

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

dipl. inž. Saud R. Hamidović

**MIKROBIOLOŠKA AKTIVNOST
OŠTEĆENIH ZEMLJIŠTA NA
LOKACIJAMA RUDNIKA MRKOG UGLJA
I BILJNO MIKROBNE INTERAKCIJE U
PROCESIMA EKOREMEDIJACIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Saud R. Hamidović, BSc

**MICROBIOLOGICAL ACTIVITY OF
DEGRADED SOILS AT LOCATION OF
BROWN COAL MINE FIELD AND PLANT
MICROBIAL INTERACTIONS IN
ECOREMEDIATION PROCESSES**

PhD thesis

Belgrade, 2014

MENTOR: _____

dr Blažo Lalević, docent

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Vera Raičević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Zoran Krivošej, redovni profesor

Prirodno matematički fakultet, Kosovska Mitrovica

dr Josip Čolo, vanredni profesor

Poljoprivredno prehrambeni fakultet, Sarajevo (Bosna i
Hercegovina)

dr Ševal Muminović, redovni profesor

Poljoprivredno prehrambeni fakultet, Sarajevo (Bosna i
Hercegovina)

DATUM ODBRANE: _____

Izražavam svoju zahvalnost mentoru Dr Blažu Laleviću na njegovoj stručnoj, drugarskoj i ljudskoj pomoći pri izradi ovog rada. Njegovo razumevanje, sposobnost da ohrabri i motiviše pomogla mi je da prevaziđem prepreke koje su se povremeno javljale.

Zahvaljujem se Dr Veri Raičević na stručnoj pomoći koju mi je pružala počev od osmišljavanja teme do realizacije rada, te na savetima i sugestijama bez kojih ovaj rad ne bi bio ono što jeste.

Zahvaljujem se Dr Josipu Čoli na razumevanju, strpljenju i stručnoj podršci tokom izrade rada.

Zahvaljujem se Dr Zoranu Krivošeju na stručnoj i savetodavnoj podršci pri izradi rada.

Zahvaljujem se Dr Ševalu Muminoviću na konsultacijama i savetima u toku izrade rada.

Zahvaljujem se Dr Draganu Kikoviću na dragocenim informacijama, sugestijama i pojašnjenjima prilikom izrade rada.

Zahvaljujem se članovima Katedre za Ekološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu na pomoći pri izradi eksperimentalnog dela rada. Posebna zahvalnost pripada laborantkinji Zlati na svesrdnoj i profesionalnoj pomoći.

Zahvaljujem se upravi Rudnika mrkog uglja „Kakanj“ koji su mi odobrili terenska istraživanja na površinskom kopu „Vrtilište“. Posebno se zahvaljujem dipl. agronomu Adnanu Tursunu na pokazanoj profesionalnosti i gostoprimstvu.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, koja je zajedno sa mnom delila svaku brigu, napor, krizu, nervozu i radost. Pokazanom strpljenju, ljubavi i požrtvovanosti ostaću zauvijek dužan.

Večnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima. Njihova briga, ljubav i podrška ostaće stalno uz mene.

MIKROBIOLOŠKA AKTIVNOST OŠTEĆENIH ZEMLJIŠTA NA LOKACIJAMA RUDNIKA MRKOG UGLJA I BILJNO MIKROBNE INTERAKCIJE U PROCESIMA EKOREMEDIJACIJE

Rezime

Rudnik mrkog uglja “Kakanj” je jedan od najstarijih rudnika u Bosni i Hercegovini. Eksploatacija uglja na teritoriji današnjeg basena Kakanj potiče još iz perioda austrougarske vladavine. Godišnja proizvodnja od nekoliko miliona tona mrkog uglja doprinela je razvoju ovog dela Bosne i Hercegovine. Međutim, eksploatacija uglja dovela je i do negativnih posledica po životnu sredinu, odnosno kontaminacije zemljišta, vazduha i vode, kao i do smanjenja biodiverziteta. U isto vreme, aktivnosti tokom eksploatacije uglja dovode do nastanka velike količine otpadnog materijala koji se odlaže na površinu zemljišta. Degradacija zemljišta, usled intenzivne eksploatacije uglja, je jedna od karakteristika ovog područja i vodi ka formiranju zemljišta sa niskim proizvodnim kapacitetom. Zbog ovakvih uslova, neophodno je izvršiti obnavljanje zemljišta. Tehnologije zasnovane na aktivnosti biljaka i mikroorganizama su pogodne za poboljšavanje kvaliteta degradiranih površina. Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje mikrobioloških osobina degradiranih ekosistema, mikrobnog i biljnog diverziteta i njihove interakcije u ekoremedijacionim tehnologijama na području rudnika mrkog uglja “Kakanj”. Istraživanja na ovom području obavljena su 2011, 2012 i 2013. godine na tri lokacije: Vrtlište 1, Vrtlište 2 i Stara jama i jama Haljinići. Determinacija biljnih vrsta izvršena je pomoću ključa za identifikaciju, dok su mikrobiološke i hemijske karakteristike i enzimska aktivnost određeni standardnom metodologijom.

Rezultati pokazuju dominaciju vrsta iz familije *Asteraceae*, koje imaju najveći uticaj na očuvanje prirodnog vegetacionog pokrivača. Najveći broj biljnih vrsta je zabeležen 2013. godine. U najvećem broju uzoraka, brojnost bakterija je veća u rizosferi u poređenju sa zonom zemljišta. Ukupan broj bakterija i broj amonifikatora je u najvećem broju uzoraka bio veći u poređenju sa ostalim grupama bakterija (oligonitrofilni i *Azotobacter* sp.). Zastupljenost gljiva u najvećem broju uzoraka je veći u

odnosu na broj aktinomiceta. Najmanja mikrobiološka aktivnost je bila u jalovini. U najvećem broju uzoraka, dehidrogenazna aktivnost bila je najveća u uzorcima gde je bio i najveći ukupan broj bakterija.

Dodavanje zemljišta jalovini rezultiralo je većom mikrobiološkom aktivnošću ispitivanih supstrata. Takođe, inokulacija supstrata čistim kulturama i mešanim bakterijskim populacijama *Bacillus* sp. uticala je na povećanje stepena klijavosti semena, kao i suve i sveže biomase klijanaca.

Ovi rezultati mikrobiološke aktivnosti zemljišta i biljno-mikrobnog diverziteta na području rudnika mrkog uglja "Kakanj" su veoma značajni za obnavljanje ekosistema uništenog eksploatacijom uglja i mogu biti korisni sa aspekta upotrebe bakterijskih populacija u unapređenju ekoremedijacionih tehnologija, kao i za formiranje prirodnog ekosistema na lokacijama rudnika mrkog uglja "Kakanj".

Ključne reči: Biljni diverzitet, mikrobni diverzitet, ekoremedijacija, bakterijske populacije

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Melioracije zemljišta

UDK: 631.484 (043.2)

MICROBIOLOGICAL ACTIVITY OF DEGRADED SOILS AT LOCATION OF BROWN COAL MINE FIELD AND PLANT MICROBIAL INTERACTIONS IN ECOREMEDIATION PROCESSES

Summary

Coal mine “Kakanj” is one of the ancient coal fields in Bosnia and Herzegovina. The coal exploitation on the territory of today`s Kakanj basin has lasted from the Austro-Hungarian period. The annual productivity of millions of tons of brown coal has enabled the development of the this region of Bosnia and Herzegovina. However, coal exploitation lead to negative consequences of environments, i.e. soil, air and water pollution and biodiversity loss. In the same time, activities during the coal exploitation generate a big amount of waste, which is deposited at the soil surface. Soil degradation, due to intensive coal exploitation is one of the characteristics of this area and leads to the formation of the soils of the lower land capability class. Because of harsh condition, these lands require reclamation. Plant-microbe-based technologies are suitable for improvement of environmental quality of degraded landscapes. The aim of this PhD thesis is determination of microbiological properties of degraded ecosystems, microbial and plant diversity and their`s interactions in ecoremediation technologies in coal mine field “Kakanj”. Investigations in this region were performed in 2011; 2012; and 2013 at three location: Vrtlište 1; Vrtlište 2; and Stara jama i jama Haljinići. Determination of plant species was conducted using the identification key, while microbial properties and enzyme activity was determined using the standard methodology.

The results show the domination of *Asteraceae* species, which had the most important effect on natural vegetation restoration. The higher plant species number was recorded in 2013. In most of samples, bacterial number was higher in rhizosphere compared with bulk soil. Total bacterial number and number of ammonification bacteria in most of samples was higher compared with other groups of bacteria (diazotrophs and *Azotobacter* sp.). Abundance of fungi in most of samples was higher compared with actinomycetes number. The lowest microbial activity was detected in barren soil. In most of samples, dehydrogenase activity was in correlation with total bacterial number.

Addition of soil to barren soil resulted in higher microbiological activity of examined substrates. Also, inoculation of substrates with pure cultures and mixed bacterial populations of *Bacillus* sp. leads to the increasing of germination rate of seeds, as well as dry and wet biomass of seedlings.

This results of microbiological activity of soil and plant-microbial diversity in coal mine field “Kakanj” are important for restoration of mining activities-degraded ecosystem and can be useful for using of bacterial populations in improvement of ecoremediation technologies, as well as formation of natural ecosystems at location of coal mine field “Kakanj”.

Key words: Plant diversity, microbial diversity, ecoremediation, bacterial populations

Scientific field: Biotechnical sciences

Major scientific field: Soil management

UDK: 631.484 (043.2)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Biljne zajednice i obnova područja pod eksploatacijom uglja.....	5
2.2. Mikrobne populacije na područjima pod eksploatacijom uglja.....	8
2.3. Značaj rizosfere i biljno-mikrobnih interakcija u narušenim ekosistemima..	12
2.4. Dosadašnja istraživanja na području rudnika mrkog uglja „Kakanj“	14
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	16
4. MATERIJAL I METODE RADA	18
4.1. Opšte karakteristike područja rudnika mrkog uglja „Kakanj“	18
4.1.1. Klimatske karakteristike.....	18
4.1.1.1. Temperatura vazduha	18
4.1.1.2. Padavine i relativna vlažnost vazduha.....	19
4.1.2 Pedološke karakteristike.....	20
4.2. Uzimanje uzoraka zemljišta, rizosfere i jalovine.....	20
4.3. Hemijska karakterizacija zemljišta i jalovine.....	21
4.4. Determinacija biljnih vrsta.....	22
4.5. Mikrobni diverzitet zemljišta, rizosfere i jalovine.....	23
4.6. Enzimaska aktivnost zemljišta, rizosfere i jalovine.....	27
4.7. Izolacija i identifikacija mikroorganizama.....	28
4.7.1. Izolacija i identifikacija bakterija.....	28
4.7.1.1. Identifikacija bakterija primenom API testa.....	28
4.7.1.2. Identifikacija bakterija molekularnim metodama	29
4.7.2. Izolacija i identifikacija gljiva	30
4.8. Rast biljaka na supstratima.....	31
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	33
5.1. Hemijske karakteristike zemljišta i jalovine.....	33
5.2. Determinacija biljnih vrsta.....	36
5.3. Mikrobni diverzitet i enzimaska aktivnost u zemljištu i rizosferi.....	50
5.3.1. Mikrobni diverzitet u zemljištu i rizosferi u periodu od 2011-2013. godine	50

5.3.2. Enzimaska aktivnost zemljišta i rizosfere u periodu od 2011-2013. godine.....	61
5.4. Mikrobni diverzitet i enzimaska aktivnost jalovine u periodu od 2011-2013. godine	64
5.5. Izolacija i identifikacija mikroorganizama	67
5.5.1. Izolacija i identifikacija bakterija	67
5.5.1.1. Identifikacija bakterija API testom i molekularnim metodama	69
5.5.2. Izolacija i identifikacija gljiva	70
5.5.2.1. Opis identifikovanih gljiva	72
5.6. Mikrobiološka aktivnost i rast biljaka na supstratima	73
5.6.1. Mikrobiološka aktivnost supstrata	73
5.6.2. Klijavost semena, sveža i suva biomasa klijanaca na supstratima.....	81
6. DISKUSIJA.....	87
6.1. Diverzitet biljnih vrsta na oštećenim ekosistemima.....	88
6.2. Mikrobni diverzitet u oštećenim zemljištima i rizosferi biljaka.....	90
6.3. Biljno-mikrobne interakcije u popravci oštećenih zemljišta.....	99
7. ZAKLJUČAK.....	103
LITERATURA.....	106

1. UVOD

Proizvodnja energije u savremenom svetu postala je prioritet današnjice, a samim tim i rudnici uglja a i ugalj kao sirovina dobili su na važnosti. Na teritoriji Federacije Bosne i Hercegovine postoji devet aktivnih rudnika uglja. Jedan od najvećih je rudnik mrkog uglja „Kakanj“, koji neprestano radi više od stotinu godina.

Ležište uglja zauzima prostor od oko 450 ha, u obliku nepravilne elipse. Ovaj rudnik raspolaže sa ukupnim geološkim rezervama uglja od 435.050.000 tona od čega 246.400.000 tona su bilansne. Proizvodnja uglja se zasniva na dva rudnika. Podzemna eksploatacija uglja se obavlja u pogonu Stara jama i jama Haljinići, a površinska eksploatacija u pogonu Vrtlište. Oko 90% proizvodnje se isporučuje TE Čatići u Kaknju. Postojeći kapaciteti u podzemnoj i površinskoj eksploataciji uglja omogućavaju proizvodnju od 1.150.000. tona godišnje. Eksploatacione rezerve u rudniku Kakanj iznose 173.210.000 tona uglja.

Podzemna i površinska eksploatacija uglja, prerada i transport u rudniku „Kakanj“, pored razvoja i prosperiteta ovog kraja, dovele su nužno i do negativnog uticaja na životnu sredinu. Decenijskim neplanskim iskopavanjem rude mrkog uglja, nepovratno je uništeno na stotine hektara prirodnih travnjaka i oraničnih površina, dok je kontaminirano i degradirano daleko više prirodnih zemljišnih površina na lokacijama gde se odlaže otkrivka. Koeficijent otkrivke u rudniku Vrtlište je $5,8 \text{ m}^3 \text{ s.m./t}$, a otpadna glina se odvaja od uglja i transportuje do odlagališta.

Otpad koji se generiše u rudniku se klasifikuje kao komunalni i tehnološki otpad. Ovaj otpad se odvozi transportnim sredstvima na mesta za odlaganje i na taj način zauzima nove površine zemljišta što predstavlja dodatni ekološki i ekonomski problem. Tokom transporta vrši se dodatna destrukcija i kontaminacija značajnih zemljišnih površina. Ovakva eksploatacija dovela je do negativnog uticaja na životnu sredinu, pre svega na kvalitet površinskih i podzemnih voda, vazduha, zemljišta, ali i zdravlja ljudi. Najizraženiji poremećaji ekosistema su na površinama gde se vrši površinska eksploatacija, odlaže otkrivka i odlagalištima otpada nastalog nakon tehnološke obrade uglja. Sve preduzete radnje indirektno ili direktno dovode do estetskih promena, poremećaja stabilnosti biocenoze i degradacije staništa. Pored toga, destrukcija ekosistema izazvana aktivnostima u rudniku ima za posledicu uklanjanje

biološki aktivnog površinskog sloja zemljišta, mešanja sa manje plodnim zemljištem, čime se pogoršava njegov nutritivni kapacitet i uslovi za razvoj biomase. Aktivnosti u rudniku, takođe, uslovljavaju i poremećaje u protoku podzemnih i površinskih voda, kao i kontaminaciju vodenih ekosistema i vazduha. Poremećaji u funkciji ekosistema uočavaju se pre svega u smanjenju biodiverziteta u zemljištu.

Spontani razvoj biljne vegetacije u oštećenim ekosistemima je otežan i spor. Stoga je neophodno preduzeti različite mere koje će doprineti većoj brojnosti i aktivnosti mikrobnih populacija, ubrzanom rastu biljaka na ispitivanom lokalitetu i uspostavljanju normalnog procesa kruženja nutritijenata.

Imajući u vidu specifičnost ovog basena, njegovo istorijsko zagađenje kao i obimnost degradiranih zemljišnih površina, u zadnjih dvadesetak godina, pristupilo se merama rekultivacije. Primenjene su konvencionalne (hemijske, fizičke i dr.) metode za popravku degradiranih zemljišta i voda. Međutim, primena tih metoda ne samo da je zahtevala značajna finansijska sredstva i da nije bila efikasna, već je dovela do povećanja kontaminacije ili nepopravljivog oštećenja kako starih tako i novih zemljišnih i vodenih površina. Uzimajući u obzir mogućnosti (tehničke i finansijske), iskustva iz Evropske Unije i drugih razvijenih zemalja ukazuju da se primenom ekoremedijacionih tehnologija mogu postići zadovoljavajući rezultati. Ekoremedijacione tehnologije podrazumevaju primenu mikroorganizama i biljaka u cilju stabilizacije biocenoze i povratka narušenog ekosistema što je moguće više u prvobitno stanje. U ovom procesu glavna uloga pripada autohtonim mikroorganizmima i samoniklim biljkama sa oštećenih lokacija. U uslovima koji vladaju u oštećenim zemljištima autohtoni zemljišni mikroorganizmi, adaptirani na ekološke uslove, ubrzano uspostavljaju stabilan nutritivni ciklus, neophodan za rast biljaka tj. za obnavljanje vegetacionog pokrivača. S druge strane, biljni pokrivač koji se razvija u ovim uslovima akumulira hranljive materije koje nakon izumiranja biljaka dospevaju u zemljište i postaju dostupne mikrobnim populacijama. Na ovaj način uz obostranu korist povećava se brojnost i aktivnost i jednih i drugih „činilaca“ a rezultat je ubrzan proces oporavka plodnosti i stabilizacija zemljišnog ekosistema. Zbog toga, ekoremedijacione tehnologije zasnovane na biljno-mikrobnim interakcijama, predstavljaju efikasne, ekonomski isplative i ekološki opravdane metode u poređenju sa drugim konvencionalnim tehnikama i zauzimaju značajno mesto u rekultivaciji ekosistema oštećenih dugogodišnjom eksploatacijom

uglja. Neophodan preduslov za uspešnu primenu ekoremedijacionih tehnologija jeste poznavanje biljnog diverziteta, mikrobiološke aktivnosti i njihovog međusobnog odnosa u oštećenim ekosistemima.

2. PREGLED LITERATURE

Poremećaj ekosistema može se definisati kao pojava ili serija pojava koje menjaju odnose između organizama i njihove okoline u prostoru i vremenu. Ovi poremećaji izazvani aktivnostima u rudnicima su negativna odlika industrijalizacije i urbanizacije. Usled povećanja potrošnje fosilnih goriva kao značajnog izvora energije na svetskom nivou, uglj polako preuzima funkciju primarnog energetskeg izvora. Međutim, aktivnosti vezane za eksploataciju uglja uslovile su poremećaje u flori, fauni, hidrološkom ciklusu i biološkm procesima u zemljištu (Sarma, 2005). Bašić i sar. (1993) konstatuju da svaka namena zemljišta zahteva njegov odgovarajući kvalitet, a svaka promena osobina zemljišta utiče na njegovu namenu. Promene osobina zemljišta, gubitak njegove plodnosti i drugih karakteristika, Martinović (1997) definiše kao degradacija ili oštećenje zemljišta, usled čega opada produktivna sposobnost zemljišta, što se odražava i na porast biljaka (Bertović, 2010).

Iako eksploatacija uglja čoveku omogućava dobijanje energetskeg materijala, ona je direktno uticala i utiče na seriju ekoloških problema. Ovi problemi su multipolarni, jer uključuju kontaminaciju vode, zemljišta, atmosfere, ali i izazivaju određene zdravstvene probleme kod radnika koji su direktno izloženi procesima tokom eksploatacije (Bai i sar., 2007). Krajnji rezultat aktivnosti eksploatacije uglja je otpad i uništavanje zemljišta. Osim toga što destruktivno deluje na zemljišne horizonte i strukturu, mikrobiološku aktivnost i ciklus biogenih elemenata, otpad utiče i na destrukciju vegetacionog pokrivača i zemljišnog profila (Kundu i Ghose, 1997), odnosno kompletno pogoršavanje kvaliteta zemljišta. Eksploatacija uglja izaziva kontaminaciju zemljišta teškim metalima (Horvat i sar., 2003). Istovarivanjem čvrstog otpada nastalog tokom eksploatacije uglja može trajno dovesti do unošenja polutanata u zemljište. To se, pre svega, odnosi na teške metale (Zhang i sar., 2010), ali i na neka jedinjenja koja ne postoje u prirodi već nastaju kao rezultat aktivnosti čoveka. Tu spadaju neka organohlorna jedinjenja (Jung i Thornton, 1997), policiklični aromatični ugljovodonici (Wang i sar., 2009) itd.

2.1. Biljne zajednice i obnova područja pod eksploatacijom uglja

Očuvanje biodiverziteta je jedan od najvažnijih zadataka u obnavljanju ekosistema i može se definisati kao manipulacija organizmima i ekološkim procesima u cilju stvaranja održivog i prirodnog ekosistema, što sličnijeg onom koji je postojao pre poremećaja nastalih ljudskim aktivnostima (Allen i sar., 2001). Uništavanje biljnog pokrivača tokom eksploatacije uglja praćeno je konstantnim gubitkom ekosistema. Različiti neplodni materijali, koji nastaju tokom različitih aktivnosti u rudnicima, dospevaju do površina u okviru i van rudnika. Ovakve površine nemaju povoljne uslove za rast biljaka. S obzirom da je prirodna kolonizacija veoma spor proces, revegetacija i druge strategije obnove ekosistema imaju poseban značaj u obnavljanju i poboljšanju uslova na ovim terenima (Sarma, 2005). To se najčešće čini uvođenjem individualnih vrsta retkih biljaka ili velikog broja biljnih vrsta (Bowles i Whelan, 1994; Falk i sar., 1996). Međutim, stvaranje ovakvih uslova je izuzetno teško zbog konstantnog porasta ljudske populacije, globalne invazije egzotičnih biljnih vrsta, eutrofikacije, intenzivne urbanizacije i poljoprivredne proizvodnje itd. Zbog toga se češće primenjuje introdukcija velikog broja vrsta u cilju iniciranja sukcesija i obnavljanja uništenih područja.

Na područjima pod direktnim uticajem eksploatacije uglja uslovi za rast i razvoj biljaka su veoma nepovoljni. Jedan od najznačajnijih ograničavajućih činilaca za rast biljaka je kiselost. Ekstremna kiselost se najčešće pojavljuje kao rezultat oksidacije pirita (Chadwick, 1973). U slučaju višegodišnje ekstremne kiselosti dolazi do gubitka biljnog pokrivača (Costigan i sar., 1981). Osim toga, visok sadržaj pristupačnih formi Fe, Al i Mn (Sarma, 2005), nizak sadržaj organske materije (Schafer i sar., 1980), vlažnost i zbijenost zemljišta (Richardson, 1975) takođe utiču na stvaranje nepovoljnih uslova za rast biljaka.

Ispitivanje ekoloških parametara rudnika uglja je predmet intenzivnih proučavanja širom sveta (Rodrigues i sar., 2004; Freitas i sar., 2004; Wiegleb i Felink, 2001; Grant, 2003; Bell i sar., 2001). Međutim, intenzivna ispitivanja florističkog sastava ovih područja vršena su još 80-ih godina 20. veka (Richardson i sar., 1971; Dancer i sar., 1977; Moore i Zimmermann, 1977). Saxena (1979) objavio je listu biljnih vrsta za revegetaciju kopova u Radžastanu (Indija), dok je Prasad (1989) takođe ukazao

na bolji rast nekih biljaka (*Dalbergia sisso*, *Albizia procera*, *Pongamia pinnata*) na lokacijama gde se vrši eksploatacija rude gvožđa. Đorđević-Miloradović i Đulaković (1997) su ispitivajući jalovine ugljenog basena „Kostolac“ utvrdili da već u prvoj godini počinje spontana rekolonizacija biljaka na jalovinama. U početnim fazama nastanka biljnih zajednica dominiraju *Tusillago farfara* L., *Lactuca seriola* L. i *Matricaria inodora* L. Broj biljnih vrsta u funkciji vremena se povećavao, tako da je nakon 5 godina detektovano 56 vrsta, od kojih su najznačajnije *Chenopodium album* L., *Erigeron canadensis* L., *Bromus arvensis* L., *Trifolium repens* L. itd. Međutim, nakon 7-8 godina menja se floristički sastav zajednice, uz drastično opadanje broja vrsta. Na spontanu rekolonizaciju jalovine ukazuju i Motorina i sar. (1980), koji razlikuju 3 etape obrazovanja ekosistema: 1-5(7) godina, 7-15 godina i 15-20 godina. Svaka etapa praćena je razvojem specifičnih biljnih vrsta, odnosno biljnih zajednica.

Proces prilagođavanja biljnih zajednica na različitim terenima usko je vezan za ekološke parametre. Uslovi koji vladaju na određenim lokacijama daju informacije o uslovima za potencijalno uspevanje biljaka. Ovde svakako spadaju vremenski uslovi, postojeća vegetacija, karakteristike terena (MacDougall i sar., 2008; Stohlgren i sar., 1999; Burke i sar., 1998) itd. Određene biljne vrste se odlikuju karakteristikama koje im omogućavaju opstanak i razmnožavanje u specifičnim uslovima staništa (Walker i sar., 2006). Dakle, biljne zajednice koje samoniklo uspevaju na specifičnim lokacijama predstavljaju populaciju koja je u većoj ili manjoj meri tolerantna na postojeće uslove staništa (Holdaway i Sparrow, 2006). Međutim, ove populacije nisu apsolutno statične; ekološki uslovi se menjaju, menjajući pri tom i ekološku nišu za date lokacije. Ove promene izazivaju porast broja ekotipova i ekoregiona, čime se povećava mogućnost pojave novih vrsta (Stanton-Kenedy, 2008).

Biljne sukcesije označavaju promene u sastavu i strukturi biljnih zajednica u funkciji vremena i na terenima pod eksploatacijom uglja se mogu podstaći različitim tehnologijama (Bradshaw, 2000). Na ovim područjima rast biljaka je veoma značajan za formiranje i razvoj zemljišta. Prisustvo vegetacije na lokacijama sa intenzivnom eksploatacijom uglja značajno poboljšava karakteristike zemljišta u poređenju sa lokacijama bez biljnog pokrivača (Carter i Ungar, 2002). Za ovakva specifična područja, biljke imaju veliki značaj u intenziviranju mineralizacije i mikrobiološke aktivnosti (Berendse, 1998; Van Breemen i Finzi, 1998). Osim toga, prisustvo

vegetacije utiče na strukturu zemljišta, stabilnost agregata, akumulaciju organskih materija i vodni režim (Angers i Caron, 1998). Međutim, biljke za koje se utvrdi da su pogodne za obnavljanje ekosistema, mogu uticati na sporiji razvoj prirodnog biljnog pokrivača (Leps i sar., 2007; Hodačova i Prach, 2003), tako da ne dolazi do zadovoljavajućeg razvoja biljnog pokrivača (Martinez-Ruiz i Marrs, 2007). Sa druge strane, i u nepovoljnim sredinama, dolazi do stvaranja ekoregiona malih dimenzija u kojima je izražena ekspanzija vegetacije i smena biljnih populacija (Campbell i sar., 1990).

Aktivnost čoveka značajno utiče na sastav i strukturu biljnih zajednica (Bernhardt-Romermann i sar., 2006; Hill i Pickering, 2006). Stres kojem je biljni pokrivač izložen i promena uslova u zemljištu stvaraju mogućnost za invaziju drugih biljnih vrsta i kompeticiju za hranljivim materijama sa prirodnom vegetacijom (Bartuszevige i sar., 2007; Barthram i sar., 2005). Invazijom ovih biljaka sprečava se preživljavanje arbuskularne mikorize i drugih mikroorganizama (Jasper i sar., 1989) značajnih za biogeochemijske cikluse u zemljištu (Enkhtuya i sar., 2005). Usled dominacije invazivnih u odnosu na prirodne biljne vrste, otežano je formiranje prirodnog biljnog pokrivača (Batten i sar., 2008). Zbog toga se povećanje prirodnog biodiverziteta smatra uspešnom barijerom protiv invazivnih vrsta, pri čemu se eliminišu uslovi pogodni za njihovu pojavu (Kennedy i sar., 2002). MacDougall i sar. (2008) konstatuju da je uklanjanje invazivnih vrsta i sistematska introdukcija prirodne vegetacije neophodno za očuvanje ekosistema.

Biljne vrste različito utiču na karakteristike zemljišta, njegov potencijal za obnavljanjem (Mitchell i sar., 1997) i stvaraju uslove za razvoj drugih biljnih vrsta (Hobbie i sar., 2007). Uvođenje biljnih vrsta, posebno poljoprivrednih, je često korišćena metoda za obnavljanje područja, pri čemu se mogu koristiti i vrste koje poboljšavaju fizičke, hemijske i biološke karakteristike zemljišta. Ispitivanje florističkog sastava pruža značajne informacije koje mogu poslužiti za poređenje sastava i strukture biljnih zajednica u različitim vremenskim periodima (Stanton-Kennedy, 2008).

2.2. Mikrobne populacije na područjima pod eksploatacijom uglja

U poređenju sa biljkama, mikroorganizmi se znatno razlikuju i predstavljaju poseban izazov u razumevanju značaja biodiverziteta u procesima restauracije ekosistema. Mikroorganizmi su temelji svake diskusije o biodiverzitetu i predstavljaju osnovu svakog diverziteta svake lokacije svakog ekosistema. Mikroorganizmi su glavni činilac restauracije narušenih ekosistema. Bez životinja i biljaka, oporavak i funkcionisanje ekosistema se može ostvariti, ali bez mikroorganizama ekosistem prestaje da funkcioniše i postoji (Allen i sar., 2001).

Mikrobiološka aktivnost zemljišta se koristi kao parametar biodiverziteta i ekoloških procesa (Society for Ecological Restoration, 2002) na područjima pod intenzivnom eksploatacijom uglja. U ovom kontekstu, postoje dva osnovna pristupa u cilju uspešnog obnavljanja ekosistema. To su povratak uslova u stanje koje je prethodilo eksploataciji uglja i maksimalno funkcionisanje ekosistema (Harris, 2003). Prednost primene mikroorganizama ogleda se u većoj osetljivosti prema svim biotičkim i abiotičkim faktorima u odnosu na krupnije organizme, čime se dobija znatno jasnija slika u pogledu opšteg stanja ekosistema. Zato se mikroorganizmi vrlo često koriste za biotestove kontaminiranih terena (Strachan i sar., 2002).

Postoji veliki broj metoda za ispitivanje mikrobioloških osobina kontaminiranih zemljišta (Alef i Nannipieri, 1995). Primenom jedne od metoda često se dobija veliki broj informacija o većem broju karakteristika. U osnovi, ciljevi istraživanja su veličina, sastav i aktivnost, pri čemu se ispituje veličina kolonija mikroorganizama, prisustvo određenih fizioloških i sistematskih grupa mikroorganizama, metabolizam itd.

Konstantno funkcionisanje ekosistema je neophodno za održivost i produktivnost zemljišta u budućnosti. Poznavanje tolerancije zemljišta prema različitim procesima može omogućiti donošenje boljih odluka za generacije koje dolaze. Kapacitet zemljišta po pitanju ove tolerancije nije beskonačan, jer je zemljište živ ekosistem gde žive različite zajednice živih bića. Uz promene nivoa kontaminacije ili intenziteta drugih procesa, mnoge grupe mikroorganizama preživljavaju i nastavljaju da žive bez ikakvih posledica. Međutim, promene u diverzitetu i funkcionalnim karakteristikama mikrobnih zajednica mogu imati nesagledive posledice po kruženje biogenih elemenata, strukturu i produktivnost prirodnih biljnih zajednica. Ovakve promene mikrobnih

zajednica mogu takođe uticati i na produktivnost biljaka neophodnih za ishranu ljudi (Morgan i sar., 2005).

Ispitivanjem parametara mikrobiološke aktivnosti tokom uništavanja, obnavljanja i očuvanja ekosistema narušenih eksploatacijom uglja, mogu se dobiti validni i korisni rezultati. Insam i Haselwandter (1989) su konstatovali povećanje mikrobne biomase pri tretmanu glečera, što je bilo praćeno i razvojem biljnog pokrivača. Do sličnih rezultata došli su i Ohtonen i sar. (1999) pri tretmanu glečera u američkoj saveznoj državi Vašington. Oni ukazuju na dominantnost bakterija na nekim lokalitetima, odnosno gljiva na drugim lokalitetima. Slične trendove konstatuju i Singh i sar. (2001) na klizištima u šumama Nepala, kao i Merila i sar. (2002) ispitujući uzvišene obale zapadne Finske. Insam i Domsch (1988) su konstatovali povećanje mikrobne biomase i smanjenje sadržaja CO₂ tokom obnavljanja ekosistema narušenog eksploatacijom uglja. Do sličnih zaključaka došli su i Johnson i Williamson (1994). Harris i sar. (1989) su takođe ispitivali mikrobnu biomasu u cilju determinacije osobina površinskog sloja zemljišta tokom eksploatacije uglja i konstatovali degradaciju ovog sloja usled nagomilavanja otpadnih materijala. Harris i sar. (1993) su radili na razvoju teorijskih strategija na bazi mikrobiološke aktivnosti u cilju pravilne interpretacije dobijenih rezultata. Tako je ustanovljeno da tretman azotnih đubriva i setve trava utiče na poboljšanje hemijskog sastava uklonjenog površinskog sloja zemljišta, tako da je nakon tri godine sadržaj azota bio veći za 65% a mikrobna biomasa za 62% (Hart i sar., 1999). Ruzek i sar. (2001) konstatuju korelaciju između postupaka obnavljanja narušenog ekosistema i povećanja mikrobne biomase, pre svega usled promene sadržaja organske materije i karakteristika zemljišta. Međutim, Lukesova (2001) je konstatovala smanjenje mikrobne biomase na terenima sa intenzivnom eksploatacijom uglja u Češkoj i Nemačkoj.

Degens i Harris (1997) koristili su metode za determinisanje katabolizma mikroorganizama i konstatovali da se intenzitet disanja razlikovao u zavisnosti od karakteristika zemljišta. Schipper i sar. (2001) su istraživali narušena područja sa spontanim biljnim pokrivačem i konstatovali da se heterotrofija brzo uspostavlja nakon procesa narušavanja, ali se posle izvesnog vremena gubi, što je uslovljeno pristupačnošću hranljivih materija (Grime, 1979). Harris i Birch (1989) su pratili promene u zemljištu na lokacijama koje su obnovljene nakon eksploatacije uglja i

konstatovali povećanje enzimске aktivnosti i intenziteta nitrifikacije. Do sličnih rezultata došli su i Coyne i sar. (1998) nakon dodavanja organskog otpada zemljištu gde je eksploatisana ruda. Obnavljanje ekosistema narušenih na sličan način takođe utiče i na intenzitet drugih procesa kao što su mineralizacija (Kaye i Hart, 1998a) i disanje (Kaye i Hart, 1998b). Vance i Entry (2000) su uspeh obnavljanja jalovina pratili ispitivanjem mikrobioloških parametara i ustanovili da je ispitivanje enzimске aktivnosti znatno bolji indikator od merenja mikrobne biomase, jer bolje odlikava procese akumulacije organske materije. Yin i sar. (2000) su obavili uzorkovanje zemljišta sa više lokaliteta (pod eksploatacijom uglja, obnovljeno zemljište, nenarušene šume) u Džamari (Brazil) i konstatovali porast broja bakterija, kao i celokupnog diverziteta idući od narušenih ka nenarušenim terenima, što su povezali i sa prisustvom obnovljenog biljnog pokrivača. Literaturni podaci ukazuju i na prisustvo azotofiksatora u narušenim ekosistemima sa nedovoljno razvijenim biljnim pokrivačem, čija aktivnost se može povezati sa deficitom pristupačnog azota (Nemergut i sar., 2007; Duc i sar., 2009), dok dalji razvoj ekosistema i biljnog pokrivača utiče na intenziviranje mineralizacionih procesa i ukazuje na značajnu ulogu ekstracelularnih enzima tokom stvaranja normalnog zemljišta (Schipper i sar., 2001; Tschërko i sar, 2005).

Mikrobna aktivnost uključuje sve metabolitičke reakcije koje nastaju pod uticajem mikroorganizama u zemljištu (Nannipieri i sar., 1990) i ima važnu ulogu u održavanju produktivnosti zemljišta, a takođe pozitivno utiče na neke karakteristike zemljišta, kao što su plodnost i struktura (Kujur i Patel, 2012). Mikrobna biomasa zemljišta, koja predstavlja živi deo organske materije zemljišta, deluje kao važan ekološki indikator i odgovorna je za transformaciju i mineralizaciju biljnih i životinjskih ostataka prisutnih u zemljištu. Zbog toga, promene mikrobne biomase zemljišta mogu dovesti do promene značajnih funkcija, kao što su transformacija organskih materija i kruženje hranljivih materija, što ukazuje da mikroorganizmi veoma brzo reaguju na promene zemljišnih uslova (Brookes, 1995). Na mikroorganizme takođe utiče i prisustvo teških metala, koji su toksični za većinu bakterija, jer inhibiraju osnovne funkcije ćelije i metabolizam (Walker i sar., 2000; Lorenz i sar., 2006), kao i enzimsku aktivnost (Chen i sar., 2005; Yang i sar., 2006). Intenzivna eksploatacija smanjuje zemljišnu plodnost i dovodi do negativnog uticaja različitih teških metala na floru i faunu (Kujur i Patel, 2012), ali i na mikrobne zajednice (Khosla i Reddy, 2008). Zbog

toga su veoma značajne informacije o mikrobiološkim karakteristikama kontaminiranog područja kako bi se primenile odgovarajuće ekoremedijacione tehnologije (Vidali, 2001).

