

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Slavica K. Kerečki

**MIKROBIOLOŠKI TRETMAN SEMENA U
ODRŽIVOJ BILJNOJ PROIZVODNJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Slavica K. Kerečki

**SEED MICROBIOLOGICAL TREATMENT IN
SUSTAINABLE PLANT PRODUCTION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

MENTORI:

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

Dr Jelena Jovičić-Petrović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Igor Kljujev, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Dr Milica Bogdanović, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd

Dr Vera Karličić, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Istraživanja u okviru disertacije su realizovana sredstvima Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije

Izraze duboke zahvalnosti želim da uputim mojoj mentorki, prof. dr Veri Raičević koja je svojim mudrim savetima, razumevanju i liderstvom učinila da ova disertacija dobije svoj epilog. Hvala što je širom otvorila vrata i uvela u čarobno carstvo mikroorganizama, čoveka u onom životnom razdoblju kada se malo veruje u njegovu sposobnost i energiju da može da se suoči sa takvim izazovom. Hvala što je verovala u mene.

Iskrena zahvalnost prof. dr Jeleni Jovičić-Petrović bez čije nesebične podrške i podstreka u svim aspektima rada ova disertacija ne bi bila realizovana. Hvala na beskrajnom strpljenju, upornosti i ogromnoj energiji kojom me je vodila i usmeravala ka cilju.

Dr Milici Bogdanović, višem naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu, veliko hvala na strpljenju i stručnoj kompetentnosti koja mi je omogućila da dođem do novih saznanja. Hvala na nesebičnosti i iskrenoj podršci na putu do željenog cilja.

Iskreno zahvaljujem prof. dr Igoru Kljujevu na stručnoj i tehničkoj pomoći u toku izrade teze. Hvala za iskrenu podršku.

Dr Veri Karličić zahvaljujem na nesebičnom angažovanju, korisnim konsultacijama i idejama vezanim za izradu teze. Hvala za toplu, ljudsku podršku u trenucima kada počinjete da sumnjate u sebe.

Prof. dr Vladimiru Pavloviću, prof. dr Ilinki Pećinar, prof. dr Milici Mirković i dr Nemanji Mirkoviću zahvaljujem na pomoći u toku eksperimentalnog dela koja je doprinela unapređenju teze i postizanju krajnjeg cilja.

Zahvaljujem se dr Jasni Ristić-Đurović i dr Saši Ćirkoviću sa Instituta za fiziku Univerziteta u Beogradu za savete i tehničku pomoć u eksperimentalnom delu vezanom za uticaj statičkog magnetnog polja na germinaciju.

Zauvek sam zahvalna mojoj majci Petri i dragoj sestri Veri koje su me sve vreme pratile i bile moja najveća podrška na ovom lepom, ali punog izazova putu.

Međutim, neko kome želim da ova disertacija bude motivacija i da hrabro sledi svoje snove je moja Emilija, moj blagoslov, neprikosnovena ljubav, inspiracija i pokretačka snaga za sve što činim.

MIKROBIOLOŠKI TRETMAN SEMENA U ODRŽIVOJ BILJNOJ PROIZVODNJI

REZIME

Veliki značaj u održivoj biljnoj proizvodnji imaju rizosferne bakterije koje stimuliraju rast biljaka (PGPR). Cilj disertacije je bio ispitati mogućnost primene PGPR u mikrobiološkom tretmanu semena izabranih biljnih vrsta, što bi doprinelo boljem razumevanju uspostavljanja kompleksnih biljno-mikrobnih interakcijskih odnosa. Kako *Azotobacter chroococcum* i *Bacillus megaterium* predstavljaju izuzetno rasprostranjene zemljišne bakterije, cilj je bio da se ispita potencijal izolata, predstavnika ovih vrsta, u mikrobiološkom tretmanu semena. Molekularna identifikacija je potvrdila pripadnost izolata F8/2 vrsti *Azotobacter chroococcum* i 11/3 vrsti *Bacillus megaterium*, a na osnovu ispitanih karakteristika utvrđeno je da pripadaju grupi PGPR.

Efekti mikrobiološkog tretmana praćeni su kroz parametre germinacije: finalni procenat germinacije (FGP), germinacijski indeks (GI), prosečno vreme germinacije (MGT) i vigor (I i II). Kod odabranih biljnih vrsta izvršena je morfometrijska analiza korena. Imajući u vidu značaj korena u proizvodnji šećerne repe, kao i nedostatak istraživanja vezanih za uticaj inokulacije na mikrostrukturne promene u tkivu korena, ispitan je uticaj inokulacije sa *A. chroococcum* F8/2 na mikromorfološke promene korena šećerne repe. Praćena je površinska i endofitna kolonizacija primenom odgajivačke i mikroskopske metode. Skening-ekletron- i konfokal-laser-skening mikroskopija je potvrdila sposobnost sojeva da površinski kolonizuju koren različitih biljnih vrsta. Inokulacija *A. chroococcum* F8/2 uticala je na povećanje germinacijskih parametara kod više biljnih vrsta. Kod pšenice FGP je povećan za 15,58%, GI kod soje za 100%, vigor I kod šećerne repe za 91% i vigor II kod kukuruza za 68%. Inokulacija nije značajnije uticala na MGT, ali je doprinela povećanju dužine klijanaca soje za 100%. Inokulacijom *B. megaterium* 11/3 najveća povećanja germinacijskih parametara su: FGP i GI uljane repice za 40% i 41%, vigor I krastavca za 33% i vigor II pšenice za 43%. Inokulacija sa *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3 je uticala na promene u morfologiji korena kod većine testiranih biljaka, što je od izuzetne važnosti za ishranu i zdravstveni status biljaka. *A. chroococcum* F8/2 je najveći efekat pokazao kod kukuruza gde je uticao na ukupnu dužinu, površinu, volumen i prečnik korena. Inokulacijom sa *B. megaterium* 11/3 najveći efekat je postignut kod krastavca gde su povećanja ukupne dužine, površine, volumena i prečnika korena iznosila 55%, 82%, 91% i 36%. Mikromorfološka ispitivanja uticaja inokulacije *A. chroococcum* F8/2 na rani rast korena šećerne repe ukazala su da nastale promene na vaskularnom tkivu korena mogu poboljšati transport vode i nutrijenata.

Rezultati istraživanja u okviru ove disertacije su pokazali da PGPR sojevi, *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3, imaju potencijal primene u mikrobiološkom tretmanu semena različitih biljnih vrsta što opravdava njihovu primenu u održivoj biljnoj proizvodnji.

Ključne reči: *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium*, biopraiming, endofitna i površinska kolonizacija, germinacija, inokulacija, morfologija korena

Naučna oblast: Mikrobiologija

Uža naučna oblast: Ekološka mikrobiologija

UDK: 631.53.027:631.147(043.3)

SEED MICROBIOLOGICAL TREATMENT IN SUSTAINABLE PLANT PRODUCTION

ABSTRACT

Plant growth promoting rhizosphere bacteria (PGPR) are of great importance for sustainable plant production. The aim of this dissertation was to examine the potential of employing PGPR to microbiological seeds treatment of chosen plant species, in order to obtain a deeper understanding of complex plant-microbial interaction relationships. Since *Azotobacter chroococcum* and *Bacillus megaterium* are widely distributed soil bacteria, the goal was to explore the potential of isolates belonging to these species for microbiological seed treatment. Molecular identification confirmed that samples F8/2 and 11/3 belong to the species *Azotobacter chroococcum* and *Bacillus megaterium*, respectively, and based on the studied traits they were assigned to the PGPR group.

Germination parameters: final germination percentage (FGP), germination index (GI), mean germination time (MGT), and vigor (I and II) were used to assess the effects of microbiological treatment. Roots of the chosen plants species were analyzed morphometrically. Given the importance of roots in sugar beet production and the lack of studies on the effect of inoculation on microstructural changes in root tissues, the effect of inoculation with *A. chroococcum* F8/2 on micromorphological changes in sugar beet roots was studied. Culture-based and microscopic techniques were used to observe surface and endophytic colonization. Scanning-electron- and confocal-laser-scanning microscopy verified the ability of strains to colonize the root surfaces of various plant species. Inoculation with *A. chroococcum* F8/2 affected the increase of germination parameters in several plant species. FGP increased by 15.58% in wheat, GI increased by 100% in soybean, vigor I increased by 91% in sugar beet, and vigor II increased by 68% in maize. Inoculation had no effect on MGT but did lead to a 100% rise in the length of soybean seedlings. The most significant accomplishments in germination parameters with *B. megaterium* 11/3 inoculation are: FGP and GI of rapeseed by 40% and 41%, vigor I of cucumbers by 33%, and vigor II of wheat by 43%. Inoculation with *A. chroococcum* F8/2 and *B. megaterium* 11/3 led to alterations in root morphology in the majority of the studied plants, which is vital for plant nutrition and health. In maize, *A. chroococcum* F8/2 had the greatest effect, altering the total length, area, volume, and diameter of the roots. The most significant result was obtained by inoculating cucumber with *B. megaterium* 11/3, with increases in total length, surface, volume, and diameter of the roots of 55%, 82%, 91%, and 36%, respectively. Micromorphological analyses of the effect of *A. chroococcum* F8/2 inoculation on the early development of sugar beet roots revealed that the resulting alterations in the roots' vascular tissue can enhance water and nutrient transfer.

The results of the dissertation research revealed that the PGPR strains, *A. chroococcum* F8/2 and *B. megaterium* 11/3, have the potential for use in the microbiological treatment of seeds of various plant species, which supports their use in sustainable plant production.

Key words: *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium*, biopriming, endophytic and surface colonization, germination, inoculation, morphology of roots

Scientific field: Microbiology

Scientific subfield: Microbial ecology

UDK: 631.53.027:631.147(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Uticaj agrohemikalija na životnu sredinu	3
2.2. Uloga i mogućnosti primene mikroorganizama u održivoj biljnoj proizvodnji	5
2.3. Rizosferne bakterije stimulatori biljnog rasta	8
2.4. Mehanizmi delovanja bakterija stimulatora biljnog rasta	10
2.4.1. Direktni mehanizmi	11
2.4.2. Indirektni mehanizmi	15
2.5. Rodovi <i>Azotobacter</i> i <i>Bacillus</i> kao bakterije stimulatori biljnog rasta	15
2.6. Biljno-mikrobne interakcije	16
2.6.1. Kolonizacija korena	17
2.6.2. Sposobnost kolonizacije korena od strane predstavnika rodova <i>Azotobacter</i> i <i>Bacillus</i>	20
2.7. Germinacija kao ključna faza u životnom ciklusu biljke	20
2.7.1. Tretman semena: metode za poboljšanje klijavosti	22
2.8. Mikrobiološki tretman semena	24
2.8.1. Uticaj mikrobiološkog tretmana semena na klijanje i rane faze biljnog rasta	26
3. CILJ RADA	29
4. MATERIJAL I METODE	30
4.1. Karakteristike testiranih rizobakterija	30
4.1.1. Molekularna identifikacija	31
4.1.2. Ekološke karakteristike	33
4.2. Mehanizmi stimulacije biljnog rasta	33
4.2.1. Enzimska aktivnost bakterijskih sojeva	33
4.2.2. Produkcija indolsirćetne kiseline (IAA)	33
4.2.3. Sposobnost korišćenja l-aminociklopropan-1-karboksilne kiseline (ACC)	34
4.2.4. Produkcija siderofora	35
4.2.5. Sposobnost solubilizacije fosfora (P), kalijuma (K) i cinka (Zn)	35
4.2.6. Produkcija amonijaka (NH ₃)	36
4.2.7. Produkcija egzopolisaharida	36

4.2.8. Produkcija cijanovodonične kiseline (HCN)	37
4.2.9. Ispitivanje sastava isparljivih organskih smeša metabolisanih od strane bakterijskih sojeva	37
4.2.10. Antifugalna aktivnost izabranih bakterijskih sojeva	38
4.3. Uticaj mikrobiološkog tretmana na parametre germinacije	38
4.3.1. Ispitivane biljne vrste	38
4.3.2. Uticaj mikrobiološkog tretmana na parametre germinacije biljnih vrsta	39
4.3.3. Uticaj statičkog magnetnog polja (SMP) na parametre germinacije inokulisanih semena	40
4.4. Ispitivanje sposobnosti sojeva za površinsku i endofitnu kolonizaciju biljaka	40
4.4.1. Priprema biljnog materijala za ispitivanje površinske i endofitne kolonizacije	40
4.4.2. Utvrđivanje stepena površinske i endofitne kolonizacije korena biljaka bakterijama <i>Azotobacter chroococcum</i> F8/2 i <i>Bacillus megaterium</i> 11/3	41
4.4.3. Ispitivanje površinske kolonizacije korena biljaka skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM)	41
4.4.4. Ispitivanje površinske i endofitne kolonizacije korena biljaka konfokalnom laserskom skenirajućom mikroskopijom (CLSM)	42
4.5. Uticaj mikrobiološkog tretmana na makro i mikromorfološke karakteristike korena i nadzemnog dela u ranoj fazi rasta	42
4.5.1. Ispitivanje uticaja mikrobiološkog tretmana na makromorfološke odlike korena	42
4.5.2. Ispitivanje uticaja mikrobiološkog tretmana na suhu masu korena i nadzemnog dela biljke u ranoj fazi rasta	43
4.5.3. Uticaj inokulacije <i>Azotobacter chroococcum</i> F8/2 na mikrostrukturu korena šećerne repe	43
4.6. Ispitivanje uticaja organskih isparljivih metabolita (VOC) bakterija na klijance	43
4.7. Statistička obrada podataka	43
5. REZULTATI I DISKUSIJA	44
5.1. Karakterizacija i identifikacija sojeva roda <i>Azotobacter</i> i <i>Bacillus</i>	44
5.1.1. Morfološke karakteristike kolonija i ćelija	45
5.1.2. Molekularna identifikacija bakterijskih sojeva	46
5.1.3. Ekološke karakteristike <i>Azotobacter chroococcum</i> F 8/2 i <i>Bacillus megaterium</i> 11/3	47
5.2. Mehanizmi stimulacije biljnog rasta sojeva <i>Azotobacter chroococcum</i> F8/2 i <i>Bacillus megaterium</i> 11/3	50
5.2.1. Enzimaska aktivnost <i>Azotobacter chroococcum</i> F 8/2 i <i>Bacillus megaterium</i> 11/3	50
5.2.2. Sinteza indol-3- sirćetne kiseline (IAA)	51
5.2.3. ACC deaminaza	52
5.2.4. Produkcija siderofora	53

5.2.5. Solubilizacija nutrijenata	54
5.2.6. Produkcija amonijaka (NH ₃)	55
5.2.7. Produkcija egzopolisaharida	56
5.2.8. Produkcija cijanovodonične kiseline (HCN)	57
5.2.9. Produkcija organskih isparljivih jedinjenja (VOC)	57
5.2.10. Antagonistička aktivnost <i>Azotobacter chroococcum</i> F 8/2 i <i>Bacillus megaterium</i> 11/3 prema fitopatogenim gljivama	59
5.3. Uticaj inokulacije <i>Azotobacter chroococcum</i> F 8/2 i <i>Bacillus megaterium</i> 11/3 na parametre germinacije	61
5.3.1. Uticaj inokulacije sa <i>Azotobacter chroococcum</i> F8/2 na parametre germinacije	62
5.3.2. Uticaj inokulacije sa <i>Bacillus megaterium</i> 11/3 na parametre germinacije	66
5.4. Uticaj SMP kao abiotičkog faktora na efekte bioprajinjima	69
5.4.1. Uticaj SMP na efekte dobijene inokulacijom sa <i>Azotobacter chroococcum</i> F8/2	70
5.4.2. Uticaj SMP na efekte dobijene inokulacijom sa <i>Bacillus megaterium</i> 11/3	73
5.5. Uticaj inokulacije sojevima <i>Azotobacter chroococcum</i> F8/2 i <i>Bacillus megaterium</i> 11/3 na morfološke karakteristike korena	75
5.5.1. Efekat inokulacije sa <i>Azotobacter chroococcum</i> F8/2 na mikromorfološke strukture korena šećerne repe u ranoj fazi rasta	78
5.6. Uticaj inokulacije sojevima <i>Azotobacter chroococcum</i> F 8/2 i <i>Bacillus megaterium</i> 11/3 na suhu masu korena i nadzemnog dela	80
5.7. Površinska i endofitna kolonizacija korena biljaka sa <i>Azotobacter chroococcum</i> F8/2 i <i>Bacillus megaterium</i> 11/3	83
6. ZAKLJUČAK	94
7. LITERATURA	98
8. PRILOZI	155

1. UVOD

Poljoprivredna proizvodnja je pred velikim izazovom, jer se do 2050. godine očekuje povećanje od 60-110% (OECD-FAO, 2012; Tilman, 2011) kako bi se obezbedile dovoljne količine hrane na globalnom nivou. Višedecenijska primena agrohemijskih sredstava u konvencionalnoj biljnoj proizvodnji, u cilju obezbeđenja stabilne proizvodnje, dovodi do narušavanja strukturnih i funkcionalnih elemenata celokupnog ekosistema i ugrožavanja opstanka svih životnih formi. Primena mineralnih đubriva sa jedne strane doprinosi povećanju prinosa, ali sa druge remeti mineralni balans, narušava strukturu, plodnost i biodiverzitet zemljišta. Pored niza štetnih efekata, potrebno je posebno naglasiti da toksične komponente mineralnih đubriva ulaze u lanac ishrane, indukujući promene koje će se odraziti i na buduće generacije. Iako je uloga pesticida u poljoprivrednoj proizvodnji velika, nemogućnost postizanja apsolutne selektivnosti u odnosu na patogene doprinosi štetnim efektima na ljude i druge organizme. Prekomerna upotreba pesticida i mineralnih đubriva doprinosi i klimatskim promenama, odnosno efektu staklene bašte kroz emisiju štetnih gasova i depoziciju toksičnih komponenata u zemljište. Klimatske promene direktno utiču na gubitak prinosa najvažnijih poljoprivrednih kultura, a podatak da sa svakim stepenom povećanja temperature dolazi do gubitaka u prinosu kukuruza za 7,4%, pšenice 6%, pirinča 3,2% i soje 3,1% (Zhao et al., 2017) ukazuje na neophodnost i hitnost pronalazjenja održivih rešenja. U biljnoj proizvodnji zemljište je kritična komponenta od čijeg kvaliteta zavisi celokupan životni ciklus biljke. Zbog toga je od izuzetne važnosti očuvanje zdravlja i kvaliteta zemljišta. Međutim, negativan uticaj agrohemijskih sredstava rezultirao je poremećajem u funkcionisanju zemljišnog ekosistema što se direktno odražava na slabljenje sposobnosti biljaka da opstaju i ispolje svoj fiziološki potencijal. Da bi se ovaj prirodni i neobnovljivi resurs očuvao u skladu sa zakonima održivosti, implementacija svih tehnologija koje podržavaju ovakav koncept dobija sve više na značaju.

Osnovni cilj održive poljoprivredne proizvodnje je obezbeđenje hrane u kvantitativnom i kvalitativnom smislu uz istovremeno očuvanje svih prirodnih resursa i poštovanje prirodnih zakonitosti koji vladaju u okruženju. Za biljnu proizvodnju zemljište je izvor mogućih rešenja i u tom kontekstu, neprocenjivu ulogu i doprinos imaju zemljsni, korisni mikroorganizmi. Zahvaljujući aktivnostima u geohemijskim procesima, procesima kruženja elemenata u biosferi, humifikaciji, ishrani biljaka i biokontrolnoj aktivnosti sve više se u održivoj poljoprivrednoj biljnoj proizvodnji, primenjuju različiti korisni zemljsni mikroorganizmi. Posebna populacija zemljskih mikroorganizama su rizobakterije, stimulatori biljnog rasta (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, PGPR). To je populacija mikroorganizama koja uspostavlja bliske intrakcijske odnose sa biljkom kroz proces kolonizacije rizosfernog zemljišta i biljnog tkiva, pre svega korena. Rodovi mikroorganizama *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, *Streptomyces* predstavljaju prirodni potencijal koji može biti atraktivna ekoalternativa agrohemijskim sredstvima. PGPR su mikrobi koji su povezani s rizosferom zemljišta i doprinose poboljšanju ishrane biljaka, povećanju prinosa useva, otpornosti na bolesti, povećanju plodnosti zemljišta i poboljšanju strukture zemljišta. U prirodnim uslovima, biljke su uvek povezane sa zajednicom mikroba, fitomikrobiomom, i razumevanje interakcija koja se uspostavlja između biljaka i fitomikrobioma je od izuzetne važnosti za formiranje održivih agroekosistema. Rizosfera je nesumnjivo najsloženije mikrostanište, koje se sastoji od mreže korena biljaka, zemljišta i raznovrsnog konzorcijuma bakterija, gljiva, eukariota i arheja i uslovi u rizosferi imaju direktan uticaj na rast useva i prinos. Rizosfera je složena zona u kojoj se, zahvaljujući intenzivnim biološkim, fizičkim i hemijskim procesima odvija dinamički tok i kruženje ugljenika, nutrijenata i vode. Korisni rizosferni mikrobi, sa različitim funkcionalnim sposobnostima, mogu doprineti poboljšanju produktivnosti agroekosistema i na taj način se rizosferni inženjering može smatrati posebnom strategijom i mehanizmom održive biljne proizvodnje.

Biljka u toku svog životnog ciklusa prolazi kroz različite faze i konstantno se suočava sa faktorima životne sredine. Prvi kontakt sa životnom sredinom biljka ostvaruje semenom, a uspešnom germinacijom se obezbeđuje kontinuirana biljna proizvodnja. Globalne klimatske

promene imaju štetne posledice na poljoprivredne proizvodne sisteme zbog čega je poboljšanje kvaliteta semena važna komponenta u održivosti biljne proizvodnje u uslovima klimatskih promena. Usvajanje ekološki prihvatljivih strategija neophodno je ne samo da bi se smanjili ulazni troškovi ili opterećenje prirodnih resursa, već i osigurala održiva proizvodnja hrane. Zbog toga su tehnologije prajminga postale sve prihvatljiviji, održiviji, jeftiniji i jednostavniji način borbe protiv stresa i zagađenja zemljišta i voda. Biološki agensi koji se koriste u prajming tehnologiji, poznatoj kao bioprajming, su PGPR. Dobro je poznato da ovi mikrobi mogu stimulisati rast biljaka kroz različite mehanizme, uključujući snabdevanje azotom procesom azotofiksacije, solubilizacijom nerastvorljivih minerala, produkcijom različitih litičkih enzima, regulatora rasta i moduliranjem fitohormonske aktivnosti, indukovanjem rezistencije itd.

Bioprajming tehnologija, metodom mikrobiološke inokulacije semena, doprinosi uspostavljanju interakcije biljaka sa mikroorganizmima u najranijoj fazi rasta, što rezultira međusobnom podrškom kroz ceo životni ciklus u uslovima različitih ekoloških faktora. Bioprajming značajno poboljšava klijavost semena, nicanje, razvoj biljaka i parametre prinosa kako u normalnim tako i stresnim okolnostima.

Upotreba mikroorganizama koji stimulišu rast biljaka bioprajmingom je efikasna tehnika i smatra se da je ključna komponenta strategije integrisanog upravljanja za prevazilaženje klimatskih promena kao i biotičkog stresa (štetočine i patogeni) u različitim agroekosistemima.

Za usvajanje ovih tehnologija koje mogu povećati rast useva, pružiti zaštitu od biotičkog i abiotičkog stresa, povećavati prinos i poboljšati kvalitet zemljišta i to bez rizika po životnu sredinu ili zdravlje ljudi, potrebno je razvijati svest i ohrabriti poljoprivredne proizvođače. Međutim, pored poljoprivrednika, važna je, pre svega politička, pravna, ekonomska, edukativna, kao i podrška svih onih koji su na putu do momenta njihove primene u neposrednoj proizvodnji.

Kako bi se olakšala primena ove jednostavne i jeftine tehnologije u različitim agroekosistemskim uslovima, potrebna su dodatna multidisciplinarna istraživanja o PGPR sa aspekta njihove održivosti, postojanosti, mehanizma, ekspresije gena na semenu, razumevanja metaboličkih interakcija i brojnih drugih. Zbog svega navedenog istraživanja u ovoj oblasti i dalje predstavljaju izazov za istraživače različitih profila.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Uticaj agrohemikalija na životnu sredinu

Agroekosistem je u potpunosti modifikovan aktivnošću čoveka i može se posmatrati kao veliki ekosistem sa brojnim elementima koji deluju u interakciji, uključujući ekološke, ekonomske i društvene komponente. Dobro razvijen i formiran prirodni ekosistem je relativno stabilan, samoodrživ, prilagođava se promenama, oporavlja od poremećaja i sposoban je da održi produktivnost koristeći samo energiju sunčevog zračenja. Međutim, kada koncept ekosistema proširimo na agroekosistem onda se fokus pomera na lako merljive rezultate sistema npr. prinos. Ipak i kod agroekosistema se moraju uzeti u obzir složene interakcije bioloških, fizičkih, hemijskih, ekoloških i socioloških faktora, koji određuju procese koji omogućavaju postizanje i održavanje prinosa. Agroekosisteme je često teže proučavati od prirodnih ekosistema, jer se složene interakcije dodatno komplikuju ljudskim aktivnostima koje menjaju normalne strukture i funkcije ekosistema. Činjenica je, da bi bilo koji agroekosistem bio potpuno održiv moraju se uzeti u obzir ekološki, ekonomski i društveni faktori i procesi u interakciji. Ipak, ekološka održivost je gradivni blok na kojem se zasnivaju ostali elementi održivosti. Dugoročna održivost mora se više oslanjati na internu proizvodnju i regulatorne usluge ekosistema nego na eksterne inpute (Hawes et al., 2021).

Poslednjih decenija u poljoprivrednoj biljnoj proizvodnji se intenzivirala upotreba agrohemikalija kako bi se obezbedio optimalan prinos. Agrohemikalije predstavljaju različite hemijske proizvode, ali se pre svega odnose na mineralna đubriva i pesticide čiji širok spektar uključuje herbicide, insecticide, fungicide i nematocide. Takođe, termin se odnosi i na sintetične hormone i druge agense koji pomažu rast i razvoj poljoprivrednih kultura. Iako je skoro nemoguće zamisliti biljnu proizvodnju bez njihove upotrebe u situaciji kada ljudska populacija raste i kada su zahtevi za hranom sve veći, javio se problem nekontrolisane upotrebe. Takođe, veliki problem je postojeća disproporcija između zahtevanog rasta poljoprivredne proizvodnje koja iznosi 4% po stanovniku u narednoj dekadi (OECD-FAO, 2022) i povećanja raspoloživih novih poljoprivrednih površina koja nije bila veća od 0,1% u periodu 1961 - 2000, sa tendencijom smanjenja od 2000 (FAO, 2020). Nedostatak plodnog poljoprivrednog zemljišta pokušava se nadomestiti primenom agrohemikalija, posebno mineralnih đubriva na već postojećim površinama. Trend povećanja može se videti na primeru upotrebe azotnih đubriva. S obzirom na značaj azota u rastu i razvoju biljke, iz godine u godinu raste stopa primene mineralnih azotnih đubriva. Tako je 1900-te iznosila 0,2 kg po glavi stanovnika da bi se do 2000-te povećala na 14 kg (Smil, 2001). U 2020. godini potrošnja mineralnog azotnog đubriva procenjena je na 10,0 miliona tona u EU, slično prosečnoj količini potrošenoj između 2010 i 2019 godine (Eurostat, 2020). Globalna potrošnja pesticida u 2019. godini iznosila je približno 4,19 miliona metričkih tona, pri čemu je Kina bila ubedljivo najveći potrošač pesticida (1,76 miliona metričkih tona), slede Sjedinjene Američke Države (408 hiljada tona), Brazil (377 hiljada tona) i Argentina (204 hiljade tona) (Fernández, 2021.)

Stav da se intenzivnijom upotrebom agrohemikalija može obezbediti optimalna proizvodnja ne može biti bez posledica. Prekomerna, neadekvatna, nekontrolisana i dugotrajna primena azotnih, fosfatnih đubriva i pesticida prouzrokuje niz štetnih efekata na životnu sredinu. Neposredno, nakon primene azotnih đubriva, samo 50% od ukupne količine biva apsorbovano od strane biljaka što znači da se veliki deo oslobađa u okruženje. Isparavanjem se izgubi 2-20%, 15-25% reaguje sa organskim komponentama zemljišta, dok 2-10% odlazi u površinske i podzemne vode (Savci, 2012). Prekomerna i dugotrajna primena azotnih i fosfatnih đubriva uzrokuje dospevanje teških metala (živa, kadmium, arsen, olovo) u zemljište i biljke preko kojih se ovi polutanti uvode u lanac ishrane i degradaciju fizičko-hemijskih karakteristika zemljišta kao što je povećanje saliniteta, gubljenje neorganske forme fosfora i organske materije i pojava acidifikacije (Savci, 2012). Veliki problem je pojava sabijenosti zemljišta, jer komponente mineralnih đubriva sprečavaju formiranje zemljišnih agregata (Antony et al., 2020). Narušavanje strukture zemljišnih agregata ometa drenažu vode i aeraciju zemljišta, ključnu za normalan rast biljke. Struktura zemljišta zavisi od prisustva i

aktivnosti mikroorganizama čiji opstanak može biti direktno ugrožen primenom agrohemikalija, što se odražava na smanjenje biodiverziteta bakterijskih (Meena et al., 2020) i zajednica gljiva u zemljištu (Streletskii et al., 2022). Smanjenje diverziteta korisnih zemljišnih mikrobnih zajednica nepovoljno će se odraziti na rast i razvoj biljaka smanjenjem dostupnosti nutrijenata ili povećanjem pojave bolesti kod biljaka (Meena et al., 2020).

Negativni efekti se ne ograničavaju samo na zemljišne ekosisteme. Jedan od velikih problema nastalih intenzivnom primenom fosfornih i azotnih mineralnih đubriva je eutrofikacija. Povećane koncentracije azotnih i fosfornih jedinjenja u vodi dovode do prekomernog umnožavanja algi i drugih vodenih biljaka koje narušavaju kvalitet voda. Smanjenje koncentracije kiseonika u donjim slojevima vode dovodi do redukovanja broja vodenih organizama, povećanja smrtnosti riba, ali i povećanja broja neželjenih vrsta (OECD, 2012). Kako navodi Savci (2012), koncentracija nitrata u podzemnim vodama u poljoprivrednim regionima, često premašuje standard o kvalitetu vode za piće od 50 mg/l propisan od strane Svetske zdravstvene organizacije. U procesu transformacije mineralnih đubriva u zemljištu oslobađaju se azotni oksidi (NO, NO₂ i N₂O), ugljen dioksid i metan. Od ukupnog povećanja N₂O u atmosferi, 24% je rezultat primene azotnih đubriva i njegove emisije iz poljoprivrednog zemljišta koji zajedno sa već pomenutim gasovima doprinosi efektu staklene bašte i globalnom zagrevanju. Kao rezultat toga dolazi do rasta temperature zemljišta, što negativno utiče na biološku aktivnost, sadržaj vlage, proces dekompozicije, pojavu acidifikacije zbog kiselih kiša i promene u ciklusu ugljenika (Kaka et al., 2021). Takođe, autori su istakli da poremećaji u ciklusu ugljenika mogu imati fatalan efekat, jer se povećanjem emisije ugljen dioksida u atmosferu remeti postojeća ravnoteža i dolazi do njegove akumulacije i nemogućnosti blagovremenog uključivanja u proces kruženja.

Rezistencija insekata, fitopatogenih mikroorganizama i korova na pesticide je rastući problem koji se pokušava prevazići. Prvi slučaj rezistencije zabeležen je 1914. godine i od tada je skoro nerešiv problem. Lamichhane et al. (2016) navode da je u poslednjoj dekadi, veliki broj studija ukazao na problem rezistencije nekih biljnih patogenih gljiva i oomiceta na fungicide, gde jedan isti patogen može razviti rezistenciju na desetine antifungalnih proizvoda. Takođe, podaci ukazuju da je jedan broj bakterijskih patogena razvio rezistenciju na baktericide uključujući i proizvode na bazi bakra (Canteros et al. 2008; Cazorla et al. 2002; Shenge et al. 2014). Problem rezistencije korova na herbicide može se videti na primeru lisičjeg repka (*Alopecurus myosuroides* Huds.) koji je postao najrezistentniji korov i gorući problem u zemljama Evrope (Moss et al., 2007). Jedan od pristupa za rešavanje problema rezistencije je svakako potraga za novim, efikasnijim aktivnim materijama, ali takođe i stvaranje genetski modifikovanih sorti rezistentnih na patogene što otvara niz novih problema, od etičkih do ekonomskih.

Koncentracija pesticida u okruženju često prevazilazi legalne i ekološke standarde, pa dodatni problem predstavljaju njihovi ostaci u zemljištu. U jednoj studiji Silva et al. (2019) ispitana je distribucija 76 ostataka pesticida u 317 uzoraka poljoprivrednog zemljišta (površinski sloj) iz 11 država članica EU i 6 glavnih sistema useva u toku 2015. godine. Konstatovano je da preko 80% ispitivanih uzoraka sadrži ostatke pesticida (25% uzoraka je imalo jedan ostatak, 58% uzoraka je imalo mešavine dva ili više ostataka). Ovi rezultati ukazali su na neophodnost usvajanja održivih agronomskih praksi kako bi se smanjila upotreba pesticida i dalja kontaminacija zemljišta. Konačno, potrebne su usklađene politike zaštite zemljišta EU da bi se postigla održiva proizvodnja hrane. Fokus takvih politika ne treba da bude samo na uvođenju pesticida na tržište (EC79/117/EEC, EC91/414/EEC, 2009) i smanjenju unosa pesticida (EU, Directive 2009/128/Ec), već i praćenju stvarnog sadržaja ostataka pesticida u zemljištu, kao i uspostavljanjem dobro utemeljenih standarda kvaliteta zemljišta.

Na primeru primene pesticida mogu se videti destruktivni efekti savremene, konvencionalne biljne proizvodnje. Oko 0,1% primenjenih pesticida postiže efekat onoga čemu su namenjeni, dok 99,9% nestaje ili opstaje u vazduhu, vodi, zemljištu ulazeći u lanac ishrane (Pimentel, 1995). Dokumentovano je da rezidue pesticida stižu daleko od mesta primene, te se mogu pronaći i na Antartiku, Artiku i Himalajima. Izuzetno lako se spiraju i dospevaju do površinskih i podzemnih voda ugrožavajući vodene organizme i njihov biodiverzitet. Ostaci pesticida mogu se naći u prašini

i biti prisutni u atmosferi i tako dospeti u respiratorni sistem ljudi i životinja (Bento et al., 2017). Ulaženjem u lanac ishrane prouzrokuju akutne i hronične zdravstvene probleme kod ljudi, koji mogu imati i letalni ishod. Smatra se da se oko 11000 smrtnih slučajeva godišnje dešava usled trovanja pesticidima (Savci, 2012).

Poljoprivreda i zemljišni biodiverzitet su u velikoj meri međusobno zavisni. Poljoprivreda zavisi od usluga ekosistema koji obezbeđuje zemljišni biodiverzitet, što dovodi do plodnosti zemljišta. Plodno zemljište je osnova poljoprivredne proizvodnje i produktivnosti. Međutim, intenzivne agronomske prakse, uključujući mehaničku obradu zemljišta, intenzivnu primenu mineralnih đubriva i pesticida, predstavljaju direktne pretnje zemljišnom biodiverzitetu. Na ovaj način poljoprivredne aktivnosti su doprinele smanjenju održivosti ekosistema. Preteranom zavisnošću od fosilnih goriva i spoljašnjih inputa, agroekosistemi su doprineli degradaciji zemljišta, voda, genetičkih i kulturnih resursa na koje se poljoprivreda uvek oslanjala. Krajnji rezultat neželjenih promena nastalih primenom agrohemijskih sredstava je poremećaj ekološke ravnoteže koja vodi ugrožavanju zdravlja i opstanka svih životnih formi. Zbog toga je pronalaženje ekološki prihvatljivih rešenja osnova daljeg razvoja poljoprivredne proizvodnje i očuvanja životne sredine. Sa aspekta biljne proizvodnje, ono što odlikuje njenu održivost je očuvanje svih ekosistema uz istovremeno povećanje produktivnosti kako bi se obezbedila dovoljna količina i kvalitet hrane.

Pored naučnih istraživanja koja ukazuju na neophodnost kontrolisane upotrebe agrohemijskih sredstava, neophodna je podrška od strane kreatora politike i implementacija platformi za bezbednu/sigurnu upotrebu agrohemijskih sredstava, fokusirana na rizike po životnu sredinu i zdravlje ljudi (Gnanaprakasam et al., 2020). Prelaz na održive poljoprivredne sisteme zahteva dugoročnu perspektivu i holističke pristupe oličene u agroekološkim pristupima koji su potrebni za postizanje ciljeva održivog razvoja (FAO, 2019). Prelazak na održive agroekosisteme mora postati cilj savremene poljoprivrede, a biotehnologija pruža mnoge korisne alate za poboljšanje zdravlja agroekosistema i dostizanje ovog cilja.

2.2. Uloga i mogućnosti primene mikroorganizama u održivoj biljnoj proizvodnji

Mikroorganizmi su prirodni resurs koji može biti eksploatisan u službi održivosti. Ukupan broj mikroorganizama na Zemlji je procenjen na $4-6 \times 10^{30}$ (Kumar et al., 2020). Ova populacija je veoma heterogena i čine je bakterije, arheae, gljive, alge i protozoe. Za većinu zemljišta karakteristično je da su dominantni filumi *Proteobacteria* i *Actinobacteria*, čiji su predstavnici prisutni u svim zemljištima, koji sa još 10 filuma sa najvećom prisutnošću čine oko 95% ukupnih bakterija (Sengupta et al., 2020). U osnovi, zemljište je "biološka laboratorija" u kojoj se nalaze različiti mikroorganizmi (Nobbe and Hiltner, 1895). Iako mikroorganizmi čine manje od 0,5% (težina/težina) mase zemljišta njihov udeo u ukupnoj metaboličkoj aktivnosti zemljišnog ekosistema je 60-80% (Maheshwari et al., 2020a). Pošto su uključeni u procese transformacije makro i mikronutrijenata, razlaganja organske materije, skladištenja ugljenika i humifikacije, mikroorganizmi utiču na strukturu, funkcionalnost zemljišta i njegov potencijal da obezbedi uslove za intenzivnu biljnu proizvodnju (Meena et al., 2015). Plodnost zemljišta je rezultat transformacije organske materije u humus u procesu humifikacije koja je proizvod aktivnosti bakterija i gljiva (Datta et al., 2017). Humus kao stabilna organska frakcija doprinosi formiranju zemljišnih agregata i povećava raspoloživost nutrijenata i vode (Khatoon et al., 2017). U procesima humifikacije, razlaganja i transformacije složenih organskih jedinjenja uključeni su mikrobnim enzimima. Polimeri biljnog porekla, koji u najvećoj meri čine svežu organsku materiju koja dospeva u zemljište (celuloza/hemiceluloza i lignin), predstavljaju najveći izvor ugljenika u zemljištu. Kompleksna struktura ove lignocelulozne mase utiče na težu, sporiju degradaciju i transformaciju, ali zahvaljujući mikrobnim ekstracelularnim enzimima ova teško razgradiva jedinjenja podležu humifikaciji. Među zemljišnim mikroorganizmima od značaja za dekompoziciju celuloze ističu se gljive *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* i bakterije *Streptomyces*, *Cellomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* i *Clostridium thermocellum* (Khatoon et al., 2017). Lignin je, pored toga što je izvor

ugljenika, značajan izvor aromatičnih komponenata u zemljištu (Datta et al., 2017). Takođe, u toku procesa razgradnje lignina u zemljištu raste koncentracija organskih kiselina, ugljen dioksida, metana i vode (Khatoon et al., 2017). Sposobnost biodegradacije lignocelulozne mase potvrđena je kod nekih bazidiomiceta (Datta et al., 2017), poput *Phanerochaete chrysosporium* čija visoka stopa razgradnje lignina poreklom iz duvana u roku od 10 dana iznosi 37,70% (Su et al., 2016). Među teško razgradivim polimernim jedinjenjima koja u zemljištu podležu humifikaciji je i hitin, glavna konstitutivna komponenta ćelijskog zida mnogih gljiva, insekata i artropoda. Dekompozicija hitina dešava se zahvaljujući aktivnosti mikrobnih hitinaza pri čemu se krajnji produkti CO₂, CH₄, NH₄⁺ uključuju u ciklus C i N (Beier and Bertilsson, 2013). Brezenska et al. (2016) navodi *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Cytophaga*, *Pseudomonas* kao rodove zemljišnih bakterija koje imaju sposobnost razgradnje hitina, a od gljiva značajni su rodovi *Aspergillus*, *Mucor* i *Mortierella*.

Za proces humifikacije značajno je razlaganje proteina koje se u zemljištu dešava pod uticajem mikrobnih proteaza. Mikrobne proteaze su od ključnog značaja u procesu kruženja N i C posebno kada se ima u vidu da je 40% organskih azotnih jedinjenja u zemljištu proteinske prirode (proteini, peptidi i amonokiseline) (Silva et al., 2020). U toku razlaganja proteina, amonifikacija i nitrifikacija su mikrobni procesi kojima se kontroliše dostupnost NH₄⁺ u zemljištu i time utiče na produktivnost zemljišnog ekosistema (Wang et al., 2018). Rodovi *Bacillus*, *Proteus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* i *Streptomyces* su poznati amonifikatori (Jovičić-Petrović i Kljujev, 2014). Na proces amonifikacije nadovezuje se dvofazni proces nitrifikacije. U prvoj fazi poznatoj kao nitrificacija učestvuju rodovi *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* i *Nitrospira* koji pomažu oksidaciju amonijumovih jedinjenja do nitrita, a u drugoj fazi, nitrataciji, oksidacija nitrita u nitrata vrši se od strane bakterijskih rodova *Nitrobacterium* i *Nitrocystis* (Aislabie and Deslippe, 2013; Jovičić-Petrović i Kljujev, 2014). U zemljištima, u situaciji kada je dostupnost kiseonika limitirana, dešava se proces denitrifikacije za vreme koje rastvorljivi azotni oksidi služe kao alternativni primaoci elektrona. U završnoj fazi denitrifikacije, vezani N iz zemljišta se osobađa i vraća u atmosferu i time se zaokružuje ciklus azota. Aislabie and Deslippe (2013) navode da u denitrifikaciji učestvuju različiti mikroorganizmi koji nisu blisko filogenetski povezani, poput *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, gljiva i drugih eukariota i da aktivnosti u ciklusu azota nisu izričito raspodeljene među bakterijama, jer neke mogu imati višestruke uloge. Isti autori navode da neke bakterije iz rodova *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* i *Azospirillum* mogu da vrše i azotofiksaciju i denitrifikaciju, dok nitrifikujući *Nitrosomonas* može da vrši i denitrifikaciju. U zemljištima gde je limitiran sadržaj dostupnog azota mikroorganizmi procesom poznatim kao biološka azotofiksacija nadoknađuju njegov nedostatak. Azot u gasovitoj formi je zastupljen 78% u atmosferi i kao takav je inertan i nedostupan biljkama. Jedino grupa mikroorganizama poznata kao azotofiksatori ima sposobnost da raskine trogubu vezu između atoma atmosferskog azota transformišući ga uz prisustvo enzima nitrogenaza, u amonijak (Newton, 2015). Amonijak se zatim koristi za sintezu aminokiselina i postupno polimerizuje u proteine. Biološku azotofiksaciju vrše simbiotski, endofitni i slobodnoživući mikroorganizmi, a za zemljišni ekosistem od posebnog su značaja slobodni azotofiksatori iz rodova *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus* i *Pseudomonas*, koji naseljavaju rizosferu i okolno zemljište (Chanway and Yang, 2014). Od simbiotskih azotofiksatora značajni su rodovi *Rhizobium*, *Mesorhizobium* i *Frankia* (Aislabie and Deslippe, 2013).

Povećana dostupnost nerastvorljivih polifosfata se dešava zahvaljujući aktivnosti najmoćnijih fofosolubilizujućih mikroorganizama u zemljištu, rodova *Pseudomonas* i *Bacillus*. Solubilizacija cinka (ZnO, ZnCO₃, Zn₃(PO₄)₂) dešava se od strane rodova *Bacillus* sp., *Klebsiella* spp. i *Pseudomonas* spp., dok sulforedukujući mikroorganizmi *Desulfovibrio* sp., *Methanosarcina* sp. i *Methanobacterium* sp. povećavaju dostupnost sumpora (Maheshwari et al., 2020a). Takođe, mikroorganizmi poseduju kapacitet da fermentativnim procesom degradiraju i transformišu organski i neorganski supstrat u aerobnim i anaerobnim uslovima oslobađajući korisne produkte za zemljišni ekosistem (Faniyi and Oyatokun, 2021).

Kada su uzme u obzir bogat mikrobni diverzitet zemljišta, njihova metabolička aktivnost s jedne strane i pritisak koji trpi zemljišni ekosistem/agroekosistem s druge strane, jasno je da se

korišćenjem potencijala zemljišnih mikroorganizama može doprineti očuvanju održivog i klimatski pametnog poljoprivrednog proizvodnog sistema (Maitra et al., 2022). Suočavanje s klimatskim promenama i progresivnom degradacijom poljoprivrednog zemljišta koja ugrožava rast i produktivnost biljaka, zahteva traženje efikasnih i održivih poljoprivrednih praksi za zamenu agrohemikalija i jedan je od najvažnijih izazova današnjice (Antoszewski et al., 2022).

Najveći broj zemljišnih mikroorganizama koji pokazuju korisne efekte u agroekosistemu koncentrisan je i izoluje se iz rizosfere, uske zone zemljišta koji se nalazi pod uticajem korena biljke. Milioni mikroorganizama koji žive u rizosferi mogu svom domaćinu pružiti brojne prednosti, uključujući stimulaciju rasta, efikasnost upotrebe nutrijenata i kontrolu štetočina i fitopatogena (Ray et al., 2020). U formi inokulanata i u asocijaciji sa biljkom mogu biti značajna komponenta održive poljoprivredne proizvodnje, jer nakon primene, mikrobnii inokulanti u rizosfernom zemljištu stimulišu normalne procese, stimulišu apsorpciju nutrijenata i produktivnost, toleranciju na abiotički stres i poboljšavaju kvalitet useva (Sudheer et al., 2020), doprinose redukciji agrohemikalija i utiču na prirodnu stabilnost agroekosistema (Gallart et al., 2018). Upotreba bioinokulanata u poljoprivredi, nije nova praksa, već stogodišnja tehnologija, koju su prvi put opisali i patentirali Nobbe i Hiltner (1895). Inokulanti imaju cilj da održavaju plodnost zemljišta i obezbede biljkama nutrijente. Stoga se kao biofertilizatori najčešće koriste azotofiksatori, mikorizne gljive, P-, K-, Zn-, S- solubilizatori (Harman et al., 2004; Hart et al., 2017; He et al., 2015). Iako je primarna uloga biofertilizatora obezbediti raspoloživost nutrijenata, primena nekih biofertilizatora doprinela je povećanju nutritivnih vrednosti biljaka. Tako npr. povećanje sadržaja fenolnih jedinjenja, karotenoida i antocijanina u salati postignuto je nakon inokulacije *Glomus fasciculatum* (Balsam et al., 2011), *Azospitillum* i *Azotobacter* doprineli povećanju sadržaja ulja i proteina kod suncokreta (Akbari et al., 2011), a u koinokulaciji *G. fasciculatum*, *G. mosseae* i *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus mucilaginosus* i *B. megaterium* značajno je povećana koncentracija fenolnih jedinjenja, flavonoida i fenolne kiseline kod spanaća (Khalid et al., 2017).

Bolesti biljaka su ogroman i stalan problem koji direktno utiče na prinos i kvalitet proizvoda, jer vrlo često pesticidi nemaju očekivani efekat zbog prisustva delimične ili potpune rezistencije patogena. Ozbiljnost prisutnih bolesti i patogena u agroekosistemu rezultira smanjenjem kvaliteta i prinosa koji u zavisnosti od useva na globalnom nivou varira između 26-29% kod soje, 50% kod pšenice i više od 80% kod pamuka (Oerke, 2006; Savary et al., 2019). Biološka kontrola je alternativa sintetskim pesticidima i definiše kao direktna ili indirektna inhibicija bolesti ili patogena od strane drugog organizma (antagoniste) ili grupe organizama (Cook and Backer, 1983). Njihovom primenom ne postoje štetni efekti na biljku domaćina i ne postoji mogućnost razvoja rezistencije patogena (Dunne et al., 1996). Jensen et al. (2016) ističu četiri glavna mehanizma biokontrole kao što je nutritivna kompeticija, kompeticija za prostor putem antibioze, gde biokontrolni agensi sintetišu toksične sekundarne metabolite, zatim parazitizam i indirektna uloga biokontrolnog agensa u indukciji sistemske rezistencije kod biljke.

Industrijalizacijom poljoprivredne proizvodnje teški metali uvode se u zemljište putem agrohemikalija i u većim koncentracijama imaju nesagledive posledice po žive sisteme. S obzirom na metabolički kapacitet zemljišnih mikroorganizama bioremedijaciona uloga je od izuzetnog značaja za održivost poljoprivredne proizvodnje. Pires et al. (2017) navode da se detoksikacija od teških metala u zemljištu može zasnivati na aktivnosti predstavnika rodova *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Arthrobacter* koji zahvaljujući procesima biosorpcije, biotransformacije i bioakumulacije mogu opstati i funkcionisati u staništima zagađenim teškim metalima koristeći strategije poput helatnog vezivanja, volatizacije i skladištenja u vakuolama.

Održavanje plodnosti i zdravlja zemljišta zahteva odgovorno upravljanje kako bi se izbegao prekomerni gubitak nutrijenata, održao sadržaj organskog ugljenika i svela na minimum kontaminacija zemljišta. Iako je upotreba mineralnih đubriva povećala prinos useva, njihova integracija s organskim đubrivima i bioinokulantima pomaže u poboljšanju efikasnosti korišćenja nutrijenata, poboljšava zdravlje zemljišta i u određenoj meri ublažava neka ograničenja povezana s prekomernom primenom đubriva. Pored biofertilizacije, biokontrolne, bioremedijacione uloge, bioinokulanti imaju i druge korisne efekte kao što su aktivnosti kojima se ublažavanju posledice

globalnog zagrevanja i klimatskih promena. Takođe, mikrobnii inokulanti, mogu pružiti otpornost biljkama, posebno u uslovima stresa i za razliku od agrohemiakalija nemaju štetnih efekata na ekosistem (Maitra et al., 2022).

Neophodno je istaći da su molekularni mehanizmi biljno-mikrobne interakcije još uvek slabo proučeni (Antoszewski et al., 2022) i da objašnjenje ovih složenih mehanizama, otkrivanje i determinisanje novih sojeva, pronalaženje novih metoda i tehnologija za njihovu primenu može doprineti održivosti poljoprivrede.

2.3. Rizosferne bakterije stimulatori biljnog rasta

Rizosfera je zemljišna zona pod uticajem korena i njegovih eksudata ključnih za selekciju rizosfernih mikroorganizama (Bakker et al., 2013). Predstavlja kompleksni ekosistem, jedinstvenih fizičkih, hemijskih i bioloških osobina. Definisane širine rizosfere u literaturi je vrlo različito, a kako Vetterlein et al. (2022) navode zavisi od procesa koji se posmatra i može se kretati od nekoliko μm do nekoliko mm. Ipak jedinstven stav je da je to uska zona oko korena i da predstavlja pravo skladište mikroba. Broj mikroorganizama u rizosferi je 10-1000 puta veći u odnosu na zonu bez korensko-zemljišne interakcije (Gouda et al., 2018). Rizobakterije koje imaju stimulativan uticaj na rast i razvoj biljaka definisane su kao bakterije stimulatori biljnog rasta, PGPR (Kloepper i Schroth, 1978). Smatra se da 2-5% od ukupnih rizosfernih bakterija može kategorisati u PGPR (Grover et al., 2021). Veliki broj bakterijskih vrsta koje pripadaju rodovima *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia* i *Zoogloea* ima ulogu PGPR (Babalola, 2010). Ove bakterije predstavljaju značajnu komponentu održive biljne proizvodnje, jer stimulativan uticaj na razvoj biljaka ostvaruju putem različitih aktivnosti koje ih kategorišu kao biofertilizatore, fitostimulatore i biopesticide (Bhattacharyya and Jha, 2012). Rizobakterije imaju potencijal da povećaju rast useva, dostupnost nutrijenata, toleranciju na abiotički i biotički stres, uz očuvanje voda i terestijalnog diverziteta. U održivoj biljnoj proizvodnji koriste se pre svega kao biofertilizatori koji predstavljaju medijatore u transportu nutrijenata redukujući upotrebu mineralnih đubriva. Do sada, najbolje proučeni mikrobnii inokulanti sa ulogom biofertilizatora su azotofiksatori, fosfor-, kalijum- i cink-solubilizatori. Biokontrolnu ulogu u supresiji biljnih patogena imaju zahvaljujući kompeticiji za nutrijente, sintezi ekstracelularnih, hidrolitičkih enzima i sekundarnih metabolita, dok produkcijom fitohormona pospešuju metabolizam biljke i pokreću odbrambeni mehanizam. S obzirom da su fitohormoni glavni regulatori biljnog rasta i razvoja, PGPR prate biljku od najranije faze životnog ciklusa-germinacije, pa do konačnog prinosa, dajući doprinos svakoj od njih. Pored kvantitativnog aspekta u biljnoj proizvodnji uspešna kolonizacija rizosfere PGPR-om poboljšava nutritivni kvalitet poljoprivrednih kultura. Tako *Pseudomonas* spp. kod suncokreta dovodi do povećanja ne samo prečnika glave i broja zrna, već i sadržaja ulja (Sharif, 2012). Povećanje sadržaja flavonoida, proteina i ugljenih hidrata pri tretmanu leblebije sa konzorcijumom *P. fluorescens* OKC i *Trichoderma asperellum* T42 potvrdio je Yadav et al. (2017). Kod kukuruza *Azotobacter* i *Azospirillum* su pored povećanja prinosa i stope rasta doprineli povećanju sadržaja suve materije (Sharif, 2011). Danas je primena mikrobnii formulacija (inokulanata) sve više integralna komponenta održive biljne proizvodnje, i potvrđeni su brojni pozitivni efekti nakon njihove primene: poboljšanje klijavosti, podržavanje rasta i razvoja biljke u ranim fazama, povećanje prinosa (Tabela 1).

Tabela 1: PGPR i stimulatívni efekti na biljke

PGPR	Biljna vrsta	Efekat	Literaturni izvor
<i>Azospirillum lipoferum</i>	<i>Zea mays</i>	povećanje biomase nadzemnog dela, dužine i širine listova, prečnika stabla, dužine korena, broja lateralnih korenova i njegove biomase	Renoud et al., 2022.
<i>Azospirilum brasilense</i>	<i>Triticum aestivum</i>	povećanje apsorpcije azota i akumulacije u stablu, korenu i zrnu, povećanje biomase korena i stabla	Galindo et al., 2022.
<i>Azotobacter</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Brassica napus</i> , <i>Sinapsis alba</i> , <i>Amaranthus retroflexus</i> , <i>Rumex patientia</i> , <i>Panicum miliaceum</i> , <i>Linum usitatissimum</i>	povećanje dužine korena i stabla	Minut et al., 2023.
<i>A. chroococum</i> , <i>Rhodobacter capsulatus</i>	<i>Brassica rapa</i>	povećanje visine, suve mase korena, nadzemnog dela, lisne površine i sadržaja hlorofila	Hussein et al., 2014.
<i>A. chroococum</i> , <i>A. lipoferum</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	povećanje težine zrna, suve mase	Mirshekari et al., 2012.
<i>Azotobacter</i> spp., <i>Azospirilum</i> spp.	<i>Zea mays</i>	povećanje prinosa i broja zrna po klipju	Sharifi and Khavazi, 2011.
<i>Burkholderia</i> sp., <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Solanum lycopersicum</i>	povećanje ukupne biomase korena, stabla, lišća i prinosa	Nakahara et al., 2022.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Helianthus annuus</i>	povećanje visine nadzemnog dela, dužine korena i težine klijanaca	Moeinzadeh et al., 2010.
<i>B. subtilis</i> , <i>Cronobacter dublinensis</i> , <i>P. monteilii</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	povećanje u prinosu esencijalnog ulja	Singh et al., 2013a.
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Solanum melongena</i>	antifungalna aktivnost prema <i>Alternaria blight</i>	Attia et al., 2022.
<i>B. subtilis</i> GB03, <i>B. amyloliquefaciens</i> IN937a, <i>B. pumilis</i> SE34, <i>B. pumilis</i> T4, <i>B. pasterui</i> C9, <i>Paenibacillus polymixa</i> 681, <i>P. fluorescens</i> 89B-61, <i>Serratia marscencens</i> 90-166	<i>Arabidopsis thaliana</i>	povećanje sveže mase lišća	Ryu et al., 2005.
<i>B. pumilis</i> , <i>B. firmus</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	povećanje visine nadzemnog dela, broj listova i broja krtola po biljci u stresnim uslovima (suša, salinitet, teški metali)	Gururani et al., 2012.

<i>Bacillus cereus</i> , <i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Oryza sativa</i>	povećanje germinacije, rasta, resorpcije nutrijenata, tolerancije na nepovoljne faktore okruženja	Saucedo-Martinez et al., 2020.
<i>Agrobacterium rubi</i> , <i>Burkholderia gladii</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i>	<i>Raphanus raphanistrum subsp. sativus</i>	poboljšanje germinacije i u uslovima povećanog saliniteta	Kaymak et al., 2009.
<i>Pseudomonas fluorescence</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	poboljšanje rasta i prinosa u uslovima stresa	Nawaz et al., 2020.
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Glycine max</i>	modifikacija strukture korena, povećanje dužine, biomase, broja nodula, sadržaja N u suši	Prudent et al., 2015.
<i>P. fluorescens</i>	<i>Oryza sativa</i>	povećanje dužine korena u uslovima poplava	Etesami et al., 2014.
<i>Rhizobia</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.	<i>Cicer arietinum</i>	povećanje biomase	Khan et al., 2019.
<i>Burkholderia ambifaria</i> , <i>Bacillus caribensis</i>	<i>Amaranthushypochondriacus</i> , <i>A. cruentus</i>	povećan sadržaj N u svim tkivima i rasta i prinosa	Parra-Cota et al., 2014.
<i>Burkholderia cenocepacia</i> , <i>B. contaminans</i>	<i>Zea mays</i>	antifungalna aktivnost prema <i>Fusarium temperatum</i>	Tagele et al., 2019.
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Zea mays</i>	poboljšanje rasta u uslovima povećanog saliniteta	El-Esawi et al., 2018.
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Arabidopsis</i>	stimulacija rasta lateralnih korenova	Zhang et al., 2022.

Zbog pozitivnog agronomskog učinka proizvoda na bazi mikroba, otvorilo se svetsko tržište novih vrsta đubriva na bazi PGPR koja su komercijalno dostupna u mnogim zemljama od 1950-ih (Timmusk et al., 2017). Široka komercijalna upotreba korisnih mikroorganizama zahteva rešavanje brojnih pitanja, a sistemski pristup koji koristi informacione tehnologije za analizu mikrobioma i molekularna razjašnjenja metaboličkih puteva imaju potencijal da unaprede primenu u prirodnim, odnosno poljskim uslovima. Pokretanje nauke u poljoprivredi je uslov za razvoj pametne poljoprivrede i kreiranje zelene ekološke tehnologije koja će pomoći da se pravilno usmere aktivnosti u vezi sa primenom mikroorganizama u poljoprivredi. Tek tada će manipulacija rizosferom i primena PGPR postati ključni mehanizmi kojima se može podržati koncept održivosti poljoprivredne proizvodnje.

2.4. Mehanizmi delovanja bakterija stimulatora biljnog rasta

Biljke koje rastu u poljskim uslovima nisu nezavisne individue, već grade složene zajednice sa suptilnim i relativno stalnim partnerskim odnosima (Lundberg et al., 2012). Dobro strukturisana i regulisana zajednica mikroorganizama uvek je povezana sa biljkom (Bulgarelli et al., 2015) i ova zajednica se označava kao fitomikrobiom koji sa biljkom čini holobiont (Smith et al., 2017). Bakterije stimulatori rasta biljaka koje naseljavaju rizosferu su povezane sa korenskim sistemom i ispoljavaju fitostimulativni efekat, koji se može pripisati direktnim i indirektnim mehanizmima. Direktni mehanizmi uključuju dostupnost hranjivih materija u zemljištu (npr. solubilizacija i mobilizacija nutrijenata) i proizvodnju fitohormona (Basu et al., 2021). Delovanje litičkih enzima,

antibiotika, siderofora i isparljivih metabolita kao i indukcija sistemske rezistencije (ISR) za suzbijanje štetnih fitopatogena, označavaju se kao glavni indirektni mehanizmi putem kojih PGPR stimulišu rast i razvoj biljaka (Olanrewaju et al., 2017).

2.4.1. Direktni mehanizmi

Fitohormoni deluju kao glasnici koji koordiniraju ćelijske aktivnosti i regulišu rast biljaka, modifikujući arhitekturu korena i izdanaka (Verbon and Liberman, 2016). Sposobnost sinteze biljnih hormona potvrđena je kod mnogih PGPR. Fitohormoni su sekundarni metaboliti i poznati su pod nazivom „klasičnih pet“: auksini, giberelini, citokinini, etilen i apciscinska kiselina (Patel et al., 2015). Produkcija auksina je otkrivena kod *Azospirillum* i *Pseudomonas*, kod *Azotobacter vinelandi* potvrđena je produkcija citokinina, sinteza giberelina kod *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia*, sinteza apciscinske kiseline kod *Azospirillum brasilense*, jasmonske kiseline kod *Bacillus pumilus* i salicilne kod *Pseudomonas aeruginosa* (Kudoyarova et al., 2015). Mikrobnim fitohormoni ispoljavaju apsolutno identične funkcionalne osobine kao i biljni hormoni sa minimalnim strukturnim razlikama koje ne utiču na njihovu funkciju što znači da su u potpunosti kompatibilni biljnim (Shi et al., 2017). Utiču na hormonsku homeostazu u biljci i ispoljavaju aktivnost u veoma malim koncentracijama (Kudoyarova et al., 2015). Hormoni direktno regulišu različite funkcije koje su u vezi sa germinacijom, rastom, metabolizmom, reprodukcijom i otpornosti prema patogenima (Spaepen, 2015). Za fitohormonalu modulaciju od posebnog značaja je sinteza mikrobne 1-aminociklopropan-1-karboksilat (ACC) deaminaze, jer je sposobnost regulacije nivoa etilena jedna od ključnih metaboličkih aktivnosti PGPR (Gamalero and Glick, 2015). ACC deaminaze katalizuju hidrolizu ACC-a koji je prekursor etilena (Gupta and Pandey, 2019; Khan et al., 2016). Izuzetno je važno da endofitna ACC deaminaza hidrolizuje ACC pre nego što ga biljna ACC oksidaza preuzme i uključi u metabolički put etilena (Houben and Van de Poel, 2019). Hidrolizom, koncentracija ACC u biljci opada, dolazi do smanjenja koncentracije etilena i istovremeno se gubi inhibitorni efekat koji ispoljava na elongaciju korena (Jackson, 1991). Pretpostavlja se da sve biljke čija semena kolonizuju PGPR sojevi koji produkuju ACC deaminazu, treba da imaju duži koren i nadzemni deo (Glick et al., 1997). Takođe, aktivnošću mikrobne ACC deaminaze omogućava se opstanak klijanaca u početnim fazama rasta, nakon setve, kada su podložniji negativnim uticajima spoljne sredine (Jackson, 1991).

Pored fitohormona za biljnu fiziologiju je od ključnog značaja raspoloživost nutrijenata, kao konstitutivnih elementa hormona, enzima, aminokiselina i genetskog materijala (Singh et al., 2018; Pandey 2018; Romera et al., 2021).

Azot (N) je esencijalni konstituent enzimskih, strukturnih proteina i nukleotida. Zbog toga može da se kaže da je glavni limitirajući element biljnog razvoja (Munees and Mulugeta, 2014), jer u slučaju njegovog nedostatka dolazi do redukcije rasta, razvoja i prinosa. Atmosfera predstavlja najjeftiniji i neiscrpn izvor azota, a grupa mikroorganizama poznata kao azotofiksatori ima sposobnost da redukuje atmosferski azot. Proces je poznat kao biološka azotofiksacija i po svom značaju može se porediti sa fotosintezom. Biswas and Gresshoff (2014) navode literaturni podatak da se azotofiksacijom obezbeđuje 200 miliona tona azota godišnje na globalnom nivou i da je ekvivalent skupoj Haber-Bošovoj reakciji koja se primenjuje u proizvodnji mineralnih azotnih đubriva i koja zahteva visoki pritisak (150-350 atm) i temperaturu (350-550 °C) u odnosu na biološku azotofiksaciju koja je efikasan katalitički proces koji se odvija u ambijentalnim uslovima i subatmosferskom pritisku. Samo oni rizosferni mikroorganizmi koji poseduju enzimski sistem, nitrogenazu, učestvuju u biološkoj azotofiksaciji. U odnosu na karakter interakcije sa biljkom mogu biti simbiotski i slobodni azotofiksatori (Cooper and Scherer, 2012). Od slobodnih azotofiksatora najpoznatiji i u tom smislu najprimenjiviji kao bofertilizatori su sojevi *Azotobacter* (Kumari et al., 2017).

Pored azota, fosfor (P) je sledeći po značaju nutrijent neophodan za pravilan razvoj korena, čvrstoću stabljike, formiranje cveta i semena (Satyaprakash et al., 2017). Uloge su mu brojne: konstitutivna je komponenta nukleotida, fosfolipida, enzima i koenzima (Kalayu, 2019); učestvuje u

transformaciji energije i sintezi makromolekula (Khan et al., 2010); učestvuje u fotosintezi i transpiraciji (Sharma et al., 2013). Njegova dostupnost u zemljištu je često limitirana i ima ga u nivou od 150-700 $\mu\text{g/g}$ zemljišta (Muindi, 2019). Fosfor je površinski vezan u nedostupnim formama za apatit, njegove okside i hidrokside, okside i hidrokside gvožđa i aluminijuma, ali ukoliko se prevedu u dostupne oblike, postaju najjeftiniji izvori fosfora što je od esencijalnog značaja za održivost biljne proizvodnje (Sharma, 2013; Fink et al., 2016). U savremenoj biljnoj proizvodnji problem nedostupnosti fosfora se pokušava rešiti primenom fosfatnih đubriva. Međutim, neposredno nakon primene, a u zavisnosti od pH zemljišta, dolazi do prevođenja velike količine P u nerastvorljive oblike. U kiselim zemljištima stvaraju se nerastvorljivi kompleksi sa aluminijum- i gvožđe- oksidima, dok u alkalnim zemljištima P u reakciji sa kalcijumom formira slabo rastvorljivi kalcijum fosfat (Johan et al., 2021). To znači da problem nedostupnosti fosfora ostaje prisutan bez obzira na unos mineralnih đubriva. S druge strane, u održivoj biljnoj proizvodnji korisnim mikroorganizmima pripada centralna uloga u prirodnom ciklusu P. Mehanizam solubilizacije fosfata podrazumeva snižavanje pH zemljišta uz pomoć organskih kiselina (oksalna, limunska, butirna, mlečna, sukcinna, glukonska, acetatna i fumarna) koje su rezultat mikrobnog metabolizma, pre svega oksidativne respiracije ili fermentacije organskih ugljenikovih jedinjenja (glukoza) (Harrison et al., 1972; Maliha et al., 2004; Trolove et al., 2003). Često su u kombinaciji sa drugim metabolitima: sideroforima, litičkim enzimima i fitohormonima (Vassilev et al., 2006). Međutim, 30-50% od ukupnog P u većini zemljišta pripada organskim jedinjenjima P, iako širi dijapazon obuhvata 4-90% (Khan et al., 2010). Forma inozitol-fosfata je najzastupljenija organska forma P, a zatim slede fosfomonoestri, fosfodiestri (fosfolipidi, nukleinske kiseline i njihovi derivati) (Balaban et al., 2017). Pošto su velike molekulske težine, moraju prvo preći u forme male molekulske težine i rastvorljive jonske fosfate (HPO_4^- , H_2PO_4^-) da bi se asimilovali od strane biljaka u procesu mineralizacije. Ovo je moguće zahvaljujući enzimima fosfatazama. Od celokupnog mikrobnog potencijala, sposobnost solubilizacije fosfora ima 1-50% bakterija (*Phosphate Solubilising Bacteria*, PBS) i 0,1-0,5% gljiva (Satyaprakash et al., 2017). *Pseudomonas*, *Bacillus* i *Rhizobium* su najznačajniji i najmoćniji solubilizatori zahvaljujući produkciji fosfataza ili organskih kiselina (Rodríguez and Farga, 1999). PSB brojnost određena je fizičko-hemijskim odlikama zemljišta (Vikram et al., 2007). Obično je njihova brojnost tolika da ih ne čini dovoljno kompetitivnim u odnosu na druge bakterije u rizosferi (Jain et al., 2012). Zato je inokulacija semena ciljanim PSB mikroorganizmima, ili njihova aplikacija direktno u rizosferu ključ za korišćenje njihove sposobnosti solubilizacije P i stimulacije biljnog rasta (Kalayu, 2019). PBS se još od 1950. god. koriste kao biofertilizatori i mogu i do 50% zameniti mineralna đubriva povoljno utičući na prinos uz poboljšanje narušenog kvaliteta zemljišta (Sharma et al., 2021).

Značajan makronutrijent u procesu fotosinteze, enzimske aktivnosti i sintezi proteina je kalijum (K), a njegov nedostatak rezultira slabo razvijenim korenom, malom produkcijom semena i smanjenjem prinosa (Hasanuzzaman et al., 2018). Koncentracija rastvorljivog K u zemljištu varira od 4 do 30 g/kg (Rajawat et al., 2019). Limitiranost K u zemljištu je rezultat njegove nedostupnosti, a ne nedostataka. Preko 90% K je u nedostupnoj formi u silikatnim mineralima i nerastvorljivim stenama (Parmar and Sindhu, 2013). Zbog toga, PGPR koje proizvode organske kiseline mogu da ga mobilisu. Pored produkcije organskih kiselina (limunska, oksalna) kod nekih PGPR prisutan je mehanizam helatnog vezivanja silikatnog jona pri čemu se oslobađa K u zemljišni rastvor (Meena et al., 2014).

Cink (Zn) je mikroelement koji predstavlja ključnu komponentu 300 enzima, značajan je za završavanje, reprodukciju, očuvanje ćelijskog integriteta i niz fizioloških procesa biljke (fotosinteza, metabolizam azota, sinteza hlorofila, auksina, proteina, zaštita od oksidativnog stresa) (Hussain 2015; Li et al., 2016; Hussain et al., 2018; Rudani et al., 2018). Na globalnom nivou, deficit Zn je, ne samo kod biljaka već i kod čoveka, među najvećim problemima i smatra se da je oko 17% svetske humane populacije u riziku od nedostatka cinka (Khan et al., 2022). U zemljištu ga ima dovoljno, ali razlog njegove ograničene dostupnosti je loša rastvorljivost (Cakmak, 2008). Čak i primenom mineralnog đubriva već nakon sedam dana dolazi do njegovog prevođenja u nerastvorljivu formu (Hussain et al., 2018). Najčešći razlozi su visoka ili niska pH, prisustvo niskog

sadržaja organske materije, bikarbonata, loša drenaža zemljišta (Rengel, 2015). Zbog toga su PGPR koje mogu da solubilizuju Zn alternativa mineralnim đubrivima u održivoj biljnoj proizvodnji. Među solubilizatore Zn spadaju *Bacillus* sp. *Pseudomonas striata*, *P. fluorescense*, *P. aeruginosa*, *Burholderia cenocepacia*, *Gluconacetobacter diazotrophuicus*, *Serratia* spp. (Anuradha et al., 2015; Saravanan et al., 2007; Fasim et al., 2002; Abaid-Ullah et al., 2015). Kamran et al. (2017) navode da mikroorganizmi acidifikacijom i ekskretovanjem protona solubizuju Zn. Snižavnje pH vrednosti u rizosferi povećava njegovu dostupnost, i procenjuje se da za svaku sniženu jedinicu pH dostupnost raste i do 100 puta (Rengel, 2015). Neki mikroorganizmi proizvode Zn-helatore koji nakon formiranja kompleksa sa Zn kreću u pravcu rizosfere i otpuštaju ligant-Zn²⁺ na površinu korena (Saravanan et al., 2011).

Pored cinka, gvožđe (Fe) je izuzetno važan mikronutrijent za obavljanje fizioloških procesa biljaka, jer je kofaktor mnogih enzima, uključen je u redoks reakcije, DNK sintezu, azotofiksaciju i fotosintezu. Njegov nedostatak vodi ograničenju rasta i redukciji prinosa. Fe je zastupljeno u okruženju u ogromnim količinama, ali na žalost u formi feri jona (Fe³⁺), odnosno feri-oksida nedostupnog živim organizmima (Ammari and Mengel, 2006). PGPR su razvili posebnu strategiju preuzimanja Fe iz okruženja i njegovog transporta do biljnih ćelija u obliku fero-jona (Fe²⁺) koji se može metabolisati od strane biljke. Mehanizam je omogućen zahvaljujući produkciji sekundarnih metabolita-siderofora. Značaj Fe-siderofora (na grčkom - „Fe-nosač“) utvrđen je pre 30 godina (Paul i Clark, 1988). To su signalni molekuli koji obezbeđuju gvožđe i drugim organizmima. Biljke ne uspeavaju da akumuliraju dovoljnu količinu Fe i pored dva mehanizmima koje su razvile poznatih kao Strategija I (snižavanje pH okruženja kroz eksudaciju H⁺ i organskih reduktanata) i Strategija II (produkcija fito-siderofora, tj. neproteinogenih aminokiselina) i zato produkciju mikrobnih Fe-(III) siderofora možemo posmatrati kao Strategiju III (Loper and Buyer, 1991). Mikrobne siderofore po svojoj hemijskoj prirodi su hidrosolubilni organski molekuli, male molekulske mase: kateholati, hidroksamati i alfa-hidroksi-karboksilati (Budzikiewicz, 2010). Takođe, poznato je da neke mikrobne siderofore u jednom molekulu mogu imati kombinaciju više glavnih funkcionalnih grupa (pioverdin) (Cornelis, 2010).

Aktivnost mikrobnih siderofora i proces vezivanja gvožđa se dešava kroz sledeće faze (Kraemer, 2004):

- ligandi (siderofore) sa visokim afinitetom vezivanja Fe se oslobađanju u okruženje,
- siderofore vezuju Fe i vrši se transport kompleksa Fe-siderofora kroz mikrobnu membranu,
- aktivira se enzimski sistem unutar ćelija i oslobađa Fe-jon iz siderofore.

Produkcija mikrobnih ekstracelularnih siderofora je strategija kojom mikroorganizmi postaju konkurentniji i kompetentniji u odnosu na one koji nemaju tu osobinu među autohtonom populacijom (Kloepper et al., 1980). To znači da biranjem PGPR sojeva koji imaju sposobnost produkcije siderofora i tehnikom mikrobiološke inokulacije možemo uticati na dostupnost gvožđa u rizosferi. Na primeru pirinča može se potvrditi doprinos siderofora u formiranju bakterijskih plaka. Otpuštanje solubilne forme Fe od strane siderofora može da doprinese i rastu Fe-oksidujućih bakterija u rizosferi i direktno doprinesu formiranju Fe-plaka koji može da zapleni arsen (As), teški metal, i time spreči njegovu resorpciju od strane biljnog korena (Lakshmanan et al., 2015a).

