. (2020). Effect of plant growth promoting bacteria on Seed germination and seedling emergence of alfalfa (*Medicago sativa* L.) hamedani ecotype in the laboratory, morphological characteristics and pigment contents in greenhouse conditions. *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, 8(2), 173-187.
- Song, L., Wang, S., Ye, W. (2020). Establishment and Application of Critical Nitrogen Dilution Curve for Rice Based on Leaf Dry Matter. *Agronomy*, 10, 367.

- Sotelo, M., Irisarri, P., Lorite, M., Casaretto, E., Rebuffo, M., Sanjuán, J., Monza, J. (2011). Diversity of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus* grown in northern and southern regions of Uruguay. *Applied Soil Ecology*, 49, 197-207.
- Souza, R., Beneduzi, A., Ambrosini, A., Costa, P.B., Meyer, J., Vargas, L. K., Schoenfeld, R., Passaglia, L. M. P. (2013). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant and Soil*, 366, 585-603.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448.
- Sprent, J. I. (2009). *Legume Nodulation: Global Perspective*. Oxford: Wiley-Blackwell.
- SRPS ISO 10390:2007 Kvalitet zemljišta - Određivanje pH-vrednosti, SRPS, Institut za standardizaciju Republike Srbije, Beograd, Srbija, 2007.
- SRPS ISO 10693:2005 Kvalitet zemljišta - Određivanje sadržaja karbonata - Volumetrijska metoda, SRPS, Institut za standardizaciju Republike Srbije, Beograd, Srbija, 2007.
- SRPS ISO 10694:2005 Kvalitet zemljišta - Određivanje organskog i ukupnog ugljenika posle suvog sagorevanja (elementarna analiza), SRPS, Institut za standardizaciju Republike Srbije, Beograd, Srbija, 2005.
- SRPS ISO 11464:2004 Kvalitet zemljišta - Prethodna obrada uzoraka za fizičko-hemijske analize, SRPS, Institut za standardizaciju Republike Srbije, Beograd, Srbija, 2004.
- SRPS ISO 11465:2002 Kvalitet zemljišta - Određivanje sadržaja suve materije i vode u obliku masene frakcije - Gravimetrijska metoda, SRPS, Institut za standardizaciju Republike Srbije, Beograd, Srbija, 2002.
- SRPS ISO 11466:2004 Kvalitet zemljišta - Ekstrakcija elemenata u tragovima rastvorljivih u carskoj vodi, SRPS, Institut za standardizaciju Republike Srbije, Beograd, Srbija, 2004.
- SRPS ISO 13878:2005 Kvalitet zemljišta - Određivanje sadržaja ukupnog azota suvim sagorevanjem ("elementarna analiza"), SRPS, Institut za standardizaciju Republike Srbije, Beograd, Srbija, 2005.
- SRPS ISO 14870:2005 Kvalitet zemljišta - Ekstrakcija elemenata u tragovima puferskim rastvorom DTPA, SRPS, Institut za standardizaciju Republike Srbije, Beograd, Srbija, 2005.
- Stajković, O., De Meyer, S., Miličić, B., Willems, A., Delić, D. (2009). Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Botanica Serbica*, 33, 107-114.
- Stajković-Srbinović, O., De Meyer, S., Kuzmanović, Đ., Dinić, Z., Delić, D., Willems, A. (2020). Soybean seed chemical composition as influenced by *Bradyrhizobium* inoculation in soils with elevated nickel concentrations. *Applied Soil Ecology*, 153, 103576.
- Stajković-Srbinović, O., De Meyer, S., Miličić, B., Delić, D., Willems, A. (2012). Genetic diversity of rhizobia associated with alfalfa in Serbian soils. *Biology and Fertility of Soils*, 48: 531-545.
- Stajković-Srbinović, O., Delić, D., Kuzmanović, D., Sikirić, B., Rasulić, N., Nikolić, B., Knežević-Vukčević, J. (2016). Growth and nutrient uptake of Orchardgrass (*Dactylis Glomerata* L.) and Meadow Fescue (*Festuca pratensis* Huds.) as affected by Rhizobacteria. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44, 296-301.
- Stajković-Srbinović, O., Delić, D., Rasulić, N., Buntić, A., Kuzmanović, D., Kostić-Kravljanić, L., Sikirić, B. (2015a). Alfalfa growth on acid soil as influenced by calcification and *Ensifer* strains inoculation. *Zemljište i biljka*, 64(2), 1-8.

- Stajković-Srbinović, O., Delić, D., Rasulić, N., Čakmak, D., Kuzmanović, Đ., Sikirić, B., (2015b). Mineral Composition of Red Clover under *Rhizobium* Inoculation and Lime Application in Acid Soil. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(2), 554-560.
- Stajković-Srbinović, O., Delić, D., Rasulić, N., Kuzmanović, Đ., Houškova, B., Sikirić, B., Mrvić, V. (2017). Microorganisms in Soils with High Nickel and Chromium Concentrations in Western Serbia. *Polish Journal of Environmental Studies*, 26(4), 1663-1671.
- Stajković-Srbinović, O., Kuzmanović, Đ., Rasulić, N., Knežević, M., Ugrenović, V., Buntić, A., Delić, D. (2021). Effect of inoculation with *Bradyrhizobium* and phosphate solubilizing bacteria on soybean seed yield and composition. *Zemljište i biljka*, 70(2), 56-66.
- Stevović, V., Lazarević, Đ., Tomić, D., Delić, D., Đurović, D. (2017). Pre-Sowing Seed Inoculation in the Birdsfoot Trefoil Seed Production. *Agrofor International Journal*, 2(1).
- Storey, E. P., Boghoozian, R., Little, J. L., Lowman, D. W., Chakraborty, R. (2006). Characterization of 'Schizokinen'; a dihydroxamate-type siderophore produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917. *Biometals*, 19(6), 637-649.
- Sujkowska-Rybkowska, M., Kasowska, D., Gediga, K., Banasiewicz, J., Stępkowski, T. (2020). *Lotus corniculatus*-rhizobia symbiosis under Ni, Co and Cr stress on ultramafic soil. *Plant and Soil*, 451(1-2), 459-484.
- Sumner, M. E. (2005). Food Production on Acid Soils in the Developing World: Problems and Solutions. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 51(5), 621-624.
- Sumner, M. E., Fey, M. V., Noble, A. D. (1991). Nutrient Status and Toxicity Problems in Acid Soils. *Soil Acidity*, 149-182.
- Sumner, M. E., Noble, A. D., 2003. Soil acidification: the world story. In: *Handbook of Soil Acidity*. Marcel Dekker, New York, pp. 1-28.
- Swanson, E. B., Somers, D. A., Tomes, D. T. (1990). Birdsfoot Trefoil (*Lotus corniculatus* L.). *Legumes and Oilseed Crops I*, 323-340.
- Swarnalakshmi, K., Yadav, V., Tyagi, D., Dhar, D., Kannepalli, A., Kumar, S. (2020). Significance of plant growth promoting rhizobacteria in grain legumes: growth promotion and crop production. *Plants*, 9, 1596.
- Tabares-da Rosa, S., Monza, J., Sanjuán, J., Rebuffo, M., Lattanzi, F., Reyno, R., Sabatini, O., Del Papa, M., Signorelli, S. (2019). Rhizobia Inoculants for Alfalfa in Acid Soils: A Proposal for Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 23(2).
- Tak, A., Gehlot, P., Pathak, R., Singh, S. K. (2017). Species Diversity of Rhizobia. *Rhizobium Biology and Biotechnology*, 215-245.
- Tapia-García, E., Hernández-Trejo, V., Guevara-Luna, J., Rojas-Rojas, F., Arroyo-Herrera, I., Meza-Radilla, G., Vásquez-Murrieta, M., Estrada-de los Santos, P. (2020). Plant growth-promoting bacteria isolated from wild legume nodules and nodules of *Phaseolus vulgaris* L. trap plants in central and southern Mexico. *Microbiological Research*, 239, 126522.
- Thomas, G. W. (1982). Exchangeable cations. In: *Methods of soil analysis: Part 2. Chemical and microbiological properties*. ASA Monograph Number 9, pp. 159-165.
- Thor, K. (2019). Calcium - Nutrient and Messenger. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Timmers, A. C., Soupène, E., Auriac, M. C., de Billy, F., Vasse, J., Boistard, P., Truchet, G. (2000). Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(11), 1204-13.


- Torres Tejerizo, G., Del Papa, M. F., Soria-Diaz, M. E., Draghi, W., Lozano, M., de los Angeles Giusti, M., Manyani, H., Megias, M., Serrano, A. G., Puhler, A., Niehaus, K., Lagares, A., Pistorio, M. (2011). The nodulation of alfalfa by the acid-tolerant *Rhizobium* sp. strain LPU83 does not require sulfated forms of lipochitooligosaccharide nodulation signals. *Journal of Bacteriology*, 193(1), 30-39.
- Torres Tejerizo, G., Rogel, M. A., Ormeño-Orrillo, E., Althabegoiti, M. J., Nilsson, J. F., Niehaus, K., Schlüter, A., Pühler, A., Del Papa, M. F., Lagares, A., Martínez-Romero, E., Pistorio, M. (2016). *Rhizobium favelukesii* sp. nov., isolated from the root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(11), 4451-4457.
- Tussipkan, D., Manabayeva, S. (2022). Alfalfa (*Medicago sativa* L.): Genotypic Diversity and Transgenic Alfalfa for Phytoremediation. *Frontiers in Environmental Science*, 10.
- Uexküll, H., Mutert, E. (1995). Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil*, 171(1), 1-15.
- van Rhijn, P., Vanderleyden, J. (1995). The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiological Reviews*, 59, 124-142.
- Vargas, L. K., Lisboa, B. B., Schlindwein, G., Granada, C. E., Giongo, A., Beneduzi, A., Passaglia, L. M. P. (2009). Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33, 1227-1235.
- Vasić, T., Krnjaja, V., Marković, J., Andjelković, S., Petrović, M., Laposavić, A., Terzić, D. (2019). Fungal Pathogens of Birdsfoot Trefoil (*Lotus corniculatus* L.) in Serbia. *Proceedings of the X International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2019"*, Jahorina, October 03 - 06, 2019, p. 1023-1027.
- Vega-Hernández, M. C., Pérez-Galdona, R., Dazzo, F. B., Jarabe-Lorenzo, A., Alfayate, M. C., León-Barrios, M. (2001). Novel infection process in the indeterminate root nodule symbiosis between *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste) and *Bradyrhizobium* sp. *New Phytologist*, 150, 707-721.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586.
- Vieira, J., Da Silva, P., Stefenon, V. (2017). *In vitro* growth and indole acetic acid production by *Mesorhizobium loti* SEMIA806 and SEMIA816 under the influence of copper ions. *Microbiological Research*, 8(2).
- Vincent, J. M. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific.
- Voigt, P. W., Staley, T. E. (2004). Selection for Aluminium and Acid – Soil Resistance in White Clover. *Crop Science*, 44, 38-48.
- Vojinović, Ž., Petrović, V. (1961). Rasprostranjenost nekih važnijih kvržičnih bakterija u zemljištima N.R. Srbije, *Arhiv za poljoprivredne nauke*.
- Vučković, S., Stojanović, I., Prodanović, S., Cupina, B., Živanović, T., Vojin, S., Jelacic, S. (2006). Morphological and Nutritional Properties of Birdsfoot Trefoil (*Lotus corniculatus* L.) Autochthonous Populations in Serbia and Bosnia and Herzegovina. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(2), 421-428.