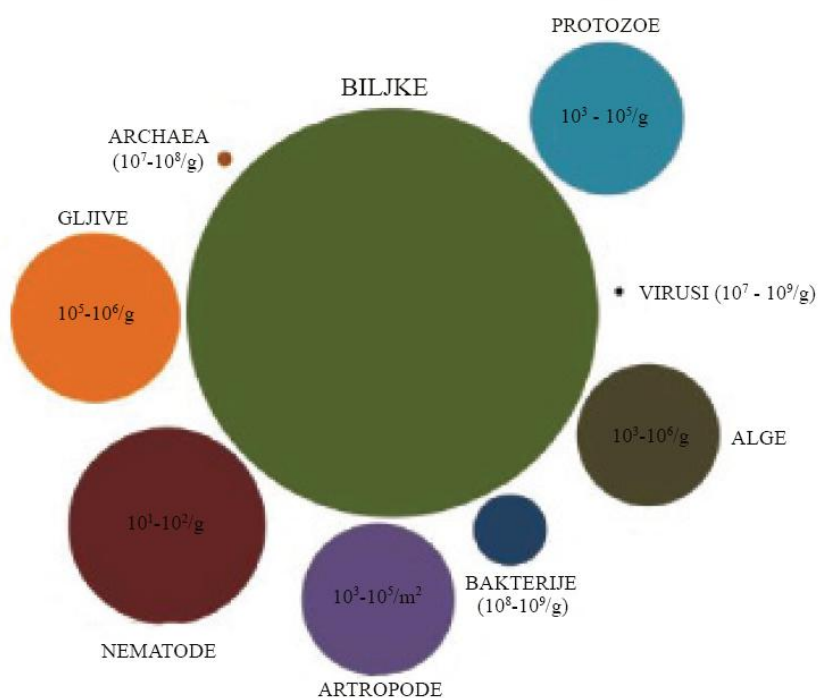
Mikrobna biomasa, kao i pristupačne hranljive materije, imaju važnu ulogu transformacijama u zemljištu (Singh i sar., 1989). Bilo kakve promene u mikrobnj biomasi direktno utiču na tok transformacija organskih materija u zemljištu (Kujur i Patel, 2012). Zato podaci o aktivnosti mikroorganizama pružaju značajne podatke o promenama bioloških osobina zemljišta (Jordan i sar., 1995).

Enzimski aktivnost je karakteristika zemljišta koja je u svojoj osnovi hemijska, ali ima direktno biološko poreklo. S ozirom da su veoma osetljivi na kontaminaciju, enzimi se mogu koristiti kao dobar indikator ili parametar procene kvaliteta zemljišta. Enzimski aktivnost efikasno reprezentuje biološki status zemljišta (Sisa, 1993). Dick i sar. (1996) smatraju da su analize enzima dobar metod procene kvaliteta zemljišta zbog toga što su direktno vezani za najvažnije osobine zemljišta i mikrobiološku aktivnost i sporije podležu promenama od ostalih parametara, a za njihovu determinaciju koriste se relativno jednostavne metode. Enzimski aktivnost zavisi od sadržaja organskih i mineralnih koloida i hemijskih osobina (Kucharski i Wyszowska, 2004). Mnoga istraživanja ukazuju da su mikrobiološka i enzimski aktivnost uslovljene prisustvom teških metala u zemljištu (Chen i sar., 2005; Yang i sar., 2006; Gao i sar., 2009).

Osim što učestvuju u transformacijama i biogehemijskom kruženju ugljenika, azota i fosfora (Schoenholtz, 2000), mikroorganizmi produkuju enzime koji imaju veliki značaj za biohemijske transformacije u zemljištu, tako da su ispitivanja enzimski aktivnosti zemljišta direktno vezana za brojnost i aktivnost mikroorganizama (Riffaldi i sar., 2002). Tako rezultati nekih istraživanja ukazuju da je enzimski aktivnost povezana sa sadržajem ukupnog ugljenika i azota, kao i biomasom bakterija i gljiva (Bandick i Dick, 1999). Kao parametar mikrobne aktivnosti, posebno veliki značaj pripada dehidrogenaznoj aktivnosti, koja je direktno vezana za sadržaj organskog ugljenika u zemljištu (Aon i Colaneri, 2001). Enzimski aktivnost je povezana i sa procesima kruženja azota (amonifikacija, nitrifikacija, denitrifikacija) i fosfora (transformacije neorganskog fosfora) u zemljištu i koristi se i kao parametar plodnosti zemljišta (Brohon i sar., 2001).

2.3. Značaj rizosfere i biljno-mikrobnih interakcija u narušenim ekosistemima

Termin “rizosfera” prvi put je upotrebio Hiltner (1904). Od tada do danas, rizosferni procesi kod biljaka su veoma dobro proučeni, dok mikroorganizmima i mikrobnim zajednicama u rizosferi nije posvećena dovoljna pažnja (Khan, 2005). Rizosfera se definiše kao uska zona zemljišta koja je pod direktnim uticajem korenovog sistema (Hrynkiwicz i Baum, 2012). Zemljišni mikroorganizmi, koji uključuju slobodne i simbiotske rizobakterije i mikorizne gljive, su integralni deo rizosferne mikroflore, ali i neki drugi organizmi (sl. 1). U rizosferi je konstatovano prisustvo bakterija, gljiva, nematoda, protozoa, algi, virusa, arhea i artropoda (Lynch, 1990a, Bonkowski i sar., 2009; Buee i sar., 2009; Raaijmakers i sar., 2009). Najveći broj članova ove rizosferne zajednice predstavlja deo kompleksnog lanca ishrane i koristi velike količine hranljivih materija koje nastaju kao posledica aktivnosti biljaka (Mendes i sar., 2013).



Sl. 1.- Predstavnicu živog sveta u rizosferi. Za svaku grupu organizama, u zagradi ili u polju, je data i njihova prosečna zastupljenost (Izvor: modifikacija Mendes i sar., 2013)

Najvažniji rezultat ovih interakcija između biljaka i rizosferne mikroflore je velika brojnost i metabolička aktivnost mikroorganizama u rizosferi, čak i u narušenim i oštećenim ekosistemima (van der Lelie, 1998). Eksudati korenovog sistema, kao i produkti drugih procesa, predstavljaju hranu za rizosfernu mikrofloru, usled čega i dolazi do intenziviranja mikrobiološke aktivnosti u rizosferi (Brimecombe i sar., 2007), što stimulatивно utiče na razvoj korenovog sistema i porast biljaka. Istraživanja ukazuju da eksudati korenovog sistema čine oko 5% biljne mase i značajno utiču na brojnost i aktivnost mikroorganizama (Mrkovački i sar., 2012). Eksudati se razlikuju po svom hemijskom sastavu, koji najviše zavisi od biljne vrste, i ugrađuju se u biomasu mikroorganizama (Das i Debnath, 2005). Interakcije između biljaka i mikroorganizama imaju veliki značaj u kruženju hranljivih materija (Rosenvald i sar., 2011). Ove interakcije direktno determinišu karakteristike zemljišta (Dilly i sar., 2000).

Tokom formiranja zemljišta na lokacijama pod eksploatacijom uglja dolazi do povećanja bakterijske biomase i aktivnosti mikroorganizama (Banning i sar., 2008; Chodak i sar., 2009, Kristufek i sar., 2005). Visoka mikrobiološka aktivnost ima pozitivne efekte na kvalitet zemljišta, tako da je značaj ovih interakcija znatno veći pri surovim ekološkim uslovima, pogotovo na lokacijama sa intenzivnom eksploatacijom uglja (Lohmus i sar., 2006; Walker i sar., 2004).

Dakle, mikroorganizmi predstavljaju posrednike između biljaka (sl. 2), koje zahtevaju pristupačne hranljive materije, i zemljišta, koje poseduje ove materije, ali često u niskim koncentracijama i/ili u kompleksnoj nepristupačnoj formi. Zbog toga se rizosferni mikroorganizmi smatraju ključnom komponentom interakcije između biljaka i zemljišta (Lynch, 1990b).

Od svih grupa mikroorganizama, u zoni rizosfere najčešće su prisutne bakterije i gljive. U poređenju sa zemljištem, u zoni rizosfere je zastupljenost gljiva i bakterija veća i do 20 puta (Morgan i sar., 2005). Kompeticija za hranljivim materijama u zoni rizosfere je vrlo velika. Zbog toga su rizosferni mikroorganizmi razvili čitav niz specifičnih strategija (od antagonističkih do sinergističkih), ili međusobno ili sa biljkama (Perotto i Bonfante, 1997). Razumevanje ovih, a posebno biljno-mikrobnih interakcija je od ključne važnosti za upotrebu mikroorganizama u cilju stimulacije biljnog rasta, kao i restauracije uništenih ekosistema.



Sl. 2. - Rizosferni mikroorganizmi i njihova uloga u odnosima između biljaka i zemljišta (Izvor: Richardson i sar., 2009)

2.4. Dosadašnja istraživanja na području rudnika mrkog uglja „Kakanj“

Biljni i mikrobni diverzitet na lokacijama rudnika mrkog uglja „Kakanj“ u proteklom periodu nije dovoljno istražen, dok je nešto više pažnje posvećeno hemijskim analizama različitih tipova zemljišta.

Biljni diverzitet na lokacijama rudnika nije sistematski proučavan, već su u radovima uglavnom prikazivan grub opis terena uz isticanje isključivo najzastupljenijih vrsta. Takođe, koliko je poznato, učestalost biljnih vrsta nije ispitivana, kao ni smena biljnih zajednica u funkciji vremena. Sva ispitivanja biljnog diverziteta nisu vršena sa jasno determinisanim ciljem, već su obavljana u okviru drugih istraživanja, uglavnom vezanih za rekultivaciju površina ili ispitivanje mogućnosti korišćenja zemljišta u različite svrhe. Tako Rahman (2004), opisujući prirodne karakteristike opštine Kakanj navodi da su severni, severoistočni i istočni deo opštine pod šumskom vegetacijom i da je uglavnom čine bukva, grab, jasen, glog, jela, bor i smrča, dok u centralnom, južnom i jugozapadnom delu dominiraju livade i pašnjaci. Poljoprivredna proizvodnja, a samim tim i prisustvo ratarskih i povrtarskih kultura konstatovana je samo pri okućnicama. Isti

autor, takođe, ističe značaj drvenastih i zeljastih biljaka u obogaćivanju zemljišta organskom materijom. Ahmetović (2003) je ispitivao rekultivaciju jalovine površinskog kopa „Vrtlište“ i konstatovao da su najčešći tipovi zemljišta na ovom kopu rendzina i smeđa zemljišta. Reakcija sredine ispitivanih uzoraka je neutralna do vrlo alkalna, sadržaj karbonata osrednji do visok, sadržaj humusa i pristupačnog fosfora nizak, a sadržaj kalijuma visok. Čustović i sar. (2012), analizirajući stanje zemljišta na području opštine Kakanj, konstatuju povećan sadržaj nekih teških metala, prvenstveno nikla i kadmijuma. Međutim, zbog visoke pH vrednosti pretpostavlja se da su ti metali u inaktivnom obliku. Osim toga, ni sadržaj policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH) nije visok.

Detaljnija istraživanja u vezi sa biljnim i mikrobnim diverzitetom na području rudnika mrkog uglja „Kakanj“ nisu obavljena.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj ovih istraživanja je ispitivanje mogućnosti sanacije posledica izazvanih višedecenijskom eksploatacijom uglja na području rudnika mrkog uglja „Kakanj“ primenom ekoremedijacionih tehnologija. S obzirom na nesagledive posledice po životnu sredinu i slabu efikasnost konvencionalnih metoda, primena ekoremedijacije usloviće oporavak i stabilizaciju ekosistema. Zbog toga je kao početni cilj postavljena karakterizacija ekosistema što podrazumeva hemijsku i mikrobiološku karakterizaciju zemljišta koji nastaje eksploatacijom uglja, kao i determinaciju prisutnih biljnih vrsta. Otpad koji nastaje u rudniku, dodatno doprinosi narušavanju ekološke ravnoteže i smanjenju biološkog diverziteta. Zbog toga je kao poseban cilj u disertaciji postavljeno ispitivanje hemijskih i mikrobioloških karakteristika jalovine.

Detaljna karakterizacija ekosistema je predstavljala osnovu za dalja istraživanja u okviru ove disertacije. Determinacija biljnih vrsta na kontaminiranim lokacijama, kao i praćenje smene biljnih zajednica, predstavlja važan parametar koji ukazuje na prirodne procese oporavka narušenog ekosistema.

Mikroorganizmi, kao značajna komponenta ekosistema, su važan činilac ekoremedijacionih tehnologija, tako da je jedan od ciljeva istraživanja njihova izolacija iz zemljišta i jalovine. Imajući u vidu, da samo precizno okarakterisane populacije mikroorganizama imaju potencijal za primenu u ekoremedijacionim tehnologijama, važan cilj ove disertacije je identifikacija mikrobnih populacija koja će se izvršiti primenom biohemijskih testova i molekularnih metoda. Na ovaj način formiraće se kolekcija autohtonih mikrobnih populacija sa lokacije rudnika „Kakanj“, što predstavlja važan cilj ove disertacije

Složene interakcije koje se uspostavljaju u rizosferi biljaka između mikrobnih populacija i korena biljaka doprinose preživljavanju različitih grupa mikroorganizama i povećanja mikrobnog diverziteta što se odražava na povećanje mikrobiološke aktivnosti u zoni rizosfere. Zbog toga je jedan od važnih ciljeva disertacije, ispitivanje mikrobiološke aktivnosti zone rizosfere.

Treba imati u vidu da otpad koji nastaje u toku tehnološkog procesa u rudniku zauzima nove površine zemljišta i time doprinosi estetskim i funkcionalnim poremećajima i opštem narušavanju kvaliteta životne sredine. Važan cilj istraživanja

predstavlja ispitivanje biološke vrednosti jalovine iz rudnika „Kakanj“ i sagledavanje mogućnosti da se ovaj otpadni materijal koristi kao supstrat za rast biljaka. U cilju boljeg iskorišćavanja jalovine, ispitaće se mogućnost primene selekcionisanih autohtonih mikrobnih populacija na rast različitih biljnih vrsta.

Važno je istaći, da će istraživanja u okviru ove disertacije doprineti sagledavanju mogućnosti iskorišćavanja biodiverziteta i biljno mikrobnih interakcija u sanaciji posledica višedecenijske eksploatacije uglja. Takođe, disertacija će doprineti i sagledavanju otpada kao resursa, koji se može iskoristiti u korisne svrhe.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Opšte karakteristike područja rudnika mrkog uglja „Kakanj“

Rudnik mrkog uglja „Kakanj“ je smešten na području opštine Kakanj (6 km od grada) u srednjem i južnom delu Zeničko-dobojskog kantona. Zauzima centralni deo Sarajevsko-zeničke kotline koja se nalazi severno od Visokog i jugoistočno od Zenice, privredno najznačajnijeg regiona Bosne i Hercegovine. Rudnik pripada Sarajevsko-zeničkom ugljenom basenu.

Površinski kop „Vrtlište“ se nalazi na severnom delu ležišta uglja. Sa južne strane oivičen je rekom Bosnom a sa zapadne Ribnicom. Celokupno ležište ima oblik nepravilne elipse. Ispitivane lokacije imaju različite morfološke forme, ispresecane manjim ili većim udolinama, pri čemu se teren postepeno izdiže od juga ka severu.

4.1.1. Klimatske karakteristike

Na ispitivanom području zastupljena je tipična kontinentalna klima, koja ima dva osnovna oblika: umereno kontinentalna i planinska. Umereno kontinentalna klima se odlikuje umereno toplim do toplim letima i hladnim zimama sa osrednjom količinom padavina na nižim nadmorskim visinama, odnosno velikom količinom u predelima sa nadmorskom visinom od preko 1000 m. Planinska klima se karakteriše hladnijim i vlažnijim letima i oštrim zimama sa velikom količinom padavina.

S obzirom da ne postoje meteorološki podaci za opštinu Kakanj, radi preciznije interpretacije klimatskih karakteristika, korišćeni su podaci meteorološke stanice Zenica, kao najbliže Kaknju i najsličnije po svojoj morfologiji.

4.1.1.1. Temperatura vazduha

Za period od 47 godina (1961-2008), najhladniji mesec bio je januar, dok je juli najtopliji (tab. 1). Srednja mesečna temperatura vazduha bila je najniža u januaru 1964. godine (-6,4) a najviša u avgustu 2003. godine (23,8°C).

Tabela 1. - Srednje mesečne temperature (°t) vazduha (Zenica, 1961-2008)

Mesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	Prosek
°t	-0,5	2,0	6,2	10,7	15,3	18,5	20,2	19,8	15,7	11,1	5,5	0,7	10,4

U godinama kada je izvršeno uzorkovanje, srednje mesečne temperature vazduha pokazuju blaga odstupanja u odnosu na višegodišnje proseke (tab. 2).

Tabela 2. - Srednja mesečna temperatura vazduha (°C) za 2011, 2012 i 2013. godinu (Zenica)

God.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	Sred.
2011	0,4	1,6	6,2	12,7	15,2	19,9	21,4	22,2	19,6	10,2	3,7	2,7	11,3
2012	0,0	-3,6	8,6	11,5	15,1	22,9	24,5	24,0	18,7	12,5	9,2	0,7	12,0
2013	2,9	2,0	6,3	13,1	16,2	19,9	22,0	22,8	16,2	13,3	7,5	1,0	12,0

4.1.1.2. Padavine i relativna vlažnost vazduha

Za period od 39 godina (1951-1990) srednja godišnja suma padavina iznosila je 804 mm (tab. 3). Godišnja količina padavina bila je najveća 2001. godine (1051 mm) a najmanja 1990. godine (543 mm).

Tabela 3. - Srednja mesečna količina padavina u mm (Zenica, 1951-1990)

Mesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	Ukupno
Padavine (mm)	53	48	54	64	73	85	70	65	73	68	80	70	804

U godinama uzorkovanja, srednja mesečna količina padavina je manja u odnosu na višegodišnji prosek (tab. 4).

Tabela 4. - Srednja mesečna količina padavina (mm) u godinama uzorkovanja (Zenica)

God.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	Suma
2011	16,4	16,0	24,4	27,1	78,8	74,9	120,6	9,3	21,1	59,2	13,9	57,5	519,2
2012	65,2	88,2	5,7	99,9	126,4	9,2	49,5	0,6	57,1	89,0	45,5	66,6	702,9
2013	82,0	107,5	90,2	38,9	120,6	58,7	51,5	25,6	61,2	56,7	96,4	3,9	793,2

Prosečna godišnja relativna vlažnost vazduha je relativno visoka iznosi 81% i posledica je blizine reke Bosne. U godinama kada je vršeno uzorkovanje, prosečna godišnja relativna vlažnost vazduha je nešto manja u odnosu na višegodišnji prosek (tab. 5).

Tabela 5. - Srednja relativna vlažnost vazduha (%) u 2011, 2012 i 2013. godini (Zenica)

God.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	Sred.
2011	85	76	69	62	73	69	70	66	68	77	82	83	73
2012	82	76	61	70	72	62	59	50	68	79	80	83	70
2013	87	87	75	68	75	76	72	69	81	83	87	90	79

4.1.2. Pedološke karakteristike

Na ispitivanim lokacijama dominiraju automorfna zemljišta tipa rendzine (A – C). Ove rendzine su nastale na krečnjaku i peščarima, ali su one na ispitivanom području pretežno nastale na laporcima. Na području cele opštine Kakanj, rendzine čine 30% svih tipova zemljišta.

4.2. Uzimanje uzoraka zemljišta, rizosfere i jalovine

Početni materijal za ova istraživanja predstavljali su uzorci zemljišta, rizosfere i jalovine na lokalitetu rudnika "Kakanj" (Bosna i Hercegovina). Istraživanja su

obuhvatila tri lokacije: Vrtlište 1, Vrtlište 2 i Jama Haljinići i Stara jama. Ove lokacije se karakterišu intenzivnim spontanom razvojem biljnih zajednica.

Uzorkovanje je obavljeno u leto 2011, 2012 i 2013. godine. Nakon iskopavanja biljaka, izvršeno je odvajanje zemljišta i rizosfere, koje je odvojeno mehaničkim putem pomoću sterilne pincete. Uzorci jalovine su uzeti sa površinskog (0-10 cm) i podpovršinskog sloja (10-25 cm).

4.3. Hemijska karakterizacija zemljišta i jalovine

Hemijske analize zemljišta i jalovine izvršene su 2011. godine. Uzorci zemljišta (FS-1, FS-2, FS-3 i FS-4) uzeti su na lokacijama gde je izvršena determinacija biljnih vrsta. Pojedinačni uzorci zemljišta sakupljeni su iz površinskog sloja, nakon čega je formiran reprezentativan uzorak u okviru svake od 4 lokacije posebno. Uzorak jalovine je takođe uzet sa više mesta u okviru deponije, posle čega je formiran reprezentativan uzorak. Nakon donošenja uzoraka zemljišta, rizosfere i jalovine, sušenja do vazdušno suvog stanja, usitnjavanja i prosejavanja kroz sito veličine pora do 2 mm, izvršene su osnovne hemijske analize, analize sadržaja teških metala i organskih zagađivača, prema sledećim metodama:

- određivanje reakcije (pH vrednost u H₂O i 1M KCl) potencijometrijski
- određivanje zemno-alkalnih karbonata volumetrijski, po Scheibler-ovoj metodi (DIN ISO 10693:1997)
- određivanje sadržaja organskog ugljenika (Tjurin, modifikacija Simakov-a, 1957);
- određivanje sadržaja ukupnog azota po Kjeldahl-u (Bremner i Keeney, 1965);
- određivanje sadržaja pristupačnih oblika azota (NH₄⁺-N i NO₃⁻-N) destilacijom sa vrelom vodenom parom iz nKCl ekstrakta (za nitratni azot korišćena je Devardova legura);
- određivanje sadržaja pristupačnog fosfora i kalijuma AL metodom (Egner i sar., 1960);
- određivanje ukupnih sadržaja teških metala metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS), očitavanjem u plamenu acetilen/vazduh, nakon razaranja po metodi U.S. EPA 3050;

- određivanje pristupačnih sadržaja mikroelemenata i teških metala metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS), očitavanjem u plamenu acetilen/vazduh, nakon ekstrakcije sa 0,005M rastvorom DTPA (Lindsay i Norvell, 1978); pristupačni bor (B) određen je metodom kolorimetrije (curcumin), nakon ekstrakcije vrelom vodom (Džamić i sar., 1996);

- pristupačni sadržaji kalcijuma (Ca) i magnezijuma (Mg) određeni su metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS), očitavanjem u plamenu acetilen/vazduh, nakon ekstrakcije sa 1M NH₄OAc (pH 7,0) (Sumner i Miller, 1996);

- policiklični aromatični ugljovodonici (polycyclic aromatic hydrocarbons-PAH) i polihlorovani bifenili (polychlorinated biphenyls-PCB) metodom gasne hromatografije (HP6890) sa masenom spektrometrijskom detekcijom (HP5973 MSD) primenom međunarodnog standarda ISO 18287:2006 prema sledećem protokolu: temperaturni program: 60°C (2 min); 30°C/min do 120°C; 5°C/min do 300°C; 300°C (15 min); temperatura injektora 260°C; splitless injection: 1µl, keep the split closed 1,8min; noseći gas helijum, at 0,8 ml/min to 1 ml/min;

- ugljovodonici (C₁₀ do C₄₀) metodom gasne hromatografije (6890N Network GC System) sa PTV inletom i FID detektorom (Agilent Technologies) primenom međunarodnog standarda ISO 16703:2004 prema sledećem protokolu: temperaturni program: od 35°C (1,5 min), 5°C/min do 60°C, a zatim 15°C/min do 350°C u toku 5 minuta; sistem za injektiranje CIS4 injektor: 45°C, 0,06 min, 12°C/min do 350°C, 2min; mode solvent vent: split vent 60 ml/min, 1,06 min, vent pressure: 0,0 psi, 0,06 min, vent flow: 200 ml/min, gas saver: 20 ml/min, 2,0 min; detektor FID: 375°C; vodonik protok 40 ml/min; vazduh protok: 450ml/min; noseći gas: helijum; protok nosećeg gasa: 7,4 ml/min, konstantan protok pritisak 2,8 psi; make-up gas: azot; protok make up gasa: 37,7 ml/min (samo azot); 45 ml/min (kombinovan sa protokom kolone); injektirana zapremina: 4 µl.

4.4. Determinacija biljnih vrsta

Terenska istraživanja su obavljena tokom leta 2011., 2012. i 2013. godine i obuhvataju vegetaciju koja se razvija na ispitivanim lokacijama. U fitocenološkoj analizi

vegetacije korišćene su metode švajcarsko-francuske fitocenološke škole (Braun-Blanquet, 1964). Determinacija biljnih vrsta izvršena je prema Josifović (1970-1980) i Flora Europaea (2001).

4.5. Mikrobnii diverzitet zemljišta, rizosfere i jalovine

Diverzitet mikroorganizama u uzetim uzorcima je određen metodom razređenja na standardnim mikrobiološkim podlogama. Kao medijum za razređivanje u ovim ispitivanjima korišćen je fiziološki rastvor (sterilna vodovodska voda), prethodno sterilizovan u autoklavu na temperaturi od 120°C i pritisku od 1,5 atm u trajanju od 20 min.

U zavisnosti od analizirane grupe mikroorganizama, izvršeno je zasejavanje uzoraka (24 sata nakon donošenja) sa 0,5 ml inokuluma različitih razređenja na odgovarajuće hranljive podloge.

U proučavanim uzorcima zemljišta, rizosfere i jalovine određen je: ukupan broj bakterija, brojnost gljiva, aktinomiceta, ukupnih i sporogenih amonifikatora, ukupan broj oligonitrofila i brojnost *Azotobacter-a*.

Ukupan broj bakterija određen je na hranljivoj podlozi 10 puta razblažen tripton soja agar - TSA (tab. 6).

Tabela 6. - Sastav podloge deset puta razblažen TSA

Naziv hemikalije	Količina (g)
Tripton	1,5
Soja pepton	0,5
NaCl	0,5
Agar	1,5
Destilovana voda	1000 ml
pH nakon sterilizacije 7,3	

Brojnost gljiva određena je na hranljivoj podlozi roze bengal streptomycin agar (Peper i sar., 1995) - RBSA (tab. 7). Nakon sterilizacije, RBSA podlozi dodat je streptomycin sulfat u količini od 0,03 mg/1000 ml hranljive podloge.

Brojnost aktinomiceta određena je na skrobno-amonijačnom agaru (tab. 8).

Tabela 7. - Sastav podloge roze bengal streptomycin agar (RBSA)

Naziv hemikalije	Količina (g)
Pepton	5,0
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5
Glukoza	10,0
K ₂ HPO ₄	1,0
Roze bengal	0,033
Agar	15,0
Destilovana voda	1000 ml

Tabela 8. - Sastav podloge skrobno-amonijačni agar

Naziv hemikalije	Količina (g)
Skrob	10,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0
NaCl	1,0
KNO ₃	1,0
CaCO ₃	3,0
Agar	20,0
Destilovana voda	1000 ml

Brojnost ukupnih i sporogenih amonifikatora određen je na meso-peptonskom agaru - MPA (tab. 9), a brojnost oligonitrofila i *Azotobacter-a sp.* na Fjodorovom agaru (tab. 10).

Tabela 9. - Sastav mesopeptonskog agara (MPA)

Naziv hemikalije	Količina (g)
Pepton	15,0
Mesni ekstrakt	3,0
NaCl	5,0
K ₃ PO ₄	0,3
Agar	18,0
Destilovana voda	1000 ml
pH nakon sterilizacije 7,3	

Tabela 10. - Sastav podloge Fjodorov agar

Naziv hemikalije	Količina (g)
K ₂ HPO ₄	0,3
CaHPO ₄	0,2
MgSO ₄	0,3
NaCl	0,5
FeCl ₃	0,1
CaCO ₃	2,5
Manit	20,0
Agar	16,0
Mikroelementi	1,0
Destilovana voda	1000 ml
pH nakon sterilizacije 7,0	
Mikroelementi (na 1000 ml):	
H ₃ BO ₄	5,0
(NH ₄) ₂ MoO ₄	5,0
KJ	0,5
NaBr	0,5
ZnSO ₄	0,2
Al ₂ (SO ₄) ₃	0,3

Pripremljene hranljive podloge su sterilizirane postupkom vlažne sterilizacije sa povećanim atmosferskim pritiskom, u autoklavu, na temperaturi od 120°C i pritisku od 1,5 atm u trajanju od 20 min.

Mikrobiološka aktivnost ispitivanih uzoraka zemljišta, rizosfere i jalovine određivana je standardnim mikrobiološkim metodama, indirektnom metodom zasejavanja iz odgovarajućeg razređenja uzoraka na hranljive podloge. Za inokulaciju odgovarajućih hranljivih podloga korišćena su sledeća razređenja (tab. 11):

Tabela 11. - Hranljive podloge i razređenja za mikrobiološke analize uzoraka

Uzorci	Hranljive podloge		
	TSA MPA Oligonitrofilii	RBSA skrobno-amonijačni agar	<i>Azotobacter</i> sp.
zemljište	-4	-3	-2
rizosfera	-4	-3	-2
jalovina	-4	-3	-2

Po 10 ml sterilne i na 45°C ohlađene podloge uneto je u Petri kutiju u kojoj je prethodno dodat inokulum. Sve mikrobiološke analize obavljene su u tri ponavljanja. Inkubacija je obavljena u termostatu, a u zavisnosti od ispitivane grupe mikroorganizama period inkubacije je bio različit i na različitim temperaturama (tab. 12). Biogenost ispitivanih uzoraka zemljišta određivana je nakon inkubacije, brojanjem izraslih kolonija na odgovarajućim hranjivim podlogama. Brojnost ispitivanih grupa mikroorganizama preračunata je na 1g vazdušno suvog uzorka zemljišta i izražena kao broj kolonija po gramu suvog zemljišta (CFU/g).

Tabela 12. - Trajanje inkubacije za različite grupe mikroorganizama

Grupa mikroorganizama	Trajanje inkubacije (dani)	Temperatura (°C)
bakterije	5-6	28-30
gljive	4-5	25
aktinomicete	10-14	28-30
<i>Azotobacter</i> sp.	1-2	28-30

Vlažnost uzoraka zemljišta mjerena je sušenjem u sušnici na temperaturi od 105°C u trajanju od 120 min.

4.6. Enzimska aktivnost zemljišta, rizosfere i jalovine

Dehidrogenazna aktivnost zemljišta određena je metodom Casida i sar. (1964) i zasnovana je na transformaciji 2,3,5-trifeniltetrazolium hlorida (TTC) do trifenilformazana (TRF). Postupak se sastoji u mešanju 10 g ispitivanih uzoraka zemljišta s 0,1 g CaCO₃. Zatim je smeša podela na tri dela (po 3 g) i stavlja u po tri test kolbe. U svaku kolbu dodato je po 1,25 ml destilovane vode i 0,5 ml 3%-nog rastvora TTC-a. Nakon inkubacije na temperaturi od 37°C u trajanju od 24 sata, u svaku kolbu dodato je po 5 ml metanola, nakon čega je izvršena filtracija uzoraka. Filtrati su zatim razblaženi metanolom, tako da je ukupna zapremina dobijenih filtrata iznosila 50 ml. Intenzitet obojenosti determinisan je pomoću spektrofotometra (T70 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments LTD), pri talasnoj dužini od 485nm. Kao blank korišćen je metanol. Dehidrogenazna aktivnost uzoraka je izražena u µg TPF/g/h.

Fosfatna aktivnost zemljišta određena je na osnovu transformacije p-nitrofenilfosfata do p-nitrofenola (Tabatabai, 1994). Postupak se sastoji u tome što se odmeri 1g suvog uzorka zemljišta prosejanog kroz sito promera 2 mm i prenese u kolbu. Postupak se obavlja u 4 ponavljanja (po dva uzorka i dve kontrole za kiselu i alkalnu fosfatazu). U svaku kolbu dodato je po 0,2 ml toluena, 4 ml MUB pufera (pH 6,5 za kiselu i 11 za alkalnu fosfatazu) i 1ml 0,05 M p-nitrofenil fosfata. Nakon inkubacije na temperaturi od 37°C u trajanju od 1 sata, u svaku kolbu dodano je po 1 ml 0,5M CaCl₂ i 4 ml 0,5 M NaOH, nakon čega je izvršena filtracija. U kontrolnim varijantama p-nitrofenilfosfat je dodat nakon inkubacije. Intenzitet obojenosti determinisan je pomoću spektrofotometra (T70 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments LTD), pri talasnoj dužini od 410 nm. Aktivnost kisele i alkalne fosfataze uzoraka je izražena u µg PNP/g/h.

Aktivnost arilsulfataze u zemljištu određena je 2013. godine na osnovu transformacije p-nitrofenil sulfata do p-nitrofenola (Tabatabai, 1994). Nakon odmeravanja 1 g suvog uzorka zemljišta prosejanog kroz sito od 2mm i prenošenja u kolbu, dodato je po 0,25 ml toluena, 4 ml acetatnog pufera i 1 ml rastvora p-nitrofenil sulfata. Posle homogenizacije uzorka, inkubacija je obavljena na 37°C u trajanju od 1h.

Nakon inkubacije dodato je 1 ml 0,5 M CaCl₂ i 4 ml NaOH. Intenzitet obojenosti je, posle filtracije uzoraka, meren spektrofotometrijski (T70 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments LTD) pri talasnoj dužini od 400 nm (Elsgaard i sar., 2002). U kontrolnoj varijanti p-nitrofenil sulfat je dodat nakon inkubacije, i to neposredno pre filtracije. Arilsulfatazna aktivnost je izražena u µg PNP/g/h.

4.7. Izolacija i identifikacija mikroorganizama

Nakon karakterizacije uzoraka, izvršena je i identifikacija bakterija, gljiva i aktinomiceta prema odgovarajućim ključevima za identifikaciju.

4.7.1. Izolacija i identifikacija bakterija

Nakon određivanja mikrobiološke aktivnosti ispitivanih uzoraka, izvršena je izolacija i identifikacija bakterija i gljiva. Izolirane su kolonije koje su bile najzastupljenije u ispitivanim uzorcima. Odabrane kolonije bakterija su presejane na hranljivu podlogu TSA. Dobijeni izolati održavani su korišćenjem istih hranljivih podloga.

Čiste kulture bakterija dobijene su presejavanjem odabranih izolata, metodom iscrpljivanja. Nakon 24-časovne inkubacije čistih kultura na TSA podlozi pri temperaturi od 30°C, izvršeno je ispitivanje morfoloških osobina dobijenih čistih kultura (oblik, prisustvo spora, bojenje po Gramu) pomoću mikroskopa Leica DMSL (Nemačka).

U cilju precizne determinacije bakterijskih izolata, identifikacija je obavljena primenom brzog biohemijskog API testa i molekularnim metodama.

4.7.1.1. Identifikacija bakterija primenom API testa

Selekcionisane čiste kulture bakterija identifikovane su primenom API i APIWEB sistema (bioMerieux Inc., Francuska). Pre postupka identifikacije, čiste kulture su presejane na podlogu MPA, na kojoj je vršeno i održavanje čistih kultura bakterija. Identifikacija je obavljena nakon inokulacije API-50 CH sistema kolonijama

24-očasnih selekcionisanih čistih kultura bakterija. Očitavanje dobijenih rezultata vršeno je nakon 24, odnosno 48 sati inkubacije na 30°C.

4.7.1.2. Identifikacija bakterija molekularnim metodama

Ekstrakcija i analiza bakterijske DNK, uključujući i pripremu umnoženih PCR produkata za sekvencioniranje obavljena je u laboratoriji Odseka za štetočine bilja, Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu, Zemun. Primenom molekularnih metoda analizirana su dva bakterijska izolata: izolat 13k i izolat 19k.

Ekstrakcija DNK iz bakterijske kulture

Genomska DNK svakog pojedinačnog izolata ekstrahovana je pomoću DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Čiste kulture bakterijskih izolata presejane su na 0,1xTSA podlogu i inkubirane na temperaturi od 30°C u vremenu od 24 časa. Nakon inkubacije, pojedinačne kolonije bakterijskih izolata su uzorkovane pomoću sterilne pipete i rastvorene u 200 µl smeše pufera za lizu ćelija i proteinaze K. Nakon inkubacije na temperaturi od 56°C u trajanju od 2 časa, izolacija DNK je izvršena pomoću DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) prema uputstvu proizvođača. Ekstrahovana DNK je rastvorena u 100 ul AE pufera, a zatim čuvana na -20°C.

Umnožavanje DNK metodom lančane reakcije polimeraze (PCR) i sekvencioniranje produkata reakcije

Region 16S rDNK bakterijskih izolata 13k i 19k umnožen je metodom lančane reakcije polimeraze (PCR) pomoću univerzalnih prajmera za amplifikaciju 16S rRNK gena bakterija 27F 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Gürtler i Stanisich, 1996) i 1523R 5'-AGGAGGTGATCCAGCCG-3' (Gonzales i sar., 1997). Ovi univerzalni prajmeri umnožavaju produkt 16S rDNK dužine 1500 baznih parova (bp).

PCR amplifikacija je urađena u 20 μ l PCR smeše sadržaja: PCR pufer A sa MgCl₂ (1x), MgCl₂ (0.5mM), dNTPs (0.3mM), prajmeri (0.75 μ M), KAPATaq polimeraza (KAPA Biosystems) 0.0375U/ μ l i 1 μ l 1:10 razređene ekstrahovane DNK uzorka. Umnožavanje produkta je izvršeno u Eppendorf Mastercycler[®]ep prema sledećem termalnom protokolu: inicijalna denaturacija 95°C (5 minuta), denaturacija 95°C (1 minut), elongacija 50°C (1 minut), ekstenzija 72°C (1 minut) u 33 ciklusa i finalna ekstenzija 72°C (7 minuta).