Signalna komunikacija u rizosferi postoji na različitim nivoima, od mutualističkog do antagonističkog između različitih vrsta i unutar njih: biljka-mikrob, mikrob-mikrob, mikrob-nematode, mikrob-insekti i utiče na celovitost ekosistema (Wenke, 2010). Ulogu posrednika u dijalogu imaju mikrobna organska isparljiva jedinjenja (*Volatile Organic Compounds*, VOC). U toku mikrobnog metabolizma oslobađaju se jedinjenja male molekulske mase (300 g/mol; C < 15), niske tačke ključanja i visokog pritiska isparavanja (0,01 kPa na temperaturi 20 °C) (Finchiera et al., 2017a). Fizičko-hemijske karakteristike VOC omogućavaju isparavanje i difuziju iznad i ispod površine zemlje kroz zemljišne pore bilo da su ispunjene vazduhom ili vodom (Effmert et al.,

2012). Po svojoj hemijskoj prirodi to su različite klase hemijskih jedinjenja: alkoholi, alkeni, ketoni, sulfidi, terpentini, benzenoidi i pirazini (Schmidt et al., 2015). Više od 300 ovakvih molekula je identifikovano kao VOC, ali su GC-MS analize potvrdile da bi i do sada otkrivena neimenovana jedinjenja mogla imati funkciju VOC-a (Bailly and Weisskopf, 2012). Da ova jedinjenja nisu samo prosti „metabolički otpaci“ potvrđuje činjenica da postoji kompleksan dvokomponentni genetski regulatorni sistem (GacS/GacA) koji je uključen u njihovu regulaciju (Ossowicki et al., 2017). U poslednjoj deceniji su zasluženno postala predmet brojnih istraživanja u oblasti održive poljoprivrede zbog svog uticaja na rast i razvoj biljaka. Oslobađanje organskih isparljivih jedinjenja koja promovišu biljni rast nije jedinstveno za sve PGPR iako je njihova produkcija prisutna i kod gljiva, Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija. Sidorova et al. (2022) navode da baza identifikovanih mikrobnih jedinjenja obuhvata više od 2000 jedinjenja sintetizovanih od strane od oko 1000 bakterijskih vrsta i gljiva i predstavljaju mali deo velikog mikrobnog potencijala njihove sinteze. Bez neophodnog fizičkog kontakata mikrob-biljka, VOC deluju na većim distancama kao signalni molekuli. Lako prolaze kroz biološke membrane (Sidorova et al., 2022) i sposobni su da pokrenu različite fiziološke procese u biljkama. Dosadašnja ispitivanja su potvrdila njihov značaj:

- VOC utiču na aktivnost i modulaciju biljnih fitohormona, citokinina (Ryu et al., 2003), etilena (Ryu et al., 2004), auksina, salicilne kiseline, brasinosteroida i giberelina (Ryu et al., 2005), abscizinske kiseline (ABA) (Zang et al., 2008),
- VOC mogu biti izvor nutrijenata (Meldau et al., 2013),
- Učestvuju u indukovanoj sistemskoj rezistenciji i inhibiciji biljnih patogena (Kottb et al., 2015; Kai et al., 2016),
- Uključeni su u supresiju i povećanje tolerancije na delovanje abiotičkih stresova (Cho et al., 2008).

Pored pozitivnog, VOC mogu ispoljiti i toksično dejstvo na rast i razvoj biljaka, a u krajnjim slučajevima mogu izazvati i smrt biljke, što se vezuje za produkciju pojedinih isparljivih jedinjenja kao što su cijanovodonična kiselina (HCN) (Blom et al., 2011a), amonijak, dimetilsulfid, trimetilsulfid, 3-fenilpropionska kiselina (Chung et al., 2010; Liu et al., 2021; Le et al., 2022). Postoji više faktora koji utiču na karakter molekula koji će se metabolisati. Mikroorganizmi u zavisnosti od podloge produkuju veliki broj ekstracelularnih enzima koji će uticati na metabolički put i oslobađanje molekula VOC-a koji će pozitivno ili negativno uticati na biljku (Asari et al., 2016). Ogleđima je potvrđeno da će negativan efekat biti znatno manji ukoliko su podloge na kojima se gaje mikroorganizmi nutritivno siromašnije (Blom et al., 2011b; Asari et al., 2016). Podloge koje su bogate proteinima, Luria-Bertani agar, hranjivi agar, Kings B medium mogu doprineti produkciji HCN i NH₃ i dovesti do inhibicije biljnog rasta (Bally and Weisskopf, 2012) u odnosu na podloge koje su bogate šećerom (M9, MS) (Asari et al., 2016). Čak i vrlo male varijacije u nutrijentu i njegovoj koncentraciji mogu značajno da utiču na količinu i tip VOC-a koji se produkuje. U laboratorijskim uslovima doza i koncentracija inokuluma utiče na ispoljavanje pozitivnog ili negativnog efekta isparljivih organskih komponenata jednog istog soja. Ispitivanja od strane Blom et al., (2011b) su pokazala da se sa povećanjem doze ne sintetišu nova jedinjenja, ali da će neka jedinjenja biti prisutna u većoj koncentraciji i time odrediti stepen pozitivnog ili negativnog dejstva. Takođe, potrebno je istaći da je prilikom ispitivanja VOC-a u laboratorijskim uslovima prisutan još jedan ograničavajući faktor: u oglede su uključene uglavnom vrlo mlade biljke, klijanci, čiji se metabolizam znatno razlikuje od metabolizma odrasle biljke. Mlade biljke, posebno klijanci, su znatno osetljiviji na dejstvo VOC-a u odnosu na odrasle biljke (Bailly and Weisskopf, 2012). U poljskim uslovima na produkciju VOC-a utiču fizičko-hemijske osobine zemljišta (pH, O₂, T, voda, veličina neorganskih čestica, agregati minerala, veličina i oblik pora) kao i interaktivni odnosi između zemljišne biote. Za najveći broj ogleđina korišćen je kao model *Arabidopsis thaliana*, ali se više uključuju i ostale biljne vrste kao što su paradajz (*Solanum lycopersicum* L.), kukuruz (*Zea mays* L.), ljuta papričica (*Capsicum annuum* L.), salata (*Lactuca sativa* L.), uljana repica (*Brassica campestris* L.) (Passari et al., 2019; Sánchez-López et al., 2016; Fincheira et al.,

2017b; Fincheira and Quiroz, 2018; Yamagiwa et al., 2011). Zbog velikog potencijala koji bi mogao biti iskorišćen u održivoj biljnoj proizvodnji u narednom periodu potrebno je izvršiti identifikaciju velikog broja molekula VOC-a, odrediti njihovu optimalnu koncentraciju, dozu i uticaj na različite biljne kulture.

2.4.2. Indirektni mehanizmi

Zbog velikog ekonomskog angažovanja i česte neefikasnosti hemijskih pesticida, biološka kontrola se razmatra kao zamena ili dopuna u cilju redukcije upotrebe hemikalija u održivoj biljnoj proizvodnji. Značajna biokontrolna uloga pripada PGPR i primenom mikrobiološke inokulacije semena doprinosi se aktiviranju različitih biokontrolnih mehanizama od ranih razvojnih faza pa do kraja životnog ciklusa biljke. PGPR pokazuju biokontrolnu aktivnost u rizosferi na sledeće načine:

- sintezom bakterijskih alohemikalija: Fe-siderofore antibiotici, biocidni VOC, litički i detoksikacioni enzimi (Chincholkar et al., 2007; Beneduzi et al., 2012; Kottb et al., 2015; Maksimov et al., 2011),
- mehanizmom hiperparazitizma (Pal and Gardener, 2006), prisustvom kompeticije sa patogenima za prostor i nutrijente (Kamilova et al., 2005),
- produkcijom fitohormona i regulisanjem aktivnosti ACC deaminaza (Jaroszuk-Ścisiel et al., 2019),
- formiranjem biofilma na korenu biljke u cilju njene zaštite od patogena (Rudrappa et al., 2008).

Nakon prvog susreta biljka može razviti pojačanu otpornost-rezistenciju na patogen pri svakom sledećem kontaktu sa njim. Ova pojava je poznata kao indukovana otpornost-rezistencija (Pieterse and Van Loon, 2005), a u okviru nje razlikujemo dva tipa:

- sistemska stečena rezistencija (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) i
- indukovana sistemska rezistencija (*Induced Systemic Resistance*, ISR).

Razlika između ISR i SAR je u signalnim putevima i molekulima koji dovode do njihove aktivnosti, ali zajedničko je da su to fenomeni koji aktiviraju hemijske i fizičke odbrambene mehanizme biljke bez modifikacije njenog genoma. SAR je isključivo pokrenuta od strane patogenog mikroorganizma i kontrolisana od strane signalnog puta koji zavisi od akumulacije salicilne kiseline i PR (*Pathogenesis Related*) proteina koji su po svojoj prirodi enzimi različitih uloga (peroksidaze, hitinaze, β -1,3-glukanaze) (Gozzo, 2003). U slučaju ISR-a, kao jedan od ključnih momenata je formirana biljno-mikrobna asocijacija koja je u osnovi percepcija i prepoznavanja patogena od strane biljke (Hammond-Kosack and Jones, 1996). Kada je patogen prisutan u rizosferi PGPR se ponašaju kao induceri ISR, jer sintezom različitih jedinjenja aktiviraju gene u biljnom organizmu odgovorne za sintezu komponenata rezistencije (Annapurna et al., 2013). Ključni regulatori ISR su jasmonska kiselina i etilen koji su rezultat metabolizma rizobakterija. U održivoj biljnoj proizvodnji, indukovana otpornost delujući zajedno sa drugim strategijama predstavlja izuzetan potencijal u biokontroli.

2.5. Rodovi *Azotobacter* i *Bacillus* kao bakterije stimulatori biljnog rasta

Iz velike zajednice PGPR posebno se izdvajaju *Azotobacter* sp. i *Bacillus* sp. koji su kao mikrobnii inokulanti izučavani u velikom broju eksperimenata *in vitro* i *in vivo* (Minut et al., 2023; Hindersah et al., 2021; Romero-Perdomo et al., 2017). Oni su tipični predstavnici dve važne grupe rizosfernih bakterija sa dve ključne uloge u nutritivnom ciklusu biljke: biološkoj azotofiksaciji i solubilizaciji fosfora.

Vrste roda *Azotobacter* poput *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. armeniacus*, *A. nigricans* i *A. paspali* zahvaljujući pre svega sposobnosti fiksacije azota, a zatim i solubizaciji P, K, Zn, Cu, S i Mn spadaju u grupu bakterija koja direktnim mehanizmima stimuliše rast biljaka. *Azotobacter* sp. ima kompletno razvijen mehanizam neophodan za proces azotofiksacije: od ferodoksina, hidrogenaza i najvažnijeg enzima Mo-Fe-nitrogenaza (Kumari et al., 2017). Sabra et al. (2000) su istakli da je azotofiksacija vrlo osjetljiva na prisustvo kiseonika i zato je *Azotobacter* sp. razvio odbrambenu strategiju: pored uključivanja specijalno sintetizovanog proteina koji ima funkciju da štiti nitrogenazu, bakterija intenzivira metabolizam i respiraciju i na taj način redukuje koncentraciju kiseonika u ćeliji. U *in vitro* uslovima *Azotobacter* sp. fiksira 10 mg N/g C-izvora (Kumari et al., 2017). Zbog sposobnosti da fiksiraju elementarni azot predstavnici roda *Azotobacter*, mogu se koristiti kao biofertilizatori u održivoj biljnoj proizvodnji i biti alternativa ili dopuna azotnim mineralnim đubrivima. Romero-Perdomo et al. (2017) su u svom radu pokazali da je primena mešanih populacija *A. chroococcum* AC1 i *A. chroococcum* AC10 smanjila potrebu za azotnim đubrivima i do 50%, a Kumar et al., (2001) su pokazali da sojevi *A. chroococcum* rastvaraju fosfat u zemljištu i tako doprinose poboljšanju rasta *Triticum aestivum*.

Takođe, dokazana je produkcija fitohormona (IAA, giberelina, citokinina) od strane *A. chroococcum*, što doprinosi povećanju rasta biljaka i stimulativnom uticaju na klijanje semena i dužinu korena i izdanaka različitih useva (Wani et al., 2013). Vrste *Azotobacter* kroz sintezu biološki aktivnih supstanci, proizvodnju fitopatogenih inhibitora, azotofiksaciju i balansirani unos nutrijenata mogu imati pozitivan uticaj na rast i prinos useva (Sumbul et al., 2020). Dokazana je i produkcija siderofora (Tindale et al., 2000), egzopolisaharida (Gauri et al., 2012), antifungalna aktivnost (Nagaraja et al., 2016), bioremedijacijski kapacitet u degradaciji pesticida, insekticida i herbicida (Castillo et al., 2011; Chennappa et al., 2016; Chenappa et al., 2019) zbog čega se prepoznaje kao značajan biološki agens i komponenta održive biljne proizvodnje.

Bakterije roda *Bacillus* (*B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilis* i *B. thuringiensis*) su među najzastupljenijima u rizosferi biljaka. Produkcijom velikog broja metabolita mogu da stimulišu rast biljaka. Dominantna aktivnost *Bacillus* sp. je posredovanje u ciklusu kruženja fosfora, različitim mehanizmima kao što je produkcija organskih kiselina (mlečna, oksalna, propionska, acetatna) solubilizuju neorganski fosfor, a produkcijom kiselih fosfataza mineralizuju organski fosfor (Saeid et al., 2018). Takođe, *Bacillus* sp. je uključen u ciklus kruženja ugljenika i učesćem u metabolizmu ugljenih hidrata doprinosi povećanju sadržaja mono i disaharida (glukoza, fruktoza) glavnih izvora energije za veliki broj organizama (Kang et al., 2014a). Pojedine vrste *Bacillus* sp. mogu da sintetišu biljne hormone (IAA, citokinine, gibereline), siderofore i ACC deaminazu. Doprinos ciklusu azota daju neki *B. megaterium* sojevi koji imaju sposobnost azotofiksacije (Singh et al., 2020a).

Azotobacter se koristi kao biofertilizator više od veka (Das, 2019) i njegovoj primeni doprinosi brzo umnožavanje i razvijanje guste populacije u rizosferi, kada se primjenjuje kao tretman semena ili se inkorporira u zemljište (Maryenko, 1964). *Bacillus* sp. je bio jedan od prvih komercijalizovanih biofertilizatora koji je povećao prinos useva za 40% (Kang et al., 2015). Mogućnosti *Bacillus* sp. da produkuje spore i *Azotobacter* sp. da formira ciste, forme otporne na abiotičke stresove, povećava njihovu upotrebnu i komercijalnu vrednost kao mikrobnih inokulanata u održivoj biljnoj proizvodnji (Kang et al., 2014a).

2.6. Biljno-mikrobne interakcije

Biljno-mikrobna interakcija je složen, dinamičan i kontinuiran proces koji je star koliko i pojava kopnenih biljaka na Zemlji. Tokom miliona godina evolucije, biljke su se povezivale sa mikrobima i formirale ekološku jedinicu "holobiont" (Dolatabadian, 2020). Korisne asocijacije omogućavaju biljkama da opstanu u širokom spektru abiotičkog i biotičkog stresa, a biljke postižu ove prednosti selektivnim privlačenjem mikroba koristeći korenske izlučevine potrebne za ishranu i aktivnost mikroorganizama (Pantigoso et al., 2022).

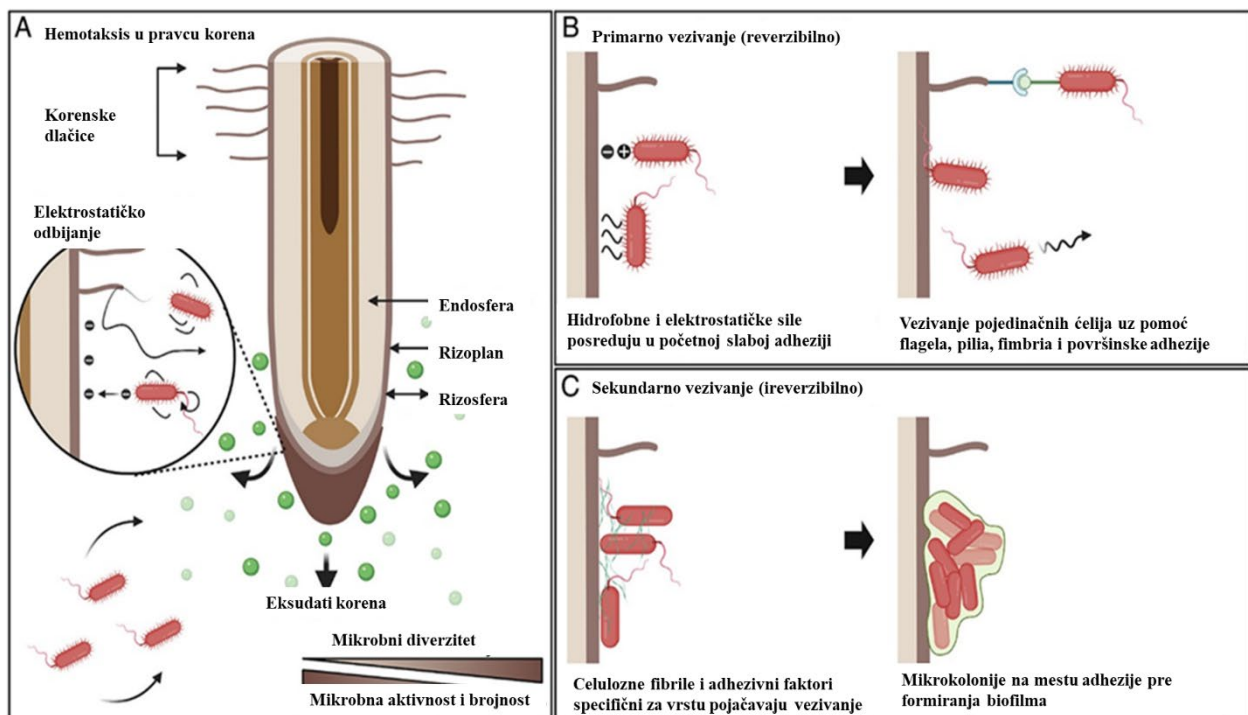
Na osnovu uticaja koji imaju na biljke, mikroorganizmi rizosfere mogu biti kategorisani kao korisni, komensalistički i patogeni. Prvu grupu čine PGPR koji učestvuju u procesima transformacije organske materije, ciklusima kruženja nutrijenata i pedogenezi (Liu et al., 2019), u drugoj grupi su mikroorganizmi čiji je uticaj na okruženje neutralnog karaktera, a patogeni imaju negativan uticaj na biljke. Za pokretanje interakcije između korena, zemljišta i mikroorganizma, ključna je rizodepozicija odnosno proces oslobađanja korenskog eksudata u rizosferu koji predstavlja izvor nutrijenata rizosfernim mikroorganizmima (Hassan et al., 2019). Sastav korenskog eksudata je kompleksan, jer ga čine jedinjenja male molekulske težine (prosti šećeri, amino kiseline, organske kiseline, biljni hormoni, vitamini, fenoli, joni i drugi sekundarni metaboliti) i jedinjenja velike molekulske težine (enzimi, proteini, polisaharidi, steroli, flavonoidi, nukleotidi). Pozitivna reakcija rizosfernih mikroorganizama na prisustvo odgovarajućeg korenskog eksudata podrazumeva uspešnu kolonizaciju korena i uspostavljanje interakcije sa biljkom. Na interakciju biljka-mikrob utiče afinitet jednog aktera prema drugom koji je genetski određen i može se ispoljiti kao simbiotska, asocijativna ili slobodna asocijacija (Yu and Hochholdinger, 2018). Opisivanjem i razumevanjem mikrobnih zajednica povezanih s biljkama može se omogućiti upravljanje rizosfernim mikrobiomom kako bi se poboljšalo zdravlje i produktivnost biljaka (Xun et al., 2021).

2.6.1. Kolonizacija korena

Kolonizacija korena je važna strategija PGPR, jer od sposobnosti da se nađu na površini korena (površinska kolonizacija) i/ili prodru u unutrašnjost tkiva (endofitna kolonizacija) zavisi krajnji efekat. Za površinsku kolonizaciju PGPR moraju biti "rizosferno kompetentni", a to podrazumeva sposobnost mikroorganizma da uspešno kolonizuju rizosferu i površinu korena (rizoplan) u toku dužeg vremenskog perioda, a prisustvo flagela, lipopolisaharida, produkcija siderofora, enzima, amonokiselina su uključeni u proces uspešne površinske kolonizacije, opstanka i formiranja dobrog mikro-okruženja (Lugtenberg et al., 2001; Whipps et al., 2001; Dow et al., 2003; Compant, 2010). Međutim, pored navedenih karakteristika rizobakterija, uspešnost kolonizacije zavisi od sastava biljnog eksudata, pre svega prisustva visoko i nisko molekularnih jedinjenja na koja direktno utiče genotip biljke, faza njenog razvoja, struktura korena kao i stres (Lugtenberg et al., 2001; Bertin et al., 2003; Haichar et al., 2008; Enebe and Babalola, 2018). Bakterije pokazuju afinitet prema eksudatima bogatim C6-jedinjenjima koja im služe kao izvor energije. Takođe, stepen kolonizacije direktno je proporcionalan koncentraciji eksudata (Gamalero et al., 2004). U rizosferi je izuzetno važna kompatibilnost koja mora da postoji između jedinjenja oslobođenih od strane biljke i sposobnosti PGPR-a da ih koriste kao nutrijente, jer neki biljni eksudati mogu imati negativan efekat na bakterijsku vrstu (Buyer and Russek-Cohen, 2002). Sastav biljnog eksudata je osnova hemijske signalizacije, poznate kao hemotaksis. Hemotaksis je baza biljno-mikrobnog partnerstva, jer omogućava međusobno prepoznavanje (Benizri et al., 2001). Osobine eksudata i hemotaksisa određuju vrstu mikroorganizma koja naseljava rizosferu i stepen kolonizacije korena. Na primeru pirinča vidi se uloga hemotaksisa: sekrecijom organskih kiselina od strane korena paradajza stimulirana je kolonizacija *Pseudomonas fluorescens* (Weert et al., 2002), a produkcija amino kiselina i ugljenih hidrata promovira kolonizaciju korena *Corynebacterium flavesens* i *Bacillus pumilis* (Jimenez et al., 2003). Ukoliko je prisutna kompatibilnost između biljnih eksudata i bakterije, bakterijska ćelija će ekspresijom gena neophodnih za kolonizaciju odgovoriti na signale iz eksudata, tj. okruženja najčešće kroz fenotipsku varijabilnost, superiornijim metaboličkim i biohemijskim osobinama u odnosu na druge sojeve koji ih ne ispoljavaju (Camacho, 2002; Haas and Defago, 2005; Kumar et al., 2007; Compant, 2010). Sposobnost rizobakterija da kolonizuju površinu korena zavisi od uslova: da opstanu, množe se i da su konkurentne ostaloj mikrobioti u vremenu neophodnom da pokažu svoje aktivnosti u toku vegetacionih promena (Bolwerk et al., 2003). Najvažniji faktor koji utiče na opstanak PGPR je kompeticija sa autohtonom florom za limitirane resurse sredine.

Prema Knights et al. (2021), bakterijska kolonizacija korena je proces koji se odvija u više koraka. Biljke luče fotosintetski fiksiran ugljenik u rizosferu formirajući hemijski gradijent koji

hemotaksički privlači pokretne bakterije iz zemljišta prema površini korena. Flagele ili pili pokreću bakterije i omogućavaju im da savladaju elektrostatičko odbijanje na površini korena. Primarno vezivanje rezultira slabim, reverzibilnim vezivanjem pojedinačnih ćelija za površinu korena (Slika 1.B). Ovo je u početku posredovano hidrofobnim i elektrostatičkim interakcijama, a zatim ojačano proteinskim dodacima i površinskom adhezijom specifičnom za vrstu. Sekundarno pričvršćivanje dovodi do snažnog ireverzibilnog vezivanja bakterija za površinu korena, promovirajući stvaranje mikrokolonija na početnom mestu vezivanja (Slika 1.C). Ovaj proces je posredovan proizvodnjom celuloznih vlakana i drugih faktora specifičnih za vrstu uključujući ekstracelularne polisaharide i proteine (Slika 1). Molekularni mehanizmi pričvršćivanja za koren najbolje su proučeni kod poljoprivredno važnih bakterijskih rodova: *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* i *Salmonella* (Wheatley and Poole, 2018). Ove proteobakterije imaju zajednički dvofazni mehanizam koji se sastoji od: primarnog vezivanja, gde su bakterije reverzibilno povezane na površinu korena, nakon čega sledi sekundarno vezivanje koje rezultira njihovom ireverzibilnom adhezijom. Uprkos prednostima vezivanja za koren, samo mali deo inokulisanih bakterija, koji obično predstavlja 0,4%-3,5% populacije, zapravo se veže za koren u kontrolisanim uslovima (Rodríguez-Navarro et al., 2007). Ovo je prvenstveno zbog elektrostatičkih sila koje se javljaju između negativno nabijenog bakterijskog ćelijskog zida i površine korena (Berne et al., 2015). Kako bi savladale ove sile odbijanja, bakterije koriste flagele i pile da se kreću prema površini korena (Slika 1). Sekundarno vezivanje uključuje snažno ireverzibilno vezivanje bakterija za površinu korena posredstvom ekstracelularnih celuloznih fibrila i sekundarnih faktora vezanja specifičnih za vrstu. Sekundarna vezanost kulminira formiranjem bakterijskih mikrokolonija na korenu (slika 1C). Adhezivni elementi specifični za vrstu kao što su egzopolisaharidi (EPS) i lipo-polisaharidi (LPS) igraju ulogu i u primarnom i u sekundarnom vezivanju različitih vrsta bakterija. EPS je glavna komponenta ćelijske površine koja se sastoji od polimera ugljenih hidrata, koji stimulišu ćelijsku agregaciju i ireverzibilno vezivanje za površinu korena formirajući mostove između bakterijskih ćelija. LPS imaju ključnu ulogu u uspostavljanju efikasnih asocijacija između različitih bakterija koje stimulišu rast biljaka i njihovih domaćina (Burdman et al., 2000).



Slika 1: Bakterijska kolonizacija korena biljaka (modifikovano od Knights et al., 2021).

Nakon kolonizacije površine korena, PGPR mogu da prodoru u unutrašnjost biljnog tkiva čime započinje unutrašnja (endofitna) kolonizacija. Koevolucija biljaka i mikroba dovela je do toga da neke od bakterija postanu fakultativni intracelularni endofiti (Bulgarelli et al., 2013). Epifitski i endofitski načini života omogućava mikroorganizmima da ostanu usidreni u okruženju koje je bogato nutrijentima i olakšaju razvoj korisnih biljno-mikrobnih interakcija, čime se pruža ključna prednost u odnosu na stil slobodnog života mikroorganizama (Knights et al., 2021).

Glavne ulazne tačke budućih endofita su oštećenja na korenu najčešće prouzrokovana nematodama ili patogenim mikroorganizmima, vrh korena i tačke grananja korena. Takođe, ulazne tačke mogu biti otvori stoma i klica (Hallman et al., 1997; Sorensen and Sessitsch, 2006). Od 1926. god. endofitna faza je prihvaćena kao posebna faza u životnom ciklusu bakterija (Peroti, 1926) i od tada se endofiti izoluju iz sterilnih biljnih tkiva (Henning and Villforth, 1940). Kod endofita produkcija litičkih enzima, koji razlažu ćelijski zid biljnih ćelija, pomaže kolonizaciju unutrašnjih tkiva, ali ono što ih razlikuje od patogena koji takođe proizvode litičke enzime je količina sekretovanog enzima, jer endofiti ove enzime proizvode u malim količinama u odnosu na patogene koji ih proizvode u velikim količinama štetnim po biljnu ćeliju (Elbeltagy et al., 2000; Reinhold-Hurek et al., 2011). Od sposobnosti dalje kolonizacije tkiva zavisi njihova klasifikacija:

- Prolazni endofiti su obično lokalizovani na korteksu. Oni sasvim slučajno postaju endofiti, na primer preko oštećenja prouzrokovanih od strane nematode,
- Oportuni endofiti kolonizuju rizoplan, jer imaju odgovor na hemotaksis, a odatle kroz oštećenja prodiru u unutrašnjost tkiva biljke na vrhu korena i bočno (na mestima grananja) (Chi et al., 2005),
- Kompetitivni endofiti koji su mnogo bolje adaptirani na okruženje biljke i pored karakteristika koje su svojstvene za oportune endofite, oni imaju sposobnost prodiranja u posebna biljna tkiva kao što je vaskularno, šireći se kroz biljku. Pozitivno utiču na metabolizam i balans i onda kada su velike brojnosti (Hardiom et al., 2008).

Endofiti prodru u biljno tkivo, gde provode deo ili ceo svoj životni ciklus, ali neki iskazuju i osobine PGPR. One kao povratnu reakciju na dobre uslove u procesu površinske i endofitne kolonizacije korena ispoljavaju, u većoj ili manjoj meri, svoj PGPR potencijal. Svojim prisustvom ne remete funkcionisanje i anatomiju biljnog tkiva, ali mogu da iniciraju radikalne promene u fiziološkim procesima koji direktno utiču na rast i razvoj biljke (Azevedo and Araújo, 2007). Ove promene su vrlo često i veće nego kada ista mikroflora deluje kao rizosferna (Azevedo and Araújo, 2007; Afzal et al., 2017). Endofitna kolonizacija biljnih tkiva moguća je samo od strane onih rizobakterija koje poseduju genetski potencijal koji im omogućuje ovakvu interakciju sa biljkom. Genomski i multi-omik pristupi su olakšali identifikaciju mnogih bakterijskih gena zajedničkih za filogenetski različite bakterijske taksone koji su uključeni u adaptaciju na korenske niše, kao što su one potrebne za kolonizaciju i interakcije bakterija-bakterije (Levy et al., 2018). Specifičnost interakcije zavisi pre svega od potreba same biljke, ali i bakterija za odgovarajućim nutrijentima (Hardiom et al., 2008). Kroz već pomenuti mehanizam hemotaksisa biva selektovana odgovarajuća bakterijska vrsta, a unutar vrste soj. To znači da je struktura endofitne zajednice pod uticajem biljnog genotipa, faze njenog razvoja, vrste biljnog tkiva i fiziološkog statusa.

Takođe, sa aspekta poljoprivredne proizvodnje primena agrotehničkih mera, kao abiotičkog faktora, značajno može uticati na strukturu endofitne zajednice (Hardiom et al., 2008). Endofitni mikrobi koji su vezani za seme, klicu i klijance su više kompatibilni biljci (Johnston-Monje and Raizada, 2011; Kandel et al., 2017; Nelson, 2018). Pored vertikalno prenetih endofita, novi endofiti se nagomilavaju u endosferi biljke za vreme biljnog rasta i kolonizuju različite delove donoseći neke nove i funkcionalne osobine fitobiomu, ili dorpinoseći gubitku osobina koje nisu od koristi biljkama u datom trenutku (Martiny and Jones, 2015; Kandel., 2017).

2.6.2. Sposobnost kolonizacije korena od strane predstavnika rodova *Azotobacter* i *Bacillus*

Pored hemotaksisa, sinteza pojedinih sekundarnih metabolita i konkurentnost u borbi za nutrijente od strane PGPR doprinose njihovoj boljoj kolonizaciji u rizosferi. *Bacillus* sp. i *Azotobacter* sp. su moćni kompetitori u rizosferi, jer su uključeni u cikluse svih esencijalnih nutrijenata, pre svega azota, fosfora i gvožđa. *Bacillus* sp. i *Azotobacter* sp. imaju izraženu enzimsku aktivnost koja ukazuje na veću adaptibilnost na uslove okruženja i sposobnost kolonizacije (Huang et al., 2022). Iako je brojnost *Azotobacter* sp. u zemljištu relativno niska ($< 10^4$ CFU/g zemljišta), prisutan je oko 30-80% ispitanih zemljišta na globalnom nivou, pri čemu njegova brojnost u rizosferi ne odstupa značajnije od one u zemljištima koja nisu pod uticajem biljnog korena (Kennedy et al., 2004; Aasfar et al., 2021). Karakteristično je da *Azotobacter* naseljava plodna zemljišta, jer ima velike nutritivne zahteve (Aasfar et al., 2021). Pored nutritivne kompeticije, sinteza baktericidnih komponenti koje utiču na konkurente omogućava dominantnost u rizosferi i lakšu kolonizaciju. *Azotobacter* sintezom antibakterijskih (anizomicin) i antifugalnih jedinjenja i *Bacillus* sp. sintezom različitih antimikrobnih peptida, enzima, proteina ili VOC-a deluju antagonistički, što ih čini odličnim kompetitorima u kolonizaciji (Mardanova et al., 2017; Sumbul et al., 2020).

Odlike mikrobnih ćelija kao što je prisustvo flagela, sinteza EPS i enzima mogu značajno uticati na proces kolonizacije. Flagele omogućavaju pokretljivost i kontakt sa korenskim eksudatima, mucigelom i time omogućuju lakšu kolonizaciju (Turnbul et al., 2001), dok sinteza EPS olakšava adheziju bakterije za površinu korena pri čemu se formiraju ćelijski agregati i biofilmovi (Balsanelli et al., 2014). Formiranje biofilma je ključno za uspešnu kolonizaciju korena i uobičajena je strategija koju koriste mnoge bakterije u zemljištu. Biofilmovi pružaju fizičku barijeru protiv štetnih spoljašnjih faktora kao što je difuzija antimikrobnih jedinjenja iz biljke domaćina ili drugih članova mikrobioma (Knights et al., 2021). Kolonizaciji *Azotobacter* može da doprinese njegova pokretljivost u ranoj fazi rasta i prisustvo flagela u slučaju nekih sojeva. Iako bi jedan od faktora kolonizacije bio i niži parcijalni pritisak kiseonika u biljnom tkivu, dosadašnja ispitivanja ovo ne potvrđuju u dovoljnoj meri (Rana et al., 2020). *Bacillus* sp. koristi dva mehanizma za proces kolonizacije: hemotaksis i formiranje biofilma, jer je potvrđeno da nakon hemotaksisa proces kolonizacije započinje formiranjem biofilma na korenu (Weng et al., 2013; Yuan et al., 2015). Potvrđeno je da su vrste roda *Bacillus* kao endofiti prisutni kod šećerne trske (Rosha et al., 2021). Takođe, *Bacillus* sp. izolovan je kao endofit iz starih i savremenih sorti kukuruza (Johnson-Monje and Raizada, 2011). Njegovo prisustvo je potvrđeno u smenu kukuruza što je indikacija da se vertikalno prenosi i da to može biti od značaja za opstanak biljke domaćina (Gond et al., 2015). Rod *Bacillus*, zajedno sa rodovima *Methylobacterium*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter* i *Pseudomonas* jedan je od najzastupljenijih biljnih endofita (Praca et al., 2012).

2.7. Germinacija kao ključna faza u životnom ciklusu biljke

U biljnoj proizvodnji jedan od najvećih problema koji utiče na gubitak prinosa je nedostatak sinhronizovanog rasta i razvoja useva kao posledica delovanja nepovoljnih vremenskih uslova i promena u mikroklimatu zemljišta (Mwale et al., 2003). Zato je za uspešnu biljnu proizvodnju glavni cilj obezbediti brzu i uniformnu germinaciju, jer je odlučujuća za preživljavanje klijanaca i vegetativan rast, samim tim i prinos (Guo et al., 2018). Germinacija je ključan proces, jer embrion semena iz stanja mirovanja (dormancija) prelazi u aktivno stanje i predstavlja niz sinhronizovanih fizioloških i morfogogenetskih procesa. To je moment kada se biljka uključuje u prirodni ili agro-ekosistem. Fiziologija semena, a posebno uticaj brzine germinacije na dalje faze rasta su još u periodu formiranja poljoprivrede 10 000 godine p.n.e. bili centar ljudskog interesovanja (Filho, 2015). Definisane germinacije, mehanizam koji je uključen, fiziološke i biohemijske promene bile su tema brojnih naučnih istraživanja. Već 1876. godine Nobbe uvodi testove germinacije; 1911. godine Hiltner i Ihssena uvode termine koji opisuju dobar izgled klijanaca i označavaju semena koja

daju klijance sa dužim korenom; Alberts 1927. godine posmatra efekte hladnog testa germinacije na razvoj klijanaca kukuruza. Testom se simuliraju hladni uslovi koji vladaju u polju, meri se sposobnost semena (najčešće kukuruza i soje) da klija i prati rast klijanaca u uslovima hladnoće i povećane vlage (Tatum and Zuber, 1943). ISTA (*International Seed Testing Association*) je osnovana 1924. godine sa ciljem da razvija i standardizuje procedure koje se koriste u oblasti testiranja semena. Prvi posleratni kongres u organizaciji ISTA održan je 1950. godine u Vašingtonu gde je pažnja bila fokusirana na kvalitet semena, a 1985. godine daje definiciju germinacije opisujući je kao „pojavu kojom se determiniše razvoj klijanaca iz embriona semena“. Takođe, u kasnijem periodu, ISTA je definisala pojam normalnih klijanaca, uslove i period germinacije za veliki broj semena različitih biljnih kultura. Poslednjih 30 godina broj publikacija koje su vezane za seme povećava se na godišnjem nivou za 9,1% i najveći deo se odnosi na germinaciju kao najvažniju karakteristiku (Liu et al., 2022a).

Proces germinacije je vrlo kompleksan i osetljiv, jer je fiziologija semena u toku germinacije pod uticajem velikog broja abiotičkih i biotičkih faktora uz istovremeno prisustvo povećane osetljivosti na bolesti (Chachalis and Readdy, 2000; Rajjou et al., 2012). Smatra se da je germinacija najosetljivija faza u razvoju useva. Kada govorimo o abiotičkim faktorima životne sredine, za germinaciju su najvažniji temperatura, voda, dostupnost kiseonika, svetlost (Loubser and de Venter, 1990), ali bez uticaja nije ni supstrat, starost semena, uslovi skladištenja i inhibitorne supstance (Martinovka et al., 2006; Zheng et al., 2005; Kordali et al., 2007; Evenari, 1949). U toku germinacije unutar semena, u njegovom embrionu, dešavaju se metaboličke promene kroz tri faze. Uspešan prolazak semena kroz sve faze ujednačene, rapidne germinacije i pojava normalnih klijanaca sa dobro razvijenim esencijalnim strukturama su ključ uspešne biljne proizvodnje (Khan et al., 2012).

Imbibicija vode (*imbibitio*, lat. usvajanje, upijanje, vlaženje) predstavlja difuziju vode iz okruženja u seme. Uslovljena je niskim vodnim potencijalom semena u odnosu na spoljnu sredinu. Usvajanjem vode započinje prva faza germinacije. Apsorbovana voda ne prelazi 2-3 puta vrednost suve mase semena, što znači da je ta količina prilično mala, ali ključna za uspeh germinacije (Bewley and Black, 1994). Rezultat uspešne imbibicije je značajno povećanje volumena semena. Pritisak koji daje apsorbovana voda omogućuje pucanje semenskog omotača (perikarp) koji zbog svoje rigidne prirode i nepermeabilnosti u odnosu na vodu i gasove može inhibitorno uticati na početak germinacije (Godwin et al., 2017). Nakon što seme apsorbuje vodu, u prvih 30 minuta dolazi do ograničenog oslobađanja šećera, aminokiselina, proteina i organskih kiselina u okolinu koji stimulišu mikroorganizme što je od posebnog značaja za zemljišne uslove (Bewley and Black 1994). U toku germinacije potreba za energijom je velika i zbog toga je respiracija pojačana što znači da i potrebe za kiseonikom variraju u zavisnosti od faze germinacije (Bewley and Black, 1994; Toole et al., 1956). Nakon imbibicije sledi aktiviranje hidrolitičkih enzima čijom se aktivnošću pojačava mobilizacija rezervnih materija i povećava dostupnost visokoenergetskih, vitalnih biomolekula za potrebe klijanaca i rast bez fotosinteze (Basra et al., 2005). U toku imbibicije odvijaju se glikoliza, pentoza-fosfatni put i ciklus limunske kiseline. Rezultat je oslobađanje različitih produkata od kojih su adenzin-trifosfat (ATP) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) od ključnog značaja kao visoki energetski potencijali semena. Ova energija je potrebna za sintezu proteina koja otpočinje u semenu. Ključni moment pre-germinativnog metabolizma je reparacija oštećene DNK zahvaljujući DNK-ligazama (Paparella et al., 2015).

Druga faza je poznata kao aktivaciona faza i ovde se uspostavlja ravnoteža potencijala vode unutar semena i okruženja. U ovoj fazi dešavaju se veliki metabolički događaji, poput sinteze novih proteina. Jednostavna jedinjenja dobijena u prvoj fazi se translociraju u pupoljčić, dešava se sinteza novih mitohondrija, proteina, kao i pokretanje stres-mehanizma produkcijom specifičnih proteina (proteina toplotnog šoka i kasne embriogeneze) (Catusse et al., 2011; Delseny et al., 2016; Wakasa et al., 2013). Po drugi put se dešava rapidna apsorpcija vode koja uslovljava vidljivu germinaciju i uzrok je popuštanja turgora ćelijskog zida klice i slabljenja tkiva koje okružuje njen vrh. Pretpostavka je da se ćelije koje su apsorbivale vodu šire i produkuju protone (vodonikove jone)

(Belwey and Black, 1994). Dolazi do acidifikacije i kidanja vodoničnih veza između ugljenih hidrata ćelijskog zida. Rezultat je smanjenje njegove rigidnosti uz istovremeno povećanje elastičnosti što omogućuje ekstenziju ćelija klice. Ovo je važan događaj, jer se smatra da deoba ćelija nije neophodna za ekspanziju klice u početnim fazama, koliko elongacija. Nakon 10-12 h od početka germinacije pojava klice je prvi vidljivi rezultat (Toole et al., 1956) i predstavlja treću fazu. Uspešnost germinacije ocenjuje se analizom većeg broja parametara (Kader and Jutzi, 2002). Najvažniji parametri klijavosti su procenat germinacije (FGP), germinacijski indeks (GI), prosečno vreme germinacije (MGT), vigor I (VI) i II (VII).

2.7.1. Tretman semena: metode za poboljšanje klijavosti

Tehnologija definisana kao prajming je jednostavan način da se poboljša klijavost i rast useva za duži vremenski period (Dutta, 2018). McDonald je 2000. godine definisao prajming kao potapanje semena u bilo koji rastvor koji sadrži određene agense, čime se pokreću pregerminativni procesi, a zatim naglim sušenjem zaustavljaju, pre izbivanja klice. Hidratacija koja se postiže prajmingom je ispod one koja je neophodna za pojavu klice, ali je dovoljna za pregerminativne metaboličke procese. Nakon hidratacije, sušenjem nivo vlage svodi se na početni što omogućava skladištenje semena, a kasnije setvu (Jimenez-Arias et al., 2017). Istorija prajminga započinje pre više od 2000 godina. Grk Theophrastus (371-287 p.n.e.) prvi je uočio da se brzina germinacije povećava potapanjem semena krastavca (*Cucumber sativus* L.) u vodu pre setve (Dutta, 2018). Paparella et al. (2015) navode da je Plinius Secundus (A.D. 23-79) u cilju poboljšanja germinacije, potapao seme krastavca u rastvor vode i meda; Francuski naučnik Oliver de Serres (XVI vek) je semena tri različite vrste pšenice potapao u ekstrakt stajnjaka u trajanju od dva dana i sušio pre setve; Čarls Darwin potapanjem semena salate u morsku vodu poboljšao germinaciju, a moderan koncept tehnologiji prajminga dao je Ells 1963. godine uvodeći sušenje posle imbibicije semena. Austin et al. (1969) su uočili značaj prajminga u uslovima stresa. U novijoj istoriji tema brojnih istraživanja su fiziološke, biohemijske i molekularne promene koje su javljaju u toku prajminga. Potvrđeno je da prajming utiče na poboljšanje apsorpcije nutrijenata i vode, povećava sposobnost semena da klija u većem temperaturnom opsegu, prekida dormanciju prouzrokovanu svetlosnim i temperaturnim faktorima, povećava produktivnost i doprinosi sinhronizaciji u zrenju odraslih biljaka (Dutta, 2018). Prajming se može posmatrati kao pozitivan stres, blagog do srednje umerenog intenziteta (Rakshit and Singh, 2018). Bez njega bi spremnost biljke za brzi i adekvatni odgovor u novonastalim, nepovoljnim uslovima izostala, jer veliki broj biljaka ima sposobnost da nakon prvog izlaganja stresu ("stres-memorija") aktiviraju svoje odbrambene mehanizme moduliranjem biohemijskih, epigenetskih, fizioloških procesa i da kasnije postižu bolju germinaciju i prinos u neadekvatnim uslovima (Lutts et al., 2016; Liu et al., 2022b). Prajming će uticati na produkciju biljnih hormona (jasmonska kiselina, absicinska kiselina, salicilna kiselina i etilen) koji će nakon germinacije u kasnijim fazama uticati na modifikaciju korenske arhitekture, fotosintetskih pigmenta, povećanje sadržaja prolina i smanjenje stomatalne provodljivosti (Xu and Watahiki, 2019; Wahab et al., 2022). Prisustvo negativnih uticaja abiotičkih faktora može ugroziti sve faze rasta i razvoja biljke, a posebno germinaciju. Abiotički stres može biti posledica suše, povećanog saliniteta, niske temperature, teških metala i nanočestica (El-Saadony et al., 2022). Oko 37% poljoprivrednog zemljišta u svetu je pod uticajem navedenih faktora koji direktno utiču da se na 29-34% površina koje su pod usevima ne postiže povećanje u prinosu (Jisha et al., 2013). U nekim agrosistemima dolazi do njegovog potpunog izostanka (Ray et al., 2013). Abiotički faktori na biljku deluju kao oksidativni stres čiji je krajnji negativan rezultat akumulacija slobodnih radikala (*Reactive Oxygen Species*, ROS) koji degradiraju ćelijske membrane biljnih tkiva, njihove proteine, lipide i DNK (Sharma et al., 2012). Ukoliko zataje reparativni mehanizmi biljke, oštećena DNK i akumulacija ROS-a vode ćelijskoj smrti (Ventura et al., 2012). U slučaju negativnog delovanja biotičkih faktora prajmingom se pokreće dugoročni signalni put kroz vaskularno biljno tkivo, od lokalnog do sistemskog odbrambenog mehanizma. Oslobođaju se biološki aktivatori odbrambenog sistema biljke i obezbeđuje se rezistencija na patogene i najčešće su to promene u enzimskoj

aktivnosti (Pieterse et al., 2009; Fuerst et al., 2018; Thakker et al., 2012). Uspeh prajminga zavisi od vrste biljke - genotipa, fiziologije, morfologije semena i primenjenog tretmana (Paparella et al., 2015; Vidak et al., 2022).

U odnosu na prajming agens koji se koristi razlikuju se sledeći tretmani: hidroprajming, osmoprajming, hemoprajming, termoprajming, hormonalni prajming, prajming fizičkim agensima i bioprajming (Devika et al., 2021; Wang et al., 2022). Osmoprajming podrazumeva potapanje semena u tečnostima sa niskim vodnim potencijalom, dok hidroprajming predstavlja jednostavno potapanje semena u destilovanu vodu na sobnoj temperaturi 5-10 °C (Paparella et al., 2015). Iako se hidroprajming smatra niskorizičnom i ekonomičnom tehnikom, kod nje je vrlo teško kontrolisati proces hidratacije, jer zavisi isključivo od potencijla semena da apsorbuje vodu (Jisha et al., 2013). Nedostatak tretmana se ogleda u neujednačenoj hidrataciji semena što utiče na uniformnost i sinhronizaciju klijavosti. Takođe, vrlo je teško odrediti momenat prestanka hidratacije pre nego što germinacija uđe u treću fazu (McDonald, 2000). Kod hidroprajminga semena nakon završenog tretmana moraju biti dobro osušena do postizanja originalne težine, jer je nedovoljno sušenje štetno (Thomas et al., 2000; Jisha et al., 2013). Hemijska jedinjenja koja se koriste za formiranje rastvora u osmoprajmingu su najčešće $MgSO_4$, KCl , KNO_3 , manitol, $NaCl$ i $CaCl_2$ (Jisha et al., 2013). Osmoprajming čuva integritet ćelijskih membrana i doprinosi prolongiranoj i kontrolisanoj hidrataciji semena (Jett et al., 1996), ali ukoliko primenjeni agens ne odgovara permeabilnosti membrane semena, joni iz prajming rastvora lako ulaze u seme, remete njegovu osmotsku ravnotežu, akumuliraju se i imaju citotoksičan efekat (Paparella et al., 2015). Neka sintetička ili prirodna jedinjenja kao što su holin, etanol, putrescin, KH_2PO_4 , $ZnSO_4$, $CuSO_4$ primenjuju se u hemoprajmingu. Potvrđeno je da prajming sa sintetizovanim hormonima (apcisinska kiselina, auksin, giberolini, citokinini) i drugim promoterima rasta poboljšava germinaciju. Hormoni su medijatori u odgovoru biljke na abiotičke faktore kao što su niske temperature, suša i povećan salinitet. Utiču na ekspresiju gena koji doprinose povećanju tolerancije na stresno okruženje (Jisha et al., 2013). Postoje podaci da su semena slačice i uljane repice primenom ABA kao prajming agensa pokazala veću stopu germinacije u odnosu na netretirana semenena i u uslovima niskih temperatura, suše i stresa soli (Gao et al., 2002). Primena prajming tretmana kod kojih ne postoji hidratacija podrazumeva primenu fizičkih agenasa (magnetno polje, ultrazvuk, x-zraci). Izbor ovih tretmana u prajmingu je u većoj meri ekološki opravdan u odnosu na one koji uključuju hemijske agense čija je primena u suprotnosti sa konceptom održivosti (Araujo et al., 2016; Dutta, 2018)). Poznato je da u velikim dozama fizički faktori okruženja imaju genotoksičan efekat, ali je interesantno da u nižim dozama pokazuju stimulativan efekat na biljke (De Micco et al., 2014). U fizičke tretmane spada i termoprajming, koji podrazumeva tretiranje semena na različitim temperaturama, a cilj tretmana je poboljšanje germinacije u uslovima temperaturnog stresa (Paparella et al., 2015; Huang et al., 2002). Niske temperature daju bolje rezultate, dok je primena visokih temperatura ograničena za biljne vrste toplog klimata (Paparella et al., 2015).

Iako svi navedeni tretmani ispunjavaju zadatak da stimulatивно deluju na germinaciju i rane faze rasta, imaju nedostatke. Uglavnom, pored ekološkog aspekta, tehnički mogu biti zahtevni i ekonomski nerentabilni. Takođe, Deshmukh et al. (2020) navode da mogu da se primene samo za eliminisanje negativnih efekata abiotičkog stresa, dok u uslovima delovanja biotičkog stresa nemaju ulogu. U okviru prajminga tehnika, bioprajming sve više dobija na značaju, jer je jedini koji je u potpunosti ekološki opravdan, niskorizičan, jeftin i lako primenljiv. U funkciji bioloških agenasa su PGPR koji se mikrobiološkom inokulacijom uvode u životni ciklus biljke.

Magnetno polje kao abiotički faktor je deo prirodnog sistema koji aktivno deluje na celokupan živi svet. Biološki sistemi ga različitim mehanizmima percipiraju, a proizvod ove interakcije je pokretanje biohemijskih i fizioloških promena koje stoje u osnovi različitih pojava.

Iako vrlo male jačine (0.05 mT), uticaj Zemljinog magnetnog polja na živi svet je ogroman. Efekti zavise od genotipa, fiziološkog stanja biološkog sistema (Hernandez-Aquilar et al., 2009; Zhang et al., 2017a; Gutzeit, 2001) i klimatskih uslova (Courtilot et al., 2007). Činjenica da se različite vrste magnetnog polja već koriste u brojne svrhe u različitim oblastima pokrenula je ideju njegove primene u sferi održive biljne proizvodnje. Kao fizički predtretman semena ispitivan je u

cilju povećana prinosa bez štetnih efekata na životnu sredinu (Vasilevski, 2003). Magnetno polje utiče na metaboličku aktivnost i rast različitih biljaka u zavisnosti od tipa magneta, njegovog inteziteta, polarnosti, orijentacije i vremena izlaganja (Pittman, 1977). Značajan deo ispitivanja u ovoj oblasti odnosi se na primenu statičkog magnetnog polja (SMP), čija jačina se ne menja u toku vremena. Na osnovu jačine, SMP može biti slabo (do 1mT), srednje (1mT-1T), jako (1-20T) i ultra-jako (preko 20T), a od jačine polja, vremena izloženosti, biljne vrste drugih faktora okruženja zavise efekti na biljni rast (Zhang et al., 2017b). To su ključni razlozi zbog kojih su podaci o uticaju magnetnog polja često kontradiktorni. Međutim, i pored toga, primenu SMP-a i drugih oblika magnetnog delovanja u održivoj biljnoj proizvodnji pravdaju brojni rezultati naučnih ispitivanja koji su potvrdili pozitivne efekte na germinaciju (Bhardwaj et al., 2012), razvoj biljaka u ranim fazama (Kataria et al., 2017; Souza et al., 2014) i konačni prinos (Souza et al., 2006; Vashisth et al., 2013). Jačina SMP koja se primenjuje u tretiranju semena - primingu kreće se od 2,5-250 mT. Dejstvom SMP povećava se permeabilnost ćelijskih zidova semenskog omotača omogućujući veću apsorpciju vode i energetskih molekula (Reina et al., 2001) čime se podiže enegetski nivo ćelija (Aladjajiyana, 2002) i kao posledicu imamo bogatiju metaboličku aktivnost (Iqbal et al., 2012a, 2012b). Nakon izlaganja semena pšenice SMP-u, primećeno je povećanje aktivnosti α -amilaze i to 50-100% u odnosu na kontrolu (Katsenios et al., 2016). Izrazita aktivnost α -amilaze u toku germinacije u njenim početnim fazama utiče na mobilizaciju ugljenih hidrata i njihovu razgradnju do monosaharida koji će biti iskorišćeni za razvoj klijanaca (Kataria et al., 2017). Povećana asimilacija vode i povećanje aktivnosti α -amilaza, dehidrogenaza i proteaza, razlog su poboljšanja germinacijskih parametara (Shine et al., 2011; Shine and Gurupasad, 2012). Pored hirolitičkih enzima, pojačana aktivnost peroksidaza, katalaza, super-oksidi dismutaza, glutation-reduktaza, glutation-transferaza (Maffei, 2014) vodi produkciji ROS-a. Povećanje produkcije ovih enzima je odgovor biljke na stres, koji u ovom slučaju proizvodi magnetno polje. Slobodni radikali produkovani u fazi germinacije imaju ulogu signalnih molekula i podstiču na mobilizaciju rezervne materije, slabljenje endosperma, povećanje koncentracije jona Ca^{2+} , hormonalnu signalizaciju, ekspresiju gena i elongaciju ćelija (El-Maarouf-Bouteau and Bailly, 2008), rapidan rast osovinskog korena (Verma and Sharma, 2010) i zaštitu semena od patogena (Radhakrishnan, 2019). Kao nosioci slobodnih elektrona, ROS imaju paramagnetne osobine (endogeni magneti) i mogu biti pogođeni delovanjem eksternog SMP koje utiče značajno na promenu u kretanju slobodnih elektrona ROS-a što uslovljava pojačanu reaktivnost zbog čega ROS lako stupaju u reakcije sa drugim biološkim molekulima kao što su lipidi, peptidi i DNK (Goodman and Black, 2002; Juan et al., 2021). Pored germinacije i kasnije etape razvoja biljke su unapređene, jer se kroz stimulaciju metaboličke aktivnosti od strane SMP-a obezbeđuju asimilativi neophodni za sve faze rasta i razvoja, a time i veći sadržaj suve materije i njena dobra preraspodela unutar biljnih organa (Souza et al., 2006).

2.8. Mikrobiološki tretman semena

Kvalitet semena je važan aspekt savremenih agronomskih strategija, jer ujednačena klijavost i visoka snaga klijanaca doprinose svim parametrima prinosa biljaka. Da bi se poboljšala klijavost semena mogu se koristiti korisni mikrobi koji pripadaju arbuskularnim mikoriznim gljivama, *Trichoderma* spp. i rizobakterijama (Cardarelli et al., 2022). Ovi mikroorganizmi mogu povećati klijavost semena i performanse biljaka kao i toleranciju na biotički (patogeni i štetočine) i abiotički stres (so, suša i teški metali) uz smanjenu upotrebu agrohemijskih inputa (Paravar et al., 2023).

Tretman semena PGPR je efikasan način uvođenja PGPR u rizosferu, gde zahvaljujući kompetivnosti uspešno kolonizuju koren.

Postoji nekoliko načina kojima se mikroorganizmi vezuju za seme:

- oblaganje semena filmom (u tečni inokulum se dodaju aditivi kao što su celulaza, parafinsko ulje, polisheridi koji poboljšavaju adheziju),

- nanošenje inkapsuliranih PGPR (mikroorganizmi se inkapsuliraju uz pomoć alginata, skrobnog sirupa, skroba ili agaroze što omogućava zaštitu inokuluma, postepeno i produženo oslobađanje),
- oblaganje tresetom (koristi se najviše kod semena leguminoza, gde se na seme obloženo rizobijumom nanosi vlažan treset),
- biopriming (hidratacija semena sa suspenzijom bioprajming agensa).

Bioprajming je tehnologija koja se najčešće primenjuje. U bioprajming tehnologiji ulogu prajming agensa imaju bioaktivni molekuli (fitohormoni) ili PGPR (Hamayun et al., 2010; Paparella et al., 2015). Najzastupljenija, lako primenljiva, praktična, ekonomična, ekološki opravdana metoda bioprajminga je mikrobiološka inokulacija i predstavlja kombinaciju dva elementa: imbibiciju, tj. hidrataciju semena (fiziološki aspekt) i inokulaciju PGPR-om (biološki aspekt) (Reedy, 2013). Bioprajmingom, tj. metodom mikrobiološke inokulacije, seme se potapa u bakterijsku suspenziju za određeni vremenski period, pri čemu mikroorganizmi različitim stimulusima, direktnim i indirektnim mehanizama pokreću fiziološke, biohemijske, transkripcione i epigenetske promene u semenu promovšući germinaciju i rast klijanaca (Liu et al., 2022c). Sa druge strane, oslobođeni eksudati iz semena obezbeđuju nutrijente i energiju za mikroorganizme (Wright et al., 2003). Oslobođena organska materija semena u toku germinacije, a u kasnijim fazama i korena, ključna je za uspostavljanje veze između mikroorganizma i biljke (Whipps, 1990). Naime u toku procesa klijanja, seme oslobađa ugljene hidrate i aminokiselinske eksudate. Zauzvrat, mikroorganizmi koriste oslobođene eksudate semena kao nutritivni izvor u zemljištu, a zatim kolonizuju koren biljaka. Bioprajmingom se kreiraju idealni uslovi za adheziju PGPR na površinu semena-površinsku kolonizaciju i proliferaciju u njegovu unutrašnjost-endofitnu kolonizaciju (Mahmood and Kataoka, 2018). Brojnost PGPR za vreme bioprajminga se uvećava od 10 do 10.000 puta u odnosu na vrednost početnog inokuluma (Callan et al., 1990).

Mikrobiološki tretman semena doprinosi ranom uspostavljanju interakcije biljaka i mikroorganizama, što dovodi do biostimulativnih efekata kao što su poboljšanje rasta biljaka, povećan unos nutrijenata i povećana otpornost biljaka na abiotički stres (Cardarelli et al., 2022). U tabeli 2. predstavljeni su efekti bioprajminga sa različitim PGPR na neke biljne vrste, kao i literaturni izvori predstavljenih rezultata.

Tabela 2: Efekti primene PGPR u mikrobiološkom tretmanu semena

PGPR	Biljna vrsta	Efekat	Literaturni izvor
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Zea mays</i>	povećan FGP, sveža i suva masa klijanaca, dužina primarnog korena, aktivnost katalaza, peroksidaza, sadržaj prolina i hlorofila	Li et al., 2021.
<i>Bacillus polymixa</i>	<i>Dracocephalum kotschy</i>	poboljšana germinacija, rast klijanaca, sadržaj hloroplasta i esencijalnih ulja	Bidabadi and Mehralian, 2019.
<i>Enterobacter hormaechei</i> sp.	<i>Abelmoschus esculentus</i>	povećan vigor index, P i K apsorpcija, konfiguracija korena, povećana lisna površina i hlorofil indeks	Roslan et al., 2020.
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	povećana visina, sadržaj hlorofila, dužina korena	Meena et al., 2016.
<i>Rhizobia, Trichoderma viride</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	poboljšana germinacija, visina biljke, broj mahuna po biljci, broj zrna po mahuni, suva masa,	Negi et al., 2019.

		antifugalna aktivnost prema <i>Rhizoctonia</i>	
<i>Azospirillum</i>	<i>Trichosanthes cucumerina</i>	povećan FGP, MGT, vigor i suva masa kljanaca	Gowthamy et al., 2017.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MF-30	<i>Zea mays</i>	povećan sadržaj rastvorljivih šećera, proteina, prolina povećana aktivnost antioksidant enzima i biomase korena i stabla, anatagonizam prema <i>Rhizoctonia solani</i>	Singh et al., 2020b.
<i>Azospirillum</i> sp.	<i>Lactuca sativa</i>	povećana biomase, sadržaj hlorofila, limunske kiseline, kvaliteta i produženje vremena skladišteanja	Fasciglione et al., 2015.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BHU B13-398, <i>Bacillus subtilis</i> BHUM	<i>Vigna radiata</i>	povećana dužina, sveža i suva mase korena i nadzemnog dela, sadržaja hlorofila i lisne mase, antagonizam prema <i>Rhizoctomia solani</i>	Kumari et al., 2018.
<i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Azospirillum berasilense</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	<i>Triticum aestivum</i>	u uslovima stresa soli povećana aktivnost antioksidans enzima, povećan FGP i suva masa kljanaca	Mozafari and Fathollahy, 2020.

Mikrobiološki tretman semena postaje sve popularniji u celom svetu. Od 191 rada objavljena između 1960. i 2019. godine na temu primene mikroorganizama u bioprajangingu, oko 41% je publikovano u poslednjih devet godina (Rocha et al., 2019a). Ovo je u skladu sa rastućom potražnjom globalnog tržišta za biološkim tretmanom semena (Markets and Markets, 2018).

2.8.1. Uticaj mikrobiološkog tretmana semena na klijanje i rane faze biljnog rasta

Sve faze germinacije su pod uticajem fitohormona, a mikrobiološka inokulacija služi kao okidač za njihovo rapidno pokretanje (Han and Yang, 2015). Zahvaljujući sintezi mikrobnih fitohormona, modulira se koncentracija biljnih hormona i na taj način uspešno podstiče klijavost. Dormancija semena, za koju je odgovorna ABA, sprečava njegovu germinaciju u periodu kada su uslovi okruženja nepovoljni za razvoj kljanaca. Da bi seme ušlo u germinaciju mora nakon imbibicije da neutrališe inhibitorni uticaj hormona ABA, odnosno dormancija se mora prekinuti. Od strane biljke, tj. semena, to se postiže aktiviranjem specifičnog katabolizma, smanjenjem osetljivosti i sintezom fitohormona (giberelini, etilen, brasinosteroidi, salicilna kiselina, citokinini, auksini, jasmonska kiselina/oksilipini) (Skubacz and Golec, 2017; Dave et al., 2016). Ove klase hormona sintetišu i mikroorganizmi i u cilju kontrole germinacije svi zajedno čine jedinstvenu signalnu mrežu, reagujući jedni sa drugim.

Giberelin (GA) je uključen u kompletan razvojni proces biljke, ali sa aspekta germinacije GA ispoljavaju dve značajne aktivnosti (Derek and Black, 1994):

- učestvuju u hidrolizi rezervnih materija, jer stimulišu enzimsku produkciju, posebno amilaza i kontrolišu degradaciju endosperma,
- direktno utiču na razvoj klice stimulacijom deobe i elongacije ćelija.

Potvrđeno je da nedostatak GA apsolutno sprečava germinaciju kod semena *Arabidopsis thaliana* i paradajza (Karssen et al., 1989). GA je u tesnoj korelaciji sa etilenom i utiče na njegovu biosintezu zajedno stimulišući germinaciju (Corbineau et al., 2014). Etilen stimuliše više radijalni rast, dok giberelini elongaciju embriona (Dugardeyn et al., 2008). Sinteza GA može biti značajno stimulisana prisustvom auksina i u kombinaciji sa njim dovodi do brze germinacije (Gholami et al., 2009). Prema Kang et al., (2014b) sinteza GA je potvrđena kod *Rhizobium* spp., *Acetobacter*

diazotrophicus i *Bacillus* spp. Etilen je gasoviti fitohormon, jednostavne hemijske strukture. Uključen je u fiziološke i razvojne procese germinacije semena u koncentracijama koje se prema nekim ispitivanjima kreću 0,1-200 µl/l, što zavisi od dubine dormancije i uslova okruženja (Corbineau et al., 2014). U toku germinacije etilen utiče na pokretanje proteina ćelijskog zida i slobodnih radikala koji vode slabljenju endosperma (Huarte et al., 2020). Da je hormonalna regulacija kompleksna i da se hormoni međusobno uslovljavaju potvrđuje činjenica da je auksin (IAA) od primarnog značaja za regulaciju etilena. Mehanizam je opisao Glick et al. (1998): PGPR sintetišu IAA iz triptofana prisutnom u korenskom eksudatu biljke. Sintetizovan mikrobn fitohormon se resorbuje od strane biljke i zajedno sa endogenim IAA stimuliše proliferaciju i/ili elongaciju ćelija, ali i aktivnost enzima ACC sintetaze, prekursora etilena. Jedan deo sintetizovane ACC biva ekskretovan i iskorišćen od strane PGPR koji proizvode ACC deaminaze. Kao posledica toga dolazi do smanjenja nivoa ACC u biljci i manje mogućnosti sinteze etilena. Zajedno, etilen i IAA kroz stimulaciju germinacije i deobe ćelija, stimulišu rast embriona (Glick et al., 2007). Park et al. (2021) navode su PGPR kod kojih je potvrđena izuzetna sinteza auksina vrste iz rodova *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Enterobacter* i *Pseudomonas*, dok Sapre et al. (2019) navode rodove kod koji je potvrđena sinteza ACC deaminaza: *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Agrobacterium* i *Burkholderia*.

Bioprajinomom semena se pored stimulacije procesa germinacije sprečava razvoj patogena u semenu (Taylor and Harman, 1990). Ovo je izuzetno važna funkcija bioprajinomom, jer je seme posebno interesantno ne samo kao prenosilac korisnih, već i štetnih mikroorganizama (Supari et al., 2014). Zadržavanje patogena u toku procesa germinacije dovodi do povećanja njihove brojnosti, mogućih štetnih efekata na proces klijanja kao i ugrožavanje opstanka korisnih mikroorganizama (Bailly et al., 2020; Barret et al., 2016). Mahmood et al. (2016) navode da primenom mikrobiološke inokulacije semena moguće je u okviru PGPR izaberati one sojeve koje odlikuje veća sposobnost azotofiksacije, produkcije siderofora, litičkih enzima, antibiotika aminokiselina, vitamina, polisaharida i drugih metabolita. Ova svojstva stimulatora biljnog rasta omogućavaju im da postaju dominantni po brojnosti i metaboličkoj aktivnosti i na taj način mikrobiološkom inokulacijom semena moguće je modulirati diverzitet rizosfere, dajući prednost izabranim sojevima (Kloepper and Schroth, 1981). Dobar primer je da *Burkholderia ambifaria* MCI 17 pomaže rast kukuruznih klijanaca kada se aplikuje na seme tehnikom mikrobiološke inokulacije, ali kada se isti soj aplikuje direktno u zemljište efekat izostaje (Ciccillo et al., 2002).

Nakon uspešne germinacije i faze kada se klijanci oslanjaju na rezervne materije semena, započinje rana faza rasta biljke. Njen dalji razvoj, stabilizacija i učvršćivanje u zemljište, zatim apsorpcija, sladištenje nutrijenata i translokacija vode i minerala u stablo su funkcija korena. To je vitalni organ biljke i od njegovih osobina zavisi rast i prinos biljaka. Važna osobina korena je sposobnost adaptacije na raspoloživost nutrijenata i vode i druge abiotičke ekološke faktore, kao i sposobnost biotičke interakcije sa drugom vrstom. Svi navedeni faktori mogu uticati da osobine korena, iako genetski određene, variraju između i unutar vrsta (Bardgett et al., 2014). Delovanjem spoljašnjih faktora dešavaju se unutrašnje fiziološke promene u korenskom tkivu koje menjaju morfologiju korena. Morfologija korena odnosi se na osobine individualnog korena kao što su dužina, ukupna površina, ukupan volumen, prečnik i prisustvo korenskih dlačica kao karakteristika epidermisa. Zahvaljujući produkciji fitohormona (posebno IAA), sintezom sekundarnih metabolita i enzima PGPR utiču na morfološke, prostorne i funkcionalne osobine korena (Grover et al., 2021; Vacheron et al., 2013; Hodge et al., 2009; Malamy 2005). IAA je uključen u sve aspekte biljnog rasta sa akcentom na morfologiju korena. Pored toga što utiče na elongaciju korena stimuliše bočno grananje i povećanje rasta korenskih dlačica (Spaepen, 2014). Mikrobn (egzogeni) auksin zajedno sa biljnim (endogenim) može stimulisati elongaciju i/ili proliferaciju ćelija korena, diferencijaciju vaskularnog tkiva i uticati na fototropizam i gravitropizam (Aloni et al., 2006; Peer et al., 2011). Auksin ne utiče samo na biljku već indukuje i fiziološke promene kod mikroorganizma što se vidi na primeru *Rhizobium etli* gde je odgovoran za isključivanje pokretljivosti mikroorganizma i potenciranje njegovog vezivanja za površinu korena (Spaepen et al., 2009). Pored etilena i auksina na formiranje korenovog sistema utiču i mikrobn citokinini. Oni stimulišu ćelijsku deobu,

diferencijaciju korenskog meristema, indukuju proliferaciju korenskih dlačica, ali dovode do inhibicije lateralnih korenova i elongacije primarnih (Riefler et al., 2005). Pored toga, ovi fitohormoni utiču na strukturu provodnog tkiva korena i povećanu diferencijaciju epidermalnih ćelija i formirane korenskih dlačica koje omogućavaju veću apsorpciju nutrijenata (Aloni et al., 2006; Boivin et al., 2016). Mikrobní fitohormoni pored morfoloških promena korena imaju sposobnost da iniciraju hemijske i strukturne promene u zidu ćelija korena (Zang et al., 2007). Pored fitohormona, mikrobnim metabolizmom oslobođene pristupačne forme azota se ponašaju kao signalni molekuli i pokreću ekspresiju odgovarajućih gena koji utiču na morfologiju korena (Jia and Wiren, 2020).

Dobro razvijen korenov sistem ima sposobnost veće apsorpcije i akumulacije nutrijenata (N, P, K) u biljnom tkivu koji utiču na povećanje suve mase korena i nadzemnog dela (Chen et al., 2023). U ranoj fazi rasta, zahvaljujući apsorbovanim mineralima iz zemljišta jednim delom, a drugim delom, fotosintetskim proizvodima akumulira se masa biljke. Svetlosna energija se koristi da konvertuje vodu, ugljen dioksid, minerale u kiseonik i energijom bogata organska jedinjenja u procesu fotosinteze. U oba procesa *Bacillus* sp. i *Azotobacter* sp. mogu imati važnu stimulativnu ulogu. Moduliranje nivoa fitohormona doprinosi razvoju korenovog sistema, intezivnijoj resorpciji nutrijenata što se direkto odražava na povećanje sadržaja hlorofila, stomatalne provodljivost, efektivnosti fotosintetskog sistema i stope fotosinteze (Xu and Watahiki 2020). Povećanje sadržaja hlorofila može biti rezultat apsorpcije i inkorporacije nutrijenata (azota) iz zemljišta pod uticajem rizobakterija (Purwanto et al., 2021). Zato prisustvo azotofiksatora može da doprinese povećanju koncentracije azota i sintezi hlorofila (Shuppar and Kamial, 2020). Pod stresnim uslovima fotosinteza se inhibira za 50% zbog oslobođenih ROS (Foyer, C. H., and Shigeoka, S., 2011; Dumanović et al., 2021). Međutim, prisustvo PGPR mogu smanjiti negativni uticaj ROS-a ili eliminisati, aktiviranjem antioksidant enzima i time zaštititi hloroplaste i biljku od oksidativnog stresa (Allen, 1995).

Brojna istraživanja (Cardarelli et al., 2022; Jafari et al., 2021; Rocha et al., 2019a; Rocha et al., 2019b; Oliveira et al., 2017) su pokazala da tretman semena PGPR-ma može pomoći usevima u poboljšanju klijavosti, formiranju klijanaca ili postizanju visokih prinosa i kvaliteta hrane, pod smanjenim unosom mineralnih đubriva. *Bacillus* spp. kao bioinokulanti doprineli su povećanju rasta kukuruza (Li et al., 2021), pšenice (Ji et al., 2021), soje (Hasanuzzaman et al., 2022), plavog patlidžana (Jalapathi et al., 2021), zlatnog pasulja (Kumari et al., 2018), paradajza (Salehin et al., 2021). Primenom *Azotobacter* spp. inokulanata evidentirana su poboljšanja prinosa kukuruza (Sharifi, 2011), ječma (Mirshekari et al., 2012), suncokreta (Khosravi et al., 2014), pšenice (Patra et al., 2019). Istraživanja Barnett et al. (2019) su pokazala da je inokulacija semena pšenice vrstama roda *Streptomyces*, *Aspergillus* i *Bacillus* dovela do povećanja prinosa zrna. Takođe, u uslovima niskih temperatura inokulacija semena soje sa *Bacillus megaterium*, *Trichoderma longibrachiatum* i *Trichoderma simmonsii* je uticala na povećanje indeksa klijavosti i rasta klijanaca (Bakhshandeh et al., 2020).

Inokulacija semena PGPR može biti moćno sredstvo protiv većeg broja bolesti, patogena, ali i uslova abiotičkog stresa. Bez obzira na obećavajuće rezultate, još uvek postoje izazovi koji se uglavnom odnose na širenje iz laboratorije u polje i pravilnu formulaciju, uključujući efikasne mikrobne kombinacije i materijale za oblaganje koji mogu rezultirati produženim vekom trajanja semena i PGPR. Ova ograničenja treba prevazići kako bi se omogućila šira upotreba tretmana semena kao isplative metode u održivim poljoprivrednim sistemima (Rocha et al., 2019a). Primena PGPR, doprinosi smanjenju upotrebe sintetičkih sredstava za zaštitu bilja i đubriva, dok istovremeno osigurava dobar prinos.

3. CILJ RADA

Interakcija između korisnih zemljišnih mikroorganizama i biljaka određuje zdravlje i prinos biljaka, ali i plodnost zemljišta. Koncept održive poljoprivrede daje veliki značaj primeni rizosfernih bakterija kako bi se biljkama pomoglo da lakše usvoje nutijente, ali i prežive abiotički i biotički stres. Potreba za smanjenjem zavisnosti poljoprivredne proizvodnje od agrohemikalija, dodatno je doprinela da primena PGPR u poljoprivredi postane atraktivna alternativa tradicionalnom pristupu. Poznati su različiti načini primene korisnih mikroorganizama, kao što su direktno unošenje u zemljište, potapanje korena, folijarno, tretman semena itd. Nanošenje korisnih bakterija na seme je jedna od najčešće primenjenih metoda i označava se kao inokulacija semena.

Polazeći od navedenih činjenica, osnovni naučni cilj ove doktorske disertacije je sagledavanje mogućnosti primene inokulacije semena sa PGPR u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji. Ciljevi disertacije izvedeni su iz polaznih hipoteza da primena metoda inokulacije semena može doprineti boljem uspostavljanju složenih biljno-mikrobnih interakcija i uticati na rast biljaka u najranijim fazama rasta, što može doprineti daljoj primeni ove tehnologije u održivoj poljoprivredi. Ispitivanje značaja uspostavljanja interakcijskih odnosa bakterija i biljaka u najranijim fazama rasta biljaka može ukazati da PGPR mogu predstavljati potencijalne alate u orijentisanju poljoprivredne proizvodnje ka ekološki i ekonomski opravdanim agronomskim praksama. Ključni cilj disertacije je bio da se odredi potencijal odabranih izolata kao agensa u mikrobiološkom tretmanu semena.

