

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Danka S. Radić

**BIODIVERZITET KVASACA U
ZEMLJIŠTU I NJIHOV ZNAČAJ U
ODRŽIVOJ POLJOPRIVREDI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Danka S. Radić

**BIODIVERSITY OF SOIL YEASTS AND
THEIR IMPORTANCE IN SUSTAINABLE
AGRICULTURE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

POLJOPRIVREDNI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU

Mentor:

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

Članovi komisije:

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

Dr Miroslav Vrvić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

Dr Miomir Nikšić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Dr Vera Pavlović, docent
Univerzitet u Beogradu, Mašinski fakultet

Datum odbrane:

Istraživanja u okviru disertacije su finansirana iz sredstava projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije "Biodiverzitet kao potencijal u ekoremedijacionim tehnologijama oštećenih ekosistema", TR 31080.

Želela bih da izrazim veliku zahvalnost svom mentoru prof. dr Veri Raičević na podršci, razumevanju i motivaciji, ali i na velikoj slobodi koju mi je pružila u eksperimentalnom radu. Veliko hvala i za sve sugestije, dobronamerne savete i detaljne ispravke koje su doprinele unapređenju ove teze.

Zahvalnost dugujem i prof. dr Blaži Laleviću za korisne diskusije koje su mi pomogle u rešavanju mnogih dilema, na pomoći i savetima, kao i na trudu, vremenu i strpljenju od samog početka izrade teze.

dr Veri Pavlović, docentu na Katedri za fiziku i elektrotehniku Mašinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu zahvaljujem se na velikoj i stručnoj pomoći pri obradi i tumačenju Raman spektara.

Zahvaljujem se i prof. dr Miroslavu Vrviću i prof. dr Miomiru Nikšiću na korisnim savetima i sugestijama tokom izrade i pisanja ove teze.

Veliko hvala i mojim kolegama sa Katedre za ekološku mikrobiologiju na pomoći, savetima i podršci.

Takođe, posebnu zahvalnost dugujem kolegama: Nemanji Mirkoviću za pomoć prilikom rada i tumačenju rezultata vezanih za DGGE metod; Jeleni Đorđević na prijateljstvu i korisnim savetima iz oblasti hemije i biohemije; Dejanu Laziću za pruženu pomoć u vezi sa molekularnom identifikacijom i rešavanja svih problema iz oblasti genetike; Stevi Leviću na savetima i pomoći pri radu na Raman mikroskopu; sestrinskoj Katedri za tehnološku mikrobiologiju i laboratoriji Abiotech Univerziteta Educons na velikoj pomoći u eksperimentalnom radu, ali i na prijateljstvu i razumevanju.

Sve ovo je bilo mnogo lakše uz podršku dragih prijatelja koji su mi pružili nesebičnu podršku. Neizmerno hvala Jeleni i Veri na iskrenosti i pomoći, a posebno na strpljenju, podršci i razumevanju za sve moje uspone i padove.

A najveću zahvalnost dugujem mojim roditeljima i sestri na bezuslovnoj ljubavi, podršci i motivaciji svih ovih godina.

Autor

BIODIVERZITET KVASACA U ZEMLJIŠTU I NJIHOV ZNAČAJ U ODRŽIVOJ POLJOPRIVREDI

REZIME

Metode konvencionalne proizvodnje koje se primenjuju u savremenoj poljoprivrednoj proizvodnji, dovele su do narušavanja stabilnosti prirodnih i agroekosistema. Nekontrolisana upotreba pesticida, mineralnih đubriva i drugih sintetičkih hemijskih jedinjenja, predstavljaju opasnost po zdravlje ljudi i okoline. Diverzitet zemljišnih mikroorganizama je od ključnog značaja za održavanje stabilnosti i produktivnosti u ekosistema zbog njihove uloge u procesima transformacije organske materije, uklanjanja toksičnih jedinjenja, formiranja i održavanja strukture zemljišta, stimulacije rasta biljaka, i drugih značajnih uloga. Opštem mikrobnom diverzitetu u zemljištu doprinose i kvasci, jednoćelijski eukariotni mikroorganizmi.

Cilj istraživanja je bio stvaranje kolekcije kvasaca iz različitih zemljišta i ispitivanje njihove praktične primene u održivoj poljoprivredi. Za ispitivanje mikrobnog diverziteta zemljišta korišćene su standardne mikrobiološke i molekularna PCR-DGGE metoda.

Izolacija kvasaca je izvršena metodom nakupljanja. Dobijeno je jedanaest izolata koji su okarakterisani i identifikovani na osnovu morfoloških, odgajivačkih, ekoloških, biohemijskih i enzimskih karakteristika. Molekularna identifikacija izolata je izvršena umnožavanjem i sekvencioniranjem D1/D2 regiona i poređenjem dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka. Izolati kvasaca su identifikovani do nivoa vrste i to četiri izolata kao *Candida tropicalis* (2TD2912B, 3TD0905L, 4TD1101S i Avin1312L), četiri izolata kao *Cyberlindnera saturnus* (CK2404I, 1KD1983V, 2KD3007J i Cvin1610M) i preostala tri kao *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D) *Hanseniaspora uvarum* (EK1605T) i *Rhodotorula mucilaginosa* (SK0809R). Dodatna karakterizacija kvasaca koji pripadaju različitim rodovima je određena pomoću Raman spektroskopije.

U cilju ispitivanja mogućnosti primene kvasaca kao stimulatora biljnog rasta (PGP) je određena produkcija indol sirćetne kiseline (IAA), transformacija azotnih jedinjenja i solubilizacija fosfata. Najveća sposobnost solubilizacije fosfora utvrđena je kod izolata *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D), stvaranje nitrata kod *Rhodotorula mucilaginosa* (SK0809R), a produkcija indol sirćetne kiseline kod izolata *Candida*

tropicalis (3TD0905L). Antagonizam prema fitopatogenim gljivama *Pythium aphanidermatum* i *Botrytis cinerea* je utvrđen primenom dvojnih kultura. Visok procenat antagonizma prema *Botrytis cinerea* su ispoljila dva izolata *Candida tropicalis* (3TD0905L i Avin1312L). Na osnovu rezultata odnosno produkcije IAA, rastvorljivosti fosfata i transformacije azotnih jedinjenja, izabrana su četiri izolata za ispitivanje njihovog uticaja na rast biljaka. Uticaj izabranih izolata na slačicu (*Sinapi salba* L.), crvenu detelinu (*Trifolium pretense* L.), suncokret (*Helianthus annuus* L.), pšenicu (*Triticum vulgare* L.) i zelenu salatu (*Lactuca sativa*) praćen je u kontrolisanim uslovima, a dobijeni rezultati potvrđuju napred ispitivana PGP svojstva *in vivo*. Sposobnost izolata kvasaca u bioakumulaciji bakra ispitana je metodom optičke emisije spektrometrije sa indukovanom spregnutom plazmom (ICP-OES). Najveći procenat bioakumulacije bakra je utvrđen kod *Candida tropicalis* (4TD1101S). Analizom spektra dobijenog Raman spektroskopijom, uočeno je prisustvo CuS i/ili Cu₂-_{xs} (0<x<1) mineralnog kompleksa, kao i indukovana sinteza metalotioneina u vidu Cu-tioneina uz porast udela cistinog sadržaja. Zapažene su i izvesne promene u Raman pikovima nukleobaza i aromatičnih aminokiselina, što je odraz specifičnog odgovora date vrste kvasca na stres.

Rezultati disertacije ukazuju na potencijal zemljišnih izolata kvasaca za primenu u održivoj poljoprivredi i bioremedijaciji oštećenih ekosistema i na taj način kvasci postaju moćan alat u različitim oblastima biotehnologije. Takođe, razjašnjenje pojedinih mehanizama unutar ćelija kvasaca ukazuju da ova istraživanja mogu doprineti razjašnjenju nekih fundamentalnih procesa u ćelijama eukariotnih mikroorganizama.

Ključne reči: kvasci, biodiverzitet, Raman spektroskopija, stimulacija rasta biljaka, bioakumulacija Cu, održiva poljoprivreda.

Naučna oblast: Mikrobiologija

Uža naučna oblast: Ekološka mikrobiologija

UDK: 631.466: 631.95 (043.3)

BIODIVERSITY OF SOIL YEASTS AND THEIR IMPORTANCE IN SUSTAINABLE AGRICULTURE

ABSTRACT

Conventional agriculture, which has been applied in modern food production has severely affected ecosystem's stability. Improper use of pesticides, herbicides, mineral fertilizers, as well as other synthetic compounds, represents a serious threat for the human kind and nature. The diversity of soil microorganisms is crucial for maintaining stability and productivity of the ecosystem. Soil microorganisms play an important role in the processes of transformation of organic matter, removal of toxic compounds, the formation and maintenance of soil structure, stimulation of plant growth, etc. Yeasts belong to unicellular soil microorganisms group that play a significant role in the ecosystem and contribute to the general biodiversity. The aim of this thesis was to create the collection of yeast strains that originate from the different soil types and testing their potential for the application in sustainable agriculture. Standard microbiological and molecular PCR-DGGE method are used to examine the microbial diversity of soil.

Yeasts strains have been isolated by the accumulation method. Finally, eleven isolates were characterized and identified based on morphological, cultivation, ecology, biochemical, and enzyme characteristics. Molecular identification was based on multiplication and D1/D2 region sequencing. The obtained sequences have been compared with those from GenBank basis. Yeasts isolates were identified up to the species level: four isolates were *Candida tropicalis* (2TD2912B, 3TD0905L, 4TD1101S i Avin1312L), four isolates were *Cyberlindnera saturnus* (CK2404I, 1KD1983V, 2KD3007J i Cvin1610M) and the last three were *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D), *Hanseniaspora uvarum* (EK1605T) and *Rhodotorula mucilaginosa* (SK0809R). Additional characterization was performed with the Raman spectroscopy.

Several assays were applied in order to estimate the yeasts potential in plant growth promoting (PGP): indole acetic acid production (IAA), transformation of nitrogen compounds and phosphate solubilisation. The most efficient in matter of solubilisation of phosphate was *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D), while *Rhodotorula*

mucilaginosa (SK0809R) has the highest potential in the nitrate production. The production of indole acetic acid has been the most pronounced in *Candida tropicalis* strain (3TD0905L). Antagonism against phytopathogenic fungi, *Pythium aphanidermatum* and *Botrytis cinerea*, was accessed by dual culture method. Two strains of *Candida tropicalis* (3TD0905L i Avin1312L) showed high percentage of antagonism toward *Botrytis cinerea*.

Based on its ability to produce IAA, to solubilise phosphate and to transform nitrogen compounds, four isolates were selected and their ability to affect the plant growth has been studied. Several plant species were selected: mustard (*Sinapis alba* L.), red clover (*Trifolium pretense* L.), sunflower (*Helianthus annuus* L.), wheat (*Triticum vulgare* L.), and lettuce (*Lactuca sativa*). This experiment confirmed the PGP ability *in vivo*.

Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES) was applied in order to examine the ability of the selected yeasts strains to absorb copper. The highest percentage of copper bioaccumulation exhibited *Candida tropicalis* (4TD1101S).

Raman spectrum of Cu-treated yeast has shown the creation of CuS or Cu_{2-x}S ($0 < x < 1$) mineral complex, as well as the induced metallothionein synthesis in the form of Cu-thioneine and the increase of cystine content. On the basis of the Raman spectra, changes in the peaks of nucleobases and aromatic amino acids have been determined, which represent a specific response of the yeast species to the stress conditions.

The results of this thesis show that soil yeasts have promising potential in sustainable agriculture as well as in bioremediation of impaired ecosystems. In this way, yeasts become a powerful tool in different areas of biotechnology. Also, the understanding of some mechanisms into the yeast cells, suggest that this research may contribute to the of some fundamental processes in cells of eukaryotic microorganisms.

Key words: yeasts, biodiversity, Raman spectroscopy, plant growth promoting, bioaccumulation of Cu, sustainable agriculture

Scientific field: Microbiology

Scientific discipline: Microbial ecology

UDK: 631.466: 631.95 (043.3)

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. PREGLED LITERATURE | 3 |
| 2.1. Biodiverzitet kvasaca u zemljištu..... | 4 |
| 2.2. Zemljišni kvasci u održivoj poljoprivredi i bioremedijaciji oštećenih zemljišta..... | 9 |
| 2.2.1. Kvasci kao potencijal u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji..... | 10 |
| 2.2.2. Uloga kvasaca u solubilizaciji fosfata u zemljištu | 12 |
| 2.2.3. Uloga kvasaca u transformaciji azotnih jedinjenja u zemljištu | 14 |
| 2.2.4. Antagonizam kvasaca prema fitopatogenim gljivama | 15 |
| 2.2.5. Bioremedijacioni potencijal kvasaca..... | 16 |
| 2.3. Savremene metode karakterizacije kvasaca u zemljištu..... | 19 |
| 2.3.1. Karakterizacija kvasaca Raman spektroskopijom..... | 21 |
| 3. CILJ RADA | 24 |
| 4. MATERIJAL I METODE..... | 26 |
| 4.1. Mikrobiološka karakterizacija zemljišta | 26 |
| 4.1.1. Ispitivanje diverziteta mikroorganizama DGGE metodom | 28 |
| 4.2. Izolacija kvasaca iz zemljišta | 30 |
| 4.3. Identifikacija i karakterizacija kvasaca | 30 |
| 4.3.1. Određivanje morfoloških karakteristika..... | 31 |
| 4.3.2. Određivanje odgajivačkih karakteristika..... | 31 |
| 4.3.3. Određivanje ekoloških karakteristika | 32 |
| 4.3.4. Biohemijska karakterizacija izolata..... | 33 |
| 4.3.5. Molekularna identifikacija | 33 |
| 4.3.6. Enzimska karakterizacija izolata..... | 36 |
| 4.3.7. Priprema uzoraka kvasaca za snimanje na Ramanu | 36 |
| 4.4. Direktni mehanizmi stimulacije biljnog rasta | 36 |
| 4.4.1. Produkcija indol-sirćetne kiseline (IAA) | 37 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.4.2. | Solubilizacija fosfata | 38 |
| 4.4.3. | Transformacija azotnih jedinjenja | 40 |
| 4.5. | Antifungalna aktivnost izolata | 41 |
| 4.6. | Uticaj odabranih izolata na rast biljaka | 41 |
| 4.7. | Kvasci i bioakumulacija bakra | 43 |
| 4.8. | Statistička obrada rezultata..... | 44 |
| 5. | REZULTATI I DISKUSIJA | 45 |
| 5.1. | Mikrobiološka karakterizacija zemljišta | 45 |
| 5.1.1. | Određivanje biodiverziteta kvasaca i gljiva PCR-DGGE metodom | 49 |
| 5.2. | Izolacija kvasaca iz zemljišta | 51 |
| 5.3. | Identifikacija i karakterizacija kvasaca iz zemljišta | 53 |
| 5.3.1. | Morfološke, odgajivačke i ekološke karakteristike izolata kvasaca..... | 53 |
| 5.3.2. | Rast izolata pri različitim temperaturama | 59 |
| 5.3.3. | Rast izolata pri različitim pH vrednostima | 60 |
| 5.3.4. | Rast izolata pri različitim koncentracijama natrijum-hlorida | 61 |
| 5.3.5. | Interakcija izolata kvasaca imikroorganizama | 63 |
| 5.4. | Biohemijska karakterizacija i identifikacija izolata kvasaca..... | 67 |
| 5.4.1. | Molekularna identifikacija izolata..... | 71 |
| 5.4.2. | Enzimska karakterizacija izolata kvasaca | 77 |
| 5.4.3. | Karakterizacija izolata kvasaca Raman spektroskopijom | 80 |
| 5.5. | Direktni mehanizmi stimulacije biljnog rasta | 91 |
| 5.5.1. | Uticaj izolata kvasaca na solubilizaciju fosfata..... | 93 |
| 5.5.2. | Uloga izolata kvasaca u transformacija azotnih jedinjenja | 98 |
| 5.6. | Antagonizam kvasaca prema fitopatogenim gljivama | 104 |
| 5.7. | Efekti inokulacije semena biljaka izolatima kvasaca | 109 |
| 5.7.1. | Inokulacija crvene deteline (<i>Trifolium pratense</i> L.) sa izolatima kvasaca | 111 |
| 5.7.2. | Inokulacija pšenice (<i>Triticum vulgare</i> L.) sa izolatima kvasaca | 113 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 5.7.3. | Inokulacija suncokreta (<i>Helianthus annuus</i> L.) sa izolatima kvasaca..... | 115 |
| 5.7.4. | Inokulacija slačice (<i>Sinapis alba</i> L.) sa izolatima kvasaca | 117 |
| 5.7.5. | Inokulacija zelene salate (<i>Lactuca sativa</i> L.) sa izolatima kvasaca | 118 |
| 5.8. | Bioremedijacioni potencijal kvasaca..... | 120 |
| 5.8.1. | Sposobnost izolata kvasaca u bioakumulaciji bakra | 121 |
| 6. | ZAKLJUČAK | 129 |
| 7. | LITERATURA..... | 134 |

1. UVOD

Industrijalizacija, konvencionalna poljoprivredna proizvodnja i nekontrolisana eksploatacija prirodnih resursa dovele su do narušavanja ravnoteže u životnoj sredini. Od početka 60-ih godina XX veka, značajno se povećala poljoprivredna proizvodnja, kao i potrošnja hrane na svetskom nivou (Hajduković, 2010). Zbog povećanja potreba za proizvodnjom hrane, šire se poljoprivredne površine, intenzivira proizvodnja i povećava upotreba sredstava za zaštitu, primena agrotehničkih mera i mineralnih đubriva na bazi azota (N), fosfora (P) i kalijuma (K), a sve u cilju većih prinosa i bolje otpornosti. Primena ovakvog načina proizvodnje ima za posledicu degradaciju resursa (zemljište, voda i vazduh), koji imaju ograničenu sposobnost obnavljanja. Kako bi se smanjili negativni uticaji na životnu sredinu i zdravlje ljudi neophodno je redukovati upotrebu hemikalija, a favorizovati poljoprivredne tehnike i mere koje optimalno koriste prirodne resurse.

Za održavanje stabilnosti i produktivnosti agro-ekosistema od ključnog značaja su mikroorganizmi, zbog njihove uloge u procesima razlaganja organske materije, kruženja azota, fosfora, ugljenika i sumpora, formiranja strukture zemljišta, uklanjanja toksičnih jedinjenja, suzbijanja biljnih bolesti, stimulaciji rasta biljaka i proizvodnji obnovljivih izvora energije.

U zemljištu su prisutni i kvasci, jednoćelijski eukariotni mikroorganizmi, koji se sistematski svrstavaju u gljive i značajno doprinose opštem biodiverzitetu. Značajan potencijal u održivoj poljoprivredi predstavljaju mikroorganizmi stimulatori biljnog rasta, koji mogu biti veoma važna komponenta u ostvarivanju povećanja kvaliteta i kvantiteta prinosa useva. Kvasci stupaju u interakciju sa biljkama u zoni rizosfere i direktno ili indirektno stimulišu rast korena, povećavajući dostupnost hranljivih materija. Takođe, imaju sposobnost da sintetišu indol sirćetnu kiselinu, poliamine, gibbereline i antimikrobna jedinjenja.

Među esencijalnim makronutrijentima neophodnih za biološki rast i razvoj biljaka je i fosfor. U zemljištu se kao i većina esencijalnih hranljivih materija nalazi u nerastvornom obliku, nedostupan biljkama. Jedan od načina da se ovaj problem reši je primena fosfatnih đubriva, koja su dosta skupa i često se neracionalno koriste. Zbog toga postoji potreba za alternativnim rešenjem, kao što su fosfosolubilizirajući

mikroorganizmi, među kojima su i zemljišni kvasci, koji imaju važnu ulogu u prevođenju nerastvorljivih oblika fosfora u rastvorljiv i na taj način omogućavaju održivo korišćenje fosfatnih đubriva, ali i očuvanje zdravlja zemljišta.

Tehnologije kojima se sve više teži, kada je u pitanju zaštita bilja su primena agrotehničkih mera, bioloških produkata i antagonističkih organizama, uvođenje kompetitorskih vrsta, superparazita ili predatora. Kada su u pitanju kvasci, njihove antagonističke karakteristike mogu se pripisati različitim mehanizmima, kojima se na efikasan i bezbedan način kontrolišu biljne bolesti i štetočine.

Najveći broj istraživanja o kvascima rađena su *in vitro* u kontrolisanim uslovima i u odsustvu velikog broja faktora, koji mogu da utiču na metabolizam kvasaca, kada se oni nalaze u njihovom prirodnom staništu. Zbog toga je neophodno upoznavanje mehanizama transformacije i produkcije mnogih bioloških važnih jedinjenja *in situ*, kao i faktora koji utiču na ove procese, radi boljeg razumevanja uloge kvasaca u agro-ekosistemima i mogućnosti za njihovu uspešnu primenu u održivoj poljoprivredi.

2. PREGLED LITERATURE

Brojna istraživanja u svetu, u protekle dve decenije, ukazuju da je funkcionisanje ekosistema direktno zavisno od biodiverziteta, ali su znanja o biodiverzitetu u zemljištu još uvek ograničena (Peter et al., 2011; Delgado-Baquerizo et al., 2016). Mikrobne zajednice se odlikuju multifunkcionalnošću, odnosno obavljaju istovremeno brojne i ključne ekosistemске funkcije i usluge, uključujući kruženje nutrijenata, primarnu proizvodnju, razlaganje organske materije i regulaciju klime (Bodelier, 2011; Bardgett i Van der Putten, 2014; Delgado-Baquerizo et al., 2016). Očuvanje ekosistemskog diverziteta na Zemlji, produktivnost biljaka i kruženje nutrijenata spada u najvažnije uslove za očuvanje i upravljanje u prirodnim, ali i agroekosistemima (Wardle et al., 2004). Stoga će se gubitak mikrobnog biodiverziteta, koji nastaje kao posledica promena u životnoj sredini, kao što su korišćenje zemljišta i globalne klimatske promene, odraziti na kapacitet mikroorganizama u obavljanju osnovnih ekosistemskih funkcija (Tedersoo et al., 2014).

Značajna komponenta mikrobnog diverziteta u zemljištu su gljive, koje kao heterotrofni organizmi daju podršku ključnim procesima u kopnenim ekosistemima. Zbog sinteze različitih enzimskih sistema, one su uključene u mnoga kruženja nutrijenata, čime se osiguravaju važne ekosistemске usluge, kao što je mobilizacija i promet nutrijenata, ali i razlaganje složenih organskih jedinjenja, uključujući i toksične molekule. Gljive su neophodne u zemljišnim ekosistemima, jer su jedini organizmi sposobni da transformišu lignin. Na taj način, gljive osiguravaju ishranu velikog broja različitih heterotrofnih organizama. U principu, gljive koje žive u zemljištu mogu se svrstati u dve funkcionalne grupe: filamentozne višecelijske gljive i uglavnom, jednoćelijske kvasce. Obe se mogu naći u grupama *Asco-* i *Basidiomycota*. Kvasci predstavljaju važne komponente mnogih ekosistemima i značajno doprinose opštem biodiverzitetu, ali se pretpostavlja da je opisano samo oko 5 % kvasaca koji postoje u prirodi (Deak, 2009). U prirodi se nalaze u zemljištu i vodenim sredinama, ali i asocijaciji sa biljkama ili insektima, beskičmenjacima i ribama u veoma različitim ekološkim nišama.

Kvasci uglavnom imaju ekonomski značaj u mikrobnjoj biotehnologiji, poljoprivredi i medicini. Zbog toga je otkrivanje novih sojeva, ili čak vrsta i njihova identifikacija veoma značajna. Posebno treba istaći, da je zemljište veliki rezervoar brojnih vrsta kvasaca (Wuczkowski i Prillinger, 2004), koji potencijalno mogu imati ekonomski

značaj. Ako se prihvati, da je procenat poznatih vrsta kvasaca samo 5 % od ukupnog broja koji nastanjuju Zemlju, a da je zemljište veliki rezervoar ovih mikroorganizama, onda postoji veliki prostor za traženje novih vrsta, koje se mogu iskoristiti u održivoj poljoprivredi.

2.1. Biodiverzitet kvasaca u zemljištu

Zemljište predstavlja složen i dinamičan biološki sistem u kome brojne mikrobne populacije doprinose biodiverzitetu. Diverzitet je važan i neodvojiv deo svakog ekosistema i ima ulogu u održavanju strukture i funkcija ekosistema. Mikroorganizmi su od ključnog značaja za održavanje funkcije zemljišta u prirodnim i agroekosistemima, zbog uloge u procesima formiranja strukture zemljišta, razlaganja organske materije, uklanjanja toksičnih jedinjenja, kruženja ugljenika, azota, fosfora i sumpora (Van Elsas et al., 2006).

Važna komponenta mikrobnog diverziteta u zemljištu su i gljive, uključujući i kvasce. Tipični zemljišni kvasci pripadaju rodovima: *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Lindnera*, *Lipomyces*, *Rhodotorula* i *Schizoblastosporion* (Vaz et al., 2011). Vrste kvasca, koje pripadaju rodovima *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Lipomyces* i *Schizoblastosporion* izolovane su iz različitih tipova zemljišta, što ukazuje da je zemljište ekološka niša za ove kvasce (Phaff i Starmer, 1987). Sposobnost autohtonih zemljišnih kvasaca da opstanu u zemljištu, objašnjava se brojnim mehanizmima adaptacije. Na primer, većina ovih kvasaca poseduje širok spektar metaboličkih aktivnosti koje im omogućavaju da asimiliraju hidrolitičke proizvode biljnog materijala, koji nastaje nakon aktivnosti plesni i prokariota. Takođe, *Lipomyces* i *Williopsis saturnus* stvaraju otporne spore, dok neki poput *Lipomyces*, *Cryptococcus* i *Rhodotorula* proizvode egzopolimerne kapsule, koje im omogućavaju bolje preživljavanje u staništima, koja su siromašna dostupnim hranljivim materijama.

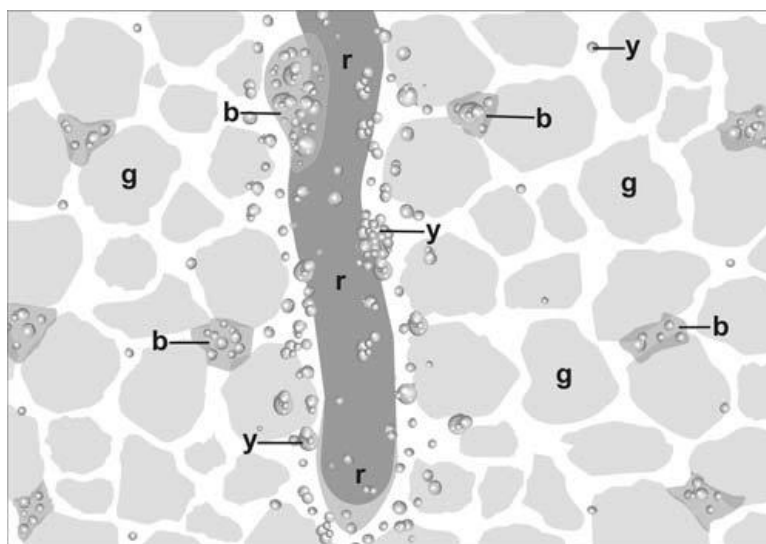
Osnovna karakteristika zemljišta kao staništa je ogromna prostorna i vremenska heterogenost u pogledu fizičko-hemijskih karakteristika, uključujući dostupnost hranljivih materija i vode, veličine pora, temperatura itd. To rezultira i heterogenošću u brojnosti mikroorganizama, kao i biološkim procesima, koji igraju ključnu ulogu u funkcionisanju ekosistema. Istraživanja su pokazala da postoji neujednačena distribucija

mikrobne biomase u zemljištu, uključujući i kvasce, što najverovatnije odražava ekološku heterogenost tipičnu za živi svet u zemljištu (Frey, 2007).

Prisustvo kvasca u zemljištu zavisi od mnogo faktora, npr. tipa zemljišta, padavina, klime, odnosno od brojnih biotičkih i abiotičkih faktora. Veća raznolikost kvasaca konstatovana je u vlažnim zemljištima bogatim nutrijentima u odnosu na sušna i siromašna zemljišta (Spencer i Spencer, 1997). Utvrđeno je da semi-aridna zemljišta, siromašna sa nutrijentima, uglavnom naseljavaju *Cryptococcus* i srodni bazidiomicetni kvasci (Spencer i Spencer, 1997). Neki sojevi *Cryptococcus* u zemljištu mogu da stvaraju ekstraćelijske polimerne supstance (EPS) i formiraju biofilme (Joubert et al., 2003). Formiranje ovakvih biofilмова je poznat mehanizam za preživljavanje mikroorganizama u sredinama sa niskim sadržajem nutrijenata (Decho, 1990). Kvasci mogu naseljavati različita zemljišta, što potvrđuje i njihova geografska rasprostranjenost od artičke do tropske zone (Lachance i Starmer, 1998). I u artičkim zonama kvasci mogu biti dominantna grupa u odnosu na druge mikroorganizme (Wynn-Williams, 1982). U većini slučajeva, brojnost kvasaca u zemljištu je do 10^6 ćelija/gramu zemljišta (Botha, 2006). Kvasci se uglavnom nalaze u površinskim slojevima zemljišta, do 10 cm, kao rezultat njihove sposobnosti da rastu u aerobnim uslovima i koriste različita jedinjenja ugljenika. Unutar ekosistema, organski ugljenik deluje kao izvor nutrijenata za zemljišne mikroorganizme, koji procesima transformacije stvaraju nutrijente neophodne za rast biljaka (Wardle et al., 2004). Na ovaj način aktivnošću razgrađivača indirektno se reguliše rast biljaka, dok sa druge strane, biljke osiguravaju organski ugljenik izlučivanjem u rizosferu. Zbog toga, kvasci se mogu naći u zoni rizosfere, kao direktan odgovor na veliku količinu organske materije, pre svega ugljenih hidrata (Botha, 2006). Treba imati na umu, da bez obzira na snabdevanje ugljenikom od strane biljaka i deponovane mrtve organske materije u zemljištu, količina dostupnih nutrijenata u zemljištu je ograničena (Williams, 1985). U vodenom zemljišnom ekstraktu, može se naći manje od 2 i 5 g/ml aminokiselina i ugljenih hidrata (Ko i Lockwood, 1976). Stoga je razumljivo što se zemljište obično posmatra kao oligotrofna sredina (Williams, 1985). Zemljišni kvasci mogu da rastu u oligotrofnim uslovima (Kimura et al., 1998), ali su takođe izolovani iz staništa, koja su relativno bogata hranljivim materijama, kao što je rizosfera (Kvasnikov et al., 1975) i organski otpad i đubriva (Fell i Stätzell-Tallman, 1998). Međutim, s obzirom na

prethodno spomenutu heterogenost zemljišta kao staništa, može se očekivati da brojnost i diverzitet vrsta kvasaca u zemljištu bude neravnomerno raspoređena i pokaže vremensku varijaciju u zavisnosti od ekoloških uslova (Botha, 2011).

Veća brojnost populacije kvasaca obično se nalazi u neposrednoj blizini korena u odnosu na okolno zemljište, prvenstveno zbog ugljenika koje biljka izlučuje sa korenskim eksudatima, koji se lako asimiluju od strane kvasaca (Botha, 2006). Hemijski sastav korenskih eksudata zavisi od biljne vrste, genotipa i uslova rasta (Fan et al., 2001) i ove razlike se reflektuju na diverzitet vrsta kvasca u rizosferi. Slika 1 prikazuje relativnu zastupljenost kvasaca u rizosferi i okolnom zemljištu.



Slika 1. Distribucija zemljišnih kvasaca (y) u odnosu na koren biljke (r), izuzimajući ostatak mikrobnih zajednica u zemljištu. U regionima koji su siromašni nutrijentima, kvasci formiraju biofilmove (b). Kvasci koji mogu da stvaraju ekstraćelijske polimerne supstance (EPS), imaju značajnu ulogu u formiranju zemljišnih agregata (g). Izvor: Botha (2006)

Takođe, više kvasaca se može naći u zemljištu ispod biljaka koje sadrže plodove bogate ugljenim hidratima, jer oni deluju kao inokulum bogat hranljivim materijama (Phaff et al., 1966).

Istraživanja su pokazala da neki kvasci, zbog svojih oligotrofnih sposobnosti, ne samo da mogu naseljavati zemljište, već mogu biti prisutni i na stenama (Burford et al., 2003). Značajan deo mikrobnih zajednica u širokom rasponu stena i minerala kao što su granit, gips, mramor, silikati i aluminosilikati, čine epilittne i endolittne gljive. Kvasci i druge gljive prisutne na ovim stenama mogu, vremenom, doprineti njihovom raspadanju i formiranju zemljišta, kao i snabdevanju rastvorljivim nutrijentima zemljišnih

mikrobnih zajednica (Burford et al., 2003). Raspadanjem stena metaboličkom aktivnošću gljiva, fosfor, sumpor i elementi u tragovima postaju biodostupni. Utvrđeno je, da je rastvaranje stena zapravo rezultat reakcije finalnih proizvoda metabolizma, kao što su H^+ , organske kiseline i siderofore.

Kvasci mogu imati važnu ulogu u formiranju i održavanju strukture zemljišta i sedimenta formiranjem zemljišnih agregata. Tako su istraživanja Vishniac (1995) pokazala da kvasci iz rodova *Cryptococcus* i *Lipomyces* imaju značajnu ulogu u formiranju zemljišnih agregata upravo zahvaljujući sposobnosti produkcije ekstracelularnih polisaharidnih jedinjenja (EPS). Ova jedinjenja utiču na povećanje stabilnosti agregata i poboljšanje strukture zemljišta, što će se odraziti na poboljšanje plodnosti zemljišta (Bronick i Lal, 2004).

Unutar zemljišta kao ekosistema kontinuirano se odvija proces kruženja energije i transformacija materije od primarnih proizvođača, biljaka, kroz lanac ishrane i širok spektar raznovrsnih heterotrofa, uključujući mikroorganizme i makroskopsku faunu (Coleman i Crossley, 1996). Osnovni razlagači organske materije su bakterije, gljive i kvasci kao značajna grupa gljiva. Većina kvasaca koji su do sada otkriveni su saprofiti i imaju značajnu ulogu u procesima mineralizacije i kruženju organske materije. Za razliku od tipičnog fenotipa saharolitičkih kvasaca, tipični zemljišni kvasci mogu da koriste širok spektar izvora ugljenika, uključujući proizvode od enzimske hidrolize lignoceluloznog biljnog materijala, kao što su jednostavna aromatična jedinjenja, hemiceluloza i organske kiseline (Middelhoven, 2006). Ovi kvasci asimiluju jedinjenja poput ferulinske kiseline, 4-hidroksibenzoeve kiseline i vanilinske kiseline, nastalih razgradnjom lignina (Middelhoven, 1993). Neki kvasci mogu da fermentišu ugljene hidrate, dok drugi mogu da koriste i nefermentisana organska jedinjenja (Kurtzman i Fell, 1998). Sve ovo ukazuje da zemljišni kvasci mogu igrati ključnu ulogu u razlaganju biljnog materijala i kruženju nutrijenata u zemljištu. Zemljišni kvasci imaju ulogu u ciklusu kruženja azota, sumpora, solubilizaciji nerastvorljivih fosfata (Botha, 2011) i na taj način mogu stimulisati rast biljaka.

Da bi se bolje razumeo diverzitet kvasaca u zemljištu mora se imati u vidu da oni u zemljištu koegzistiraju sa drugim organizmima. Zemljišni kvasci mogu učestvovati u različitim mikrobnim interakcijama, kao što su amensalizam, mutualizam, sinergizam, predatorstvo, komensalizam (Lachance i Starmer, 1998). Uzimajući u obzir veliku

raznovrsnost mikroorganizama u zemljištu i da kvasci koegzistiraju u svom prirodnom staništu, moguće je da u jednom trenutku učestvuju u više od jedne mikrobne interakcije.

Amensalizam predstavlja odnos gde jedan organizam inhibira rast i aktivnost drugog produkcijom inhibitornih jedinjenja. Istraživanja su pokazala da zemljišni kvasac *Cryptococcus laurentii* inhibira rast filamentoznih gljiva na voću (Chand-Goyal i Spotts, 1997). Neki kvasci mogu da proizvode ekstracelularne glikolipide i glikoproteine, koji imaju fungicidno, ili fungistatičko dejstvo (Golubev, 2006).

Budući da zemljišta predstavljaju uglavnom oligotrofne sredine, to sugeriše na aktivnu kompeticiju za raspoloživim hranljivim materijama, pre svega za izvorima ugljenika i azota. Poznato je da konkurencija za hranljivim materijama ima uticaj na sastav mikrobiološke zajednice. Jedna od čestih kompeticija u zemljištu je i za gvožđe, koje je uglavnom u feri obliku (Fe^{3+}). Mikroorganizmi u rizosferi sintetizuju siderofore ne samo za svoj rast već i za biljku domaćina (Yasmin et al., 2012). Mikrobne siderofore imaju visok afinitet vezivanja sa feri jonima i transport do mikrobne ćelije. Istraživanja su pokazala da *Rhodotorula glutinis* izolovana iz rizosfere proizvodi siderofore i na taj način inhibira rast *Penicillium expansum* i *Botrytis cinerea* (Sansone et al., 2005). *Metschnikowia pulcherrima*, kvasac izolovan iz rizosfere (Vadkertiova i Slavikova, 2007), inhibira rast velikog broja mikroorganizama produkcijom pulherimina, koji kompleksira gvožđe, čineći ga nedostupnim za kompetitore (Sipiczki, 2006).

Predatorski odnosi kod kvasaca su slabo proučavani. Tokom praćenja interakcija predatorskih kvasaca i njihovog plena u Petri kutijama, utvrđeno je da neki sojevi *Saccharomycopsis* ispoljavaju predatorsku sposobnost na velikom broju askomicetnih i bazidiomicetnih kvasaca, tako što formiraju infekcione pege, kojima prodiru u organizam izazivajući njihovu smrt (Lachance i Pang, 1997; Lachance et al., 2000). Predatorsko dejstvo kvasaca može biti postignuto i lučenjem litičkih enzima (Lachance et al., 2000). Vrste *Saccharomycopsis fermentans* i *Saccharomycopsis javanensis* kod kojih je utvrđena sposobnost predatorstva izolovane su iz zemljišta (Kurtzman i Smith, 1998), čime je potvrđeno da kvasci i u ovakvoj sredini mogu nastupiti kao predatori.

Sinergizam je poseban oblik interakcije u kome intermedijarni produkti metabolizma jedne populacije predstavljaju neophodan supstrat za druge (Raičević et al., 2010). Smith et al. (2004) su utvrdili da proizvodnja etanola od strane *Saccharomyces*

cerevisiae poboljšava rast *Acinetobacter*, bakterije koja se nalazi u istoj ekološkoj niši kao i kvasac.

Većina studija o interakcijama kvasaca odnose se na interakcije prema drugim biotičkim komponentama u zemljištu, dok su interakcije između vrsta ili sojeva kvasaca slabije proučavane (Botha, 2006).

2.2. Zemljišni kvasci u održivoj poljoprivredi i bioremedijaciji oštećenih zemljišta

Nekontrolisan porast stanovništva uz povećanu potražnju za hranom, energijom, vlaknima, kao i sve prisutnija degradacija zemljišta, ukazuju da je od ključnog značaja u bezbednoj proizvodnji hrane upravljanje kvalitetom poljoprivrednih zemljišta. Široka upotreba agrohemičija u intenzivnoj poljoprivrednoj proizvodnji, sa ciljem povećanja proizvodnje hrane, pogoršala je situaciju i ugrozila kvalitet životne sredine, ali i zdravlje ljudi i životinja. Na taj način intenzivna poljoprivredna proizvodnja uzrokovala je povećanje emisije gasova staklene bašte, povećanje temperature na planeti i narušila stabilnost biosfere (Duarte et al., 2006). Ove posledice, uz brojne faktore stresa, uključujući salinitet, sušu, deficit nutrijenata, kontaminaciju, eroziju zemljišta, bolesti, invaziju štetočina i korova, utiču na ljudsko zdravlje i dovode do ograničenja u funkcionisanju agroekosistema. Sve ovo nalaže potrebu i važnost održive poljoprivrede. Prema Altieri (2004), "održivi razvoj" se posmatra kao rezultat interakcija tri osnovna faktora: životna sredina, društvo i ekonomija, gde međusobne interakcije između ekonomije i životne sredine (agro-ekologija), životne sredine i društva (ekološka svest) i društva i ekonomije (životni standard), konačno definišu koncept "održivog razvoja". Zbog toga se sve više razvijaju strategije bazirane na primeni ekološki opravdanih agrotehničkih praksi i efikasnijoj eksploataciji korisnih mikrobioloških procesa (Barea, 2015) u okviru održivog razvoja. Ove *low input* biotehnologije prepoznaju zemljišne mikroorganizme kao relevantne komponente odgovorne za održivu proizvodnju hrane uz održavanje kvaliteta životne sredine (Barea, 2015). Zapravo, zemljišni mikroorganizmi igraju fundamentalnu ulogu u poljoprivredi, utičući na poboljšanje ishrane i zdravlja biljaka, kao i kvaliteta zemljišta (Lugtenberg, 2015). Mikrobne populacije postaju instrumenti u fundamentalnim procesima odgovornim za stabilnost i produktivnost agroekosistema (Singh et al., 2011).

2.2.1. Kvasci kao potencijal u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji

Zona rizosfere je mesto ogromnog mikrobnog diverziteta gde se ostvaruju mutualistički interakcijski odnosi između mikroorganizama i biljaka. U poslednje vreme eksploatacija korisnih mikroorganizama u održivoj poljoprivredi privlači sve više pažnje. U održivoj poljoprivrednoj proizvodnji, mikroorganizmi se prvenstveno koriste u cilju smanjenja primene mineralnih đubriva, pesticide, ili za povećanje rasta i prinosa useva (Saharan i Nehra, 2011). U zoni rizosfere mikroorganizmi kolonizuju koren biljaka i proizvodnjom hormona rasta, azotofiksacijom, solubilizacijom fosfata i drugim mehanizmima, mogu doprineti poboljšanju snabdevanja biljaka neophodnim nutrijentima i povećati tolerantnost na stres iz životne sredine (teški metali, organski zagađivači, itd.).

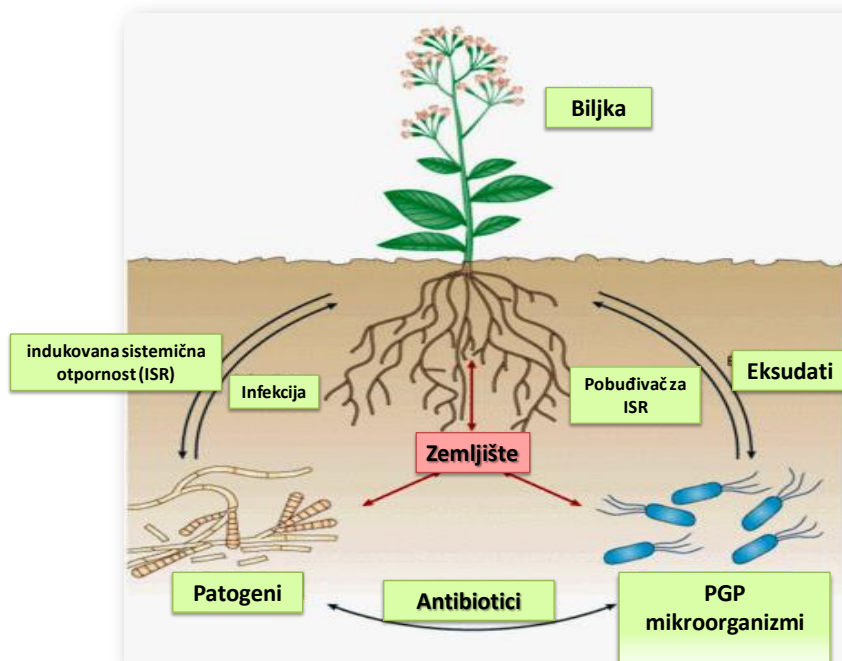
Istraživanja od kraja 70-ih godina prošlog veka, pokazala su da mikroorganizmi u rizosferi biljaka mogu stimulisati rast biljaka i označeni su kao mikroorganizmi stimulatori rasta (*plant growth promoting microorganisms-PGPM*). Pored bakterija, neke rizosferne gljive (Bent, 2006) i kvasci (El-Tarabily i Sivasithamparam, 2006) mogu stimulisati rast biljaka.

Mikroorganizmi na rast i zdravstveno stanje biljaka, utiču pojedinačnim ili kombinacijom više različitih mehanizama. Direktni mehanizmi obuhvataju procese kojima se povećava dostupnost hranljivih materija, ili reguliše hormonski status (azotofiksacija, produkcija siderofora, auksina, giberelina, citokinina, amonijaka i regulacija nivoa etilena). Indirektni mehanizmi odnose se na suzbijanje biljnih patogena i indukovanje sistemske rezistentnosti biljaka (Haas i Defago, 2005).

U zemljištu, gde su prisutni mikroorganizmi i korenov sistem biljaka, odvijaju se brojne interakcije između mikroorganizama (bakterija, gljiva i kvasaca), mikroorganizama i biljaka, mikroorganizama i životinja, biljaka i životinja, kao i između svih živih sistema i spoljašnje sredine (Slika 2). Jedan od ključnih interakcijskih odnosa u ekosistemu je interakcija zemljište-biljka-mikroorganizmi (Singh i Mukerji, 2006).

Sve veći broj studija ukazuje da rizosferni kvasci mogu na veoma različite načine i različitim mehanizmima stimulisati rast biljaka (El-Tarabily i Sivasithamparam, 2006; Cloete et al., 2009; Amprayn et al., 2012; Nakayan et al., 2013; Fu et al., 2016). Tako se izolati kvasaca *Williopsis californica*, *W. saturnus*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida tropicalis* mogu svrstati u grupu PGPM (Amprayn et al., 2012), a istraživanja Fu et al. (2016) ukazuju na potencijal kvasaca kao biofertilizatora za primenu u kontrolisanim i

poljskim uslovima. Ovi efekti ostvaruju se kroz procese: produkcije fitohormona (Nassar et al., 2005); rastvorljivosti fosfata (Sharma et al., 2013); inhibicije patogenih mikroorganizama (Sansone et al., 2005); produkcije siderofora (Sansone et al., 2005); oksidacije azota i sumpora (Falih i Wainwright, 1995) i povećanja površine korena-mikoriza (Mirabal Alonso et al., 2008).



Slika 2. Interakcija između PGPM, biljke, patogena i zemljišta.

Izvor: Haas, D. i Defago, G. (2005).

Inokulacijom sa *Candida tropicalis* uočena je stimulacija rasta krompira, soje i pirinča (Gomaa et al., 2005; Mekki i Ahmed, 2005; Amprayni et al., 2012).

Neki kvasci na površini korena ili semena, mogu da sintetišu i oslobađaju indol-3-sirćetnu kiselinu (*indole-3-acetic acid*; IAA) i auksin (Fu et al., 2016). IAA utiče na fotosintezu, razvoj korenovog sistema, stimuliše deobu, klijanje semena, formiranje pigmenata, biosintezu različitih metabolita i povećava otpornost na stres iz spoljašnje sredine (Zaghian et al., 2012). Takođe, ima značajnu ulogu i kao regulacioni agens za ćelijsku diferencijaciju mikroorganizama, stimuliše klijanje spora i elongaciju micelijuma kod streptomiceta i aktinomiceta (Matsukawa et al., 2007). Mikroorganizmi koji se odlikuju većom produkcijom IAA postaju “dobri kandidati” za primenu kao biofertilizatori (Saharan i Nehra, 2011), s obzirom da utiču na povećanje dužine i

površine korena, i na taj način omogućavaju olakšan pristup nutrijenata i ishranu biljaka.

Do sada su utvrđena dva načina biosinteze IAA: triptofan-nezavisni i triptofan-zavisni put (Nutaratat et al., 2015). Na ovaj proces utiče veliki broj faktora poput: pH sredine, osmotskog stresa, sastava korenskih eksudata, a ključni faktor je prisustvo kiseonika (Malhotra i Srivastava, 2009).

Indol-3-piruvinska kiselina, indol-3-acetamid i indol-3-acetonitril smatraju se glavnim komponentama triptofan nezavisnog puta za biosintezu IAA (Duca et al., 2014). Produkcija IAA praćena je kod sledećih vrsta: *Pichia spartinae* (Nakamura et al., 1991), *Candida valida*, *Rhodotorula glutinis* i *Trichosporon asahii* (El-Tarabily, 2004), *Cyberlindnera (Williopsis) saturnus* (Nassar et al., 2005), *Rhodotorula graminis* i *Rhodotorula mucilaginosa* (Xin et al., 2009), *Candida tropicalis* (Amprayni et al., 2012), *Candida maltose* (Limtong i Koowadjanakul, 2012), *Cryptococcus* sp. (Deng et al., 2012) i *Rhodosporidium fluviale* (Limtong et al., 2014).

PGP karakteristike kvasaca ukazuju na potencijalnu primenu kvasaca u ratarskoj proizvodnji uz obezbeđenje optimalnog prinosa i smanjenu upotrebu mineralnih đubriva. Istraživanja potvrđuju da kvasci mogu biti "isplativi biofertilizatori" (Lonhienne et al., 2014). Izolat CtHY je zemljišni kvasac, koji je izolovan iz rizosfere pirinča i primenjuje se kao komercijalni biofertilizator pod nazivom BioGro (Kecskes et al., 2008). U ogleđima je pokazano da inokulacija pirinča sa BioGro poboljšava rast pirinča i snabdevanje azotom (Cong et al., 2011).

2.2.2. Uloga kvasaca u solubilizaciji fosfata u zemljištu

Fosfor je jedan od glavnih makronutrijenata za biološki rast i razvoj biljaka (Mohamed, 2015). U zemljištu, većina esencijalnih hranljivih materija uključujući i fosfor se nalazi u nerastvornom obliku nedostupnom biljkama (Nautiyal, 1999).

Fosforni joni u zemljištu su uglavnom vrlo nepokretni, jer se snažno adsorbuju na okside i hidrokside gvožđa, aluminijuma i mangana, zatim čestice gline, a sa jonima kalcijuma daju kalcijum fosfate (Dinić et al., 2014). Po pravilu, fosfora uvek ima više u površinskim slojevima, dok mu se sa dubinom profila količina smanjuje, što se može tumačiti njegovom biološkom akumulacijom i uticajem unošenja đubriva (Manojlović et al., 2014).

Pristupačnost fosfora za biljke jednim delom zavisi i od pH vrednosti zemljišta. Biljke ga usvajaju u obliku jona ortofosforne kiseline, dihidrogenfosfata i hidrogenfosfata (Yasser et al., 2014). Pod uticajem zemljišnih kiselina, izlučevina korenovog sistema, vode i ugljen-dioksida se vrši mobilizacija fosforne kiseline. Oslobođeni fosfatni joni ukoliko se ne usvoje od strane biljaka, manjim delom ostaju u zemljišnom rastvoru, a većim delom grade fosforna jedinjenja različite rastvorljivosti (Manojlović et al., 2014). Mikroorganizmi imaju važnu ulogu u kruženju fosfora u zemljištu, fosfosolubilizirajući mikroorganizmi (*phosphate solubilising microorganisms*, PSMs), tako što oslobađaju fosfor iz neorganskih i organskih jedinjenja kroz procese rastvaranja i mineralizacije (Ejikeme i Uzoma, 2013). Ovaj ciklus odvija se kroz cikličnu oksidaciju i redukciju fosfornih jedinjenja, gde se vrši transfer elektrona između različitih oksidacionih stanja fosfora od fosfina do fosfata (Behera et al., 2014). Prvi podaci o fosfosolubilizirajućim mikroorganizmima datiraju od 1903. godine (Khan et al., 2007). Od ukupne mikrobne populacije u zemljištu, fosfosolubilizirajućih bakterija ima 1-50 %, dok fosfosolubilizirajućih gljiva samo 0,1-0,5 % (Chen et al., 2006). Takođe, bakterije pokazuju veću aktivnost u solubilizaciji fosfata u odnosu na gljive (Alam et al., 2002). Fosfosolubilizirajući mikroorganizmi imaju najveću aktivnost u zoni rizosfere (Vazquez et al., 2000), što je direktan odgovor na veliku količinu organske materije, koja dospeva u obliku eksudata, sekreta i lizata (Ejikeme i Uzoma, 2013). Genetički i biohemijski mehanizmi procesa solubilizacije fosfata još uvek nisu dovoljno razjašnjeni (Behera et al., 2014).

Kvasci iz filuma *Ascomycota* i *Basidiomycota* imaju značajnu ulogu u procesima kruženja fosfora. Zemljišni kvasci iz rodova *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* i *Williopsis* sposobni su da nerastvorljiv oblik fosfata prevode u rastvorljiv oblik u uslovima *in vitro* (Al-Falih, 2005). Mehanizmi koji utiču na rast biljaka zavise od vrste kvasaca. Tako *Yarrowia lipolytica* poboljšava rast biljaka kroz proces solubilizacije fosfata (El-Tarabily i Sivasithamparam, 2006). *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus laurentii* i *Saccharomyces kunashirensis* proizvode lako rastvorne i isparljive eksudate, koji pozitivno deluju na klijanje spora i rast hifa mikorizne arbuskularne gljive *Glomus mosseae* (Sampedro et al., 2004). Takođe, ovi kvasci imaju mogućnost rastvaranja slabo rastvorljivih izvora fosfora (kalcijum i gvožđe fosfat) i akumulacije polifosfata (Mirabal Alonso et al., 2008).

Falih i Wainwright (1995) su predložili da se zemljišni kvasci koriste u inokulisanom obliku, kako bi se stimulisali procesi oksidacije sumpora i rastvaranje fosfata. Upotreba fosfosolubilizirajućih mikroorganizama otvara nove horizonte ne samo u pogledu produktivnosti useva, već i u očuvanju zdravlja zemljišta. Sa druge strane, održivost PSM tehnologije u velikoj meri zavisi od kvaliteta i distribucije inokulanata koji se primenjuju u poljoprivrednoj proizvodnji.

2.2.3. Uloga kvasaca u transformaciji azotnih jedinjenja u zemljištu

Azot (N), jedan od najvažnijih makronutrijenata, deo je svih živih ćelija i sastavni deo proteina, nukleotida, nukleinskih kiselina i enzima. Molekularni azot (N₂) čini četiri petine atmosfere, ali je on metabolički nedostupan višim biljkama i životinjama (Htet et al., 2013). Međutim, dostupan je nekim mikroorganizmima kroz proces biološke azotifikacije, gde se atmosferski azot prevodi u amonijak, pomoću enzima nitrogenaze (Saikia i Jain, 2007). U zemljištu, azot je prisutan u organskom i mineralnom obliku, pri čemu je dominantan organski oblik (> 90 %). Konverzija organskog azota u neorganski oblik vrši se kroz proces mineralizacije, a prva karika u tom procesu je amonifikacija. Amonijačni azot podleže procesu nitrifikacije pri čemu nastaju nitriti i nitrati. U procesu denitrifikacije dolazi do biološke redukcije nitrata preko nitrita do isparljivih gasova: N₂, azot-monoksida i azot (I) oksida. Lohnis (1913) je prvi formulisao koncept azotnog ciklusa. Unutar azotnog ciklusa odvija se niz biohemijskih, fizičko-hemijskih reakcija i transformacija u kojima neprekidno dolazi do ponovnog vraćanja azota u atmosferu, litosferu i hidrosferu. Proces kruženja azota u zemljištu, zavisi od različitih faktora, koji uključuju sadržaj organske materije, odnos C/N, pH, mikrobnu populaciju kao i sadržaj gline (Senwo, 1995).

Mnogi mikroorganizmi, uključujući i kvasce, imaju ulogu u transformaciji azotnih jedinjenja (Botha, 2011). Kvasci mogu da koriste veliki broj azotnih jedinjenja kao izvor azota, a njihova sposobnost, odnosno nesposobnost, da koriste jedno ili više ovih jedinjenja, može se iskoristiti kao kriterijum za klasifikaciju (Messenguy et al., 2006). Poznato je više od pedeset različitih izvora azota, koje kvasci mogu da koriste, poput L-amino kiselina, D-amino kiselina, purina, pirimidina, poliamina, amina, nitrita i nitrata (Messenguy et al., 2006). Sposobnost korišćenja azotnih jedinjenja najbolje je proučena kod *S. cerevisiae*, dok su ostali kvasci manje istraživani (Messenguy et al., 2006). Large

(1986) je utvrdio mogućnost korišćenja organskih azotnih jedinjenja od strane kvasaca koji pripadaju različitim rodovima. Ovo istraživanje imalo je poseban fokus na hemijske i metaboličke aspekte degradacije azotnih jedinjenja.

Falih i Wainwright (1995) su utvrdili da zemljišni kvasac *Williopsis californica* ima sposobnost prevođenja amonijuma do nitrata. *Candida tropicalis*, *Geotrichum capitatum*, *Geotrichum candidum* i *Rhodotorula minuta* izolovani iz zemljišta, imaju sposobnost *in vitro* transformacije amonijumovih jedinjenja do nitrita i nitrata (Al-Falih, 2006). Takođe je utvrđeno da *Hansenula anomala* (Navarro et al., 2003), kao i *Candida nitratophila* i *Candida utilis* imaju sposobnost da istovremeno koriste nitrata i amonijumova jedinjenja (Hipkin, 1989).

In vitro studije ukazuju na sposobnost kvasaca u transformaciji azotnih jedinjenja, što može imati izuzetan značaj u održivoj poljoprivredi.

2.2.4. Antagonizam kvasaca prema fitopatogenim gljivama

Termin biološka kontrola u širem smislu podrazumeva primenu korisnih mikroorganizama (bakterija, kvasaca i gljiva), ili produkata njihovog metabolizma, kao i primenu biljnih ekstrakata i etarskih ulja u zaštiti biljaka (Droby, 2006). Mogućnost primene mikroorganizama u biološkoj kontroli invazivnih organizama, a posebno fitopatogenih gljiva, dobija sve veći značaj u biotehnološkim istraživanjima. Utvrđeno je da u međusobnom kontaktu sa biljnim patogenom, mikroorganizmi mogu ispoljiti različite mehanizme delovanja:

1. direktni antagonizam koji podrazumeva hiperparazitizam biljnog patogena;
2. kombinovani antagonizam: manifestuje se sekrecijom antibiotika, litičkih enzima (hitinaze, glukonaze i proteaze), hemijskih produkata razgradnje (amonijak, ugljendioksid, cijanovodonik) i primenom različitih oblika fizičko-hemijske interferencije;
3. indirektni antagonizam: podrazumeva kompeticiju za prostor i raspoložive izvore energije i hrane, produkciju siderofora i indukovanu otpornost biljke domaćina stimulisanu fitohormonima (Pal i Gardener, 2006).

Antagonističke karakteristike kvasaca mogu se pripisati: kompeticiji za hranljivim materijama; promeni pH u medijumu koja nastaje kao rezultat jonske razmene, ili produkcije organskih kiselina; tolerantnosti na visoke koncentracije etanola (Passoth i

Schnurer, 2003) i produkciji i sekreciji antimikrobnih jedinjenja, kao što su mikocini (Golubev, 2006; Schmitt i Breinig, 2006). Utvrđeno je da kvasci koji proizvode mikocine, imaju veću antagonističku aktivnost prema kvascima iz drugih staništa u odnosu na vlastito stanište (Botha, 2006; Golubev, 2006). Istraživanja vezana za antagonističku aktivnost kvasaca doprinela su boljem razumevanju njihove uloge u ekosistemima (Botha, 2006; Golubev, 2006). Prema Do -Sousa (1969) kompeticija za hranljivim materijama predstavlja najvažniji faktor u ekologiji kvasaca. Mehanizam kontrole *Botrytis cinerea* od strane *Sporobolomyces roseus* je upravo kompeticija za šećerom (Filonow, 1996). Isti mehanizam utvrđen je i u slučaju *Pichia guilliermondii* koja je antagonist *Ceratocystis paradoxa* (Reyes, 2004). Antagonistička aktivnost *Candida sake* (Nunes et al., 2001) i *Candida guilliermondii* (Scherm et al., 2003) prema *Penicillium expansum* postignuta je kompeticijom za azotnim jedinjenjima. *Rhodotorula glutinis* (izolat LS-11), *Cryptococcus laurentii* (izolat LS-28), *Candida famata* (izolat 21-D) i *Pichia guilliermondii* (izolat 29-A) navode se kao vrlo efikasni antagonisti fitopatogenih gljiva: *Aspergillus niger*, *B. cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *P. expansum*, *P. italicum* i *P. digitatum* na plodovima jabuka, krušaka, jagoda, kivija, grožđa, pomorandži, mandarina i grejpfruta (Lima et al., 1999). *Pichia membranefaciens* predstavlja efikasnog antagonistu za *Rhizopus stolonifer* (Fan i Tian, 2000) na nektarinama, dok *Cryptococcus albidus* obezbeđuje dobru kontrolu kada je u pitanju *Penicillium expansum* na plodovima jabuke i kruške (Tian et al., 2002).

Mikrobiološki antagonisti predstavljaju potencijalne agense, koji mogu da obezbede efikasan i bezbedan način za kontrolu biljnih bolesti i štetočina. Zbog sve većih zahteva, koji se odnose na očuvanje životne sredine u savremenoj i konvecionalnoj proizvodnji, velika pažnja se poklanja biološkoj kontroli i primeni biokontrolnih proizvoda. Potreba za minimiziranjem gubitaka u proizvodnji povrća, voća i žitarica, kao i brojni ekološki problemi vezani za bezbednost i sigurnost u proizvodnji hrane, ukazuju da je korišćenje vrsta i sojeva kvasaca priznata i obećavajuća alternativa, ali koju treba dalje istraživati (Sui et al., 2015).

2.2.5. Bioremedijacioni potencijal kvasaca

Procesi urbanizacije i industrijalizacije doveli su do povećanog zagađenja životne sredine (zemljišta, vode i vazduha), globalnog zagrevanja i klimatskih promena. Brojna

ksenobiotska jedinjenja, prisutna u životnoj sredini utiču na zdravlje ljudi, životinja i celokupnu životnu sredinu. Među ksenobiotskim jedinjenjima posebno mesto zauzimaju alkani prisutni u nafti, ugljovodonici i organske materije iz industrijskih otpadnih voda. Značajni zagađivači su i teški metali, koji zbog postojanosti u životnoj sredini ukoliko dospeju u lanac ishrane, mogu predstavljati veliki rizik po zdravlje ljudi i životinja. Upravo zbog osobine da se ne mogu degradirati ili uništiti, njihova koncentracija u zemljištu kumulativno se povećava. Metali poput kobalta, hroma, bakra, mangana, molibdena i cinka u niskim koncentracijama predstavljaju esencijalne elemente za žive organizme, dok pri višim koncentracijama ispoljavaju toksično dejstvo.

Bakar (Cu) predstavlja vrlo važan mikronutrijent koji postoji kao kupro (Cu^+) i kupri (Cu^{2+}) jon. Prosečna koncentracija Cu u litosferi je oko 70 mg/kg, dok je u gornjim slojevima zemljišta između 2 i 100 mg/kg (Baker i Senft, 1995). U aerisanim zemljištima najčešće se sreće u obliku Cu^{2+} jona (Kabata-Pendias et al., 2001). U poljoprivrednim zemljištima dva najčešća izvora Cu su đubriva i fungicidi (Flores-Veles et al., 1996). Od 1885. godine preparat poznat kao Bordovska čorba ($\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CuSO}_4$) koristi se kao fungicid posebno u vinogradima (Ristić et al., 2006). Upotreba fungicida na bazi Cu dovela je do akumulacije ovog metala u mnogim poljoprivrednim zemljištima širom sveta, pri čemu su koncentracije Cu mnogo veće od onih koje su neophodne za zdrav rast biljaka (Besnard et al., 2001). Brojne studije pokazale su da dugotrajna primena ovih preparata ima štetno dejstvo na živi svet, a mogu dovesti i do fitotoksičnosti (Donmez i Aksu, 2001). Počev od 2002., u Evropskoj Uniji dozvoljene količine bakarnih fungicida u organskoj proizvodnji su 6 kg/ha (EC direktiva No. 473/2002), što je ostalo sadržano i u važećoj direktivi iz 2008. godine (EC direktiva No. 889/2008). U Republici Srbiji prema pravilniku o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu i vodi za navodnjavanje i metodama za njihovo ispitivanje (Službeni glasnik Republike Srbije broj 23/1994), maksimalna dozvoljena koncentracija bakra je 100 mg/kg.

Tradicionalne tehnologije za uklanjanje Cu poput hemijske precipitacije, jonske izmene ili reverzne osmoze dosta su skupe i mogu imati određene nedostatke, kao što su stvaranje toksičnog mulja ili nepredvidivo uklanjanje metalnih jona (Villegas et al., 2005). Sa druge strane, mikroorganizmi, zbog metaboličke raznolikosti i raznovrsnosti sposobni su da obavljaju sanaciju zagađenih ekosistema. Bakterije, gljive i kvasci mogu

da asimiliraju složene materije kao izvore ugljenika i azota, obavljaju biotransformaciju složenih jedinjenja, koja bi se akumulirala u životnoj sredini. Zbog toga, među inovativnim rešenjima koja se mogu primeniti u tretmanu kontaminiranih voda i zemljišta, ističe se primena biološkog materijala, kao što su žive ili mrtve ćelije mikroorganizama. Kvasci zbog svoje sposobnost prilagođavanja ekstremnim uslovima, kao što je temperatura, pH i preživljavanje pri različitim nivoima organskih i neorganskih zagađenja, postaju potencijalno korisni za saniranje zagađenja u životnoj sredini (Trama et al., 2014).

Istraživanja Li et al. (2014) su ukazala da *Zygosaccharomyces rouxii* i *Saccharomyces cerevisiae* tokom rasta mogu akumulirati 94 % kadmijuma (Cd). Takođe, identifikovani su neki sojevi kvasaca, koji su visoko tolerantni na olovo (Pb) i sposobni da nagomilavaju visoku koncentraciju ovog opasnog teškog metala (Trama et al., 2014). U mnogim slučajevima, ćelijski zid je odgovoran za vezivanje teških metala, ali mikrobní metabolizam može uzrokovati i biotransformaciju metala (Ilhan et al., 2004). Proces biosorpcije zavisi isključivo od sorpcionih mesta prisutnih na strukturama ćelijskog zida i u plazmalemi neaktivnih mikroorganizama; kao i metabolizma živih ćelija (Chojnacka, 2010).

Abe et al. (2001) su iz sedimenta izolovali *Cryptococcus* sp., koji je tolerantan na visoke koncentracije Cu. Siloniz et al. (2002) su opisali sposobnost kvasca *Pichia guilliermondii* izolovanog iz otpadnog mulja, da apsorbuje visoke koncentracije Cu iz tečnog medijuma. Pored toga, Balsalobre et al. (2003) su utvrdili da tolerancija i apsorbpcija teških metala zavisi od vrste kvasca. Različite vrste kvasaca: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida tropicalis*, *Geotrichum capitatum*, *Rhodotorula minuta*, *Loddermyces elongisporus* i *Williopsis californica* (Udofia et al., 2009) predstavljaju dobre izvore biomase za biosorpciju teških metala (Falih, 1998; Rahatgaonkar i Mahore, 2008; Udofia et al., 2009).

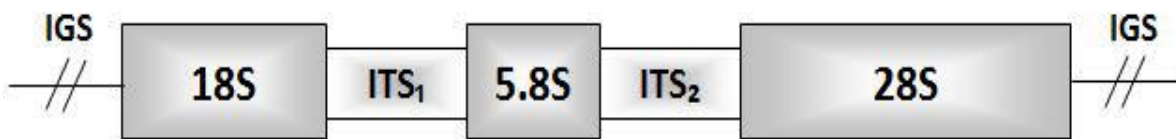
Mnogi mikroorganizmi izolovani iz zagađenih zemljišta, otpadnih voda, komposta i ekstremnih sredina imaju potencijal za primenu u bioremedijaciji (Munoz et al., 2012; Jovičić-Petrović et al., 2014). Primenom mikrobnih populacija, uključujući i kvasce, može se uspešno rešiti jedan od važnijih ekoloških problema, nastao zbog visoke koncentracije teških metala. Visoka tolerancija kvasaca na prisustvo Cu, ali i drugih teških metala, pruža mogućnost praktične primene u procesu bioremedijacije

kontaminiranih sredina. Glavna prednost bioremedijacione tehnologije su niži troškovi u odnosu na konvencionalne tehnike kao što su spaljivanje. Osim toga, biološki tretman predstavlja trajno rešenje. Bioremedijacija je najefikasniji instrument za upravljanje i oporavak kontaminiranih sredina (Kulshreshtha et al., 2014).

2.3. Savremene metode karakterizacije kvasaca u zemljištu

Poznavanje diverziteta kvasaca u zemljištu uglavnom se zasniva na primeni konvencionalnih mikrobioloških metoda, koje imaju ozbiljna ograničenja za otkrivanje pravog diverziteta u izabranom okruženju. Razvojem molekularnih tehnika obezbeđen je bolji uvid u specifične interakcije i aktivnosti zemljišnih kvasaca. Kombinacijom lančane reakcije polimeraze-PCR (*polymerase chain reaction*) koja predstavlja *in vitro* umnožavanje (amplifikaciju) određenih DNK sekvenci pomoću specifičnih oligonukleotidnih sekvenci (prajmera) i termostabilne DNK polimeraze (Bruns et al., 1991), elektroforeze u gradijentu denaturirajućeg agensa-DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) i PCR/SSCP- (*Single-strand Conformational Polymorphism*), metodi koja se zasniva na poređenju pređenog elektroforetskog puta jednolančanih DNK, mogu se dati precizniji odgovori o raznovrsnosti ekosistema. Prelaz sa fenotipske na molekularnu identifikaciju, počela je utvrđivanjem molarnog procenta guanina (G) i citozina (C) u jedarnoj DNK. Ove analize pokazale su da je sadržaj G+C kod askomicetnih kvasaca 28-50 mol %, dok je kod bazidiomicetnih od 50-70 mol % (Kurtzman i Fell, 1998).

Regioni DNK sa genima za rRNK nazivaju se ribozomalna DNK (rDNK) i predstavljaju najčešće korišćene regione gena u filogenetskim ispitivanjima. Razlog primene rDNK je njeno univerzalno postojanje, jednostavna amplifikacija, dostupnost brojnih prajmera, kao i mogućnost filogenetskog poređenja na različitim nivoima. U okviru ovog regiona se nalaze konzervativni geni koji kodiraju 18S, 5.8S i 28S rRNK molekule. Između ova tri gena (Slika 3) nalaze se interni transkribovani regioni (ITS1 i ITS2), dok su dve rDNK jedinice razdvojene intergenskim prostorom (IGS).



Slika 3. Eukariotska rDNK. Izvor: Petrović (2012)

Najpouzdaniji način identifikacije kvasaca je na osnovu analize sekvence D1/D2 regiona 26S ribozomalne subjedinice i ITS1 i ITS2 regiona (Fell et al., 2000). 18S, 5.8S i 28S rRNKse koriste za objašnjenje filogenetskih odnosa na nivou klase, reda i familije (Huhndorf et al., 2004). Sa druge strane, ITS1 i ITS2 regioni su veoma varijabilni i koriste se za detekciju vrste, ali i nižih taksonomskih jedinica (Jeewon et al., 2003).

Prvih 600-900 baznih parova (bp) od 5' kraja 28S rDNK najčešće je korišćen region unutar 28S rDNK gena, jer uključuje tri različita domena (D1, D2 i D3), koji predstavljaju najvarijabilniji deo ovog gena. Ostali delovi ovog gena su konstantni, čak i za veoma različite taksone. Prvih 600-900 bp 28S rDNK daju značajan doprinos u razjašnjenju filogenetskih odnosa na nivou roda ili familije, a u nekim slučajevima i na nivou vrste (Huhndorf et al., 2004).

ITS-5.8S najčešće je sekvenciran DNK region koji obuhvata prilično konzervativan 5.8S region dužine oko 150 bp i dva interna transkribovana regiona (ITS1 i ITS2), čije dužine iznose 180-225 bp (White et al., 1990). Zbog većeg stepena varijabilnosti u odnosu na 28S rDNK i 18S rDNK, ovaj region pokazao se kao veoma koristan za utvrđivanje filogenetskih odnosa između veoma srodnih vrsta ili čak unutar vrsta (Camara et al., 2002).

DGGE predstavlja elektroforetsku metodu kojom je moguće detektovati razlike između DNK fragmenata iste veličine i različite nukleotidne sekvence na osnovu različitih tačaka topljenja DNK (Muyzer i Smalla, 1998). To se postiže u poliakrilamidnom gelu, u prisustvu denaturišućih agenasa uree i formamida. PCR-DGGE omogućava proučavanje mikrobioloških zajednica u životnoj sredini bez kultivacije. Zahvaljujući ovoj metodi može se utvrditi odgovor mikroorganizama na različite promene u životnoj sredini (Sharma et al., 2006). Poseban značaj ogleda se i u činjenici da PCR-DGGE može da obezbedi *fingerprint* zajednice mikroorganizama nakon direktne ekstrakcije ukupne DNK (Milovanović, 2011).

Prvi rezultati dobijeni PCR-DGGE metodom odnosili su se na bakterijske biofilmove (Muyzer et al., 1993). Od tada, ova metoda se koristi za ispitivanje gljivičnih patogena u korenu biljaka (Kowalchuk et al., 1997), ali i za gljive koje ne mogu da se detektuju standardnim metodama.

PCR-DGGE baziran na analizi 18S i 26-28S rRNK genskih sekvenci se koristi za karakterizaciju složenih mikrobnih zajednica, uključujući i kvasce, u različitim ekosistemima (Muccilli et al., 2011).

Hesham et al. (2006) su primenili PCR-DGGE za identifikaciju kvasaca iz rodova: *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* i *Sporidiobolus*, koji učestvuju u biodegradaciji policikličnih aromatičnih ugljovodonika iz sirove nafte. Cocolin et al. (2000) su koristili ovu metodu kako bi analizirali različite vrste kvasaca prisutnih u sukcesivnim fazama fermentacije vina. Prakitchaiwattana et al. (2004) su poredili PCR-DGGE metod sa tradicionalnim metodama za proučavanje diverziteta kvasaca na grožđu. PCR-DGGE takođe je korišćen za detekciju kvasaca u fermentaciji *Coffea arabica* (Masoud et al., 2004).

2.3.1. Karakterizacija kvasaca Raman spektroskopijom

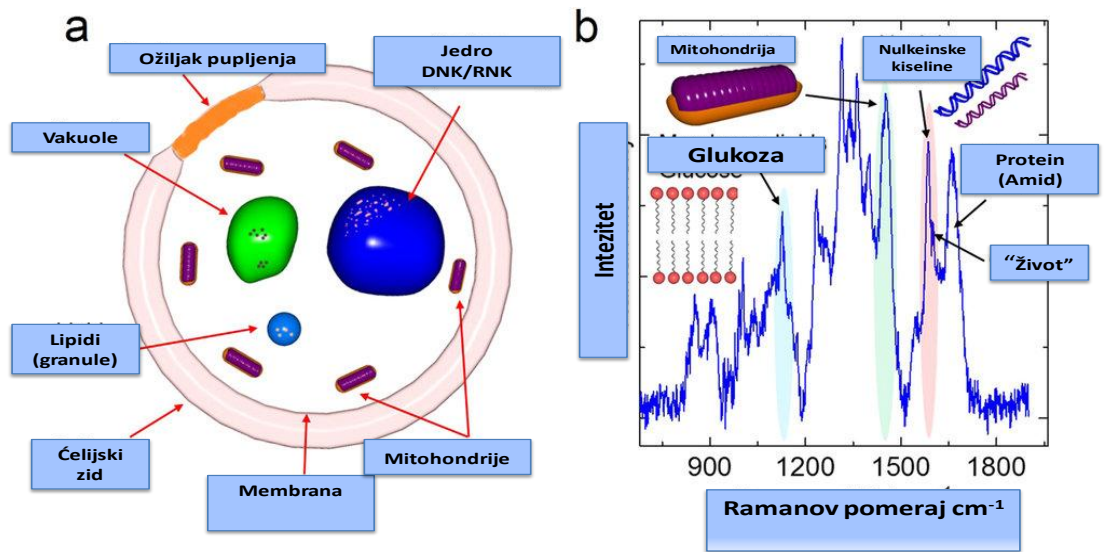
Praćenje aktivnosti zemljišnih mikroorganizama konvencionalnim mikrobiološkim metodama zahteva značajnu potrošnju materijala i veliki utrošak vremena. Spektroskopske vibracione tehnike, kao što je i Raman spektroskopija, imaju savremen pristup biohemijskoj karakterizaciji i omogućavaju brzu i preciznu klasifikaciju velikog broja prokariotskih i eukariotskih mikroorganizama (Hamasha, 2011). Raman spektroskopija se razlikuje od drugih metoda i po niskoj ceni, jednostavnosti upotrebe i po velikom broju informacija o hemijskom sastavu, strukturi i interakciji biomolekula unutar mikroorganizama (Stockel et al., 2016).

Ramanski spektri mikroorganizama oslikavaju vibracije biohemijskih komponenata unutar ćelije, konkretno: proteina, DNK, RNK, lipida, ugljenih hidrata, vode kao i komponenata prisutnih u manjim koncentracijama (Rosch et al., 2011). Različiti mikroorganizmi razlikuju se, npr. u proteinskom sastavu ćelijskog zida, pa samim tim pokazuju drugačije Raman spektre (Harz et al., 2009). Ove specifične biohemijske razlike između uzoraka, omogućavaju karakterizaciju i identifikaciju bakterija, gljiva i kvasaca do nivoa vrste, pa čak i do nivoa podvrste (Stockel et al., 2016).

Različiti pristupi primenjuju se za karakterizaciju eukariotskih mikroorganizama. U slučaju kvasaca i gljiva, preporučuje se posmatranje više od jednog Raman spektra, zbog varijacija signala od različitih organela. Neophodno je snimiti oko pedeset spektara da bi se izvršila statistička analiza i izveli odgovarajući zaključci.

Kada je u pitanju ćelija kvasca, raspodela karakterističnih Raman traka oslikava različite delove ćelije (Slika 4). Npr., karakteristični pik na talasnim brojevima u opsegu 1731-1765 cm^{-1} potiče od C=O istežućih vibracija i predstavlja Raman odgovor frakcije lipida, dok se na talasnim brojevima u oblasti 1624-1687 cm^{-1} javlja Raman odgovor koji potiče od C=C lipidne veze i amida I (Rosch et al., 2005), a Raman pik u oblasti 1580-1600 cm^{-1} potiče od vibracija unutar aromatičnih aminokiselina i nukleotidnih baza (Rosch et al., 2006).

Rodriguez et al. (2013) su koristili Raman spektroskopiju za identifikaciju *Zygosaccharomyces bailii*, *Dekkera bruxellensis* i *Saccharomyces cerevisiae*, kvasaca odgovornih za kvarenje vina. Mogućnost identifikacije kvasaca na nivou jedne ćelije u svom istraživanju predstavili su Rosch et al. (2005). Peng et al. (2010) su koristili Raman spektroskopiju kako bi ispitali akumulaciju etanola u ćeliji kvasca. Zahvaljujući Raman spektroskopiji, Huang et al. (2004) su uspešno pratili deobu ćelije (mitozu) kod *Schizosaccharomyces pombe*.



Slika 4. a) skica ćelije kvasca; b) različite komponente ćelije kvasca snimljene Raman spektroskopijom. Autor, Raul D. Rodriguez

Brojne studije vezane za Raman spektroskopiju, ukazuju na mogućnosti ove metode u identifikaciji mikroorganizama u životnoj sredini, prehrambenoj tehnologiji i medicini (Peng et al. 2010; Rodriguez et al., 2013).

3. CILJ RADA

U uslovima intezivne poljoprivredne proizvodnje značajno se menjaju floristički sastav, kao i mnoga svojstva zemljišta, što radikalno utiče na nutritivne cikluse i biodiverzitet u ekosistemu. Mikroorganizmi imaju ključnu ulogu u očuvanju prirodne sredine i proizvodnji hrane. U poređenju sa drugim mikroorganizmima o diverzitetu kvasaca i funkcijama koje obavljaju u zemljištu malo se zna, jer su u većini studija korišćene klasične mikrobiološke metode, koje su imale za cilj utvrđivanje njihovog prisustva u različitim sredinama. Iako još uvek nisu razjašnjene funkcije kvasaca u zemljištu, zna se da učestvuju u procesima razlaganja organske materije, kruženju ugljenika, azota, fosfora i sumpora, formiranju strukture zemljišta, a imaju i značajnu ulogu u suzbijanju biljnih bolesti i stimulaciji rasta biljaka. Polazeći od nedostataka klasičnih mikrobioloških metoda, primenjene su i molekularne metode. S obzirom da ove metode pružaju opšti uvid u genetsku heterogenost mikrobnih zajednica u zemljištu, biće primenjena PCR-DGGE metoda za utvrđivanje prisustva kvasaca i gljiva u uzorcima zemljišta oglednog školskog dobra Radmilovac. Na osnovu dobijenih rezultata izvršiće se komparacija standardnih i molekularnih metoda za upoznavanje diverziteta kvasaca u zemljištu.

Ciljevi ove disertacije polaze od hipoteze da velikom mikrobnom diverzitetu u zemljištu doprinose i kvasci, koji obavljaju važne procese i utiču na dobro funkcionisanje ekosistema, pa tako i na rast biljaka.

Cilj istraživanja je stvaranje kolekcije kvasaca iz različitih uzoraka zemljišta. Ova kolekcija predstavljaće osnovu za dalja istraživanja u okviru disertacije i koristiće se za ispitivanje potencijala kvasaca u održivoj poljoprivredi i bioremedijaciji oštećenih zemljišta.

U cilju primene kolekcionisanih kvasaca izvršiće se identifikacija izolata kvasaca na osnovu morfoloških, odgajivačkih, ekoloških, biohemijskih i enzimskih karakteristika. Radi preciznije identifikacije primeniće se molekularne metode, a detaljnija karakterizacija izolata različitih vrsta kvasaca biće dopunjena primenom Raman spektroskopije.

U cilju mogućnosti primene sojeva kvasaca iz različitih zemljišta u održivoj poljoprivredi, utvrdiće se i sposobnost izolata kvasaca da učestvuju u procesu

solubilizacije fosfata, transformaciji azotnih jedinjenja, produkciji indol sirćetne kiseline i ispoljavanju antagonizma prema fitopatogenim gljivama *Botrytis cinerea* i *Pythium aphanidermatum*. Selekcionisani kvasci koristiće se i za ispitivanje uticaja na rast različitih biljnih vrsta.

U cilju potencijalne primene u bioremedijaciji, ispitaće se i sposobnost bioakumulacije bakra od strane izabranih izolata, a izolat sa najvećim procentom bioakumulacije biće dodatno okarakterisan Raman spektroskopijom.

4. MATERIJAL I METODE

Najveći deo eksperimentalnih istraživanja je urađen na Katedri za Ekološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Takođe, jedan deo istraživanja je urađen na Univerzitetu Educons (Sremska Kamenica) i Institutu za fizičku hemiju Friedrich-Schiller Univerziteta (Jena, Nemačka).

4.1. Mikrobiološka karakterizacija zemljišta

Za izolaciju kvasaca korišćeni su uzorci zemljišta (Tabela 1) uzeti sa dubine 0-30 cm sa različitih lokaliteta u toku avgusta i oktobra, 2013. godine: zemljište iz gradske sredine kontaminirano organskim zagađivačima (dečiji park Tivat, Republika Crna Gora, 2T, 3T, 4T, B, C, E); zemljište iz vinograda (Podrum Radovanović, Krnjevo, Republika Srbija, 1 i 2) i zemljište sa oglednog školskog dobra Radmilovac (Poljoprivredni fakultet, Beograd, Republika Srbija, Avin i Cvin). Takođe je uzet i uzorak rizosfere trske iz plitkog jezera (naselje Trešnja, Beograd, Republika Srbija, SK). Uzorci zemljišta transportovani su u sterilnim kesama za uzorkovanje u Laboratoriju Katedre za Ekološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, gde je izvršeno formiranje kompozitnih uzoraka, mikrobiološka karakterizacija i izolacija kvasaca.

Tabela 1. Geografska lokacija uzoraka zemljišta

| Oznaka uzorka | Geografska lokacija |
|---------------|-------------------------------|
| 2T | 42°26'07"SGŠ, 18°41'28"IGD |
| 3T | 42°26'07"SGŠ, 18°41'28"IGD |
| 4T | 42°26'07"SGŠ, 18°41'28"IGD |
| B | 42°26'07"SGŠ, 18°41'28"IGD |
| C | 42°26'07"SGŠ, 18°41'28"IGD |
| E | 42°26'07"SGŠ, 18°41'28"IGD |
| Avin | 44°25'51,9"SGŠ, 21°03'068"IGD |
| Cvin | 44°25'51,9"SGŠ, 21°03'068"IGD |
| 1 | 44°45'20"SGŠ, 20°36'47"IGD |
| 2 | 44°45'20"SGŠ, 20°36'47"IGD |
| SK | 44°38'11"SGŠ, 20°31'9"IGD |

Mikrobiološka karakterizacija zemljišta izvršena je metodama razređenja i nakupljanja na standardnim mikrobiološkim podlogama. Razređenje uzoraka vršeno je u sterilnoj vodovodskoj vodi. Određen je ukupan broj bakterija, gljiva, aktinomiceta,

ukupnih i sporogenih amonifikatora i slobodnih azotofiksatora. Ukupan broj bakterija određen je na 10 puta razblaženom tripton sojinom agaru (10 % TSA, Torlak, Srbija). Brojnost gljiva određena je na hranljivoj podlozi roze bengal streptomycin agar (Pepper et al., 1995) (Tabela 2). Nakon sterilizacije, ovoj podlozi dodat je streptomycin-sulfat u količini od 0,033 mg/1000 ml hranljive podloge.

Brojnost aktinomiceta određena je na skrobno-amonijačnom agaru (Tabela 3).

Tabela 2. Sastav podloge roze bengal streptomycin agar (RB)

| Naziv hemikalije | Količina (g) |
|--|---------------------|
| Pepton | 5,0 |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,50 |
| Glukoza | 10,0 |
| K ₂ HPO ₄ | 1,0 |
| Roze bengal | 0,033 |
| Agar | 15,0 |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Tabela 3. 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 |

Broj ukupnih amonifikatora određen je na meso-peptonskom agaru (MPA, Torlak, Srbija). Broj sporogenih amonifikatora određen je na MPA, a pre zasejavanja inokulum odgovarajućeg razređenja zagrevan je na 80°C u trajanju od 10 minuta.

Broj slobodnih azotofiksatora je određen na Fjodorovom agaru (Tabela 4).

Sve podloge sterilisane su u autoklavu (Sutjeska, Beograd) na temperaturi od 121°C u trajanju od 20 minuta.

Nakon inkubacije u termostatu (Binder, Nemačka) u trajanju od 5 dana na 30°C određen je ukupan broj bakterija, gljiva nakon sedam dana inkubacije na 25°C, aktinomiceta nakon četrnaest dana na 30°C, dok je ukupan broj slobodnih azotofiksatora određen posle dva dana na 30°C. Broj mikroorganizama izražen je na 1 gram suvog zemljišta, a

vlaga zemljišta određena je sušenjem u sušnici (Binder, Nemačka) na 105°C u trajanju od 2 sata. pH vrednost uzoraka određena je potenciometrijski (Eutech 510, Thermo Scientific, Kanada).

Tabela 4. 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 ml |
| Destilovana voda | 1000 ml |
| 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 |

4.1.1. Ispitivanje diverziteta mikroorganizama DGGE metodom

PCR-DGGE metod predstavlja metodu za proučavanje biodiverziteta mikroorganizama u uzorcima iz životne sredine bez prethodne kultivacije. Ova metoda korišćena je za određivanje prisustva kvasaca i gljiva u uzorcima zemljišta sa oglednog školskog dobra Radmilovac.

Ekstrakcija zemljišne DNK

Ekstrakcija DNK iz zemljišta izvršena je pomoću kita ZR Soil Microbe DNA MiniPrep (Zymo Research, USA).

Pre početka rada pripremljen je Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filters koji je centrifugiran 3 min na 8 000 rpm. Zemljište mase 0,25 g kvantitativno je preneto u ZR BashingBead™ Lysis Tube i dodato je 750 µl Lysis Solution. Tako pripremljene ZR BashingBead™ Lysis Tube homogenizovane su u disruptoru (Scientific industries-ST-D258, USA) 5 min. Zatim su ZR BashingBead™ Lysis Tube centrifugirane u trajanju

od 1 min na 10 000 rpm. Dobijeni supernatant zapremine 400 µl dodat je u Zymo-Spin™ IV Spin Filter. Zatim je izvršeno centrifugiranje 1 min na 7 000 rpm. Po završenom centrifugiranju dodato je 1200 µl Soil DNA Binding Buffer. Zatim je 800 µl preneto u Zymo-Spin™ IIC kolonu i centrifugirano je 1 min na 10 000 rpm. Dobijeni supernatant je odbačen, a za sledeći korak korišćen je talog koji je preostao na koloni. Na talog koji je preostao na koloni dodato je 200 µl DNA Pre-Wash Buffer u Zymo-Spin™ IIC kolonu smeštenu u novu kolekcionu tubu i centrifugirano 1 min na 10 000 rpm. Nakon završenog centrifugiranja 500 µl Soil DNA Wash Buffer dodato je u Zymo-Spin™ IIC kolonu i centrifugirano je 1 min na 10 000 rpm. Zymo-Spin™ IIC kolona preneti je u čistu epruveticu u koju je dodato 50 µl DNA Elution Buffer direktno na membranu kolone. Nakon 10 min izvršeno je centrifugiranje u trajanju od 30 s i 10 000 rpm, kako bi se eluirala DNK. Eluirana DNK preneti je u pripremljenu Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filters smeštenu u čistu tubicu a zatim je izvršeno centrifugiranje 1 min na 8 000 rpm. Ekstrahovana DNK čuvana je u zamrzivaču na - 20°C.

Lančana reakcija polimeraze (PCR) univerzalnim prajmerima ITS1/ITS4

ITS1/ITS4 su univerzalni par prajmera kojima je omogućena amplifikacija ITS (Internal transcribed spacer) regiona jedarne DNK eukariota. PCR amplifikacija obavljena je u termosajkleru (Kyratec, Australija) pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina u trajanju od 60 s pri 94°C; 35 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacije 35 s pri 94°C, hibridizacije (*annealing*) 35 s pri 57°C, elongacije prajmera 1 min pri 72°C praćeno finalnom elongacijom od 10 min pri 72°C (Susumu i Yukiko, 2001; Cunnington et al., 2003). Zahvaljujući ovom paru prajmera utvrđeno je prisustvo gljiva u uzorcima zemljišta.

Lančana reakcija polimeraze (PCR) univerzalnim prajmerima NL1 i NL4

NL1 i NL4 predstavljaju univerzalni par prajmera kojima je omogućena amplifikacija D1/D2 regiona. PCR reakcije izvedene su u termosajkleru (Kyratec, Australija) pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina u trajanju od 2 min pri 94°C; 30 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacije 30 s pri 94°C, hibridizacije (*annealing*) 30 s pri 52°C, elongacije prajmera 60 s pri 72°C praćeno finalnom

elongacijom od 7 min pri 72°C (Marshall et al., 2003). Zahvaljujući ovom paru prajmera utvrđeno je prisustvo kvasaca u uzorcima zemljišta.

Vizuelizacija PCR produkata pomoću DGGE analize

DGGE analiza dobijenih PCR produkata sa prajmerima ITS1/ITS4 i NL1/NL4 urađena je na Bio-Rad Dcode System (Bio-Rad, USA). PCR produkti dodati su u poliakrilamidni gel debljine 0,8 mm (8 % w/v akrilamida : bisakrilamida 37,5 :1) koristeći gradijent denaturacije od 30 % do 50 % uree i formamida (100 % odgovara 7 M uree i 40 % w/v foramida). Elektroforeza je izvedena pod konstantnim naponom od 120 V, temperaturi od 60°C i trajanju od 6 h. Nakon toga, gel je obojen sa 1 x *tris* acetat- EDTA (TAE) koji sadrži 0,5 mg/ml etidijum bromida u trajanju od 20 min i fotografisan sa UV-transiluminatorom.

4.2. Izolacija kvasaca iz zemljišta

Izolacija kvasaca izvršena je metodom nakupljanja na YPD (*yeast extract-peptone-dextrose*) podlozi za gajenje kvasaca (sa 1 % kvašćevog ekstrakta, 2 % peptona i 2 % dekstroze) uz dodatak 80 µg/ml streptomicina (Slavikova i Vadkertiova, 2003), koji je dodat nakon sterilizacije na temperaturi od 121°C u trajanju od 20 minuta. U tako pripremljenu podlogu (90 ml) dodato je 10 g zemljišta i inkubirano je na šejkeru (Biosan ES-20, Letonija) na temperaturi od 28°C tokom 48 h i pri 120 rpm. Nakon inkubacije uzeto je 1 ml suspenzije i preneto na agarizovanu YPD podlogu. Inkubacija je izvršena na 28°C u trajanju od 48 h. Za dalja istraživanja izabrane su morfološki različite kolonije, a višestrukim presejavanjem dobijene su čiste kulture kvasaca. Čistoća kultura proveravana je prilikom svakog presejavanja mikroskopiranjem (Nikon Eclipse 50i, Japan). Kulture kvasaca čuvane su na kosom sladnom agaru (Torlak, Srbija) na 4°C i održavane periodičnim presejavanjem uz istovremenu proveru čistoće kultura.

4.3. Identifikacija i karakterizacija kvasaca

U okviru identifikacije i karakterizacije kvasaca određene su morfološke, odgajivačke, ekološke i fiziološke karakteristike. Takođe, izvršena je molekularna identifikacija dobijenih izolata i njihova karakterizacija pomoću Raman spektroskopije.

4.3.1. Određivanje morfoloških karakteristika

U okviru morfoloških karakteristika ispitane su makromorfološke i mikroskopske karakteristike izolata. Od makromorfoloških karakteristika određene su boja, oblik i tekstura kolonija na YPD i sladnom agaru. Od mikroskopskih karakteristika određeni su oblik i veličina ćelije i stvaranje micelije i pseudomicelije. Makromorfološke karakteristike određene su nakon gajenja izolata na sladnom i YPD agaru u trajanju od 72 h i temperaturi od 28°C. Oblik i veličina ćelija određen je mikroskopski (Nikon Eclipse 50i, Japan) pomoću fiksiranog i obojenog preparata. Bojenje je izvršeno fuksinom u trajanju od 5 minuta.

Za dokazivanje stvaranja micelije i pseudomicelije korišćena je metoda Mihajlović (1983), korišćenjem krompirovog agara, pripremljenog po sledećoj recepturi): 100 g očišćenog i dobro izgnječnog krompira potopljeno je u 3000 ml vodovodske vode. Posle 3 h stajanja na hladnom mestu izvršena je filtracija a zatim i zagrevanje u trajanju od 1 h na 120°C. Za pripremu agara na 230 ml ove tečnosti dodato je 770 ml vodovodske vode, 20 g glukoze i 20 g agara. Gotova podloga sterilisana je 20 min na 121 °C. U Petrijevu kutiju stavljen je stakleni štapić u obliku slova “U”, preko njega dve mikroskopske pločice, a zatim je sve sterilisano u suvom sterilizatoru (Instrumentaria, Zagreb) 2 h na temperaturi od 180-200°C. Krompirov agar izliven je u drugu Petrijevu kutiju. Sterilnom pincetom izvađena je sterilna mikroskopska pločica, koja je bila potopljena u rastopljenom agaru, a zatim je ponovo vraćena u prvu Petrijevu kutiju, gde je stavljena preko savijenog štapića. Preko mikroskopske pločice zasejani su izolati i preko toga stavljena je mikroskopska ljušpica. U Petrijeve kutije je sipano malo sterilne destilovane vode, kako bi se sprečilo isušivanje agara. Inkubacija je trajala 5 dana na temperaturi od 28°C, a nakon toga je vršeno mikroskopiranje.

4.3.2. Određivanje odgajivačkih karakteristika

Za određivanje odgajivačkih karakteristika praćen je rast na kosom sladnom agaru i rast na sladnom bujonu. Inkubacija je trajala 30 dana u mraku na temperaturi od 20°C, u termostatu (Binder, Nemačka). Nakon toga, vršen je opis rasta kolonija (boja i tekstura) na kosom agaru, a na sladnom bujonu stvaranje taloga, prstena ili navlake.

4.3.3. Određivanje ekoloških karakteristika

Od ekoloških karakteristika ispitan je rast izolata pri različitim temperaturama, pH vrednostima hranljive podloge i različitim koncentracijama natrijum-hlorida (NaCl).

Uticaj temperature na rast izolata

U cilju ispitivanja uticaja temperature na rast, čiste kulture izolata kvasaca zasejane su na YPD podlogu i inkubirane u termostatima (Binder, Nemačka) u trajanju od 5 dana pri temperaturama od: 4°C, 10°C, 20°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C i 50°C.

Uticaj pH vrednosti na rast izolata

Za ispitivanje rasta izolata pri različitim pH vrednostima korišćen je YPD agar, čija je pH vrednost podešena pre autoklaviranja dodavanjem 1 M rastvora HCl, ili 1 M rastvora NaOH. Ispitan je rast pri sledećim pH vrednostima: 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10; 10,5; 11. pH vrednost merena je pomoću pH-metra (Eutech 510, Thermo Scientific, Kanada). Formiranje kolonija na podlogama sa podešenom pH vrednošću nakon 72 h inkubacije u mraku, pri 28°C u termostatu (Binder, Nemačka), smatrano je pozitivnim rezultatom.

Uticaj različitih koncentracija natrijum-hlorida (NaCl) na rast izolata kvasaca

Odnos izolata prema različitim koncentracijama soli ispitan je na YPD podlozi sa agarom, u koju je pre autoklaviranja dodat NaCl u koncentracijama: 3, 5 i 7 %. Formiranje kolonija na ovim podlogama nakon 72 h inkubacije pri 28°C u mraku u termostatu (Binder, Nemačka), smatrano je pozitivnim rezultatom.

Interakcija izolata kvasaca i mikroorganizama

Za određivanje interakcije kvasaca prema *Candida albicans* i bakterijskim sojevima korišćen jedifuzioni metod sa bunarčićima. Bakterijski sojevi, *C. albicans* (Tabela 5) i sojevi kvasaca pripremljeni su od bujona kultura starosti 24 h. Ispitivanje je rađeno tako što su Petri šolje sa čvrstom podlogom (MPA) prelivane sa odgovarajućim soft agarom (10 ml želatinoznog bujona i 10 µl bakterijske kulture/*C. albicans*). U soft agaru napravljeni su bunarčići (Ø5mm) u koje je dodato 20 µl ispitivane kulture kvasaca. Inkubacija je obavljena na temperaturi od 31°C ± 2°C. Tetraciklin (30 mcg, Bioanalyse),

nistatin (100 U, Bioanalyse), ampicilin (10 mcg, Bioanalyse) i hloramfenikol (30 mcg, Bioanalyse) korišćeni su kao pozitivni referentni standardi za određivanje osjetljivosti bakterijskih sojeva i *C. albicans*. Svaka proba ovog eksperimenta ponovljena je tri puta, a posmatrano je pojavljivanje zone inhibicije rasta (bistre zone) oko uzoraka, kao i mogućnost rasta kvasaca u prisustvu patogenih bakterijskih sojeva i *C. albicans*.

Tabela 5. Sojevi korišćeni u difuzionom testu sa bunarčićima

| Bakterijski soj | Antibiotik | Izvor ili referenca |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------|
| <i>Proteus mirabilis</i> | Ampicillin10mcg | ATCC 12453 |
| <i>Escherichia coli</i> | Ampicillin10mcg | ATCC 25922 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Chloramphenicol30 mcg | ATCC 27853 |
| <i>Candida albicans</i> | Nystatin100 U | ATCC 10231 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Tetracycline30 mcg | ATCC 6623 |
| <i>Bacillus cereus</i> | Tetracycline30 mcg | ATCC 11778 |

4.3.4 Biohemijska karakterizacija izolata

Identifikacija izolata na osnovu biohemijskih karakteristika izvršena je pomoću API AUX 20C sistema (BioMérieux, Francuska). Ovaj test omogućava određivanje asimilacije ugljenih hidrata kroz 19 reakcija u veoma malim zapreminama uzoraka. Kulture kvasaca stare 24 h dodate su u 0,85 % NaCl (2 ml), a potom je suspenzija homogenizovana pomoću vorteksa. Inkubacija je trajala 48-72 h na temperaturi od 29°C ± 2°C. Pozitivnom reakcijom smatra se pojava zamućenja. Dobijeni rezultati analizirani su uz pomoć softvera APIWeb, Version-1.1.0.

4.3.5. Molekularna identifikacija

Molekularna identifikacija izolata podrazumevala je sekvencioniranje produkata dobijenih nakon amplifikacije univerzalnim prajmerima i poređenje dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u GenBank Bazi podataka (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA).

Priprema izolata za molekularnu identifikaciju

DNK je ekstrahovana iz sveže kulture kvasca dobijene gajenjem u YPD tečnoj podlozi u trajanju od 24 h na 28°C na orbitalnom termostatirajućem šejkeru (Biosan ES-20, Letonija) pri 150 rpm. Ekstrakcija DNK iz izolata izvršena je pomoću kita ZR Soil Microbe DNA MiniPrep (Zymo Research, USA).

Pripremljena kultura zapremine 0,25 ml i 750 µl Lysis Solution dodati su u ZR BashingBead™ Lysis Tube. Tako pripremljene ZR BashingBead™ Lysis Tube homogenizovane su u disruptoru (Scientific industries-ST-D258, USA) 5 min. Zatim su ZR BashingBead™ Lysis Tube centrifugirane u trajanju od 1 min na 10 000 rpm. Dobijeni supernatant zapremine 400 µl dodat je u Zymo-Spin™ IV Spin Filter. Zatim je izvršeno centrifugiranje 1 min na 7 000 rpm. Po završenom centrifugiranju dodato je 1200 µl Soil DNA Binding Buffer. Zatim je 800 µl preneto u Zymo-Spin™ IIC kolonu i centrifugirano je 1 min na 10 000 rpm. Dobijeni supernatant je odbačen, a za sledeći korak korišćen je talog koji je preostao na koloni. Na talog koji je preostao na koloni dodato je 200 µl DNA Pre-Wash Buffer u Zymo-Spin™ IIC kolonu smeštenu u novu kolekcionu tubu i centrifugirano 1 min na 10 000 rpm. Nakon završenog centrifugiranja 500 µl Soil DNA Wash Buffer dodato je u Zymo-Spin™ IIC kolonu i centrifugirano je 1 min na 10 000 rpm. Zymo-Spin™ IIC kolona prenet je u čistu epruveticu u koju je dodato 50 µl DNA Elution Buffer direktno na membranu kolone. Nakon 10 min izvršeno je centrifugiranje u trajanju od 30 s i 10 000 rpm, kako bi se eluirala DNK. Eluirana DNK prenet je u pripremljenu Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filters smeštenu u čistu tubicu a zatim je izvršeno centrifugiranje 1 min na 8 000 rpm. Ekstrahovana DNK čuvana je u zamrzivaču na - 20°C.

Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Lančana reakcija polimeraze (PCR) primenjena je u cilju identifikacije ispitivanih izolata kvasaca. Kod svih izolata izvršeno je umnožavanje odgovarajućeg segmenta DNK iz D1/D2 regiona pomoću univerzalnih prajmera za taj region NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' i NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) (Kurtzman i Robnett, 1997). PCR reakcije obavljene su u radnoj zapremini od 50 µl koju čine: 0,2 mM dNTP (KapaBiosystems, UK), 1 U HotStart DNA Polymerase (KapaBiosystems, UK), po 0,5 µM svakog prajmera (100

pmol/μl, Metabion International, Nemačka), 20 ng DNK i odgovarajuća količina Rnase-free vode (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf). U svakoj PCR reakciji kao negativna kontrola korišćena je smeša sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNK u koju je umesto DNK uzorka dodavana molekularna RNase-free voda. PCR reakcije izvedene su u termosajkleru (Kyratec, Australia) pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina u trajanju od 2 min pri 94°C; 30 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije 30 s pri 94°C, hibridizacije (*annealing*) 30 s pri 52°C, elongacije prajmera 60 s pri 72°C praćeno finalnom elongacijom od 7 min pri 72°C (Marshall et al., 2003).

Vizuelizacija PCR produkata

Vizuelizacija PCR produkata obavljena je razdvajanjem na 1 % agaroznom gelu koji je pripremljen rastvaranjem agaroze u 1 x tris-borat-EDTA puferu (TBE) (Fermentas, Litvanija). PCR produkt zapremine 5 μl pomešan je sa 0,5 μl boje Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH) i dodat u bunariće. Očekivana veličina fragmenata iznosila je ~ 600 bp. Određivanje veličine produkta izvršeno je poređenjem sa *ladder*-om (Nippon Genetics Europe GmbH). Elektroforeza je izvedena pri konstantnoj struji od 100 V u trajanju od 40 min u aparatu za horizontalnu elektroforezu (Advance, Mupid-One, Japan). Dobijeni fragmenti posmatrani su u komori transiluminatora (Nippon Genetics Europe GmbH). Prisustvo jednog DNK fragmenata očekivane dužine označeno je kao pozitivna reakcija. PCR produkti sekvencionirani su na ABI 3730XL Sequencer-u (Macrogen, Inc., Seul, Koreja) u oba smera korišćenjem istih prajmera kao pri amplifikaciji.

Poravnavanje sekvenci izvršeno je uz pomoć Clustal W 2.0 algoritma (Larkin et al., 2007) i MEGA5 softvera (Tamura et al., 2011.). Potom su sekvence obrađene u programu FinchTV Version 1.4.0., određene su im konsenzus nukleotidne sekvence i deponovane su u GenBank bazu podataka u okviru National Center for Biotechnology Information (NCBI), gde im je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession Number).

4.3.6. Enzimska karakterizacija izolata

Enzimska karakterizacija izolata izvršena je API ZYM testom (bioMérieux, Francuska) prema uputstvu proizvođača. API ZYM omogućava semikvantitativno određivanje enzimске aktivnosti kroz 19 reakcija u veoma malim zapreminama uzoraka. Za ovaj test korišćena je tečna kultura izolata starosti 24 h u YPD medijumu, koja je dodata u tubice. Nakon inkubacionog perioda (4 sata na 37°C), u svaku reakcionu tubicu dodata je po jedna kap reagenasa ZYM A i ZYM B (bioMérieux, Francuska), a posle pet minuta vizuelno je ocenjena promena boje i poređena sa API ZYM Colour Chart-om.

4.3.7. Priprema uzoraka kvasaca za snimanje na Ramanu

Za karakterizaciju kvasaca koji pripadaju različitim rodovima korišćen je Raman mikroskop XploRA (Horiba Jobin Yvon, Japan). Čista kultura ispitivanog soja kvasca inkubirana je 24 h/28°C na YPD medijumu. U ependorf je dodato 1 ml sterilne destilovane vode i čista kultura. Sadržaj u ependorfu je homogenizovan u vorteksu, a zatim centrifugiran (3000 rpm, 2 min). Nakon centrifugiranja, supernatant je pažljivo izvučen. Postupak je ponovljen tri puta. Nakon poslednjeg trećeg centrifugiranja odstranjen je supernatant i dodato je 1 ml sterilne destilovane vode uz homogenizovanje u vorteksu. Nakon toga, 0,1 ml iz jednog ependorfa preneto je u drugi u kome se nalazilo 0,9 ml sterilne destilovane vode. Pripremljena suspenzija ispitivanog kvasca naneta je na kvarcnu pločicu. Snimanje uzoraka vršeno je Raman mikroskopom na sobnoj temperaturi, u oblasti talasnih brojeva od 500 do 3200 cm⁻¹, primenom lasera talasne dužine od 532 nm, sa rešetkom od 1200 zarezova po 1 mm. Merenje je vršeno sa korakom od 3 cm⁻¹. Dijametar snopa na uzorku iznosio je ~ 1 μm, dok je ukupno vreme snimanja po ćeliji bilo 20 s.

4.4. Direktni mehanizmi stimulacije biljnog rasta

U okviru direktnih mehanizama stimulacije biljnog rasta praćeni su: produkcija amonijaka i indolsirćetne kiseline, rastvorljivost fosfata i transformacija azotnih jedinjenja.

4.4.1. Produkcija indol-sirćetne kiseline (IAA)

Sposobnost produkcije indolsirćetne kiseline (IAA) određena je kolorimetrijskom metodom (Xin et al., 2009). Kulture starosti 24 h zasejane su u 5 ml YPD medijuma čiji je sastav: ekstrakt kvasca 10 g/l, pepton 2 g/l, l-triptofan 100 µg/ml, destilovana voda 1 l.

Inkubacija je trajala 7 dana pri temperaturi od 28°C i 150 rpm (Biosan ES-20, Letonija). Nakon inkubacije, 2 ml suspenzije kvasca preneto je u tubice za centrifugiranje na 8000 rpm u trajanju od 5 min (Mini Spin, Eppendorf, Nemačka). Supernatant zapremine 0,5 ml prenet je u staklenu epruvetu i pomešan sa 0,5 ml Salkowski reagensa čiji je sadržaj: 0,5 M kristalnog gvožđe (III)-hlorida ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) 2 ml i 35 % perhlorna kiselina (HClO_4) 98 ml (Gordon i Weber, 1951). Smeša je homogenizovana u vorteksui inkubirana u mraku, na sobnoj t°C u trajanju od 30 minuta.

Rastvor L-triptofana (Sigma Aldrich, USA), koncentracije 1 mg/ml pripremljen je u destilovanoj vodi, sterilisan je kroz filter promera 0,2 µm (Minisart, Sartorius), a nakon toga dodat je u podlogu do finalne koncentracije od 100 µg/ml l-triptofana.

Očitavanje apsorbance izvršeno je na 530 nm (T70 UV/VIS Spectromer, PG Instruments LTD, Velika Britanija). Dobijene vrednosti upoređene su sa vrednostima standardne krive IAA, a količina proizvedene IAA od strane izolata izražena je u µg/ml. Standardna kriva IAA konstruisana je rastvaranjem 10 mg sintetičke IAA (Sigma-Aldrich, USA) u 10 ml acetona. Ovaj rastvor korišćen je za pripremu serije rastvora potrebne za standardnu krivu čije su koncentracije iznosile: 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml i 100 µg/ml IAA. Zatim je u 1 ml svakog pojedinačnog rastvora dodato 1 ml Salkowski reagensa, inkubirano na sobnoj t°C u trajanju od 30 minuta. Očitavanje je vršeno na 530 nm (T70 UV/VIS Spectromer, PG Instruments LTD, Velika Britanija), a dobijene vrednosti su prikazane u tabeli 6.

Tabela 6. Standardna kriva u YPD medijumu

| Koncentracija IAA µg/ml | 530 nm |
|----------------------------|--------|
| 1 | 0,017 |
| 5 | 0,119 |
| 10 | 0,252 |
| 20 | 0,507 |
| 50 | 1,169 |
| 100 | 1,988 |

4.4.2. Solubilizacija fosfata

Rastvorljivost fosfata od strane svih izolata određena je metodom *in vitro* po Al-Falih-u (2005). Praćena je dinamika rastvaranja fosfata, produkcija biomase i promena pH u toku četiri nedelje.

Izolati kvasaca gajeni su u Čapek-ovom medijumu, koji je pripremljen prema sledećoj recepturi: 30 g saharoze, 2 g NaNO₃, 1 g K₂HPO₄, 0,5 g KCl, 0,5 g MgSO₄ x 7H₂O, 0,01 g FeSO₄ i 1 l destilovane vode. pH medijuma podešena je na 6 sa 2N NaOH. Podloga je zatim sterilisana u autoklavu na 121°C u trajanju od 20 min. Nakon sterilizacije u 100 ml medijuma dodato je 1 ml suspenzije u kojoj se nalazi 1,4 x 10⁵ ćelija kvasca i 1 g kalcijum- fosfata (Ca₃(PO₄)₂). Kontrolu predstavlja 100 ml neinokulisanog medijuma i 1 g Ca₃(PO₄)₂. Svaki tretman postavljen je u tri ponavljanja. Inkubacija je obavljena u šejkeru (100 rpm) četiri nedelje na temperaturi od 28°C. Nakon svake nedelje sadržaj je filtriran kroz prethodno osušen i izmeren filter papir (Whatman No.1). Biomasa kvasca određena je sušenjem filter papira u sušnici (Binder, Nemačka) do konstantne mase na 80°C/24 h. pH vrednost filtrata određena je pomoću pH-metra (Eutech 510, Thermo Scientific, Kanada).

Sadržaj rastvornog fosfata određen je po metodi P-V-16/A (Privredni pregled, 1990). Za određivanje rastvornog fosfata potrebno je pripremiti: kombinovani reagens, indikatorski rastvor fenolftaleina, standardni rastvor fosfata i sumpornu kiselinu.

1. Kombinovani reagens-pripremljen je tako što je rastvoreno 0,50 g askorbinske kiseline u 100 ml mešanog rastvora.

Priprema mešanog rastvora: rastvoreno je 0,13 g kalijum-antimon tartarata (K(SbO)C₄H₄O₆ x 3H₂O) u normalnom sudu od 1 l, a zatim je dodato 5,6 g amonijum-molibdata ((NH₄)₆MoO₂₄x4H₂O). U tako pripremljen rastvor dodato je 70 ml koncentrovane sumporne kiseline (ρ=1,84 g/ml) uz stalno mešanje sadržaja. Rastvor je ohlađen i razblažen destilovanom vodom do zapremine od 1 l.

2. Indikatorski rastvor fenolftaleina (5 g/l) -rastvoreno je 0,5 g fenolftaleina u 50 ml etil alkohola i dodato je 50 ml destilovane vode.

3. Standardni rastvor fosfata (1 ml=0,0025 mg P) -pripremljen je osnovni rastvor (1 ml=0,05 mg P) rastvaranjem 0,2197 kalijum-dihidrogen fosfata (KH₂PO₄) prethodno

osušenog na 105°C, u vodi i razblaženog do zapremine od 1 l. Standardni rastvor dobijen je razblaživanjem 50 ml osnovnog rastvora do 1 l vodom.

4. Sumporna kiselina (31:69)-Dodato je 310 ml koncentrovane sumporne kiseline ($\rho=1,84$ g/ml) u 600 ml destilovane vode. Rastvor je ohlađen i razblažen destilovanom vodom do zapremine od 1 l.

Zapremina uzorka od 50 ml za koju se smatra da sadrži manje od 25 μg rastvornog fosfora odmerena je u erlenmajer od 150 ml. Dodata je kap fenolftaleina. U zavisnosti od prisustva/odsustva ljubičaste boje, dodata je sumporna kiselina (31:69) u kapima do obezbojavanja. Na kraju je u uzorak dodato 10 ml kombinovanog reagensa i nakon 10 min, izmerena je apsorbance plave boje na 880 nm spektrofotometrijski (T70 UV/VIS Spectromer, PG Instruments LTD, Velika Britanija). Količina rastvornog fosfora u mg/l očitana je iz odnosa apsorbance iz kalibracionog dijagrama.

Konstrukcija kalibracionog dijagrama

U normalni sud od 50 ml odmerena je zapremina radnog standardnog rastvora prema tabeli 7.

Tabela 7. Priprema standardnog rastvora

| Red. br. | Zapremina standardnog rastvora u ml 1ml=0,01 mg PO_4^{3-} ili 0,003261mg PO_4^{3-} -P | Odgovarajuća koncentracija u mg PO_4^{3-} /l | Odgovarajuća koncentracija u mg PO_4^{3-} -P/l |
|----------|---|---|---|
| 1 | 0* | 0* | 0* |
| 2 | 0,2 | 0,04 | 0,0130 |
| 3 | 0,5 | 0,1 | 0,0326 |
| 4 | 1,0 | 0,2 | 0,0652 |
| 5 | 2,0 | 0,4 | 0,1304 |
| 6 | 4,0 | 0,8 | 0,2608 |
| 7 | 7,0 | 1,4 | 0,4564 |
| 8 | 10 | 2,0 | 0,6520 |

* rastvor blanka

Razvijanje boje standardnih rastvora za upoređivanje: U odmerni sud od 50 ml u kome je standardni rastvor dodato je 10 ml kombinovanog reagensa. Posle 10 min određene su apsorbance boje za svaki rastvor na 880 nm (T70 UV/VIS Spectromer, PG Instruments LTD, Velika Britanija).

4.4.3. Transformacija azotnih jedinjenja

U okviru transformacije azotnih jedinjenja utvrđena je produkcija amonijaka i transformacija amonijum-sulfata do nitrata.

Produkcija amonijaka

Sposobnost produkcije amonijaka određena je zasejavanjem kulture starosti 24 h u 5 ml peptonske vode (Torlak, Srbija) i inkubiranjem na 28°C u trajanju od 5 dana. Nakon inkubacije, 0,5 ml Nessler reagensa (Alfapanon, Srbija) dodato je u epruvete. Očitavanje promene boje izvršeno je 5 minuta kasnije. Pojava žute do braon boje označava pozitivnu reakciju.

Transformacija amonijum-sulfata

Transformacija amonijum-sulfata kod svih izolata je određena *in vitro* metodom po Al-Falih-u (2006). Praćene su promene pH i biomase kvasaca, kao i koncentracije nitrata nastale nitrifikacijom amonijum-sulfata ((NH₄)₂SO₄) u toku četiri nedelje.

Izolati kvasaca gajeni su u Čapek-ovom medijumu, koji je pripremljen na isti način kao i u poglavlju (4.4.2.). U 100 ml medijuma dodato je 1 ml suspenzije u kojoj se nalazilo $1,4 \times 10^5$ ćelija kvasca. Konačna koncentracija (NH₄)₂SO₄ iznosila je 100 mg/l. Kontrolu je predstavljao neinokulisani medijum sa istom količinom (NH₄)₂SO₄. Inkubacija je obavljena u šejkeru (100 rpm) četiri nedelje na temperaturi od 28°C. Biomasa i pH vrednost određeni su na isti način kao i kod oglada sa fosfatima (4.4.2.).

Određivanje sadržaja nitrata

Sadržaj nitrata određen je prema metodi 4500-NO₃-B (APHA, 1999). Za određivanje nitrata potrebno je pripremiti: 1 M HCl osnovni rastvor nitrata (Merck, Nemačka).

Priprema rastvora: Rastvor 1 M HCl pripremljen je tako što je odmereno 4,15 ml koncentrovane HCl (37 %) u normalni sud od 50 ml.

Za kalibracionu krivu pripremljeni su: slepa proba-50 ml destilovane vode i osnovni rastvor nitrata (od koga su pripremljeni standardni rastvori za kalibracionu krivu) koncentracije 1000 mg/l (Merck, Nemačka).

Standardni rastvori za kalibracionu krivu pripremljeni su u sledećim koncentracijama: 10 mg/l, 20 mg/l i 40 mg/l. Na 50 ml standardnog rastvora i uzorka dodato je 1 ml 1M

HCl. ApSORBANCA je očitana spektrofotometrijski (T70 UV/VIS Spectromer, PG Instruments LTD, Velika Britanija) na 220 nm i 275 nm. Sadržaj nitrata izračunat je po obrascu (APHA, 1999):

$$abs(NO_3) = abs_{220nm} - 2 \times abs_{275nm}$$

4.5. Antifungalna aktivnost izolata

Za ispitivanje antagonizma kvasaca prema fitopatogenim gljivama korišćen je test dvojnih kultura na krompir-dekstroznoj hranljivoj podlozi (PDA; Merck, Nemačka).

U istraživanju korišćene su fitopatogene vrste *Botrytis cinerea* i *Pythium aphanidermatum* (kulture iz kolekcije Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd, Srbija). Za potrebe ovog ogleda, kulture gljiva osvežene su na PDA i inkubirane 7 dana (*Botrytis cinerea*) odnosno dva dana (*Pythium aphanidermatum*) na 25°C, dok su kulture kvasaca osvežene na YPD i inkubirane 24 h na 28°C. Disk prečnika 5 mm uzet je sa ivice kolonije fitopatogena i postavljen je u sredinu Petri kutije, a na udaljenosti od 3 cm zasejan je izolat kvasca u formi linije. Kao kontrola, disk micelije fitopatogena zasejan je na PDA podlogu na istoj poziciji, ali bez izolata kvasaca. Tokom sedam dana posmatrana je interakcija kvasaca i *Botrytis cinerea* na temperaturi od 25°C, a za interakciju sa *Pythium aphanidermatum* taj period je trajao dva dana na istoj temperaturi. Nakon inkubacije zabeležen je rast gljiva u kontroli i na Petri kutijama u kojima su prisutne obe kulture. Ogled je izveden u tri ponavljanja, a procenat inhibicije izračunat je prema obrascu (Siripornvisal, 2010):

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

gde je: I %-procenat inhibicije patogena; r_0 -poluprečnik kolonije patogena na kontrolnoj Petri kutiji (mm); r -poluprečnik kolonije patogena u testu dvojnih kultura (mm).

4.6. Uticaj odabranih izolata na rast biljaka

Na osnovu rezultata dobijenih posle ogleda koji su uključivali produkciju IAA, rastvorljivost fosfata i transformaciju azotnih jedinjenja, izabrana su četiri izolata (BK0302D, CK2404I, 2TD2912B i 3TD0905L) i konzorcijum izabranih izolata za praćenje njihovog uticaja na rast biljaka.

Kulture kvasaca starosti 24 h presejane su u 10 ml sterilnog YPD medijuma. Nakon inkubacije od 48 h na temperaturi od 28°C kulturama kvasaca inokulisano je 100 ml medijuma (YPD) u sterilnim uslovima. Inkubacija je trajala 48 h na temperaturi od 28°C. Nakon inkubacije ćelije kvasaca oborene su centrifugiranjem u trajanju od 10 min i 6000 rpm (5804 R, Eppendorf, Nemačka), a zatim isprane 2 x sterilnom destilovanom vodom. Konačan broj kvasaca za inokulaciju podešen je pripremom razređenja sterilnom vodovodskom vodom na 10^8 CFU ml⁻¹ što odgovara apsorbanci od 0,5 na 780 nm (T70 UV/VIS Spectromer, PG Instruments LTD, Velika Britanija).

Pripremljeni su inokulumi pojedinačnih kultura kvasaca i njihovog konzorcijumau odnosu: 1:1:1:1. U ogledu su korišćeni sledeći tretmani:

1. BK0302D-seme inokulisano suspenzijom izolata BK0302D;
2. CK2404I-seme inokulisano suspenzijom izolata CK2404I;
3. 2TD2912B-seme inokulisano suspenzijom izolata 2TD2912B;
4. 3TD0905L-seme inokulisano suspenzijom izolata 3TD0905L;
5. Konzorcijum: Seme inokulisano mešavinom izolata u odnosu 1:1:1:1;
6. KD: negativna kontrola;
7. FS: pozitivna kontrola.

Semena izabranih kultura (slačica-*Sinapis alba* L., pšenica-*Triticum vulgare* L., crvena detelina-*Trifolium pretense* L., suncokret-*Helianthus annuus* L. i zelena salata-*Lactuca sativa*) sterilisana su potapanjem u 70 % etanol u trajanju od 2 min uz blago mešanje. Nakon toga semena su preneti u 2 % rastvor natrijum-hipohlorita (NaOCl) u trajanju od 15 minuta. Ispiranje semena izvršeno je sterilnom destilovanom vodom (5-10x), a posle toga semena su potopljena u rastvor koji je sadržao 600 mg/l penicilina i 250 mg/l streptomocina u trajanju od 30 min. Nakon ovog, semena su osušena u aseptičnim uslovima, u laminarnoj komori. Provera sterilnosti izvršena je postavljanjem suvih semena na hranljivu podlogu (MPA) i inkubiranjem na 30°C u trajanju od 48 h. Odsustvo bakterijskog rasta potvrda je sterilnosti semena.

Inokulacija semena biljaka pripremljenim inokulumima obavljena je na temperaturi od 25°C pri 100 rpm (Biosan ES-20, Letonija) u trajanju od 1 h. Semena odabranih kultura (50 semena po posudi) posejana su u plastične posude napunjene sa 0,5 kg deposola iz rudarskog basena RB Kolubara (Srbija). Pozitivnu kontrolu (FS) predstavlja neinokulisano seme gajeno u komercijalnom supstratu (Floradur®Plant Universal,

FloraGard, Nemačka), a negativnu neinokulisano seme gajeno u deposolu (KD). Ogled je trajao 15 dana u laboratorijskim uslovima, pri intenzitetu svetlosti od 14 000 lux-a (MH Philips 600W), dužini dana od 12 h i temperaturi od $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

Ogled je postavljen u tri ponavljanja. Na kraju ogleda zabeleženi su podaci o visini biljke, dužini korena i ukupnoj suvoj biomasi. Suva biomasa određena je sušenjem u sušnici (Binder, Nemačka) do konstantne mase na 50°C u trajanju od 24 h.

4.7. Kvasci i bioakumulacija bakra

Izabrana su četiri izolata (Avin1312L, BK0302D, 3TD0905L i 4TD1101S), koji su pokazali najbolji rast pri koncentraciji od 2 mM kristalnog bakar-sulfata ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$).

Svi izolati gajeni su na YPD agaru (100 ml), kojem je nakon sterilizacije (121°C i 20 minuta) dodat $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ u sledećim koncentracijama: 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM i 2 mM. Formiranje kolonija na podlogama sa dodatkom $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ nakon 72 h inkubacije pri 28°C u mraku, smatrano je pozitivnim rezultatom.

U 100ml YPD tečnog medijuma nakon sterilizacije, dodato je 2 mM $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ i inokulisano izabranim izolatima starosti 24 h pri čemu je njihova konačna koncentracija u medijumu iznosila 10^8 CFU ml^{-1} . Inkubacija je obavljena u termostatirajućem šejkeru (Biosan ES-20, Letonija) četiri dana na temperaturi od 28°C i 150 rpm. Kontrolu predstavlja 100 ml neinokulisanog medijuma, kome je dodat $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ u koncentraciji od 2 mM. Ogled je postavljen u tri ponavljanja. Nakon završenog perioda inkubacije, sadržaji erlenmajera filtrirani su kroz prethodno osušen i izmeren filter papir (Whatman No.1). Biomasa izabranih izolata određena je sušenjem do konstantne mase na $80^\circ\text{C}/24$ h.

Određivanje sadržaja Cu^{2+} metodom ICP-OES

Ukupan sadržaj bakra (Cu^{2+}) akumuliranog u ćelijama kvasaca određen je ICP-OES metodom (Thermo Scientific iCAP 6500 Duo). Za kiselinsku digestiju korišćen je zatvoren sistem mikrotalasne pećnice „Berghof MWS-3+”. Osušeni i usitnjeni uzorci, mase 0,3 g, digestovani su u teflonskim sudovima uz dodatak 7 ml koncentrovane HNO_3 (65 %) i 2 ml H_2O_2 (30 %). Digestija u sistemu mikrotalasne pećnice podešena je na sledeće uslove: 160°C u trajanju od 5 minuta, 190°C u trajanju od 5 minuta i 210°C u

trajanju od 10 minuta. Snaga mikrotalasa u svakoj fazi bila je do 80 %. Za pripremu reagenasa, standarda i uzoraka korišćena je ultra čista voda provodljivosti 0,55 $\mu\text{S}/\text{cm}$, tj. otpornosti 18,2 $\text{M}\Omega\text{cm}$ na 25°C. Nakon digestije, sadržaj je prenet u normalni sud zapremine od 25 ml i dopunjen 0,1 M HNO_3 do zapremine od 25 ml. Blank rastvor pripremljen je na isti način kao i uzorak. Za konstruisanje kalibracione krive korišćen je standardni rastvor Cu (J.T.Baker, U.S.A.). Sva merenja rađena su u tri ponavljanja, a dobijeni rezultati (mg/kg), preračunati su u procenete u odnosu na kontrolu.

Raman analiza kvasca sa najvećim procentom bioakumulacije

Nakon ICP-OES metode izvršena je i analiza ćelija kvasca (4TD1101S) u medijumu bez i sa dodatkom 2 mM Cu^{2+} pomoću Raman spektroskopije. Priprema uzorka obavljena je na isti način, kao što je opisano u poglavlju (4.7.).

4.8. Statistička obrada rezultata

Za statističku obradu podataka dobijenih u ogledu u kome su praćeni transformacija azotnih jedinjenja i solubilizacija fosfata, korišćena je statistica software 8.0 jednofaktorska analiza varijanse, dok je Tukey-ev test korišćen kako bi se odredila statistički značajna razlika ($\alpha=0.05$) između srednjih vrednosti. Za određivanje korelacije između promenljivih korišćen je Pearson Correlation Coefficient Calculator (www.socscistatistics.com/tests/pearson).

Za statističku obradu podataka dobijenih u ogledu u kome je praćen uticaj izolata na rast biljaka, korišćena je statistica software 8.0 jednofaktorska analiza varijanse, a međusobne razlike između pojedinačnih tretmana testirane su Tukey-im testom.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Mikrobiološka karakterizacija zemljišta

Ključni ekosistemski procesi u zemljištu kao što je kruženje nutrijenata, razlaganje ugljenika i transformacija organske materije zavisi od zemljišnih bakterija i gljiva (Trivedi et al., 2013). Diverzitet bioloških zajednica u zemljištu je od ključnog značaja za održavanje života na našoj planeti. Iako čine manje od 0,5 % (w/w) od ukupne mase zemljišta, raznovrsne mikrobne populacije imaju značajnu ulogu u biološkoj kontroli, procesima transformacije organske materije, nastanka biljnih asimilativa, održavanju strukture zemljišta i degradaciji organskih zagađivača (Amato i Ladd, 1994; Yan et al., 2015). Za proučavanje mikrobnog diverziteta pored klasičnih (direktnih i indirektnih) metoda se koriste i savremene molekularne metode, koje omogućavaju bolje upoznavanje sa strukturom zemljišnih bakterijskih zajednica (Chodak et al., 2015).

Zemljište je izuzetno heterogena sredina sa ogromnim brojem raznovrsnih populacija (Daniel, 2005). Uprkos tome što je sadržaj izvora hrane i energije u zemljištu u poređenju sa optimalnim koncentracijama za rast mikroorganizama u *in vitro* uslovima značajno nižibrojnost bakterijskih populacija se kreće od 10^3 do 10^6 "vrsta" po gramu zemljišta (Fierer i Jackson, 2006).

Uzorci 2T, 3T, 4T, B, C i E sadrže povećan sadržaj organskih zagađivača poput policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH), polihlorovanih bifenila (PCB) i organokalajnih jedinjenja (Jovičić Petrović et al., 2014) i odlikuju se sa slabo baznom pH vrednošću. Za procenu sastava bakterijskih zajednica u zemljištu, neophodno je uzeti u obzir hemijske karakteristike zemljišta (Chodak et al., 2015). Mikrobiološka analiza uzoraka zemljišta pokazala je visoku brojnost ukupnih i sporogenih bakterija, amonifikatora i aktinomiceta. Prisustvo velikog broja pojedinih grupa mikroorganizama u opsegu 10^5 - 10^7 CFU/g, ukazuje da se u zemljištu odvijaju intenzivni mikrobiološki procesi, kao i da je moguće odvijanje mikrobioloških transformacija. Jedan od parametara biogenosti zemljišta je i ukupan broj bakterija (Mandić et al., 2005). Razlike u brojnosti ukupnih bakterija u ispitivanim uzorcima mogu se povezati sa mehaničkim sastavom zemljišta, kao i sa njegovim fizičko-hemijskim karakteristikama (Ilić et al., 2016).

Tabela 8. Broj mikroorganizama (CFU/g) i pH u zemljištu

| Uzorci | Ukupne bakterije $\times 10^7$ | Gljive $\times 10^4$ | Aktinomicete $\times 10^5$ | Amonifikatori $\times 10^6$ | Sporogene bakterije $\times 10^6$ | Ukupni slobodni azotofiksatori $\times 10^4$ | pH |
|--------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---|------|
| 2T | 0,47 | 2,40 | 1,61 | 3,49 | 0,94 | 3,31 | 7,31 |
| 3T | 2,22 | 1,30 | 2,40 | 9,18 | 2,11 | 4,45 | 7,29 |
| 4T | 1,42 | 3,00 | 2,18 | 4,68 | 0,24 | 1,87 | 7,87 |
| B | 0,46 | 1,70 | 0,78 | 0,65 | 0,14 | 0,25 | 7,50 |
| C | 0,53 | 0,30 | 1,58 | 1,09 | 0,09 | 0,04 | 7,35 |
| E | 1,14 | 3,50 | 2,35 | 5,46 | 1,57 | 4,42 | 7,11 |
| Avin | 6,52 | 2,20 | 2,65 | 1,20 | 0,68 | 1,56 | 7,65 |
| Cvin | 5,81 | 2,36 | 4,46 | 1,26 | 0,44 | 2,72 | 7,95 |
| 1 | 0,89 | 6,80 | 2,74 | 0,68 | 0,44 | 2,60 | 7,77 |
| 2 | 0,90 | 6,60 | 2,67 | 0,42 | 0,15 | 2,90 | 8,08 |
| SK | 59,80 | 8,00 | 2,52 | 38,60 | 4,00 | 5,00 | 6,95 |

Brojna istraživanja ukazuju da su promene u mikrobnim zajednicama u zemljištu često veoma snažno povezane sa hemijskim karakteristikama zemljišta (Lauber et al., 2009; Jenkins et al., 2009).

Poređenjem dobijenih rezultata mikrobioloških analiza zemljišta uzorkovanih iz gradskog parka (Tivat, Crna Gora) je uočena razlika u brojnosti mikroorganizama (Tabela 8), koja je posledica heterogenosti zemljišta na toj lokaciji. Zemljišni ekosistemi su složene dinamične sredine u kojima fizički i hemijski faktori variraju u vremenu, prostoru, a mikrobiološka aktivnost i diverzitet vrste uglavnom je pod uticajem fizičkih i hemijskih karakteristika, klime i vegetacije (Sharma i Mishra, 1992). Ukupan broj bakterija bio je najveći u uzorku 3T ($2,22 \times 10^7$ CFU/g), a najmanji u uzorku B ($4,60 \times 10^6$ CFU/g); najveća brojnost gljiva bila je u uzorku E ($3,50 \times 10^4$ CFU/g), a najmanja u uzorku C ($3,00 \times 10^3$ CFU/g); najveća brojnost aktinomicetabila je u uzorku 3T ($2,40 \times 10^5$ CFU/g), a najmanja u uzorku B ($7,80 \times 10^4$ CFU/g); najveća brojnost amonifikatorabila je u uzorku 3T ($9,18 \times 10^6$ CFU/g), a najmanja u uzorku B ($6,50 \times 10^5$ CFU/g); najveća brojnost sporogenih bakterijabila je u uzorku 3T ($2,11 \times 10^6$

CFU/g), a najmanja u uzorku C ($9,00 \times 10^4$ CFU/g) i najveća brojnost slobodnih azotofiksatora bila je u uzorku 3T ($4,45 \times 10^4$ CFU/g), a najmanja u uzorku C ($4,00 \times 10^2$ CFU/g).

Između uzoraka Avin i Cvin, uzorkovanih u poljoprivrednom zemljištu na poljoprivrednom školskom dobru Radmilovac su utvrđene razlike u brojnosti mikroorganizama. Najveća brojnost gljiva ($2,36 \times 10^4$ CFU/g), aktinomiceta ($4,46 \times 10^5$ CFU/g), amonifikatora ($1,26 \times 10^6$ CFU/g) i slobodnih azotofiksatora ($2,72 \times 10^4$ CFU/g) je određena u uzorku Cvin, dok je najveća brojnost ukupnih bakterija ($6,52 \times 10^7$ CFU/g) i sporogenih bakterija ($6,80 \times 10^5$ CFU/g) određena u uzorku Avin (Tabela 8).

U poljoprivrednim zemljištima na diverzitet mikrobnih populacija utiču primenjene prakse upravljanja zemljištem, obrada zemljišta, navodnjavanje i upotreba đubriva (Hoffman et al., 2006). Poređenjem dobijenih rezultata mikrobioloških analiza zemljišta uzorkovanih iz vinograda (Radovanović) je utvrđeno da između uzoraka 1 i 2 nema značajnijih razlika u pogledu brojnosti ukupnih bakterija, gljiva, aktinomiceta i ukupnih slobodnih azotofiksatora (Tabela 8). U uzorku 1 bila je najveća brojnost amonifikatora ($6,80 \times 10^5$ CFU/g) i sporogenih bakterija ($4,40 \times 10^5$ CFU/g).

U odnosu na druge ispitivane uzorkenajveća brojnost ukupnih bakterija ($5,80 \times 10^8$ CFU/g), gljiva ($8,00 \times 10^4$ CFU/g), amonifikatora ($3,86 \times 10^7$ CFU/g), sporogenih bakterija ($4,00 \times 10^6$ CFU/g) i azotofiksatora ($5,00 \times 10^4$ CFU/g) bila je u rizosferi trske (SK). Preko korena, biljke izlučuju organska jedinjenja (šećere, organske kiseline, amino kiseline i vitamine) koja utiču na aktivnost zemljišnih mikroorganizama (Nasrin i Rahman, 2007). Takođe kvasci svoju biomasu povećavaju konzumiranjem biljnih eksudata i urizosferi (Yurkov et al., 2008). Oslobođena organska materija iz korena predstavlja izvor hrane i energije za aktivan razvoj mikrobnih populacija oko korena što se odražava na odvijanje različitih mikrobnih procesa, kao i njihovu ukupnu biomasu u rizosferi. Ova jedinjenja čine oko 5 % biljne mase i imaju značajan uticaj na kvalitativni i kvantitativni diverzitet mikroorganizama (Mrkovački et al., 2012). Istraživanja vezana za rizosferu trske ukazuju da semikrobiološka aktivnost, bogatstvo i diverzitet smanjuju od leta do jeseni, a da genetsko bogatstvo i biodiverzitet gljiva zavisi od hidrološkog režima (Ma et al., 2014).

Na aktivnost i zastupljenost pojedinih grupa mikroorganizama u zemljištu utiče veliki broj faktora: tip zemljišta, prisustvo teških metala, organskih zagađivača, način obrade, primena organskih i mineralnih đubriva i pesticida (Hoffman et al., 2006). Takođe, dugotrajno izlaganje mikroorganizama različitim vrstama stresa u zemljištu utiče na njihovu zastupljenost, ali ne i na metaboličku aktivnost (Griffiths et al., 2000).

Amonifikacija predstavlja ključan proces u ciklusu azota u zemljištu i u ovom procesu učestvuju različite mikrobne populacije. U ispitivanim uzorcima, najveća brojnost amonifikatora ($3,86 \times 10^7$ CFU/g) bila je u zemljištu SK, a najmanja ($4,20 \times 10^5$ CFU/g) u uzorku 2 (Tabela 8). Tintor et al. (2009) su utvrdili da je brojnost ove grupe mikroorganizama najmanje osetljiva na promenu kako fizičkih, tako i hemijskih parametara u zemljištu. Prema Alexanderu (1977) njihova zastupljenost zavisi od količine i vrste supstrata, ekoloških faktora i biljnih vrsta.

Sporogene bakterije su dominantna grupa u zemljištima sa izraženim mobilizacionim procesima, jer su u stanju da koriste i mineralna jedinjenja azota (Tešić i Todorović, 1988). Najveća brojnost ove grupe mikroorganizama bila je u uzorku SK ($4,00 \times 10^6$ CFU/g), a najmanja u uzorku B ($1,40 \times 10^5$ CFU/g).

Gljive imaju značajnu ulogu u transformaciji organskih jedinjenja, a najveća brojnost ove grupe mikroorganizama ($8,00 \times 10^4$ CFU/g) bila je u uzorku SK, a najmanja ($1,30 \times 10^4$ CFU/g) u uzorku C (Tabela 8). Relativno velika brojnost populacija gljiva u ispitivanim uzorcima ukazuje da gljive imaju široku amplitudu optimalne vrednosti pH (Rousk et al., 2010).

Aktinomicete su po svojoj zastupljenosti u mnogim zemljištima odmah iza bakterija (Takisawa et al., 1993), pri čemu najveći broj vrsta pripada rodu *Streptomyces* (Goodfellow i Simpson, 1987). Najveća zastupljenost ove grupe mikroorganizama bila je u uzorku 2 ($2,67 \times 10^5$ CFU/g), a najmanja ($7,80 \times 10^4$ CFU/g) u uzorku B (Tabela 8). Predstavnik slobodnih azotofiksatora je *Azotobacter* sp. koji predstavlja važan pokazatelj plodnosti zemljišta. Aerobni slobodni azotofiksatori zastupljeni su u skoro svim tipovima zemljišta. Njihova brojnost u ispitivanim uzorcima kretala se od 10^3 - 10^4 CFU/g, a najveća brojnost ($5,00 \times 10^4$ CFU/g) bila je u uzorku SK (Tabela 8).

Diverzitet i brojnost mikroorganizama u ispitivanim uzorcima zemljišta, ukazuju na njihov doprinos u stvaranju i održavanju stabilnosti ekosistema (Garbeva et al., 2004).

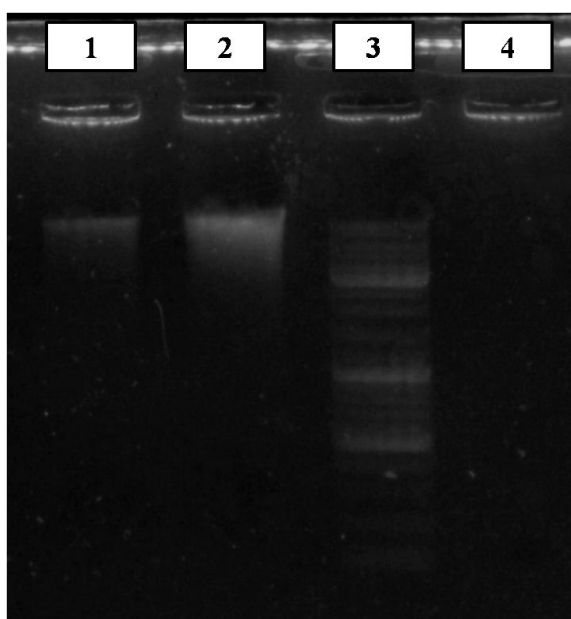
Ogromnu raznolikost mikrobnih populacija u zemljištu je teško proučavati i zbog nedostataka metode agarnih ploča, sastav i složenost zemljišnih mikrobiota je uglavnom ostala neistražena ili potcenjena. Procenjuje se da oko 99-99,9 % bakterijskih populacija se ne može, ili se veoma teško, gajiti na hranljivim podlogama (Torsvik i Ovreas, 2002). Razlozi izostanka rasta na hranljivim medijumima mogu biti različiti, kao što je niska stopa rasta ili spor rast (Vartoukian et al., 2010). Neke bakterijske populacije mogu imati stroge i specifične nutritivne zahteve i zbog toga ne rastu na konvencionalnim podlogama (Kopke et al., 2005). Dodatno, rast može biti onemogućen i sekrecijom antibakterijskih supstanci u medijumu (Tamaki et al., 2005). Takođe, može se desiti da bakterije ne mogu da rastu u monokulturi u odsustvu signalnih molekula koje otpuštaju bakterijske populacije prisutne samo u okviru prirodnih staništa (Lewis, 2007). Osim toga, mikroorganizmi izolovani koristeći standardne metode kultivacije, retko su brojčano dominantniji u prirodnim sredinama, već se umnožavaju kolonije koje dobro rastu na nutritivno-bogatim hranljivim podlogama (Hugenholtz, 2002).

U poslednje vreme se koriste molekularne metode kao što je denaturaciona gel gradijent elektroforeza (DGGE) kao i metagenomski pristup. Kod ovih metoda DNK se izdvaja direktno iz uzoraka zemljišta i izbegava se korak gajenja u laboratorijskim uslovima. Ove metode mogu doprineti boljem razumevanju ogromnog biodiverziteta u zemljištu.

5.1.1. Određivanje biodiverziteta kvasaca i gljiva PCR-DGGE metodom

Važna komponenta mikrobnog diverziteta u zemljištu su i gljive koje kao glavni razlagači organske materije daju podršku ključnim procesima u kopnenim ekosistemima. Takođe, gljive predstavljaju dominantnu komponentu zemljišne mikrobne biomase. Kvasci su značajni članovi zemljišnih ekosistema i značajno doprinose opštem biodiverzitetu, ali do sada, mali broj vrsta kvasaca je poznat. Pretpostavlja se da je opisano samo oko 5 % kvasca koji postoje u prirodi (Fell et al., 2000). Međutim, znanje o raznolikosti i funkcijama zemljišnih gljivičnih biocenoza i dalje su ograničena. Molekularna metoda, koja omogućava karakterizaciju složenih mikrobnih zajednica, uključujući kvasce i gljive u različitim ekosistemima je i PCR-DGGE metod. Ove tehnike olakšaću otkrivanje gljiva, uključujući i probirljive, odnosno sojeve koji ne rastu na sintetičkim medijumima, razumevanju strukture i dinamike gljivičnih zajednica u zemljištu (Hoshino i Matsumoto, 2007). Primena molekularnih

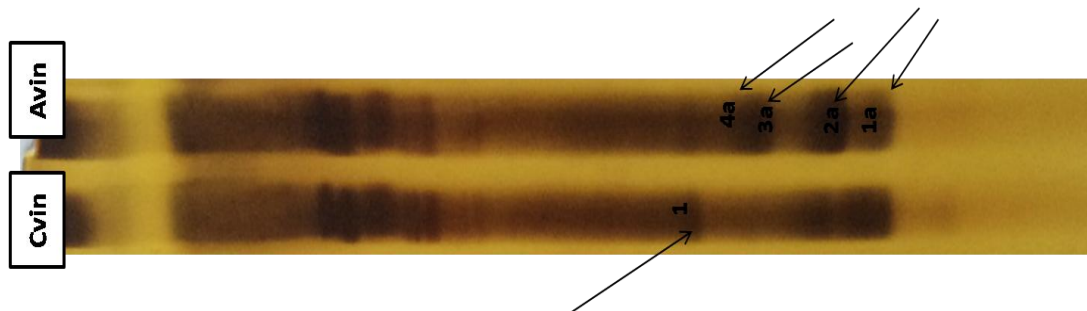
tehnika značajno je doprinela znanjima u oblasti ekologije gljiva u zemljištu u različitim ekosistemima kao što su šume (Perkiomaki et al., 2003), travnjaci (Brodie et al., 2003), poljoprivredna zemljišta (Gomes et al., 2003; Hoshino, 2012). Molekularne metode bazirane na analizi 18S ribozomalnih DNK (rDNK) fragmenata, koji su umnoženi iz rizofernog zemljišta kukuruza, klonirani i sekvencionirani, korišćeni su za određivanje biodiverziteta (Gomes et al., 2003). Na osnovu dobijenih rezultata je utvrđeno da u ranim fazama rasta kukuruza dominiraju *Ascomycetes* iz reda *Pleosporales*, dok u kasnijim fazama rasta dominiraju drugi redovi kvasaca *Ascomycetes* i *Basidiomycetes*.



Slika 5. Elektroforeza totalne DNK iz zemljišta. Kolone: 1-DNK iz zemljišta Cvin, 2-DNK iz zemljišta Avin, 3-Ladder(Nippon Genetics Europe GmbH) i 4-negativna kontrola

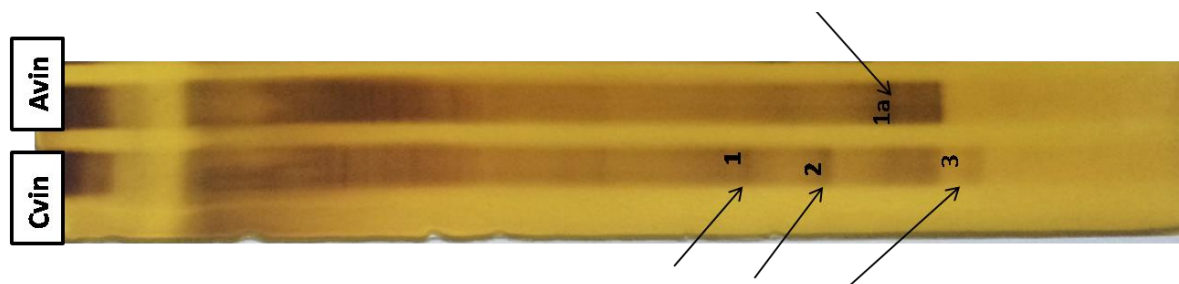
Radi utvrđivanja diverziteta gljiva i kvasaca u uzorcima zemljišta Cvin i Avin, sadržaj zemljišta je ispitivan DGGE metodom.

DGGE profil PCR fragmenata dobijenih umnožavanjem gena za 18S rRNK iz ukupne DNK (Slika 5) izolovane iz zemljišta ukazao je na razlike između ispitivanih uzoraka zemljišta. U zemljištu Avin uočene su četiri trake sa pojačanim intezitetom, koje nisu prisutne u uzorku Cvin, dok se jedna traka pojačanog inteziteta javlja samo u uzorku Cvin (Slika 6).



Slika 6. DGGE profili zemljišta dobijenih umnožavanjem konzerviranog 18S rDNK regiona prajmerima NL1 i NL4. Strelice ukazuju natrake koje su najjačeg inteziteta u uzorcima Avin (1a, 2a, 3a i 4a) i Cvin (1)

Sa druge strane DGGE profil PCR fragmenata dobijenih umnožavanjem ITS regiona iz ukupne DNK izolovane iz zemljišta ukazuje na prisustvo tri trake slabijeg inteziteta u uzorku Cvin. Ove trake nisu uočene u uzorku Avin. U uzorku Avin uočena je samo jedna traka jačeg inteziteta koja nije uočena u uzorku Cvin (Slika 7).



Slika 7. DGGE profili zemljišta dobijenih umnožavanjem konzerviranog ITS regiona prajmerima ITS1 i ITS 4. Strelice ukazuju natrake koje su najjačeg inteziteta u uzorcima Avin (1a) i Cvin (1,2 i 3)

Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da postoji razlika u diverzitetu kvasaca i gljiva između ispitivanih uzoraka. Za dalja istraživanja neophodno je primeniti dodatne metode, kako bi se došlo do utvrđivanja diverziteta do nivoa roda ili vrste.

5.2. Izolacija kvasaca iz zemljišta

Mikroorganizmi predstavljaju osnovu ekološke ravnoteže u biosferi, a sastav mikrobnih zajednica utiče na procese transformacije biljnih ostataka u zemljištu i dostupnost biljnih nutrijenata, stabilizaciju zemljišnih agregata, smanjenja erozije i održavanje zemljišnog vodnog kapaciteta (Slavikova i Vadkertiova, 2003). Kvasci, jednoćelijski eukariotni mikroorganizmi, zbog svog širokog spektra enzimskih sposobnosti su

uključenju mnoge cikluse i imaju značajnu ulogu za održavanje biodiverziteta i stabilnosti različitih ekosistema. U zemljištu kvasci mogu da koriste različite izvore ugljenika, uključujući i proizvode koji su nastali hidrolizom biljnog materijala, poput hemiceluloze, organskih kiselina i jednostavnih aromatičnih jedinjenja. Takođe, imaju značajnu ulogu u ciklusima azota i sumpora, neki imaju sposobnost da nerastvorljiv oblik fosfata prevedu u rastvorljiv, a mogu pozitivno uticati i na rast biljaka (Botha, 2011). U svetu se izuzetna pažnja poklanja bioindustrijskoj proizvodnji, pa su kvasci mnogo više proučavani sa tog aspekta, ali se ne sme zaboraviti da je zemljište ogroman rezervoar različitih vrsta kvasaca. Istraživanja vezana za kvasce u zemljištu su imala za cilj utvrđivanje njihove brojnosti i biodiverziteta, bez mnogo osvrta na funkcije u ekosistemima (Botha, 2011). Iz ovoga sledi i važnost upoznavanja diverziteta kvasaca u različitim zemljišnim ekosistemima.

Primenom metode nakupljanja na YPD podlozi i višestrukim presejavanjem su dobijene čiste kulture kvasaca, ukupno jedanaest izolata, od kojih su šest iz gradskog parka (Tivat, Crna Gora), četiri iz poljoprivrednog zemljišta, odnosno, dva izolata su iz zemljišta poljoprivrednog školskog dobra Radmilovac (Beograd, Srbija), dva izolata iz zemljišta iz vinograda Radovanović (Krnjevo, Srbija) i jedan iz rizosfere trske (Trešnja, Srbija). Čistoća kultura je proverena mikroskopski (Nikon Eclipse 50i, Japan).

Formirana je kolekcija od jedanaest čistih kultura kvasaca koja je korišćena za dalja istraživanja (Tabela 9).

Tabela 9. Oznaka i poreklo izolata kvasaca iz zemljišta

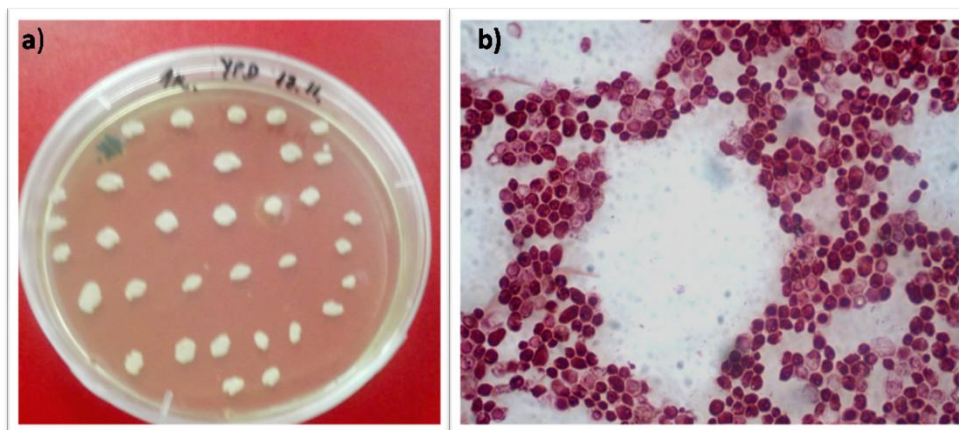
| Oznaka izolata | Poreklo izolata |
|-----------------------|--|
| 1KD1983V | zemljište iz vinograda, Radovanović |
| 2KD3007J | zemljište iz vinograda, Radovanović |
| Avin1312L | zemljište poljoprivrednog školskog dobra Radmilovac |
| Cvin1610M | zemljište poljoprivrednog školskog dobra Radmilovac |
| 2TD2912B | Gradski park, Tivat |
| 3TD0905L | Gradski park, Tivat |
| 4TD1101S | Gradski park, Tivat |
| BK0302D | Gradski park, Tivat |
| EK1605T | Gradski park, Tivat |
| CK2404I | Gradski park, Tivat |
| SK0809R | rizosfera trske |

5.3. Identifikacija i karakterizacija kvasaca iz zemljišta

Nakon izolacije i dobijanja čistih kultura izvršena je identifikacija izolata kvasaca. Izvršeno je ispitivanje morfoloških (makro i mikromorfoloških), odgajivačkih i ekoloških karakteristika. Pored primene konvencionalnih metoda, primenjene su i brze metode poput API 20C AUX sistema (BioMerieux, Francuska) za biohemijsku karakterizaciju i identifikaciju izolata, API ZYM (BioMerieux, Francuska) za enzimsku karakterizaciju, molekularne metode PCR i Raman spektroskopija.

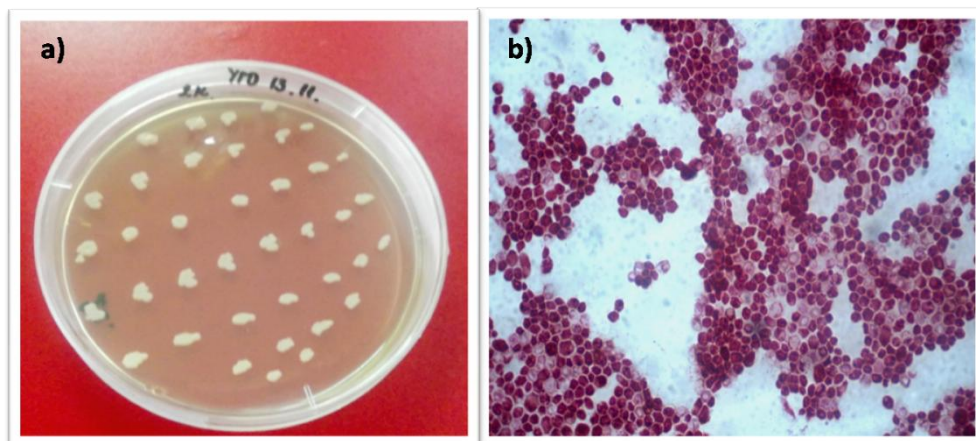
5.3.1. Morfološke, odgajivačke i ekološke karakteristike izolata kvasaca

Karakterizacija rasta kvasaca na hranljivim podlogama (makromorfološke karakteristike- oblik, boja i tekstura kolonija) i mikromorfoloških karakteristike (oblik, veličina ćelija i stvaranje micelije i pseudomicelije) je prvi korak u identifikaciji.



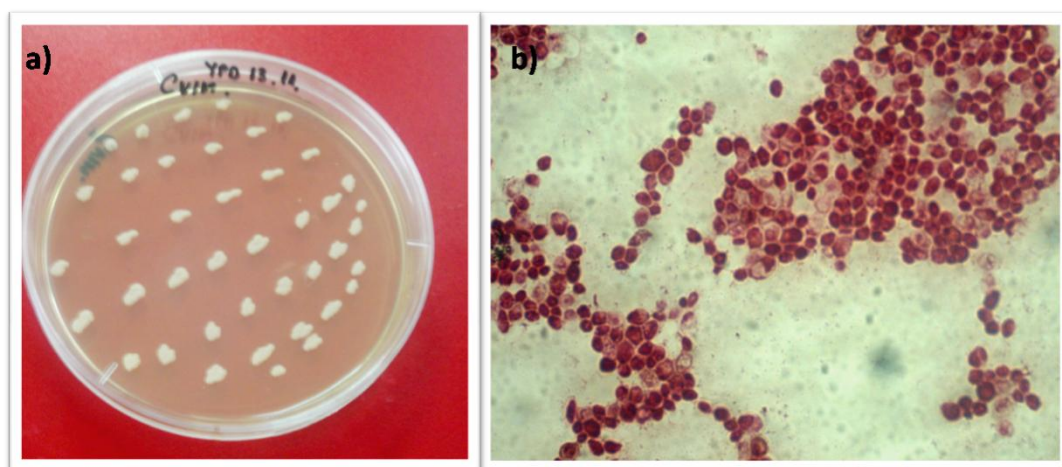
Slika 8. a) Izgled kolonija izolata 1KD1983V na YPD podlozi; b) Mikroskopski preparat izolata 1KD1983V

Izolat 1KD1983V je izolovan iz zemljišta vinograda Radovanović (Krnjevo, Srbija). Na YPD podlozi kolonije ovog izolata su bele boje, sitne i meke (Slika 8). Mikroskopskim pregledom preparata izolata 1KD1983V su uočene ćelije ovalnog oblika i veličine 3,5x5 μm . Ovaj izolat ne stvara pseudomiceliju.



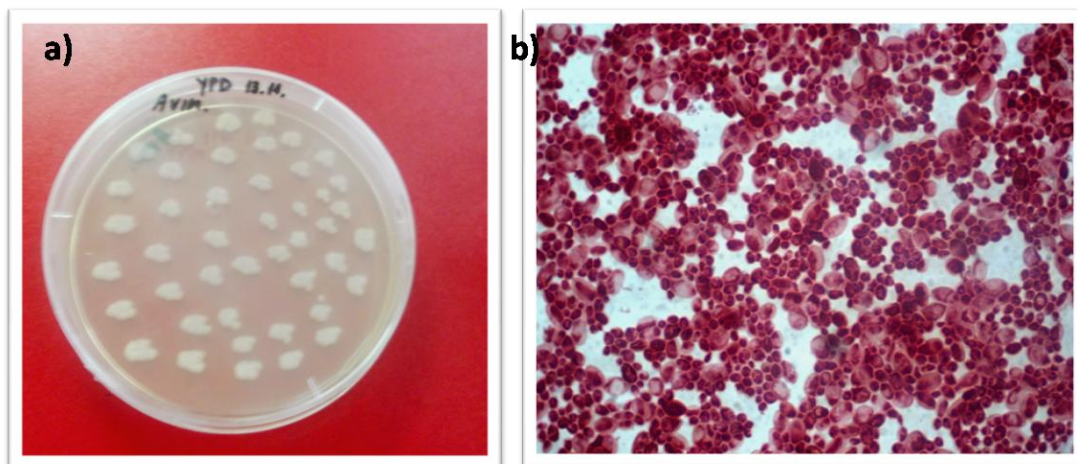
Slika 9. a) Izgled kolonija izolata 2KD3007J na YPD podlozi; b) Mikroskopski preparat izolata 2KD3007J

Izolat 2KD3007J je izolovan iz zemljišta vinograda Radovanović (Krnjevo, Srbija). Na YPD podlozi kolonije ovog izolata su krem boje, glatke i meke (Slika 9). Mikroskopskim pregledom preparata izolata 2KD3007J su uočene ćelije okruglog oblika i veličine 4x4 µm. Ovaj izolat ne stvara pseudomiceliju.



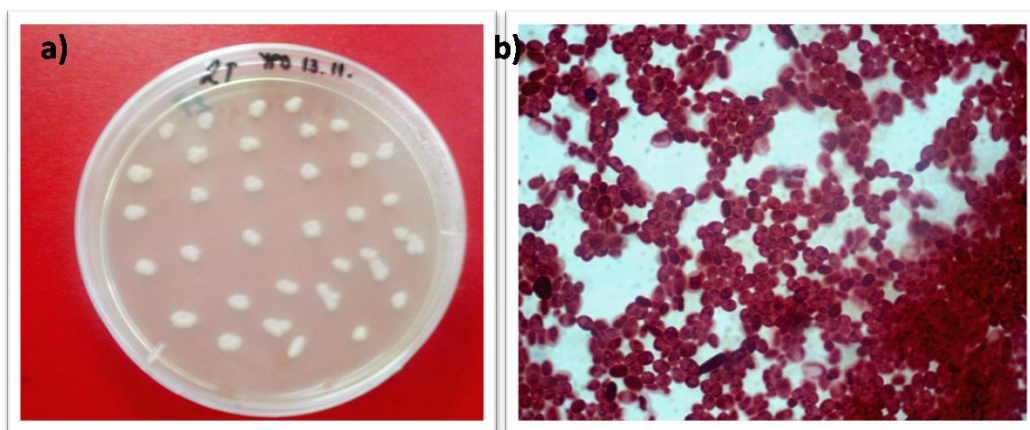
Slika 10. a) Izgled kolonija izolata Cvin1610M na YPD podlozi; b) Mikroskopski preparat izolata Cvin1610M

Izolat Cvin1610M je izolovan sa poljoprivrednog školskog dobra Radmilovac (Srbija). Na YPD podlozi kolonije ovog izolata su bele boje i glatke (Slika 10). Mikroskopskim pregledom preparata izolata Cvin1610M su uočene ćelije ovalnog oblika i veličine 4x5 µm. Ovaj izolat ne stvara pseudomiceliju.



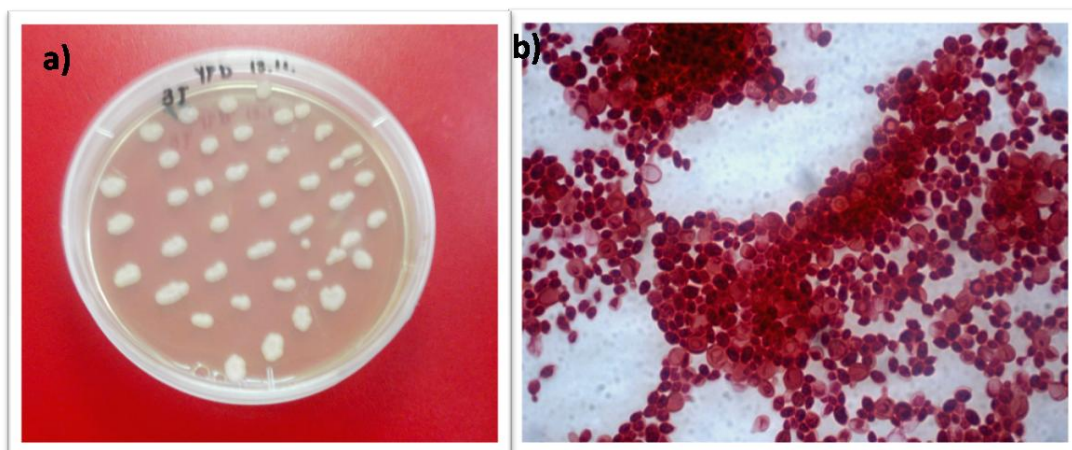
Slika 11. a) Izgled kolonija izolata Avin1312L na YPD podlozi; b) Mikroskopski preparat izolata Avin1312L

Izolat Avin1312L je izolovan sa poljoprivrednog školskog dobra Radmilovac (Srbija). Na YPD podlozi kolonije ovog izolata su krem boje, okrugle i naborane (Slika 11). Mikroskopskim pregledom preparata izolata Avin1312L su uočene ćelije sferičnog oblika i veličine $3,5 \times 4,5 \mu\text{m}$. Ovaj izolat stvara pseudomiceliju.



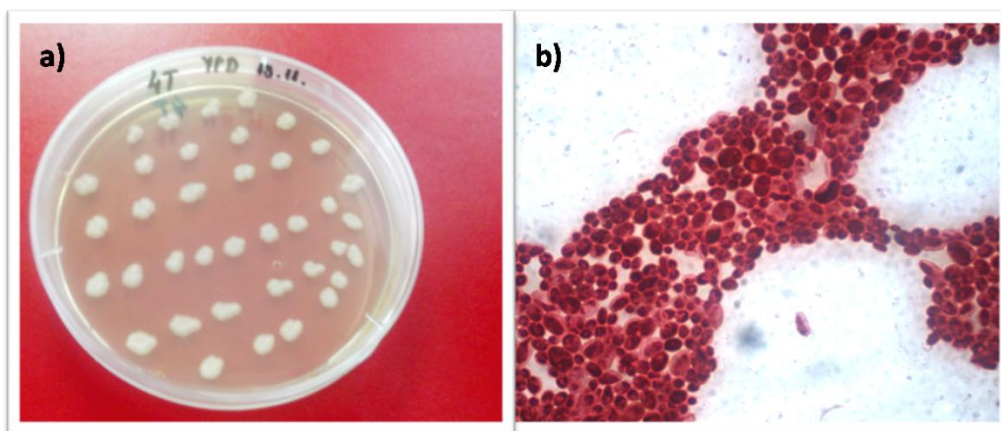
Slika 12. a) Izgled kolonija izolata 2TD2912B na YPD podlozi; b) Mikroskopski preparat izolata 2TD2912B

Izolat 2TD2912B je izolovan iz zemljišta gradskog parka (Tivat, Crna Gora). Na YPD podlozi kolonije ovog izolata su subeličaste boje, okrugle i naborane (Slika 12). Mikroskopskim pregledom preparata izolata 2TD2912B su uočene ćelije sferičnog oblika i veličine $3,5 \times 4,5 \mu\text{m}$. Ovaj izolat stvara pseudomiceliju.



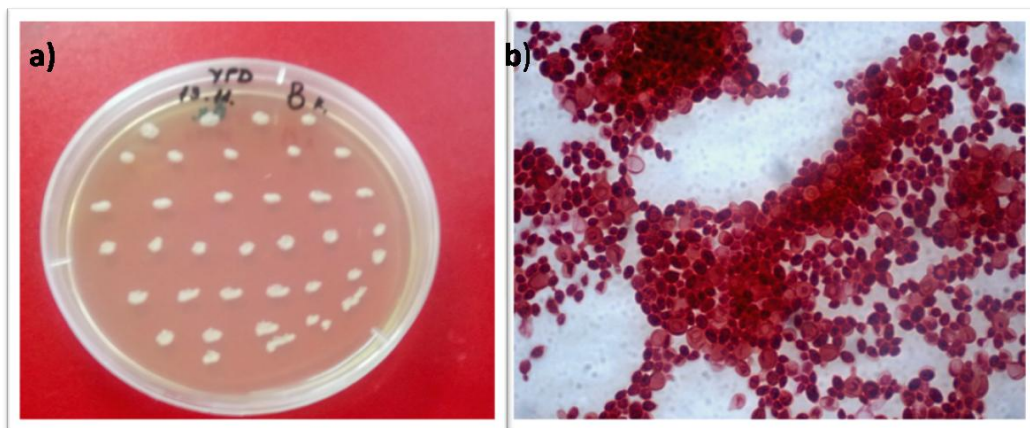
Slika 13. a) Izgled kolonija izolata 3TD0905L na YPD podlozi; b) Mikroskopski preparat izolata 3TD0905L

Izolat 3TD0905L je izolovan iz zemljišta gradskog parka (Tivat, Crna Gora). Na YPD podlozi kolonije ovog izolata su krem boje, okrugle iglatke (Slika 13). Mikroskopskim pregledom preparata izolata 3TD0905L su uočene ćelije ovoidnog oblika i veličine 3,0x5 μm . Ovaj izolat stvara pseudomiceliju.



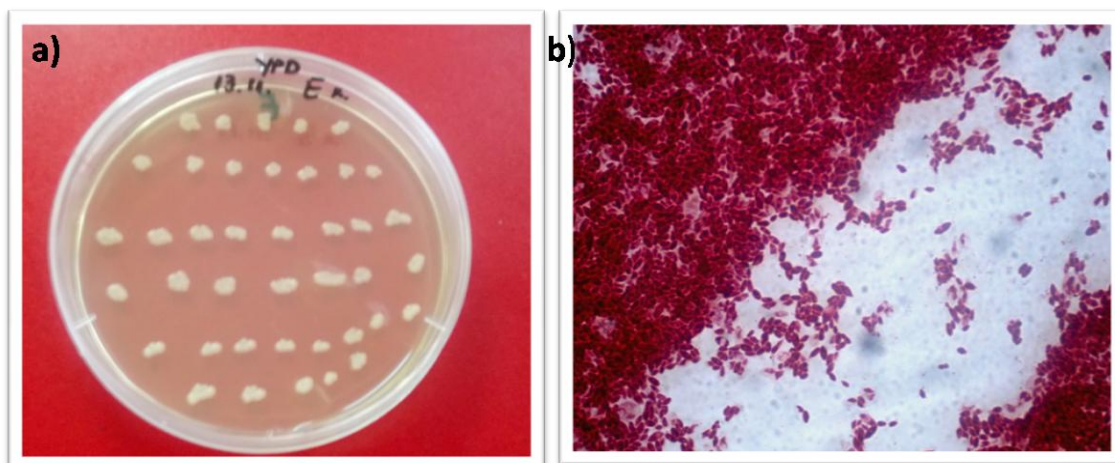
Slika 14. a) Izgled kolonija izolata 4TD1101S na YPD podlozi; b) Mikroskopski preparat izolata 4TD1101S

Izolat 4TD1101S je izolovan iz zemljišta gradskog parka (Tivat, Crna Gora). Na YPD podlozi kolonije ovog izolata su bele boje, vlažne i meke (Slika 14). Mikroskopskim pregledom preparata izolata 4TD1101S su uočene ćelije ovoidnog oblika i veličine 4x6 μm . Ovaj izolat ne stvara pseudomiceliju.



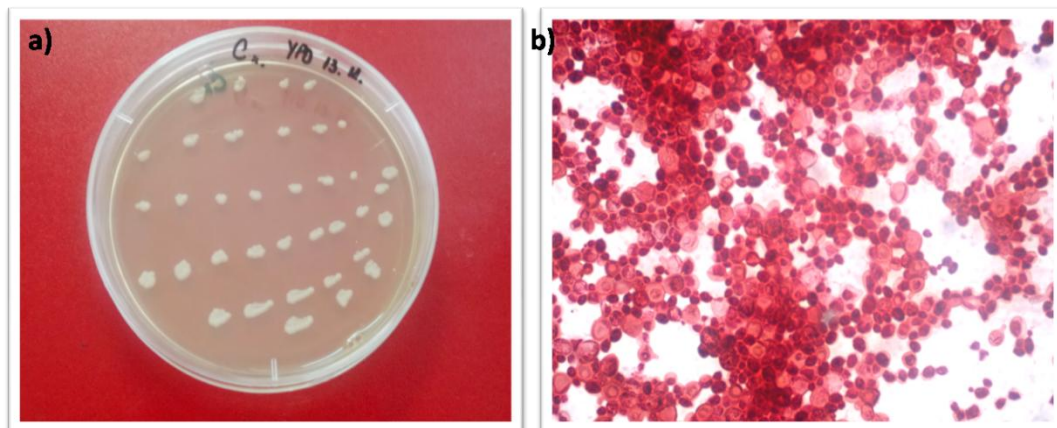
Slika 15. a) Izgled kolonija izolata BK0302D na YPD podlozi; b) Mikroskopski preparat izolata BK0302D

Izolat BK0302D je izolovan iz zemljišta gradskog parka (Tivat, Crna Gora). Na YPD podlozi kolonije ovog izolata sukrane boje, polusjajne i meke (Slika 15). Mikroskopskim pregledom preparata izolata BK0302D su uočene čelije loptastog oblika i veličine 4x4,5 µm. Ovaj izolat ne stvara pseudomiceliju.



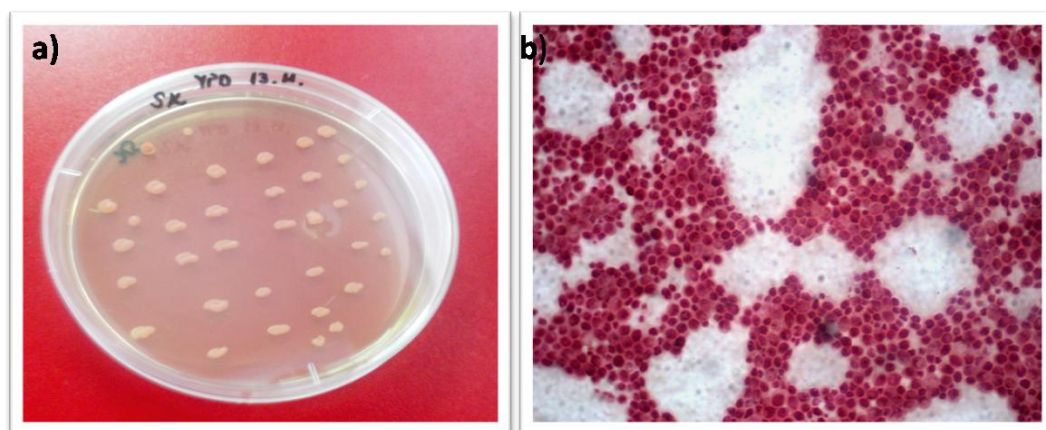
Slika 16. a) Izgled kolonija izolata EK1605T na YPD podlozi; b) Mikroskopski preparat izolata EK1605T

Izolat EK1605T je izolovan iz zemljišta gradskog parka (Tivat, Crna Gora). Na YPD podlozi kolonije ovog izolata sukrane boje, glatke i sjajne i blago podignute u centru (Slika 16). Mikroskopskim pregledom preparata izolata EK1605T su uočene čelijesferoidnog oblika i veličine 2,5x3,5 µm. Ovaj izolat ne stvara pseudomiceliju.



Slika 17. a) Izgled kolonija izolata CK2404I na YPD podlozi; b) Mikroskopski preparat izolata CK2404I

Izolat CK2404I je izolovan iz zemljišta gradskog parka (Tivat, Crna Gora). Na YPD podlozi kolonije ovog izolata subele boje, sitne i meke (Slika 17). Mikroskopskim pregledom preparata izolata CK2404I su uočene ćelijeokruglog oblika i veličine $5 \times 6 \mu\text{m}$. Ovaj izolat ne stvara pseudomiceliju.



Slika 18. a) Izgled kolonija izolata SK0809R na YPD podlozi; b) Mikroskopski preparat izolata SK0809R

Izolat SK0809R je izolovan iz rizosfere trske (Trešnja, Srbija). Na YPD podlozi kolonije ovog izolata su roze boje, sjajne i krupne (Slika 18). Mikroskopskim pregledom preparata izolata SK0809R su uočene ćelije sferičnog oblika i veličine $4,5 \times 5 \mu\text{m}$. Ovaj izolatne stvara pseudomiceliju.

Ispitane su i odgajivačke karakteristike kolonija izolata na kosom sladnom agaru i sladnom bujonu. Kod izolata 2TD2912B, Avin1312L, 4TD1101S, 3TD0905L i EK1605T je primećeno stvaranje taloga. Stvaranje skrame je primećeno kod izolata

1KD1983V, 2KD3007J, CK2404I i Cvin1610M. Pojava ružičastog prstena je zabeležena kod izolata SK0809R, dok je kod izolata BK0302D došlo do stvaranja tzv. krpica. Kod rasta na kosom sladnom agaru, makromorfološki izgled kolonija bio je isti kao i kod rasta na YPD agaru.

Na osnovu ove faze istraživanja može se reći da postoje razlike između ispitivanih izolata kvasaca, kada su u pitanju odgajivačke i morfološke karakteristike.

5.3.2. Rast izolata pri različitim temperaturama

Pored sadržaja vlage, temperatura je jedan od najvažnijih činilaca, koji utiče na rast i aktivnost zemljišnih mikroorganizama (Paul i Clark, 1996). U zemljištu bakterije i gljive imaju najveću aktivnost na temperaturama ispod 30°C, dok se sa povećanjem temperature njihova aktivnost smanjuje (Pettersson i Baath, 2003). Kvasci se najčešće gaje na temperaturama koje su bliske njihovom prirodnom staništu (Boundy-Mills, 2006). Najveći broj vrsta kvasaca su izolovani iz sredina sa temperaturama od 20°C do 25°C (Boundy-Mills, 2006). Međutim, postoje i vrste kao što su *Leucosporidium scottii* i *Mrakia frigid* koje rastu na temperaturama od -1°C do 4°C (Deak, 2006).

Tabela 10. Rast izolata kvasaca pri različitim temperaturama

| Oznaka izolata | 4°C | 10°C | 20°C | 30°C | 35°C | 40°C | 45°C | 50°C | |
|------------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------------|
| 1KD1983V | - | +/- | + | + | - | - | - | - | mezofilni |
| 2KD3007J | - | + | + | + | - | - | - | - | mezofilni |
| 2TD2912B | - | - | + | + | + | + | + | - | termofilni |
| 3TD0905L | - | - | + | + | + | + | + | - | termofilni |
| 4TD1101S | - | - | + | + | + | + | + | - | termofilni |
| BK0302D | - | - | + | + | + | - | - | - | mezofilni |
| CK2404I | - | +/- | + | + | + | - | - | - | mezofilni |
| EK1605T | - | + | + | + | +/- | - | - | - | mezofilni |
| SK0809R | - | + | + | + | +/- | - | - | - | mezofilni |
| Avin1312L | - | - | + | + | + | + | + | - | termofilni |
| Cvin1610M | - | + | + | + | - | - | - | - | mezofilni |

Ispitivani izolati kvasaca su ispoljili različit rast u odnosu na temperaturu kao ekološki faktor (Tabela 10). Među izolatima koji rastu na temperaturama iznad 35°C izdvojila su

se četiri izolata: 2TD2912B, 3TD0905L i 4TD1101S izolovani iz gradskog parka (Tivat, Crna Gora) i Avin1312L izolovan iz zemljišta školskog dobra Radmilovac. Ovi izolati su rasli i na temperaturi od 45°C, dok nije bilo rasta na višim temperaturama (50°C). Najosetljivijim na rast pri temperaturama iznad 30°C pokazala su se tri izolata: 1KD1983V, 2KD3007J i Cvin1610M. Svi izolati su rasli na temperaturama od 20°C i 30°C, dok nijedan izolat nije ispoljio rast na 4°C. Na 10°C rast su ispoljili 2KD3007J, EK1605T i Cvin1610M, a izuzetno slab rast na istoj temperaturi su imali i izolati 1KD1983V i CK2404I.

Sposobnost rasta i razmnožavanja na različitim temperaturama se povezuje sa raznovrsnošću bioloških membrana kod ćelija kvasaca. Istraživanja ukazuju da kvasci u odnosu na optimalnu temperaturu rasta mogu biti u rasponu od psihrofilnih do termofilnih i na osnovu temperature rasta se mogu svrstati u različite termalne kategorije. Prema Arthur i Watson (1976) izolati 1KD1983V, 2KD3007J, CK2404I, EK1605T, SK0809R, BK0302D i Cvin1610M pripadaju mezofilnim, dok su termofilni izolati 2TD2912B, 3TD0905L, 4TD1101S i Avin1312L (Tabela 10).

Sposobnost kvasaca da rastu na različitim temperaturama, od velikog je značaja za njihovu primenu u biotehnologiji i prehrambenoj industriji, ali i za preživljavanje u životnoj sredini.

5.3.3. Rast izolata pri različitim pH vrednostima

Na rast i aktivnost mikroorganizama utiče i pH vrednost sredine. Rast većine kvasaca nije inhibiran pri pH 3, iako je optimalna pH vrednost za većinu vrsta između 4,5-6,5 (Phaff et al., 1978). U istraživanjima kvasaca često se koriste medijumi koji imaju nižu pH vrednost kako bi se inhibirao rast bakterija (Boundy-Mills, 2006). Istraživanja Vreulink et al. (2007) su ukazala na negativnu korelaciju između pH zemljišta i brojnosti kvasaca.

Utvrđeno je da postoje razlike između ispitivanih izolata kvasaca u odnosu na pH vrednosti (Tabela 11). Najniža pH pri kojoj je ispoljen slab rast je 2 (izolat EK1605T), a najviša 10,5. Pri pH 2,5 rast su ispoljila četiri izolata: EK1605T, 2TD2912B, 3TD0905L i 4TD1101S. Ovi izolati izolovani su iz gradskog parka Tivat. Na pH 3 su svi izolati ispoljili rast, dok je prva viša pH vrednost na kojoj izolati nisu rasli pH 10. Na pH 10,5

rast su ispoljili samo izolati 4TD1101S i Avin1610M. Nijedan izolat nije rastao pri pH 11.

Tabela 11. Rast izolata kvasaca pri različitim pH vrednostima

| Oznaka izolata | pH 1,5 | pH 2 | pH 2,5 | pH 3 | pH 3,5 | pH 4 | pH 4,5 | pH 5 | pH 6 | pH 7 | pH 9,5 | pH 10 | pH 10,5 | pH 11 |
|------------------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|------|------|--------|-------|---------|-------|
| 1KD1983V | - | - | - | +/- | + | + | + | + | + | + | + | +/- | - | - |
| 2KD3007J | - | - | - | +/- | + | + | + | + | + | + | + | +/- | - | - |
| 2TD2912B | - | - | +/- | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| 3TD0905L | - | - | +/- | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| 4TD1101S | - | - | +/- | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +/- | - |
| BK0302D | - | - | - | +/- | + | + | + | + | + | + | +/- | - | - | - |
| CK2404I | - | - | - | +/- | + | + | + | + | + | + | + | +/- | - | - |
| EK1605T | - | +/- | + | + | + | + | + | + | + | + | +/- | - | - | - |
| SK0809R | - | - | - | +/- | + | + | + | + | + | + | +/- | - | - | - |
| Avin1312L | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +/- | - |
| Cvin1610M | - | - | - | +/- | + | + | + | + | + | + | + | +/- | - | - |

Literaturni podaci takođe ukazuju na sposobnost kvasaca da rastu u velikom opsegu pH vrednosti, najčešće od 3-10 (Deak, 2006). Od izolata kvasaca ispitivanih u ovom radu najširu amplitudu pH ima izolat 4TD1101S (Tabela 11). Kvasci koji se mogu prilagoditi rastu pod različitim ekstremnim uslovima pH, temperature, dostupnosti nutrijenata, mogu se primeniti u bioremedijacionim tehnologijama upravljanja otpadom (Bahafid et al., 2013).

Neke vrste kvasaca su izuzetno otporne na vrlo nisku pH vrednost od 1,5. pH vrednostima velikog uticaja na odvijanje različitih procesa, ali i na ispoljavanje određenih interakcija između mikroorganizama, kao što je slučaj sa kvascima i bakterijama mlečne kiseline (Deak, 2006).

5.3.4. Rast izolata pri različitim koncentracijama natrijum-hlorida

S obzirom na ulogu koju mikroorganizmi imaju u zemljištu, veoma je važno razumeti i njihov odgovor na abiotički i biotički stres. U poljoprivrednim zemljištima kao rezultat primene mineralnih đubriva i navodnjavanja može doći do pojave visokog saliniteta.

Istraživanja koja su sprovedena na zaslanjenim zemljištima su ukazala na štetan uticaj saliniteta na mikroorganizme i njihovu aktivnost (Rietz i Haynes, 2003; Sardinha et al., 2003). Veliki uticaj na sastav mikrobne zajednice ima salinitet, a utvrđeno je i da su gljive osjetljivije na osmotski stres u odnosu na bakterije (Wichern et al., 2006). Odgovor kvasaca na različite vrste stresa je specifičan i zavisi od vrste kvasca i staništa (Tanghe et al., 2006). Autohtoni zemljišni kvasci mogu preživeti ekstremne uslove koristeći različite strategije, kao što su egzopolimerne kapsule i formiranje biofilma (Botha, 2006).

Tabela 12. Uticaj različitih koncentracija natrijum-hlorida na rast izolata

| Oznaka izolata | 3 % NaCl | 5 % NaCl | 7 % NaCl |
|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 1KD1983V | + | - | - |
| 2KD3007J | + | - | - |
| 2TD2912B | + | + | - |
| 3TD0905L | + | + | - |
| 4TD1101S | + | + | - |
| BK0302D | + | +/- | - |
| CK2404I | + | +/- | - |
| EK1605T | + | - | - |
| SK0809R | + | +/- | - |
| Avin1312L | + | +/- | - |
| Cvin1610M | + | +/- | - |

Svi izolati su ispoljili rast pri sadržaju NaCl od 3 % a nijedan izolat nije rastao pri koncentraciji NaCl od 7 %. (Tabela 12). Sa povećanjem koncentracije NaCl, opada i broj izolata koji mogu da rastu pri ovim uslovima. Pri koncentraciji NaCl od 5 % izolati 2TD2912B, 3TD0905L i 4TD1101S su ispoljili rast, jedva primetan rast se javio kod izolata BK0302D, CK2404I, SK0809R, Avin1312L i Cvin1610M, dok tri izolata 1KD1983V, 2KD3007J i EK1605T nisu rasla pri ovoj koncentraciji NaCl.

Prema podacima Mahajan i Tuteja (2005) već su tada značajne površine zemljišta u svetu bile pogođene povećanim salinitetom i salinizacija je označena kao vodeći faktor gubitka više od 50 % obradivih površina. Dugotrajnim izlaganjem biljaka visokom sadržaju soli dovodi do smanjenja produktivnosti i prinosa za više od 50 % (Acquaah, 2007). Zbog toga od posebnog značaja je i sposobnost korisnih mikroorganizama da se prilagode visokom sadržaju soli u zemljištu i da smanje negativan stres po biljke (Dimkpa et al., 2009). Primeno inokulacije kukuruza sa *Rhodotorula glutinis*, značajno

su ublaženi negativni efekti visokog nivoa saliniteta na parametre rasta kukuruza (Gomaa i Gaballah, 2004), a utvrđena je i veća akumulacija poliamina. Pozitivan uticaj na rast kukuruza u uslovima povećanog saliniteta je imala i inokulacija sa *Saccharomyces cerevisiae* i *Rhodotorula mucilaginosa* (El-Dissoky et al., 2013).

Mogućnost korišćenja mikroorganizama za ublažavanje stresa kod različitih biljnih vrsta ima izuzetan značaj za poljoprivrednu proizvodnju. Pojedini mikroorganizmi mogu da posluže i kao modeli za bolje razumevanje adaptacije i tolerantnosti na stres, što može pozitivno uticati i na koncept primenjene tehnologije (Milošević i Marinković, 2000).

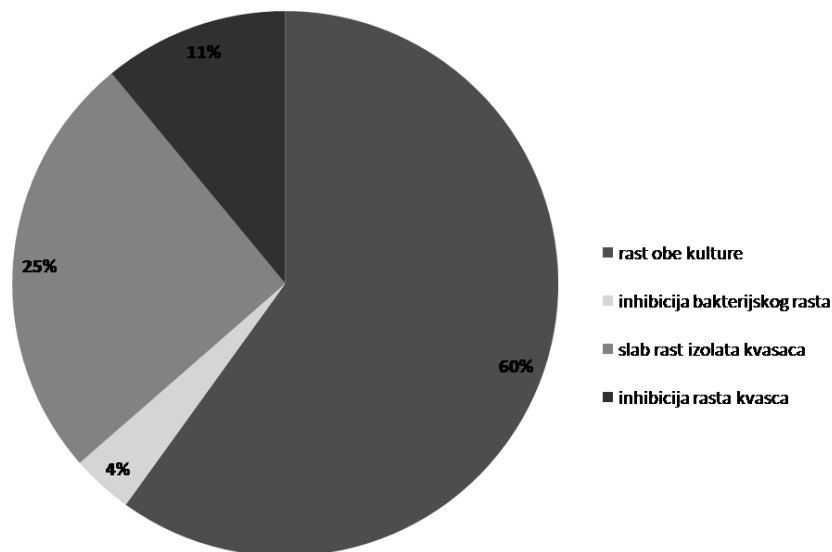
5.3.5. Interakcija izolata kvasaca i mikroorganizama

Kvasci u zemljištu, kao prirodnom staništu, stupaju u različite interakcijske odnose sa širokim spektrom različitih organizama, kao što su alge, plesni, prokarioti, protisti, makroskopska i mikroskopska fauna, kao i sa korenom biljaka. Rast i opstanak određenih vrsta kvasca u zemljištu predstavlja kumulativni rezultat brojnih interakcija u zemljišnoj mikrobnoj zajednici.

Interakcija između istih i različitih mikrobnih populacija i njihovog okruženja ima ključnu ulogu u očuvanju i održavanju ekosistema. U okviru svojih ekoloških niša, kvasci mogu učestvovati u različitim mikrobnim interakcijama, kao što su amensalizam, komensalizam, kompeticija, mutualizam, parazitizam, predatorstvo i sinergizam (Botha, 2006). O interakcijama kvasaca u zemljištu se najviše zna na osnovu *in vitro* studija, koje su rađene u odsustvu velikog broja faktora koji mogu da utiču na metabolizam kvasaca, kada se oni nalaze u svom prirodnom staništu (Botha, 2006). Tako u ispitivanju kompetitivnih odnosa u zemljišnom mikrokosmosu između različitih bakterija koje koriste n-alkane i kvasaca, konstatovano je da kvasci prerastu bakterije u peskovitom zemljištu, što se delimično može pripisati zakišeljavanju zemljišta koje nastaje kao posledica metaboličke aktivnosti kvasca. Međutim, kada se doda bentonit, mineral gline sa visokim kapacitetom za jonsku izmenu, brojnost kvasaca i bakterija roda *Pseudomonas* je ujednačena. *Cryptococcus neoformans* BFI koristi 2,5-dihidroksifenilacetatnu kiselinu proizvedenu od strane *Klebsiella aerogenes* za sintezu pigmenta melanina, koji ima značajnu ulogu u zaštiti ovog kvasca od UV zraka i drugih negativnih uticaja okoline (Frasas et al., 2007).

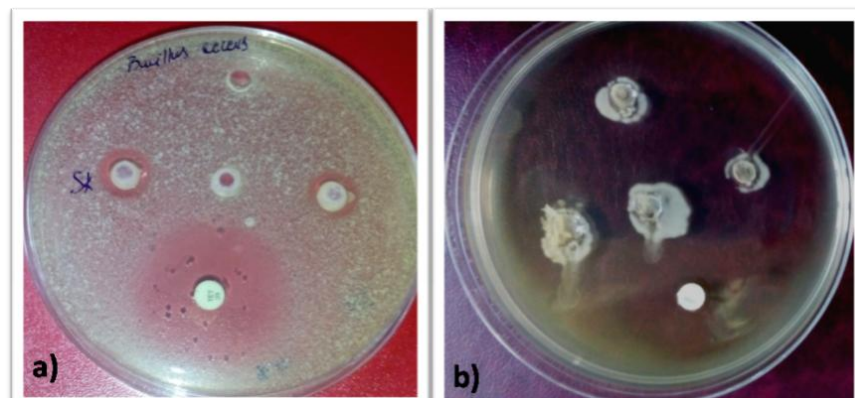
Radi boljeg razumevanja ekoloških karakteristika izolata kvasaca koje doprinose preživljavanju i opstanku kvasaca u životnoj sredini, razmatrani su interakcijski odnosi izolata kvasaca sa različitim bakterijskim sojevima iz kolekcije Katedre za tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivredni fakultet (Zemun, Srbija): *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* i *Bacillus subtilis*. Takođe je ispitana iinterakcija izolata sa izolatom *Candida albicans* (Tabela 14). Interakcijski odnosi između kvasaca i drugih mikroorganizama mogu imati primenu u biotehnologiji.

U ovim istraživanjima najveći broj interakcijskih odnosa je okarakterisan kao ++, što znači da su izolati kvasaca i bakterijski sojevi zajedno nesmetano rasli (Grafik 1). Ali, samo je jedan izolat kvasca (3TD0905L) ispoljio ovakve interakcijske odnose (++) prema svim testiranim bakterijskim sojevima. Ostali izolati ispoljili su ovakve odnose prema četiri testirana bakterijska soja (1KD1983V; 2TD2912B; Avin1312L i Cvin1610M), odnosno tri (4TD1101S; BK0302D; CK2404I), a izolat kvasca EK1605T ovakve interakcijske odnose je ispoljio samo prema jednom bakterijskomsoju (Tabela 13). Izolat kvasca SK0809R nije ispoljio ovakve odnose ni prema jednom testiranom bakterijskom soju. Dobijeni rezultati ukazuju da ispitivani izolati kvasaca i bakterijskih sojeva mogu opstati zajedno u laboratorijskim uslovima. Istraživanja Fleet (1990) ukazuju da kvasci mogu stimulisati rast bakterija produkcijom vitamina i organskih kiselina. Sinergijski efekti između kvasaca i bakterija mogu imati i praktičnu primenu u bioremedijacionim tehnologijama. Tako je uočeno da je konzorcijum kvasaca i bakterija značajan za uklanjanje ukupnih naftnih i policikličkih aromatičnih ugljovodonika, a kvasci dodatno igraju važnu ulogu u uklanjanju policikličkih aromatičnih ugljovodonika sa 4-6 prstena (Zhang et al., 2014).



Grafik 1. Interakcija izolata kvasaca i bakterijskih sojeva

Izolati kvasaca Avin1312L i SK0809R su inhibirali rast (+/-) *P. mirabilis*, odnosno *B. cereus*, pri čemu je izolat Avin1312L doveo do inhibicije rasta *P. mirabilis* i pojave zone prečnika 34 mm, što je jednako zoni koju je uzrokovao ampicilin (Slika 19).



Slika 19. a) Inhibicija rasta *Bacillus cereus* od strane izolata SK0809R; b) inhibicija rasta *Proteus mirabilis* od strane izolata Avin1312L

Interakcijski odnosi koje smo označili +/-, a koji ukazuju na slab rast izolata kvasaca u prisustvu bakterijskih sojeva su konstatovan i pod uticajem svih testiranih bakterijskih sojeva. *P. mirabilis* je uticao na slab rast četiri izolata kvasca, dok su neki bakterijski sojevi u potpunosti inhibirali rast kvasaca. Tako su bakterijski sojevi *E. coli* i *B. subtilis*

inhibirali rast dva izolata kvasca, a *P. mirabilis* jedan izolat. Bakterijski sojevi *P. aeuruginosa* i *B. cereus* nisu u potpunosti inhibirali nijedan izolat kvasca. Najosetljiviji izolati kvasaca su EK1605T i SK0809R. Interesantno je da izolat kvasca SK0809R koji je bio najosetljiviji na ispitivane bakterijske sojeve, istovremeno je inhibirao rast *B. cereus*, što ukazuje na veoma složene interakcijske odnose, što zahteva dodatna istraživanja. Prema Botha (2006) opstanak kvasaca u zemljištu je rezultat brojnih interakcija unutar mikrobne zajednice.

Pozitivna interakcija između gljiva i kvasaca se ostvaruje i ekskrecijom hidrolitičkih enzima koji učestvuju u proizvodnji supstrata za rast kvasaca (Fleet, 1998). Da bi se što bolje razumele interakcije između kvasaca i drugih mikroorganizama, neophodno je uključiti veći broj vrsta, ali i primeniti novije metode, koje će omogućiti bolje razumevanje uloge kvasaca u zemljišnim ekosistemima.

Tabela 13. Interakcija izolata kvasaca i bakterijskih sojeva: *Pseudomonas aeuruginosa*, *Bacillus cereus*, *Esherichia coli*, *Proteus mirabilis* i *Bacillus subtilis*

| Izolat | Bakterijski sojevi | | | | |
|-----------|-----------------------|------------------|----------------|--------------------------|--------------------|
| | <i>P. aeuruginosa</i> | <i>B. cereus</i> | <i>E. coli</i> | <i>Proteus mirabilis</i> | <i>B. subtilis</i> |
| 1KD1983V | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | -/+ |
| 2KD3007J | +/+ | +/- | -/+ | +/+ | -/+ |
| 2TD2912B | +/+ | +/+ | +/- | +/+ | +/+ |
| 3TD0905L | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ |
| 4TD1101S | +/+ | +/+ | +/+ | +/- | +/- |
| BK0302D | +/+ | +/- | +/+ | +/- | +/+ |
| CK2404I | +/+ | -/+ | +/+ | +/- | +/+ |
| EK1605T | +/- | -/+ | -/+ | +/- | +/+ |
| SK0809R | +/- | +/- | +/- | +/- | +/- |
| Avin1312L | +/+ | +/+ | +/+ | +/- | +/+ |
| Cvin1610M | +/+ | +/- | +/+ | +/+ | +/+ |

+/+ rast obe kulture; +/- inhibicija bakterijskog rasta; +/-slab rast izolata kvasaca i dobar rast bakterija; -/+ inhibicija rasta kvasca i dobar rast bakterije

Između populacije kvasaca se mogu takođe ispoljiti različiti interakcijski odnosi. Pet testiranih izolata je rastao zajedno sa *C. albicans* (Tabela 14). Schmitz et al. (2000) su pokazali različite nivoe kompetitivnosti između sojeva kvasaca koji koriste n-alkan- u mikrokosmosu tretiranom n-alkanom. Tako su sojevi *Arxula adenivorans*, *Candida maltosa* i *Yarrowia lipolytica* prerasli sojeve *Candide shehatae*, *C. tropicalis* i *Pichia stipitis*, dok su *C. maltosa* i *Y. lipolytica* koegzistirali u istom broju unutar ovog zemljišnog mikrokosmosa (Schmitz et al., 2000).

Tabela 14. Interakcija između izolata kvasaca i *C. albicans*

| | |
|-----------|------|
| 1KD1983V | +/+ |
| 2KD3007J | +/+ |
| 2TD2912B | +/+ |
| 3TD0905L | +/+ |
| 4TD1101S | -/+ |
| BK0302D | +-/+ |
| CK2404I | -/+ |
| EK1605T | -/+ |
| SK0809R | -/+ |
| Avin1312L | +/+ |
| Cvin1610M | +-/+ |

+/+ rast obe kulture; +/-slab rast izolata kvasaca i dobar *C. albicans*; -/+ inhibicija rasta izolata kvasca i dobar rast *C. albicans*

Rast izolata 4TD1101S, CK2404I, EK1605Ti SK0809R je bioinhibiran pod uticajem *C. albicans*, a dva izolata su imala slab rast. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima Shimizu (1993), koja ukazuju da seuinterakcijama između kvasaca najčešće javlja amensalizam, gde se produkcijom "killer" toksina inhibira, ili potpuno uništava rast drugog izolata kvasca. Nijedan od testiranih izolata nije inhibirao rast *C. albicans*.

5.4. Biohemijska karakterizacija i identifikacija izolata kvasaca

Kvasci se mogu identifikovati konvencionalnim metodama kojima se određuje niz morfoloških, biohemijskih i fizioloških karakteristika. Glavni nedostatak ovih metoda su dugotrajne procedure koje zahtevaju najmanje 14 dana, kako bi se došlo do rezultata (Willemsen et al., 1997). Zbog toga posebnu pažnju privlače pojednostavljene, komercijalne i dostupne metode poput API 20C AUX sistema (BioMerieux, Francuska). Zahvaljujući ovoj metodi je izvršena identifikacija izolata na osnovu biohemijskih karakteristika (Tabela 15).

REZULTATI I DISKUSIJA

Tabela 15. Karakteristike izolata kvasaca (API 20C AUX-test, BioMerieux, Francuska).

| Aktivna supstanca | 1KD1983V | 2KD3007J | 2TD2912B | 3TD0905L | 4TD1101S | BK0302D | CK2404I | EK1605T | SK0809R | Avin1312L | Cvin1610M |
|---------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|-----------|-----------|
| Glukoza | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Glicerol | + | + | + | - | + | + | - | - | - | + | + |
| Kalcijum, 2-keto-glukonat | - | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - |
| L-arabinoza | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| D-ksiloza | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Adonitol | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - |
| Ksilitol | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - |
| D-galaktoza | - | - | + | + | + | + | + | - | + | + | - |
| Inozitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-sorbitol | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - |
| Metil- α -glukopiranozid | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | - |
| N-acetil-glukozamin | - | - | + | + | + | + | + | - | - | + | - |
| D-celobioza | + | + | - | + | + | + | + | + | - | - | + |
| D-laktoza | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | - |
| D-maltoza | - | - | + | + | + | + | + | - | + | + | - |
| D-saharoza | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | + |
| D-trehaloza | - | - | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| D-melezitoza | - | - | + | + | + | + | + | - | + | + | - |
| D-rafinoza | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - | + |

Izolat 1KD1983V je pokazao najveći stepen sličnosti sa dve vrste roda *Candida* i to sa *Candida utilis* (54,7 %) i *Candida spherica* (45,3 %). Utvrđeno je da ovaj izolat može vršiti asimilaciju: glukoze, glicerola, D-ksiloze, ksilitola, D-sorbitola, D-celobioze, D-saharoze i D-rafinoze.

Biohemijski profil izolata 2KD3007J je pokazao najveći stepen sličnosti sa *Candida utilis* (92,3 %). Ovaj izolat može vršiti asimilaciju: glukoze, glicerola, D-ksiloze, D-sorbitola, D-celobioze, D-saharoze i D-rafinoze.

Izolat 2TD2912B je pokazao najveći stepen sličnosti sa tri vrste roda *Candida*: *Candida albicans* (32,5 %), *Candida tropicalis* (25 %) i *Candida parapsilosis* (17 %). Ovaj izolat vrši asimilaciju: glukoze, glicerola, kalcijum 2-keto-glukonata, D-ksiloze, adonitola (ribitola), ksilitola, D-galaktoze, D-sorbitola, metil- α D-glukopiranozida, N-acetil-glukozamina, D-maltoze, D-saharoze, D-trehaloze i D-melezitoze.

Biohemijski profil izolata 3TD0905L (Slika 20) je pokazao najveći stepen sličnosti sa dve različite vrste i to sa *Candida tropicalis* (52,8 %) i *Trichosporon unicoides* (35,2 %). Utvrđeno je da ovaj izolat vrši asimilaciju sledećih ugljenih hidrata: glukoze, kalcijum 2-keto-glukonata, D-ksiloze, adonitola (ribitola), ksilitola, D-galaktoze, D-sorbitola, metil- α D-glukopiranozida, N-acetil-glukozamina, D-celuloze, D-laktoze, D-maltoze, D-saharoze, D-trehaloze i D-melezitoze.

Izolat 4TD1101S je pokazao najveći stepen sličnosti sa tri vrste roda *Candida*: *Candida famata* (41 %), *Candida tropicalis* (26,5 %) i *Candida lusitaniae* (23,2 %). Ovaj izolat vrši asimilaciju: glukoze, glicerola, kalcijum 2-keto-glukonata, D-ksiloze, adonitola (ribitola), D-galaktoze, D-sorbitola, metil- α D-glukopiranozida, N-acetil-glukozamina, D-celuloze, D-laktoze, D-maltoze, D-saharoze, D-trehaloze i D-melezitoze.

Izolat SK0809R (Slika 20) je pokazao najveći stepen sličnosti sa *Rhodotorula mucilaginosa* (99,9 %). Ovaj izolat može vršiti asimilaciju: glukoze, L-arabinoze, D-ksiloze, adonitola (ribitola), ksilitola, D-galaktoze, D-maltoze, D-saharoze, D-trehaloze, D-melezitoze i D-rafinoze.

Izolat EK1605T je pokazao najveći stepen sličnosti sa *Kloeckera spp.* (99,2 %). Utvrđeno je da ovaj izolat vrši asimilaciju sledećih ugljenih hidrata: glukoze, kalcijum 2-keto-glutanata, D-celuloze i D-rafinoze (Slika 20).

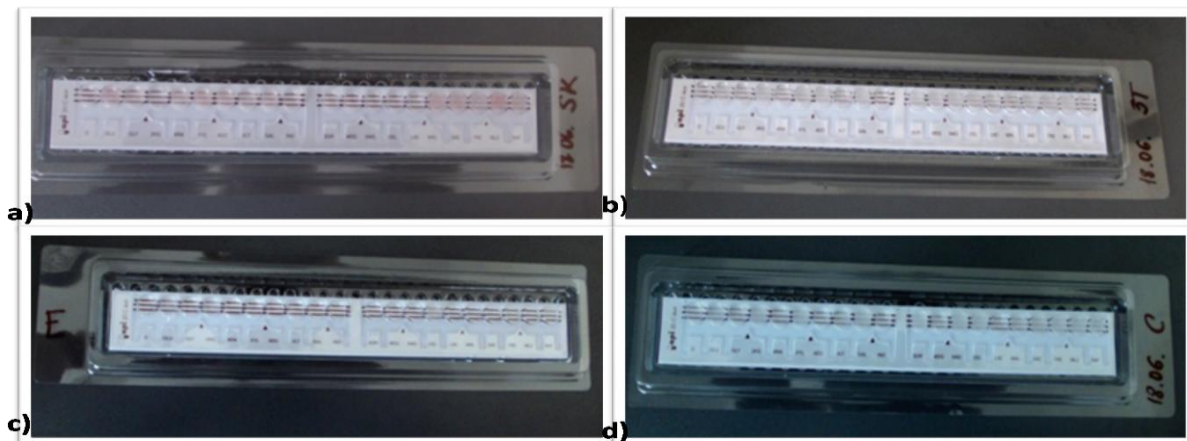
Izolat BK0302D je pokazao najveći stepen sličnosti sa dve vrste roda *Candida* i to sa *Candida guilliermondii* (68,7 %) i *Candida famata* (31,2 %). Ovaj izolat može vršiti asimilaciju: glukoze, glicerola, kalcijum 2-keto-glutanata, D-ksiloze, adonitola (ribitol), ksilitola, D-galaktoze, D-sorbitola, metil- α D-glukopiranozida, N-acetil-glukozamina, D-celuloze, D-maltoze, D-saharoze, D-trehaloze, D-melezitoze i D-rafinoze.

Biohemijski profil izolata CK2404I (Slika 20) je pokazao najveći stepen sličnosti sa rodom *Candida* (*Candida guilliermondi* 77,9 %) i rodom *Cryptococcus* (*Cryptococcus laurentii* 11,2 %). Utvrđeno je da ovaj izolat vrši asimilaciju sledećih ugljenih hidrata: glukoze, kalcijum 2-keto-glutanata, D-ksiloze, ksilitola, D-galaktoze, D-sorbitola, N-acetil-glukozamina, D-celuloze, D-maltoze, D-saharoze, D-trehaloze, D-melezitoze i D-rafinoze.

Izolat Avin1312L je pokazao najveći stepen sličnosti sa *Candida famata* (98,9 %). Utvrđeno je da ovaj izolat vrši asimilaciju sledećih ugljenih hidrata: glukoze, glicerola, kalcijum 2-keto-glutanata, D-ksiloze, adonitola (ribitol), ksilitola, D-galaktoze, D-

sorbitola, metil- α D-glukopiranozida, N-acetil-glukozamina, D-trehaloze, D-laktoze, D-maltoze i D-melezitoze.

Biohemijski profil izolata Cvin1610M je pokazao najveći stepen sličnosti sa *Candida utilis* (99 %). Ovaj izolat može vršiti asimilaciju: glukoze, glicerola, ksilitola, D-celuloze, D-saharoze, D-trehaloze i D-rafinoze.



Slika 20. a) API 20C AUX (BioMerieux, Francuska) za izolat SK0809R; b) API 20C AUX za izolat 3TD0905L; c) API 20C AUX za izolat EK1605T i d) API 20C AUX za izolat CK2404I

D-ksiloza je jedan od najzastupljenijih pentoznih šećera u prirodi, a kvasci je mogu koristiti iz veoma različite lignocelulozne biomase. Na ovaj način lignocelulozna biomasa se može koristiti za proizvodnju mikrobnog ulja koje može biti alternativa biogorivima i obećavajući izvor energije (Pan et al., 2009). Od 11 izolata 10 izolata kvasaca koristi ksilozu (Tabela 19), što može biti potencijal za proizvodnju biogoriva.

Najveća razlika između ispitivanih izolata je utvrđena u asimilaciji L-arabinoze, koja ulazi u sastav hemiceluloze, glavne komponente ćelijskog zida biljaka. Sposobnost korišćenja l-arabinoze i pretvaranje u etanol bi značajno doprinela poboljšanju iskorišćavanja biomase u fermentaciji etanola (Knoshaug et al., 2009). Od testiranih izolata samo izolat SK0809R (*Rhodotorula mucilaginosa*) može da koristi ovaj monosaharid. Istraživanja su pokazala da *R. mucilaginosa* (Bura et al., 2012) izolovana iz stabljike klona topole ima sposobnost biokonverzije arabinoze u arabitol, ali i ksiloze u ksilitol, što može imati značaj za prehrambenu i farmaceutsku industriju. Sposobnost asimilacije D-laktoze pokazala su samo tri izolata (3TD0905L, 4TD1101S i Avin1312L), a nijedan izolat ne može da asimiluje inozitol (Tabela 19).

U poređenju sa konvencionalnim metodama, primenom API 20C AUX sistema postiže se tačnost od 93 % do 100 % (Smith et al., 1999). Zahvaljujući ovoj metodi na brz i jednostavan način utvrđen je biohemijski profil ispitivanih izolata. Za precizniju identifikaciju, neophodno je uraditi i dodatne testove, poput redukcije nitrata, praćenja morfologije na kukuruznom agaru i otpornosti na aktidion (cikloheksimid).

5.4.1. Molekularna identifikacija izolata

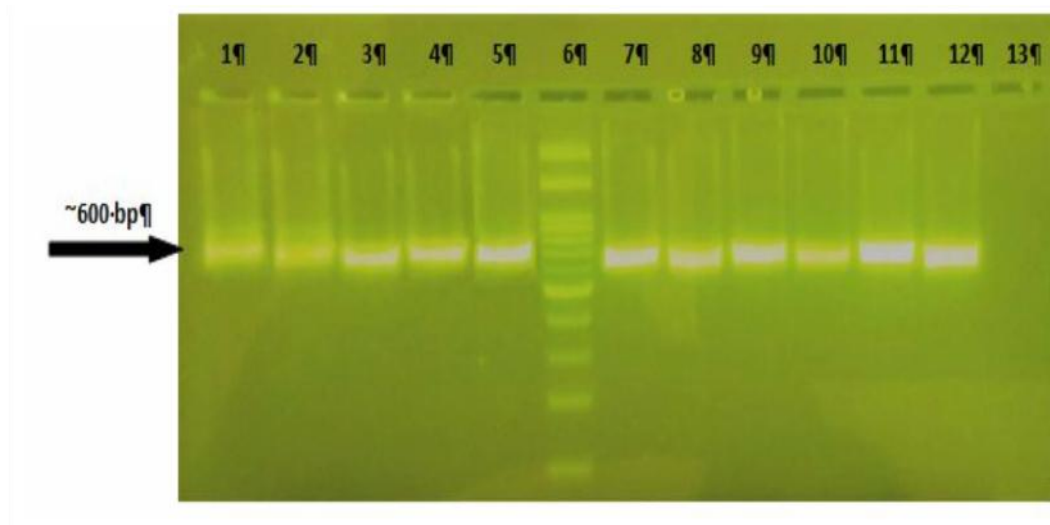
Diverzitet kvasaca u zemljištu je ispitan u različitim delovima sveta, u rasponu od tropskih do zemljišta Antarktika (Babjeva i Chernow 1995; Spencer i Spencer 1997; Slavikova i Vadkertiova, 2003). U ovom radu je izvršena identifikacija izolata kvasaca primenom molekularne metode.

Prednost molekularnih metoda pored jednostavnosti, visoke specifičnosti i brzine je i mogućnost razlikovanja morfoloških sličnih izolata.

Kvasci uglavnom imaju ekonomski (npr. u mikrobnoj biotehnologiji) poljoprivredni i medicinski značaj, stoga, otkrivanje novih sojeva ili čak vrsta i njihova tačna identifikacija je veoma važna. Sa druge strane, zemljište je mesto "skladištenja", ali i razvoja pojedinih vrsta kvasaca (Wuczkowski i Prillinger, 2004).

Primenom metodom ekstrakcije DNK je dobijena odgovarajuća količina ukupne DNK, koja je bila pogodna za dalja ispitivanja. Nakon ekstrakcije DNK je primenjena amplifikacija D1/D2 regiona, primenom univerzalnih prajmera NL1 i NL4 (Slika 21).

Molekularna metoda PCR je uspešno primenjena za umnožavanje odgovarajućih fragmenata svih izolata, a zatim je usledilo sekvencioniranje dobijenih produkata i poređenje obrađenih sekvenci sa sekvencama u GenBank bazi podataka. Konsenzus sekvence su deponovane u bazu podataka i dodeljeni su im pristupni brojevi (Tabela 20).



Slika 21. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera NL1/NL4. Kolone: 1-izolat 1KD1983V, 2-2KD3007J, 3-izolat 2TD2912B, 4-izolat 3TD0905L, 5-izolat 4TD1101S, 6- DNA Ladder (Nippon Genetics Europe GmbH), 7-izolat BK0302D, 8-izolat CK2404I, 9- izolat EK1605T, 10-izolat Cvin1610M, 11-izolat Avin1312L, 12-izolat SK0809R i 13-negativna kontrola (PCR smeša sa RNase-free vodom)

Tabela 20. Pregled sekvenci ispitivanih izolata

| Oznaka izolata | Vrsta | GenBank-pristupni broj |
|------------------|------------------------------------|------------------------|
| 2TD2912B | <i>Candida tropicalis</i> | KR013283 |
| 3TD0905L | <i>Candida tropicalis</i> | KP990661 |
| 4TD1101S | <i>Candida tropicalis</i> | KR013284 |
| BK0302D | <i>Schwanniomyces occidentalis</i> | KP990664 |
| CK2404I | <i>Cyberlindnera saturnus</i> | KP990663 |
| EK1605T | <i>Hanseniaspora uvarum</i> | KP990659 |
| SK0809R | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | KP990660 |
| 1KD1983V | <i>Cyberlindnera saturnus</i> | KR013287 |
| 2KD3007J | <i>Cyberlindnera saturnus</i> | KP990662 |
| Avin1312L | <i>Candida tropicalis</i> | KR013285 |
| Cvin1610M | <i>Cyberlindnera saturnus</i> | KR013286 |

BLAST analizom sekvenci amplifikovanih produkata svi izolati su uspešno identifikovani do nivoa vrste. Izolati: 2TD2912B, 3TD0905L, 4TD1101S i Avin1312L kao *Candida tropicalis*; izolati: CK2404I, 1KD1983V, 2KD3007J i Cvin1610M kao *Cyberlindnera saturnus*; BK0302D kao *Schwanniomyces occidentalis*; EK1605T kao *Hanseniaspora uvarum* i SK0809R kao *Rhodotorula mucilaginosa* (Tabela 20).

Molekularna identifikacija izolata 1KD1983V, 2KD3007J, CK2404I i Cvin1610M

Nakon amplifikacije D1/D2 regionai elektroforetske analize dobijenih produkata izolata: 1KD1983V, 2KD3007J, CK2404I i Cvin1610M je utvrđeno da su dobijeni fragmenti očekivane dužine od oko 600 bp. Reakcije su bile bez nespecifičnih bendova. BLAST analiza sekvence izolata 1KD1983V dužine 528 bp je pokazala da sekvenca izolata ima najviši stepen nukleotidne sličnosti (99 %-100 %) sa sekvencama 17 izolata vrste *Cyberlindnera saturnus*.

Izolat 1KD1983V je izolovan iz zemljišta iz vinograda (Radovanović, Srbija), dok su ostali izolati sa kojima je pokazao najveći stepen sličnosti iz različitih sredina i iz različitih delova sveta: morske sredine (EU293426 i EU543664), zemljišta u kome je gajen Žen - Šen (EF068197), ušća Patos Lagoon u Brazilu (KP087896), rizosfere *Impatiens glandulifera* (FR772345), šumskog zemljišta (AJ507804) i korena šećerne trske (FN428868).

BLAST analiza sekvence izolata 2KD3007J dužine 582 bp je pokazala da sekvenca izolata ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (99 %-100 %) sa 11 izolata vrste *Cyberlindnera saturnus*.

Izolat 2KD3007J je izolovan iz zemljišta iz vinograda Radovanović. Izolati sa kojima je pokazao najveći stepen sličnosti su iz različitih sredina: zemljište (KT895984, EF068197), mora (EU543664 i EF532300) i šumskog zemljišta (AJ507804).

BLAST analiza sekvence izolata CK2404I dužine 595 bp je pokazala da ovaj izolat ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (99 %) sa šest izolata vrste *Cyberlindnera saturnus*.

Izolat CK2404I je izolovan iz zemljišta kontaminiranog organskim zagađivačima (PAH, PCB i organokalajna jedinjenja), a pokazao je najveći stepen sličnosti sa izolatima iz sledećih sredina: zemljišta (KT895984), morska obala (EU293426 i EU543664), ušće Patos Lagoon u Brazilu (KP087896) i šumsko zemljište (AJ507804).

BLAST analiza sekvence izolata Cvin1610M dužine 509 bp je pokazala da ovaj izolat ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (99 %-100 %) sa 16 izolata vrste *Cyberlindnera saturnus*.

Izolat Cvin1610M je izolovan iz zemljišta poljoprivrednog školskog dobra Radmilovac. Najveći stepen sličnosti je pokazao sa izolatima iz sledećih sredina: zemljišta

(KT895984, KC006602 i FN868262), morske sredine (EU293426 i EU543664), rizosfere *Impatiens glandulifera* (FR772345) i šumskog zemljišta (AJ507804).

Cyberlindnera saturnus je telemorfni askomicetni kvasac, pripada klasi *Saccharomycetes* i redu *Saccharomycetales* i ima pet varijeteta. Mogućnost razlikovanja između varijeteta se zasniva na fermentaciji ili asimilaciji različitih izvora ugljenika ili azota, kao i zahtevima za vitaminima (Kurtzman i Smith, 1998). Prvo istraživanje o genima za kodiranje ACC deaminaze (*acdS*) je rađeno na *Cyberlindnera saturnus* i *Pseudomonas* sp. ACP (Homna i Shimomura, 1978).

Molekularna identifikacija izolata EK1605T

Nakon amplifikacije D1/D2 regiona i elektroforetske analize dobijenog produkta izolata EK1605T je utvrđeno da je dobijeni fragment očekivane dužine od oko 600 bp. Reakcija je bila bez nespecifičnih bendova.

BLAST analiza sekvence izolata EK1605T dužine 587 bp je pokazala da izolat ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (99 %-100 %) sa više od 80 izolata vrste *Hanseniaspora uvarum*. Rezultati identifikacije pomoću API testa se poklapaju sa rezultatima molekularne identifikacije.

Izolat EK1605T je izolovan iz zemljišta kontaminiranog organskim zagađivačima (PAH, PCB i organokalajna jedinjenja), a pokazao je najveći stepen sličnosti sa izolatima iz sledećih sredina: vinograda (KT922489 i KT922487), različitih faza fermentacije vina (JN083811), kožnih lezija (KX400755) i zemljišta (KU316740).

Molekularna identifikacija izolata 2TD2912B, 3TD0905L, 4TD1101S i Avin1312L

Nakon amplifikacije D1/D2 regionai elektroforetske analize dobijenih produkata izolata:2TD2912B, 3TD0905L, 4TD1101S i Avin1312L je utvrđeno da su dobijeni fragmenti očekivane dužine od oko 600 bp. Reakcije su bile bez nespecifičnih bendova.

BLAST analiza sekvence izolata 2TD2912B dužine 533 bp je pokazala da izolat ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (99 %) sa više od 80 izolata vrste *Candida tropicalis*.

Izolat 2TD2912B je izolovan iz zemljišta kontaminiranog organskim zagađivačima (PAH, PCB i organokalajna jedinjenja). Najveći stepen sličnosti je pokazao sa izolatima iz različitih delova sveta i sredina: (GU225747) izolovan pri industrijskoj fermentaciji

zelenih maslina, zemljišta na kojem je gajen badem (DQ857893), kliničkog uzorka (AY951983, KT718114), smeše zemljišta i melase (KJ577477), ATCC 750 (KU729147), krvi (KJ451716), zemljišta (KP064125), soka šećerne trske (KF359928), površine paprika (JX068685), itd.

BLAST analiza sekvence izolata 3TD0905L dužine 581 bp je pokazala da izolat ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (100 %) sa 75 izolata vrste *Candida tropicalis*.

Izolat 3TD0905L je izolovan iz zemljišta kontaminiranog organskim zagađivačima (PAH, PCB i organokalajna jedinjenja), a najveći stepen sličnosti je pokazao sa izolatima iz sledećih sredina: krvi (KJ451716, HQ214057), Južnog kineskog mora (EU651854), digestivnog trakta ribe (JX532154), sok šećerne trske (KF359928), kakao zrna u toku spontane fermentacije (FR870028), aktivnog mulja (GU373782), zemljišta sa visokim sadržajem nafte (GU388393), otpadaka od hrane (GQ272609), iz tradicionalnog piva od šećerne trske sa Obale Slonovače (FJ665619), itd.

BLAST analiza sekvence izolata 4TD1101S dužine 584 bp je pokazala da izolat ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (99 %) sa više od 90 izolata vrste *Candida tropicalis*.

Izolat 4TD1101S je izolovan iz zemljišta kontaminiranog organskim zagađivačima (PAH, PCB i organokalajna jedinjenja). Izolati sa kojima ima najveći stepen sličnosti potiču iz različitih sredina kao što su: ATCC 1369 (KX792975), industrijskog mulja (KT380847), krvi (KJ451716), fecesa bizona (AB741059), rumen (burag) (JQ353488), kakao zrna u toku spontane fermentacije (FR870028), klinički uzorak (AY951982), itd.

BLAST analiza sekvence izolata Avin1312L dužine 569 bp je pokazala da izolat ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (100 %) sa pet izolata vrste *Candida tropicalis*.

Izolat Avin1312L je izolovan iz zemljišta poljoprivrednog školskog dobra Radmilovac. Ovaj izolat ima najveći stepen sličnosti sa izolatima iz sredina kao što su: digestivni trakt brojlera (KX268687 i KX268686), morska voda (EU293420), ostaci maslina (AJ749824) i klinički uzorak (AY951983).

Candida tropicalis je askomicetni kvasac koji pripada klasi *Saccharomycetes* i redu *Saccharomycetales* i može se izolovati iz veoma različitih sredina.

Molekularna identifikacija izolata SK0809R

Nakon amplifikacije D1/D2 regionai elektroforetske analize dobijenog produkta izolata SK0809R je utvrđeno da je dobijeni fragment očekivane dužine od oko 600 bp. Reakcija je bila bez nespecifičnih bendova.

BLAST analiza sekvence izolata SK0809R dužine 586 bp je pokazala da izolat ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (100 %) sa 22 izolata vrste *Rhodotorula mucilaginosa*. Rezultati identifikacije pomoću API testa se poklapaju sa rezultatima molekularne identifikacije.

Izolat SK0809R je izolovan iz rizosfere trske, a pokazao je najveći stepen sličnosti sa izolatima iz sredina kao što su: zemljište (KU316790), ušće Patos Lagoon u Brazilu (KP087899), fermentisano mleko (GQ121643) i Mangrove (AB304770 i AB304768), dok su preostali izolati nepoznatog porekla.

Rhodotorula mucilaginosa je bazidiomicetni kvasac koji pripada klasi *Urediniomycetes* i redu *Sporidiales*.

Molekularna identifikacija izolata BK0302D

Nakon amplifikacije D1/D2 regionai elektroforetske analize dobijenog produkta izolata BK0302D je utvrđeno da je dobijeni fragment očekivane dužine od oko 600 bp. Reakcija je bila bez nespecifičnih bendova.

BLAST analiza sekvence izolata BK0302D dužine 585 bp je pokazala da ovaj izolat ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (99 %) sa tri izolata vrste *Schwanniomyces occidentalis*.

Izolat BK0302D je izolovan iz zemljišta kontaminiranog organskim zagađivačima (PAH, PCB i organokalajna jedinjenja). Nije poznato poreklo izolata sa kojima izolat BK0302D ima najveći stepen sličnosti.

Schwanniomyces occidentalis je askomicetni kvasac koji pripada klasi *Saccharomycetes* i redu *Saccharomycetales* i odlikuje se vrlo niskom divergencijom gena rRNK sekvence (Martorell et al., 2005). Razvijeno je nekoliko genetskih modela za proizvodnju heterolognih proteina iz *Schwanniomyces occidentalis* (Spencer et al., 2002).

5.4.2. Enzimska karakterizacija izolata kvasaca

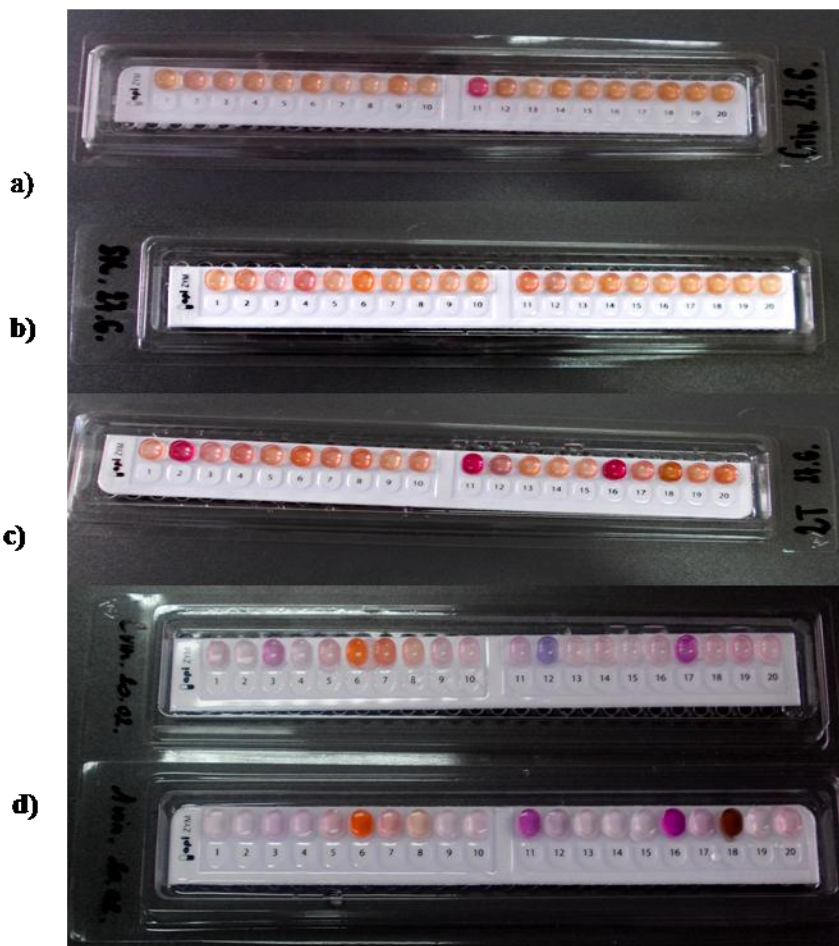
Kvasci predstavljaju važne izvore biomolekula uključujući i enzime, koji se najčešće koriste u industrijske svrhe. Enzimi mikrobnog porekla imaju primenu u prehrambenoj, tekstilnoj, farmaceutskoj industriji, molekularnoj biologiji i proizvodnji biogoriva (Romo-Sanchez et al., 2010).

Rezultati enzimske karakterizacije ispitivanih izolata dobijeni su primenom API ZYM sistema (BioMerieux, Francuska), koji se zasniva na detekciji hidrolitičkih enzima kroz 19 enzimskih reakcija (Tabela 21). Ova metoda je jednostavna i praktična, ne zahteva veliku količinu ispitivanih mikroorganizama, a može se vršiti i pod aerobnim i anaerobnim uslovima (Laughon et al., 1982). Rezultati jasno pokazuju razlike u produkciji ekstarcelularnih enzima različitih vrsta izolata (Tabela 21). Osam izolata je pokazalo visoku produkciju leucin arilamidaze, što ukazuje na izraženu proteolitičku aktivnost (Carvalho et al., 2013). Isti autori su utvrdili produkciju ovog enzima od strane kvasaca iz roda *Candida*, *Lindera* i *Torulasporea*, izolovanih iz zemljišta, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji.

N-acetil- β -glukozaminidaza je detektovana kod tri izolata 2TD2912B, 3TD0905L i Avin1312L, a najjaču enzimsku aktivnost su pokazali izolati Avin1312L i 3TD0905L, kod kojih je utvrđena i visoka antagonistička aktivnost prema *Botrytis cinerea* (Tabela 21). Sva tri izolata su identifikovana kao *Candida tropicalis*, a dobijeni rezultati su u skladu sa istraživanjima Kamel i El-Moniem (2013). Sposobnost produkcije β -glukozidaze koja učestvuje u degradaciji ćelijskog zida gljiva je utvrđena kod šest izolata, a najjaču enzimsku aktivnost je pokazao izolat *C. saturnus* (1KD1983V). β -glukozidaze povezane sa složenim ugljenim hidratima mogu imati potencijalnu primenu ne samo u biološkoj kontroli, nego i u prehrambenoj i tekstilnoj industriji i proizvodnji biogoriva (Lavenson et al., 2012). Produkcija lipaze (C14) i cistin arilamidaze je utvrđena samo kod izolata Avin1312L i Cvin1610M, izolovanih iz zemljišta poljoprivrednog školskog dobra Radmilovac (Tabela 21). Nijedan izolat nije imao pozitivnu reakciju na α -himotripsin, α i β -galaktozidazu, β -glukuronidazu i α -manozidazu.

Jedan od načina oslobađanja neorganskog fosfata iz organofosfatnih kompleksa je produkcija enzima fosfataza (Behera et al., 2014). Fosfataze u zavisnosti od pH vrednosti se klasifikuju u dve grupe: kiselna fosfataza (pH < 6) i alkalna fosfataza (pH >

6). Kisela i alkalna fosfataza su detektovane i kod izolata koji su pokazali sposobnost solubilizacije fosfata *S. occidentalis* (BK0302D), *C. saturnus* (CK2404I) i *C. tropicalis* (2TD2912B), što ukazuje na potencijal ovih izolata kvasaca u snabdevanju biljaka sa fosforom (Tabela 21).



Slika 22. API ZYM test za izolate: a) *C. saturnus* (CK2404I) b) *R. mucilaginosa* (SK0809R) c) *C. tropicalis* (2TD2912B) i d) *C. saturnus* (Cvin1610M) i *C. tropicalis* (Avin1312L)

Treba imati u vidu da su svi ispitivani izolati gajeni u YPD medijumu, pa zbog toga dobijeni rezultati ukazuju samo na potencijal produkcije enzima u podešenim uslovima gajenja, uz dodatak određenog izvora ugljenika u hranljivu podlogu (Jovičić-Petrović, 2014).

Izolati 1KD1983V i 2KD3007J (*Cyberlindnera saturnus*) izolovani iz vinograda Radovanović su pokazali identične rezultate po pitanju produkcije enzima i to estereaze (C4), estereaze lipaze (C8), leucin arilamidaze, valin arilamidaze, naftol-AS-BI-

REZULTATI I DISKUSIJA

fosfohidrolaze i β -glukozidaze (Tabela 21). Kod izolata SK0809R (*Rhodotorula mucilaginosa*) je utvrđena produkcija enzima estereaze (C4), estereaze lipaze (C8), leucin arilamidaze, naftol-AS-BI-fosfohidrolaze i kisele fosfataze (Tabela 21).

Tabela 21. Rezultati ispitivanja enzimске aktivnosti izolata kvasaca pomoću API ZYM-a (BioMerieux, Francuska)

| enzim | 1KD1983V | 2KD3007J | SK0809R | 2TD2912B | 3TD0905L | 4TD1101S | BK0302D | CK2404I | EK1605T | Avin1312L | Cvin1610M |
|------------------------------------|----------|----------|---------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|-----------|-----------|
| Alkalna fosfataza | - | - | - | +++ | +++ | +++ | +++ | + | + | + | - |
| Esteraza (C4) | +++ | +++ | + | + | - | + | + | - | + | + | + |
| Esteraza lipaza (C8) | +++ | +++ | +++ | + | +++ | ++ | - | - | - | ++ | - |
| Lipaza (C14) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | +++ | + |
| Leucin arilamidaza | +++ | +++ | +++ | - | +++ | +++ | - | - | +++ | ++ | ++ |
| Valin arilamidaza | +++ | +++ | - | - | - | - | - | - | - | + | ++ |
| Cistin arilamidaza | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Tripsin | - | - | - | - | +++ | + | - | - | + | - | - |
| α -himotripsin | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Kisela fosfataza | - | - | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | + | + | ++ |
| Naftol-AS-BI-fosfohidrolaza | +++ | ++ | + | +++ | ++ | ++ | - | - | + | - | ++ |
| α -galaktozidaza | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β -galaktozidaza | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β -glukuronidaza | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -glukozidaza | - | - | - | +++ | +++ | +++ | - | - | - | +++ | - |
| β -glukozidaza | +++ | + | - | - | + | + | - | - | - | + | + |
| N-acetil- β -glukozaminidaza | - | - | - | + | +++ | - | - | - | - | +++ | - |
| α -manozidaza | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -fukozidaza | - | - | - | ++ | + | - | - | - | - | - | - |

Izolat 2TD2912B (*Candida tropicalis*) vrši produkciju alkalne fosfataze, estereaze (C4), estereaze lipaze (C8), kisele fosfataze, naftol-AS-BI-fosfohidrolaze, α -glukozidaze i α -fukozidaze (Tabela 21). Kod izolata 3TD0905L (*Candida tropicalis*) je utvrđena

produkcija alkalne fosfataze, estereaze lipaze (C8), leucin arilamidaze, tripsina, kisele fosfataze, naftol-AS-BI-fosfohidrolaze, α i β -glukozidaze, N-acetil- β -glukozaminidaze i α -fukozidaze (Tabela 21).

Izolat 4TD1101S (*Candida tropicalis*) vrši produkciju alkalne fosfataze, estereaze lipaze (C8), leucin arilamidaze, tripsina, kisele fosfataze, naftol-AS-BI-fosfohidrolaze i α i β -glukozidaze. Kod izolata BK0302D (*Schwanniomyces occidentalis*) je utvrđena produkcija alkalne fosfataze, estereaze lipaze (C8) i kisele fosfataze, dok je kod izolata CK2404I (*Cyberlindnera saturnus*) utvrđena samo produkcija kisele i alkalne fosfataze (Tabela 21).

Izolat EK1605T (*Hanseniaspora uvarum*) vrši produkciju: alkalne fosfataze, estereaze lipaze (C8), leucin arilamidaze, tripsina, kisele fosfataze i naftol-AS-BI-fosfohidrolaze (Tabela 21). Izolat Avin1312L (*Candida tropicalis*) vrši produkciju alkalne fosfataze, estereaze (C4), estereaze lipaze (C8), lipaze (C14), leucin arilamidaze, valin arilamidaze, cistin arilamidaze, kisele fosfataze, α i β -glukozidaze i N-acetil- β -glukozaminidaze (Tabela 21). Kod izolata Cvin1610M (*Cyberlindnera saturnus*) je utvrđena produkcija estereaze (C4), lipaze (C14), leucin arilamidaze, valin arilamidaze, cistin arilamidaze, kisele fosfataze, naftol-AS-BI-fosfohidrolaze i β -glukozidaza (Slika 22).

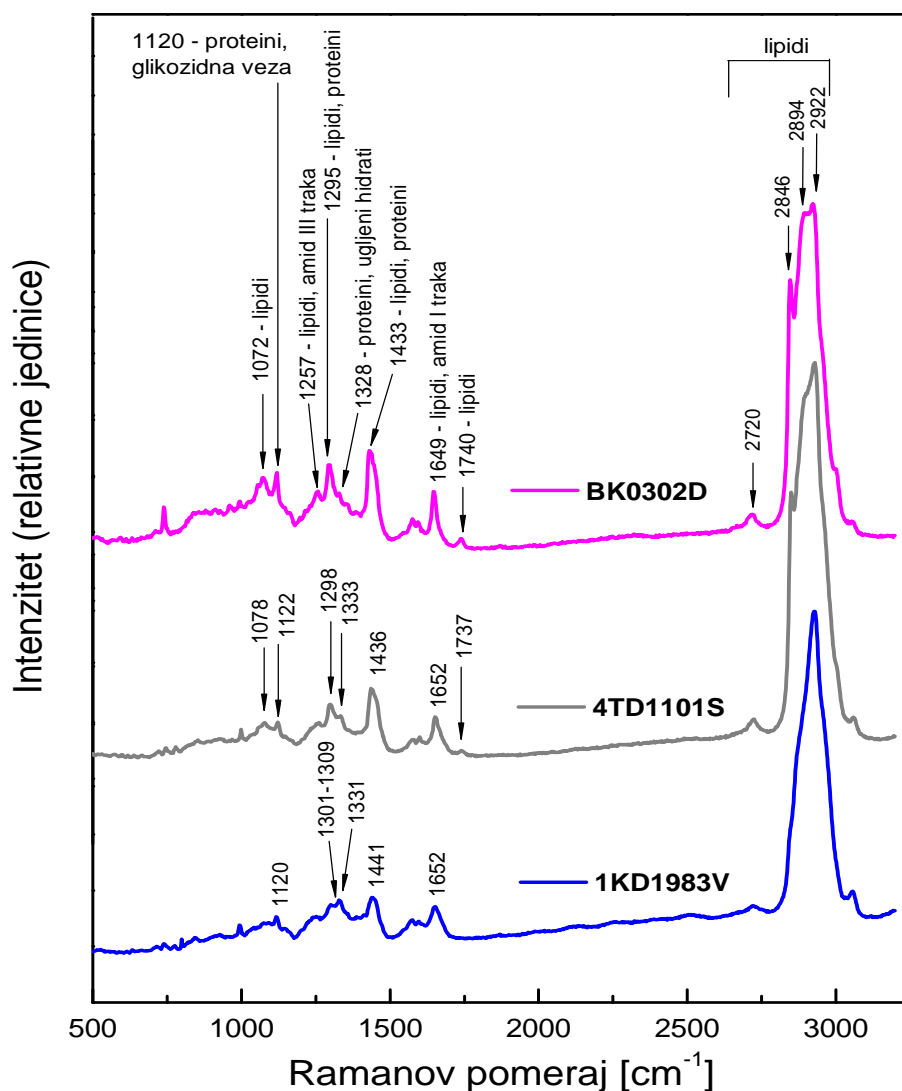
5.4.3. Karakterizacija izolata kvasaca Raman spektroskopijom

Spektroskopske vibracione tehnike kao što je i Raman spektroskopija omogućavaju biohemijску karakterizaciju i brzu i preciznu klasifikaciju velikog broja mikroorganizama (Hamasha, 2011). U poslednjih petnaest godina, Raman spektroskopija je postala prihvaćena kao neinvazivna metoda za brzu identifikaciju mikroorganizama (Stockel et al., 2016). Zahvaljujući ovoj metodi, moguće je utvrditi razlike između uzoraka i izvršiti identifikaciju gljiva, bakterija i kvasaca (Stockel et al., 2016). Kako bi se utvrdile razlike u biohemijским karakteristikama između izolata različitih rodova kvasaca, u ovom radu je primenjena Raman spektroskopija.

Poređenje Raman spektara izolata 1KD1983V, 4TD1101S i BK0302D

Na slici 23 je prikazano poređenje traka lipida u Raman spektrima izolata 1KD1983V, 4TD1101S i BK0302D. Trake su dobijene usrednjavanjem većeg broja snimljenih Raman spektara. Može se konstatovati da su kod izolata 4KD1101S (*Candida*

tropicalis) Raman pikovi koji odgovaraju frakciji lipida izraženiji nego kod izolata 1KD1983V (*Cyberlindnera saturnus*), pri čemu su ti isti pikovi najizraženiji kod izolata BK0302D (*Schwanniomyces occidentalis*). To se najpre može zaključiti na osnovu oblasti talasnih brojeva iznad 1700 cm^{-1} . Naime, sa slike 23 se može videti da se u spektrima izolata 1KD1983V uopšte ne zapaža traka u oblasti oko $1737 - 1740\text{ cm}^{-1}$, koja je karakteristična za frakciju lipida, a potiče od C=O „*stretching*“ vibracija (Huang et al., 2005; Rosch et al., 2005; Rosch et al., 2006; Bednarova et al., 2012), dok je ta traka jedva primetno naznačena u spektrima izolata 4TD1101S (na $\sim 1737\text{ cm}^{-1}$), a postaje jasno primetna tek kod izolata BK0302D (na $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$).



Slika 23. Raman spektri izolata kvasaca *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D), *Candida tropicalis* (4TD1101S) i *Cyberlindnera saturnus* (1KD1983V) na kojima dominiraju pikovi lipida

Bitne promene se zapažaju i u oblasti od 2800 do 3100 cm^{-1} , gde postoji složeni pik koji kod izolata BK0302D pokazuje oblik karakterističan za Ramanov odziv frakcije lipida (Bednarova et al., 2012; Serrano et al., 2015), dok je to slabije izraženo kod izolata 4TD1101S, a najslabije - u spektrima izolata 1KD1983V.

Pored toga, promene u intenzitetu pika na $\sim 1072\text{-}1078 \text{ cm}^{-1}$, koji se takođe primarno može pripisati frakciji lipida (C-C istežućim tj. „*stretching*“ vibracijama) (Bednarova et al., 2012.; Samek et al., 2014), uz manji doprinos C-N istežućih vibracija proteina (Bhowmick et al., 2008), su analogne promenama navedenim kod pika na 1737-1740 cm^{-1} . Ipak, može se smatrati da je u spektrima sva tri izolata obuhvaćen odgovor frakcije lipida, jer je kod svih uzoraka prisutna traka na $\sim 2720 \text{ cm}^{-1}$ za koju je objavljeno da takođe karakteriše lipide (Bednarova et al., 2012).

Od ostalih pikova koji su uobičajeno prisutni u spektru lipida, ali nisu specifični samo za njih, mogu se pomenuti pikovi na:

- a) $\sim 1255\text{-}1257 \text{ cm}^{-1}$ (lipidi i amidi III) (Bhowmick et al., 2008; Bednarova et al., 2012; Serrano et al., 2015),
- b) $\sim 1295\text{-}1309 \text{ cm}^{-1}$ (dominantno „*CH₂twisting*“ vibraciona moda lipida i delom „*C-H deformation*“ moda proteina u oblasti 1295-1301 cm^{-1} , uz liniju amida III na $\sim 1308\text{-}1309 \text{ cm}^{-1}$) (Xie i Lia, 2003; Huang et al., 2004; Singh et al., 2006; Bhowmick et al., 2008; Bednarova et al., 2012), kao i pikovi na
- c) 1433-1441 cm^{-1} i $\sim 1649\text{-}1652 \text{ cm}^{-1}$ koji potiču od lipida i proteina, odnosno od lipida i amida I, respektivno (Huang et al., 2005; Rosch et al., 2006; Onogi et al., 2010; Bednarova et al., 2010).

Ta poslednja četiri navedena pika su najizraženija kod izolata BK0302D, a najmanje izražena kod izolata 1KD1983V.

Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da je sadržaj lipida najveći u izolatu BK0302D, a najmanji kod izolata 1KD1983V. Na povećani sadržaj lipida u odnosu na frakciju proteina kod izolata BK0302D, u poređenju sa izolatima 1KD1983V i 4TD1101S, ukazuje i oblik pika na $\sim 1649\text{-}1652 \text{ cm}^{-1}$. Ovaj pik je u opštem slučaju asimetričan, jer njemu, pored linije lipida čiji se maksimum javlja na pomenutim vrednostima talasnog broja (Huang et al., 2005; Hamaguchi, 2009; Onogi et al., 2010; Bednarova et al., 2012), daje doprinos i linija amida I na oko 1660-1670 cm^{-1} , u vidu pregiba tj. „*shoulder*“ efekta (Xie i Lia, 2003; Singh et al., 2006; Bednarova et al.,

2012; Samek et al., 2014; Serrano et al., 2015). Asimetričnost tog pika u spektrima naših uzoraka dolazi do izražaja kod izolata 1KD1983V i delimično u spektrima izolata 4TD1101S, dok je kod BK0302D ovaj pik uži i dobija skoro simetričnu formu (pregib na desnoj strani pika se gubi), zbog pojačanog udela frakcije lipida u odnosu na frakciju proteina.

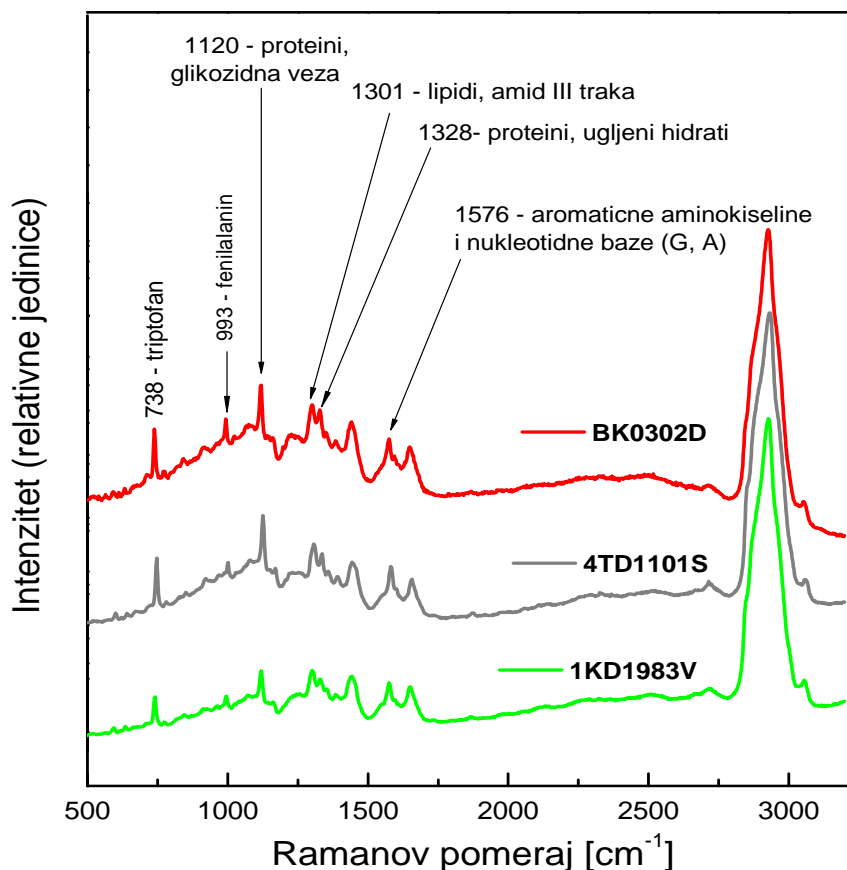
Dodatno, u prilog promene sadržaja frakcije lipida u odnosu na sadržaj proteina i ugljenih hidrata, govori i promena relativnog intenziteta pika na $\sim 1295\text{-}1309\text{ cm}^{-1}$ u odnosu na pik na $\sim 1328\text{-}1331\text{ cm}^{-1}$ (Huang et al., 2005; Rosch et al., 2006; Bhowmick et al., 2008; Bednarova et al., 2012; Serrano et al., 2015). Kod izolata BK0302D je prvi pik (dominantno lipidi) znatno veći od drugog, dok se taj odnos smanjuje kod izolata 4TD1101S, da bi kod izolata 1KD1983V pri nekim snimcima drugi pik imao čak i veći intenzitet od prvog. Pri poređenju spektara izolata BK0302D, 4TD1101S i 1KD1983V, primećuje se i to da talasni broj, kao i frekvencija složenog pika na $\sim 1295\text{-}1309\text{ cm}^{-1}$ opadaju, što je u skladu sa zaključkom o sve većem udelu linije lipida (linija na oko $1295\text{-}1301\text{ cm}^{-1}$), u okviru tog pika.

Promene u izgledu spektra u oblasti od $1550\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$ se odnose ne samo na promene sadržaja lipida, već i na promene u Raman odgovoru aromatičnih aminokiselina i nukleotidnih baza, a ovo poslednje je detaljnije razmatrano u spektrima prikazanim na slici 24. Spektri na slici 24 i slici 25 odgovaraju onim regionima u ćeliji kvasca u kojima lipidi nisu dominantna frakcija, tako da u tim spektrima nema pika na $1737\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$, a nema ni karakteristične diferencijacije složenog pika u oblasti od 2800 do 3100 cm^{-1} . Tada pik na $\sim 1649\text{-}1654\text{ cm}^{-1}$ ostaje širok i asimetričan kod sva tri izolata kvasca.

Spektar aromatičnih amino-kiselina i nukleotidnih (azotnih) baza

Pik koji se u snimljenim spektrima zapaža u oblasti oko $1576\text{-}1581\text{ cm}^{-1}$ se u literaturi pripisuje vibracijama unutar aromatičnih aminokiselina i nukleotidnih baza (prvenstveno adenina i guanina) (Rosch et al., 2006; Serrano et al., 2015). Pored toga, pikovi na $\sim 738\text{-}747\text{ cm}^{-1}$ i $993\text{-}1002\text{ cm}^{-1}$ se pripisuju prvenstveno aromatičnim aminokiselinama triptofanu i fenilalaninu („ring breathing vibrations“) respektivno, kao i vibracijama pojedinih veza koje u proteinima grade neke komponente sa bočnim ostacima ovih aminokiselina (Huang et al., 2005; Rosch et al., 2006; Samek et al.,

2014). Na slici 24 su prikazani spektri na kojima su ovi pikovi intenzivniji nego što su oni to bili u spektru na slici 23, gde su dominirale trake lipida, što je posledica druge izabrane oblasti u okviru ćelije kvasca, tokom snimanja spektara.

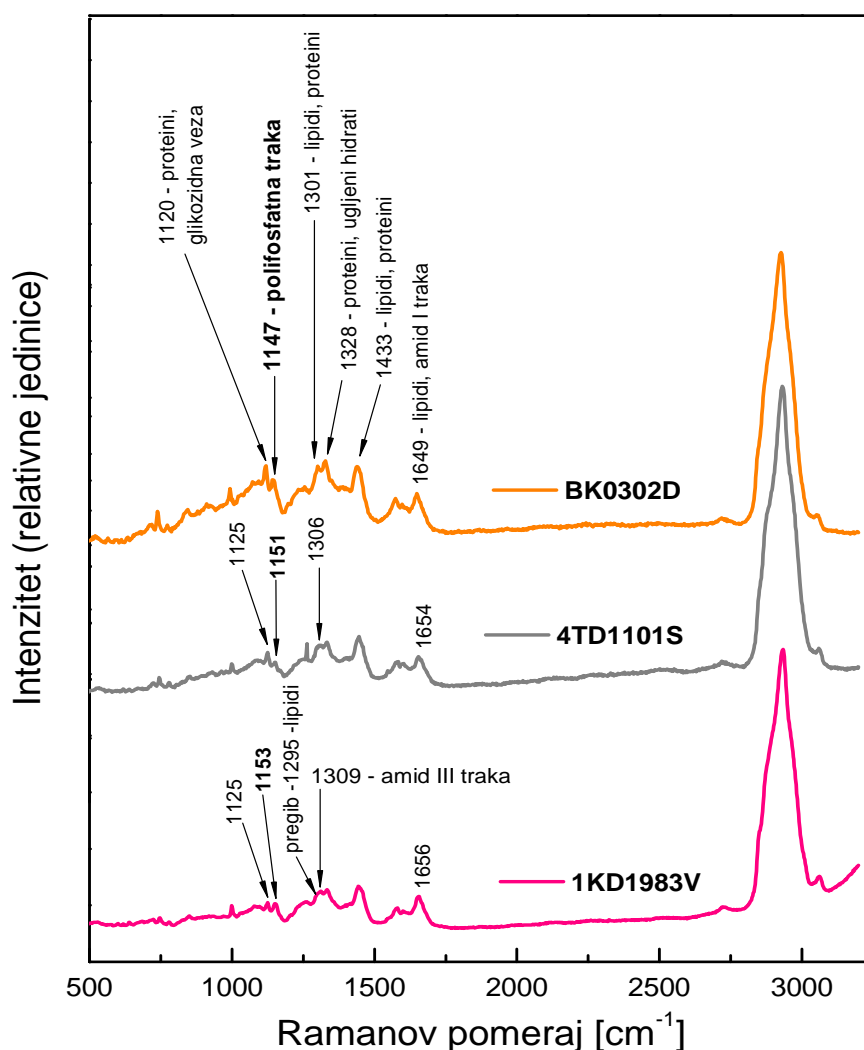


Slika 24. Raman spektri izolata kvasaca *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D), *Candida tropicalis* (4TD1101S) i *Cyberlindnera saturnus* (1KD1983V) na kojima dominiraju pikovi aromatičnih amino-kiselina i nukleotidnih baza, proteina i ugljenih hidrata.

Vidi se da su u spektrima na slici 24 takođe dosta izraženi i pikovi koji potiču od proteina i ugljenih hidrata, kao i od C-O-C glikozidne veze. Tako je npr. pik na ~ 1120 - 1125 cm^{-1} (C-N „stretching“ mode proteina i glikozidna veza (Rosch et al., 2006; Bhowmick et al., 2008; Samek et al., 2014) naročito izražen u poređenju sa lipidnim pikom na ~ 1072 - 1078 cm^{-1} kojise na slici 24 faktički i ne zapaža, a i pik na ~ 1328 - 1336 cm^{-1} (C-H deformacione mode u proteinima i ugljeni hidrati kao što je glikogen) je kod izolata BK0302D i 4TD1101S bitno izraženiji nego što je bio u spektru lipida.

Spektar koji odgovara oblasti vakuole

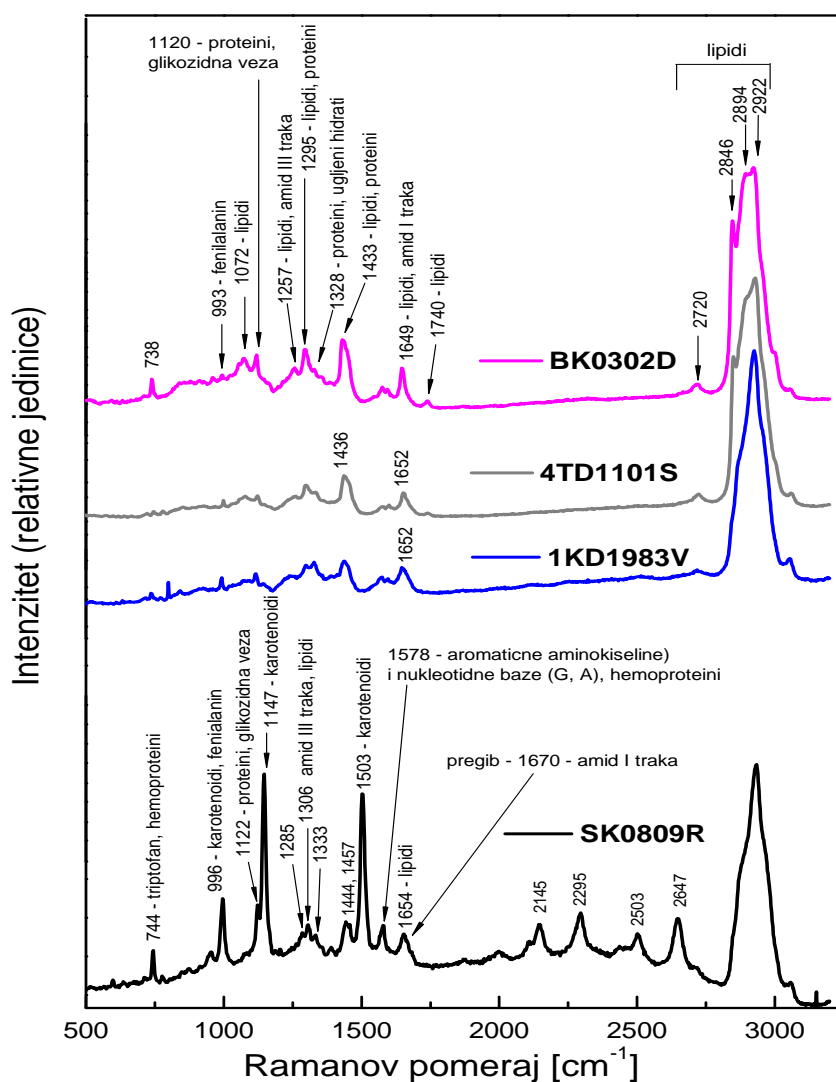
Slika 25 prikazuje spektar koji najverovatnije potiče iz oblasti vakuole, što se može zaključiti na osnovu spektara datih u literaturnim podacima. Na to prvenstveno ukazuje pik na 1147-1153 cm^{-1} , za koji je objavljeno da potiče prvenstveno od polifosfata i da može da služi kao marker za vakuolu (Bednarova et al., 2012). Sa druge strane, ovaj pik neki autori pripisuju i C-C i C-N istežućim vibracijama proteina (Huang et al., 2005; Singh et al., 2006). Čini se da je ovaj pik najizraženiji kod izolata BK0302D, mada je izražen i kod nekih snimaka izolata 1KD1983V.



Slika 25. Raman spektri izolata kvasaca *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D), *Candida tropicalis* (4TD1101S) i *Cyberlindnera saturnus* (1KD1983V) na kojima se registruje Raman odgovor vakuole

Na slici 25 se takođe može zapaziti da su pikovi smešteni na ~ 1120 - 1125 cm^{-1} (proteini i glikozidna veza C-O-C) i na ~ 1328 - 1333 cm^{-1} (proteini i ugljeni hidrati) najizraženiji u spektru vakuole izolata BK0302D. Linija na ~ 1295 - 1301 cm^{-1} (lipidi) je takođe najizraženija kod izolata BK0302D, što je u skladu i sa ranije konstatovanim najvećim sadržajem lipida u tom uzorku.

Poređenje Raman spektra izolata SK0809R (*Rhodotorula mucilaginosa*) sa spektrima izolata 1KD1983V, 4TD1101S i BK0302D



Slika 26. Poređenje Raman spektra izolata *Rhodotorula mucilaginosa* (SK0809R) sa Raman spektrima izolata kvasaca *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D), *Candida tropicalis* (4TD1101S) i *Cyberlindnera saturnus* (1KD1983V)

Pri poređenju Raman spektra izolata SK0809R sa spektrima izolata 1KD1983V, 4TD1101S i BK0302D (Slika 26), može se reći da se najupečatljivija promena odnosi na pojavu Raman pikova karotenoida u spektru SK0809R.

Poznato je da su za karotenoide generalno karakteristična sledeća tri Raman pika (De Oliveira, 2009; Jehlička, 2014; Thomas i McGoverin, 2016):

- 1) pik u oblasti talasnih brojeva od 1500 do 1535 cm^{-1} , koji se pripisuje istežućim vibracijama C=C veza u glavnom polienskom lancu,
- 2) pik u oblasti 1145 - 1165 cm^{-1} , koji se pripisuje prvenstveno C-C istežućim vibracijama u glavnom polienskom lancu i
- 3) pik u oblasti 1000 - 1010 cm^{-1} , koji se najčešće pripisuje C-CH₃ deformacionim modama.

U ranijim istraživanjima je uočeno da strukturne razlike između karotenoida, npr. u krajnjim prstenovima i polienskim bočnim lancima, kao i razlike u broju konjugovanih dvostrukih veza u glavnom polienskom lancu, utiču na Raman pomeraj ova tri dominantna pika u Raman spektrima i dovode do pojave nekih manjih pikova koji su specifični za konkretne vrste karotenoida (Withnal et al., 2003; Maia et al., 2015; Thomas i McGoverin, 2016).

Spektar karotenoida koji je zapažen kod izolata SK0809R (Slika 26) je po obliku veoma sličan spektru β -karotena (Collins et al., 2011; Pacia et al., 2015). To se može zaključiti ne samo na osnovu tri dominantna Raman pika karotenoida, već i na osnovu sporednih (manjih) pikova u oblasti od 2000 do 2700 cm^{-1} (Collins et al., 2011). Inače, β -karoten spada u jedan od 3-4 karakteristična pigmenta za kvasac *Rhodotorula mucilaginosa* (SK0809R). Po nekim autorima on predstavlja čak i dominantni karotenoid za ovu vrstu kvasca (Aksu i Eren, 2005), dok drugi autori navode da se zavisno od uslova rasta kvasca i torulen i torularhodin mogu pojaviti kao dominantno prisutni karotenoidi, pri čemu je u optimalnim uslovima za rast (pH 5 i 25°C) dominantan torulen, dok je npr. pri temperaturama iznad 31°C dominantan torularhodin, a pri pH <5 - preovlađuje β -karoten (Cheng i Yang, 2016). Ipak, pri poređenju spektra izolata SK0809R sa spektrom koji je za vrstu *Rhodotorula mucilaginosa* gajenu pod aerobnim uslovima prikazan u radu koji su objavili Pacia et al. (2015, fig. 2 F), može se konstatovati da su položaji sva tri glavna pika karotenoida u istraživanjima pomereni ka nižim vrednostima talasnih brojeva. Naime, u spektrima posmatranog izolata SK0809R se pomenuti pikovi nalaze

na položajima: $\sim 996 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1147 \text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1503 \text{ cm}^{-1}$, dok su u radu objavljenom od strane Pacia et al. (2015) ti pikovi kod vrste *Rhodotorula mucilaginosa* uočeni na položajima: 1002 cm^{-1} , 1154 cm^{-1} i 1511 cm^{-1} . Čak i pod pretpostavkom da je reč o različitom udelu četiri glavnakarotenoida za vrstu *Rhodotorula mucilaginosa* u posmatranim uzorcima i uzorcima u poslednjem pomenutom radu (različiti relativni udeo torularhodina, torulena, β -karotena i γ -karotena (Aksu i Eren, 2005; Moline et al., 2010), pomeranje pikova u ovim istraživanjima je veće od očekivanog. U svetlu gore navedene mogućnosti uticaja strukture kvasca na položaj tri karakteristična karotenoidna pika, moglo bi se pretpostaviti, da u glavnim lancima karotenoida kod SK0809R postoje izvesne strukturne promene, ali se postavlja pitanje o kakvim strukturnim promenama je reč i šta je moglo izazvati takve promene. Inače, piku na $\sim 996 \text{ cm}^{-1}$ može dati doprinos i linija fenilalanina („ring breathing vibrations“), dok piku na $\sim 1147 \text{ cm}^{-1}$ delom mogu doprineti i vibracije koje odgovaraju proteinskim komponentama (C-C i C-N istežuće vibracije proteina), a možda i linija polifosfata.

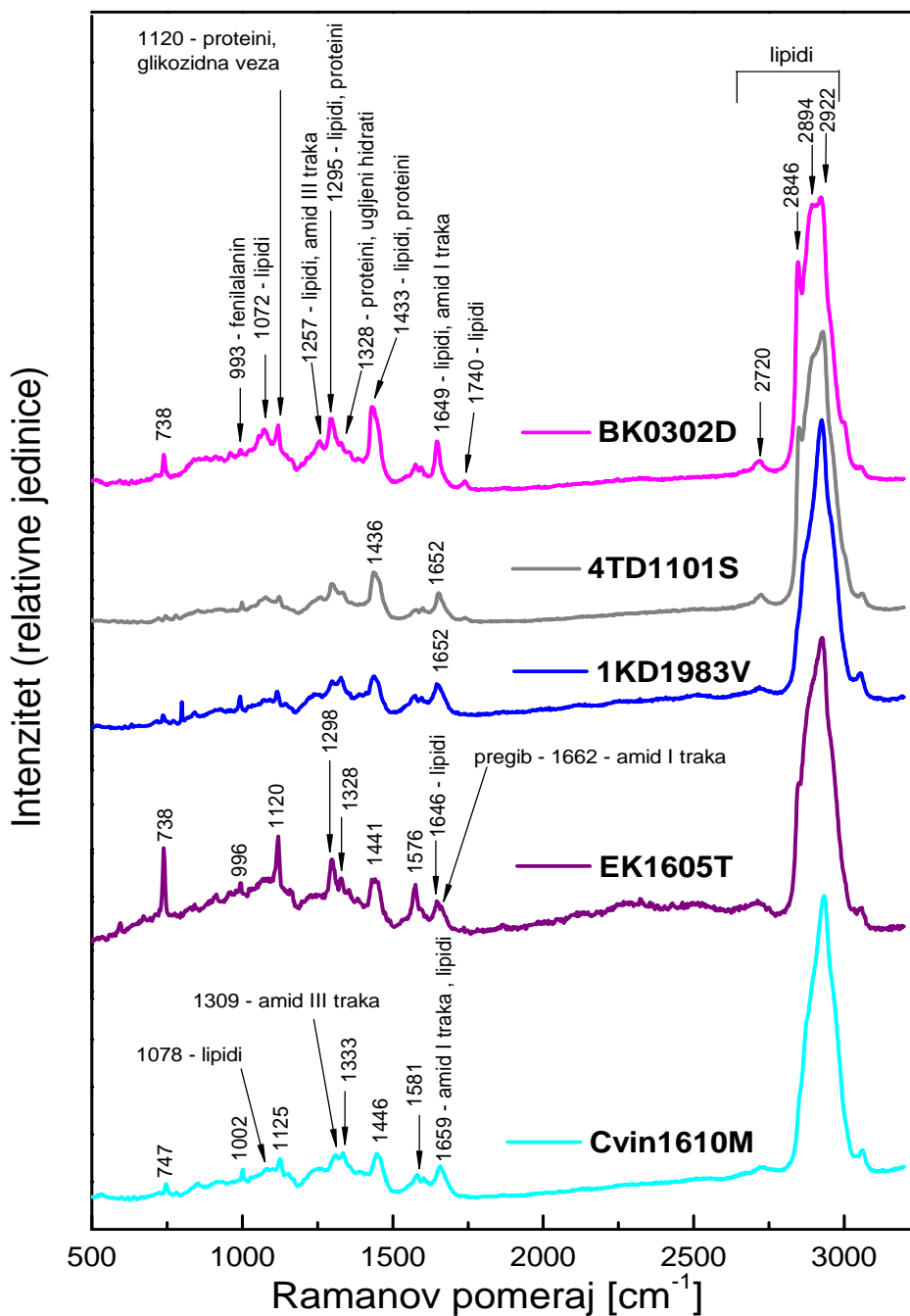
Pored pikova karotenoida, u Raman spektru izolata SK0809R prisutni su i pikovi hemoproteina, tj. proteina koji sadrže hem kao funkcionalnu grupu bitnu za transport kiseonika i za biološke oksidacije. Poređenjem sa spektrom koji je u radu Pacia et al. (2015) prikazan kao objedinjen Raman odgovor karotenoida i hemoproteina uz prisustvo i linija lipida (Fig.1 F), može se konstatovati da su karakteristična tri pika hemoproteina u spektrima pomerena, kao i glavni pikovi karotenoida ka nižim vrednostima talasnih brojeva. Reč je o pikovima koji su u pomenutom radu registrovani na: $\sim 750 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1131 \text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1586 \text{ cm}^{-1}$, a pri merenjima na $\sim 741 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1122 \text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1578 \text{ cm}^{-1}$. Ipak treba imati u vidu da, prema literaturnim podacima, pikovima na ovim položajima ne daju doprinos isključivo linije hemoproteina, već i druge linije, koje mogu izazvati uočeno pomeranje u vrednosti talasnih brojeva pikova. Naime, piku na $\sim 744 \text{ cm}^{-1}$ doprinos verovatno daje i linija triptofana, dok pik na $\sim 1122 \text{ cm}^{-1}$ prvenstveno potiče od glikozidne veze i generalno od C-N „stretching“ moda proteina, a pik na $\sim 1578 \text{ cm}^{-1}$ se može pripisati i vibracijama unutar aromatičnih aminokiselina i nukleotidnih baza (prvenstveno adenina i guanina). Pikovi hemoproteina u spektru SK0809R na slici 23 su bitno slabije izraženi nego pikovi karotenoida, što je uobičajeno kada su kvasci gajeni pod aerobnim uslovima, jer su tada karotenoidi dominantna

jedinjenja koja preuzimaju ulogu detoksifikatora i tada je ćelijska koncentracija hemoproteina prilično niska (Pacia et al., 2015).

Što se tiče pojave lipidnih traka u spektru izolata SK0809R, te trake su prisutne, ali su manje izražene nego kod izolata BK0302D, pa čak i manje izražene nego kod izolata 4TD1101S, jer nema diferencijacije linija u okviru složenog lipidnog pika, koji se javlja oblasti od 2800 do 3100 cm^{-1} , a nema ni pika na $\sim 1072\text{-}1078 \text{ cm}^{-1}$ (primarno lipidi), ni pika na $\sim 1255\text{-}1257 \text{ cm}^{-1}$ (lipidi i amidi III), kao ni lipidnog pika na $\sim 1737\text{-}1740 \text{ cm}^{-1}$. Pri tome su pik na $\sim 1649\text{-}1654 \text{ cm}^{-1}$ (lipidi i amidi I) i pik na $\sim 1440\text{-}1450 \text{ cm}^{-1}$ (lipidi i proteini) slabije izraženi nego kod izolata BK0302D.

Poređenje Raman spektra izolata EK1605T (*Hanseniaspora uvarum*) i spektra izolata Cvin1610M (*Cyberlindnera saturnus*) sa spektrima izolata 1KD1983V, 4TD1101S i BK0302D

Iako je izolat EK1605T izolovan iz zemljišta sa visokim sadržajem polihlorovanih bifenola (PCB) i policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH), kao što je bio slučaj i sa izolatima 4TD1101S i BK0302D, ipak se ne može govoriti o jasnom povećanju sadržaja lipida u izolatu EK1605T, bar ne u onoj meri u kojoj je to uočeno kod izolata BK0302D i 4TD1101S (Slika 27). U stvari, spektar izolata EK1605T ukazuje na to da je sadržaj lipida u ovom uzorku sličan sadržaju lipida u izolatu 1KD1983V, pri čemu su trake lipida malo izraženije, ali ipak slabije izražene nego kod izolata 4TD1101S, a samim tim i slabije izražene nego kod izolata BK0302D. Osnovna razlika koja se primećuje u spektru izolata EK1605T, u odnosu na spektre izolata 1KD1983V, 4TD1101S i BK0302D, odnosi se najpre na znatan porast intenziteta pikova na sledećim položajima: $\sim 738 \text{ cm}^{-1}$ (triptofan i hemoproteini), $\sim 1120 \text{ cm}^{-1}$ (proteini i glikozidna veza) i $\sim 1576 \text{ cm}^{-1}$ (aromatične aminokiseline i nukleotidne baze, kao i hemoproteini). S obzirom na to da su lipidne trake slabije izražene kod izolata EK1605T nego kod izolata 4TD1101S i BK0302D, porast pika na $\sim 1298 \text{ cm}^{-1}$ kod izolata EK1605T najpre se može pripisati porastu koncentracije linije proteina u okviru tog pika, a ne porastu koncentracije lipidne linije u toj oblasti talasnih brojeva. Takođe, primećuje se da je Raman linija na $\sim 1328 \text{ cm}^{-1}$ jače izražena kod izolata EK1605T nego kod izolata 1KD1983V, 4TD1101S, BK0302D i Cvin1610M, što dodatno ukazuje na veći sadržaj proteina i ugljenih hidrata.



Slika 27. Poređenje Raman spektara izolata kvasaca *Hanseniaspora uvarum* (EK1605T) i *Cyberlindnera saturnus* (Cvin1610M) sa Raman spektrima izolata *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D), *Candida tropicalis* (4TD1101S) i *Cyberlindnera saturnus* (1KD1983V)

Nisu uočene jasne razlike između oblika spektra izolata Cvin1610M i spektra izolata 1KD1983V (Slika 27). Jedva primetno je izraženija traka u oblasti $\sim 1117-1125 \text{ cm}^{-1}$, što može biti uzrokovano blagim povećanjem doprinosa vibracija proteina i glikozidne

veze. Razmatranjem položaja pojedinih pikova, uočava se da kod izolata Cvin1610M postoji pomeranje pikova ka višim vrednostima talasnih brojeva. Precizni položaji pikova u oblasti $\sim 1295\text{-}1309\text{ cm}^{-1}$ i u oblasti $\sim 1649\text{-}1654\text{ cm}^{-1}$ potencijalno ukazuju na nešto veći doprinos moda amida III i amida I, respektivno, u odnosu na doprinos moda lipida.

5.5. Direktni mehanizmi stimulacije biljnog rasta

Mikroorganizmi koji se nalaze u rizosferi biljaka mogu različitim direktnim i indirektnim mehanizmima (*plant growth promoting*, PGP) stimulisati biljni rast. Ovi PGP mehanizmi uključuju azotofiksaciju, solubilizaciju fosfata, sintezu fitohormona, regulaciju produkcije etilenai tako direktno i indirektno podržavaju rast biljaka i povećavaju dostupnost nutrijenata (Saharan i Nehra, 2011). Mehanizmima direktne stimulacije se omogućava i olakšava snabdevanje biljaka neophodnim hranljivim materijama (rastvorljivost fosfata i transformacija azotnih jedinjenja), ili sinteza jedinjenja koja direktno stimulišu rast biljaka, kao što su indol-3-sirćetna kiselina (Nassar et al., 2005), amonijak, giberelini, produkcija siderofora (Sharma et al., 2013) i 1-aminociklopropan-1-karboksilat deaminaze (Cloete et al., 2009). Ovi mikroorganizmi se uspešno primenjuju u poljoprivrednoj praksi kao biofertilizatori (Gupta et al., 2015), biopesticidi (Sharma et al., 2013) i kao bioremedijacioni agensi (Hansda et al., 2014). Eksploatacija kvasaca u poljoprivredi je privukla pažnju zbog značajne biološke aktivnosti, ali i povećanja sigurnosti proizvodnje hrane (Agamy et al., 2013).

Produkcija auksina, koji se u prirodi javlja u nekoliko oblika, predstavlja jedan od najzastupljenijih PGP mehanizama, a najviše izučavani oblik auksina je indol-3-sirćetna kiselina (Glick, 2012).

Od svih ispitanih izolata kvasaca (11 izolata), kod šest je utvrđena sposobnost produkcije IAA ($\mu\text{g/ml}$) u prisustvu $100\ \mu\text{g/ml}$ l-triptofana. Najveća vrednost IAA je zabeležena kod *C. tropicalis* (3TD0905L, $6,00\ \mu\text{g/ml}$), a zatim i kod preostala tri izolata ove vrste kvasca i to: 2TD2912B ($3,70\ \mu\text{g/ml}$), 4TD1101S ($3,02\ \mu\text{g/ml}$) i Avin1312L ($2,80\ \mu\text{g/ml}$). Sposobnost produkcije IAA (Tabela 22) je utvrđena i kod *S. occidentalis* (BK0302D, $1,09\ \mu\text{g/ml}$) i *C. saturnus* (Cvin1610M, $1,08\ \mu\text{g/ml}$).

Tabela 22. Produkcija indol-3-sirćetne kiseline (IAA) od strane testiranih izolata kvasaca

| Izolat kvasca | Produkcija IAA ($\mu\text{g/ml}$) |
|--|-------------------------------------|
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> 1KD1983V | / |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> 2KD3007J | / |
| <i>Candida tropicalis</i> 2TD2912B | 3,70 |
| <i>Candida tropicalis</i> 3TD0905L | 6,00 |
| <i>Candida tropicalis</i> 4TD1101S | 3,02 |
| <i>Schwanniomyces occidentalis</i> BK0302D | 1,09 |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> CK2404I | / |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> EK1605T | / |
| <i>Candida tropicalis</i> Avin1312L | 2,80 |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> Cvin1610M | 1,08 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> SK0809R | / |

Različiti su podaci o optimalnoj koncentraciji IAA koja može imati pozitivan efekat, a prema istraživanju Teixeira et al. (2007) ona mora iznositi najmanje 0,7 $\mu\text{g/ml}$. *Candida tropicalis* HY izolovan iz zemljišta (Amprayn et al., 2012) je imao manju produkciju IAA (2,6 $\mu\text{g/ml}$) u odnosu na iste ispitivane vrste u ovoj disertaciji (2TD2912B, 3TD0905L, 4TD1101S i Avin1312L). U poređenju sa istraživanjima Chamnanpa et al. (2013), od pet izolata *Candida tropicalis* izolovanih iz rizosfere trave vetivere, samo jedan izolat je imao veću produkciju IAA (29,9 mg/l) u odnosu na izolate iste vrste, koji su ispitani u ovoj disertaciji.

U istraživanju Sun et al. (2014), kvasci izolovani iz lišća *Drosera indica* L. (*Cryptococcus flavus*, *Pseudozyma aphidis*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida* sp., *Hannaella coprosmaensis*, *Sporisorium reilianum* i *Ustilago esculenta*) su imali veću produkciju IAA (32,6-147,4 $\mu\text{g/ml}$) u odnosu na izolate koji su ispitani u ovoj disertaciji. Veću produkciju IAA (8,63- 610,63 $\mu\text{g/ml}$) su imali i kvasci izolovani iz lišća *Drosera spatulata* Lab: *Aureobasidium pullulans*, *Dothideomycetes* sp., *Pseudozyma aphidis*, *Candida akabanensis*, *Ustilago esculenta*, itd. (Fu et al., 2016).

Produkcijom IAA, mikroorganizmi pozitivno utiču na rast i dužinu korena, što dovodi do povećanja njegove površine, a samim tim i do većeg pristupa hranljivim materijama iz zemljišta (Fu et al., 2016). Jedan od načina biosinteze IAA je preko triptofan-zavisnog puta, što je bio i slučaj u istraživanjima rađenim u ovoj disertaciji. Triptofan

kao glavni prekursor u sintezi auksina u zemljištu je najrasprostranjeniji u oblasti od 12-16 cm od vrha korena (Jaeger et al., 1999). Samo mali broj studija je potvrdio biosintezu IAA preko triptofan-nezavisnog puta, jer još uvek nisu utvrđena intermedijarna jedinjenja, srednja faza, kao i geni uključeni u ovakav način biosinteze IAA (Sun et al., 2014). Na biosintezu IAA može uticati veliki broj faktora među kojima su i pH i temperatura (Spaepen et al., 2007). Kod mikoriznih gljiva biosinteza IAA se najbolje odvija pri pH 6,0-9,0 (Strzelczyk et al., 1992). Za većinu izolata kvasaca optimalna temperatura za biosintezu IAA u *in vitro* uslovima je 28°C, dok je pri temperaturama od 37°C i 16°C ovaj proces manje intezivan (Sun et al., 2014). Istraživanja vezana za produkciju IAA u ovoj disertaciji su izvršena u prisustvu 100 µg/ml l-triptofana i temperaturi od 28°C, što ne znači da bi ovi izolati kvasaca pri nekim drugim uslovima ispoljili drugačiju produkciju IAA. Stoga je u budućim istraživanjima potrebno optimizirati uslove biosinteze IAA u *in vitro* uslovima i utvrditi uticaj različitih koncentracija l-triptofana, ugljenika i azota (Sun et al., 2014).

5.5.1. Uticaj izolata kvasaca na solubilizaciju fosfata

S obzirom na različitu rastvorljivost fosfora u zemljištu, od izuzetnog je značaja koeficijent njegove pristupačnosti za biljke. Zemljišni mikroorganizmi su efikasni u oslobađanju fosfora iz neorganskih i organskih jedinjenja kroz procese rastvaranja i mineralizacije (Hilda i Fraga, 1999), čime doprinose pristupačnosti fosfora za biljke. Zbog toga, fosfosolubilizirajući mikroorganizmi se mogu primeniti u obliku inokuluma u cilju poboljšanja rasta biljaka i većeg prinosa (Fasim et al., 2002).

Značajnu ulogu u solubilizaciji fosfata imaju i zemljišni kvasci, koji nerastvorni oblik fosfata prevode u rastvorljiv i na taj način omogućavaju snabdevanje biljaka fosforom. Jedan od ciljeva rada bio je i da se ispita sposobnost izolovanih kvasaca u procesu solubilizacije fosfata *in vitro*.

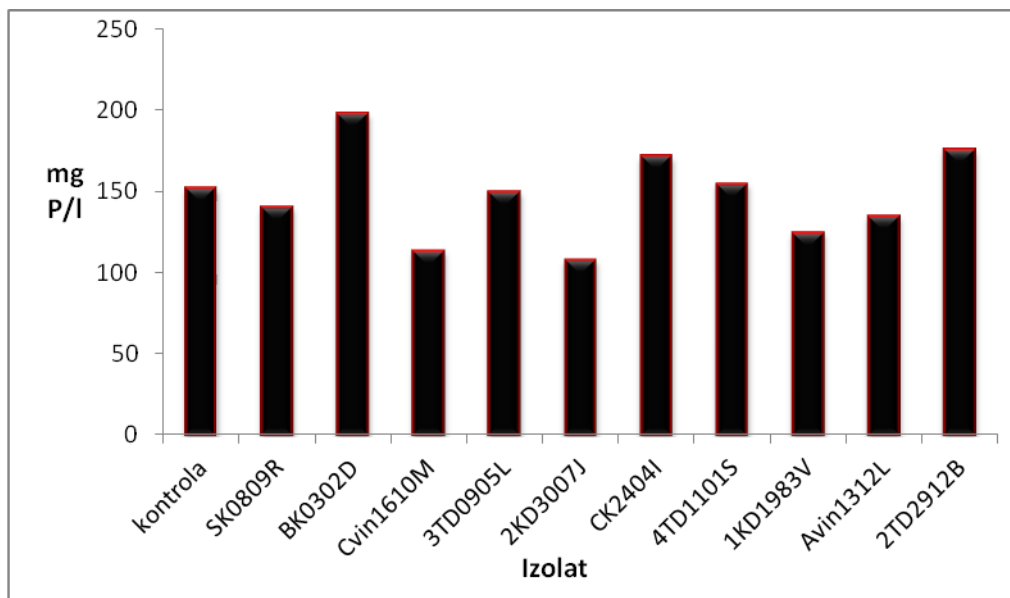
Tabela 23. Solubilizacija fosfata kod izolata kvasaca (mg P/l) tokom četiri nedelje inkubacije

| Uzorak | Početno stanje | mg P/l | | | |
|-----------|--------------------------|------------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | I nedelja | II nedelja | III nedelja | IV nedelja |
| kontrola | 151,0±1,1 ^{a,A} | 157,5±1,9 ^{a,b,c,d,e,f,B} | 142,2±1,1 ^{a,C} | 151,0±1,7 ^{a,A} | 156,7±1,4 ^{a,B} |
| SK0809R | 151,0±1,1 ^{a,A} | 159,7±1,5 ^{a,c,d,e,B} | 145,2±2,1 ^{a,A} | 125,1±1,3 ^{b,C} | 131,2±1,5 ^{b,c,C} |
| BK0302D | 151,0±1,1 ^{a,A} | 178,9±1,2 ^{g,B} | 196,3±1,8 ^{b,C} | 195,8±1,3 ^{c,C} | 220,4±1,4 ^{d,D} |
| Cvin1610M | 151,0±1,1 ^{a,A} | 142,8±1,9 ^{h,B} | 81,7±1,4 ^{c,C} | 103,0±2,0 ^{d,D} | 125,8±1,4 ^{b,E} |
| 3TD0905L | 151,0±1,1 ^{a,A} | 149,0±1,6 ^{c,h,A} | 144,3±1,5 ^{a,A} | 150,1±1,9 ^{a,A,B} | 156,3±1,2 ^{a,B} |
| 2KD3007J | 151,0±1,1 ^{a,A} | 141,9±1,5 ^{h,B} | 74,4±1,5 ^{d,e,C} | 99,3±1,8 ^{d,D} | 115,8±1,7 ^{e,E} |
| CK2404I | 151,0±1,1 ^{a,A} | 148,0±1,1 ^{b,h,A} | 69,4±1,7 ^{d,B} | 183,9±1,9 ^{e,C} | 202,7±1,5 ^{f,D} |
| 4TD1101S | 151,0±1,1 ^{a,A} | 149,6±1,2 ^{a,h,A} | 146,5±1,4 ^{a,A} | 150,1±1,4 ^{a,A} | 170,5±1,4 ^{g,B} |
| 1KD1983V | 151,0±1,1 ^{a,A} | 168,3±1,5 ^{d,g,B} | 75,8±1,9 ^{e,C} | 118,5±1,9 ^{b,D} | 135,6±1,2 ^{c,E} |
| Avin1312L | 151,0±1,1 ^{a,A} | 163,1±1,2 ^{d,e,B} | 154,1±2,0 ^{f,A} | 151,7±1,1 ^{a,A} | 70,1±1,1 ^{h,C} |
| 2TD2912B | 151,0±1,1 ^{a,A} | 156,8±1,8 ^{a,b,c,d,A} | 167,4±1,5 ^{g,B} | 173,7±1,3 ^{f,B} | 205,0±1,1 ^{f,C} |
| EK1605T | 151,0±1,1 ^{a,A} | / | / | / | / |

Najveća količina fosfora nakon četiri nedelje inkubacije je utvrđena kod *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D, 220,4 mg P/l), zatim kod *Candida tropicalis* (2TD2912B, 205,0 mg P/l) i *Cyberlindnera saturnus* (CK2404I, 202,7 mg P/l), a najmanja kod *C. tropicalis* (Avin1312L, 70,1 mg P/l). U toku prve nedelje, najveću efikasnost u procesu solubilizacije fosfata je zabeležio izolat *S. occidentalis* (BK0302D, 178,9 mg P/l) u odnosu na kontrolu i druge izolate. Najizraženije promene u količini fosfora su utvrđene u toku druge nedelje kod četiri izolata *Cyberlindnera saturnus*: CK2404I (69,4 mg P/l) 2KD3007J (74,4 mg P/l), 1KD1983V (75,8 mg P/l) i Cvin1610M (81,7 mg P/l). Tokom druge i treće nedelje nije bilo statistički značajne razlike u količini fosfora kod izolata *S. occidentalis* (BK0302D) i *C. tropicalis* (2TD2912B). Nakon završenog perioda inkubacije do promene u količini fosfora došlo je kod izolata *Candida tropicalis* (4TD1101S, 170,5 mg P/l). Dobijeni rezultati ukazuju da svi izolati nemaju sposobnost solubilizacije fosfata (Tabela 23).

Mali broj istraživanja je imao za cilj proučavanje mogućnosti kvasaca u solubilizaciji fosfata. Izolati *S. occidentalis* (BK0302D), *C. tropicalis* (2TD2912B) i *C. saturnus* (CK2404I) su imali veću produkciju fosfora u odnosu na zemljišne kvasce (*Candida tropicalis*, *Geotrichum capitates*, *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula minuta* i *Rhodotorula rubra*), koji su proučavani od strane Al-Falih (2005), gde se količina fosfata nakon završenog perioda inkubacije kretala od 4-45 µg/ml. Kvasac iz roda *Saccharomyces* izolovan iz uzoraka gline, imao je manju produkciju fosfora (2,56 µg

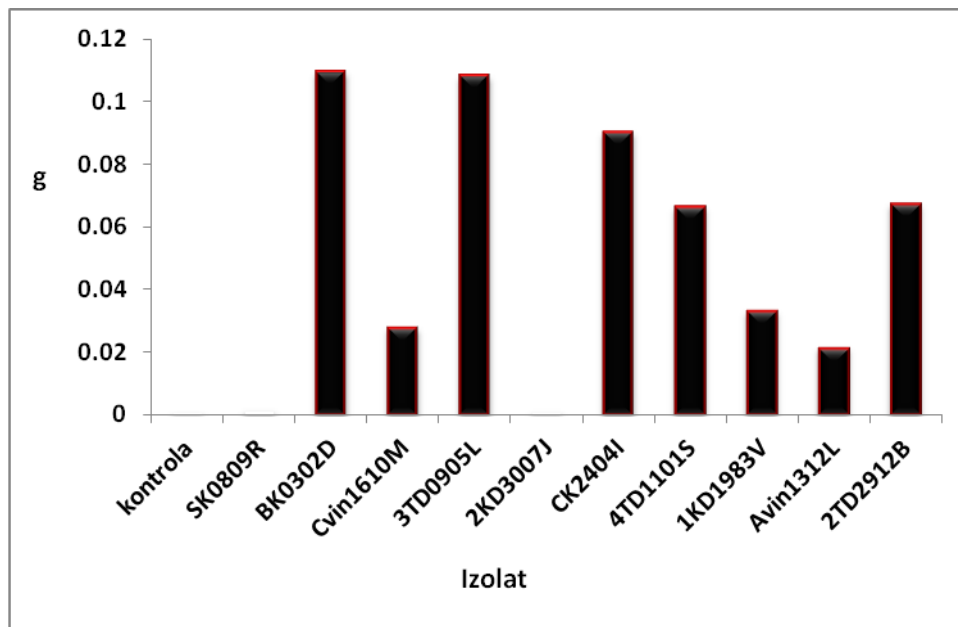
P/ml) u odnosu na ispitivane izolate (Hesham i Hashem, 2011). Izolati koji su proučavani u ovoj disertaciji su bili manje efikasni u solubilizaciji fosfata u odnosu na filamentozne gljive *Aspergillus* i *Penicillium* (Sane i Mehta, 2015).



Grafik 2. Prosečne vrednosti solubilizovanog fosfata (mg P/l)

Najveću efikasnost u procesu solubilizacije fosfata ispoljila su tri izolata BK0302D, CK2404I i 2TD2912B (Grafik 2). Izolati 3TD0905L i 4TD1101S su imali iste vrednosti fosfora kao i kontrola, dok su izolati SK0809R, Cvin1610M, 2KD3007J, 1KD1983V i Avin1312L imali manje količine fosfora u odnosu na kontrolu (Grafik 2).

Biomasa ispitivanih izolata u toku procesa solubilizacije je iznosila između 0,0005 g do 0,1094 g (Grafik 3).



Grafik 3. Biomase izolata kvasaca (g) u procesu solubilizacije fosfata

Nakon četiri nedelje inkubacije, najveća biomasa je izmerena kod *S. occidentalis* (BK0302D, 0,1094 g), zatim kod *C. tropicalis* (3TD0905L, 0,1080 g), *C. saturnus* (CK2404I, 0,0901 g) i *C. tropicalis* (2TD2912B, 0,0671 g). Kod izolata *C. tropicalis* (4TD1101S), takođe je došlo do povećanja biomase (Grafik 3). Kod izolata koji nisu imali sposobnost solubilizacije fosfata zabeležene su znatno manje biomase (Grafik 3). Najmanja biomasa je zabeležena kod izolata *C. saturnus* (2KD3007J, 0,0005 g). Povećanje količine fosfora je praćeno i povećanjem biomase i obrnuto, što potvrđuje i koeficijent korelacije (0,5899). U poređenju sa drugim autorima (Al-Falih2005; Sane i Mehta, 2015) ispitivani izolati su imali manju produkciju biomase.

Proces solubilizacije fosfata je praćen i smanjenjem pH vrednosti (Tabela 24).

Tabela 24. Promena pH vrednosti u toku procesa solubilizacije fosfata tokom inkubacije

| Uzorak | Početno stanje | pH | | | |
|------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | I nedelja | II nedelja | III nedelja | IV nedelja |
| kontrola | 6,0±0,00 ^{a,A} | 6,12±0,09 ^{a,B,C,D} | 6,14±0,3 ^{a,C} | 6,15±0,01 ^{a,C} | 6,09±0,10 ^{a,D} |
| SK0809R | 6,0±0,00 ^{a,A} | 6,13±0,20 ^{a,B} | 6,11±0,13 ^{a,B} | 7,29±0,07 ^{b,C} | 7,16±0,07 ^{b,D} |
| BK0302D | 6,0±0,00 ^{a,A} | 5,67±0,11 ^{b,e,B} | 5,44±0,10 ^{b,C} | 5,63±0,10 ^{c,B,D} | 5,38±0,09 ^{g,E} |
| Cvin1610M | 6,0±0,00 ^{a,A} | 5,44±0,05 ^{c,B} | 7,94±0,06 ^{c,C} | 8,23±0,06 ^{d,D} | 8,75±0,02 ^{d,E} |
| 3TD0905L | 6,0±0,00 ^{a,A} | 6,03±0,12 ^{a,d,A} | 6,05±0,05 ^{a,d,A} | 6,17±0,03 ^{a,B} | 5,79±0,07 ^{e,C} |
| 2KD3007J | 6,0±0,00 ^{a,A} | 5,38±0,06 ^{c,B} | 7,94±0,08 ^{c,C} | 8,20±0,01 ^{d,D} | 8,38±0,11 ^{f,E} |
| CK2404I | 6,0±0,00 ^{a,A} | 5,75±0,08 ^{e,B} | 7,43±0,13 ^{e,C} | 5,50±0,03 ^{e,D} | 5,58±0,04 ^{c,D} |
| 4TD1101S | 6,0±0,00 ^{a,A} | 5,91±0,03 ^{f,A,B} | 5,97±0,10 ^{d,A,B} | 5,90±0,13 ^{f,B} | 5,94±0,05 ^{h,A,B} |
| 1KD1983V | 6,0±0,00 ^{a,A} | 5,25±0,20 ^{g,B} | 7,54±0,07 ^{f,C} | 7,29±0,08 ^{b,D} | 7,16±0,03 ^{b,E} |
| Avin1312L | 6,0±0,00 ^{a,A} | 5,85±0,10 ^{e,f,B} | 5,70±0,04 ^{g,C} | 5,98±0,04 ^{f,A} | 7,75±0,05 ^{i,D} |
| 2TD2912B | 6,0±0,00 ^{a,A} | 5,94±0,12 ^{d,f,A} | 5,69±0,05 ^{g,B} | 5,70±0,03 ^{c,B} | 5,50±0,12 ^{j,C} |
| EK1605T | 6,0±0,00 ^{a,A} | / | / | / | / |

Najniža pH (5,38) je izmerena kod *S. occidentalis* (BK0302D) na kraju četvrte nedelje (Tabela 24). Takođe, kod ovog izolata je izmerena najveća biomasa (0,1094) i količina P (220,4 mg P/l). Na kraju inkubacionog perioda pH vrednost kod *C. tropicalis* (2TD2912B) je iznosila 5,50, a kod *C. saturnus* (CK2404I) 5,58. Ova tri izolata su pokazala inicijalni pad pH u medijumu, koji odgovara povećanju količine fosfora, što je i potvrđeno značajnim negativnim koeficijentom korelacije (-0,9589). Posle druge nedelje, najvišu vrednost pH i najmanju količinu fosfora su imala četiri izolata *C. saturnus* (1KD1983V, 2KD3007J, CK2404I i Cvin1610M). Na kraju inkubacionog perioda inkubacije nižu pH od kontrole su imala još dva izolata *C. tropicalis* (4TD1101S i 3TD0905L).

Inverznu vezu između solubilizacije fosfata i pH vrednosti su potvrdili i drugi autori (Al-Falih, 2005; Zaidi et al., 2009). Do snižavanja pH dolazi usled produkcije organskih kiselina, koje mogu delovati na proces solubilizacije fosfata, direktnim rastvaranjem neorganskog fosfata, ili izmenom anjona fosfata anjonima kiseline (Sharma et al., 2013). Takođe, organske kiseline mogu povećati dostupnost P sprečavanjem njegove apsorpcije za zemljišne čestice, ili formiranjem kompleksa sa katjonima na površini zemljišta (Bianco i Defez, 2010). Solubilizacija fosfata zavisi od vrste mikroorganizama, kao i od kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja kiselina u medijumu (Mittal et al., 2008).

Vassileva et al. (2000) su ukazali na značaj zemljišnih kvasaca u transformaciji slabo rastvornih neorganskih fosfata i karbonata, čime se povećava dostupnost fosfora, gvožđa i drugih mikronutrijenata. Utvrđeno je da *Yarrowia lipolytica* u inkapsulisanom obliku ima sposobnost solubilizacije neorganskih fosfata i kalcijum karbonata, pri čemu dolazi do stvaranja limunske kiseline (Vassileva et al., 2000). Istraživanja Nakayan et al. (2013) su ukazala da zbog biohemijskih karakteristika i PGP osobina upotreba kvasaca u poljoprivredi može doprineti smanjenju upotrebe mineralnih đubriva uz optimalnu produkciju kukuruza, ali su kvasci još uvek nedovoljno iskorišćeni u održivoj poljoprivredi proizvodnje kukuruza.

5.5.2. Uloga izolata kvasaca u transformacija azotnih jedinjenja

Intenzivna poljoprivredna proizvodnja je doprinela povećanju prinosa useva ali je dovela i do ozbiljnih ekoloških problema, prvenstveno zbog povećane upotrebe mineralnih azotnih đubriva i značajnih gubitaka azota iz poljoprivrednog zemljišta (De Vries, 2009). Gubici azota mogu izazvati eutrofikaciju u vodenim ekosistemima što je iniciralo i donošenje propisa, kao što je EU Nitratna Direktiva. Pored toga ciklus kruženja azota je važan proces i sa aspekta klimatskih promena i nastali azot (I) oksid (N_2O) kao gas sa efektom staklene bašte višedoprinosi zagrevanju atmosfere od CO_2 (Huhe et al., 2016). Paralelno, a kao posledica donošenja različitih propisa, poslednjih nekoliko decenija, došlo je do povećanja potražnje za održivom poljoprivrednom proizvodnjom.

Boljem upravljanju povećanju produktivnosti u agroekosistemima značajno može doprineti bolje razumevanje i iskorišćavanje uloge zemljišnih mikroorganizama u procesima transformacije azotnih jedinjenja (Robertson i Groffman, 2015). U ovim oksido-redukcionim procesima u zemljištu značajnu ulogu imaju gljive, bakterije i kvasci (Alharbi, 2009). Gljive i bakterije u zemljištu imaju važnu ulogu u različitim ciklusima kruženja azota, pre svega u procesu transformacije azotne organske materije tokom koje se oslobađa amonijak koji se može iskoristiti ili imobilisati, zavisno od uslova sredine (Bloem et al., 1997). Zbog končaste i razgranate stukture hifa, gljive mogu učestvovati u procesima transformacije i prostorno udaljene azotne organske materije (Myrold i Posavatz, 2007). Rezende et al. (2004) su ukazali na potencijal

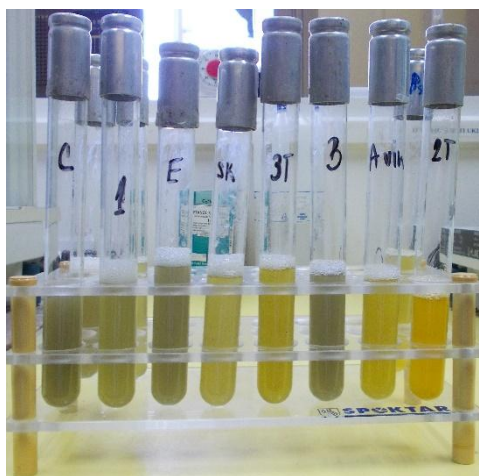
kvasaca u zemljištu i ulogu u snabdevanju biljaka azotom. U okviru ovih istraživanja ispitana je sposobnost produkcije amonijaka i nitrata.

Sposobnost izolata kvasaca u produkciji amonijaka (NH_3) predstavlja opštu karakteristiku PGP mikroorganizma (Tabela 25). U ovom istraživanju je određena sposobnost produkcije, ali ne i kvantitativno određivanje NH_3 . Istraživanja Dutta et al.(2015) su pokazala da najveći broj mikroorganizama produkuje NH_3 u količinama od 4,0-4,5 mmol/ml.

Tabela 25. Produkcija amonijaka (NH_3) od strane testiranih izolata kvasaca

| Izolat kvasca | Produkcija amonijaka |
|--|----------------------|
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> 1KD1983V | + |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> 2KD3007J | + |
| <i>Candida tropicalis</i> 2TD2912B | + |
| <i>Candida tropicalis</i> 3TD0905L | + |
| <i>Candida tropicalis</i> 4TD1101S | + |
| <i>Schwanniomyces occidentalis</i> BK0302D | + |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> CK2404I | + |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> EK1605T | + |
| <i>Candida tropicalis</i> Avin1312L | + |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> Cvin1610M | + |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> SK0809R | - |

Prisustvo (+); (-) odsustvo



Slika 28. Produkcija amonijaka od strane izolata kvasaca

Svi ispitivani izolati, osim *R. mucilaginosa*(SK0809R) su imali sposobnost produkcije NH₃ (Slika 28).

Palkova et al. (1997) su utvrdili „*quorum sensing*” mehanizam između kolonija kvasaca koje proizvode NH₃ u rizosferi mahunarki.

U istom istraživanju je ustanovljeno, da kolonija kvasca koja prva proizvodi veće količine NH₃ izaziva njegovu proizvodnju i u okolnim kolonijama, bez obzira na starost kolonija. Osim toga sinhronizacija razvoja kolonija kroz produkciju NH₃ uobičajena je pojava kod nekih vrsta kvasaca, ali se može javiti i između kolonija različitih rodova (Palkova i Forstova, 2000). Produkcija NH₃ i njegova uloga kao komunikacionog posrednika je utvrđena i kod *Debaryomyces hansenii* (Gori et al., 2007). Ova pojava mogla bi da bude korisna u uspostavljanju optimalne distribucije kvasaca u prirodnim staništima (Fu et al., 2016).

Sposobnost zemljišnih kvasaca u transformaciji azotnih jedinjenja ispitana je po Al-Falih (2006) *in vitro*. U toku ovog procesa je praćena promena količine nitrata (mg/l NO₃⁻), biomasa izolata (g) i pH vrednost medijuma.

Tabela 26. Promena sadržaja nitrata (mg/l) kod izolata kvasaca tokom četiri nedelje inkubacije

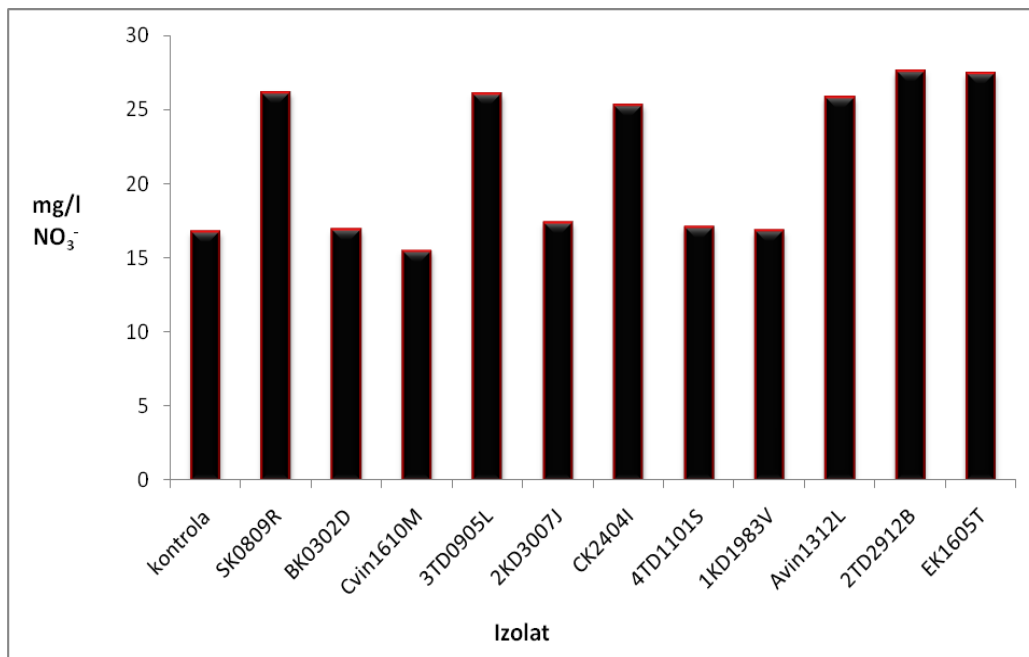
| Uzorak | NO ₃ ⁻ (mg/l) | | | |
|------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| | I nedelja | II nedelja | III nedelja | IV nedelja |
| kontrola | 16,6 ± 2,4 ^{a,A} | 16,8 ± 0,6 ^{a,A} | 16,8 ± 1,5 ^{a,A} | 16,7 ± 1,1 ^{a,A} |
| SK0809R | 25,2 ± 1,6 ^{b,A} | 29,3 ± 1,4 ^{b,B} | 22,3 ± 1,8 ^{b,C} | 27,6 ± 1,7 ^{b,c,B} |
| BK0302D | 16,5 ± 2,0 ^{a,A} | 16,5 ± 2,8 ^{a,A} | 17,1 ± 1,9 ^{a,d,A} | 17,3 ± 2,5 ^{a,A} |
| Cvin1610M | 16,6 ± 1,6 ^{a,A} | 11,8 ± 1,9 ^{c,B} | 16,5 ± 1,5 ^{a,A} | 16,9 ± 1,3 ^{a,A} |
| 3TD0905L | 29,2 ± 1,6 ^{c,A} | 27,5 ± 1,9 ^{b,A} | 19,8 ± 1,9 ^{b,d,e,B} | 27,5 ± 2,0 ^{b,c,A} |
| 2KD3007J | 16,6 ± 0,8 ^{a,A} | 16,9 ± 0,6 ^{a,A} | 18,2 ± 0,6 ^{a,e,A} | 17,6 ± 0,6 ^{a,A} |
| CK2404I | 29,0 ± 1,3 ^{c,A} | 22,4 ± 0,9 ^{d,B} | 26,6 ± 1,0 ^{c,A} | 27,1 ± 1,3 ^{b,c,A} |
| 4TD1101S | 16,6 ± 1,6 ^{a,A,B,C} | 15,9 ± 1,2 ^{a,B} | 18,1 ± 1,1 ^{a,e,D} | 17,6 ± 1,5 ^{a,C,D} |
| 1KD1983V | 16,4 ± 1,9 ^{a,A} | 16,7 ± 2,0 ^{a,A,B} | 16,6 ± 1,9 ^{a,A} | 17,4 ± 2,3 ^{a,B} |
| Avin1312L | 26,7 ± 0,9 ^{d,A} | 23,5 ± 1,2 ^{d,B} | 26,7 ± 1,0 ^{c,A} | 26,3 ± 0,9 ^{c,A} |
| 2TD2912B | 27,8 ± 1,6 ^{e,A} | 27,9 ± 1,9 ^{b,A} | 27,8 ± 1,7 ^{c,A} | 26,7 ± 1,9 ^{c,A} |
| EK1605T | 28,8 ± 1,8 ^{c,A} | 27,4 ± 2,0 ^{b,A} | 27,4 ± 1,9 ^{c,A} | 26,0 ± 2,1 ^{c,B} |

* Na početku ogleada u kontroli i u medijumu svih ispitivanih izolata sadržaj NO₃⁻ je iznosio 16,6 mg/l

Prema istraživanjima Al-Falih (2006) i Alharbi (2009), transformacija amonijum-sulfata je praćena u toku četiri nedelje. Nakon završenog inkubacionog perioda najveća količina NO₃⁻ je zabeležena kod sledećih izolata: *R. mucilaginosa* (SK0809R, 27,6 mg/l), tri izolata *C. tropicalis* (3TD0905L 27,5 mg/l; Avin1312L 26,3 mg/l i 2TD2912B

26,7 mg/l), *C. saturnus* (CK2404I 27,1 mg/l) i *H. uvarum* (EK1605T 26,0 mg/l). Preostalih pet izolata nije imalo sposobnost transformacije amonijum-sulfata (Tabela 26). U toku prve nedelje, kod izolata *H. uvarum* (EK1605T) količina nitrata je iznosila 28,8 mg/l, a na kraju inkubacionog perioda 26,0 mg/l. Do treće nedelje količina nitrata kod ovog izolata, nije se statistički značajno menjala, a do promene je došlo između treće i četvrte nedelje (Tabela 26). Najveću efikasnost u transformaciji amonijum-sulfata u prvoj nedelji je zabeležio izolat *C. saturnus* (CK2404I, 29,0 mg/l NO₃⁻). Kod istog izolata u toku druge nedelje je došlo do statistički značajnog smanjenja sadržaja nitrata (22,4 mg/l). U toku četiri nedelje inkubacionog perioda statistički značajne promene u sadržaju nitrata nisu zabeležene kod izolata *C. tropicalis* (2TD2912B). U prvoj nedelji količina nitrata kod ovog izolata je iznosila 27,8 mg/l, a na kraju četvrte nedelje 26,7 mg/l. U slučaju *R. mucilaginosa* (SK0809R), najveća količina nitrata je zabeležena u toku druge nedelje (29,3 mg/l), da bi na kraju inkubacionog perioda ona iznosila 27,6 mg/l.

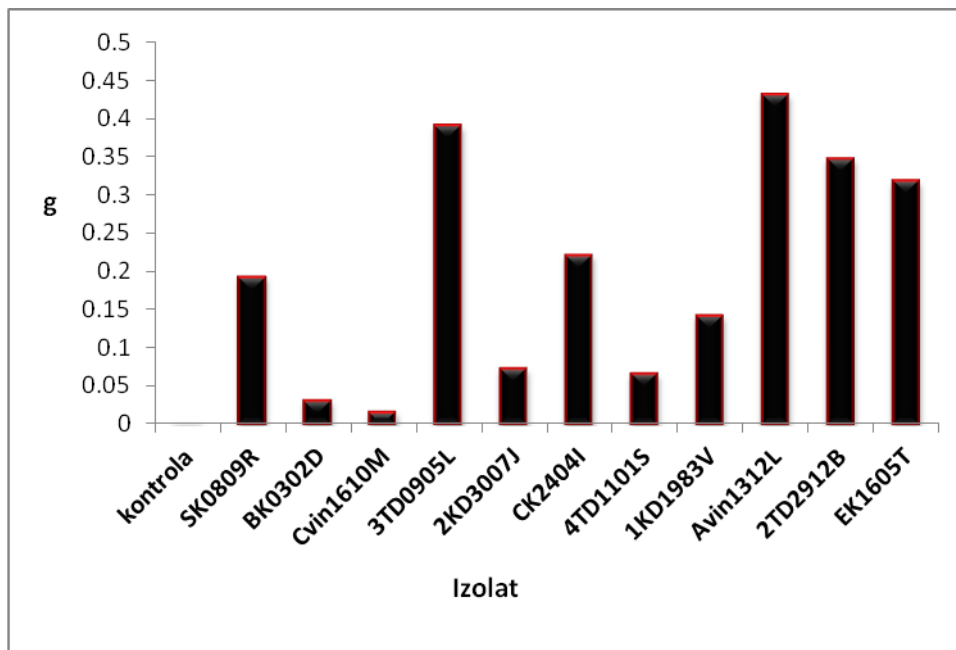
Sposobnost transformacije amonijum-sulfata u *in vitro* uslovima u trajanju od četiri nedelje je ispitana i kod kvasaca izolovanih iz peska: *Candida tropicalis*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum capitatum* i *Rhodotorula minuta* (Al-Falih, 2006). Svi izolati osim *C. tropicalis* su imali sposobnost transformacije amonijum-sulfata do nitrata, dok su nitriti zabeleženi samo u tragovima i to na kraju inkubacionog perioda (Al-Falih, 2006). Prema istom istraživanju najveći sadržaj nitrata je zabeležen kod *R. minuta* (94 µg/ml), zatim kod *G. capitatum* (70 µg/ml), a najmanji kod *G. candidum* (55 µg/ml). Ovi izolati su ispoljili veću efikasnost u transformaciji amonijum-sulfata u odnosu na izolate koji su proučavani u ovoj disertaciji. Za razliku od ovih istraživanja, u ovoj disertaciji od četiri izolata *C. tropicalis*, samo jedan (4TD1101S) nije imao sposobnost transformacije amonijum-sulfata. Alharbi (2009) je ispitivao sposobnost transformacije amonijum-sulfata od strane patogenih izolata *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans* u uslovima *in vitro*. Nakon četiri nedelje inkubacionog perioda, sadržaj nitrata kod *Candida albicans* je iznosio 57,0 µg/ml, a kod *Staphylococcus aureus* samo 1 µg/ml. Kod izolata *Williopsis californica* i *Saccharomyces cerevisiae*, količina nitrata nastala u toku transformacije amonijum-sulfata je iznosila 69 µg/ml, odnosno 58 µg/ml za *S. cerevisiae* (Falih i Wainwright, 1995).



Grafik 4. Prosečne vrednosti nitrata (mg/l NO₃⁻) u toku inkubacije

U toku procesa transformacije azotnih jedinjenja najveća prosečna vrednost nitrata je zabeležena kod izolata 2TD2912B i EK1605T. Veće količine nitrata u odnosu na kontrolu su zabeležene i kod izolata SK0809R, 3TD0905L i CK2404I (Grafik 4). Izolati BK0302D, 2KD3007J, 4TD1101S i 1KD1983V su imali isti sadržaj nitrata kao i kontrola, dok je kod izolata Cvin1610M zabeležen manji sadržaj nitrata u odnosu na kontrolu (Grafik 4).

Pored promene u sadržaju nitrata, praćena je i promena biomase (g). Biomasa ispitivanih izolata u procesu transformacije amonijum-sulfata je iznosila od 0,0148 g do 0,4314 g.



Grafik 5. Biomase izolata kvasaca (g) u procesu transformacije amonijum-sulfata

Nakon četiri nedelje, najveća biomasa je zabeležena kod tri izolata *C. tropicalis* (Avin1312L, 0,4314 g; 3TD0905L, 0,3906 g i 2TD2912B, 0,3473g), zatim kod *H. uvarum* (EK1605T, 0,3175 g) i *C. saturnus* (CK2404I, 0,2209 g). Nešto manja biomasa je izmerena kod izolata *R. mucilaginosa* (SK0809R, 0,1922 g). Kod izolata BK0302D, Cvin1610M, 2KD3007J, 4TD1101S i 1KD1983V koji nemaju sposobnost transformacije amonijum-sulfata zabeležene su izuzetno male biomase (Grafik 5). Povećanje količine nitrata je praćeno povećanjem biomase. U poređenju sa istraživanjima Al-Falih (2006) ispitivani izolati su imali veću produkciju biomase, ali u odnosu na istraživanja Falih i Wainwright (1995) biomasa ispitivanih izolata je bila manja.

U toku procesa transformacije amonijum-sulfata je praćena i promena pH vrednosti. Do izraženog pada pH vrednosti u toku procesa transformacije amonijum-sulfata dolazi usled produkcije organskih kiselina (Wainwright i Grayston, 1987; Falih i Wainwright, 1995; Al-Falih, 2006). Na kraju četvrte nedelje inkubacionog perioda najniža pH je zabeležena kod dva izolata *C. tropicalis* (Avin1312L, 2,91 i 2TD2912B, 2,96), a zatim kod *C. saturnus* (CK2404I, 2,97).

Tabela 27. Promena pH vrednosti medijuma u procesu transformacije amonijum-sulfata tokom inkubacije

| Uzorak | Početno stanje | pH | | | |
|-----------|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | | I nedelja | II nedelja | III nedelja | IV nedelja |
| kontrola | 6,0±0,0 ^{a,A} | 6,00±0,0 ^{a,A} | 6,04±0,3 ^{a,B} | 6,02±0,0 ^{a,A,B} | 6,03±0,2 ^{a,A,B} |
| SK0809R | 6,0±0,0 ^{a,A} | 3,85±0,2 ^{b,B} | 3,32±0,1 ^{b,C} | 3,18±0,4 ^{b,D} | 3,42±0,1 ^{b,C} |
| BK0302D | 6,0±0,0 ^{a,A} | 3,03±0,1 ^{c,B} | 3,08±0,1 ^{c,B,C} | 6,04±0,1 ^{a,A} | 6,01±0,2 ^{a,A} |
| Cvin1610M | 6,0±0,0 ^{a,A} | 5,83±0,1 ^{a,B} | 6,91±0,5 ^{d,C} | 7,32±0,1 ^{c,D} | 6,88±0,3 ^{c,C} |
| 3TD0905L | 6,0±0,0 ^{a,A} | 3,84 ±0,0 ^{b,B} | 3,07±0,1 ^{c,C} | 2,95±0,1 ^{d,D} | 2,95±0,1 ^{d,e,D} |
| 2KD3007J | 6,0±0,0 ^{a,A} | 6,32± 0,1 ^{d,B} | 5,94±0,0 ^{e,A} | 6,07±0,1 ^{a,A,B} | 6,04±0,1 ^{a,A} |
| CK2404I | 6,0±0,0 ^{a,A} | 3,07±0,5 ^{c,B,D} | 2,93±0,2 ^{f,C} | 3,10±0,0 ^{b,d,D} | 2,97±0,1 ^{d,e,B,C} |
| 4TD1101S | 6,0±0,0 ^{a,A} | 5,80±0,1 ^{a,B} | 5,90±0,1 ^{e,A} | 5,99±0,1 ^{a,A,B} | 6,06±0,2 ^{a,A} |
| 1KD1983V | 6,0±0,0 ^{a,A} | 5,76±0,2 ^{a,B} | 6,48±0,3 ^{g,C} | 6,81±0,3 ^{e,D} | 6,82±0,3 ^{c,D} |
| Avin1312L | 6,0±0,0 ^{a,A} | 3,89±0,1 ^{b,B} | 3,03±0,1 ^{c,f,C} | 2,88±0,1 ^{d,D} | 2,91±0,1 ^{e,D} |
| 2TD2912B | 6,0±0,0 ^{a,A} | 3,81±0,0 ^{b,B} | 3,04±0,0 ^{c,f,C} | 2,96±0,1 ^{d,C} | 2,96±0,2 ^{d,e,C} |
| EK1605T | 6,0±0,0 ^{a,A} | 5,03±0,1 ^{e,B} | 3,54±0,1 ^{h,C} | 3,52±0,2 ^{f,C} | 3,54±0,2 ^{b,C} |

Statistički značajne promene kod svih ispitivanih izolata su zabeležene u toku prve nedelje, dok između treće i četvrte nedelje nije došlo do značajnijih promena u pH vrednosti. Kod svih izolata koji su imali sposobnost transformacije amonijum-sulfata je zabeleženo smanjenje pH vrednosti na kraju inkubacionog perioda (Tabela 27). Inicijalni pad pH vrednosti u medijumu odgovara povećanju količine nitrata, što je i potvrđeno značajnim negativnim koeficijentom korelacije (-0,9858).

U procesu oksidacije amonijum jona (NH_4^+) učestvuje i veliki broj heterotrofnih bakterija i gljiva. Prva gljiva izolovana kao nitrifikator bila je *Aspergillus flavus* (1954. godine) i od tada je najviše proučavana u procesu heterotrofne nitrifikacije (Robertson i Groffman, 2015), gde značajno mesto zauzimaju i kvasci.

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji ukazuju na potencijal zemljišnih kvasaca u transformaciji azotnih jedinjenja *in vitro* i mogućnosti njihove primene u održavanju stabilnosti i produktivnosti agro-ekosistema.

5.6. Antagonizam kvasaca prema fitopatogenim gljivama

U zaštiti biljaka od fitopatogenih mikroorganizama preovlađuje upotreba hemijskih sredstava ili pesticida. Ova sredstva mogu biti različitog hemijskog sastava, perzistentnosti i toksikoloških osobina i kao takva mogu predstavljati opasnost po životnu sredinu (Grahovac et al., 2009). Biološka kontrola bazirana na

mikroorganizmima koji proizvode antibiotike ili imaju antifungalni uticaj u borbi sa bolestima biljaka predstavljaju moćnu alternativu u odnosu na sintetičke hemikalije koje su opasne za ljude (De Vrieze, 2015). Zbog toga istraživanja koja imaju za cilj primenu alternativnih metoda u suzbijanju biljnih patogena su sve intezivnija. Najveću pažnju privlače bakterije, aktinomicete, filamentozne gljive i zemljišni kvasci koji postaju sve interesantniji biokontrolni agensi (Suprpta, 2012; Fu et al., 2016). Mehanizmi koji imaju značajnu ulogu u biološkoj kontroli kvasaca prema fitopatogenim gljivama su: kompeticija za hranljivim materijama i prostorom, produkcija antifungalnih isparljivih metabolita (Nutaratat et al., 2014) i mikoparazitizam (El Ghaouth et al., 1998). Poznato je da je ćelijski zid gljiva veoma kompleksan i da sadrži jedinjenja kao što su hitin, β -1,3-glukan i manoproteini, a neke vrste sadrže i celulozu. Sposobnost kvasca da proizvede neke hidrolitičke enzime, kao što su glukanaze, hitinazne, proteaze i celulaze, pomažu u promovisanju antagonističke aktivnosti prema fitopatogenim gljivama. Indirektna posledica ovih aktivnosti je promovisanje rasta biljaka. Pokazalo se da neki sojevi kvasaca *Pseudozyma rugulosa* i *P. antarctica* imaju antifungalnu aktivnost zahvaljujući produkciji proteaze (Nutaratat et al., 2014). Jedan od mehanizama biološke kontrole je i produkcija enzima (hitinaze i β -1,3-glukanaze) koji učestvuju u degradaciji ćelijskog zida (Urquhart i Punja, 2002). Kompleks endohitinaza, egzohitinaza i N-acetilglukozaminidaza zapravo čine hitinolitičke enzime, a produkt njihove aktivnosti je N-acetilglukozamin (Sharma, 2012). Neki sojevi *Hanseniaspora uvarum* imaju sposobnost da proizvode enzim β -glukozidazu bez represije glukoze i značajnog smanjenja aktivnosti pri promenama pH vrednosti (Lopez et al., 2015).

U cilju ispitivanja antifugalne sposobnosti izolata kvasaca na *Pythium aphanidermatum* i *Botrytis cinerea* je urađen test dvojnih kultura. Antagonistička aktivnost ispitivanih izolata je određena na osnovu inhibicije rasta micelije fitopatogenih gljiva (I %). Prema Sookchaoy et al. (2009), izolati koji pokazuju antagonističku aktivnost su klasifikovani u četiri grupe: izolati sa veoma visokom (> 75 %), visokom (61-75 %), umerenom (51-60 %) i niskom (< 51 %) antagonističkom aktivnošću.

Jedan od najpoznatijih predstavnika roda *Pythium* je *Pythium aphanidermatum*. Vrste ovog roda parazitiraju na velikom broju biljaka i izazivaju značajne štete poljoprivredi širom sveta. Posebno su osetljive povrtarske biljke paradajz, paprika, krastavac, kupus, salata, tikve, šargarepa, grašak, itd. (Ivanović, 2004). Takođe, ova fitopatogena gljiva

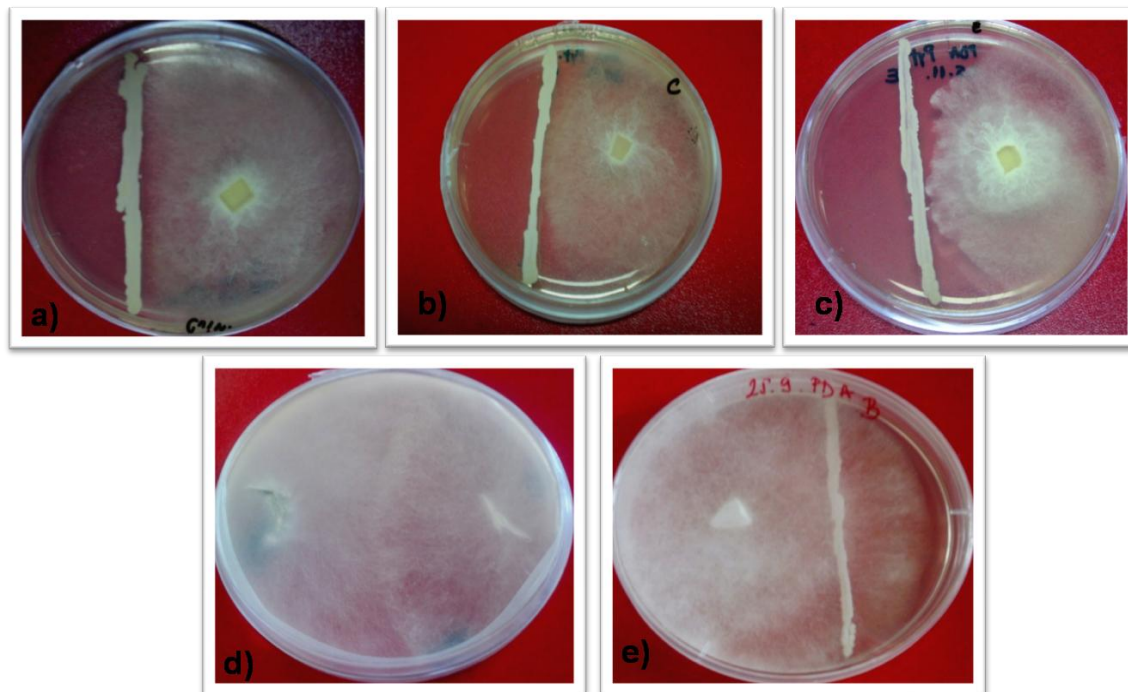
može se javiti i na ratarskim kulturama, cveću, travama, ali i na nekim vrstama voćki. O ekonomskom značaju *Botrytis cinerea* prouzrokovavaču sive truleži, najbolje govori podatak, da se na fungicide za njegovo suzbijanje godišnje troši 15-25 miliona dolara (Tanović et al., 2011). Patogen je za 235 vrsta biljaka, ugrožava proizvodnju povrća, voća, grožđa, i ukrasnog bilja, a može da parazitira na skoro svim delovima biljke u svim fazama razvoja (Tanović et al., 2011). Zbog svoje velike genetske varijabilnosti, kratkog životnog ciklusa i velike otpornosti prema fungicidima, *B. cinerea* se smatra patogenom visokog rizika i njegovo suzbijanje je dosta zahtevno (Haidar et al., 2016). Mere koje se koriste u borbi protiv *B. cinerea* se mogu podeliti u četiri grupe: hemijske, agrotehničke i biološke mere kao i stvaranje otpornih sorti (Tanović et al., 2011). Različite vrste mikroorganizama su ispoljile potencijal u biološkoj kontroli *P. aphanidermatum*. Među njima značajno mesto zauzimaju bakterije iz rodova: *Bacillus*, *Agrobacterium* i *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*); gljive koje pripadaju rodu *Trichoderma* (*Trichoderma harzianum*) i aktinomicete (Lu et al., 2008).

Tabela 28. Procenat inhibicije (I %) rasta *Pythium aphanidermatum* u prisustvu izolata kvasaca

| <i>Pythium aphanidermatum</i> | |
|--|------------|
| Izolat kvasca | I % |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> 1KD1983V | / |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> 2KD3007J | / |
| <i>Candida tropicalis</i> 2TD2912B | / |
| <i>Candida tropicalis</i> 3TD0905L | / |
| <i>Candida tropicalis</i> 4TD1101S | / |
| <i>Schwanniomyces occidentalis</i> BK0302D | / |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> CK2404I | 31,81±1,29 |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> EK1605T | 46,06±0,97 |
| <i>Candida tropicalis</i> Avin1312L | / |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> Cvin1610M | 35,31±0,64 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> SK0809R | / |

Procenat inhibicije *H. uvarum* (EK1605T) prema *P. aphanidemratum* je iznosio 46,06 %, a kod dva izolata *C. saturnus* (CK2404I i Cvin1610M) 31,81 %, odnosno 35,31 %. Ova tri izolata su dovela do pojave zone inhibicije rasta *P. aphanidermatum*, kod izolata CK2404I od 0,5 mm, a kod izolata Cvin1610M i EK1605T od 2 mm (Slika 29).

Ostali izolati nisu ispoljili efekat na suzbijanje rasta ovog fitopatogena (Tabela 28) i u ovim slučajevima kolonije *P. aphanidermatum* su u potpunosti prerasle kolonije izolata kvasaca. Prema **Sookchaoy et al. (2009)** *H. uvarum* (EK1605T) i dva izolata *C. saturnus* (CK2404I i Cvin 1610M) se svrstavaju u grupu sa niskom antagonističkom aktivnošću.



Slika 29. a) Uticaj izolata *Cyberlindnera saturnus* (Cvin1610M) na *Pythium aphanidermatum* u odnosu na kontrolu (d); b) Uticaj izolata *Cyberlindnera saturnus* (CK2404I) na *Pythium aphanidermatum* u odnosu na kontrolu; c) Uticaj izolata *Hanseniaspora uvarum* (EK1605T) na *Pythium aphanidermatum* u odnosu na kontrolu; d) Kontrola *Pythium aphanidermatum*; e) Uticaj izolata *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D) na *Pythium aphanidermatum* u odnosu na kontrolu

U istraživanju Kamel i El-Moniem (2013) *Geotrichum candidum* je inhibirao rast *P. aphanidermatum* za 74,4 %. *H. uvarum* (EK1605T) i dva izolata *C. saturnus* (Cvin1610M i CK2404I) su pokazali veći procenat inhibicije prema *Pythium aphanidermatum* u odnosu na kvasce izolovane iz rizosfere, suvog voća, šumskog zemljišta i zemljišta komercijalne plantaže (Mestre et al., 2016). Prema istraživanjima Mestre et al. (2016) ovi kvasci su imali različit procenat inhibicije rasta na *P.*

aphanidermatum i to: *Aureobasidium pullulans* YF 8.3 (21 %), *Candida carolinensis* CRUB1774 (22 %), *Candida maritima* CRUB 1775 (18 %), *Candida saitoana* CRUB1770 (25 %) i *Candida* sp. T18.4b (3 %).

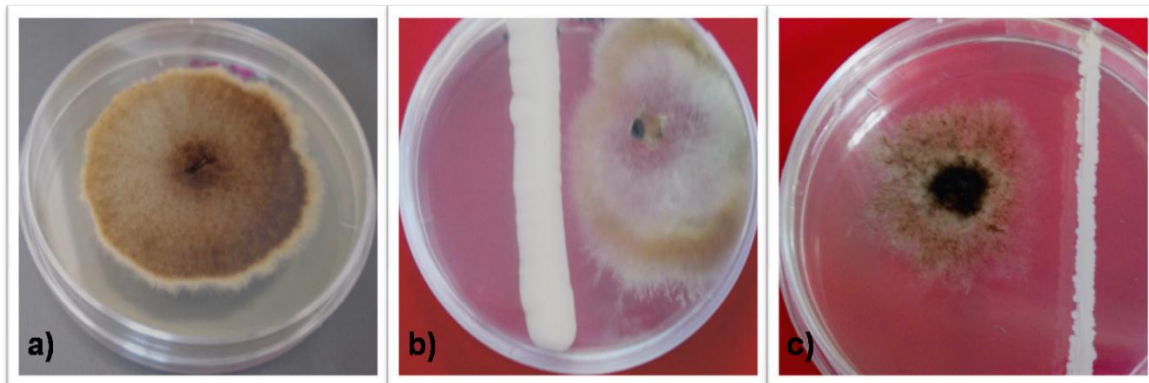
Pedesetih godina XX veka za zaštitu salate od *B. cinerea*, počinju da se primenjuju antagonistički sojevi *Fusarium* spp. i *Penicillium claviforme* (Wood, 1951). Među mikrobnim antagonistima *B. cinerea* do sada su opisani mnogi mikroorganizmi (bakterije, filamentozne gljive i kvasci). Najbolji rezultati u cilju suzbijanja ovog biljnog patogena postignuti su upotrebom *Trichoderma* sp. (Gupta et al., 1999; Okigbo i Ikediugwu, 2000; Vos et al., 2015).

Tabela 29. Procenat inhibicije rasta (I %) *Botrytis cinerea* u prisustvu izolata kvasaca

| Izolat kvasca | <i>Botrytis cinerea</i> |
|--|-------------------------|
| | I % |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> 1KD1983V | 44,12 ± 2,94 |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> 2KD3007J | 55,55 ± 3,00 |
| <i>Candida tropicalis</i> 2TD2912B | 38,41 ± 2,93 |
| <i>Candida tropicalis</i> 3TD0905L | 66,47 ± 1,76 |
| <i>Candida tropicalis</i> 4TD1101S | 56,27 ± 2,38 |
| <i>Schwanniomyces occidentalis</i> BK0302D | 55,68 ± 2,96 |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> CK2404I | 45,61 ± 2,41 |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> EK1605T | 18,04 ± 1,80 |
| <i>Candida tropicalis</i> Avin1312L | 61,96 ± 2,45 |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> Cvin1610M | 52,94 ± 2,35 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> SK0809R | 27,77 ± 3,18 |

Procenat inhibicije rasta *B. cinerea* u odnosu na kontrolu se kretao od 18,04 % do 66,47 % (Tabela 29), a najviši je bio pri rastu fitopatogenasa izolatima *C. tropicalis* (3TD0905L, 66,47 % i Avin1312L, 61,96 %). Kod ova dva izolata je utvrđena i produkcija enzima N-aceil-β-glukozaminidaze (Tabela 29). Prema Sookchaoy et al. (2009) *C. tropicalis* (3TD0905L i Avin1312L) se svrstavaju u grupu sa visokom antagonističkom aktivnošću, dok se dva izolata *C. saturnus* (2KD3007J, 55,55 % i Cvin1610M, 52,94 %), *C. tropicalis* (4TD1101S, 56,27 %) i *S. occidentalis* (BK0302D)

svrstavaju u grupu saumerenom antagonističkom aktivnošću. Ni u jednom ispitanom slučaju kolonije *B. cinerea* nisu prerasle kolonije ispitivanih izolata kvasaca (Slika 30).



Slika 30. a) Kontrola *Botrytis cinerea* b) Uticaj izolata *Hanseniaspora uvarum* (EK1605T) na *Botrytis cinerea* u odnosu na kontrolu c) Uticaj izolata *Candida tropicalis* (3TD0905L) na *Botrytis cinerea* u odnosu na kontrolu

Kvasci izolovani iz šire *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima* i *Pichia guilliermondii* su pokazali veći stepen inhibicije *B. cinerea* u odnosu na komercijalni soj *Candida oleophila* (Raspor et al., 2010). Potencijal za biološku kontrolu je utvrđen i kod *H. uvarum* uz dodatak 2 mM salicilne kiseline i 2 mM natrijum-bikarbonata, što je rezultiralo izuzetnim smanjenjem infekcije grožđa (95 %) izazvane *B. cinerea* (Qin et al., 2013). Kako bi se izbegla primena fungicida za suzbijanje *B. cinerea* može se koristiti i *Pichia membranifaciens* (Santos et al., 2004).

Jedna od prednosti primene mikrobioloških biopesticida u odnosu na druga sredstva je raznovrsnost njihovog načina delovanja, mogućnost uspostavljanja rasta u fitosferi i kontinuirana produkcija bioaktivnih jedinjenja *in situ* (Cawoy et al., 2011).

5.7. Efekti inokulacije semena biljaka izolatima kvasaca

Poljoprivreda je jedna od ljudskih aktivnosti koja značajno doprinosi povećanju količine hemijskih zagađivača preko preterane upotrebe mineralnih đubriva i pesticida, koji imaju potencijalne posledice po okolinu i nose rizik za ljudsko zdravlje (Vejan et al., 2016). Zbog toga iskorišćavanje PGP mikroorganizama u smislu biofertilizatora, biokontrolnih organizama i bioremedijacionih agenasa, predstavlja alternative koje osiguravaju stabilnost i produktivnost u agroekosistemu uz unapređenje bezbednosti

REZULTATI I DISKUSIJA

proizvodnje hrane i kvaliteta životne sredine. Zbog proizvodnje različitih biološki aktivnih jedinjenja (fitohormoni, vitamini, aminokiseline, enzimi, itd.), koji stimulatивно utiču na rast, razvoj i produktivnost biljaka i proizvodnje antimikrobnih supstanci koje pomažu u smanjenju fitopatogenih infekcija (Botha, 2011), kvasci postaju sve interesantniji agensi za primenu u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji.

U cilju ispitivanja mogućnosti primene izolovanih i identifikovanih zemljišnih kvasaca u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji izvršena je inokulacija semena različitih biljaka. Selekcija izolata sa kojima je izvršena inokulacija je izvršena na osnovu različitih PGP mehanizama (Tabela 30) koji su ranije ispitani.

Tabela 30. PGP karakteristike odabranih izolata kvasaca

| Izolot | Solubilizacija fosfata (mg P/l) | Produkcija IAA (µg/ml) | Produkcija | |
|---|------------------------------------|---------------------------|---|-------------------------------|
| | | | nitrate (mg/l NO ₃ ⁻) | Produkcija NH ₃ |
| <i>Candida tropicalis</i> 2TD2912B | 205,0 | 3,70 | 26,7 | + |
| <i>Candida tropicalis</i> 3TD0905L | 156,3 | 6,00 | 27,5 | + |
| <i>Schwanniomyces</i> <i>occidentalis</i> BK0302D | 220,4 | 1,09 | 17,3 | + |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> CK2404I | 202,7 | / | 27,1 | + |

Zemljišni kvasci imaju značajnu ulogu u procesu solubilizacije fosfata, tako što oslobađaju fosfor iz neorganskih i organskih jedinjenja kroz procese rastvaranja i mineralizacije. Najveća količina fosfora je utvrđena kod *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D) koji je zbog toga izabran za inokulaciju različitih biljaka (Tabela 30). Jedan od najraširenijih i najaktivnijih fitohormona auksinske grupe je indol-3-sirćetna kiselina (IAA), pa je zbog toga izabran izolat *Candida tropicalis* (3TD0905L). Mora se imati u vidu da sintezu auksina u zemljištu i rizosferi mikroorganizama određuje sastav korenskih eksudata koji sadrže metaboličke prekusore l-triptofana (Bharucha et al., 2013). Sposobnost kvasaca u transformaciji azotnih jedinjenja može imati izuzetan značaj u održivoj poljoprivredi. Najveće količine nitrata su određene kod izolata *C. tropicalis* (3TD0905L) i *C. saturnus* (CK2404I). Kod izolata *C. tropicalis* (2TD2912B) je utvrđena sposobnost solubilizacije fosfata, produkcija IAA i visoka produkcija nitrata

(Tabela 30). Takođe, kod svih izabranih izolata je utvrđena produkcija amonijaka (Tabela 30), koja predstavlja opštu karakteristiku PGP mikroorganizama.

Prema Egamberdiyeva (2007) za ispoljavanje maksimalnog PGP potencijala se koriste siromašni supstrati, pa je zbog toga u ovim ogledima korišćen deposol iz RB Kolubara. Ovaj supstrat se odlikuje niskim sadržajem hranljivih materija, slabom dostupnošću sa azotom, fosforom i kalijumom, što ukazuje na nepovoljnu sredinu za rast biljaka (Antić et al., 1992). S obzirom da je nastanak deposola rezultat površinske eksploatacije uglja i da je njegov fizičko-hemijski sastav dosta nepovoljan, postoji potreba za rekultivacijom ovakvog područja. Zbog toga, pored mogućnosti korišćenja izolata kvasaca u održivoj poljoprivredi, cilj je bio i utvrđivanje njihovog potencijala u ekoremedijaciji oštećenih ekosistema.

Uticao izolata koji su ispoljili PGP karakteristike: *C. tropicalis* (2TD2912B i 3TD0905L), *S. occidentalis* (BK0302D), *C. saturnus* (CK2404I) i konzorcijuma ovih izolata (2TD2912B:3TD0905L:CK2404I:BK0302D=1:1:1:1) na rani rast slačice (*Sinapis alba* L.), crvene deteline (*Trifolium pratense* L.), suncokreta (*Helianthus annuus* L.), pšenice (*Triticum vulgare* L.) i zelene salate (*Lactuca sativa*) je praćen u kontrolisanim uslovima, u odnosu na neinokulisanu kontrolu u deposolu (KD) i pozitivnu kontrolu u komercijalnom supstratu (FS). Efekti izolata kvasaca su određeni kroz parametre rasta biljaka: visine, dužine korena i suve biomase. Brojne studije ukazuju da inokulacija semena biljaka sa različitim sojevima kvasaca stimulatивно utiče na rast biljaka povećavajući fotosintetsku produkciju (Amprayn et al., 2012; Agamy et al., 2013). Pozitivan efekat biološki aktivnih jedinjenja koje proizvode mikroorganizmi na poljoprivredne kulture počinje u najranijim fazama rasta i dalje se ispoljava kroz suzbijanje fitopatogena i povećanje produktivnosti (Ignatova et al., 2015).

5.7.1. Inokulacija crvene deteline (*Trifolium pratense* L.) sa izolatima kvasaca

Stimulativne efekte inokulacije sa PGP mikroorganizmima na rast crvene deteline proučavali su brojni istraživači. Morales et al. (2007) su ukazali da je inokulacija sa *Penicillium albidum* doprinela rastu i boljoj ishrani crvene deteline, indukujući razvoj korena i povećanje mobilizacije fosfata iz zemljišta, a sinergizam između nekoliko fosfosolubilizirajućih gljiva i arbuskularne mikorize, također je stimulisao rast ove biljke (Souchie et al., 2010).

REZULTATI I DISKUSIJA

Najveći uticaj inokulacije na suhu biomasu crvene deteline (Slika 31) u odnosu na kontrolu u deposolu (KD) je postignut inokulacijom sa *C. saturnus* (CK2404I, 0,31 g) i konzorcijumom kvasaca (0,29 g), između kojih nema statistički značajnih razlika (Tabela 31).

Tabela 31. Uticaj izolata i konzorcijumakvasaca na rast crvene deteline (*Trifolium pretense*L.)

| Tretman | Suva biomasa (g) | Dužina korena (cm) | Visina (cm) |
|---|----------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Candida tropicalis</i> , 2TD2912B | 0,25±0,03 ^{a,c,e} | 3,10±0,27 ^c | 6,03±0,21 ^a |
| <i>Candida tropicalis</i> , 3TD0905L | 0,25±0,03 ^c | 3,11±0,28 ^c | 6,17±0,33 ^a |
| <i>Schwanniomyces occidentalis</i> , BK0302D | 0,27±0,02 ^{a,d,e} | 3,67±0,50 ^d | 7,00±0,55 ^c |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> , CK2404I | 0,31±0,04 ^d | 4,45±0,81 ^b | 7,87±0,79 ^d |
| Konzorcijum | 0,29±0,04 ^{e,d} | 3,03±0,23 ^c | 6,10±0,28 ^a |
| KD | 0,26±0,02 ^{a,c} | 2,66±0,53 ^a | 6,09±0,54 ^a |
| FS | 0,17±0,03 ^b | 4,70±0,84 ^b | 8,31±0,86 ^b |

kontrola u deposolu (KD); pozitivna kontrola u komercijalnom supstratu (FS)

Inokulacija sa *S. occidentalis* (BK0302D) i *C. tropicalis* (2TD2912B i 3TD0905L) nije uticala na biomasu crvene deteline. Dobijeni rezultati ukazuju da su suve biomase crvene deteline inokulisane sa *C. tropicalis* (2TD2912B, 0,25 g; 3TD0905L, 0,25 g), *C. saturnus* (CK2404I, 0,31 g), *S. occidentalis* (BK0302D, 0,27 g) i konzorcijumom (0,29 g) statistički značajno veće u odnosu na pozitivnu kontrolu (FS, 0,17 g).



Slika 31. a) *In vivo* uticaj izolata *Cyberlindnera saturnus* (CK2404I) na rast crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) u odnosu na neinokulisanu kontrolu u deposolu (b)

Najveći uticaj inokulacije na dužinu korena crvene deteline u odnosu na kontrolu u deposolu (KD) je postignut primenom inokuluma *C. saturnus* (CK2404I, 4,45 cm), *S. occidentalis* (BK0302D), *C. tropicalis* (2TD2912B, 3TD0905L) i konzorcijumom

(Tabela 31). Dužina korena crvene deteline inokulisane *C. tropicalis* (2TD2912B i 3TD0905L), *S. occidentalis* (BK0302D) i konzorcijumom, statistički je značajno manja od pozitivne kontrole (FS, 4,70 cm).

Najveći uticaj inokulacije na visinu crvene deteline u odnosu na kontrolu u deposolu (KD) je postignut inokulacijom sa *C. saturnus* (CK2404I, 7,87 cm). Značajan uticaj na visinu crvene deteline u odnosu na kontrolu u deposolu (KD) je imala i inokulacija sa *S. occidentalis* (BK0302D, 7,00 cm). Na visinu crvene deteline nije imala uticaj inokulacija sa *C. tropicalis* (2TD2912B i 3TD0905L) i konzorcijumom (Tabela 31). Visina crvene deteline u pozitivnoj kontroli (FS) je statistički značajno veća u odnosu na visine svih ostalih testiranih inokuluma (Tabela 31). Endofitni kvasac *Cyberlindnera saturnus* je zahvaljujući produkciji IAA, uticao na povećanje suve biomase i dužine korena kukuruza (Nassar et al., 2005). Kvasci koji imaju sposobnost produkcije IAA mogu ispoljavati pozitivan uticaj na biljne izdanke i koren (Fu et al., 2016).

5.7.2. Inokulacija pšenice (*Triticum vulgare* L.) sa izolatima kvasaca

Inokulacija pšenice PGP mikroorganizmima i arbuskularnim mikoriznim gljivama je uticala na povećanje biomase (Saia et al., 2015). Singh i Reddy (2011) su ukazali da je inokulacija sa fosfosolubilizirajućom gljivom *Penicillium oxalicum* imala pozitivan efekat na rast i prinos pšenice.

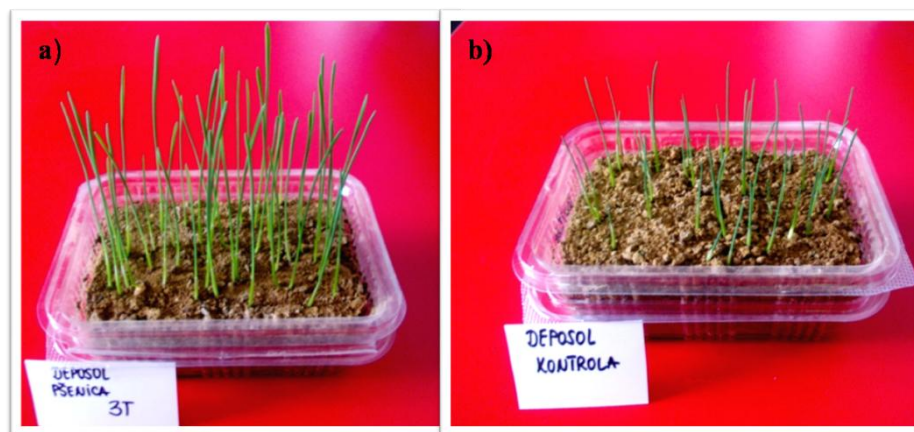
Najveći uticaj na suhu biomasu pšenice u odnosu na kontrolu u deposolu (KD) je postignut inokulacijom sa *C. tropicalis* (3TD0905L, 3,74 g). Takođe, statistički značajan uticaj na suhu biomasu pšenice je postignut i inokulacijom sa *S. occidentalis* (BK0302D, 3,05 g). Inokulacija pšenice sa *C. tropicalis* (2TD2912B, 2,31 g), *C. saturnus* (CK2404I, 2,69 g) i konzorcijumom (2,28 g) nije imala uticaj na suhu biomasu pšenice (Tabela 32). Rezultati ukazuju i da su suve biomase pšenice dobijene inokulacijom sa *C. saturnus* (CK2404I), *C. tropicalis* (3TD0905L) i *S. occidentalis* (BK0302D) statistički značajno veće od suve biomase u pozitivnoj kontroli (FS, 2,28 g).

Tabela 32. Uticaj izolata i konzorcijuma kvasaca na rast pšenice (*Triticum vulgare* L.)

| Tretman | Suva biomasa (g) | Dužina korena (cm) | Visina (cm) |
|---|------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <i>Candida tropicalis</i> , 2TD2912B | 2,31±0,20 ^b | 11,21±2,54 ^c | 17,97±2,94 ^c |
| <i>Candida tropicalis</i> , 3TD0905L | 3,74±0,25 ^c | 13,33±1,66 ^d | 22,42±2,56 ^d |
| <i>Schwanniomyces occidentalis</i> , BK0302D | 3,05±0,13 ^d | 10,15±3,70 ^{a,c} | 16,13±3,92 ^c |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> , CK2404I | 2,69±0,19 ^a | 9,28±2,71 ^a | 13,75±3,70 ^a |
| Konzorcijum | 2,28±0,12 ^b | 9,28±3,58 ^a | 13,37±4,24 ^a |
| KD | 2,53±0,17 ^a | 9,52±3,24 ^a | 14,05±3,68 ^a |
| FS | 2,28±0,14 ^b | 16,11±2,57 ^b | 28,85±4,14 ^b |

kontrola u deposolu (KD); pozitivna kontrola u komercijalnom supstratu (FS)

Najveći uticaj inokulacije na dužinu korena pšenice u odnosu na kontrolu u deposolu (KD) je postignut primenom inokuluma sa *C. tropicalis* (3TD0905L, 13,33 cm). Statistički značajan uticaj na dužinu korena pšenice u odnosu na kontrolu u deposolu (KD) je imala i inokulacija sa drugim izolatom *C. tropicalis* (2TD2912B, 11,21 cm). Na dužinu korena pšenice nije imala uticaj inokulacija sa *C. saturnus* (CK2404I), *S. occidentalis* (BK0302D) i konzorcijumom (Tabela 32). Dužina korena pšenice u pozitivnoj kontroli (FS) je statistički značajno veća u odnosu na dužine korena svih ostalih testiranih inokuluma.

Slika 32. a) *In vivo* uticaj izolata *Candida tropicalis* (3TD0905L) na rast pšenice (*Triticum vulgare* L.) u odnosu na neinokulisanu kontrolu u deposolu (b)

Najveći uticaj inokulacije na visinu pšenice (Slika 32) u odnosu na kontrolu u deposolu (KD) je postignut primenom inokuluma sa *C. tropicalis* (3TD0905L, 22,42 cm). Statistički značajan uticaj na visinu pšenice u odnosu na kontrolu u deposolu (KD), imala je i inokulacija sa *C. tropicalis* (2TD2912B) i *S. occidentalis* (BK0302D). Na

visinu pšenice nije imala uticaj inokulacija sa konzorcijumom i *C. saturnus* (CK2404I). Visina pšenice u pozitivnoj kontroli (FS) je statistički značajno veća u odnosu na visine svih ostalih testiranih inokuluma (Tabela 32). Inokulacija sa *C. tropicalis* (3TD0905L) je imala najveći uticaj na dužinu korena i visinu pšenice, što se može povezati i sa visokom produkcijom IAA kiseline od strane ovog izolata.

Utvrđeno je da je inokulacija pšenice izolatima kvasaca imala pozitivan efekat na parametre rasta (Wali Asal, 2010). *Candida tropicalis* primenjena folijarno promoviše rast krompira i soje (Gomaa et al., 2005; Mekki i Ahmed, 2005). U oba istraživanja je zabeleženo povećanje suve biomase i prinosa, ali i smanjenje učestalosti infekcije na krompiru izazavane pepelnicama (*Thysanoptera*). Inokulacija sa *Candida tropicalis* HY, pozitivno je uticala na visinu i dužinu korena pirinča (Amprayn et al., 2012). Takođe je utvrđeno da se veća uspešnost postiže u slučaju inokulacije samo sa ovim sojem u odnosu na mešani inokulum.

5.7.3. Inokulacija suncokreta (*Helianthus annuus* L.) sa izolatima kvasaca

Suncokret (*Helianthus annuus* L.) ima veliki kapacitet za uklanjanje teških metala (Ullah et al., 2011), otporan je na sušu i vrlo je kompetitivan u odnosu na korove (Gawronski i Gawronska, 2007), a posebno je pogodan za fitoremedijaciju zagađenja koja potiču iz industrije (Nešić, 2011).

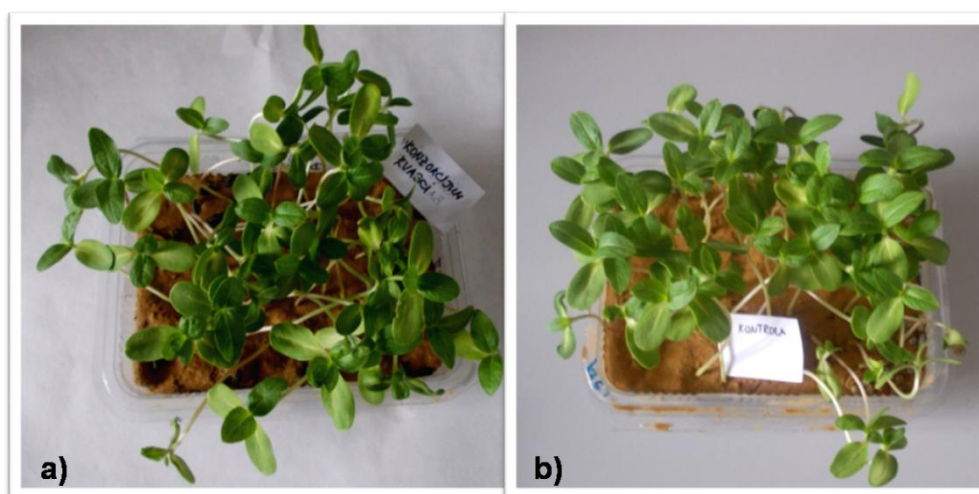
Inokulacija suncokreta sa izolatima kvasaca nije imala značajnog uticaja na suhu biomasu u odnosu na kontrolu u deposolu (Tabela 33). Takođe, suva biomasa suncokreta u pozitivnoj kontroli (FS) je statistički značajno veća u odnosu na suve biomase svih ostalih testiranih inokuluma (Tabela 33).

Tabela 33. Uticaj izolata i konzorcijuma kvasaca na rast suncokreta (*Helianthus annuus* L.)

| Tretman | Suva biomasa (g) | Dužina korena (cm) | Visina (cm) |
|--|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <i>Candida tropicalis</i> , 2TD2912B | 3,07±0,22 ^a | 7,53±2,61 ^{a,b} | 18,25±3,23 ^a |
| <i>Candida tropicalis</i> , 3TD0905L | 2,22±0,08 ^c | 8,72±3,32 ^b | 19,52±2,47 ^a |
| <i>Schwanniomyces occidentalis</i> , BK0302D | 3,21±0,20 ^a | 7,43±2,26 ^{a,b} | 19,08±2,06 ^a |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> , CK2404I | 2,96±0,27 ^{a,d} | 5,40±1,09 ^c | 16,08±3,16 ^c |
| Konzorcijum | 2,76±0,13 ^d | 10,28±2,65 ^d | 21,98±2,21 ^d |
| KD | 3,03±0,06 ^a | 7,15±1,61 ^a | 18,45±1,44 ^a |
| FS | 3,61±0,07 ^b | 8,00±2,69 ^{a,b} | 24,67±3,19 ^b |

kontrola u deposolu (KD); pozitivna kontrola u komercijalnom supstratu (FS)

Najveći uticaj inokulacije na dužinu korena suncokreta (Slika 33) u odnosu na kontrolu u deposolu (KD) je postignut primenom konzorcijuma (10,28 cm). Statistički značajan uticaj na dužinu korena suncokreta je zabeležen i kod izolata *C. tropicalis* (3TD0905L, 8,72 cm). Inokulacija sa *C. saturnus* (CK2404I), *C. tropicalis* (2TD2912B) i *S. occidentalis* (BK0302D) nije imala uticaj na dužinu korena suncokreta (Tabela 33). Uticaj inokulacije konzorcijumom na dužinu korena suncokreta je bio veći u odnosu na pozitivnu kontrolu (FS). Ostali primenjeni inokulumi nisu imali uticaj na dužinu korena suncokreta u odnosu na pozitivnu kontrolu (FS).



Slika 33. a) *In vivo* uticaj konzorcijuma na rast suncokreta (*Helianthus annuus* L) u odnosu na neinokulisanu kontrolu u deposolu (b)

Najveći uticaj inokulacije na visinu suncokreta u odnosu na kontrolu u deposolu (KD) je postignut primenom konzorcijuma (Tabela 33). Ostali primenjeni inokulumi nisu imali uticaja na visinu suncokreta u odnosu na kontrolu u deposolu. Takođe, visina suncokreta u pozitivnoj kontroli (FS) je statistički značajno veća u odnosu na visine svih ostalih testiranih inokuluma (Tabela 33). Primena konzorcijuma imala je najbolji efekat na dužinu korena i visinu suncokreta. Uspešnost inokulacije različitih biljnih vrsta primenom konzorcijuma, utvrdili su i drugi istraživači (Raval i Desai, 2012; Mohamed i Metwally, 2014). Inokulacija pasulja sa *Rhizobium leguminosarum* i *Saccharomyces cerevisiae*, izolovanog iz zemljišta, imala je pozitivan efekat na povećanje nodulacije korena pasulja, suve biomase i snabdevanje azotom (Mohamed i Metwally, 2014). PGP bakterije (*Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp. i *Azotobacter* sp.) su imale pozitivan uticaj na rast suncokreta (Raval i Desai, 2012).

5.7.4. Inokulacija slačice (*Sinapis alba* L.) sa izolatima kvasaca

Slačica (*Sinapis alba* L.) ima izuzetno dobre agronomske osobine, kao što su tolerancija ili otpornost na sušu, bolesti i štetočine (Lee et al., 2014). Takođe, ova biljka ima veliki značaj i u fitoremedijaciji (Zhang et al., 2016).

Najveći uticaj inokulacije na suhu biomasu slačice u odnosu na kontrolu u deposolu (KD) je postignut primenom inokuluma *C. saturnus* (CK2404I, 2,02 g). Statistički značajan uticaj na suhu biomasu slačice u odnosu na kontrolu u deposolu (KD) je imala i inokulacija sa *C. tropicalis* (3TD0905L, 1,25 g i 2TD2912B, 0,82 g) i *S. occidentalis* (BK0302D, 0,93 g).

Tabela 34. Uticaj izolata i konzorcijuma kvasaca na rast slačice (*Sinapis alba* L.)

| Tretman | Suva biomasa (g) | Dužina korena (cm) | Visina (cm) |
|---|----------------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>Candida tropicalis</i> , 2TD2912B | 0,82±0,10 ^d | 2,50±1,59 ^a | 9,30±1,90 ^c |
| <i>Candida tropicalis</i> , 3TD0905L | 1,25±0,18 ^e | 2,67±0,85 ^a | 9,32±1,30 ^c |
| <i>Schwanniomyces occidentalis</i> , BK0302D | 0,93±0,08 ^d | 2,11±0,74 ^a | 8,20±1,40 ^a |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> , CK2404I | 2,02±0,12 ^f | 3,01±2,26 ^c | 9,70±3,00 ^c |
| Konzorcijum | 0,67±0,18 ^{c,d} | 3,12±1,28 ^c | 9,50±1,70 ^c |
| KD | 0,53±0,10 ^{a,b,c} | 1,94±1,00 ^a | 7,60±1,50 ^a |
| FS | 0,46±0,08 ^b | 5,85±2,40 ^b | 13,60±2,60 ^b |

kontrola u deposolu (KD); pozitivna kontrola u komercijalnom supstratu (FS)

Rezultati ukazuju i da su suve biomase slačice dobijene inokulacijom sa *C. tropicalis* (2TD2912B i 3TD0905L), *C. saturnus* (CK2404I), *S. occidentalis* (BK0302D) i konzorcijumom, statistički značajno veće od suve biomase u pozitivnoj kontroli (Tabela 34).

Najveći uticaj inokulacije na dužinu korena slačice u odnosu na kontrolu u deposolu je postignut primenom konzorcijuma (3,12 cm). Statistički značajan uticaj na dužinu korena slačice je zabeležen i kod izolata *C. saturnus* (CK2404I, 3,01 cm). Između inokulacije sa *C. saturnus* (CK2404I) i konzorcijumom ne postoji statistički značajna razlika (Tabela 34). Inokulacija sa *C. tropicalis* (2TD2912B i 3TD0905L) i *S. occidentalis* (BK0302D) nije imala uticaj na dužinu korena slačice (Tabela 34). Dužina korena slačice u pozitivnoj kontroli (FS) je statistički značajno veća u odnosu na dužine korena svih ostalih testiranih inokuluma.

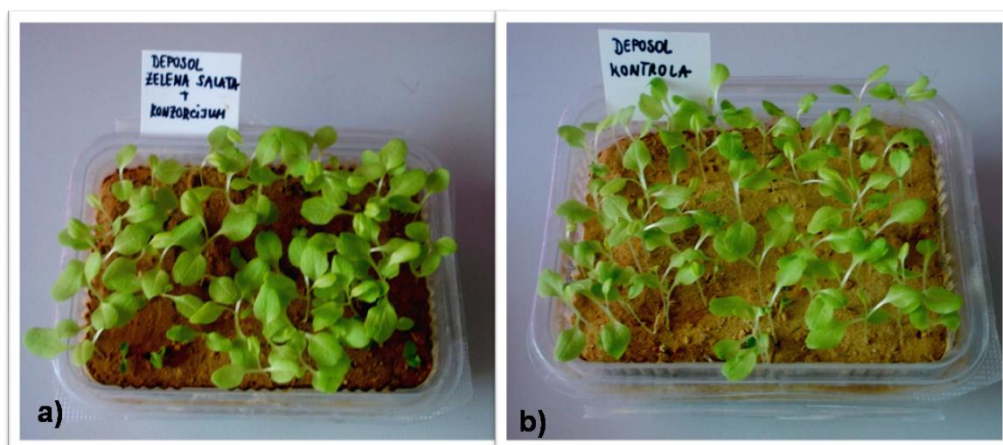
occidentalis (BK0302D) i konzorcijumom, statistički značajno veće od suve biomase u pozitivnoj kontroli (Tabela 35).

Tabela 35. Uticaj izolata i konzorcijuma kvasacana rast zelene salate (*Lactuca sativa*)

| Tretmani | Suva biomasa (g) | Dužina korena (cm) | Visina (cm) |
|---|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>Candida tropicalis</i> , 2TD2912B | 0,24±0,06 ^a | 2,88±1,27 ^a | 4,09±1,41 ^a |
| <i>Candida tropicalis</i> , 3TD0905L | 0,25±0,09 ^a | 2,37±0,79 ^a | 4,17±0,67 ^a |
| <i>Schwanniomyces occidentalis</i> , BK0302D | 0,23±0,09 ^a | 2,62±0,98 ^a | 4,48±1,09 ^a |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> , CK2404I | 0,18±0,09 ^b | 2,88±0,81 ^a | 4,31±0,88 ^a |
| Konzorcijum | 0,29±0,07 ^c | 3,53±1,18 ^c | 5,08±1,14 ^c |
| KD | 0,26±0,08 ^{a,c} | 2,61±0,65 ^a | 4,58±0,53 ^{a,c} |
| FS | 0,13±0,05 ^b | 4,63±1,28 ^b | 7,08±1,51 ^b |

kontrola u deposolu (KD); pozitivna kontrola u komercijalnom supstratu (FS)

Najveći uticaj inokulacije na dužinu korena zelene salate (Slika 35) u odnosu na kontrolu u deposolu je postignut primenom konzorcijuma (3,53 cm). Inokulacija sa *S. occidentalis* (BK0302D), *C. tropicalis* (2TD2912B i 3TD0905L) i *C. saturnus* (CK2404I) nije imala uticaj na dužinu korena zelene salate (Tabela 35). Takođe dužina korena zelene salate u pozitivnoj kontroli (FS) je statistički značajno veća u odnosu na dužine korena svih ostalih testiranih inokuluma.



Slika 35. a) *In vivo* uticaj konzorcijumana rast zelene salate (*Lactuca sativa*) u odnosu na neinokulisane kontrolu u deposolu (b)

Najveći uticaj inokulacije na visinu zelene salate u odnosu na kontrolu u deposolu je postignut primenom konzorcijuma (5,08 cm). Inokulacija sa *S. occidentalis* (BK0302D), *C. tropicalis* (2TD2912B i 3TD0905L) i *C. saturnus* (CK2404I) nije imala uticaj na

visinu zelene salate (Tabela 35). Takođe, visina zelene salate u pozitivnoj kontroli (FS) je statistički značajno veća u odnosu na visine svih ostalih testiranih inokuluma. Nakayan et al. (2009) su utvrdili da *Pichia* sp. CC1 u kombinaciji sa smanjenom koncentracijom hemijskog đubriva ($^{1/2}$ CF) utiče na povećanje suve biomase zelene salate za 107 % (Nakayan et al., 2009).

Ispitivani izolati kvasaca su pokazali različite efekte na različite biljne vrste, što je u skladu sa rezultatima drugih istraživača. Najslabiji odgovor na inokulaciju izabranim izolatima kvasaca su imale zelena salata i suncokret. Na interakcije između biljaka i PGP mikroorganizama utiče veliki broj faktora poput sastava zemljišta, temperature, vlažnosti, biljne vrste, količine mineralnih đubriva, vrste mikroorganizama, itd. (Saharan i Nehra, 2011). Da bi se u potpunosti utvrdio PGP potencijal nekog izolata, neophodno je izvršiti njegovo testiranje i u uslovima koji nisu u potpunosti kontrolisani. Takođe ključnu ulogu u procesima stimulacije biljnog rasta imaju i kvasci koji proizvode IAA (El-Tarabily i Sivasithamparam, 2006; Fu et al., 2016). I druga istraživanja su utvrdila pozitivan uticaj kvasaca na rast: *Nicotiana benthamiana* (Fu et al., 2016), *Cyamopsis tetragonoloba* (Gomoaa i Mohamed, 2007), šećerne repe (Agamy et al., 2013) i drugih biljnih kultura. Navedena istraživanja se mogu uporediti sa istraživanjima u ovoj disertaciji, jer su izolati *C. tropicalis* (2TD2912B i 3TD0905L) pokazali pozitivan efekat na rast slačice, pšenice i crvene deteline. Pored ova dva izolata, visoku efikasnost su pokazali i *S. occidentalis* (BK0302D) i *C. saturnus* (CK2404I).

Interakcije između biljaka i kvasaca predstavljaju oblast istraživanja koja sve više privlači pažnju i poljoprivrednih proizvođača. Mogućnost primene mikrobnih inokulanata koji bi doveli do povećanja prinosa i kvaliteta proizvoda se istražuju širom sveta. Njihova primena kao biofertilizatora može pozitivno uticati na racionalniju primenu mineralnih đubriva, ali i na održivost agroekosistema.

5.8. Bioremedijacioni potencijal kvasaca

Prisustvo teških metala u ekosistemima predstavlja poseban rizik za živi svet, zbog osobine da se ne mogu degradirati ili uništiti, te se njihova koncentracija kumulativno povećava. Procenjuje se da je na 6,24 % ukupnih poljoprivrednih površina u EU, potrebno preuzeti neke od mera sanacije zbog povećanog sadržaja teških metala (Toth et

al., 2016). Sanacija bi koštala 17,3 milijardi € godišnje (CEC, 2006), što naglašava obim problema. Intenzivna poljoprivredna proizvodnja rezultira povećanim sadržajem teških metalakoji u zemljište dospevaju preko fertilizatora, ili hemijskih sredstava za zaštitu biljaka. Agencija za zaštitu životne sredine u USA je objavila listu upornih, bioakumulativnih ili toksičnih materija među kojima su kadmijum, nikal, bakar i cink. Istovremeno, Organizacija Ujedinjenih Nacija za hranu i poljoprivredu u *Codex Alimentarius* navodi da su teški metali najotrovniji zagađivači koje hrana može da sadrži (FAO, 2011). Sve ovo ukazuje da se moraju preduzimati mere sanacije. Jedna od alternativnih metoda za uklanjanje teških metala je upotreba biomase gljiva koja poslednjih godina postaje sve značajnija zamena za skupe fizičko-hemijske, konvencionalne tehnologije.

5.8.1. Sposobnost izolata kvasaca u bioakumulaciji bakra

Bakar u zemljištu ima visok afinitet vezivanja za organsku materiju i dugotrajno se zadržava u površinskom sloju (0-15 cm). Akumulacija Cu u zemljištu ima štetno dejstvo na živi svet, a može dovesti i do fitotoksičnosti. Primena biotehnoških metoda koje koriste biološki materijal, kao što su mikroorganizmi i biljke, mogu biti alternativa trenutno primenjivanim hemijskim i fizičkim metodama (Zabochnicka-Swiątek i Krzywonos, 2014). Prvi korak u procesu bioakumulacije je biosorpcija (Chojnacka, 2010). U procesu bioakumulacije se koriste živi organizmi, gde dolazi do transporta kontaminanta u ćeliju i akumulacije metala unutar ćelije (Zabochnicka-Swiątek i Krzywonos, 2014). Metali se mogu akumulirati i kroz proces precipitacije, a važno je da su precipitovani metali vezani za ćeliju (Zabochnicka-Swiątek i Krzywonos, 2014). U poređenju sa procesom biosorpcije, bioakumulacija je skuplja, selektivnija i duže traje (Vijayaraghavan i Yun, 2009). Većina teških metala na površini voda (posebno mangan i olovo) se uklanjaju bioapsorpcijom od strane algi (Babak et al., 2012). U istraživanjima Anand et al. (2006), *Trichoderma viride* je korišćena u bioakumulaciji Cu.

Izolati kvasaca (BK0302D, 3TD0905L, 4TD1101S, 2TD2912B, EK1605T, CK2404I, SK0809R, 1KD1983V, 2KD3007J, Cvin1610M i Avin1312L) su testirani na povišen sadržaj Cu^{2+} (Tabela 36). Svi izolati su ispoljili rast pri koncentracijama Cu^{2+} od 0,5 i 1 mM. Dva izolata *C. saturnus* (1KD1983V i 2KD3007J) i *H. uvarum* (EK1605T) nisu

ispoljili rast pri koncentraciji Cu^{2+} od 1,5 mM, dok je kod izolata *C. tropicalis* (2TD2912B), *C. saturnus* (CK2404I i Cvin1610M) i *R. mucilaginosa* (SK0809R) utvrđen jedva primetan rast. Za dalja istraživanja su korišćeni izolati sa najvećom tolerancijom na prisustvo Cu^{2+} od 2 mM i to *S. occidentalis* (BK0302D) i tri izolata *C. tropicalis* (3TD0905L, 4TD1101S i Avin1312L).

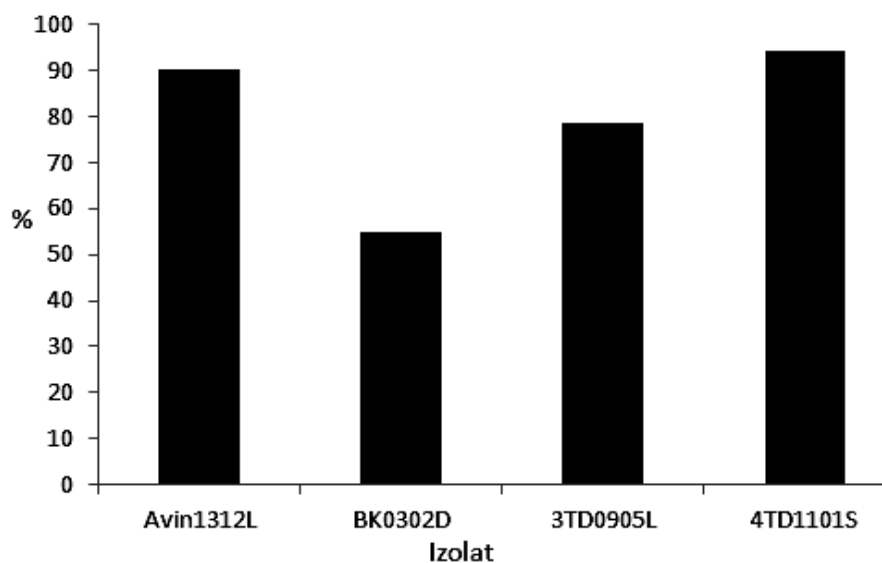
Tabela 36. Rast izolata kvasaca pri različitim koncentracijama Cu^{2+}

| Izolat | Koncentracija Cu^{2+} mM | | | |
|---|-----------------------------------|---|-----|---|
| | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 |
| <i>Candida tropicalis</i> Avin1312L | + | + | + | + |
| <i>Schwaniomyces occidentalis</i> BK0302D | + | + | + | + |
| <i>Candida tropicalis</i> 3TD0905L | + | + | + | + |
| <i>Candida tropicalis</i> 4TD1101S | + | + | + | + |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> EK1605T | + | + | - | - |
| <i>Candida tropicalis</i> 2TD2912B | + | + | +/- | - |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> Cvin1610M | + | + | +/- | - |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> CK2404I | + | + | +/- | - |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> 1KD1983V | + | + | - | - |
| <i>Cyberlindnera saturnus</i> 2KD3007J | + | + | - | - |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> SK0809R | + | + | +/- | - |

Na sposobnost različitih sojeva kvasaca da rastu pri povišenim koncentracijama Cu^{2+} su ukazali mnogi autori (Abe et al., 2001; Villegas et al., 2005). Iako ne postoji koncentracija teških metala koja predstavlja granicu između rezistentnih i nerezistentnih sojeva, u slučaju bakra i hroma otpornim se mogu smatrati oni izolati koji imaju sposobnost rasta pri 1 mM (Ceylan i Ugur, 2012). Izolati koji su ispitani u ovoj disertaciji su pokazali veću tolerantnost na povećane koncentracije Cu^{2+} u odnosu na *Rhodotorula mucilaginosa* i *Candida* sp.-sojeva izolovanih iz otpadnih voda rudnika bakra u Argentini, koji su ispoljili rast pri koncentraciji Cu^{2+} 0,1-1 mM (Villegas et al., 2005). Abe et al. (2001) su izolovali kvasac *Cryptococcus* sp., koji je rastao u YPD bujonu pri različitim koncentracijama Cu^{2+} (1-10 mM). Volesky et al. (1995) smatraju da se visoka tolerancija prema povećanim koncentracijama Cu^{2+} može objasniti niskom dostupnošću ovog jona, zbog složenih organskih jedinjenja u medijima koji se koriste u istraživanjima. Pepton, kao sastavni deo podloge takođe utiče i na ekstruziju metala (Ito et al., 2001).

Ukupan sadržaj bakra (Cu^{2+}) akumuliranog u ćelijama kvasaca je određen ICP-OES metodom. Četiri izolata (Avin1312L, BK0302D, 3TD0905L i 4TD1101S) su pokazala

sposobnost akumulacije Cu^{2+} u intervalu od 55,01-94,37 %. Najveći procenat bioakumulacije Cu^{2+} je utvrđen kod izolata *C. tropicalis* 4TD1101S, (94,37 %), a najmanji kod *S. occidentalis* (BK0302D) (Grafik 6). Visok procenat bioakumulacije su pokazala i dva izolata *C. tropicalis* (Avin1312L, 90,32 %) i (3TD0905L, 78,68 %). Ovaj procenat je veći u odnosu na procenat bioakumulacije *Candida tropicalis* (74 %) izolovane iz industrijske otpadne vode (Rehman et al., 2007).



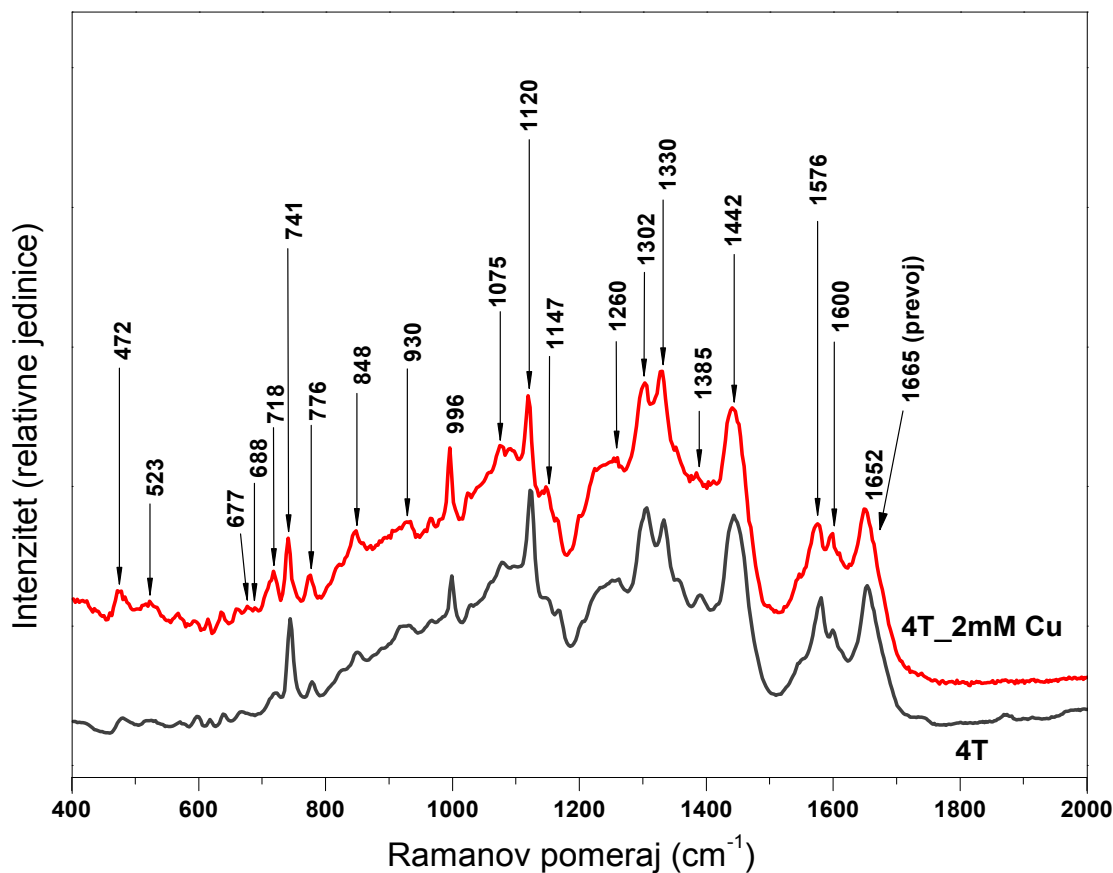
Grafik 6. Procenat bioakumulacije Cu^{2+} od strane izolata *Candida tropicalis* (Avin1312L, 3TD0905L i 4TD1101S) i *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D), određen pomoću ICP-OES

Tolerancija i bioakumulacija teških metala mogu da zavise od vrste kvasca, ali i od propustljivosti ćelijske membrane, ćelijske strukture i fizioloških osobina (Balsalobre et al., 2003). Utvrđeno je da askomicetni kvasci (npr. *Candida* sp.) oslobađaju Cu u ekstracelularni prostor, dok bazidiomicetni kvasci (npr. *Rhodotorula* sp.) zadržavaju metal unutar ćelije (Villegas et al., 2005). Prema nekim autorima Cu^{2+} iz medijuma sedeponuje na ćelijskom zidu ili ćelijskoj membrani (Ito et al., 2007). Međutim, utvrđeno je da prilikom gajenja *Yarrowia lipolytica*, u tečnom medijumu koji sadrži Cu^{2+} , dolazi do progresivne apsorpcije metala u intracelularni prostor ćelije, gde se on zadržava sve do kraja logaritamske faze, kada dolazi do ekstrudiranja Cu^{2+} (Ito et al., 2007). Na bioakumulaciju Cu^{2+} utiče i starost kulture, pa su izolati kvasaca imali najveći kapacitet apsorpcije Cu^{2+} iz tečnog medijuma na samom početku inkubacije

(Villegas et al., 2005). Na ovaj proces utiče i odnos između koncentracije Cu^{2+} u medijumu i raspoložive biomase kvasca (Brady i Duncan, 1994).

Ranija istraživanja o bioakumulaciji teških metala su pokazala da je pH vrednost jedan od važnih parametara, koji utiče na efikasnost ovog procesa (Brady i Duncan, 1994; Aksu i Donmez, 2001). Bioakumulacija Cu sevrši pri pH vrednosti 5-5,5, dok se pri nižim pH vrednostima, znatno smanjuje moć apsorpcije (Ross i Parkin, 1989). Bioakumulacija Cu^{2+} najčešće se dešava pri temperaturama od 5°C do 40°C, a maksimalan efekat se postiže na 25-30°C (Stoll, 1996). Jedan od mehanizama kojim se može objasniti bioakumulacija teških metala je i prisustvo metalotioneina. Metalotioneini su termostabilni proteini, čija je biosinteza indukovana različitim ekološkim i fiziološkim promenama, uključujući visoke koncentracije metala i oksidativni stres (Hohmann i Mager, 1997; de Sioniz et al., 2002). Ovi proteini su bogati cisteinskim ostacima i vezuju za sebe katjone teških metala (Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} i Ag^{3+}) i na taj način smanjuju njihov toksičan efekat na ćelije eukariota (Brady et al., 1994).

Pored određivanja procenta bioakumulacije Cu^{2+} ICP-OES metodom, izvršena je i analiza ćelija kvasca sa najvećim procentom bioakumulacije (*C. tropicalis*, 4TD1101S) pre i posle tretiranja sa 2 mM $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, pomoću Raman spektroskopije (Slika 36).



Slika 36. Ramanski spektri kvasca *Candida tropicalis* (4TD1101S) pre i posle tretiranja sa 2 mM bakar-sulfata ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$)

Oba spektra izolata *C. tropicalis* (4TD1101S), dobijena su usrednjavanjem većeg broja ($n \geq 10$) snimljenih spektara (Slika 36). Primećeno je da nakon tretiranja kvasca dolazi do blagih promena u nekim pikovima, u opsegu talasnih brojeva do 1800 cm^{-1} . Uočava se porast intenziteta pika na $\sim 472 \text{ cm}^{-1}$, što može biti izazvano stvaranjem CuS (prostorna grupa simetrije D_{6h}^4), jer taj pik odgovara položaju najjače linije u Raman spektru ovog jedinjenja I odnosi se na istežuće vibracije S-S kovalentne veze (Xie et al., 2015). Takođe, pomenuti pik može poticati Iod formiranja drugih Cu_{2-x}S ($0 < x < 1$) struktura. Inače, pojava CuS mineralizacije na površini ćelije ili u zidu ćelije Cu-tretiranog kvasca uslovljena je koncentracijom Cu u medijumu kojim se kvasac tretira I prisustvom određenih gena (npr. *SLF1* gena) u datoj vrsti kvasca (Winge et al., 1998), a važna je sastanovišta razmatranja svojstva Cu-detoksifikacije I tolerantnosti kvasca na bakar. Porast intenziteta pikova na $\sim 523 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 677 \text{ cm}^{-1}$ i $\sim 688 \text{ cm}^{-1}$ ukazuje na

indukovanu sintezu metalotioneina (MT) u Cu-tretiranim kvascima i na porast udela disulfidnih (S-S) veza u njima, tj. na povećanje udela cistinskog sadržaja usled delimične oksidacije Cu-proteina u kvascima (Torreggiani i Tinti, 2010).

U spektru Cu-tretiranog kvasca (Slika 36) takođe se javljaju promene u pikovima nukleobaza i aromatičnih aminokiselina, što ističe činjenicu da su one osetljive na mikrookruženje. Npr., menja se odnos intenziteta pikova na $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ i 1576 cm^{-1} , pri čemu oni potiču od aromatičnih aminokiselina i purinskih baza. Raste intenzitet linije na $\sim 718 \text{ cm}^{-1}$, koja se pripisuje adeninu (Samek et al., 2014) i dezoksiadenozinu (Panikkanvalappil et al., 2013), a u manjoj meri raste i intenzitet linije na $775 \sim \text{cm}^{-1}$ koja potiče od doprinosa moda citozina, timina i uracila (Mungroo et al., 2016). Primećuje se i porast pika na $\sim 1330 \text{ cm}^{-1}$ u odnosu na pik na $\sim 1385 \text{ cm}^{-1}$, kao i u odnosu na pik na $\sim 1442 \text{ cm}^{-1}$, što može biti posledica povećanog udela dezoksiadenozinskih moda u odnosu na udeo moda dezoksitimidina i dezoksiguanozina. Ove promene ukazuju na moguću perturbaciju u lokalnom okruženju oko pojedinih nukleobaza, odnosno na moguću promenu u strukturi DNK usled ROS (*reactive oxygen species*) uticaja.

Naime, pri izlaganju ćelija povećanim koncentracijama Cu, oni Cu joni koji nisu ušli u sastav MT i CuS mogu dovesti do poremećaja metabolizma ćelije i do generisanja ROS molekula (kao što je pojava H_2O_2), koji lako difunduju kroz ćelijsku membranu i mogu izazvati oštećenja u DNK (Panikkanvalappil et al., 2013). Na slici 36 se takođe zapaža da slabi pikovi u oblasti $1075\text{-}1092 \text{ cm}^{-1}$ postaju ipak izraženiji (u odnosu na susedne pikove) nakon tretiranja kvasca sa bakar (II)-sulfat-pentahidratom, što takođe može biti posledica promena u geometriji dezoksiriboza-fosfat skeleta DNK spirale i sekundarnoj strukturi DNK, npr. Usled postojanja ROS uticaja, tj. Usled postojanja hidroksilnih radikala koji dovode do izmeštanja H atoma u okviru pomenute strukture (Panikkanvalappil et al., 2013).

Od pikova koji odgovaraju aromatičnim aminokiselinama, zapaža se porast intenziteta tirozinskog pika na $\sim 848 \text{ cm}^{-1}$ (Noothalapati et al., 2016), kao i pika fenilalanina $\sim 996 \text{ cm}^{-1}$ (Samek et al., 2014).

Tabela 37. Predložena asignacija bitnih pikova zapaženih na Raman spektru prikazanom na slici 36. (asignacija je izvršena u skladu sa literaturnim podacima navedenim u ovom poglavlju i poglavlju 5.4.3)

| Redni broj | Položaj Raman pika, | Poreklo (oznaka) pika |
|------------|---------------------|---|
| pika | cm ⁻¹ | |
| 1 | 472 | CuS, Cu _{2-x} S (0 < x < 1) |
| 2 | 523 | Cu-MT (S-S moda cistina) |
| 3 | 677, 688 | Cu-MT (C-S, S-S mode cistina) |
| 4 | 718 | adenin i dezoksiadenozin |
| 5 | 741 | triptofan i dezoksitimidin |
| 6 | 776 | citozin, timin i uracil |
| 7 | 848 | tirozin |
| 8 | 928 | α-heliks u proteinima, glukanska traka, α-1,4 glikozidna veza |
| 9 | 996 | fenilalanin |
| 10 | 1075 | lipidi |
| 11 | 1120 | proteini, glikozidna veza |
| 12 | 1147 | skeletalne mode hemoproteina, tj. C-C i C-N istežuće vibracije proteina, polifosfati |
| 13 | 1260 | lipidi, amid III |
| 14 | 1302 | lipidi, proteini (C-H uvijajuće vibracije u ravni) |
| 15 | 1330 | dezoksiadenozin, proteini i ugljeni hidrati |
| 16 | 1385 | dezoksitimidin, dezoksiguanozin, dezoksiadenozin, |
| 17 | 1442 | lipidi, proteini (CH ₂ , CH ₃ savijajuće vibracije) |
| 18 | 1576 | aromatične aminokiseline, nukleobaze adenin i guanin |
| 19 | 1600 | aromatične aminokiseline |
| 20 | 1652 | C=C istežuće vibracije fosfolipida |
| 21 | 1665 | amid I |

Jedva primetno raste pik na ~ 930 cm⁻¹ koji generalno potiče od skeletalnih moda alfa-heliks konformacije u okviru sekundarne strukture proteina, ali i od moda glukana i glikozidne veze (Kizil et al., 2002; Azo materials, 2014). Može se pretpostaviti da i blagi porast pika na ~ 1147 cm⁻¹ prvenstveno potiče od promena u skeletalnim modama hemoproteina (Schach et al., 2011), odnosno od promena u C-C i C-N istežućim vibracijama proteina (Huang et al., 2005; Singh et al., 2006), mada ovom piku mogu

dati doprinos i mode polifosfata (Bednarova et al., 2012). Na Raman spektru se ne uočavaju najjače mode za $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Hope i Wood, 2004).

Akumulacija bakra u zemljištu ima velike posledice na aktivnost živog dela zemljišta, a time i na celokupne biološke procese i kvalitet zemljišta. Mere popravke bazirane na hemijskim postupcima nose brojne izazove, što je uticalo i na razvijanje novih ekološki i ekonomski opravdanih postupaka bioremedijacije. Visok procenat bioakumulacije izolata *C. tropicalis* (4TD1101S, 94,37 %) ukazuje na mogućnost primene u procesu bioremedijacije različitih zemljišnih ekosistema.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu eksperimentalnih istraživanja izvedenih u okviru ove disertacije i analize literaturnih podataka mogu se izvesti zaključci:

1. Primenom klasične indirektna metode za proučavanje mikrobnog diverziteta zemljišta uočena je dobra biogenost zemljišta odabranih za izolaciju kvasaca: gradskog zemljišta (gradski park Tivat, Crna Gora), poljoprivrednog zemljišta (vinograd Radovanović, Krnjevo i poljoprivredno školsko dobro, Radmilovac) i rizosfere trske (Trešnja, Srbija). Ispitana zemljišta se razlikuju prema mikrobiološkim karakteristikama, a najveća brojnost ukupnih bakterija, gljiva, amonifikatora, sporogenih bakterija i azotofiksatora je utvrđena u rizosferi trske (SK).
2. Primenom molekularne PCR-DGGE metode je utvrđen diverzitet gljiva i kvasaca u uzorcima zemljišta (Cvin i Avin) poljoprivrednog školskog dobra Radmilovac. DGGE profil PCR fragmenata dobijenih umnožavanjem gena za 18S rRNK i ITS regiona iz ukupne DNK izolovane iz zemljišta je ukazao na razlike u diverzitetu između ispitivanih uzoraka zemljišta.
3. Izolovano je jedanaest izolata kvasaca od toga šest iz gradskog zemljišta, četiri iz poljoprivrednog zemljišta, odnosno, dva izolata iz zemljišta poljoprivrednog školskog dobra Radmilovac i dva izolata iz zemljišta vinograda Radovanović i jedan izolat iz rizosfere trske. Na osnovu morfoloških (makro i mikromorfoloških) i odgajivačkih karakteristika je utvrđeno da između izolata kvasaca postoje razlike.
4. Izolati kvasaca se razlikuju na osnovu ekoloških karakteristika. Testiranje odnosa izolata kvasaca prema temperaturi sredine je pokazalo da najveći broj izolata raste pri temperaturi od 30°C, a sposobnost rasta na maksimalnoj temperaturi od 45°C su ispoljila četiri izolata *Candida tropicalis* 2TD2912B, 3TD0905L, 4TD1101S i Avin1312L. Odnos izolata kvasaca prema pH vrednosti sredine je pokazao da svi izolati poseduju sposobnost tolerancije pH vrednosti od 3-9,5. Najniža pH pri kojoj je ispoljen slab rast je 2 (izolat *H. uvarum*, EK1605T), a najviša 10,5 (dva izolata *C. tropicalis* 4TD1101S i Avin1312L). Testiranje odnosa izolata kvasaca prema različitim koncentracijama natrijum-hlorida (NaCl) je pokazalo da su svi izolati bili sposobni da podnesu

- koncentraciju od 3 %, dok nijedan izolat nije rastao pri koncentraciji NaCl od 7 %.
5. U interakcijskim odnosima izolata kvasaca sa različitim bakterijskim sojevima: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* i *Bacillus subtilis* je utvrđeno da je u 60 % interakcijskih odnosa došlo do rasta obe kulture. Izolati kvasaca Avin1312L i SK0809R su inhibirali rast *Proteus mirabilis*, odnosno *Bacillus cereus*, pri čemu je izolat *C. tropicalis* (Avin1312L) inhibirao je rast *P. mirabilis*. Pet testiranih izolata je rastao zajedno sa *C. albicans*, a kod četiri ispitana izolata je došlo do inhibicije rasta.
 6. Biohemijska karakterizacija pomoću API 20C AUX sistema je omogućila identifikaciju izolata SK0809R (*Rhodotorula mucilaginosa*) i EK1605T (*Hanseniaspora uvarum*) do nivoa vrste, za izolate 2TD2912B, 3TD0905L, 4TD1101S i Avin1312L do nivoa roda (*Candida* sp.), dok u slučaju izolata 1KD1983V, 2KD3007J, CK2404I i Cvin1610M, API 20C AUX nije pružio dovoljno pouzdane informacije o identifikaciji.
 7. Radi precizne identifikacija do nivoa vrste je izvršeno umnožavanje D1/D2 regiona, sekvencioniranje i poređenje dobijenih sekvenci sa sekvencama u GenBank bazi podataka. Molekularne metode su omogućile pouzdanu identifikaciju izolata 2TD2912B, 3TD0905L, 4TD1101S i Avin1312L kao *Candida tropicalis*; izolata CK2404I, 1KD1983V, 2KD3007J i Cvin1610M kao *Cyberlindnera saturnus* i izolata BK0302D kao *Schwanniomyces occidentalis*. Primjenjene molekularne metode identifikacije su potvrdile rezultate dobijene API testovima kod izolata SK0809R (*Rhodotorula mucilaginosa*) i EK1605T (*Hanseniaspora uvarum*).
 8. Enzimaska karakterizacija je ukazala na razlike u produkciji ekstarcelularnih enzima različitih vrsta izolata kvasaca. Osam izolata je pokazalo visoku produkciju leucin arilamidaze, što ukazuje na izraženu proteolitičku aktivnost. N-acetil- β -glukozaminidaza je detektovana kod tri izolata *Candida tropicalis* (2TD2912B, 3TD0905L i Avin1312L), dok je β -glukozidaza detektovana kod tri izolata *C. saturnus* (1KD1983V, 2KD3007J i Cvin1610M) i tri izolata *C. tropicalis* (3TD0905L, 4TD1101S i Avin1312L). Kisela i alkalna fosfataza su

- detektovane kod izolata koji su pokazali sposobnost solubilizacije fosfata *S. occidentalis* (BK0302D), *C. saturnus* (CK2404I) i *C. tropicalis* (2TD2912B).
9. Raman spektroskopijom su analizirani i spektri izolata 1KD1983V, BK0302D, 4TD1101S, EK1605T, SK0809R i Cvin1610M. Poređenjem Raman spektara izolata 1KD1983V, 4TD1101S i BK0302D je utvrđeno da je sadržaj lipida najveći u izolatu BK0302D, a najmanji kod izolata 1KD1983V. Pik na $1147\text{--}1155\text{ cm}^{-1}$ koji potiče prvenstveno od polifosfata i može da služi kao marker za vakuolu je najizraženiji kod izolata BK0302D. Pri poređenju Raman spektra izolata SK0809R sa spektrima izolata 1KD1983V, 4TD1101S i BK0302D, najupečatljivija promena se odnosi na pojavu Raman pikova karotenoida u spektru SK0809R. Osnovna razlika koja se primećuje u spektru izolata EK1605T u odnosu na spektre izolata 1KD1983V, 4TD1101S i BK0302D se odnosi na znatan porast intenziteta pikova na sledećim položajima: $\sim 738\text{ cm}^{-1}$ (triptofan i hemoproteini), $\sim 1120\text{ cm}^{-1}$ (proteini i glikozidna veza) i $\sim 1576\text{ cm}^{-1}$ (aromatične aminokiseline i nukleotidne baze, kao i hemoproteini). Takođe, Raman linija na $\sim 1328\text{ cm}^{-1}$ je jače izražena kod izolata EK1605T nego kod izolata 1KD1983V, 4TD1101S, BK0302D i Cvin1610M, što dodatno ukazuje na veći sadržaj proteina i ugljenih hidrata.
10. Izolati su ispoljili različite direktne PGP mehanizme. Najveća vrednost IAA je zabeležena kod *Candida tropicalis* (3TD0905L, 6,00 $\mu\text{g/ml}$), a zatim i kod preostala tri izolata ove vrste kvasca i to: 2TD2912B (3,70 $\mu\text{g/ml}$), 4TD1101S (3,02 $\mu\text{g/ml}$) i Avin1312L (2,80 $\mu\text{g/ml}$). Sposobnost produkcije IAA je utvrđena i kod *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D, 1,09 $\mu\text{g/ml}$) i *Cyberlindnera saturnus* (Cvin1610M, 1,08 $\mu\text{g/ml}$). Ostali izolati nisu imali sposobnost produkcije IAA. Najveća količina fosfora je utvrđena kod *Schwanniomyces occidentalis* (BK0302D, 220,4 mg P/l). Sposobnost solubilizacije fosfata imali su i izolati *C. saturnus* (CK2404I) i *C. tropicalis* (2TD2912B). Sposobnost produkcije amonijaka (NH_3) imali su svi ispitivani izolati, osim *R. mucilaginosa* (SK0809R). Sposobnost zemljišnih kvasaca u transformaciji amonijum-sulfata je utvrđena kod šest izolata, a najveća količina NO_3^- je zabeležena kod sledećih izolata: *R. mucilaginosa* (SK0809R, 27,6 mg/l), *C. tropicalis* (3TD0905L 27,5 mg/l) i *C. saturnus* (CK2404I 27,1 mg/l).

11. Indirektni PGP mehanizam-antagonistička aktivnost izolata kvasaca je pokazala da među izolatima postoje potencijalni biokontrolni agensi. Procenat inhibicije izolata *H. uvarum* (EK1605T) prema *Pythium aphanidemratum* je iznosio 46,06 %, a kod dva izolata *C. saturnus* (CK2404I i Cvin1610M) 31,81 %, odnosno 35,31 %. Kada je u pitanju antagonistička aktivnost izolata kvasaca prema *Botrytis cinerea*, procenat inhibicije kod dva izolata *Candida tropicalis* (3TD0905L i Avin1312L) je iznosio 66,47 %, odnosno 61,96 %; kod dva izolata *C. saturnus* (2KD3007J i Cvin1610M) 55,55 %, odnosno 52,94 %; *C. tropicalis* (4TD1101S) 56,27 % i *S. occidentalis* (BK0302D) 55,68 %.
12. Odabrani sojevi imali su različite efekte na rast biljaka. Inokulacija crvene deteline (*Trifolium pretense* L.) sa *C. saturnus* (CK2404I) je imala najveći uticaj na suhu biomasu (0,31 g), dužinu korena (4,45 cm) i visinu crvene deteline (7,87 cm). Najveći uticaj na suhu biomasu (3,74 g), dužinu korena (13,33 cm) i visinu (22,42 cm) pšenice (*Triticum vulgare* L.) je postignut inokulacijom sa *C. tropicalis* (3TD0905L). Inokulacija suncokreta (*Helianthus annuus* L.) sa izolatima kvasaca nije imala značajnog uticaja na suhu biomasu. Ovi rezultati ukazuju da uspeh inokulacije zavisi od interakcije obe komponente, biljke i kvasca.
13. Najveći uticaj inokulacije na dužinu korena (10,28 cm) i visinu suncokreta (21,98 cm) je postignut primenom konzorcijuma. Inokulacija slačice (*Sinapis alba* L.) sa *C. saturnus* (CK2404I) je imala najveći uticaj na suhu biomasu (2,02 g) i visinu (9,70 cm), dok je inokulacija konzorcijumom imala najveći uticaj na dužinu korena (3,12 cm). Inokulacija zelene salate (*Lactuca sativa*) nije imala značajnog uticaja na suhu biomasu, dok je najveći uticaj inokulacije na dužinu korena (3,53 cm) i visinu (5,08 cm) zelene salate postignut primenom konzorcijuma.
14. Sposobnost bioakumulacije 2 mM Cu²⁺ su pokazala tri izolata *Candida tropicalis* (Avin1312L, 3TD0905L i 4TD1101S) i izolat *S. occidentalis* (BK0302D). Najveći procenat bioakumulacije Cu²⁺ je utvrđen kod izolata *C. tropicalis*-4TD1101S (94,37 %), a najmanji kod *S. occidentalis* (BK0302D). Ovi rezultati ukazuju na potencijal izolata kvasaca u bioremedijaciji oštećenih ekosistema.

15. Raman spektroskopijom su analizirani i spektri izolata 4TD1101S (*C. tropicalis*) u medijumu bez i sa dodatkom 2 mM $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. Promene uočene analizom spektara ukazuju na prisustvo CuS i/ili Cu_{2-x}S ($0 < x < 1$) mineralnog kompleksa, kao i na indukovanu sintezu metalotioneina u vidu Cu-tioneina uz porast udela cistinskog sadržaja usled delimične oksidacije tog proteina u tretiranim kvascima. Zapažene su i izvesne promene u Raman pikovima nukleobaza i aromatičnih aminokiselina, što je odraz specifičnog odgovora date vrste kvasca na stres.
16. Opšti zaključak disertacije je da ispitivani izolati kvasaca ispoljavaju različite PGP mehanizme. Odabrani izolati su pokazali različit nivo stimulativnog dejstva prema odabranim biljnim vrstama, što ukazuje na njihovu potencijalnu primenu u održivoj poljoprivredi. Visok procenat bioakumulacije Cu (*C. tropicalis* i *S. occidentalis*) ukazuje i na mogućnost primene u bioremedijaciji. Dalja istraživanja koja će omogućiti bolje razumevanje uloge zemljišnih kvasca u procesima transformacije i produkcije bioloških važnih jedinjenja, stvorice mogućnosti za njihovu uspešnu primenu u biotehnologiji.

7. LITERATURA

Abe, F., Miura, T., Nagahma, T., Inoue, A., Usami, R., Horokoshi, K. (2001): Isolation of a highly copper-tolerant yeast, *Cryptococcus* sp., from the Japan Trench and the induction of superoxide dismutase activity by Cu^{2+} . *Biotechnology Letters* 23: 2027-2034.

Acquaah, G. (2007): *Principles of plant genetics and breeding*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Agamy, R., Hashem, M., Alamri, S. (2013): Effect of soil amendment with yeasts as bio-fertilizers on the growth and productivity of sugar beet. *African Journal of Agricultural Research* 8: 46-56.

Aksu, Z., Donmez, G. (2001): Comparison of copper (II) biosorptive properties of live and treated *Candida* sp. *Journal of Environmental Science and Health, Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering* 36: 367-381.

Aksu, Z., Eren, A.T. (2005): Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry* 40: 2985-2991.

Alam S., Khalil, S., Ayub, N., Rashid, M. (2002): In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganism (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agriculture and Biology* 4: 454-458.

Alexander, M. (1977): *Introduction to Soil Microbiology*. In: Wiley, J. (Second Eds.). New York, USA.

Al-Falih, A.M. (2005): Phosphate solubilization in vitro by some soil yeasts. *Qatar University Science Journal* 25: 119-125.

Al-Falih, A.M. (2006): Nitrogen transformations in vitro by some soil yeasts. *Saudi Journal of Biological Sciences* 13: 135-140.

Alharbi, S.A. (2009): In vitro mineral transformations by the human pathogens *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 7: 655-657.

Altieri, M.A. (2004): Linking ecologists and traditional farmers in the search for sustainable agriculture. *Frontiers in Ecology and the Environment* 2: 35-42.

Amato, M., Ladd, J.N. (1994): Application of the ninhydrin-reactive N assay for microbial biomass in acid soils. *Soilless Biology Biochemistry* 26: 1109-1115.

American Public Health Association, APHA (1999): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 4500-NO₃-B, Ultraviolet Spectrophotometric Screening Method. DC Washington, USA.

Amprayn, K-o., Rose, M.T., Kecskes, M., Pereg, L., Nguyen, H.T. (2012): Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied Soil Ecology* 61: 295-299.

Anand, P., Isar, J., Saran, S., Saxena, R.K. (2006): Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology* 97: 1018-1025.

Antić, D., Riznić, J., Telenta, B. (1992). Air pollution from coal-fired power plants in comparison with other energy sources. *International Journal of Global Energy Issues* 4: 74-78.

Arthur, H., Watson, K. (1976): Thermal adaptation in yeast: Growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeast. *Journal of Bacteriology* 128: 56-68.

Azo Materials (2014): Using Raman spectroscopy to understand the conformational stability of protein therapeutics, <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=11142> (date accessed: 15 Jul 2014).

Babak, L., Supinova, P., Zichova, M., Burdychova, R., Vitova, E. (2012): Biosorption of Cu, Zn and Pb by thermophilic bacteria-effect of biomass concentration on biosorption capacity. *Acta Universitatis Agriculturae Et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 5: 9-18.

Babjeva, I.P., Chernov, I.Y. (1995): Geographic aspects of yeast ecology. *Physiol. Gen. Biol. Rev.* 9: 1-54.

Bahafid, W., Tahri Joutey, N., Sayel, H., Boularab, I., Ghachtouli, N.E.L. (2013): Bioaugmentation of chromium-polluted soil microcosms with *Candida tropicalis* diminishes phytoavailable chromium. *Journal of Applied Microbiology* 115: 727-734.

Baker, D.E., Senft, J.P. (1995): Copper. In: Alloway, B.J. (Eds.), *Heavy metals in soils*. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Balsalobre, L., de-Siloniz, M.I., Valderrama, M.J., Benito, T., Larrea, M.T., Peinado, J.M. (2003): Occurrence of yeasts in municipal wastes and their behaviour in presence of cadmium, copper and zinc. *Journal of Basic Microbiology* 43: 185-193.

Bardgett, R.D., Van der Putten, W.H. (2014): Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* 515: 505-511.

Barea, J. M. (2015): Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 15: 261-282.

Bednarova, L., Palacky, J., Bauerova, V., Hruskova-Heidingsfeldova, O., Pichova, I., Mojzes, P. (2012): Raman microspectroscopy of the yeast vacuoles. *Hindawi Publishing Corporation Spectroscopy: An International Journal* 27: 503-507.

Behera, B.C., Singdevsachan, S.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K., Thatoi, H.N. (2014): Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilizing microorganism in mangrove: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3: 97-110.

Bent, E. (2006): Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In: Tuzun, S., Bent, E. (Eds.), *Multigenic and induced systemic resistance in plants*. Springer-Verlag, New York, pp. 225-258.

Besnard, E., Chenu, C., Robert, M. (2001): Influence of organic amendments on copper distribution among particle-size and density fractions in Champagne vineyard soils. *Environmental Pollution* 112: 329-337.

Bharucha, U., Patel, K., Trivedi, U.B. (2013): Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural Research* 2: 215-221.

Bhowmick, T.K., Pyrgiotakis, G., Finton, K., Suresh, A.K., Kane, S.G., Moudgil, B., Bellare, J.R. (2008): A study of the effect of JB particles on *Saccharomyces cerevisiae* (yeast) cells by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* 39: 1859-1868.

Bianco, C., Defez, R. (2010): Improvement of phosphate solubilization and medicago plant yield by an indole-3-acetic acid-overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 4626-4632.

Bloem, J., De Ruiter, P.C., Bouwman, L.A. (1997): Soil food webs and nutrient cycling in agroecosystems. In: van Elsas, J.D., et al. (Eds.), *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 245-278.

Bodelier, P.L.E. (2011): Toward understanding, managing, and protecting microbial ecosystems. *Frontiers in Microbiology* 2: 80.

Botha, A. (2006): Yeasts in soil. In: Rosa, C., Gabor, P. (Eds.). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 221-241.

Botha, A. (2011): The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 1-8.

Boundy-Mills, K. (2006): Methods for investigating yeast biodiversity. In: Rosa, C., Gabor, P. (Eds.). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 67-100.

Brady, D., Duncan, J.R. (1994): Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41: 149-154.

Brodie, E., Edwards, S., Clipson, N. (2003): Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology* 45: 105-114.

Bronick, C.J., Lal, R. (2004): Soil structure and management. *Geoderma* 124: 3-22.

Bruns, T.D., White, T.J., Taylor, J.W. (1991): Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 22: 525-564.

Bulluck, L.R., Brosiusb, M., Evanylob, G.K., Ristaino, J.B. (2002): Organic synthetic fertility amendments influence soil microbial, physical chemical properties on organic conventional farms. *Applied Soil Ecology* 192: 147-160.

Bura, R., Vajzovic, A., Doty, S.L. (2012): Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 I: production of xylitol and ethanol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 39: 1003-1011.

Burford, E.P., Kierans, M., Gadd, G.M. (2003): Geomycology: fungi in mineral substrata. *Mycologist* 17: 98-107.

Camara, M.P.S., Palm, M.E., Berkum, P. van, O'Neill, N.R. (2002): Molecular phylogeny of *Leptosphaeria* and *Phaeosphaeria*. *Mycologia* 94: 630-640.

Carvalho, F.P., de Souza, A.C., Magalhaes-Guedes, K.T., Dias, D.R., Silva, C.F., Schwan, R.F. (2013): Yeasts diversity in Brazilian cerrado soils: Study of the enzymatic activities. *African Journal of Microbiology Research* 7: 4176-4190.

Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., Ongena, M. (2011): *Bacillus*-based biological control of plant diseases. *Pesticides in the modern world-pesticides use and management*. In Tech, Rijeka 273-302.

Chamnanpa, T., Limtong, P., Srisuk, N., Limtong, S. (2013): Diversity of yeasts in vetiver phylloplane and soil in vetiver rhizosphere in Thailand and their ability to produce indole-3-acetic acid. *Seminar on Natural Resources Adaptation to the Global Climate Change* 16: 245-248.

Chand-Goyal, T., Spotts, R.A. (1997): Biological control of postharvest diseases of apple and pear under semi-commercial conditions using three saprophytic yeasts. *Biological Control* 10: 199-206.

Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arunshen, A.B., Lai, W.A., Young, C.C. (2006): Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33-41.

Cheng, Y-T., Yang, C-F. (2016): Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 61: 270-275.

Chojnacka, H. (2010): Biosorption and bioaccumulation-The prospects for practical applications. *Environment International* 36: 299-307.

Chodak, M., Pietrzykowski, M., Sroka, K. (2015): Physiological profiles of microbial communities in mine soils afforested with different tree species. *Ecological Engineering* 81: 462-470.

Cloete, K.J., Valentine, A.J., Stander, M.A., Blomerus, L.M., Botha, A. (2009): Evidence of symbiosis between the soil yeast *Cryptococcus laurentii* and a sclerophyllous medicinal shrub, *Agathosma betulina* (Berg.) Pillans. *Microbial Ecology* 57: 624-632.

Ceylan, O., Ugur, A. (2012): Bio-monitoring of heavy metal resistance in *Pseudomonas* and *Pseudomonas* related genus. *Journal of Biological Environmental Science* 6: 233-242.

- Cocolin, L., Bisson, L., Mills, D. (2000): Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 189: 81-87.
- Coleman, D.C., Crossley, D.A. (1996): Secondary production: activities of heterotrophic organisms-microbes. In: Coleman, D.C., Crossley, D.A. (Eds.), *Fundamentals of soil ecology*. Academic, London, UK, pp. 33-195.
- Collins, A.M., Jones, H.D.T., Han, D., Hu, Q., Beechem, T.E., Timlin, J.A., (2011): Carotenoid distribution in living cells of *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*). *Plos ONE* 6: 1-7.
- Commission of the European Committees (2006). CEC
- Cong, P.T., Dung, T.D., Hien, N.T., Choudhury, A., Rose, M.T., Kecskes, M. L., Deaker, R., Kennedy, I.R. (2011): Effects of a multistrain biofertilizer and phosphorus rates on nutrition and grain yield of paddy rice on a sandy soil in southern Vietnam. *Journal of Plant Nutrition* 34: 1058-1069.
- Cunnington, J.H., Takamatsu, S., Lawrie, A.C., Pascoe, I.G. (2003): Molecular identification of anamorphic powdery mildews (*Erysiphales*). *Australasian Plant Pathology* 32: 421-428.
- Daniel, R. (2005): The metagenomics of soil. *Nature Reviews. Microbiology* 3: 470-478.
- Deak, T. (2006): Environmental Factors Influencing Yeasts. In: Rosa, C., Gabor, P. (Eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 155-175.
- Deak, T. (2009): Ecology and biodiversity of yeasts with potential value in biotechnology. Springer, Netherlands, pp. 151-168.
- Decho, A.W. (1990): Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology* 28: 73-153.
- Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F.T., Reich, P.B., Jeffries, T.C., Gaitan, J.J., Encinar, D., Berdugo, M., Campbell, C.D., Singh, B.K. (2016): Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature Communications* 7: doi:10.1038/ncomms10541.

De Oliveira, V.E., Castro, H.V., Edwards, H.G.M., de Oliveira, L.F.C. (2009): Carotenes and carotenoids in natural biological samples: a Raman spectroscopic analysis. *Journal of Raman Spectroscopy* 41: 642-650.

De Sioniz, M.I., Balsalobre, L., Alba, C., Valderrama, M.J., Peinado, J.M. (2002): Feasibility of copper uptake by the yeast *Pichia guilliermondii* isolated from sewage sludge. *Research in Microbiology* 153: 173-180.

De Vries, F.T. (2009): Soil fungi and nitrogen cycling. Causes and consequences of changing fungal biomass in grasslands. PhD thesis, Wageningen Universiteit, Wageningen.

De Vrieze, M., Piandey, P., Bucheli, T., Varadarajan, A.R., Ahrens, C.H., Weisskopf, L., et al. (2015): Volatile organic compounds from native potato-associated *Pseudomonas* as potential anti-oomycete agents. *Frontiers in Microbiology* 6: 1295.

Deng, Z., Wang, W., Tan, H., Cao, L. (2012): Characterization of heavy metal-resistant endophytic yeast *Cryptococcus* sp. CBSB78 from rapes (*Brassica chinensis*) and its potential in promoting the growth of *Brassica* spp. in metal-contaminated soils. *Water, Air, & Soil Pollution* 223: 5321-5329.

Dimkpa, C.O., Merten, D., Svatos, A., Buchel, G., Kothe, E. (2009): Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *Journal of Applied Microbiology* 107: 1687-1696.

Dinić, Z., Ugrinović, M., Bosnić, P., Mijatović, M., Zdravković, J., Miladinović, M., Jošić, D. (2014): Solubilization of inorganic phosphate by endophytic *Pseudomonas* sp. from french bean nodules. *Ratarstvo i povrtarstvo* 51: 100-105.

Do Carmo-Sousa, L. (1969): Distribution of yeasts in nature. In: Rose, A.H., Harrison, J.S. (Eds.), *The Yeasts*. Academic Press: London, UK, pp. 79-105.

Donmez, G., Aksu, Z. (2001): Bioaccumulation of copper (II) and nickel (II) by the non-adapted and adapted growing *Candida* sp. *Water Research* 35: 1425-1434.

Droby, S. (2006): Improving quality and safety of fresh fruit and vegetables afterharvest by the use of biocontrol agents and natural materials. *Acta Horticulturae* 709: 45-51.

Duarte, C.M., Dachs, J., Llabres, M., Alonso-Laita, P., Gasol, J.M., Tovar-Sanchez, A., Sanudo-Wilhemly, S. Agusti, S. (2006): Aerosol inputs enhance new

production in the subtropical northeast Atlantic. *Journal of Geophysical Research* 111: doi: 10.1029/2005JG000140.

Duca, D., Lorv, J., Patten, C.L., Rose, D., Glick, B.R. (2014): Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek* 106: 85-125.

Dutta, D., Dobson, A.J., Houtz, P.L., Glasser, C., Revah, J., Korzelius, J., Patel, P.H., Edgar, B.A., Buchon N. (2015): Regional cell-specific transcriptome mapping reveals regulatory complexity in the adult *Drosophila midgut*. *Cell Reports* 12: 346-358.

Egamberdiyeva, D. (2007): The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology* 36: 184-189.

Ejikeme, O.C., Uzoma, A.C. (2013): Comparative study on solubilization of tri-calcium phosphate (TCP) by phosphate solubilizing fungi (PSF) isolated from Nsukka pepper plant rhizosphere and root free soil. *Journal of Yeast and Fungal Research* 4: 52-57.

El Ghaouth, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M. (1998): Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology* 88: 282-291.

El-Dissoky, R.A., Ebtsam, M., Morsy, M.A., El-Shazly (2013): Beneficial effect of potassium fertilization and yeast strains on maize plants grown on salt affected soil. *Scientific Journal - Faculty of Agriculture - Mansoura University* 4: 827-842.

El-Tarabily, K.A. (2004): Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 96: 69-75.

El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K. (2006): Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* 47: 25-35.

Falih, A.M., Wainwright, M. (1995): Nitrification, S-oxidation and P-solubilization by the soil yeast *Williopsis californica* and by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycological Research* 99: 200-204.

Falih, A.M. (1998): Comparative toxicity of heavy metals to some yeasts isolated from Saudi Arabian soil. *Bioresource Technology* 64: 193-198.

Fan, Q., Tian, S.P. (2000): Postharvest biological control of rhizopus rot on nectarine fruit by *Pichia membranefaciens* Hansen. Plant Disease Journal 84: 1212-1216.

Fan, TW-M., Lane, A.N., Schenker, M., Bartley, J.P., Crowley, D., Higashi, R.M. (2001): Comprehensive chemical profiling of gramineous plant root exudates using high-resolution NMR and MS. Phytochemistry 57: 209-221.

FAO, 2011. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Available at: www.fao.org/index_es.htm. (Consulta: junio 11, 2011).

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

Filonow, A.B., Vishniac, H.S., Anderson, J.A., Janisiewicz, W.J. (1996): Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. Biological Control 7: 212-220.

Fell, J.W., Statzell-Tallman, A. (1998): *Cryptococcus* Vuillemin. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds.), The yeasts, a taxonomic study. Elsevier, Amsterdam, pp 742-767.

Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca A., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A. (2000): Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: 1351-1371.

Fierer, N., Jackson, R.B. (2006): The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proceedings of the National Academy of Sciences 103: 626-631.

Fleet, G.H. (1990): Yeasts in dairy products. Journal of applied bacteriology 68: 199-211.

Fleet, G.H. (1998): Yeasts in natural habitats. Food Technology and Biotechnology 36: 285-289.

Flores-Velez, L.M., Ducaroir, J., Jaunet, A.M., Robert, M. (1996): Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyard soil by three different methods. European Journal of Soil Science 47: 523-532.

Frases, S., Salazar, A., Dadachova, E., Casadevall, A. (2007): *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 615-621.

Frey, S.D. (2007): Spatial distribution of soil organisms. In: Paul, E.A. (Third Eds.), *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 283-300.

Fu, S.F., Sun, P.F., Lu, H.Y., Wei, J.Y., Xiao, H.S., Fang, W.T., Cheng, B.Y., Chou, J.Y. (2016): Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. *Fungal Biology* 120: 433-448.

Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas J.D. (2004): Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42: 243-270.

Gawronski, S.W., Gawronska, H. (2007): Plant taxonomy for phytoremediation. In: Marmiroli N. et al. (Eds.), *Advanced Science and Technology for Biological Decontamination of Sites Affected by Chemical and Radiological Nuclear Agents*. Springer, pp. 79-88.

Glick, B.R. (2012): Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401> Article ID 963401.

Golubev, W.I. (2006): Antagonistic interactions among yeasts. In: Rosa, C.A., Peter, G., (Eds.). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 197-219.

Goodfellow, M., Simpson, K.E. (1987): Ecology of streptomycetes. *Frontiers in Applied Microbiology* 2: 97-125.

Gomaa, A.M., Gaballah, M.S. (2004): Changes in compatible solutes of some maize varieties grown in sandy soils and biofertilized with *Rhodotorula glutinis* under saline conditions. *Journal of Applied Sciences Research* 1: 347-351.

Gomaa, A.M., Moawad, S.S., Ebadah, I.M.A., Salim, H.A. (2005): Application of bioorganic farming and its influence on certain pests infestation, growth and productivity of potato plants. *Journal of Applied Sciences Research* 1: 205-211.

Gomaa, A.M., Mohamed, M.H. (2007): Application of bio-organic agriculture and its effects on guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) root nodules, forage, seed yield and yield quality. *World Journal of Agricultural Sciences* 3: 91-96.

Gomes, N.C.M., Fagbola, O., Costa, R., Rumjanek, N.G., Buchner, A., Mendona-Hagler, L., Smalla K. (2003): Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3758-3766.

Gordon, S.A., Weber, R.P. (1951): Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology* 26: 192-195.

Gori, K., Mortensen, H.D., Arneborg, N., Jespersen, L. (2007): Ammonia production and its possible role as a mediator of communication or *Debaryomyces hansenii* and other cheese-relevant yeast species. *Journal of Dairy Science* 90: 5032-5041.

Grahovac, M., Inđić, D., Lazić, S., Vuković, S. (2009): Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi. *Pesticidi i fitomedicina* 24: 245-258.

Griffiths, B.S, Ritz, K., Bardgett, R.D., Cook, R., Christensen, S., Ekelund, F., Sorensen, S.J., Baath, E., Bloem, J., Rüter, P.C. de, Dolfing, J., Nicolardot, B. (2000): Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation- induced microbial diversity reductions: An examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *Oikos* 90: 279-294.

Gupta, V.P., Tewari, S.K., Govindaiah, D., Bajpai, A.K. (1999): Ultrastructure of mycoparasitism of *Trichoderma*, *Gliocladium* and *Laetisaria* species on *Botryodiplodia theobromae*. *Journal of Phytopathology* 147: 19-24.

Haas, D., Defago, G. (2005): Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3: 307-319.

Haidar, R., Fermaud, M., Calvo-Garrido, C., Roudet, J., Deschamps, A. (2016): Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. *Phytopathologia Mediterranea* 55: 13-34.

Hajduković, I. (2010): Održiva poljoprivredna proizvodnja kao odgovor na degradaciju tala. Diplomski rad. Veleučilište u Šibeniku, Hrvatska.

Hamaguchi, H-o (2009): Developments of Raman spectroscopy in the past 40 years: from a molecule to a living cell. *Current Science* 97: 186-191.

Hamasha, K.M. (2011): Raman spectroscopy for the microbiological characterization and identification of medically relevant bacteria. PhD thesis. Wayne State University, Detroit, Michigan.

Hansda, A., Kumar, V., Anshumali, V., Usmani, Z. (2014): Phytoremediation of heavy metals contaminated soil using plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A current perspective. *Recent Research in Science and Technology* 6: 131-134.

Harz, M., Rosch, P., Popp, J. (2009): Vibrational spectroscopy-A powerful tool for the rapid identification of microbial cells at the single-cell level. *Cytometry Part A* 75: 104-113.

Hassan, I.A., Basahi, J.M., Ismail, I.M. (2013): Gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidants as bioindicators of airborne heavy metal pollution in Jeddah, Saudi Arabia. *Current World Environment Journal* 8: 203-213.

Hesham, A.E.L., Khan, S., Liu, X.C., Zhang, Y., Wang, Z., Yang, M. (2006): Application of PCR–DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Yeast* 23: 879-887.

Hesham, A.E-L., Hashem, M.M. (2011): Molecular genetics identification of yeasts strains isolated from Egyptian soils for solubilization of inorganic phosphates and growth promotion of corn plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 55-61.

Hipkin, C.R. (1989): Nitrate assimilation in yeast. In: Wray, J.L., Kinghorn, J.R. (Eds), *Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation*. Oxford Science Publications, Oxford, pp. 51-68.

Hilda, R., Fraga, R. (1999): Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319-359.

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.

Hohmann, S., Mager, W.H. (1997): *Yeast stress responses*. Springer-Verlag, Heidelberg.

Homna, M., Shimomura, T. (1978): Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry* 42: 1825-1831.

Hope, G., Wood, R. (2004): Transient adsorption of sulfate ions during copper electrodeposition. *Journal of The Electrochemical Society* 151: 550-553.

Hoshino, Y.T., Matsumoto, N. (2007): Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. *Soil Science and Plant Nutrition* 53: 40-55.

Hoshino, Y.T. (2012): Molecular analyses of soil fungal community. In: Hernandez-Soriano, M.C. (Eds.), *Methods and Applications Soil health and land use management*. In Tech Published, Chapter 15.

Htet, N.N.W., Yu, S.S., Latt, Z K. (2013): Ammonium accumulation in culture broth of soil yeast isolates and their effects on sorghum plant. *Journal of Scientific & Innovative Research* 2: 2320-4818.

Huang, Y.S., Karashima, T., Yamamoto, M., Ogura, T., Hamaguchi, H. (2004): Raman spectroscopic signature of life in a living yeast cell. *Journal of Raman Spectroscopy* 35: 525-526.

Huang, Y.S., Karashima, T., Yamamoto, M., Hamaguchi, H. (2005): Molecular-level investigation of the structure, transformation, and bioactivity of single living fission yeast cells by time- and space-resolved Raman spectroscopy. *Biochemistry* 44: 10009-10019.

Hughenoltz, P. (2002): Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* 3: 0003.1-0003.8.

Huhe, Borjigin, S., Buhebaoyin, W.Y., Li, M., Cheng, Y. (2016): Microbial nitrogen-cycle gene abundance in soil of cropland abandoned for different periods. *PLoS ONE* 11: e0154697.

Huhndorf, S.M., Miller, A.N., Fernandez, F.A. (2004): Molecular systematics of the Sordariales: the order and the family *Lasiosphaeriaceae redefined*. *Mycologia* 96: 368-387.

Ignatova, L., Brazhnikova, Y, Berzhanova, R., Mukasheva, T. (2015): Plant growth-promoting and antifungal activity of yeasts from dark chestnut soil. *Microbiological Research* 175: 78-83.

Ilhan, S., Cabuk, A., Filik, C., Calikan, F. (2004): Effect of pretreatment on biosorption of heavy metals by fungal biomass. *Trakya University Journal of Social Science* 5: 11-17.

Ilić, D., Radić, D., Karličić, V., Jovičić-Petrović, J., Kiković, D., Lalević, B., Raičević, V. (2016): Mikrobni diverzitet zemljišta kontaminiranog visokim sadržajem teških metala. *Zaštita Materijala* 57: 383-387.

Ito, H., Inouhe, M., Tohoyama, H., Joho, M. (2007): Copper extrusion after accumulation during growth of copper-tolerant yeast *Yarrowia lipolytica*. *Z. Naturforsch* 62: 77-82.

Ivanović, M. (2004): Mikoze i pseudomikoze biljaka. Nauka, Beograd, Srbija.

Jaeger, C., Lindow, S., Miller, W., Clark, E., Firestone, M. (1999): Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2685-2690.

Jeewon, R., Cai, L., Liew, E.C.Y., Zhang, K.Q., Hyde, K.D. (2003): *Dyrithiopsis lakefuxianensis* gen et sp. nov. from Fuxian Lake, Yunnan, China and notes on the taxonomic confusion surrounding Dyrithium. *Mycologia* 95: 911-920.

Jehlička, J., Osterrothova, K., Nedbalova, L., Gunde-Cimerman, N., Oren, A., (2014): Discrimination of pigments of microalgae, bacteria and yeasts using lightweight handheld Raman spectrometers: Prospects for astrobiology. 11th International GeoRaman Conference, June 15-19, St. Louis, Missouri, USA.

Jenkins, S.N., Waite, I.S., Blackburn, A., Husband, R., Rushton, S.P., Manning D.C., et al. (2009): Actinobacterial community dynamics in long term managed grasslands. *Antonie van Leeuwenhoek* 95: 319-334.

Joubert, L.M., Botha, A., Wolfaardt, G.M. (2003): Feeding relationships in yeast-ciliate biofilms. In: McBain, A. Allison, D., Brading, M., Rickard, A., Verran, J., Walker, J. (Eds.), *BBC 6. Biofilm communities: order from chaos?* Bioline, Cardiff, pp. 409-415.

Jovicic-Petrovic, J., Karlicic, V., Radic, D., Jovanovic, Lj., Kikovic, D., Raicevic, V. (2014): Microbial biodiversity in PAH and PCB contaminatedsSoil as a potential for in situ bioremediation. *Proceedings of the 9th Conference on Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems, Venice/Istanbul, Italy/Turkey*, pp.1.

Jovičić-Petrović, J. (2014): Gljive iz agroindustrijskog otpada kao antagonisti fitopatogenim gljivama. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija.

Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (2001): Trace elements in soils and plants. CRC Press. Boca Raton.

Kamel, Z., El-Moniem, N.H.A. (2013): Potential of antagonistic yeast strains as biocontrol agents against root rot disease in tomato. *International Journal of Advanced Research* 1: 372-390.

Kecskes, M. L., Rose, M.T., Tran, K.C., Nguyen, K.O., Michel, E., Lauby, B., Rakotondrainibe, M., Casteriano, A.V., Palagyi, A., Krishnen, G., Kennedy, I. R. (2008): Identification and quality control of BioGro inoculant Biofertiliser strains. In: Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A., Kecskes, M.L, Rose, M.T. (Eds.), *Efficient Nutrient Use in Rice Production in Vietnam Achieved Using Inoculant Biofertilisers, Proceedings of a Project (SMCN/2002/073) Workshop Held in Hanoi Vietnam, 12-13 October 2007, ACIAR Proceedings*, pp. 117-125.

Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A. (2007): Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-A review. *Agronomy for Sustainable Development* 27: 29-43.

Kimura, Y., Nakano, Y., Fujita, K., Miyabe, S., Imasaka, S., Ishikawa, Y., Sato, M. (1998): Isolation and characteristics of yeast able to grow at low concentrations of nutrients. *Yeasts* 14: 233-238.

Kizil, R., Irudayaraj, J., Seetharaman, K. (2002): Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3912-3918.

Knoshaug, E., Franden, M., Stambuk, B., Zhang, M., Singh A. (2009): Utilization and transport of L-arabinose by non-*Saccharomyces* yeasts. *Cellulose* 16: 729-741.

Ko, W.H., Lockwood, J.L. (1976): Soil fungistasis: relation to fungal spore nutrition. *Phytopathology* 57: 894-901.

Kopke, B., Wilms, R., Engelen, B., Cypionka, H., Sass, H. (2005): Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. *Applied Environmental Microbiology* 71: 7819-7830.

Kowalchuk, G.A., Gerards, S., Woldendorp, J.W. (1997): Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (Marram grass) roots by

denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. *Applied Environmental Microbiology* 63: 3858-3865.

Kulshreshtha, S., Mathur, N., Bhatnagar, P. (2014): Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express* 4: 29.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. (1997): Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 1216-1223.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (1998): *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1055.

Kurtzman, C.P., Smith, M.Th. (1998): *Saccharomycopsis* Schionning. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Fourth Eds.), *The Yeasts, a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, pp 374-386.

Kvasnikov, E.I., Nagornaya, S.S., Shchelokova, I.F. (1975): Yeast flora of plant rhizosphere and phyllosphere. *Microbiologia (in Russian)* 44: 339-345.

Lachance, M.A., Pang, W.M. (1997): Predacious yeasts. *Yeast* 13: 225-232.

Lachance, M.A., Starmer, W.T. (1998): Ecology of yeasts. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Fourth Eds.), *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, pp. 21-30.

Lachance, M.A., Pupovac-Velikonja, A., Natarajan, S., Schlag-Edler, B. (2000): Nutrition and phylogeny of predacious yeasts. *Canadian Journal of Microbiology* 46: 495-505.

Large, P. (1986): Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast* 2: 1-34.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics Applications Note* 23: 2947-2948.

Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N. (2009): Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community composition at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 5111-5120.

Laughon, B.E., Syed, S.A., Loesche, W.J. (1982): API ZYM system for identification of *Bacteroides* spp., *Capnocytophaga* spp., and *Spirochetes* of oral origin. *Journal of Clinical Microbiology* 97-102.

Lavenson, D.M., Tozzia, E.J., Karuna, N., Jeoh, T., Powella, R.L., McCarthy, M. (2012): The effect of mixing on the liquefaction and saccharification of cellulosic fibers. *Bioresource Technology* 111: 240-247.

Lee, R.W., Malchev, I.T., Rajcan, I., Kott, L.S. (2014): Identification of putative quantitative trait loci associated with a flavonoid related to resistance to cabbage seedpod weevil (*Ceutorhynchus obstrictus*) in canola derived from an intergeneric cross, *Sinapis alba* x *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* 127: 419-428.

Lewis, K. (2007): Persister cells, dormancy and infectious disease. *Natural Review Microbiology* 5: 48-56.

Li, C., Jiang, W., Ma, N., et al. (2014): Bioaccumulation of cadmium by growing *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* 155: 116-121.

Lima, G., Arru, S., De Curtis, V. Arras, G. (1999): Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23: 223-229.

Limtong, S., Koowadjanakul, N. (2012): Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 3323-3335.

Limtong, S., Kaewwichian, R., Yongmanitchai, W., Kawasaki, H. (2014): Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30: 1785-1796.

Lonhienne, T., Mason, M.G., Ragan, M.A., Hugenholtz, P., Schmidt, S., Paungfoo-Lonhienne, C. (2014): Yeast as a biofertilizer alters plant growth and morphology. *Crop Science* 54: 785-790.

Lohnis, F. (1913): "Vorlesungen uber Landwirtschaftliche Bacterologia." Borntraeger, Berlin.

Lopez, M.C., Mateo, J.J., Maicas, S. (2015): Screening of β -glucosidase and β -xylosidase activities in four non-*Saccharomyces* yeast isolates. *Journal of Food Science* 80: 1696-1704.

Lu, C.G., Liu, W.C., Qiu, J.Y., Wang, H.M., Liu, T., Liu, W.D. (2008): Identification of an antifungal metabolite produced by a potential biocontrol *Actinomyces* strain A01. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 701-707.

Lugtenberg, B. (2015): Life of microbes in the rhizosphere. In: Lugtenberg, B., (Eds.), *Principles of plant-microbe interactions*. Springer International Publishing Switzerland, Heidelberg, pp. 7-15.

Ma, F., Wu, J., Wang, L., Yang, J., Li, S., Li, Z., Zhag, X. (2014): Characterization of the microbial community in the rhizosphere of *Phragmites australis* (cav.) trin ex. steudel growing in the Sun Island wetland. *Water Environment Research* 86: 258-268.

Mahajan, S, Tuteja, N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139-158.

Maia, L.F., Fernandes, R.F., Almeida, M.R., de Oliveira, L.F.C. (2015): Rapid assessment of chemical compounds from *Phyllogorgia dilatata* using Raman spectroscopy. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25: 619-626.

Malhotra, M., Srivastava, S. (2009): Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *European Journal of Soil Biology* 45: 73-80.

Mandić, L., Djukić, D., Stevović, V. (2005): The number of microorganisms in the soil under different grass-leguminous mixtures. *Biotechnology in animal husbandry* 21: 175-179.

Manojlović, M., Bogdanović, D., Lazić, S., Nešić, Lj. (2014): Plodnost i opterećenost zemljišta u pograničnom području. Priručnik, ISBN 978-86-7520-290-5.

Martorell, P., Fernandez-Espinar, M.T., Querol, A. (2005): Sequence based identification of species belonging to the genus *Debaryomyces*. *FEMS Yeast Research* 5: 1157-1165.

Marshall, M.N., Cocolin, L., Mills, D.A., Vander Gheynst, J.S. (2003): Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *Journal of Applied Microbiology* 95: 934-948.

Masoud, W., Cesar, L.B., Jespersen, L., Jakobsen, M. (2004): Yeast involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast* 21: 549-556.

Matsukawa, E., Nakagawa, Y., Iimura, Y., Hayakawa, M. (2007): Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp. *Actinomycetologica* 21: 32-39.

Mekki, B.B., Ahmed, A.G. (2005): Growth, yield and seed quality of soybean (*Glycine max* L.) as affected by organic, bio-fertilizer and yeast application. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1: 320-324.

Messenguy, F., Andre, B., Dubois, E. (2006): Diversity of nitrogen metabolism among yeast species: Regulatory and evolutionary aspects. In: Rosa, C., Gabor, P. (Eds.). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 123-155.

Mestre, M.C., Fontenla, S., Bruzone, M.C., Fernandez, N.V., Dames, J. (2016): Detection of plant growth enhancing features in psychrotolerant yeasts from Patagonia (Argentina). *Journal of Basic Microbiology* 56:1098-1106.

Middelhoven, W.J. (1993): Catabolism of benzene compounds by ascomycetous and basidiomycetous yeasts and yeastlike fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* 63:125-144.

Middelhoven, W.J. (2006): Polysaccharides and phenolic compounds as substrate for yeasts isolated from rotten wood and description of *Cryptococcus fagi* sp.nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 90: 57-67.

Milovanović, V. (2011): Study of microbial diversity and yeast interactions using molecular methods. PhD thesis, Marche Polytechnic University, Ancona, Italy.

Mittal, V., Singh, O., Nayyar, H., Kaur, J., Tewari, R. (2008): Stimulatory effect of phosphate solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). *Soil Biology and Biochemistry* 40: 718-727.

Mihajlović, M.B. (1983): Priručnik za identifikaciju bakterija, kvasaca i plesni. Savez veterinara i veterinarskih tehničara, Beograd, Srbija.

Milošević, N., Marinković, J. (2000): Uloga mikroorganizama u adaptaciji poljoprivrednih biljnih vrsta na abiotičke stresove, Institut za ratarstvo i povrtlarstvo Novi Sad, Srbija.

Mirabal Alonso, L., Kleiner, D., Ortega, E. (2008): Spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* host yeasts that solubilize phosphate and accumulate polyphosphates. *Mycorrhiza* 18: 197-204.

Mirecki, N., Mijajlović, M., Dulović, S. (2015): The effects of different substrates on the quality of seedlings and yield in organic production of lettuce. "XX Savetovanje o biotehnologiji", Zbornik radova 20.

Mohamed, H.M., Metwally, A.K. (2014): Effect of combined inoculation of *Rhizobium* with soil yeasts on nodulation, growth and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under field condition. *American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology* 4: 1-10.

Mohamed, H.M. (2015): Impact of inoculation with arbuscular mycorrhizal, phosphate solubilizing bacteria and soil yeast on growth, yield and phosphorus content of onion plants. *International Journal of Soil Science* 10: 93-99.

Moline, M., Flores, M. R., Libkind, D., Dieguez, M. C., Farias, M.E., van Broock, M. (2010): Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. *Photochemical & Photobiological Sciences* 9: 1145-1151.

Morales, A., Alvear, M., Valenzuela, E., Rubio, R. Borie, F. (2007): Effect of inoculation with *Penicillium albidum*, a phosphate-solubilizing fungus, on the growth of *Trifolium pratense* cropped in a volcanic soil. *Journal of Basic Microbiology* 47: 275-280.

Mrkovački, N., Jarak, M., Đalović, I., Jocković, Đ. (2012): Značaj i efekat primene PGPR na mikrobiološku aktivnost u rizosferi kukuruza. *Ratarstvo i Povrtarstvo* 49: 335-344.

Muccilli, S., Caggia, C., Randazzo, C.L., Restuccia, C. (2011): Yeast dynamics during the fermentation of brined green olives treated in the field with kaolin and Bordeaux mixture to control the olive fruit fly. *International Journal of Food Microbiology* 148: 15-22.

Mungroo, N.A., Oliveira, G., Neethirajan, S. (2016): SERS based point-of-care detection of food-borne pathogens. *Microchimica Acta* 183: 697-707.

Munoz, A.J., Ruiz, E., Abriouel, H. (2012): Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for biosorption. *Chemical Engineering Journal* 210: 325-332.

Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology* 59: 695-700.

Muyzer, G., Smalla, K. (1998): Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek* 73: 127-141.

Myrold, D.D., Posavatz, N.R. (2007): Potential importance of bacteria and fungi in nitrate assimilation in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 1737-1743.

Nakamura, T., Murakami, T., Saotome, M., Tomita, K., Kitsuya, T. et al. (1991): Identification of indole-3-acetic acid in *Pichia spartinae* an ascosporeogenous yeast from *Spartina alterniflora* marshland environments. *Mycologia* 83: 662-664.

Nakayan, P., Shen, F.T., Hung, M.H., Young, C.C. (2009): Effectiveness of *Pichia* sp. CC1 in decreasing chemical fertilization requirements of garden lettuce in pot experiments. *Asian Journal of Food and Agro-Industry* S66-S68.

Nakayan, P., Hameed, A., Singh, S., Young, L S., Hung, M.H., Young, C.C. (2013): Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. *Plant and Soil* 373: 301-315.

Nasrin, S., Rahman, M.A. (2007): Isolation and characterization of rhizosphere bacteria and their effect on germination of rice seeds and growth of seedlings. *Journal of Bio-Science* 15: 77-82.

Nassar, A., El-Tarabily, K., Sivasithamparam, K. (2005): Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils* 42: 97-108.

Nautiyal, C.S. (1999): An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265-270.

Navarro, F.J., Perdomo, G., Tejera, P., Medina, B., Machin, F., Guillen, R.M., Lancha, A., Siverio, J.M. (2003): The role of nitrate reductase in the regulation of the nitrate assimilation pathway in the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Research* 4: 149-155.

Nešić, I. (2011): Fitoremedijacija i biljke pogodne za fitoremedijaciju voda zagađenih teškim metalima. Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu, Srbija.

Noothalapati, H., Sasaki, T., Kaino, T., Kawamukai, M., Ando, M., Hamaguchi, H., Yamamoto, T. (2016): Label-free chemical imaging of fungal spore walls by Raman microscopy and multivariate curve resolution analysis. *Scientific Reports* 6: 27789 doi:10.1038/srep27789.

Nunes, C., Usall, J., Teixido, N., Vinas, I. (2001): Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology* 70: 53-61.

Nutaratat, P., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P., Limtong, S. (2014): Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. *Fungal Biology* 118: 683-694.

Nutaratat, P., Amsri, W., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P., Limtong, S. (2015): Indole-3-acetic acid production by newly isolated red yeast *Rhodospiridium paludigenum*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 61: 1-9.

Okigbo, R.N., Ikediugwu, F.E.O. (2000): Studies on biological control of postharvest rot in Yams (*Dioscorea* spp.) using *Trichoderma viridae*. *Journal of Phytopathology* 148: 351-355.

Onogi, C., Torii, H., Hamaguchi, H-o. (2009): Raman spectra of isotope-substituted mitochondria of living budding yeast cells: Possible origin of the ‘‘Raman spectroscopic signature of life’’. *Chemistry Letters* 38: 898-899.

Pacia, M.Z., Turnau, K., Baranska, M., Kaczor, A. (2015): Interplay between carotenoids, hemoproteins and the ‘‘life band’’ origin studied in live *Rhodotorula mucilaginosa* cells by means of Raman microimaging. *Analyst* 140: 1809-1813.

Pal, K.K., Gardener, M.B. (2006): Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor doi: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

Palkova, Z., Janderova, B., Zikanova, B., Pospisek, M., Forstova, J. (1997): Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390: 532-536.

Palkova, Z., Forstova, J. (2000): Yeast colonies synchronise their growth and development. *Journal of Cell Science* 113: 1923-1928.

Pan, L.X., Yang, D.F., Shao, L., Li, W., Chen, G.G., Liang, Z.Q. (2009): Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. *Food Technology and Biotechnology* 47: 215-220.

Panikkanvalappil, S.R., Mahmoud, M.A., Mackey, M.A., El-Sayed, M.A. (2013): Surface-enhanced Raman spectroscopy for real-time monitoring of reactive oxygen species-induced DNA damage and its prevention by platinum nanoparticles. *ACS Nano (ACS Publications) - American Chemical Society* 7: 7524-7533

Passoth, V., Schnurer, J. (2003): Non-conventional yeasts in antifungal application. In: de Winde, H. (Eds.), *Functional Genetics of Industrial Yeasts*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 297-330.

Paul, E.A., Clark, F.E. (1996): *Soil Microbiology and Biochemistry (Second Eds.)*. Academic Press, USA.

Peng, L., Wang, G., Liao, W., Yao, H., Huang, S., Li, Y.Q. (2010): Intracellular ethanol accumulation in yeast cells during aerobic fermentation: a Raman spectroscopic exploration. *Letters in Applied Microbiology*, 51: 632-638.

Pepper, I.L., Gerba, C.P., Brendencke, J.W. (1995): *Environmental Microbiology, CA 92101-4495. A Laboratory Manual*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 175.

Perkiomaki, J., Tom-Petersen, A., Nybroe, O., Fritze, H. (2003): Boreal forest microbial community after long-term field exposure to acid and metal pollution and its potential remediation by using wood ash. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 517-526.

Peter, H., Beier, S., Bertilsson, S., Lindstrom, E.S., Langenheder, S., Tranvik, L.S. (2011): Function-specific response to depletion of microbial diversity. *International Society for Microbial Ecology* 5: 351-361.

- Petrović, K.P. (2012): Morphological, molecular and pathogenic characterization of species diaporthe/phomopsis on soybean in Serbia. PhD thesis, Belgrade, Serbia.
- Pettersson, M., Baath, E. (2003): Temperature-dependent changes in the soil bacterial community in limed and unlimed soil. *FEMS Microbiology Ecology* 45: 13-21.
- Phaff, H.J., Miller, M.W., Mrak, E.M. (1966): Ecology, chap VIII. In: Phaff, H.F., Miller, M.W., Mrak, E.M. (Eds.), *The life of yeasts*. Harvard University Press, Cambridge, pp. 93-123.
- Phaff, H., Miller, M.W., Mrak, E.M. (1978): *The life of yeasts*. (Second Eds.). Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Phaff, H J., Starmer, W.T. (1987): Yeasts associated with plants, insects and soil. In: Rose, A.H., Harrison, J.S. (Eds.), *The yeasts*. London, Academic Press, pp. 123-180.
- Prakitchaiwattana, C., Fleet, G., Heard, G. (2004): Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research* 4: 865-877.
- Privredni pregled (1990): Standardne metode za ispitivanje higijenske ispravnosti, Metod P-V-16/A. Beograd, Srbija, str. 330-339.
- Qin, X.J., Xiao, H.M., Liu, L., Gao, J.X., Wang, X., Yang, R. (2013): Effects of *Hanseniaspora uvarum* integrated with salicylic acid or sodium bicarbonate on postharvest decay of grapes. *Advanced Materials Research* 781-784: 1780-1785.
- Quainoo, A.K., Konadu, A., Kumi, M. (2015): The potential of shea nut shells in phytoremediation of heavy metals in contaminated soil using lettuce (*Lactuca sativa*) as a test crop. *Journal of Bioremediation and Biodegradation* 6: 1.
- Rahatgaonkar, A.M., Mahore, N.R. (2008): A selective bioreduction of toxic heavy metal ions from aquatic environment by *Saccharomyces cerevisiae*. *E-Journal of Chemistry* 5: 918-923.
- Raičević, V., Lalević, B., Kljujev, I., Petrović, J. (2010): Ekološka mikrobiologija, WUS Austria MSDP 004/2009, Beograd.

Raspor, P., Mikli-Milek, D., Avbelj, M., Čadež, N. (2010): Biocontrol of grey mould disease on grape caused by *Botrytis cinerea* with autochthonous wine yeasts. *Food Technology and Biotechnology* 48: 336-343.

Raval, A.A., Desai, P.B. (2012): Rhizobacteria from rhizosphere of sunflower (*Helianthus annuus* L.) and their effect on plant growth. *Research Journal of Recent Sciences* 1: 58-61.

Rehman, A., Farooq, H., Shakoori, A.R. (2007): Copper tolerant yeast, *Candida tropicalis*, isolated from industrial effluents: its potential use in wastewater treatment. *Pakistan Journal of Zoology* 39: 405-412.

Reyes, M.E.Q., Rohrbach, K.G., Paull, R.E. (2004): Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 33: 193-203.

Rezende, L.A., Assis, L.C., Nahas, E. (2004): Carbon, nitrogen and phosphorus mineralization in two soils amended with distillery yeast. *Bioresource Technology* 94: 159-167.

Rietz, D.N., Haynes, R.J. (2003): Effects of irrigation induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 845-854.

Ristić, M., Bokić, T., Zečević, T. (2006): Copper accumulation and availability in vineyard soils of Serbia. *Facta Universitatis, Working and Living Environmental Protection* 3: 35-42.

Robertson, G.P., Groffman, P.M. (2015): Nitrogen transformations. In: Paul, E.A. (Fourth Eds.), *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic Press, Burlington, Massachusetts, USA, pp. 421-446.

Rodriguez, S.B., Thornton, M.A., Thorntona, R.J. (2013): Raman spectroscopy and chemometrics for identification and strain discrimination of the wine spoilage yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, and *Brettanomyces bruxellensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 6264-6270.

Romo-Sanchez, S., Alves-Baffi, M., Arevalo-Villena, M., Ubeda-Iranzo, J., Briones-Perez, A. (2010): Yeast biodiversity from oleic ecosystems: Study of their biotechnological properties. *Food Microbiology*, 27: 487-492.

Rosch, P., Harz, M., Schmitt, M., Popp, J. (2005): Raman spectroscopic identification of single yeast cells. *Journal of Raman Spectroscopy* 36: 377-379.

Rosch, P., Harz, M., Peschke, K-D., Ronneberger, O., Burkhardt, H., Popp, J. (2006): Identification of single eukaryotic cells with micro-Raman spectroscopy. *Biopolymers* 82: 312-316.

Rosch, P., Stockel, S., Meisel, S., Munchberg, U., Kloß, S., Kusic, D., Schumacher, W., Popp, J. (2011): A Raman spectroscopic approach for the cultivation-free identification of microbes. A proceedings of SPIE 8311, Optical Sensors and Biophotonics III 83111B: <http://dx.doi.org/10.1117/12.901241>.

Ross, I.S., Parkin, M.J. (1989): Uptake of copper by *Candida utilis*. *Mycological Research* 93: 33-37.

Rousk, J., Baath, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., Knight, R., Fierer, N. (2010): Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal* 1-12.

Saia, S., Rappa, V., Ruisi, P., Abenavoli, M.R., Sunseri, F., Giambalvo, D., Frenda, A.S., Martinelli, F. (2015): Soil inoculation with symbiotic microorganisms promotes plant growth and nutrient transporter genes expression in durum wheat. *Frontiers in Plant Science* 6: 815.

Saharan, B.S., Nehra, V. (2011): Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. *International Journal of Life Science and Medical Research* 21: 1-30.

Saikia, S.P., Jain, V. (2007): Biological nitrogen fixation with non-legumes: An achievable target or a dogma. *Current Science* 92: 10.

Sane, S.A., Mehta, S.K. (2015): Isolation and evaluation of rock phosphate solubilizing fungi as potential bio-fertilizer. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides* 6: 156.

Santos, A., Sanchez, A., Marquina, D. (2004): Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research* 159: 331-338.

Samek, O., Mlynarikova, K., Bernatova, S., Ježek, J., Krzyžanek, V., Šiler, M., Zemanek, P., Ružička, F., Hola, V., Mahelova, M. (2014): *Candida parapsilosis* biofilm identification by Raman spectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences* 15: 23924-23935.

Sampedro, I., Aranda, E., Scervino, J.M., Fracchia, S., Garcia-Romera, I., Ocampo, J.A., Godeas, A. (2004): Improvement by soil yeasts of arbuscular

mycorrhizal symbiosis of soybean (*Glycine max*) colonized by *Glomus mosseae*. Mycorrhiza 14: 229-234.

Sansone, G., Rezza, I., Calvente, V., Benuzzi, D., Tosetti, M.I.S.D. (2005): Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. Postharvest Biology and Technology 35: 245-251.

Sardinha, M., Muller, T., Schmeisky, H., Joergensen, R.G. (2003): Microbial performance in soils along a salinity gradient under acidic conditions. Applied Soil Ecology 23: 237-244.

Schach, D., Großerüschkamp, M., Nowak, C., Knoll, W., Naumann, R.L.C. (2011): Spectro-electrochemical investigation of the bc1 complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* using surface enhanced b-band resonance Raman spectroscopy. In: Cavrak, M. (Eds.), Biomimetic Based Applications. In Tech, Chapter 12.

Scherm, B., Ortu, G., Muzzu, A., Budroni, M., Arras, G., Migheli, Q. (2003): Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. Journal of Plant Pathology 85: 205-213.

Schmitz, C., Goebel, I., Wagner, S., Vomberg, A., Klinner, U. (2000): Competition between n-alkane-assimilating yeasts and bacteria during colonization of sand soil microcosms. Applied Microbiology and Biotechnology 54: 126-132.

Schmitt, M.J., Breinig, F. (2006): Yeast viral killer toxins: Lethality and self-protection. Nature Reviews Microbiology 4: 212-221.

Senwo, Z.N. (1995): Amino acid composition of soil organic matter and nitrogen transformations in soils under different management systems. PhD thesis, Iowa State University, USA.

Serrano, P., Hermelink, A., Lasch, P., de Vera, J-P., König, N., Burckhardt, O., Wagner, D. (2015): Confocal Raman microspectroscopy reveals a convergence of the chemical composition in methanogenic archaea from a Siberian permafrost-affected soil. FEMS Microbiology Ecology 91: doi: <http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiv126>.

Sharma, D.K., Mishra, S. (1992): Fuel Science and Technology International 10: 1601.

Sharma, S., Szele, Z., Schilling, R., Munch, J.C., Schlöter, M. (2006): Influence of freeze-thaw stress on the structure and function of microbial communities and

denitrifying populations in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2148-2154.

Sharma, R. (2012): A brief review on mechanism of *Trichoderma* fungus use as biological control agents. *International Journal of Inovations and Bio-Sciences* 2: 200-210.

Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, T.A. (2013): Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2: 587.

Shimizu, K. (1993): Killer yeasts. In: Fleet, G.H. (Eds.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 243-264.

Siloniz, M., Balsalobre, C., Valderrama, M., Peinado, J. (2002): Feasibility of copper uptake by the yeast *Pichia guilliermondii* isolated from sewage sludge. *Research in Microbiology* 153: 173-180.

Singh, G.P., Volpe, G., Creely, C.M., Grotsch, H., Geli, I.M., Petrov, D. (2006): The lag phase and G1 phase of a single yeast cell monitored by Raman microspectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* 37: 858-864.

Singh, G., Mukerji, K.G. (2006): Root exudates as determinant of rhizospheric microbial biodiversity. In: Mukerji, K.G., Manoharachary, C., Singh, J. (Eds.), *Soil biology, microbial activity in the rhizosphere*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp. 39-53.

Singh, J.S., Pandey, V.C., Singh, D.P. (2011): Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 140: 339-353.

Singh, H., Reddy, M.S. (2011): Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European Journal of Soil Biology* 47: 30-34.

Sipiczki, M. (2006): *Metschnikowia* strains isolated from botrytised grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 6716-6724.

Siripornvisal, S. (2010): Biocontrol efficacy of *Bacillus subtilis* BCB3-19 against tomato gray mold. *KMITL Science and Technology Journal* 10: 37-44.

- Slavikova, E., Vadkertiova, R. (2003): The diversity of yeasts in the agricultural soil. *Journal of Basic Microbiology* 43: 430-436.
- Smith, M.B., Dunklee, D., Vu, H., Woods, G.L. (1999): Comparative performance of the RapID Yeast Plus system and the API 20C AUX clinical yeast system. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 2697-2698.
- Smith, M.G., des Etages, S.G., Snyder, M. (2004): Microbial synergy via an ethanol-triggered pathway. *Molecular and Cellular Biology* 24: 3874-3884.
- Sookchaoy, K., Panthachode, S., Thipchu, J. (2009): Screening of *Trichoderma* spp. for *Phytophthora* root and foot rot on *Citrus sinensis* biocontrol. Intl Conf. on the Role of Universities in Hands-On Education, 23-29 August, Thailand, pp. 356-362.
- Souchie, E.L., Azcon, R., Barea, J.M., Silva, E.M.R., Saggin-Junior, O.J. (2010): Enhancement of clover growth by inoculation of P-solubilizing fungi and arbuscular mycorrhizal fungi. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 82: 771-777.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. (2007): Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews* 31: 425-448.
- Spencer, J.F.T., Spencer, D.M. (1997): Ecology: where yeasts live. In: Spencer, J.F.T., Spencer, D.M. (Eds.), *Yeasts in natural and artificial habitats*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 33-58.
- Spencer, J.F.T., Ragout de Spencer, A.L., Laluce, C. (2002): Non-conventional yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 147-156.
- Stockel, S., Kirchhoff, J., Neugebauer, U., Rosch, P., Popp, J. (2016): The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms. *Journal of Raman Spectroscopy* 47: 89-109.
- Stoll, A. (1996): Bioaccumulation of heavy metals by the yeast *S. cerevisiae* and the bioremediation of industrial waste water. PhD thesis, Rhodes University.
- Strzelczyk, E., Pokojska, A., Kampert, M. (1992): The effect of pH on production of plant growth regulators by mycorrhizal fungi. *Symbiosis* 14: 201-215.
- Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Liua, J. (2015): Responses of yeast biocontrol agents to environmental stress. *Applied and Environmental Microbiology* 81: 2968-2975.

Sun, P-F., Fang, W-T., Shin, L-Y., Wei, J-Y., Fu, S-F., Chou, J-Y. (2014): Indole-3-acetic acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. PLoS ONE 9: doi:10.1371/journal.pone.0114196.

Suprpta, D.N. (2012): Potential of microbial antagonists as biocontrol agents against plant fungal pathogens. ISSAAS-Agricultural Science Researches, Journals, Conventions 18: 1-8.

Susumu, T., Yukiko, T. (2001): PCR primers useful for nucleotide sequencing of rDNA of the powdery mildew fungi. Mycoscience 42: 135-139.

Takisawa, M., Colwell, R.R., Hill, R.T. (1993): Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. Applied and Environmental Microbiology 59: 997-1002.

Tamaki, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Nakamura, K., Nomura, N., Matsumura, M., Kamagata, Y. (2005): Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. Applied Environmental Biology 71: 2162-2169.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution 28: 2731-2739.

Tanghe, A., Prior, B., Thevelein, J.M. (2006): Yeast Responses to Stresses. In: Rosa, C., Gabor, P. (Eds.), Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 175-197.

Tanović, B., Hrustić, J., Mihajlović, M., Grahovac, M., Delibašić, G., Vukša, P. (2011): Suzbijanje *Botrytis cinerea* i problem rezistentnosti na fungicide. Pesticidi i fitomedicina 26: 99-110.

Tedersoo, L., et al. (2014): Fungal biogeography. Global diversity and geography of soil fungi. Science 346: 1078-1087.

Teixeira, D.A., Alfenas, A.C., Mafia, R.G. (2007): Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. Brazilian Journal of Microbiology 38: 1-6.

Tešić, Ž., Todorović, M. (1988): Mikrobiologija. Naučna knjiga, Beograd, Srbija.

Thomas, D.B., McGoverin, C.M. (2016): The analytical niche for Raman spectroscopy in biological pigment research. *Spectroscopy Europe* 28: 6-9.

Tian, S.P., Fan, Q., Xu, Y., Liu, H.B. (2002): Biocontrol efficacy of antagonist yeasts to grey mold and blue mold on apples and pears in controlled atmospheres. *Plant Disease Journal* 86: 848-853.

Tintor, B., Milošević, N., Vasin, J. (2009): Mikrobiološka svojstva černozema Južne Bačke u zavisnosti od načina korišćenja zemljišta. *Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtlarstvo* 46.

Torreggiani, A., Tinti, A. (2010): Raman spectroscopy a promising technique for investigations of metallothioneins. *Metallomics* 2: 246-260.

Torsvik, V., Ovreas, L. (2002): Microbial diversity and function of soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5: 240-245.

Toth, G., Hermann, T., Da Silva, M.R., Montanarella, L. (2016): Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environment International* 88: 299-309.

Trama, B., Fernandes J.D.S., Labuto, G., de Oliveira, J.C.F., Viana-Niero, C., Pascon, R.C., Vallim, M.A. (2014): The evaluation of bioremediation potential of a yeast collection isolated from composting. *Advances in Microbiology* 4: 796-807.

Trivedi, P., Anderson, I.C., Singh, B.K. (2013): Microbial modulators of soil carbon storage: Integrating genomic and metabolic knowledge for global prediction. *Trends in Microbiology* 21: 641-651.

Udofia, G.E., Essien, J.P., Eduok, S.I., Akpan, B.P. (2009): Bioaccumulation of heavy metals by yeasts from Qua Iboe estuary mangrove sediment ecosystem. *Nigeria African Journal of Microbiology Research* 3: 862-869.

Ullah, R., Bakht, J., Shafi, M., Iqbal, M., Khan, A., Saeed, M. (2011): Phytoaccumulation of heavy metals by sunflower (*Helianthus annuus* L.) grown on contaminated soil. *Journal of Biotechnology* 10: 17192-17198.

Urquhart, E.J., Punja, Z.K. (2002): Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by *Tilletiopsis* species, phyllosphere yeasts that are antagonists of powdery mildew fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 219-229.

Vadkertiova, R., Slavikova, E. (2007): Killer activity of yeasts isolated from natural environments against some medically important *Candida* species. Polish Journal of Microbiology 56: 39-43.

Van Elsas, J.D., Jansson, J.K., Trevors, T.J. (2006): Modern soil microbiology. CRC Press Taylor & Francis Group.

Vartoukian, S.R., Palmer, R.M., Wade, W.G. (2010): Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. FEMS Microbiology Letters 309: 1-7.

Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J., Vassilev, N. (2000): Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. Process Biochemistry 35: 693-697.

Vaz, A.B.M., Rosa, L.H., Vieira, M.L.A., de Garcia, V., Brandao, L.R., Lia Teixeira, L.C.R.S., Moline, M., Libkind, D., Maria van Broock, M., Rosa, C.A., (2011): The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. Brazilian Journal of Microbiology 42: 937-947.

Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M., Cortes, A.E., Bashan, Y. (2000): Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi arid coastal lagoon. Biology and Fertility of Soils 30: 460-468.

Vijayaraghavan, K., Yun, Y.S. (2009): Bacterial biosorbents and biosorption. Biotechnology Advances 26: 266-291.

Villegas, L.B., Amoroso, M.J., de Figueroa, L.I.C. (2005): Copper tolerant yeasts isolated from polluted area of Argentina. Journal of Basic Microbiology 45: 381-391.

Vishniac, H.S. (1995): Simulated in situ competitive ability and survival of a representative soil yeasts, *Cryptococcus albidus*. Microbial Ecology 30: 309-320.

Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail S., Boyce, A. (2016): Role of plant growth promoting *Rhizobacteria* in agricultural sustainability-A Review. Molecules 21: 1-17.

Volesky, B., Holan, Z.R. (1995): Biosorption of heavy metals. Biotechnology Progress 11: 235-250.

Vos, C.M., De Cremer, K., Cammue, B.P., De Coninck, B. (2015): The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. *Molecular Plant Pathology* 16: 400-412.

Vreulink, J., Esterhuysen, A., Jacobs, K., Botha, A. (2007): Soil properties that impact yeast and actinomycete numbers in sandy low nutrient soils. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 1369-1374.

Wainwright, M., Grayston, S.J. (1987): Nitrification and sulphur oxidation by *Aspergillus flavus* growing in medium containing reduced nitrogen and sulphur. *Transaction of British Mycological Society* 88: 309-315.

Wali Asal, M.A. (2010): The combined Effect of mineral organic and biofertilizers on the productivity and quality of some wheat cultivars. PhD Thesis, Fac. Agric. Alex. Univ., Egypt.

Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Klironomos, J.N., Setälä, H., Van der Putten, W.H., Wall, D.H. (2004): Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304: 1629-1633.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.

Wichern, J., Wichern, F., Joergensen, R.G. (2006): Impact of salinity on soil microbial communities and the decomposition of maize in acidic soils. *Geoderma* 137: 100-108.

Williams, S.T. (1985): Oligotrophy in soil: fact or fiction. In: Fletcher, M., Floodgate, G.D. (Eds.), *Bacteria in their natural environments*. Academic, London, pp. 81-110.

Willemsen, M., Breynaert, J., Lauwers, S. (1997): Comparison of auxacolor with API 20 C Aux in yeast identification. *Clinical Microbiology and Infection*, 3: 369-375.

Winge, D.R., Sewell, A.K., Yu, W., Thorvaldsen, J.L., Farrell, R. (1998): Metal ion stress in yeast. In: Silver, S., Walden, W., I.T.P. (Eds.), *Metal ions in gene regulation*. Springer US, Chapter 11.

Withnall, R., Chowdhry, B.Z., Silver, J., Edwards, H.G.M., de Oliveira, L.F.C. (2003): Raman spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochimica Acta Part A* 59: 2207-2212.

Wuczowski, M., Prillinger, H. (2004): Molecular identification of yeasts from soils of the alluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria ("Nationalpark Donauauen"). *Microbiological Research* 159: 263-275.

Wood, R.K.S. (1951): The control of diseases of lettuce by use of antagonistic microorganisms. I. the control of *Botrytis cinerea* Pers. *Annals of Applied Biology* 38: 203-216.

Wynn-Williams, D.D. (1982): Simulation of seasonal changes in microbial activity of maritime Antarctic peat. *Soil Biology and Biochemistry* 14: 1-12.

Xie, C., Lia, Y-q. (2003): Confocal micro-Raman spectroscopy of single biological cells using optical trapping and shifted excitation difference techniques. *Journal of Applied Physics* 93: 2982-2986.

Xin, G., Glawe, D., Doty, S.L. (2009): Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid producing yeasts occurring in *Populus* trees. *Mycological Research* 113: 973-980.

Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuo, C., Qin, W. (2015): Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research* 3: 316-323.

Yasmin, S., Alaczar-Fuoli, L., Grundlinger, M., Puempel, T., Cairns, T., Blatzer M., *et al.* (2012): Mevalonate governs interdependency of ergosterol and siderophore biosynthesis in the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: E497-E504.

Yasser, M.M., Mousa, A.S.M., Massoud, O.N., Nasr, S.H. (2014): Solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing fungi isolated from Egyptian soils. *Journal of Biology and Earth Sciences* 4: B83-B90.

Yurkov, A.M., Chernov, I.Y., Tiunov, A.V. (2008): Influence of *Lumbricus terrestris* earthworms on the structure of the yeast community of forest litter. *Microbiology* 77: 107-111.

Zabochnicka-Swiatek, M., Krzywonos, M. (2014): Potentials of biosorption and bioaccumulation processes for heavy metal removal. Polish Journal of Environmental Studies 23: 551-561.

Zaghian, S., Shokri, D., Emtiazi, G. (2012): Co-production of a UV-stable bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) and indole-3-acetic acid hormone (IAA) and their optimization by Taguchi design in *Bacillus pumilus*. Annals of Microbiology 62: 1189-1197.

Zaidi, A., Khan, M.S., Ahmed, M., Oves, M., (2009): Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica Journal 56: 263-284

Zhang, C., Qi, J., Cao, Y. (2014): Synergistic effect of yeast-bacterial co-culture on bioremediation of oil-contaminated soil. Bioremediation Journal 18: 136-146.

Zhang, X., Liu, T., Duan, M., Song, J., Li, X. (2016): De novo transcriptome analysis of *Sinapis alba* in revealing the glucosinolate and phytochelatin pathways. Frontiers in Plant Science 7: 259.

BIOGRAFIJA

Danka S. Radić je rođena 08. 09. 1981. godine u Zemunu. Završila je osnovnu školu u Novim Banovcima, a Medicinsku školu "Beograd", smer farmaceutski tehničar 2000. godine. Diplomirala je 2010. godine na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na odseku za prehrambenu tehnologiju biljnih proizvoda. Osnovne studije je završila sa prosečnom ocenom svih položenih ispita 8,56 i ocenom 10 na diplomskom radu: „Mikroinkapsulacija potencijalnih probiotika tehnikom elektrostatičke ekstruzije“. 2010. godine upisala je doktorske akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu, studijski program Zemljište i melioracije, uža naučna oblast Ekološka mikrobiologija. 2011. godine izabrana u zvanje i na radno mesto istraživač saradnik na Katedri za ekološku mikrobiologiju. Izvodi praktičnu nastavu na predmetima Osnovi mikrobiologije zemljišta i Mikrobiologija.

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

Autor je i koautor dva rada sa ISI liste objavljenih u uglednim inostranim časopisima i preko 10 naučnih radova u međunarodnim i domaćim časopisima sa recenzijom i u zbornicima radova sa međunarodnih i domaćih skupova.

Član je Udruženja mikrobiologa Srbije od 2011.godine.

PRILOG 1

Izjava o autorstvu

Potpisana: Danka S. Radić

Broj indeksa: 10/19

IZJAVLJUJEM

Da je doktorska disertacija pod naslovom **BIODIVERZITET KVASACA U
ZEMLJIŠTU I NJIHOV ZNAČAJ U ODRŽIVOJ POLJOPRIVREDI**

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 09.01.2017. godine

PRILOG 2

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Danka S. Radić

Studijski program: Zemljište i melioracije

Broj indeksa: 10/19

Naslov rada: Biodiverzitet kvasaca u zemljištu i njihov značaj u održivoj poljoprivredi

Mentor: prof. dr Vera Raičević, redovni profesor

Potpisana: Danka Radić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 09.01.2017. godine

PRILOG 3

Izjava o autorstvu

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku “Svetozar Marković” da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom “Biodiverzitet kvasaca u zemljištu i njihov značaj u održivoj poljoprivredi” koja je moje autorsko delo. Disertaciju sa svim priložima sam predala u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje. Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 09.01.2017. godine

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo - nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.