Provera uspešnosti sinteze 16S rDNK regiona vršena je propuštanjem PCR produkta uzoraka kroz agarozni gel obojen etidijum-bromidom i vizualiziran pod UV transiluminatorom. Prečišćavanje produkata PCR umnožavanja obavljeno je pomoću QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) prema uputstvu proizvođača.

Sekvencioniranje je obavljeno na automatskom sekvencionatoru MacroGen Inc. (Seul, Južna Koreja). Umnoženi 16S rDNK region uzorka je sekvencioniran u oba pravca korišćenjem istih prajmera kao i pri umnožavanju DNK. Nukleotidne sekvence su analizirane korišćenjem FinchTV v.1.4.0 (www.geospiza.com), sastavljene pomoću programa Clustal W, integrisanog unutar softvera MEGA5 (Tamura i sar., 2011), i deponovane u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojevima KF494373 za izolat 13k i KF494374 za izolat 19k. Taksonomska identifikacija izolata je izvršena upoređivanjem njihovih 16S rDNK sekvenci sa sekvencama bakterija NCBI GenBank baze podataka pomoću BLAST analize (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.7.2. Izolacija i identifikacija gljiva

Čiste kulture gljiva dobijene su presejavanjem izolata na podlogu RBSA, na kojoj je vršeno i održavanje čistih kultura gljiva. Identifikacija čistih kutura obavljena je ispitivanjem morfoloških karakteristika rasta gljiva na hranljivim podlogama sladni agar sa 3% sladnog ekstrakta i Čapek kvaščevar agar (CYA) uz dodatak mikroelemenata (tab. 13), primjenom ključa za identifikaciju gljiva (Samson i sar., 2004).

Tabela 13. - Sastav hranljive podloge Čapek kvašćev agar (CYA)

Naziv hemikalije	Količina (g)
NaNO ₃	3,0
KCl	0,5
FeSO ₄	0,01
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5
Kvašćev ekstrakt	0,5
Saharoza	30,0
Agar	20,0
TMS (rastvor mikroelemenata)	1ml
Destilovana voda	1000 ml
TMS:	
ZnSO ₄	1,0
CuSO ₄	0,5
Destilovana voda	100 ml

pH nakon sterilizacije 6-6,5

4.8. Rast biljaka na supstratima

Potencijalna biološka vrednost jalovine određena je u ogledu gde su praćeni stepen klijavosti semena različitih biljaka i biomasa klijanaca.

U ovom ogledu korišćeno je 5 biljnih vrsta: salata (*Lactuca sativa* L.), slačica (*Sinapis alba* L.), pšenica (*Triticum aestivum* L.), ovas (*Avena sativa* L.) i tritikale (*x triticosecale* Wittm ex A. Camus.) Ogled je postavljen u staklari Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Semena su pre setve sterilisane u 30%-tnom rastvoru H₂O₂ u trajanju od 20 sekundi.

U ogledu je korišćeno 5 supstrata:

- 100% jalovine (u daljem tekstu: varijanta 100)
- 75% jalovine + 25% zemljišta (u daljem tekstu: varijanta 75)

- 50% jalovine i 50% zemljišta (u daljem tekstu: varijanta 50)
- 25% jalovine i 75% zemljišta (u daljem tekstu: varijanta 25)
- 100% zemljišta (kontrola)

Rezultati najvažnijih agrohemijskih osobina korišćenog zemljišta prikazani su u tabeli 14.

Tabela 14. - Agrohemijske analize zemljišta

pH		CaCO ₃	Humus	Ukupni	P ₂ O ₅	K ₂ O	NH ₄	NO ₃	NH ₄ +NO ₃	C:N
H ₂ O	KCl	(%)	(%)	N (%)	mg/100g		mg/kg			
8,21	7,72	3,9	3,2	0,218	20,0	12,8	3,5	45,5	49,0	8,5:1

Uzorci zemljišta i jalovine su pre postavljanja ogleda isitnjeni, prosušeni i prosejani kroz sito prečnika pora 2 mm. Nakon vlaženja destilovanom vodom, ogledni sudovi (plastične čaše) su napunjene supstratima, u koje su zasejana semena. Ogled je postavljen u 5 ponavljanja a broj semenki po sudu bio je 5, osim za slačicu i salatu gde je korišćeno 10 semenki po sudu. Ogled je trajao 25 dana. Na kraju ogleda isključile biljke su vađene iz supstrata, merena je sveža i suva biomasa (posle prirodnog sušenja a zatim na 60°C u trajanju od 120 min).

Na isti način postavljena su još dva ogleda: u jednom su supstrati inokulisani čistom kulturom bakterije *Bacillus* sp. 13k a u drugom inokulacija je izvršena mešanim bakterijskim populacijama *Bacillus* sp. 13k i *Bacillus* sp. 19k. Obe bakterijske vrste izolovane su iz jalovine. Veličina bakterijskog inokuluma je određena nakon zasejavanja na podlogu MPA i inkubacije od 6 dana na temperaturi od 30°C.

Nakon postavljanja ogleda, izvršene su mikrobiološke analize supstrata odmah nakon setve semena. Ove analize su takođe ponovljene nakon završetka ogleda. Mikrobiološke analize su obuhvatile ispitivanje ukupnog broja bakterija, ukupnih i sporogenih amonifikatora, oligonitrofila i *Azotobacter* sp., na isti način opisan u poglavlju 4.5. Takođe, izvršeno je i određivanje enzimske aktivnosti uzoraka (dehidrogenaze) na isti način kao što je opisano u poglavlju 4.6.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. Hemijske karakteristike zemljišta i jalovine

Ispitivani uzorci zemljišta se razlikuju po reakciji i sadržaju karbonata. Prema dobijenim pH vrednostima, uzorci FS-1 i FS-2 imaju slabo alkalnu reakciju, uzorak FS-3 slabo kiselu, uzorak FS-4 neutralnu, a uzorak jalovine jako kiselu reakciju. Reakcija zemljišta u saglasnosti je sa utvrđenom količinom slobodnih karbonata, odnosno uzorci FS-1 i FS-2 pripadaju klasi jako karbonatnih zemljišta, uzorak FS-4 slabo karbonatnim zemljištima, dok su uzorci FS-3 i jalovina bez slobodnih karbonata. Sadržaj organskog ugljenika je u svim ispitivanim uzorcima vrlo visok, sadržaj pristupačnog fosfora nizak, dok je sadržaj pristupačnog kalijuma srednji, osim u uzorku FS-2 koji se odlikuje visokim sadržajem ovog elementa (tab. 15). Sadržaji Cu, Zn i teških metala su niski (tab. 16), dok je sadržaj nikla visok (tab. 17).

Tabela 15. - Osnovna hemijska svojstva zemljišta i jalovine

uzorak	pH		CaCO ₃ (%)	Organski C (%)	Ukupni N (%)	C/N	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	P ₂ O ₅	K ₂ O
	H ₂ O	KCl					mg/kg		mg/100g	
FS-1	8,10	7,60	36,4	5,738	0,255	22,5:1	14,7	9,1	4,0	17,0
FS-2	7,74	7,37	13,6	39,716	0,383	103,7:1	21,7	1,4	1,2	22,6
FS-3	6,36	6,02	0,0	37,708	0,772	48,8:1	45,5	11,2	5,6	12,5
FS-4	7,19	6,88	5,3	10,908	0,345	31,6:1	21,0	11,9	0,6	17,0
jalovina	5,96	5,23	0,0	15,282	0,486	31,4:1	23,8	8,4	3,0	12,9

Tabela 16. - Ukupni sadržaji mikroelemenata u zemljištu i jalovini

uzorak	Fe	Mn	Cu	Zn
	mg/kg			
FS-1	1,68	558,5	27,73	53,40
FS-2	1,32	261,7	42,29	87,20
FS-3	2,12	110,3	48,36	89,25
FS-4	1,77	54,3	37,63	52,69
jalovina	3,69	268,0	39,59	76,23

U poređenju sa vrednostima za poljoprivredna zemljišta, u svim uzorcima sadržaj pristupačnog Fe je veoma visok. Sadržaj Zn je srednji do visok a Cu srednji do veoma visok. Pristupačni sadržaji Ca su visoki a Mg mnogo niži (tab. 18).

Tabela 17. - Ukupni sadržaji teških metala u zemljištu i jalovini

uzorak	Cd	Co	Cr	Ni	Pb
	mg/kg				
FS-1	0,10	16,64	41,76	106,28	12,14
FS-2	0,20	19,66	49,66	144,00	20,30
FS-3	0,30	17,21	78,36	154,49	24,99
FS-4	0,05	11,65	124,70	169,34	28,15
jalovina	0,70	24,86	84,97	167,80	23,90

Tabela 18. - Pristupačni mikroelementi i sekundarni makroelementi u zemljištu i jalovini

uzorak	Fe	Mn	Zn	Cu	Ca	Mg	Ca/Mg	B
	ppm				mg/100g		mmol/100g	mg/kg
FS-1	28,14	8,87	1,66	1,22	2131,3	34,7	37,3:1	0,92
FS-2	35,69	6,12	5,11	5,7	2350,3	77,1	18,5:1	5,4
FS-3	378,56	14,7	3,61	3,19	825,6	20,3	24,7:1	1,34
FS-4	120,64	14,86	3,78	3,66	1901,7	36,3	31,7:1	3,7
jalovina	123,05	7,38	3,96	3,86	337,2	26,8	7,6:1	2,32

U svim uzorcima jedinjenja iz grupe polihlorovanih bifenila nisu detektovana. Sadržaj PAH-ova je veoma nizak u uzorku jalovine kao i u uzorku FS-3, nešto veći u uzorcima FS-2 i FS-4, dok je najveći sadržaj u uzorku FS-1. Sadržaj ugljovodonika je nizak u svim uzorcima, osim u uzorku jalovine, gde je njihova količina veća od 1 g/kg. Uzorak jalovine ima visok sadržaj ugljovodonika iz grupe C₁₀ – C₄₀, dok ostali uzorci imaju znatno niži sadržaj ove grupe zagađivača (tab. 19).

Tabela 19. - Organski zagađivači u uzorcima zemljišta i jalovine (mg/kg)

Parametar/uzorak		FS-1	FS-2	FS-3	FS-4	jalovina
PAH	naftalen	0,789	0,261	0,110	0,451	0,061
	acenaftilen	0,028	0,013	<0,005	0,013	<0,005
	acenaften	0,076	<0,005	<0,005	0,061	<0,005
	fluoren	0,014	0,037	<0,005	0,104	<0,005
	fenantren	0,891	0,255	0,104	0,163	0,073
	antracen	0,870	0,101	0,013	0,070	0,044
	fluoranten	0,074	0,100	0,024	0,046	0,035
	piren	0,064	0,092	0,024	0,088	0,040
	benzo(a)antracen	0,051	0,070	0,012	0,037	0,027
	krizen	0,121	0,029	0,027	<0,005	0,012
	benzo(b)fluoranten	0,046	0,043	0,024	<0,005	<0,005
	benzo(k)fluoranten	0,019	0,034	0,011	<0,005	<0,005
	benzo(a)piren	0,015	0,021	<0,005	<0,005	<0,005
	indeno 1,2,3-cd piren	0,005	0,015	<0,005	<0,005	<0,005
	dibenzo(ah)antracen	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
	benzo(ghi)perilen	0,032	0,019	<0,005	<0,005	<0,005
ukupno	3,096	1,089	0,350	1,034	0,291	
PCB	18	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
	28 i 31	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
	44	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
	52	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
	101	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
	118	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
	138	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
	149	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
	153	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
	180	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
	194	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
ugljovodonici	C ₁₀ – C ₄₀	297,2	193,5	113,0	115,6	1263,6

5.2. Determinacija biljnih vrsta

Na lokacijama „Vrtlište 1“, „Vrtlište 2“, „Stara Jama i Jama Haljinići“, u 2011. godini, konstatovano je prisustvo 34 biljne vrste iz 32 roda i 20 familija. Najbrojnija je familija *Asteraceae* sa 7 vrsta i rodova i čini 20,6% od ukupnog broja determinisanih biljnih vrsta, odnosno 21,9% od ukupno definisanih rodova. Predstavnici ostalih determinisanih familija su slabije zastupljeni na ispitivanim lokalitetima. Predstavnici familija *Amaranthaceae* (2 vrste, 1 rod), *Betulaceae* (2 vrste, 2 roda), *Caryophyllaceae* (2 vrste, 2 roda), *Chenopodiaceae* (2 vrste, 2 roda), *Poaceae* (2 vrste, 2 roda), *Polygonaceae* (2 vrste, 1 rod), *Rosaceae* (2 vrste, 2 roda) i *Scrophulariaceae* (2 vrste, 2 roda) čine 47,1% ukupno determinisanih biljnih vrsta, odnosno 43,8% ukupno identifikovanih rodova. Ostale familije (*Brassicaceae*, *Dipsacaceae*, *Equisetaceae*, *Phytolaccaceae*, *Plantaginaceae*, *Polypodiaceae*, *Portulacaceae*, *Ranunculaceae*, *Resedaceae*, *Salicaceae* i *Typhaceae*) zastupljene su sa po jednom vrstom, odnosno rodom, i čine 32,3% od ukupno determinisanih biljnih vrsta, odnosno 34,3% od ukupno determinisanih rodova (tab. 20). Nasuprot tome, na jalovini nije konstatovano prisustvo biljaka.

U 2012. godini na lokacijama rudnika mrkog uglja „Kakanj“ nisu zabeležene značajne razlike u pogledu broja biljnih vrsta, rodova i familija u odnosu na 2011. godinu (tab. 21). Ukupno je identifikovano 29 biljnih vrsta iz 27 rodova i 18 familija. Kao i u 2011. godini, dominiraju predstavnici familije *Asteraceae* i čine 17,2% od ukupno determinisanih vrsta, odnosno 18,5% ukupno determinisanih rodova. Familije koje su zastupljene sa dve vrste su *Amaranthaceae* (1 rod), *Betulaceae* (2 roda), *Caryophyllaceae* (2 roda), *Poaceae* (2 roda), *Polygonaceae* (1 rod), *Rosaceae* (2 roda) i *Salicaceae* (2 roda). Sve zajedno sačinjavaju 48,3% ukupno definisanih biljnih vrsta, odnosno 44,4% od ukupno determinisanih rodova. Familije *Chenopodiaceae*, *Dipsacaceae*, *Equisetaceae*, *Phytolaccaceae*, *Plantaginaceae*, *Polypodiaceae*, *Portulacaceae*, *Ranunculaceae*, *Resedaceae* i *Scrophulariaceae* su zastupljene sa po jednom vrstom, odnosno rodom i sačinjavaju 34,5% od ukupno determinisanih biljnih vrsta, odnosno 37,1% determinisanih rodova. Za razliku od 2011. godine, na jalovini je konstatovano prisustvo samo jedne biljne vrste i to *Amaranthus albus* L.

Tabela 20. - Determinisane biljne vrste na lokacijama rudnika mrkog uglja
 “Kakanj“ u 2011. godini

Familija	Biljna vrsta	Familija	Biljna vrsta
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Amaranthus albus</i> L., <i>Amaranthus retroflexus</i> L.	<i>Poaceae</i>	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop, <i>Setaria</i> <i>viridis</i> (L.) P. B.
<i>Asteraceae</i>	<i>Artemisia absinthium</i> L., <i>Doronicum sp.</i> L., <i>Erigeron canadensis</i> L., <i>Matricaria inodora</i> L., <i>Taraxacum officinale</i> Web., <i>Tussilago farfara</i> L., <i>Xanthium italicum</i> Mor.	<i>Polygonaceae</i>	<i>Polygonum aviculare</i> L., <i>Polygonum</i> <i>lapathifolium</i> L.
		<i>Polypodiaceae</i>	<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn
		<i>Portulacaceae</i>	<i>Portulaca oleracea</i> L.
<i>Betulaceae</i>	<i>Betula pendula</i> Roth., <i>Carduus acanthoides</i> L.	<i>Ranunculaceae</i>	<i>Clematis vitalba</i> L.
<i>Brassicaceae</i>	<i>Diplotaxis muralis</i> (L.) DC.	<i>Resedaceae</i>	<i>Reseda luteola</i> L.
<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Saponaria officinalis</i> L., <i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke	<i>Rosaceae</i>	<i>Prunus avium</i> L., <i>Potentilla reptans</i> L.
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium botrys</i> L., <i>Salsola ruthenica</i> Iljin	<i>Salicaceae</i>	<i>Salix alba</i> L.
		<i>Scrophulariaceae</i>	<i>Verbascum</i> <i>phlomoides</i> L. <i>Chaenorhinum</i> <i>minus</i> (L.) Lange
<i>Dipsacaceae</i>	<i>Dipsacus laciniatus</i> L.		
<i>Equisetaceae</i>	<i>Equisetum talmateia</i> Ehrh.	<i>Typhaceae</i>	<i>Typha latifolia</i> L.
<i>Phytolaccaceae</i>	<i>Phytolacca americana</i> L.		
<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago lanceolata</i> L.		



Sl. 3. - *Polygonum aviculare* L.



Sl. 4. - *Verbascum phlomoides* L.

Tabela 21. - Determinisane biljne vrste na lokacijama rudnika mrkog uglja
 “Kakanj“ u 2012. godini

Familija	Biljna vrsta	Familija	Biljna vrsta
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Amaranthus albus</i> L., <i>Amaranthus retroflexus</i> L.	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago lanceolata</i> L.
		<i>Poaceae</i>	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop, <i>Setaria viridis</i> (L.) P. B.
<i>Asteraceae</i>	<i>Artemisia absinthium</i> L., <i>Doronicum sp.</i> L., <i>Matricaria inodora</i> L., <i>Tussilago farfara</i> L., <i>Xanthium italicum</i> Mor.	<i>Polygonaceae</i>	<i>Polygonum aviculare</i> L., <i>Polygonum lapathifolium</i> L.
		<i>Polypodiaceae</i>	<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn
<i>Betulaceae</i>	<i>Betula pendula</i> Roth., <i>Carduus acanthoides</i> L.	<i>Portulacaceae</i>	<i>Portulaca oleracea</i> L.
<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Saponaria officinalis</i> L., <i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke	<i>Ranunculaceae</i>	<i>Clematis vitalba</i> L.
		<i>Resedaceae</i>	<i>Reseda luteola</i> L.
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium botrys</i> L.	<i>Rosaceae</i>	<i>Prunus avium</i> L., <i>Potentilla reptans</i> L.
<i>Dipsacaceae</i>	<i>Dipsacus laciniatus</i> L.	<i>Salicaceae</i>	<i>Salix alba</i> L., <i>Populus nigra</i> L.
<i>Equisetaceae</i>	<i>Equisetum talmateia</i> Ehrh.		
<i>Phytolaccaceae</i>	<i>Phytolacca americana</i> L.	<i>Scrophulariaceae</i>	<i>Verbascum phlomoides</i> L.



Sl. 5. - *Betula pendula* Roth.

U 2013. godini ukupno je determinisano 104 biljnih vrsta koje su svrstane u 34 familije i 87 rodova. Najbrojnija je familija *Asteraceae* sa 20 vrstom, zatim familija *Poaceae* sa 12 vrsta i familija *Fabaceae* sa 9 biljnih vrsta, što čini ukupno 39,4% od svih vrsta. Ove tri familije su ukupno zastupljene sa 35 rodova, što ukupno čini 40,2% od ukupnog broja rodova. Familije *Rosaceae* i *Lamiaceae* imaju po 6 vrsta, odnosno rodova i zajedno čine 11,5% od svih biljnih vrsta, odnosno 13,8% od ukupno determinisanih rodova. Familije *Salicaceae* (2 roda) i *Apiaceae* (5 rodova) zastupljene su sa po 5 vrsta. Obe familije učestvuju sa ukupno 9,6% od svih vrsta, odnosno 8,1% od

svih rodova. Ostale familije su slabije zastupljene. Četiri predstavnika ima familija *Polygonaceae*, po tri *Boraginaceae* i *Euphorbiaceae*, po dva *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Malvaceae*, *Ranunculaceae*, *Resedaceae*, *Rubiaceae* i *Sapindaceae*, i ukupno čine 25,0% od svih determinisanih vrsta, odnosno 20,7% od svih rodova. Sve ostale familije imaju po jednog predstavnika (*Verbenaceae*, *Scrophulariaceae*, *Primulaceae*, *Plantaginaceae*, *Papaveraceae*, *Liliaceae*, *Oleaceae*, *Hypericaceae*, *Adoxaceae*, *Betulaceae*, *Brassicaceae*, *Convolvulaceae*, *Cornaceae*, *Dipsacaceae*, *Equisetaceae*), što ukupno čini 14,5% svih determinisanih vrsta, odnosno 17,2 rodova (tab. 22). Fitocenološki snimci pojedinih lokaliteta prikazani su u tabelama 23, 24, 25, 26 i 27.

Tabela 22. - Determinisane biljne vrste na lokacijama rudnika mrkog uglja
“Kakanj“ u 2013. godini

Familija	Biljna vrsta	Familija	Biljna vrsta
<i>Adoxaceae</i>	<i>Sambucus ebulus L.</i>	<i>Hypericaceae</i>	<i>Hypericum perforatum L.</i>
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Amaranthus blitoides</i> Watson, <i>Amaranthus albus L.</i>	<i>Oleaceae</i>	<i>Ligustrum vulgare L.</i>
<i>Apiaceae</i>	<i>Daucus carota L.</i>	<i>Lamiaceae</i>	<i>Clinopodium vulgare L.</i>
	<i>Eryngium campestre L.</i>		<i>Prunella vulgaris L.</i>
	<i>Pastinaca sativa L.</i>		<i>Mentha longifolia (L.) Hudson</i>
	<i>Tordylium maximum L.</i>		<i>Origanum vulgare L.</i>
	<i>Torilis arvensis (Hudson) Link</i>		<i>Salvia verticillata L.</i>
<i>Asteraceae</i>	<i>Achillea millefolium L.</i>		<i>Stachys annua L.</i>
	<i>Anthemis arvensis L.</i>	<i>Liliaceae</i>	<i>Allium scorodoprasum L.</i>
	<i>Artemisia absinthium L.</i>	<i>Malvaceae</i>	<i>Althaea cannabina L.</i>

<i>Carduus acanthoides</i> L.		<i>Malva sylvestris</i> L.
<i>Centaurea splendens</i> L.	<i>Papaveraceae</i>	<i>Papaver rhoeas</i> L.
<i>Cichorium intybus</i> L.	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago lanceolata</i> L.
<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop	<i>Poaceae</i>	<i>Bromus arvensis</i> L.
<i>Cirsium eriophorum</i> (L.) Scop		<i>Bromus hordaceus</i> L.
<i>Cirsium vulgare</i> (Savi) Ten. <i>Cirsium</i>		<i>Bromus inermis</i> Leyss
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist		<i>Calamagrostis</i> <i>arundinacea</i> (L.) Roth
<i>Crepis foetida</i> L. subsp. <i>rhoeadifolia</i> (M. B.) Fiori et Paol.		<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.
<i>Doronicum</i> sp. L.		<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop
<i>Inula britannica</i> L.		<i>Dactylis glomerata</i> L.
<i>Lactuca serriola</i> L.		<i>Elymus repens</i> (L.) Gould
<i>Picris hieracioides</i> L.		<i>Festuca pratensis</i> Huds.
<i>Tripleurospermum</i> <i>inodorum</i> (L.) Sch.		<i>Lolium perenne</i> L.
<i>Tussilago farfara</i> L.		<i>Poa compressa</i> L.
<i>Xanthium italicum</i> Mor.		<i>Vulpia myuros</i> (L.) C. C. Gmel.
<i>Xanthium strumarium</i> L.		
<i>Sonchus asper</i> Hill.		<i>Polygonaceae</i>

			<i>convolvulus (L.) Dum.</i>	
<i>Betulaceae</i>	<i>Betula pendula Roth.</i>		<i>Polygonum aviculare L</i>	
<i>Boraginaceae</i>	<i>Anchusa officinalis L.</i>		<i>Polygonum lapathifolium L.</i>	
	<i>Echium vulgare L.</i>		<i>Rumex crispus L.</i>	
	<i>Lappula squarosa (Retz.) Dumort.</i>	<i>Primulaceae</i>	<i>Anagallis foemina Mill.</i>	
<i>Brassicaceae</i>	<i>Erysimum repandum L.</i>	<i>Ranunculaceae</i>	<i>Clematis vitalba L.</i>	
			<i>Ranunculus sardous Crantz</i>	
<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Arenaria serpyllifolia L.</i>	<i>Resedaceae</i>	<i>Reseda lutea L.</i>	
	<i>Petrorhagia prolifera (L.) P.W.Ball & Heywood</i>		<i>Reseda phyteuma L.</i>	
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Atriplex oblongifolia Waldst. & Kit.</i>	<i>Rosaceae</i>	<i>Agrimonia eupatoria Ledeb.</i>	
	<i>Atriplex patula L.</i>		<i>Crataegus monogyna Jacq.</i>	
<i>Convolvulaceae</i>	<i>Convolvulus arvensis L.</i>		<i>Potentilla reptans L.</i>	
<i>Cornaceae</i>	<i>Cornus sangiunea L.</i>		<i>Rosa canina L.</i>	
<i>Dipsacaceae</i>	<i>Dipsacus laciniatus L.</i>		<i>Rubus fruticosus L.</i>	
<i>Equisetaceae</i>	<i>Equisetum telmateia Ehrh.</i>		<i>Sanguisorba minor Scop.</i>	
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Euphorbia exigua L.</i>		<i>Rubiaceae</i>	<i>Galium album Mill</i>
	<i>Euphorbia falcata L</i>			<i>Galium verum L.</i>
	<i>Euphorbia stricta L.</i>	<i>Salicaceae</i>	<i>Populus nigra L.</i>	
<i>Fabaceae</i>	<i>Dorycnium herbaceum Vill.</i>		<i>Salix alba L.</i>	

	<i>Lathyrus tuberosus L.</i>		<i>Salix caprea L.</i>
	<i>Lotus corniculatus L.</i>		<i>Salix fragilis L.</i>
	<i>Medicago falcata L.</i>		<i>Salix purpurea L.</i>
	<i>Medicago lupulina L.</i>	<i>Scrophulariaceae</i>	<i>Chaenorrhinum minus(L.) Lange in Willk. & Lange</i>
	<i>Melilotus officinalis (L.) Pallas</i>	<i>Sapindaceae</i>	<i>Acer campestre L.</i>
	<i>Ononis spinosa L.</i>		<i>Acer negundo L.</i>
	<i>Securigera varia (L.) Lassen</i>	<i>Verbenaceae</i>	<i>Verbena officinalis L.</i>
	<i>Trifolium pratense L.</i>		

Tabela 23. - Fitocenološki snimak 1, Vrtlište 1, dimenzije 5x5 m:

Familija	Biljna vrsta		Familija	Biljna vrsta	
<i>Apiaceae</i>	<i>Daucus carota L.</i>	1.1	<i>Fabaceae</i>	<i>Dorycnium herbaceum Vill.</i>	1.2
	<i>Torilis arvensis (Hudson) Link</i>	+		<i>Lotus corniculatus L.</i>	+
<i>Asteraceae</i>	<i>Carduus acanthoides L.</i>	+		<i>Medicago falcata L.</i>	1.1
	<i>Lactuca serriola L.</i>	1.1	<i>Ononis spinosa L.</i>	1.1	
	<i>Sonchus asper Hill.</i>	+	<i>Poaceae</i>	<i>Bromus inermis Leyss.</i>	1.2
<i>Boraginaceae</i>	<i>Echium vulgare L.</i>	1.1		<i>Dactylis glomerata L.</i>	1.2
<i>Convolvulaceae</i>	<i>Convolvulus arvensis L.</i>	+	<i>Rosaceae</i>	<i>Sanguisorba minor Scop.</i>	+
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Euphorbia exigua L.</i>	+	<i>Rubiaceae</i>	<i>Galium verum L.</i>	3.3
	<i>Euphorbia falcata L.</i>	1.1			

Tabela 24. - Fitocenološki snimak 2, Vrtlište 2, dimenzije 20x10 m

Familija	Biljna vrsta		Familija	Biljna vrsta	
<i>Adoxaceae</i>	<i>Sambucus ebulus L.</i>	1.1	<i>Fabaceae</i>	<i>Lathyrus tuberosus L.</i>	1.1
<i>Apiaceae</i>	<i>Pastinaca sativa L.</i>	1.1		<i>Lotus corniculatus L.</i>	+
<i>Asteraceae</i>	<i>Anthemis arvensis L.</i>	1.1		<i>Medicago lupulina L.</i>	+
	<i>Cirsium arvense (L.) Scop.</i>	3.3		<i>Melilotus officinalis Lam.</i>	+
	<i>Cirsium vulgare (Savi) Ten.</i>	+	<i>Securigera varia (L.) Lassen</i>	+	
	<i>Lactuca serriola L.</i>	1.1	<i>Malvaceae</i>	<i>Malva sylvestris L.</i>	+
	<i>Picris hieracioides L.</i>	1.1	<i>Papaveraceae</i>	<i>Papaver rhoeas L.</i>	1.2
	<i>Tripleurospermum inodorum (L.) Sch</i>	1.1	<i>Poaceae</i>	<i>Bromus hordeaceus L.</i>	+
	<i>Tussilago farfara L.</i>	1.1	<i>Polygonaceae</i>	<i>Bilderdykia convolvulus (L.) Dum.</i>	1.1
<i>Xanthium strumarium L.</i>	+	<i>Polygonum aviculare L.</i>		1.1	
<i>Boraginaceae</i>	<i>Anchusa officinalis L.</i>	1.1		<i>Polygonum lapathifolium L.</i>	+
	<i>Echium vulgare L.</i>	+		<i>Rumex crispus L.</i>	+
	<i>Lappula squarosa (Retz.) Dumort.</i>	1.1			
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Atriplex patula L.</i>	+	<i>Ranunculaceae</i>	<i>Ranunculus sardous Crantz.</i>	+
			<i>Resedaceae</i>	<i>Reseda lutea L.</i>	+
<i>Convolvulaceae</i>	<i>Convolvulus</i>	3.3		<i>Reseda</i>	+

	<i>arvensis L.</i>			<i>phyteuma L.</i>	
<i>Equisetaceae</i>	<i>Equisetum telmateia Ehrh.</i>	4.4	<i>Rosaceae</i>	<i>Potentilla reptans L.</i>	+
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Euphorbia exigua L.</i>	+	<i>Verbenaceae</i>	<i>Verbena officinalis L.</i>	+



Sl. 6. - *Xanthium strumarium L.*

Tabela 25. - Fitocenološki snimak 3, Stara jama, lokacija 1, dimenzije 20x10 m:

Familija	Biljna vrsta		Familija	Biljna vrsta	
<i>Apiaceae</i>	<i>Daucus carota L.</i>	1.1	<i>Fabaceae</i>	<i>Lotus corniculatus L.</i>	1.1
	<i>Tordylium maximum L.</i>	1.1		<i>Securigera varia (L.) Lassen.</i>	+
<i>Asteraceae</i>	<i>Achillea millefolium L.</i>	+		<i>Trifolium pratense L.</i>	1.1

	<i>Anthemis arvensis</i> <i>L.</i>	1.1	<i>Liliaceae</i>	<i>Allium scorodoprasum</i> <i>L.</i>	+
	<i>Artemisia absinthium</i> <i>L.</i>	3.3	<i>Papaveraceae</i>	<i>Papaver rhoeas</i> <i>L.</i>	1.1
	<i>Conyza canadensis</i> (<i>L.</i>) Cronquist	1.1	<i>Poaceae</i>	<i>Dactylis glomerata</i> <i>L.</i>	1.1
	<i>Crepis foetida</i> <i>L.</i> subsp. <i>rhoadifolia</i> (<i>M. B.</i>) Fiori et Paol	1.1		<i>Elymus repens</i> (<i>L.</i>) Gould.	1.1
	<i>Lactuca serriola</i> <i>L.</i>	1.1	<i>Ranunculaceae</i>	<i>Clematis vitalba</i> <i>L.</i>	1.1
	<i>Picris hieracioides</i> <i>L.</i>	1.1	<i>Rosaceae</i>	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	+
	<i>Tripleurospermum inodorum</i> (<i>L.</i>) Sch	1.1		<i>Potentilla reptans</i> <i>L.</i>	4.4
<i>Brassicaceae</i>	<i>Erysimum repandum</i> <i>L.</i>	+		<i>Sanguisorba minor</i> Scop.	1.1
<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Arenaria serpyllifolia</i> <i>L.</i>	1.1	<i>Rubiaceae</i>	<i>Galium album</i> Miller.	+
	<i>Petrorhagia prolifera</i> (<i>L.</i>) P. W. Ball & Heywood.	1.1	<i>Salicaceae</i>	<i>Populus nigra</i> <i>L.</i>	1.1
<i>Dipsacaceae</i>	<i>Dipsacus laciniatus</i> <i>L.</i>	+		<i>Salix alba</i> <i>L.</i>	+
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Euphorbia stricta</i> <i>L.</i>	+		<i>Salix purpurea</i> <i>L.</i>	+
				<i>Salix caprea</i> <i>L.</i>	+
			<i>Verbenaceae</i>	<i>Verbena officinalis</i> <i>L.</i>	+

Tabela 26. - Fitocenološki snimak 4, Stara jama, lokacija 2, dimenzije 10x10 m:

Familija	Biljna vrsta		Familija	Biljna vrsta	
<i>Asteraceae</i>	<i>Anthemis arvensis</i> <i>L.</i>	+	<i>Lamiaceae</i>	<i>Prunella</i> <i>vulgaris L.</i>	+
	<i>Conyza canadensis</i> <i>(L.) Cronquist</i>	4.4	<i>Papaveraceae</i>	<i>Papaver rhoeas</i> <i>L.</i>	2.2
	<i>Crepis foetida L.</i> <i>subsp. rhoeadifolia</i> <i>(M. B.) Fiori et</i> <i>Paol.</i>	2.2	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago</i> <i>lanceolata L.</i>	+
	<i>Tripleurospermum</i> <i>inodorum (L.) Sch</i>	1.1	<i>Poaceae</i>	<i>Calamagrostis</i> <i>arundinacea (L.)</i> <i>Roth</i>	2.2
	<i>Xanthium</i> <i>strumarium L.</i>	+		<i>Vulpia myuros</i> <i>(L.) C. C. Gmel</i>	1.2
<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Petrorhagia</i> <i>prolifera (L.) P. W.</i> <i>Ball & Heywood</i>	1.1	<i>Polygonaceae</i>	<i>Polygonum</i> <i>lapathifolium L.</i>	+
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Euphorbia stricta L.</i>	+	<i>Rosaceae</i>	<i>Sanguisorba</i> <i>minor Scop.</i>	2.2
<i>Fabaceae</i>	<i>Dorycnium</i> <i>herbaceum Vill.</i>	+	<i>Salicaceae</i>	<i>Populus nigra L.</i>	2.2
	<i>Lotus corniculatus</i> <i>L.</i>	+	<i>Sapindaceae</i>	<i>Acer campestre</i> <i>L.</i>	+
	<i>Trifolium pratense</i> <i>L.</i>	+			



Sl. 7. - *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch.

Na jalovini je uočeno prisustvo pet familija (*Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Convolvulaceae*, *Poaceae* i *Polygonaceae*).

Tabela 27. - Fitocenološki snimak 5 (jalovina)

Familija	Biljna vrsta		Familija	Biljna vrsta	
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Amaranthus blitoides</i> Watson.	1.1	<i>Poaceae</i>	<i>Festuca pratensis</i> Huds.	2.2
				<i>Elymus repens</i> (L.) Gould.	+
				<i>Vulpia myuros</i> (L.) C. C. Gmel	+
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Atriplex oblongifolia</i> Waldst. & Kit.	+			
<i>Convolvulaceae</i>	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	+	<i>Polygonaceae</i>	<i>Polygonum aviculare</i> L.	1.2
<i>Poaceae</i>	<i>Bromus hordeaceus</i> L.	1.2		<i>Polygonum lapathifolium</i> L.	1.1

	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	2.2			
--	---------------------------------------	-----	--	--	--

5.3. Mikrobni diverzitet i enzimaska aktivnost u zemljištu i rizosferi

5.3.1. Mikrobni diverzitet u zemljištu i rizosferi u periodu od 2011-2013. godine

U 2011. godini dominantne biljne vrste na ispitivanim lokacijama bile su: *Polygonum aviculare* L., *Potentilla reptans* L., *Plantago lanceolata* L., *Doronicum* sp. L., *Equisetum telmateia* Ehrh., *Polygonum lapathifolium* L., *Saponaria officinalis* L., *Matricaria inodora* L., *Erigeron canadensis* L. i *Reseda luteola* L. Mikrobiološkim analizama ispitana je brojnost različitih fizioloških i sistematskih grupa mikroorganizama u zoni zemljišta i rizosfere ovih biljnih vrsta.

Brojnost bakterija u uzorcima zavisila je od vrste biljaka i zone uzimanja uzoraka (tab. 28). U svim uzorcima ukupan broj bakterija je veći u uzorcima koji su uzeti iz zone rizosfere u poređenju sa uzorcima iz zemljišta. Najveća brojnost bakterija zabeležena je u uzorcima rizosfere biljke *Reseda luteola* L. Visoka brojnost bakterija zabeležena je i u uzorku zemljišta iste biljke. *Equisetum telmateia* Ehrh. se takođe odlikuje visokim ukupnim brojem bakterija, dok je brojnost bakterija u uzorcima ostalih biljaka znatno manja. Najniži ukupan broj bakterija bio je u uzorku zemljišta vrste *Polygonum lapathifolium* L.