- Wang, C., Zhao, D., Qi, G., Mao, Z., Hu, X., Du, B., Liu, K., Ding, Y. (2020). Effects of *Bacillus velezensis* FKM10 for Promoting the Growth of *Malus hupehensis* Rehd. and Inhibiting *Fusarium verticillioides*. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Wang, Q., Liu, J., Zhu, H. (2018a). Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-Rhizobium Interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9.
- Wang, X. L., Cui, W. J., Feng, X. Y., Zhong, Z. M., Li, Y., Chen, W. X., Tian, C. F. (2018b). Rhizobia inhabiting nodules and rhizosphere soils of alfalfa: A strong selection of facultative microsymbionts. *Soil Biology and Biochemistry*, 116, 340-350.
- Weakland, D. R., Smith, S. N., Bell, B., Tripathi, A., Mobley, H. L. T. (2020). The *Serratia marcescens* Siderophore Serratiochelin Is Necessary for Full Virulence during Bloodstream Infection. *Infection and Immunity*, 88(8), e00117-20.
- Webster, G., Gough, C., Vasse, J., Batchelor, C. A., O'Callaghan, K. J., Kothari, S. L., Davey, M. R., Dénarié, J., Cocking, E. C. (1997). Interactions of rhizobia with rice and wheat. *Plant and Soil*, 194, 115-122.
- Wigley, K., Moot, D., Wakelin, S. A., Laugraud, A., Blond, C., Seth, K., Ridgway, H. (2017). Diverse bacterial taxa inhabit root nodules of lucerne (*Medicago sativa* L.) in New Zealand pastoral soils. *Plant and Soil*, 420(1-2), 253-262.
- Xin, X. F., Kvitko, B., He, S. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 316-328.
- Xu, X., Du, X., Wang, F., Sha, J., Chen, Q., Tian, G., Zhu, Z., Ge, S., Jiang, Y. (2020). Effects of Potassium Levels on Plant Growth, Accumulation and Distribution of Carbon, and Nitrate Metabolism in Apple Dwarf Rootstock Seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 11, 904.
- Yahaghi, Z., Shirvani, M., Nourbakhsh, F., Pueyo, J. (2019). Uptake and effects of lead and zinc on alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed germination and seedling growth: Role of plant growth promoting bacteria. *South African Journal of Botany*, 124, 573-582.
- Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 145-156.
- Zahir, Z.A., Arshad, M., Frankenberger, W. T. (2004). Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy*, 81, 97-168.
- Zavod za statistiku Republike Srbije. Cene mineralnih đubriva u RS. <https://stips.minpolj.gov.rs/srl/dokument/izvestaj-cene-mineralnih-dubriva-septembar-2020>.
- Zavod za statistiku Republike Srbije. <https://data.stat.gov.rs/?caller=SDDB>.
- Zgadżaj, R., James, E. K., Kelly, S., Kawaharada, Y., de Jonge, N., Jensen, D. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S. (2015). A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. *PLOS Genetics*, 11(6).
- Zhao, L. F., Xu, Y. J., Ma, Z. Q., Deng, Z. S., Shan, C. J., Wei, G. H. (2013). Colonization and plant growth promoting characterization of endophytic *Pseudomonas chlororaphis* strain Zong1 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 623-631.

8. PRILOZI

8. PRILOZI

Prilog 1. Pregled bakterijskih izolata iz korenskih kvržica lucerke

Naziv izolata	Način uzgoja biljke domaćina	Uzorak zemljišta	Gram reakcija	Nodulacija	Tip izolata
PLK3AH	gajena lucerka	PLK3	G+ štapići	nod -	<p>Nerizobijalni izolati</p> 
PLR2AH	gajena lucerka	PLR2	G+ štapići	nod -	
L3	gajena lucerka	ALX	G+ štapići	nod -	
4.3	gajena lucerka	PLK2	G+ štapići	nod -	
6.1	gajena lucerka	PLK2	G+ štapići	nod -	
1.5	gajena lucerka	PLK2	G+ štapići	nod -	
L22	gajena lucerka	MKL	G+ štapići	nod -	
L21	gajena lucerka	MKL	G+ štapići	nod -	
L1*	gajena lucerka	GRD	G- štapići	nod -	
LG*	samonikla lucerka	GRD	G- štapići	nod -	
Luc2*	samonikla lucerka	GRD	G- štapići	nod -	
L2Cr*	samonikla lucerka	GRD	G- štapići	nod -	
DLK2Eh	samonikla lucerka	DLK2	G+ štapići	nod -	
4.6R	gajena lucerka	PLR3	G+ štapići	nod -	
L18	gajena lucerka	MKL	G+ štapići	nod -	
PLR2Bh	gajena lucerka	PLR2	G+ štapići	nod -	
ppN 1	samonikla lucerka	GRD	G- štapići	nod -	
SM2	samonikla lucerka	SM	G+ štapići	nod -	
4.3R	samonikla lucerka	PLR3	G+ štapići	nod -	
2.1B	samonikla lucerka	NBGL	G+ štapići	nod -	
PLK2Am	gajena lucerka	PLK2	G+ štapići	nod -	
2.1B1	samonikla lucerka	NBGL	G+ štapići	nod -	
214*	samonikla lucerka	*	G+ štapići	nod -	
219*	samonikla lucerka	*	G- štapići	nod -	
GNOV4	samonikla lucerka	GRD	G- štapići	nod+	
GPD2	samonikla lucerka	GRD	G- štapići	nod+	
10-2 BM	samonikla lucerka	GRD	G- štapići	nod+	
GV2-1	samonikla lucerka	GRD	G- štapići	nod+	
2.24	samonikla lucerka	NBGL	G- štapići	nod+	
2-1	samonikla lucerka	NBGL	G- štapići	nod+	
2.3R	samonikla lucerka	NBGL	G- štapići	nod+	
10-2N	samonikla lucerka	GRD	G- štapići	nod+	
DLM1Bm	samonikla lucerka	DLM1	G- štapići	nod+	
MS2	samonikla lucerka	SM	G- štapići	nod-	
MS3	samonikla lucerka	SM	G- štapići	nod-	
MS6	samonikla lucerka	SM	G- štapići	nod-	
MS7	samonikla lucerka	SM	G- štapići	nod-	
MS8	samonikla lucerka	SM	G- štapići	nod-	
OS	samonikla lucerka	SM	G- štapići	nod-	
4.6R1	samonikla lucerka	PLR3	G- štapići	nod-	
2.3R1	samonikla lucerka	NBGL	G- štapići	nod-	
PLR1Bh	gajena lucerka	PLR1	G- štapići	nod-	
DLK2Bh	samonikla lucerka	DLK2	G- štapići	nod-	
DLK2Dh	samonikla lucerka	DLK2	G- štapići	nod-	
DLK2Ch	samonikla lucerka	DLK2	G- štapići	nod-	
DLM1Bh	samonikla lucerka	DLM1	G- štapići	nod-	
DLM1Ch	samonikla lucerka	DLM1	G- štapići	nod-	
SM8	samonikla lucerka	SM	G- štapići	nod-	
SM1	samonikla lucerka	SM	G- štapići	nod-	
SMO3	samonikla lucerka	SM	G- štapići	nod-	
SMO	samonikla lucerka	SM	G- štapići	nod-	
Vø p12	samonikla lucerka	GRD	G- štapići	nod-	

Rizobijalni izolati




Prilog 1. (nastavak) Pregled bakterijskih izolata iz korenskih kvrčica lucerke

Naziv izolata	Način uzgoja biljke domaćina	Uzorak zemljišta	Gram reakcija	Nodulacija	Tip izolata
2.6b	samonikla lucerka	DLK1	G- štapići	nod-	Rizobijalni izolati 
2.2b	samonikla lucerka	DLK1	G- štapići	nod-	
4.9cr	samonikla lucerka	DLK1	G- štapići	nod-	
3.1b	samonikla lucerka	DLK1	G- štapići	nod-	
2.4b	samonikla lucerka	DLK1	G- štapići	nod-	
2.1b	samonikla lucerka	DLK1	G- štapići	nod-	
2.5b	samonikla lucerka	DLK1	G- štapići	nod-	
4.8b	samonikla lucerka	DLK1	G- štapići	nod-	
3.1b	samonikla lucerka	DLK1	G- štapići	nod-	
SMO1	samonikla lucerka	SM	G- štapići	nod-	
DLK2Dh1	samonikla lucerka	DLK2	G- štapići	nod-	
DLK2Eh1	samonikla lucerka	DLK2	G- štapići	nod-	

*: Izolati iz prethodnih istraživanja Instituta za zemljište; nod-: izolat ne noduliše biljku domaćina prilikom reinokulacije, nod+: izolat noduliše biljku domaćina prilikom reinokulacije; GRD- Grdelička klisura.

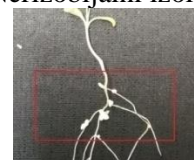
Prilog 2. Pregled bakterijskih izolata iz korenskih kvrčica žutog zvezdana

Naziv izolata	Način uzgoja biljke domaćina	Uzorak zemljišta	Gram reakcija	Nodulacija	Tip izolata	
DZM1Lm	samonikli zvezdan	DZM1	G- štapići	nod+	Rizobijalni izolati 	
DZK1Cm	samonikli zvezdan	DZK1	G- štapići	nod+		
PZR1Dm	gajeni zvezdan	PZR1	G- štapići	nod+		
PZNCm	gajeni zvezdan	PZN	G- štapići	nod+		
PZNDm	gajeni zvezdan	PZN	G- štapići	nod+		
DZR2Cm	samonikli zvezdan	DZR2	G- štapići	nod+		
PZR1Bm	gajeni zvezdan	PZR1	G- štapići	nod+		
610*	samonikli zvezdan	ZLT	G- štapići	nod+		
1M12*	samonikli zvezdan	*	G- štapići	nod+		
U1C*	samonikli zvezdan	*	G- štapići	nod+		
631oz*	samonikli zvezdan	*	G- štapići	nod+		
754*	samonikli zvezdan	VH	G- štapići	nod+		
DZM1Mm	samonikli zvezdan	DZM1	G- štapići	nod+		
PZR1Bm1	gajeni zvezdan	PZR1	G- štapići	nod-		
DZR2Dm	samonikli zvezdan	DZR2	G- štapići	nod+		
PZNDm1	gajeni zvezdan	PZN	G- štapići	nod+		
PZR1Em	gajeni zvezdan	PZR1	G- štapići	nod+		
DZK1Em	samonikli zvezdan	DZK1	G- štapići	nod+		
DZM1Jm	samonikli zvezdan	DZM1	G- štapići	nod+		
DZM1Om	samonikli zvezdan	DZM1	G- štapići	nod+		
PZNDm2	gajeni zvezdan	PZN	G- štapići	nod-		
PZR1Cm	gajeni zvezdan	PZR1	G- štapići	nod-		
DZK1Cm2	samonikli zvezdan	DZK1	G- štapići	nod-		
DZM1Jh	samonikli zvezdan	DZM1	G- štapići	nod-		
DZK1Bm	samonikli zvezdan	DZK1	G- štapići	nod+		
DZM1Km	samonikli zvezdan	DZM1	G- štapići	nod+		
DZM1Cm	samonikli zvezdan	DZM1	G- štapići	nod+		
DZM1Hm	samonikli zvezdan	DZM1	G- štapići	nod+		
DZM1Nm	samonikli zvezdan	DZM1	G- štapići	nod+		
DZM1Im	samonikli zvezdan	DZM1	G- štapići	nod+		
PZNBm	gajeni zvezdan	PZN	G- štapići	nod -		Nerizobijalni izolati
PZR1Em1	samonikli zvezdan	PZR1	G+ štapići	nod -		
DZR2Am2	samonikli zvezdan	DZR2	G- štapići	nod -		
ZR7IM2	samonikli zvezdan	ZR7	G+ štapići	nod -		
DZK1Bh	samonikli zvezdan	DZK1	G+ štapići	nod -		