PGPR mogu stimulisati rast i produktivnost različitih useva u zavisnosti od uspostavljene interakcije i procesa prepoznavanja. Imajući u vidu specifičnosti biljno-mikrobne interakcije za istraživanja su odabrani izolati F8/2 i 11/3 koji pripadaju tipičnim zemljišnim vrstama *Azotobacter chroococcum* i *Bacillus megaterium* i deset biljnih vrsta. Cilj disertacije je bio molekularna identifikacija izolata kao i karakterizacija u smislu određivanja njihovog potencijala u stimulaciji rasta biljaka i utvrđivanja pripadnosti grupi PGPR. To je podrazumevalo ispitivanje uloge sojeva u nutritivnom ciklusu, enzimska aktivnost, sposobnost produkcije hormona, sinteza VOC i uloga u biokontrolnoj aktivnosti prema nekim fitopatogenim gljivama. U cilju preciznije karakterizacije sojeva ispitan je odnos sojeva prema ekološkim faktorima kao što su temperatura, pH i povišena koncentracija soli.

Klijanje semena je ključna razvojna faza u životu biljaka i brzina, ujednačenost i kvalitet klijanja semena značajno utiču na kasniji rast, stanje biljke i prinos. S obzirom na značaj ove faze, cilj je bio da se izabranim PGPR sojevima, bioprajinom, odnosno metodom mikrobiološke inokulacije tretiraju semena različitih biljnih kultura i utvrde efekti inokulacije na parametre klijavosti. Takođe, cilj je bio i praćenje parametara germinacije inokulisanih semena tretiranih statičkim magnetnim poljem, kao abiotičkim faktorom.

Cilj je bio i ispitivanje uticaja mikrobiološke inokulacije na makro- i mikro- morfološke karakteristike korena kao i biomasu nadzemnog dela biljaka kao indikatore vegetativnog rasta u ranoj fazi rasta biljaka.

Polazeći od brojnih literaturnih podataka koji ukazuju da uspeh inokulacije značajno zavisi od sposobnosti sojeva da kolonizuju koren za cilj je postavljeno ispitivanje sposobnosti odabranih sojeva da površinski i endofitno kolonizuju koren u ranoj fazi rasta biljaka, primenom odgajivačkih i mikroskopskih tehnika (skenirajuća elektronska mikroskopija, konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija).

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Karakteristike testiranih rizobakterija

Bakterijski sojevi, korišćeni u istraživanju, pripadaju kolekciji Katedre za ekološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu u Zemunu. U okviru ranijih istraživanja, izolovani su iz poljoprivrednih zemljišta i na osnovu izgleda kolonije, morfoloških karakteristika ćelija (Tabela 3) i fizioloških karakteristika određenih standardnim testovima i primenom API50CH identifikovani su kao predstavnici vrste *Azotobacter chroococcum* i *Bacillus megaterium*.

Tabela 3: Izgled kolonija i mikromorfološke karakteristike ćelija *Azotobacter chroococcum* F8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3

Oznaka soja	Izgled kolonija			Mikromorfološke karakteristike		
	oblik i veličina	boja	površina i tekstura	bojenje po Gramu	oblik i raspored	prisusvo cista i spora
<i>Azotobacter chroococcum</i> F8/2	okrugle, krupne	u ranoj fazi rasta transparentne, starenjem proizvode tamno-žute pigment	ravne, glatke, mukoidne, gumaste	negativne	dominantno ovalan oblik; mogu biti pojedinačne ili u paru	prisutne ciste
<i>Bacillus megaterium</i> 11/3	krupne, nejednake veličine	beličasto-krem, sa starenjem tamno-žute	ravne, glatke i sjajne, jasno ograničenih ivica	pozitivne	krupni štapići, pojedinačni, ili u kraćim lancima	formira spore

Kulture su održavane na odgovarajućim podlogama i čuvane na temperaturi 4°C do upotrebe. Soj *A. chroococcum* F8/2 je održavan na bezazotnoj podlozi po Fjodorovu, a soj *B. megaterium* 11/3 na tripton-soja agaru (TSA, Torlak, Srbija).

Sastav podloge po Fjodorovu

	(g/l)
MgSO ₄	0,3
KH ₂ PO ₄	0,3
CaHPO ₄	0,2
CaCO ₃	2,5
FeCl ₃	0,1
Manit	20
Agar	16
NaCl	0,5
Rastvor mikroelemenata	1 ml

Stok rasvor mikroelemenata

	(g/l)
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ x 4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,22
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,05
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,12

4.1.1. Molekularna identifikacija

Priprema izolata za ekstrakciju DNK

Bakterijske kulture su gajene na odgovarajućim podlogama i režimu inkubacije 28 °C u toku 24-48 h. Posle inkubacije, u sterilne ependorf tube (1,5 ml) uneto je po 100 µg čiste bakterijske kluture. Dodato je po 300 µl fiziološkog rastvora, a zatim je u tri navrata izvršeno ispiranje u fiziološkom rastvoru uz obaranje ćelija centrifugiranjem na 7000 rpm (Nippon, Genetics Europe GmbH, Nemačka) u trajanju od 5 minuta. Nakon finalnog odlivanja supernatanta, dodato je po 100 µl Rnase-free vode (MolecularBiology Grade Water, Eppendorf) u svaku ependorf tubu. Vorteksovanjem su pripremljeni uzorci homogenizovani i podvrgnuti daljoj proceduri izolacije DNK.

Izolacija hromozomalne DNK

Izolacija DNK je obavljena pomoću ZR Soil Microbe DNA Mini Preparation Kit-a i uputstvu proizvođača (ZymoResearch, SAD). U ZR Wasing Bead™ Lysis tube dodati su pripremljeni uzorci i 750 µl rastvora za liziranje. Smeša je tretirana na disruptoru (Scientific industries–ST-D258, SAD) 5 minuta, a zatim je centrifugirana na 10.000 rpm (Mini Spin Eppendorf, Nemačka) u trajanju od 1 minuta. U prethodno pripremljenu Zymo Spin™ IV Spin Filter tubu dodato je 400 µl dobijenog supernatanta. Supernatant je centrifugiran na 7000 rpm (Mini Spin Eppendorf, Nemačka) u trajanju od 1 minuta, a zatim je dodato 1200 µl Soil DNA Binding Buffer-a. Iz dobijene smeše, 800 µl je prebačeno u Zymo Spin™ IIC kolonu sa kolekcijom tubom. Centrifugiranjem na 10.000 rpm u trajanju od 1 minuta, dobijena tečnost iz kolekcione epruvete je eliminisana i postupak je ponovljen. Postavljena je nova kolekcijona tuba, a direktno na filter Zymo Spin™ IIC kolone dodato je 200 µl DNA Pre-Wash Buffer-a, nakon čega je primenjeno centrifugiranje na 10.000 rpm/1minuta. Zatim je dodato 500 µl Soil DNA Wash Buffer-a i smeša je ponovo centrifugirana po istom režimu. Zym Spin™ IIC kolona transferovana je u novu sterilnu tubicu, a na filter je direktno dodato 100 µl DNA Elution Buffer-a u cilju elucije DNK uz centrifugiranje na 10.000 rpm, 30 sekundi. Eluirana DNK prebačena je u prethodno pripremljenu Zymo Spin™ IV HCR Spin filter-tubu. Centrifugiranjem na 8000 rpm u trajanju od 1 minuta izolovana je DNK. U cilju njene kvantifikacije, izvršeno je merenje apsorbance na 260 nm u 1 µl ekstrahovane DNK (NanoDrop™ Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, SAD).

Lančana reakcija polimeraze (PCR):

PCR metoda je primenjena u cilju umnožavanja 16S rDNK regiona kod izabranih bakterijskih sojeva pomoću prajmera 16SF/16SR za *A. chroococcum* F8/2 i UNI16SF/UNI16R za *B. megaterium* sp. 11/3, a u slučaju *A. chroococcum* F8/2 je dodatno, u cilju amplifikacije *nifH* gena, primenjen i par prajmera *nifHg1F/nifHg1R* (Operon Biotechnologies, Nemačka) (Tabela 4).

Tabela 4: Parovi prajmera korišćeni za identifikaciju sojeva

Soj	Region	Korišćeni prajmeri	Literatura
<i>Azotobacter chroococcum</i> F8/2	16S rDNK	16S-F (GAATCTTCCACAATGGACG) 16S-R (TGACGGGCGGTGTGTACAAG)	Jovicic et al., 2009.
	<i>nifH</i>	<i>nifHg1</i> -F (GGTTGTGACCCGAAAGCTGA) <i>nifHg1</i> -R (GCGTACATGGCCATCATCTC)	Helmut et al., 2004.
<i>Bacillus megaterium</i> 11/3	16S rDNK	UNI16S-F (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) UNI16S-R (GGTCCG TGT TTCAAGACG)	Haynes et al., 1995.

Za formiranje PCR smeša za oba soja korišćen je KapaBiosystem PCR kit (Velika Britanija). Radna zapremina PCR smeše od 50 μ l za sekvencioniranje 16S rDNK za *A. chroococcum* F8/2 sadržala je 5 μ l reakcionog pufera (10x), 1 μ l dNTP (10 mM), 1 μ l svakog prajmera 0,2 μ l Taq polimeraze (2 U/ μ l), 5 μ l DNK i Rnase-free vode do 50 μ l. PCR reakcija se odvijala u sledećim uslovima: inicijalna denaturacija na 94 °C u trajanju od 5 minuta. je praćena sa 30 ciklusa koji su podrazumevali denaturaciju na 94 °C u trajanju od 30 sekundi, hibridizaciju na 55 °C u trajanju od 30 sekundi i elongaciju na 72 °C u trajanju od 2 minuta. Finalna elongacija se odvijala na 72 °C u trajanju od 7 minuta.

Sastav PCR smeše za sekvencioniranje *nifH* gena je bio identičan sastavu PCR smeše korišćene za sekvencioniranje 16S rDNK regiona, izuzev prajmera. PCR reakcija se odvijala u termosajkleru (Kyratec, Australija) pod sledećim uslovima: inicijalna denaturacija na 94 °C u trajanju 5 minuta praćena je sa 30 ciklusa koji su podrazumevali denaturaciju na 94 °C u trajanju od 30 sekundi hibridizaciju na 50 °C u trajanju od 30 sekundi i fazu elongacije na 72°C u trajanju od 2 minuta. Finalna ekstenzija se odvijala na 72 °C u trajanju od 7 minuta.

Radna zapremina PCR smeše za *B. megaterium* 11/3 sadržala 10 μ l reakcionog pufera (10x), 3 μ l 25 MgCl₂, 1 μ l dNTP mix, 2 μ l svakog prajmera (0,2 μ l Taq polimeraze, 1 μ l DNK i RNA free vode do 50 μ l. PCR program se sastojao iz sledećih koraka: početne denaturacije na 95°C u trajanju 5 minuta praćene sa 35 ciklusa gde se denaturacija odvijala na 95 °C, 30 sekundi, hibridizacija na 55 °C u trajanju od 30 sekundi. i elongacija na 72 °C u trajanju od 1 minuta. Finalna elongacija se odvijala na 72 °C u trajanju od 1 minuta.

Kao negativne kontrole korišćene su smeše identičnog sastava specifičnog za svaku PCR reakciju, u kojima je umesto DNK uzorka u PCR smešu dodata Rnase-free voda.

Vizualizacija PCR produkata

Elektroforezom je izvršena vizuelizacija fragmenata dobijenih PCR produkata. Proces elektroforeze se odvijao na 1% agaroznom gelu pripremljenom rastvaranjem agaroze u 1 x TBE (Tris-Borat-EDTA buffer) (Fermentas, Litvanija). Gel je zagrevan do ključanja, a zatim je nakon hlađenja i postizanja temperature od najviše 60 °C dodato 2,5 μ l Midori Green Advance boje (Nippon Genetics Europe GmbH) i izvršeno izlivanje u kalup aparata za horizontalnu elektroforezu (Advance Mupid-One, Japan). Elektroforeza se odvijala na 60 A u trajanju od 40 minuta. Određivanje veličine produkta izvršeno je poređenjem sa odgovarajućim markerom (Nippon Genetics Europe GmbH). Umnoženi fragmenti su posmatrani u komori transiluminatora (Nippon genetics Europe GmbH). Pozitivan rezultat elektroforeze je podrazumevao dobijanje po jednog fragmenta očekivane dužine od ~ 1500 bp.

Sekvencioniranje i identifikacija bakterijskih sojeva

Umnoženi fragmenti su prečišćeni i sekvencionirani u oba smera, uz primenu identičnih prajmera kao i prilikom amplifikacije, primenom ABI 3730XL Sequencer (Macrogen, Inc., Seul, Koreja). Za poravnanje sekvenci korišten je Clustal W 2.0 alogaritam (Larkin et al., 2007) i MEGA 5 Softver (Tamura et al., 2011).

Molekularna identifikacija bakterijskih sojeva izvršena je višestrukim uparivanjem dobijenih sekvenci sa sekvencama drugih bakterija dostupnih u GenBank bazi podataka (<http://blast.GenBank.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), za šta je korišćen CLUSTAL W program (Thompson et al., 1994).

Deponovanjem u GenBank bazu podataka, (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), sekvence su dobile pristupne brojeve (*GenBank Accession Number*).

4.1.2. Ekološke karakteristike

U okviru ekoloških odlika izabranih bakterijskih sojeva, posmatran je uticaj temperature, pH i povećane koncentracije soli na njihov rast.

Uticaj temperature na izabrane bakterijske sojeve

Odnos izabranih sojeva i različitih temperatura je utvrđen praćenjem rasta *B. megaterium* 11/3 na TSA i *A. chroococcum* F 8/2 na podlozi po Fjodorovu na temperaturama od 4, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 i 60 °C nakon inkubacionog perioda od 24-48 h. Pojava bakterijskog rasta je označena kao pozitivan rezultat.

Uticaj pH na izabrane bakterijske sojeve

Različite pH vrednosti hranljivog agara, HA (Torlak, Srbija) podešene su dodavanjem 1M HCl ili 1M NaOH, na sledeće vrednosti: 3,5; 4; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0; 8; 8,5; 9; 9,5; 10; 10,5 i 11. Inkubacija zasejanih podloga se odvijala na temperaturi od 28±2 °C u trajanju od 48-72 h. Pojava bakterijskog rasta nakon inkubacije je bila označena kao pozitivan rezultat.

Uticaj prisustva povećane koncentracije natrijum hlorida (NaCl) na izabrane bakterijske sojeve

U HA podlogu dodat je natrijum hlorid (NaCl) u koncentracijama od 3, 5 i 7%, pre autoklaviranja. Inkubacija je vršena na temperaturi od 28±2 °C. Pojava kolonija nakon 24-48 h je indikovala pozitivan rezultat.

4.2 Mehanizmi stimulacije biljnog rasta

U okviru ispitivanja sposobnosti bakterijskih sojeva da direktnim i indirektnim mehanizmima stimulišu biljni rast i razvoj ispitivana su sledeća svojstva: enzimska aktivnost, produkcija indol-sirćetne kiseline (IAA), sposobnost regulisanja nivoa l-aminociclopropan-l-karboksilne kiseline (ACC), sinteza siderofora, sposobnost solubilizacije P, K, Zn iz neorganskih izvora, produkcija amonijaka, egzopolisaharida, cijanovodonične kiseline (HCN), isparljivih organskih metabolita (VOC) i ispitivanje antagonističkog odnosa prema *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum* i *Fusarium oxysporum*.

4.2.1. Enzimska aktivnost bakterijskih sojeva

Bakterijski sojevi su podvrgnuti biohemijskom testiranju primenom APIZYM sistema (Biomerieux, Francuska). Bakterijske kulture stare 24 h nakon gajenja na odgovarajućim podlogama (TSA i podloga Fjodorova) prenete su u sterilan fiziološki rastvor (2 ml) i pripremljena je suspenzija optičke gustine 6 na 550 nm (T70 UV/VIS Spectromer, PG Instruments LTD, UK) što je odgovaralo brojnosti od $1,8 \times 10^9$ CFU/ml. Od ovako pripremljenih suspenzija, pipetom je po 65 µl preneto u svaki od bunarića API testa. Nakon inkubacije od 4 h na temperaturi 37±2 °C (Binder, Litvanija), u bunariće je dodata po 1 kap ZYM A i ZYM B reagensa i posle 5 minuta rezultati su očitani poređenjem boje u bunarićima sa uputstvom API Colour ZYM Chart-a.

4.2.2. Produkcija indolsirćetne kiseline (IAA)

Sposobnost produkcije IAA utvrđena je primenom kolorimetrijskog testa (Paten and Glick, 2002). Sveže bakterijske kulture su zasejane u 5 ml M9 medijuma koji je potom inkubiran na 30±1 °C/24 h/150 rpm (Biosan ES-20, Letonija). Količina 0,5 ml dobijene kulture je prebačena u 9 ml

M9 medijuma obogaćenog sa 100 µg/ml l-tryptophana (Sigma Aldrich, SAD) i inkubirano na 30±1 °C/72h/150 rpm. Nakon inkubacije, 2 ml suspenzije je centrifugirano na 6000 rpm/15 minuta (Mini Spin, Ependorf, Nemačka). Zatim je 1 ml supernatanta prenet u eprivetu sa 2 ml Salkowski reagensa. Suspenzija je homogenizovana vorteksovanjem, a zatim je na sobnoj temperaturi, u mraku, inkubirana 25 minuta. Vrednost apsorbance je očitana na 530 nm (T70 UV/VIS Spectrometer, PG, Velika Britanija) i upoređena sa vrednostima standardne krive IAA (obuhvata vrednosti 1-100 µg/ml IAA). Količina sintetizovane IAA od strane soja je izražena u µg/ml.

Standardna kriva je formirana rastvaranjem 10 mg sintetičke IAA (Sigma, Aldrich, SAD) u 10 ml acetona, a zatim je od ovog rastvora pripremljena serija rastvora u M9 medijumu do postizanja finalnih koncentracija od 1, 5, 10, 20, 50 i 100 µg/ml IAA. U 1 ml svakog pojedinačnog rastvora dodato je po 1 ml Salkowski reagensa, inkubirano na sobnoj temperaturi 30 min, a zatim je izvršeno očitavanje na 530 nm (T70 UV/VIS Spectrometer, pG Instruments LTD, Velika Britanija).

Sastav M9 mineralnog medijuma (ml/l)	Štok rastvora soli M9 (g/l)	Štok rastvor elemenata u tragovima (100x) (g/l)
M9 rastvor soli (10x)	100	FeCl ₃ x6H ₂ O 0,83
Glukoza (20%)	20	ZnCl ₂ 0,084
1M MgSO ₄	1	NaCl 5
1M CaCl ₂	0,3	NH ₄ Cl 5
Biotin (1mg/ml)	1	pH 7,2
Tiamin (1mg/ml)	1	H ₃ BO ₃ 0,010
Elementi u tragu (100x)	10	MnCl ₂ 0,0016
pH	7,5	pH 7,5

Priprema Salkowski reagensa: 2 ml 0,5 M kristalnog gvožđe (III)-hlorida (FeCl₃ x 6H₂O) i 98 ml 35% perhlorne kiseline (HClO₄) je homogenizovano vorteksovanjem, a zatim inkubirano na sobnoj temperaturi, u mraku u trajanju od 30 minuta.

Rastvor l-triptofana koncentracije 1 mg/ml je pripremljen u destilovanoj vodi, a zatim sterilisan pomoću membranskog filtera sa porama promera 0,2 µm (Minisort Sartorius) i dodat u M9 medijum u koncentraciji od 100 µg/ml l-triptofana.

4.2.3. Sposobnost korišćenja l-aminociklopropan-l-karboksilne kiseline (ACC)

Na osnovu sposobnosti da se koristi ACC kao izvor azota potvrđena je aktivnost ACC deaminaza kod izabranih sojeva.

Aktivnost ACC deaminaza je kod *B. megaterium* 11/3 testirana na Dworkin-Foster podlozi (DF) (Dworkin and Foster, 1985) u koju je dodat ACC kao jedini izvor azota u koncentraciji od 3 mM. Bakterijska kultura je zasejana u TSB medijum (5 ml) i inkubirana 24 h na 28±2 °C/150 rpm (Biosan, ES-20, Letonija). Centrifugiranjem na 6000 g u trajanju od 10 minuta dobijen je talog koji je ispran, a zatim resuspendovan u 0.1 M MgSO₄. Pipetom, kultura je zasejana, u vidu kapi, na DF-ACC podlogu. Inkubacija je trajala 48 h na 28±2 °C. Pojava kolonija nakon inkubacije je bila indikacija aktivnosti ACC deaminaza. Inokulisana DF podloga bez ACC predstavljala je kontrolu.

S obzirom da predhodni test nije pouzdan kada su u pitanju azotofiksirajuće bakterije poput predstavnika *Azotobacter* sp., aktivnost ACC deaminaza je kod *A. chroococcum* F8/2 utvrđena ninhidrinskim testom (Li et al., 2011). Bakterijska kultura dobijena nakon inkubacije u LB medijumu (Sambrook et al., 1989) u trajanju 24 h pri 28 °C/200 rpm (Biosan ES – 20, Letonija) je podvrgnuta centrifugiranju na 10.000 g u trajanju od 5 minuta (Mini Spin Eppendorf, Nemačka) i ispiranju (2x) pomoću DF medijuma. Dobijeni talog je resuspendovan u 2 ml DF medijuma obogaćenog sa 3 mmol/l ACC-a (Sigma-Aldrich, SAD), nakon čega je sledila inkubacija u trajanju od 24 h na 28 °C/200 rpm. Količina od 1 ml dobijene kulture je centrifugirana na 10.000 g u

trajanju od 5 minuta, a zatim od dobijenog supernatanta izdvojeno 0,1 ml i dodato u 1 ml DF medijuma. Od ovako razređenog supernatanta, po 60 µl je u tri ponavljanja preneto u bunariće PCR mikropolejta uz dodatak 120 µl ninhidrin reagensa i zagrevano 30 minuta u vodenom kupatilu na temperaturi ključanja. Promena boje (Ruhemanova ljubičasta) u poređenju sa kontrolnim DF-ACC je bila potvrda da soj koristi ACC, a zatim je u cilju kvantifikacije, 100 µl ovog reakcionog rastvora preneto u mikropolejt sa 96 bunarića ravnog dna u tri ponavljanja. Očitana je apsorbancija na 570 nm (T70 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments, LTD) i dobijene vrednosti su poređene sa vrednostima standardne ACC krive u rangu koncentracija od 0,005-0,5 mmol/l.

Standardna kriva je formirana tako što je DF-ACC medijum (sa koncentracijom ACC od 3 mmol/l) razblažen sa DF medijumom do postizanja rastvora radnih koncentracija 0,005, 0,01, 0,015, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,40 i 0,50 mmol/l. Neinkulisani DF-ACC medijum je predstavljao kontrolu.

LB medium	(g/l)	DF medijum	(g/l)	Elementi u tragovima	(µg/l)	Citratni pufer	(g/l)
Tripton	10	KH ₂ PO ₄	4	FeSO ₄	1	Na-citrat-dihidrat	24,27
Kvašičev ekstrakt	5	Na ₂ HPO ₄	6	H ₃ BO ₃	10	Limunska kis.	3,36
NaCl	10	MgSO ₄ x7H ₂ O	2	MnSO ₄ xH ₂ O	11,2	Destilovana voda	1
pH	7	Glukoza	2	ZnSO ₄ x7H ₂ O	124,6	pH	6,0
		Glukonska kis.	2	CuSO ₄ x5H ₂ O	78,2		
		Limunska kis.	2	MoO ₃	10		
			4	Agar	20		

Priprema ninhidrin reagensa: 500 µl ninhidrina i 15 µl askorbinske kiseline je rastvoreno u 60 ml etilen glikola. Rastvor je čuvan na 20 °C do upotrebe. Neposredno pre primene, rastvoru se dodalo 60 ml/mmol citratnog pufera (pH 6,0).

4.2.4. Produkcija siderofora

Modifikovana CAS-metoda opisana od strane Lakshmanan et al. (2015) je primenjena u cilju potvrđivanja produkcije siderofora. Sveže bakterijske kulture su zasejane na CAS-agar podlogu, a zatim inkubirane na 28±2 °C u trajanju od pet dana. Pojava zona žute ili narandžaste boje je potvrda sposobnosti produkcije siderofora.

Sastav CAS-agar podloge:

- Rastvor: 60,5 mg hrom azurol S (CAS, Fluka) indikatora u 50 ml vode;
- Rastvor: 1 mM FeCl₃ x 6H₂O u 10 mM HCl;
- Rastvor: 72,9 mg heksadeciltrimetilamonijum-a (HDTMA, Sigma) u 40 ml vode;
- Rastvor (a) je pomešan sa rastvorom (b) i uz lagano mešanje dodat je pripremljenom i autoklaviranom rastvoru (c);
- 100 ml dobijene smeše (a + b + c) dodato je u 900 ml sterilnog LB medijuma čija je pH korigovana na 6,8.

4.2.5. Sposobnost solubilizacije fosfora (P), kalijuma (K) i cinka (Zn)

Sposobnost odabranih sojeva da solubilizuju P je utvrđena koršćenjem NBRIP medijuma (*National Botanical Research Institute's Phosphate*; Nautiyal, 1999). Bakterijske kulture stare 24-48 h nanete su na podlogu u tri ponavljanja i inkubarane 14 dana na temperaturi od 28±2 °C.

Sposobnost izabranih sojeva da solubilizuju K ispitana je primenom modifikovanog Aleksandar medijuma obogaćenog brom-timol indikatorom (Rajawat et al., 2016). K-Al-silikat (Galenika, Srbija) je predstavljao jedini izvor kalijuma. Bakterijske kulture stare 24-48 h su

zasejane na modifikovan medijum u tri ponavljanja. Inkubacija je trajala tri dana na temperaturi od 28 ± 2 °C.

Sposobnost solubilizacije Zn je utvrđena primenom Tris-mineralnog medijuma (Gandhi and Muralidharan, 2016). Kao izvor cinka korišćen je cink-oksidi (ZnO) (Sigma-Aldrich, SAD) koji je u medijumu bio zastupljen sa 1%. Bakterijske kulture stare 24-48 h nanete su na podlogu u tri ponavljanja i inkubarane na temperaturi od 30 °C/48 h.

Nakon inkubacionog perioda pojave prosvetljenih zona na NBRIP i Tris-mineralnom medijumu i jasnih žutih zona na modifikovanom Aleksandar medijumu su indikovale sposobnost solubilizacije fosfora, cinka i kalijuma iz nerastvornih neorganskih jedinjenja. Kapacitet solubilizacije fosfora, cinka i kalijuma je izražen indeksom solubilizacije (SI):

SI = (prečnik kolonije + prečnik halo-zone)/prečnik kolonije x 100 (Bashir et al., 2017).

NBRIP medijum	(g/l)	Modifikovan Aleksandar medijum	(g/l)	Tris-mineralni medijum	(g/l)
Glukoza	10	Glukoza	5	Dekstroza	10
Ca ₃ (PO ₄)	5	MgSO ₄	0,5	(NH ₄)SO ₄	1
MgCl ₂ *6H ₂ O	5	FeCl ₃	0,006	KCl	0,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1	Ca ₃ (PO ₄) ₂	2	K ₂ HPO ₄	0,1
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,25	CaCO ₃	0,1	MgSO ₄	0,2
KCl	0,2	KAlSi	3	ZnO	10
pH	7	Agar	20	Agar	15
		pH	7,5	pH	7

Modifikovanom Aleksandar medijumu je pre autoklaviranja dodato 2,5 ml/100 ml podloge rastvora brom-timol plavog. Stok rastvor indikatora sadrži 5 g brom-timol plavog u 1l 70% etanola.

4.2.6. Produkcija amonijaka (NH₃)

Bakterijske kulture su gajene u 5 ml peptonske vode (Torlak, Srbija) 72 h na temperaturi od 28 ± 2 °C. Nakon inkubacionog perioda dodato je 0,5 ml Nessler-ovog reagensa (Alfapanonija, Srbija) i promena boje od žute do braon indikovala je sposobnost izolata da produkuju amonijak (Cappuccino and Sherman, 2005).

4.2.7. Produkcija egzopolisaharida

Produkcija egzopolisaharida je utvrđena primenom procedure datoj od strane Paulo i saradnika (2012). Sterilni filter diskovi (Ø 5 mm) postavljeni su u Petri kutije sa čvrstom podlogom ATCC No. 14 (Arfarita et al., 2016) i inokulisani sa 5 µl bakterijske suspenzije gustine 10⁷ CFU/ml. Inkubacija je trajala 48 h na temperaturi od 28 ± 2 °C. Pojava sluzavih kolonija oko diskova i pojava precipitata nakon unošenja kolonije u 2 ml apsolutnog etanola predstavlja potvrdu sposobnosti produkcije egzopolisaharida.

ATCC No. 14 podloga

	(g/l)
KH ₂ PO ₄	0,2
K ₂ HPO ₄	0,8
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2
CaSO ₄ *2H ₂ O	0,1
FeCl ₃	2,0 mg
Na ₂ MoO ₄	u tragu
Kvašćev ekstrakt	0,5

Saharoza	20
Agar	15
pH	7,2

4.2.8. Produkcija cijanovodonične kiseline (HCN)

Metoda opisana od strane Bakker and Schipper (1987) je primenjena za utvrđivanje sposobnosti soja da produkuje HCN. Bakterijska kultura stara 24-48 h je ezom naneta na površinu TSA u koju je pre autoklaviranja dodato 4,4 g/l glicina. Sterilan filter papir (Whatman No. 1) je pre postavljanja na unutrašnju stranu poklopca Petri kutije kratkotrajno potopljen u 0,5% vodeni rastvor pikrinske kiseline i 25% (težina/zapremina) natrijum karbonata (Na₂CO₃), a zatim su postavljeni poklopci na Petri kutijama zatvoreni parafilmom. Inkubacija je trajala 96 h na temperaturi od 28±2 °C. Promena boje filter papira od žute do braon je indikacija sinteze HCN (Cappuccino and Sherman, 2005).

4.2.9. Ispitivanje sastava isparljivih organskih smeša metabolisanih od strane bakterijskih sojeva

U cilju analize isparljivih organskih jedinjenja metabolisanih od strane bakterijskih sojeva *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3 primenjena je GC-MS metoda (Gasna hromatografija-Masena spektrometrija).

Priprema uzoraka

Ispitivanje isparljivih metabolita je izvršeno nakon gajenja bakterijskih sojeva u tečnim hranljivim podlogama. *A. chroococcum* F8/2 je gajen na tečnoj podlozi po Fjorodovu koja je pripremljena po recepturi datoj u sekciji 4.1.1., ali bez dodatka agara, a *B. megaterium* 11/3 na tripton soja bujonu (TSB) (Torlak, Srbija).

Pored toga, u cilju ispitivanja uticaja hranjive podloge na sastav isparljivih organskih jedinjenja u slučaju soja *B. megaterium* 11/3 ista analiza je sprovedena i sa zemljišnim ekstraktom. Zemljišni ekstrakt je pripremljen tako što je kilogram zemljišta neutralne pH pomešan sa 2 l vodovodske vode i ostavljen da stoji 24 h. Smeša je sterilisana na temperaturi od 121 °C u trajanju od 1h. Nakon hlađenja, izdvojena tečna faza je odlicvena od taloga, a zatim profiltrirana nekoliko puta u cilju dobijanja čistog filtrata. Dobijeni filtrat je sterilisan na temperaturi od 121 °C u trajanju od 20 minuta.

Sterilne bočice namenjene za hromatografsku analizu dimenzija 75.5 x 22.5 x 20 ml (Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka) su korišćene u cilju pripreme uzoraka. Po 5 ml od svake podloge preneto je u bočice za hromatografsku analizu, a zatim su inkulisane odgovarajućim sojevima sa po 20 µl suspenzije (10⁷ CFU/ml). Zasejane podloge su inkubirane na temperaturi od 28±2 °C u vremenskom periodu od tri dana. Neinkulisane bočice sa sterilnim podlogama su predstavljale kontrole.

GC-MS analiza

GC/MS analiza urađena je na Agilent gasno-hromatografskom sistemu (Kalifornija, SAD) sa autosamplerom GC 80, gasnim hromatografom 7890 A i masenim detektorom 5975C MSD. Režim na autosampleru je bio sledeći: vreme inkubacije 1200 sekundi, temperatura uzorka 100 °C, i temperatura šprica 110 °C. Gasni hromatograf je direktno bio povezan na dva detektora: plameno-jonizacioni (FID) i maseno-spektrometrijski detektor (MSD) u cilju kvalitativne i semikvantitativne analize isparljivih komponenti. Kapilarna polarna kolona HP-Innowax (30 mm x 0,320 mm, debljina filma 0,25 µm) korišćena je pri svim analizama. Protok nosećeg gasa helijuma je bio konstantan 3 ml/minuta. Temperatura injektora je bila 220 °C, a plameno-jonizacionog detektora 300 °C. Temperaturni režim kolone je bio programiran na sledeći način: 35 °C u trajanju od 5

minuta, zatim raste brzinom od 3 °C minuta do 65 °C i 10°C/minuta do 225 °C, na kojoj ostaje 4 minuta. Injektovanje je vršeno u split režimu 3:1, a injektovana zapremina je bila 2000 µl uzorka. Maseni spektri su snimljeni tehnikom elektronske jonizacije (EI) i energijom od 70 eV. Temperatura jonskog izvora je bila 230 °C, uz konstantno grejanje masenog analizatora (kvadrupol) na 150 °C. Sadržaj isparljivih komponenata je izražen na osnovu relativnog masenog procenata površina njihovih pikova dobijenih iz FID hromatograma i potvrđen poređenjem indeksa retencije i masenih spektara sa istim kod standardnih jedinjenja iz NISTWebBook biblioteke (*US National Institute of Standards and Technology*). Retencioni indeksi (RI) analiziranih jedinjenja dobijeni na osnovu retencionih indeksa *n*-alkana (C₆-C₂₆ pod istim hromatografskim uslovima).

4.2.10. Antifugalna aktivnost izabranih bakterijskih sojeva

Antagonizam *A. chroococcum* F 8/2 i *B. megaterium* 11/3 prema fitopatogenim gljivama je utvrđen na osnovu konfrontacijskog testa (testa dvojnih kultura). U test su bile uključene fitopatogene gljive: *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum* i *Fusarium oxysporum* koje pripadaju kolekciji kultura Katedre ekološke mikrobiologije Poljoprivrednog fakulteta.

Kulture fitopatogena su gajene na krompir dekstroznom agaru (*Potato Dextrose Agar*, PDA; Merck, Nemačka) na temperaturi od 25 °C u trajanju od sedam dana. Bakterijske kulture su osvežene gajenjem na podlogama i inkubacionom režimu u skladu sa protokolom opisanim u sekciji 4.1.1. U Petri kutije (Ø 9 cm) sa izlivenom PDA podlogom na centralni deo postavljen je disk prečnika 5 mm uzet sa ivice aktivno rastuće kolonije fitopatogena. Na udaljenosti od 3 cm od centra, zasejan je bakterijski soj u formi linije. Konfrontacijski test je postavljen u tri ponavljanja. Fitopatogen zasejan na PDA bez prisustva bakterije predstavljao je kontrolu. Period inkubacije je trajao sedam dana, na temperaturi od 25 °C. Nakon inkubacije posmatran je rast fitopatogena u kontroli i rast u prisustvu bakterije. Na osnovu razlika u poluprečniku formirane kolonije patogena u kontrolnoj Petri kutiji i poluprečnika kolonije patogena ka bakterijskoj koloniji u testu dvojnih kultura, a prema obrascu Siripornvisal (2010), izračunat je procenat inhibicije:

$$I\% = (r_0 - r) \times 100\% / r_0$$

I % - procenat inhibicije rasta patogena;

r₀ - poluprečnik kolonije fitopatogena u kontroli (mm)

r - poluprečnik kolonije fitopatogena ka bakterijskom soju u konfrontacijskom testu (mm)

Na osnovu rezultata konfrontacijskog testa antagonistička aktivnost bakterijskih sojeva klasifikovana je prema Sookchaoy et al (2009) kao: veoma visoka (> 75%), visoka (61-75%), umerena (51-60%) i slaba (< 51%).

4.3. Uticaj mikrobiološkog tretmana na parametre germinacije

4.3.1. Ispitivane biljne vrste

U ovoj disertaciji korišćena su semena sledećih biljnih vrsta:

Slačica (*Sinapsis alba* L.), sorta „NS-Bela“, NS seme, Novi Sad

Bosiljak (*Ocimum basilicum*), SemeSemena, Beograd

Pšenica (*Triticum aestivum* L.), sorta „Pobeda“, NS Seme, Novi Sad

Kinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), „Nutricia“, Beograd

Kukuruz šećerac (*Zea mays* convar. *saccharata*), sorta „Union F1“, Superior doo, Velika Plana

Uljana repica (*Brassica napus* L.), sorta „Zlatna“, NS seme, Novi Sad

Šećerna repa (*Beta vulgaris* L.), sorta „Hurricane“, SesVanderHave, Belgium

Soja (*Glycine max* L.), sorta „Balkan, Hemoslavija, Novi Sad
Paradajz (*Solanum lycopersicum* L.), sorta „SaintPierre“, SemeSemena, Beograd
Krastavac (*Cucumis sativus* L.), sorta „Delikates“, SemeSemena, Beograd

Sva izdvojena semena izabranih biljnih kultura bila su homogena i bez vidljivih oštećenja.

4.3.2. Uticaj mikrobiološkog tretmana na parametre germinacije biljnih vrsta

U cilju potvrđivanja promotivnog efekta bioprajminga na rane faze životnog ciklusa biljke, praćena je germinacija semena izabranih biljnih kultura primenom modifikovane metode na filter papiru preporučene od strane ISTA (*International Seed Testing Association*, 2014).

Za svaku biljnu vrstu bili su postavljeni sledeći tretmani:

Tretman 1: semena inokulisana suspenzijom *A. chroococcum* F8/2;

Tertman 2: semena inokulisana suspenzijom *B. megaterium* 11/3;

Kontrolni tretman - nekinokulisana semena.

Izabrano je 100 semena po tretmanu koja su postavljena u četiri ponavljanja po 25. Postupak sterilizacije i inokulacije semena je obavljen po proceduri opisanoj u sekciji 4.3.

U Petri kutije (Ø 9 cm) postavljen je filter papir (Whatman, No. 1) na koji je dodato po 5 ml sterilne vodovodske vode u toku oglada kako bi se obezbedila optimalna vlaga za proces germinacije. Zbog veličine, zrna semena soje i kukuruza postavljena su u veće Petri kutije (Ø 18 cm) uz dodatak sterilne vodovodske vode u količini od 20 ml. Naklijavanje se dešavalo u ambijentalnim uslovima na prosečnoj temperaturi od 20 °C, sa prosečnom vlagom 63% i svetlosnim režimom od 16 h. Proces germinacije je praćen sedam dana. Pojava klice dužine 2 mm je bila znak uspešne germinacije semena. Broj proklijalih semena za svaku grupu tretmana je svakodnevno evidentiran. Nakon ovog perioda, iz svakog ponavljanja izabrana su po tri reprezentativna klijanca starosti sedam dana i izmerena je dužina (cm). Nakon toga, sušeni su na temperaturi od 90 °C/12 h i izmerena je njihova suva masa (g). Na osnovu dobijenih podataka izračunati su parametri germinacije za svaki tretman: finalni procenat germinacije (FGP), germinacijski indeks (GI), prosečno vreme germinacije (MGT), vigor I (VI) i II (VII).

Finalni procenat germinacije je predstavljen procentom proklijalih zrna u odnosu na ukupan broj zrna (Iqbal et al. 2015):

$$\text{FPG (\%)} = \text{broj proklijalih zrna/ukupan broj} \times 100$$

Indeks germinacije je predstavljao odnos između proklijalih zrna po danu (Gt) i ukupnog broja dana perioda germinacije (Dt) (Ansari i Ksiksi 2016):

$$\text{GI} = \sum \text{Gt} / \sum \text{Dt}$$

Prosečno vreme germinacije (MGT) predstvljao je odnos proklijalih zrna po danu odnosu (nD) na ukupan broj proklijalih zrna (n) (Iqbal et al. 2016):

$$\text{MGT (dan)} = \sum (\text{nD}) / \text{n}$$

Vigor I i Vigor II su predstavljali proizvod procenta germinacije i dužine klijanaca (koren + nadzemni deo), odnosno suve mase (koren + nadzemni deo) (Iqbal et al. 2016):

$$\begin{aligned} \text{V I} &= \% \text{ FGP} \times \text{dužina klijanaca} \\ \text{V II} &= \% \text{ FGP} \times \text{suva masa klijanaca} \end{aligned}$$

U cilju analize parametra germinacije primenjen je softver *Advanced germination measurement tool* (Agon Info-Tech).

4.3.3. Uticaj statičkog magnetnog polja (SMP) na parametre germinacije inokulisanih semena

Jedan od postavljenih ciljeva rada je bio i da se utvrdi koliko SMP kao abiotički faktor može uticati na efekte postignute prethodno primenjenim bioprajinomom.

Priprema semena i procedura inokulacije je bila u skladu sa procedurom opisanom u sekciji 4.3. Nakon inokulacije i kratkog sušenja, semena su izložena delovanju magnetna različitih jačina: 30 mT, 60 mT i 90 mT u dva vremenska režima 5 minuta i 15 minuta, a zatim naklijavana na filter papiru metodom opisanom u sekciji 4.3.2. Predstavljene su rezultati uticaja SMP jačine 90 mT, s obzirom da SMP slabije jačine nije imalo uticaja.

Ekspozicioni sistem statičkog magnetnog polja

Ekspozicioni sistem statičkog magnetnog polja je bio formiran u skladu sa prethodnim istraživanjem Jovičić-Petrović et al.(2021). Dva magnetna bloka (B 150-100-25 FA, GausGroup, Požarevac, Srbija) veličine 100 x 100 x 25 mm³ bila su postavljena u paru, jedan iznad drugog i učvršćena aluminijumskim okvirom. Petri kutije sa semenima su postavljane u formirani prostor i izložena delovanju statičkog magnetnog polja u dva vremenska intervala 5 i 15 minuta. Podešavanjem razmaka između ploča regulisana je jačina magnetnog polja.

4.4. Ispitivanje sposobnosti sojeva za površinsku i endofitnu kolonizaciju biljaka

Prisustvo izolata na površinskim i unutrašnjim strukturama korena odabranih biljaka nakon tri nedelje rasta u *monoxenic* uslovima (jedna biljka-jedan bakterijski soj), izvršeno je primenom dve mikroskopske metode: skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i konfokalne laserske skenirajuće mikroskopije (CLMS), kao i primenom metode razređenja i primene selektivnih hranljivih podloga (Karličić, 2017).

4.4.1. Priprema biljnog materijala za ispitivanje površinske i endofitne kolonizacije

Sterilizacija semena

Semena su sterilisana 70% (v/v) alkoholom u trajanju od 2 minuta, a zatim preneti u 2% rastvor NaOCl (v/v) u trajanju od 2 minuta, isprana su tri puta sterilnom destilovanom vodom, a zatim prosušena u sterilnim uslovima. Provera uspešnosti sterilizacije je obavljena tako što je po pet semena, iz grupe sterilisanih semena po biljci, postavljeno na HA podlogu i inkubirano na 30 °C/24 h. Odsustvo bakterijskih kolonija nakon inkubacije je smatrano indikatorom uspešne sterilizacije.

Priprema inokuluma i inokulacija semena

Bakterijske kulture stare 48 ili 72 h sa čvrstih hranljivih podloga (TSA za *B. megaterium* 11/3 i Fjodorova za *A. chroococcum* F8/2) su dodate u sterilan fiziološki rastvor (0,9% NaCl) do postizanja optičke 1 gustine 550 nm što odgovara brojnosti od $\approx 10^7$ CFU/ml (T70 UV/VIS Spectromer, PG Instruments LTD, Velika Britanija). Po jedna porcija sterilisanih semena od svake biljne vrste je potopljena u pripremljene bakterijske suspenzije i inokulisana u trajanju od 1 h na 28±2 °C/130 rpm (KS 260 basic, IKA, Staufen, Nemačka). Nakon ovog perioda semena su prosušena u sterilnim uslovima.

Gajenje biljaka

Pesak granulacije 1,5-2,0 mm (Fluidra Serbica, DOO Beograd, Srbija) je opran vodovodskom vodom i ispran sterilnom destilovanom vodom, a zatim sterilisan u autoklavu na 121 °C/20 minuta. Po 1 kg sterilnog peska je stavljeno u sterilne plastične bokseve (16 cm x 9 cm x 6 cm) uz dodatak 60 ml sterilnog Hoaglandovog rastvora u cilju obezbeđenja vlage i nutrijenata, konstantno održavanih u toku eksperimentalnog perioda. Semena biljaka, osim kukuruza i soje, postavljena su u ovako pripremljene bokseve. Semena soje i kukuruza postavljena su u staklene epruvete širine 3 cm i dužine 20 cm. Napunjene su do 10 cm visine kvarcnim peskom i dodato je 10 ml Hoaglandovog rastvora. Sudovi sa zasejanim biljnim materijalom su postavljeni u fitotron komoru. Uslovi gajenja za sve biljke bili su identični: temperatura od 26±1 °C; fotoperiod 10 h svetlost/14 h noć. Ogljed je trajao tri nedelje.

Hoaglandov rastvor	(ml/l)	Stok mikroelemenata	(g/l)
2M KNO ₃	2,5	H ₃ BO ₃	2,86
1M Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	2,5	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81
FeEDTA	1,5	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22
2M MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,051
1M NH ₄ NO ₃	1	H ₃ MoO ₄ ·xH ₂ O	0,09
1M KH ₂ PO ₄	0,5	Na ₂ MoO ₄ ·xH ₂ O	0,12
Mikroelementi	1		
pH	6		

4.4.2. Utvrđivanje stepena površinske i endofitne kolonizacije korena biljaka bakterijama *Azotobacter chroococcum* F8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3

Sposobnost sojeva da površinski i endofitno kolonizuju koren ispitana je kod biljaka kod kojih su u fazi germinacije postignuta povećanja u FGP i/ili vigoru. U slučaju *A. chroococcum* F8/2, to su bile: slačica (*Sinapsis alba* L.), pšenica (*Triticum aestivum* L.), kinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) kukuruz (*Zea mays* convar. *saccharata*), uljana repica (*Brassica napus* L.), soja (*Glycine max* L.), paradajz (*Solanum lycopersicum* L.) i krastavac (*Cucumis sativus* L.), dok je su za ogled sa *B. megaterium* 11/3 odabrane: slačica (*Sinapsis alba* L.), pšenica (*Triticum aestivum* L.), kukuruz (*Zea mays* convar. *saccharata*), uljana repica (*Brassica napus* L.) i krastavac (*Cucumis sativus* L.). Posle tri nedelje gajenja, korenovi mladih biljaka su odvojeni od nadzemnih delova u aseptičnim uslovima. Na osnovu jednog grama sveže mase korena napravljena je serija razređenja od 10¹-10⁹. Primenom odgovarajućih podloga i inkubacije od 24/48 h na temperaturi 28±2 °C utvrđena je brojnost na površini korena biljaka za svaki tretman pojedinačno. Brojnost *B. megaterium* 11/3 je utvrđena tako što je po 0,5 ml od svakog razređenja zasejavano u Petri kutije sa TSA podlogom, a brojnost *A. chroococcum* F8/2 je utvrđena na podlozi po Fjodorovu na koju je odgovarajuće razređenje u količini od 0,2 ml zasejavano metodom kapi (Somasegaran and Hoben, 1994). Inkubacija se je trajala 24-48 h na temperaturi 28±2 °C. Brojnost je izražena kao CFU/g svežeg korena.

4.4.3. Ispitivanje površinske kolonizacije korena biljaka skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM)

Sposobnost sojeva da površinski i endofitno kolonizuju koren ispitana je kod biljaka kod kojih su u fazi germinacije postignuta najveća procentualna povećanja u FGP i/ili vigoru. U slučaju primene *A. chroococcum* F8/2 kao inokulanta najveća procentualna povećanja izabranih parametara germinacije postignuta su kod pšenice (*Triticum aestivum* L.) i kukuruza (*Zea mays* convar.

saccharata), a u slučaju inokulacije sa *B. megaterium* 11/3 izabrane biljne vrste su bile pšenica (*Triticum aestivum* L.) i uljana repica (*Brassica napus* L.).

Priprema i inokulacija semena izabranih biljnih kultura i gajenje biljaka je podrazumevala primenu procedura opisanim u sekciji 4.4.1. Nakon tri nedelje rasta, izabrani korenovi biljaka pripremljeni su za postupak liofilizacije. Korenovi su postavljeni pojedinačno na aluminijmsku foliju u Petri kutije koje su zatim zatvorene parafilmom na kome su formirane tačkaste perforacije. Ovako pripremljene Petri kutije su bile izložene temperaturi od - 80 °C u tajanju 24 h nakon čega je izvršena njihova liofilizacija. Uzorci su smešteni u liofilizator (Alpha LSC 1-4 plus, Martin Christ, Nemačka) pri čemu su uzorci liofilizirani tokom 20 h na temperaturi od -20 °C, a nakon toga 4 h pri vakuumu od 0,05 mbar. Nakon liofilizacije, uzorci su čuvani u frižideru na temperaturi od 4 °C do momenta mikroskopiranja. Primenom uređaja BAL-TEC SCD 005 uzorci su naparvani tankim slojem 24-karatnog zlata, a zatim posmatrani na skenirajućem elektronskom mikroskopu (SEM Joel JSM-6390LV, SAD).

4.4.4. Ispitivanje površinske i endofitne kolonizacije korena biljaka konfokalnom laserskom skenirajućom mikroskopijom (CLSM)

Konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija (CLSM) je mikroskopska tehnika koja je primenjena za fluorescentno obojene uzorke u cilju preciznog trodimenzionalnog predstavljanja površinske i endofitne kolonizacije korena biljaka. Priprema preparata za mikroskopiranje podrazumevala je inokulaciju semena, gajenje biljaka i bojenje korena fluorescentnom bojom, propidium-jodidom (PI) (Acros Organics, Switzerland). Priprema i inokulacija semena pšenice, kukuruza, uljane repice i gajenje biljaka su izvedeni po procedurama opisanim u sekciji 4.4.1. Nakon tri nedelje rasta izabrani korenovi biljaka, po modifikovanom protokolu datim od strane Rothamsted Research Institute for Agricultural Sciences ([tps://www.rothamsted.ac.uk](https://www.rothamsted.ac.uk)), potopljeni su u radni rastvor fluorescentne boje u trajanju od 1 minut postavljeni na mikroskopsku pločicu, prekriveni pokrovnim staklom i mikroskopirani na konfokal-laser-skening mikroskopu Leica TCS SP5 II sa invertnim fluorescentnim modulom mikroskopa DMI 6000. Korišćen je 20x HC PL APO 20x/0.70 objektiv, a ekscitacija vršena 514 nm linijom Argon lasera. Primenjen je tip sekvencijalnog snimanja, u kojem je jedan kanal predstavljao fluorescentan signal propidijum jodida izmeren u opsegu talasnih dužina 600nm-700nm, i pseudooboje je crvenom bojom, dok je drugi kanal predstavljao signal transmisionog detektora (nijanse sive boje).

Priprema stok rastvora propidium jodida

Propidijum jodid (1 mg) je rastvoren u 1 ml sterilne destilovane vode. Stok rastvor je zaštićen aluminijumskom folijom od svetlosti i čuvan na 4 °C do upotrebe.

Priprema radnog rastvora propidium jodida

Stok rastvor (10 µl) prenet je u tubu sa 1 ml sterilne destilovane vode.

4.5. Uticaj mikrobiološkog tretmana na makro i mikromorfološke karakteristike korena i nadzemnog dela u ranoj fazi rasta

4.5.1. Ispitivanje uticaja mikrobiološkog tretmana na makromorfološke odlike korena

Priprema semena, inokulacija i postavljenje ogleda su bili u skladu sa protokolom opisanim u sekciji 4.3. Nakon tri nedelje, odabrano je po pet reprezentativnih biljaka po tretmanu. Korenovi su odvojeni od nadzemnih delova i izvršena je analiza makromorfoloških osobina primenom RoorSnap aplikacije (CDI Bio-Science, INC). Izmerena je njihova ukupna dužina, površina, volumen i prosečan prečnik. Takođe, izmerena je suva masa korenova i nadzemnih delova izabranih biljaka kao važnih indikatora vegetativnog rasta.

4.5.2. Ispitivanje uticaja mikrobiološkog tretmana na suhu masu korena i nadzemnog dela biljke u ranoj fazi rasta

U okviru ispitivanja uticaja bioprajinjanga na rast i razvoj biljka do tri nedelje starosti, izmerena je suva masa korena i nadzemnih delova kao važnih indikatora vegetativnog rasta. Odvojeni korenovi i nazemni delovi biljaka gajenih po proceduri opisanoj u sekciji 4.4.2. stavljeni su na sušenje (Binder, Nemačka) u trajanju od 24 h na 90 °C do postizanja konstantne mase koja je zatim izmerena.

4.5.3. Uticaj inokulacije *Azotobacter chroococcum* F8/2 na mikrostrukturu korena šećerne repe

Semena šećerne repe su sterilisana i inokulisana po proceduri opisanoj u sekciji 4.4.1. Po 25 semena po tretmanu (inokulacija i kontrola) je postavljeno u plastične kutije (500 x 280 x 55 mm) napunjene komercijalnim supstratom (Klasmann-Dilmann, Nemačka). U ambijentalnim uslovima sa prosečnom temperaturom 20 °C, vlagom 63% i svetlosnim režimom od 16 h uz dodavanje sterilne destilovane vode u supstrat (10 ml) biljke su gajene tri sedmice. Broj proklijalih biljaka po tretmanima je zabeležen i finalni procenat germinacije izračunat. Po pet reprezentativnih biljaka je uzeto i odvojeni su korenovi u dužini od 5 cm, fiksirani 50% alkoholom (v/v) i učvršćeni parafinom. Pomoću mikrotoma, delovi debljine 8-12 µm su isečeni i obojeni po proceduri opisanoj od strane Ruzin (1999). Poprečni preseki kontrolnih i inokuliranih korenova su posmatrani mikroskopom (Leica DM2000, Nemačka), a primenom softvera Leica IM1000 uzorci su slikani i izmerena je oblast primarnog i sekundarnog ksilema, broj ćelija parenhima, vrednost zapremine 10 najvećih parenhimskih ćelija, površina 10 sprovodnih sudova i oblast ćelija parenhima.

4.6. Ispitivanje uticaja organskih isparljivih metabolita (VOC) bakterija na klijance

Pasivni difuzioni sistem je korišćen za utvrđivanje uticaja isparljivih metabolita produkovanih od strane izolata na klijance. U jednu polovinu Petri kutije izlivena je sterilna hranljiva podloga i to po Fjodorovu za ispitivanje uticaja isparljivih metabolita *A. chroococcum* F8/2, a TSA za ispitivanje *B. megaterium* 11/3. Po 20 µl bakterijske suspenzije gustine koja odgovara OD₅₅₀ 1 (≈ 10⁷ CFU/ml; T70 UV/VIS Spectromer, PG Instruments LTD, UK) *A. chroococcum* F8/2, odnosno *B. megaterium* 11/3 zasejano je površinski. U drugu polovinu Petri kutije postavljen sterilan filter papir (Wathsmann, No.1) uz dodatak 1 ml sterilne vode u cilju obezbeđenja vlage neophodne za germinaciju semena. Semena sterilisana po postupku opisanom u sekciji 4.4.1., postavljena su na vlažni filter papir nakon čega su Petri kutije zatvorene parafilmom. U varijanti kontrole, izlivena podloga nisu inokulisane odabranim bakterijskim sojevima. Po 18 semena je postavljeno u tri ponavljanja po biljnoj vrsti. Ovako pripremljena semena su klijala u uslovima sobnog režima u periodu od sedam dana. Po završetku oglada, 12 reprezentativnih klijanaca po tretmanu izabrano je za merenje sveže mase, a nakon sušenja na temperaturi od 90 °C/24 h izmerena je njihova suva masa.

4.7. Statistička obrada podataka

Testiranje statističke značajnosti razlika između inokuliranih i kontrolnih uzoraka u ogleđima germinacije, morfometrije korena, ispitivanja vrednosti mase korena i nadzemnog dela i uticaja VOC-a na masu klijanca, podrazumevalo je primenu Shapiro Wilk i Kolmogorov testova za proveru normalnosti podataka i t-testa za nezavisne uzorke. Za statističku razliku uzet je nivo značajnosti $p \leq 0,05$. Analiza je sprovedena na softveru SPSS 21.0 (IBM, Chicago, USA).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Karakterizacija i identifikacija sojeva roda *Azotobacter* i *Bacillus*

Rizobakterije koje stimulišu rast i razvoj biljaka, PGPR, poslednjih godina sve više nalaze primenu u održivoj poljoprivredi u zemljama širom sveta. PGPR utiču na rast biljaka proizvodnjom i oslobađanjem sekundarnih metabolita (regulatora rasta biljaka), smanjujući ili spečavajući štetne efekte fitopatogenih organizama u rizosferi i/ili olakšavajući dostupnost i unos određenih nutrijenata iz rizosfere. PGPR ublažavaju stres, povećavaju produktivnost biljaka i poboljšavaju kvalitet zemljišta direktnim i indirektnim mehanizmima.

Izbor efektivnog PGPR-a je najkritičniji korak za postizanje maksimalnog efekta ove tehnologije zbog čega primena novih PGPR-a sojeva mikroorganizama u bioprajinu semena i njihova komercijalizacija podrazumeva temeljnu identifikaciju i karakterizaciju.

Poznato je da samo oko 1-5 % rizosfernih bakterija ima ovaj potencijal (Barriuso et al., 2008), među kojima su i rodovi *Bacillus* i *Azotobacter* kao najčešće korišćeni biofertilizatori (Hindersah et al., 2021). Upravo zbog potencijalno brojnih mehanizama stimulacije rasta biljaka, velike rasprostranjenosti u zemljištu i mogućnosti primene u održivoj poljoprivredi istraživanje je obuhvatilo rodove *Azotobacter* i *Bacillus*. Istraživanje je podrazumevalo ispitivanje morfoloških i ekoloških karakteristika, a u cilju određivanja filogenetske pripadnosti primenjena je molekularna identifikacija. Takođe, izvršena je identifikacija mehanizama stimulacije biljnog rasta. *Azotobacter* je poznat po svojim stimulativnim efektima na rast i prinos useva kroz biološku azotofiksaciju, biosintezu biološki aktivnih supstanci, stimulaciju rasta mikroba u rizosferi i proizvodnji inhibitora fitopatogena (Lenart, 2012). Vrste ovog roda bakterija formiraju ciste koje im pomažu da prežive oscilacije temperature i dostupnosti vode (Aasfar et al., 2021). Svi ovi kapaciteti daju mogućnost primene u proizvodnji biostimulatora koji mogu da smanje prekomernu upotrebu mineralnih đubriva (Aasfar et al., 2021). Rod *Bacillus* zbog sposobnosti formiranja spora koje doprinose stabilnosti, lakoći rukovanja tokom proizvodnje bioinokulanata kao i produženju roka trajanja postaje obećavajuća PGPR u održivoj biljnoj proizvodnji (Liu et al., 2022d). *Bacillus* spp. može poboljšati snabdevanje biljaka sa esencijalnim nutrijentima (kao što su P i N), doprineti smanjenju primene mineralnih đubriva i zagađenju zemljišta i voda, čime se promoviše održivi razvoj poljoprivrede. Inokulacija *Bacillus* spp. povećava brojnost korisnih bakterija na korenu biljaka i stimuliše produkciju korenskih izlučevina što rezultira stimulacijom rasta biljaka (Sanchez-Lopez et al., 2011). Osim toga, nedavno istraživanja sa *B. licheniformis* (FMCH001) ukazuju da inokulacija može poboljšati efikasnost korišćenja vode kod kukuruza kako u uslovima navodnjavanja tako i u pod uslovima stresa suše (Akhtar et al., 2020).

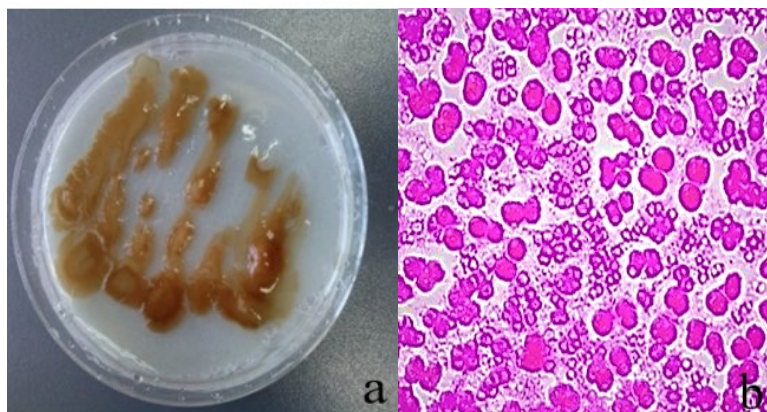
Vrste roda *Azotobacter* pripadaju γ -Proteobacteria porodici *Azotobacteraceae*. Predstavnici porodice *Azotobacteraceae* su koherentna grupa aerobnih, slobodnoživećih, heterotrofnih bakterija čija je glavna karakteristika sposobnost da fiksiraju atmosferski (molekularni) azot iz vazduha (Becking, 2006).

Vrste roda *Bacillus* su široko rasprostranjene u agroekosistemima i pripadaju carstvu *Bacteria*, filum *Firmicutes*, klasi *Bacilli*, red *Bacillales* i familiji *Bacillaceae* (Maughan and van der Auwera, 2011). Među predstavnicima roda *Bacillus* nalaze se brojni PGPR koji različitim aktivnostima kao što su solubilizacija fosfata, sinteza siderofora, fitohormona i imaju dominantnu ulogu kao biokontrolni agensi (Calvo et al., 2020) i biokompatibilni su sa azotofiksatorima (*Azospirillum* i *Azotobacter*) što ih čini odličnim ko-inokulantima (Kashyap et al., 2019).

5.1.1. Morfološke karakteristike kolonija i ćelija

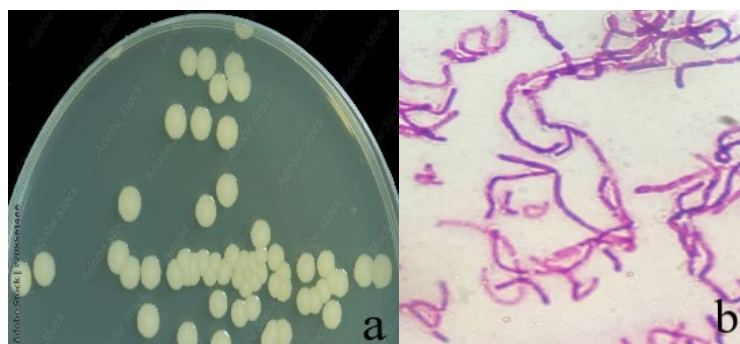
U istraživanjima su utvrđene mikro- i makromorfološke karakteristike bakterijskih sojeva, kroz praćenje rasta i izgleda kolonija na hranljivim podlogama, produkciju pigmenata, veličinu i oblik ćelija, bojenje po Gramu, prisustvo flagela, kapsula, cista i spora.

Na selektivnoj, bezazotnoj Fjodorovoj podlozi kolonije izolata F8/2 rastu iznad ravni podloge, zaravljene su na vrhu, gumaste i mukoidne, transparentne u ranoj fazi rasta uz produkciju tamnog pigmenta sa starenjem kolonija (Slika 2a). Mikroskopiranjem uočeno je da su ćelije Gram negativne, organizovane pojedinačno ili u paru (Slika 2b). Ovalni oblik ćelija je dominantan, ali se mogu uočiti i štapićaste forme. Ćelije stvaraju veliku količinu kapsularne sluzi i formiraju ciste kao odgovor na nepovoljne uslove okruženja. Mikrobnii inokulanti su u zemljištu osetljiviji na smanjeni sadržaj nutrijenata u odnosu na laboratorijske uslove i često moraju da se bore za resurse sa autohtonom mikrobnom zajednicom, što može da rezultira smanjenjem njihove brojnosti (Souza et al., 2015). Zbog toga sposobnost formiranja cista ili spora je važna odlika bioinokulanata u održivoj biljnoj proizvodnji, jer omogućava opstanak i održavanje mikrobnog diverziteta (Jones and Lennon, 2010). Ciste su otpornije na štetna delovanja isušivanja i povećano UV zračenje u odnosu na vegetativne ćelije (Socolofsky and Wyss, 1962). One sadrže redukovanu kopiju vegetativne ćelije u svom centralnom telu i u uslovima optimizacije faktora okruženja započinje njihova germinacija (ekscitacija) i oslobađanje nove vegetativne ćelije koja nastavlja dalju deobu (Kumari et al., 2017). Ispitane morfološke karakteristike izolata F8/2 su u skladu sa ranije opisanom morfologijom *Azotobacter* spp. (Bergey and Holt, 2000).



Slika 2: Morfološke karakteristike *Azotobacter chroococcum* F8/2 a) izgled kolonije *A. chroococcum* F 8/2 na Fjodorovoj podlozi b) morfologija ćelija *A. chroococcum* F 8/2; uveličanje 1000x.

Na TSA podlozi kolonije izolata 11/3 su krupne, nejednake veličine, beličasto-krem pigmentacije koja sa starenjem postaje tamno-žuta. Kolonije su jasno ograničenih ivica, konveksne, glatke i sjajne (Slika 3a). Morfološke karakteristike kolonija izolata 11/3 su u skladu sa morfološkim odlikama *Bacillus* spp. (Bergey and Holt, 2000) Mikroskopiranjem preparata utvrđeno je da su ćelije Gram pozitivne, krupne, štapićastog oblika, pojedinačne ili organizovane u kraćim lancima (Slika 3b) sa sposobnošću formiranja spora. Formiranje spora predstavlja mehanizam preživljavanja bakterijske ćelije, to je forma otporna na fizičke i hemijske agense, ekstremne temperaturne uslove, sušu, povećan salinitet i radijaciju. Prisustvo endospora omogućava široku rasprostranjenost i perzistenciju roda *Bacillus* u različitim uslovima sredine.



Slika 3: Morfološke karakteristike *Bacillus megaterium* 11/3 a) izgled kolonije *B. megaterium* 11/3 na TSA podlozi b) morfologija ćelija *B. megaterium* 11/3; uveličanje 1000x.

5.1.2. Molekularna identifikacija bakterijskih sojeva

PCR je brza i jeftina tehnika kojom je moguće na jednostavan način umnožiti željeni region DNK. U cilju molekularne analize umnožavaju se odabrani regioni DNK zahvaljujući DNK prajmerima, specifičnim za DNK region od interesa.

Nakon što je izolovana DNK, primenjena je amplifikacija sekvence 16S rDNK koja je esencijalna za ćelijsku funkciju i visoko specifična za svaku bakterijsku vrstu. Smatra se “zlatnim standardom” u identifikaciji novih bakterijskih izolata. Takođe, u slučaju izolata F8/2, identifikacija je upotpunjena amplifikacijom *nif* regiona (Carrion et al., 2015) odgovornog za kodiranje nitrogenaze. Dobijene sekvence izolata su poređene sa postojećim sekvencama iz GenBank baze podataka, čime je izvršena identifikacija do nivoa vrste.

Dobijena 16S rDNK sekvenca izolata F8/2 pokazala je najveći stepen nukleotidne sličnosti (97,55%) sa *Azotobacter chroococcum* soj 59A koji je izolovan iz zemljišta i *Azotobacter chroococcum* AZE-8 izolovanog iz rizosfere leguminoza. Dobijena *nif* sekvenca ima najveću sličnost (98%) sa *Azotobacter chroococcum* soj B3 izolovanog iz zemljišta.

Sekvenca izolata 11/3 je pokazala najveću sličnost (99,64%) sa *Bacillus megaterium* sojevima 65-Y918, SX11 i SX10 koji su izolovani iz rizosfernog zemljišta kao halo-tolerantna mikroflora.

Pristupni brojevi novih i sličnih sekvenci dati su u Tabeli 5.

Tabela 5: Pristupni brojevi dobijenih sekvenci i sojevi sa najvećom sličnošću

Izolat	GenBank pristupni brojevi	Slični sojevi	Pristupni brojevi
<i>Azotobacter chroococcum</i> F8/2	MZ 188902 (16S rDNK sekvenca)	<i>A. chroococcum</i> 59A	JX096396
		<i>A. chroococcum</i> AZE-8	MK53789
	MZ 230598 (<i>nif</i> sekvenca)	<i>A. chroococcum</i> B3	CP011835
<i>Bacillus megaterium</i> 11/3	ON 478151 (16S rDNK sekvenca)	<i>B. megaterium</i> 65-Y918 <i>B. megaterium</i> SX11 <i>B. megaterium</i> SX10	KU647258.1 MF431757.1 MF431756.1

5.1.3. Ekološke karakteristike *Azotobacter chroococcum* F 8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3

Abiotički faktori značajno utiču na rast i aktivnost zemljišnih bakterijskih populacija i rast biljaka i mogu biti glavni ograničavajući faktori rasta i prinosa biljaka, uzrokujući nisku produktivnost i ugrožavajući globalnu sigurnost proizvodnje hrane. Zbog toga je od posebnog značaja proučavanje složenih biljno-mikrobnih interakcija kao i uticaj bakterijskih populacija na toleranciju biljaka na abiotički i biotički stres. Globalna poljoprivredna proizvodnja teži ekonomskoj i ekološkoj održivosti, što stvara potrebu za smanjenjem upotrebe mineralnih đubriva i povećanjem tolerancije biljaka na abiotički i biotički stres (Lopes et al., 2021). Primena mikroorganizama koji stimuliraju rast biljaka (*Plant Growth Promoting Microorganisms*, PGPM) potencijalno je korisna tehnika za poboljšanje produktivnosti useva, kvalitet i sigurnost hrane u ekološki prihvatljivijim poljoprivrednim sistemima (Mimmo et al., 2018). Ovi organizmi imaju sposobnost da kolonizuju koren biljaka, pružaju dobrobit svojim domaćinima modulirajući proizvodnju fitohormona, povećavajući dostupnost nutrijenata u zemljištu i otpornost na abiotičke i biotičke faktore. Za povećanje uspeha u korišćenju mikrobne biotehnologije potrebno je znati kako optimizovati interakcije biljke i PGPM i kako PGPM reaguju na promenjive uslove životne sredine, budući da su kopneni ekosistemi sve više pod antropogenim uticajima. Stoga je od posebnog značaja izbor PGP (*Plant Growth Promoting*) sojeva koji se odlikuju dobrom adaptibilnom sposobnošću na faktore okruženja kako bi preživeli u stresnim uslovima u agroekosistemu.

Visoke ili niske temperature u velikoj meri utiču na rast mikroorganizama čak i u situacijama kada postoji balans u nutrijentima, optimalna vlaga i prisustvo kiseonika (Wei, 2020). Temperatura je jedan od najvažnijih činilaca koji utiču ne samo na rast već i metaboličku aktivnost mikroorganizama (Paul and Clark, 1988). Optimalni temperaturni opseg za većinu zemljišnih bakterija je 23-26 °C, međutim, svaka bakterijska vrsta ima posebne temperaturne zahteve za aktivnost svojih enzima i kod većine ona je najveća oko 30 °C, a daljim povećanjem temperature se smanjuje (Bajard et al., 1996; Wei, 2020). Kachhap et al. (2015) su istakli da posebno visoke temperature usled zagrevanja zemljišta mogu negativno uticati na mikrobnu populaciju rizosfere. Zato je važna termotolerantnost PGPR koja omogućava ne samo njihov opstanak, već i dominantnost u mikrobiomu rizosfere i zadržavanje osobina stimulatora biljnog rasta (Chitara et al., 2017).

PGPR koji mogu da opstanu u širokom pH opsegu od 4-12 imaju veću šansu za opstanak u rizosferi u odnosu na mikroorganizme koji nemaju visok prag pH-tolerancije (Chari et al., 2018; Kumar et al., 2019). Veliki broj mikrobnih biohemijskih procesa je rezultat aktivnosti egzogenih enzima koji su izuzetno osetljivi na pH vrednost (Lynch, 1995). Tako na primer, aktivnost kiselih i alkalnih fosfataza je direktno zavisna od pH vrednosti; proces nitrifikacije se inhibira na pH < 7,5 (Lynch, 1995), dok je aktivnost siderofora značajnija za alkalnija zemljišta (Lurthy et al., 2020). Zbog različitog odnosa PGPR prema pH vrednosti zemljišta, u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji se najčešće razmatra primena PGPR kao konzorcijuma.

Povećanje saliniteta zemljišta je globalno jedan od najvećih i najprisutnijih abiotičkih faktora stresa pod čijim je uticajem 50% kultiviranog zemljišta (Abbas et al., 2019). Povećane koncentracije jona natrijuma i hlora dovode do toksičnosti, jonskog disbalansa i redukcije apsorpcije drugih nutrijenata (Chinnusamy et al., 2005). To za posledicu ima inhibiciju biljnog rasta i smanjenje prinosa. Povećana koncentracija jona natrijuma redukuje ulazak kalijumovih jona što vodi poremećaju enzimske aktivnosti, osmotskog balansa i funkcionisanja stoma (Singh et al., 2013b). Ekstremne koncentracije natrijuma dovode do promena u procesima germinacije, zrenja i cvetanja (Kaya et al., 2006; Singh et al., 2013b). Produkcijom različitih organskih i neorganskih jedinjenja PGPR zajednica može da pomogne biljkama u uslovima povećanog saliniteta u rizosferi. Dobar primer je produkcija egzopolisaharida i hidrofilnih biofilmova koji formiraju zaštitne zone oko korena u uslovima povećane koncentracije toksičnih Na⁺ jona ne dozvoljavajući transport u biljno tkivo (Morcillo and Manzanera, 2021).

Rast *Azotobacter chroococcum* F8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3 pri različitim temperaturama

A. chroococcum F8/2 je tipična mezofilna bakterija koja pokazuje najbolji rast na temperaturi od 30 °C. Slab rast je konstatovan na temperaturi od 15, 20 i 40 °C. Ispod 15 °C i iznad 40 °C nije konstatovan rast (Tabela 6).

Tabela 6: Rast *Azotobacter chroococcum* F8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3 pri različitim temperaturama

Bakterijski sojevi	Temperatura (°C)											
	4	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
<i>A. chroococcum</i> F8/2	-	-	+	+	++	+++	++	+	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i> 11/3	-	+	+	++	+++	+++	++	+	+	-	-	-

+ slab rast; ++ umeren rast; +++ značajan rast

Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima. Mukhtar et al. (2018) su ispitivali uticaj temperature od 25 do 40 °C na rast *A. vinelandii* i *A. chroococcum* IIB-3 i utvrdili da su maksimalan rast ispitivani sojevi pokazali na temperaturi od 30 °C. Spor rast na 20 °C i vrlo brz i dobar rast u intervalu od 28-34 °C. Za *Azotobacter* sp. temperatura je jedan od najvažnijih faktora koji utiču na sposobnost azotofiksacije (Dar et al., 2021).

B. megaterium 11/3 je rastao u vrlo širokom temperaturnom opsegu 1-45 °C, dok je najbolji rast uočen u temperaturnom opsegu od 20-35 °C (Tabela 6). Sposobnost rasta u širokom temperaturnom opsegu izolata vrste *B. megaterium* je potvrđena u brojnim ispitivanjima. Gibson i Gordon (1974) su za *B. megaterium* utvrdili da je optimalna temperatura 30-37°C, maksimalna 40-45°C, dok granične vrednosti za slab rast su 3-10°C. Stahl i Olsson (1997) su ispitivanjem 12 sojeva *B. megaterium* utvrdili da su tri soja rasla na 55 °C, dok kod ostalih sojeva maksimalna temperatura rasta bila je do 46 °C. Thant et al. (2018) su ispitivanjem pet sojeva *B. megaterium* utvrdili da je optimalan rast pri 30-44 °C, s tim da je na 42°C došlo do smanjenja stope brzine rasta. Na temperaturi od 45 °C nije bili rasta, osim kod jednog soja. Termotolerantnost Gram pozitivnih bakterija može se objasniti prisustvom peptoglikana koji je prisutan u ćelijskom zidu 90% i doprinosi rezistenciji mikroorganizma na toplotu (Andriani et al., 2017).