Prisustvo vegetacije uglavnom je stimulatивно uticalo na razvoj amonifikatora (tab. 28). Veoma visoka brojnost ukupnih amonifikatora je zabeležena u uzorcima zemljišta i rizosfere vrsta *Reseda luteola* L. i *Equisetum telmateia* Ehrh. u poređenju sa ostalim vrstama. U svim uzorcima brojnost ukupnih amonifikatora je veća u uzorcima rizosfere u odnosu na zemljište, osim kod vrsta *Equisetum telmateia* Ehrh. i *Erigeron canadensis* L.

Tabela 28. - Ukupan broj bakterija i amonifikatora (CFUx10⁵/g) u zemljištu i rizosferi

Uzorak	ukupan broj bakterija		ukupan broj amonifikatora		sporogeni amonifikatori	
	zemljište	rizosfera	zemljište	rizosfera	zemljište	rizosfera
<i>Polygonum aviculare</i> L.	19,6	40,6	26,8	51,9	0,8	0,7
<i>Potentilla reptans</i> L.	29,4	50,7	20,8	30,9	2,1	1,6
<i>Plantago lanceolata</i> L.	30,0	105,3	44,3	53,1	1,2	2,5
<i>Doronicum</i> sp. L.	65,2	318,0	45,7	69,2	0,7	0,2
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.	143,2	1074,4	662,3	499,3	31,6	0,3
<i>Polygonum lapathifolium</i> L.	5,0	98,4	20,2	82,6	0,3	0,8
<i>Saponaria officinalis</i> L.	29,2	137,5	8,4	91,7	0,1	0,1
<i>Matricaria inodora</i> L.	48,7	113,5	26,5	52,9	0,1	0,3
<i>Erigeron canadensis</i> L.	59,5	89,8	56,6	46,5	1,3	0,5
<i>Reseda luteola</i> L.	1839,3	2298,2	1483,7	2270,7	6,9	14,2
prosek	226,91	432,64	239,53	324,88	4,51	2,12

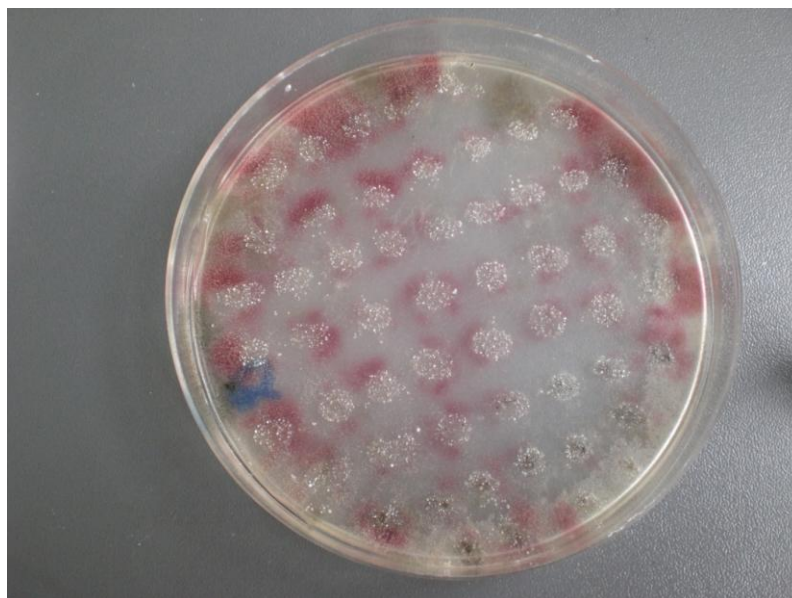
U uzorcima zemljišta, zastupljenost sporogenih amonifikatora je najveća kod vrste *Equisetum telmateia* Ehrh., dok je u uzorcima rizosfere najveća brojnost kod vrste *Reseda luteola* L. Najmanja zastupljenost sporogenih amonifikatora u zemljištu bila je kod vrsta *Saponaria officinalis* L. i *Matricaria inodora* L. *Saponaria officinalis* L. se, u poređenju sa ostalim vrstama, odlikuje i najmanjim brojem sporogenih amonifikatora u uzorcima iz zone rizosfere.

U uzorcima rizosfere konstatovana je veća zastupljenost oligonitrofila u odnosu na zemljište (tab. 29). U svim uzorcima, brojnost ove grupe mikroorganizama bila je najveća kod vrsta *Equisetum telmateia* Ehrh. i *Reseda luteola* L. Nasuprot tome, vrste iz roda *Polygonum* odlikuju se slabom zastupljenošću oligonitrofila. Visoka brojnost *Azotobacter* sp. u odnosu na ostale ispitivane vrste konstatovana je kod uzoraka zemljišta i rizosfere vrste *Reseda luteola* L. (sl. 8). Slaba zastupljenost *Azotobacter* sp. konstatovana je u uzorcima zemljišta vrsta *Plantago lanceolata* L., *Erigeron canadensis* L. i *Doronicum* sp. L. Odsustvo *Azotobacter* sp. zabeleženo je u uzorku rizosfere vrste

Erigeron canadensis L., dok je njegova slaba zastupljenost bila u uzorcima rizosfere *Saponaria officinalis* L. i *Plantago lanceolata* L.

Tabela 29. - Brojnost oligonitrofila i *Azotobacter* sp. (CFUx10⁴/g) u zemljištu i rizosferi

Uzorak	oligonitrofilni		<i>Azotobacter</i> sp.	
	zemljište	rizosfera	zemljište	rizosfera
<i>Polygonum aviculare</i> L.	218,8	579,8	5,7	3,9
<i>Potentilla reptans</i> L.	338,7	456,3	3,5	4,1
<i>Plantago lanceolata</i> L.	548,7	618,0	2,6	3,3
<i>Doronicum</i> sp. L.	800,1	1196,0	3,0	3,8
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.	1345,9	1410,2	4,7	5,6
<i>Polygonum lapathifolium</i> L.	120,5	563,4	5,6	4,4
<i>Saponaria officinalis</i> L.	308,0	741,0	5,6	2,4
<i>Matricaria inodora</i> L.	669,0	995,6	3,1	4,5
<i>Erigeron canadensis</i> L.	829,6	1007,0	2,8	0,0
<i>Reseda luteola</i> L.	2149,6	3028,7	20,2	31,0
prosek	732,89	1059,60	5,86	6,30



Sl. 8. - Kolonije *Azotobacter* sp. u zoni zemljišta vrste *Reseda luteola* L.

Zastupljenost gljiva u uzorcima je veoma različita. Najmanja zastupljenost bila je u uzorcima zemljišta vrsta iz roda *Polygonum*, dok se vrste *Saponaria officinalis* L., *Matricaria inodora* L. i *Erigeron canadensis* L. odlikuju znatno većim brojem gljiva u zoni zemljišta u poređenju sa ostalim biljnim vrstama. Vrsta *Matricaria inodora* L., kod koje je najveća zastupljenost gljiva u zoni zemljišta, odlikuje se najmanjom brojnošću gljiva u zoni rizosfere u odnosu na ostale ispitivane vrste. Visoka brojnost gljiva u zoni rizosfere je takođe bila kod vrsta *Saponaria officinalis* L. i *Erigeron canadensis* L., ali je njihova najveća zastupljenost zabeležena u uzorku vrste *Reseda luteola* L. Uzorci uzeti iz zone zemljišta i rizosfere ove vrste odlikuju se i najslabijom zastupljenošću aktinomiceta u poređenju sa ostalim uzorcima. Slaba zastupljenost aktinomiceta bila je u uzorcima zemljišta i rizosfere vrsta *Equisetum telmateia* Ehrh. i *Polygonum lapathifolium* L. U zoni zemljišta najveća zastupljenost aktinomiceta bila je kod vrste *Erigeron canadensis* L., dok se vrste *Potentilla reptans* L. i *Saponaria officinalis* L. takođe odlikuju visokom zastupljenošću aktinomiceta. Obe ove vrste u zoni rizosfere imaju najveću brojnost aktinomiceta u poređenju sa ostalim ispitivanim uzorcima (tab. 30).

Tabela 30. - Brojnost gljiva i aktinomiceta (CFUx10⁴/g) u zemljištu i rizosferi

Uzorak	gljive		aktinomicete	
	zemljište	rizosfera	zemljište	rizosfera
<i>Polygonum aviculare</i> L.	0,2	0,9	3,0	3,3
<i>Potentilla reptans</i> L.	1,8	0,7	4,7	3,5
<i>Plantago lanceolata</i> L.	4,6	2,5	4,0	3,0
<i>Doronicum</i> sp. L.	2,9	4,0	2,7	1,6
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.	3,6	3,4	1,0	1,7
<i>Polygonum lapathifolium</i> L.	0,7	1,6	1,4	0,6
<i>Saponaria officinalis</i> L.	9,3	10,5	4,5	5,3
<i>Matricaria inodora</i> L.	18,1	0,6	3,8	2,3
<i>Erigeron canadensis</i> L.	10,9	14,6	5,1	2,8
<i>Reseda luteola</i> L.	5,4	20,9	0,3	0,0
prosek	5,75	5,97	3,05	2,41

U 2012. godini dominantne biljne vrste na ispitivanim lokacijama bile su: *Amaranthus retroflexus* L., *Matricaria inodora* L., *Saponaria officinalis* L., *Equisetum telmateia* Ehrh., *Plantago lanceolata* L., *Polygonum aviculare* L., *Polygonum lapathifolium* L., *Tussilago farfara* L., *Potentilla reptans* L., *Doronicum sp.* L., *Artemisia absinthium* L., *Xanthium italicum* Mor., *Populus nigra* L. i *Amaranthus albus* L.

Prisustvo biljnih vrsta stimulatивно je uticalo na brojnost ukupnih bakterija u 2012. godini (tab. 31). Najmanja zastupljenost bakterija bila je u uzorcima zemljišta vrste *Amaranthus albus* L., dok je najveća zastupljenost bila kod vrsta *Polygonum aviculare* L. i *Equisetum telmateia* Ehrh. U zoni rizosfere najveća brojnost bakterija konstatovana je kod vrsta *Tussilago farfara* L., *Plantago lanceolata* L. i *Polygonum aviculare* L., dok je kod vrste *Populus nigra* L. zabeležena najmanja brojnost ukupnih bakterija.

Najveći broj ukupnih amonifikatora bio je u uzorku zemljišta vrste *Equisetum telmateia* Ehrh., a visoka brojnost zabeležena je i u uzorku *Tussilago farfara* L. Najmanji broj ukupnih amonifikatora u uzorcima zemljišta bio je kod vrste *Artemisia absinthium* L., u čijoj je rizosferi zabeležen i najveći broj ukupnih amonifikatora u poređenju sa ostalim uzorcima iz zone rizosfere (tab. 31). U rizosferi vrsta *Potentilla reptans* L. i *Xanthium italicum* Mor. je takođe zabeležen visok broj ukupnih amonifikatora, dok je vrlo niska brojnost ove grupe mikroorganizama konstatovana u rizosferi vrsta *Amaranthus albus* L., *Plantago lanceolata* L. i vrsta iz roda *Polygonum*. Nasuprot tome, uzorci zemljišta i rizosfere vrste *Polygonum aviculare* L. odlikuju se najvećom brojnošću sporogenih amonifikatora.

Što se tiče brojnosti oligonitrofila u uzorcima iz zone zemljišta (tab. 32), njihov najveći broj bio je kod vrste *Potentilla reptans* L., dok je najmanji broj konstatovan kod vrste *Plantago lanceolata* L. U najvećem broju uzoraka iz zone rizosfere, broj oligonitrofila je veći u odnosu na zonu zemljišta. Najveća brojnost bila je u zoni rizosfere vrste *Artemisia absinthium* L. a najmanja kod vrste *Polygonum lapathifolium* L.

Tabela 31. - Ukupan broj bakterija i amonifikatora (CFUx10⁵/g) u zemljištu i rizosferi

Uzorak	ukupan broj bakterija		ukupan broj amonifikatora		sporogeni amonifikatori	
	zemljište	rizosfera	zemljište	rizosfera	zemljište	rizosfera
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	77,4	96,3	24,0	28,2	2,0	1,2
<i>Matricaria inodora</i> L.	72,7	100,4	28,8	31,0	0,8	0,2
<i>Saponaria officinalis</i> L.	43,2	121,9	25,0	40,9	1,2	0,8
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.	161,7	159,1	112,1	46,3	1,8	1,3
<i>Plantago lanceolata</i> L.	54,4	186,8	24,1	17,2	1,5	2,1
<i>Polygonum aviculare</i> L.	227,4	173,1	20,7	16,8	3,1	2,9
<i>Polygonum lapathifolium</i> L.	93,5	98,6	8,9	14,0	0,4	1,4
<i>Tussilago farfara</i> L.	110,3	299,6	51,7	40,9	0,1	2,3
<i>Potentilla reptans</i> L.	75,4	105,0	36,3	86,7	2,5	2,2
<i>Doronicum sp.</i> L.	51,2	64,6	31,0	47,8	2,2	0,7
<i>Artemisia absinthium</i> L.	56,5	165,0	4,2	139,7	1,1	2,4
<i>Xanthium italicum</i> Mor.	53,2	69,2	24,8	74,0	0,5	0,1
<i>Populus nigra</i> L.	50,8	57,1	29,8	39,9	0,6	0,3
<i>Amaranthus albus</i> L.	26,8	65,4	15,7	16,0	1,1	1,7
prosek	82,46	125,86	31,22	45,67	1,35	1,40

U odnosu na sve uzorke iz obe ispitivane zone, brojnost *Azotobacter* sp. (tab. 32) je najmanja kod vrste *Xanthium italicum* Mor. U uzorcima iz zone zemljišta visoka brojnost *Azotobacter* sp. je konstatovana kod vrsta *Saponaria officinalis* L. i *Polygonum lapathifolium* L., dok je u zoni rizosfere vrsta *Polygonum aviculare* L., *Matricaria inodora* L., *Plantago lanceolata* L. i *Tussilago farfara* L. zabeležena visoka brojnost *Azotobacter* sp.

Tabela 32. - Brojnost oligonitrofila i *Azotobacter* sp. (CFUx10⁴/g) u zemljištu i rizosferi

uzorak	oligonitrofilni		<i>Azotobacter</i> sp.	
	zemljište	rizosfera	zemljište	rizosfera
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	255,0	458,5	5,5	3,8
<i>Matricaria inodora</i> L.	173,0	403,5	1,3	7,6
<i>Saponaria officinalis</i> L.	275,2	348,0	16,0	6,8
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.	255,7	251,6	5,8	5,0
<i>Plantago lanceolata</i> L.	112,6	333,5	6,2	7,4
<i>Polygonum aviculare</i> L.	261,4	362,4	6,9	7,9
<i>Polygonum lapathifolium</i> L.	225,3	178,3	9,4	5,4
<i>Tussilago farfara</i> L.	273,9	359,6	5,3	7,0
<i>Potentilla reptans</i> L.	430,2	360,4	0,9	1,1
<i>Doronicum</i> sp. L.	384,3	347,2	1,0	0,4
<i>Artemisia absinthium</i> L.	201,4	1430,0	1,3	0,4
<i>Xanthium italicum</i> Mor.	252,4	415,6	0,1	0,2
<i>Populus nigra</i> L.	259,5	287,3	0,9	0,8
<i>Amaranthus albus</i> L.	147,5	559,8	0,5	0,3
prosek	250,5	435,41	4,36	3,86

U većini uzoraka, brojnost gljiva je veća u odnosu na broj aktinomiceta (tab. 33). U uzorcima zemljišta najveća brojnost gljiva bila je kod vrsta *Saponaria officinalis* L. i *Matricaria inodora* L., dok ih je najmanje kod vrsta *Doronicum* sp. L. i *Equisetum telmateia* Ehrh. U uzorcima rizosfere gljive su najbrojnije kod vrsta *Artemisia absinthium* L. i *Saponaria officinalis* L. (sl. 9), dok ih je najmanje kod vrste *Amaranthus retroflexus* L. U brojnosti aktinomiceta ne postoje velike razlike između uzoraka. Najveći njihov broj bio je u uzorku zemljišta vrsta *Matricaria inodora* L., *Amaranthus retroflexus* L. i *Plantago lanceolata* L., dok ih je najmanje kod vrsta *Saponaria officinalis* L. i *Amaranthus albus* L. U uzorcima rizosfere najveći broj aktinomiceta zabeležen je kod vrste *Artemisia absinthium* L., dok ih je najmanje kod vrsta *Amaranthus retroflexus* L. i *Equisetum telmateia* Ehrh.



Sl. 9. - Kolonije gljiva u zoni rizosfere vrste *Saponaria officinalis* L.

Tabela 33. - Brojnost gljiva i aktinomiceta u zemljištu i rizosferi (CFUx10⁴/g)

Uzorak	gljive		aktinomicete	
	zemljište	rizosfera	zemljište	rizosfera
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	4,1	0,4	3,7	0,9
<i>Matricaria inodora</i> L.	17,0	14,5	3,9	1,1
<i>Saponaria officinalis</i> L.	18,6	40,9	0,7	1,2
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.	1,5	1,6	1,2	0,9
<i>Plantago lanceolata</i> L.	11,6	6,9	3,8	2,7
<i>Polygonum aviculare</i> L.	7,5	3,9	2,4	3,9
<i>Polygonum lapathifolium</i> L.	3,1	4,3	1,5	1,5
<i>Tussilago farfara</i> L.	7,0	16,1	3,1	1,2
<i>Potentilla reptans</i> L.	2,1	1,7	2,5	2,8
<i>Doronicum sp.</i> L.	0,8	1,6	3,3	4,2
<i>Artemisia absinthium</i> L.	3,5	46,4	2,0	5,3
<i>Xanthium italicum</i> Mor.	1,8	1,4	1,7	2,7
<i>Populus nigra</i> L.	3,0	2,2	3,3	3,5
<i>Amaranthus albus</i> L.	3,6	15,5	1,0	1,1
prosek	6,08	11,24	2,44	2,36

U 2013. godini izvršeno je ispitivanje mikrobnog diverziteta u zemljištu i rizosferi sledećih biljnih vrsta: *Euphorbia exigua* L., *Salix fragilis* L., *Galium verum* L., *Equisetum telmateia* Ehrh., *Amaranthus albus* L., *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch., *Tordylium maximum* L., *Dorycnium herbaceum* Vill. i *Conyza canadensis* (L.) Cronquist.

Zone zemljišta i rizosfere vrste *Galium verum* L. karakterišu se najvećim ukupnim brojem bakterija (tab. 34). Najmanji broj bakterija u zoni zemljišta bio je kod vrste *Conyza canadensis* (L.) Cronquist, odnosno kod vrste *Amaranthus albus* L. u zoni rizosfere.

U zoni rizosfere, ukupan broj amonifikatora (tab. 34) bio je veći u zoni rizosfere u odnosu na zonu zemljišta, osim kod vrsta *Galium verum* L. i *Tordylium maximum* L. U zoni zemljišta vrste *Galium verum* L. zabeležen je najveći ukupan broj amonifikatora, dok ih je u zoni rizosfere najviše kod vrste *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch. Najmanji broj amonifikatora konstatovan je u obe ispitivane zone vrste *Amaranthus albus* L. Sporogeni oblici su najzastupljeniji u zoni zemljišta kod vrsta *Euphorbia exigua* L. i *Salix fragilis* L., odnosno u zoni rizosfere kod vrste *Equisetum telmateia* Ehrh. Najmanji broj sporogenih oblika bio je u zoni zemljišta vrsta *Dorycnium herbaceum* Vill. i *Tordylium maximum* L., dok je u zoni rizofere njihov broj najmanji kod vrsta *Tordylium maximum* L. i *Conyza canadensis* (L.) Cronquist.

Brojnost oligonitrofila bila je veća u uzorcima rizosfere u odnosu na zonu zemljišta, osim kod vrsta *Salix fragilis* L., *Galium verum* L. i *Equisetum telmateia* Ehrh. Najmanji broj oligonitrofila konstatovan je u zoni zemljišta vrsta *Euphorbia exigua* L. i *Conyza canadensis* (L.) Cronquist, dok je njihov najveći broj bio kod vrste *Galium verum* L.. Kod vrste *Amaranthus albus* L. brojnost ove grupe mikroorganizama u obe ispitivane zone bila je niska. Najveći broj oligonitrofila u zoni rizosfere bio je kod vrste *Dorycnium herbaceum* Vill.

Tabela 34. - Ukupan broj bakterija i amonifikatora (CFUx10⁵/g) u zemljištu i rizosferi

Uzorak	ukupan broj bakterija		ukupan broj amonifikatora		sporogeni amonifikatori	
	zemljište	rizosfera	zemljište	rizosfera	zemljište	rizosfera
<i>Euphorbia exigua</i> L.	11,4	18,3	8,4	14,6	1,5	1,4
<i>Salix fragilis</i> L.	39,1	10,9	12,8	13,9	1,4	1,3
<i>Galium verum</i> L.	68,2	44,2	27,3	20,8	1,2	1,6
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.	41,5	18,7	18,8	20,6	0,5	5,1
<i>Amaranthus albus</i> L.	12,8	8,4	5,2	7,6	0,6	0,9
<i>Tripleurospermum inodorum</i> (L.) Sch.	41,7	30,5	7,6	23,3	0,6	1,7
<i>Tordylium maximum</i> L.	23,4	18,8	8,6	8,3	0,5	0,5
<i>Dorycnium herbaceum</i> Vill.	14,6	40,8	7,6	13,0	0,4	1,0
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist	5,5	33,9	9,1	9,8	1,0	0,4
prosek	28,69	24,94	11,71	14,66	1,88	1,54

Brojnost *Azotobacter* sp. zavisila je takođe od zone uzimanja uzoraka i biljne vrste. Kod vrste *Equisetum telmateia* Ehrh. zabeležen je najmanji broj *Azotobacter* sp. u zoni zemljišta, ali i najveći broj u zoni rizosfere u poređenju sa ostalim uzetim uzorcima. U zoni zemljišta, brojnost ovog slobodnog azotofiksatora bila je najveća kod vrsta *Tordylium maximum* L. i *Dorycnium herbaceum* Vill., dok je u rizosfernoj zoni njegova zastupljenost bila najmanja kod vrsta *Dorycnium herbaceum* Vill. i *Salix fragilis* L. (tab. 35).

U zoni zemljišta konstatovana je veća zastupljenost gljiva u odnosu na zonu rizosfere, osim kod vrste *Conyza canadensis* (L.) Cronquist. Zastupljenost gljiva je najmanja u zoni zemljišta ove vrste, a slaba zastupljenost bila je i kod vrste *Tordylium maximum* L. Najveća brojnost gljiva bila je kod vrste *Amaranthus albus* L. Kod ove vrste je zabeležena i najveća zastupljenost gljiva u zoni rizosfere, dok je u ovoj zoni najmanja zastupljenost ove grupe mikroorganizama konstatovana kod vrsta *Tordylium maximum* L. i *Galium verum* L.

Tabela 35. - Brojnost oligonitrofila i *Azotobacter* sp. (CFUx10⁴/g) u zemljištu i rizosferi

uzorak	oligonitrofilni		<i>Azotobacter</i> sp.	
	zemljište	rizosfera	zemljište	rizosfera
<i>Euphorbia exigua</i> L.	34,3	164,5	5,7	5,1
<i>Salix fragilis</i> L.	142,9	83,4	5,3	4,9
<i>Galium verum</i> L.	615,9	242,5	3,6	7,4
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.	280,0	132,7	2,0	13,7
<i>Amaranthus albus</i> L.	39,7	55,6	4,2	8,1
<i>Tripleurospermum inodorum</i> (L.) Sch.	113,9	235,8	4,7	6,8
<i>Tordylium maximum</i> L.	111,4	184,6	8,4	8,2
<i>Dorycnium herbaceum</i> Vill.	71,3	366,3	8,3	4,6
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist	36,4	162,1	5,9	8,4
prosek	160,64	180,83	5,34	7,47

Najveća brojnost aktinomiceta u zemljištu bila je kod vrste *Euphorbia exigua* L., odnosno u zoni rizosfere kod vrste *Tordylium maximum* L., dok ih je najmanje u obe ispitivane zone kod vrste *Conyza canadensis* (L.) Cronquist (tab. 36).

Tabela 36. - Brojnost gljiva i aktinomiceta u zemljištu i rizosferi (CFUx10⁴/g)

Uzorak	gljive		aktinomicete	
	zemljište	rizosfera	zemljište	rizosfera
<i>Euphorbia exigua</i> L.	1,0	0,9	14,5	1,8
<i>Salix fragilis</i> L.	3,1	2,5	0,9	3,3
<i>Galium verum</i> L.	2,8	0,1	3,0	8,5
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.	2,2	1,3	6,7	8,4
<i>Amaranthus albus</i> L.	9,6	5,0	4,8	5,3
<i>Tripleurospermum inodorum</i> (L.) Sch.	2,6	1,4	6,0	7,6
<i>Tordylium maximum</i> L.	0,4	0,1	11,3	11,2
<i>Dorycnium herbaceum</i> Vill.	1,6	1,0	12,6	10,4
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist	0,1	0,9	0,8	1,2
prosek	2,60	1,47	6,66	6,41

5.3.2. Enzimaska aktivnost zemljišta i rizosfere u periodu od 2011-2013. godine

U 2011. godini u ispitivanim uzorcima uočavaju se razlike u vrednostima dehidrogenazne aktivnosti. Zemljište i rizosfera kod vrsta *Reseda luteola* L. i *Equisetum telmateia* Ehrh. odlikuju se najvećom dehidrogenaznom aktivnošću u poređenju sa ostalim biljnim vrstama, dok je u zonama zemljišta i rizosfere *Saponaria officinalis* L., kao i vrsta iz roda *Polygonum*, zabeležena najmanja dehidrogenazna aktivnost (tab. 37). Fosfatazna aktivnost takođe pokazuje različite vrednosti u zavisnosti od biljne vrste i zone uzimanja uzoraka. Zona zemljišta kod vrsta *Erigeron canadensis* L. i *Equisetum telmateia* Ehrh. odlikuju se najvećom aktivnošću kisele fosfataze, dok je u zoni rizosfere najveća vrednost i kisele i alkalne fosfataze konstatovana kod vrste *Reseda luteola* L. Najmanja vrednost kisele fosfataze u obe zone zabeležena je kod vrste *Polygonum lapathifolium* L. Vrednost alkalne fosfataze u zemljištu najmanja je kod vrste *Matricaria inodora* L., odnosno u zoni rizosfere kod vrste *Erigeron canadensis* L.

Tabela 37. - Enzimaska aktivnost zemljišta i rizosfere u 2011. godini

Uzorak	Dehidrogenazna aktivnost ($\times 10^{-5}$ $\mu\text{g TPF/g/h}$)		Fosfatazna aktivnost ($\mu\text{g pNP/g/h}$)			
	zemljište	rizosfera	zemljište		rizosfera	
			kisela	alkalna	kisela	alkalna
<i>Polygonum aviculare</i> L.	1,78	3,08	3,9	7,2	6,0	5,0
<i>Potentilla reptans</i> L.	2,08	2,75	6,3	4,3	3,7	5,5
<i>Plantago lanceolata</i> L.	2,17	3,03	7,8	3,6	7,7	3,7
<i>Doronicum</i> sp. L.	3,25	5,42	7,5	4,0	3,0	4,2
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.	5,82	8,10	10,0	10,5	2,9	3,9
<i>Polygonum lapathifolium</i> L.	1,48	1,92	3,2	6,5	2,5	3,4
<i>Saponaria officinalis</i> L.	1,69	2,08	4,4	7,5	3,0	3,5
<i>Matricaria inodora</i> L.	3,03	3,89	4,0	3,0	3,5	5,5
<i>Erigeron canadensis</i> L.	3,77	6,41	11,0	6,0	6,2	2,0
<i>Reseda luteola</i> L.	9,08	9,63	6,5	6,0	9,5	7,0
prosek	3,42	4,63	6,46	5,86	4,80	4,37

Dehidrogenazna aktivnost ispitivanih uzoraka u 2012. godini nije visoka (tab. 38). Najveća vrednost u zemljištu zabeležena je kod vrste *Saponaria officinalis* L. Kod ove, kao i kod vrste *Matricaria inodora* L. najveća dehidrogenazna aktivnost bila je i u zoni rizosfere. Vrste *Potentilla reptans* L., *Doronicum sp. L.*, *Xanthium italicum* Mor. i *Amaranthus albus* L. imaju nisku dehidrogenaznu aktivnost u zemljištu i rizosferi. Kod vrste *Saponaria officinalis* L. u zemljištu konstatovana je i najveća fosfatazna aktivnost u poređenju sa ostalim ispitvanim biljnim vrstama, dok je u zoni rizosfere najveća fosfatazna aktivnost zabeležena kod vrste *Polygonum aviculare* L. U zoni zemljišta najmanja fosfatazna aktivnost bila je kod vrste *Populus nigra* L., dok je u zoni rizosfere najniža fosfatazna aktivnost bila kod vrsta *Artemisia absinthium* L. i *Populus nigra* L.

Tabela 38. - Enzimaska aktivnost zemljišta i rizosfere u 2012. godini

uzorak	Dehidrogenazna aktivnost ($\times 10^{-5}$ $\mu\text{g TPF/g/h}$)		Fosfatazna aktivnost ($\mu\text{g pNP/g/h}$)			
	zemljište	rizosfera	zemljište		rizosfera	
			kisela	alkalna	kisela	alkalna
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	1,73	1,68	2,2	1,4	1,2	1,5
<i>Matricaria inodora</i> L.	1,08	4,10	3,2	2,5	2,2	2,1
<i>Saponaria officinalis</i> L.	3,22	3,22	5,3	4,2	1,8	3,2
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.	1,74	2,08	1,3	1,5	2,5	1,8
<i>Plantago lanceolata</i> L.	1,94	1,22	2,1	1,4	1,9	1,5
<i>Polygonum aviculare</i> L.	1,07	2,49	1,2	2,1	4,2	3,5
<i>Polygonum lapathifolium</i> L.	1,73	1,71	1,8	1,4	1,4	1,4
<i>Tussilago farfara</i> L.	1,65	2,50	1,6	2,2	1,0	1,3
<i>Potentilla reptans</i> L.	0,62	0,47	2,1	1,7	2,1	1,0
<i>Doronicum sp. L.</i>	0,43	0,31	3,1	2,4	1,2	1,1
<i>Artemisia absinthium</i> L.	1,14	0,21	1,4	1,9	0,9	0,7
<i>Xanthium italicum</i> Mor.	0,36	0,80	2,4	2,1	1,3	1,1
<i>Populus nigra</i> L.	1,15	0,57	1,1	1,2	1,0	0,8
<i>Amaranthus albus</i> L.	0,67	0,57	2,3	2,5	1,3	1,5
prosek	1,32	1,57	2,22	2,04	1,71	1,61

Najveća dehidrogenazna aktivnost 2013. godine u zoni zemljišta i rizosfere bila je kod vrste *Galium verum* L. Visoka dehidrogenazna aktivnost je takođe konstatovana u zoni zemljišta vrsta *Euphorbia exigua* L. i *Equisetum telmateia* Ehrh., odnosno kod vrsta *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch. i *Tordylium maximum* L. u zoni rizosfere (tab. 39). Niska dehidrogenazna aktivnost u obe ispitivane zone bila je kod vrsta *Dorycnium herbaceum* Vill. i *Conyza canadensis* (L.) Cronquist.

Tabela 39. - Dehidrogenazna i fosfatna aktivnost zemljišta i rizosfere

uzorak	Dehidrogenazna aktivnost (x10 ⁻⁵ µg TPF/g/h)		Fosfatna aktivnost (µg pNP/g/h)			
	zemljište	rizosfera	zemljište		rizosfera	
			kiselna	alkalna	kiselna	alkalna
<i>Euphorbia exigua</i> L.	15,00	3,53	14,0	4,4	1,4	8,1
<i>Salix fragilis</i> L.	3,86	3,35	7,5	5,1	0,7	6,1
<i>Galium verum</i> L.	15,62	23,47	2,8	3,8	12,1	1,5
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.	10,55	2,20	4,5	4,0	3,6	2,1
<i>Amaranthus albus</i> L.	5,06	1,58	0,5	1,3	1,6	2,9
<i>Tripleurospermum inodorum</i> (L.) Sch.	1,99	8,36	5,5	3,5	6,2	3,9
<i>Tordylium maximum</i> L.	3,20	8,82	1,2	3,0	1,3	4,6
<i>Dorycnium herbaceum</i> Vill.	2,11	1,83	0,6	1,8	8,5	3,6
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist	1,82	2,25	2,5	2,1	5,9	2,1
prosek	6,58	6,15	4,34	3,22	4,59	3,88

Aktivnost kisele i alkalne fosfataze bila je najniža u zoni zemljišta vrste *Amaranthus albus* L. Niske vrednosti zabeležene su i kod vrste *Dorycnium herbaceum* Vill., dok su najviše vrednosti ovih enzima bile u zoni zemljišta kod vrsta *Euphorbia exigua* L. i *Salix fragilis* L. U zoni rizosfere najveća aktivnost kisele i najmanja aktivnost alkalne fosfataze zabeležena je kod vrste *Galium verum* L. Kao i u zoni

zemljišta, u ovoj zoni najveće vrednosti alkalne fosfataze su konstatovane kod vrsta *Euphorbia exigua* L. i *Salix fragilis* L. Kod ove dve vrste zabeležene su i veoma niske vrednosti kisele fosfataze.

Kod većine ispitivanih uzoraka, aktivnost arilsulfataze je veća u zoni rizosfere u poređenju sa zonom zemljišta. Uzorci iz zone zemljišta vrsta *Galium verum* L. i *Equisetum telmateia* Ehrh. imale su najmanju arilsulfataznu aktivnost, dok je u zoni rizosfere ova aktivnost najmanja kod vrsta *Euphorbia exigua* L. i *Conyza canadensis* (L.) Cronquist. Vrste *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch. i *Equisetum telmateia* Ehrh. imale su najveću aktivnost arilsulfataze u zoni rizosfere (tab. 40).

Tabela 40. - Arilsulfatazna aktivnost zemljišta i rizosfere

uzorak	Arilsulfatazna aktivnost (µg PNP/g/h)	
	zemljište	rizosfera
<i>Euphorbia exigua</i> L.	90	50
<i>Salix fragilis</i> L.	250	100
<i>Galium verum</i> L.	10	70
<i>Equisetum telmateia</i> Ehrh.	10	250
<i>Amaranthus albus</i> L.	50	150
<i>Tripleurospermum inodorum</i> (L.) Sch.	150	250
<i>Tordylium maximum</i> L.	50	160
<i>Doronicum herbaceum</i> Vill.	350	200
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist	100	50
prosek	117,78	142,22

5.4. Mikrobnii diverzitet i enzimski aktivnost jalovine u periodu od 2011-2013. godine

U 2011. godini ukupan broj bakterija u jalovini nije bio visok. U površinskom sloju ukupan broj bakterija je veći u odnosu na podpovršinski sloj. Zastupljenost

amonifikatora je takođe bila vrlo niska, dok sporogeni amonifikatori nisu konstatovani (tab. 41). Zastupljenost oligonitrofila je takođe bila niska, dok *Azotobacter* sp. nije detektovan. Brojnost oligonitrofila bila je veća u podpovršinskom sloju u odnosu na površinski. Brojnost gljiva je veća u poređenju sa brojem aktinomiceta. Osim toga, brojnost obe grupe mikroorganizama je veća u podpovršinskom u odnosu na površinski sloj.

Jalovina se odlikuje slabom enzimskom aktivnošću (tab. 42). U površinskom sloju aktivnost dehidrogenaze i alkalne fosfataze je veća u odnosu na potpovršinski sloj.

Tabela 41. - Brojnost mikroorganizama (CFUx10³/g) u jalovini 2011. godine

Dubina	ukupan broj bakterija	amonifikatori		oligoni-trofilni	<i>Azoto-bacter</i> sp.	gljive	aktino-micete
		ukupni	sporogeni				
0-20 cm	121,9	33,9	0,0	74,5	0,0	11,5	2,0
20-40 cm	55,8	79,7	0,0	119,5	0,0	29,5	5,6
prosek	88,85	56,80	0,0	97,00	0,0	20,50	3,8

Tabela 42. - Enzimska aktivnost jalovine u 2011. godini

Dubina	Dehidrogenazna aktivnost (x10 ⁻⁵ µg TPF/g/h)	Fosfatazna aktivnost (µg pNP/g/h)	
		kisela	alkalna
0-20 cm	0,24	0,5	3,6
20-40 cm	0,16	3,4	2,0
prosek	0,20	1,95	2,80

U 2012. godini ukupan broj bakterija, amonifikatora i oligonitrofila je veći nego u 2011. godini. U površinskom sloju zabeležen je veći broj ovih grupa bakterija u odnosu na podpovršinski sloj. Sporogeni amonifikatori i *Azotobacter* sp. nisu detektovani. Brojnost gljiva i aktinomiceta je veća u podpovršinskom sloju u odnosu na površinski (tab. 43). Enzimska aktivnost je veća u površinskom sloju jalovine u odnosu na podpovršinski (tab. 44).

Tabela 43. - Brojnost mikroorganizama (CFUx10³/g) u jalovini 2012. godine

Dubina	ukupan broj bakterija	amonifikatori		oligoni-trofili	<i>Azoto-bacter</i> sp.	gljive	aktinomicete
		ukupni	sporogeni				
0-20 cm	2.384,3	280,4	0,0	984,6	0,0	5,9	2,3
20-40 cm	1.350,4	221,5	0,0	822,5	0,0	11,8	3,3
prosek	1.867,35	250,95	0,0	903,55	0,0	8,85	2,65

Tabela 44. - Enzimaska aktivnost jalovine u 2012. godini

Dubina	Dehidrogenazna aktivnost (x10 ⁻⁵ µg TPF/g/h)	Fosfatazna aktivnost (µg pNP/g/h)	
		kisela	alkalna
0-20 cm	0,32	0,9	1,1
20-40 cm	0,22	0,8	0,7
prosek	0,27	0,85	0,90

U 2013. godini ukupan broj bakterija, broj amonifikatora, oligonitrofila, gljiva i aktinomiceta bio je veći u površinskom sloju jalovine u odnosu na podpovršinski. Za razliku od prethodnih godina, u 2013. godini prisutni su i sporogeni amonifikatori. *Azotobacter* sp. nije detektovan ni u trećoj godini istraživanja (tab. 45).