Pilog 2. (nastavak) Pregled bakterijskih izolata iz korenskih kvrčica žutog zvezdana

Naziv izolata	Način uzgoja biljke domaćina	Uzorak zemljišta	Gram reakcija	Nodulacija	Tip izolata
ZR7IM2	samonikli zvezdan	ZR7	G+ štapići	nod -	
DZK1Bh	samonikli zvezdan	DZK1	G+ štapići	nod -	
ZR7Gm	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	
DZM1Nm1	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
DZM1LH2	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
PZR1Ah	gajeni zvezdan	PZR1	G+ štapići	nod -	
DZK1Em1	samonikli zvezdan	DZK1	G+ štapići	nod -	
DZK1Dm	samonikli zvezdan	DZK1	G+ štapići	nod -	
DZK1Jh	samonikli zvezdan	DZK1	G+ štapići	nod -	
DZM1Hm1	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
DZK1Eh	samonikli zvezdan	DZK1	G+ štapići	nod -	
2MNK*	samonikli zvezdan	*	G+ štapići	NT	
DZK1Ah	samonikli zvezdan	DZK1	G+ štapići	nod -	
DZM1Gh	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
DZM1Hh	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
ZR7Mm	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	
ZR7Jm	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	
ZR7Dm	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	
ZR7Em	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	
ZR7Hm	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	
ZR7Bm	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	
ZR7Cm	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	
DZK1Ch	samonikli zvezdan	DZK1	G+ štapići	nod -	
DZK1Dh	samonikli zvezdan	DZK1	G+ štapići	nod -	
DZK1Fm	samonikli zvezdan	DZK1	G+ štapići	nod -	
DZK1Bh	samonikli zvezdan	DZK1	G+ štapići	nod -	
DZM1Kh1	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
DZM1Oh2	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
DZM1Fh	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
DZM1Lh1	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
DZM1Lh2	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
DZM1Kh2	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
DZM1Kh3	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
DZM1Mh1	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
PZR1Gh	gajeni zvezdan	PZR1	G+ štapići	nod -	
ZR7GH1	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	
DZR3Am	samonikli zvezdan	DZR3	G+ štapići	nod -	
ZR7Dh	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	
ZR7Gh1	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	
ZR7Kh	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	
ZR7Hh	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	
ZR7Jh	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	
ZR7Gh2	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	
ZR7Bh	samonikli zvezdan	ZR7	G- štapići	nod -	

Nerizobijalni izolati



Pilog 2. (nastavak) Pregled bakterijskih izolata iz korenskih kvržica žutog zvezdana

Naziv izolata	Način uzgoja biljke domaćina	Uzorak zemljišta	Gram reakcija	Nodulacija	Tip izolata
DZM1IHh	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	Nerizobijalni izolati 
DZM1Ih	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
DZM1Oh2	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
DZR3Am	samonikli zvezdan	DZR3	G+ štapići	nod -	
DZM1Kh3	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
PZR1Bh	gajeni zvezdan	PZR1	G+ štapići	nod -	
DZK1Eh	samonikli zvezdan	DZK1	G+ štapići	nod -	
DZK1Em	samonikli zvezdan	DZK1	G+ štapići	nod -	
DZM1Hm	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
DZM1Km	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	
DZM1Jm	samonikli zvezdan	DZM1	G+ štapići	nod -	

*Izolati iz prethodnih istraživanja Instituta za zemljište; NT: nije testirano; nod-: izolat ne noduliše biljku domaćina prilikom reinokulacije, nod+: izolat noduliše biljku domaćina prilikom reinokulacije; ZLT: Zlatibor, VH: Vladičin Han.

Prilog 3. Tolerancija izolata iz korenskih kvržica lucerke (*M. sativa*) na različite pH vrednosti

Naziv izolata	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
PLK3AH	-	+	+	+	+	+	-
PLR2AH	-	+	+	+	+	-	-
L3	-	-	+	+	+	+	+
4.3	-	-	+	+	+	-	-
6.1	-	-	+	+	+	-	-
1.5	-	-	+	+	+	-	-
L22	-	-	+	+	+	+	-
L21	-	+	+	+	-	-	-
L1	-	+	+	+	-	-	-
LG	-	+	+	+	+	-	-
Luc2	-	+	+	+	+	-	-
L2Cr	-	+	+	+	+	-	-
DLK2Eh	-	-	+	+	+	+	-
4.6R B	-	-	+	+	-	-	-
L18	+	+	+	+	+	+	-
PLR2Bh	-	+	+	+	+	+	-
ppN 1	+	+	+	+	-	-	-
SM2	-	-	+	+	+	+	-
4.6R	-	+	+	+	-	-	-
2.1B	-	-	+	+	+	+	-
PLK2Am	-	-	+	+	+	-	-
2.1B1	-	+	+	+	+	+	-
214	-	-	+	+	+	+	-
219	-	-	+	+	+	-	-
GNOV4	-	-	+	+	-	-	-
GPD2	-	-	+	+	-	-	-
10-2 BM	-	+	+	+	+	-	-
GV2-1	-	+	+	+	+	-	-
2.24	-	+	+	+	+	-	-
2-1	-	+	+	+	+	-	-
2.3R	-	+	+	+	-	-	-
10-2N	+	+	+	+	+	-	-
DLM1Bm	-	±	+	+	+	±	-
MS2	+	+	+	+	+	-	-
MS3	+	+	+	+	+	-	-
MS6	-	±	+	+	+	+	-
MS7	-	-	+	+	+	+	-

Prilog 3. (nastavak) Tolerancija izolata iz korenskih kvržica lucerke (*M. sativa*) na različite pH vrednosti

Naziv izolata	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
MS8	+	+	+	+	+	+	-
OS	+	+	+	+	±	±	-
4.6R1	-	-	+	+	-	-	-
2.3R1	-	-	+	+	+	+	-
PLR1Bh	±	±	+	+	+	+	±
DLK2Bh	-	+	+	+	+	+	-
DLK2Dh	-	+	+	+	+	-	-
DLK2Ch	-	-	+	+	+	+	-
DLM1Bh	-	+	+	+	+	-	-
DLM1Ch	-	+	+	+	+	±	±
SM8	-	-	+	+	+	-	-
SM1	-	+	+	+	+	+	-
SMO3	-	+	+	+	+	-	-
SMO	-	-	+	+	+	-	-
Vø p12	-	±	+	+	+	+	±
2.6b	-	-	+	+	+	-	-
2.2b	-	-	+	+	+	-	-
4.9cr	±	+	+	+	+	-	-
3.1b	+	+	+	+	+	-	-
2.4b	+	+	+	+	+	+	-
2.1b	-	-	+	+	+	-	-
2.5b	-	-	+	+	+	±	-
4.8b	±	+	+	+	+	-	-
3.1b	-	-	+	+	+	-	-
SMO1	-	-	+	+	+	-	-
DLK2Dh1	-	-	+	+	+	-	-
DLK2Eh1	-	-	+	+	+	-	-

-: nije detektovan rast izolata.

Prilog 4. Tolerancija izolata iz korenskih kvržica žutog zvezdana (*L. corniculatus*) na različite pH vrednosti

Naziv izolata	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
DZM1Lm	-	+	+	+	+	-	-
DZK1Cm	-	+	+	+	+	+	-
PZR1Dm	+	+	+	+	+	-	-
PZNCm	-	-	+	+	+	+	-
PZNDm	-	+	+	+	+	-	-
DZR2Cm	-	-	-	+	+	-	-
PZR1Bm	-	+	+	+	+	-	-
610	+	+	+	+	+	NT	-
1M12	+	+	+	+	+	+	-
U1C	+	+	+	+	+	+	-
631oz	+	+	+	+	+	+	-
754	+	+	+	+	+	+	-
DZM1Mm	-	-	+	+	+	-	-
PZR1Bm1	-	+	+	+	+	-	-
DZR2Dm	-	+	+	+	+	-	-
PZNDm1	±	±	+	+	+	+	-
PZR1Em1	-	+	+	+	+	-	-
DZM1Em	-	-	+	+	+	±	±
DZM1Jm	-	-	+	+	+	-	-
DZM1Om	-	-	+	+	+	-	-
PZNDm2	-	±	+	+	+	-	-
PZR1Cm	±	+	+	+	+	-	-

Prilog 4. (nastavak) Tolerancija izolata iz korenskih kvržica žutog zvezdana (*L. corniculatus*) na različite pH vrednosti

Naziv izolata	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
DZK1Cm2	-	+	+	+	+	-	-
DZM1Jh	+	+	+	+	+	-	-
DZK1Bm	+	+	+	+	+	-	-
DZK1Km	-	+	+	+	+	+	-
DZM1Cm	-	+	+	+	+	-	-
DZM1Hm	-	+	+	+	+	-	-
DZM1Nm	-	+	+	+	+	-	-
DZM1Im	+	+	+	+	+	-	-
PZNBm	-	+	+	+	+	+	-
PZR1Em1	-	-	+	+	+	-	-
DZR2Am2	-	+	+	+	+	-	-
ZR7IM2	+	+	+	+	+	-	-
DZK1BH	+	+	+	+	+	-	-
ZR7GM	-	-	+	+	+	-	-
PZR1Ah	+	+	+	+	+	-	-
DZM1Nm1	+	+	+	+	+	-	-
DZM1LH2	-	+	+	+	-	-	-
DZK1Em1	-	-	+	+	+	+	+
DZK1Dm	-	±	+	+	+	-	-
DZK1Jh	+	+	+	+	+	+	-
DZM1Hm1	-	±	+	+	+	-	-
DZK1Eh	-	-	+	+	+	-	-
2MNK	±	±	+	+	+	-	-
DZK1Ah	-	+	+	+	-	-	-
DZM1Gh	-	-	+	+	±	±	-
DZM1Hh	-	-	+	+	+	-	-
ZR7Mm	+	+	+	+	+	-	-
ZR7Jm	-	+	+	+	+	-	-
ZR7Dm	+	+	+	+	+	-	-
ZR7Em	+	+	+	+	+	-	-
ZR7Hm	+	+	+	+	+	+	+
ZR7Bm	+	+	+	+	+	+	+
ZR7Cm	-	+	+	+	+	+	-
DZK1Ch	-	±	+	+	-	-	-
DZK1Dh	-	±	+	+	±	-	-
DZK1Fm	-	-	+	+	-	-	-
DZK1Bh	±	-	+	+	+	-	-
DZM1Kh1	-	+	+	+	-	-	-
DZM1Oh1	-	+	+	+	+	-	-
DZM1Fh	-	+	+	+	+	±	±
DZM1Lh1	-	-	+	+	+	+	-
DZM1Lh2	-	-	+	+	-	-	-
DZM1Kh2	-	±	+	+	+	-	-
DZM1Kh3	-	±	+	+	-	-	-
DZM1Mh1	-	-	+	+	+	±	-
PZR1Gh	-	-	+	+	-	-	-
ZR7GH1	+	+	+	+	+	-	-
DZR3Am	-	+	+	+	-	-	-
ZR7Dh	+	+	+	+	+	+	-
ZR7Gh1	+	+	+	+	+	-	-
ZR7Kh	+	+	+	+	+	-	-
ZR7Hh	-	+	+	+	+	-	-
ZR7Jh	+	+	+	+	+	-	-

Prilog 4. (nastavak) Tolerancija izolata iz korenskih kvrčica žutog zvezdana (*L. corniculatus*) na različite pH vrednosti

Naziv izolata	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
ZR7Gh2	+	+	+	+	-	-	-
ZR7Bh	+	+	+	+	+	-	-
DZM1IHh	-	±	+	+	-	-	-
DZM1Ih	-	-	+	+	-	-	-
DZM1Oh2	-	+	+	+	+	+	-
DZR3Am	-	-	+	+	+	+	-
DZM1Kh3	-	±	+	+	+	+	-
PZR1Bh	-	-	-	+	-	-	-
DZK1Eh	-	-	+	+	+	±	-
DZK1Em	-	+	+	+	+	-	-
DZM1Hm	+	+	+	+	+	-	-
DZM1Km	-	-	+	+	+	-	-
DZM1Jm	-	-	+	+	+	-	-

NT: nije testirano; -: nije detektovan rast izolata.