Rast *Azotobacter chroococcum* F 8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3 pri različitim pH vrednostima

Najveći broj zemljišnih bakterija u odnosu na optimalnu pH vrednost pripada grupi neutrofilnih organizama, ali opseg njihovog opstanka je značajno veći. *A. chroococcum* F 8/2 je pokazao sposobnost rasta u opsegu pH vrednosti 5,5-9,5. Ova široka amplituda za rast, u odnosu na pH, omogućava rast i aktivnost izolata u različitim uslovima u zemljištu, od kiselih do alkalnih sredina. Optimalan rast je evidentiran u pH intervalu 6,5-8. Slab rast je uočen na pH 5,5, 6, 8,5, 9 i 9,5 (Tabela 7).

Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima. Jain et al. (2021) su testirali 24 *Azotobacter* soja na različite pH vrednosti i utvrdili da je kod svih sojeva rast bio prisutan na pH 6; po 4 soja su pokazala rast na pH 4 i pH 8, dok je samo jedan soj pokazao sposobnost rasta na pH 10. Jimenez et al. (2011) su pH 6-7 definisali kao optimalnu za *Azotobacter* sojeve izolovane iz rizosfernog zemljišta različitih useva.

B. megaterium 11/3 preživljava u opsegu pH 4,5-10, što ukazuje na veliku adaptibilnu sposobnost. Dobar rast je uočen na pH 6-9, što može biti od značaja kada je u pitanju solubilizacija fosfata, jer pH vrednosti između 6-7,5 su najoptimalnije za ovaj metabolički proces (Thant et al., 2018). Soj je slabo rastao na pH 4,5; 5; 5,5; 9,5 i 10. Na pH vrednostima nižim od 4,5 i višim od 10 nije bilo rasta, što je u skladu sa rezultatima ranijih istraživanja. *B. megaterium* G18 je pokazao sposobnost adaptacije na nisku pH vrednost i slab rast je zabeležen na pH 4,5 (Goswami et al.,

2018), dok su Thant et al. (2018) zabeležili prisustvo rasta svih sojeva pri pH 9, a samo jedan soj je pokazao odsustvo rasta pri pH 5.

Tabela 7: Rast *Azotobacter chroococcum* F 8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3 pri različitim pH vrednostima

Bakterijski sojevi	pH vrednost													
	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10	10,5
<i>A. chroococcum</i> F8/2	-	-	-	+	+	+++	+++	+++	++	+	+	+	-	-
<i>B. megaterium</i> 11/3	-	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-

+ slab rast; ++ umeren rast; +++ značajan rast

Rast *Azotobacter chroococcum* F 8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3 pri različitim koncentracijama NaCl

Imajući u vidu povećanje saliniteta poljoprivrednih zemljišta, istraživanje je obuhvatilo i ispitivanje odnosa testiranih sojeva prema koncentraciji NaCl. *A. chroococcum* F 8/2 pokazao je sposobnost rasta na podlogama obogaćenim NaCl od 3 i 5%, dok na koncentraciji od 7% nije bilo rasta (Tabela 8). Jain et al. (2021) gajenjem 24 soja u Jensen medijumu pri koncentraciji NaCl od 1 do 4% potvrdili su značajan rast kod svih sojeva, a povećanjem koncentracije NaCl na 5% umeren rast je bio prisutan kod 20 sojeva. Pri koncentraciji NaCl od 7%, 13 je pokazalo slab rast, a kod preostalih 7 sojeva nije bilo rasta. Chennappa et al. (2016) kod ispitivanih sojeva *A. chroococcum*, *A. vinelandii* i *A. salinestrus* su utvrdili sposobnost rasta pri maksimalnoj koncentraciji NaCl od 8%. Navedena svojstva ukazuju na mogućnost primene *Azotobacter* sp. u zemljištima povećanog saliniteta. Rezultati do kojih je došao Rojas-Tapias et al. (2012) su potvrdili mogućnost primene *Azotobacter* sp. u borbi protiv povećanog saliniteta kod kukuruza, gde je imao ulogu posrednika u nutritivnom ciklusu.

Tabela 8: Rast *Azotobacter chroococcum* F 8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3 pri različitim koncentracijama NaCl

Bakterijski sojevi	Koncentracija NaCl (%)		
	3	5	7
<i>A. chroococcum</i> F8/2	+++	+	-
<i>B. megaterium</i> 11/3	+++	+++	+

+ slab rast; ++ umeren rast; +++ značajan rast

B. megaterium 11/3 pokazao je značajan rast na podlozi obogaćenoj NaCl u koncentraciji od 3 i 5%, dok je slab rast bio prisutan na koncentraciji od 7% (Tabela 8). Slabi halofili imaju optimalan rast na koncentraciji NaCl od 1 do 3%, a umereni pri 3-15% NaCl (Ventosa et al., 2008). S obzirom da soj *B. megaterium* 11/3 raste i na koncentraciji soli od 7% može se kategorisati u grupu halofila što ga čini značajnim PGP potencijalom u zemljištima velikog saliniteta. *B. megaterium uyuni* S29 je pokazao sposobnost rasta i metaboličke aktivnosti u sredinama sa koncentracijom NaCl od 5 i 10%, dok je optimalan rast na koncentraciji NaCl od 4,5% (Rodriguez-Contreras et al., 2015). Thant et al. (2018) su utvrdili sposobnost rasta pet ispitivanih sojeva *B. megaterium* na koncentracijama od 3-6% i da je rast moguć i na znatno većim koncentracijama soli, ali uz neophodan period adaptacije nakon kojeg bakterije mogu ponovo da rastu i budu aktivne.

5.2. Mehanizmi stimulacije biljnog rasta sojeva *Azotobacter chroococcum* F8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3

PGPR pružaju višestruku korist biljkama putem različitih mehanizama kao što su solubilizacija nutrijenata, sinteza siderofora, fitohormonalna modulacija, produkcija organskih isparljivih metabolita i biokontrolna aktivnost. Brojna istraživanja su potvrdila svojstva stimulatora biljnog rasta za rodove *Azotobacter* sp. i *Bacillus* sp. (Wani et al., 2013; Agbodjato et al., 2015; Matos et al. 2017; Saeid et al., 2018). Vrste roda *Azotobacter* su široko rasprostranjene u različitim tipovima zemljišta, u vodenim ekosistemima i rizosferi različitih biljnih vrsta. Osnovni mehanizam stimulacije rasta biljaka *A. chroococcum* je uloga u ciklusu azota u prirodi, u fiksaciji elementarnog oblika i prevođenju u amonijum jone. Osim što je model organizma za proučavanje diazotrofa, *Azotobacter* sp. odlikuje i izrazita produkcija fitohormona poput IAA, giberelina, citokinina (Wani et al., 2013), siderofora (Tindale et al., 2000), egzopolisaharida (Gauri et al., 2012), sposobnost solubilizacije P, K, Zn, Cu, S i Mn, antifungalna aktivnosti i tolerancija na herbicide (Inamdar et al., 2000). *Bacillus* sp. različitim mehanizmima kao što je produkcija organskih kiselina (mlečna, oksalna, propionska, acetatna) solubilizuju neorganski fosfor, a produkcijom kiselih fosfataza mineralizuju organski fosfor (Saeid et al., 2018). Imajući ovo u vidu, kod izabranih sojeva u ovom eksperimentalnom delu, primenom različitih testova okarakterisane su PGP karakteristike.

5.2.1. Enzimska aktivnost *Azotobacter chroococcum* F8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3

Primenom API ZYM testa utvrđena je sposobnost produkcije velikog broja enzima koji su značajni u procesu razlaganja organske materije (Tabela 9). Visoka enzimska aktivnost sojeva obezbeđuje njihovu važnu ulogu u nutritivnom ciklusu biljaka.

A. chroococcum F8/2 pokazao je izuzetnu aktivnost alkalnih i kiselih fosfataza i umerenu aktivnost naftol-AS-BI fosfohidrolaza. *B. megaterium* 11/3 učestvuje u mineralizaciji organske forme fosfora zahvaljujuću sposobnosti sinteze kiselih, alkalnih fosfataza i naftol-AS-BI fosfohidrolaza (Tabela 9). Ovi rezultati ukazuju na značaj testiranih sojeva u snabdevanju biljaka sa fosforom. Organske rezidue sadrže značajnu količinu fosfora i doprinose njegovom brzom oslobađanju nakon što su inkorporirane u zemljište (Krey et al., 2013). Organske forme fosfata su inozitol-fosfati, fosfolipidi, glukozofosfati, adenzin-di-fosfat (ADP), adenzin-tri-fosfat (ATP), nukleoproteini (Borie et al., 1989). Proces mineralizacije ovih jedinjenja je ključan u kruženju fosfora pri čemu primarnu ulogu u procesu transformacije imaju mikrobni i biljni enzimi (Santana et al., 2016). Među enzimima mikroorganizama, najveću ulogu u mineralizaciji organskog fosfora imaju fosfataze (Greaves and Webley, 1965). U odnosu na optimalnu pH vrednost na kojoj ispoljavaju svoju aktivnost klasifikovane su na kisele (pH < 6) i alkalne (pH > 8) (Rodriguez et al., 2006).

Zbog značajne aktivnosti obe grupe fosfataza, *A. chroococcum* F8/2 ima potencijal biofertilizatora, jer inokulacija zemljišta i semena fosfosolubilizatorima može smanjiti upotrebu mineralnih đubriva i uticati na oporavak slabo produktivnog poljoprivrednog zemljišta (Krey et al., 2013; Selvi et al., 2017). Aktivnost α -glukozidaza je konstatovana kod oba izolata što ukazuje na ulogu u procesu transformacije skroba do glukoze, a aktivnost β -glukozidaze konstatovana kod *B. megaterium* 11/3 ukazuje na potencijalnu ulogu u transformaciji celuloze. *A. chroococcum* F/2 se odlikuje aktivnošću leucin arilamidaze i umerenom enzimskom aktivnošću esteraza, esteraza lipaza, tripsina, naftol-AS-BI-fosfohidrolaza i α -galaktozidaza, dok sinteza ostalih enzima koji su obuhvaćeni ovim testom nije potvrđena. *B. megaterium* 11/3 ima sposobnost da doprinese hidrolizi jedinjenja proteinske prirode zahvaljujući katalitičkoj aktivnosti tripsina i himotripsina.

Tabela 9: Enzimaska aktivnost soja *Azotobacter chroococcum* F 8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3

Enzim	Supstrat	<i>Azotobacter chroococcum</i> F 8/2	<i>Bacillus megaterium</i> 11/3
Alkalna fosfataza	2-naftil fosfat	++	+
Esteraza (C 4)	2-naftil butirat	+	+
Esteraza lipaza (C 8)	2-naftil kaprilat	+	+
Lipaza (C 14)	2-naftil miristat	-	-
Leucin arilamidaza	L-leucil-2-naftilamid	++	-
Valin arilamidaza	L-valil-2-naftilamid	-	-
Cistein arilamidaza	L-cistol-2-naftilamid	-	+
Tripsin	N-benzoil-DL-arginin-2-naftilamid	+	+
α -himotripsin	N-glutaril-fenilalanin-naftilamid	-	+
Kisele fosfataze	2-naftil-fosfat	++	+
Naftol-AS-BI fosfohidrolaza	Naftol-AS-BI-fosfat	+	+
α -galaktozidaza	6-Br-2-naftil- α D-galaktopiranozid	+	+
β -galaktozidaza	2-naftil- β D-galaktopiranozid	-	+
β -glukuronidaza	Naftil-AS-BI- β D-glukuronid	-	-
α -glukozidaza	2-naftil- α D-glukopiranozid	++	+
β -glukozidaza	6-Br-2-naftil- β D-glukopiranozid	-	+
N-Acetil- β -glukoaminidaza	1-naftil- α L-glukopiranozid	-	-
α -manozidaza	6-Br-2-naftil- α D-manopiranozid	-	-
α -fukozidaza	2-naftil- α L-fukopiranozid	-	-

+ umerena enzimaska aktivnost; ++ izrazita enzimaska aktivnost; - nije uočena enzimaska aktivnost

Enzimaska aktivnost *B. megaterium* 11/3 i *A. chroococcum* F8/2 (Tabela 9) pokazala je da ovi sojevi aktivno učestvuju u procesu kruženja biljnih nutrijenata kao što su fosfor i azot i tako doprinose ishrani biljaka ovim nutrijentima.

5.2.2. Sinteza indol-3-sirćetne kiseline (IAA)

Fitohormon indol-3-sirćetna kiselina (IAA) je najčešći auksin koji se nalazi u prirodi i proizvode ga biljke i bakterije putem sličnog biosintetskog puta. Sinteza IAA spada u direktan mehanizam stimulacije rasta biljaka (Figueiredo et al., 2016). Auksini koje proizvode PGPR, pospešuju rast korena, a snažan rast korena poboljšava kondiciju biljke usled poboljšanog unosa vode i hranjivih materija (Kurepa and Smalle, 2022). Osim toga, auksin može poboljšati toleranciju na biotički i abiotički stres biljka (Numan et al., 2018).

A. chroococcum F8/2 je sintetisao IAA, dok isto svojstvo nije potvrđeno kod *B. megaterium* 11/3, iako istraživanja pokazuju da predstavnici roda *Bacillus* mogu sintetisati IAA (Wagi and Ahmed, 2019).

U slučaju diazotrofa, ovo svojstvo može imati i indirektan uticaj na poboljšanje azotofiksacije. To pokazuje istraživanje Defez et al. (2016) kojim je utvrđeno da povećanjem sinteze IAA kod transformisanih diazotrofa *Enterobacter cloacae* RCA25 i *Klebsiella variicola* RCA26 dolazi do pojačane aktivnosti nitrogenaza i azotofiksacije. Takođe, degradirani mikrobni

auksin u zemljištu može imati i ulogu nutrijenta (Scott et al., 2013). *A. chroococcum* F 8/2 je pokazao sposobnost produkcije auksina u koncentraciji od 10 µg/ml u prisustvu triptofana. (Tabela 12; Slika 4). Dobijena vrednost je u skladu sa rezultatima brojnih istraživanja. Brakel and Hilger (1965) su utvrdili vrednost biosinteze auksina od 11 µg/ml kod *A. chroococcum*. Ispitivanjima Ahmad et al. (2005) pokazano je da se produkcija IAA od strane *Azotobacter* spp. može kretati u intervalu od 7,3-32,8 µg/ml, a kasnijim istraživanjima Ahmad et al. (2008) na *Azotobacter* sojevima utvrđena je sinteza auksina u opsegu od 1,27-13,47 µg/ml. Patil (2011) je ispitivao sposobnost produkcije auksina kod tri *Azotobacter* soja. Soj oznake Azb 5 sintetizovao je 14,35 µg/ml, soj Azb 3 11,53 µg/ml, a soj Azb 7,25 µg/ml. Bjelic et al. (2015) su kod testiranih *Azotobacter* sojeva utvrdili sintezu IAA do maksimalne koncentracije od 50,38 µg/ml. Alkurtany and Yseen (2019) su potvrdili najveću koncentraciju sintetizovane IAA kod *A. chroococcum* 28,6 µg/ml, zatim *A. vinelandi* 23 µg/ml i *A. beijerinckii* 17,4 µg/ml. Prilikom primene PGPR koje imaju sposobnost produkcije IAA treba imati na umu da velike koncentracije auksina ispoljavaju toksični efekat, stimulišu sintezu etilena koji u većoj koncentraciji ima negativan uticaj na biljku (Thimann 1939; Iqbal et al., 2017). Treba imati u vidu da je sinteza mikrobnog auksina u rizosferi određena karakterom biljno-mikrobne komunikacije, odnosno stepenom endofitne kolonizacije i sastavom eksudata (Spaepen et al., 2007; Mota et al., 2008).



Slika 4: Produkcija IAA od strane *Azotobacter chroococcum* F8/2 a) kontrola b) sinteza IAA (10 µg/ml)

5.2.3. ACC deaminaza

Uloga etilena je od velike važnosti u procesu germinacije i sintezi i transferu auksina (Ahammed et al., 2020; Muday et al., 2012). Međutim, ukoliko se povećana koncentracija etilena zadrži nakon germinacije dolazi do njegovog inhibitornog delovanja na kasnije razvojne faze biljke, posebno koren i njegovu morfologiju, a ponekad može doći do uginuća biljke (Hardoim et al., 2008; Dubois et al., 2018). Zato je neophodno da postoji mehanizam da se visoka koncentracija etilena nakon germinacije snizi. Mehanizam kojim PGPR ovo postižu podrazumeva produkciju posebnog enzima, ACC-deaminaze. Njima pripada ključna uloga u mikrobno-biljnoj asocijaciji, jer se smatra da je regulacija etilena jedna od aktivnosti u rizosferi (Gamalero and Glick, 2015). ACC deaminaze hidrolizuju prekursor etilena (l-aminociklopropan-l-karboksilna kiselina, ACC) do α -ketobutirata i amonijaka. Na ovaj način se pored gubitka inhibitornog efekta etilena, oslobođenim amonijakom obezbeđuje azot za mikrobni metabolizam (Glick et al., 1998). Biljke koje su inokulisane sojevima koji imaju sposobnost da koriste ACC pokazuju veću sposobnost za normalno funkcionisanje u stresnim uslovima kao što su suša, povećan salinitet, poplave (Sayyed et al., 2019). *A. chroococcum* F8/2 je nakon perioda inkubacije od 16 h, početnu koncentraciju ACC od 3 mmol/l u medijumu, snizio na 0,803 mmol/l, odnosno početna koncentracija je redukovana za 91,67% (Tabela 12). Time

je potvrđena produkcija ACC-deaminaze od strane ovog soja. Sposobnost produkcije ACC od strane *A. chroococcum* potvrđena je i od strane Viscardi et al. (2016).

Sposobnost sinteze ACC deaminaza prisutna je kod *Bacillus* spp. Misra i Chauhan (2020) su inokulacijom halotolerantnim ACC sojevima, *Bacillus subtilis* NBRI 28B, *Bacillus subtilis* NBRI 33 N, *Bacillus safensis* NBRI 12 M ublažili efekte stresa na kukuruz kroz modulaciju nivoa etilena, što je rezultiralo povećanjem vegetativnog rasta, hlorofila, karotenoida i sadržaja rastvorljivog šećera. Gupta et al. (2022) su primenom ACC sojeva *B. subtilis* MBD 133 i *Pseudomonas aeruginosa* GKP KS2 ublažili negativne efekte povećane koncentracije etilena u uslovima stresa soli i povećanog osmotskog pritiska. U ninhidrin-ACC testu, *B. subtilis* MBD 133 je početnu koncentraciju 0,220 mmol/l nakon 24 h snizio na 0,0301mmol/l zahvaljujući aktivnosti ACC deaminaza. *B. megaterium* NMp082 je zahvaljujući sintezi ACC deaminaza kod *Medicago sativa* i *Arabidopsis thaliana* doprineo povećanju rasta u uslovima stresa soli (Chinnaswamy et al., 2018). Međutim, nemaju svi PGPR gene koji kodiraju sintezu ACC-deaminaza. *B. megaterium* 11/3 nije pokazao sposobnost da koristi ACC (Tabela 9). Ovo svojstvo izostaje i kod nekih endofitnih PGPR, kao i onih koje PGP svojstva pokazuju u uslovima nekog faktora stresa, poput stresa uzrokovanog salinitetom. Maheshwari et al. (2020b) su testiranjem 26 endofita izolovanih iz nodula *Pisum sativum* utvrdili da 16 izolata sintetišu ACC-deaminaze, dok je kod 10 izolata ovaj mehanizam izostao. Nagaraju et al., (2021) su utvrdili da je od 50 halofilnih bakterijskih izolata, 39 pokazalo pozitivan rezultat na aktivnost ACC deaminaza.

PGPR koje odlikuje sinteza i aktivnost ACC deaminaza imaju ključnu ulogu u ublažavanju i sprečavanju negativnih posledica biotičkih i abiotičkih stresova na biljku, zato *A. chroococcum* F8/2 može biti vredan potencijal u proizvodnji kultura u suboptimalnim uslovima.

5.2.4. Produkcija siderofora

Potrebe za gvoždem su izuzetno male, ali Fe spada u esencijalne elemente za većinu organizama. Uobičajeni način na koji bakterije dobijaju gvožđe je lučenje siderofora, sekundarnih metabolita koji vezuju gvožđe iz okoline i dostavljaju ga ćelijama putem specifičnih receptora. Biljke mogu da usvoje bakterijski Fe^{3+} -sideroforni kompleks i na taj način bakterije stimulišu rast biljaka (Crowley et al., 1988; Timofeeva et al., 2022).

Primenom CAS S metode ispitana je sposobnost sinteze siderofora od strane ispitivanih PGPR. Dobijeni rezultati su potvrdili produkciju siderofora od strane *A. chroococcum* F8/2 (Tabela 12; Slika 4a). Prosečan prečnik halo zone od 2 cm je bio znak izrazite sposobnosti soja da produkuje siderofore s obzirom na klasifikaciju datu od strane Wani et al. (2007) gde je produkcija u zavisnosti od zone: slaba zona do 1,5 mm; umerena 6-10 mm i izrazita > 11 mm. Isti autori su testiranjem 12 sojeva *Azotobacter* spp. utvrdili sposobnost produkcije siderofora kod svih sojeva, ali najveći potencijal je pokazao *A. chroococcum* A4. Azotofiksatori imaju izuzetno razvijen mehanizam vezivanja Fe (Muthuselvan and Balagurunathan, 2013), jer nitrogenaze i ostali proteini koji su uključeni u azotofiksaciju, zahtevaju veliku količinu gvožđa (Brill, 1980). Zang et al. (2019) su utvrdili da se kod *A. chroococcum* NCIMB 8003 i *A. chroococcum* B3 strategija vezivanja gvožđa vertikalno nasleđuje i da od prisutnih klasa siderofora, vibrioferin ima najveći afinitet vezivanja gvožđa. Struktura i mehanizam Fe-siderofora metabolisanih od strane *A. chroococcum* još uvek nisu dovoljno ispitani (Sumbul et al., 2020). Siderofore pored nutritivne uloge imaju funkciju u biokontrolnoj aktivnosti kao kompetitori za Fe, njihovom produkcijom rastvorljiva forma Fe se stavlja biljkama na raspolaganje čime ono postaje nedostupno patogenima (Pahari et al., 2017). Siderofore koje produkuje *Azotobacter* sp. kroz kompeticiju za Fe, kao i one sa antibiotskim svojstvima (azotobactin) izuzetno su korisne u biokontroli (Muthuselvan et al., 2013) i mogu biti alternativa štetnim pesticidima.

B. megaterium 11/3 nije pokazao sposobnost produkcije siderofora, iako je prisustvo siderofora utvrđeno kod nekih *Bacillus* spp. Ghazy and El-Nahrawy (2021) su dobili pozitivne rezultate testa na sintezu siderofora kod svih ispitivanih sojeva (*B. subtilis*, *B. circulance*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas korensis*). Prečnik halo

zone se kretao od 1,62 cm za *B. subtilis* do 0,36 cm za *B. licheniformis*. Ferreira et al. (2019) su u ogledu kojim su ispitivali sposobnost sinteze, vrste i helatnog potencijala *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Pantoea allii* i *Rhizobium radiobacter* utvrdili sposobnost produkcije siderofora na pH 9 kod svih ispitivanih bakterija, a od prisutnih vrsta siderofora utvrdili su da je kateholatni tip bio karakterističan za *B. subtilis*, dok je hidroksamatni tip bio prisutan kod *B. megaterium* koji je pokazao i najveći helatni kapacitet u vezivanju Fe.

S obzirom da nedostatak Fe kod biljaka dovodi do značajnog smanjenja kvaliteta i prinosa useva, *A. chroococcum* F 8/2 može biti značajna alternativa za rešavanje ovog problema.

5.2.5. Solubilizacija nutrijenata

Nedostatak makronutrijenata kao što je azot, fosfor, kalijum, kao i mikronutrijenta (Zn, Cu, B, Mo itd.) u zemljištu može biti rezultat prirodno lošeg statusa nutrijenata u zemljištu, slabe pokretljivosti ili fiksacije u zemljištu, smanjene ili loše rastvorljivosti nutrijenata i antagonističkih interakcija. Nedostupne oblike ovih nutrijenata mogu solubilizovati različiti zemljišni mikroorganizmi.

S obzirom na ulogu PGPR u ishrani biljaka i procesima transformacije neorganskih izvora nutrijenata kroz mehanizam solubilizacije cilj je bio da se utvrdi prisustvo ovog mehanizma kod selekcionisanih sojeva u *in vitro* uslovima.

Solubilizacija fosfora (P), cinka (Zn) i kalijuma (K)

Izostanak prosvetljenih zona oko kolonija *A. chroococcum* F 8/2 na NBRIP podlozi kao izvora neorganskog fosfora, je bila potvrda da soj nema sposobnost solubilizacije nerastvornih fosfata. Husen (2003) je testom na solubilizaciju fosfora kod *A. vinelandii* Mac 259 utvrdio da ne postoji potencijal. Ortega et al. (2013) su naveli da je nekoliko studija pokazalo da rod *Azotobacter* ne pokazuje visok nivo solubilizacije fosfata. Narula et al (2000) su od 18 izolata determinisanih kao *A. chroococcum* izabrali šest kod kojih se indeks solubilizacije kretao od 1 za izolat PS12 do 4 za izolat PS13.

Nakon perioda inkubacije i rasta na NBRIP podlozi *B. megaterium* 11/3 je pokazao slabu sposobnost solubilizacije fosfata iz podloge u kojoj je bio u formi trikalcijum fosfata. Postignut indeks solubilizacije je bio nizak (SI = 1,1) (Tabela 12; Slika 6a). Matos et al. (2017) su izolovali 40 endofita iz korena banane i utvrdili kod najvećeg broja izolata koji pripadaju *Bacillus* sp. nizak SI koji se kretao za ovu kategoriju u opsegu 1,26-1,43. Prema Silva-Filho and Vidor (2000) vrednosti SI između 1 i 2 označavaju slabu sposobnost solubilizacije fosfora.

Od svih mikronutrijenata, cink je, globalno najdeficitarniji u zemljištu. Hina et al. (2018) navode da bakterije u solubilizaciji Zn i Fe koriste mehanizme helatnog vezivanja i acidifikacije kroz produkciju različitih organskih kiselina.

Dobijeni rezultat testiranja sposobnosti Zn solubilizacije od strane *A. chroococcum* F 8/2 je bio negativan (Tabela 12). Sharma et al. (2014b) navode da azotofiksatori *Rhizobium*, *Azospirillum* i *Azotobacter* nisu determinisani kao značajni solubilizatori Zn. Isti autori su od 48 endofitnih bakterijskih izolata od kojih je 43 izolovano iz rizosfere soje i 5 iz rizosfere zlatnog pasulja ispitivali sposobnost solubilizacije cinka iz dva izvora ZnO i Zn₃(PO₄)₂ u Tris-mineralnoj podlozi. Rezultati su pokazali da je 17 izolata rizosfere soje i 3 izolata rizosfere zlatnog pasulja imalo potencijal solubilizacije ZnO, dok je 12 izolata iz rizosfere soje i 2 iz rizosfere zlatnog pasulja pokazalo sposobnost solubilizacije Zn₃(PO₄)₂. Na osnovu morfoloških i biohemijski karakteristika izolati su pripadali *Pseudomonas* sp., *P. aeruginosa* (16N, 3P), *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp. i *Enterococcus* sp.

Mumtaz et al. (2017) su ispitali solubilizaciju Zn od strane 70 ispitivanih sojeva *Bacillus* spp., od kojih je 13 pokazalo izrazit stepen sposobnosti da mobilizuju Zn in neorganskih kompleksa sa SI u opsegu 2,23-3,88, dok je Ahmad (2008) utvrdio sposobnost solubilizacije kod 20 od 50 ispitivanih sojeva. Abaid-Ullah et al. (2011) su kod devet od 50 ispitivanih izolata iz rizosfere

uzvrdili prisustvo ovog svojstva. Hina et al. (2018) u ogledu u koji je bilo uključeno 77 sojeva izdvojena su 35 sa sposobnošću Zn solubilizacije, a od njih su se posebno izdvojili *B. cereus* (ATCC14579), *B. thuringiensis* (YWC) i *B. mycoides* (ATCC 6462) kod kojih je potvrđena produkcija pirogroždane, vinske, oksalosirćetne i jabučne kiseline odgovornih za dobru solubilizaciju. *B. megaterium* 11/3 je pokazao slabu sposobnost mobilizacije Zn (Slika 6b). Međutim, iako je indeks solubilizacije bio 1,5 (Tabela 12) soj može kao bioinokulant doprineti rešavanju problema nedostatka Zn kod biljaka. Literaturni podaci su pokazali da je zahvaljujući solubilizaciji Zn *Bacillus* sp. stimulisao rast pirinča (Vaid et al. 2014) i unapredio rast i povećao sadržaj Zn kod soje i pšenice (Khande et al., 2017).

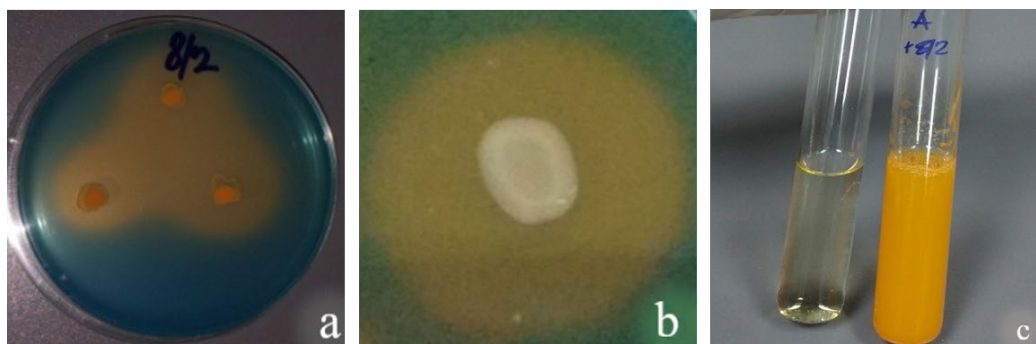
A. chroococcum F 8/2 stvaranjem halo zone na modifikovanom Aleksandar medijumu, a na osnovu izračunatog indeksa solubilizacije (SI) 3, pokazao sposobnost solubilizacije K iz K-Al silikatnog kompleksa (Tabela 12; Slika 5b). Kapacitet *Azotobacter* sp. da solubilizuje kalijum je PGP je odlika potvrđena i drugim ispitivanjima (Singh et al., 2010; Ali and Hussei, 2021). Singh et al. (2010) su potvrdili da je inokulacija kukuruza i pšenice sa *A. chroococcum*, *B. mucilaginosus* i *Rhizobium* povećala mobilizaciju K iz supstrata, dovela do veće produkcije biomase i sadržaja K u njoj, povećanja sadržaja hlorofila i proteina. Latef et al. (2020) navode da *A. chroococcum* i *Azospirillum lipoferum* u uslovima povećanog saliniteta povećavaju mobilizaciju K⁺ jona i doprinose balansu odnosa K⁺/Na⁺ jona. Do istih zaključaka došli su Rojas-Tapias et al. (2012) u ogledu sa gajenjem kukuruza u uslovima povećanog salineta, gde su ispitivani *Azotobacter* sojevi doprineli povećanju dostupnosti K. Pored sposobnosti da solubilizuje K, *Azotobacter* spp. je potvrdio ulogu u povećanju sposobnosti biljaka da asimiluju K (Singh et al., 2010). Mikroorganizmi koji pripadaju K-solubilizatorima posebnim mehanizmima kao što su produkcija organskih ili neorganskih kiselina, produkcija polisaharida, protona i siderofora mogu da oslobode kalijum iz mineralnih jedinjenja (Rajawat et al., 2016). Međutim, uključivanje i uspešnost ovih mehanizama zavisi i od hemijske strukture mineralnih izvora (Setiawati and Mutmainnah, 2016) i u slučaju kada je K vezan u silikatnim stenama uglavnom je prisutan mehanizam helatnog vezivanja silikonskog jona (Meena et al., 2014) pri čemu se oslobađa K u zemljišni rastvor (Bennett et al., 1998).

Rezultat testa na modifikovanom Aleksandar medijumu pokazao je da soj *B. megaterium* 11/3 nema sposobnost solubilizacije kalijuma iz K-Al silikata. Romero-Munar and Aroca (2023) su ispitivali uticaj soja *B. megaterium* koji nema sposobnost solubilizacije K na pirinač gajen u uslovima smanjene koncentracije K. Rezultati su pokazali da bez obzira na to što *B. megaterium* ne utiče direktno na dostupnost K, kroz set drugih PGP mehanizama utiče na ekspresiju K⁺ transportera kod biljaka, što doprinosi višoj koncentraciji K u tkivu i boljem rastu u odnosu na neinokulisane biljke. *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3 su pokazali aktivnost u kruženju nutrijenata ključnih za fiziologiju biljaka i pokazali mogućnost primene kao biofertilizatora koji bi doprineli smanjenju ili isključenju mineralnih đubriva u biljnoj proizvodnji.

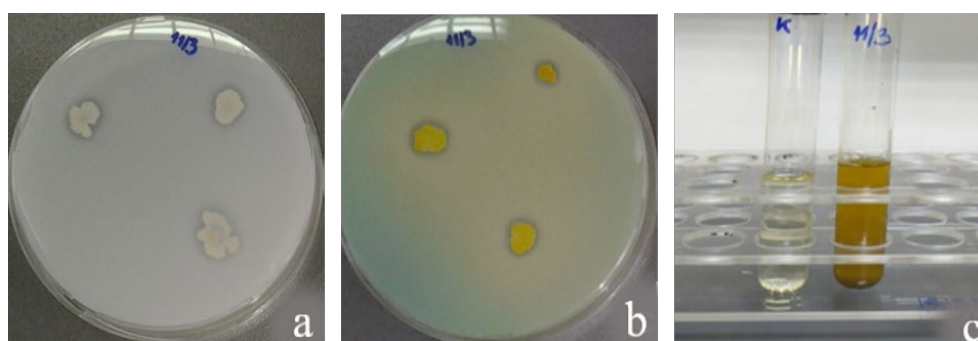
5.2.6. Produkcija amonijaka (NH₃)

Pored toga što kao slobodni azotofiksatori imaju sposobnost konvertovanja atmosferskog azota u amonijak u toku biološke azotifikacije, *Azotobacter* spp. pokazuju sposobnost oslobađanja amonijaka i iz organskih izvora. Produkcija amonijaka iz organskih jedinjenja je mehanizam kojim se povećava dostupnost azota u rizosferi. Amonijak je forma koju biljke mogu da asimiluju i koriste i to na indirektan način utiče na rast i prinos biljaka (Jain et al., 2021). Rezultat testa koji je bazirao na promeni boje Neslerovog reagensa do nijanse žute (Slika 5c) potvrdio je ovu važnu pgp osobinu *A. chroococcum* F8/2 (Tabela 12). Da je to zajednička osobina *Azotobacter* spp. dokumentovali su Jain et al. (2021) kada je kod sva 24 ispitana soja test na produkciju amonijaka bio pozitivan, a 10 sojeva je pokazalo izuzetan potencijal u sintezi amonijaka. Ahmad et al. (2008) su testiranjem *Azotobacter* spp. potvrdili rezultate. Goswami i Deka (2020) navode da pored nutritivne uloge, amonijak ukoliko se sintetiše u većoj količini je biokontrolni agens koji redukuje kolonizaciju patogena i inhibira germinaciju spora gljiva.

Produkcija amonijaka kao rezultat razlaganja organskih komponenata je izražena osobina roda *Bacillus*. *B. megaterium* 11/3 je potvrdio sposobnost produkcije amonijaka. (Tabela 12; Slika 6c). Agbodjato et al. (2015) su utvrdili ovo PGP svojstvo kod više od 80% ispitivanih *Bacillus* spp. Singh et al (2020a) su od 22 izolata *Bacillus* sp. iz rizosfere šećerne trske utvrdili produkciju amonijaka kod 60% ispitivanih izolata. Od 35 *Bacillus* sojeva izolovanih iz rizosfere pšenice kod 85% potvrđena je sinteza NH_3 (Cherif-Silini et al., 2016).



Slika 5: PGP karakteristike *Azotobacter chroococcum* F8/2 a) sinteza siderofora b) solubilizacija kalijuma c) produkcija amonijaka



Slika 6: PGP karakteristike *Bacillus megaterium* 11/3 a) solubilizacija fosfata b) solubilizacija cinka c) produkcija amonijaka

5.2.7. Produkcija egzopolisaharida

Posebna odlika PGPR je produkcija egzopolisaharida (EPS). Sanches et al. (2006) navode da su EPS multifunkcionalna organska jedinjenja, odgovorna za virulenciju, zaštitu bakterijske ćelije od dehidracije, delovanja antibiotika, uticaja osmotskog stresa, bakteriofaga, protozoa i toksičnih jedinjenja. Prilikom izbora biopriming agensa, ova osobina daje prednost upravo zbog višestruke ulogu EPS-a. Uvođenje sojeva, kao biopriming agenasa, sa sposobnošću sinteze EPS doprinosi njihovom opstanku, kompetitivnosti, boljoj kolonizaciji u rizosferi, povećanoj stabilizaciji i formiranju zemljišnih agregata stvaranju boljeg mikro-okruženja za razvoj biljka (Arfarita et al., 2016). *A. chroococcum* F8/2 je pokazao potencijal za sintezu egzopolisaharida što je potvrđeno pojavom mukoidnih kolonija i precipitata u završnom testu sa etanolom (Tabela 12). Ovaj rod je poznat po izuzetnom potencijalu da produkuje egzopolisaharide (Gauri et al., 2012). EPS produkovani od strane *Azotobacter* obezbeđuju hidrataciju same mikrobne ćelije i formiranje biofilma u uslovima suše (Aasfar et al., 2021), a njihovi polisaharidi mogu da reaguju sa drugim molekulima (leucin, proteini, lipidi) (Chang et al., 2007) i teškim metalima (Cd i Cr) (Gauri et al., 2012).

Pozitivan rezultat testa potvrdio je sposobnost *B. megaterium* 11/3 da produkuje egzopolisaharide (Tabela 12). Malick et al. (2017) su potvrdili da neke *Bacillus* sp. odlikuje izuzetan potencijal produkcije EPS, veći nego u slučaju ispitivanih mlečnokiselinskih bakterija. Količina sintetizovanih EPS zavisi od temperature, pH vrednosti, vrste medijuma i faze rasta

(Gomaa and Yousef, 2020; Malick et al., 2017; Chowdhuri et al., 2011). Chowdhuri et al. (2011) su potvrdili da je maksimalna produkcija EPS od strane *B. megaterium* RB-05 na temperaturi od 34 °C i pH 7,5. Shady et al. (2011) su utvrdili da je maksimalna produkcija EPS od strane *B. megaterium* zabeležena na temperaturama od 35 °C i pH 5, a Gandhi et al (1997) su utvrdili da je temperaturni opseg 30-35 °C i pH 6-6,5 omogućio maksimalnu produkciju EPS od starene *B. megaterium*. Maqshoof et al. (2020) su od 40 ispitivanih sojeva izdvojili šest zbog svoje visoke tolerancije na olovo i sposobnosti produkcije EPS. Autori su utvrdili da je sinteza EPS doprinela ne samo povećanju rasta spanaća već i redukciji apsorpcije olova od strane korena, posebno *B. safensis* (N11) kod kojeg je postojala i najveća sinteza EPS.

Produkcija EPS od strane oba soja i njihova potencijana primena kao inokulanata u održivoj proizvodnji bi imala ogroman agroekonomski značaj, jer omogućava preživljavanje, održavanje i funkcionisanje mikrobne zajednice u njihovom staništu. Takođe, prisustvo EPS u zemljištu doprinosi poboljšanju strukture zemljišta, stvarajući bolje uslove za rast korenovog sistema.

5.2.8. Produkcija cijanovodonične kiseline (HCN)

Rezultat kvalitativne analize testa na produkciju HCN za *A. chroococcum* F8/2 je pokazao da bakterija nema ovu sposobnost. Izostanak produkcije HCN kod 11 izolata koji pripadaju rodu *Azotobacter* od testiranih 13 potvrđen je od strane Bjelić et al. (2015). HCN se sintetiše od strane mikroorganizama, insekata i biljaka kao biokontrolna komponenta (Kamei et al., 2014). Međutim, Rijavec i Lapanje (2016) su dali novi koncept u kome HCN nema primarnu ulogu biokontrolnog mehanizma, već je uključen u nutritivni ciklus P i geohemijske procese zahvaljujući sposobnosti helatnog vezivanja metala. U rizosferi produkcija HCN je karakteristična uglavnom za rod *Pseudomonas* kod kojeg 88,89% sojeva ima ovo svojstvo i *Bacillus* gde 50% sojeva sintetiše HCN (Ahmad et al., 2008). Produkcija HCN je osobina koju imaju sojevi *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* i *Rhizobium*, ali kod velikog broja mikroorganizama često nije prisutna (Rahman et al., 2019). Isti autori su ispitivanjem 39 izolata poreklom iz rizosfere različitih useva potvrdili sintezu HCN kod samo 6 izolata.

B. megaterium 11/3 nije pokazao sposobnost sinteze HCN (Tabela 12) što je u skladu sa rezultatima Kumar et al. (2014) koji nisu utvrdili sposobnost testiranog soja *B. megaterium* da produkuje HCN. Cherif-Silini et al. (2016) su od 35 ispitivanih *Bacillus* sojeva potvrdili produkciju samo kod jednog soja, a Reetha et al. (2014) su potvrdili odsustvo sinteze HCN kod ispitivanih sojeva *B. subtilis* izolovanih iz rizosfere suncokreta.

5.2.9. Produkcija organskih isparljivih jedinjenja (VOC)

U poslednjoj deceniji je identifikovan veliki broj organskih isparljivih jedinjenja koja imaju značajnu ulogu u stimulaciji rasta biljaka, pre svega regulišući sintezu ili metabolizam fitohormona. Takođe, dokazano je da VOC koje proizvode PGPR imaju potencijal da kontrolišu biljne patogene i da izazovu sistemsku otpornost na bolesti (Tahir et al., 2017; Kumar et al., 2020). PGPR ili proizvodi dobijeni od PGPR, obično zahtevaju fizički kontakt s delovima biljke za stimulaciju rasta biljaka, međutim, mnoge vrste bakterija mogu regulisati rast biljaka iz daljine bez ikakvog kontakta, što sugerise mogućnost da te bakterije sintetišu isparljiva organska jedinjenja koja stimulišu ili inhibiraju rast biljaka. Bailly and Weisskopf (2012) su naveli da bakterije koje imaju potencijalnu aktivnost sinteze VOC i tako stimulišu rast biljaka uključuju vrste *Chromobacterium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, i *Arthrobacter* Raza et al., 2016). Međutim, postoji nedostatak literaturnih podataka o metabolisanim VOC od strane *Azotobacter* sp. *A. chroococcum* F8/2 se pokazao kao značajan u produkciji VOC-a. Sastav i grafički prikaz pikova pojedinačnih isparljivih jedinjenja metaboličke smeše prikazan je u tabeli 10 i grafiku 1 (Prilog 8.1). Analizom je utvrđeno da su u smeši gasovitih metabolita alkoholi bili dominantni. Procentualno najzastupljeniji je bio etanol (46,67%), što je bilo očekivano s obzirom da je medijum u kojem je rastao sadržao 20 g/l manitola. Jones et al. (2004) su primetili da prisustvo šećera u korenskom

eksudatu daje sličan efekat, čime je potvrđena pretpostavka da sastav podloge utiče na kvalitativna i kvantitativna svojstva isparljive organske smeše. Prisustvo šećera može da promovise sintezu mikrobnih stimulanasa (acetoin i indol), ili sintezu biokontrolnih jedinjenja (etanol, 1-tridekanol) pojačavajući korisni efekat biljno-mikrobne interakcije (Lazzara et al., 2017). Pery and Pery (2019) su uočili da je etanol produkovan od strane *B. licheniformis* bio značajan u biokontroli, ali i poboljšanju germinacije. U mikrobnom metabolizmu etanol je uglavnom međuproizvod koji služi kao prekursor za sintezu drugih isparljivih organskih metabolita. 3-metil-1-butanol je bio zastupljen u smeši *A. chroococcum* F8/2 sa 17,32%. Fialho et al. (2011) je potvrdio da njegovo prisustvo doprinosi biokontroli fitopatogena *Sclerotinia sclerotiorum*. Takođe, *A. chroococcum* F 8/2 je sintetisao 2-metil-propanol koji je u isparljivoj smeši bio zastupljen sa 32,01%. Prethodnim ispitivanjima njegovo prisustvo je utvrđeno u isparljivoj organskoj smeši *B. subtilis* GB03, *B. amyloliquefaciens* IN937 (Frag et al., 2006) i *Phoma* sp. GS8-3 (Naznin et al., 2013). U kombinaciji sa različitim udelom drugih isparljivih organskih jedinjenja stimulatивно je delovao na razvoj duvana (Naznin et al., 2013). Ovi alkoholi imaju vrlo sličan efekat kao 2,3-butandiol (Frag et al., 2006), čiji je stimulatивni uticaj na biljke potvrđen. 2,3-butandiol je identifikovan kao jedno od najznačajnijih mikrobnih organskih isparljivih supstanci i esencijalni bakterijski stimulator koji utiče na intenziviranje katabolizma glukoze od kiselih do neutralnih produkata (Forlani et al., 1999). Produkovan od strane *Pseudomonas chlororaphis* O6 utiče na povećanje stomatalnog zatvaranja, pojačanu akumulaciju salicilne kiseline i indukovanu sistemsku rezistenciju utičući na povećanje otpornosti na sušu (Cho et al., 2008). Ispitivani soj *A. chroococcum* F 8/2 je ispoljio toleranciju na koncentraciju NaCl od 5% (tabela 4), što može biti povezano sa produkcijom 2,3-butandiola.

Komponente isparljive organske smeše čiji je stimulatивni efekat na biljni rast potvrđen ranijim istraživanjima je acetoin (3-hidroksi-2-butanon) i njegova oksidovana forma 2,3-butandiol (Ryu et al., 2004). Iako su prisutni u smeši u maloj koncentraciji od samo 0,93% (acetoin) i 0,56% (2,3-butandion) (Tabela 10) njihov stimulatивni efekat ne treba isključiti, jer je poznato da upravo male koncentracije VOC-a imaju pozitivan efekat na biljku (Naznin et al., 2013).

Isparljiva smeša organskih jedinjenja metabolisana od strane *A. chroococcum* F8/2, može imati ulogu promotera biljnog rasta u održivoj biljnoj proizvodnji (Kerečki et al., 2022).

Tabela 10: Isparljiva organska jedinjenja koje produkuje *Azotobacter chroococcum* F8/2 na Fjodorovoj bezazotnoj podlozi

Broj pika	Isparljivo organsko jedinjenje	Indeks retencije	Vreme retencije (min)	Oblast pika	Maksimalni udeo pika (%)	Udeo u ukupnoj smeši (%)
1	Neidentifikovana jedinjenja	685	1,278	326991	1,52	0,73
2	Aceton	814	1,600	419315	1,95	0,93
3	Etanol	916	2,559	21506395	100,00	47,67
4	2,3-butandion	982	3,203	252182	1,17	0,56
5	2-metil-1-propanol	1096	6,708	14441697	67,15	32,01
6	3-metil-1-butanol	1224	11,298	7814027	36,33	17,32
7	2-metil-4-penten-1-ol	1366	16,549	144189	0,67	0,32
8	1-tetradekanol	2174	27,236	211407	0,98	0,47

Produkcija antimikrobnih VOC je jedan od biokontrolnih mehanizama predstavnika roda *Bacillus* (Guevara-Avenidaño et al., 2020). Istraživanja su pokazala sposobnost inhibicije rasta *Sclerotium rolfsii*, *S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Penicillium* spp., *F. euwallaceae* i *Graphium* spp. dejstvom isparljivih jedinjenja produkovanih od strane *Bacillus* sp. (Torres et al., 2017; Guevara-Avenidaño et al., 2019).

Rezultati hromatografije isparljive smeše metabolisane od strane *B. megaterium* 11/3 gajenog u TSB, a zatim i u zemljišnom ekstraktu potvrdili su da sastav medijuma utiče na produkciju isparljivih jedinjenja (Lazzara et al., 2017). VOC nisu detektovana nakon gajenja *B. megaterium* 11/3 u agarizovanom zemljišnom ekstraktu (Prilog 8.2). Sa druge strane, gajenje u TSB medijumu, koji je nutritivno bogatiji u odnosu na zemljišni, za rezultat je dalo produkciju dva jedinjenja koja nisu bila prisutna u isparljivim smešama kontrole, izoamil alkohol (2,20%) i 3-metil-2-pentanon (0,47%) (Tabela 11).

Tabela 11: Isparljive organske materije koje produkuje *Bacillus megaterium* 11/3 na TSB

Broj pika	Isparljivo organsko jedinjenje	Indeks retencije	Vreme retencije (min)	Oblast pika	Maksimalni udeo pika (%)	Udeo u ukupnoj smeši (%)
1	3-metil-2-pentanon	1020	3,941	304036	1,13	0,47
2	Izoamil alkohol	1218	11,199	1436989	5,36	2,20

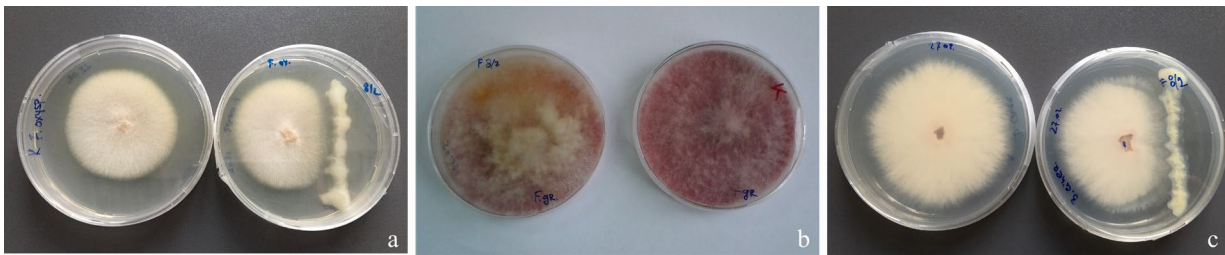
Alkoholi se neselektivno apsorbuju i akumuliraju u ćelijskoj membrani dovodeći do inhibicije njenih funkcija u čemu se ogleda njihovo antimikrobno dejstvo (Ingram and Buttke, 1985). Ando et al. (2012) su utvrdili da izoamil alkohol može biti apsorbovan od strane spora gljiva, dovodeći do inhibicije njihovog klijanja. Izoamil alkohol je već poznat kao deo isparljivih smeša predstavnika roda *Bacillus*, *B. subtilis* i *B. amyloliquefaciens* sa sposobnošću redukcije rasta *Moniliophthora perniciosa* i *Fusarium oxysporum*, *in vitro* (Chaves-López et al., 2015). Calvo et al. (2020) su zabeležili inhibitorno dejstvo izoamil alkohola produkovanog od strane *B. velezensis* na *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* i *M. fructicola*.

Guevara-Avendaño et al. (2020) su zabeležili prisustvo 3-metil-2-pentanona u isparljivim smešama tri predstavnika *B. subtilis* kompleksa koji su pokazali snažno antifungalno dejstvo prema *F. kuroshium*. Detektovan je i u VOC smešama zemljišnih bakterija koje inhibiraju germinaciju spora gljiva (Schulz et al., 2010). Ovo jedinjenje produkuje i predstavnici *Streptomyces* spp. i utvrđeno je da njegova primena u koncentraciji od 100 µl/l dovodi do inhibicije rasta *Phytophthora capsici* za 63,40% (Corralli et al., 2020). Asari et al. (2016) su potvrdili produkciju 3-metil-2-pentanona od strane četiri izolata *B. amyloliquefaciens* i zabeležili stimulaciju rasta *Arabidopsis thaliana* izložene VOC-u ovih bakterija. Sa druge strane, autori naglašavaju značajne razlike u sastavu isparljive smeše u zavisnosti od hranljivog medijuma kao i značajne razlike u efektima koje VOC ispoljava na biljku u zavisnosti od hranljivog medijuma, od stimulativnih do inhibitornih.

5.2.10. Antagonistička aktivnost *Azotobacter chroococcum* F8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3 prema fitopatogenim gljivama

Biokontrola postaje sve značajnija u borbi protiv fitopatogena ne samo što isključuje štetno delovanje hemijskih komponenata fungicida na životnu sredinu već i sve češću pojavu rezistencije. Zato je deo eksperimentalnog rada bio usmeren na ovu PGP osobinu.

Dobijeni rezultati konfrontacijskog testa (testa dvojnih kultura) su pokazali da *A. chroococcum* F8/2 može biti značajan biokontrolni faktor, jer je prema izabranim fitopatogenima pokazao antifungalnu aktivnost (Tabela 12; Slika 7), dok *B. megaterium* 11/3 nije pokazao biokontrolnu aktivnost u testu.



Slika 7: Dualni test *Azotobacter chroococcum* F8/2 prema a) *Fusarium oxysporum* b) *Fusarium graminearum* c) *Botrytis cinerea*

Fusarium je filamentozna gljiva i jedan od najdestruktivnijih biljnih patogena. Izaziva bolesti kod velikog broja domaćina, utičući negativno na krajnji prinos i ekonomsku dobit na globalnom nivou (Fang et al., 2020). *Fusarium* sp. je prouzokovač truležne fuzarioze korena i nižih delova biljaka, a u slučaju žitarica i fuzarioze klasa. Sintetišu širok spektar sekundarnih toksičnih metaboilita, a po svojoj patogenosti posebno se ističe *F. oxysporum* (Chang et al., 2018). *Botrytis cinerea* je fitopatogen koji pogađa više od 200 vrsta jednogodišnjih i dvogodišnjih biljaka širom sveta. Izaziva nekrozu biljnog tkiva i kao posledica prisutna je redukcija prinosa (Ahmed and Sabah, 2018). Posедуje širok spektar enzima koji razlažu ćelijski zid domaćina i proizvode toksine koji kod domaćina indukuju ćelijsku smrt, što je, kako se smatra, njegova glavna strategija (Williamson et al., 2007). Na žalost, veliki broj klasa fungicida nije se pokazao efektivnim, jer ovaj patogen odlikuje izražena sposobnost adaptacije.

Rezultati testa antagonističke aktivnosti i procenat inhibicije, pokazali su da *A. chroococcum* F8/2 ima izuzetan potencijal u biokontroli testiranih patogena. Procenat inhibicije prema *F. oxysporum* 56,66% i *B. cinerea* 66,67%, dok u dualnom testu sa *F. graminearum* nije pokazao inhibitorni efekat, ali je uticao na promenu morfologije kolonije patogena u zoni rasta. Antagonistička aktivnost ovog soja može biti povezana sa sintezom siderofora (Tabela 12) i produkcijom inhibitornih VOC (Tabela 10). Imajući u vidu značajan stepen inhibicije prema fitopatogenim gljivama ova istraživanja je potrebno dalje nastaviti u cilju detekcije i karakterizacije antifungalnih mehanizama. Veliki broj studija potvrdio je biokontrolnu aktivnost *Azotobacter* spp. Pomnurguran et al. (2012) su kod testiranih *Azotobacter* izolata utvrdili antagonizam prema patogenima *Aspergillus flavus*, *Cercospora* sp., *F. oxysporum*. Bjelić et al. (2015) su identifikovali biokontrolnu aktivnost testiranih *Azotobacter* sojeva prema *Fusarium* sp. gde je procenat inhibicije za soj Azt1 iznosio 38,43%, a za soj Azt2 39,21%. Chennappa et al. (2016) su testiranjem *A. chroococcum* utvrdili antagonističku aktivnost prema različitim fitopatogenima *Aspergillus*, *Fusarium* i *Alternaria*. Procenat inhibicije prema *Aspergillus* spp. se kretao u opsegu 13,33-21,66%, za *Alternaria* sp. 18,33-21,66% i *Fusarium* sp. 16,66-18,33%. Muslim et al. (2021) su utvrdili biokontrolnu aktivnost kod testiranih *Azotobacter* izolata prema *F. solani*. Najveći procenat inhibicije pokazao je izolat Ach 1 od 69,37%, a najniži izolat Ach 2 od 63,87%. Ahmed i Sabah (2018) su utvrdili da je kod 70% biljka tretiranih *B. cinerea* bilo simptoma infekcije u odnosu na one koje su tretirane biokontrolnim agensima *A. chroococcum* i *Trichoderma harzianum* kod koji je procenat infekcije bio manji i iznosio je 36% i 33%. Autori ističu da su ovi inokulanti najverovatnije stimulisali sintezu odbrambenih enzima biljaka (super dismutaza, katalaza, peroksidaza) i tako indukovali njenu rezistenciju. Koliki je značaj biokontrole pokazali su i Nagaraja et al. (2016) kada je nakon tretiranja žitarica sa *Aspergillus nigricans* postignuta redukcija infekcije do 50%, izazvana fitopatogenim gljivama *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. poae* i *F. equisetiv*.

Bacillus sp. odlikuje širok spektar antifungalnih aktivnosti zahvaljujući produkciji enzima, isparljivih organskih jedinjenja, proteina i peptida (Mardanova et al., 2017). Međutim, *B. megaterium* 11/3 nije pokazao antagonističku aktivnost prema izabranim fitopatogenima *F. oxysporum*, *F. graminearum* i *B. cinerea* (Tabela 12). Ispitujući biokontrolne aktivnosti sojeva *B. subtilis*, Mardanova et al. (2017) su utvrdili različite antagonističke aktivnosti sojeva prema patogenima, što je bilo objašnjeno velikom fenotipskom i genotipskom heterogenošću roda.

Oyedele and Ogunbanwo (2014) koji su testirali 9 sojeva *B. subtilis* na antagonizam prema *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *F. oxysporum* i *Rhizopus stolonifer* i utvrdili da su samo dva izolata, DB3 i Og7, pokazala antagonizam prema izabranim patogenima i da pored vrste patogena, temperatura, pH vrednost i vreme inkubacije utiču na sintezu biokontrolnih supstanci.

Tabela 12. PGP karakteristike *Azotobacter chroococcum* F 8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3

PGP svojsva		Bakterijski sojevi	
		<i>A. chroococcum</i> F8/2	<i>B. megaterium</i> 11/3
Sinteza IAA (µg/ml)		10,00±0,16	-
Sposobnost korišćenja ACC (mmol/l)		2,75±0,14*	-
Produkcija siderofora (Ø cm)		2,00±0,19	-
Solubilizacija nutrijenata (SI)	P	-	1,1
	Zn	-	1,5
	K	3,00±1,18	-
Produkcija NH ₃		+	+
Produkcija egzopolisaharida		+	+
Produkcija HCN		-	-
Sinteza bioaktivnog VOC-a		+	+
Antagonistička aktivnost (%I)	<i>Fusarium oxysporum</i>	56,66±0,46	-
	<i>Fusarium graminearum</i>	-	-
	<i>Botrytis cinera</i>	66,67±0,44	-

* Sposobnost korišćenja ACC je izračunata na osnovu razlike između početne koncentracije ACC u medijumu i koncentracije ACC-a nakon perioda inkubacije od 16 h.

Na osnovu izvršene karakterizacije, *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3 pripadaju grupi PGPR i pokazuju značajan potencijal primene u cilju stimulacije biljnog rasta i postizanja veće održivosti biljne proizvodnje. Rezultati testova solubilizacije P, Zn i K, produkciju NH₃, produkcije EPS, sinteza bioaktivnog VOC-a i izuzetna enzimaska aktivnost ukazuju na značajan potencijal ispitivanih sojeva. Potvrđena sinteza IAA, sposobnost korišćenja ACC, produkcija siderofora i izražena antagonistička aktivnost prema ispitivanim fitopatogenima su svojstva koja dodatno poseduje *A. chroococcum* F8/2, što uz svojstvo azotofiksacije čini značajan set korisnih karakteristika koje doprinese unapređenju biljnog rasta.

5.3. Uticaj inokulacije *Azotobacter choroococcum* F 8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3 na parametre germinacije

Prajming semena je ključ za poboljšanje germinacije koja je baza stabilne proizvodnje, visokog prinosa i kvaliteta. Međutim, u odnosu na sve ostale metode prajminga, bioprajming predstavlja najpogodniji alat za ekološku i održivu proizvodnju. Prisustvo PGPR doprinosi uspostavljanju brze i uniformne germinacije i formiranju mladih klijanaca sposobnih da u uslovima stresa nastave svoj rast i razvoj.

U ovoj disertaciji, uticaj *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3 bioprajminga na germinaciju je utvrđen na osnovu parametara geminacije kod sledećih biljnih vrsta: slačica (*Sinapsis alba* L.), bosiljak (*Ocimum basilicum* L.), pšenica (*Triticum aesarivum* L.), kinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), kukuruz šećerac (*Zea mays* convar. *saccharata*), uljana repica (*Brassica napus* L.), šećerna repa (*Beta vulgaris* L.), soja (*Glycine max* L.), paradajz (*Solanum lycopersicum* L.) i krastavac (*Cucumis sativus* L.).

Kvantitavno testiranje parametara germinacije podrazumeva, pre svega izračunavanje finalnog procenata germinacije (FGP), koji je polazna osnova za pretpostavku o vitalnosti semena. Sve vrednosti FGP iznad 50% se mogu smatrati prihvatljivim (Ansari and Ksiksi, 2016), a što je njegova vrednost veća, bolja je germinacija semena (Scott et al., 1984). Iako FGP značajno utiče na vrednost ostalih parametara on ne daje jasnu predstavu uniformnosti i brzine germinacije, jer pokazuje samo konačan broj semena koja su završila germinativni proces (Kader, 2005).

U cilju procene uspeha germinacije analiziran je indeks germinacije (GI) koji najbolje oslikava odnos brzine i procenta germinacije (seme/dan) (Bewley and Black, 1994). Svako povećanje vrednosti GI je indikacija da je bolja germinacija i vigor. Spora germinacija često utiče da biljka duže bude izložena negativnim faktorima okruženja i zbog toga produktivnost biljke u velikoj meri zavisi od brzine i sinhronizacije germinacije (Osburn and Schroth, 1989).

Analiza parametara germinacije podrazumeva kvantifikaciju prosečnog vremena germinacije (MGT). Prosečno vreme germinacije se odnosi na broj dana kada se najveći deo germinacijskog procesa dešava i nema korelaciju sa brzinom i uniformnošću (Kader, 2005), ali može dati pretpostavku o vigoru semena. Svako povećanje vrednosti MGT ukazuje na redukciju vigora i najčešće je vezano za starenje semena (Amirmoradi and Feizi, 2017). MGT može biti opisan i kao dužina lag faze (period od početka imbibicije do pojave klice) u kojoj se pokreću reparativni mehanizmi kako bi se smanjile posledice starenja semena, a to bi značilo da se sa starenjem semena produžava ova faza, odnosno veća je vrednost MGT (Mavi et al., 2010).

Vigor je još 1969. godine prihvaćen kao fundamentalna fiziološka karakteristika semena i njegova veza sa prinostom i opstankom biljke. TeKrony (2003) je rekao da je „vigor semena zbir svih njegovih osobina koje determinišu njegov potencijal za rapidno, uniformno klijanje i razvoj normalnih klijanaca pod širokim dijapazonom različitih poljskih uslova“. Sadašnji koncept definicije vigora dala je ISTA (2014): „vigor semena je zbir odlika koje definišu aktivnost i performansu većeg broja semena kroz njihovu optimalnu germinaciju u različitim uslovima životnog okruženja“ i predstavlja kompleksan germinacijski parametar (Rajjou et al., 2012). Loš vigor semena je najčešće rezultat skladištenja (Cheah and Osborne, 1978), prisustva visokog nivoa oksidativnog stresa ili rezultat smenjivanja perioda dehidracije i rehidracije u toku formiranja semena (Dandoy et al., 1987).

Poznato je da mikroorganizmi primenjeni u bioprajangingu mogu uticati na parametre germinacije semena i da se ova poboljšanja mogu ogledati kroz uticaj na jedan ili više parametara germinacije. Cilj ove faze ispitivanja bio je utvrđivanje efekata dva bakterijska soja sa potvrđenim svojstvima stimulacije biljnog rasta na parametre germinacije različitih poljoprivrednih kultura. Efekti na rane faze rasta, koji mogu proisticati iz specifičnosti odnosa biljaka i PGPR daće početne podatke za uvid u mogućnost primene ovih bakterija u mikrobiološkom tretmanu semena.

5.3.1. Uticaj inokulacije sa *Azotobacter chroococcum* F8/2 na parametre germinacije

Na osnovu analize dobijenih rezultata značajno povećanje FGP postignuto je kod pšenice, soje, kinoe, krastavca i paradajza od 16%, 15%, 11%, 11 i 9% (Tabela 13). Kod bosiljka, slačice, kukuruza i uljane repice nije postojala značajnija razlika između tretmana. Jedino je kod šećerne repe primećeno smanjenje FGP. Međutim, uočeno je da je procenat germinacije kod šećerne repe znatno niži i u kontrolnom tretmanu u odnosu na propisani standard za germinaciju semena u Republici Srbiji od 96% („Službeni list SRJ“, бр. 8/1993-194; 21/1993-418). U ogledima koji se odnose na ispitivanje uticaja inokulacije na mikromorfološke parametre korena šećerne repe, inokulisana semena su postavljena u supstrat i uočeno je da su sva inokulisana semena šećerne repe sa *A. chroococcum* F8/2 proklijala u odnosu na kontrolu gde je procenat germinacije bio niži 7% (Kerečki et al., 2022). Da germinacija filter-papir metodom može dati niži procenat germinacije u odnosu na germinaciju na supstratu potvrdili su El-Keblwyet et al. (2018) i Jovičić et al. (2021). Bolji mikroklimat supstrata, pre svega vazdušno-vodni režim, mogao bi biti razlog nastalih razlika (Jovičić-Petrović et al., 2021). Rezultati brojnih istraživanja su potvrdili da se inokulacijom PGPR, odnosno *Azotobacter* sp. može poboljšati germinacija. Kurrey and Sharma (2018) navode da se

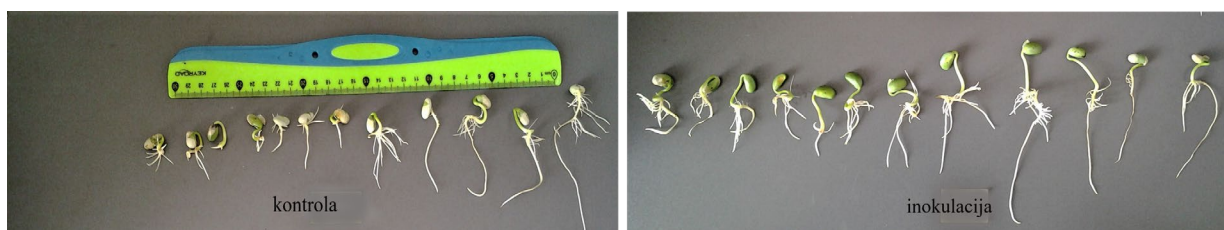
povećanja kreću od 20-30%, a *Azotobacter* sp. može biti od posebnog značaja za poboljšanje germinacije od 20-30% kod semena slabije klijavosti (Gurikar et al., 2016). Konzorcijum *A. chroococcum* i *Azospirillum* u uslovima povećanog saliniteta (20 i 50 dS/m) uticao je na povećanje procenata germinacije kod *Dodonaea viscosa* L. za 333% i 233% (Yousefi et al., 2017). Mangmang et al. (2015a, 2015b) su naveli da u nekim slučajevima PGPR utiču na povećanje germinacije za 100%, a kao razlog ovog efekta naveli su sposobnost PGPR da produkuju auksin koji doprinosi biosintezi giberelina i regulaciji aktivnosti amilaza, ključnih u germinaciji. Reddy et al. (2018) navode da je inokulacijom semena sa *Azotobacter* sp. povećan procenat germinacije kod paradajza za 33-46%, a prinos od 38-60%. Mohammad (2014) je kombinacijom *A. lipoferum* i *A. chroococcum* poboljšao germinaciju i rast klijanaca pšenice. Povećanje germinacije od 7% i težine klijanaca od 20% potvrđeno je nakon primene konzorcijuma *A. chroococcum* i *B. megaterium* var. *phosphaticus* (Bákonyl et al., 2013). Biopajming sa *A. lipoferum* DSM 1691 kod kukuruza povećao je procenat germinacije za 18,5% u odnosu na kontrolu (Gholami et al., 2009). Shaukat et al. (2006) su potvrdili da nakon inokulacije semena kukuruza i suncokreta sa *Azospirillum*, *Pseudomonas* i *Azotobacter* dolazi do povećanja germinacije u nekim slučajevima i do 100%. Paul et al. (2002) su za većinu ispitivanih sojeva *A. chroococcum* dobili rezultate koji su potvrdili promovisanje germinacije i povećanje mase klijanaca za 0,9 do 12,73%. Kumar and Narula (1999) su inokulacijom semena pšenice sa *A. chroococcum* P-4 poboljšali germinaciju i naglasili da su sposobnost solubilizacije fosfata, produkcija fitohormona, siderofora i antifungalna aktivnost najverovatnije doprineli povećanju germinacije, što je u skladu sa rezultatima ove studije u kojoj je *A. chroococcum* F8/2 pokazao sposobnost produkcije IAA, siderofora kao i antifungalni potencijal (Tabela 12).

Pored povećanja FGP, primenom *A. chroococcum* F8/2 u bioprajmingu, zabeležena su povećanja vrednosti indeksa germinacije kod soje od 100%, pšenice 19,8%, paradajza i krastavca od 17% (Tabela 13). Kod ostalih biljnih kultura bila su prisutna manja povećanja GI, ali bez statističke značajnosti. Ranijim istraživanjima *Azotobacter* sp. pokazao je stimulatívni efekat na GI. Mia et al. (2012) istakli da PGPR inokulanti koji sintetizuju IAA u prisustvu eksudata semena najverovatnije utiču na bržu germinaciju. Yousefi et al. (2017) su utvrdili da je u uslovima povećanog saliniteta (15 i 20 dS/m) *A. chroococcum* povećao GI za 88% i 316%, a u kombinaciji sa *A. lipoferum* u uslovima stresa (50 dS/m) povećan je za 155%.

Istraživanja su potvrdila da se inokulacijom sa *Azotobacter* sp. može se značajno uticati na MGT. El-Nahrawy and Yassin (2020) su potvrdili da i u uslovima povećanog saliniteta *Azotobacter* izolati, Az1-Az6, smanjuju prosečno vreme germinacije. Međutim, u ovom radu rezultati testa su pokazali da ne postoje statistički značajne razlike u prosečnom vremenu germinacije po biljnim vrstama.

A. chroococcum F8/2 uticao je na povećanje vigora I kod šećerne repe, uljane repice, kinoe za 91%, 52% i 45%, dok su vrednosti vigora II bile povećane kod kukuruza za 68%, slačice 33%, paradajza 36% i soje 23%. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima i analizama ranijih istraživanja. Rudolf et al. (2015) su PGPR - inokulacijom semena kukuruza lošeg vigora postigli poboljšanje vigora što je rezultiralo povećanjem procenta germinacije za 7,5% koji je odgovarao procentu germinacije semena visokog kvaliteta. Gholami et al. (2009) su primenom *Azospirillum brasilense* DMS 1690 i *Pseudomonas putida* R-168 postigli pored povećanja procenta germinacije od 18,5% i značajna povećanja vigora I klijanaca kukuruza za 116% i 94%. Aishwarya et al. (2019) su primenom tri soja *A. vinelandi* kod pasulja postigli promociju vigora I od 79,98% kod *A. vinelandi* 1, do 84,78% kod *A. vinelandi* 3 u odnosu na kontrolu. Sev et al. (2020) su inokulacijom semena paradajza *A. vinelandi* AV7 zabeležili vrednost vigora I od 790, a u kontroli 560. Eksperiment izveden od strane Boddupalli et al. (2017) je pokazao da su semena pšenice i paradajza inokulisana *Azotobacter* sp. u uslovima prisutnih nanočestica cink oksida postigla veći vigor I za 15-20% u odnosu na neinokulisana semena. Neinokulisana semena paradajza u uslovima povećane koncentracije cink oksida redukovala su vigor I za 50-60%. Biopajming sa *A. lipoferum* DSM 1691 kod kukuruza poboljšao je vigor I klijanaca u odnosu na kontrolu (Gholami et al., 2009).

Povećana dužina klijanaca direktno utiče na poboljšanje vigora I i u bioprajmingu semena PGPR može biti rezultat sinteze mikrobnih fitohormona (Glick et al, 2007). Delshadi et al. (2017) PGPR su bioprajmingom postigli povećanje dužine klijanaca slatke deteline (*Onobrihychis sativa*). Jnawali et al. (2015) izneli su literaturni podatak da je prisustvo *A. chroococcum* u rizosferi paradajza i krastavca bilo u korelaciji sa povećanom germinacijom i rastom klijanaca, kao i da je inokulacijom pšenice PGPR postignuto povećanje dužine klijanaca. *A. chroococcum* F/2 je kod većine biljaka uticao na povećanje dužne klijanaca, ali od statističkog značaja su povećanja kod soje i kinoa od 100% i 30,8% (Slika 8). Povećanje suve mase bilo je prisutno kod bosiljka od 40%, slačice 28% i paradajza 25%.



Slika 8: Efekat inokulacije sa *Azotobacter chroococcum* F8/2 na kiljance *Glycine max* L.

Germinacija semena nakon inokulacije može biti stimulirana, inhibirana ili ostati na nivou kontrolnih tretmana i sva tri ova efekta je ispoljio *A. chroococcum* F8/2 prema odabranim biljnim vrstama. *A. chroococcum* sam i u kombinaciji sa *Pseudomonas* i *Azospirillum* je inhibitorno delovao na germinaciju semena kinoa pri čemu je redukovao vigor, a inhibitorni efekat *Azotobacter* mogao je biti rezultat kompeticije za kiseonik ili zbog produkcije jedinjenja koja imaju antagonističku aktivnost (Al-Barakah and Sohaib, 2019), dok promovisana geminacija može biti rezultat povećane koncentracije šećera nastala kao posledica bakterijske inokulacije (Zhang et al., 2008). Mohammad (2014) je primenom *A. chroococcum* zabeležio povećanje procenata germinacije kod nekih sorti pšenice, dok kod drugih ovaj efekat je izostao. Različiti efekti inokulacije mogu ukazati na specifičnost reakcije bakterije što zavisi od soja, ali i od koncentracije inokuluma (Somova et al., 2001) Tako su istraživanja Pacheco da Silva et al., (2022) pokazala da inokulacija različitih sorti soje ima raspon odgovora od 60% povećanja parametara rasta do smanjenja od 12%, što ukazuje na prisustvo sorta-PGPR specifičnost. Stamenov et al. (2018) su u ogledima sa crnim lukom pokazali da su primenjeni PGPR, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp. D i K inhibitorno delovali na germinaciju, dok je *Azotobacter* sp. pokazao pozitivne rezultate. Manmnang et al. (2015b) su pokazali da primenjeni sojevi *Azospirillum brasilense* različito utiču na posmatrane germinacijske parametre kod paradajza i salate, gde je jedan soj pokazao pozitivan efekat kod jedne biljke da bi taj efekat izostao kod druge.