Rezultati ispitivanja enzimske aktivnosti jalovine ukazuju na veće vrednosti dehidrogenazne, fosfatazne i arilsulfatazne aktivnosti u površinskom sloju u odnosu na potpovršinski (tab. 46).

Tabela 45. - Brojnost mikroorganizama (CFUx10³/g) u jalovini 2013. godine

Dubina	ukupan broj bakterija	amonifikatori		oligoni-trofili	<i>Azoto-bacter</i> sp.	gljive	aktinomicete
		ukupni	sporogeni				
0-20 cm	312,8	326,7	76,5	118,2	0,0	24,3	4,17
20-40 cm	225,5	254,2	43,1	92,1	0,0	16,7	2,24
prosek	269,15	290,45	59,80	105,15	0,0	20,5	3,20

Tabela 46. - Enzimaska aktivnost jalovine u 2013. godini

Dubina	Dehidrogenazna aktivnost ($\times 10^{-5}$ $\mu\text{g TPF/g/h}$)	Fosfatazna aktivnost ($\mu\text{g pNP/g/h}$)		Arilsulfatazna aktivnost ($\mu\text{g PNP/g/h}$)
		kisela	alkalna	
0-20 cm	6,52	2,0	0,4	250
20-40 cm	1,12	0,5	0,1	223
prosek	3,82	1,25	0,25	236,50

5.5. Izolacija i identifikacija mikroorganizama

5.5.1. Izolacija i identifikacija bakterija

Iz uzoraka zemljišta, rizosfere i jalovine na lokacijama rudnika mrkog uglja „Kakanj“ izolovan je 21 bakterijski izolat (tab. 47). Iz uzoraka jalovine izolovano je 2 bakterijska izolata, dok je iz uzoraka zemljišta i rizosfere sa lokacija „Vrtlište“ i „Stara jama i jama Haljinići“ izolovano 19 bakterijska izolata.

Tabela 47. - Oznaka izolata, poreklo i morfološke osobine kolonija bakterija

oznaka izolata	poreklo	opis kolonija	opis preparata
19K	jalovina	Pojedinačne beličaste okrugle kolonije	Gram-pozitivni sporogeni štapići
13K	jalovina	Pojedinačne bele okruglaste kolonije	Gram-pozitivni sporogeni štapići
4K	rizosfera	Pojedinačne beličaste okrugle kolonije	Gram-pozitivni sporogeni štapići
3K	zemljište	Pojedinačne bele okruglaste kolonije	Gram-pozitivni sporogeni štapići
T4K	zemljište	Okruglaste	Gram-negativne

		pojedinačne crvene kolonije	pojedinačne koke
MP3K	rizosfera	Okruglaste bele kolonije kožaste konzistencije	Gram-pozitivni sporogeni štapići
F4K	zemljište	Sitne prozračne kolonije	Gram-negativne diplokoke
MPA4K	zemljište	Kolonije nepravilnog oblika, u vidu skrame	Gram-negativni asporogeni štapići
F17	zemljište	Krupne sluzave prozračne kolonije	Gram-negativne diplokoke
225AZ	zemljište	Sitne prozračne kolonije	Gram-negativne diplokoke
9MCM	rizosfera	Pojedinačne bele okruglaste kolonije	Gram-pozitivni sporogeni štapići
175F	zemljište	Sitne prozračne kolonije	Gram-negativne diplokoke
75F	zemljište	Krupne sluzave prozračne kolonije	Gram-negativne diplokoke
8M	zemljište	Sitnije i krupnije okrugle svetložute kolonije	Gram-pozitivni sporogeni štapići
9K	zemljište	Krupne bele kolonije	Gram-pozitivni sporogeni štapići
13K-1	zemljište	Krupne bele kolonije	Gram-pozitivni sporogeni štapići
17	zemljište	Beličaste kolonije nepravilnog oblika, u vidu prevlake	Gram-negativni asporogeni štapići
16PK	zemljište	Bele krupne kolonije u vidu	Gram-negativni asporogeni štapići

		skrame	
33	zemljište	Žute prozračne kolonije	Gram-negativni asporogeni štapići
12KP	zemljište	Sitne žute mat kolonije	Gram-pozitivni sporogeni štapići
PKF	rizosfera	Sitne svetložute sjajne kolonije	Gram- pozitivne koke

5.5.1.1. Identifikacija bakterija API testom i molekularnim metodama

Primenom brzih biohemijskih testova (API testa) izvršena je identifikacija dva bakterijska izolata (13k i 19k) koji su izolovani iz jalovine rudnika mrkog uglja „Kakanj“.

Primena *API 50 CH* i *APIWEB* sistema za identifikaciju izolata 13k pokazuje da izolovane čiste kulture bakterija pokazuju najveću sličnost sa vrstom *Bacillus thuringiensis*.

Izolat 13k izolovan je iz uzorka jalovine. Izolacija i održavanje čistih kultura ovog izolata vršeno je na hranljivoj podlozi TSA. Na podlozi TSA bakterije rastu brzo do vrlo brzo, formirajući sitne do srednje krupne pojedinačne bele kolonije okruglog oblika. Bakterije su štapićastog oblika, po gramu se boje pozitivno i stvaraju spore.

Primena *API 50 CH* i *APIWEB* sistema za identifikaciju izolata 19k pokazuje da izolovane čiste kulture bakterija pokazuju najveću sličnost sa vrstom *Paenibacillus alvei*. Izolat 19k izolovan je iz uzoraka jalovine. Izolacija i održavanje čistih kultura ovog izolata vršeno je na hranljivoj podlozi TSA. Na podlozi TSA bakterije rastu brzo, stvarajući sitne pojedinačne beličaste kolonije okruglastog oblika. Oblik bakterija je štapićast. Po gramu se bakterije boje pozitivno i stvaraju spore.

Molekularna identifikacija bakterijskih izolata je izvršena sekvencioniranjem umnoženog regiona 16S rDNK i poređenjem sa NCBI bazom podataka nukleotidnih sekvenci. Dužina DNK produkta sekvencioniranja je iznosila 1406 uspešno sekvencioniranih baznih parova za izolat 13k, odnosno 1410 baznih parova za izolat 19k.

Izolati 13k identifikovani su sekvencioniranjem 16S rRNK gena na osnovu kog je klasifikovan u okviru roda *Bacillus*. Uspešno je sekvencionirano 1410 baznih parova ovog izolata (od 73 do 1484 nukleotidnog mesta 16S gena vrste *Bacillus cereus*, GenBank Acc. No. AY224386) i deponovano pod pristupni broj GenBank Acc. No. KF494373. Poređenjem pomoću BLAST algoritma sa postojećim sekvencama u NCBI bazi podataka utvrđen je identitet 16S rDNK izolata 13k od 100% sa 16S rDNK regionom bakterija *Bacillus simplex* soj CV20 (KC503978), *Bacillus thuringiensis* soj ex4 (KF317874) i *Bacillus muralis* soj cp5 (JN082264).

Bakterijski izolati 19k identifikovani su sekvencioniranjem 16S rRNK gena i takođe je klasifikovan unutar roda *Bacillus*. Uspešno je sekvencionirano 1406 baznih parova izolata 19k (od 77 do 1484 nukleotidnog mesta 16S gena vrste *Bacillus cereus*, AY224386) koji su deponovani pod pristupnim brojem KF494374 u NCBI bazi podataka. Na osnovu BLAST analize ovaj produkt je pokazao 100% homologije sa vrstama *Bacillus cereus* soj PGSI2 (KF478211), *Bacillus thuringiensis* soj CLHDHF(2)F 2-1 (KC858854) i *Bacillus subtilis* (FJ435215).

5.5.2. Izolacija i identifikacija gljiva

Iz uzoraka zemljišta, rizosfere i jalovine na lokacijama rudnika mrkog uglja „Kakanj“ izolovano je 7 izolata gljiva (tab. 48). Iz uzoraka jalovine izolovan je 1 izolati, dok je iz uzoraka zemljišta i rizosfere izolovano 6 izolata gljiva.

Tabela 48. - Oznaka izolata, poreklo i morfološke osobine kolonija gljiva

oznaka izolata	poreklo	opis kolonija	opis preparata
9G	jalovina	Sivomaslinasta boja, u obliku koncentričnih krugova	Septirane hife, proširena konidiofora
11G	rizosfera	Tamno siva boja, na obodu beličasta, sa	Septirane hife, razgranata

		naličja crvenkasta,	konidiofora
4GK	zemljište	Sivo-beličaste kolonije, paučinast rast	Neseptirane hife, prisustvo sporangija
3GK	zemljište	Žućkaste pojedinačne kolonije, sa naličja crvene	Septirana hifa, razgranate konidiofore
T4G	rizosfera	Žute kolonije, podloga pigmentiše žuto	Septirane hife, proširena konidiofora
MP3G	rizosfera	Svetložute kolonije, ispunjavaju petri kutiju	Neseptirane hife, prisustvo sporangije
13G-1	zemljište	Siva boja, beli obod kolonija	Septirane hife, proširena konidiofora

Primjenom ključa za identifikaciju gljiva, identifikovano je svih 7 izolata gljiva do rodova (tab. 49).

Tabela 49.- Identifikovani izolati gljiva

oznaka izolata	Naziv roda
9G	<i>Aspergillus</i> sp.
11G	<i>Penicillium</i> sp.
4GK	<i>Rhizopus</i> sp.
3GK	<i>Penicillium</i> sp.
T4G	<i>Aspergillus</i> sp.
MP3G	<i>Mucor</i> sp.
13G-1	<i>Aspergillus</i> sp.

5.5.2.1. Opis identifikovanih gljiva

Aspergillus sp. 9G, T4G i 13G-1

Izolacija: Izolat 9G izolovan je iz uzorka jalovine, izolat T4G iz uzorka rizosfere vrste *Saponaria officinalis* a izolat 13G-1 iz zemljišta vrste *Polygonum aviculare* L.

Rast na hranljivim podlogama i makroskopski opis: Svi izolati na podlozi RBSA rastu veoma brzo. Sa lica su u početku žute boje, koja kasnije kod izolata 9G i 13G-1 prelazi u sivu, sivkastu i sivomaslinastu boju, dok kod izolata T4G ostaje žuta. Sa naličja svi izolati su svetlo crvene do bledo rozikaste boje. Na sladnom i Čapekovom agaru kolonije izolata rastu srednje brzo do brzo i uglavnom su žute boje.

Mikroskopske osobine: Hife gljiva su septirane i žućkaste boje. Konidiofore su uglavnom bezbojne. Konidispore su sitne i glatke, pravilnog ili nepravilnog okruglastog oblika.

Penicillium sp. 11G i 3GK

Izolacija: Izolat 11G izolovan je iz zone rizosfere vrste *Matricaria inodora* L., dok je izolat 3GK izolovan iz zemljišta iste vrste.

Rast na hranljivim podlogama i makroskopski opis: Oba izolata rastu brzo na hranljivoj podlozi RBSA. U početnoj fazi rasta, kolonije su sitne i bledozelene boje. Kasnije kolonije izolata 11G dobijaju prvo svetlosivu a zatim i tamnosivu boju, dok se kod izolata 3GK javlja žućkasta boja. Kolonije se vrlo brzo šire po površini agara. Na Čapekovom i sladnom agaru kolonije takođe rastu vrlo brzo i tamnozelene su boje sa lica a svetlije sa naličja.

Mikroskopski opis: Izolati imaju septirane žute do žućkaste hife. Konidiofore su bezbojne, kod izolata 11G glatke ili blago neravne, a kod izolata 3GK hrapave. Fijalide su veoma brojne, a konidije su elipsoidne.

Rhizopus sp. 4GK

Izolacija: Izolat 4GK je izolovan iz zemljišta vrste *Potentilla reptans* L.

Rast na hranljivim podlogama i makroskopski opis: Izolat raste veoma brzo, filamentozno i posle 4-5 dana ispunjava petri kutiju. Tekstura je pamučinasta. Sa lica i naličja, boja kolonija je beličasta. Na Čapekovom i sladnom agaru ovaj izolat ima identične karakteristike rasta.

Mikroskopski opis: Izolat ima neseptirane široke hife. Sporangiofore su nerazgranate, braon boje. Sporangije su okruglaste sa spljoštenom osnovom. sporangiospore su jednoćelijske, okrugle ili ovalne, smeđe boje, glatke ili blago izbrazdane.

Mucor sp. MP3G

Izolacija: Izolat 4GK je izolovan iz zone rizosfere vrste *Potentilla reptans* L.

Rast na hranljivim podlogama i makroskopski opis: Kolonije ove gljive rastu brzo na svim ispitivanim podlogama. U prvim fazama rasta kolonije su sa lica beličaste a u kasnijim fazama svetložučkaste boje. Sa naličja boja kolonija je bela. Tekstura kolonija je paučinasta.

Mikroskopski opis: Izolat MP3G ima neseptirane široke hife. Sporangiofore su kratke, jednodelne ili razgranate i na njihovim vrhovima formira se sporangija okruglastog oblika sive do crne boje. U njoj unutrašnjosti nalaze se sporangiospore, koje su okrugle ili blago izdužene. Rizoidi ne postoje.

5.6. Mikrobiološka aktivnost i rast biljaka na supstratima

Rezultati ukazuju na različitu klijavost semena, svežu i suhu biomasu i zastupljenost mikroorganizama u zavisnosti od biljne vrste i vrste supstrata.

5.6.1. Mikrobiološka aktivnost supstrata

Brojnost mikroorganizama u supstratima bila je različita i zavisila je od vrste biljke i vrste supstrata (tab. 50).

Tabela 50. - Ukupan broj bakterija u supstratima

Biljna vrsta	Varijanta supstrata	ukupan broj bakterija (CFUx10 ⁶ /g)		
		Bez inokulacije	Sa inokulacijom	
			<i>Bacillus</i> sp. 13k	<i>Bacillus</i> sp. 13k+19k
Salata	100	2,02	2,33	3,12
	75	3,32	3,38	3,89
	50	6,29	6,44	7,03
	25	9,08	9,55	11,13
	Kontrola	6,40	6,54	7,21
Slačica	100	0,37	0,47	0,98
	75	3,04	3,15	3,90
	50	2,38	2,58	3,16
	25	5,52	5,87	6,98
	Kontrola	7,26	7,88	8,54
Pšenica	100	3,38	3,49	3,53
	75	2,70	2,80	2,89
	50	5,62	5,80	6,01
	25	8,25	8,38	8,67
	kontrola	4,20	4,55	4,69
Ovas	100	2,45	2,65	3,12
	75	3,98	4,25	4,89
	50	8,06	8,27	9,03
	25	6,12	6,28	7,11
	kontrola	8,38	8,47	8,90
Tritikale	100	1,77	2,01	2,55
	75	7,84	8,14	8,49
	50	7,53	8,12	8,03
	25	8,78	9,24	9,01
	kontrola	7,94	8,04	8,11

U varijanti 100 najmanji ukupni broj bakterija zabeležen je kod slačice a najveći kod pšenice. Kod pšenice je u varijanti 75 konstatovan najmanji broj bakterija, dok se tritikale odlikuje najvećim ukupnim brojem bakterija. U varijanti 50, kod ovsa je zabeležen najveći broj bakterija, dok je najmanji broj konstatovan kod slačice. Varijanta 25 se odlikuje najvećim brojem bakterija kod salate, dok je najmanji broj konstatovan kod slačice. U kontrolnoj varijanti najveći ukupni broj bakterija je bio kod slačice i ovsa u poređenju sa ostalim kombinacijama supstrata, dok je kod ostalih vrsta veća brojnost bakterija bila u različitim varijantama dodavanja jalovine. U većini varijanti, najmanji broj bakterija bio je kod varijante 100.

Inokulacija supstrata bakterijom *Bacillus* sp. 13k pozitivno je uticala na brojnost bakterija u svim varijantama ogleda, dok je inokulacija mešanim bakterijskim populacijama uglavnom stimulatивно delovala na brojnost bakterija. Kod pšenice ne postoje velike razlike u pogledu broja ukupnih bakterija u inokulisanim tretmanima. Sa izuzetkom varijante 100, sličan trend ukupnog broja bakterija ima i tritikale. Kod ovsa i salate je ukupan broj bakterija znatno veći u inokulisanim varijantama supstrata u odnosu na neinokulisane, dok je kod slačice povećanju ukupnog broja bakterija najviše doprinela inokulacija supstrata mešanim bakterijskim populacijama.

Ukupan broj amonifikatora je najveći u kontrolnoj varijanti ogleda gde su posejane salata, pšenica i tritikale u poređenju sa ostalim varijantama ogleda. Kod slačice je najveća brojnost zabeležena u varijanti 25 a kod ovsa u varijanti 50. U varijanti 50 kod slačice i pšenice zabeležen je najmanji broj amonifikatora u poređenju sa ostalim varijantama. U varijanti 100 najmanji ukupan broj amonifikatora zabeležen je u tretmanima gde su sejani ovas i tritikale (tab. 51).

Tabela 51. - Brojnost ukupnih i sporogenih amonifikatora u supstratima

Biljna vrsta	Varijanta supstrata	ukupni amonifikatori (CFUx10 ⁶ /g)			sporogeni amonifikatori (CFUx10 ⁶ /g)		
		Bez inokulacije	Sa inokulacijom		Bez inokulacije	Sa inokulacijom	
			<i>Bacillus</i> sp. 13k	<i>Bacillus</i> sp. 13k+19k		<i>Bacillus</i> sp. 13k	<i>Bacillus</i> sp. 13k+19k
Salata	100	1,12	1,42	1,56	0,26	0,35	0,37
	75	0,65	0,81	1,01	0,17	0,25	0,22
	50	1,47	1,55	1,54	0,14	0,24	0,25
	25	1,86	2,01	2,09	0,60	0,84	0,79
	Kontrola	1,99	2,44	2,67	0,46	0,65	0,62
Slačica	100	0,64	0,84	1,12	0,60	1,14	1,03
	75	0,46	0,55	0,78	0,20	0,34	0,38
	50	0,40	0,51	0,97	0,02	0,11	0,31
	25	3,16	3,58	4,45	0,15	0,24	0,28
	Kontrola	1,45	1,64	2,01	0,19	0,26	0,28
Pšenica	100	2,40	2,65	2,56	0,36	0,51	0,42
	75	3,00	3,24	3,13	0,25	0,40	0,38
	50	0,86	1,14	1,00	0,38	0,53	0,44
	25	1,91	2,14	2,05	0,58	0,73	0,67
	kontrola	3,95	4,21	4,01	0,71	0,86	0,78
Ovas	100	0,42	0,51	0,76	0,37	0,44	0,55
	75	2,83	2,95	3,54	0,25	0,41	0,61
	50	7,02	8,25	8,88	0,81	1,01	1,33
	25	3,45	3,56	3,90	0,80	0,95	1,08
	kontrola	5,32	5,55	6,03	0,99	1,04	1,22
Tritikale	100	0,31	0,38	0,56	0,02	0,09	0,32
	75	2,56	2,68	3,13	0,58	0,74	1,11
	50	2,51	2,68	2,60	1,04	1,14	1,78
	25	2,05	2,45	2,13	1,26	1,33	1,90
	kontrola	7,94	9,11	8,13	0,67	0,87	1,12

Sporogeni amonifikatori u varijanti sa salatom, pšenicom i ovsem su brojniji u kontrolnoj i varijanti 25 u poređenju sa ostalim varijantama supstrata. Kod slačice njihov najveći broj je konstatovan u supstratu koji sačinjava samo jalovina, dok se varijanta 25 odlikuje najvećim brojem sporogenih amonifikatora u sudovima gde je zasejan tritikale (tab. 51). Kao i kod ukupnih i sporogenih bakterija, inokulacija supstrata čistim kulturama bakterije *Bacillus* sp. 13k i mešanim bakterijskim populacijama uticala je na povećanje broja ukupnih i sporogenih amonifikatora. U najvećem broju varijanti najveći broj ukupnih i sporogenih amonifikatora bio je pri inokulaciji mešanim bakterijskim populacijama. Pšenica odstupa od ove zakonitosti, gde je najveći broj ove fiziološke grupe mikroorganizama bilo u varijanti sa inokulacijom čistim kulturama *Bacillus* sp. 13k. Najveći broj amonifikatora imali su ovas i tritikale, dok je kod ostalih biljnih vrsta njihov broj znatno manji.

Brojnost oligonitrofila kod najvećeg broja biljaka (salata, slačica, ovas i tritikale) je najmanja u varijanti 100 (tab. 52), dok je kod pšenice najmanji broj ove grupe bakterija u varijanti 75. Smanjenje sadržaja jalovine u supstratu uticalo je na povećanje broja oligonitrofila u varijanti gde su korišćeni salata i tritikale. U svima varijantama ogleda, osim kod slačice, najveći broj oligonitrofila je zabeležen u kontrolnoj varijanti. Inokulacija supstrata čistim kulturama bakterije *Bacillus* sp. 13k uticalo je na povećanje broja oligonitrofila, s tim što je najveći broj u svim varijantama zabeležen u kontrolnoj varijanti. U istoj varijanti najveći je broj oligonitrofila i nakon inokulacije mešanim bakterijskim populacijama, koja je uglavnom uticala na povećanje broja oligonitrofila, ali u nekim varijantama i na smanjenje njihove brojnosti u odnosu na inokulaciju bakterijom *Bacillus* sp. 13k.

U svim varijantama ogleda, osim kod pšenice, brojnost *Azotobacter* sp. je najmanja u varijanti 100. Kod salate, pšenice i ovsa najveći broj *Azotobacter* sp. je zabeležen u kontrolnoj varijanti. Inokulacija je pozitivno uticala na brojnost *Azotobacter* sp., ali su razlike u odnosu na neinokulisano varijantu veoma male.

Tabela 52. - Brojnost oligonitrofila i *Azotobacter* sp. u supstratima

Biljna vrsta	Varijanta supstrata	Oligonitrofilii (CFUx10 ⁶ /g)			<i>Azotobacter</i> sp. (CFUx10 ³ /g)		
		Bez inokulacije	Sa inokulacijom		Bez inokulacije	Sa inokulacijom	
			<i>Bacillus</i> sp. 13k	<i>Bacillus</i> sp. 13k+19k		<i>Bacillus</i> sp. 13k	<i>Bacillus</i> sp. 13k+19k
Salata	100	0,20	0,32	0,44	7,80	8,02	8,29
	75	0,34	0,43	0,56	18,53	19,23	20,20
	50	0,65	0,81	1,11	16,24	16,76	17,23
	25	0,82	0,88	1,23	16,04	16,55	18,09
	Kontrola	0,95	1,12	1,45	35,64	36,09	39,09
Slačica	100	0,02	0,11	0,11	0,22	0,27	0,56
	75	0,38	0,49	0,67	57,47	58,07	60,06
	50	0,54	0,66	0,64	41,88	42,48	45,89
	25	2,68	2,88	2,55	43,30	43,89	38,05
	Kontrola	2,28	3,01	3,94	33,58	34,55	33,76
Pšenica	100	2,63	2,77	2,99	50,05	51,07	45,21
	75	1,37	1,55	1,22	59,02	60,17	66,73
	50	1,84	2,32	2,87	44,46	45,50	52,75
	25	2,77	3,11	3,45	37,22	38,38	38,09
	kontrola	5,26	5,45	6,63	84,62	85,09	78,65
Ovas	100	0,40	0,51	0,47	42,79	43,12	45,09
	75	2,10	2,23	2,54	53,57	54,34	50,12
	50	3,91	4,12	4,03	61,34	62,76	54,76
	25	3,19	3,44	3,98	71,27	71,90	67,33
	kontrola	4,47	4,87	6,11	72,30	73,76	68,97
Tritikale	100	0,39	0,48	0,67	3,03	3,23	2,77
	75	1,25	1,34	1,29	34,33	35,51	38,09
	50	1,58	1,76	2,12	29,45	30,76	34,45
	25	1,76	1,89	2,33	40,64	41,49	45,87
	kontrola	2,30	2,50	3,23	34,02	35,01	30,01

Dehidrogenazna aktivnost supstrata imala je različite vrednosti u zavisnosti od vrste biljaka i varijante supstrata. U svima varijantama ogleda smanjivanje sadržaja jalovine u supstratima uticalo je na povećanje dehidrogenazne aktivnosti. U kontrolnim varijantama nema velikih razlika u pogledu aktivnosti dehidrogenaze. Najveća dehidrogenazna aktivnost bila je kod ovsu u kontrolnoj varijanti, dok je kod salate u varijanti 100 aktivnost ovog enzima bila najmanja. U poređenju sa ostalim biljnim vrstama, kod salate je u varijantama 75 i 50 takođe najmanja dehidrogenazna aktivnost, dok je kod ovsu u istim varijantama aktivnost bila najveća.

Inokulacija supstrata čistim kulturama bakterija uticala je na povećanje dehidrogenazne aktivnosti u svim varijantama ogleda. Smanjenje sadržaja jalovine u supstratima je takođe uticalo na povećanje dehidrogenazne aktivnosti kao i kod neinokulisanih varijanti. U varijanti 100 kod salate je dehidrogenazna aktivnost najmanja u poređenju sa svim varijantama ogleda. Inokulacija supstrata čistim kulturama bakterije *Bacillus* sp. 13k nije znatno uticala na povećanje dehidrogenazne aktivnosti kod svih varijanti ogleda, dok je inokulacija mešanim bakterijskim populacijama uticala na znatno povećanje dehidrogenazne aktivnosti, naročito u varijantama 100 i 75 kod većine ispitivanih biljnih vrsta. U svim kontrolnim varijantama inokulacija čistim kulturama bakterije *Bacillus* sp. 13k i mešanim bakterijskim populacijama je uticala na neznatno povećanje dehidrogenazne aktivnosti supstrata (tab. 53).

Tabela 53. - Dehidrogenazna aktivnost supstrata

Biljna vrsta	Varijanta supstrata	Dehidrogenazna aktivnost (x10 ⁻⁵ µg TPF/g/h)		
		Bez inokulacije	Sa inokulacijom	
			<i>Bacillus</i> sp. 13k	<i>Bacillus</i> sp. 13k+19k
Salata	100	0,20	0,44	0,76
	75	0,31	0,76	0,98
	50	0,35	0,36	0,44
	25	2,45	2,66	2,78
	kontrola	4,45	4,65	4,71
Slačica	100	0,44	0,52	0,79
	75	0,67	0,78	1,12
	50	1,13	1,24	1,54
	25	2,25	2,45	3,09
	kontrola	5,56	5,70	5,78
Pšenica	100	0,67	0,79	1,12
	75	0,77	0,80	0,82
	50	1,56	1,67	1,75
	25	3,35	3,39	3,87
	kontrola	5,56	5,79	5,87
Ovas	100	0,63	0,76	0,97
	75	1,63	1,78	2,23
	50	1,78	1,80	2,02
	25	2,81	2,97	3,33
	kontrola	5,97	6,08	6,32
Tritikale	100	0,29	0,35	0,77
	75	1,37	1,46	1,76
	50	1,74	1,89	2,34
	25	1,64	1,74	2,10
	kontrola	5,53	5,76	5,97

5.6.2. Klijavost semena, sveža i suva biomasa klijanaca na supstratima

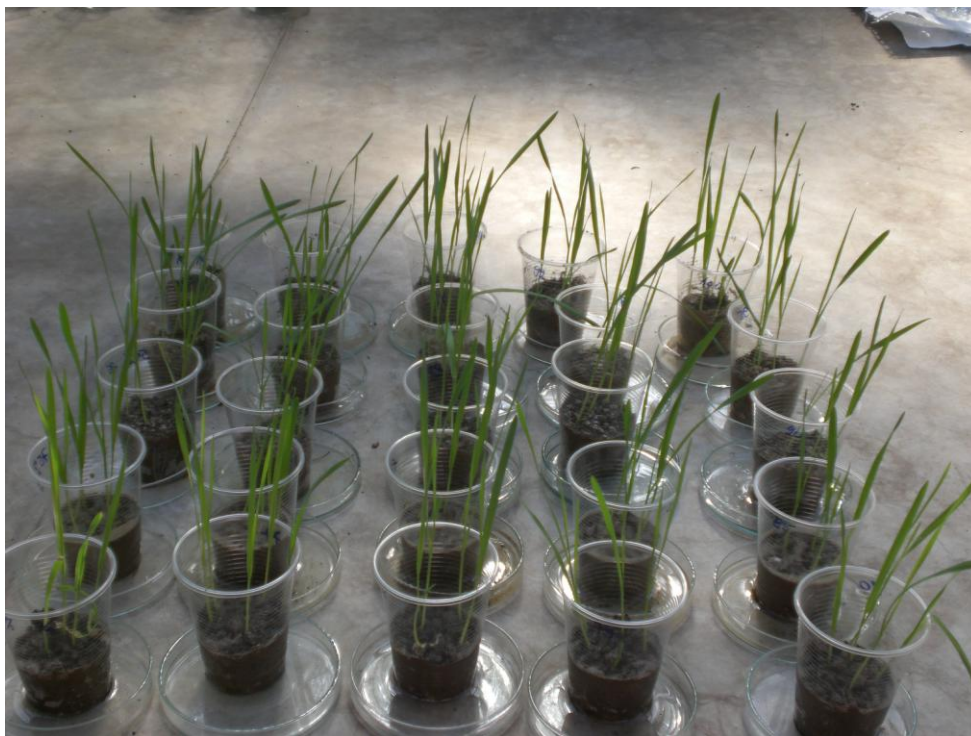
Stepen klijavosti semena biljnih vrsta bio je različit i zavisio je od vrste biljke, varijante i inokulacije supstrata (tab. 54).

U svim varijantama, kod ovsu je klijavost bila veoma visoka (iznad 80%). Između tretmana nema značajnih razlika u pogledu klijavosti semena. Kod drugih ispitivanih vrsta, klijavost semena je znatno niža. U varijanti bez inokulacije, klijavost semena salate je najniža u poređenju sa ostalim biljnim vrstama. Inokulacija supstrata čistim kulturama bakterija je znatno uticala na povećanje stepena klijavosti semena salate u svim varijantama ogleđa. Najveće procentualno povećanje stepena klijavosti bilo je u varijantama 50 i 25. Slačica i tritikale imali su slične stepene klijavosti po tretmanima. Stepen klijavosti semena kod ovih biljnih vrsta se povećava sa smanjenjem sadržaja jalovine kako u neinokulisanim, tako i u inokulisanim supstratima. Kod pšenice u varijantama 100, 75 i kod kontrole ne postoje znatne razlike u pogledu stepena klijavosti bez obzira na prisustvo ili odsustvo inokulacije supstrata. Efekat inokulacije supstrata je veoma izražen u varijantama 50 i 25, gde je u odsustvu inokulacije najniži stepen klijavosti. Inokulacija mešanim bakterijskim populacijama uglavnom je uticala na povećanje stepena klijavosti u odnosu na neinokulisane varijante, kao i inokulaciju čistim kulturama bakterije *Bacillus* sp. 13k.

Tabela 54. - Stepen klijavosti semena biljaka (%) na različitim supstratima

Biljna vrsta	Varijanta supstrata	Bez inokulacije	Sa inokulacijom	
			<i>Bacillus</i> sp. 13k	<i>Bacillus</i> sp. 13k+19k
Salata	100	20	30	46
	75	24	32	50
	50	24	72	98
	25	32	76	96
	kontrola	40	80	100
Slačica	100	42	34	40
	75	56	50	48
	50	66	62	60
	25	70	60	54
	kontrola	84	80	72
Pšenica	100	68	60	56
	75	40	38	34
	50	28	58	88
	25	24	70	76
	kontrola	48	52	64
Ovas	100	100	96	98
	75	92	88	90
	50	88	82	86
	25	88	82	80
	kontrola	80	86	84
Tritikale	100	60	68	70
	75	48	52	56
	50	52	58	64
	25	64	60	60
	kontrola	72	68	66

Sveža biomasa klijanaca je takođe zavisila od biljne vrste, varijante supstrata i prisustva ili odsustva inokulacije (tab. 55). Upoređujući sve biljne vrste na svim varijantama supstrata, najmanja sveža biomasa bila je kod salate. Kod ove biljne vrste, i u inokulisanim i neinokulisanim varijantama, sveža biomasa bila je najveća u kontrolnoj varijanti a najmanja u supstratu koji se sastojao od jalovine. Kod slačice ne postoje velike razlike u svežoj biomasi u okviru varijanti. Sa smanjenjem količine jalovine u supstratu raste sveža biomasa klijanaca. Kod pšenice je najveća sveža biomasa klijanaca bila u supstratu koji je činila jalovina, ali inokulacija nije znatno promenila biomasu. Znatno veća sveža biomasa klijanaca pšenice bila je nakon inokulacije varijanti 50 i 25. Osim u kontrolnoj varijanti, u poređenju sa ostalim biljnim vrstama, najveću svežu biomasu imao je ovas u svim varijantama ogleđa (sl. 10). Najveća biomasa ovasa bila je u varijanti 25 a najmanja u supstratu koji je sačinjavala jalovina. Tritikale je imao ujednačenu svežu biomasu klijanaca u okviru varijanti supstrata. Najveća biomasa bila je u supstratu od jalovine a najmanja u varijanti 25, bez obzira na inokulaciju. Primena mešanih bakterijskih populacija *Bacillus* sp. 13k i *Bacillus* sp. 19k uglavnom je uticala na povećanje sveže biomase klijanaca u odnosu na inokulaciju čistim kulturama bakterije *Bacillus* sp. 13k.



Sl. 10. - Rast ovsa na različitim supstratima

Biomasa suvih klijanaca je takođe zavisila od različitih faktora (tab. 56). Dobijene vrednosti su znatno niže u odnosu na svežu biomasu klijanaca. Kod salate je suva biomasa klijanaca bila najmanja u odnosu na ostale biljne vrste. U kontrolnoj varijanti, u poređenju sa ostalim varijantama supstrata, suva biomasa bila je najveća. Znatno veća biomasa bila je u varijantama inokulacije supstrata 50 i 25 u odnosu na neinokulisani supstrat. Slačica i tritikale imali su slične vrednosti suve biomase u okviru varijanti supstrata, s tim što kod slačice količina biomase raste sa smanjenjem sadržaja jalovine u supstratima, dok tritikale ima najveću količinu suve biomase u varijanti 75. Kod pšenice je količina suve biomase najveća u varijanti 100, a u varijantama 50 i 25 je ona znatno veća u inokulisanim supstratima u odnosu na neinokulisane. Kod ovsa je količina suve biomase najmanja u kontrolnoj varijanti. U najvećem broju uzoraka ne postoje značajne razlike u suvoj biomasi klijanaca, bez obzira na primenu inokulacije.

Tabela 55. - Sveža biomasa klijanaca (g) na različitim supstratima

Biljna vrsta	Varijanta supstrata	Bez inokulacije	Sa inokulacijom	
			<i>Bacillus</i> sp. 13k	<i>Bacillus</i> sp. 13k+19k
Salata	100	0,02	0,02	0,08
	75	0,03	0,05	0,10
	50	0,24	0,75	1,04
	25	0,25	0,62	0,88
	kontrola	0,54	0,76	1,11
Slačica	100	0,06	0,08	0,09
	75	0,45	0,48	0,54
	50	1,40	1,38	1,48
	25	2,39	2,20	2,15
	kontrola	4,18	4,07	4,01
Pšenica	100	2,25	2,37	2,32
	75	1,60	1,47	1,40
	50	0,57	0,78	0,98
	25	1,11	1,46	1,67
	kontrola	2,11	2,25	2,31
Ovas	100	2,99	3,11	3,23
	75	4,10	4,18	4,25
	50	3,90	4,02	4,24
	25	4,40	4,55	4,68
	kontrola	3,93	3,99	4,12
Tritikale	100	2,45	2,51	2,61
	75	1,60	1,71	1,79
	50	1,57	1,64	1,71
	25	1,11	1,24	1,18
	kontrola	2,11	2,18	2,07

Tabela 56. - Suva biomasa klijanaca (g) na različitim supstratima

Biljna vrsta	Varijanta supstrata	Bez inokulacije	Sa inokulacijom	
			<i>Bacillus</i> sp. 13k	<i>Bacillus</i> sp. 13k+19k
Salata	100	0,01	0,01	0,03
	75	0,01	0,01	0,02
	50	0,05	0,12	0,16
	25	0,06	0,09	0,15
	kontrola	0,11	0,13	0,18
Slačica	100	0,01	0,01	0,01
	75	0,10	0,10	0,11
	50	0,11	0,11	0,12
	25	0,23	0,21	0,23
	kontrola	0,30	0,33	0,32
Pšenica	100	0,43	0,45	0,48
	75	0,23	0,24	0,23
	50	0,08	0,12	0,14
	25	0,18	0,25	0,28
	kontrola	0,32	0,30	0,33
Ovas	100	0,80	0,90	0,91
	75	0,83	0,81	0,85
	50	0,71	0,75	0,78
	25	0,81	0,86	0,91
	kontrola	0,66	0,67	0,67
Tritikale	100	0,56	0,51	0,50
	75	0,81	0,82	0,81
	50	0,42	0,44	0,45
	25	0,38	0,39	0,41
	kontrola	0,52	0,50	0,53

6. DISKUSIJA

Neminovna posledica globalizacije, industrijalizacije i tehničko-tehnološke revolucije je i pojava kontaminacije zemljišta, vode i vazduha. Zbog toga mnogi autori u poslednjoj deceniji ukazuju na problem životne sredine i značaj njenog očuvanja (Cheng, 2003; Kabata-Pendias i Mukherjee, 2007; Rautengarten i sar., 2004), posebno na značaj očuvanja kvaliteta zemljišta (Bertović, 2010). U cilju rešavanja ovih problema, neophodno je izvršiti karakterizaciju zemljišta, što predstavlja osnovni preduslov za aktivnosti koje bi doprinele oporavku ekosistema u celini. Isti autori ukazuju da utvrđivanje činjeničnog stanja predstavlja osnovni preduslov za ispitivanje mogućnosti korišćenja zemljišta u različite svrhe. Shodno tome, kvalitet zemljišta se može posmatrati sa dva aspekta: sa jedne strane, to su promene fizičkih, hemijskih i bioloških osobina zemljišta, a sa druge prisustvo različitih organskih i neorganskih zagađivača, kao što su ugljovodonici, PAH, PCB, teški metali (Bertović, 2010) i dr.