Prilog 5. Tolerancija izolata iz korenskih kvrčica lucerke (*M. sativa*) na različite koncentracije NaCl

Naziv izolata	0,5% NaCl	1% NaCl	2% NaCl	3% NaCl	4% NaCl	5% NaCl	6% NaCl
PLK3AH	+	+	+	+	+	+	+
PLR2AH	+	+	+	+	+	+	+
L3*	+	+	+	+	+	+	+
4.3	+	+	+	+	+	+	+
6.1	+	+	+	+	+	+	+
1.5	+	+	+	+	+	+	+
L22	+	+	+	+	-	-	-
L21	+	+	+	+	+	±	-
L1	+	+	+	+	±	-	-
LG	+	+	+	+	+	-	-
Luc2	+	+	+	+	+	-	-
L2Cr	+	+	+	+	+	±	±
DLK2Eh	+	+	+	+	-	-	-
4.6R B	+	+	+	+	-	-	-
L18	+	+	+	+	+	+	±
PLR2Bh	+	+	+	+	+	+	-
ppN 1	+	+	+	+	+	-	-
SM2	+	+	+	+	+	-	-
4.6R	+	+	+	+	+	-	-
2.1B	+	+	+	+	+	-	-
PLK2Am	+	+	+	+	±	±	-
2.1B1	+	+	+	+	±	-	-
214	+	+	+	+	+	-	-
219	+	+	+	+	+	-	-
GNOV4	+	+	+	+	-	-	-
GPD2	+	+	+	+	±	-	-
10-2 BM	+	+	+	+		-	-
GV2-1	+	+	+	+	±	-	-
2.24	+	+	+	+	+	-	-
2-1	+	+	+	+	+	-	-
2.3R	+	+	+	+	±	-	-
10-2N	+	+	+	+	±	-	-
DLM1Bm	+	+	+	+	+	-	-
MS2	+	+	+	+	±	-	-

Prilog 5. (nastavak) Tolerancija izolata iz korenskih kvržica lucerke (*M. sativa*) na različite koncentracije NaCl

Naziv izolata	0,5% NaCl	1% NaCl	2% NaCl	3% NaCl	4% NaCl	5% NaCl	6% NaCl
MS3	+	+	+	+	±	-	-
MS6	+	+	+	+	±	±	±
MS7	+	+	+	+	-	-	-
MS8	+	+	+	+	+	-	-
OS	+	+	+	±	±	-	-
4.6R1	+	+	+	+	+	-	-
2.3R1	+	+	+	-	-	-	-
PLR1Bh	+	+	+	+	-	-	-
DLK2Bh	+	+	+	-	-	-	-
DLK2Dh	+	+	+	-	-	-	-
DLK2Ch	+	+	+	+	+	-	-
DLM1Bh	+	+	+	±	-	-	-
DLM1Ch	+	+	+	±	-	-	-
SM8	+	+	+	-	-	-	-
SM1	+	+	+	+	-	-	-
SMO3	+	+	+	+	+	+	+
SMO	+	+	+	-	-	-	-
Vø p12	+	+	+	-	-	-	-
2.6b	+	+	-	-	-	-	-
2.2b	+	+	+	±	±	-	-
4.9cr	+	+	-	-	-	-	-
3.1b	+	+	+	+	+	+	-
2.4b	+	+	-	-	-	-	-
2.1b	+	+	+	+	±	±	-
2.5b	+	+	+	+	-	-	-
4.8b	+	+	+	+	+	+	-
3.1b	+	+	±	-	-	-	-
SMO1	+	+	+	+	-	-	-
DLK2Dh1	+	+	+	+	±	-	-
DLK2Eh1	+	+	+	-	-	-	-

*: Izolat je pokazao tolerantnost na do 10% NaCl; -: nije detektovan rast izolata.

Prilog 6. Tolerancija izolata iz korenskih kvržica žutog zvezdana (*L. corniculatus*) na različite koncentracije NaCl

Naziv izolata	0,5% NaCl	1% NaCl	2% NaCl	3% NaCl	4% NaCl	5% NaCl	6% NaCl
DZM1Lm	+	+	±	-	-	-	-
DZK1Cm	+	+	-	-	-	-	-
PZR1Dm	+	+	+	-	-	-	-
PZNCm	+	+	-	-	-	-	-
PZNDm	+	+	+	-	-	-	-
DZR2Cm	+	+	+	-	-	-	-
PZR1Bm	+	+	-	-	-	-	-
610							
1M12							
U1C				NT			
631oz							
754							
DZM1Mm	+	+	+	-	-	-	-
PZR1Bm1	+	+	+	-	-	-	-
DZR2Dm	+	+	+	+	±	-	-
PZNDm1	+	+	+	-	-	-	-

Prilog 6. (nastavak) Tolerancija izolata iz korenskih kvržica žutog zvezdana (*L. corniculatus*) na različite koncentracije NaCl

Naziv izolata	0,5% NaCl	1% NaCl	2% NaCl	3% NaCl	4% NaCl	5% NaCl	6% NaCl
PZR1Em1	+	+	+	-	-	-	-
DZM1Em	+	+	+	±	-	-	-
DZM1Jm	+	+	-	-	-	-	-
DZM1Om	+	+	-	-	-	-	-
PZNDm2	+	+	+	±	-	-	-
PZR1Cm	+	+	+	±	±	-	-
DZK1Cm2	+	+	-	-	-	-	-
DZM1Jh	+	+	-	-	-	-	-
DZK1Bm	+	+	-	-	-	-	-
DZK1Km	+	+	+	±	-	-	-
DZM1Cm	+	+	+	+	-	-	-
DZM1Im	+	+	+	-	-	-	-
PZNBm	+	+	+	+	-	-	-
PZR1Em1	+	+	+	+	+	+	-
DZR2Am2	+	+	+	+	+	-	-
ZR7IM2	+	+	+	+	+	±	-
DZK1Bh*	+	+	+	+	+	+	+
ZR7GM	+	+	+	+	+	-	-
PZR1Ah	+	+	+	+	+	-	-
DZM1Nm1	+	+	+	-	-	-	-
DZM1LH2	+	+	+	+	+	+	+
DZK1Em1	+	+	+	+	±	-	-
DZK1Dm	+	+	+	+	-	-	-
DZK1Jh	+	+	+	+	+	-	-
DZM1Hm1	+	+	+	+	±	-	-
DZK1Eh	+	+	+	+	+	+	-
2MNK	+	+	+	+	-	-	-
DZK1Ah	+	+	+	+	+	+	+
DZM1Gh	+	+	+	+	+	+	+
DZM1Hh	+	+	+	+	+	+	-
ZR7Mm	+	+	+	+	+	-	-
ZR7Jm	+	+	+	+	+	-	-
ZR7Dm	+	+	+	+	+	+	-
ZR7Em	+	+	+	+	+	+	+
ZR7Hm	+	+	+	+	+	-	-
ZR7Bm	+	+	+	+	+	±	-
ZR7Cm	+	+	+	+	+	-	-
DZK1Ch	+	+	+	+	+	+	+
DZK1Dh	+	+	+	+	-	-	-
DZK1Fm	+	+	+	+	±	-	-
DZK1Bh	+	+	+	+	+	+	+
DZM1Kh1	+	+	+	+	+	-	-
DZM1Oh1	+	+	+	+	+	-	-
DZM1Fh	+	+	+	+	+	+	-
DZM1Lh1	+	+	+	+	+	+	±
DZM1Lh2	+	+	+	+	+	+	+
DZM1Kh2	+	+	+	+	+	-	-
DZM1Kh3	+	+	+	+	+	-	-
DZM1Mh1	+	+	+	+	+	-	-
PZR1Gh	+	+	+	+	+	+	-
ZR7GH1	+	+	+	+	+	-	-
DZR3Am	+	+	+	±	-	-	-
ZR7Dh	+	+	+	+	+	-	-

Prilog 6. (nastavak) Tolerancija izolata iz korenskih kvržića žutog zvezdana (*L. corniculatus*) na različite koncentracije NaCl

Naziv izolata	0,5% NaCl	1% NaCl	2% NaCl	3% NaCl	4% NaCl	5% NaCl	6% NaCl
ZR7Gh1	+	+	+	+	+	-	-
ZR7Kh	+	+	+	+	+	±	-
ZR7Hh	+	+	+	+	+	±	-
ZR7Jh	+	+	+	+	+	-	-
ZR7Gh2	+	+	+	+	+	-	-
ZR7Bh	+	+	+	+	+	-	-
DZM1IHh	+	+	+	+	±	-	-
DZM1Ih	+	+	+	-	-	-	-
DZM1Oh2	+	+	+	+	-	-	-
DZR3Am	+	+	+	±	-	-	-
DZM1Kh3	+	+	+	+	+	-	-
PZR1Bh	+	+	+	+	+	-	-
DZK1Eh	+	+	+	-	-	-	-
DZK1Em	+	+	+	+	±	-	-
DZM1Hm	+	+	+	+	+	±	-
DZM1Km	+	+	+	+	-	-	-
DZM1Jm	-	-	+	+	+	-	-

*: Izolat je pokazao tolerantnost na do 10% NaCl; NT: nije testirano; -: nije detektovan rast izolata.