Rezultati su pokazali da se bioprajming tehnikom, odnosno inokulacijom *A. chroococcum* može značajno uticati na povećanje germinacije i rast klijanaca, jer je kod svih ispitivanih biljaka došlo do povećanja vrednosti jednog ili više parametara klijavosti. Iz iznetih rezultata može se videti da postignuti efekti variraju zavisno od ispitivane biljne vrste, tako da kompatibilnost PGPR i biljaka ima važnu ulogu u primeni. Istovremeno ova istraživanja su ukazala na potrebu za daljim proučavanjem kako bi se procenili faktori koji mogu uticati na komunikaciju između sorte biljaka i PGPR-a i na identifikaciju načina za poboljšanje efikasnosti interakcijskih odnosa soj-sorta. Biljke kod kojih je pored povećanja procenta germinacije postignuto povećanje vrednosti u više različitih parametara (GI, vigor I, dužina klijanaca) su soja, kinoa i paradajz. S obzirom na njihov značaj u nacionalnoj i svetskoj poljoprivrednoj proizvodnji, primenu *A. chroococcum* u bioprajmingu semena ovih biljnih vrsta možemo smatrati kao značajan potencijal u unapređenju održivosti poljoprivredne proizvodnje.

Tabela 13: Uticaj inokulacije sa *Azotobacter chroococcum* F8/2 na parametre klijavosti

Biljna vrsta	Tretmani	FGP (%)	GI	MGT	Vigor I	Vigor II	Dužina klijanaca (cm)	Suva masa klijanaca (g)
<i>Sinapsis alba</i> L.	Kontrola	100±0	25,0±0,37	1,0±0,09	118±194	0,39±0,09	11,87±1,95	0,0039±0,0010
	Inokulacija	100±0	24,5±1,00	1,00±0,05	1266±269	0,52±0,10*	12,65±2,67	0,0050±0,0010*
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Kontrola	69±8	4,00±0,49	5,00±0,18	321±86	0,04±0,02	4,60±1,00	0,0005±0,0001
	Inokulacija	58±8	3,00±0,31	5,00±0,26	294±48	0,04±0,02	5,06±0,79	0,0007±0,0002*
<i>Triticum aestivum</i> L.	Kontrola	77±2	12,00±1,23	2,00±0,19	894±169	1,04±0,14	11,64±2,29	0,0135±0,0020
	Inokulacija	89±7*	14,38±1,53*	2,00±0,13	1883±241	1,83±0,2	21,18±2,38	0,0200±0,0020
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	Kontrola	65±2	8,86±1,18	3,00±0,35	190±45	0,06±0,02	2,92±0,64	0,0008±0,0003
	Inokulacija	72±3*	8,91±0,76	3,00±0,37	276±61*	0,06±0,02	3,82±0,80*	0,0007±0,0003
<i>Zea mays</i> convar. <i>saccharata</i>	Kontrola	93±6	8,00±0,66	3,00±0,09	389±70	2,84±1,02	4,24±0,84	0,0306±0,0110
	Inokulacija	92±11	8,00±1,09	3,00±0,144	806±113	4,77±0,98*	8,76±1,06	0,0520±9,0110
<i>Brassica napus</i> L.	Kontrola	44±0	8,00±1,78	2,00±0,49	398±84	0,13±0,03	9,04±1,90	0,0032±0,0070
	Inokulacija	43±11	8,00±1,92	2,00±0,32	592±157*	0,14±0,05	13,77±1,19	0,0030±0,0080
<i>Beta vulgaris</i> L.	Kontrola	54±5	2,7±0,56	5,00±0,38	183±120	0,11±0,03	3,38±2,15	0,0021±0,0006
	Inokulacija	34±5*	2,8±0,50	4,00±0,14	349±173*	0,09±0,04	8,22±1,36	0,0023±0,0004
<i>Glycine max</i> L.	Kontrola	48±3	2,00±0,15	5,00±0,48	223±102	8,43±1,80	4,63±2,08	0,1758±0,0367
	Inokulacija	55±3*	4,00±0,69*	5,00±0,96	501±160	10,40±1,92*	9,26±3,41*	0,1811±0,0375
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Kontrola	91±4	6,00±0,16	4,00±0,13	1076±117	0,14±0,22	11,82±1,14	0,0016±0,0003
	Inokulacija	99±2*	7,00±0,42	4,00±0,18	992±324	0,19±0,04*	9,25±1,01	0,0020±0,0004*
<i>Cucumis sativus</i> L.	Kontrola	65±5	6,00±0,16	3,00±0,34	549±104	1,1±0,29	8,71±1,44	0,0174±0,0040
	Inokulacija	72±2*	7,00±0,72*	3,00±0,14	1293±168	1,32±0,27	18,19±2,14	0,0186±0,0040

±std.dev.; * vrednost parametra u tretmanu inokulacije se razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou značajnosti $p \leq 0,05$

5.3.2. Uticaj inokulacije sa *Bacillus megaterium* 11/3 na parametre germinacije

Na osnovu analize rezultata povećanje FGP uočeno je kod uljane repice i to od 40% (Tabela 14). Da *Bacillus* sp. može imati značajnu ulogu u poboljšanju klijavosti potvrdili su rezultati brojnih istraživanja. Martinez et al. (2013) su inokulacijom semena paradajza sa *Bacillus* sp. utvrdili povećanje FGP za 5-6% u odnosu na kontrolu. Begum et al. (2003) su utvrdili da su *B. pumilus* SE-34, *B. pasteurii* T4, *B. subtilis* IN937-b i *B. subtilis* GBO3 zahvaljujući antimikrobnoj aktivnosti, indirektno, doprineli povećanju FGP kod *Abelmoschus esculentus* L. Rodrigez et al. (2015) su kod *Abies religiosa* sa *Bacillus*-bioprajangom postigli FGP od 68%, što je značajno više u odnosu na kontrolu (28%). Bidabadi and Mehrallan (2019) bioprajangom *B. polymixa*, nakon 13 dana zabeležili FGP od preko 20%, dok u kontroli klijanje nije počelo, obzirom da *Dracocephalum kotschy* Boiss odlikuje spora germinacija. Naseer et al. (2020) su u inokulaciji semena pirinča uključili 15 izolata *B. megaterium* i utvrdili da je FGP bio povećan kod svih sojeva u odnosu na kontrolu. Autori su utvrdili najnižu vrednost FGP primenom izolata AN71 (82,5%), a kod izolata AN24, AN 30, AN 31 AN75 FGP bio je 100%, dok je u kontroli FGP iznosio 77,5%. Cueva-Yesquen et al. (2021) su inokulacijom sa devet PGPR u testu germinacije kod *Passiflora incarnata* utvrdili da se među bakterijama koje daju najbolje efekte nalazi *B. megaterium* EP184. Kaymak et al. (2009) su primenom *B. subtilis* BA 142 kod *Raphanus sativus* L. (sorta „Siyah“) u uslovima stresa soli (15 i 20 g/l NaCl) postigli vrednosti FGP od 54,74% i 21,34% koje su bile znatno veće od FGP u kontrolnim tretmanima gde je zabeležen FGP od 34,13% i 1,28%. FGP se povećao za 30% i 10% kod dve sorte semena pšenice - sorte tolerantne i sorte osetljive na sušu, inokulacijom sa *B. subtilis* 10-4 koji u stresnim uslovima suše doprinosi brzom adaptaciji i aktiviranju specifičnog metabolizma biljke (smanjenje sadržaja prolina, sprečavanje gubitka elektrolita i peroksidacija masti) (Lastochkina et al., 2020). Den et al. (2021) su bioprajangom dve različite sorte semena *Helianthus annuus* L. (FH545; FH620) sa *Bacillus* sp. (KS-54) postigli značajna povećanja FGP od 47% i 25%. Wu et al. (2016) su inokulacijom semena *Codonopsis pilosula* sa *B. subtilis* GB03 poboljšali FGP za 12% u slučaju kada je vreme potapanja semena u inokulum trajalo 5 minuta. Mehanizmi efekata bioprajangina na FGP, koji su potvrđeni u većem broju istraživanja, još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Za dobru germinaciju od izuzetnog značaja je aktivnost enzima amilaza u semenu, a Li i Hu (2020) su potvrdili da se povećanje aktivnosti β -amilaza za 4% i 18,5% dešava pod uticajem *B. subtilis* QM3 u zavisnosti od koncentracije inokuluma.

Međutim, negativan uticaj na procenat germinacije *B. megaterium* 11/3 je pokazao kod soje (Tabela 14). Kang et al. (2007) su primenom *Pseudomonas chlororaphis* O6 utvrdili inhibiciju u germinaciji pšenice i ječma, dok je odsustvo inhibicije zabeleženo kod krastavca i pirinča. Autori su istakli da je razlog razlike u efektima jednog istog soja rezultat razlike sastava eksudata ispitivanih biljaka.

Rezultati testa su pokazali da je *B. megaterium* 11/3 značajno uticao na povećanje GI od 41% kod uljane repice i 26% kod kukuruza. Da inokulacija PGPR utiče značajno na povećanje GI potvrdila su istraživanja Kaymak et al. (2009) koji su primenom *Agrobacterium rubi* A 16, *Burkholderia gladii* BA 7, *Pseudomonas putida* BA, *Bacillus subtilis* bA 142 i *Bacillus megaterium* M3 poboljšali GI *Raphanus sativus* L. u uslovima stresa soli (15 i 20 g/l NaCl). Zongzheng et al. (2009) su primenom *B. subtilis* SY1 kod semena plavog patlidžana postigli povećanje GI za 35%.

MGT je parametar germinacije koji pokazuje kolika je brzina klijavosti i istovremeno je u korelaciji sa vigorom. Zato je od izuzetnog značaja postignuto smanjenje njegove vrednosti za 33% kod kukuruza nakon inokulacije *B. megaterium* 11/3. Rezultati istraživanja Yildirim et al. (2021) su potvrdili da endofitni bakterijski sojevi *Pseudomonas fluorescens* L5b, *Pseudomonas gessardii* L13, *Bacillus subtilis* sBs i *Bacillus mojavensis* ApBm inokulacijom semena paprike (koja su bila u različitim starosnim fazama) značajno smanjili MGT. Najbolji rezultat je postignut sa *B. mojavensis* ApBm kojim se MGT sa 6,52, koliko je zabeleženo u kontrolnom tretmanu, redukovao na 4,01.

Rezultati testa germinacije su pokazali da je *B. megaterium* 11/3 povećao vigor I kod slačice, krastavca i kukuruza za 28%, 33% i 31% (Tabela14). Amogou et al. (2018) su kod semena kukuruza inokuliranih *B. panthothenicus* povećali vigor I za 76,64%, dok su Kifle i Laing (2016) inokulacijom kukuruza sa *B. megaterium* V16 i *B. ambifaria* (V9) postigli izuzetno velika povećanja, jer zabeležene vrednosti vigora su bile od 7 do 8 puta više u tretmanima inokulacije u odnosu na kontrolni tretman. Zongzheng et al. (2009) su primenom *B. subtilis* SY1 kod semena plavog patlidžana povećali vigor I za 64%. Veliko povećanje vigora I od 210% postigli je Wu et al. (2016) inokulacijom semena *Codonopsis pilosula* sa *B. subtilis*. Begum et al. (2003) su utvrdili da su *B. pumilus* SE-34, *B. pasteurii* T4, *B. subtilis* IN937-b i *B. subtilis* GBO3 zahvaljujući antimikrobnoj aktivnosti, indirektno, doprineli povećanju vigora klijanaca *Abelmoschus esculentus* L. Rajer et al. (2022) su inokulacijom sa *B. atrophaeus* FA12 i *B. cabrialesii* FA 26 povećali vigor I *Oryza sativa* L. za 78,89% i 198,70%. Naser et al. (2020) su u inokulaciji semena pirinča uključili 15 izolata *B. megaterium*, od kojih je izolat AN24 uticao na najveće povećanje vigora (54,35%) u odnosu na kontrolu. Iako dužina klijanaca pored FGP utiče na vrednost vigora I, analizom rezultata ovog testa nisu zabeležena statistički značajna povećanja u dužini klijanaca kod kultura kod kojih je vigor I povećan. Takođe, nisu zabeležene značajnije promene u vigoru I kod uljane repice i soje gde su zabeležena smanjenja dužine klijanaca. Međutim, smanjenje dužine klijanaca za 40% u kombinaciji na niskim procentom germinacije uticao je na smanjenje vigora I kod bosiljka. Pored toga što ishod inokulacije zavisi od aktivnosti mikroorganizma i karaktera biljno-mikrobne interakcije, zavistan je i od drugih faktora kao što su uslovi skladištenja semena neposredno pre izlaganja delovanju mikroorganizama (Sarić-Krsmanović et al., 2017). Isti autori su naveli podatak da dva izolata *Bacillus licheniformis* imaju pozitivan efekat na semena *Datura stramonium* i *Abutilon theophrasti* kada su čuvana u laboratorijskim uslovima i negativan efekat kada su semena bila skaldištena i čuvana na temperaturi od 4 °C.

Povećanje vigora II zabeleženo je kod kukuruza i pšenice i iznosila su 39% i 43% u odnosu na kontrolu. S obzirom da nisu postojala značajnija povećanja u FGP kod pšenice i kukuruza, postignuta povećanja vigora II kod ovih biljaka je rezultat povećanja suve mase klijanaca. Suva masa klijanaca pšenice povećana je za 42,7%, a kukuruza za 38,61%. Povećanje suve mase nadzemnog dela i korena klijanaca kukuruza od 61,1% i 61,5% u uslovima stresa soli postignuto je nakon bioprajminga sa *Bacillus* sp. MGW9 (Li et al., 2021). Bidabadi i Mehrallan (2019) su zabeležili povećanje suve mase klijanaca *Dracocephalum Kotschy* Bois nakon bioprajminga sa *B. polymixa*, dok su Andrade et al. (2020) pored FGP i dužine klijanaca, zabeležili povećanje suve mase klijanaca kukuruza - hibrida 30A37PW® od 14-53% i hibrida DKB 390 od 8-27% nakon inokulacije *Bacillus* sp. (RZ2MS9) u odnosu na kontrolni tretman.

Tabela 14: Uticaj inokulacije *Bacillus megaterium* 11/3 na parametre klijavosti

Biljna vrsta	Tretmani	FGP (%)	GI	MGT	Vigor I	Vigor II	Dužina klijanaca (cm)	Suva masa klijanaca (g)
<i>Sinapsis alba</i> L.	Kontrola	97±4	24,00±1,19	1,00±0,04	1139±194	0,43±0,11	11,72±1,83	0,0044±0,0011
	Inokulacija	99±2	25,00±0,58	1,00±0,03	1517±309*	0,43±0,08	13,37±2,79	0,0043±0,0007
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Kontrola	90±2	12,00±0,26	2,00±0,02	466±95	0,07±0,02	4,71±0,96	0,0007±0,0002
	Inokulacija	90±8	8,00±0,64	3,00±0,02	334±60*	0,07±0,01	3,47±0,62*	0,0007±0,0002
<i>Triticum aestivum</i> L.	Kontrola	98±2	10,56±0,38	2,00±0,09	934±141	0,96±0,24	9,53±1,38	0,0098±0,0025
	Inokulacija	95±2	9,79±0,43*	3,00±0,17	1254±112	1,37±0,25*	9,48±0,96	0,0144±0,0025*
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	Kontrola	66±2	7,25±0,90	3,00±0,26	212±39	0,05±0,01	3,22±0,60	0,0007±0,0002
	Inokulacija	65±14	6,81±1,73	3,00±0,17	223±36	0,04±0,02	3,66±0,57	0,0007±0,0002
<i>Zea mays</i> convar. <i>saccharata</i>	Kontrola	99±2	6,74±0,54	4,00±0,35	551±67	3,16±0,63	5,56±0,67	0,0320±0,0065
	Inokulacija	98±2	8,49±0,65*	3,00±0,26*	709±113*	4,38±1,07*	8,07±1,21	0,0449±0,1140*
<i>Brassica napus</i> L.	Kontrola	42±4	6,56±1,08	2,00±0,28	327±51	0,10±0,03	7,82±1,28	0,0027±0,0004
	Inokulacija	59±4*	9,25±0,92*	2,00±0,19	553±69	0,20±0,04	6,53±0,52*	0,0034±0,0008*
<i>Beta vulgaris</i> L.	Kontrola	60±6	4,15±0,63	4,00±0,35	266±61	0,16±0,03	4,40±0,70	0,0027±0,0004
	Inokulacija	51±10	4,21±1,05	4,00±0,50	304±73	0,13±0,03*	5,60±0,75*	0,0025±0,0001
<i>Glycine max</i> L.	Kontrola	85±2	5,75±0,31	4,00±0,22	598±129	15,04±2,11	7,00±1,56	0,1759±0,0244
	Inokulacija	69±7*	5,85±1,08	5,00±0,31*	153±29	16,37±3,97	2,66±0,59	0,2352±0,4597*
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Kontrola	94±5	6,00±0,13	4,00±0,93	734±72	0,16±0,00	7,81±0,61	0,0017±0,0003
	Inokulacija	96±3	7,00±0,91	4,00±0,32	1069±124	0,16±0,00	9,16±0,56	0,0017±0,0003
<i>Cucumis sativus</i> L.	Kontrola	90±5	10,00±1,94	2,00±0,57	258±41	1,67±0,35	2,87±0,45	0,0185±0,0034
	Inokulacija	87±7	11,00±1,94	2,00±0,14	339±68*	1,45±0,24	2,40±0,29*	0,0167±0,0025

± std. dev.; * vrednost parametra u tretmanu inokulacije se razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou značajnosti $p \leq 0,05$

S obzirom da je *B. megaterium* 11/3 kod kukuruza doveo do statistički značajnog povećanja najvećeg broja parametara kljavosti (GI, MGT, vigor I, vigor II i suva masa klijanaca) kao i dužine klijanaca, koje nije statistički značajno, može se smatrati značajnim potencijalom za primenu u bioprajinu pri proizvodnji ove važne ratarske kulture. Pored toga, ovaj soj je doveo do poboljšanja više od jednog parametra germinacije uljane repice.

Dobijeni rezultati testova germinacije su pokazali da *A. chroococcum* F/2 i *B. megaterium* 11/3 mogu biti značajni bioprajin agensi za uspešnu germinaciju, pri čemu se mora voditi računa o kompatibilnosti između eksudata semena i inokulanta.

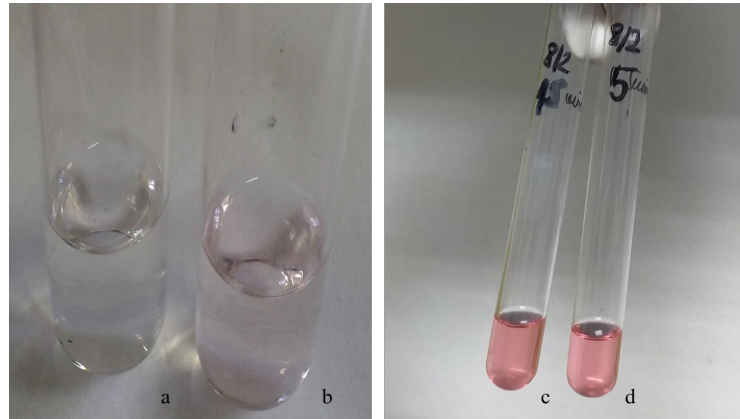
5.4. Uticaj SMP kao abiotičkog faktora na efekte bioprajin

Pored toga što je uloga i značaj SMP polja u unapređenju germinacije, rasta i prinosa poznati (Pittman 1977, Vasilevski 2003, Bhardwaj et al., 2012, Vashisth et al., 2013, Souza et al., 2006) brojna pitanja ostaju otvorena i zahtevaju opsežna ispitivanja. Neke od dosadašnjih analiza pokazala su da jačina statičkog magnetnog polja, vreme izlaganja, genotip biljke i uslovi okruženja značajno utiču na krajnji rezultat njegovog delovanja (Pittman, 1977; Morillo-Coronado et al., 2022). Ispitivanja su potvrdila mogućnost primene SMP-a kao praingin agensa. Izlaganje semena pirinča (*Oryza sativa* L.) SMP jačine 150 mT povećalo je FGP (Carbonelli et al., 2009), a Florez et al. (2004) su utvrdili da jačine SMP 125 i 250 mT, kada deluju 24 h, značajno povećavaju FGP i redukuju MGT. Vashisth and Nagarajan (2010) su kod suncokreta (*Helianthus annuus* L.) primenom SMP jačine od 0-250 mT, sa povećanjem u etapama za po 50 mT, uočili povećanje brzine germinacije, dužine i suve mase klijanaca. Cakmak et al. (2010) izlaganjem semena pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.) SMP-u jačine 4 ili 7 mT povećavali stopu germinacije. Izlaganjem semena paradajza (*Solanum lycopersicum* L.) različitim vrednostima jačine SMP od 80, 120, 160 i 200 mT u trajanju od 1, 3, 5, 10, 15 i 20 minuta poboljšali su se germinacijski parametri, a najveće povećanje u procentu germinacije postignuto je sa SMP jačine 160 i 200 mT u trajanju od 1 minuta (Souza et al., 2010). Kod semena graška (*Pisum sativum* L. cv. *climax*), SMP jačine 60 mT i 180 mT uticao je na povećanje FGP za 86,43%, GI za 13,21% i vigora I za 204,60% (Iqbal et al., 2013).

Većina dosadašnjih ispitivanja je posmatrala samostalni uticaj SMP na germinaciju bez prisustva nekog drugog praingin agensa, međutim u slučaju primene bioprajin može se pretpostaviti da SMP može ispoljiti uticaj i na aktivnost PGPR.

Pored uticaja na biljke, potvrđen je uticaj SMP na aktivnost bakterija. Dosadašnja ispitivanja su potvrdila da magnetno polje deluje na bakterijski ćelijski rast, proliferaciju, viabilnost i njenu morfologiju (May et al., 2009). Bajpai et al. (2012) su potvrdili da SMP jačine 100 mT inhibira rast i Gram- (*Staphylococcus epidermidis*) i G + (*E. coli*) bakterija, usled oštećenja ćelijskih membrana. Ren et al. (2018) su naveli podatak da je u slučaju izlaganja *Penibacillus* sp. SMP-u, sa povećanjem vremena izlaganja i intenziteta došlo je do inhibicije aktivnosti i ćelijske smrti. Isti autori su potvrdili da je na 60 mT kod *Acinetobacter* B11 došlo do potpunog gubitka citoplazmatskog sadržaja i ćelijske aktivnosti, jer ova jačina SMP dovela je do formiranja mikroperforacija, ireverzibilnih oštećenja na ćelijskoj površini, ali da manji intenzitet SMP od 25-35 mT i optimalno vreme izlaganja može, bez obzira na mikropromene u strukturi ispitivanog soja *Acinetobacter* B11, stimulatивно delovati na enzimsku aktivnost. Haritwal et al. (2015) su utvrdili da je kod *Bacillus* sp. povećana sinteza IAA, siderofora i ACC deaminaza i parametri rasta u uslovima abiotičkog stresa nakon izlaganja magnetnom polju jačine +1700 μ T. Jovičić-Petrović et al. (2021) su izlaganjem *B. amyloliquefaciens* D5 ARV SMP 15 minuta potvrdili značajno povećanje sinteze IAA. S obzirom da je *A. chroococcum* F 8/2 pokazao svojstvo produkcije IAA, prvi korak ove faze istraživanja bio je ispitivanje uticaja SMP na promenu u sintetisanju količini ovog fitohormona. Pojačana sinteza IAA utvrđena je kod *A. chroococcum* F 8/2

nakon delovanja SMP jačine 90 mT 5 i 15 minuta. U slučaju kada su se kolonije soja izlagane uticaju SMP 5minuta količina sintetizovane IAA iznosila je 100 µg/ml, a u slučaju produženja vremena izlaganja na 15 minuta količina sintetizovane IAA bila je veća od 100 µg/ml (Slika 9c, 9d). Dobijene vrednosti su bile znatno veće od one koja je utvrđene bez delovanja SMP, od 10 µg/ml (Tabela 12). Rezultati su pokazali da je SMP 90 mT uticao na metaboličku aktivnost *A. chroococcum* F 8/2 koja bi značajno mogla uticati na efekte bioprajinjama ovim sojem.



Slika 9: Produkcija IAA od strane *Azotobacter chroococcum* F8/2 a) kontrola b) sinteza IAA od strane *A. chroococcum* F8/2 koji nije izložen SMP c) sinteza IAA od strane *A. chroococcum* F8/2 koji je izložen SMP 90 mT 5 minuta d) sinteza IAA od strane *A. chroococcum* F8/2 koji je izložen SMP 90 mT 15 minuta

Cilj ove faze istraživanja bio je ispitivanje delovanja SMP na efekte koji su postignuti bioprajinjom. Postavljena je hipoteza da se efekat ove interakcije magnetno polje-mikroorganizam-seme odražava i na postignute rezultate kroz parametre germinacije. Stoga su praćeni parametri germinacije nakon inokulacije i izlaganja delovanju SMP.

5.4.1. Uticaj SMP na efekte dobijene inokulacijom sa *Azotobacter chroococcum* F8/2

Na osnovu analize rezultata nakon izlaganja inokulisanih semena bosiljka uticaju SMP jačine 90 mT u trajanju od 15 minuta i šećerne repe u trajanju od 5 minuta postignuta su značajna povećanja procenta germinacije za 41% i 56%. (Tabela 15). *A. chroococcum* F8/2 je inhibirao klijavost bosiljka (Tabela 13), ali uvođenjem SMP kao abiotičkog faktora dolazi do suprotnog efekta. Kod kinoe, paradajza i pšenice SMP 90 mT i vreme ekspozicije od 15 minuta inhibitorno je delovalo na procenat germinacije i smanjenja su iznosila 31%, 13% i 10%. Smanjenjam vremena izlaganja kod paradajza i pšenice na 5 minuta nisu uočene statistički značajne razlike u FGP u odnosu na kontrolni tretman.

Veliko povećanje u GI od 85% utvrđeno je kod bosiljka nakon izlaganja inokulisanih semena SMP 90 mT u trajanju od 15 minuta.

Kod bosiljka i krastavca, oba vremenska režima primenjenog SMP pozitivno su uticali na MGT, dok je kod paradajza pozitivan efekat bio samo u slučaju kraćeg vremena izlaganja. Međutim, kod šećerne repe je zabeležen negativan efekat, jer je MGT bio povećan za 26%.

Jedino statistički značajno povećanje vigora I od 23% zabeleženo je kod bosiljka kada su inokulisana semena izlagana SMP 90mT 5 minuta Isti ekspozicioni režim je kod kinoe uticao na smanjenje vigora I za 21%, a produženjem vremena izlaganja na 15 minuta smanjenje vigora I je bilo prisutno kod slačice, kinoe i paradajza za 31%, 29% i 12%. Na nižu vrednost vigora I slačice uticalo je smanjenje dužine klijanaca. Takođe, smanjena je dužina klijanaca pšenice i šećerne repe. Smanjenje

suve mase klijanaca bosiljka nije značajnije uticalo na vrednost vigora II, naprotiv, rezultati su pokazali povećanje koje je najverovatnije rezultat povećanog FGP.

Kod kukuruza je vigor II bio niži u odnosu na tretman inokulacije, a s obzirom da u FGP nije bilo razlika od značaja, smanjenje je posledica smanjenja suve mase.

U slučaju inokulacije *A. chroococcum* F8/2 (Tabela 13) kod velikog broja biljaka parametri klijavosti su povećani što se može pripisati i prisustvu optimalne koncentracije auksina (Tabela 12). Zato bi prisutna smanjenja u parametrima klijavosti uz primenu SMP mogla da se objasniti prisusutvom velike koncentracije egzogenog auksina sintetizovanog od strane bakterije nakon delovanja SMP. Thimann (1939) smatra da je inhibicija rasta kao i njegova stimulacija u biljnom svetu pojava koja je u većini slučajeva rezultat delovanja auksina i da vrlo visoke koncentracije direktno inhibiraju rast i da su u suštini toksične. Barbez et al. (2017) ističu da iako mehanizam delovanja auksina nije dovoljno razjašnjen, u osnovi, ovaj fitohormon aktivira mehanizam kojim se vrši acidifikacija intracelularnog prostora i pokretanje enzima ćelijskog zida koji utiču na njegovo slabljenje i omogućavaju ekspanziju ćelija, a u kojoj će meri mehanizam delovanja auksina biti stimulativan ili inhibitoran zavisi od njegove koncentracije, ali i vrste tkiva koja bi mogla biti od značaja kada se imaju u vidu jedino postignuti pozitivni efekti primene SMP kod bosiljka.

Tabela 15: Uticaj tretmana SMP na efekte dobijene inokulacijom *Azotobacter chroococcum* F8/2

Biljna vrsta	Tretmani	FGP (%)	GI	MGT	Vigor I	Vigor II	Dužina klijanaca (cm)	Suva masa Klijanaca (g)
<i>Sinapsis alba</i> L.	BP	100±0	25,00±0,34	1,06±0,05	1266±269	0,52±0,10	12,66±2,67	0,005±0,001
	BP + T5	99±2	24,50±0,42	1,03±0,04	806±113	0,49±0,10	8,14±1,15	0,005±0,001
	BP + T15	98±2	24,21±0,53	1,03±0,06	872±167*	0,48±0,07	8,90±1,64*	0,005±0,001
<i>Ocimum basilicum</i> L.	BP	58±8	3,00±0,31	5,01±0,27	316±48	0,04±0,01	5,10±0,79	0,0007±0,0002
	BP + T5	82±5	6,11±0,45	4,03±0,15*	363±32*	0,04±0,01	4,43±0,30*	0,0005±0,0001*
	BP + T15	84±18*	5,56±0,77*	4,20±0,42*	336±72	0,06±0,02*	4,00±0,47*	0,0007±0,0002
<i>Triticum aestivum</i> L.	BP	89±7	14,38±1,53	1,97±0,13	1883±242	1,83±0,20	21,18±3,39	0,0200±0,0020
	BP + T5	86±5	14,14±1,67	1,88±0,20	1445±212	1,03±0,16	16,82±2,46*	0,0119±0,0010
	BP + T15	80±3*	11,78±0,17*	2,16±0,16	1320±181	0,94±0,15	16,56±2,52*	0,0118±0,0020
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	BP	72±3	8,91±0,76	2,85±0,37	276±62	0,06±0,02	3,82±0,81	0,0008±0,0003
	BP + T5	63±2*	8,50±0,78	2,67±0,28	218±25*	0,05±0,01	3,46±0,38	0,0008±0,0002
	BP + T15	55±4*	8,50±1,62	2,26±0,50	195±27*	0,50±0,01	3,55±0,36	0,0009±0,0002
<i>Zea mays</i> convar. <i>saccharata</i>	BP	92±11	8,00±1,09	3,12±0,14	806±133	4,77±0,98	8,76±1,06	0,0520±0,0110
	BP + T5	99±2	8,76±0,43	3,03±0,13	521±86	4,39±0,60	5,25±0,82	0,0440±0,0060*
	BP + T15	100±0	8,38±0,07	3,14±0,07	391±65	3,62±0,88*	3,91±0,65	0,0360±0,0090*
<i>Brassica napus</i> L.	BP	43±12	8,46±1,92	1,66±0,32	592±157	0,13±0,05	13,77±1,19	0,0030±0,0001
	BP + T5	49±10	8,40±1,22	1,98±0,43	505±168	0,14±0,05	10,19±2,57*	0,0030±0,0007
	BP + T15	47±9	8,17±1,93	1,93±0,26	679±159	0,13±0,03	14,41±2,37	0,0027±0,0004
<i>Beta vulgaris</i> L.	BP	34±5	2,80±0,50	3,56±0,14	349±174	0,10±0,04	8,22±1,36	0,0023±0,0004
	BP + T5	53±2*	3,54±0,05	4,64±0,29*	412±76	0,12±0,03	7,77±1,35	0,0022±0,0006
	BP + T15	34±5	2,67±0,52	3,62±0,22	260±70	0,07±0,02	7,57±1,27	0,0021±0,0004
<i>Glycine max</i> L.	BP	55±4	3,73±0,69	4,63±0,48	501±161	10,40±1,92	9,26±3,41	0,1811±0,0370
	BP + T5	60±3	3,62±0,54	4,75±0,11	434±133	10,36±2,32	7,25±2,27	0,1730±0,0394
	BP + T15	56±7	3,12±0,70	4,84±0,55	616±215	8,87±2,69	11,21±4,51	0,1573±0,0386
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	BP	99±2	6,64±0,42	3,97±0,18	992±324	0,19±0,04	9,20±1,01	0,0020±0,0004
	BP + T5	90±2*	6,66±0,33	3,60±0,14*	818±87	0,18±0,03	9,09±0,91	0,0020±0,0003
	BP + T15	86±5*	6,40±0,87	3,87±0,43	729±104*	0,16±0,02*	8,50±1,07	0,0019±0,0003
<i>Cucumis sativus</i> L.	BP	71±2	7,39±0,72	2,81±0,15	1293±168	1,32±0,27	18,19±2,14	0,0190±0,0040
	BP + T5	100±0	14,87±1,12	2,09±0,38*	1688±96	1,81±0,21	16,88±0,96	0,0180±0,0020

BP - biopraiming; T5 - tretman SMP u trajanju od 5 min.; T15 - tretman SMP u trajanju od 15 min.; ± std. dev.; * vrednosti parametra u tretmanu sa SMP se razlikuju u odnosu na tretman inokulacije na nivou značajnosti $p \leq 0,05$

5.4.2. Uticaj SMP na efekte dobijene inokulacijom sa *Bacillus megaterium* 11/3

Analizom rezultata testa kombinovanog tretmana inokulacije sa *B. megaterium* 11/3 i izlaganjem SMP 90 mT 5 minuta povećan je FGP kod šećerne repe i pšenice za 49% i 5%, a produženjem vremena izlaganja na 15 minuta kod šećerne repe je FGP povećan za 76%. Međutim, kod uljane repice zabeležena su smanjenja FGP od 24% i 29% u zavisnosti od vremena izlaganja, dok kod većine biljaka kombinovani tretman inokulacije *B. megaterium* 11/3 i SMP nije uticao značajne na FGP (Tabela 16). Jovičić-Petrović et al. (2021) su zabeležili pozitivan efekat kombinovanog tretmana sa *B. amyloliquefaciens* D5 ARV i SMP jačine 90 mT u trajanju od 15 minuta. na revitalizaciju starih semena slačice i povećanje procenta germinacije za 53,20%. S obzirom da je u ovoj studiji kombinovani tretman bioprajinomom i SMP delovao inhibitoryno jedino na FGP uljane repice u odnosu na tretman inokulacije i da vrednosti odgovaraju FGP neinokulisanih semena (Tabela 14), jedna od pretpostavki bi bila sa je genotip biljke bio ključan za efekat interakcije.

Kombinovani tretman inokulacije i SMP i vremenom izlaganja od 5 i 15 minuta je kod šećerne repe povećao GI za 36% i 76%. Smanjenja GI zabeležena su kod kukuruza, uljane repice i krastavca od 12%, 39% i 60% .

Kombinovani tretman inokulacije i SMP 5 i 15 minuta je pozitivno uticao na MGT soje i redukovan je za 25% i 27%. Kod svih ostalih biljnih kultura nisu zabeležene promene u odnosu na kontrolni tretman.

Povećanje vigora I za 27% postignuto je kod krastavca u slučaju kada su se inokulisana semena izložila SMP na 5 minuta, dok kod svih ostalih kultura nije bilo značajnijih promena. Povećana dužina klijanaca krastavca uticala je značajnije na povećanje vigora I. Takođe, isti režim kombinovanog tretmana uticao je na povećanje vigora II kod krastavca za 20%, a povećanje vigora II i suve mase klijanaca od 15% postignuto je kod paradajza kada se produžilo vremena izlaganja na 15 minuta. Jovičić-Petrović et al. (2021) ističu da je razlog povećanja suve mase pojačana akumulacija metabolita i preraspodela ugljenika između primarnog i sekundarnog metabolizma. Isti autori su primenom kombinovanog tretmana inokulacije sa *B. amyloliquefaciens* D5ARV i SMP 90 mT 15 minuta povećali suvu masu slačice za 24,44%. Međutim, u ovom ogledu, kombinovani tretman sa *B. megaterium* 11/3 i isti ekspozicioni režim uticao je na smanjenja suve mase slačice i soje od 23% i 25% što se negativno odrazilo na vrednost vigora II, gde su smanjenja iznosila 25% i 31%. Smanjenje vigora II od 35% bilo je prisutno i kod uljane repice, ali kao posledica niskog FGP.

Analizom rezultata može se zaključiti da kombinovani tretman *B. megaterium* 11/3 i SMP je pozitivno uticao na germinaciju pšenice i šećerne repe kod koje je pored povećanja FGP, povećan GI za 75% što je bilo najveće postignuto povećanje od svih posmatranih parametara. Kod uljane repice inhibitoryno delovanje bilo je najizraženije.

Dobijeni rezultati testa germinacije su potvrdili njenu kompleksnost i osetljivost, ali i mogućnost da se pažljivim biranjem PGPR sojeva, biljnih vrsta, kontrolom uslova gajenja i delovanja nekih od abiotičkih faktora (u ovom slučaju SMP) mogu unaprediti germinacijski parametri i vigor klijanaca. Kombinovana primena mikrobiološkog tretmana semena i SMP dala je pozitivne efekte kod bosiljka i šećerne repe, takođe, odsustvo pozitivnih efekata kod većine biljaka ili čak prisustvo inhibicije npr. slučaju kinoe i uljane repice ukazuje na specifičnost ispitivanih interakcija i na potrebu detaljnih istraživanja u slučaju razmatranja potencijalne primene.

Tabela 16: Uticaj SMP na parametre germinacije semena inokulisanih *Bacillus megaterium* 11/3

Biljna vrsta	Tretmani	FGP	GI	MGT	Vigor I	Vigor II	Dužina klijanaca(cm)	Suva masa klijanaca (g)
<i>Sinapsis alba</i> L.	BP	99±2	25,00±0,58	1,00±0,03	1517±309	0,43±0,08	15,32±2,79	0,0043±0,0007
	BP + T5	100±0	24,75±0,29	1,02±0,02	1295±256	0,33±0,11*	12,95±2,56*	0,0033±0,0011*
	BP + T15	100±0	24,75±0,54	1,02±0,02	1337±279	0,40±0,10	13,37±2,79	0,0040±0,0001
<i>Ocimum basilicum</i> L.	BP	90±8	8,00±0,64	3,00±0,02	334±60	0,06±0,01	3,72±0,67	0,0007±0,0001
	BP + T5	96±6	8,53±0,91	3,13±0,23	329±55	0,07±0,01	3,67±0,71	0,0008±0,0001
	BP + T15	83±9	7,47±1,10	3,16±0,15	293±50	0,12±0,02	3,47±0,62	0,0008±0,0001
<i>Triticum aestivum</i> L.	BP	95±2	9,79±0,43	3,00±0,17	1254±112	1,37±0,25	13,20±0,96	0,0144±0,0025
	BP + T5	100±0*	10,11±0,37	2,67±0,14	1089±263	1,19±0,25	10,89±2,63*	0,0120±0,0025*
	BP + T15	94±2.30	10,04±0,11	2,55±0,11	890±87	1,27±0,21	9,48±0,96	0,0135±0,0022
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	BP	65±14	6,81±1,73	3,00±0,17	223±36	0,04±0,02	3,48±0,40	0,0007±0,0002
	BP + T5	60±8	6,32±1,17	2,93±0,35	201±43	0,04±0,01	3,32±0,50	0,0006±0,0002
	BP + T15	53±8	6,82±2,62	2,93±0,91	196±52	0,04±0,01	3,66±0,57	0,0007±0,0001
<i>Zea mays</i> convar. <i>saccharata</i>	BP	98±2	8,49±0,65	3,00±0,26	709±113	4,38±1,07	8,07±1,21	0,0449±0,1140
	BP + T5	96±8	7,45±0,56*	3,42±0,24	685±105	4,36±1,09	7,16±0,85	0,0450±0,0045
	BP + T15	99±2	8,83±0,20	3,05±0,06	799±122	4,68±0,93	8,07±1,21	0,0470±0,0090
<i>Brassica napus</i> L.	BP	59±4	9,25±0,92	2,00 ±0,19	553±69	0,20±0,04	9,41±1,33	0,0034±0,0008
	BP + T5	45±4*	5,62±1,13*	2,39±0,24	294±36	0,16±0,04*	6,53±0,55	0,0036±0,0008
	BP + T15	42±5*	6,39±0,80*	2,42±0,42	274±40	0,13±0,05*	6,53±0,52	0,0032±0,0012
<i>Beta vulgaris</i> L.	BP	51±10	4,21±1,05	3,52±0,50	304±73	0,13±0,03	5,60±0,75	0,0025±0,0001
	BP + T5	76±3*	5,73±0,43*	3,66±0,14	448±85*	0,18±0,03	5,88±1,08	0,0023±0,0004
	BP + T15	90±5*	7,40±0,65*	3,28±0,19	502±58	0,20±0,03	5,60±0,75	0,0022±0,0004*
<i>Glycine max</i> L.	BP	69±7	5,85±1,08	5,00±0,31	153±29	16,37±3,97	2,24±0,39	0,2352±0,0400
	BP + T5	64±10	4,75±0,72	3,73±0,19*	340±79	11,22±1,86*	5,32±1,12	0,1753±0,0160*
	BP + T15	57±13	4,57±0,79	3,63±0,36*	149±37	12,05±2,93*	2,65±0,59*	0,2105±0,0264
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	BP	96±3	7,00±0,91	4,00±0,32	1069±124	0,16±0,03	11,13±1,16	0,0016±0,0003
	BP + T5	92±11	6,74±1,46	3,77±0,37	775±58	0,17±0,04	8,00±0,66	0,0017±0,0006
	BP + T15	93±5	7,40±1,00	3,60±0,23	851±46	0,19±0,04*	9,16±0,52	0,0020±0,0004*
<i>Cucumis sativus</i> L.	BP	87±7	11,00±1,94	2,00±0,14	339±68	1,45±0,24	3,89±0,72	0,0167±0,0025
	BP + T5	94±5	6,86±0,65*	3,76±0,21	468±140*	1,75±0,27*	5,12±1,29*	0,0185±0,0024
	BP + T15	96±8	11,39±1,72	2,25±0,30	230±32	1,71±0,29	2,40±0,29	0,0179±0,0026

BP - bioprajming; T5 - tretman SMP u trajanju od 5 min.; T15 - tretman SMP u trajanju od 15 min; ± std. dev.; * vrednosti parametra u tretmanu sa SMP se razlikuje u odnosu na tretman inokulacije na nivou značajnosti $p \leq 0,05$

5.5 Uticaj inokulacije sojevima *Azotobacter chroococcum* F8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3 na morfološke karakteristike korena

Karakteristike korena su genetski određene (Liang et al., 2014), međutim, promenljive su i menjaju se u odnosu na gradijent nutrijenata i vode, kao i zbog biotičkih interakcija sa drugim vrstama, zbog čega se uočavaju varijacije u karakteristikama korena unutar iste vrste (Bardgett et al., 2014). Dakle, bilo koji od ovih spoljašnjih faktora može uticati na karakteristike korena i u tom kontekstu PGPR su prepoznate kao faktori koji mogu uticati na promenu arhitekture korena (Mantelin et al., 2006). Imajući u vidu da je funkcionalnost korenovog sistema određena njegovom veličinom i morfologijom (Gordon et al., 2000), jedan od ciljeva ovog rada je ispitivanje uticaja inokulacije izabranih PGP sojeva na morfologiju korena. U ova ispitivanja su uključene biljne vrste kod kojih je u prethodnom istraživanju uočen stimulatívni efekat na neke od parametara germinacije.

Uticaj PGPR-a na rast i prinos biljaka je dokumentovan i u većini studija naglasak je stavljen na parametre rasta nadzemnog dela biljke. Međutim, interakcija PGPR sa biljkom počinje u rizosferi, a nadzemni rast biljke u velikoj meri zavisi od razvoja korenovog sistema (Grover et al., 2021).

Slačica (*Sinapis alba* L.), pšenica (*Triticum aestivum* L.), kinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), kukuruz (*Zea mays* convar. *Saccharata*), uljana repica (*Brassica napus* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.), paradajz (*Solanum lycopersicum* L.) i krastavac (*Cucumis sativus* L.) su gajene tri nedelje na kvarcnom pesku uz dodatak Hoaglandovog rastvora. Po isteku ovog perioda odvojeni su korenovi od nadzemnog dela i primenom SnapRoot aplikacije analizirani morfološki parametri korena. Dobijene vrednosti predstavljene su u tabelama 17 i 18. Rezultati su pokazali da je inokulacija sa *A. chroococcum* F8/2 uticala na povećanje morfoloških parametara korena kod većine testiranih biljaka. Pri inokulaciji sa *A. chroococum* F8/2, dužina korena je povećana kod svih testiranih biljaka osim kod soje i paradajza a statistički značajno povećanje je zabeleženo kod slačice i kukuruza (Tabela 17). Površina korena je povećana kod svih testiranih biljaka, osim soje, a statistički značajno povećanje konstatovano je pri inokulaciji slačice, pšenice i kukuruza. Volumen korena je statistički značajno povećan kod slačice, pšenice, kukuruza, paradajza i krastavca, dok kod ostalih biljaka nije bilo efekata od statističkog značaja. Prečnik korena je statistički značajno povećan kod pšenice, kukuruza i paradajza, dok kod slačice i uljane repice nije bilo efekata. Najveći efekat zabeležen je kod kukuruza gde su ukupna dužina, površina, volumen i prečnik korena povećani za 29%, 72%, 147% i 45%. Kod slačice je postignuto povećanje ukupne dužine, površine i volumena korena iznosilo 47%, 51% i 62%, a kod pšenice ukupna površina, volumen i prečnik korena povećani su za 95%, 227% i 58%. Kod paradajza i krastavca zabeležena su niža procentualna povećanja u ukupnom volumenu korena od 38% i 32%. Jedino kod soje su sva četiri ispitivana parametra morfologije veća u kontroli u odnosu na tretman.

Promene karakteristika korena posredstvom PGPR mogu doprineti agroekosistemu kroz poboljšanje otpornosti useva, tolerancije na stres, efikasnosti korišćenja resursa, stukture zemljišta itd. Stoga, PGPR koje imaju sposobnost da moduliraju karakteristike korena mogu igrati važnu ulogu u održivosti poljoprivrede, a promene karakteristika korena se mogu koristiti kao primarni kriterijumi za selekciju potencijalnih PGPR sojeva (Grover et al., 2021).

Jedna od najvažnijih posledica stimulatívog uticaja PGPR-a na rast korenovog sistema je povećana apsorpcija nutrijenata. Kako bi stimulisali veće usvajanje nutrijenata i rast biljaka, PGPR su uključene u puteve koji koordiniraju razvoj i ishranu biljaka (Turan et al., 2021).

Tabela 17: Uticaj inokulacije *Azotobacter chroococum* F8/2 na morfološke karakteristike korena biljaka

Biljna vrsta	Tretmani	Morfometrijski parametri korena			
		Ukupna dužina (cm)	Ukupna površina (cm ²)	Ukupan volumen (mm ³)	Prečnik korena (mm)
<i>Sinapsis alba</i> L.	Kontrola	111,85±14,58	351,53±67,97	84,89±25,07	0,94±0,08
	Inokulacija	164,22±9,20*	530,8±15,93*	137,30±7,39*	0,94±0,09
<i>Triticum aestivum</i> L.	Kontrola	1283,35±146,85	4213,08±525,68	1332,62±422,87	1,00±0,08
	Inokulacija	1313,08±208,60	8223,64±1213,65*	4357,88±886,47*	1,58±0,18*
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	Kontrola	218,82±23,13	352,75±50,63	49,62±14,13	0,49±0,03
	Inokulacija	221,43±27,83	404,16±49,76	61,51±13,03	0,56±0,07
<i>Zea mays</i> convar. <i>saccharata</i>	Kontrola	728,37±99,15	2600,00±246,6	712,35±135,03	1,04±0,24
	Inokulacija	936,92±169,90*	4461,61±69,82*	1758±378,93*	1,47±0,19*
<i>Brassica napus</i> L.	Kontrola	281,39±44,20	938,46±172,37	274,80±82,3	0,98±0,06
	Inokulacija	364,63±109,39	988,77±181,92	250,49±84,77	0,98±0,15
<i>Glycine max</i> L.	Kontrola	1325,89±138,09	4525,89±521,34	1247,72±253,89	1,098±0,11
	Inokulacija	1319,37±167,83	4296,15±501,94	1209,79±217,40	0,99±0,145
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Kontrola	1723,16±411,78	6365,23±1006,13	2076,94±485,23	1,15±0,22
	Inokulacija	1616,40±313,45	7399,86±1188,62	2873,93±362,76*	1,39±0,05*
<i>Cucumis sativus</i> L.	Kontrola	2093,5±264,76	6311,19±592,51	1568,91±159,68	0,94±0,06
	Inokulacija	2105,71±257,66	6899,11±625,93	2076,17±318,87*	1,00±0,12

K-kontrola; T-tretman inokulacije; ± std. dev.; * vrednost parametra u tretmanu inokulacije se razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou značajnosti $p \leq 0,05$

Stimulacija rasta korena kao posledica inokulacije i efekata PGPR uglavnom se povezuje sa sposobnošću bakterija da sintetišu IAA. Poznato je da mnogi PGPR sintetišu auksine koji utiču na rast i arhitekturu korena (Vacheron et al., 2013). *A. chroococum* F8/2, kao PGPR se odlikuje sposobnošću produkcije IAA (Tabela 12).

Inokulacija sa *B. megaterium* 11/3 uticala je na povećanje morfoloških parametara korena kod skoro svih testiranih biljaka (Tabela 18). Dužina korena pri inokulaciji sa *B. megaterium* 11/3 je povećana kod svih testiranih biljaka, a statistički značajno povećanje je konstatovano kod slačice, krastavca i pšenice. Statistički značajno povećanje površine konstatovano je kod krastavca i pšenice. Volumen je statistički značajno povećan kod kukuruza, krastavca i pšenice. Inokulacija sa *B. megaterium* 11/3 nije imala uticaj na prečnik korena kod slačice, pšenice i kukuruza, a povećanje prečnika je konstatovano kod krastavca. Inokulacijom sa *B. megaterium* 11/3 najveći efekat je postignut kod krastavca gde su povećanja ukupne dužine, površine, volumena i prečnika korena u odnosu na kontrolni tretman iznosila 55%, 82%, 91% i 36%. Kod pšenice povećanje ukupne dužine korena iznosilo je 39%, povećanje ukupne površine 59% i ukupnog volumena 79%. *B. megaterium* 11/3 je uticao na povećanje volumena korena kukuruza za 23%.

Dobijeni rezultati ukazuju da između ispitivanih sojeva postoji razlika u efektima na morfologiju korena kod različitih biljnih vrsta (Tabela 17 i 18), što ukazuje na značaj interakcija između biljke i mikroorganizama, ali i neophodnost daljih istraživanja u razjašnjenju ovih interakcija. Bez obzira na uočene razlike između ispitivanih sojeva, rezultati ovih istraživanja su pokazali da primena inokulacije izabranim sojevima predstavlja mogućnost za stimulaciju rasta i razvoja korena pojedinih biljnih kultura, što je potvrđeno i brojnim drugim istraživanjima (Grover et al., 2021; Namwongsa et al., 2019; Vacheron et al., 2013).

Tabela 18: Uticaj inokulacije *Bacillus megaterium* 11/3 na morfološke karakteristike korena biljaka

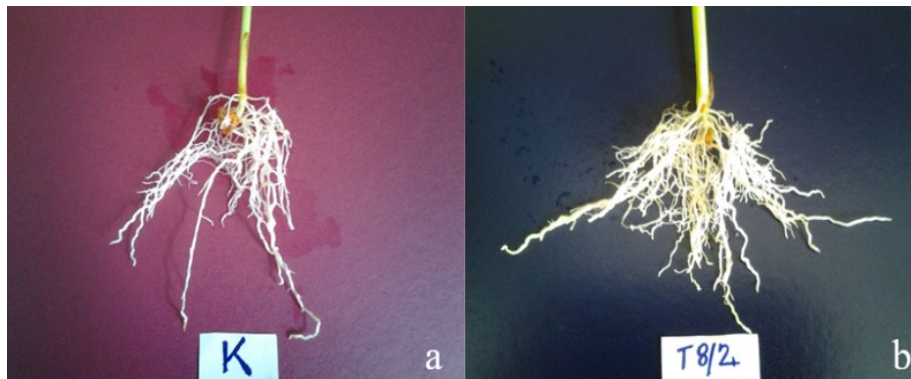
Biljna vrsta	Tretmani	Morfometrijski parametri korena			
		Ukupna dužina (cm)	Ukupna površina (cm ²)	Ukupan volumen (mm ³)	Prečnik korena (mm)
<i>Sinapsis alba</i> L.	Kontrola	111,85±14,58	351,53±64,97	84,89±25,07	0,94±0,08
	Inokulacija	138,16±18,99 *	375,45±44,40	78,04±11,65	0,84±0,09
<i>Triticum aestivum</i> L.	Kontrola	1108,44±251,27	2472,28±457,50	465,62±77,24	0,73±0,03
	Inokulacija	1539,33±126,23*	3935,76±209,85*	827,84±97,11*	0,82±0,10
<i>Zea mays</i> convar. <i>saccharata</i>	Kontrola	726,36±165,16	2438,13±480,61	686,22±103,71	1,01±0,12
	Inokulacija	790,86±130,20	2854,52±302,51	844,42±58,88*	1,11±0,12
<i>Brassica napus</i> L.	Kontrola	89,36±8,75	251,77±43,44	57,30±16,90	0,90±0,12
	Inokulacija	91,26±9,37	236,70±20,46	49,42±7,47	0,82±0,08
<i>Cucumis sativus</i> L.	Kontrola	1352,98±109,71	2803,44±479,61	798,76±146,74	0,69±0,07
	Inokulacija	2093,50±302,80*	5111,18±802,11*	1528,1±187,59*	0,94±0,06*

K-kontrola; T-tretman inokulacije; ± std. dev.; * vrednost parametra u tretmanu inokulacije se razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou značajnosti $p \leq 0,05$

Inokulacijom pšenice (*Triticum aestivum* L.), kukuruza (*Zea mays* L.), sirka (*Sorghum bicolor* L.) i zelenog muhara (*Setaria viridis* L.) sa različitim sojevima *Azospirillum*, neposredno posle germinacije, inicirane su morfološke promene korena (Grover et al., 2021). Hadas and Okon (1987) su potvrdili da je inokulacija sa *A. brasilense* uticala na značajno povećanje dužine korena paradajza za 35%. Inokulacijom semena šafrana (*Carthamus tinctorius* L.) sa sojevima *A. vinelandii* Khsr1, *A. brasilense* i *P. stutzeri* Khsr3 zabeležena su povećanja prečnika korena od 76% (Nosheen et al., 2011). Rego et al. (2014) su utvrdili da je individualna ili kombinovana inokulacija sojevima *Burkholderia pyrrocinia* R-46 i *P. fluorescens* R-55 uticala na arhitekturu, morfologiju i fiziologiju korena pirinča. Povećana je dužina korena sa 14,9 cm na 22,6 cm i prečnik sa 303,81 na 373,94 μm . Namwongsa et al. (2019) su pokazali da je inokulacijom artičoke sa *Bacillus aquimaris* došlo do povećanja težine, dužine, površine, volumena i prečnika korena u uslovima suše. Pattren and Glick (2002) su utvrdili povećanje dužine korena kanole za 35-50% inokulacijom sa *Pseudomonas putida*. Bae et al. (2007) su inokulacijom semena krastavca različitim PGPR sojevima potvrdili njihov stimulatívni efekat na razvoj adventivnih korenova.

U *in vitro* uslovima egzogeni (mikrobni) auksin u manjim koncentracijama može da redukuje rast primarnog korena i stimuliše elongaciju i brojnost korenskih dlačica (Contesto et al., 2008), da poveća broj i dužinu lateralnih korenova (Ivanchenko et al., 2006; Remans et al., 2008) i utiče na promociju ksilema (Bashan and de-Bashan, 2010). Kod klijanaca paradajza, auksin u koncentraciji od 10 μM inhibirao je rast primarnog korena, ali je stimulisao produkciju lateralnih korenova i korenskih dlačica (Vacheron et al., 2013). U ovom radu SnapRoot kvantifikacija korenova nije podrazumevala obradu korenskih dlačica, ali vizuelno je bilo uočljivo da je kod većine inokulisanih biljaka postojala njihova veća zastupljenost i razvijenost (Slika 10). Povećanje broja korenskih dlačica i posebno lateralnih korenova vodi povećanju površine i promenama u funkciji korena, jer poboljšavaju apsorpciju nutrijenata (Hannan et al., 2021). Njihova uloga je ključna u kruženju ugljenika, a sa druge strane, pošto su kratkog veka, predstavljaju važan izvor hranljivih elemenata, jer njihovim razlaganjem količina nutrijenata premašuje onu koja nastaje raspadanjem lišća (Gordon et al., 2000). S obzirom da mikrobni (egzogeni) auksin u manjim koncentracijama doprinosi njihovom razvoju (Remans et al., 2008; Paten and Glick, 2002) stimulacija rasta zabeležena nakon primene *A. chroococcum* F8/2 može biti rezultat upravo sposobnosti soja da produkuje IAA (Tabela 12). Međutim, velika koncentracija auksina može imati inhibitorni efekat na elongaciju korena i smanjenje začetaka lateralnih (Ivanchenko

et al., 2010). Povećana koncentracija može stimulisati sintezu etilena koji dovodi do inhibicije razvoja korena i blokade transporta auksina uz istovremeno stimulisanje drugih procesa kao što su starenje, opadanje i zrenje (Arteca and Arteca, 2008).



Slika 10: Efekat inokulacije *Azotobacter chroococcum* F8/2 na razvoj korena i korenskih dlačica *Zea mays* convar. *saccharata* a) neinokulisana kontrola b) inokulisani koren

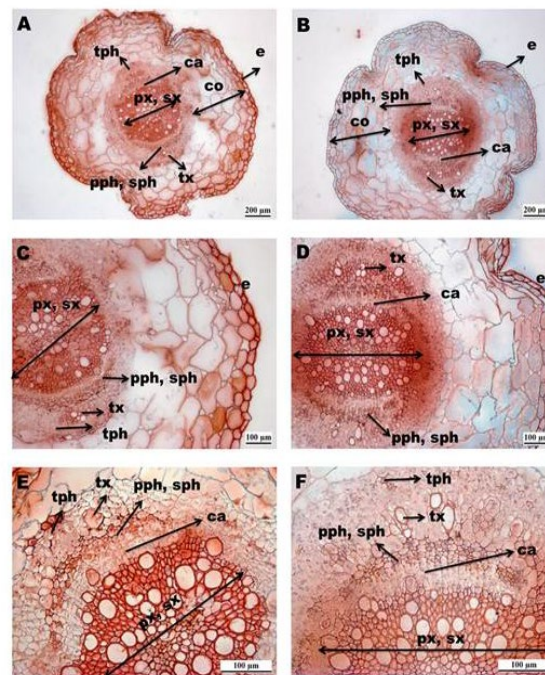
Sa druge strane, zabeležen je uticaj *B. megaterium* 11/3 na morfološke promene korena iako je biohemijska karakterizacija potvrdila da ovaj izolat ne proizvodi IAA (Tabela 12). Alteracija korenskih dlačica i ostale promene morfologije korena zabeležene nakon inokulacije ovim izolatom mogu biti posledica produkcije drugih metabolita koji ovom studijom nisu uključeni u karakterizaciju. Grover et al. (2021) naveli su da pored fitohormona, signalni molekuli kao što je NO^- mogu doprineti povećanju lateralnog grananja i razvoju korenskih dlačica koje se uglavnom dešava u prve tri nedelje post-germinacionog perioda. Takođe, određeni broj VOC i sekundarnih metabolita koje proizvodi PGPR povećava toleranciju biljaka na uslove stresa i pomažu u stimulaciji rasta biljaka specifičnim menjanjem karakteristika korena. Korenov sistem biljaka može brzo i efikasno osjetiti isparljive materije koje oslobađaju mikrobi. Odgovor biljke na VOC kroz promenu arhitekture korena može biti od ekološkog značaja za povećanje kolonizacije korena i jačanje korisnih međusobnih interakcija između biljaka i sa njima povezanim bakterijama (Gutiérrez-Luna et al., 2010). Inokulacija *Arabidopsis thaliana* sa *Bacillus megaterium* UMCV1 rezultirala je izmenjenom arhitekturom korenskog sistema sa inhibicijom rasta primarnog korena i povećanjem broja i dužine bočnih korena. Gutiérrez-Luna et al., (2010) su utvrdili da su aldehidi, ketoni i 1-butanol kao najzastupljenije komponente VOC smeše sintetizovane od strane sojeva *Bacillus simplex*, *Bacillus cereus* i *Bacillus* sp., doprineli razvoju primarnog korena i bočnih korenova kod *A. thaliana* što je uticalo na povećanje biomase. Tahir et al. (2017) su utvrdili da su metabolisani VOC (albuterol i 1,3-propandiol) od strane *Bacillus subtilis* SYST2 uticali na povećanje dužine korena paradajza, dok su Fincheira et al. (2017) utvrdili da je *Bacillus* sp. BCT9 koji metaboliše VOC poput 3-hidroksi-2-butanona, 2,3-butandiola, 2-nonanona, 2-tridekanona i 2-pentadekanona, pozitivno uticao na rast korena *Lactuca sativa*.

Sigurno je da identifikacija bioaktivnih isparljivih jedinjenja može otvoriti nove puteve za poboljšanje produktivnosti useva na održiv način.

5.5.1. Efekat inokulacije sa *Azotobacter chroococcum* F8/2 na mikromorfološke strukture korena šećerne repe (*Beta vulgaris* L.) u ranoj fazi rasta

Uticaj inokulacije *A. chroococcum* F8/2 na mikromorfološke strukture praćen je na korenu šećerne repe (*Beta vulgaris* L.). Dobijeni rezultati merenja (Tabela 19, Slika 11) pokazali su da je inokulacijom *A. chroococcum* F8/2 došlo do statistički značajnog povećanja primarnog i sekundarnog ksilema i zapremine 10 najvećih parenhimskih ćelija kod korena šećerne repe. Rano uspostavljanje

biljno-mikrobne interakcije je na taj način uticalo na strukturne promene na nivou korenskog parenhima, što uz uticaj *A. chroococcum* F8/2 na dostupnost nutrijenata ima višestruk značaj za rast biljke (Kerečki et al., 2022).



Slika 11: Poprečni presek korena *Beta vulgaris* L. U tretmanu inokulacije sa *A. chroococcum* F8/2 (a, c, e) i kontrole (b, d, f) pokazuje značajan sekundarni rast i početak tercijarnog rasta. (a-d) detaljan prikaz korteksa; (e,f) detaljan prikaz centralnog cilindra. e-epidermis; co-korteks; pph-primarni floem; px-primarni ksilem; sx-sekundarni ksilem; sph-sekundarni floem; tx- tetriarni ksilem; sph-sekundarni floem; ca-kambijum.

El-Afry et al. (2012) su primenom *Pseudomonas* sp. kao inokulanta kojim su tretirani listovi pšenice, uočili povećanje prečnika provodnih sudova u listu. Hegazi et al. (2015) su inokulacijom korijandera sa *A. chroococcum* postigli povećanje prečnika ksilema i debljine floema. Veličina prečnika je od ključnog značaja sa aspekta transporta vode i nutrijenata od korena do lišća i zbog toga značajno utiče na biljni rast i prinos (Source et al., 2013). Veći provodni sudovi ksilema omogućavaju veći stepen apsorpcije nutrijenata (Comas et al., 2002; Bowsher et al., 2016) i transporta vode (Solar et al., 2006). Stimulacija rasta provodnog tkiva i PGP potencijal *A. chroococcum* F 8/2 (Tabela 19; Slika 11) mogu doprineti povećanju dostupnosti nutrijenata, njihovom transportu što direktno utiče na bolji i brži metabolizam. Source et al. (2013) su naglasili značaj fitohormona, posebno auksina, u stimulaciji rasta korena, kambijuma, diferencijaciji i deljenju ćelija primarnog i sekundarnog provodnog tkiva (Sorce et al., 2013; Bhalerao and Fisher, 2014; Immanen et al., 2016). Na osnovu dobijenih rezultata mikromorfološke analize (Tabela 19) može se pretpostaviti da je sintetizovana IAA od strane *A. chroococcum* F8/2 uticala stimulatивно na deobu ćelija i diferencijaciju ksilema inokulisanih biljaka. Za diferencijaciju ćelija je od posebne važnosti prisustvo auksina, što je konstatovano i ugradnjom ugljenikovog radioaktivnog izotopa u ćelijski zid (Sorce et al., 2013; Johnsson et al., 2019). U slučaju povećane koncentracije etilena, može doći do inhibicije elongacije korena s obzirom da ovaj hormon utiče na sintezu i transport auksina. *A. chroococcum* F8/2 je pokazao sposobnost snižavanja ACC, prekursora etilena (Tabela 12) i mogućnost da spreči njegovo inhibično delovanje na auksin, rast i ekspanziju korenovog sistema. Rego et al. (2014) su analizom unutrašnjeg tkiva korena pirinča nakon

primene inokulacije PGPR-om, *Burkholderia pyrrocinia* (R-46), *Pseudomonas fluorescens* (R-55) i *Trichoderma asperellum*, utvrdili da je došlo je do značajne ekspanzije korteksa, povećanja aerenhima za 2%, povećanja prečnika vaskularnog cilindra i povećanje metaksilema. Primena inokulacije dovela do povećanja broja i prečnika sudova ksilema što je doprinelo većoj rezistenciji na sušu kod leblebija (*Cicer arietinum* L.), kikiriki (*Arachis hypogaea* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.), grašak (*Phaseolus vulgaris* L.), proso (*Pennisetum glaucum* L.), golubiji grašak (*Cajanus cajan* L.), vigna (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)(Purushothaman et al., 2013).

Tabela 19: Mikromorfološka anatomska struktura korena *Beta vulgaris* L.

Mikromorfološke karakteristike korena <i>Beta vulgaris</i> L.								
Tretmani	RD (μm)	TRA (μm^2)	ACR (μm^3)	APSX (μm)	NoP	MALPC10 (μm^3)	MAV18 (μm)	MAPC
Kontrola	1441,91 $\pm 164,13$	1688243,93 $\pm 171424,61$	1155360,32 $\pm 132456,04$	121246,72 $\pm 20858,11$	223,78 $\pm 29,86$	11280,13 $\pm 2478,56$	691,84 $\pm 128,87$	5261,00 $\pm 1041,39$
Inokulacija	1430,30 $\pm 150,60$	1675259,60 $\pm 207094,87$	1157463,43 $\pm 153599,60$	155545,80 $\pm 22738,34^*$	205,56 $\pm 11,9$	13847,84 $\pm 1317,54^*$	852,19 $\pm 152,63^*$	5656,45 $\pm 877,21$

*značajno na nivou $p \leq 0,05$; \pm standardna devijacija; $n=10$ osim u slučaju merenja površine 10 najvećih ćelija parenhima, sprovodnih sudova i broja ćelija (minimum je bio 90 merenja). RD - prečnik korena, TRA - ukupna površina korena, ACR - zapremina korteksa, APSX - oblast primarnog i sekundarnog ksilema, NoP - broj ćelija parenhima, MALPC10 - vrednost zapremine 10 najvećih parenhimskih ćelija, MAV10 - površina 10 provodnih sudova, MAPC - oblast ćelija parenhima.

Ova istraživanja su pokazala da rano uspostavljanje interakcije biljka-mikrob tokom bioprajinjga šećerne repe stimulatивно utiče na strukturne promene na nivou parenhima korena. Takođe, ova istraživanja predstavljaju prva mikromorfološka ispitivanju ranog rasta korena šećerne repe inokulisane sa *Azotobacter* (Kerečki et al., 2022). Na ovaj način inokulacija sa *A. chroococcum* F8/2 povećava dostupnost nutrijenata, ali i njihov transport u nadzemni deo biljke.

5.6. Uticaj inokulacije sojevima *Azotobacter chroococcum* F8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3 na suhu masu korena i nadzemnog dela

Nakon utvrđivanja morfoloških parametara korena slačice (*Sinapis alba* L.), pšenice (*Triticum aestivum* L.), kinoe (*Chenopodium quinoa* Willd.), kukuruza (*Zea mays* L.), uljane repice (*Brassica napus* L.), soje (*Glycine max* L.), paradajza (*Solanum lycopersicum* L.) i krastavca (*Cucumis sativus* L.) izmerena je suva masa korena i nadzemnih delova kao značajnih indikatora vegetativnog rasta. Biljke su gajene tri nedelje na kvarcnom pesku uz dodatak Hoaglandovog rastvora. Odvojeni su koren i nadzemni deo i nakon sušenja izmerena je suva masa.

Inokulacija sa *A. chroococcum* F8/2 uticala je na značajno povećanje suve mase korena kukuruza, uljane repice i slačice od 58%, 40% i 25% (Tabela 20). Povećanje nije zabeleženo kod pšenice, kinoe, soje, paradajza, krastavca. Zabeleženi su nešto drugačiji efekti inokulacije na suhu biomasu nadzemnog dela. *A. chroococum* F8/2 je ispoljio stimulativan efekat na produkciju biomase nadzemnog dela kukuruza, pšenice, paradajza i kinoe povećavši je za 13%, 19%, 31% i 45%. Kukuruz je jedina inokulisana biljka kod koje je inokulacija dovela do stimulacije produkcije celokupne biomase biljke i to za 40%. Inokulacija semena soje i krastavca nije imala efekat na produkciju biomase.

Tabela 20: Uticaj inokulacije *Azotobacter chroococcum* F8/2 na suhu masu korena i nadzemnog dela (g)

<i>A. chroococcum</i> F8/2			
Biljna vrsta	Tretmani	Suva masa korena (g)	Suva masa nadzemnog dela (g)
<i>Sinapsis alba</i> L.	K	0,0008±0,0002	0,0054±0,0001
	T	0,0010±0,0002 *	0,0063±0,0010
<i>Triticum aestivum</i> L.	K	0,0076±0,0010	0,0213±0,0043
	T	0,0076±0,0009	0,0253±0,0040*
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	K	0,0008±0,0002	0,0047±0,0008
	T	0,0007±0,0003	0,0068±0,0019*
<i>Zea mays convar. saccharata</i>	K	0,0293±0,0096	0,0556±0,0124
	T	0,0464±0,0099*	0,0721±0,0144*
<i>Brassica napus</i> L.	K	0,0010±0,0002	0,0121±0,0050
	T	0,0014±0,0002*	0,0117±0,0023
<i>Glycine max</i> L.	K	0,0163±0,0028	0,1086±0,0135
	T	0,0194±0,0059	0,1168±0,0266
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	K	0,0027±0,0009	0,0162±0,0061
	T	0,0028±0,0004	0,0213±0,0034*
<i>Cucumis sativus</i> L.	K	0,0058±0,0011	0,0384±0,0050
	T	0,0049±0,0013	0,0399±0,0085

K-kontrola; T-tretman inokulacije; ± std. dev.; * vrednost parametra u tretmanu inokulacije se razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou značajnosti $p \leq 0,05$

Uticaj inokulacija sa *B. megaterium* 11/3 praćen je na slačici (*Sinapsis alba* L.), pšenici (*Triticum aestivum* L.), kukuruza (*Zea mays convar. saccharata*), uljanoj repici (*Brassica napus* L.), i krastavcu (*Cucumis sativus* L.) (Tabela 21). Rezultati su pokazali značajno povećanje suve masa korena kukuruza, slačice i uljane repice povećavši je za 50%, 62% i 86%. Tretman nije stimulisao produkciju u slučaju pšenice i krastavca. Suva biomasa nadzemnog dela je značajno uvećana inokulacijom slačice, kukuruza i uljane repice, ali i pšenice rezultirajući povećanjima od 117%, 58%, 29% i 16%. Inokulacija krastavca nije imala efekat na produkciju biomase.

Inokulacija slačice sa oba soja dovela je do povećanja produkcije biomase mada su efekti postignuti sa *B. megaterium* 11/3 znatno veći i beleže porast ukupne biomase za 106% (Tabela 21). U slučaju pšenice oba soja su stimulisala produkciju nadzemnog dela, dok efekat na biomasu korena nije zabeležen. Inokulacija kukuruza sa *A. chroococum* F8/2 i sa *B. megaterium* 11/3 dovela je do stimulacije produkcije biomase i nadzemnog dela i korena i to je jedina biljna vrsta na kojoj su oba soja postigla ovaj efekat. Dobijeni rezultati, zajedno sa rezultatima morfoloških karakteristika korena biljaka (Tabela 17 i 18) dodatno potvrđuju da inokulacija odabranim sojevima predstavlja dobar izbor za stimulaciju rasta i razvoja korena pojedinih biljnih kultura.

Tabela 21: Uticaj mikrobiološke inokulacije *B. megaterium* 11/3 na suhu masu korena i nadzemnog dela biljaka (g)

<i>B. megaterium</i> 11/3			
Biljna vrsta	Tretmani	Suva masa korena (g)	Suva masa nadzemnog dela (g)
<i>Sinapsis alba</i> L.	K	0,0013±0,0005	0,0054±0,0011
	T	0,0021±0,0006*	0,0117±0,0025*
<i>Triticum aestivum</i> L.	K	0,0070±0,0012	0,0345±0,0064
	T	0,0072±0,0014	0,0401±0,0054*
<i>Zea mays</i> convar. <i>saccharata</i>	K	0,0185±0,0030	0,0633±0,0076
	T	0,0278±0,0052*	0,1000±0,0225*
<i>Brassica napus</i> L.	K	0,0007±0,0002	0,0084±0,0011
	T	0,0013±0,0004*	0,0108±0,0013*
<i>Cucumis sativus</i> L.	K	0,0058±0,0011	0,0384±0,0050
	T	0,049±0,0014	0,0389±0,0040

K-kontrola; T-tretman inokulacije; ± std. dev.; * vrednost parametra u tretmanu inokulacije se razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou značajnosti $p \leq 0,05$

Brojne studije su potvrdile stimulativan uticaj inokulacije sa vrstama roda *Azotobacter* na useve, od povećanja klijavosti semena, razvoja korena, poboljšanja unosa nutrijenata, biomase korena i nadzemnog dela, kao i površine i broja listova. Primenom *A. chroococcum* kao inokulatna u mnogim oglecima potvrđeno je povećanje akumulacije suve materije usled proizvoda N-fiksacije i fitohormona (Jnawali et al., 2015). El-Shanshoury et al. (1989) zabeležili su dvostruko povećanje suve mase korena paradajza nakon primene inokulacije sa *A. chroococcum*. U uslovima povećanog saliniteta povećanje suve mase korena paradajza od 45% postignuto je u ogledu Oosten et al. (2018). U slučaju *A. chroococcum* F8/2 izostao je efekat na biomasu korena, ali je zabeleženo značajno povećanje suve mase nadzemnog dela (Tabela 20). Inokulacijom semena šafrana (*Carthamus tinctorius* L.) sa sojevima *A. vinelandii* Khsr1, *Azospirillum brasilense* i *Pseudomonas stutzeri* Khsr 3 došlo je do povećanja suve mase za 76% (Nosheen et al., 2011). Mumtaz et al. (2017) primenom *Bacillus* spp. sa sposobnošću Zn - solubilizacije u inokulaciji kukuruza potvrdili su povećanje u svežoj i suvoj masi korena. Povećanja u suvoj masi od strane pojedinih sojeva iznosila su 122, 98 i 94%, u odnosu na kontrolu. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima zabeleženim u ovoj studiji, *B. megaterium* 11/3 se takođe odlikuje sposobnošću solubilizacije Zn (Tabela 12), ali i P i produkcije amonijaka. Takođe, njegova primena na kukuruzu značajno je stimulisala produkciju biomase korena (Tabela 21). Grover et al. (2021) su naveli literaturni podatak da je inokulacijom sa *Azospirillum brasilense* povećana suva masa korena paradajza za 50%. *Penibacillus polymixa* RC05 povećao je suhu masu korena krastavca sa 2,56 mg na 19,32 mg/biljka (Bae et al., 2007). U slučaju inokulacije pšenice *Bacillus* sojevima koji su pokazali sposobnost produkcije ACC i fosfolubilizacije, masa korena je bila 3,9 puta veća u odnosu na kontrolu (Baig et al., 2012). Povećanje suve mase korena kukuruza (*Zea mays* L.cv, Ronaldihno) od 15% postignuto je nakon inokulacije *B. licheniformis* FMCH 001 (Akhtar et al., 2020). *B. megaterium* STB1 je kod *Arabidopsis thaliana* doprineo stimulaciji razvoja lateralnih korenova, povećanju njegove suve mase, ali i inhibiciji primarnog korena (Bucio et al., 2007). Razlike u rezultatima se mogu objasniti i razlikom u afinitetu biljaka prema PGPR. Tilak and Ready (2006) kada su svojim oglecima utvrdili da kukuruz više reaguje na *B. circulans* i *B. cereus* inokulaciju od pšenice.