Uzorci zemljišta pokazuju različitu reakciju sredine i sadržaj karbonata. Variranja u utvrđenim sadržajima organskog ugljenika su uslovljena različitom količinom uglja na pojedinačnim lokacijama ispitivanja. Vrlo visok C/N odnos potvrđuje da je uglj, a ne organska materija zemljišta, odnosno humus, dominantan izvor organskog ugljenika, jer ukazuje da se radi o organskoj materiji vrlo bogatoj ugljenikom, a siromašnom u azotu. Utvrđeni C/N odnosi u svim ispitivanim uzorcima, a posebno u uzorcima FS-2 i FS-3, ukazuju na mogućnost pojave depresije u azotu, odnosno tokom mineralizacije ovog organskog materijala, količina mineralizovanog azota će u potpunosti biti iskorišćena za izgradnju biomase mikroorganizama koji učestvuju u prosecu mineralizacije, dok neće biti "viška" mineralnog azota koji bi mogao da bude pristupačan biljkama. Utvrđena rezerva mineralnog azota može da se koristi samo uslovno, jer je sadržaj mineralnog azota u zemljištu veoma promenljiv, u zavisnosti od velikog broja faktora (vlaga, temperatura, trenutni uslovi u toku uzorkovanja i dr.). Međutim, iako C/N odnos ukazuje na moguću depresiju u azotu, utvrđene količine mineralnog azota se ne mogu smatrati niskim, posebno u uzorcima FS-3 i FS-4. Sadržaj Ca u ispitivanim uzorcima bio je visok, dok je sadržaj Mg znatno niži, tako da Ca/Mg odnos ukazuje na moguć nedostatak Mg u ishrani biljaka, iako je utvrđeni sadržaj Mg viši od granice deficitarnosti (10 mg/100 g). Visoki pristupačni

sadržaji mikroelemenata u uslovima neutralne do alkalne reakcije zemljišta su najverovatnije posledica mineralnog sastava zemljišta, kao i stepena razvijenosti zemljišta.

Na osnovu graničnih vrednosti autora metode (Lindsay i Norwell, 1979) pristupačni sadržaj Fe je veoma visok u svim analiziranim uzorcima. Ukupni sadržaji Cu, Zn i teških metala su znatno niži od maksimalno dozvoljenih vrednosti za poljoprivredna zemljišta (Kabata-Pendijas i Mukherjee, 2007), osim sadržaja Ni, čije su vrednosti znatno iznad ove granice (tab. 41). Visok sadržaj Ni na ovom području potvrđen je i u istraživanjima koja su obavili Čustović i sar. (2012) i najverovatnije je posledica sastava minerala.

6.1. Diverzitet biljnih vrsta na oštećenim ekosistemima

U ovim istraživanjima opisane su promene u strukturi biljnih zajednica i zastupljenosti mikrobnih populacija na lokacijama rudnika mrkog uglja „Kakanj“ tokom trogodišnjeg perioda (2011-2013). Kada su u pitanju biljne zajednice, njihovu strukturu, brojnost i promene uslovljava kvalitet zemljišta (Martinez-Ruiz i Fernandez-Santos, 2005). Redukovani kvalitet zemljišta pruža optimalne uslove za razvoj i opstanak nekih invazivnih biljnih vrsta. Međutim, ispitivanje promena u sastavu i strukturi biljnih zajednica, posebno onih koje dominiraju na određenom području, ukazuju na to da su promenama obuhvaćene i pojedinačne vrste, što je potvrđeno u mnogim istraživanjima. Tako su MacDougall i sar. (2008) konstatovali da klimatske karakteristike imaju najveći uticaj na sastav biljnih zajednica, pri čemu su promene izraženije kod pojedinih vrsta unutar zajednice. U prirodnim sistemima prisustvo različitih biljnih vrsta najčešće ukazuje na invaziju nepoželjnih biljnih vrsta na ekosistem (Meiners i sar., 2004; Meiners, 2007), kojima najviše odgovara slab vegetacioni pokrivač i manji sadržaj pristupačnih hranljivih materija (Frouz i sar., 2007; Hodačova i Prach, 2003; Tropek i sar., 2010). Vegetacioni pokrivač koji nastaje na lokacijama pod eksploatacijom uglja je jedini izvor organskih materija (Zhao i sar., 2013) i značajno utiče na fizičke karakteristike i plodnost zemljišta (Marques i sar., 2008). Korenov sistem različitih biljnih vrsta takođe utiče na strukturu zemljišta. Rast korenovog sistema utiče na stvaranje zemljišnih agregata i akumulaciju organskih materija, što stimuliše razvoj rizosfere i mikrobiološku aktivnost (Zhao i sar., 2013).

Tokom intenzivne eksploatacije uglja, najveći deo područja pod eksploatacijom postaje degradiran, pri čemu se stvaraju nepovoljni uslovi za rast biljaka. Eksploatacija uglja dovodi do nesagledivih posledica po razvoj bioloških zajednica (Sarma, 2005). U našim istraživanjima broj žbunastih, drvenastih i zeljastih biljaka se povećava u funkciji vremena. U 2011. godini na ispitivanim lokacijama detektovana je jedna žbunasta vrsta, 3 drvenaste i 30 zeljastih, u 2012. godini jedna žbunasta, 4 drvenaste i 24 zeljaste, dok u 2013. godini 6 žbunastih, 8 drvenastih i 90 zeljastih biljnih vrsta. Ovi rezultati ukazuju da je došlo do značajnog povećanja indeksa zeljastih biljnih vrsta na područjima pod eksploatacijom uglja. Do povećanja stepena kolonizacije određenih biljnih vrsta u novim ekosistemima dolazi usled eksploatacije uglja, što je potvrđeno i u prethodnim istraživanjima (Lyngdoh, 1995; Das Gupta, 1999; Sarma, 2002).

Nepovoljni uslovi redukuju mogućnost regeneracije mnogih biljnih vrsta, tako da može doći do smanjenja njihovog broja. Meier i sar. (1995) su konstatovali da se neke biljne vrste sporadično javljaju na lokacijama gde se vrši eksploatacija uglja. Ovu činjenicu autori objašnjavaju ekstremnim mikroklimatskim uslovima praćenim narušavanjem ekosistema, kompeticijom sa drugim biljnim vrstama i nepovoljnim klimatskim karakteristikama. Osim toga, brojni autori naglašavaju značaj nedostatka rasejavanja semena na lokacijama koje potencijalno mogu biti kolonizirane biljkama (Beckage i sar., 2000; Ford i sar., 2000; Robinson i Handel, 2000).

U našim istraživanjima konstatovana je dominantnost biljnih vrsta iz familije *Asteraceae* u poređenju sa ostalim ispitivanim vrstama. U 2011. i 2012. godini, osim predstavnika familije *Asteraceae*, značajna je zastupljenost i biljnih vrsta iz familija *Amaranthaceae*, *Betulaceae*, *Poaceae*, *Polygonaceae* i *Rosaceae*. U 2013. godini redosled zastupljenosti familija na osnovu broja detektovanih vrsta ima sledeći karakter: *Poaceae*>*Fabaceae*>*Rosaceae*/*Lamiaceae*>*Salicaceae*/*Apiaceae*. Predstavnici ovih familija su detektovani i u istraživanjima koja je obavio Sarma (2005) ispitivajući uticaj eksploatacije uglja na vegetacioni pokrivač u regionu Jaintia u Indiji. Većinu ovih familija detektovali su i Guo i sar. (2011) ispitivajući uticaj eksploatacije uglja na biljni pokrivač i kvalitet zemljišta na području rudnika Qinxin u Kini. Autori ukazuju da najzastupljenije familije, među kojima su i *Rosaceae* i *Fabaceae*, imaju najznačajniji efekat na formiranje i očuvanje prirodne vegetacije. U zavisnosti od ispitivanih lokacija, isti autori konstatuju dominantnost predstavnika familije *Asteraceae* u odnosu na druge

familije, što je identično našim rezultatima. Moreno-de las Heras i sar. (2008) su ispitivajući sukcesije u obnovljenim terenima na području rudnika u centralnoj Španiji, konstatovali prisustvo biljaka iz familija *Asteraceae*, *Boraginaceae*, *Euphorbiceae*, *Poaceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae* itd, što je identično našim rezultatima. Isti autori ukazuju da u prirodnim ekosistemima, sukcesije uglavnom zavise od karakteristika terena koji je izložen eksploataciji uglja, klimatskih osobina i konzervacije okolne vegetacije. Slični rezultati su dobijeni i tokom ispitivanja ekosistema nastalog kao posledica čovekove delatnosti u centralnoj Evropi, gde početni uslovi koji vladaju u uništenim područjima i mezoklimatske razlike utiču na razvoj specifičnih sukcesija (Prach i sar., 2007).

Poslednjih decenija, posebna pažnja se posvećuje ispitivanju procesa mikrobnih sukcesija u ekstremnim uslovima. Po nekim autorima, upravo je pristupačnost hranljivih materija limitirajući faktor za razvoj mikrobnih sukcesija (Urbanova i sar., 2011), dok drugi autori smatraju da su klima i fizičke karakteristike i kvalitet supstrata najvažniji za sukcesije (Kastovska i sar., 2005; Schmidt i sar., 2008), pogotovo u područjima pod eksploatacijom uglja. Ova činjenica je veoma značajna za zemlje Evrope, gde je eksploatacija uglja intenzivna (Urbanova i sar., 2011).

6.2. Mikrobni diverzitet u oštećenim zemljištima i rizosferi biljaka

Eksploatacija uglja dovodi do stvaranja stresnih uslova izazvanih negativnim antropogenim delovanjem, što ima za rezultat promenu biohemijske aktivnosti zemljišnih mikroorganizama. Na terenima pod direktnom eksploatacijom uglja, hemijske analize ukazuju samo na nivo kontaminacije, ali ne odslikavaju i posledice po ekosistem, kao ni njihov uticaj na ključne procese metabolizma u zemljištu (Kujur i Patel, 2012). Međutim, primenom bioloških metoda se može proceniti realni uticaj kontaminacije na zemljišne organizme, tačnije njihov rast i aktivnost u stresnim uslovima (Smejkalova i sar., 2003). U cilju sprečavanja nepovoljnih ekoloških posledica, mikrobiološka karakterizacija se smatra važnim parametrom kvaliteta zemljišta (Filip, 2002), a mikroorganizmi daju jasnu sliku o kvalitetu zemljišta i enzimskoj aktivnosti i uključeni su u biohemijske cikluse ugljenika, azota, fosfora, sumpora i drugih hranljivih elemenata (Caldwell, 2005).

Mikrobiološka aktivnost zemljišta ima direktan uticaj na funkcionisanje ekosistema (Ardakani i sar., 2009), stabilnost ekosistema i plodnost (Smith i Papendick, 1993) i može se koristiti kao parametar kvaliteta zemljišta (Groffman i sar., 2001). Ova aktivnost se takođe smatra i indikatorom zrelosti zemljišta (Machulla i sar., 2005). Zbog toga, ispitivanje mikrobioloških i biohemijskih parametara može biti značajno i korisno za razumevanje limitirajućih faktora i predlaganje strategija koje će doprineti održivosti ekosistema (Harris, 2003). Brojnost, aktivnost i diverzitet mikroorganizama u zemljištu su značajni činioci plodnosti zemljišta (Jarak i Đurić, 2008). Na zastupljenost pojedinih grupa mikroorganizama i enzimsku aktivnost utiče veliki broj spoljašnjih faktora (Hoffmann i sar., 2006). Mikroorganizmi zauzimaju važno mesto u kruženju hranljivih elemenata u prirodi, omogućavaju obavljanje procesa humifikacije i dehumifikacije (Mrkovački i sar., 2012) i značajni su činioci plodnosti zemljišta i porasta biljaka.

Ukupan broj bakterija predstavlja značajan parametar stanja i kvaliteta ekosistema (http://www.fao.org/gtos/tems/variable_show.jsp?VARIABLE_ID=11), čiji se značaj ogleda u tome što sprečavaju gubitak hranljivih materija iz supstrata u kome se nalaze, ugrađuju ih u sopstvenu biomasu i ponovo ih prevode u organski oblik (Miletić i Radulović, 2005). U 2011. godini, sa izuzetkom uzorka iz zone zemljišta vrste *Reseda luteola* L., ukupan broj mikroorganizama u ovoj zoni se kreće između 5,0 i $143,2 \times 10^5$ /g. U 2012. godini ovaj raspon je uži i iznosi od 26,8 do $227,4 \times 10^5$ /g, dok se u 2013. godini interval kreće od 5,5 do $68,2 \times 10^5$ /g. Miletić i Radulović (2005) konstatuju znatno manji broj bakterija u organskoj prostirci u letnjem periodu, dok su Zhao i sar. (2013), ispitivajući razvoj zemljišta na površinama pod eksploatacijom uglja, konstatovali porast broja bakterija sa povećanjem vremena popravke terena sa 125,78 na $1236,08 \times 10^5$ /g. Isti autori konstatuju da biljne vrste značajno utiču na karakteristike zemljišta, pre svega agregaciju i mikrobiološke osobine, što je u skladu sa našim rezultatima. Tereni pokriveni žbunastim vrstama imaju znatno veći poljski kapacitet, agregaciju, mikrobiološki profil i ukupni broj bakterija (Zhao i sar., 2013), što je potvrđeno i u našim istraživanjima. Biljke koje rastu na siromašnim supstratima su zavisne od hranljivih materija koje nastaju truljenjem otpadaka biljnih vrsta (Leuschner i Rode, 1999), što značajno utiče i na mikrobiološku aktivnost. Do sličnih zaključaka došli su i Miletić i Radulović (2005) koji veći ukupan broj bakterija povezuju sa većim

sadržajem hranljivih materija u biljnim ostacima, koji se tokom godine mineralizuju i oslobađaju veću količinu pristupačnih hranljivih materija.

U većini uzoraka ukupan broj bakterija je veći u zoni rizosfere u odnosu na zonu zemljišta. Posle sadnje biljnih vrsta, mikrobne zajednice u rizosferi nisu dovoljno adaptirane na nepovoljne uslove koji vladaju u terenima pod eksploatacijom uglja i one su pod direktnim uticajem populacija u zoni zemljišta. Diverzitet bakterijskih populacija u zoni zemljišta se značajno povećava paralelno sa procesom stvaranja pravog zemljišta, tako da dolazi do znatnog povećanja diverziteta bakterijskih populacija u rizosferi u odnosu na zemljište. Ovo povećanje odslikava poboljšanje uslova tokom formiranja zemljišta. Na ovaj proces utiču dva osnovna faktora: promene hemijskih karakteristika, odnosno povećanje broja organskih supstrata, i povećanje opšte heterogenosti (Rosenvald i sar., 2011). Međutim, u nekim ekosistemima je konstatovan manji diverzitet bakterijskih populacija u rizosferi u odnosu na zonu zemljišta (Berg i Smalla, 2009). Rizosferni efekat na formiranje strukture rizosfernih bakterijskih populacija je izuzetno veliki, jer su sličnosti između populacija u rizosferi i zemljištu vrlo male i iznose između 33 i 42% (Rosenvald i sar., 2011). Isti autor konstatuje da su najveće razlike između bakterijskih populacija u rizosferi i zemljištu zabeležene u drugoj godini posle sadnje, kada biljke značajno stimulišu rizosferne mikrobne populacije.

Korenski eksudati i mucigel predstavljaju najvažniji činilac u regulaciji mikrobnog diverziteta i aktivnosti korenovog sistema. Cook i sar. (1995) pretpostavljaju da biljke mogu uticati na rizosfernu mikrofloru stimulacijom onih mikroorganizama koji su korisni za sopstveni rast i razvoj. Drugi autori tvrde da se eksudati pasivno oslobađaju kao sporedni ili otpadni proizvodi biljaka (Hartmann i sar., 2009; Jones i sar., 2009; Dennis i sar., 2010).

Ghose (2004) konstatuje pad broja bakterija u deponijama različite starosti na kojima nije bilo biljnog pokrivača. Ukupan broj bakterija je na ovim deponijama bio znatno veći ($57,8$ do $92,2 \times 10^5/g$) u poređenju sa vrednostima istog parametra u jalovini rudnika "Kakanj" (u svim godinama istraživanja broj bakterija je iznosio od $55,8$ do $2384,3 \times 10^3/g$).

Amonifikatori predstavljaju grupu mikroorganizama koja vrši razgradnju proteina do pristupačnog amonijačnog jona. To su nespecifični mikroorganizmi i veoma su brojni u zemljištu. Alexander (1977) navodi da je brojnost amonifikatora u

površinskim slojevima zemljišta između 10^5 i 10^7 po gramu. Njihova brojnost je uslovljena supstratom, tipom zemljišta i klimatskim karakteristikama. Amonifikatori stvaraju ekstracelularne enzime koji razlažu proteine na manje jedinice koje može da usvoji ćelija (Stamenov, 2013). Osim toga, enzimaska aktivnost u odnosu na procese kruženja azota (amonifikacija, nitrifikacija i azotofiksacija) i fosfora u zemljištu su često korišćeni parametri plodnosti zemljišta (Aon i Colaneri, 2001; Brohon i sar., 2001).

U 2011. godini brojnost amonifikatora u zemljištu iznosila je između $8,4$ i $1.483,7 \times 10^5/g$, u 2012. godini između $4,2$ i $112,1 \times 10^5/g$ i u 2013. godini između $5,2$ i $27,3 \times 10^5/g$. Ove vrednosti su veće u odnosu na rezultate koje su dobili Miletić i Radulović (2005). Ovi autori navode da je brojnost amonifikatora uslovljena klimatskim karakteristikama, odnosno da je u letnjem periodu njihova brojnost najmanja u poređenju sa ostalim godišnjim dobima. S obzirom na nešto niže temperature i višu količinu padavina u 2011. godini, što je rezultiralo većom brojnošću ove fiziološke grupe bakterija, može se konstatovati da je u našim istraživanjima potvrđen prethodni zaključak. Broj sporogenih amonifikatora je znatno manji u odnosu na njihov ukupan broj, a u zoni rizosfere većine uzoraka je veći broj amonifikatora u odnosu na zonu zemljišta. Dinamika brojnosti mikroorganizama u zonama uzorkovanja ukazuje na postojanje specifičnih odnosa između mikrobnih populacija unutar jedne zone, kao i između zona (Hu i sar., 1999).

Oligonitrofilni mikroorganizmi koriste male količine azota iz organske materije a delimično imaju i sposobnost azotofiksacije. Oni koriste organske materije sa širokim C/N odnosom za sopstvene biosintetske procese. Njihovom aktivnošću C/N odnos se smanjuje, jer se zemljište obogaćuje azotom a deo ugljenika izdvaja u formi CO_2 (Miletić i Radulović, 2005). Oni su veoma osetljivi na prisustvo metala i njihova aktivnost je ograničena u zemljištima siromašnim organskom materijom i hranljivim materijama (Brookes, 1995). U 2011. godini njihov broj u zemljištu iznosio je između $120,5$ i $2.149,6 \times 10^4/g$, u 2012. godini između $112,6$ i $430,2 \times 10^4/g$ i u 2013. godini između $34,3$ i $615,9 \times 10^4/g$. Ove vrednosti su veće u poređenju sa rezultatima koje su zabeležili Miletić i Radulović (2005). U 2011. godini zastupljenost oligonitrofila je veća u poređenju sa ukupnim brojem bakterija i amonifikatorima, dok je u 2012. i 2013. brojnost oligonitrofila uglavnom manja od ostalih grupa bakterija. Ovo se može povezati sa klimatskim karakteristikama područja, jer oligonitrofilnim

mikroorganizmima odgovara niža temperatura tokom letnjih meseci i veća vlažnost. U 2011. godini je, u poređenju sa ostale dve godine, bila najveća količina padavina u julu, odnosno najniža temperatura vazduha, to je rezultiralo većom zastupljenošću oligonitrofila. Do sličnih zaključaka došli su i Miletić i Radulović (2005). U većini uzoraka, brojnost oligonitrofila je veća u zoni rizosfere u poređenju sa zonom zemljišta.

Pristupačnost azota često je limitirajući faktor biljne proizvodnje i utiče na biljne zajednice i procese u ekosistemu (Tan i sar., 2003). Slobodni azotofiksatori žive u zemljištu i rizosferi i imaju važnu ulogu u razvoju prirodnih ekosistema povećavanjem sadržaja azota u supstratima, stimulisanjem biljnog rasta i regulacijom strukture biljnih zajednica (Deslippe i sar., 2005; Soares i sar., 2006). Mnogi faktori, kao što su fizičke i hemijske osobine supstrata, genotip biljnih vrsta itd. mogu da utiču na diverzitet i strukturu azotofiksatora (Tan i sar., 2003; Chowdhury i sar., 2009; Coelho i sar., 2008).

Brojnost azotofiksatora u ispitivanim uzorcima nije bila velika. U 2011. godini, osim kod vrste *Reseda luteola* L., brojnost azotofiksatora je veoma ujednačena u svim uzorcima, bez obzira na biljnu vrstu i zonu uzorkovanja. Sličan trend kod većine uzoraka je zabeležen u 2013. godini, dok je u 2012. godini primetna razlika u broju *Azotobacter* sp. u zavisnosti od biljnih vrsta i zone uzimanja uzoraka. Brojnost ovih slobodnih azotofiksatora je niža u poređenju sa ostalim grupama bakterija. Mrkovački i sar. (2012) konstatuju da biljke stimulišu razvoj mikroorganizama ali da je njihova zastupljenost u rizosferi različita: amonifikatori su najbrojniji, dok su azotofiksatori najmanje zastupljeni, što se podudara sa našim rezultatima.

Gljive su grupa mikroorganizama i imaju značajnu ulogu u zemljištu, jer svojim enzimima utiču na razlaganje kompleksnih jedinjenja i transformišu ih u pristupačne forme. Produkti razlaganja najčešće imaju kiselu reakciju i to su uglavnom jake organske kiseline, kao što su sirćetna, limunska, oksalna itd. Ovi proizvodi agresivno deluju na mineralnu komponentu (Miletić i Radulović, 2005).

Efikasnost usvajanja ugljenika kod gljiva iznosi 40-55%, što znači da one usvajaju i transformišu više ugljenika nego bakterije. Osim toga, bakterije su manje efikasne u skladištenju ugljenika i oslobađaju veće količine ovog elementa u obliku CO₂. Gljive imaju veći sadržaj ugljenika i niži sadržaj azota u svojim ćelijama od bakterijskih a zbog svoje male veličine i velike dodirne površine, aktivnije učestvuju u

usvajanju ovih elemenata u poređenju sa korenovim dlačicama i tako poboljšavaju ishranu biljaka ovim elementima (Hoorman, 2011).

Brojnost gljiva u zemljištu bila je različita i kretala se u približnim intervalima za 2011. i 2012. godinu ($0,2$ do $18,1 \times 10^4/g$, odnosno $0,8$ do $18,6 \times 10^4/g$) i $0,1$ do $9,6 \times 10^4/g$ (2013. godine). U 2011. i 2012. godini brojnost gljiva je uglavnom veća u zoni rizosfere u poređenju sa zemljištem, dok je u 2013. godini njihova brojnost veća u zemljištu. Dobijene vrednosti su nešto više u odnosu na istraživanja koja su obavili Maharana i Patel (2013) ispitivajući mikrobne zajednice na području pod eksploatacijom uglja. Međutim, Miletić i Radulović (2005) su u organskoj prostirci različitih šumskih biljnih vrsta (bele lipe, crne jove, crnog bora, duglazije i japanskog ariša) konstatovali sličnu brojnost gljiva kao u našim istraživanjima. Isti autori konstatuju da je brojnost gljiva najmanja u periodu suše, odnosno u uslovima smanjene vlažnosti. Ova konstatacija je u skladu sa našim istraživanjima, jer je brojnost gljiva najmanja u 2012. godini, odnosno u godini kada je zabeležena manja količina padavina u letnjim mesecima u odnosu na 2011. i 2013. godinu.

Međutim, Ghose (2004) konstatuje znatno veću brojnost gljiva u poređenju sa našim rezultatima. Isti autor ukazuje i na smanjenje zastupljenosti gljiva ispitivajući uticaj eksploatacije uglja na plodnost zemljišta tokom desetogodišnjeg perioda obnavljanja ekosistema. Ova konstatacija je vrlo slična našim rezultatima.

Aktinomicete su široko rasprostranjeni mikroorganizmi u prirodnim ekosistemima, kao i u onim koje je čovek stvorio svojom aktivnošću. One imaju važnu ulogu u degradaciji organske materije (Seong i sar., 2001), pri čemu nastaju ugljendioksid i voda, kao i biljkama pristupačne hranljive materije (Miletić i Radulović, 2005).

Intervali zastupljenosti aktinomiceta su znatno uži u poređenju sa gljivama. U uzorcima jalovine brojnost aktinomiceta je veoma niska u poređenju sa ostalim uzorcima. U većini uzoraka, u rizosferi je njihova zastupljenost veća u odnosu na zemljište. Brojnost aktinomiceta se 2011. godine kretala u intervalu od $0,3$ do $5,1 \times 10^4/g$ (uz izuzetak zone rizosfere vrste *Reseda luteola* L., gde nije bilo aktinomiceta), u 2012. godini od $0,7$ do $3,9 \times 10^4/g$ i u 2013. godini od $0,2$ do $14,5 \times 10^4/g$. Na osnovu ovih podataka, može se zaključiti da se brojnost aktinomiceta povećava u funkciji vremena, što se razlikuje od prethodnih istraživanja (Ghose, 2004), koji konstatuje smanjenje

njihove brojnosti u funkciji vremena. Vrednosti dobijene u 2013. godini vrlo su slične rezultatima koje su objavili Zhao i sar. (2013) uz konstataciju da je brojnost aktinomiceta najveća nakon 9-ogodišnjeg i maksimalnog 13-ogodišnjeg perioda obnavljanja lokacija u kineskoj rudarskoj oblasti Pingshuo. Miletić i Radulović (2005) konstatuju nisku zastupljenost aktinomiceta u letnjem periodu, što je u skladu i sa našim rezultatima.

Sa izuzetkom od svega nekoliko uzoraka, bakterije dominiraju u odnosu na gljive i aktinomicete i čine najmanje 95% ukupnog broja mikroorganizama. Zhao i sar. (2013) u sličnim istraživanjima takođe konstatuju dominantnost bakterija sa učešćem od 95,9 do 99,7%.

Dehidrogenaze u zemljištu, koje predstavljaju grupu intracelularnih enzima prisutnih u živim ćelijama mikroorganizama, regulišu metaboličke reakcije u okviru oksidativnog transfera energije (Smith i Papendick, 1993). S obzirom da ne spadaju u ekstracelularne enzime u zemljištu, smatraju se dobrim indikatorom opšte mikrobiološke aktivnosti (Dick, 1997). Dehidrogenazna aktivnost zemljišta obuhvata aktivnost različitih dehidrogenaza (respiratornog i azotnog metabolizma i ciklusa limunske kiseline), koje su prisutne u skoro svim mikroorganizmima. Zbog toga su dehidrogenaze indikator biološkog redoks sistema i mogu se koristiti za merenje intenziteta mikrobnog metabolizma u zemljištu (Kujur i Patel, 2012).

Aktivnost dehidrogenaze se znatno razlikovala po godinama uzorkovanja u zavisnosti od biljnih vrsta i zone uzimanja uzoraka. U 2011. godini, dehidrogenazna aktivnost se kretala u intervalu od 1,48 do $9,63 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g TPF/g/h}$, u 2012 godini znatno niža (0,36 do $4,10 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g TPF/g/h}$) a u 2013. godini najveća (1,58 do $23,47 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g TPF/g/h}$). Ove vrednosti nisu visoke i s obzirom da se radi o lokacijama pod direktnom eksploatacijom uglja, niske vrednosti dehidrogenazne aktivnosti su i očekivane. Do sličnih zaključaka su došli i Pitchel i Hayes (1990). Vrednosti dehidrogenazne aktivnosti su znatno niže u odnosu na druga istraživanja, gde je u sličnim uslovima eksploatacije uglja dehidrogenazna aktivnost iznosila 0,052 $\mu\text{g TPF/g/h}$ (Kujur i Patel, 2012), odnosno 0,056 do 1,275 $\mu\text{g TPF/g/h}$ (Maharana i Patel, 2013). S obzirom da je prisutna u skoro svim mikroorganizmima (Taylor i sar., 2002), dehidrogenazna aktivnost ukazuje na kataboličku aktivnost zemljišta, odnosno u korelaciji je sa brojnošću i aktivnošću mikroorganizama (Skujins, 1976). Ovo je potvrđeno i našim

rezultatima u 2011. godini, gde je kod vrste *Reseda luteola* L. bio najveći broj bakterija u obe ispitivane zone i najveća dehidrogenazna aktivnost. Osim toga, u zoni zemljišta vrste *Polygonum lapathifolium* L. ukupan broj bakterija i dehidrogenazna aktivnost bili su najmanji u poređenju sa ostalim vrstama (tab. 28 i 37). Slični rezultati su dobijeni i 2013. godine, gde su najveći broj bakterija i dehidrogenazna aktivnost bili u obe ispitivane zone kod vrste *Galium verum* L., dok su isti parametri bili najmanji kod vrste *Conyza canadensis* (L.) Cronquist u zoni zemljišta, odnosno kod vrste *Amaranthus albus* L. u zoni rizosfere (tab. 37 i 41). Međutim, rezultati iz 2012. godine odstupaju od navedenih trendova, jer dehidrogenazna aktivnost ne prati brojnost mikroorganizama. Rezultati ukazuju da je najveći ukupan broj bakterija bio u zoni zemljišta vrsta *Polygonum aviculare* L. i *Equisetum talmateia* Ehrh., dok je u istoj zoni najveća dehidrogenazna aktivnost bila kod vrste *Saponaria officinalis* L. Sa druge strane, najmanji ukupan broj bakterija je bio kod vrste *Amaranthus albus* L., dok je najmanja dehidrogenazna aktivnost bila kod *Doronicum* sp. L. Slična odstupanja prisutna su i u zoni rizosfere (tab. 31 i 38). Po nekim autorima, dehidrogenazna aktivnost se ne može smatrati jednim od indikatora opšte mikrobiološke aktivnosti zbog slabe efikasnosti akceptora elektrona koji se koriste u cilju određivanja ove aktivnosti (Benefield i sar., 1977). Pozitivna korelacija između brojnosti mikroorganizama i enzimske aktivnosti ne mora biti uvek prisutna u prirodnim ekosistemima, jer činioci spoljne sredine imaju znatno veći uticaj na brojnost mikroorganizama nego na njihovu aktivnost (Singh i Rengel, 2007).

Hemijski i biohemijski parametri mogu poslužiti kao indikatori efekta tretmana na procese u zemljištu koji doprinose kruženju hranljivih elemenata u ekosistemu (Prasanna i sar., 2011). Korelacija između mikrobne i enzimske aktivnosti je potvrđena samo ukoliko su lako razgradljivi izvori ugljenika uneti u zemljište (Frankenberger i Dick, 1983). Poznato je da je dehidrogenazna aktivnost znatno povećana pri porastu aktivnih vidljivih ćelija (Casida i sar., 1964). U našem eksperimentu gde su različite biljne vrste gajene na supstratima inokulisanim čistim kulturama i mešanim bakterijskim populacijama, vrednosti dehidrogenazne aktivnosti su neznatno do znatno veće u poređenju sa kontrolnom varijantom. I mnoga druga istraživanja potvrđuju povećanje dehidrogenazne aktivnosti kao posledicu primene inokulacije mikroorganizmima (Jarak i sar., 2006; Wolna-Maruwka i sar., 2012). Dobijene

vrednosti u našim istraživanjima nisu visoke i mogu se povezati sa prisustvom jalovine u supstratima. Emnova i sar. (2008) su, ispitivajući dehidrogenaznu aktivnost u zemljištima sa povećanim sadržajem bakra i pri inokulaciji bakterijom *Pseudomonas aureofaciens* dobili vrednosti slične našim rezultatima. Osim toga, autori ukazuju i da eksudati korenovog sistema mogu povećati dehidrogenaznu aktivnost (Wielgosz i Szember, 2006; Wolna-Maruwka i sar., 2009), što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima u našim eksperimentima. I teški metali značajno utiču na inhibiciju enzimske aktivnosti stvaranjem kompleksa sa supstratom ili blokiranjem funkcionalnih grupa enzima ili reakcijom sa kompleksom enzim-supstrat (Speir i sar., 1995).

Fosfataze su velika grupa enzima koji katališu hidrolizu estara i anhidrida fosforne kiseline (Schmidt i Laskowski, 1961). U zemljišnim ekosistemima, imaju značajnu ulogu u procesima kruženja fosfora (Speir i Ross, 1978) i porastu biljaka i, s obzirom da se smatraju dobrim indikatorom zemljišne plodnosti, imaju ključnu ulogu u zemljištu (Eivazi i Tabatabai, 1977; Dick i sar., 2000). Aktivnost kisele i alkalne fosfataze je povezana sa sadržajem organske materije (Aon i Colaneri, 2001), ali i sa drugim parametrima, od kojih je svakako najvažnija pH vrednost (Martinez i Tabatabai, 1997).

U našim istraživanjima, fosfatazna aktivnost varira po godinama uzorkovanja, zoni uzimanja uzoraka i biljnim vrstama. U 2011. godini se kretala između 3 i 11 $\mu\text{g pNP/g/h}$ u zemljištu, odnosno 2-9,5 $\mu\text{g pNP/g/h}$ u zoni rizosfere. U 2012. godini je bila najniža i kretala se od 1,1 do 5,3 $\mu\text{g pNP/g/h}$ (zemljište), odnosno 0,7-4,2 (rizosfera), dok je u 2013. godini bila najveća i kretala se od 0,5 do 14 $\mu\text{g pNP/g/h}$ u zemljištu, dok je u zoni rizosfere aktivnost iznosila 0,7 do 12,1 $\mu\text{g pNP/g/h}$. Ove vrednosti su znatno niže u poređenju sa rezultatima koje su dobili Emmerling i sar. (2000) ispitivajući enzimsku aktivnost zemljišta u rudniku, ali uz primenu različitih organskih materijala u cilju stimulacije mikrobne aktivnosti. Takođe više vrednosti fosfatazne aktivnosti u poređenju sa našim rezultatima konstatovali su i Dowarah i sar. (2009) ispitivajući lokacije na području rudnika uglja sa visokim sadržajem sumpora.

Poznato je da usvajanje sumpora od strane biljaka u obliku neogranskog sulfata (SO_4) i njegova pristupačnost zavise od intenziteta mineralizacije ili mobilizacije aromatičnih sulfatnih estara (Fitzgerald, 1976). U različitim profilima zemljišta, neki oblici sumpora su vezani za organska jedinjenja i indirektno su pristupačni biljkama. U

tom slučaju, pristupačnost sumpora će zavisiti od ekstracelularne hidrolize ovih aromatičnih sulfatnih estara ili intracelularne oksidacije rastvorljivih organskih materija koje usvajaju mikroorganizmi u cilju stvaranja energije i ugljenika za sopstvene biosintetske procese, pri čemu kao spordni proizvod nastaje SO_4 . Svi ovi procesi vrše se pomoću enzima arilsulfataze. Ovi enzimi su široko rasprostranjeni u prirodi (Dodgson i sar., 1982) i zemljištu (Ganeshamurthy i sar., 1995) i odgovorni su za hidrolizu sulfatnih estara u zemljištu (Kertesz i Mirleau, 2004). Prisustvo ovih enzima u različitim zemljištima je često u korelaciji sa mikrobnom biomasom i stepenom mobilizacije sumpora (Vong i sar., 2003).

U našim istraživanjima, vrednosti za arilsulfataznu aktivnost iznose od 10 do 350 $\mu\text{g PNP/g/h}$. Ove vrednosti su znatno veće u odnosu na druga istraživanja gde su ispitivana poljoprivredna zemljišta (Elsgaard i sar., 2002; Kizilkaya i Dengiz, 2010), gde su dobijene vrednosti iznosila 10-20, odnosno 11 do 30 $\mu\text{g PNP/g/h}$. U uzorcima iz zone rizosfere, arilsulfatazna aktivnost se kretala između 50 i 250 $\mu\text{g PNP/g/h}$, što je više u odnosu na uzorke iz zone rizosfere nekih poljoprivrednih kultura (Vong i sar., 2004, Siwik-Ziomek i Koper, 2010). Dobijene vrednosti arilsulfatazne aktivnosti u našim istraživanjima su više i u poređenju sa vrednostima dobijenim nakon revegetacije deponija materijala nastalog tokom eksploatacije uglja u suptropskom klimatskom pojasu (Finkenbein i sar., 2013), kao i deponijskim materijalom poreklom iz rudnika (Fresquez i sar., 1985). Međutim, Klose i sar. (1999) su zabeležili slične vrednosti arilsulfatazne aktivnosti našim rezultatima ispitivajući poljoprivredna zemljišta.

Mnoga istraživanja ukazuju da na oslobađanje sulfata iz rastvorljivih i nerastvorljivih estara u zemljištu utiče veliki broj spoljašnjih faktora (Burns, 1982) kao što su prisustvo teških metala (Tyler, 1981), pH vrednost (Acosta-Martinez i Tabatabai, 2000), sadržaj organske materije (Jezierska-Tys i Frac, 2005) itd.