Prilog 7. Tolerancija izolata iz korenskih kvržića lucerke (*M. sativa*) na različite temperature

Naziv izolata	4°C	16°C	28°C	45°C	60°C
PLK3AH	-	+	+	-	-
PLR2AH	-	+	+	-	-
L3	-	+	+	+	±
4.3	-	-	+	±	-
6.1	-	-	+	±	-
1.5	-	-	+	±	-
L22	-	-	+	-	-
L21	-	-	+	-	-
L1	-	-	+	-	-
LG	-	+	+	-	-
Luc2	-	-	+	-	-
L2Cr	-	+	+	-	-
DLK2Eh	-	-	+	-	-
4.6R	-	-	+	-	-
L18	-	-	+	-	-
PLR2Bh	-	+	+	-	-
ppN 1	-	-	+	+	-
SM2	-	-	+	-	-
4.3R	-	-	+	-	-
2.1B	-	-	+	-	-
PLK2Am	-	+	+	±	-
2.1B1	-	-	+	-	-
214	-	-	+	-	-
219	-	-	+	-	-
GNOV4	-	±	+	-	-
GPD2	-	-	+	+	-
10-2 BM	-	-	+	-	-
GV2-1	-	-	+	-	-
2.24	-	-	+	-	-
2-1	-	-	+	+	-

Prilog 7. (nastavak) Tolerancija izolata iz korenskih kvržica lucerke (*M. sativa*) na različite temperature

Naziv izolata	4°C	16°C	28°C	45°C	60°C
L4	-	-	+	-	-
2.3R	-	-	+	-	-
10-2N	-	-	+	-	-
DLM1Bm	-	-	+	-	-
MS2	-	±	+	-	-
MS3	-	-	+	-	-
MS6	-	-	+	-	-
MS7	-	-	+	-	-
MS8	-	-	+	-	-
OS	-	-	+	±	-
4.6R1	-	-	+	-	-
2.3R1	-	-	+	-	-
PLR1Bh	-	-	+	-	-
DLK2Bh	-	+	+	-	-
DLK2Dh	-	+	+	-	-
DLK2Ch	-	+	+	-	-
DLM1Bh	-	+	+	-	-
DLM1Ch	-	+	+	-	-
SM8	-	+	+	-	-
SM1	-	-	+	-	-
SMO3	-	+	+	-	-
SMO	-	-	+	+	-
Vø p12	-	-	+	-	-
2.6b	-	+	+	-	-
2.2b	-	+	+	-	-
4.9cr	-	-	+	-	-
3.1b	-	+	+	-	-
2.4b	-	-	+	-	-
2.1b	-	+	+	±	-
2.5b	-	-	+	-	-
4.8b	-	-	+	-	-
3.1b	-	+	+	-	-
SMO1	-	+	+	+	-
DLK2Dh1	-	-	+	-	-
DLK2Eh1	-	+	+	-	-

NT: nije testirano; -: nije detektovan rast izolata.

Prilog 8. Tolerancija izolata iz korenskih kvržica žutog zvezdana (*L. corniculatus*) na različite temperature

Naziv izolata	4°C	16°C	28°C	45°C	60°C
DZM1Lm	-	-	+	±	-
DZK1Cm	-	-	+	-	-
PZR1Dm	-	-	+	-	-
PZNCm	-	-	+	-	-
PZNDm	-	-	+	-	-
DZR2Cm	-	-	+	-	-
PZR1Bm	-	-	+	-	-
610					
1M12					
U1C			NT		
631oz					
754					
DZM1Mm	-	-	+	-	-
PZR1Bm1	-	-	+	-	-
DZR2Dm	-	-	+	-	-
PZNDm1	-	+	+	-	-
PZR1Em1	-	+	+	-	-
DZM1Em	-	-	+	-	-
DZM1Jm	-	-	+	-	-
DZM1Om	-	±	+	-	-
PZNDm2	-	±	+	-	-
PZR1Cm	-	-	+	±	-
DZK1Cm2	-	-	+	-	-
DZM1Jh	-	-	+	-	-
DZK1Bm	-	+	+	-	-
DZK1Km	-	-	+	-	-
DZM1Cm	-	-	+	-	-
DZM1Im	-	-	+	-	-
PZNBm	-	+	+	-	-
PZR1Em1	-	+	+	-	-
DZR2Am2	-	+	+	-	-
ZR7IM2	-	+	+	-	-
PZR1Ah	-	+	+	+	-
DZK1BH	-	-	+	-	-
ZR7GM	-	+	+	-	-
DZM1Nm1	-	-	+	-	-
DZM1LH2	-	-	+	-	-
DZK1Em1	-	+	+	-	-
DZK1Dm	-	+	+	-	-
DZK1Jh	-	+	+	-	-
DZM1Hm1	-	+	+	-	-
DZK1Eh	-	+	+	-	-
2MNK	-	±	+	±	-
DZK1Ah	-	+	+	-	-
DZM1Gh	-	+	+	-	-
DZM1Hh	-	+	+	-	-
ZR7Mm	-	+	+	-	-
ZR7Jm	-	+	+	-	-
ZR7Dm	-	+	+	-	-
ZR7Em	-	+	+	-	-
ZR7Hm	-	+	+	-	-
ZR7Bm	-	+	+	-	-
ZR7Cm	-	+	+	-	-

NT: nije testirano; -: nije detektovan rast izolata.

Prilog 8. (nastavak) Tolerancija izolata iz korenskih kvržica žutog zvezdana (*L. corniculatus*) na različite temperature

Naziv izolata	4°C	16°C	28°C	45°C	60°C
DZK1Ch	-	+	+	-	-
DZK1Dh	-	+	+	-	-
DZK1Fm	-	-	+	-	-
DZK1Bh	-	-	+	±	-
DZM1Kh1	-	+	+	-	-
DZM1Oh1	-	+	+	-	-
DZM1Fh	-	+	+	-	-
DZM1Lh1	-	+	+	-	-
DZM1Lh2	-	+	+	-	-
DZM1Kh2	-	-	+	-	-
DZM1Kh3	-	-	+	-	-
DZM1Mh1	-	+	+	-	-
PZR1Gh	-	+	+	-	-
ZR7GH1	-	+	+	-	-
DZR3Am	-	+	+	-	-
ZR7Dh	-	+	+	-	-
ZR7Gh1	-	+	+	-	-
ZR7Kh	-	+	+	-	-
ZR7Hh	-	+	+	-	-
ZR7Jh	-	+	+	-	-
ZR7Gh2	-	+	+	-	-
ZR7Bh	-	+	+	-	-
DZM1IHh	-	-	+	-	-
DZM1Ih	-	+	+	-	-
DZM1Oh2	-	-	+	-	-
DZR3Am	-	+	+	-	-
DZM1Kh3	-	+	+	-	-
PZR1Bh	-	+	+	-	-
DZK1Eh	-	+	+	-	-
DZK1Em	-	+	+	-	-
DZM1Hm	-	+	+	-	-
DZM1Km	-	-	+	-	-
DZM1Jm	-	+	+	-	-

NT: nije testirano; -: nije detektovan rast izolata.

Prilog 9. PGP osobine izolata poreklom iz korenskih kvržica lucerke (*M. sativa*)

Naziv izolata	Produkcija siderofora (poluprečnik halo zone mm)	Solubilizacija fosfata (poluprečnik halo zone mm)	Produkcija IAA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
PLK3AH	3,17±1,15 ^s	-	16,13±2,22 ^d
PLR2AH	4,83±0,29 ^f	-	20,15±1,14 ^{cd}
L3	7,00±1,73 ^e	-	50,87±2,16 ^a
4.3	1,83±0,58 ^{hi}	-	5,08±0,66 ^h
6.1	-	-	19,95±0,16 ^{cd}
1.5	-	-	7,18±0,63 ^{fg}
L22	0,83±0,29 ⁱ	-	8,95±0,61 ^f
L21	1,00±0,50 ⁱ	-	7,20±0,47 ^{fg}
L1	9,83±0,58 ^d	1,17±0,58 ^e	26,85±0,92 ^c
LG	13,00±2,56 ^c	13,00±1,32 ^a	28,93±1,24 ^{bc}
Luc2	17,00±1,73 ^b	9,89±1,04 ^c	28,73±1,59 ^{bc}
L2Cr	44,83±4,07 ^a	12,17±1,76 ^b	21,86±0,74 ^c
DLK2Eh	11,83±1,53 ^{cd}	-	12,20±1,22 ^e
4.6R	-	-	-
L18	-	-	1,03±0,59 ^k
PLR2Bh	-	-	-
ppN 1	-	-	-
SM2	-	2,17±0,29 ^{de}	1,95±0,10 ^{jk}
4.3R	-	-	-
2.1B	-	-	-
PLK2Am	-	-	-
2.1B	-	-	-
214	NT	-	NT
219	NT	-	NT
GNOV4	-	-	-
GPD2	-	-	-
10-2 BM	-	-	-
GV2-1	-	-	-
2.24	-	-	7,12±0,47 ^{fg}
2-1	-	-	-
2.3R	-	-	-
10-2N	2,67±0,23 ^h	-	-
DLM1Bm	-	-	2,25±0,42 ^j
MS2	-	-	1,34±0,20 ^k
MS3	-	-	0,89±0,12 ^{kl}
MS6	-	-	-
MS7	-	-	-
MS8	-	-	-
OS	-	-	-
4.6R1	-	-	-
2.3R	-	-	-
PLR1Bh	-	-	-
DLK2Bh	-	-	3,4±0,96 ⁱ
DLK2Dh	-	-	4,97±0,76 ^h
DLK2Ch	4,00±0,50 ^{fg}	-	20,34±0,91 ^{cd}
DLM1Bh	-	-	27,85±1,71 ^{bc}
DLM1Ch	-	-	-
SM8	-	1,13±0,09 ^e	1,02±0,70 ^{jk}

Prilog 9. (nastavak) PGP osobine izolata poreklom iz korenskih kvržica lucerke (*M. sativa*)

Naziv izolata	Produkcija siderofora (poluprečnik halo zone mm)	Solubilizacija fosfata (poluprečnik halo zone mm)	Produkcija IAA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
SM1	-	-	10,02±1,42 ^{ef}
SMO3	-	-	-
SMO	-	2,83±0,58 ^d	8,65±0,49 ^f
Vø p12	-	-	3,95±0,45 ^{hi}
2.6b	-	-	-
2.2b	-	-	-
4.9cr	-	-	2,53±0,92 ^j
3.1b	-	-	-
2.4b	-	-	-
2.1b	-	-	7,01±2,42 ^{fg}
2.5b	-	-	-
4.8b	-	-	-
3.1b	-	-	-
SMO1	-	-	30,72±1,33 ^b
DLK2Dh1	-	-	4,07±0,54 ^h
DLK2Eh1	11,83±2,47 ^{cd}	-	12,05±1,01 ^e

NT: nije testirano; -: nije detektovana produkcija; a-l: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$).

Prilog 10. PGP osobine izolata poreklom iz korenskih kvržica žutog zvezdana (*L. corniculatus*)

Naziv izolata	Produkcija siderofora (poluprečnik halo zone mm)	Solubilizacija fosfata (poluprečnik halo zone mm)	Produkcija IAA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
DZM1Lm	-	5,00±0,00 ^b	12,77±0,20 ^g
DZK1Cm	-	3,50±1,00 ^{cd}	7,41±0,29 ⁱ
PZR1Dm	-	-	10,00±2,41 ⁱ
PZNCm	-	-	13,34±1,42 ^g
PZNDm	-	3,33±0,24 ^d	0,97±0,25 ^{mn}
DZR2Cm	-	5,17±0,23 ^b	3,01±0,24 ^l
PZR1Bm	-	-	11,77±1,04 ^{gh}
610	-	2,17±0,24 ^e	1,43±0,10 ^m
1M12	-	-	99,37±5,05 ^a
U1C	-	-	76,70±4,92 ^b
631oz	-	-	18,72±3,42 ^{ef}
754	-	2,67±0,24 ^{de}	43,65±5,21 ^c
DZM1Mm	-	-	1,00±0,10 ^m
PZR1Bm1	-	-	12,02±1,25 ^g
DZR2Dm	-	-	-
PZNDm1	-	4,33±0,47 ^{bc}	1,13±0,10 ^m
PZR1Em	-	1,83±0,24 ^{ef}	6,97±1,05 ^{jh}
DZK1Em	-	-	-
DZM1Jm	-	-	-
DZM1Om	-	2,00±0,1 ^f	3,99±0,33 ^{kl}
PZNDm2	-	-	-
PZR1Cm	-	-	-
DZK1Cm2	-	-	-
DZM1Jh	4,83±1,89 ^{ef}	-	10,42±0,86 ⁱ
DZK1Bm	-	-	1,01±0,1 ^m
DZM1Km	-	-	-
DZM1Cm	-	-	3,00±0,00 ^l
DZM1Hm	-	-	-
DZM1Nm	-	-	-
DZM1Im	-	-	4,01±0,1 ^{kl}
PZNBm	-	-	-
PZR1Em1	-	2,50±1,00 ^{de}	7,25±1,04 ^j
DZR2Am2	-	-	-
ZR7IM2	20,17±2,75 ^b	-	42,40±1,10 ^c
DZK1Bh	12,00±2,65 ^c	9,83±1,53 ^a	44,12±2,44 ^c
ZR7Gm	7,83±0,76 ^d	-	36,05±1,82 ^d
DZM1Nm1	-	-	6,39±1,05 ^{ijkl}
DZM1LH2	-	-	-
PZR1Ah	-	-	1,14±0,10 ^m
DZK1Em1	-	-	-
DZK1Dm	-	-	-
DZK1Jh	2,00±0,50 ^{fg}	1,83±0,58 ^f	17,78±0,95 ^f
DZM1Hm1	20,83±0,40 ^b	-	12,0±1,0 ^g
DZK1Eh	20,79±3,30 ^b	-	11,99±0,9 ^g
2MNK	-	-	-
DZK1Ah	-	-	20,92±0,77 ^e
DZM1Gh	-	-	-
DZM1Hh	-	-	-

Prilog 10. (nastavak) PGP osobine izolata poreklom iz korenskih kvržica žutog zvezdana (*L. corniculatus*)

Naziv izolata	Produkcija siderofora (poluprečnik halo zone mm)	Solubilizacija fosfata (poluprečnik halo zone mm)	Produkcija IAA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
ZR7Mm	-	-	-
ZR7Jm	-	-	-
ZR7Dm	-	-	3,37±0,43 ^l
ZR7Em	-	-	-
ZR7Hm	2,16±0,24 ^{fg}	-	-
ZR7Bm	-	-	-
ZR7Cm	-	-	-
DZK1Ch	-	-	0,92±0,30 ^{mn}
DZK1Dh	-	-	16,03±0,85 ^f
DZK1Fm	-	-	-
DZK1Bh	-	-	-
DZM1Kh1	-	-	-
DZM1Oh2	7,17±2,02 ^{de}	-	4,07±0,19 ^{kl}
DZM1Fh	-	-	-
DZM1Lh1	-	-	-
DZM1Lh2	-	-	-
DZM1Kh2	-	-	-
DZM1Kh3	1,00±0,00 ^s	-	9,02±1,54 ⁱ
DZM1Mh1	-	-	-
PZR1Gh	-	3,00±0,00 ^d	10,68±1,24 ^h
ZR7GH1	-	-	-
DZR3Am	-	-	1,03±0,38 ^m
ZR7Dh	2,83±0,58 ^f	2,17±0,58 ^e	2,16±0,13 ^{lm}
ZR7Gh1	-	-	-
ZR7Kh	24,83±2,36 ^a	-	14,70±1,25 ^{fg}
ZR7Hh	-	-	-
ZR7Jh	5,17±0,24 ^e	-	-
ZR7Gh2	-	-	4,41±0,43 ^{kl}
ZR7Bh	-	-	-
DZM1IHh	8,17±2,02 ^d	-	6,85±0,53 ^{jk}
DZM1Ih	8,00±1,00 ^d	-	4,17±0,96 ^{kl}
DZM1Oh2	-	-	-
DZR3Am	-	-	1,00±0,09 ^m
DZM1Kh3	-	-	-
PZR1Bh	2,83±0,29 ^f	-	6,08±1,13 ^{kl}
DZK1Eh	-	-	-
DZK1Em	-	-	3,78±0,25 ^{kl}
DZM1Hm	-	2,00±1,00 ^e	3,34±0,52 ^l
DZM1Km	-	-	4,00±0,00 ^{kl}
DZM1Jm	-	4,00±1,0 ^c	6,00±0,50 ^{kl}

-. nije detektovana produkcija; a-n: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P < 0,05$).

Prilog 11. Pregled svih izolata determinisanih u ovoj studiji

Naziv izolata	Sekvenca gena	Vrsta	Procenat sličnosti (%)
PLK3AH	16S rRNA	<i>Bacillus megaterium</i>	99,90
	<i>tuf</i>		99,86
PLR2AH	16S rRNA	<i>Bacillus zanthoxyli/B. aryabhatai</i>	99,90
	<i>tuf</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	100
L3	16S rRNA	<i>Bacillus mojavensis</i>	99,79
	<i>tuf</i>		99,72
4.3	16S rRNA	<i>Bacillus thuringiensis/B. toyensis</i>	99,88
	<i>tuf</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
6.1	16S rRNA	<i>Bacillus thuringiensis/B. toyensis</i>	99,88
	<i>tuf</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
1.5	16S rRNA	<i>Bacillus thuringiensis/B. toyensis</i>	99,48
	<i>tuf</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
L22	16S rRNA	<i>Bacillus kochii</i>	99,56
	<i>tuf</i>		98,99
L21	16S rRNA	<i>Bacillus megaterium/B. flexa</i>	100
	<i>tuf</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	100
L1	16S rRNA	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	98,78
	<i>gyrB</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	100
LG	16S rRNA	<i>Pseudomonas sp.</i>	98,08
	<i>gyrB</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	100
Luc2	16S rRNA	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	99,17
	<i>gyrB</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	100
L2Cr	16S rRNA	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	98,80
	<i>gyrB</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	100
DLK2Eh	16s rRNA	<i>Bacillus zanthoxyli/B. aryabhatai</i>	98,84
	<i>tuf</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	99,74
L18	16S rRNA	<i>Bacillus megaterium/B. aryabhatai/B. zanthoxyli/B. aryabhatai/B. flexa</i>	99,87
214	16S rRNA	<i>Nocardia sp./Rhodococcus sp.</i>	99,90
219	16S rRNA	<i>Bosea thioxidans</i>	99,49
PLR2Bh	16S rRNA	<i>Bacillus zanthoxyli/B. aryabhatai</i>	99,98
ppN 1	16S rRNA	<i>Agrobacterium tumefaciens/Rhizobium nepotum/Agrobacterium fabacearum</i>	99,09
SM2	16S rRNA	<i>Bacillus licheniformis</i>	98,66
4.3R	16S rRNA	<i>Bacillus subtilis</i>	98,59
2.1B	16S rRNA	<i>Bacillus zanthoxyli/B. aryabhatai</i>	98,01
PLK2Am	16S rRNA	<i>Peribacillus simplex/Brevibacterium frigidotolerans</i>	99,70
	<i>tuf</i>	<i>Brevibacterium frigidotolerans</i>	99,39
2.1B1	16S rRNA	<i>Bacillus zanthoxyli/B. aryabhatai</i>	100
	<i>tuf</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	99,66
4.6R1	16S rRNA	<i>Mesorhizobium erdmanii</i>	100
2.3R	16S rRNA	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	98,59
10-2N	16S rRNA	<i>Sinorhizobium medicae</i>	98,58
	<i>recA</i>		99,46
DLM1Bm	16S rRNA	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99,66
	<i>recA</i>		99,13
GNOV4	16S rRNA	<i>Sinorhizobium sp.</i>	100
	<i>recA</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99,10
GPD2	16S rRNA	<i>Sinorhizobium medicae</i>	100
	<i>recA</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99,48
10-2 BM	16S rRNA	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99,81
GV2-1	16S rRNA	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99,77
	<i>recA</i>		98,96

Prilog 11. (nastavak) Pregled svih izolata determinisanih u ovoj studiji

Naziv izolata	Sekvenca gena	Vrsta	Procenat sličnosti (%)
2.24	16S rRNA	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100
	<i>recA</i>		99,39
2-1	16S rRNA	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100
	<i>recA</i>		98
L4	16S rRNA	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99,22
	<i>recA</i>		98,13
L5	16S rRNA	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99,06
ZR7IM2	16S rRNA	<i>Serratia plymuthica</i>	99,48
	<i>gyrB</i>		100
DZK1BH	16S rRNA	<i>Bacillus megaterium</i>	100
	<i>tuf</i>		100
ZR7GM	16S rRNA	<i>Serratia plymuthica</i>	99,36
	<i>gyrB</i>		100
DZM1Nm1	16S rRNA	<i>Bacillus</i> spp.	100
DZM1LH2	16S rRNA	<i>Bacillus thuringiensis/B. cereus/B. paramobilis</i>	99,72
	<i>tuf</i>	<i>Bacillus toyensis</i>	99,63
DZK1Em1	16S rRNA	<i>Bacillus</i> spp.	100
DZK1Dm	16S rRNA	<i>Bacillus</i> spp.	100
	<i>tuf</i>	<i>Bacillus toyensis</i>	99,66
DZK1Jh	16S rRNA	<i>Bacillus megaterium/B. aryabhatai/B. flexa</i>	100
	<i>tuf</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	99,77
DZM1Hm1	16S rRNA	<i>Bacillus mobilis/B. hominis/B. paramobilis</i>	100
	<i>tuf</i>	<i>Bacillus toyensis</i>	99,69
DZK1Eh	16S rRNA	<i>Periacillus simplex/Brevibacterium frigitolerans</i>	99,62
	<i>tuf</i>	<i>Brevibacterium frigitolerans</i>	99,59
PZNBm	16S rRNA	<i>Phylobacterium loti</i>	99,78
	<i>recA</i>		95,93
PZR1Em1	16S rRNA	<i>Bacillus licheniformis/B. sonorensis/B. haynesii</i>	98,89
	<i>tuf</i>	<i>B. paralicheniformis</i>	99,71
DZR2Am2	16S rRNA	<i>Pseudomonas fragi</i>	98,96
2NMK	16S rRNA	<i>Paenibacillus albidus</i>	98,61
1MNKsv	16S rRNA	<i>Paenibacillus wynnii/P. albidus</i>	98,12
1MNKnod	16S rRNA	<i>Paenibacillus wynnii/P. albidus</i>	98,12
613	16S rRNA	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	99,56
617	16S rRNA	<i>Mesorhizobium</i> spp.	99,57
607	16S rRNA	<i>Mesorhizobium</i> spp.	98,86
611	16S rRNA	<i>Mesorhizobium jarvisii/M. carmichaelinearum</i>	99,52
615	16S rRNA	<i>Mesorhizobium</i> spp.	99,67
629 ₁	16S rRNA	<i>Mesorhizobium silamurunense/ M. amorphae</i>	99,65
602v	16S rRNA	<i>Mesorhizobium erdmani</i>	98,46
616	16S rRNA	<i>Mesorhizobium huakuii/M. jarvisii</i>	100
604	16S rRNA	<i>Mesorhizobium erdmanii</i>	100
608	16S rRNA	<i>Mesorhizobium huakuii/M. jarvisii</i>	100
PZR1Em	16S rRNA	<i>Mesorhizobium erdmanii</i>	99,40
DZM1Mm	16S rRNA	<i>Mesorhizobium</i> sp.	100
	<i>recA</i>		98,95
PZR1Bm1	16S rRNA	<i>Mesorhizobium jarvisii/M. erdmanii</i>	99,90
DZR2Dm	16S rRNA	<i>Mesorhizobium sphorae/M. waitakense</i>	99,55
PZNDm1	16S rRNA	<i>Mesorhizobium jarvisii/M. erdmanii</i>	100
DZM1Lm	16S rRNA	<i>Mesorhizobium cantuariense</i>	99,37
DZK1Cm	16S rRNA	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	99,46
PZR1Dm	16S rRNA	<i>Mesorhizobium erdmanii</i>	99,70

Prilog 11. (nastavak) Pregled svih izolata determinisanih u ovoj studiji

Naziv izolata	Sekvenca gena	Vrsta	Procenat sličnosti (%)
PZNCm	16S rRNA	<i>Mesorhizobium erdmanii</i>	100
	<i>recA</i>	<i>Mesorhizobium japonicum</i>	98,65
PZNDm	16S rRNA	<i>Mesorhizobium erdmanii</i>	99,79
DZR2Cm	16S rRNA	<i>Mesorhizobium loti</i>	99,47
PZR1Bm	16S rRNA	<i>Mesorhizobium jarvisii</i>	99,90
610	16S rRNA	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	99,78
1M12	16S rRNA	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	99,47
	<i>recA</i>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	99,40
U1C	16S rRNA	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	99,79
	<i>recA</i>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	99,61
631oz	16S rRNA	<i>Mesorhizobium caraganae</i>	99,60
	<i>recA</i>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	98,59
754	16S rRNA	<i>Mesorhizobium jarvisii</i>	100
	<i>recA</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>	99

Prilog 12. Značajne korelacije između suve biljne mase, N% i usvajanja nutrijenata u biljkama žutog zvezdana (*L. corniculatus*) (Ogled u saksijama I)

	SDW	N%	Ca	K	Mg	P	B	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	N-u	Ca-u	K-u	Mg-u	P-u	B-u	Cu-u	Fe-u	Mn-u	Ni-u	Zn-u	
SDW	1																							
N%		1																						
Ca			1																					
K	**			1																				
Mg			**		1																			
P		**		**		1																		
B					*		1																	
Cu			*		*			1																
Fe	*			**		**			1															
Mn					*			*		1														
Ni		**	**	**	*	*					1													
Zn							**					1												
N-u	**	*		*					*				1											
Ca-u	**			*						*			**	1										
K-u	**											*	**	**	1									
Mg-u	**			*					*	*		*	**	**	**	1								
P-u	**	*		**		*			*	*		**	**	**	**	**	1							
B-u	**			*			**			*		**	**	**	**	**	**	1						
Cu-u	**			*						*			**	**	**	**	**	**	1					
Fe-u									*	**			**	**	**	**	**	**	**	1				
Mn-u	**			*						**			**	**	**	**	**	**	**	**	1			
Ni-u	**			*						**			**	**	**	**	**	**	**	**	**	1		
Zn-u	**			*								*	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	

*p<0,05: značajna korelacija; **p<0,01: veoma značajna korelacija; u: usvajanje; SDW: suva nadzemna masa biljaka.

Prilog 13. Koncentracija mikroelemenata u biljkama lucerke (*M. sativa*) (Ogled u polju)

Biljna vrsta	Otkos	Tretman	Mikroelementi (mg kg ⁻¹)								
			Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn	
Lucerka	I 2020.	Ø	0.83 ^a	9.92 ^a	5.28 ^b	1132 ^a	51.9 ^a	10.51 ^a	3.55 ^a	26.0 ^a	
		T1	0.35 ^c	3.67 ^d	4.86 ^c	485 ^c	45.6 ^b	5.44 ^c	0.75 ^c	20.5 ^b	
		T2	0.35 ^c	5.09 ^c	4.99 ^c	469 ^{bc}	35.7 ^c	5.58 ^c	0.55 ^c	19.7 ^b	
		T3	0.50 ^b	8.26 ^b	7.89 ^a	693 ^b	46.5 ^b	7.45 ^b	1.86 ^b	25.7 ^a	
	II 2020.	Ø	IGDM	0.79 ^a	4.59 ^c	83.7 ^c	22.6 ^{ab}	3.07 ^b	IGDM	18.4 ^c	
		T1	IGDM	0.78 ^a	4.68 ^c	85.4 ^c	21.4 ^b	2.97 ^c	IGDM	18.8 ^c	
		T2	IGDM	0.61 ^b	6.72 ^a	106.0 ^b	25.3 ^a	3.99 ^a	IGDM	25.1 ^a	
		T3	0.06	0.77 ^a	5.26 ^b	115 ^a	22.4 ^{ab}	3.04 ^b	IGDM	21.3 ^b	
	I 2021.	Ø		0.58 ^a	4.19 ^a	6.51 ^a	120 ^b	25.1 ^{ab}	4.38 ^a	IGDM	27.6 ^a
		T1		0.12 ^b	1.22 ^b	6.30 ^a	137 ^a	32.9 ^a	4.26 ^b	IGDM	23.9 ^b
		T2		0.07 ^c	0.65 ^c	5.34 ^b	89.6 ^c	28.0 ^{ab}	4.31 ^a	IGDM	26.7 ^a
		T3	IGDM	0.81 ^{bc}	5.91 ^{ab}	82.4 ^c	21.6 ^b	3.76 ^c	IGDM	20.4 ^c	
III 2021.	Ø		0.38 ^a	4.25 ^a	6.69 ^c	581 ^a	37.6 ^a	7.61 ^b	0.07 ^b	18.5 ^a	
	T1		0.33 ^a	3.93 ^a	6.85 ^c	462 ^b	35.3 ^{ab}	8.70 ^a	0.82 ^a	17.8 ^a	
	T2		0.13 ^b	1.83 ^b	7.02 ^b	194 ^d	33.3 ^b	6.81 ^{bc}	IGDM	17.7 ^a	
	T3		0.18 ^b	2.07 ^b	8.03 ^a	236 ^c	32.2 ^b	6.61 ^c	IGDM	17.4 ^b	

Vrednosti obeležene crvenim su u opsegu koje se smatraju povišenim ili toksičnim po Kabata-Pendias, 2010; a-c: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$); IGDM: ispod granice detekcije metode (Co i Pb: $< 0,05 \text{ mg kg}^{-1}$); T1: seme tretirano sa *S. meliloti* L4; T2: seme tretirano sa *B. megaterium* DLK2Eh; T3: seme tretirano sa *S. meliloti* L4 i *B. megaterium* DLK2Eh; Ø: netretirana kontrola.

Prilog 14. Koncentracija mikroelemenata u biljkama ježevica (*D. glomerata*) (Ogled u polju)

Biljna vrsta	Otkos	Tretman	Mikroelementi (mg kg ⁻¹)							
			Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Ježevica	I 2020.	Ø	0.59 ^a	9.51 ^a	5.03 ^a	804 ^a	91.2 ^b	8.64 ^a	2.99 ^a	21.8 ^a
		T1	0.12 ^b	3.32 ^c	2.24 ^c	213 ^c	82.0 ^c	4.33 ^c	IGDM	12.6 ^c
		T2	0.11 ^b	4.70 ^{bc}	3.17 ^b	201 ^c	92.8 ^b	5.66 ^b	IGDM	15.4 ^b
		T3	0.33 ^{ab}	6.91 ^b	3.07 ^b	449 ^b	99.1 ^a	6.45 ^b	0.97 ^b	19.0 ^a
	II 2020.	Ø	IGDM	4.10 ^{ab}	1.51 ^b	123 ^b	103.4 ^b	5.97 ^a	IGDM	15.9 ^b
		T1	0.08 ^a	3.70 ^b	2.20 ^{ab}	112.5 ^c	109.2 ^a	5.72 ^a	IGDM	15.70 ^b
		T2	0.09 ^a	3.80 ^b	2.11 ^{ab}	89.7 ^d	111.9 ^a	5.78 ^a	IGDM	14.3 ^c
		T3	0.07 ^a	4.93 ^a	2.81 ^a	138 ^a	94.6 ^c	5.80 ^a	IGDM	21.9 ^a
	I 2021.	Ø	IGDM	1.97 ^b	1.56 ^a	51.2 ^{ab}	55.8 ^b	4.88 ^a	IGDM	18.3 ^a
		T1	IGDM	4.11 ^a	1.03 ^b	46.2 ^b	60.5 ^a	4.93 ^a	IGDM	15.0 ^b
		T2	IGDM	1.42 ^b	1.04 ^b	54.5 ^a	46.0 ^c	4.03 ^b	IGDM	12.9 ^c
		T3	IGDM	1.21 ^b	1.75 ^a	52.2 ^{ab}	57.3 ^{ab}	4.60 ^{ab}	IGDM	18.4 ^a
III 2021.	Ø		0.40 ^a	10.61 ^a	4.77 ^a	542 ^a	85.2 ^a	9.47 ^a	1.44 ^a	26.9 ^b
	T1		0.33 ^{ab}	7.71 ^b	3.74 ^b	481 ^b	75.4 ^b	8.15 ^b	0.90 ^{ab}	24.6 ^c
	T2		0.21 ^b	5.57 ^c	4.94 ^a	314 ^c	65.5 ^c	7.18 ^c	0.49 ^b	34.8 ^a
	T3		0.19 ^b	6.19 ^{bc}	4.67 ^a	332 ^c	68.7 ^c	7.24 ^c	0.90 ^{ab}	27.7 ^b

*Vrednosti obeležene crvenim su u opsegu koje se smatraju povišenim ili toksičnim po Kabata-Pendias, 2010; a-c: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$); IGDM: ispod granice detekcije metode (Co i Pb: $< 0,05 \text{ mg kg}^{-1}$); T1: seme tretirano sa *S. meliloti* L4; T2: seme tretirano sa *B. megaterium* DLK2Eh; T3: seme tretirano sa *S. meliloti* L4 i *B. megaterium* DLK2Eh; Ø: netretirana kontrola.