Nadzemni deo se menja u toku vegetativnog perioda i u korelaciji sa ostalim odlikama biljke, posebno korena, i daje predstavu o njenim metaboličkim i razvojnim procesima (Blaha, 2019). Suva masa je u tesnoj vezi sa produktivnošću biljke. Navedeni literaturni podaci pokazuju da se povećanje

suve mase nadzemnog dela može postići mikrobiološkom inokulacijom. Kao odgovor na primenjenu inokulaciju sa PGPR došlo je do povećanje suve mase nadzemnog dela pirinča (Sharma et al., 2014a) i kukuruza (Gholami et al., 2009). Almaghrabi et al. (2013) su inokulacijom paradajza sa PGPR postigli sledeća povećanja suve mase nadzemnog dela u odnosu na kontrolu: inokulacijom sa *Serratia marcescens* izmerena suva masa nadzemnog dela je veća za 115%; *Pseudomonas putida* za 71,65%, *B. amyloliquefaciens* 58,30%, *Pseudomonas fluorescens* 50%, *B. subtilis* 45% i *B. cereus* 35%. U ovoj studiji, inokulacijom paradajza sa *A. chroococcum* F8/2 postignuto je uvećanje biomase nadzemnog dela od 31,48% (Tabela 20). Rubin et al. (2017) su ukazali da PGPR, zahvaljujući mehanizmima stimulacije biljnog rasta, deluju na povećanje nadzemnog dela prosečno za 28%, da bi u uslovima suše ono bilo znatno veće i do 45%. Moeinzadeh et al. (2010) su nakon uspešne germinacije različitim sojevima *Pseudomonas fluorescens* UTPf76 i UTPf86 uticali na povećanje dužine nadzemnog dela suncokreta. *Azospirillum* je kod pšenice povećao masu nadzemnog dela za 18% (Veresoglou and Meneses, 2010). *Azospirillum brasilense* povećao suhu masu nadzemnog paradajza za 90% (Grover et al., 2021). Niz literaturnih podataka potvrdio je stimulativan uticaj inokulacije *Bacillus* sp. na razvoj nadzemnog dela. Tako je *B. megaterium* STB1 kod *Arabidopsis thaliana* uticao na povećanje nadzemnog dela 3,5 puta u odnosu na kontrolu (49,9 vs 187,4 mg) (Bucio et al., 2007), dok je *B. cereus* kod pirinča, zlatnog pasulja i leblebije povećao biomasu nadzemnog dela (Chakraborty et al., 2011). *B. subtilis*, *B. thuringiensis* i *B. megaterium* su biopraimingom povećali suhu masu nadzemnog dela leblebija za 77% (Khan et al., 2020).

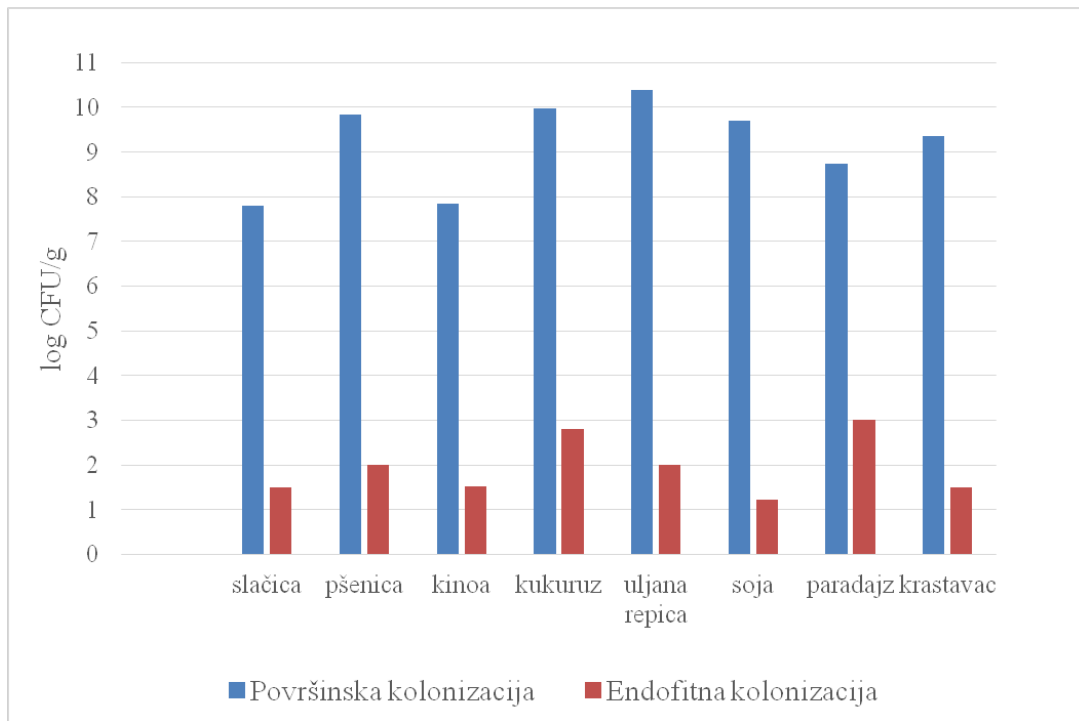
Ova istraživanja, kao i brojna druga ukazala su da morfološke karakteristike korena mogu poslužiti za procenu efekata inokulacije PGPR. Međutim, na ove osobine mogu uticati različiti ekološki faktori i zbog toga je važno razumeti puteve i gene uključene u osobine korena i mikrobne signale/metabolite koji mogu presresti i/ili ukrštati puteve za modulaciju karakteristika korena (Grover et al., 2021). Upotreba naprednih alata i tehnologija može doprineti da se dešifruju složeni mehanizmi uključeni u PGPR interakcije koje utiču na karakteristike korena. Istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji su ukazala na neophodnost nastavka istraživanja uz primenu novih tehnologija što će otvoriti nove puteve u primeni PGPR.

5.7. Površinska i endofitna kolonizacija korena biljaka sa *Azotobacter chroococcum* F8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3

Bakterijska kolonizacija rizosfere je tačka za uspostavljanje interakcija između biljaka i bakterija koje predstavljaju ključnu determinantu zdravlja i produktivnosti biljaka. Biljke utiču na kolonizaciju bakterija prvenstveno moduliranjem sastava svojih korenskih eksudata i podizanjem urođenog imunološkog odgovora. Ovi eksudati dovode do hemijskih i fizičkih modifikacija mikrookruženja rizosfere. Jedinostveni uslovi koji se nalaze unutar rizosfere vrše selekciju mikrobnih zajednica iz okolnog zemljišta. Treba imati u vidu da su interakcije između bakterija i bakterija (*Bacteria-Bacteria Interactions*, BBI) preovlađujuće u rizosferi i utiču na perzistentnost bakterija i kolonizaciju korena kroz metaboličku razmenu, izlučivanje antimikrobnih jedinjenja i druge procese. U eksperimentima u kojima je *Arabidopsis thaliana* koinokulisan sa *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli* zabeleženo je da korenski eksudati dovode do hemotaksisa ćelija *B. subtilis* i povećanja njihove brojnosti u zoni elongacije korena uz istovremeno smanjenje brojnosti *Escherichia coli* (Massalha et al., 2017). Tradicionalno, kolonizacija bakterija se ispituje u sterilnim laboratorijskim uslovima koji isključuju uticaj BBI (Knights et al., 2021). Istraživanja sprovedena u okviru ove disertacije su bazirana na ispitivanju čistih kultura odabranih sojeva bakterija.

Kod biljnih vrsta kod kojih je biopraimingom sa *A. chroococcum* F 8/2 (slačica, pšenica, kinoa, kukuruz, uljana repica, soja, paradajz i krastavac; Tabela 13) i *B. megaterium* 11/3 (slačica, pšenica,

kukuruz, uljana repica i krastavac; Tabela 14) došlo do povećanja procenta klijavosti i/ili vigora, utvrđena je površinska i endofitna kolonizacija korena metodom razređenja. Rezultati su potvrdili sposobnost *A. chroococcum* F 8/2 i *B. megaterium* 11/3 da kolonizuju površinu korena testiranih biljaka. Brojnost izolata *A. chroococcum* F 8/2 se na površini korena kretala od $\approx 6,27 \times 10^7$ CFU/g sveže mase korena (slačica) do $\approx 2,43 \times 10^{10}$ CFU/g sveže mase korena kod uljane repice (Grafik 1).

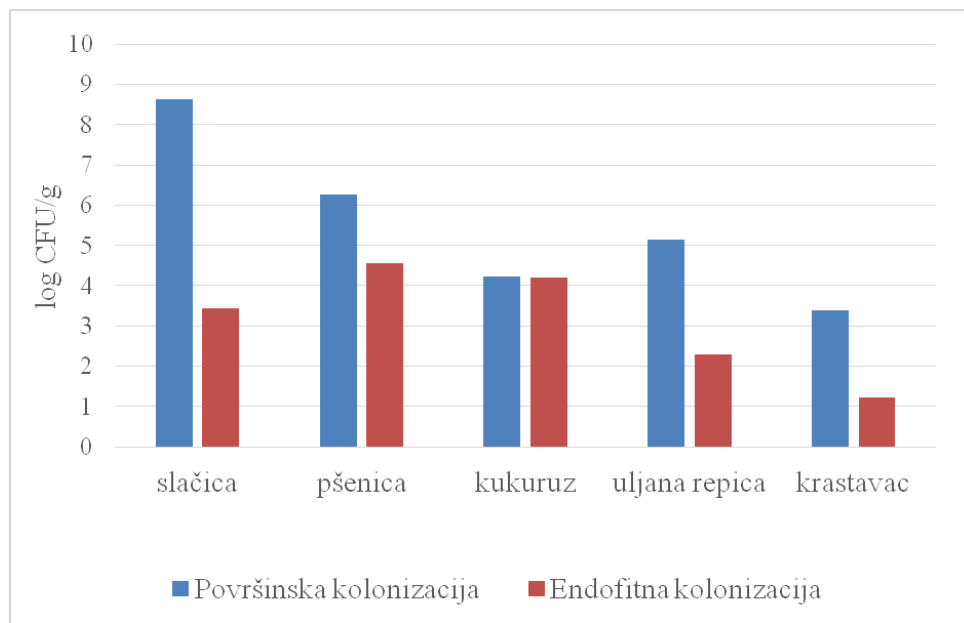


Grafik 1: Površinska i endofitna kolonizacija korena biljaka inokuliranih *Azotobacter chroococcum* F8/2; (log CFU/ g sveže mase korena)

U odnosu na *A. chroococcum* F 8/2 soj *B. megaterium* 11/3 je pokazao nižu brojnost na površini svih testiranih biljaka, izuzev u slučaju slačice, i kretao se $\approx 2,3 \times 10^3$ CFU/g sveže mase korena (krastavac) do $\approx 4,2 \times 10^8$ CFU/g sveže mase korena kod slačice (Grafik 2).

Razlike u broju ćelija na površini korena mogu ukazivati na veći međusobni afinitet ispoljen u interakciji biljka - PGPR koji favorizuje *A. chroococcum* F8/2 u odnosu na *B. megaterium* 11/3. Razlike u stepenu kolonizacije pojedinačnog soja javljaju se i između samih biljnih vrsta, što je naročito uočljivo u slučaju *B. megaterium* 11/3 gde je brojnost zabeležena na površini slačice 10^5 puta veća od brojnosti na površini krastavca. Ovi rezultati su u skladu sa podacima Reva et al. (2004) koji su naveli da se brojnost nekoliko sojeva *Bacillus* sp. na površini korena ječma i uljane repice kretala od svega nekoliko kolonija, pa do od 10^6 CFU/g svežeg korena, zavisno od kombinacije bakterijskog soja i biljne vrste. Karličić (2017) je utvrdila da je brojnost *Pseudomonas putida* P1 ARV na korenu crvene deteline 5×10^5 CFU/g, dok je kod pšenice iznosila 1×10^{10} CFU/g svežeg korena. Mendis et al. (2018) su sedmično, tokom 28 dana, ispitali brojnost *B. amyloliquefaciens* QST713 i *B. firmus* I-1582 na površini korena kukuruza i utvrdili da se ona kretala između 10^4 - 10^5 CFU/g svežeg korena, a najniža zabeležena brojnost je iznosila 10^3 CFU/g svežeg korena. Kljujev (2012) je utvrdio da je brojnost *Herbaspirillum frisingense* (GSF30BA28) na površini korena zelene salate iznosila od $1,71 \times 10^6$ ćelija/mm³ apsolutno suvog korena, dok je nešto manja brojnost zabeležena na spanaću ($1,27 \times 10^6$ ćelija/mm³ apsolutno suvog korena) i šargarepi ($1,28 \times 10^6$ ćelija/mm³ apsolutno suvog korena). Gyaneshwar et al. (2001) su konstatovali da se nakon inokulacije pirinča (var. IR72) sa *Serratia*

marcescens IRBG500, stepen površinske kolonizacije kretao od 2 log CFU/g sveže mase korena prvog dana nakon inokulacije do 7,5 log CFU/g četrnaestog dana nakon inokulacije.



Grafik 2: Površinska i endofitna kolonizacija korena biljaka inokuliranih *Bacillus megaterium* 11/3; (log CFU/ g sveže mase korena)

Dobijene razlike u stepenu kolonizacije mogu ukazivati na različit hemijski sastav korenskih eksudata ispitivanih biljnih vrsta. Potvrđeno je da korenski eksudati izazivaju promene u sastavu proteina ćelijskog zida PGPR olakšavajući kolonizaciju korena (Dutta et al., 2013). Chaundry et al. (2016) ističu sastav eksudata kao ključan faktor koji određuje kolonizaciju *Pseudomonas aeruginosa* koji je bio prisutan u najvećem broju na korenu pšenice i pirinča, dok je u manjem broju kolonizovao koren pamuka i kanole. Autori ističu da je zajednička karakteristika pšenice i pirinča žiličast korenov sistem dok su produkovani eksudati, najverovatnije, uticali na bolju adaptaciju *P. aeruginosa* na koren, u odnosu na vretenast korenov sistem kanole i pamuka i njihove eksudate. Na uspeh kolonizacije, pored afiniteta PGPR prema određenom eksudatu, utiču i osobine samog soja poput kompetitivnosti i antagonizma u odnosu na patogene, pokretljivosti, sposobnosti produkcije egzopolisaharida, veličine populacije ali i abiotički faktori (Bhattacharyya i Jha, 2012).

Neke bakterije stvaraju intimnije veze s biljkama kolonizirajući rizoplan (površinu korena) kao epifite ili endosferu (prostor između korenskih ćelija) kao endofite. Bakterijski endofiti koriste endosferu kao jedinstvenu zaštitnu ekološku nišu koja im osigurava sigurno i konzistentno okruženje (Senthilkumar et al., 2011). Za uzvrat često imaju ulogu u zaštiti domaćina od patogena i stresnih uslova sredine (Miliute et al., 2015; Afzal et al., 2019). Većina endofitnih bakterija ima dvofazni životni ciklus koji se menja između biljnog i zemljišnog okruženja (Afzal et al., 2019). Uglavnom se nalaze u intercelularnim prostorima koji su bogati ugljenim hidratima, aminokselinama i neorganskim nutrijentima. Kolonizuju tkiva korena, lista, stabla, ploda i semena. Kolonizacija može biti lokalizovana na samo jednu vrstu biljnog tkiva ili sistematska, kroz celu biljku. U ranoj fazi kolonizacije endofiti se uočavaju u korenskim dlačicama, a zatim korenskoj kapi (Kandel et al., 2017). Brojnost endofita određuje veliki broj faktora poput kompeticije, faze biljnog rasta, genetike, klimatskih uslova.

Izolati testirani u ovoj studiji su pored sposobnosti da kolonizuju površinu pokazali i sposobnost da prodru i nasele unutrašnja tkiva korena svih ispitivanih vrsta. Najmanja brojnost *A. chroococcum* F 8/2 je zabeležena u unutrašnjosti korena soje $\approx 1,6 \times 10^1$ CFU/g, a najveća kod paradajza $\approx 1,17 \times 10^3$ CFU/g sveže mase korena nakon tri nedelje gajenja (Grafik 1). Najmanja brojnost *B. megaterium* 11/3 je uočena u korenu krastavca $\approx 1,6 \times 10^1$ CFU/g, a najveća kod pšenice $\approx 3,6 \times 10^4$ CFU/g sveže mase korena nakon tri nedelje gajenja (Grafik 2).

Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima, tako je Karličić (2017) utvrdila da se endofitna brojnost *P. putida* P1 ARV kreće od $1,1 \times 10^2$ CFU/g kod pšenice do $9,8 \times 10^4$ CFU/g kod slačice. Gyaneshwar et al. (2001) su utvrdili da je nakon inokulacije pirinča (var. IR72) sa *S. marcescens* IRBG500 brojnost u unutrašnjosti tkiva korena vremenom rasla, sedmog dana iznosila je 3,5 log CFU/g, četrnaestog 6,4 log CFU/g sveže mase korena, i da se broj endofita stabilizovao nakon tri nedelje od početka gajenja, što je period gajenja i u ovoj studiji. Bernabeu et al. (2018) su inokulisali seme pšenice sa azotofiksatorom, *Parabukholderia tropica* MTo-293 i utvrdili brojnost endofita od 4 do 5 log CFU/g sveže mase korena. Oni su potvrdili da je stepen površinske i endofitne kolonizacije bio stabilan za vreme trajanja oglada (20 dana) i da je broj endofita ostao u ovom periodu niži za 2-4 reda veličine u odnosu na brojnost na rizoplanu. I u ovoj studiji je zabeležena znatno niža endofitna brojnost *A. chroococcum* F 8/2 u odnosu na broj bakterija prisutan na površini korena, a najveća razlika između brojnosti na površini i u unutrašnjosti korena je zabeležena kod soje (Grafik 1). U slučaju *B. megaterium* 11/3 najveća razlika je zabeležena kod slačice kod koje je broj bakterija prisutan na površini korena veći od broja endofita za 10^5 (Grafik 2). Andreolii et al. (2019) predpostavljaju da je endogena-endofitna mikroflora (vertikalno preneti endofiti) bolji kompetitor u procesu kolonizacije i da može negativno da utiče na kolonizaciju egzogenih bakterija i da je zato sposobnost sojeva da, u toku inokulacije, adekvatno odgovore na kompeticiju endogene mikroflora osnova stabilne endofitne kolonizacije. Fernandez-Gonzalez et al. (2019) navode da su endofitne bakterijske zajednice korena maslina uglavnom određene genotipom sorte i biljke koji služi kao glavni faktor za oblikovanje korenskih endofitnih bakterijskih zajednica. Takođe, niža brojnost, od 2 do 6 log CFU/g, u odnosu na patogene mikroorganizme (7 do 10 log CFU/g sveže mase korena), obezbeđuje da ih biljka „ne prepozna“ kao patogene i potencijalnu opasnost (Andreolli et al., 2017; Zinniel et al., 2002). Patogeni mikroorganizmi i endofitne bakterije predstavljaju kompetitore za istu ekološku nišu u biljkama, stoga inokulacija endofitnim bakterijama predstavlja efikasnu metoda za biološko suzbijanje patogena (Senthilkumar et al., 2011).

Od posebnog značaja je odabir metode koja se primenjuje pri ispitivanju endofita, jer na njihov opstanak utiče priroda, koncentracija i vreme delovanja agensa koji se koristi u sterilizaciji (Hallmann and Berg, 2006) kao i činjenica da li hemijski agens štetno deluje na endofitni mikrobiom biljke ili ne (George et al., 2020). Eevers et al. (2015) navode da se samo oko 0,001-1% endofita prisutnih u biljnom tkivu može izolovati ističući da se veliki broj ovih sojeva gubi nakon inicijalne izolacije u laboratorijskim uslovima, a kao moguć razlog navodi se nedostatak nekih biljnih jedinjenja prisutnih u maceriranom tkivu neophodnih za rast endofita.

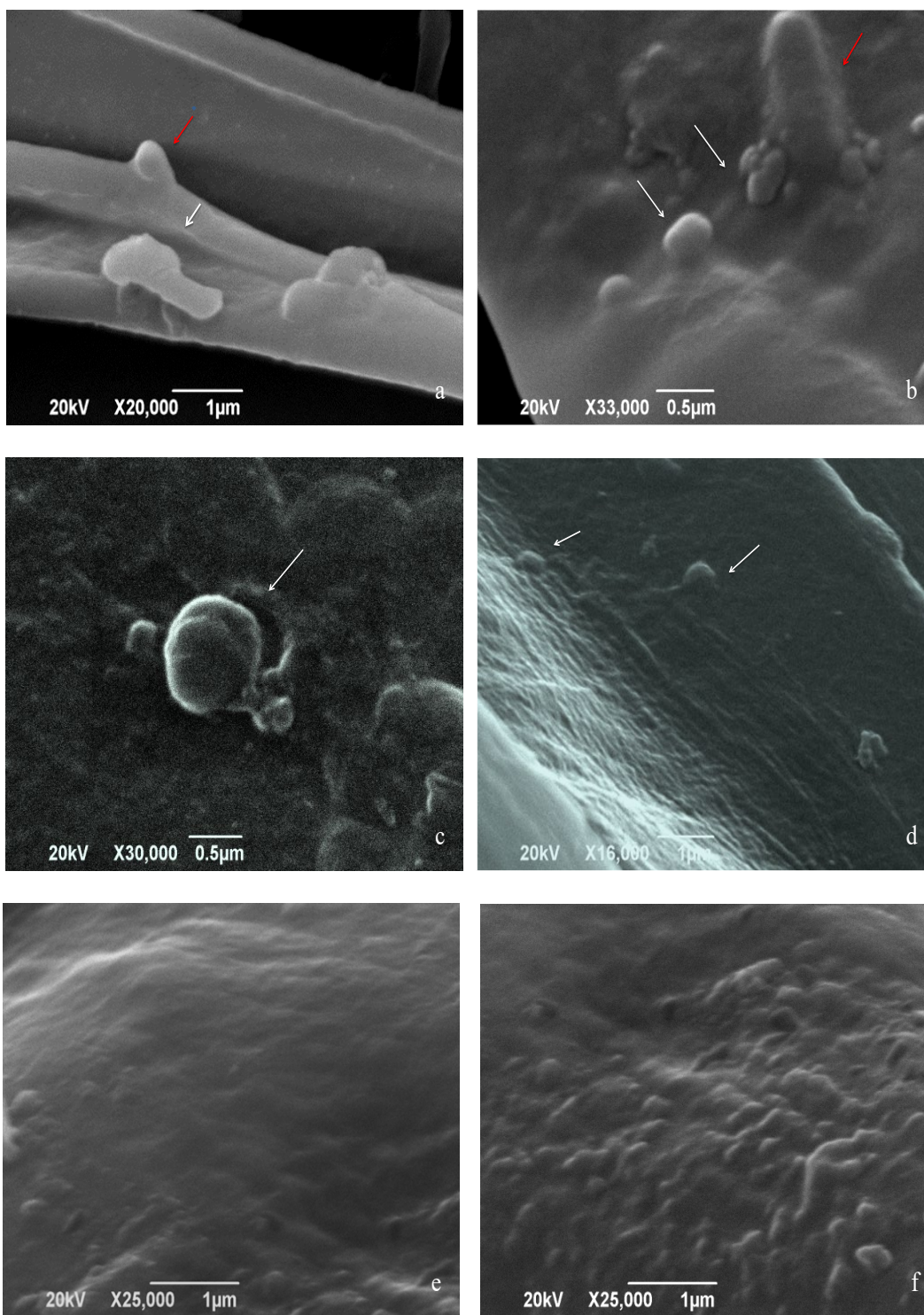
U cilju vizuelizacije bakterijske kolonizacije korena ispitivanih biljnih vrsta, primenjena je skening-elektronska mikroskopija (SEM) i konfokal-laser-skening mikroskopija (CLSM). Kao ključni parametri za odabir biljnih vrsta na kojima će se utvrđivati endofitna kolonizacija mikroskopskim metodama odabrani su efekti na procent germinacije i vigora. Bioprajmingom semena sa *A. chroococcum* F8/2 najveća povećanja FGP i /ili vigora su zabeležena kod kukuruza i pšenice, a bioprajmingom sa *B. megaterium* 11/3 kod uljane repice i pšenice. Kukuruz i pšenica se nalaze među biljnim vrstama kod kojih je utvrđena najviša brojnost *A. chroococcum* F8/2 na površini i u unutrašnjosti korena (Grafik 1). Sa druge strane, *B. megaterium* 11/3 je endofitno u najvećoj meri kolonizovao koren pšenice, kod koje je i bilo značajnih efekata na parametre germinacije (Grafik 2). Bent et al. (2001) ističu da je često prisustvo manjeg broja ćelija dovoljno za stimulativan efekat na

biljni rast, dok veći broj može dovesti do inhibicije, naročito kada PGPR deluju direktnim mehanizmima stimulacije biljnog rasta. U ovim istraživanjima *B. megaterium* 11/3 je pokazao najveći afinitet za kolonizaciju korena slačice, ali bez obzira na visoku brojnost nije postignut značajan efekat na germinacijske parametre ove biljne vrste. Kolonizacija rizosfere i rizoplana je od izuzetne važnosti i smatra se da je to osnova za pružanje stimulaturnih efekata na biljku domaćina (Compant et al., 2005).

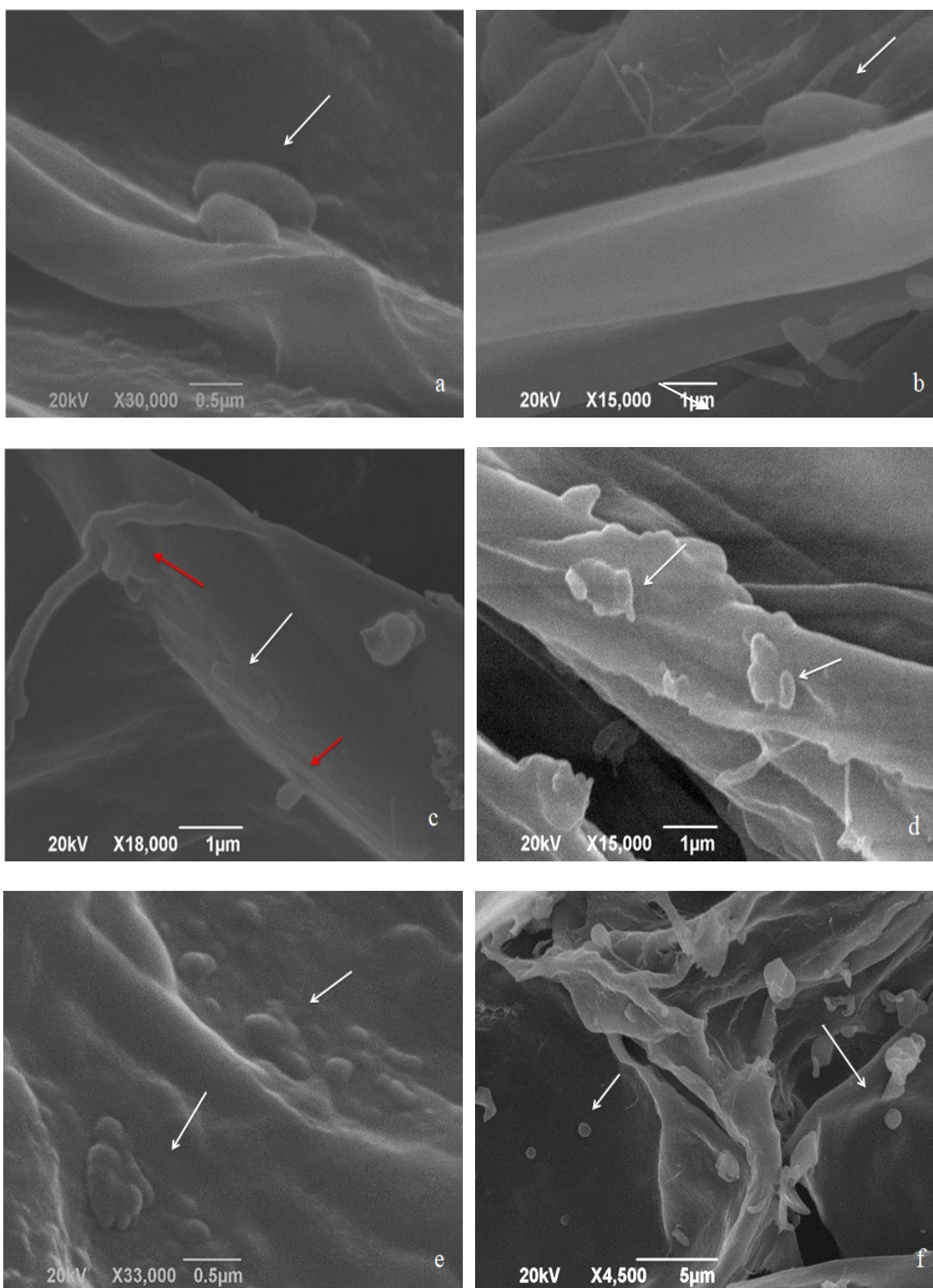
Na korenovima posmatranih biljnih kultura potvrđena je sposobnost površinske kolonizacije *A. chroococcum* F8/2 (Slike 12-16). To je u skladu sa *in vitro* istraživanjima na *Arnebia hispidissima* inokulisanoj sa pet različitih sojeva *A. chroococcum*, u kojoj je nakon 10 dana inkubacije, primenom transmisiona elektronske mikroskopije (TEM), konstatovano prisustvo ćelija *A. chroococcum*. Na ovaj način je potvrđena endofitska sposobnost sojeva *A. chroococcum* (Thokchom et al., 2017). Velmourougane et al. (2017) su primenom SEM-a posmatrali kolonizaciju korena leblebije sa *A. chroococcum* i *Trichoderma viride*. Biljke su uzgajane u sterilnoj podlozi od peska i vermikulita (1:1) i u uzorcima uzetim 40 dana nakon inokulacije, konstatovana je proliferacija ćelija *A. chroococcum*, kako pojedinačne tako i vezane za miceliju gljive. Primenom SEM-a uočeno je veće prisustvo *A. chroococcum* F8/2 na korenskim dlačicama (Slika 12a), mestima izbivanja korenskih dlačica i zoni oko korenskih dlačica (Slika 12b) što je od izuzetnog značaja kada se ima u vidu da je zona korenskih dlačica mesto najintenzivnije razmene metaboličkih produkata biljke i mikroorganizma, ali i ulazno mesto endofita. Formiranje mikrokolonija (Slika 12f) ukazalo je na sposobnost izolata da formira biofilm i njegov potencijal kao bioinokulanta. Biofilmovi formirani od strane PGPR, koji strukturno predstavljaju agregate mikrobnih ćelija u matriksu egzopolisaharida, značajno doprinose poboljšanju plodnosti zemljišta, snabdevanju biljaka nutrijentima, biokontroli, bioremedijaciji i smanjenju štetnih posledica povećanog saliniteta (Gupta et al., 2017). Formiranje mikrokolonija predstavlja početak formiranja arhitekture biofilma, da bi se u kasnijoj fazi jasni oblici bakterijskih ćelija izgubili (Gupta et al., 2017). *A. chroococcum* F8/2 se odlikuje izrazitom produkcijom EPS (Tabela 12) koji stimulišu ćelijsku agregaciju. Ireverzibilnim vezivanjem za površinu korena formiraju se mostovi između bakterijskih ćelija (Burdman et al., 2000). Proizvodnju egzopolisaharida od strane *A. chroococcum* primenom SEM-a konstatovali su Velmourougane et al. (2017).

Soj *B. megaterium* 11/3 je kolonizovao površinu korena i korenskih dlačica kod uljane repice (Slika 13a, 13d) i pšenice (Slika 13b, 13c). Uočeno je da je pored vegetativne forme prisutan i veliki broj spora (Slika 13e, 13f). Formiranje spora od strane inokulanta je ključ za njegovo održavanje i očuvanje PGP potencijala u nepovoljnim uslovima. I u slučaju *B. megaterium* 11/3, primenom SEM-a, uočeno je veće prisustvo bakterijskih ćelija u zoni oko korenskih dlačica (Slika 13b, 13c). *B. megaterium* je izolovan kao endofitna bakterija biljaka iz familije *Orchidaceae*, *Fabaceae*, *Cyperaceae* i višegodišnjih leguminoznih biljaka (Wang et al., 2019; Lopez et al., 2018; Hwang, et al., 2020; Dahmani et al., 2020).

Istraživanja Massalha et al. (2017) su ukazala da je početna agregacija *B. subtilis* konstatovana u zoni elongacije korena *Arabidopsis* sp. Ova agregacija je uočena već 20 minuta nakon inokulacije, što ukazuje da je ovaj proces prvenstveno vođen hemotaksijom bakterija prema eksudatu na površini korena. Činjenica da se agregacija vidi u zoni elongacije korena sugerise na povećano lučenje specifičnih jedinjenja iz ovog dela korena koja posreduju u privlačenju (Beauregard et al., 2013). Metabolomičkom analizom eksudata korena identifikovano je nekoliko aminokiselina za koje se zna da služe kao hemoatraktanti za *B. subtilis*. Massalha et al. (2017) su posmatrali kolonizaciju korena mikrofluidnom opremom s konfokalnom mikroskopijom za lasersko skeniranje i konstatovali su akumulaciju *B. subtilis* neposredno iznad vrha korena tačno 30 minuta od inokulacije. Gustina bakterija na istoj poziciji se značajno povećala za pet puta tokom prvih 6 h od početka inokulacije. Pored značajnog nakupljanja bakterija u zoni elongacije, konstatovana je značajna akumulaciju u donjim delovima korena tokom kasnijih faza eksperimenata (nakon 4-5 h nakon inokulacije).



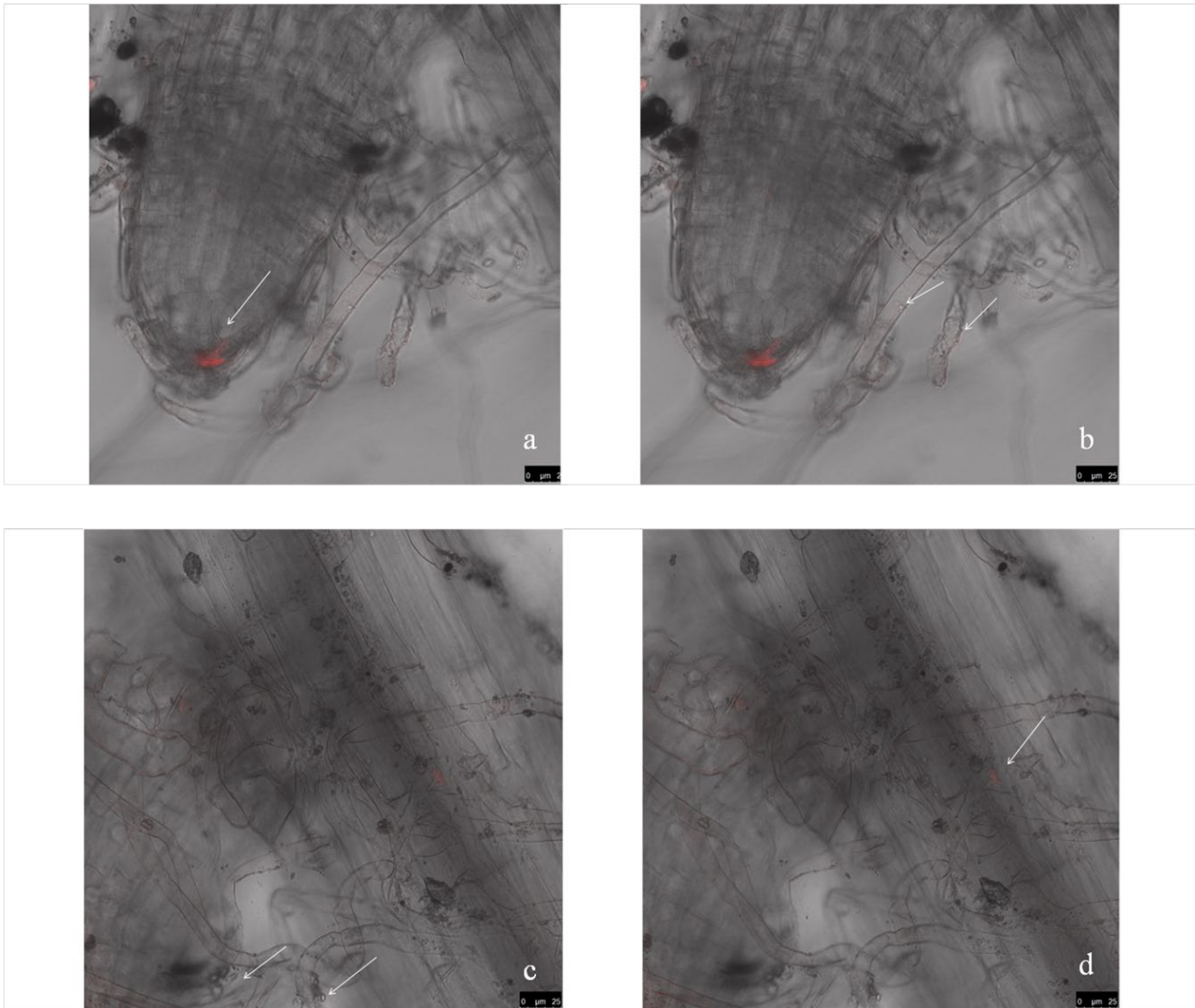
Slika 12: Površinska kolonizacija korena biljaka sa *Azotobacter chroococcum* F8/2 a) *A. chroococcum* F8/2 na mestu izbijanja korenske dlačice kod pšenice (mesto izbijanja korenske dlačice označeno je crvenom strelicom b) *A. chroococcum* F 8/2 blizu mesta izbijanja korenske dlačice kod pšenice c) *A. chroococcum* F8/2 na površini korena kukuruza (ćelije bakterija su označene belom strelicom d) pojedinačne ćelije *A. chroococcum* F8/2 na distalnom delu korena kukuruza e) površina korena kukuruza bez formiranih mikrokolonija f) površina korena kukuruza sa mikrokolonijama *A. chroococcum* F8/2.



Slika 13: Površinska kolonizacija korena biljaka sa *Bacillus megaterium* 11/3 a) *B. megaterium* 11/3 na korenovoj dlačici uljane repice (ćelija bakterije označena je belom strelicom) b) *B. megaterium* 11/3 na površini korenске dlačice pšenice c) *B. megaterium* 11/3 blizu mesta izbijanja korenских dlačica kod pšenice (ćelija bakterije je označena belom strelicom, mesta izbijanja korenских dlačica označena su crvenim strelicama) d) *B. megaterium* 11/3 na površini korena uljane repice bliže vrhu e) spore *B.*

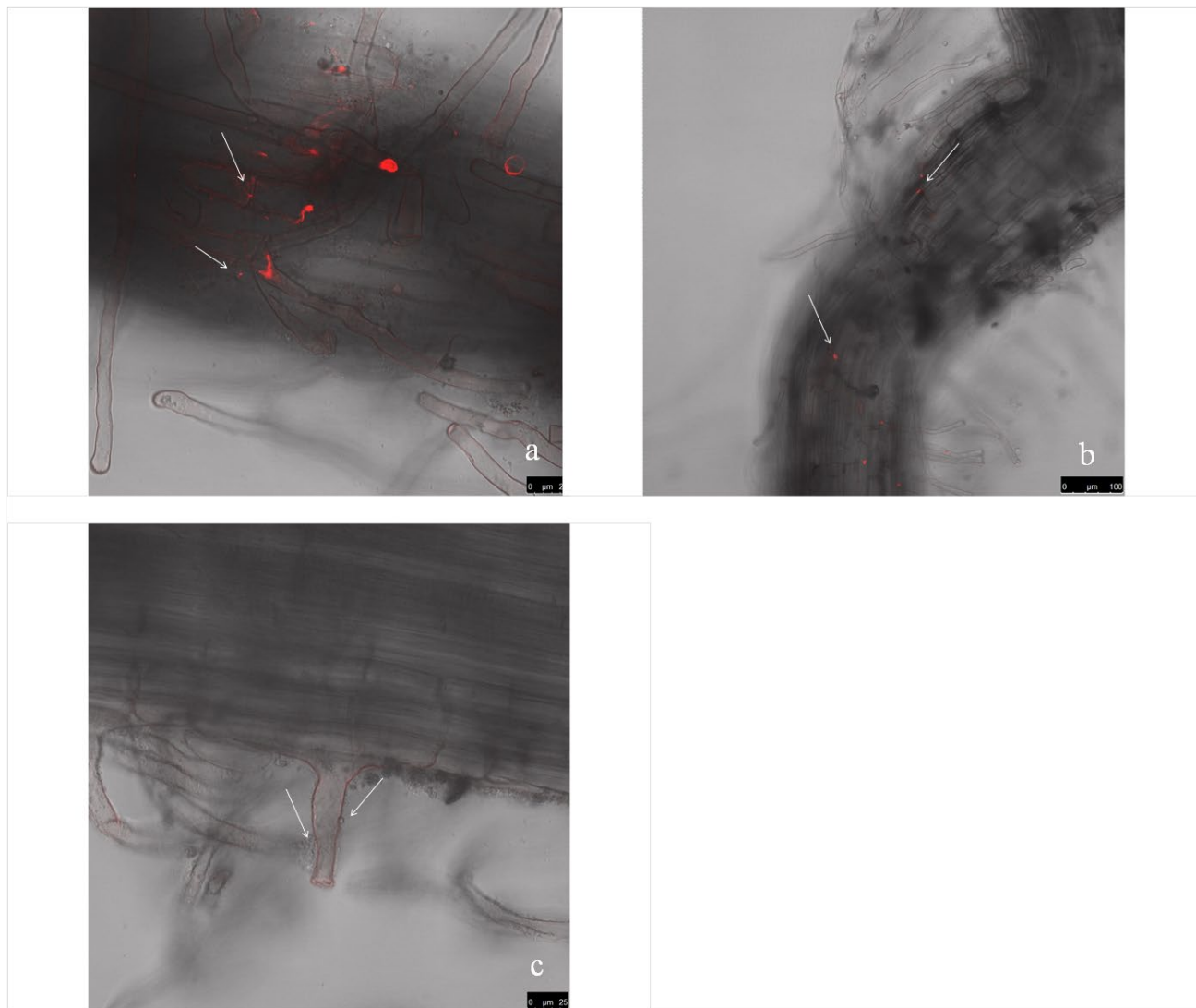
megaterium 11/3 na korenu uljane repice (bela strelica pokazuje mesto koncentracije velikog broja spora f) spore na korenu pšenice (bele strelice označavaju spore).

Mikrografije dobijene primenom CLSM, gde je u cilju jasnije vizualizacije bakterijskih ćelija primenjeno bojenje propidium jodidom (PI), potvrdile su sposobnost površinske kolonizacije korena biljaka sa oba ispitivana soja. Ključna mesta kolonizacije su zona korenskih dlačica (Slika 14b, 14c; Slika 15; Slika 16a, 16b) i korenska kapa (Slika 14a).



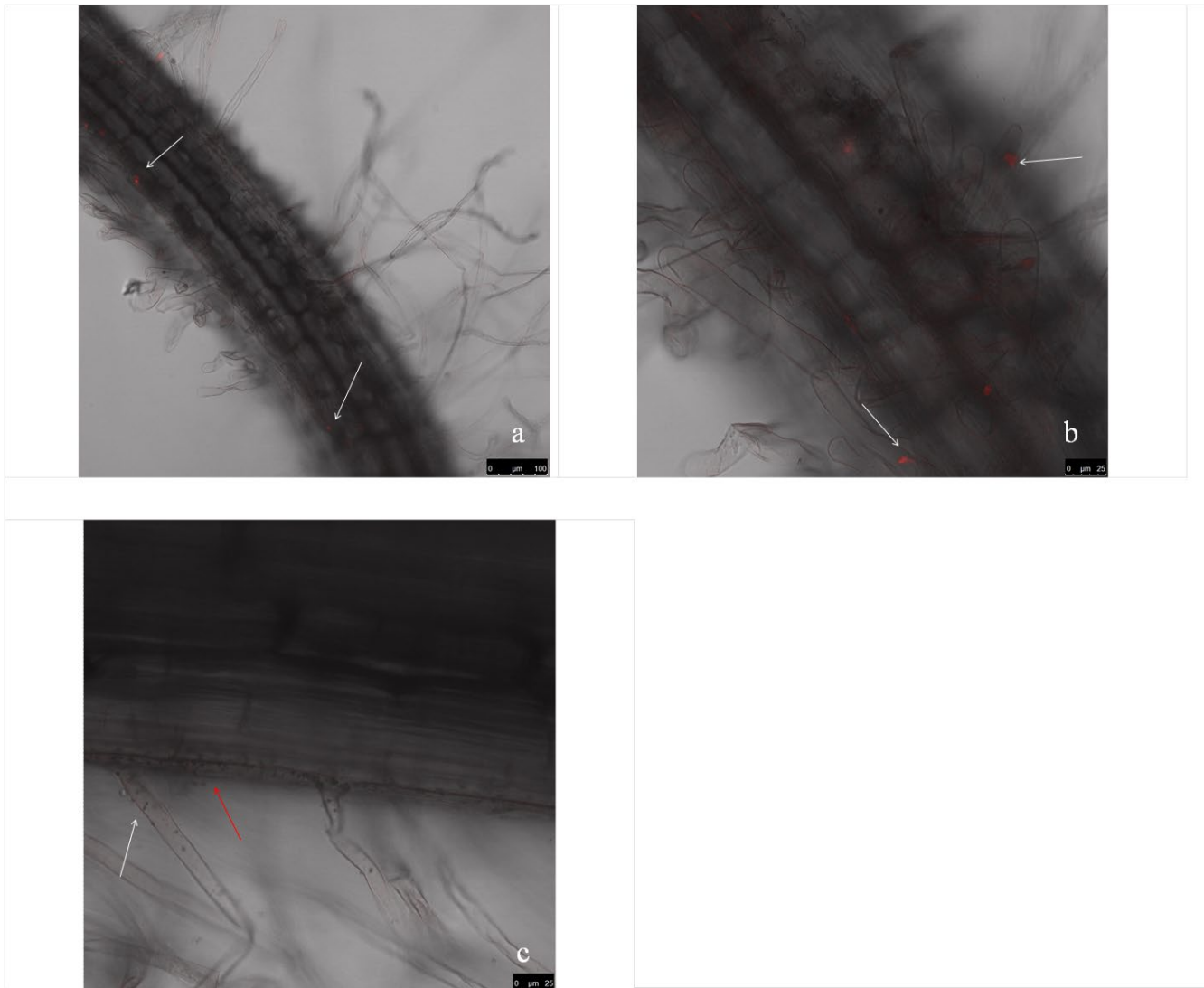
Slika 14: Mikrografija površinske kolonizacije korena pšenice sa *Azotobacter chroococcum* F8/2 (kanali PI fluorescencije i transmisioni kanal su spojeni u jednu sliku) a) mikrokolonije *A. chroococcum* F8/2 na vrhu korenske kape (mikrokolonija je crveno obojena i označena belom strelicom; bar predstavlja 25 µm) b) žive ćelije *A. chroococcum* F8/2 na i duž korenske dlake (ćelije bakterija su neobojene i označene belim strelicama; bar predstavlja 25 µm) c) zona korenskih dlačica i *A. chroococcum* (ćelije bakterija su neobojene i označene belom strelicom; bar predstavlja 25 µm) d) mikrokolonija *A. chroococcum* F8/2 na površini distalnog dela korena (mikrokolonija je crveno obojena i označena belom strelicom; bar predstavlja 25 µm).

Na mikrografijama dobijenim uz pomoć transmisionog detektora uočavaju se i neobojene, žive bakterijske ćelije (Slike 14b, 14c i 15c). Međutim, CLSM nije potvrđena endofitna kolonizacija. Razlog tome može biti mala brojnost koja je potvrđena kvantitativno, primena PI koji boji samo mrtve ćelije, dajući predstavu o još manjoj brojnosti, kao i nedostatak specifičnog bojenja, npr. GFP (Kandel et al., 2017).



Slika 15: Mikrografija korena pšenice inokulisanog sa *Azotobacter chroococcum* F8/2 a) površina korena u zoni korenskih dlačica sa *A. chroococcum* F8/2 (ćelije bakterija su označene belom strelicom i crveno obojene; bar predstavlja 25 µm) b) pojedinačne ćelije *A. chroococcum* F8/2 na površini blizu vrha korena (ćelije bakterija su crveno obojene; bar predstavlja 100 µm) c) *A. chroococcum* F8/2 duž površine korenske dlačice (ćelije bakterija su neobojene i označene belim strelicama; bar predstavlja 25 µm).

Massalha et al. (2017) su proučavali kolonizaciju korena primenom mikrofluidne opreme u kombinaciji sa CLSM i konstatovali da se brojnost bakterija povećala za pet puta tokom prvih šest sati nakon inokulacije. Pored značajnog nakupljanja bakterija u zoni elongacije, konstatovana je značajna akumulacija u donjim delovima korena tokom kasnijih faza.



Slika 16: Mikrografija površine korena biljaka inokuliranih sa *Bacillus megaterium* 11/3 a) *B. megaterium* 11/3 na površini u zoni korenskih dlačica kod uljane repice (ćelije bakterija su crveno obojene i označene belim strelicama; bar predstavlja 100 μm) b) *B. megaterium* 11/3 u zoni korenskih dlačica kod pšenice (ćelije bakterija su crveno obojene i označene belim strelicama; bar predstavlja 25 μm) c) spore *B. megaterium* 11/3 na rizoplani i korenskim dlačicama pšenice (crvena strelica pokazuje spore na rizoplani, bela strelica pokazuje spore na površini korenskih dlačica, spore se vide kao tamno obojene tačkaste strukture; bar predstavlja 25 μm).

Sojevi *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3, koji su korišćeni u ovim istraživanjima su izolovani iz zemljišta i predstavljaju tipične zemljišne bakterije koje mogu kolonizovati rizosferu i pripadaju grupi PGPR. Rezultati ove studije su pokazali da odabrani izolati poseduju sposobnost da u većem ili manjem broju kolonizuju površinu i unutrašnja tkiva korena više biljnih vrsta (Grafik 1; Graifik 2). Sa druge strane endofitne bakterije predstavljaju klasu specijalizovanih rizobakterija koje su stekle sposobnost invazije korena biljaka nakon kolonizacije rizosfere (Compant et al., 2010). Proces kolonizacije uključuje složenu komunikaciju i obično počinje od korena i zahteva prepoznavanje specifičnih jedinjenja u eksudatu korena od strane endofitne bakterije (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006). Biljke proizvode korenske eksudate za interakciju sa korisnim bakterijama za vlastitu ekološku prednost (Compant et al., 2005). Uočeno je da endofitne bakterije kolonizuju unutrašnjost

biljke u nizu događaja sličnih kolonizaciji rizosfere od strane rizobakterija (Hallmann et al., 1997). Međutim, endofitna kolonizacija zahteva više različitih ekoloških i genetskih faktora koji omogućavaju bakteriji da uđe u endosferu biljke (Compant et al., 2010). Posebno važnim mehanizmom u izboru specifičnih endofita smatra se selektivni odbrambeni odgovor biljaka.

Sposobnost biljaka i mikroorganizama da sarađuju u korišćenju zemljišnih resursa je osnova života u kopnenim ekosistemima. U modernim sistemima poljoprivredne proizvodnje, gde su prirodne interakcije između biljaka i mikroba uglavnom zamenjene unošenjem mineralnog đubriva, smatra se da su usevi možda izgubili sposobnost održavanja raznolikog mikrobioma (Pérez-Jaramillo et al., 2016) zbog čega je održivost sistema opala. Shodno tome, razumevanje interakcija biljnih mikrobioma postalo je glavni fokus istraživanja. Tehnološki razvoj je uveliko proširio znanje o mikrobnom sastavu zemljišta, metabolomika detaljno opisuje hemijski sastav rizodepozita, a transkriptomika i proteomika za proučavanje PGPR i ekspresije biljnih gena opisuje ogromnu složenost mikrobnih zajednica povezanih s biljkama (Widder et al., 2016.). Zemljište kao stanište, međutim, neverovatno je dinamična i strukturno složeno kao i ponašanje mikroba koji naseljavaju strukture zemljišta i rizosferu, a dosadašnji pristupi nisu uspeali da pruže potpuno razumevanje mikrobne dinamike, prvenstveno zbog metodoloških ograničenja. Jedan od pristupa, koji daje nadu ka boljem razumevanju interakcije koren-bakterije i modulacije bakterijskih zajednica koje kolonizuju površinu korena je primena mikrofluid uređaja koji omogućava direktno snimanje interakcija koren-bakterije u realnom vremenu (Massalha et al., 2019). Takođe, jedna od alternativa je razvoj 3D žive mikroskopije u rizosferi, bez remećenja fizičkih uslova za život biljaka i mikroorganizama (Liu, et al., 2021). Ovi rezultati ukazuju da mikroskopija živih sistema u životnoj sredini predstavljaju neprocenjivo sredstvo za razumevanje interakcije između biljaka i mikroba.

Rezultati dobijeni tokom ovih istraživanja u laboratorijskim, kontrolisanim uslovima mogu ukazati na pravac daljih istraživanja koji će doprineti boljem upoznavanju složenih biljno-mikrobnih interakcija. Mikroskopska pomoć u promatranju mikroorganizama u njihovom prirodnom staništu doprineće sticanju ključnih znanja o njihovom odnosu s biljkama. Modernoj zemljišnoj mikrobiologiji nedostaju efikasne metode za detekciju PGPR i bez alata i tehnika ne možemo razumeti složene biljno-mikrobne interakcije. Ovo je glavno usko grlo u korišćenju mikrobne inokulacije u rizosfernom inženjeringu (Romano et al., 2020). Što budemo imali više fundamentalnih znanja o PGPR i njihovim interakcijama sa biljkama, verovatno ćemo efikasnije koristiti ove bakterije u održivoj poljoprivredi.

U ovoj disertaciji je pokazano da je uspešna kolonizacija *A. chroococcum* F8/2, pored uticaja na % germinacije i vigor semena, uticala i na morfološke parametare korenova u ranoj fazi rasta. Promene morfoloških parametara korena kukuruza ispoljile su se kroz povećanje ukupne dužine, površine, volumena i prečnika za 29%, 72%, 147% i 45% u odnosu na kontrolu (Tabela 17) i verovatno su posledica prisustva *A. chroococcum* F8/2 na i u korenu (Slika 12c, 12d 12f).

B. megaterium 11/3 je uticao na povećanje dužine, površine i volumena korena kod različitih biljnih vrsta (Tabela 18). Imajući u vidu da ovaj bakterijski soj ne proizvodi IAA (Tabela 12) dobijeni rezultati sugerišu da su promene u morfologiji korena od strane *B. megaterium* 11/3 rezultat drugih mehanizama. López-Bucio et al. (2007) ukazuju da promene u arhitekturi korena od strane *B. megaterium* uključuju mehanizme nezavisne od auksina i etilena. Kod pšenice povećanje ukupne dužine korena iznosilo je 39%, površine 78% i ukupnog volumena 59% (Tabela 18) što je verovatno rezultat endofitne kolonizacije konstatovane metodom razređenja i prisustva ćelija *B. megaterium* 11/3 na i u površini korena (Slika 13b, 13c, 13f).

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu eksperimentalnih rezultata moguće je izvesti sledeće zaključke:

1. Primenom molekularne identifikacije potvrđeno je da izolat F8/2 pripada vrsti *Azotobacter chroococcum*, na osnovu sekvence 16S rRNK gena kao i *nif* sekvence. Takođe, dobijena sekvenca 16S rRNK izolata 11/3 je potvrdila pripadnost izolata vrsti *Bacillus megaterium*.
2. *A. chroococcum* F8/2 je pokazao rast u temperaturnom rasponu od 15-40 °C, pH 5,5-9,5 i pri koncentraciji NaCl od 3-5%. Rast *B. megaterium* 11/3 je konstatovan pri temperaturnom rasponu od 10-45 °C i pH vrednosti od 4,5-10 i koncentraciji NaCl od 3-7%. Širok opseg ekoloških faktora unutar kojih mogu da opstanu PGPR daje komperativnu prednost za opstanak u rizosferi u odnosu na mikoorganizme koji ne mogu da podnesu oscilacije ekoloških faktora. Dobijeni rezultati ukazuju da oba soja, posebno *B. megaterium* 11/3, mogu preživeti variranje temperature, pH i sadržaja NaCl u rizosferi i zemljištu. Pored toga, od značaja za mogućnost primene i komercijalizacije *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3 je njihova sposobnost preživljavanja nepovoljnih uslova poput nedostatka nutrijenata, suše ili visoke koncentracije hemikalija. Oba soja se odlikuju sposobnošću preživljavanja nepovoljnih uslova, *A. chroococcum* F8/2 formiranjem cisti, dok *B. megaterium* 11/3 ima sposobnost formiranja rezistentnih endospora.
3. *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3 se odlikuju visokom enzimskom aktivnošću i proizvode: alkalnu fosfatazu, esterazu, esterazu lipaze, leucin arilamidazu, tripsin, kiselu fosfatazu, naftol-AS-BI fosfohidrolazu, α -galaktozidazu i α -glukozidazu. Pored ovih enzima *B. megaterium* 11/3 proizvode i cistein arilamidazu, α -himotripsin, β -galaktozidazu i β -glukozidazu. Zahvaljujući izuzetnoj enzimskoj aktivnosti oba soja aktivno učestvuju u procesu kruženja nutrijenata, kao što su azot i fosfor i tako doprinose ishrani biljaka ovim nutrijentima i predstavljaju veliki potencijal primene kao biofertilizatori.
4. Na osnovu ispitanih direktnih i indirektnih mehanizma koji stimulatивно utiču na rast biljaka, konstatovano je da *A. chroococcum* F8/2 sintetiše IAA (10 μ g/ml), ima sposobnost korišćenja ACC, proizvode siderofore (2,00 \emptyset cm) i NH₃, solubilizuje K (SI 3,00), proizvode egzopolisaharide i ispoljava antagonističku aktivnost prema *Fusarium oxysporum* (56,66%) i *Botrytis cinerea* (66,67%). Na osnovu ovih karakteristika *A. chroococcum* F8/2 pripada grupi PGPR.
5. Na osnovu ispitanih direktnih i indirektnih mehanizma koji stimulatивно utiču na rast biljaka, konstatovano je da *B. megaterium* 11/3 solubilizuje P (SI 1,1) i Zn (SI 1,5), proizvode NH₃, kao i egzopolisaharide. Ove karakteristike omogućavaju da se *B. megaterium* 11/3 svrsta u grupu PGPR.
6. Zajednička karakteristika *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3, koja dodatno, omogućava svrstavanje u grupu PGPR je produkcija bioaktivnih VOC. Između ispitivanih sojeva uočena je razlika u produkciji bioaktivnih VOC.
7. Rezultati hromatografije isparljive smeše metabolisane od strane *B. megaterium* 11/3 ukazali su da sastav medijuma na kojima se bakterije gaje utiče na produkciju isparljivih jedinjenja. Gajenjem *B. megaterium* 11/3 u nutritivno bogatom medijumu rezultiralo je produkcijom dva jedinjenja koja nisu bila prisutna u isparljivim smešama kontrole, izoamil alkohol (2,20%) i 3-methyl-2-pentanon (0,47%).

8. Imajući u vidu nedostatak literaturnih podataka o metabolisanim VOC od strane roda *Azotobacter*, ova istraživanja imaju poseban značaj. Istraživanje je pokazalo da se *A. chroococcum* F8/2 odlikuje značajnom produkcijom VOC-a. Analizom je utvrđeno da su u smeši gasovitih metabolita bili dominantni alkoholi. Procentualno najzastupljeniji je bio etanol (46,67%), za koji je poznato da je značajan u biokontroli, ali i poboljšanju germinacije. Takođe, etanol je uglavnom međuproizvod koji služi kao prekursor za sintezu drugih isparljivih bioaktivnih organskih metabolita. Konstatovano je i prisustvo acetoina (3-hidroksi-2-butanon) i njegova oksidovana forma 2,3-butandion koji iako su prisutani u smeši u maloj koncentraciji od samo 0,93% (acetoin) i 0,56% (2,3-butandion) mogu imati stimulatívni efekta, jer je poznato da upravo male koncentracije VOC-a imaju bioaktivni uticaj na biljku.
9. Ispitivanjem uticaja tretmana sa *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3 na parametre germinacije kod različitih biljnih vrsta (slačica (*Sinapsis alba* L.), bosiljak (*Ocimum basilicum* L.), pšenica (*Triticum aestivum* L.), kinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), kukuruz šećerac (*Zea mays* convar. *saccharata*), uljana repica (*Brassica napus* L.), šećerna repa (*Beta vulgaris* L.), soja (*Glycine max* L.), paradajz (*Solanum lycopersicum* L.) i krastavac (*Cucumis sativus* L.)) konstatovani su stimulatívni i inhibitorni efekti, a kod nekih nije konstatovana razlika u odnosu na kontrolni tretman. Razlike su uočene u odnosu na primenjeni soj, parametre germinacije i biljnu vrstu.
10. *A. chroococcum* F8/2 je uticao na povećanje ukupno 43 od 70 parametara (10 biljnih vrsta x 7 parametara germinacije), od čega su 21 vrednosti statistički značajne. Pri inokulaciji sa *B. megaterium* 11/3 povećanje vrednost je konststovano kod 34 od čega je statistički značajno povećanje kod 14. Statistički značajno smanjenje pri inokulaciji sa *A. chroococcum* F8/2 je konstatovano samo na jednom parametru, FGP kod šećerne repe, dok je pri inokulaciji sa *B. megaterium* 11/3 konststovano statistički značajno smanjenje 8 vrednosti (bosiljak: vigor I i dužina klijanaca, pšenica: GI; kukuruz: MGT; uljana repica: dužina klijanaca; šećerna repa: vigor II; soja: FGP; krastavac: dužina klijanaca).
11. Ispitivani sojevi *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3 su različito uticali na parametre germinacije kod testiranih biljnih vrsta, što ukazuje na izuzetnu kompleksnost procesa i uticaj brojnih faktora. Međutim, može se konstatovati da su vrednosti parametra vigor I, primenom oba soja povećane kod svih biljnih vrsta, izuzev kod bosiljka. Inokulacijom semena *A. chroococcum* F8/2 konststovano je povećanje vigora od 91% kod šećerne repe, 68% kod kukuruza, uljane repice 52%, kioe 45%, paradajza 36%, slačice 33%, i soje 23%. Pri inokulaciji sa *B. megaterium* 11/3 povećanje je iznosilo kod slačice 33%, krastavca 32% i 28% kod kukuruza. Kako se vigorom može okarakterisati sveobuhvatni potencijal semena na osnovu koga se može dati pretpostavka uspešnog daljeg razvoja biljke može se zaključiti da se mikrobiološkom inokulacijom semena primenom oba soja može uticati na uspešan dalji rast biljaka.
12. *A. chroococcum* F 8/2 je kod svih ispitivanih biljaka uticao na povećanje germinacije i rast klijanaca i statistički značajno povećanje vrednosti više od jednog parametara klijavosti konststovano je kod soje, kioe i paradajza. *B. megaterium* 11/3 je kod kukuruza doveo do statistički značajnog povećanja GI, vigor I, vigor II i suve mase klijanaca i može se smatrati značajnim potencijalom za primenu u bioprajangungu pri proizvodnji ove važne ratarske kulture. Istovremeno ova istraživanja ukazala su na potrebu za daljim proučavanjem kako bi se procenili faktori koji mogu uticati na komunikaciju između sorte biljaka i PGPR-a i na identifikaciju načina za poboljšanje efikasnosti interakcijskih odnosa soj-sorta.

13. Uticaj statičkog magnetnog polja (SMP) jačine 90mT na semena inokulisana *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3 je zavisio od vremena izlaganja, biljne vrste kao i parametara germinacije. Izlaganje inokulisanih (*A. chroococcum* F8/2) semena bosiljka SMP jačine 90 mT u trajanju od 15 min i šećerne repe u trajanju od 5 min uticalo je na povećanje procenta germinacije za 41% i 56%, a povećanje GI od 85% utvrđeno je kod bosiljka nakon izlaganja inokulisanih semena SMP 15 min. Kod kinoe, paradajza i pšenice SMP 90 mT i vreme ekspozicije od 15 min inhibitorno je delovalo na FGP i smanjenja su iznosila 31%, 13% i 10%. Tretman SMP i *B. megaterium* 11/3 uticao je na povećanje germinaciju pšenice i šećerne repe kod koje je pored povećanja FGP, povećan GI za 75% što je bilo najveće postignuto povećanje od svih posmatranih parametara. Najizraženiji inhibitorni efekat zabeležen je kod uljane repice. Kombinovana primena mikrobiološkog tretmana semena i SMP je kod nekih biljnih vrsta dovela do povećanja parametara germinacije, ali je zabeležen i inhibitorni uticaj npr. kod kinoe i uljane repice. Dobijeni rezultati ukazuju na specifičnost ispitivanih interakcija i potrebu detaljnih istraživanja i razmatranja potencijalne primene SMP.
14. Inokulacija sa *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3 je uticala na promenu morfoloških parametara korena u ranoj fazi rasta biljaka. Inokulacija sa *A. chroococcum* F8/2 uticala je na značajnog povećanja dužine korena slačice od 47% i kukuruza od 29%, povećanje volumena korena pšenice i kukuruza za 227% i 147%, suve mase korena kukuruza od 58%. Biopraiming sa *B. megaterium* 11/3 povećao je dužinu korena krastavca i pšenice za 55% i 39% i volumen za 91% i 78%. Uticao je na povećanje suve mase korena uljane repice za 86% i suve mase korena slačice za 62%. Bez obzira na uočene razlike između ispitivanih sojeva, rezultati ovih istraživanja su pokazali da inokulacija izabranim sojevima predstavlja mogućnost za stimulaciju rasta i razvoja korena pojedinih biljnih vrsta. Dobar rast i razvoj korenovog sistema je od izuzetne važnosti za ishranu i zdravstveni status biljaka. Stimulativni efekti na rast korena mogu se povezati sa produkcijom IAA, ali i drugih metabolita, kao što su bioaktivni VOC.
15. Inokulacija *A. chroococcum* F8/2 šećerne repe je uticala i na mikromorfološke strukture provodnog tkiva korena koje su od vitalnog značaja za nutritivni status biljke. Može se pretpostaviti da je sintetizovana IAA od strane *A. chroococcum* F8/2 uticala stimulativno na deobu ćelija i diferencijaciju ksilema inokulisanih biljaka. Na ovaj način inokulacija sa *A. chroococcum* F8/2 povećava dostupnost nutrijenata ali i njihov transport u nadzemni deo biljke. Ova istraživanja predstavljaju prva mikromorfološka ispitivanju ranog rasta korena šećerne repe inokulisanog sa rodnom *Azotobacter*.
16. Inokulacija sa *A. chroococcum* F8/2 uticala je na značajno povećanje suve mase korena kukuruza (58%), uljane repice (40%) i slačice (25%), dok povećanje nije zabeleženo kod pšenice, kinoe, soje, paradajza, krastavca. *A. chroococum* F8/2 je stimulativno uticao na biomase nadzemnog dela kukuruza, pšenice, paradajza i kinoe povećavši je za 13%, 19%, 31% i 45%. Kukuruz je jedina inokulisana biljka kod koje je inokulacija dovela do povećanja celokupne biomase biljke i to za 40%. Inokulacija soje i krastavca nije uticala na produkciju biomase. Inokulacija sa *B. megaterium* 11/3 je uticala na značajno povećanje suve mase korena kukuruza (50%), slačice (62%) i uljane repice (86%). Tretman nije stimulisao produkciju biomase kod pšenice i krastavca. Suva biomasa nadzemnog dela je značajno uvećana inokulacijom slačice, kukuruza i uljane repice, ali i pšenice rezultirajući povećanjima od 117%, 58%, 29% i 16%. Inokulacija krastavca nije imala efekat na produkciju biomase. Oba soja dovela su do povećanja produkcije biomase slačice i efekti inokulacije sa *B. megaterium* 11/3 iznose 106%.

17. Oba soja su pokazala sposobnost površinske i endofitne kolonizacije što je osnovni uslov za dalje PGP delovanje u rizosferi. Pri inokulaciji se *A. chroococcum* F8/2 stepen površinske kolonizacije kretao u intervalu od $\approx 6,27 \times 10^7$ CFU/g sveže mase korena (slacica) do $\approx 2,4 \times 10^{10}$ CFU/g sveže mase korena (uljana repica). *B. megaterium* 11/3 je pokazao niži stepen površinske kolonizacije i kretao se u intervalu od $\approx 2,5 \times 10^3$ CFU/g kod krastavca do $\approx 4,2 \times 10^8$ CFU/g sveže mase korena kod slacice. Rezultati su pokazali da u interakciji biljka-PGPR postoji veći međusobni afinitet kada je u pitanju inokulacija sa *A. chroococcum* F8/2 u odnosu na *B. megaterium* 11/3. Takođe, uočena je razlika u stepenu kolonizacije između soja i biljnih vrsta. Tako je brojnost *A. chroococcum* F8/2 je znatno viša na/u korenu uljane repice, u odnosu na koren slacice. Za razliku od *A. chroococcum* F8/2, *B. megaterium* 11/3 je na korenu slacice imao najveći stepen kolonizacije ($4,2 \times 10^8$ CFU/g). Stepen endofitne kolonizacije sa *A. chroococcum* F8/2 kretao se od $\approx 1,6 \times 10^1$ CFU/g kod soje do $\approx 1,17 \times 10^3$ CFU/g sveže mase korena kod paradajza. *B. megaterium* 11/3 je endofitno kolonizovao koren krastavca ($\approx 1,6 \times 10^1$ CFU/g) a najviše $\approx 3,6 \times 10^4$ CFU/g koren pšenice.
18. Primenom SEM-a uočeno je veće prisustvo *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3 na korenskim dlačicama, mestima izbivanja i zoni oko korenskih dlačica što je od izuzetnog značaja posebno kada se ima u vidu da je zona korenskih dlačica mesto najintenzivnije razmene metaboličkih produkata biljke i mikroorganizma, ali i ulazno mesto endofita. Formiranje mikrokolonija *A. chroococcum* F8/2 na površini korena kukuruza u zoni korenskih dlačica je od izuzetne važnosti za ishranu biljaka i snabdevanje azotom. Soj *B. megaterium* 11/3 je kolonizovao površinu korena i korenskih dlačica kod uljane repice i pšenice, ali je uočeno da je pored vegetativne forme prisutan i veliki broj spora. Formiranje spora je značajno za održavanje i očuvanje PGP potencijala u nepovoljnim uslovima.
19. Mikrografije dobijene primenom CLSM, potvrdile su sposobnost površinske kolonizacije korena biljaka sa oba ispitivana soja. Ključna mesta kolonizacije su zona korenskih dlačica i korenska kapa. Bojenjem propidium jodidom dolazi do izrazito jasnog signala i potvrde prisustva mrtvih bakterijskih ćelija, međutim, uočavaju se i nebojene bakterijske ćelije što ukazuje na njihov fiziološki status (žive ćelije). *Azotobacter chroococcum* F8/2 i *Bacillus megaterium* 11/3, nisu izolovane iz endosfere, već iz zemljišta, ali dobijeni rezultati potvrđuju sposobnost ovih sojeva da kolonizuju rizosferu i pripadaju grupi rizobakterija. Ova istraživanja, obavljena u laboratorijskim, kontrolisanim uslovima mogu ukazati na pravac daljih istraživanja koji će doprineti boljem upoznavanju složenih biljno-mikrobnih interakcija. Mikroskopske metode posmatranja mikroorganizama u njihovom prirodnom staništu doprineće sticanju ključnih znanja o njihovom odnosu s biljkama. Modernoj zemljišnoj mikrobiologiji nedostaju efikasne metode za detekciju PGPB i bez alata i tehnika ne možemo razumeti složene biljno-mikrobne interakcije.
20. Na osnovu dobijenih rezultata može se konstatovati da je primena sojeva *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3, koji pripadaju grupi PGPR, u tretmanu semena od izuzetnog značaja za stimulaciju germinacije, formiranje zdravih dobro razvijenih klijanaca i podržavanja rane faze rasta. Uspostavljanje složenih interakcijskih odnosa između biljaka i PGPR u najranijim fazama je ključno za postizanje dobrog i stabilnog prinosa u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji.

Rezultati istraživanja u okviru ove disertacije su pokazali da *A. chroococcum* F8/2 i *B. megaterium* 11/3, predstavljaju značajne alate koji mogu postati deo zelene tehnologije doprinoseći smanjenju primene agrohemijskih uz istovremeno poboljšanje strukture, plodnosti zemljišta i kvaliteta životne sredine. Istovremeno ova istraživanja su otvorila brojne mogućnosti za dalja naučna ispitivanja o složenim biljno-mikrobnim interakcijama.

7. LITERATURA

- Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., Meftah, K. I. (2021): Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Frontiers in Microbiology*, 12: 628379.
- Abaid-Ullah, M., Hassan, M. N., Muhammad, J., Brader, G., Shah, M. K. N., Sessitsch, A., Hafeez, F. Y. (2015): Plant Growth Promoting Rhizobacteria: an alternate way to improve yield and quality of wheat (*Triticum aestivum*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 17: 51-60.
- Abaid-Ullah, M., Hassan, M. N., Nawaz, M. K., Hafeez, F. Y. (2011): Biofortification of wheat (*Triticum aestivum* L) through Zn mobilizing PGPR. *Proceedings of international science conference. Prospects and challenges to sustainable agriculture*, Azad Jammu and Kashmir University, Pakistan, pp. 298.
- Abbas, R., Rasul, S., Aslam, K., Baber, M., Shahid, M., Mubeen, F., Naqqash, T. (2019): Science halotolerant PGPR: a hope for cultivation of saline soils. *Journal of King Saud University-Science*, 31: 1195-1201.
- Afzal, I., Irum, I., Zabta, K. S., Azra, Y. (2017): Plant growth-promoting potential of endophytic bacteria isolated from roots of wild *Dodonaea viscosa* L. *Plant Growth Regulation*, 81: 399-408.
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., Shahzad, S. (2019): Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological research*, 221: 36-49.
- Agbodjato, N. A., Noumavo, P. A., Baba-Moussa, F., Salami, H. A., Sina, H., Sèzan, A., Bankolé, H., Adjanooun, A., Baba-Moussa, L. (2015): Characterization of potential plant growth promoting rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L) in central and northern Benin (West Africa). *Applied and Environmental Soil Science*, 9: 901656.
- Ahammed, G. J., Gantait, S., Mitra, M., Yang, Y., Li, X. (2020): Role of ethylene crosstalk in seed germination and early seedling development: A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 151: 124-131.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M. S. (2005): Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology*, 29: 29-34.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M. S. (2008): Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 63: 173-81.
- Ahmed, A. A. A., Sabah, L. A. (2018): Induced resistance in tomato to the gray mold *Botrytis cinerea* by *Trichoderma harzianum* and *Azotobacter chroococcum*. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 9: 1418-1434.

Aishwarya, A. A., Anju, S. P., Amol, J. D., Jaiprakash, D. (2019): Isolation of *Azotobacter* and study of its effect as a liquid formulation on seed germination and growth parameters of green gram (*Vigna radiata* L.). *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 8: 336-341.

Aislabie, J., Deslippe, J. R., Dymond, J. R. (2013): Soil microbes and their contribution to soil services. In: Dymond, J. R. (Ed.), *Ecosystem services in New Zealand: conditions and trends*, Manaaki Whenua Press, Lincoln, pp. 143-161.