6.3. Biljno-mikrobne interakcije u popravci oštećenih zemljišta

Korisna svojstva bakterija su predmet brojnih istraživanja mikrobiologa i ekonomista zbog svog potencijala u povećanju biljne proizvodnje (Somers i sar., 2004). Bakterije promotori biljnog rasta (plant grow promoting bacteria - PGPB) uglavnom su

primenjivane na travama u poljskim uslovima i nekim hortikulturnim biljkama. Sojevi koji pripadaju rodovima *Azospirillum* (Okon i Itzigshon, 1995; Dobbelaere i sar., 2001), *Bacillus* (Reddy i Rahe, 1989; Kokalis-Bourelle i sar., 2002; Kokalis-Bourelle i sar., 2006) i *Pseudomonas* (McCullaugh i sar., 1996; Meyer i sar., 2010) su korišćeni u eksperimentalnim testovima ekonomski značajnih poljoprivrednih kultura. Osim toga, za rizosferne bakterije koje pripadaju navedenim rodovima utvrđena je sposobnost kolonizacije tkiva biljaka (Pedraza i sar., 2007; Mano i Morisaki, 2008).

Generalno, PGPB funkcionišu na tri načina (Glick, 2001): sintezom određenih jedinjenja koja koriste biljke (Dobbelaere i sar., 2003; Zahir i sar., 2004), stimulisanjem usvajanja određenih hranljivih materija iz supstrata (Lucas i sar., 2004) i prevencijom biljnih bolesti (Guo i sar., 2004; Saravanakumar i sar., 2008). Međutim, mehanizmi kojima se podstiče biljni rast, pri čemu dolazi do povećanja prinosa još uvek nisu razjašnjeni (Dey i sar., 2004). Postoji nekoliko mogućih mehanizama: sposobnost produkcije vitalnih enzima koji utiču na izduživanje i rast korena (Li i sar., 2000); sposobnost produkcije hormona kao što su auksin (Patten i Glick, 2002), apscisinska kiselina (Dobbelaere i sar., 2003), giberelinska kiselina i citokinini (Dey i sar., 2004); simbiozna azotofiksacija (Kennedy i sar., 2004); antagonizam protiv fitopatogenih bakterija produkcijom siderofora, antibiotika, pigmenata i cijanida (Pal i sar., 2001; Glick i Pasternak, 2003); rastvaranje i mineralizacija hranljivih materija, posebno fosfata (Richardson, 2001; Banerjee i Yasmin, 2002); povećanje otpornosti prema suši (Alvarez i sar., 1996), salinitetu i stresu (Štajner i sar., 1997); produkcija vodnorastvorljivih vitamina B kompleksa, pantotenske kiseline, tiamina, riboflavina i biotina (Sierra i sar., 1999; Revillas i sar., 2000). Osim u biljnoj proizvodnji, upotreba PGPB je poslednjih godina proširena i na remedijaciju kontaminiranih zemljišta u kombinaciji sa biljkama (Zhuang i sar., 2007), što je u skladu i sa našim istraživanjima.

Rezultati istraživanja ukazuju na pozitivan uticaj inokulacije supstrata bakterijama roda *Bacillus* na stepen klijavosti semena, suhu i svežu biomasu klijanaca poljoprivrednih kultura. Pozitivni efekti primene bakterija iz roda *Bacillus* sp. konstatovali su i drugi autori. Probanza i sar. (2002) su ispitivali efekat inokulacije *Pinus pinea* bakterijama roda *Bacillus* sp. i konstatovali porast klijanaca biljaka, što povezuju sa mogućom produkcijom giberelina od strane bakterija. Bakterije iz roda *Bacillus* sp. su jedne od najzastupljenijih u zemljištu i mnoge od njih se odlikuju PGPB

efektom (Stamenov i Jarak, 2012). Postoji veći broj metabolita koje oslobađaju ovi sojevi i utiču na životnu sredinu povećavanjem pristupačnosti hranljivih materija za biljke (Barriuso i Solano, 2008). Bakterije iz ovog roda imaju potencijal povećanja prinosa i rasta različitih biljnih vrsta (Orhan i sar., 2006). Kod paradajza i paprike je inokulacija ovim bakterija uticala na zadovoljavajuću kolonizaciju, što opravdana njihovu primenu u biofertilizaciji (Garcia i sar., 2004), dok je kod maline došlo do povećanja prinosa i rasta biljaka (Orhan i sar., 2006). Bakterije iz roda *Bacillus* sp. izolovane iz rizosfere čaja imaju sposobnost produkcije indolsirćetne kiseline i stimulišu rast biljaka (Chakraborty i sar., 2006). Neki sojevi vrste *Bacillus cereus* su testirani in vitro i ustanovljeno je da utiču na rastvaranje fosfata, čime potpomažu rast biljaka (Husen, 2003). Upoređivajući efekte primene bakterija iz rodova *Bacillus* sp. i *Pseudomonas* sp. na prinos i suhu masu paradajza, afričkog spanaća i bamje, Adesemoye i sar. (2008) nisu dobili statistički značajne razilke između ovih inokulanata.

Inokulacija je pokazala pozitivan uticaj na svežu i suhu biomasu biljaka. Stamenov i sar. (2011) su istraživali uticaj *Trichoderma asperellum* na svežu i suhu biomasu engleskog ljulja varijetet calibra, kao i na brojnost mikroorganizama. Sveža masa biljaka povećana je 44,3% u odnosu na kontrolu, dok je suva masa uvećana za 43,75%. Brojnost svih ispitivanih grupa mikroorganizama je povećana. U sličnim istraživanjima, Stamenov i sar. (2012) su ispitali uticaj primene bakterijskih populacija (uključujući i *Bacillus* sp.) na prinos engleskog ljulja varijetet Esquire i konstatovali porast sveže i suve biomase u odnosu na kontrolu. U svim varijantama došlo je do povećanja broja bakterija u odnosu na kontrolu, što je identično našim rezultatima. Do sličnih rezultata došli su i Mrkovački i sar. (2012). Osim toga, primena bakterija iz roda *Bacillus* sp. uticala je i na povećanje sveže i suve mase pepermint, kao i na sadržaj azota, fosfora i hlorofila u biljkama (Sandeep i sar., 2011). Kod pšenice je primena mešanih bakterijskih populacija (uključujući i *Bacillus megaterium*) uticala na povećanje suve mase, sadržaja azota i fosfora u nadzemnom delu biljaka (El-Komy, 2005). I kod kukuruza je potvrđen stimulatívni efekat bakterija iz roda *Bacillus* sp. i označene su kao pogodne pri proizvodnji ove kulture, odnosno kao bakterije sa PGP efektom (Đalović i sar., 2013).

Osim brojnosti mikroorganizama kao značajnog parametra plodnosti zemljišta, inokulacija je pozitivno uticala i na enzimsku aktivnost. U svim ispitivanim varijantama je došlo do povećanja dehidrogenazne aktivnosti supstrata inokulisanih čistim kulturama i mešanim bakterijskim populacijama. Jarak i sar. (2006) konstatuju da je inokulacija statistički značajno uticala na povećanje dehidrogenazne aktivnosti u odnosu na kontrolu. Međutim, Emnova i sar. (2008) konstatuju da primena bakterijskih inokulanata nije uticala na porast dehidrogenazne aktivnosti zemljišta kontaminiranih bakrom.

Zastupljenost i aktivnost mikroorganizama u zemljištu verodostojno odslikava uslove koji vladaju u zemljištu i stepen njegovog razvoja (Helingerova i sar., 2010). Razvoj aktivnih mikrobnih populacija ima veliki uticaj na aktiviranje vitalnih procesa u zemljištu, kao što su kruženje biogenih elemenata i konverzija neorganskih oblika azota i fosfora u biljkama dostupne oblike (Fu i sar., 2010; Moreno-de las Heras i sar., 2008), čime dolazi do povećanja plodnosti supstrata (Zhao i sar., 2013), odnosno porasta biljaka, što je u korelaciji sa našim rezultatima. I druga istraživanja ukazuju na pozitivnu korelaciju između prinosa biljne mase i broja mikroorganizama koji potpomažu ishranu biljaka (Paul i Clark, 1989; Jarak i sar., 2004).

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti sledeće:

- Prisustvo različitih biljnih vrsta na području rudnika mrkog uglja „Kakanj“ ukazuje na potencijal ispitivanih lokacija i prirodni oporavak ekosistema. Uočeno je povećanje broja biljnih vrsta od 34, koliko je konstatovano prve godine istraživanja do 104 u poslednjoj godini. Diverzitet biljnih vrsta, koji je naročito izražen 2013. godine, ukazuje na poboljšanje uslova za rast biljaka, koje svojom aktivnošću, dalje, doprinose oporavku ekosistema. Tokom 2011., 2012. i 2013. godine najzastupljenije su biljke iz familije *Asteraceae* i imaju najznačajniji efekat na formiranje i očuvanje prirodne vegetacije.
- Na jalovini u toku 2011. god. nije konstatovano prisustvo biljaka, dok je 2012. konstatovano prisustvo samo jedne biljne vrste i to *Amaranthus albus* L., a 2013. god. pet familija *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Convolvulaceae*, *Poaceae* i *Polygonaceae*. Ovi rezultati ukazuju da su tokom perioda od 3 godine, abiotički faktori (svetlost, vlaga, itd.), zajedno sa rastom biljaka, doprineli stvaranju povoljnih uslova za rast nekih biljnih vrsta i na taj način ukazali na potencijal ovog jalovišta za oporavak.
- Ispitivani lokaliteti se izuzetno razlikuju u pogledu pH vrednosti koja se kreće od slabo alkalne, preko neutralne do slabo ili jako kisele reakcije. Sadržaj organskog ugljenika je visok, a sadržaj pristupačnog fosfora nizak. Sadržaji teških metala, osim nikla, su ispod graničnih vrednosti za poljoprivredna zemljišta. Sadržaj pristupačnog gvožđa i kalcijuma je veoma visok. Sadržaj organskih zagađivača je nizak, polihlorovani bifenili nisu detektovani, dok je sadržaj PAH-ova različit u zavisnosti od lokacije. Sadržaj ugljovodonika je nizak na svim lokacijama.
- Jalovina se odlikuje kiselom reakcijom sredine, bez slobodnih karbonata, i sadržajem organskog ugljenika od 15,2% i ukupnog N od 0,48%. Sadržaj nikla i gvožđa je visok. Polihlorovani bifenili nisu detektovani, sadržaj

PAH-ova je veoma nizak, dok je sadržaj ugljovodonika veći od 1 g/kg. Jalovina ima visok sadržaj ugljovodonika iz grupe C₁₀ – C₄₀.

- Mikrobnii diverzitet na ispitivanim lokacijama je veoma izražen i ispoljava se u prisustvu različitih fizioloških i sistematskih grupa mikroorganizama. Bakterijske populacije dominiraju u odnosu na populacije gljiva i aktinomiceta u toku sve tri godine ispitivanja.
- Brojnost ukupnih bakterija bila je različita u zavisnosti od godine ispitivanja, zone rizosfere kao i biljne vrste. Ukupan broj bakterija je najveći u toku 2011. god. a najmanji u toku 2013. god., ali treba imati u vidu da je 2011. god. konstatovana izuzetno velika brojnost u zemljištu i rizosferi biljne vrste *Reseda luteola* L., i da je to uticalo na ukupnu brojnost u toj godini. Odnos ukupnog broja bakterija u rizosferi u odnosu na zemljište iznosi od 1,9 u toku 2011., 1,5 u toku 2012., dok je taj odnos u toku 2013. godine 0,9. Veća brojnost ukupnih bakterija u rizosferi je posledica aktivnosti korenovog sistema i specifičnosti uslova koji vladaju u zoni rizosfere. Takođe, ovi rezultati upućuju na zaključak da je prisustvo većeg broja različitih biljnih vrsta na ispitivanim lokalitetima u toku 2013. god. uticalo na smanjenje rizosfernog efekta, što se manifestuje kroz izjednačavanje brojnosti ukupnih bakterija u rizosferi i zemljištu. Ukupan broj svih grupa bakterija u 2011. godini bio je najveći kod vrste *Reseda luteola* L., u 2012. godini kod vrste *Polygonum aviculare* L. i u 2013. godini kod vrste *Galium verum* L.
- Ukupni amonifikatori su brojniji u rizosferi u odnosu na zemljište u sve tri ispitivane godine a taj odnos se kreće od 1,2 do 1,4. Sporogeni amonifikatori su najbrojniji u prvoj godini istraživanja a brojnost u rizosferi i zemljištu je slična. Odnos između ukupnih amonifikatora i sporogenih je različiti u rizosferi i zemljištu i povećana brojnost u zemljištu ukazuje na povoljnije uslove u rizosferi biljaka za aktivnost bakterijskih populacija što je doprinelo germinaciji sporogenih formi u vegetativne.
- Brojnost *Azotobacter* sp. je znatno niža u poređenju sa ostalim grupama mikroorganizama. Brojnost populacija gljiva i aktinomiceta je manja u odnosu na bakterijske populacije i u brojnosti ovih populacija uglavnom nema razlike između rizosfere i zemljišta.

- Mikrobni diverzitet jalovine je manji u odnosu na ostale ispitivane lokalitete. Najmanja brojnost ukupnih bakterija je u 2011. god. a rod *Azotobacter* sp. nije detektovan ni u jednoj godini istraživanja. Enzimska aktivnosti jalovine je veća u površinskom sloju u odnosu na potpovršinski.
- Dehidrogenazna aktivnost u rizosferi je bila veća 2011. god. u odnosu na zemljište a kasnije se ta razlika ne uočava, što ukazuje na povećanje biološke aktivnosti i u zemljištu. Ukupna fosfatazna aktivnost bila je najveća 2011. god. u zemljišu i u narednom periodu istraživanja ne uočava se razlika između zemljišta i rizosfere. Arilsulfatazna aktivnost je bila veća u rizosferi biljaka u odnosu na zemljište.
- Sa lokacija rudnika mrkog uglja „Kakanj“ izolovano je više bakterijskih izolata i 7 izolata gljiva koje pripadaju rodovima *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. i *Mucor* sp.
- Dva izolata izolovana iz jalovine su identifikovana primenom biohemijskih API testova i molekularnim metodama. Izolat 13k identifikovan je sekvencioniranjem 16S rRNK gena na osnovu kog je klasifikovan u okviru roda *Bacillus*. Bakterijski izolat 19k je identifikovan sekvencioniranjem 16S rRNK gena i takođe je klasifikovan unutar roda *Bacillus*.
- Inokulacija supstrata čistim i mešanim populacijama *Bacillus* sp. 13k i mešanim populacijama *Bacillus* sp. 13k i *Bacillus* sp. 19k. uticala je na povećanje brojnosti mikrobnih populacija u supstratima u kojima su gajene salata, pšenica, ovas, slačica i tritikale.
- Inokulacija supstrata čistim kulturama bakterija i mešanim bakterijskim populacijama je uticala na povećanje stepena klijavosti kod salate, pšenice i tritikale pri sadržaju 25% jalovine, odnosno 50% kod tritikale.
- Rezultati mikrobiološke aktivnosti zemljišta i biljno-mikrobne interakcije na području rudnika mrkog uglja „Kakanj“ ukazuju na oporavak oštećenog ekosistema višedecenijskom eksploatacijom uglja. Ova istraživanja daju osnovu za primenu mikrobnih populacija i selekciju biljnih vrsta koje mogu značajno ubrzati procese ekoremedijacije i time doprineti procesima formiranja normalnog ekosistema na području rudnika mrkog uglja „Kakanj“.

LITERATURA

1. Acosta-Martinez, V., Tabatabai, M.A. (2000): Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and fertility of soils* 31: 85-91.
2. Adesemoye, A.O., Obini, M., Ugoji, E.O. (2008): Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Brazilian journal of microbiology* 39: 423-426.
3. Ahmetović, S. (2003): Stanje rekultivacije jalovine PK "Vrtlište" na području Općine Kakanj. Diplomski rad. Univerzitet u Sarajevu, Poljoprivredni fakultet, 1-17.
4. Alexander, M. (1977) : *Introduction to Soil Microbiology*. John Wiley and Sons, New York.
5. Alvarez, M.I., Sueldo, R.J., Barassi, C.A. (1996): Effect of *Azospirillum* on coleoptiles growth in wheat seedlings under water stress. *Cereal research communication* 24: 101-107.
6. Anderson, T.A., Guthrie, E.A., Walton, B.T. (1993): Bioremediation in the rhizosphere: plant roots and associated microbes clean contaminated soil. *Environmental science and technology* 27: 2630-2636.
7. Angers, D.A., Caron, J. (1998): Plant-induced changes in soil structure: Processes and feedbacks. *Biogeochemistry* 42: 55-72.
8. Alef, K., Nannipieri, P. (1995): *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, London.
9. Allen. E.B., Brown, J.S., Allen, M.F. (2001): Restoration of animal, plant, and microbial diversity. *Encyclopedia of biodiversity* 5: 185-202.
10. Aon, M.A., Colaneri, A.C. (2001): Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. *Applied soil ecology* 18: 255-270.
11. Ardakani, M.R., Pietsch, G., Moghaddam, A., Raza, A., Friedel, J.K. (2009): Response of root properties to tripartite symbiosis between lucerne (*Medicago sativa* L.), Rhizobia and Mycorrhiza under dry organic farming conditions. *American journal of agricultural and biological sciences* 4(4): 266-277.

12. Bai, X.G., Lu, L., Pei, Z.P., Fu, H. (2007): Ecological problems in China coal mining area and construction of environmental information system. International Conference "Waste Management, Environmental Geotechnology and Global Sustainable Development (ICWMEGGSD'07 - GzO'07)" Ljubljana, SLOVENIA, August 28. - 30., 2007.
13. Bandick, A.K., Dick, R.P. (1999): Field management effects on soil enzyme activities. *Soil biology and biochemistry* 31: 1471-1479.
14. Banerjee, M.R., Yasmin, L. (2002): Sulfur oxidizing rhizobacteria: an innovative environment friendly soil biotechnological tool for better canola production. *Proceeding of AGROENVIRON*. Cairo, Egypt, October 26-29 2002, 1-7.
15. Banning, N.C., Grant, C.D., Jones, D.L., Murphy, D.V. (2008): Recovery of soil organic matter, organic matter turnover and nitrogen cycling in a post-mining forest rehabilitation chronosequence. *Soil biology and biochemistry* 40: 2021-2031.
16. Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C. (2005): Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of experimental botany* 56: 1761-1778.
17. Barriuso, J., Solano, B.R., Lucas, J.A., Lobo, A.P., Villaraco, A.G., Manero, F..J.G. (2008): Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KgaA, weinheim, Edited by Ahmad, I., Pitchel, J., Hayat, S., 1-17.
18. Bashan, Y. (1998): Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology advances* 16(4): 729-770.
19. Barthram, G.T., Elston, D.A., Mullins, C.E. (2005): The physical resistance of grass patches to invasion. *Plant ecology* 176: 79-85.
20. Bartuszevige, A.M., Hrenko, R.L., Gorchov, D.L. (2007): Effects of leaf litter on establishment, growth and survival of invasive plant seedlings in a deciduous forest. *American midland naturalist* 158: 472-477.
21. Bašić, F., Butorac, A., Vidaček, Ž., Racz, Z., Ostojić, Z., Bertić, B. (1993): Program zaštite tala Hrvatske (prijedlog). Fond dokumentacije Državne uprave za zaštitu okoliša, Zagreb, 121 str.
22. Batten, K.M., Scow, K.M., Espeland, E.K. (2008): Soil microbial community associated with an invasive grass differentially impacts native plant performance. *Microbial ecology* 55: 220-228.

23. Beckage, B., Clark, J.S., Clinton, B.D., Haines, B.L. (2000): A long-term study of tree seedling recruitment in southern Appalachian forests: the effects of canopy gaps and shrub understoreys. *Canadian journal of forest research* 30: 1617-1631.
24. Bell, F.G., Bullock, S.E.T., Halbich, T.F.J., Lindsey, P. (2001): Environmental impacts associated with an abandoned mine in the Witbank Coalfield, South Africa. *International journal of coal geology* 45: 195-216.
25. Benefield, C.B., Howard, P.J.A., Howard, D.M. (1977): The estimation of dehydrogenase activity in soil. *Soil biology and biochemistry* 9: 67-70.
26. Berendse, F. (1998): Effects of dominant plant species on soils during succession in nutrient-poor ecosystems. *Biogeochemistry* 42: 73-88.
27. Berg, G., Smalla, K. (2009): Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS microbiology ecology* 68(1): 1-13.
28. Bernhardt-Romermann, M., Kirchner, M., Kudernatsch, T., Jakobi, G., Fischer A. (2006): Changed vegetation composition in coniferous forests near to motorways in southern Germany: The effects of traffic-born pollution. *Environmental pollution* 143: 572-581.
29. Bertović, L. (2010): Fitoakumulacija metala iz tla onečišćenog ugljikovodicima u kontroliranim uvjetima. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, 1-105.
30. Bonkowski, M., Villenave, C., Griffiths, B. (2009): Rhizosphere fauna: the functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. *Plant soil* 321: 213-233.
31. Bowles, M.L., Whelan, C.J. (eds) (1994): *Restoration of endangered species: conceptual issues, planning, and implementation*. Cambridge University Press, Cambridge.
32. Bradshaw, A. (2000): The use of natural processes in reclamation - advantages and difficulties. *Landscape and urban planning* 51: 89-100.
33. Braun-Blanquet, J. (1964): *Pflanzensoziologie, Grundzüge der Vegetationskunde*. (3. Auflage). Springer Verlag, Wien, 865 pages.
34. Bremner, J.M., Keeney, D.R. (1965): Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. *Analytica chimica acta* 32: 485-495.

35. Brimecombe, M.J., De Leij, F.A.A.M., Lynch, J.M. (2007): Rhizodeposition and microbial populations. In: R Pinton, Z Varanini, P Nannipieri (eds) *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, pp 73-109.
36. Brohon, B., Delolme, C., Gourdon, R. (2001): Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil biology and biochemistry* 33: 883-891.
37. Brookes, P.C. (1995): The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology fertility and soils* 19: 269-279.
38. Buee, M., De Boer, W., Martin, F., van Overbeek, L., Jurkevitch, E. (2009): The rhizosphere zoo: an overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant soil* 321: 189–212.
39. Burke, I.C., Lauenroth, W.K., Vinton, M.A., Hook, P.B., Kelly, R.H., Epstein, H.E., Aguiar, M.R., Robles, M.D., Aguilera, M.O., Murphy, K.L., Gill, R.A. (1998): Plant-soil interactions in temperate grasslands. *Biogeochemistry* 42: 121-143.
40. Burns, R.G. (1982): Enzyme activity in soil: location and possible role in microbial ecology. *Soil biology and biochemistry* 14: 423-427.
41. Caldwell, B.A. (2005) Enzymatic activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia* 49: 637-644.
42. Campbell, B.M., Lynam, T., Hatton J.C. (1990): Small-scale patterning in the recruitment of forest species during succession in tropical dry forest, Mozambique. *Vegetatio* 87: 51-57.
43. Carter, C.T., Ungar, I.A. (2002): Aboveground vegetation, seed bank and soil analysis of a 31-year-old forest restoration on coal mine spoil in southeastern Ohio. *American midland naturalist* 147: 44-59.
44. Casida, L.E. Jr, Klein, D.A., Santoro, T. (1964): Soil dehydrogenase activity. *Soil science* 98: 371-376.
45. Chakraborty, U., Chakraborty, B., Basnet, M. (2006): Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. *Journal of basic microbiology* 46(Suppl 3): 186-195.

46. Chadwick, M.J. (1973): Amendment trials of coal spoil in England. In: Ecology and reclamation of devastated land 2: 175-188. R.J. Hutnik and G. Davis (Eds). Gordon and Breach Science Publishers, Inc., New York, 81-91.
47. Chen, C.L., Liao, M., Huang, C.Y. (2005): Effect of combined pollution by heavy metals on soil enzymatic activities in areas polluted by tailing from Pb-Zn-Ag mine. *Journal of environmental sciences* 17(4): 637-640.
48. Cheng, S.P. (2003): Heavy metal pollution in China: origin, pattern and control. *Environment sciences and pollution research* 10(3): 192-198.
49. Chodak, M., Pietrzykowski, M., Niklinska, M. (2009): Development of microbial properties in a chronosequence of sandy mine soils. *Applied soil ecology* 41(3): 259-268.
50. Chowdhury, S.P., Schmid, M., Hartmann, A., Tripathi, A.K. (2009): Diversity of 16S-rRNA and nifH genes derived from rhizosphere soil and roots of an endemic drought tolerant grass, *Lasiurus sindicus*. *European journal of soil biology* 45: 114-122.
51. Coelho, M.R.R., de Vos, M., Carneiro, N.P., Marriel, I.E, Paiva, E., Seldin, L. (2008): Diversity of nifH gene pools in the rhizosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer. *FEMS microbiology letters* 279(1): 15-22.
52. Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Fujimoto, D., Mazzola, M., Banger, G., Kim, D.S. (1995): Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA* 92: 4197-4201.
53. Costigan, P.A., Bradshaw, A.D., Gemmill, R.P. (1981): The reclamation of acidic colliery spoils. Acid production potential. *Journal of applied ecology* 18: 865-878.
54. Coyne, M.S., Zhai, Q., Mackown, C.T., Barnhisel, R.I. (1998): Gross nitrogen transformation rates in soil at a surface coal mine site reclaimed for prime farmland use. *Soil biology and biochemistry* 30: 1099-1106.
55. Čustović, H., Žurovec, O., Dizdarević, Dž. (2012): Elaborat o zaštiti zemljišta na području Općine Kakanj. Poljoprivredno prehrambeni fakultet. Univerzitet u Sarajevu, 1-25.

56. Dancer, W.S., Handley, J.F., Bradshaw, A.D. (1977): Nitrogen accumulation in kaolin mining wastes in Cornwall. II. Forage legumes. *Plant and soil* 48: 303-314.
57. Das, A. C., Debnath, A. (2005): Effect of systemic herbicides on N₂-fixing and phosphate solubilizing microorganisms and relation to availability of nitrogen and phosphorus in paddy soils of West Bengal. *Chemosphere* 65: 211-217.
58. Das Gupta, S. (1999): Studies on vegetal and microbiological processes in coal mining affected areas. PhD thesis. North-eastern Hill University, Shillong, India.
59. Degens, B.P., Harris, J.A. (1997): Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil biology and biochemistry* 29: 1309-1320.
60. Dennis, P.G., Miller, A.J., Hirsch, P.R. (2010): Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS microbiology ecology* 72: 313-327.
61. Deslippe, J. R., Egger, K.N., Henry, G.H.R. (2005): Impacts of warming and fertilization on nitrogen-fixing microbial communities in the Canadian High Arctic. *FEMS microbiology ecology* 53: 41-50.
62. Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M., Chauhan, S.M. (2004): Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological research* 159: 371-394.
63. Dick, R.P. (1997): Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR (Eds.). *Biological indicators of soil health*, CAB International, Wellingford, pp. 121-156.
64. Dick, R.P., Breakwill, D., Turco, R. (1996): Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrating biological indicators. In: Doran, J.W., Jones, A.J. eds. *Handbook of Methods for Assessment of Soil Quality*. Madison, Soil Science Society America, 247-272.
65. Dick, W.A., Cheng, L., Wang, P. (2000): Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil biology and biochemistry* 32: 1915-1919.
66. Dilly, O., Bach, H.J., Buscor, F., Eschenbach, C., Kutsch, W.L., Middlehoff, U., Pritsch, K., Munch, J.C. (2000): Characteristics and energetic strategies of the rhizosphere in ecosystems of the Bornhoved Lake district. *Applied soil ecology* 15: 201-210.

67. Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J.F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S., Okon, Y. (2001): Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian journal of plant physiology* 28: 871-879.
68. Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. (2003): Plant growth-promoting effects on diazotrophs in the rhizosphere. *Critical reviews in plant sciences* 22: 107-149.
69. Dodgson, K.S., White, G., Fitzgerald, J.W. (1982): Sulphatase enzyme of microbial origin, Vol. I. CRC Press, Florida.
70. Dowarah, J., Deka Boruah, H.P., Gogoi, J., Pathak, N., Saikia, N., Handique, A.K. (2009): Eco-restoration of a high-sulphur coal mine overburden dumping site in northeast India: A case study. *Journal of earth system science* 118(5): 597-608.
71. Duc, L., Noll, M., Meier, B.E., Burgmann, H., Zeyer, J. (2009): High diversity of diazotrophs in the forefield of a receding alpine glacier. *Microbial ecology* 57: 179-190.
72. Đalović, I., Josic, D., Mrkovacki, N., Pivic, R., Bekavac, G., Purar, B., Jockovic, Đ. (2013): The competitiveness of *Azotobacter*, *Pseudomonas* and *Bacillus* applied as a mixture inoculum in rhizosphere of five maize genotypes assessed by genotyping and phenotyping methods. IV International Symposium „Agrosym 2013“, 382-386.
73. Đorđević-Miloradović, J., Đulaković, G. (1997): Rekultivacija i rekolonizacija prirodne vegetacije jalovišta i pepelišta u Kostolcu. IX kongres Jugoslovenskog društva za proučavanje zemljišta, Novi Sad, 23-27.06., 575-587.
74. Egner, H., Riehm, H., Domingo, W.R. (1960): Untersuchungen uber die chemische Bodenanalyse als Grundlage fur die Beurteilung des Nahrstoffzustandes der Boden, II: Chemische Extractionsmethoden zu Phosphorund Kaliumbestimmung. *Kungliga lantbrukshugskolans annaler* 26: 199-215.
75. Eivazi, F., Tabatabai, M.A. (1977): Phosphates in soils. *Soil biology and biochemistry* 9(3): 167-172.
76. El-Komy, H.M.A. (2005): Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. *Food technology and biotechnology* 43(1): 19-27.

77. Elsgaard, L., Andersen, G. H., Eriksen, J. (2002): Measurement of arylsulphatase activity in agricultural soils using a simplified assay. *Soil biology and biochemistry* 34: 79-82.
78. Emmerling, C., Liebner, C., Haubold-Rosar, M., Katur, J., Schroder, D. (2000): Impact of application of organic waste materials on microbial and enzyme activities of mine soils in the Lusatian coal mining region. *Plant and soil* 220: 129-138.
79. Emnova, E., Tate, R.L., Gimenez, D., Daraban, O., Budac, A. (2008): Impact of soybean seed inoculation with the levan-producing bacteria *Pseudomonas aureofaciens* on soil invertase and levansucrase activities under soil water stress and elevated copper level. *Universitatea de Științe agricole și medicină veterinară Iași* 51(1): 127-134.
80. Enkhtuya, B., Poschl, M., Vosatka, M. (2005): Native grass facilitates mycorrhizal colonisation and P uptake of tree seedlings in two anthropogenic substrates. *Water air and soil pollution* 166: 217-236.
81. Falk, D.A., Millar, C.I., Olwell, M. (eds) (1996): *Restoring diversity: strategies for reintroduction of endangered plants*. Island Press, Washington, DC.
82. Filip, Z. (2002) International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agriculture ecosystem and environment* 88: 169-174.
83. Finkenbein, P., Kretschmer, K., Kuka, K., Klotz, S., Heilmeier, H. (2013): Soil enzyme activities as bioindicators for substrate quality in revegetation of a subtropical coal mining dump. *Soil biology and biochemistry* 56: 87-89.
84. Fitzgerald, J.W. (1976): Sulphate ester formation and hydrolysis: a potentially important yet often ignored aspect of the sulphur cycle of aerobic soils. *Bacteriological reviews* 40: 628-721.
85. Flora europea database: Royal Botanic Garden Edinburgh. <http://rbgweb2.rbge.org.uk/FE/fe.html>
86. Ford, W.M., Odom, R.H., Hale, P.E., Chapman, B.R. (2000): Stand-age, stand characteristics, and landform effects on understory herbaceous communities in southern Appalachian cove-hardwoods. *Biological conservation* 93: 237-246.
87. Frankenberger, W.T. Jr, Dick, W.A. (1983): Relationship between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil science society of America journal* 47: 945-951.

88. Freitas, H., Prasad, M.N.V., Prtas, J. (2004): Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of Sao Domingos mine in the south east of Portugal: environmental implications. *Environment international* 30: 65-72.
89. Fresquez, P.R., Aldon, E.F., Sorensen, D.L. (1985): Microbial and soil enzyme activities in stockpiled topsoil and coal mine spoil material. *Proceedings of 2nd annual symposium of American Society for Surface Mining and Reclamation, Denver, CO, October 8-10, 340-345.*
90. Frouz, J., Elhottova, D., Pižl, V., Tajovsky, K., Šourkova, M., Picek, T., Maly, S., (2007): The effect of litter quality and soil faunal composition on organic matter dynamics in postmining soil: A laboratory study. *Applied soil ecology* 37: 72-80.
91. Fu, Y., Lin, C.C., Ma, J.J., Zhu, T.C. (2010): Effects of plant types on physico-chemical properties of reclaimed mining soil in inner Mongolia, China. *Chinese geographical science* 20(4): 309-317.
92. Ganeshamurthy, A.M., Singh, G., Singh, N.T. (1995): Sulphur status and response of rice to sulphur on some soils of Andaman and Nicobar Islands. *Journal of the Indian society of soil science* 43: 637-641.
93. Gao, Y., Zhou, P., Mao, L., Zhi, Y., Zhang, C., Shi, W. (2009) Effect of plant species coexistence on soil enzyme activities and soil microbial community structure under Cd and Pb combined pollution. *Journal of environmental sciences (China)* 22(7): 1040-1048.
94. Garcia, J.A.L., Probanza, A., Ramos, B., Palomino, M.R., Manero, F.J.G. (2004): Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronom sustainable development* 24(Suppl 4): 169-176.
95. Ghose, M.K. (2004): Effect of opencast mining on soil fertility. *Journal of scientific and industrial research*, 63: 1006-1009.
96. Glick, B.R. (2001): Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology advances* 21(3): 83-393.
97. Glick, B.R., Pasternak, J.J. (2003): Plant growth promoting bacteria. In: Glick, B.R., Pasternak, J.J. (eds). *Molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA*, 3rd edn. ASM Press, Washington, 436-454.

98. Gonzales, J. M., Mayer, F., Moran, M. A., Hodson, R. E., Whitman, W. B. (1997): *Sagittula stellata* gen. nov., sp. nov., a lignin-transforming bacterium from a coastal environment. *International journal of systematic bacteriology* 47 (3): 773-780.
99. Grant, C.D. (2003): Post-burn vegetation development of rehabilitated bauxite mines in western Australia. *Forest ecology and management* 186: 147-157.
100. Grime, J.P. (1979): *Plant Strategies and Vegetation Processes*. John Wiley & Sons, Chichester.
101. Groffman, P.M., McDowell, W.H., Myers, J.C., Merriam, J.L. (2001): Soil microbial biomass and activity in tropical riparian forests. *Soil biology and biochemistry*, 33: 1339-1348.
102. Guo, D.G., Bai, Z.G., Shangguan, T.L., Shao, H.B., Qiu, W. (2011): Impacts of coal mining on the aboveground vegetation and soil quality: a case study of Qinxin coal mine in Shanxi province, China. *Clean - soil air water* 39(3): 219-225.
103. Guo, J.H., Qi, H.Y., Guo, Y.H., Ge, H.L., Gong, L.Y., Zhang, L.X. (2004): Biocontrol of tomato wilt by plant growth promoting rhizobacteria. *Biological control* 29: 66-72.
104. Gürtler, V., Stanisich, V. A. (1996): New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 65: 5409-5420.
105. Harris, J.A. (2003): Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration. *European journal of soil sciences*, 54: 801-808.
106. Harris, J.A., Birch, P. (1989): Soil microbial activity in opencast coal mine restorations. *Soil use and management* 5: 155-160.
107. Harris, J.A., Birch, P., Short, K.C. (1989): Changes in the microbial community and physico-chemical characteristics of topsoils stockpiled during opencast mining. *Soil use and management* 5: 161-168.
108. Harris, J.A., Birch, P., Short, K.C. (1993): Changes in the microbial community during the construction and subsequent storage of soil stockpiles: a strategist theory interpretation. *Restoration ecology* 1: 88-100.
109. Hart, P.B.S., West, A.W., Kings, J.A., Watts, H.M., Howe, J.C. (1999): Land restoration management after topsoil mining and implications for restoration policy guidelines in New Zealand. *Land degradation and development* 10: 435-453.

110. Hartmann, A., Schmid, M., van Tuinen, D., Berg, G. (2009): Plant-driven selection of microbes. *Plant soil* 321: 235-257.
111. Helingerova, M., Frouz, J., Šantručkova, H. (2010): Microbial activity in reclaimed and unreclaimed post-mining sites near Sokolov (Czech Republic), *Ecological engineering* 36: 768-776.
112. Hill W., Pickering, C.M. (2006): Vegetation associated with different walking track types in the Kosciusko alpine area, Australia. *Journal of environmental management* 78: 24-34.
113. Hiltner, L. (1904): Über neue erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie. *Arbeiten der Deutschen landwirtschaft gesellschaft* 98: 59-78.
114. Hobbie, S.E., Ogdahl, M., Chorover, J., Chadwick, O.A., Oleksyn, J., Zytowskiak, R., Reich, P.B. (2007): Tree species effects on soil organic matter dynamics: The role of soil cation composition. *Ecosystems* 10: 999-1018.
115. Hodačova, D., Prach, K. (2003): Spoil heaps from brown coal mining: Technical reclamation versus spontaneous revegetation. *Restoration ecology* 11: 385-391.
116. Hoffman, S., Shultz, E., Csitari, G., Banko, L. (2006): Influence of mineral and organic fertilizers on soil organic carbon pools. *Archives of agronomy and soil science* 6: 627-635.
117. Holdaway, R.J., Sparrow, A.D. (2006): Assembly rules operating along a primary riverbedgrassland successional sequence. *Journal of ecology* 94: 1092-1102.
118. Hoorman, J.J. (2011): The role of soil fungus. *Agriculture and natural resources, SAG-14-11*. The Ohio State University, 1-6.
119. Horvat, M., Nolde, N., Fajon, V., Jereb, V. (2003): Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted areas in the province Guizhou, China. *Science of the total environment* 304, 231-256.
120. Hryniewicz K, Baum C. (2012): The potential of rhizosphere microorganisms to promote the plant growth in disturbed soils. In: Malik A, Grohmann E, editors. *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development. Strategies for Sustainability*: Springer Netherlands: 35-64.
121. Hu, S., van Bruggen, A. H. C., Grunwald, N. J. (1999): Dynamics of bacterial populations in relation to carbon availability in a residue-amended soil. *Applied soil ecology* 13: 21-30.