Prilog 15. Koncentracija mikroelemenata u smeši lucerke (*M. sativa*) i ježevica (*D. glomerata*) (Ogled u polju)

Biljna vrsta	Otkos	Tretman	Mikroelemeni (mg kg ⁻¹)							
			Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Smeša (lucerka i ježevica)	I 2020.	Ø	0.25 ^a	5.70 ^a	5.57 ^a	384 ^b	75.7 ^a	5.44 ^b	0.93 ^a	20.4 ^b
		T1	0.30 ^a	4.49 ^c	4.86 ^b	400 ^a	63.7 ^b	5.87 ^a	0.71 ^b	23.0 ^a
		T2	0.26 ^a	3.99 ^c	4.65 ^b	363 ^{bc}	61.2 ^c	5.42 ^b	0.43 ^c	22.1 ^{ab}
		T3	0.26 ^a	5.03 ^b	3.90 ^c	345 ^c	71.1 ^{ab}	5.80 ^a	0.62 ^b	17.3 ^b
	II 2020.	Ø	0.06 ^b	3.81 ^a	3.06 ^b	132 ^b	88.7 ^a	5.64 ^a	IGDM	22.2 ^b
		T1	0.06 ^b	3.35 ^{ab}	2.95 ^b	133 ^b	68.4 ^b	4.66 ^b	IGDM	15.8 ^d
		T2	0.10 ^a	1.76 ^b	4.38 ^a	172 ^a	34.9 ^c	3.93 ^c	IGDM	23.0 ^a
		T3	IGDM	1.07 ^b	4.80 ^a	73 ^c	31.3 ^c	2.93 ^d	IGDM	18.4 ^c
	I 2021.	Ø	IGDM	1.33 ^a	0.70 ^c	49.8 ^b	62.5 ^a	2.39 ^c	IGDM	14.0 ^c
		T1	IGDM	1.16 ^a	2.31 ^{ab}	40.4 ^c	57.2 ^b	4.72 ^a	IGDM	20.0 ^a
		T2	IGDM	1.48 ^a	3.67 ^a	51.0 ^a	41.4 ^d	4.65 ^a	IGDM	18.3 ^{ab}
		T3	IGDM	1.29 ^a	2.05 ^b	39.7 ^c	44.1 ^c	3.96 ^b	IGDM	17.1 ^b
III 2021.	Ø	0.27 ^a	7.40 ^a	4.28 ^c	411 ^a	71.5 ^a	7.96 ^a	0.80 ^a	26.0 ^b	
	T1	0.14 ^b	4.36 ^b	6.71 ^a	270 ^b	66.9 ^b	6.40 ^b	IGDM	23.4 ^c	
	T2	0.11 ^b	4.84 ^b	5.38 ^b	231 ^c	64.7 ^b	6.09 ^c	IGDM	22.7 ^c	
	T3	0.19 ^{ab}	4.99 ^b	6.41 ^a	286 ^b	61.5 ^c	6.88 ^{ab}	0.89 ^a	31.5 ^a	

*Vrednosti obeležene crvenim su u opsegu koje se smatraju povišenim ili toksičnim po Kabata-Pendias, 2010; a-d: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$); IGDM: ispod granice detekcije metode (Co i Pb: $< 0,05 \text{ mg kg}^{-1}$); T1: seme tretirano sa *S. meliloti* L4; T2: seme tretirano sa *B. megaterium* DLK2Eh; T3: seme tretirano sa *S. meliloti* L4 i *B. megaterium* DLK2Eh; Ø: netretirana kontrola.

Prilog 16. Koncentracija makroelemenata u biljkama lucerke (*M. sativa*) (Ogled u polju)

Biljna vrsta	Otkos	Tretman	Makroelemeni (g kg ⁻¹)			
			Ca	K	Mg	P
Lucerka	I 2020.	Ø	33,23 ^a	30,02 ^a	24,21 ^a	2,27 ^a
		T1	24,32 ^b	15,93 ^b	5,84 ^b	2,17 ^{ab}
		T2	22,89 ^b	14,38 ^b	5,98 ^b	1,99 ^b
		T3	16,31 ^c	16,70 ^b	5,33 ^b	2,67 ^a
	II 2020.	Ø	15,52 ^{ab}	17,03 ^b	4,17 ^{ab}	2,46 ^a
		T1	12,62 ^b	16,14 ^b	3,14 ^b	2,24 ^a
		T2	18,50 ^a	21,22 ^a	4,42 ^a	3,27 ^a
		T3	13,60 ^b	14,25 ^c	3,37 ^b	2,24 ^a
	I 2021.	Ø	19,91 ^b	16,42 ^c	6,54 ^a	2,45 ^b
		T1	24,90 ^a	21,52 ^b	5,44 ^b	3,10 ^a
		T2	20,38 ^{ab}	23,20 ^a	5,12 ^b	3,33 ^a
		T3	15,98 ^c	21,76 ^b	4,18 ^c	2,80 ^{ab}
III 2021.	Ø	33,79 ^b	10,70 ^b	7,07 ^a	2,29 ^a	
	T1	33,63 ^b	10,15 ^b	7,27 ^a	2,33 ^a	
	T2	35,29 ^{ab}	13,17 ^a	6,31 ^b	2,49 ^a	
	T3	39,85 ^a	12,47 ^{ab}	6,69 ^b	2,55 ^a	

a-c: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$); T1: seme tretirano sa *S. meliloti* L4; T2: seme tretirano sa *B. megaterium* DLK2Eh; T3: seme tretirano sa *S. meliloti* L4 i *B. megaterium* DLK2Eh; Ø: netretirana kontrola.

Prilog 17. Koncentracija makroelemenata u biljkama ježevice (*D. glomerata*) (Ogled u polju)

Biljna vrsta	Otkos	Tretman	Makroelementi (g kg ⁻¹)			
			Ca	K	Mg	P
Ježevica	I 2020.	Ø	6,06 ^a	27,95 ^c	2,93 ^a	2,07 ^b
		T1	2,13 ^a	30,52 ^b	1,93 ^b	1,86 ^b
		T2	2,26 ^a	32,81 ^a	2,19 ^{ab}	2,49 ^a
		T3	2,15 ^a	30,54 ^b	1,97 ^b	2,17 ^{ab}
	II 2020.	Ø	2,91 ^{ab}	31,16 ^b	3,25 ^{ab}	4,26 ^a
		T1	2,64 ^b	31,93 ^b	3,12 ^b	4,09 ^b
		T2	2,55 ^b	32,86 ^a	3,04 ^b	4,08 ^b
		T3	4,46 ^a	30,20 ^b	3,68 ^a	4,21 ^a
	I 2021.	Ø	1,17 ^b	28,51 ^a	1,44 ^a	2,45 ^b
		T1	1,30 ^{ab}	21,70 ^b	1,28 ^a	2,14 ^b
		T2	1,61 ^a	27,86 ^a	1,43 ^a	2,45 ^b
		T3	1,47 ^a	28,21 ^a	1,75 ^a	3,13 ^a
III 2021.	Ø	5,48 ^{bc}	24,23 ^a	3,71 ^b	3,11 ^a	
	T1	7,73 ^a	21,86 ^b	4,18 ^a	3,09 ^a	
	T2	6,38 ^b	21,40 ^b	3,62 ^b	2,92 ^a	
	T3	4,84 ^c	21,69 ^b	3,39 ^b	3,10 ^a	

a-b: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$); T1: seme tretirano sa *S. meliloti* L4; T2: seme tretirano sa *B. megaterium* DLK2Eh; T3: seme tretirano sa *S. meliloti* L4 i *B. megaterium* DLK2Eh; Ø: netretirana kontrola.

Prilog 18. Koncentracija makroelemenata u smeši lucerke (*M. sativa*) i ježevice (*D. glomerata*) (Ogled u polju)

Biljna vrsta	Otkos	Tretman	Makroelementi (g kg ⁻¹)			
			Ca	K	Mg	P
Smeša (lucerka i ježevica)	I 2020.	Ø	18,45 ^a	15,36 ^b	5,76 ^a	2,65 ^a
		T1	10,72 ^b	25,12 ^a	3,46 ^c	2,13 ^b
		T2	10,50 ^b	16,84 ^b	3,73 ^{bc}	1,98 ^b
		T3	16,11 ^{ab}	23,70 ^{ab}	4,06 ^b	2,21 ^{ab}
	II 2020.	Ø	5,71 ^c	32,14 ^a	3,02 ^{ab}	3,62 ^a
		T1	5,33 ^c	30,10 ^a	2,83 ^b	3,01 ^b
		T2	15,52 ^a	19,89 ^b	3,75 ^a	2,84 ^b
		T3	13,40 ^b	16,08 ^b	3,76 ^a	2,75 ^b
	I 2021.	Ø	1,35 ^b	31,01 ^a	1,22 ^c	1,92 ^b
		T1	1,49 ^b	27,79 ^b	1,54 ^b	2,32 ^a
		T2	3,35 ^a	21,16 ^c	1,93 ^a	2,35 ^a
		T3	2,94 ^{ab}	27,55 ^b	1,90 ^a	2,58 ^a
III 2021.	Ø	4,82 ^b	24,01 ^b	3,63 ^a	2,61 ^a	
	T1	4,47 ^b	25,42 ^a	3,44 ^a	2,51 ^a	
	T2	6,11 ^{ab}	24,19 ^b	3,56 ^a	2,42 ^a	
	T3	6,62 ^a	21,69 ^c	3,45 ^a	2,68 ^a	

a-c: Vrednosti u koloni označene istim slovima nisu statistički različite prema Duncan multiple range testu ($P \leq 0,05$); T1: seme tretirano sa *S. meliloti* L4; T2: seme tretirano sa *B. megaterium* DLK2Eh; T3: seme tretirano sa *S. meliloti* L4 i *B. megaterium* DLK2Eh; Ø: netretirana kontrola.

BIOGRAFIJA

Magdalena M. Knežević rođena je 03.11.1992. godine u Beogradu. Osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, upisala je 2011. godine na studijskom programu Molekularna biologija i fiziologija. Master akademske studije je završila 2016. godine na matičnom fakultetu, na modulu Biologija mikroorganizama. Školske 2016/17 upisala je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu u Beogradu, na modulu Mikrobiologija. Od aprila 2017. godine, zaposlena je kao istraživač-pripravnik na Institutu za zemljište u Beogradu. U maju 2019. godine izabrana je u zvanje istraživač-saradnik. U periodu od 2017. do 2019. godine bila je angažovana na projektima finansiranim od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: III46007 pod nazivom „Novi autohtoni izolati bakterija *Lysobacter* i *Pseudomonas* kao važan izbor metabolita korisnih za biotehnologiju, stimulaciju rasta biljaka i kontrolu bolesti bilja: od izolata do preparata” i OI173026 pod nazivom “Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu”. U periodu od 2020. do 2022. godine bila je angažovana na projektu Fonda za inovacionu delatnost Dokaz koncepta pod nazivom „Ekološko upravljanje biomasom miskantusa za dobijanje sredstava za oplemenjivanje i povećanje produktivnosti poljoprivrednog zemljišta”, kao rukovodilac projektnog zadatka. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije i Srpskog društva za proučavanje zemljišta. Do sada je kao autor ili koautor objavila 7 radova u međunarodnim naučnim časopisima i 6 radova u časopisima od nacionalnog značaja. Na domaćim i inostranim naučnim skupovima učestvovala je sa 8 radova i 12 saopštenja.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Магдалена М. Кнежевић

Број индекса Б3018/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Диверзитет бактерија изолованих из коренских квржица луцерке (*Medicago sativa* L.) и жутог звездана (*Lotus corniculatus* L.) и њихов потенцијал за побољшање раста биљака

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

Потпис аутора

У Београду, _____



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

Име и презиме аутора Магдалена М. Кнежевић

Број индекса Б3018/2016

Студијски програм Биологија

Наслов рада Диверзитет бактерија изолованих из коренских квржица луцерке (*Medicago sativa* L.) и жутог звездана (*Lotus corniculatus* L.) и њихов потенцијал за побољшање раста биљака

Ментор др Оливера Стајковић-Србиновић и проф. др Тања Берић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____



Изјава о коришћењу

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

Диверзитет бактерија изолованих из коренских квржица луцерке (*Medicago sativa* L.) и жутог звездана (*Lotus corniculatus* L.) и њихов потенцијал за побољшање раста биљака

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.