Akbari, P., Ghalavand, A., Modarres, S. A., Alikhani, M. A. (2011): The effect of biofertilizers, nitrogen fertilizer and farmyard manure on grain yield and seed quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Agricultural Technology*, 7:173-184.

Akhtar, S. S., Amby, D. B., Hegelund, J. N., Fimognari, L., Großkinsky, D. K., Westergaard, J. C., Müller, R., Moelbak, L., Liu, F., Roitsch, T. (2020): *Bacillus licheniformis* FMCH001 increases water use efficiency via growth stimulation in both normal and drought conditions. *Frontiers in Plant Science*, 11: 297.

Aladjadiyan, A. (2002): Study of the influence of magnetic field on some biological characteristics of *Zea mays*. *Journal of Central European Agriculture*, 3: 89-94.

Al-Barakah, F. N. I., Sohaib, M. (2019): Evaluating the germination response of *Chenopodium quinoa* seeds to bacterial inoculation under different germination media and salinity conditions. *Seed Science and Technology*, 47: 161-169.

Alberts, H. W. (1927): Effects of pericarp injury on moisture absorption, fungus attack, and viability of corn. *Journal of the American Society of Agronomy*, 19: 1021-1030.

Ali, A., Hussein, M. (2021): Co-inoculation effect of *Rhizobia* with potassium and zinc solubilizing bacteria for enhancing some growth parameters of *Phaseolus vulgaris*. *Plants*, 10: 1431-1441.

Alkurtany, A., Yseen, J. (2019): Isolation and identification of *Azotobacter* from some plants grow in Gypsiferous soil and evaluation of its efficiency for nitrogen fixation and production indole (IAA) and solubilizing phosphate. *Tikrit Journal for Agricultural Sciences*, 18: 135-142.

Allen, R. D. (1995): Overexpression of chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase in plants. In: Gartland, K. M. A., Davey, M. R. (Eds.), *Agrobacterium protocols*, Springer, Totowa, NJ, pp. 309-324.

Almaghrabi, O. A., Massoud, S. I., Abdelmoneim, T. S. (2013): Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20: 57-61.

Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., Ullrich, C. I. (2006): Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany*, 97: 883-893.

Alvarez-Pérez, J. M., González-García, S., Cobos, R., Olego, M. Á., Ibañez, A., Díez-Galán, A., Garzón-Jimeno, E., Coque, J. J. R. (2017): Use of endophytic and rhizosphere *Actinobacteria* from

grapevine plants to reduce nursery fungal graft infections that lead to young grapevine decline. *Applied and Environmental Microbiology*, 83: 24.

Amirmoradi, S., Feizi, H. (2017): Can mean germination time predict seed vigor of canola (*Brassica napus* L.) seed lots? *Acta Agrobotanica*, 70: 1729.

Ammari, T., Mengel, K. (2006): Total soluble Fe in soil solutions of chemically different soils. *Geoderma*, 136: 876-885.

Amogou, O., Dagbénonbakin, G., Agbodjato, N., Noumavo, P., Salami, H., Valère, S., Ricardos, A., Sylvestre, A., Djihal, K., Adjanohoun, A., Baba-Moussa, L. (2018): Influence of isolated PGPR in Central and Northern Benin on maize germination and greenhouse growth. *American Journal of Plant Sciences*, 9: 2775-2793.

Ando, H., Hatanaka, K., Ohata, I., Yamashita-Kitaguchi, Y., Kurata, A., Kishimoto, N. (2012): Antifungal activities of volatile substances generated by yeast isolated from Iranian commercial cheese. *Food Control*, 26: 472-478.

Andrade, P. A. M., Pimenta, L. S., Cardilho, B. E. S., Marcon, J., Silva, J. A. S., Azevedo, J. L. D., Novembre, A. D. D. L. C., Quecine, M. C. (2020): *Bacillus* sp. RZ2MS9 and the bacteria-free filtrate in the seed germination and growth of maize seedlings. *Brazilian Journal of Agriculture*, 95: 95-105.

Andreolli, M., Lampis, S., Vallini, G. (2017): Diversity, distribution and functional role of bacterial endophytes in *Vitis vinifera*. In: Maheshwari, D. K. (Ed.), *Endophytes: Biology and Biotechnology*, Springer Cham, Switzerland, pp. 233-266.

Andreolli, M., Zapparoli, G., Lampis, S., Santi, C., Angelini, E., Bertazzon, N. (2021): In vivo endophytic, rhizospheric and epiphytic colonization of *Vitis vinifera* by the plant-growth promoting and antifungal strain *Pseudomonas protegens* MP12. *Microorganisms*. 9: 234.

Andriani, Y., Safitri, R., Rochima, E., Fakhrudin, S. D. (2017): Characterization of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* potentials as probiotic bacteria in Vanamei shrimp feed (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). *Nusantara Bioscience*, 9: 188-193.

Annapurna, K., Kumar, A., Kumar, L.V., Govindasamy, V., Bose, P., Ramadoss, D. (2013): PGPR-induced systemic resistance (ISR) in plant disease management. In: Maheshwari, D. K. (Ed.), *Bacteria in agrobiology: disease management*, Springer, Berlin, pp. 405-425.

Ansari, F., Ksiksi, T. (2016): A quantitative assessment of germination parameters: The case of *Crotalaria persica* and *Tephrosia apollinea*. *The Open Ecology Journal*, 9: 13-21.

Antony, C. A., Smitha, G., Chandran, S., Abin, S. (2020): Lichens as a source and indicator of agrochemicals. In: Prasad, M. N. V. (Ed.), *Agrochemicals detection, treatment and remediation*, Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, pp. 241-261.

Antoszewski, M., Mierek-Adamska, A., Dabrowska, G. B. (2022): The Importance of microorganisms for sustainable agriculture - A Review. *Metabolites*, 12: 1100.

Anuradha, P., Syed, I., Swati, M., Patil, V. D. (2015): Solubilization of insoluble zinc compounds by different microbial isolates in vitro condition. *International Journal of Tropical Agriculture*, 338: 865-869.

Araujo, S. S, Paparella, S., Dondi, D., Bentivoglio, A., Carbonera, D., Balestrazzi, A. (2016): Physical methods for seed invigoration: advantages and challenges in seed technology. *Frontiers in Plant Science*, 7: 646.

Arfarita, N., Hidayati, N., Rosyidah, A., Machfudz, M., Higuchi, T. (2016): Exploration of indigenous soil bacteria producing-exopolysaccharides for stabilizing of aggregates land potential as biofertilizer. *Journal of Degraded and Mining Lands Management*, 4: 697-702.

Arteca, R. N., Arteca, J. M. (2008): Effects of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany*, 59: 3019-26.

Asari, S., Matzén, S., Petersen, M. A., Bejai, S., Meijer, J. (2016): Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 92: fiw 070.

Attia, M. S., Hashem, A. H., Badawy, A. A., Abdelazizm A. M. (2022): Biocontrol of early blight disease of eggplant using endophytic *Aspergillus terreus*: improving plant immunological, physiological and antifungal activities. *Botanical Studies*, 63: 26.

Austin, R.B., Longden, P.C., Hutchinson, J. (1969): Some effects of 'hardening' carrot seed. *Annals of Botany*, 33: 883-895.

Azevedo, J. L., Araújo, W. L. (2007): Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli B. N., Deshmukh, S. K. (Eds.). *Fungi: Multifaceted microbes*, Anamaya Publishers, New Delhi, pp, 189-207.

Babalola, O. O. (2010): Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*, 32: 1559-1570.

Bae, Y. S., Park, K., Lee, Y. G., Choi, O. H. (2007): A simple and rapid method for functional analysis of plant growth promoting rhizobacteria using the development of cucumber adventitious root system. *Plant Pathology Journal*, 23: 223-225.

Baig, K. S., Arshad, M., Shaharoon, B., Khalid, A. (2012): Comparative effectiveness of *Bacillus* spp. possessing either dual or single growth-promoting traits for improving phosphorus uptake, growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of Microbiology*, 62: 1109-1119.

Balsanelli, E., Baura, V. A. D., Pedrosa, F. D. O., Souza, E. M. D., Monteiro, R. A. (2014): Exopolysaccharide biosynthesis enables mature biofilm formation on abiotic surfaces by *Herbaspirillum seropedicae*. *PloS ONE*, 9(10): e110392.

Bailly, A., Weisskopf, L. (2012): Current knowledge and future challenges. *Plant signaling and behavior*, 7: 1-7.

- Bailly, C., Bousquet, A., Braun, V., Buitink, J., Desbois-Vimont, C., et al. (2020): Towards seed protection using biocontrol strategies. 2019:(hal-02931599f). <https://hal.science/hal-02931599>.
- Bajard, S., Rosso, L., Fardel, G., Flandrois, J. P., (1996): The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 29: 201-211.
- Bajpai, I., Saha, N., Basu, B. (2012): Moderate intensity static magnetic field has bactericidal effect on *E. coli* and *S. epidermidis* on sintered hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B, Applied Biomaterials*, 100: 1206-1217.
- Bakhshandeh, E., Gholamhosseini, M., Yaghoubian, Y., Pirdashti, H. (2020): Plant growth promoting microorganisms can improve germination, seedling growth and potassium uptake of soybean under drought and salt stress. *Plant Growth Regulation*, 90: 123-136.
- Bakker, A. W., Schippers, B. (1987): Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* SPP-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biology and Biochemistry*, 19: 451-457.
- Bakker, P. A. H., Berendsen, R. L., Doornbos, R. F., Wintermans, P. C., Pieterse, C. M. (2013): The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Frontiers in Plant Science*, 4: 165.
- Bákonyl, N., Bott, S., Gajdos, E., Szabó, A., Jakab, A., Tóth, B., Makleit, P., Veres, S. (2013): Using biofertilizer to improve seed germination and early development of maize. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22: 1595-1599.
- Balaban, N. P., Suleimanova, A. D., Valeeva, L. R., Chastukhina, I. B., Rudakova, N. L., Sharipova, M. R., Shakirov, E. V. (2017): Microbial phytases and phytate: exploring opportunities for sustainable phosphorus management in agriculture. *American Journal of Molecular Biology*, 7: 11-29.
- Balsanelli, E., Baura, V. A., Pedrosa, F. O., Souza, E. M., Monteiro, R. A. (2014): Exopolysaccharide biosynthesis enables mature biofilm formation on abiotic surfaces by *Herbaspirillum seropedicae*. *PLoS ONE*, 9: e110392.
- Barbez, E., Dünser, K., Gaidora, A., Lendl, T., Busch, W. (2017): Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114: E4884 - E4893.
- Bardgett, R. D., Mommer, L., De Vries, F. T. (2014): Going underground: root traits as drivers of ecosystem processes. *Trends in Ecology and Evolution*, 29: 692-699.
- Barnett, S. J., Ballard, R. A., Franco, C. M. (2019): Field assessment of microbial inoculants to control *Rhizoctonia* root rot on wheat. *Biological Control*, 132: 152-160.
- Barret, M., Guimbaud, J. F., Darrasse, A., Jacques, M. A. (2016): Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms. *Molecular Plant Pathology*, 17: 791-795.

- Barriuso, J., Ramos, S. R., Lucas, J. A., Probanza, L. A., García-Villaraco, A., Gutiérrez, M. F. J. (2008): Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In: Ahmad, I., Pichtel, J., Hayat, S. (Eds.), Plant-bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth, Weinheim, Germany, pp. 1-3.
- Bashan, Y., Bashan, L. E. (2010): How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in Agronomy*, 108: 77-136.
- Bashir, Z., Zargar, M.Y., Baba, Z.A., Mohiddin, F. A. (2017): Effect of potassium and phosphorus solubilizing bacteria on growth parameters of chilli (*Capsicum annuum* L.) under Kashmir climatic conditions. *International Journal of Chemical Studies*, 5: 692-695.
- Baslam, M., Garmendia, I., Goicoechea, N. (2011): Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) improved growth and nutritional quality of greenhouse-grown lettuce. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 59: 5504–5515.
- Basra, S. M. A., Farooq, M., Tabassum, R. (2005): Physiological and biochemical aspects of seed vigour enhancement treatments in fine rice (*Oryza sativa* L.). *Seed Science and Technology*, 33: 25-29.
- Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., Enshasy, H. El E. (2021): Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability*, 13: 1140.
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. (2013): *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 110: E1621-E1630.
- Becking, J. H. (1992): The family *Azotobacteraceae*. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer K. (Eds.), *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, Springer, NY, pp. 3144-3170.
- Begum, M., Ravishankar, V., Lokesh, S. (2003): Effect of plant growth promoting rhizobacteria on seed-borne fungal pathogens in okra. *Indian Phytopathology*, 56: 156-158.
- Beier, S., Bertilsson, S. (2013): Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. *Frontiers in Microbiology*, 4:149.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. P. (2012): Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35: 1044-1051.
- Benizri, E., Baudoin, E., Guckert, A. (2001): Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol science and technology*, 11: 557-574.
- Bennett, P. C., Choi, W. J., Rogers, J. R. (1998): Microbial destruction of feldspars. *Mineralogical Magazine*, 62A: 149-150.

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

Bento, C. P. M., Goossens, D., Rezaei, M., Riksen, M., Mol, H. G. J., Ritsema, C. J., Geissen, V. (2017): Glyphosate and AMPA distribution in wind-eroded sediment derived from loess soil. *Environmental Pollution*, 220: 1079-1089.

Bergey, D., Holt, G. (2000): *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, U.S.A.

Bernabeu, P. R., García, S. S., López, A. C., Vio, S. A., Carrasco, N., Boiardi, J. L., Luna, M. F. (2018): Assessment of bacterial inoculant formulated with *Paraburkholderia tropica* to enhance wheat productivity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34: 1-10.

Berne, C., Ducret, A., Hardy, G. G., Brun, Y. V. (2015): Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by gram-negative bacteria. *Microbiology Spectrum*, 3: 10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015.

Bertin, C., Yang, X., Weston, L. A. (2003): The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil*, 256: 67-83.

Bewley, J. D., Black, M. (1994): *Seeds: physiology of development and germination*. 2nd Edition, Plenum Press, New York, pp. 445.

Bhalerao, R. P., Fischer, U. (2014): Auxin gradients across wood-instructive or incidental? *Plant Physiology*, 151: 43-51.

Bhardwaj, J., Anand, A., Nagarajan, S. (2012): Biochemical and biophysical changes associated with magnetopriming in germinating cucumber seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 67-73.

Bhattacharyya, P. N., Jha, D. K. (2012): Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4): 1327-1350.

Bidabadi, S. S., Mehralian, M. (2019): Seed bio-priming to improve germination, seedling growth, and essential oil yield of *Dracocephalum kotschyi* Boiss: an endangered medicinal plant in Iran. 8th National Congress on Medicinal Plants, 24 and 25 April 2019, At: Tehran. Affiliation: Shahid Beheshti University, pp. 308.

Biswas, B., Gresshoff, P. M. (2014): The role of symbiotic nitrogen fixation in sustainable production of biofuels. *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 7380-7397.

Bjelic, D., Marinković, B. J., Tintor, B. B., Tančić, L. J. S., Nastasić, M. A., Mrkovački, B. N. (2015): Screening of *Azotobacter* isolates for PGP properties and antifungal activity. *Journal of Natural Sciences Research*, 129: 65-72.

Bláha, L. (2019): Importance of root-shoot ratio for crops production. *Journal of Agronomy and Agricultural Science*, 2: 012.

Blom, D. C., Fabbri, E., Connor, F., Schiestl, D., Klausner, T., Boller, T., Eberl, L., Weiskopf, L. (2011b). Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environmental Microbiology*, 13: 3047-3058.

Blom, D., Fabbri, C., Eberl, L., Weiskopf, L. (2011a): Volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 1000-1008.

Boddupalli, A., Tiwari, R., Sharma, A., Singh, S., Prasanna, R., Nain, L. (2017): Elucidating the interactions and phytotoxicity of zinc oxide nanoparticles with agriculturally beneficial bacteria and selected crop plants. *Folia microbiologica*, 62: 253-262.

Boivin, S., Fonouni-Farde, C., Frugier, F. (2016): How auxin and cytokinin phytohormones modulate root microbe interactions. *Frontiers in Plant Science*, 7:1240.

Bolwerk, A., Lagopodi, A. L., Wijffjes, A. H., Lamers, G. E., Chin, A. W. T. F., Lugtenberg, B. J., Bloemberg, G. V. (2003): Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16: 983-993.

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

Bowsher, A. W., Mason, C. M., Goolsby, E. W., Donovan, L. A. (2016): Fine root tradeoffs between nitrogen concentration and xylem vessel traits preclude unified whole plant resource strategies in *Helianthus*. *Ecology and Evolution*, 6: 1016-1031.

Brakel, J., Hilger, F. (1965): Etude qualitative et quantitative de la synthese de substances de nature auxinique par *Azotobacter chroococcum* *in vitro*. *Bulletin de l'Institut Agronomique et des Stations de Recherches de Gembloux*, 33: 469-487.

Brill, W. J. (1980): Biochemical genetics of nitrogen fixation. *Microbiological Reviews*, 44(3): 449-467.

Brzezinska, M. S., Jankiewicz, U., Burkowska, A., Walczak, M. (2014): Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Current Microbiology*, 68: 71-81.

Bucio, J., Campos-Cuevas, J. C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L. I., Valencia-Cantero, E. (2007): *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root system architecture through an auxin and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbial Interactions*, 20: 207-217.

Budzikiewicz, H. (2010): Siderophores from bacteria and from fungi. In: Cornelis, P., Andrews, S. C. (Eds.), *Iron uptake and homeostasis in microorganisms*, Caister Academic Press, Norfolk, pp. 1-16.

Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Munch, P. C., Weiman, A., Droge, J., Pan, Y., McHardy, A. C., Schulze-Lefert, P. (2015): Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host Microbe*, 17(3): 392-403.

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren, van Themaat, E., Schulze-Lefert, P. (2013): Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64: 807-38.

Burdman, S., Okon, Y., Jurkevitch, E. (2000): Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Critical Review in Microbiology*, 26: 91-110.

Buyer, J. S., Roberts, D. P., Russek-Cohen, E. (2002): Soil and plant effects on microbial community structure. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 955-64.

Cakmak, I. (2008): Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification. *Plant and Soil*, 302: 1-17.

Cakmak, T., Dumlupinar, R., Erdal, S. (2010): Acceleration of germination and early growth of wheat and bean seedlings grown under various magnetic field and osmotic conditions. *Bioelectromagnetics*, 31: 120-9.

Callan, N. W., Mathre, D.E., Miller, J. B. (1990): Biopriming seed treatment for biological control of *Pythium ultimum* pre-emergence damping-off in sh2 sweet corn. *Plant Disease*, 74: 368-372.

Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Gracia, A. P., Blanco, D., Venturini, M. E. (2020): Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 166: 111208.

Camacho, M. M. C., Wijfjes, A. H. M., Mulders, I. H. M., Lugtenberg, B. (2002): Characterization of NADH dehydrogenases of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 and their role in competitive root colonization. *Molecular Plant-Microbe interactions*, 15: 662-71.

Canteros, B. I., Rybak, M., Gochez, A., Velazquez, P., Rivadeneira, M., Mitidieri, M., Garran, S., Zequeira, L. (2008): Occurrence of copper resistance in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrii* in Argentina. *Phytopathology*, 98: S30.

Cappuccino, J. G., Sherman, N. (2005): *Microbiology: a laboratory manual*. 6th Edition, Pearson Education, California City, pp. 477.

Carbonelli, M. V., Martinez, E., Amaya, J. M. (2009): Stimulation of germination in rice (*Oryza sativa* L) by a static magnetic field. *Electro and Magnetobiology*, 19: 21-128.

Cardarelli, M., Woo, S. L., Rouphael, Y., Colla, G. (2022): Seed treatments with microorganisms can have a biostimulant effect by influencing germination and seedling growth of crops. *Plants*, 11: 259.

Carrión, C., Vicente, J. E., Rodríguez, N. M., Erasun, E. C., Rubio, L. M. (2015): Kinetics of *nif* gene expression in a nitrogen-fixing bacterium. *Journal of Bacteriology*, 196: 595-603.

Castillo, J. M., Casas, J., Romero, E. (2011): Isolation of an endosulfan-degrading bacterium from a coffee farm soil: persistence and inhibitory effect on its biological functions. *Science of Total Environment*, 412-413: 20-27.

Catusse, J., Meinhard, J., Job, C., Strub, J. M., Fischer, U., Pestova, E., Westohoff, P., Van Dorselaer, A., Job, D. (2011): Proteomics reveals potential biomarkers of seed vigor in sugar beet. *Proteomics*, 11: 1569-1580.

Cazorla, F. M., Arrebola, E., Sesma, A., P´erez-García, A., Codina, J. C., Murillo, J., de Vicente, A. (2002): Copper resistance in *Pseudomonas syringae* strains isolated from mango is encoded mainly by plasmids. *Phytopathology*, 92: 909-916.

Chachalis, D., Reddy, N. K. (2000): Factors affecting *Campsis radicans* seed germination and seedling emergence. *Weed Science*, 48: 212-16.

Chakraborty, U., Roy, S., Chakraborty, A. P., Dey, P., Chakraborty, B. (2011): Plant growth promotion and amelioration of salinity stress in crop plants by a salt-tolerant bacterium. *Recent Research in Science and Technology*, 3: 61-70.

Chang, W. S., Mortel, V. M., Nielsen, L., Guzman G. N., Li, X., Halverson L. J. (2007): Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *Journal of Bacteriology*, 189: 8290-8299.

Chang, X. L., Dai, H., Wang, D. P., Zhou, H. H., He, W. Q., Fu, Y., Ibrahim, F., Zhou, Y., Gong, G., Shang, J., Yang, J., Wu, X., Yong, T., Song, C., Yang, W. (2018): Identification of *Fusarium* species associated with soybean root rot in Sichuan Province, China. *European Journal of Plant Pathology*, 151: 1-15.

Chanway, C. P., Anand, R., Yang, H. (2014): Nitrogen fixation outside and inside plant tissues. In: Ohshima, T. (Ed.), *Advances in biology and ecology of nitrogen fixation*. TechEpub, London, UK, pp. 1-19.

Chari, K. D., Reddy, R. S., Triveni, S., Trimurtulu, N., Rani, C. V., Sreedhar, M. (2018): Isolation and characterization of abiotic stress tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp. from different rhizospheric soils of Telangana. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 15: 485-94.

Chaudhry, M. Z., Naz, A. U., Nawaz, A., Mukhtar, H. (2016): Colonization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on two different root systems. *Pakistan Journal of Botany*, 48: 1691-1696.

Chaves-López, C., Serio, A., Gianotti, A., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarone, C., Paparella, A. (2015): Diversity of food-borne *Bacillus volatile* compounds and influence on fungal growth. *Journal of Applied Microbiology*, 119: 487-499.

Cheah, K. S. E., Osborne, D. J. (1978): DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed. *Nature*, 272: 593-99.

Chen, Y. L., Ning, W. A. N. G., Lei, S. H. I. (2023): Analysis of phosphorus efficiency and screening of P-efficient germplasm on natural population of oilseed rape (*Brassica napus*) at seedling stage. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 45: 56.

Chennappa, G., Naik, M. K., Adkar-Purushothama, C. R., Amaresh, Y. S., Sreenivasa, M. Y. (2016): PGP potential, abiotic stress tolerance and antifungal activity of *Azotobacter* strains isolated from paddy soils. Indian Journal of Experimental Biology, 54: 322-331.

Chennappa, G., Udaykumar, N., Vidya, M., Nagaraja, H., Amaresh, Y., Sreenivasa, M. (2019): *Azotobacter*-a natural resource for bioremediation of toxic pesticides in soil ecosystems. In: Gupta, W. (Ed.), New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering, Elsevier B.V., pp. 267-279.

Cherif-Silini, H., Silini, A., Yahiaoui, B. et al. Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. Annals of Microbiology, 66: 1087-1097.

Chi, F., Shen, S. H., Cheng, H. P., Jing, Y. X., Yanni, Y. G., Dazzo, F. B. (2005). Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. Applied and environmental microbiology, 71: 7271-7278.

Chincholkar, S. B., Chaudhari, B. L., Rane, M. R., Sarode, P. D. (2007): Fungal phytopathogen suppression using siderophoregenic bio-inoculants. In: Chincholkar, S. B., Mukerji, K. G. (Eds.), Biological control of plant diseases: current concepts, Haworth, USA, pp. 401-417.

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(3): 295-308.

Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J. K. (2005): Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Science, 45: 437-448.

Chitara, M. K., Chetan Keswani, C. K., Kartikay Bisen, K. B., Vivek Singh, V. S., Singh, S. P., Sarma, B. K., Singh, H. B. (2017): Improving crop performance under heat stress using thermotolerant agriculturally important microorganisms. In: Singh, H. B., Sarma, B.K., Keswani, C. (Eds.), Advances in PGPR research, CABI, Wallingford, UK, pp. 296-305.

Cho, S. M., Kang, B. R., Han, S. H., Anderson, A. J., Park, J. Y., Lee, Y. H., Cho, B. H., Yang, K. Y., Ryu, C. M., Kim, Y. C. (2008): 2R, 3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 21: 1067-1075.

Chowdhury, S. R., Manna, S., Saha, P., Basak, R. K., Sen, R., Roy, D., Adhikari, B. (2011): Composition analysis and material characterization of an emulsifying extracellular polysaccharide (EPS) produced by *Bacillus megaterium* RB-05: a hydrodynamic sediment-attached isolate of freshwater origin. Journal of Applied Microbiology, 111: 1381-1393.

- Chung, E. J., Park, J. H., Park, T. S., Ahn, J. W., Chung, Y. R. (2010): Production of a phytotoxic compound, 3-phenylpropionic acid by a bacterial endophyte, *Arthrobacter humicola* YC6002 isolated from the root of *Zoysia japonica*. *Plant Pathology Journal*, 26: 245-252.
- Ciccillo, F., Fiore, A., Bevivino, A., Dalmastri, C., Tabacchioni, S., Chiarini, L. (2002): Effects of two different application methods of *Burkholderia ambifaria* MCI 7 on plant growth and rhizospheric bacterial diversity. *Environmental Microbiology*, 4: 238-245.
- Cook, R., Baker, K. (1983): The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, St Paul, MN, USA, pp. 539.
- Comas, L. H., Bouma, T. J., Eissenstat, D. M. (2002): Linking root traits to potential growth rate in six temperate tree species. *Oecologia*, 132(1): 34-43.
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Ait Barka E. (2005): Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1685-1693.
- Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A., (2010): Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 669-678.
- Contesini, F. J., Melo, R. R. D., Sato, H. H. (2018): an overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38: 321-334.
- Contesto, C., Desbrosses, G., Lefoulon, C., Bena, G., Borel, F., Galland, M., Gamet, L., Varoquaux, F., Touarine, B. (2008): Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on *Arabidopsis* indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Science*, 175: 178-189.
- Cooper, J., Scherer, H. (2012): Nitrogen fixation. In: Marchner, P. (Ed.), *Mineral nutrition of higher plants*, 3rd Edition, Academic Press, London, pp. 389-408.
- Corbineau, F., Xia, Q., Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H. (2014): Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy, *Frontiers in Plant Science*, 5: 539.
- Cornelis, P. (2010). Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 1637-1645.
- Corral, D. A. P., Paz, J. D. J. O., Orozco, G. I. O., Muñiz, C. H. A., Marina, M. Á. S., Cisneros, M. F. R., Velasco, C. R. (2020): Antagonistic effect of volatile and non-volatile compounds from *Streptomyces* strains on cultures of several phytopathogenic fungi. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 32: 879-889.
- Courtilot, V., Gallet, Y., Le Mouél, J. L., Fluteau, F., Genevey, A. (2007): Are there connections between the Earth's magnetic field and climate?. *Earth and Planetary Science Letters*, 253: 328-339.

- Crowley, D. E., Reid, C. P., Szaniszlo, P. J. (1988): Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant Physiology*, 87: 680-685.
- Cueva-Yesquén, L. G., Goulart, M.C., Angelis, de, A. D., Nopper, A. M., Fantinatti-Garboggini, F. (2020): Multiple plant growth-promotion traits in endophytic bacteria retrieved in the vegetative stage from Passionflower. *Frontiers in Plant Science*, 11: 621740.
- Dahmani, M. A., Desrut, A., Moumen, B., Verdon, J., Mermouri, L., Kacem, M., 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 Science*, 11: 124.
- Dandoy, E., Schyns, R., Deltour, L., Verly, W. G. (1987): Appearance and repair of apurinic/aprimidinic sites in DNA during early germination. *Mutation Research*, 181: 57-60.
- Dar, S. A., Bhat, R. A., Dervash, M. A., Dar, Z. A., Dar, G. H. (2021): *Azotobacter* as biofertilizer for sustainable soil and plant health under saline environmental conditions. In: Hakeem, K. R., Dar, G. H., Mehmood, M. A., Bhat, R. A. (Eds.), *Microbiota and biofertilizers*, Springer Cham, pp. 231-254.
- Das, H. J. (2019): *Azotobacters* as biofertilizer. In: Geoffrey Michael Gadd, G. M., Sariaslani, S. Datta, R., Kelkar, A., Baraniya, D., Molaei, A., Moulick, A., Meena, R., S., Formanek, P. (2017): Enzymatic degradation of lignin in soil: A review. *Sustainability*, 9: 1163.
- Datta, R., Kelkar, A., Baraniya, D., Molaei, A., Moulick, A., Meena, R., S., Formanek, P. (2017): Enzymatic degradation of lignin in soil: A review. *Sustainability*, 9: 1163.
- Dave, A., Vaistij, F. E., Gilday, A. D., Penfield, S. D., Graham, I. A. (2016).: Regulation of *Arabidopsis thaliana* seed dormancy and germination by 12-oxo-phytodienoic acid. *Journal of Experimental Botany*, 67: 2277-2284.
- 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: 441-452.
- De Micco, V., Paradiso, R., Aronne, G., De Pascale, S., Quarto, M., Arena, C. (2014): Leaf anatomy and photochemical behaviour of *Solanum lycopersicum* L. plants from seeds irradiated with low LET ionising radiation. *Scientific World Journal*, 2014: 428141.
- Delseny, M., Bies-Etheve, N., Carles, C., Hull, G., Vicent, C., Raynal, M. (2016): Late embryogenesis abundant (LEA) protein gene regulation during *Arabidopsis* seed maturation. *Journal of Plant Physiology*, 158: 419-27.
- Delshadi, S., Ebrahimi, M., Shirmohammadi, E. (2017): Influence of plant growth-promoting bacteria on germination, growth and nutrient uptake of *Onobrychis sativa* L., under drought stress. *Journal of Plant Interactions*, 12: 200-208.
- Den, N. Z. U., Bukhari, S. A., Iftikhar, T., Mustafa, G. (2021): Biochemical and phenolic acid profiling of sunflower hybrid varieties' seeds treated with different bio-priming agents. *Pakistan Journal of Botany*, 53: 981-989.

- Derek, B.J., M. Black. (1994): Seeds, physiology of development and germination. 2nd Edition, Springer Science and Business Media, New York, pp. 1-33.
- Deshmukh, A. J., Jaiman, R. S., Bambharolia, R. P., Patil, V. A. (2020): Seed biopriming-a review. *International Journal of Economic Plants*, 7: 038-043.
- Devika, O. S., Singh, S., Sarkar, D., Barnwal, P., Suman, J., Rakshit, A. (2021). Seed priming: a potential supplement in integrated resource management under fragile intensive ecosystems. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5: 654001.
- Dolatabadian, A. (2020): Plant-Microbe Interaction. *Biology (Basel)*, 10: 15.
- Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y. Q., Feng, J. X., Tang, J. L. (2003): Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *National Academy of Sciences of the USA*, 100: 10995-11000.
- Dubois, M., Van, der, Broeck, L., Inzé, D. (2018): The pivotal role of ethylene in plant growth. *Trends in Plant Science*, 23: 311-323.
- Dugardeyn, J., Vandebussche, F., Van, der, Straeten, D. (2008): To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by in silico gene expression analysis? *Journal of Experimental Botany*, 59: 1-16.
- Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., Jačević, V. (2021): The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. *Frontiers in Plant Science*, 11: 552969.
- Dunne, C., Delany, I., Fenton, A., O’Gara, F. (1996): Mechanisms involved in biocontrol by microbial inoculants. *Agronomie*, 16: 721-729.
- Dutta, P. (2018): Seed priming: New vistas and vemporary perspectives. In: Rakshit, A., Singh, H. (Eds.), *Advances in seed priming*, Springer, Singapore, pp. 3-22.
- Dutta, S., Rani, T. S., Podile, A. R. (2013): Root exudate-induced alterations in *Bacillus cereus* cell wall contribute to root colonization and plant growth promotion. *PloS ONE*, 8: e78369.
- Dworkin, M., Foster, J. W. (1958): Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology*, 75: 592-603.
- EC, European Agency for Safety and health at work (2009): Regulation (Ec) No 1107/2009 of The European Parliament and of The Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. *Office Journal of European Union Legislation*, 309, (1) (2009).
- Eevers, N., Gielen, M., Sánchez-López, A., Jaspers, S., White, J. C., Vangronsveld, J., Weyens, N. (2015): Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media. *Microbial Biotechnology*, 8:707-15.

- Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R., Piechulla, B. (2012): Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of Chemical Ecology*, 38: 665-703.
- El-Afry, M. M. (2012): Anatomical studies on drought-stressed wheat plants (*Triticum aestivum* L.) treated with some bacterial strains. *Acta Biologica Szegediensis*, 56: 165-174.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Suzuki, H., Sato, T., Sato, Y. I., Morisaki, H., Mitsui, H., Minamisawa, K. (2000): Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 46: 617-629.
- El-Esawi, M. A., Alaraidh, I. A., Alsahli, A. A., Alzahrani, S. M., Ali, H. M., Alayafi, A. A., Ahmat, M. (2018): *Serratia liquefaciens* KM4 improves salt stress tolerance in maize by regulating redox potential, ion homeostasis, leaf gas exchange and stress-related gene expression. *International Journal of Molecular Science*, 19: 3310.
- El-Keblawy, A., Gariola, S., Elsheikh, E. A. E., Hussain, M. I., Abhilash, P. C. (2018): Variability in seed germination behavior of six grasses under laboratory and natural field conditions: implications for restoration of degraded lands in subtropical arid deserts. *Tropical Ecology*, 59: 715-726.
- Ells, J. E. (1963): The influence of treating tomato seed with nutrient solutions on emergence rate and seedling growth. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 83: 684-687.
- El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Soliman, S. M., Salem, H. M., Desoky, E. S. M., Babalghith, A. O., AbuQamar, S. F. (2022): Role of nanoparticles in enhancing crop tolerance to abiotic stress: A comprehensive review. *Frontiers in Plant Science*, 13: 946717.
- El-Shanshoury, A. R., Hassan, M. A., Abdal, Gaffar, B. A. (1989): Synergistic effect of VAM and *Azotobacter chroococcum* on the growth and the nutrient contents of tomato plants. *Phyton*, 29: 203-212.
- El-Maarouf-Bouteau, H., Bailly, C. (2008): Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling and Behavior*, 3: 175-182.
- El-Nahrawy, S., Yassin, M. (2020): Response of different cultivars of wheat plants (*Triticum aestivum* L) to inoculation by *Azotobacter* sp. under salinity stress conditions. *Advances in Microbiology*, 20: 59-79.
- Enebe, M. C., Babalola, O. O. (2018): The influence of plant growth-promoting rhizobacteria in plant tolerance to abiotic stress: a survival strategy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102: 7821-7835.
- Etesami, H., Mirseyed Hosseini, H., Alikhani, H. A. (2014): Bacterial biosynthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, a useful trait to elongation and endophytic colonization of the roots of rice under constant flooded conditions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20: 425-434.

EU, Directive 2009/128/Ec of The European Parliament and of The Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. Office Journal of European Union Legislation, 309, (71) (2009).

Eurostat, Statistical office of the European Union (EU). Mineral fertiliser consumption remained high in 2020. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/ddn-20220628-1>.

Evenari, M. (1949): Germination inhibitors. *Botanical Review*, 15: 153-194.

Fang, D., Liu, X., Chen, X., Yan, W., He, Y., Cheng, Yi., Chen, J., Li, Z., Guo, L., Wang, T., Jianping, X., Gao, C. (2020): *Fusarium* species and *Fusarium oxysporum* species complex genotypes associated with yam wilt in South-Central China. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1964.

Faniyi O. T., Oyatokun, S. O (2021): Fermentation in the perspective of agriculture. In: Laranjo, M. (Ed.), *Fermentation-processes, benefits and risks*. IntechOpen, London, UK, pp.1-12.

FAO (2019): Report of the conference of FAO. 41st Session. Rome, 22-29. <http://www.fao.org/3/na421en/na421en.pdf>

FAO (2020): *World Food and Agriculture-Statistical yearbook 2020*. Rome, Italy. ISBN(e-book): 978-92-5-133394-5. <https://doi.org/10.4060/cb1329en>.

Farag, M. A., Ryu, C. M., Sumner, L. W., Paré, P. W. (2006): GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry*, 67: 2262-2268.

Fasciglione, G., Casanovas, E. M., Quillehauquy, V., Yommi, A. K., Goñi, M. G., Roura, S. I., Barassi, C. A. (2015): *Azospirillum* inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. *Scientia Horticulturae*, 195: 154-162.

Fasim, F., Ahmed, N., Parsons, R., Gadd, G. M. (2002): Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. *FEMS Microbiology Letters*, 213: 1-6.

Fernández, E., Pozueta-Romero, J. (2016): Volatile compounds emitted by diverse phytopathogenic microorganisms promote plant growth and flowering through cytokinin action. *Plant, Cell and Environment*, 39: 2592-2608.

Fernández, L. (2021): Global pesticide use by country. Statista. <https://www.statista.com/statistics/1263069/global-pesticide-use-by-country/>

Fernández-González, A. J., Villadas, P. J., Gómez-Lama Cabanás, C., Valverde-Corredor, A., Belaj, A., Mercado-Blanco, J., Fernández-López, M. (2019): Defining the root endosphere and rhizosphere microbiomes from the world olive germplasm collection. *Scientific reports*, 9: 20423.

Ferreira, C. M. H., Vilas-Boas, Â., Sousa, C. A., Soares, H. M. V. M., Soares, E. V. (2019): Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. *AMB Express*, 9: 78.

- Fialho, M. B., Moraes, M. H. T., Annelise, R., Pascholati, S. F. (2011): Potential of antimicrobial volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46: 137-142.
- Figueiredo, M. D. V. B., Bonifacio, A., Rodrigues, A. C., de Araujo, F. F. (2016): Plant growth-promoting rhizobacteria: key mechanisms of action. In: Choudhary, D., Varma, A. (Eds.), *Microbial-mediated induced systemic resistance in plants*, Springer, Singapore, pp. 23-37.
- Filho, M. J. (2015): Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Scientia Agricola*, 72: 363-374.
- Fincheira, P., Parada, M., Quiroz, A. (2017a): Volatile organic compounds stimulate plant growing and seed germination of *Lactuca sativa*. *Journal of soil science and plant nutrition*, 17: 853-867.
- Fincheira, P., Parra, L., Mutis, A., Parada, M., Quiroz, A. (2017b): Volatiles emitted by *Bacillus* sp. BCT9 act as growth modulating agents on *Lactuca sativa* seedlings. *Microbiological research*, 203: 47-56.
- Fincheira, P., Quiroz, A. (2018): Microbial volatiles as plant growth inducers. *Microbiological Research*, 208: 63-75.
- Fink, J. R., Inda, A. V., Tiecher, T., Barrón, V. (2016): Iron oxides and organic matter on soil phosphorus availability. *Ciência E Agrotecnologia*, 40: 369-379.
- Flórez, M., Carbonell, M. V., Martínez, E. (2004): Early sprouting and first stages of growth of rice seeds exposed to a magnetic field. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 23: 167-76.
- Forlani, G., Mantelli, M., Nielsen, E. (1999): Biochemical evidence for multiple acetoin-forming enzymes in cultured plant cells. *Phytochemistry*, 50: 255-262.
- Foyer, C. H., and Shigeoka, S. (2011): Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155: 93-100.
- Fuerst, E. P., James, M. S., Pollard, A. T., Okubara, P. A. (2018): Defense enzyme responses in dormant wild oat and wheat caryopses challenged with a seed decay pathogen. *Frontiers in Plant Science*, 8: 2259.
- Galindo, F. S., Humberto, P., P., Carlos, F. G., Lima, R., W., Marcandalli, B., E., H., Arshad, J., Oliveira, C., E., G., Lima B. H., Lavres J., Teixeira F. M. C., M: (2022): Improving sustainable field-grown wheat production with *Azospirillum brasilense* under tropical conditions: a potential tool for improving nitrogen management. *Frontiers in Environmental Science*, 10: 821628.
- Gallart, M., Adair, K. L., Love, J., Meason, D. F., Clinton, P. W., Xue, J., Turnbull, M. H. (2018): Host genotype and nitrogen form shape the root microbiome of *Pinus radiata*. *Microbial Ecology*, 75: 419-433.
- Gamalero, E., Glick, B. R. (2015): Bacterial modulation of plant ethylene levels. *Plant Physiology*, 169: 13-22.

- Gamalero, E., Lingua, G., Capr, F. G. et al (2004): Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. *FEMS Microbiology Ecology*, 48: 79-87.
- Gandhi, H. P., Ray, R. M., Patel, R. M. (1997): Exopolymer production by *Bacillus* species. *Carbohydrate polymers*, 34: 323-327.
- Gandhi, A., Muralidharan, G. (2016): Assessment of zinc solubilizing potentiality of *Acinetobacter* sp. isolated from rice rhizosphere. *European Journal of Soil Biology*, 76: 1-8.
- Gao, Y. P., Bonham-Smith, P. C., Gusta, L. V. (2002): The role of peroxiredoxin antioxidant and calmodulin in ABA-primed seeds of *Brassica napus* exposed to abiotic stresses during germination. *Journal of Plant Physiology*, 159: 951-958.
- García, J. A., Probanza, A., Ramos, B. G., Palomino, M. R., Mañero, F. J. (2004): Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomie*, 24: 169-176.
- García-Gutiérrez, L., Zerriouh, H., Romero, D., Cubero, J., Vicente, de, A., Pérez-Gracia, A. (2013): The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate and salicylic acid-dependent defence responses. *Microbial Biotechnology*, 6: 264-74.
- Gauri, S. S., Mandal, S. M., Pati, B. R. (2012): Impact of *Azotobacter* exopolysaccharides on sustainable agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95: 331-338.
- George, M. A., Urumbil, S. K., Anilkumar, M. (2020): Isolation, Identification and characterisation of endophytic bacteria in *Biophytum sensitivum* (L.) DC. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14: 647.
- Ghazy, N., El-Nahrawy, S. (2021): Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. *Archives in Microbiology*, 203: 1195-1209.
- Gholami, A., Shahsavani, S., Nezarat, S. (2009). The effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 3: 1-4.
- Gibson, T., Gordon, R. E. (1974): Endosporeforming rods and cocci. In: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 529-574.
- Glick, B. R., Liu, C., Ghosh, S., Dumbroff, E. B. (1997): The effect of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 on the development of canola seedlings subjected to various stresses. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 1233-1239.
- Glick, B. R., Penrose, D. M., Li, J. (1998): A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190: 638.

Glick, B. R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., McConkey, B. (2007): Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 26: 227-242.

Gnanaprakasam, P. D., Vanisree, A. J. (2020): Recurring detrimental impact of agrochemicals on the ecosystem, and a glimpse of organic farming as a possible rescue. *Environmental Science and Pollution Research*, 29: 75103-75112.

Godwin J, Raviv B, Grafi G. (2017): Dead pericarps of dry fruits function as long-term storage for active hydrolytic enzymes and other substances that affect germination and microbial growth. *Plants (Basel)*, 6: 64.

Gomaa, M., Yousef, N. (2020): Optimization of production and intrinsic viscosity of an exopolysaccharide from a high yielding *Virgibacillus salarius* BM02: Study of its potential antioxidant, emulsifying properties and application in the mixotrophic cultivation of *Spirulina platensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149: 552-561.

Gond, S. K., Bergen, M. S., Torres, M. S., White, J. F. Jr. (2015): Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological Research*, 172: 79-87.

Goodman, R., Blank, M. (2002): Insights into electromagnetic interaction mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, 192:16-22.

Gordon, W. S., Jackson, R. B. (2000): Nutrient concentrations in fine roots. *Ecology*, 81: 275-280.

Goswami M, Deka S. (2020): Isolation of a novel rhizobacteria having multiple plant growth promoting traits and antifungal activity against certain phytopathogens. *Microbiol Research*, 240: 12651.

Goswami, G., Panda, D., Samanta, R., Chandra, R. B., Kumar, M. M., Kama, M. B., Barooah, M. (2018): *Bacillus megaterium* adapts to acid stress condition through a network of genes: insight from a genome-wide transcriptome analysis. *Scientific Reports*, 8: 16105.

Gouda, S., Kerry, R. K., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., Patra, J. K. (2018): Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206: 131-140.

Gowthamy, U., Selvaraju, P., Hemalatha, G. (2017): Standardization of seed biopriming with liquid biofertilizers on snake gourd (*Trichosanthes cucumerina*). *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 6: 2513-2524.

Gozzo, F. (2003): Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4487-4503.

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

Grover, M., Bodhankar, S., Sharma, A., Sharma, P., Singh, J., Nain, L. (2021): PGPR mediated alterations in root traits: Way toward sustainable crop production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4: 618230.

Guevara-Avenidaño, E., Bejarano-Bolívar, A. A., Kiel-Martínez, A. L., Ramírez-Vázquez, M., Méndez-Bravo, A., von Wobeser, E. A., Reverchon, F. (2019). Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. associated with Kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiological research*, 219: 74-83.

Guevara-Avenidaño, E., Bravo-Castillo, K. R., Monribot-Villanueva, J. L., Kiel-Martínez, A. L., Ramírez-Vázquez, M., Guerrero-Analco, J. A., Reverchon, F. (2020): Diffusible and volatile organic compounds produced by avocado rhizobacteria exhibit antifungal effects against *Fusarium kuroshium*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51: 861-873.

Gull, A., Lone, A. A., Wani, N. U. I. (2019): Biotic and abiotic stresses in plants. In: de Oliveira, A. B., (Ed.), *Abiotic and biotic stress in plants*, IntechOpen Science, London, pp. 1-7.

Guo, G., Liu, X., Sun, F., Cao, J., Huo, N., Wuda, B., Xin, M., Hu, Z., Du, J., Xia, R., Rossi, V., Peng, H., Ni, Z., Sun, Q., Yao, Y. (2018): Wheat miR9678 affects seed germination by generating phased siRNAs and modulating abscisic acid/gibberellin signaling. *Plant Cell*, 30: 796-814.

Gupta, A., Rai, S., Bano, A., Sharma, S., Kumar, M., Binsuwaidan, R., Suhail, Khan, M., Upadhyay, T. K., Alshammari, N., Saeed, M., Pathak, N. (2022): ACC deaminase produced by PGPR mitigates the adverse effect of osmotic and salinity stresses in *Pisum sativum* through modulating the antioxidants activities. *Plants*, 11: 3419.

Gupta, G., Snehi, S. K., Singh, V. (2017): Role of PGPR in biofilm formations and its importance in plant health. In: Ahmad, I., Husain, F. M. (Eds.), *Biofilms in plant and soil health*, John Wiley & Sons, NY, pp. 27-42.

Gupta, S., Pandey, S. (2019): ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in french bean (*Phaseolus vulgaris*) *Plants*. *Frontiers in Microbiology*, 10:1506.

Gurikar, C., Naik, M. K., Sreenivasa, M. Y. (2016): *Azotobacter*: PGPR activities with special reference to effect of pesticides and biodegradation. *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity: Research Perspectives*, 1: 229-244.

Gururani, M. A., Upadhyaya, C. P., Baskar, V., Venkatesh, J., Nookaraju, A., Park, S. W. (2013): Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32: 245-258.

Gutiérrez-Luna, F., López-Bucio, J., Altamirano-Hernandez, J., Valenci Cantero, E., Reyez, H., Macías-Rodríguez, L. (2010): Plant growth- promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis*. 51: 75-83.

- Gutzeit, H. O. (2001): Biological effects of ELF-EMF enhanced stress response: New insights and new questions. *Electro and Magnetobiology*, 208: 15-26.
- Gyaneshwar, P., Naresh, K. G., Parekh, L. J., Poole, P. S. (2002): Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, 245: 83-93.
- Gyaneshwar, P., James, E. K., Mathan, N., Reddy, P. M., Reinhold-Hurek, B., Ladha, J. K. (2001): Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 183: 2634-45.
- Haas, D., Defago, G. (2005): Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. *Nature Reviews. Microbiology*, 3: 307-319.
- Hadas, R., Okon, Y. (1987): Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biology and Fertility of Soils*, 5: 241-247.
- Haichar, F. Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., Heulin, T., Achouak, W. (2008): Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME Journal*, 2: 1221-1230.
- Hallmann, J., Berg, G. (2006): Spectrum and population dynamics of bacteria root endophytes. In: Schulz, B. J. C., Boyle, C. J. C., Sieber, T. N. (Eds.), *Microbial root endophytes*, Springer, Berlin, pp. 15-31.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., Kloepper, J. W. (1997): Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 895-914.
- Hamayun, M., Khan, S. A., Khan, A. L., Tang, D. S., Hussain, J., Ahmad, B., Anwar, Y., Lee, I. J. (2010): Growth promotion of cucumber by pure cultures of gibberellin-producing *Phoma* sp. GAH7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26: 889-894.
- Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. (1996): Resistance gene-dependent plant defense responses. *PlantCell*, 8: 1773-1791.
- Han, C., Yang, P. (2015): Studies on the molecular mechanisms of seed germination. *Proteomics*, 15: 1671-1679.
- Hannan, A., Najmol Hoque, Md., Hassan, L., Hasan Khan Robin, A. (2021): Adaptive mechanisms of root system of rice for withstanding osmotic stress. In: Ansari, M. R. (Ed.), *Recent Advances in Rice Research*, IntechOpen, London, UK, pp.169-189.
- Hardoim, P. R., Overbeek, L. S., Elsas, J. D. (2008): Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16: 463-471.
- Haritwal, A., Mohan, D., Chaudhary, M., Modi, G. (2015): Study of magnetic field treatment on rhizosphere. *International Journal of Engineering Research and Technology*, 4. <http://dx.doi.org/10.17577/IJERTV4IS100062>.

- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004): *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews. Microbiology*, 2: 43-56.
- Harrison, M. J., Pacha, R. E., Morita, R. Y. (1972): Solubilization of inorganic phosphates by bacteria isolated from Klamatah lake sediment. *Limnology and Oceanography*, 17: 50-57.
- Hart, M. M., Antunes, P. M., Abbott, L. K. (2017): Unknown risks to soil biodiversity from commercial fungal inoculants. *Nature Ecology and Evolution*, 1: 115.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Nahar, K., Hossain, M. S., Mahmud, J. A., Hossen, M. S., Masud, A. A. C., Fujita, M. M. (2018): Potassium: A vital regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses. *Agronomy*, 8: 31.
- Hasanuzzaman, M., Raihan, M.R., Nowroz, F., Fujita, M. (2022): Insight into the mechanism of salt-induced oxidative stress tolerance in soybean by the application of *Bacillus subtilis*: coordinated actions of osmoregulation, ion homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification. *Antioxidants*, 11.
- Hassan, M. K., McNroy, J. A., Kloepper, J. W. (2019): The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: A Review. *Agriculture*, 9: 142.
- Hawes, C., Iannetta P. P.M., Squire, G. R. (2021): Agroecological practices for whole-system sustainability. *CAB Reviews*, 16:1-19.
- He, Y., Wu, Z., Tu, L., Han, Y., Zhang, G., Li, C. (2015): Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate. *Applied Clay Science*, 109-110: 68-75.
- Hegazi, M. A., Metwaly, M. M. S., Belal, E. B. (2015): Influence of plant growth promoting bacteria (PGPR) on coriander (*Coriandrum sativum*) and dill (*Anethum graveolens* L) plants. *Journal of Plant Production*, 6: 205-218.
- Henning, K., Villforth, F. (1940): Experimentelle untersuchungen zur frage der bacteriesymbiose in hoheren pflanzen und ihre beeinflussung durch 'Leitemente'. *Biochemische Zeitschrift*, 305: 299-309.
- Hernandez-Aguilar, C., Dominguez-Pacheco, A., Cruz-Orea, A., Ivanov, R., Carballo-Carballo, A., Zepeda-Bautista, R., Galindo Soria, L. (2009): Laser irradiation effects on field performance of maize seed genotypes. *International Agrophysics*, 23: 327-332.
- Hiltner, L., Ihssen, G. (1911): Uber das schlechte aufaufen and die auswinterung des gefreides infolge befalls durch *Fusarium*. *Landwirtsch Fb. Bayern*, pp. 20-60.
- Hina, J., Akhtar, M. J., Asghar, H. N., Amer, J. (2018): Screening of zinc solubilizing bacteria and their potential to increase grain concentration in wheat (*Triticum aestivum*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 20: 547-553.

- Hindersah, R., Rahmadina I., Harryanto R., Suryatmana P., Arifin, M. (2021): *Bacillus* and *Azotobacter* counts in solid biofertilizer with different concentration of zeolite and liquid inoculant. IOP conference series: Earth and Environmental Science, 667: 012010.
- Hodge, A., Berta, G., Doussan, C., Merchan, F., Crespi, M. (2009): Plant root growth, architecture and function. *Plant and Soil*, 321: 153-187.
- Houben, M., Van, Poel, B. (2019): 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO): The enzyme that makes the plant hormone ethylene. *Frontiers in Plant Science*, 10: 695.
- 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*, 22: 205.
- Huang, Y. M., Wang, H. H., Chen, K. H. (2002): Application of seed priming treatments in spinach (*Spinacia oleracea* L.) production. *Chinese Society for Horticultural Science*, 48: 117-12.
- Huarte, H. R., Puglia, G. D., Prjibelski, A. D., Raccuia, S A. (2020): Seed transcriptome annotation reveals enhanced expression of genes related to ROS homeostasis and ethylene metabolism at alternating temperatures in wild cardoon. *Plants*, 9: 1225.
- Husen, E. (2003). Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 4: 27-31.
- Hussain, A., Arshad, M., Ahmad Zahir, Z. A., Asghar, M. (2015): Prospects of zinc solubilizing bacteria for enhancing growth of maize Pakistan *Journal of Agricultural Science*, 52: 915-922.
- Hussain, A., Zahir, Z. A., Asghar, H. N., Ahmad, M., Jamil, M., Naveed, M., Zaman Akhtar, M. F. U. (2018): Zinc solubilizing bacteria for zinc biofortification in cereals: a step toward sustainable nutritional security. In: Meena, V. (Ed.), *Role of rhizospheric microbes in soil*, Springer, Singapore, pp. 203-227.
- Hwang, H. H., Chien, P. R., Huang, F. C., Yeh, P. H., Hung, S. H. W., Deng, W. L., Huang, C. C. (2022): A plant endophytic bacterium *Priestia megaterium* strain BP-R2 isolated from the halophyte *Bolboschoenus planiculmis* enhances plant growth under salt and drought stresses. *Microorganisms*, 10: 2047.
- Immanen, J., Nieminen, K., Smolander, O. P., Kojima, M., Serra, J. A., Koskinen, P., Helariutta, Y. (2016): Cytokinin and auxin display distinct but interconnected distribution and signalling profiles to stimulate cambial activity. *Current Biology*, 26: 1990-1997.
- Inamdar, S., Ravi, W., Milind, W. (2000): Longevity of *Azotobacter* cysts and model for optimization of cyst density in liquid bioinoculants. *Current Science*, 78: 719-722.
- Ingram, L. O. N., Buttke, T. M. (1985). Effects of alcohols on micro-organisms. *Advances in microbial physiology*, 25: 253-300.

International Seed Testing Association (ISTA). (1985): International Rules for Seed Testing. Seed Science and Technology, 13: 307-520.

International Seed Testing Association (ISTA). (2014): Seed vigour testing. International rules for seed testing. <https://www.seedtest.org>.

Iqbal, M., Ahmad, I., Hussain, S. M., Kheral, R. A., Bokhari, T. H., Shehzad, M. A. (2013): Optimization of pre-sowing magnetic field doses through RSM in pea. International Agrophysics, 27: 265-274.

Iqbal, M., Haq, Z., Ahmad, M. (2012a): Effect of presowing magnetic treatment on properties of pea. International Agrophysics, 26: 25-31.

Iqbal, M., Muhamad, D., ul-Haq Z, Jamil, Y., Ahmad, M. R. (2012b): Effect of presowing magnetic field to garden pea (*Pisum sativum* L) seed on germination and seedling growth. Pakistan Journal of Botany, 44: 1851-1856.

Iqbal, N., Khan, N. A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., Khan, M. I. R. (2017): Ethylene role in plant growth, development, and senescence: interaction with other phytohormones. Frontiers in Plant Science, 8: 475.

Ivanchenko, M. G., Napsucially-Mendivil, S., Dubrovsky, J. G. (2010): Auxin-induced inhibition of lateral root initiation contributes to root system shaping in *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 64(5):740-52

Jackson, B. (1991): Ethylene in root growth and development. In: Mattoo, A. K., Suttle, J. C. (Eds.), The plant hormone, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 159-181.

Jafari, A. (2021): Assess effect of phosphorus biologic fertilizer to improve crop production under warm and dry climate condition. Journal of Crop Nutrition Science, 7: 56-67.

Jain, D., Sharma, J., Kaur, G., Bhojiya, A. A. (2021): Phenetic and molecular diversity of nitrogen fixating plant growth promoting *Azotobacter* isolated from semiarid regions of India. BioMed Research International, 2021: 6686283.

Jain, R., Saxena, J., Sharma, V. (2012): Effect of phosphate-solubilizing fungi *Aspergillus awamori* S29 on mungbean (*Vigna radiata* cv. RMG 492) growth. Folia Microbiologica, 57: 533-541.

Jalpathi, E., Lakshimi, S., Sujatha, K., Kalpan, K. (2021): Biopriming with *Bacillus subtilis* to improve physiological performance of brinjal (*Solanum melongena* L.) cv CO 2 Seeds. Research Journal of Agricultural Sciences, 9: 826-829.

James, A. A., Morrison, P. T., Kolodner, R. D. (1982): Genetic recombination of bacterial plasmids: analysis of the effect of recombinationdeficient mutations on plasmid recombination. Journal of Molecular Biology, 160: 411- 430.

Jaroszuk-Ściśeł, J., Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Majewska, M., Hanaka, A., Tyśkiewicz, K., Pawlik, A., Janusz, G. (2019): Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase *In Vitro*

synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20: 4923.

Jensen, D. F., Karlsson, M., Sarrocco, S., Vannacci, G. (2016): Biological control using microorganisms as an alternative to disease resistance. *Plant Pathogen Resistance Biotechnology*, 9: 341-363.

Jensen, D. F., Dubey, M., Jensen, B., Karlsson, M. (2021): *Clonostachys rosea* to control plant diseases. In: Köhl, J., Ravensberg, W. J. (Eds.), *Microbial bioprotectants for plant disease management*. Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge, UK, pp. 429-471.

Jett, L.W., Welbaum, G. E., Morse, R. D. (1996): Effects of matric and osmotic priming treatments on broccoli seed germination. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121: 423-429.

Ji, C., Wang, X., Song, X., Zhou, Q., Li, C., Chen, Z., Gao, Q., Li, H., Li, J., Zhang, P., Cao, H. (2021): Effect of *Bacillus velezensis* JC-K3 on endophytic bacterial and fungal diversity in wheat under salt Stress. *Frontiers in Microbiology*, 12: 802054.

Jia, Z., Von Wirén, N. (2020): Signaling pathways underlying nitrogen-dependent changes in root system architecture: from model to crop species. *Journal of Experimental Botany*, 71: 4393-4404.

Jiménez, B. M., Flores, A. S., Zapata, V. E., Campos, P. E., Bouquelet, Zenteno, S. E. (2003): Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and Soil*, 249: 271-277.

Jiménez, D. J., Montaña, J. S., Martínez, M. M. (2011): Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 846-858.

Jiménez-Arias, D., Carrillo-Perdomo, E., Gracia-Machado, F., Jorge, L., Borges, A. (2017): Priming crops to cope with stress: advances in seed-priming approach. In: Gorawala, P. and Mandhatri S. (Eds.), *Agricultural research updates*, Nova Science Publishers, New York, pp. 1-32.

Jisha, K. C., Vijayakumari, K., Puthur, J. T. (2013): Seed priming for abiotic stress tolerance: An overview. *Acta Physiologica Plantarum*, 35: 1381-1396.

Jnawali, A. D., Ojha, R. B., Marahatta, S. (2015): Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability-A review. *Advances in Plants and Agricultural Research*, 2: 1-5.

Johan, P. D., Ahmed, O. H., Omar, L., Hasbullah, N. A. (2021): Phosphorus transformation in soils following co-application of charcoal and wood ash. *Agronomy*, 11: 201.

Johnson, D. (1999): The insignificance of statistical significance testing. *Journal of Wildlife Management*, 63: 763-772.

Johnsson, C., Jin, X., Xue, W., Dubreuil, C., Lezhneva, L., Fischer, U. (2019): The plant hormone auxin directs timing of xylem development by inhibition of secondary cell wall deposition through repression of secondary wall NAC domain transcription factors. *Physiologia Plantarum*, 165: 673-689.

Johnston-Monje, D., Raizada M. N. (2011): Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS ONE* 6: e20396.

Jones, D. L., Hodge, A., Kuzyakov, Y. (2004): Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist*, 163: 459-480.

Jones, S. E., Lennon, J. T. (2010): Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 5881-5886.

Jovčić, B., Begovic, J., Lozo, J., Topisirovic, L., Kojic, M. (2009). Dynamic of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Archives of Biological Sciences*, 61: 159-165.

Jovičić-Petrović, J., Karličić, V., Petrović, I., Ćirković, S., Ristić-Djurović, J. L., Raičević, V. (2021): Biomagnetic priming-possible strategy to revitalize old mustard seeds. *Bioelectromagnetics*, 42: 238-249.

Jovičić-Petrović, J., Kljujev, I. (2014): *Praktikum iz mikrobiologije zemljišta sa radnim listovima*, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, ISBN(print): 978-86-7834-207-2.

Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., Pérez-Lebeña, E. (2021): The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Science*, 22: 4642.

Kachhap, S., Chaudhary, A. N. I. T. A., Singh, S. D. (2015): Response of plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) in relation to elevated temperature conditions in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Ecoscan*, 9: 771-778.

Kader, M. A. (2005): A comparison of seed germination calculation formulae and the associated interpretation of resulting data. *Journal and Proceeding of the Royal Society of New South Wales*, 138: 65-75.

Kader, M. A., Jutzi, S. C. (2002): Temperature, osmotic pressure and seed treatments influence imbibition rates in sorghum seeds. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 188: 286-290.

Kai, M., Crespo, E., Cristescu, S. M., Harren, F. J., Francke, W., Piechulla, B. (2010): *Serratia odorifera*: analysis of volatile emission and biological impact of volatile compounds on *Arabidopsis thaliana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88: 965-976.

Kaka, H., Opute, P. A., Maboeta, M. S. (2021): Potential impacts of climate change on the toxicity of pesticides towards earthworms. *Journal of Toxicology*, 2021: 8527991.

- Kalayu, G. (2019): Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019: 1-7.
- Kamilova, F., Validov, S., Azarova, T., Mulders, I., Lugtenberg, B. (2005): Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environmental Microbiology*, 7: 1809-1817.
- 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: 2583.
- Kandel, S. L., Joubert, P. M., Doty, S. L. (2017): Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms*, 5: 77.
- Kang, B. R., Han, S. H., Zdor, R. E., Anderson, A. J., Spencer, M., Yang, K. Y., Kim, Y. H., Lee, M. C., Cho, B. H., Kim, Y. C. (2007): Inhibition of seed germination and induction of systemic disease resistance by *Pseudomonas chlororaphis* O6 requires phenazine production regulated by the global regulator, *gacS*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 586-593.
- Kang, S. M., Radhakrishnan, R., You, Y. H., Joo, G. J., Lee, I. J., Lee, K. E., Kim, J. H. (2014a): Phosphate solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 regulates endogenous plant carbohydrates and amino acids contents to promote mustard plant growth. *Indian Journal of Microbiology*, 54: 427-33.
- Kang, S. M., Khan, A. L., You, Y. H., Kim, J. G., Kamran, M., Lee, I. J. (2014b): Gibberellin production by newly isolated strain *Leifsonia soli* SE134 and its potential to promote plant growth. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 106-112.
- Kang, S., Radhakrishnan, R., Lee, K., You, Y.H., Ko, J., Kim, J., Lee, I. (2015): Mechanism of plant growth promotion elicited by *Bacillus* sp. LKE15 in oriental melon. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil and Plant Science*, 65: 637-647.
- Karličić, V. (2017): Bakterije stimulatori biljnog rasta kao potencijal u ekoremedijaciji oštećenih zemljišta. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Karsen, C. M., Zagorski, S., Kepczynski, J., Groot, S. P. C. (1989): Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Annals of Botany*, 63: 71-80.
- Kashyap, B. K., Solanki, M. K., Pandey, A. K., Prabha, S., Kumar, P., Kumari, B. (2019): *Bacillus* as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A promising green agriculture technology. In: Ansari, R., Mahmood, I. (Eds.), *Plant health under biotic stress*, Springer, Singapore, pp. 219-236.
- Kataria, S., Baghel, L., Guruprasad K. N. (2017): Predtreatment of seed with static magnetic field improves germination and early growth characteristics under salt stress in maize and soybean. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10: 83-90.
- Katsenios, N., Bilalis, D., Aivalakis, E. G., Nikolopoulou, A. E., Karkanis, A., Travlos, I. (2016): Role of pulsed electromagnetic field on enzyme activity, germination, plant growth and yield of durum wheat. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6: 152-158.

- Kaya, M. D., Okçu, G., Atak, M., Cıkılı, Y., Kolsarıcı, Ö. (2006): Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European journal of agronomy*, 24: 291-295.
- Kaymak, H. Ç., Güvenç, İ., Yaralı, F., Dönmez, M. F. (2009): The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanus sativus* L.) seeds under saline conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 33: 173-179.
- Kennedy, I. R., Choudhury, A. T. M., Kecskés, M. L. (2004): Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1229-1244.
- Kerečki, S., Pećinar, I., Karličić, V., Mirković, N., Kljujev, I., Raičević, V., Jovičić-Petrović, J. (2022): *Azotobacter chroococcum* F8/2: a multitasking bacterial strain in sugar beet biopriming, *Journal of Plant Interactions*, 17: 719-730.
- Khalid, M., Hassani, D., Bilal, M., Asad, F., Huang, D. (2017): Influence of bio-fertilizer containing beneficial fungi and rhizospheric bacteria on health promoting compounds and antioxidant activity of *Spinacia oleracea* L. *Botanical Studies*, 58: 35.
- Khan, A. L., Halo, B. A., Elyassi, A., Ali, S., Al-Hosni, K., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Lee, I. J. (2016): Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21: 58-64.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., Wani, P. A. (2010): Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi-current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56: 73-98.
- Khan, N., Bano, A. M. D., Babar, A. (2020): Impacts of plant growth promoters and plant growth regulators on rainfed agriculture. *PLoS One*, 15: e0231426.
- Khan, N., Bano, A., Rahman, M. A., Guo, J., Kang, Z., Babar, M. (2019): Comparative physiological and metabolic analysis reveals a complex mechanism involved in drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) induced by PGPR and PGRs. *Science Reports*, 9: 2097.
- Khan, N., Kazmi, R. H., Willems, L. A., van Heusden, A. W., Ligterink, W., Hilhorst, H. W. (2012): Exploring the natural variation for seedling traits and their link with seed dimensions in tomato. *PLoS ONE*, 7: e43991-e43991.
- Khan, T., Malik, A., Alwarthan, A., Shaik, M. R. (2022): The enormity of the zinc deficiency problem and available solutions; an overview. *Arabian Journal of Chemistry*, 15: 103668.
- Khande, R., Sharma, S. K., Ramesh, A., Sharma, M. P. (2017): Zinc solubilizing *Bacillus* strains that modulate growth, yield, and zinc biofortification of soybean and wheat. *Rhizosphere*, 4: 126-138.
- Khatoon, H., Solanki, P., Narayan, M., Tewari, L., Rai, J., Hina Khatoon, C. (2017): Role of microbes in organic carbon decomposition and maintenance of soil ecosystem. *International Journal of Chemical Studies*, 5: 1648-1656.

Khosravi, A., Seyed Sharifi, R., Imani, A. (2014): Study of seed inoculation with *Azotobacter* and *Pseudomonas* and nitrogen application timing on yield, fertilizer use efficiency and grain filling rate of sunflower. *Journal of Crops Improvement*, 16: 139-155.

Kifle, M. H., Laing, M. D. (2016): Effects of selected diazotrophs on maize growth. *Frontiers in plant science*, 7: 1429.

Kljujev, I. (2012): Kontaminacija biljaka patogenim bakterijama iz vode za navodnjavanje. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Kloepper, J. W., Schroth, M. N. (1978): Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: *Proceedings of the fourth international conference on plant pathogenic bacteria*. Gilbert-Clarey, Tours, France, 2: 879-82.

Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M. N. (1980): Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286: 885-886.

Kloepper, J. W., Schroth, M. N. (1981): Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology*, 71: 1020-1024.

Knights, H. E., Jorin, B., Haskett, T. L., Poole, P. S. (2021): Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. *Environmental Microbiology Reports*, 13: 428-444.

Kordali, S., Cakir, A. D., Sutay, S. (2007): Inhibitory effects of monoterpenes on seed germination and seedling growth. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62: 207-214.

Kottb, M., Gigolashvili, T., Grosskinsky, D. K., Piechulla, B. (2015): *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*, 6: 995.

Kraemer, S. M. (2004): Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquatic Sciences*, 66: 3-18.

Krey, T., Vassilev, N., Baum, C., Eichler-Löbermann, B. (2013): Effects of long-term phosphorus application and plant-growth promoting rhizobacteria on maize phosphorus nutrition under field conditions. *European Journal of Soil Biology*, 55: 124-130.

Kudoyarova, G. R., Arkhipova, T. N., Melentev, A. I. (2015): Role of bacterial phytohormones in plant growth regulation and their development. In: Maheshwari, D. K. (Ed.), *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem*. Sustainable development and biodiversity, Springer Cham, Switzerland, pp. 69-86.

Kumar, A., Singh, S., Gaurav, A. K., Srivastava, S., Verma, J. P. (2020): Plant growth-promoting bacteria: biological tools for the mitigation of salinity stress in plants. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1216.

- Kumar, A., Kumari, M., Swarupa, P. (2019): Characterization of pH dependent growth response of agriculturally important microbes for development of plant growth promoting bacterial consortium. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13: 1053-1062.
- Kumar A, Maurya BR, Raghuwanshi R (2014): Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield, and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3: 121-128.
- Kumar, R., Bhatia, R., Kukreja, K., Behl, R. K., Dudeja, S. S., Narula, N. (2007): Establishment of *Azotobacter* on plant roots: chemotactic response, development and analysis of root exudates of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of basic microbiology*, 47: 436-439.
- Kumar, V., Kumar Behl, R., Narula, N. (2001): Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. *Microbiological Research*, 156: 87-93.
- Kumar, V., Narula, N. (1999): Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils*. 28: 301-305.
- Kumari, P., Meena, M.K., Gupta, P., Dubey, M.K., Nath, G., Upadhyay, R. (2018): Plant growth promoting rhizobacteria and their biopriming for growth promotion in mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16: 163-171.
- Kumari, S., Kant, R., Singh, U. (2017): *Azotobacter*: Its role in sustainable agriculture. *New Agriculturist*, 28: 485-492.
- Kurepa J, Smalle J. A. (2022): Auxin/cytokinin antagonistic control of the shoot/root growth ratio and its relevance for adaptation to drought and nutrient deficiency stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23:1933.
- Kurrey D. K., Sharma R. (2018): Effects of *Azotobacter* on seed germination of onion. *Allahabad Farmer*, 3.
- Lakshmanan, V., Shantharaj, D., Li, G., Seyfferth, A. L., Sherrier, D. J., Bais, H. P. (2015): A natural rice rhizospheric bacterium abates arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L). *Planta*, 242: 1037-1050.
- Lamichhane, J. R., SDachbrodt-Saaydeh, S., Kudsk, P., Messéan, A. (2016): Toward a reduced reliance on conventional pesticides in european agriculture. *Plant Disease*, 100: 10-24.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettiganm P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- Lastochkina O, Garshina D, Ivanov S, Yuldashev R, Khafizova R, Allagulova C, Fedorova K, Avalbaev A, Maslennikova D, Bosacchi M. (2020): Seed priming with endophytic *Bacillus*

subtilis modulates physiological responses of two different *Triticum aestivum* L. cultivars under drought stress. *Plants*, 9: 1810.

Latef, A. A. H., Abu Alhmad, M. F., Kordrostami, M., Abo-Baker, A. B. A. E., Zakir, A. (2020): Inoculation with *Azospirillum lipoferum* or *Azotobacter chroococcum* reinforces maize growth by improving physiological activities under saline conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39: 1293-1306.

Lazazzara, V., Perazzolli, M., Pertot, I., Biasioli, F., Puopolo, G., Cappellin, L. (2017): Growth media affect the volatilome and antimicrobial activity against *Phytophthora infestans* in four *Lysobacter* type strains. *Microbiological Research*, 201: 52-62.

Le, K. D., Yu, N. H., Park, A. R., Park, D. J., Kim, C. J., Kim, J. C. (2022): *Streptomyces* sp. AN090126 as a Biocontrol agent against bacterial and fungal plant diseases. *Microorganisms*, 10: 791.

Lemfack, M. C., Gohlke, B. O., Toguem, S. M. T., Preissner, S., Piechulla, B., Preissner, R. (2018): mVOC 2.0: a database of microbial volatiles, *Nucleic Acids Research*, 46: D1261-D1265.

Lenart, A. (2012): Occurrence, characteristics, and genetic diversity of *Azotobacter chroococcum* in various soils of Southern Poland. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21: 415-424.

Levy, A., Salas Gonzalez, I., Mittelviehhaus, M., Clingenpeel, S., Herrera Paredes, S., Miao, J., Wang, K., Devescovi, G., Stillman, K., Monteiro, F., Rangel Alvarez, B., Lundberg, D. S., Lu, T. Y., Lebeis, S., Jin, Z., McDonald, M., Klein, A. P., Feltcher, M. E., Rio, T. G., Grant, S. R., Doty, S. L., Ley, R. E., Zhao, B., Venturi, V. et al. (2018): Genomic features of bacterial adaptation to plants. *Nature Genetics*, 50: 138-150.

Li, Z., Chang, S., Lin, L., Li, Y., An, Q. (2011): A colorimetric assay of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) based on ninhydrin reaction for rapid screening of bacteria containing ACC deaminase. *Letters in Applied Microbiology*, 53: 178-185.

Li, H., Yue, H., Li, L., Liu, Y., Zhang, H., Wang, J., Jiang, X. (2021): Seed biostimulant *Bacillus* sp. MGW9 improves the salt tolerance of maize during seed germination. *AMB Express*, 11: 74

Li, Y. J., Hu, Q. P. (2020): Studying of the promotion mechanism of *Bacillus subtilis* QM3 on wheat seed germination based on β -amylase. *Open Life Sciences*, 15: 553-560.

Li, Z., Fan, Y. C., Gao, L., Cao, X., Ye, J. L., Li, G. H. (2016): The dual roles of zinc sulfate in mitigating peach gummosis. *Plant Disease*, 100: 345-351.

Liang H, Yu Y, Yang H, Xu L, Dong W, Du H, Cui W, Zhang H. (2014): Inheritance and QTL mapping of related root traits in soybean at the seedling stage. *Theoretical and Applied Genetics*, 127: 2127-2137.

Liu, Z., Zhao, M., Lu, Z., Zhang, H. (2022a): Seed traits research is on the rise: a bibliometric analysis from 1991-2020. *Plants (Basel)*, 11: 2006.