122. Husen, E. (2003): Screening of soil bacteria for plant growth promoting activities in vitro. Indonesian journal of agricultural sciences 4: 27-31.
123. Insam, H., Domsch, K.H. (1988): Relationship between soil organic carbon and microbial biomass chronosequences of reclamation sites. Microbial ecology 15: 177-188.
124. Insam, H., Haselwandter, K. (1989): Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession. Oecologia 79: 174-178.
125. Jarak, M., Djukic, D., Djuric, S., Stevovic, V., Djalovic, I. (2004): The activation of microbiological processes in soil with the aim of increasing the yield of forage legumes. Acta agriculture serbica 9(17): 221-228.
126. Jarak, M., Đurić, S. (2008): Mikroorganizmi u zemljištu u funkciji održive poljoprivrede. In: M. Manojlović (ed.), Đubrenje u održivoj poljoprivredi. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Srbija, 98-117.
127. Jarak, M., Protić, R., Janković, S., Čolo, J. (2006): Response of wheat to Azotobacter – actinomyces inoculation and nitrogen fertilizers. Romanian agricultural research 23: 37-41.
128. Jasper, D.A., Abbott, L.K., Robson, A.D. (1989): Soil disturbance reduces the infectivity of external hyphae of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. The new phytologist 112: 93-99.
129. Jezierska-Tys, S., Frac, M. (2005): Changes in enzymatic activity and the number of proteolytic microorganisms in brown soil under the influence of organic fertilization and cultivation of spring wheat. Polish journal of soil science 38: 68-81.
130. Jing, Y., He, Z., Yang, X. (2007): Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. Journal of Zhejiang University science B 8:192-207.
131. Johansen, J.E., Binnerup, S.J. (2002): Contribution of Cytophaga-like bacteria to the potential of turnover of carbon, nitrogen, and phosphorus by bacteria in the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.). Microbial ecology 43: 298-306.
132. Johnson, D.B., Williamson, J.C. (1994): Conservation of mineral nitrogen in restored soils at opencast coal mine sites: 1. Results from field studies of nitrogen

- transformations following restoration. *European journal of soil science* 45: 311-317.
133. Jones, D.L., Nguyen, C., Finlay, R.D. (2009): Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface. *Plant soil* 321: 5-33.
134. Jordan, D., Kremer, R.J., Bergfield, W.A., Kim, K.Y., Cacio, V.N. (1995): Evaluation of microbial methods as potential indicators of soil quality in historical agricultural fields. *Biology fertility and soils* 19: 297-302.
135. Josifović, M. (1970-1980): *Flora SR Srbije*. Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd.
136. Jung, M.C., Thornton, I. (1997): Environmental contamination and seasonal variation of metals in soils, plants and waters in the paddy fields around a Pb-Zn mine in Korea. *Science of the total environment* 198: 105-121.
137. Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A.B. (2007): *Trace Elements from Soil to Human*. 4th Ed. p. 548. Springer.
138. Kastovska, K., Elster, J., Stibal, M., Santruckova, H. (2005): Microbial assemblages in soil microbial succession after glacial retreat in Svalbard (high Arctic). *Microbial ecology* 50: 396-407.
139. Kaye, J.P., Hart, S.P. (1998a): Ecological restoration alters nitrogen transformations in a Ponderosa Pine–Bunchgrass ecosystem. *Ecological applications* 8: 1052-1060.
140. Kaye, J.P., Hart, S.C. (1998b): Restoration and canopy-type effects on soil respiration in a ponderosa pine–bunchgrass ecosystem. *Soil science society of America journal* 62: 1062-1072.
141. Kennedy, I.R., Choudhury, A.I.M.A., Kecskes, 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(8): 1229-1244.
142. Kennedy, T.A., Naeem, S., Howe, K.M., Knops, J.M.H., Tilman, D., Reich, P. (2002): Biodiversity as a barrier to ecological invasion. *Nature* 417: 636-638.
143. Kertesz, M.A., Mirleau, P. (2004): The role of soil microbes in plant sulphur nutrition. *Journal of experimental botany* 55(404): 1939-1945.

144. Khan, A. G. (2005): Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of trace elements in medicine and biology* 18: 355-364.
145. Khosla, B., Reddy, M.S. (2008): Response of ectomycorrhizal fungi on the growth and mineral nutrition of eucalyptus seedlings in bauxite mined soil. *American-Eurasian journal of agricultural and environmental sciences* 3(1): 123-128.
146. Kizilkaya, R., Dengiz, O. (2010): Variation of land use and land cover effects on some soil physico-chemical characteristics and soil enzyme activity. *Zemdirbyste-Agriculture* 97(2): 15-24.
147. Klose, S., Moore, J.M., Tabatabai, M.A. (1999): Arylsulfatase activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. *Biology and fertility of soils* 29: 46-54.
148. Kokalis-Burelle, N., Kloepper, J.W., Reddy, M.S. (2006): Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied soil ecology* 31(1-2): 91-100.
149. Kokalis-Bourelle, N., Vavrina, E.N., Roskopf, E.N., Shelby, R.A. (2002): Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in florida. *Plant soil* 238: 257-266.
150. Kristufek, V., Elhottova, D., Chronakova, A., Dostalkova, I., Picek, T., Kalcik, J. (2005): Growth strategy of heterotrophic bacterial population along successional sequence on spoil of brown coal colliery substrate. *Folia microbiologica* 50: 427-435.
151. Kucharski, J., Wyszowska, J. (2004): Interrelationship between number of microorganisms or spring barley yield and degree of soil contamination with copper. *Plant soil and environment* 50: 243-249.
152. Kujur, M., Patel, A.K. (2012): Comparative Assessment of Microbial Biomass and Soil Enzyme Activities as Potential Indicators of Soil Quality in Different Mine Spoil, Odisha. *Journal of environment* 01 (02): 64-74.
153. Kundu, N.K., Ghose, M.K. (1997): Soil profile Characteristic in Rajmahal Coalfield area. *Indian journal of soil and water conservation* 25(1), 28-32.

154. Leps, J., Dolezal, J., Bezemer, T.M., Brown, V.K., Hedlund, K., Igual, A.M., Jorgensen, H.B., Lawson, C.S., Mortimer, S.R., Peix Geldart, A., Rodriguez Barrueco, C., Santa Regina, I., Smilauer, P., van der Putten, W.H. (2007): Long-term effectiveness of sowing high and low diversity seed mixtures to enhance plant community development on ex-arable fields. *Applied vegetation science* 10: 97-110.
155. Leuschner, Ch., Rode, M.W. (1999): The role of plant resources in forest succession: changes in radiation, water and nutrient fluxes, and plant productivity over a 300-yr-long chronosequence in NW-Germany. *Perspect. Plant ecology evolution and systematics* 2 (1): 103-147.
156. Li, J., Ovakin, D.H., Charles, T.C., Glick, B.R. (2000): An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no longer promotes root elongation. *Current microbiology* 41: 101-105.
157. Lindsay, W.L., Norvell, W.A. (1978): Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil science society of America journal* 42: 421-428.
158. Lohmus, K., Truu, J., Truu, M., Kaar, E., Ostonen, I., Alama, S., Kuznetsova, T., Rosenvald, K., Vares, A., Uri, V., Mander, U. (2006): Black alder as a promising deciduous species for the reclaiming of oil shale mining areas. In: Brebbia, C.A., Mander, U. (Eds.), *Brownfields III, Prevention, Assessment, Rehabilitation and Development of Brownfield Sites*. WIT Transactions on Ecology and Environment, vol. 94. WIT Press Southampton, Boston, 87-97.
159. Lorenz, N., Hintemann, T., Kramarrewa, T., Katayama, A., Yasuta, T., Marchner, P. (2006): Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long term arsenic and cadmium exposure. *Soil biology and biochemistry* 38: 1430-1437.
160. Lucas, G.J.A., Probanza, A., Ramos, B., Colon Flores, J.J., Gutierrez Manero, F.J., (2004): Effect on plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) on biological nitrogen fixation, nodulation and growth of *Lupinus albus* I. cv. Mulolupa. *Engineering in life sciences* 7: 1-77.
161. Lukesova, A. (2001): Soil algae in brown coal and lignite post-mining areas in Central Europe (Czech Republic and Germany). *Restoration ecology* 9: 341-350.
162. Lynch, J.M. (1990a): *The Rhizosphere*. John Wiley & Sons, New York.

163. Lynch, J.M. (1990b): Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. In JM Lynch (ed) *The rhizosphere*. John Wiley and Sons, Chichester, UK, p 1
164. Lyngdoh, T. (1995): Community dynamics and edaphic changes in relation to coal mining in Jaintia Hills, Meghalaya. PhD thesis, North-eastern Hill University, Shillong, India.
165. Machulla, G., Bruns, M.A., Scow, K.M. (2005): Microbial properties of mine spoil materials in the initial stages of soil development. *Soil science society of America journal*, 69: 1069-1077.
166. MacDougall, A.S., Wilson, S.D., Bakker, J.D. (2008): Climatic variability alters the outcome of long-term community assembly. *Journal of ecology* 96: 346-354.
167. Macrae, A., Lucon, C.M.M., Rimmer, D.L., O'Donnell, A.G. (2001): Sampling DNA from the rhizosphere of *Brassica napus* to investigate rhizobacterial community structure. *Plant and soil* 233: 223-230.
168. Maharana, J.K., Patel, A.K. (2013): Microbial communities and enzyme kinetics used as index of reclamation in a chronosequence coal mine overburden spoil. *International journal of pharma and bio sciences* 4(4): 1171-1186.
169. Mano, H., Morisaki, H. (2008): Endophytic Bacteria in the Rice Plant. *Microbes and environments* 23: 109-117.
170. Marilley, L., Aragno, M. (1999): Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Applied soil ecology* 13: 127-136.
171. Marques, M.J., Bienes, R., Perez-Rodríguez, R., Jimenez, L. (2008): Soil degradation in central Spain due to sheet water erosion by low intensity rainfall events. *Earth surface processes and landforms* 33(3): 414-423.
172. Martinez, C.E., Tabatabai, M.A. (1997): Decomposition of biotechnology byproducts in soils. *Journal of environmental quality* 26: 625-632.
173. Martinez-Ruiz, C., Fernandez-Santos, B. (2005): Natural revegetation on topsoiled mining-spoils according to the exposure. *Acta oecologica* 28: 231-238.
174. Martinez-Ruiz, C., Marrs, R. (2007): Some factors affecting successional change on uranium mine wastes: Insights for ecological restoration. *Applied vegetation science* 10: 333-342.

175. Martinović, J. (1997): Tloznanstvo u zaštiti okoliša. Državna uprava za zaštitu okoliša, Zagreb, 288 str.
176. McCullough, M., Utkhede, R., Menzies, J.G., Punja, Z.K., Paulits, T.C. (1996): Evaluation of plant growth promoting rhizobacteria for biological control of *Pythium* root rot of cucumbers grown in rockwool and effects on yield. *European journal of plant pathology* 102: 747-755.
177. Meeting, F.B. (1992): *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker, New York.
178. Meier, A., Bratton, S.P., Duffy, D.C. (1995): Possible ecological mechanisms for loss of vernal-herb diversity in logged eastern deciduous forests. *Ecological applications* 5: 935-946.
179. Meiners, S.J. (2007): Native and exotic plants species exhibit similar population dynamics during succession. *Ecology* 88: 1098-1104.
180. Meiners, S.J., Cadenasso, M.L., Pickett, S.T.A. (2004): Beyond biodiversity: Individualistic controls of invasion in a self-assembled community. *Ecology letters* 7: 121-126.
181. Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J.M. (2013): The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews* 37: 634-663.
182. Merila, P., Smolander, A., Strommer, R. (2002): Soil nitrogen transformations along a primary succession transect on the land-uplift coast in Western Finland. *Soil biology and biochemistry* 34: 373-385.
183. Meyer, J.B., Lutz M.P., Frapolli, M., Pechy-Tarr, M., Rochat, L., Keel, C., Defago, G., Maurhofer, M. (2010): Interplay between wheat cultivars, biocontrol pseudomonads, and soil. *Applied and environmental microbiology* 76: 6196-6204.
184. Miletić, Z., Radulović, Z. (2005): Biogenost organske prostirke različitih šumskih cultura na deposolima REIK "Kolubara". *Šumarstvo* 4: 11-20.
185. Mitchell, R.J., Marrs, R.H., Le Duc, M.G., Auld, M.H.D. (1997): A study of succession on lowland heaths in Dorset, southern England: Changes in vegetation and soil chemical properties. *Journal of applied ecology* 34: 1426-1444.

186. Moore, T.R., Zimmermann, R.C. (1977): Establishment of vegetation on serpentine asbestos mine waste, south eastern Quebec, Canada. *Journal of applied ecology* 14: 589-599.
187. Moreno-de las Heras, M., Nicolau, J.M., Espigares, T. (2008): Vegetation succession in reclaimed coal-mining slopes in a Mediterranean-dry environment. *Ecological engineering* 34 (2): 168-178.
188. Morgan, J.A.W., Bending, G.D., White, P.J. (2005): Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of experimental botany* 56(417): 1729-1739.
189. Motorina, N.P., Vasiljeva, T.I., Iževskaja, N.A., Novikova, Savič, A.I. (1980): Formiranje ekosistem v procese estetsvenoga vostanovljenja tehnogenih landsaftov i pri ih rekuljtivacij. 7. međunarodnij simpozium i rekuljtivacija landsaftov, narušenih promišljenaj dejateljnostju. Katowice, Tom 1, 193-209.
190. Mrkovački, N., Jarak, M., Đalović, I., Jocković Đ. (2012): Značaj i efekat primene PGPR na mikrobiološku aktivnost u rizosferi kukuruza. *Ratarstvo i povrtarstvo* 49(3): 335-344.
191. Nannipieri, P., Grego, S., Ceccanti, B. (1990): Ecological significance of the biological activity in soil. *Soil biochemistry* 6: 293-355.
192. Nemergut, D.R., Anderson, S.P., Cleveland, C.C., Martin, A.P., Miller, A.E., Seimon, A., Schmidt, S.K. (2007): Microbial community succession in an unvegetated, recently deglaciated soil. *Microbial ecology* 53: 110-122.
193. Ohtonen, R., Fritze, H., Pennanen, T., Jumpponen, A., Trappe, J. (1999): Ecosystem properties and microbial community changes in primary succession on a glacier forefront. *Oecologia* 119: 239-246.
194. Okon, Y., Itzigshon, R. (1995): The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. *Biotechnology advances* 13: 415-424.
195. Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., Sahin, F. (2006): Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci Hort- Amsterdam* 111(suppl 1): 38-43.
196. Pal, K.K., Tilak, K.V.B.R., Saxena, A.K., Dey, R., Singh, C.S. (2001): Suppression of maize root caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and

- Fusarium germinarum* by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiological research 156: 209-223.
197. Patten, C.L., Glick, B.R. (2002): Role of *Pseudomonas putida* indole-acetic acid in development of the host plant root system. Applied and environmental microbiology 68: 3795-3801.
198. Paul, E.A., Clark, E.F. (1989): Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, Inc. San Diego, California.
199. Pedraza, R., Motok, J., Tortora, M., Salazar, S., Diaz-Ricci, J. (2007): Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. Plant and soil 295: 169-178.
200. Perotto, S., Bonfante, P. (1997): Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. Trends in microbiology 5: 496-501.
201. Peper, I.L., Gerba, C.P., Brendencke, J.W. (1995): Environmental Microbiology. Acad. Press, San Diego, 11-33.
202. Pitchel, J.R., Hayes, J.M. (1990): Influence of fly ash on soil microbial activity and populations. Journal of environmental quality 19: 593-597.
203. Prach, K., Pysek, P., Jarosik, V. (2007): Climate and pH as determinants of vegetation succession in Central-European man-made habitats. Journal of vegetation science 18: 701-710.
204. Prasad, R. (1989): Removal of forest cover through mining and technology for retrieval. Proceedings of National seminar on depletion of soil and forest cover. Journal of tropical forestry 5: 109-116.
205. Prasanna, R., Joshi, M., Rana, A., Singh Shivay, Y., Nain, L. (2011): Influence of co-inoculation of bacteria-cyanobacteria on crop yield and C-N sequestration in soil under rice crop. World journal of microbiology and biotechnology, DOI 10.1007/s11274-011-0926-9.
206. Preston, G.M. (2004): Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. Philosophical transactions of the royal society of London, Series B, biological sciences 359: 907-918.
207. Probanza, A., Lucas Garcia, J.A., Ruiz Palomino, M., Ramos, B., Gutierrez Manero, F.J. (2002): *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere

- structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105), *Applied soil ecology* 20(2): 75-84.
208. Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moenne-Loccoz, Y. (2009): The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant soil* 321: 341–361.
209. Rahman, Đ. (2004): Stanje zemljišnog potencijala na području Općine Kakanj i mjere zaštite. Diplomski rad. Univerzitet u Sarajevu, Poljoprivredni fakultet, 1-28.
210. Rautengarten, A.M., Schnoor, J.L., Anderberg, S., Olendrzynski, K., Stigliani, W.M. (2004): Soil sensitivity due to acid and heavy metal deposition in East Central Europe. *Water, air and soil pollution* 85(2): 737-742.
211. Reddy, M.S., Rahe, J.E. (1989): Growth effects associated with seed bacterization not correlated with populations of *Bacillus subtilis* inoculant in onion seedling rhizospheres. *Soil biology and biochemistry* 21: 373-378.
212. Revillas, J.J., Rodelas, B., Pozo, C., Martinez-Toledo, M.V., Gonzales, L.J. (2000): Production of B-group vitamins by two *Azotobacter* strains with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic and adiazotrophic conditions. *Journal of applied microbiology* 189: 486-493.
213. Richardson, J.A. (1975): Physical problems of growing plants on colliery wastes. In: Chadwick, M.J. and Goodman, G.T. (Eds). *Ecology of resource degradation and renewal*. Blackwell Scientific Publication. Oxford, England, 275-285.
214. Richardson, A.E. (2001): Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian journal of plant physiology* 28: 897-906.
215. Richardson, J.A., Shelton, B.K., Dicker, R.J. (1971): Botanical studies of natural and planted vegetation of colliery spoil heaps. *Landscape reclamation*. IPC press, Guildford, Surrey 1: 84-99.
216. Richardson, A.E., Barea, J.M., McNeill, A.M., Prigent-Combaret, C. (2009): Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant soil* 321: 305-339.

217. Riffaldi, R., Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Cardelli, R. (2002): Biochemical properties of a Mediterranean soil as affected by long-term crop management systems. *Soil tillage and research* 67: 109-114.
218. Robinson, G.R., Handel, S.N. (2000): Directing spatial patterns of recruitment during an experimental urban woodland reclamation. *Ecological applications* 10: 174-188.
219. Rodriguez, R.R., Martins, S.V., Barros, L.C. (2004): Tropical rain forest regeneration in an area degraded by mining in Mato Grosso state, Brasil. *Forest ecology and management* 190: 323-333.
220. Rosenvald, K., Kuznetsova, T., Ostonen, I., Truu, M., Truu, J., Uri, V., Lohmus, K. (2011): Rhizosphere effect and fine-root morphological adaptations in a chronosequence of silver birch stands on reclaimed oil shale post-mining areas. *Ecological engineering* 37: 1027-1034.
221. Ruzek, L., Vorisek, K., Sixta, J. (2001): Microbial biomass-C in reclaimed soil of the Rhineland (Germany) and the north Bohemian lignite mining areas (Czech republic): measured and predicted values. *Restoration ecology* 9: 370-377.
222. Salisbury, F.B. (1994): The role of plant hormones. In: Wilkinson RE (ed) *Plant–environment interactions*. Marcel Dekker, New York, USA, pp 39-81.
223. Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. (2004): *Introduction to food-acid airborne fungi*. Seventh edition.
224. Sandeep, C., Venkat Raman, R., Radhika, M., Thejas, M.S., Sanjeev, P., Tejaswini, G., Suresh, C.K., Mulla, S.R. (2011): Effect of inoculation of *Bacillus megaterium* isolates on growth, biomass and nutrient content of Peppermint. *Journal of phytology* 3(11): 19-24.
225. Saravanakumar, D., Lavanya, N., Muthumeena, B., Raguchander, T., Suresh, S., Samiyappan, R. (2008): *Pseudomonas fluorescens* enhances resistance and natural enemy population in rice plants against leaf folder pest. *Journal of applied entomology* 132(6): 469-479.
226. Sarma, K. (2002): Coal mining and its impact on environment on Nokrek Biosphere Reserve, Meghalaya. PhD thesis, North-eastern Hill University, Shillong, India.

227. Sarma, K. (2005): Impact of coal mining on vegetation: a case study in Jaintia hills district of Meghalaya, India. International institute for geo-information science and earth observation enschede (The Netherlands) and Indian institute of remote sensing, national remote sensing agency (NRSA), Department of space, Dehradun, India, 1-85.
228. Saxena, S.K. (1979): Degradation of vegetation in the surface mined area of western Rajasthan. In: Wali, M.K. (Eds). Ecology and coal resource development. Pergamon press, New York, 626-633.
229. Schafer, W.M., Nielsenand, G.A., Nettleton, W.D. (1980): Mine spoil genesis and morphology I a spoil chronosequence in Montana. Soil science society of American journal 44: 802-807.
230. Schipper, L.A., Degens, B.P., Sparling, G.P., Duncan, L.C. (2001): Changes in microbial heterotrophic diversity along five plant successional sequences. Soil biology and biochemistry 33: 2093-2103.
231. Schmidt, G., Laskowski, Sr M. (1961): Phosphate ester cleavage (Survey). In: Boyer PD, Lardy H, Myrback K (eds). The enzymes, 2nd edn. Academic Press, New York, pp. 3-35.
232. Schmidt, S.K., Reed, S.C., Nemergut, D.R., Grandy, A.S., Cleveland, C.C., Weintraub, M.N., Hill, A.W., Costello, E.K., Meyer, A.F., Neff, J.C., Martin, A.M. (2008): The earliest stages of ecosystem succession in high-elevation (5000 metres above sea level), recently deglaciated soils. Proceedings of the royal society B – biological sciences 275: 2793-2802.
233. Schoenholtz, S.H., Van Miegroet, H., Burger, J.A. (2000): A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality: challenges and opportunities. Forest ecology and management 138: 335-356.
234. Seong, C.N., Choi, J.H., Baik, K.S. (2001): An improved selective isolation of rare actinomycetes from forest soil. The journal of microbiology 39(1): 17-23.
235. Sierra, S., Rodelas, B., Martinez-Toledo, M.V., Pozo, C., Gonzalez-Lopez, J. (1999): Production of B-group vitamins by two *Rhizobium* strains in chemically defined media. Journal of applied microbiology 86: 851-858.
236. Simakov, V.N. (1957): The use of phenylthranilic acid in the determination of humus by Tyurins method. Pochvovedenie 8: 72-73.

237. Singh, K.P., Mandal, T.N., Tripahi, S.K. (2001): Patterns of restoration of soil physico-chemical properties and microbial biomass in different landslide sites in the sal forest ecosystem of Nepal Himalaya. *Ecological engineering* 17: 385-401.
238. Singh, J.S., Raghubanshi, A.S., Singh, R.S., Srivastava, S.C. (1989): Microbial biomass acts as a source of plant nutrient in dry tropical forest and savanna. *Nature* 338: 499-500.
239. Singh, B., Rengel, Z. (2007): The role of crop residues. In: P. Marschner, Z. Rengel (Eds), *Improving soil fertility in nutrient cycling in terrestrial ecosystem soil biology* 10: 183-214.
240. Sisa, R. (1993): Enzymova aktivita pudy jako ukazateljeji biologicke aktivity. *Rostlinna vyroba* 39: 817-825.
241. Siwik-Ziomek, A., Koper, J. (2010): Changes in the content of sulphate sulphur and arylsulphatase activity in soil under potato caused by fertilization. *J. elementol* 15(1): 171-176.
242. Skujins, J. (1976): *Extracellular enzymes in soil*. CRC. Critical reviews in microbiology 4, 383-421.
243. Smejkalova, M., Mikanova, O., Boruka, L. (2003): Effects of heavy metal concentrations on biological activity of soil microorganisms. *Plant soil environment* 49(7): 321-326.
244. Smith, L.J., Papendick, R.I. (1993): Soil organic matter dynamics and crop residue management. In: Metting, B. ed. *Soil Microbial Ecology*. New York, Marcel Dekker.
245. Soares, R.A., Roesch, L.F.W., Zanatta, G., de Oliveira Camargo, F.A., Passaglia, L.M.P. (2006): Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. *Applied soil ecology* 33(3): 221-234.
246. Society for Ecological Restoration (2002): *The SER Primer on Ecological Restoration*. <http://www.ser.org/>.
247. Somers, E., Vanderleyden, J., Srinivasan, M. (2004): Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Critical reviews in microbiology* 30: 205-240.

248. Speir, T.V., Kettles, H.A., Parshotam, A., Searle, P.L., Vlaar, L.N.C. (1995): A simple kinetic approach to derive the ecological dose value ED 50, for the assessment of Cr (VI) toxicity to soil biological properties. *Soil biology and biochemistry* 27: 801-811.
249. Speir, T.W., Ross, D.J. (1978): Soil phosphatase and sulphatase. In: Burns RG (Ed.). *Soil Enzymes*, pp. 197-250, Academic Press, London, UK, 380.
250. Štajner, D., Kevrešan, S., Gašić, O., Mimica-Dukić, N., Zongli, H. (1997): Nitrogen and *Azotobacter chroococcum* enhance oxidative stress tolerance in sugar beet. *Biologia plantarum* 39: 441-445.
251. Stamenov, D. (2013): Karakterizacija mikroorganizama promotora rasta i njihovo preživljavanje u rizosferi engleskog ljulja. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu.
252. Stamenov, D., Jarak, M. (2012): Effect of microbial inoculants on the yield of english ryegrass, and number and diversity of rhizospheric microorganisms. Book of the proceedings of the Forth Joint UNS - PSU Conference "Step in the Future", 417-430.
253. Stamenov, D., Jarak, M., Đurić, S., Andjelković, S., Hajnal-Jafari, T. (2011): The effect of *Trichoderma asperellum* on the yield and number of microorganisms in the rhizosphere of english ryegrass. Proceedings (Currently on the CD) of 7. Th Balkan congress of microbiology, 25-29.10.2011., Beograd.
254. Stamenov, D., Jarak, M., Đurić, S., Hajnal-Jafari, T. (2012): Microbial inoculation effect on the Yield of English Ryegrass and Number of Rhizosperic Microorganisms, In Press, Plant, Soil and Environment, Czech Academy of Agricultural Sciences, Czech Republic.
255. Stanton-Kennedy, T.S. (2008): Soil and vegetation change on a coal mine 15 years after reclamation in the Aspen parkland of Alberta. Master thesis. University of Guelph, 1-102.
256. Stohlgren, T.J., Binkley, D., Chong, G.W., Kalkhan, M.A., Schell, L.D., Bull, K.A., Otsuki, Y., Newman, G., Bashkin, M., Son, Y. (1999): Exotic plant species invade hot spots of native plant diversity. *Ecological monographs* 69: 25-46.

257. Strachan, G., Capel, S., Maciel, H., Porter, A.J.R., Paton, G.I. (2002): Application of cellular and immunological biosensor techniques to assess herbicide toxicity in soils. *European journal of soil science* 53: 37-44.
258. Tabatabai, M.A. (1994): Soil enzymes. In: *Methods of Soil Analysis. Part 2 – Microbiological and biochemical properties*. SSSA Book Series No 5 Soil Science Society of America Inc. Madison WI, 775-833.
259. 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(10): 2731-2739.
260. Tan, Z., Hurek, T., Reinhold-Hurek, B. (2003): Effect of N fertilization, plant genotype and environmental conditions on nifH gene pools in roots of rice. *Environmental microbiology* 5(10): 1009-1015.
261. Tarkka, M., Schrey, S., Hampp, R. (2008): Plant associated micro-organisms. In: Nautiyal CS, Dion P (eds) *Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence*. Springer, New York, pp 3–51.
262. Taylor, J.P., Wilson, B., Mills, M.S., Burns, R.G. (2002): Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil biology and biochemistry* 34: 387-401.
263. Tropek, R., Kadlec, T., Karešova, P., Spitzer, L., Kočárek, P., Malenovsky, P., Banar, P., Tuf, I.H., Hejda, M., Konvička, M. (2010): Spontaneous succession in limestone quarries as an effective restoration tool for endangered arthropods and plants. *Journal of applied ecology* 47: 139-147.
264. Tscherko, D., Hammesfahr, U., Zeltner, G., Kandeler, E., Bocker, R. (2005): Plant succession and rhizosphere microbial communities in a recently deglaciated alpine terrain. *Basic and applied ecology* 6: 367-383.
265. Tyler, G. (1981): Heavy metals in soil biology and biochemistry. In: *Soil Biochem. Vol. 5* (Paul EA, Ladd JN Eds), pp. 371-414. Dekker, New York.
266. Urbanova, M., Kopecky, J., Valaskova, V., Sagova-Mareckova, M., Elhottova, D., Kyselkova, M., Moenne-Loccoz, Y., Baldrian, P. (2011): Development of bacterial community during spontaneous succession on spoil heaps after brown coal mining. *FEMS microbiology ecology* 78: 59-69.

267. U.S. EPA. Method 3050 (1986). In: Test Methods for Evaluating Solid Waste, 3rd ed., IA. Washington, D.C., U.S. Environ. Prot. Agency.
268. Van Breemen, N., Finzi, A.C. (1998): Plant-soil interactions: Ecological aspects and evolutionary implications. *Biogeochemistry* 42:1-19.
269. Vance, N.C., Entry, J.A. (2000): Soil properties important to the restoration of Shasta red fir barrens in the Siskiyou Mountains. *Forest ecology and management* 138: 427-434.
270. van der Lelie, D. (1998): Biological interactions: the role of soil bacteria in the bioremediation of heavy metal polluted soils. In: Vangronsveld, J., Cunningham, S.D. (eds), *Metal contaminated soils: in situ inactivation and phytoremediation*. Springer, RG Landes, Ney York, 31-50.
271. Vessey, J.K. (2003): Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant soil* 255: 571-586.
272. Vidali, M. (2001): Bioremediation: An overview. *Pure applied chemistry* 73(7): 1163-1172.
273. Vong, P.C., Dedourge, O., Guckert, A. (2004): Immobilization and mobilization of labelled sulphur in relation to soil arylsulphatase activity in rhizosphere soil of field-grown rape, barley and fallow. *Plant and soil* 258: 227-239.
274. Vong, P.C., Dedourge, O., Lasserre-Joulin, F., Guckert, A. (2003): Immobilized-S, microbial biomass-S and soil arylsulphatase activity in the rhizosphere soil of rape and barley as affected by labile substrate C and N additions. *Soil biology and biochemistry* 35: 1651-1661.
275. Walker, L.R., Bellingham, P.J., Peltzer, D.A. (2006): Plant characteristics are poor predictors of microsite colonization during the first two years of primary succession. *Journal of vegetation science* 17: 397-406.
276. Walker, C., Goodyear C., Anderson, D., Titball, R.W. (2000): Identification of arsenic resistant bacteria in the soil of a former munitions factory at Locknitz, Germany. *Land contamination and reclamation* 8: 13-18.
277. Walker, R.F., McLaughlin, S.B., West, D.C. (2004): Establishment of sweet birch on surface mine spoil as influenced by mycorrhizal inoculation and fertility. *Restoration ecology* 12: 8-19.

278. Wang, X.W., Zhong, N.N., Hu, D.M., Liu, Z.Z., Zhang, Z.H. (2009): Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) pollutants in groundwater from coal gangue stack area: characteristics and origin. *Water science and technology* 59 (5): 1043-1051.
279. Whiting, S.N., de Souza, M.P., Terry, N. (2001): Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environmental science and technology* 35: 3144-3150.
280. Wiegleb, G., Felink, B. (2001): Primary succession in post-burning landscape of Lower Lusatia-chance of necessity. *Ecological engineering* 17: 199-217.
281. Wielgosz, E., Szember, A. (2006): Occurrence of natural complexes of soil microorganisms in near-root zone of plants used designing house garden. *Annales UMCS, Sec. E* 61: 75-92.
282. Wolna-Maruwka, A., Niewiadomska, A., Klama, J. (2009): Biological activity of grey-brown podzolic soil organically fertilized for maize cultivation in monoculture. *Polish journal of environmental studies* 18(5): 931-939.
283. Wolna-Maruwka, A., Schroeter-Zakrzewska, A., Borowiak, K., Niewiadomska, A. (2012): Impact of microbiological inoculum on numbers and activity of microorganisms in peat substrate and on growth and flowering of scarlet sage. *Polish journal of environmental studies* 21(6): 1881-1891.
284. Yang, C.H., Crowley, D.E., Menge, J.A. (2001): 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots. *FEMS microbiology ecology* 35: 129-136.
285. Yang, Z.X., Liu, S.Q., Zheng, D.W., Feng, S.D. (2006): Effect of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. *Journal of environmental sciences* 18(6): 1135-1141.
286. Yin, B., Crowley, D., Sparovek, G., De Melo, W.J., Borneman, J. (2000): Bacterial functional redundancy along a soil reclamation gradient. *Applied and environmental microbiology* 66: 4361-4365.
287. Zahir, A.Z., Arshad, M., Frankenberger W.T. Jr (2004): Plant growth promoting rhizobacteria: application and perspectives in agriculture. *Advances in agronomy* 81: 97-168.
288. Zhang, M.K., Liu, Z.Y., Wang, H. (2010): Use of single extraction methods to predict bioavailability of heavy metals in polluted soils to rice. *Communications in soil science and plant analysis* 41(7): 820-831.

289. Zhao, Z.Q., Shahrour, I., Bai, Z.K., Fan, W.X., Feng, L.R., Li, H.F. (2013): Soils development in opencast coal mine spoils reclaimed for 1-13 years in the West-Northern Loess Plateau of China. *European journal of soil biology* 55: 40-46.
290. Zhuang, X.L., Chen, J., Shim, H., Bai, Z. (2007): New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment international* 33: 406-413.
291. http://www.fao.org/gtos/tems/variable_show.jsp?VARIABLE_ID=11

BIOGRAFIJA AUTORA

Saud Hamidović rođen je 03.05.1967. godine u Novom Pazaru. Osnovnu i srednju školu završio je u Sjenici. Poljoprivredno-prehrambeni fakultet u Sarajevu, smer ratarstvo, upisao je školske 1987/88 godine, a diplomirao 1992. godine. Temu doktorske disertacije pod nazivom „Mikrobiološka aktivnost oštećenih zemljišta na lokacijama rudnika mrkog uglja i biljno mikrobne interakcije u procesima ekoremedijacije“ prijavio je 2011. godine na naučnoj oblasti Melioracije zemljišta, katedra za ekološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu.

Od maja 2004. godine bio je zapošljen u Holding kompaniji „Vojin Popović“ u Novom Pazaru u matično selekcijskoj službi. Od 05.03.20107. godine zaposlen je na Poljoprivredno-prehrambenom fakultetu u Sarajevu, kao asistent na predmetu Mikrobiologija.

U periodu 2010-2011. godine kao saradnik na projektu, učestvovao je na istraživanjima na projektu „Ekonomika primarne poljoprivredne proizvodnje i mjere agrarne politike u Federaciji BiH“ koji je finansiralo Federalno ministarstvo poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva, Sarajevo.

U dosadašnjem istraživačkom radu, dipl.inž. Saud Hamidović, bavio se ispitivanjem mikrobnog i biljnog diverziteta i njihove interakcije u ekoremedijacionim tehnologijama na području rudnika mrkog uglja “Kakanj”. Poseban aspekt istraživačke aktivnosti dipl.inž. Sauda Hamidovića, odnosi se na primjenu selekcionisanih populacija na popravci narušenih ekosistema na lokacijama rudnika mrkog uglja u BiH. Preduzete aktivnosti bi doprinele održivom korišćenju zemljišta, koje je prihvaćeno u evropskoj politici u okviru tematskih strategija (Soil Thematic Strategy)

Do sada je objavio sam, ili u saradnji sa drugim autorima 8 naučnih radova.

Govori nemački jezik.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а: Сауд Хамидовић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 08/6

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Микробиолошка активност оштећених земљишта на локацијама рудника
мрког угља и биљно микробне интеракције у процесима екоремедијације

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

У Београду, март 2014.

Потпис докторанда

Saud Hamidovic'

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторске дисертације**

Име и презиме аутора Сауд Хамидовић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 08/6

Студијски програм Мелиорације земљишта

Наслов докторске дисертације Микробиолошка активност оштећених
земљишта на локацијама рудника мрког угља и
биљно микробне интеракције у процесима
екоремедијације

Ментор Доц. др Блажо Лалевић

Потписани/а Сауд Хамидовић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета** у Београду.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, март 2014.

Saud Hamidovic'

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Микробиолошка активност оштећених земљишта на локацијама рудника
мрког угља и биљно микробне интеракције у процесима екоремедијације

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на крају).

У Београду, март 2014.

Потпис докторанда

Saud Hamidovic'