- Liu, H., Able, A. J., Able, J. A. (2022b): Priming crops for the future: rewiring stress memory. *Trends in Plant Science*, 27: 699-716.
- Liu, X., Quan, W., Bartels, D. (2022c): Stress memory responses and seed priming correlate with drought tolerance in plants: an overview. *Planta*, 255: 45.
- Liu, J., Zhang, J., Zhu, M.; Wan, H., Chen, Z., Yang, N., Duan, J., Wei, Z., Hu, T., Liu, F. (2022d): Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) strain *Bacillus licheniformis* with biochar amendment on potato growth and water use efficiency under reduced irrigation regime. *Agronomy*, 12: 1031.
- Liu, T., Long, X., Zhou, J. P., Tian, D. W., Yang, Y. H., Zou, C. G., Xu, J. P., Mo, M. H., Zhang, K. Q. (2021): Fungistatic mechanism of ammonia against nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*, and strategy for this fungus to survive ammonia. *mSystems*, 6: e0087921.
- Liu, Y., Lu, M., Zhang, X., Sun, Q., Liu, R., Lian, B. (2019): Shift of the microbial communities from exposed sandstone rocks to forest soils during pedogenesis. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 140: 21-28.
- Liu, Y., Patko, D., Engelhardt, I., George, T. S., Stanley-Wall, N. R., Ladmiral, V., Ameduri, B., Daniell, T. J., Holden, N., MacDonald, M. P., Dupuy, L. X. (2021): Plant-environment microscopy tracks interactions of *Bacillus subtilis* with plant roots across the entire rhizosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118: e2109176118.
- Loper, J. E., Buyer, J. S. (1991): Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4: 5-13.
- Lopes, M. J. S., Dias-Filho, M. B., Gurgel, E. S. C. (2021): Successful Plant Growth-Promoting Microbes: Inoculation methods and abiotic factors. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5: 606454.
- López, J. L., Alvarez, F., Príncipe, A., Salas, M. E., Lozano, M. J., Draghi, W. O., Lagares, A. (2018): Isolation, taxonomic analysis, and phenotypic characterization of bacterial endophytes present in alfalfa (*Medicago sativa*) seeds. *Journal of Biotechnology*, 267: 55-62.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J. C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L. I., Valencia-Cantero, E. (2007): *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 20: 207-17.
- Loubser, W. A., Van de Venter, H. A. (1990): The optimal germination substratum for tomato (*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karst, ex Farw.) seed testing. *South African Journal of Plant and Soil*, 7: 201-204.
- Lugtenberg, B. J. J., Dekkers, L., Bloemberg, G. V. (2001): Molecular determinants of rhizo-sphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 461-490.

Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrektson, A., Kunin, V., Del Rio, T. G., Edgar, R. C., Eickhorst, T., Ley, R. E., Hugenholtz, P., Tringe, S. G., Dangl, J. L. (2012): Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 488: 86-90.

Lurthy, T., Cantat, C., Jeudy, C., Declerck, P., Gallardo, K., Barraud, C., Leroy, F., Ourry, A., Lemanceau, P., Salon, C., Mazurier, S. (2020): Impact of bacterial siderophores on iron status and ionome in pea. *Frontiers in Plant Science*, 11: 730.

Lutts, S., Benincasa, P., Wojtyla, L., Kubala, S., Pace, R., Lechowska, K., Garnczarska, M. (2016): Seed priming: new comprehensive approaches for an old empirical technique. In: Araujo, S., Balestrazzi, A. (Eds.), *New challenges in seed biology - Basic and translational research driving seed technology*, pp. 1-47.

Lynch, J. M. (1995): Microbial activity in acid soils. In *plant-soil interactions at low pH: Principles and management: Proceedings of The Third International Symposium on Plant-Soil Interactions at low pH*, Brisbane, Queensland, Australia, 12-16 September 1993, Springer, Netherlands, pp. 167-172.

Maffei, M. E. (2014): Magnetic field effects on plant growth, development, and evolution. *Frontiers in Plant Science*, 5: 445.

Maheshwari, H. S., Smruthi Sagarika Mahapatra, S. S., Bharti A., Rajput, L. S., Agnihotri, R., Kumar, S. (2020a): Know your agriculturally important soil microorganisms: An overview. *AgriCos e-Newsletter*, 1: 20.

Maheshwari, R., Bhutani, N., Suneja, P. (2020b): Isolation and characterization of ACC deaminase producing endophytic *Bacillus mojavensis* PRN2 from *Pisum sativum*. *Iran Journal of Biotechnology*, 18: 11-20.

Mahmood, A., Kataoka, R. (2018): Potential of biopriming in enhancing crop production and stress tolerance. In: Rakshit, H. B. S. (Ed.), *Advances in seed priming*, Springer Nature, Singapore, pp. 127-145.

Mahmood, A., Turgay, O. C., Farooq, M., Hayat, R. (2016): Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review. *FEMS Microbiology Ecology*, 92: fiw112.

Maitra, S., Brestic, M., Bhadra, P., Shankar, T., Praharaj, S., Palai, J.B., Shah, M. M. R., Berek, V., Ondrisik, P., Skalický, M., Hossain, A. (2022): Bioinoculants-natural biological resources for sustainable plant production. *Microorganisms*, 11: 51.

Maksimov, I. V., Abizgildina, R. R., Pusenkova, L. I. (2011): Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47: 333-345.

Malamy, J. (2005): Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment*, 28: 67-77.

- Malick, A., Khodaei, N., Benkerroum, N., Karboune, S. (2017): Production of exopolysaccharides by selected *Bacillus* strains: optimization of media composition to maximize the yield and structural characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102: 539-549.
- Maliha, R., Samina, K., Najma, A., Sadia, A., Farooq, L. (2004): Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms under in vitro conditions. *Pakistan Journal of Biological Science*, 7: 187-196.
- Mangmang, J. S., Deaker, R., Rogers, G. (2015a): Germination characteristics of cucumber influenced by plant growth-promoting rhizobacteria. *International Journal of Vegetable Science*, 22: 66-75.
- Mangmang, J. S., Deaker, R., Rogers, G. (2015b): Optimal plant growth-promoting concentration of *Azospirillum brasilense* inoculated to cucumber, lettuce and tomato seeds varies between bacterial strains. *Israel Journal of Plant Sciences*, 62: 145-152.
- Mantelin, S., Desbrosses, G., Larcher, M., Tranbarger, T. J., Cleyet-Marel, J. C., and Touraine, B. (2006): Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* sp. *Planta*, 223: 591-603.
- Maqshoof, A., Azhar, H., Moazzam, J. (2020): Potential of exopolysaccharides producing-lead tolerant *Bacillus* strains for improving spinach growth under lead stress. *International Journal of Agriculture and Biology*, 24: 1845-1854.
- Mardanova, A. M., Hadieva, G. F., Lutfullin, M. T., Khilyas, I. V. E., Minnullina, L. F., Gilyazeva, A. G., Sharipova, M. R. (2016): *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi. *Agricultural Sciences*, 8: 1-20.
- Markets & Markets (2018). Market reports biological seed treatment market. Retrieved from <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biological-seed-treatment-market-16422288.html> Accessed in January 2019.
- Martínez, L. L., Martínez-Peniche, R. A., Hernández-Iturriaga, M., Arvizu-Mendrano, S. M., Pacheco-Aguilar, J. R. (2013): Characterization of rhizobacteria isolated from tomato and their effect on tomato and bell pepper growth. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36: 63-69.
- Martinkova, Z., Honek, A., Lukas, J. (2006): Seed age and storage conditions influence germination of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Weed Science*, 54: 298-304.
- Martiny, J. H. B., Jones, S. E., Lennon, J. T., Martiny, A. C. (2015): Microbiomes in light of traits: a phylogenetic perspective. *Science*, 350: aac9323.
- Maryenko, V. G. (1964): Dependence of maize yield and nitrogen balance on *Azotobacter chroococcum* in the conditions of mono bacterial cultivations. *Dokl ISHA* 99: 399-40.
- Massalha, H., Korenblum, E., Malitsky, S., Aharon, A. (2017): Live imaging of root-bacteria interactions in a microfluidics setup. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114: 4549-4554.

- Massalha, H., Korenblum, E., Shapiro, O. H., Aharoni, A. (2019): Tracking root interactions system (TRIS) experiment and quality control. *Bio-Protocol*, 9: e3211.
- Matos, A. D. M., Gomes, I. C. P., Nietsche, S., Xavier, A. A., Gomes, W. S., Santos D., Neto J. A., Pereira M. C. T. (2017): Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *Annals of The Brazilian Academy of Sciences*, 89: 2945-2954.
- Maughan, H., Auwera, G. (2011): *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*, 11: 789-797.
- Mavi, K., Demir, I., Matthews, S. (2010): Mean germination time estimates the relative emergence of seed lots of three cucurbit crops under stress conditions. *Seed Science and Technology*, 38: 14-25.
- May, A., Snoussi, S., Ben, Miloud, N., Maatouk, I., Abdelmelek H., Ben, Aïssa, R., Landoulsi, A. (2009): Effects of static magnetic field on cell growth, viability, and differential gene expression in *Salmonella*. *Foodborn Pathogens and Disease*, 5: 547-552.
- McDonald Jr, M. B., Copeland, L. O., Knapp, A. D., and Grabe, D. F. (1996): Seed development, germination and quality. *American Society of Agronomy*, 34: 15-70.
- McDonald, M. B. (1999): Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*, 27: 177-237.
- McDonald, M. B. (2000): Seed priming. In: Black, M., Bewley, J. D. (Eds.), *Seed technology and its biological basis*, Sheffield Academic Press, England, pp. 287-325.
- Meena, R. S., Kumar, S., Datta, R., Lal, R., Vijayakumar, V., Brtnicky, M., Sharma, M. P., Yadav, G. S., Jhariya, M. K., Jangir, C. K., Pathan, S. I., Dokulilova, T., Pecina, V., Marfo, T. D. (2020): Impact of agrochemicals on soil microbiota and management: A review. *Land*, 9: 34.
- Meena, S. K., Rakshit, A., Meena, V.S. (2016): Effect of seed bio-priming and N doses under varied soil type on nitrogen use efficiency (NUE) of wheat (*Triticum aestivum* L.) under greenhouse conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6: 68-75.
- Meena, V. S., Maurya, B. R., Bahadur, I. (2015): Potassium solubilization by bacterial strain in waste mica. *Bangladesh Journal of Botany*, 43: 235-237.
- Meena, V. S., Maurya, B. R., Verma, J. P. (2014): Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? *Microbiological Research*, 169: 337-347.
- Meldau, D. G., Meldau, S., Hoang, L. H., Underberg, S., Wunsche, H., Baldwin, I. T. (2013): Dimethyl disulfide produced by the naturally associated bacterium *Bacillus* sp B55 promotes *Nicotiana attenuata* growth by enhancing sulfur nutrition. *Plant Cell*, 25: 2731-2747.
- Mendis, H. C., Thomas, V. P., Schwientek, P., Salamzade, R., Chien, J. T., Waidyarathne, P., Kloeppe, J., De La Fuente, L. (2018): Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. *PLoS ONE*, 13: e0193119.

- Mia, M. A. B., Shamsuddin, Z. H., Mahmood, M. (2012): Effects of rhizobia and plant growth promoting bacteria inoculation on germination and seedling vigor of lowland rice. *African Journal of Biotechnology*, 11: 3758-3765.
- Miliute, I., Buzaitė, O., Baniulis, D., Stanys, V. (2015): Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review *Zemdirbyste-Agriculture*, 102: 465-478.
- Mimmo, T., Pii, Y., Valentinuzzi, F., Astolfi, S., Lehto, N., Robinson, B., Brunetto, G., Terzano, R., Cesco, S. (2018): Nutrient availability in the rhizosphere: a review. *Acta Horticulturae*, 1217: 13-28.
- Minut, M., Diaconu, M., Rosca, M., Cozma, P., Bulgariu, L., Gavrilăscu, M. (2023): Screening of *Azotobacter*, *Bacillus* and *Pseudomonas* species as Plant growth promoting bacteria. *Processes*, 11: 80.
- Mirshekari, B., Hokmalipour, S. S. R. S., Sharifi, R. S., Farahvash, F., Ebadi-Khazine-Gadim, A. (2012): Effect of seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and phosphorus fertilizers. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10: 314-320.
- Misra, S., Chauhan, P. S. (2020): ACC deaminase-producing rhizosphere competent *Bacillus* spp. mitigate salt stress and promote *Zea mays* growth by modulating ethylene metabolism. *Biotechnology*, 10:119.
- Moeinzadeh, A., Sharif-Zadeh, F., Ahmadzadeh, M. (2010): Biopriming of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed with *Pseudomonas fluorescens* for improvement of seed invigoration and seedling growth. *Australian Journal of Crop Science*, 4: 564-570.
- Mohammad, Y. (2014): Enhancement of seed germination and seedling vigor of wheat (*Triticum aestivum* L.) following PGPR treatments. *Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*, 1: 121-124.
- Morcillo, R. J. L., Manzanera, M. (2021): The effects of plant-associated bacterial exopolysaccharides on plant abiotic stress tolerance. *Metabolites*, 11: 337.
- Morillo-Coronado, A. C., Martínez-Anzola, H. G., Velandia-Díaz, J. D., Morillo-Coronado, Y. (2022). Effects of static magnetic fields on onion (*Allium cepa* L.) seed germination and early seedling growth. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 39: 30-41.
- Moss, S. R., Perryman, S., Tatnell, L. (2007): Managing herbicide-resistant brome grass (*Alopecurus myosuroides*) theory and practice. *Weed Technology*, 21: 300-309.
- Mota, F. F., Gomes, E. A., Seldin, L. (2008): Auxin production and detection of the gene coding for the auxin efflux carrier (AEC) protein in *Paenibacillus polymyxa*. *Journal of Microbiology*, 46: 257-64.
- Mozafari, A., Fathollahy, S. (2020): Investigation the effect of seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant enzymes activity of seedling and germination indices of two wheat cultivar under salt stress conditions. *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, 9: 27-44.

- Muday, G. K., Rahman, A., Binder, B. M. (2012): Auxin and ethylene: collaborators or competitors?. *Trends in plant science*, 17: 181-195.
- Muindi, M. E. (2019): Understanding soil phosphorus. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 31: 1-18.
- Mukhtar, H., Bashir, H., Nawaz, A., Mahadi, S. (2018): Optimization of growth conditions for *Azotobacter* species and their use as biofertilizer. *Journal of Bacteriology and Mycology*, 6: 274-278.
- Mumtaz, M. Z., Ahmad, M., Jamil, M., Hussain, T. (2017): Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. *Microbiological Research*, 202: 51-60.
- Munees, A., Mulugeta, K. (2014): Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University Science*, 26(1): 1-20.
- Muslim, S. N., Aziz, R. A. R., Al-Hakeem, A. M. (2021): Biological control of *Azotobacter chroococcum* on *Fusarium solani* in tomato plant. *Journal of Physics: conference series*, 1879: 022018.
- Muthuselvan, I., Balagurunathan, R. (2013): Siderophore production from *Azotobacter* sp. and its application as biocontrol agent. *International Journal of Current Research and Review*, 5(11): 30-42.
- Mwale, S. S., Hamusimbi, C., Mwansa, K. (2003): Germination, emergence and growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in response to osmotic seed priming. *Seed Science and Technology*, 31: 199-206.
- Nagaraja, H., Chennappa, G., Rakesh, S., Naik, M. K., Amaresh, Y. S., Sreenivasa, M. Y. (2016): Antifungal activity of *Azotobacter nigricans* against trichothecene-producing *Fusarium* species associated with cereals. *Food science and biotechnology*, 25: 1197-1204.
- Nagaraju, Y., Naik, N. M., Gowdar, S. B., Narayanarao, K., Satyanarayanarao, K. (2021): ACC deaminase-positive halophilic bacterial isolates with multiple plant growth-promoting traits improve the growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under salinity stress. *Frontiers in Agronomy*, 3: 681007.
- Nakahara, H., Matsuzoe, N., Taniguchi, T., An, P. (2022): Effect of *Burkholderia* sp. and *Pseudomonas* spp. inoculation on growth, yield, and absorption of inorganic components in tomato 'Micro-Tom' under salinity conditions, *Journal of Plant Interactions*, 17: 277-289.
- Narula, N., Kumar, V., Behl, R. K., Deubel, A., Gransee, A., Merbach, W. (2000): Effect of P solubilizing *Azotobacter chroococcum* on N, P, K uptake in responsive wheat genotypes grown under greenhouse conditions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163: 393-398.
- Namwongsa, J., Jogloy, S., Vorasoot, N., Boonlue, S., Riddech, N., Mongkolthananaruk, W. (2019): Endophytic bacteria improve root traits, biomass and yield of *Helianthus tuberosus* L. under normal and deficit water conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29: 1777-1789.
- Naseer, I., Ahmad, M., Hussain, A., Jamil, M. (2020): Potential of zinc solubilizing *Bacillus* strains to improve rice growth under axenic conditions. *Pakistan Journal of Agricultural Science*, 57: 1057-1071.

- Nautiyal, C. S. (1999): An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170: 265-270.
- Nawaz A, Shahbaz M, Asadullah, Imran A, Marghoob MU, Imtiaz M, Mubeen F. (2019): Potential of salt tolerant PGPR in growth and yield augmentation of wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline conditions. *Frontiers in Microbiology*, 11: 2019.
- Naznin, H., Kimura, M., Miyazawa, M., Hyakumachi, M, (2013): Analysis of volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungus *Phoma* sp. GS8-3 for growth promotion effects on tobacco. *Microbes and Environments*, 28: 42-49.
- Negi, S., Bharat, N.K., Kumar, M. (2019): Effect of seed biopriming with indigenous PGPR, *Rhizobia* and *Trichoderma* sp. on growth, seed yield and incidence of diseases in french bean (L.). *legume Research-An International Journal*, 44: 593-601.
- Nelson, E. B. (2018): The seed microbiome: origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil*, 422: 7-35.
- Newton, W.E. (2015): Recent advances in understanding nitrogenases and how they work. In: DeBrujin, F. J. (Ed.), *Biological nitrogen fixation*, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA, pp. 7-20.
- Nobbe, F. (1876): *Handbuch der samenkunde: Physiologisch-statistische untersuchungen über den wirtschaftlichen gebrauchswerth der land-und forstwirtschaftlichen, sowie gärtnerischen saatwaaren*. Hempel & Parey, Wiegandt.
- Nobbe, F., Hiltner, L. (1895): Inoculation of the soil for cultivating leguminous plants. Patent 1896, 570 813, US.
- Nosheen, A., Bano, A., Ullah, F., Farooq, U., Yasmin, H., Hussain, I. (2011): Effect of plant growth promoting rhizobacteria on root morphology of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *African Journal of Biotechnology*, 10: 12639-12649.
- Numan, M., Bashir, S., Khan, Y., Mumtaz, R., Shinwari, Z. K., Khan, A.L. (2018): Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. *Microbiol Research*, 209: 21-32.
- OECD-FAO 2021-2030. *Agricultural Outlook 2021-2030*, ISSN(on-line): 19991142 <https://doi.org/10.1787/19991142>
- OECD-FAO (2012): *Agricultural Outlook 2012–2021*, ISSN(on-line). 19991141. <https://doi.org/10.1787/19991142>.
- Oerke, E. C. (2006): Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144: 31- 43.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., Babalola, O. O. (2017): Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33: 197.

- Oliveira, R. S., Carvalho, P., Marques, G., Ferreira, L., Pereira, S., Nunes, M., et al. (2017): Improved grain yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) under water deficit after inoculation with *Bradyrhizobium elkanii* and *Rhizophagus irregularis*. *Crop Pasture Science*, 68: 1052–1059.
- Oosten, M. J., Di Stasio, E., Cirillo, V., Silletti, S., Ventorino, V., Pepe, O., Raimondi, G., Maggio, A. (2018): Root inoculation with *Azotobacter chroococcum* 76A enhances tomato plants adaptation to salt stress under low N conditions. *BMC Plant Biology*, 18: 205.
- Ortega, L. M. P., Criollo-Campos, P. J., Gómez-Vargas, R. M., Camelo-Rusique, M., Bonilla, G. A. E., Garrido-Rubiano, M. F., Bonilla-Buitrago, R. (2013): Characterization of diazotrophic phosphate solubilizing bacteria as growth promoters of maize plants. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15: 115-123.
- Osburn, R. M., Schroth, M. N. (1989): Effect of osmopriming sugar beet seed on germination rate and incidence of *Pythium ultimum* damping-off. *Plant Disease*, 73: 21-24.
- Ossowicki, A., Jafra, S., Garbeva, P. (2017): The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. *PloS ONE*, 12: e0174362.
- Oyedele, A. O., Ogunbanwo, T. S. (2014): Antifungal activities of *Bacillus subtilis* isolated from some condiments and soil. *African Journal of Microbiology Research*, 8: 1841-1849.
- Pacheco da Silva, M. L., Moen, F. S., Liles, M. R., Feng, Y., Sanz-Saez, A. (2022): The response to inoculation with PGPR plus orange peel amendment on soybean is cultivar and environment dependent. *Plants*, 11: 1138.
- Pal, K. K., B. McSpadden Gardener, M. (2006): Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, pp. 1-25.
- Pandey, N. (2018): Role of plant nutrients in plant growth and physiology. In: Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Oku, H., Nahar, K., Hawrylak-Nowak, B. (Eds.), *Plant nutrients and abiotic stress tolerance*, Springer, Singapore, pp. 51-93.
- Pantigoso, H. A., Newberger, D., Vivanco, J. M. (2022): The rhizosphere microbiome: plant-microbial interactions for resource acquisition. *Journal of Applied Microbiology*, 133: 2864-2876.
- Paparella, S., Araujo, S. S., Rossi, G., Wijayasinghe, M., Carbonera, D., Balestrazzi, A. (2015): Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant Cell Reports*, 34: 1281-1293.
- Paravar, A., Piri, R., Balouchi, H., Ma, Y. (2023): Microbial seed coating: an attractive tool for sustainable agriculture. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 37: e00781.
- Park, S., Kim, A. L., Hong, Y. K., Shin, J. H., Joo, S. H. (2021): A highly efficient auxin-producing bacterial strain and its effect on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19: 179.
- Parmar, P., Sindhu, S. S. (2013): Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. *International Journal of Microbiological Research*, 3: 2531.

Parra-Cota, F. I., Peña-Cabriales, J. J., de los Santos-Villalobos, S., Martínez-Gallardo, N. A., Délanofrier, J. P. (2014): *Burkholderia ambifaria* and *B. caribensis* promote growth and increase yield in grain amaranth (*Amaranthus cruentus* and *A. hypochondriacus*) by improving plant nitrogen uptake. PLoS ONE, 9: e88094.

Passari, A. K., Upadhyaya, K., Singh, G., Abdel-Azeem, A. M., Thankappan, S., Uthandi, S., Hashem, A., Abd Allah, E. F., Malik, J. A., As, A., Gupta, V. K., Ranjan, S., Singh, B. P. (2019): Enhancement of disease resistance, growth potential, and photosynthesis in tomato (*Solanum lycopersicum*) by inoculation with an endophytic actinobacterium, *Streptomyces thermocarboxydus* strain BPSAC147. PLoS ONE, 14: e0219014.

Patel, K., Goswami, D., Dhandhukia, P., Thakker, J. (2015): Techniques to study microbial phytohormones. In: Maheshwari, D., (Ed.), Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem, Springer Cham, Switzerland, pp. 1-27.

Patil, V. (2011): Production of indole acetic acid by *Azotobacter* sp. Recent research in science and technology, 3: 14-16.

Patra, B., Singh, J., Hooda, V. S, Kapoor, A. (2019): Effect of seed priming, bio fertilizer inoculations and nitrogen levels on yield attributes, yield and economic returns of late sown wheat. International Journal of Chemical Studies, 7: 95-99.

Pattern, C. L., Glick, B. R. (2002): Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Applied and Environmental Microbiology, 68: 3795-3801.

Paul, E. A., Clark, F. E. (1988): Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, San Diego, CA, ISBN(Print): 0 12 546806 7.

Paul, S., Verma, O. P., Singh, M. R., Tyagi, S. P. (2002): Effect of *Azotobacter* inoculation on seed germination and yield of onion (*Allium cepa*). Agricultural Research, 23: 297-299.

Paulo, E. M., Vasconcelos, M. P., Oliveira, I. S., Affem H. M. J., Nascimento, R., Melo, I.S, Roque M. R. A., Assis, S. A. (2012): An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. Food Science and Technology, 32: 710-714.

Peer, W.A., Blakeslee, J.J., Yang, H., Murphy, A.S. (2011): Seven things we think we know about auxin transport. Molecular plant, 4: 487-504.

Pérez-Jaramillo, J. E., Mendes, R., Raaijmakers, J. M. (2016): Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. Plant Molecular Biology, 90: 635-644.

Perotti, R. (1926): On the limits of biological enquiry in soil science. Proceedings of the Soil Science Society of America, 2: 146-161.

Perry, G., Perry, D. (2019): *Bacillus* induced to biosintetize VOC and nitriles may benefit in Agriculture. Journal of Life and Environmental Sciences, 7: e2611v2.

- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van, Der, Ent, S., Van, Wees, S. C. M. (2009): Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5: 308-316.
- Pieterse, C. M. J., Van, Loon, L. C. (2007): Signalling cascades involved in induced resistance. In: Walters, D., Newton, A., Lyon, G. (Eds.), *Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection*, Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 65-88.
- Pimentel, D. (1995): Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and environmental Ethics*, 8: 17-29.
- Pires, C., Franco, A. R., Pereira, S. I. A., Henriques, I., Correia, A., Magan, N., Paula, M. L. C. (2017): Metal(loid)-contaminated soils as a source of culturable heterotrophic aerobic bacteria for remediation applications. *Geomicrobiology Journal*, 34: 1-9.
- Pittman, U. J. (1977): Effects of magnetic seed treatment on yields of barley, wheat and oats on Southern Alberta. *Canadian Journal of Plant Science*, 57: 37-45.
- Ponmurugan, K., Sankaranarayanan, A., Al-Dharbi, N. A. (2012). Biological activities of plant growth promoting *Azotobacter* sp. isolated from vegetable crops rhizosphere soils. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 6: 1-10.
- Praca, L. B., Gomes, A. C. M. M., Cabral, G., Martins, E. S., Sujii, E. H., Pontes, R. G. M. S. (2012): Endophytic colonization by Brazilian strains of *Bacillus thuringiensis* on cabbage seedlings grown in vitro. *Bt Research*, 3: 11-19.
- Pravilnik o kvalitetu semena poljoprivrednog bilja (1993). Službeni list SRJ, broj 8 od 26. februara 1993. (8/1993-194), broj 21 od 16 aprila 1993 (21/1993-418).
- Prudent, M., Salon, C., Souleimanov, A., Emery, R. J. N., and Smith, D. L. (2015): Soybean is less impacted by water stress using *Bradyrhizobium japonicum* and thuricin-17 from *Bacillus thuringiensis*. *Agronomy for Sustainable Development*, 35: 749-757.
- Purushothaman, R., Zaman-Allah, M., Mallikarjuna, N., Pannirselvam, R., Krishnamurthy, L., Gowda, C. L. (2013): Root anatomical traits and their possible contribution to drought tolerance in grain legumes. *Plant Production Science*, 16: 1-8.
- Purwanto, P., Suharti, W. S. (2021): Nutrient uptake, chlorophyll content, and yield of rice (*Oryza sativa* L.) under the application of PGPR consortium. *Biosaintifika: Journal of Biology and Biology Education*, 13: 336-344.
- Radhakrishnan, R. (2019): Magnetic field regulates plant functions, growth and enhances tolerance against environmental stresses. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 5: 1107-1119.
- Rahman, A., Shaheen, H. A., El-Aziz, A., Rabab, M., Ibrahim, D. 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: 1-11.

- Rajawat, M. V. S., Ansari, W. A., Singh, D., Singh, R. (2019): Potassium solubilizing bacteria (KSB). In: Singh, D., Prabha, R. (Eds.), *Microbial interventions in agriculture and environment*. Springer, Singapore, pp. 189-209.
- Rajawat, M. V. S., Singh, S., Tyagi, S. P., Saxena, A. K. (2016): A modified plate assay for rapid screening of potassium-solubilizing bacteria. *Pedosphere*, 26: 768–773.
- Rajer, F. U., Samma, M. K., Ali, Q., Rajar, W. A., Wu, H., Raza, W., Xie, Y., Tahir, H. A. S., Gao, X. (2022): *Bacillus* spp.-mediated growth promotion of rice seedlings and suppression of bacterial blight disease under greenhouse conditions. *Pathogens*, 11: 1251.
- Rajjou, L., Duval, M., Callardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., Job, D. (2012): Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 507-33.
- Rakshit, A., Singh, H. B. (2018): *Advances in seed priming*. Springer, Singapore, ISBN (print): 978-981-13-0031-8.
- Rana, K. L., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A. N., Yadav, N. R., Singh, K., Saxena, A. K. (2020): Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113: 1-33.
- Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C., Foley, J. A. (2013): Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS ONE*, 8: e66428.
- Ray, P., Lakshmanan, V., Labbé, J. L., Craven, K. D. (2020): Microbe to microbiome: A paradigm shift in the application of microorganisms for sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 11: 622926.
- Raza, W., Yousaf, S., Rajer, F. U. (2016): Plant growth promoting activity of volatile organic compounds produced by biocontrol strains. *Science Letters*, 4: 40-43.
- Reddy, P. P. (2013): Bio-priming of seeds. In: Reddy, P. P. (Ed.), *Recent advances in crop protection*, Springer, New Delhi, pp. 83-90.
- Reddy, S. V., Singh, A. K., Masih, H., Benjamin, J. C., Ojha, S. K., Ramteke, P. W., Singla, A. (2018): Effect of *Azotobacter* sp and *Azospirillum* sp on vegetative growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7: 2130-2137.
- Reetha, A. K., Pavani, S. L., Mohan, S. (2014). Hydrogen cyanide production ability by bacterial antagonist and their antibiotics inhibition potential on *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3: 172-178.
- Rêgo, F. M. C., Ilkiu-Borges, F., Filippi, M. C. C., De Gonçalves, L. A., Silva, G. B. (2014): Morphoanatomical and biochemical changes in the roots of rice plants induced by plant growth-promoting microorganisms. *Journal of Botany*, 2014: 818797.
- Reina, F. G., Pascual, L. A., Fundora, I. A. (2001): Influence of a stationary magnetic field on water relations in lettuce seeds. Part 2: experimental results. *Bioelectromagnetics*, 22: 596-602.

Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (2011): Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14: 435-443.

Remans, R., Beebe, S., Blair, M., Manrique, G., Tovar, E., Rao, I. M., Croonenborghs, A., Torres-Gutiérrez, R., El-Howeity, M. A., Michiels, J., Vanderleyden, J. (2008): Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant and Soil*, 302: 149-161.

Ren, Z., Leng, X., Liu, Q. (2018): Effect of a static magnetic field on the microscopic characteristics of highly efficient oil-removing bacteria. *Water Science and Technology*, 77: 296-303.

Rengel, Z. (2015): Availability of Mn, Zn and Fe in the rhizosphere. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15: 397-409.

Renoud, S., Abrouk, D., Prigent-Combaret, C., Wisniewski-Dyé, F., Legendre, L., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D. (2022): Effect of inoculation level on the impact of the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 on selected microbial functional groups in the rhizosphere of field maize. *Microorganisms*. 10: 325.

Reva, O. N., Dixeliu, C., Meijer, J., Priest, F. G. (2004): Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiological Ecology*, 48: 249-259.

Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., Schmölling, T. (2005): *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant and Cell*, 18: 40-54.

Rijavec, T., Lapanje, A. (2016): Hydrogen cyanide in the rhizosphere: Not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1785.

Rocha, I., Ma, Y., Souza-Alonso, P., Vosátka, M., Freitas, H., Oliveira, R. S. (2019a): Seed coating: a tool for delivering beneficial microbes to agricultural crops. *Frontiers in Plant Science*, 10:1357.

Rocha, I., Ma, Y., Vosátka, M., Freitas, H., Oliveira, R. S. (2019b): Growth and nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*) under water deficit as influenced by microbial inoculation via seed coating. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 205: 447-459.

Rocha, F. Y. O., Negrisoli, A. S., de Matos, G. F., Gitahy, P. M., Rossi, C. N., Vidal, M.S., Baldani, J. I. (2021): Endophytic *Bacillus* bacteria living in sugarcane plant tissues and *Telchin licus licus* larvae (Drury) (*Lepidoptera: Castniidae*): The symbiosis that may open new paths in the biological control. *Frontiers in Microbiology*, 12: 659965.

Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., Bashan, Y. (2006): Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287: 15-21.

Rodríguez, H., Farga, R. (1999): Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17: 319-339.

- Rodríguez-Contreras, A., Koller, M., Braunegg, G., Marqués-Calvo, M. S. (2015): Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain. *New Biotechnology*, 33: 73-77.
- Rodríguez-Navarro, D. N., Dardanelli, M. S., Ruíz-Saínz, J. E. (2007): Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters* 272: 127-136.
- Rojas-Tapias, D. A., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., Bonilla, R. (2012): Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, 61: 264-272.
- Romano, I., Ventrino, V., Pepe, O. (2020): Effectiveness of plant beneficial microbes: overview of the methodological approaches for the assessment of root colonization and persistence. *Frontiers in Plant Science*, 11: 6.
- Romera, F. J., Lucena, C., García, M. J., Alcántara, E., Angulo, M., Aparicio, M. Á., Pérez-Vicente, R. (2021). Plant hormones and nutrient deficiency responses. In: Gupta, D. K., Corpas, F. J. (Eds.), *Hormones and plant response, plant in challenging environments*, Springer Cham, Switzerland, pp. 9-65.
- Romero-Munar, A., Aroca, R. (2023): A non-K⁺-solubilizing PGPB (*Bacillus megaterium*) increased K⁺ deprivation tolerance in *Oryza sativa* seedlings by up-regulating root K⁺ transporters. *Plant Physiology and Biochemistry*, 196: 774-782.
- Romero-Perdomo, F., Abril, J., Camelo, M., Moreno-Galván, A., Pastrana, I., Rojas-Tapias, D., Bonilla, R. (2017): *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiología*, 49: 377-383.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E. (2006): Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 19: 827-37.
- Roslan, M. A. M., Zulkifli, N. N., Sobri, Z. M., Zuan, A. T. K., Cheak, S. C., Abdul Rahman, N. A. (2020): Seed biopriming with P- and K-solubilizing *Enterobacter hormaechei* sp. improves the early vegetative growth and the P and K uptake of okra (*Abelmoschus esculentus*) seedling. *PLoS ONE*, 15: e0232860.
- Rubin, R. L., van Groenigen, K. J., Hungate, B. A. (2017): Plant growth promoting rhizobacteria are more effective under drought: a meta-analysis. *Plant and Soil*, 416: 309-323.
- Rudani, L., Vishal, P., Kalavati, P. (2018): The importance of zinc in plant growth-A review. *International Research Journal of Natural and Applied Sciences*, 5: 38-48.
- Rudolph, N., Labuschagne, N., Aveling, T. A. S. (2015): The effect of plant growth promoting rhizobacteria on seed germination and seedling growth of maize. *Seed Science and Technology*, 43: 507-518.

- Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Pare, P. W., Bais, H. P. (2008): Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology*, 148: 1547-56.
- Ruzin, S.E. (1999): *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, Oxford, UK, ISBN (Print): 0 19 508956 1.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., Paré, P. W. (2004): Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134: 1017-1026.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Pare, P. W., Kloepper, J. W. (2003): Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 4927-4932.
- Ryu, C. M., Hu, C. H., Locy, R. D., Kloepper, J. W. (2005): Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil*, 268: 285-292.
- Sabra, W., Zeng, A. P., Lünsdor, H., Deckwer, W. D. (2000): Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:4037-44.
- Saeid, A., Prochownik, E., Dobrowolska-Iwanek, J. (2018): Phosphorus solubilization by *Bacillus* species. *Molecules*, 23: 2897.
- Salehin, A., Puri, R. R., Hafiz, M. H. R., Itoh, K. (2021). Effect of co-inoculation of *Bacillus* sp. strain with bacterial endophytes on plant growth and colonization in tomato plant (*Solanum lycopersicum*). *Microbiology Research*, 12: 480-490.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual, appendix 2, Media, In *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3rd Edition, New Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, pp. 1546.
- Sánchez, J. I., Martínez, B., Guillén, R., Díaz, R. J., Rodríguez, A. (2006): Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12): 7495-7502.
- Sánchez-López, Á. M., Baslam, M., De Diego, N., Muñoz, F. J., Bahaji, A., Almagro, G., Ricarte-Bermejo, A., García-Gómez, P., Li, J., Humplík, J. F., Novák, O., Spíchal, L., Doležal, K., Baroja-Sandhya, V., Ali, S., Grover, M., Reddy, G., Bandi, V. (2011): Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: Effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *Journal of Plant Interaction*, 6: 1-14.
- Sánchez-López, Á. M., Bahaji, A., De Diego, N., Baslam, M., Li, J., Muñoz, F. J., Pozueta-Romero, J. (2016): *Arabidopsis* responds to *Alternaria alternata* volatiles by triggering plastid phosphoglucose isomerase-independent mechanisms. *Plant Physiology*, 172: 1989-2001.
- Santana, E. B., Marques, E. L. S., Dias, J. C. T. (2016): Effects of phosphate-solubilizing bacteria, native microorganisms, and rock dust on *Jatropha curcas* L. growth. *Genetics and Molecular Research*, 15: gmr.15048729.

- Sapre, S., Gontia-Mishra, I., Tiwari, S. (2019): ACC deaminase-producing bacteria: a key player in alleviating abiotic stresses in plants. In: Kumar, A., Meena, V., (Eds.), Plant growth promoting rhizobacteria for agricultural sustainability: from theory to practices, Springer, Singapore, pp. 267-291.
- Saravanan, V. S., Kumar, M. R., Sa, T. M. (2011): Microbial zinc solubilization and their role on plants. In: Maheshwari, D. K. (Ed.), Bacteria in agrobiology: plant nutrient management, Springer, Berlin, pp. 47-63.
- Saravanan, V. S., Madhaiyan, M., Thangaraju, M. (2007): Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Chemosphere, 66: 1794-1798.
- Sarić-Krsmanović, M., Božić, D., Radivojević, L., Gajić-Umiljendić, J., Šantrić, L., Vrbničanin, S. (2017): Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and cover crops on seed germination and early establishment of field dodder (*Cuscuta campestris* Yunk.). Pesticidi i Fitomedicina, 32: 105-111.
- Satyaprakash, M., Nikitha, T., Sadhana, B., Reddi, E. U. B., Vani, S. S. (2017): Phosphorus and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6: 2133-2144.
- Saucedo-Martinez, B. C., Rodriguez, M. J. T., Akram, M., Rico, J. L., Sánchez-Yañez, J. M. (2020): Enhanced growth of *Oriza sativa* by endophytic: *Bacillus cereus* and *Paenibacillus polymyxa*. Horticulture International Journal, 4: 208-211.
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., Nelson, A. (2019): The global burden of pathogens and pests on major food crops. Nature Ecology Evolution, 3: 430-439.
- Savci, S. (2012): Investigation of effect of chemical fertilizers on environment. International conference on environmental science and development (ICESD 2012), 5-7 January 2012, Hong Kong, APCBEE Procedia 1, pp. 287-292.
- Sayyed, R. Z., Ilyas, N., Tabassum, B., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., Jadhav, H. P. (2019): Plausible role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in future climatic scenario. In: Sobti, R., Arora, N., Kothari, R. (Eds.), Environmental biotechnology: for sustainable future, Springer, Singapore, pp. 175-197.
- Schmidt, R., Cordovez, V., De Boer, W., Raaijmakers, J., Garbeva, P. (2015): Volatile affairs in microbial interactions. Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology, 9: 2329-2335.
- Schulz, S., Dickschat, J. S., Kunze, B., Wagner-Dobler, I., Diestel, R., Sasse, F. (2010): Biological activity of volatiles from marine and terrestrial bacteria. Marine drugs, 8: 2976-2987.
- Scott, J. C., Greenhut, I. V., Leveau, J. H. (2013): Functional characterization of the bacterial *iac* genes for degradation of the plant hormone indole-3-acetic acid. Journal of Chemical Ecology, 39: 942-951.
- Scott, S., Jones, R., Williams, W. (1984): Review of data analysis methods for seed germination. Crop Science, 24: 1192-1199.

- Selvi, K. B., Paul, J. J. A., Vijaya, V., Saraswathi, K. (2017): Analyzing the efficacy of phosphate solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques. *Biochemistry and Molecular Biology Journal*, 3: 1-7.
- Sengupta, A., Hariharan, J., Grewal, P. S., Dick, W. A. (2020): Bacterial community dissimilarity in soils is driven by long term land use practices. *Agrosystems, Geosciences and Environment*, 3: e20031.
- Senthilkumar, M., Anandham, R., Madhaiyan, M., Venkateswaran, V., Sa, T. (2011): Endophytic bacteria: perspectives and applications in agricultural crop production. *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystem*, 3: 61-96.
- Setiawati, T. C., Mutmainnah, L. (2016): Solubilization of potassium containing mineral by microorganisms from sugarcane rhizosphere. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9: 108-117.
- Sev, T. M., Aung, A., Mon, A. A., Yu, S. S. (2020): Assessment for plant growth promoting activities of *Azotobacter vinelandii* AV7 from rhizospheric soil of tomato. *Journal of Materials and Environmental Science*, 11: 1807-1815.
- Shady, H. A., Asker, M. M. S., Gadalla, M. A., Abd Elnasser, S. M. (2011): Production conditions of exopolysaccharide from *Bacillus megaterium* identified by 16S rRNA Gene Sequencing. *Egyptian Journal of Microbiology*, 46: 125-140.
- Sharif, R. S. (2011): Study of grain yield and some of physiological growth indices in maize (*Zea mays* L.) hybrids under seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 9: 495-500.
- Sharif, R. S. (2012): Study of nitrogen rates effects and seed biopriming with PGPR on quantitative and qualitative yield of safflower (*Carthamus tinctorius* L). *Technical Journal of Engineering and Applied Science*, 2: 162-166.
- Sharifi, R. S., Khavazi, K. (2011): Effects of seed priming with Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on yield and yield attribute of maize (*Zea mays* L.) hybrids. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 9: 496-500.
- Sharma R., Shrivastava V.L., Sharma S. (2021): Effect of substitution of chemical fertilizer by bioinoculants on plant performance and rhizospheric bacterial community: case study with *Cajanus cajan*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52: 373-386.
- Sharma, A., Shankhdhar, D., Sharma, A., Shankhdhar, S. C. (2014a): Growth promotion of rice genotypes by PGPR isolated from rice rhizospheres. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14: 505-517.
- Sharma, P., Kunawat, K. C., Kaur, S., Kaur, N. (2014b): Assessment of zinc solubilization by endophytic bacteria in legume rhizosphere. *Indian Journal of Applied Research*, 4: 439-441.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012: 217037.

Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., Gobi, T. A. (2013): Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springer plus, 31: 587-600.

Shaukat, K., Affrasayab, S., Hasnain, S. (2006): Growth responses of *Helianthus annuus* to plant growth promoting rhizobacteria used as a biofertilizer. International Journal of Agricultural Research, 1: 573-581.

Shenge, K. C., Mabagala, R. B., Mortensen, C. N., Wydra, K. (2014): Resistance of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* isolates from Tanzania to copper and implications for bacterial spot management. African Journal of Microbiological Research, 8: 2881-2885.

Shi, T., Peng, H., Zeng, S., Ji, R., Shi, K., Huang, H., Ji, X. (2017): Microbial production of plant hormones: Opportunities and challenges. Bioengineered, 8: 124-128.

Shine, M. B., Guruprasad, K. N. (2012): Impact of pre-sowing magnetic field exposure of seeds to stationary magnetic field on growth, reactive oxygen species and photosynthesis of maize under field conditions. Acta Physiologiae Plantarum, 34: 255-265.

Shine, M., Guruprasad, K., Anand, A. (2011): Enhancement of germination, growth, and photosynthesis in soybean by pre-treatment of seeds with magnetic field. Bioelectromagnetics, 32: 474-484.

Shuppar, T. R., Kamal, J. A. (2021): The effect of biological nocolation of *Azotobacter chroococcum* and *Glomus mosseae* on growth and zield of *Zea mays* L. under different levels of water stress. IOP conference series: earth and environmental science, 735: 012069.

Sidorova, D. E, Skripka, M. I., Khmel, I.A., Koksharova, O. A., Plyuta, V.A. (2022): Effects of volatile organic compounds on biofilms and swimming motility of *Agrobacterium tumefaciens*. Microorganisms, 10: 1512.

Silva V., Mol H., Zomer P., Tienstra M., Ritsema C., Geissen V. (2019): Pesticide residues in European agricultural soils - A hidden reality unfolded. Science of The Total Environment, 653: 1532-1545.

Silva, T. S., Freitas, D. F., Costa, M. E., Santos, S. E. P., Silva, L. F., Serra, A. P., Cavalcante Neitzke, P. R. M. (2020): Organic nitrogen in agricultural systems. In: Rigobelo, E. (Ed.), Nitrogen Fixation, IntechOpen, London, UK, pp. 13-34.

Silva Filho, G. N., Vidor, C. (2000): Phosphate solubilization by microorganisms in the presence of different carbon sources. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 24: 311-319.

Singh, R., Singh, R., Sumit, K. Soni, S. K., Soni, R. P., Patel, R., Kalra, A. (2013a): Technology for improving essential oil yield of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by application of bioinoculant colonized seeds under organic field conditions. Industrial crops and products, 45: 335-342.

- Singh, A., Jain, A., Sarma, B. K., Upadhyay, R. S., Singh, H. B. (2013b): Rhizosphere microbes facilitate redox homeostasis in *Cicer arietinum* against biotic stress. *Annals of Applied Biology*, 163: 33-46.
- Singh, G., Biswas, D. R., Marwaha, T. S. (2010): Mobilization of potassium from waste mica by plant growth promoting rhizobacteria and its assimilation by maize (*Zea mays*) and wheat (*Triticum aestivum*): a hydroponics study under phytotron growth chamber. *Journal of Plant Nutrition*, 33: 1236-1251.
- Singh, R. K., Singh, P., Li, H. B., Song, Q. Q., Guo, D. J., Solanki, M. K., Verma, K. K., Malviya, M. K., Song, X. P., Lakshmanan, P., Yang, L. T., Li, Y. R. (2020a): Diversity of nitrogen-fixing rhizobacteria associated with sugarcane: a comprehensive study of plant-microbe interactions for growth enhancement in *Saccharum* spp. *BMC Plant Biology*, 20: 220.
- Singh, S., Singh, U. B., Malviya, D., Paul, S., Sahu, P. K., Trivedi, M., Paul, D., Saxena, A. K. (2020b): Seed biopriming with microbial inoculant triggers local and systemic defense responses against *Rhizoctonia solani* causing banded leaf and sheath blight in maize (*Zea mays* L.). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17: 1396.
- Singh, V., Maharshi, A., Singh, D. P., Upadhyay R. M., Sarma, B. K., Singh, H. B.. (2018): Role of microbial seed priming and microbial phytohormone in modulating growth promotion and defense responses in plants. In: Raksfit, A., Singh, H. B. (Eds.), *Advances in Seed Priming*, Springer nature, Singapore, pp. 115-126.
- Siripornvisal, S. (2010): Biocontrol efficacy of *Bacillus subtilis* BCB3-19 against tomato gray mold. *KMITL Science and Technology Journal*, 10: 37-44.
- Skubacz, A., Daszkowska Golec, A. (2017): Seed dormancy: The complex process regulated by abscisic acid, gibberellins, and other phytohormones that makes seed germination work. In: El-Esawi, M. A. (Ed.), *Phytohormones: signaling mechanisms and crosstalk in plant development and stress responses*, Intechopen, London, UK, pp. 77-100.
- Smil, V. (2001): *Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production*. MIT Press, Cambridge, ISBN (Print): 0-262-19449-X.
- Smith, D. L., Gravel, V., Yergeau, E. (2017): Editorial: signaling in the phytomicrobiome. *Frontiers in Plant Science*, 8: 611.
- Socolofsky, M. D., Wyss, O. (1962): Resistance of the *Azotobacter* cyst. *Journal of Bacteriology*, 84: 119-24.
- Solar, L. I., Pernice, F., De Jong, T. M. (2006): The relationship of hydraulic conductance to root system characteristics of peach (*Prunus persica*) rootstocks. *Physiologia Plantarum*, 128: 324-333.
- Somasegaran, P., Hoben, H. J. (1994). *Handbook for rhizobia: methods in legumes-rhizobium technology*. Springer-Verlag, New York, USA, ISBN(Electronic): 10 0387941347.

- Somova, L. A., Pechurkin, N. S., Sarangova, A. B., Pisman, T. I. (2001): Effect of bacterial population density on germination wheat seeds and dynamics of simple artificial ecosystems. *Advances in Space Research*, 27: 1611-1615.
- Sönmez, I., Kaplan M., Sönmez, S. (2007): An investigation of seasonal changes in nitrate contents of soils and irrigation waters in greenhouses located in Antalya-Demre region. *Asian Journal of Chemistry*, 19: 5639-5646.
- Sookchaoy, K., Panthachode, S., Thipchu, J. (2009): Screening of *Trichodermas* pp. for *Phytophthora* root and foot rot on *Citrus sinensis* biocontrol. Proceedings of the international conference on the role of Universities in Hands-On Education Rajamangala, University of Technology Lanna, Chiang-Mai, Thailand, pp. 356-362.
- Sorensen, J., Sessitsch, A. (2006): Plant-associated bacteria lifestyle and molecular interactions. In: van Elsas, J. D., Jansson, J. K., Trevors, J. T. (Eds.), *Modern soil microbiology*. CRC Press, Boca Raton, pp. 211-236.
- Source, C., Giovannelli, A., Sebastiani, L., Anfodillo, T. (2013): Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. *Plant Cell Reports*, 32: 885-898.
- Souza, A., Garcí, D., Sueiro, L., Gilart, F., Porras, E., Licea, L. (2006): Pre-sowing magnetic treatments of tomato seeds increase the growth and yield of plants. *Bioelectromagnetics*, 27: 247-57.
- Souza, A., Sueiro, L., Garcia, D., Porras, E. (2010): Extremely low frequency non-uniform magnetic fields improve tomato seed germination and early seedling growth. *Seed Science and Technology*, 38: 61-72.
- Souza, A., García, D., Sueiro, L., Gilart, F. (2014): Improvement of the seed germination, growth and yield of onion plants by extremely low frequency non-uniform magnetic fields. *Scientia Horticulturae*, 176: 63-69.
- Souza, R., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. P. (2015): Plant growth promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38: 401-419.
- Spaepen, S. (2015): Plant hormones produced by microbes. In: Lugtenberg, B. (Ed.), *Principles of plant-microbe interactions*, Springer Cham, Switzerland, pp. 247-356.
- Spaepen, S., Bossuyt, S.N., Engelen, K., Marchal, K., Vanderleyden, J. (2014): Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New phytologist*, 201: 850-61.
- Spaepen, S., Das, F., Luyten, E., Michiels, J., Vanderleyden, J. (2009): Indole-3-acetic acid-regulated genes in *Rhizobium etli* CNPAF512. *FEMS Microbiology Letters*, 291: 195-200.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. (2007): Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews*, 31: 425-448.

- Stahl S, Olsson O. (1977): Temperature range variants of *Bacillus megaterium*. Archives of Microbiology, 113: 221-229.
- Stamenov, D., Djuric, S., & Jafari, T. H. (2018, December). Effect of PGPR on the germination and early development of onion (*Allium cepa*). International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering, 12: 6-9.
- Streletskii, R., Astaykina, A., Krasnov, G., Gorbatov, V. (2022): Changes in bacterial and fungal community of soil under treatment of pesticides. Agronomy 12: 124.
- Su, Y., Xian, H., Shi, S., Zhang, C., Manik, S. M., Mao, J., Zhang, G., Liao, W., Wang, Q., Liu, H. (2016): Biodegradation of lignin and nicotine with white rot fungi for the delignification and detoxification of tobacco stalk. BMC Biotechnology, 16: 81.
- Sudheer, S., Bai, R. G., Usmani, Z., Sharma, M. (2020): Insights on engineered microbes in sustainable agriculture: biotechnological developments and future prospects. Current Genomics, 21: 321-333.
- Sumbul, R., Ansari, A., Rizvi, R., Mahmood, I. (2020): *Azotobacter*: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. Saudi Journal of Biological Sciences, 27: 3634-3640.
- Supari, N., Hapani, S, Z., Alam, S. A., Javed, M. A., Jabir, M. D. A. R., Tin, L. C., Rashid S. N. A. A., Annuar, N. A. S., Sarmid, M. R. (2014): Microbial effects on seed germination in Malaysian rice (*Oryza sativa* L). Proceedings of the Asia-Pacific Advanced Network, 37: 42-51.
- Tagele, S. B., Kim, S. W., Lee, H. G., Lee, Y. S. (2019): Potential of novel sequence type of *Burkholderia cenocepacia* for biological control of root rot of maize (*Zea mays* L.) caused by *Fusarium temperatum*. International Journal of Molecular Science, 20: 1005.
- Tahir, H., Gu, Q., Wu, H., Niu, Y., Huo, R., Gao, X. (2017): *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. Scientific Reports, 7: 40481.
- Tahir H. A., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., Colman, M. V., Gao, X. (2017): Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. Frontiers in Microbiology, 8: 171.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28: 2731-2739.
- Tatum, L. A., Zuber, M. S. 1943: Germination of maize under adverse conditions. Journal of the American Society of Agronomy, 35: 48-59.
- Taylor, A. G., Harman, G. E. (1990): Concepts and technologies of selected seed treatments. Annual Review of Phytopathology, 28: 321-339.
- TeKrony, D. M. (2003): Precision is an essential component in seed vigor testing. Seed Science and Technology, 31: 435-477.

Thakker, J. N., Patel, S., Dhandhukia, P. C. (2012): Induction of defense-related enzymes in banana plants: Effect of live and dead pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. ISRN Biotechnology, 2013: 601303.

Thant, S., Aung, N. N., Aye, O. M., O, N. N., Htun, T. M. M., Mon, A. A., Mar, K. T., Kyaing, K., O, K. K., Thywe, M., Phwe, P., Hnin, Y. S. T., Thet, S. M., Latt, Z. K. (2018): Phosphate solubilization of *Bacillus megaterium* isolated from non-saline soils under salt stressed conditions. Journal of Bacteriology and Mycology: open access, 6: 335-341.

Thimann, K.V. (1939): Auxin and the inhibition of plant growth. Biological Reviews, 14: 314-337.

Thokchom, E., Thakuria, D., Kalita, M. C., Sharma, C. K., Talukdar, N. C. (2017): Root colonization by host-specific rhizobacteria alters indigenous root endophyte and rhizosphere soil bacterial communities and promotes the growth of mandarin orange. European Journal of Soil Biology, 79: 48-56.

Thomas, U., Varughese, K., Thomas, A., Sadanandan, S. (2000): Seed priming for increased vigour, viability and productivity of upland rice. Low External Input Sustainable Agriculture India, 4:14.

Tilak, K. V. B. R., Reddy, B. S. (2006): *Bacillus cereus* and *B. circulans* novel inoculants for crops. Current Science, 90: 642-644.

Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., Befort, B. L. (2011): Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. Proceedings of the national academy of sciences, 108: 20260-20264.

Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., Aronsson, A. C. (2017): Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. Frontiers in Plant Science, 8: 49.

Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., Sedykh, S. E. (2022): Bacterial siderophores: Classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture. Plants, 11: 3065.

Tindale, A. E., Mehrotra, M., Ottem, D., Page, W. J. (2000): Dual regulation of catechol siderophore biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* by iron and oxidative stress. Microbiology, 146: 1617-1626.

Toole, E. H., Hendricks, S. B., Borthwick, A. H., Toole, V. K. (1956): Physiology of seed germination. Annual Review of Plant Biology, 7: 299-324.

Torres, M. J., Brandan, C. P., Sabaté, D. C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Audisio, M. C. (2017): Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. Biological control, 105: 93-99.

Trolove, S. N., Hedley, M. J., Kirk, G. J. D., Bolan, N. S., Loganathan, P. (2003): Progress in selected areas of rhizosphere research on P acquisition. Australian Journal of Soil Research, 41: 471-499.

Turan, M., Arjumend, T., Argin, S., Yildirim, E., Katircioğlu, H., Gürkan, B., Bolouri, P. (2021): Plant root enhancement by plant growth promoting rhizobacteria. In: Yildirim, E., Turan, M., Ekinci, M. (Eds.), Plant Roots, IntechOpen, London, UK, pp. 145-154.

- Turnbull, G.A., Morgan, J.A.W., Whipps, J.M., Saunders, J.R. (2001): The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil and in the attachment and colonization of wheat roots. *FEMS Microbiology Ecology*, 36: 21-31.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moenne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dye, F., Prigent-Combaret, C. (2013): Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4: 356.
- Vaid, S. K., Kumar, B., Sharma, A., Shukla, A., Srivastav, P. C. (2014): Effect of zinc solubilizing bacteria on growth promotion and Zn nutrition of rice. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14: 889-910.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. (2005): Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In: Siddiqui, Z. A. (Ed.), *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. Springer Science, Netherlands, pp. 39-66.
- Vashisth, A., Nagarajan, S. (2010): Effect on germination and early growth characteristics in sunflower (*Helianthus annuus*) seeds exposed to static magnetic field. *Journal of Plant Physiology*, 167: 149-56.
- Vashisth, A., Singh, R., Joshi, D. K. (2013): Effect of static magnetic field on germination and seedling attributes in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Agricultural Physics*, 13: 182-185.
- Vasilevski, G. (2003): Perspectives of the application of biophysical methods in sustainable agriculture. *Bulgarian Journal of Plant Physiol*, Special issue, pp. 179-186.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Nikolaeva, I. (2006): Simultaneous p-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potential and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 137-144.
- Velmourougane, K., Prasanna, R., Singh, S., Chawla, G., Kumar, A., Kumar, A. S. (2017): Modulating rhizosphere colonisation, plant growth, soil nutrient availability and plant defense enzyme activity through *Trichoderma viride*- *Azotobacter chroococcum* biofilm inoculation in chickpea. *Plant Soil*, 421: 157-174.
- Ventosa, A., Mellado, E., Sanchez-Porro, C., Marquez, M. C. (2008): Halophilic and halotolerant micro-organisms from soils. In: Dion, P., Nautiyal, C. S. (Eds.), *Microbiology of extreme soils*, Springer, Berlin, pp. 87-115.
- Ventura, L., Donà, M., Macovei, A., Carbonera, D., Buttafava, A., Mondoni, A., Rossi, G., Blestrazzi, A. (2012): Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60: 196-206.
- Verbon, E. H., Liberman, L. M. (2016): Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends in Plant Science*, 21: 218-229.
- Veresoglou, S. D., Meneses, G. (2010): Impact of inoculation with *Azospirillum* spp. on growth properties and seed yield of wheat: a metaanalysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008. *Plant and Soil*, 337: 469-480.

- Verma, G., Sharma, S. (2010): Role of H₂O₂ and cell wall monoamine in germination of *Vigna radiata* seeds. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 47: 249-253.
- Vetterlein, D., Carminati, A., Kögel-Knabner, I., Bienert, G. P. Smalla, K., Oburger, E., Schnepf, A., Banitz, T., Tarkka, M. T., Schlüter, S. (2022): Rhizosphere spatio temporal organization-a key to rhizosphere functions. *Frontiers in Agronomy*, 2: 8.
- Vidak, M., Lazarević, B., Nekić, M., Šatović, Z., Carović-Stanko, K. (2022): Effect of hormonal priming and osmopriming on germination of winter savory (*Satureja montana* L.) natural population under drought stress. *Agronomy*, 12: 1288.
- Vikram, A. R., Alagawadi, H., Hamzehzarghani, P. U. Krishnaraj, P. U. (2007): Factors related to the occurrence of phosphate solubilizing bacteria and their isolation in vertisols. *International Journal of Agricultural Research*, 2: 571-580.
- Viscardi, S., Ventrino, V., Duran, P., Maggio, A., De Pascale, S., Mora, M. L., Pepe, O. (2016): Assessment of plant growth promoting activities and abiotic stress tolerance of *Azotobacter chroococcum* strains for a potential use in sustainable agriculture. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16: 848-863.
- Wagi, S., Ahmed, A. (2019): *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *Peer J*, 7: e7258.
- Wahab, A., Abdi, G., Saleem, M. H., Ali, B., Ullah, S., Shah, W., Mumtaz, S., Yasin, G., Muresan, C. C., Marc, R. A. (2022): Plants' physio-biochemical and phyto-hormonal responses to alleviate the adverse effects of drought stress: a comprehensive review. *Plants*, 11: 1620.
- Wakasa Y, Takaiwa F (2013): Seed Storage Proteins. In: Maloy, S., Hughes, K., (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2nd Editon, Academic Press, San Diego, pp. 346-348.
- Wang, J., Zhang, Y., Zhou, L., Yang, F., Li, J., Du, Y., Liu, R., Li, W., Yu, L. (2022): Ionizing radiation: effective physical agents for economic crop seed priming and the underlying physiological mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 23:15212.
- Wang, S. S., Liu, J. M., Sun, J., Sun, Y. F., Liu, J. N., Jia, N., Dai, X. F. (2019): Diversity of culture-independent bacteria and antimicrobial activity of culturable endophytic bacteria isolated from different *Dendrobium* stems. *Scientific reports*, 9: 10389.
- Wang, C, Wang, N., Zhu, J., Liu, Y., Xu, X., Niu, S., Yu, G., Han, X., He, N. (2018): Soil gross N ammonification and nitrification from tropical to temperate forests in eastern China. *Functional Ecology*, 32: 83-94.
- Wani, P. A., Khan, M. S., Zaidi, A. (2007): Co inoculation of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria to promote growth, yield, and nutrient uptake in chickpea. *Acta Agronomica Hungarica*, 55: 315-323.
- Wani, S. A., Chand, S., Ali, T. (2013): Potential use of *Azotobacter chroococcum* in crop production: an overview. *Current Agriculture Research Journal*, 1: 35-38.

Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I. H., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G. V., Vanderleyden, J., De Mot, R., Lugtenberg, B. J. (2002): Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15: 1173-80.

Wei, A. A. Q. (2020): The effect of temperature on microorganisms' growth rate. *The Expedition*, 10: 10079168.

Weng, J., Wang, Y., Li, J., Shen, Q., Zhang, R. (2013): Enhanced root colonization and biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by *abrB* gene disruption. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 8823-8830.

Wenke, K., Kai, M., Piechulla, B. (2010): Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. *Planta*, 231: 499-506.

Wheatley, R. M., Poole, P. S. (2018): Mechanisms of bacterial attachment to roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 42: 448-461.

Whipps, J. M. (1990): Carbon economy. In: Lynch, J. M. (Ed.), *The rhizosphere*. John Wiley & Sons, New York, pp. 59-97.

Whipps, J. M. (2001): Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52(Special issue): 487-511.

Widder, S., Allen, R. J., Pfeiffer, T., Curtis, T. P., Wiuf, C., Sloan, W. T., Cordero, O. X., Brown, S. P., Momeni, B., Shou, W., Kettle, H., Flint, H. J., Haas, A. F., Laroche, B., Kreft, J. U., Rainey, P. B., Freilich, S., Schuster, S., Milferstedt, K., van der Meer, J. R., Großkopf, T., Huisman, J., Free, A., Picioreanu, C., Quince, C. et al. (2016): Isaac Newton Institute Fellows; Soyer OS. Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 10: 2557-2568.

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Kan, J. A. (2007): *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8: 561-80.

Wright, B., Rowse, H. R., Whipps, J. M. (2003): Microbial populations on seeds during drum and steeping priming. *Plant and Soil*, 255: 631-640.

Wu, S. C., Cheung, K. C., Luo, Y. M. (2006): Effects of inoculation of plant growth promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. *Environmental Pollution*, 140: 124-135.

Wu, Y. N., Feng, Y. L., Pare, P. W., Chen, Y. L., Xu, R., Wu, S., Wang, S. M., Zhao, Q., Li, H. R., Wang, Y. Q., Zhang, J. L. (2016): Beneficial soil microbe promotes seed germination, plant growth and photosynthesis in herbal crop *Codonopsis pilosula*. *Crop and Pasture Science*, 67: 91-98.

Xu, D., Watahiki, K. M. (2020): Phytohormone-mediated homeostasis of root system architecture. In: Gonzales, A., Rodriguez, M., Saglom, N. G. (Eds.), *Plant science-structure, anatomy and physiology in plants cultured in vivo and in vitro*, IntechOpen, London, UK, pp. 21-31.

- Xun, W., Shao, J., Shen, Q., Zhang, R. (2021): Rhizosphere microbiome: functional compensatory assembly for plant fitness. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19: 5487-5493.
- Yadav, S. K., Singh, S., Singh, H. B., Sarma, B. K. (2017): Compatible rhizosphere-competent microbial consortia adds value to the nutritional quality in edible parts of chickpea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(30): 6122-6130.
- Yamagiwa, Y., Inagaki, Y., Ichinose, Y., Toyoda, K., Hyakumachi, M., Shiraishi, T. (2011): *Talaromyces wortmannii* FS2 emits β -caryophyllene, which promotes plant growth and induces resistance. *Journal of General Plant Pathology*, 77: 336-341.
- Yildirim, K. C., Canik Orel, D., Okyay, H., Gursan, M. M., Demir, I. (2021): Quality of immature and mature pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds in relation to bio-priming with endophytic *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. *Horticulturae*, 7: 75.
- Yousefi, S., Kartoolinejad, D., Bahmani, M., Naghdi, R. (2017): Effect of *Azospirillum lipoferum* and *Azotobacter chroococcum* on germination and early growth of hopbush shrub (*Dodonaea viscosa* L.) under salinity stress. *Journal of Sustainable Forestry*, 36: 107-120.
- Yu, P., Hochholdinger, F. (2018): The role of host genetic signatures on root-microbe interactions in the rhizosphere and endosphere. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1896.
- Yuan, J., Zhang, N., Huang, Q., Raza, W., Li, R., Vivanco, J.M., Shen, Q. (2015): Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. *Scientific Reports*, 5:13438.
- Zhang, C., Yu, Z., Zhang, M., Li, X., Wang, M., Li, L., Li, X., Ding, Z., Tian, H. (2022): *Serratia marcescens* PLR enhances lateral root formation through supplying PLR-derived auxin and enhancing auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 73: 3711-3725.
- Zhang, H., Kim, M. S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M. A., Ryu, C. M., Allen, R., Melo, I. S., Paré, P. W. (2007): Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, 226: 839-51.
- Zhang, H., Xie, X., Kim, M. S., Korniyev, D. A., Holaday, S., Paré, P. W. (2008): Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. *Plant Journal*, 56: 264-273.
- Zhang, X., Baars, O., François, M. M. (2019): Genetic, structural, and functional diversity of low and high-affinity siderophores in strains of nitrogen fixing *Azotobacter chroococcum*. *Metallomics*, 11: 201-212.
- Zhang, X., Yarema, K., Xu, A., Zhang, X., Yarema, K., Xu, A. (2017a): Impact of static magnetic field (SMF) on microorganisms, plants and animals. In: Zhang, V., Yarema, K., Xu, A. (Eds.), *Biological effects of static magnetic fields*, Springer Nature, Singapore, pp. 133-172.
- Zhang, X., Yarema, K., Xu, A. (2017b): *Biological effects of static magnetic fields*. Springer Nature, Singapore, ISBN(e-book): 9789811035791, ISBN(print): 9789811035777, pp. 1-220.

Zhao, C., Liu, B., Piao, S., Wang, X., Lobell, D. B., Huang, Y., Huang, M., Yao, Y., Bassu, S., Ciais, P. and Durand, J. L. (2017): Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114: 9326-9331.

Zheng, Y., Xie, Z., Gao, Y., Jiang, L., Xing, X., Shimizu, H., Rimmington, G.M. (2005): Effects of light, temperature and water stress on germination of *Artemisia sphaerocephala*. *Annals of Applied Biology*, 146: 327-335.

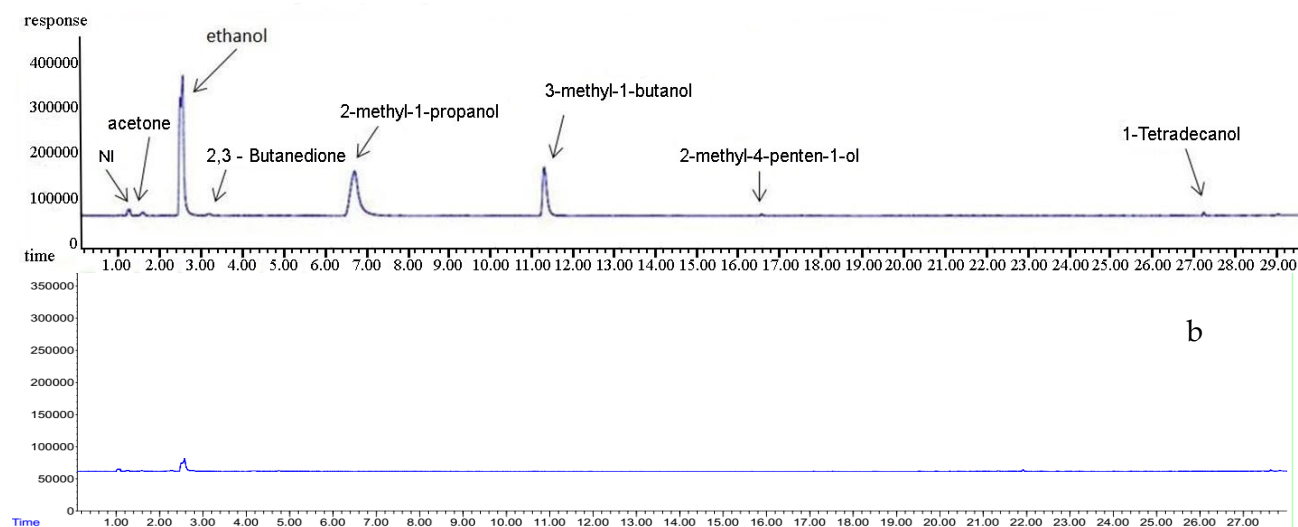
Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczarski, D., Higley, P., Vidaver, A. K. (2002): Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2198-2208.

Zongzheng, Y., Xin, L., Zhong, L., Jinzhao, P., Jin, Q., Wenyan, Y. (2009): Effect of *Bacillus subtilis* SY1 on antifungal activity and plant growth. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2: 55-61.

8. PRILOZI

8.1. Hromatografski prikaz pikova identifikovanih organskih isparljivih jedinjenja metabolisanih od strane *A. chroococcum* F8/2

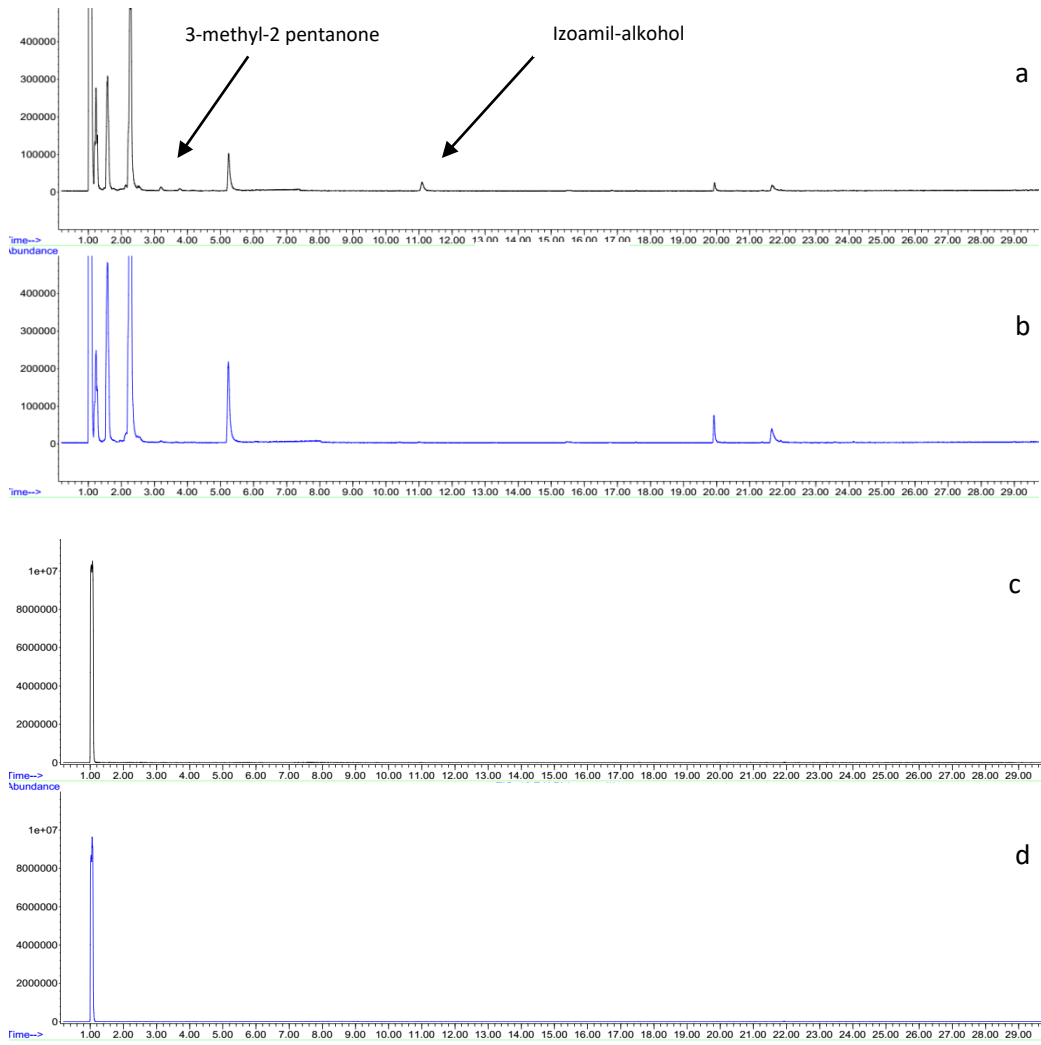
a



b

Grafik 3. Hromatografski prikaz pikova identifikovanih organskih isparljivih jedinjenja metabolisanih od strane *A. chroococcum* F8/2: a) inokulisan medijum po Fjodorovu b) kontrola-neinokulisan medijum po Fjodorovu

8.2. Hromatografski prikaz pikova identifikovanih organskih isparljivih jedinjenja metabolisanih od strane *Bacillus megaterium* 11/3



Grafik 4. Hromatografski prikaz pikova identifikovanih organskih isparljivih jedinjenja metabolisanih od strane *Bacillus megaterium* 11/3: a) inokulisan TSB medijum; b) kontrola-neinokulisan TSB; c) inokulisan zemljišni ekstrakt; d) kontrola-neinokulisan zemljišni ekstrakt

Biografija kandidata

Slavica Kerečki rođena je 1967. godine u Zemunu. 1991. diplomirala na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu, na odseku zootehnika, na temu „Uloga i mehanizam delovanja hormona“, ocenom 10. 2014. upisala master studije na studijskom programu Zaštita životne sredine u poljoprivredi na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu i završila 2015. odbranom teme „Mikrobiološki kvalitet komposta dobijenog od duvanskog otpada“, ocenom 10. Doktorske akademske studije upisala 2015. godine na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu, studijski program Zemljište i melioracije, uža naučna oblast Ekološka mikrobiologija.

IZJAVA O AUTORSTVU

Ime i prezime autora: Slavica Kerečki
Broj indeksa: ML 150012

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Mikrobiološki tretman semena u održivoj biljnoj proizvodnji

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

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Slavica Kerečki

Broj indeksa: ML 150012

Studijski program: Zemljište i melioracije

Naslov rada: Mikrobiološki tretman semena u održivoj biljnoj proizvodnji

Mentori: Dr Vera Raičević, redovan profesor

Dr Jelena Jovičić-Petrović, vanredan profesor

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna štampanoj elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, _____

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku “Svetozar Marković” da u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Mikrobiološki tretman semena u održivoj biljnoj proizvodnji

kao moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje. Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
- ④ 4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

Potpis autora

U Beogradu, _____

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda