

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Mila D. Pešić

**Identifikacija molekularnih mehanizama
interakcije miskantusa (*Miscanthus ×
giganteus*) i bakterija njegove rizosfere**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Mila D. Pešić

**Identification of the molecular mechanisms
of interactions between *Miscanthus ×
giganteus* and bacteria from its rhizosphere**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

Mentor:

dr Jelena Lozo, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Članovi komisije:

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

dr Tamara Rakić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Željko Dželetović, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu - Institut za primenu nuklearne energije „INEP“

dr Svetlana Radović, redovni profesor u penziji,
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Istraživanja za potrebe ove doktorske disertacije realizovana su na Katedri za biohemiju i molekularnu biologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom prof. dr Jelene Lozo. Deo eksperimenata realizovan je i na Katedri za ekologiju i geografiju biljaka Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu kao i Odeljenju za radioekologiju i agrohemiju Instituta za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu.

Beskonačnu zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Jeleni Lozo, koja je omogućila izradu ove teze i bez koje ništa od svega ne bi bilo moguće. Beskrajno hvala na potpunoj posvećenosti i želji da pomogne i bude tu za sva pitanja i nedoumice. Takođe, hvala na pozitivnim kritikama koje sam dobijala, a koje su doprinele dinamici i kvalitetu celokupnog rada. Hvala za neizmernu podršku i pomoć, usmeravanje i praćenje svakog koraka izrade ove doktorske teze. Hvala za korisne komentare i savete tokom čitavog procesa. Veoma sam zahvalna na neograničenom strpljenju i ukazanom poverenju. Želim da izrazim najiskreniju zahvalnost na izdvojenom vremenu i prenetom stručnom znanju, koje mi je omogućilo da prevaziđem mnoge izazove, za koje sam mislila da su nemogući, i napredujem u profesionalnom, ali i svakom drugom smislu. Smatram da svaki student priželjkuje baš ovakvog mentora.

Ogromnu zahvalnost dugujem prof. dr Slaviši Stankoviću na mogućnosti izrade ove doktorske teze. Hvala na ogromnom ukazanom poverenju i svim mogućnostima i podršci, koji su otvorili put novim iskustvima i izazovima. Hvala na velikoj pomoći tokom celog trajanja doktorskih studija, na korisnim savetima i usmeravanju koje je značajno doprinelo mom profesionalnom razvoju. Hvala na svom uloženom trudu.

Posebno veliku zahvalnost dugujem prof. dr Tamari Rakić na ogromnom doprinosu ovoj tezi, koja bi bez nje bila nemoguća. Hvala na saradnji i pruženoj šansi. Hvala na nesebičnoj pomoći, izuzetno korisnim uputstvima, konstruktivnim savetima i prenetom znanju koje je bilo esencijalno za izradu ove teze, a biće od velike koristi i u daljem toku moje karijere. Hvala na svom uloženom trudu.

Veliku zahvalnost dugujem dr Željku Dželetoviću za preneto stručno znanje i veliku pomoć u eksperimentalnoj izradi teze, bez kog bi ova teza bila bez značajnog svog dela. Boravak u laboratoriji na INEP-u ostao mi je u veoma lepom sećanju. Hvala na svom uloženom trudu.

Zahvaljujem se prof. dr Svetlani Radović na mogućnosti izrade ove doktorske teze, neizmerno korisnim savetima, na velikoj profesionalnoj pomoći i divnom odnosu prema nama doktorandima. Hvala na nesebičnom trudu da podeli svoje znanje i iskustvo, pružajući nam značajnu podršku.

Ovom prilikom zahvaljujem se i svim dragim kolegama, a naročito Nemanji Ristoviću, sa kojima je rad bio neuporedivo lakši i zanimljiviji i od kojih sam dobila dosta praktičnih znanja i iskustava. Hvala na svim konstruktivnim savetima i divnoj saradnji prilikom eksperimentalnog rada u laboratoriji.

Takođe, zahvaljujem se svojoj porodici i prijateljima što su verovali u mene. Posebno hvala mojoj mami Jeleni, koja me podržavala u svim izazovima koje je nosio ovaj proces i kojoj sam se uvek obratila kada sam bila u dilemi, i momku Milanu na strpljenju i podršci kroz sve dobre i loše faze tokom čitavog trajanja doktorskih studija.

Identifikacija molekularnih mehanizama interakcije miskantusa (*Miscanthus × giganteus*) i bakterija njegove rizosfere

Sažetak

Flotaciona jalovina, otpadni proizvod rudarenja, sadrži jako visoke koncentracije metala i predstavlja potencijalni izvor zagađenja okoline. Primena bioenergetskih biljaka u fitoremedijaciji poželjna je zbog dobijanja biomase uz istovremeno očuvanje plodnog zemljišta za poljoprivredne kulture. *Miscanthus × giganteus* u svetu se gaji kao bioenergetska biljka zbog velikih prinosa biomase, niskih zahteva gajenja i otpornosti na različite vrste stresa. U ovom istraživanju, iz rizosfere *M. × giganteus* gajenog na flotacionoj jalovini rudnika Pb/Zn/Cu u centralnoj Srbiji izolovano je 75 bakterijskih izolata, od kojih je šest, *Pseudomonas chlororaphis* Bo, *Bacillus toyonensis* Co, *B. safensis* Do, *Arthrobacter sp.* B21, *B. aryabhatai* B22 i *B. thuringiensis* F4 odabrano za dalji rad. Ovi izolati tolerisali su u različitom stepenu toksične metale, osmotski, toplotni stres ili povišenu koncentraciju soli. Posedavali su osobine kojima ostvaruju direktan stimulatívni efekat na rast biljke. Antimikrobna aktivnost na testirane biljne patogene detektovana je kod svih sojeva. Tretman rizoma *M. × giganteus* odabranim izolatima i gajenje u flotacionoj jalovini, stimulisao je rast i fitoremedijacioni potencijal ove biljke. Analiza transkriptoma pokazala je da 5134 odnosno 4758 gena ima povišenu odnosno sniženu ekspresiju u korenovima *M. × giganteus* biljaka u odgovoru na tretman bakterijama. RT-qPCR analizom potvrđena je povišena ekspresija dva gena: *MATE40* uključenog u izbacivanje toksičnih jedinjenja i u odgovor na stres, kao i *COBRA-like 1* uključenog u regulaciju biosinteze ćelijskog zida i procese rasta i razvoja.

Ključne reči: *Miscanthus × giganteus*, rizobakterije, metali/metaloidi, fitoremedijacija, PGPR, transkriptom, diferencijalno eksprimirani geni

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

Identification of the molecular mechanisms of interactions between *Miscanthus × giganteus* and bacteria from its rhizosphere

Abstract

Flotation tailings, waste products of mining, contain very high concentrations of metals and are a potential source of contamination for the environment. Using bioenergy plants in phytoremediation is desirable approach because of simultaneous biomass production and preservation of fertile land for crops. *Miscanthus × giganteus* is cultivated worldwide as a bioenergy crop due to its high biomass yields, low maintenance requirements, and resistance to various stress factors. In this study, 75 isolates were obtained from the rhizosphere of *M. × giganteus* plants grown on the flotation tailings of a Pb/Zn/Cu mine in central Serbia. Six isolates, including *Pseudomonas chlororaphis* Bo, *Bacillus toyonensis* Co, *B. safensis* Do, *Arthrobacter* sp. B21, *B. aryabhatai* B22, and *B. thuringiensis* F4, were selected for further experiments. These isolates tolerated to a certain extent toxic metals, osmotic, temperature stress or high salt concentration. The isolates possessed properties which allow the direct stimulation of plant growth. Antimicrobial activity against the tested plant pathogens was observed in all strains. Treatment of *M. × giganteus* rhizomes with selected isolates and subsequent cultivation in a flotation tailings substrate stimulated plant growth and phytoremediation potential. Transcriptome analysis showed that 5134 and 4758 genes in the roots of *M. × giganteus* plants had higher and lower expression, respectively, in response to bacterial treatment. RT-qPCR analysis confirmed higher expression of two genes: *MATE40*, involved in extrusion of toxic compounds from a plant cell and in the response to stress, and *COBRA-like 1*, involved in the regulation of cell wall biosynthesis and processes of plant growth and development.

Keywords: *Miscanthus × giganteus*, rhizobacteria, metals/metalloids, phytoremediation, PGPR, transcriptome, differentially expressed genes

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. <i>Miscanthus × giganteus</i>	1
1.2. Remedijacija zemljišta zagađenih toksičnim metalima	2
1.2.1. Fitoremedijacija zemljišta	4
1.3. Usvajanje toksičnih metala i efekat na rast i fiziologiju biljaka	9
1.3.1. Transporteri uključeni u procese usvajanja, detoksifikacije i translokacije metala ..	10
1.4. COBRA-like protein	13
1.5. Bakterije koje promovišu rast biljaka	14
2. CILJEVI RADA	19
3. MATERIJAL I METODE	20
3.1. Izolacija bakterijskih sojeva i medijumi za njihov rast	20
3.2. Biohemijska karakterizacija izolovanih sojeva	21
3.2.1. Testiranje aktivnosti egzoenzima	21
3.2.2. Testiranje sposobnosti rasta u ekstremnim uslovima	21
3.2.3. Testiranje sposobnosti rasta u prisustvu toksičnih metala	21
3.2.4. Određivanje prisustva osobina koje promovišu rast biljaka	22
3.2.5. Testiranje antimikrobne aktivnosti	23
3.2.6. Test pokretljivosti bakterija	23
3.2.7. Određivanje sposobnosti formiranja biofilma	24
3.3. Molekularna identifikacija odabranih izolata	24
3.3.1. Izolovanje genomske DNK	24
3.3.2. Umnožavanje DNK fragmenata lančanom reakcijom polimeraze	25
3.3.4. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu	26
3.4. Tretman rizoma <i>M. × giganteus</i> i ogledi u saksijama	26
3.5. Određivanje parametara rasta <i>M. × giganteus</i>	27
3.6. Određivanje parametara stresa	27
3.6.1. Određivanje relativnog sadržaja vode	27
3.6.2. Određivanje sadržaja vodonik peroksida	28
3.6.3. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije	28
3.6.4. Određivanje sadržaja prolina	28
3.7. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima	29

3.7.1. Priprema enzimskog ekstrakta i određivanje koncentracije proteina	29
3.7.2. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze	30
3.7.3. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze	30
3.7.4. Određivanje aktivnosti peroksidaze	30
3.7.5. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze	30
3.7.6. Određivanje aktivnosti katalaze	31
3.8. Određivanje sadržaja metala u biljnim tkivima	31
3.9. Izolacija ukupne RNK iz biljnog materijala i sekvenciranje	31
3.10. Analiza podataka dobijenih sekvenciranjem RNK	31
3.11. Analiza diferencijalno eksprimiranih gena metodom kvantitativnog PCR-a kome prethodi reverzna transkripcija (RT-qPCR)	32
3.12. Identifikacija <i>MATE</i> i <i>COBRA-like</i> gena	33
3.13. Filogenetska analiza <i>MATE</i> i <i>COBRA-like</i> proteina	33
3.14. Statistička analiza	33
3.15. Analiza glavnih komponenti	34
4. REZULTATI	35
4.1. Izolacija i karakterizacija bakterija za osobine koje promovišu rast biljaka	35
4.1.1. Molekularna identifikacija izolata	36
4.2. Efekat tretmana <i>Miscanthus</i> × <i>giganteus</i> konzorcijumom bakterija izolovanim iz njegove rizosfere	37
4.2.1. Promocija rasta <i>M. × giganteus</i> tretiranog konzorcijumom bakterija	37
4.2.2. Povećanje fitoremedijacionog kapaciteta <i>M. × giganteus</i> tretiranog konzorcijumom bakterija	38
4.2.3. Parametri stresa kod tretiranih i netretiranih biljaka <i>M. × giganteus</i>	42
4.2.4 Aktivnost antioksidativnih enzima kod tretiranih i netretiranih biljaka <i>M. × giganteus</i>	42
4.3. Sekvenciranje transkriptoma i određivanje DEG	43
4.4. Identifikacija <i>MATE</i> i <i>COBRA-like</i> gena u genomu <i>Miscanthus lutarioriparius</i>	47
4.5. Filogenetska analiza <i>MATE</i> i <i>COBRA-like</i> proteina	47
5. DISKUSIJA	50
6. ZAKLJUČCI	57
7. LITERATURA	58
8. PRILOZI	73

1. UVOD

1.1. *Miscanthus* × *giganteus*

Miscanthus je rod višegodišnjih rizomatoznih trava poreklom iz istočne Azije koje se odlikuju visokim rastom, koji može dostići i do 7 m visine, zavisno od vrste i uslova sredine. Životni vek je obično 18-20 godina, a maksimalni prinos biomase ostvaruju u trećoj godini (Wang i sar., 2021a). Prema nekim autorima, rod obuhvata do 20 vrsta. Međutim nakon molekularne filogenetske analize, taj broj je sveden na 11-12 vrsta čiji je bazični broj hromozoma 19, sa tipskom vrstom *M. floridulus* (Hodkinson i sar., 2015). *Miscanthus* × *giganteus* je prirodni triploidni hibrid nastao ukrštanjem diploidnog *M. sinensis* i tetraploidnog *M. sacchariflorus*, i nativan je u subtropskim regionima Afrike i jugoistočne Azije (Mei i sar., 2021). Biljke roda *Miscanthus* mogu se ukrstiti sa drugim članovima *Saccharineae* tribusa, pa su ukršteni sa biljkama roda *Saccharum*, sa idejom poboljšanja karakteristika i adaptiranosti šećerne trske, naročito na niske temperature, pri čemu su nastali hibridi nazvani "miscanes" (Kar i sar., 2020). *M. × giganteus* u svetu se prvenstveno koristi za proizvodnju energije, jer u odnosu na ostale lignocelulozne biljke ima bolji kvalitet biomase sa odličnim sagorevanjem koje je uporedivo sagorevanju šumskog drveća, a takođe, od bioenergetskih biljaka daje najveći energetske prinos po hektaru (Dželetović, 2012). Slama miskantusa pogodna je za briketiranje ili peletiranje. Osim primene u proizvodnji bioenergije, *M. × giganteus* predstavlja veoma zanimljivu sirovinu za proizvodnju papira i kartona, za proizvodnju ekoloških biorazgradivih predmeta, a koristi se i kao građevinski materijal (Dželetović, 2012). Osim toga, zbog dekorativnog izgleda, vrste roda *Miscanthus* koriste se i kao ukrasne biljke za uređenje zelenih površina. Tokom poslednjih decenija, dosta pažnje posvećeno je obnovljivim izvorima energije, između ostalih i bioenergiji kao zameni za fosilna goriva. Vrste roda *Miscanthus* se smatraju dobrom sirovinom za proizvodnju bioenergije zbog velikih prinosa biomase, relativno visoke energetske vrednosti i niskih zahteva za gajenje u smislu primene đubriva i pesticida (Weger i sar., 2021). Donje kalorične vrednosti *M. × giganteus* prema merenjima Cvetković i sar. (2016) kretale su se između 14,9 i 16,1 MJ/kg, dok su se gornje kalorične vrednosti kretale između 16,2 i 17,2 MJ/kg, kada su biljke gajene na zemljištu tipa izluženi černo zem. Lignocelulozne bioenergetske biljke bogate su celulozom, hemicelulozom i ligninom i gaje se prvenstveno za dobijanje toplote, električne energije, biogasa i etanola (Wang i sar., 2021a). Prema Janković i sar. (2023), sastav *M. × giganteus* bio je sledeći: celuloza 53,04%, hemiceluloza 18,10% i lignin 25,24%.

M. × giganteus odlikuje se izvanrednom otpornošću na različite vrste biotičkog i abiotičkog stresa. Iako nije nativan u Evropi, odlično je adaptiran na umerenu klimu, održavajući pritom visok stepen efikasnosti fotosinteze, čak na niskim temperaturama i koji je znatno veći u odnosu na biljke koje, kao i *M. × giganteus*, poseduju isti C4 tip fotosinteze, kao što su *Zea mays* and *Cyperus longus* L. (Farage i sar., 2006). Izlaganjem temperaturi od 14°C, *M. × giganteus* prevazilazi stres tako što povećava sintezu ključnih, ograničavajućih fotosintetičkih enzima (Spence i sar., 2014), ali daljim opadanjem temperature na 10°C, fotoinhibitorna oštećenja izazvana niskim temperaturama sprečavaju se povećanom sintezom deepoksidovanih ksantofila i indukcijom transporta elektrona na druge akceptore umesto na CO₂ (Farage i sar., 2006). Zbog toga *M. × giganteus* postiže veliku produktivnost čak i na suboptimalnim temperaturama, pa stoga ne čudi činjenica da je *M. × giganteus* domestifikovan i gaji se širom sveta, uključujući čak i severne delove Evrope.

S obzirom na to da kao sterilni interspecijski hibrid ne produkuje vijabilno seme, razmnožavanje *M. × giganteus* moguće je samo vegetativnim putem. Ovakav način razmnožavanja predstavlja prednost jer je time sprečena potencijalna invazivnost, koja je uočena kod srodne vrste *M. sinensis*, s obzirom da se radi o vrsti koja nije autohtona na prostoru

Evrope i Amerike. Do sada su upotrebljavana i proučavana dva tipa vegetativnog razmnožavanja kod *M. × giganteus*. Jedan podrazumeva propagiranje rizomima, a drugi mikropropagaciju u kulturi *in vitro*. Faktori od kojih zavisi uspostavljanje kulture *M. × giganteus*, kao i preživljavanje prve zime, su veličina rizoma, dubina sađenja kao i uslovi čuvanja rizoma pre sađenja. Pokazalo se i da je veća biomasa postignuta u prvoj sezoni sađenja značajna zbog veće količine ugljenih hidrata i nutrijenata transportovanih u rizome u kojima se čuvaju tokom zime (Pyter i sar., 2010). *M. × giganteus* važi za lako održiv usev, s obzirom da obezbeđuje višegodišnji zasad, nema velike zahteve za navodnjavanje, đubrenje kao ni kontrolu bolesti i primenu pesticida.

Mada ne postoje jedinstveni kriterijumi za definisanje marginalnih zemljišta, prema nekim procenama, ona zauzimaju 1,8 milijardi hektara na globalnom nivou, što predstavlja oko 21% ukupnih zemljišnih resursa (sa sajta <https://www.fao.org/>) (Kang i sar., 2013). Takođe, postoje procene da rudarske oblasti u celom svetu zauzimaju oko 66000 km² (Tang i Werner, 2023). Kane i sar. (2023) označili su *M. × giganteus* kao „inženjera ekosistema“, odnosno kao vrstu čija aktivnost značajno menja okolinu jer transformiše i menja dostupnost resursa drugim organizmima. Naime, Kane i sar. (2023) pokazali su da je gajenje *M. × giganteus* na marginalnim zemljištima različitog stepena oštećenja doprinelo poboljšanju bioloških i hemijskih karakteristika zemljišta, što se ogledalo u povećanju diverziteta mikroorganizama i biomase, kao i povećanju efikasnosti korišćenja ugljenika, vodeći ka povećanoj akumulaciji organske materije u zemljištu. Promenjena je bila i relativna zastupljenost bakterijskih i fungalnih taksona, u korist onih taksona koji se dovode u vezu sa kruženjem ugljenika u zemljištu i promocijom rasta biljaka.

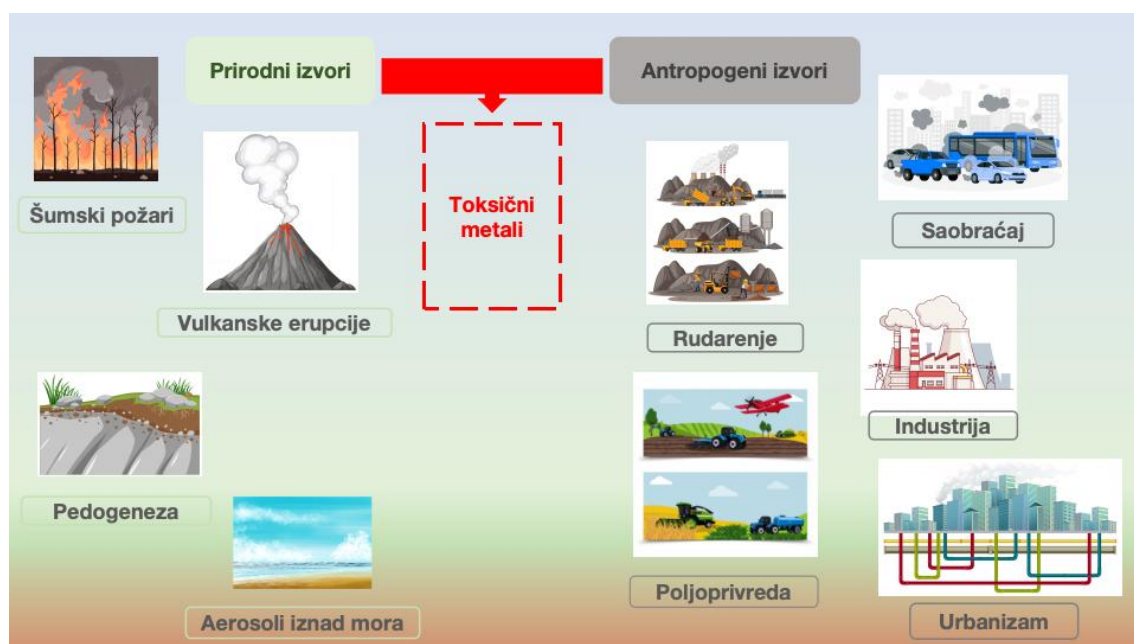
S obzirom na to da je gajenje energetskih biljaka ekološki povoljno, a dvostruka dobit bi se ostvarila korišćenjem marginalnih i degradiranih zemljišta za proizvodnju bioenergije, jer bi se na taj način rasteretilo plodno zemljište za gajenje poljoprivrednih kultura, potencijal *M. × giganteus* da raste u uslovima kontaminacije toksičnim metalima potvrđen je u više studija. Prema Nurzhanova i sar. (2019), *M. × giganteus* se pokazao kao otporan na toksične metale, pri čemu je pokazao sposobnost za njihovu akumulaciju, sa najvećom koncentracijom u korenovima. Na osnovu biokoncentracionog koeficijenta i translokacionog faktora, pokazano je da deluje kao ekskluder za neke, uglavnom jako toksične metale (As, Pb, Co, Ni, Cr, Cu, V, U) dok druge, uglavnom slabije toksične (Mn, Zn, Sr), apsorbuje.

1.2. Remedijacija zemljišta zagađenih toksičnim metalima

Zagađenje metalima predstavlja značajan ekološki i zdravstveni problem zbog njihove stabilnosti, toksičnosti po živi svet i nemogućnosti biodegradacije. Osim toga, metali pokazuju sposobnost akumulacije u tkivima živih organizama, što je označeno kao bioakumulacija, kao i sve veću bioakumulaciju kako se ide ka višim trofičkim nivoima, što je označeno kao biomagnifikacija (Priya i sar., 2023). Prema tome, usvajanje i akumulacija toksičnih metala u biljkama posredno predstavlja opasnost i po zdravlje ljudi. Poreklo metala u zemljištu može biti iz prirodnih ili antropogenih izvora (Slika 1). U prirodne izvore spadaju pedogenetski procesi, vulkanska aktivnost, šumski požari i aerosoli. Razne ljudske aktivnosti, naročito one vezane za industrijsku proizvodnju, rudarenje i poljoprivredne prakse, kao i svakodnevne aktivnosti u urbanim sredinama, kreiraju ogromnu količinu različitog otpada uključujući i otpad koji sadrži toksične metale (Sharma i sar., 2024; Priya i sar., 2023). Sa stalnim porastom svetske populacije, očekivano je da u budućnosti zagađenje životne sredine, vazduha, zemljišta i vode takođe bude u porastu. Povećanje svetske populacije nosi sa sobom i povećanu potrebu za proizvodnjom hrane, što znači da će u budućnosti biti neophodne veće površine za gajenje poljoprivrednih kultura. Zagađena zemljišta nisu pogodna za potrebe proizvodnje ni ljudske ni životinjske hrane, upravo zbog akumulacije metala u tkivima biljaka, tako da je potreba za maksimalno efikasnim

korišćenjem plodnog i nezagađenog zemljišta u poljoprivredne svrhe izazov 21. veka. Istovremeno, napredak civilizacije prati i ogromno povećanje potrebe za proizvodnjom energije kako bi mogla da podrži sve zahteve industrije i modernog načina života.

Nekontrolisana upotreba fosilnih goriva, počev od industrijske revolucije, a naročito tokom 20. veka, iako je imala nemerljiv doprinos razvoju industrije i civilizacije, dovela je do toga da počinjemo da sagledavamo negativne efekte fosilnih goriva na okolinu i zdravlje ljudi. U tom smislu, pojavljuje se ideja za traganjem za ekološki povoljnijim i obnovljivim izvorima energije. Bioenergetski usevi, u koje spada i *Miscanthus* spp., predstavljaju alternativu fosilnim gorivima, a imaju pozitivan efekat na redukciju nivoa ugljen-dioksida, emisiju gasova staklene bašte i eroziju zemljišta. Mogućnost gajenja bioenergetskih useva na marginalnim zemljištima, na kojima se gajenje poljoprivrednih kultura ne preporučuje upravo zbog rizika po zdravlje ljudi i životinja, ili na jako zagađenim zemljištima, na kojima je rast biljaka ekstremno otežan, predstavljalo bi idealan spoj proizvodnje energije i efikasnog upravljanja zemljišnim resursima, jer bi više obradivih površina bilo dostupno za poljoprivredu (Kane i sar., 2023; Mehmood i sar., 2017).



Slika 1. Izvori toksičnih metala u životnoj sredini (Napravljeno pomoću sajta Freepik)

Posebno težak vid destrukcije zemljišta predstavljaju rudnici, odnosno odlagališta flotacione jalovine koje ostaju nakon rudarenja, a koje sadrže izuzetno visoke koncentracije metala. Kako rehabilitacija odlagališta jalovine nakon rudarenja nije bila obavezna u prošlosti, kada bi profit od rudnika prestao da postoji, na tom mestu ostao bi napušten rudnik i jalovište koje je neophodno tretirati. U svetu postoji veliki broj napuštenih rudnika, npr. prema nekim podacima u SAD ima ih više od 200000 (Kubit i sar. 2015). Tang i Werner (2023) su mapirali površine pod rudnicima koristeći satelitske snimke i procenili da zauzimaju površinu od 65585,4 km², od čega se oko 79% tih površina nalazi u 13 zemalja uključujući Kinu, SAD, Rusiju, Australiju, Indoneziju, Južnu Afriku, Ukrajinu, Ganu, Kanadu, Indiju, Brazil, Kazahstan i Čile. S obzirom na to da zemljište predstavlja neobnovljiv resurs, a ima nemerljiv značaj za celokupan život na planeti Zemlji, potrebno je obratiti posebnu pažnju na njegovo očuvanje, odnosno smanjivanje antropogenih izvora zagađenja, ili remedijaciju, ukoliko zagađenje već postoji. Metali prisutni u zemljištu nalaze put i do ljudi, kroz lanac ishrane, koji počinje sa usvajanjem metala od strane biljaka. Zbog toksičnosti, mutagenosti i kancerogenosti predstavljaju značajnu pretnju po zdravlje i njihov nivo u zemljištu i posledično u hrani mora se strogo pratiti i držati u bezbednim granicama.

Tehnologije za remedijaciju zemljišta mogu se podeliti na *in situ* i *ex situ*, zavisno od mesta na kome se remedijacija vrši. Odabir između *in situ* i *ex situ* pristupa zavisi od više faktora uključujući cenu, karakteristike terena, vrstu i koncentraciju zagađivača. Kod *in situ* tehnika dekontaminacija zemljišta obavlja se direktno na mestu na kome zagađenje postoji, dok se kod *ex situ* najpre vrši ekskavacija i transport zemljišta na neku drugu lokaciju, a zatim se na njoj obavlja dekontaminacija. *Ex situ* metode zahtevaju dodatne troškove i napor oko iskopavanja, transporta i zamene iskopanog zemljišta nekim drugim, međutim pružaju mogućnost bolje kontrole uslova u kojima se remedijacija odvija, kao i skraćivanje vremena potrebnog za taj proces. *In situ* i *ex situ* remedijacione metode mogu se podeliti u tri kategorije uključujući fizičke, hemijske i biološke metode (Yadav i sar., 2022). Fizičke metode se zasnivaju na ekskavaciji, transportu i skladištenju zagađenog zemljišta na za to predviđenu lokaciju, odnosno pravljenju fizičke barijere čime se ono izoluje ili primeni visoke temperature kako bi zagađivači isparili odnosno bili imobilisani, ili uklanjanju jona metala električnom adsorpcijom. Ove metode su destruktivne, jer narušavaju fizičku strukturu i biološku aktivnost zemljišta, estetski neprikladne i skupe. Hemijske metode remedijacije zasnivaju se na dodavanju različitih organskih ili neorganskih agenasa kojima se vrši solubilizacija, stabilizacija ili redoks transformacija metala. Problem kod ovih metoda je privremena, ali ne i trajna efikasnost, zatim uvođenje sekundarnog zagađenja i cena (Sánchez-Castro i sar., 2023; Khalid i sar., 2017). Biološke metode remedijacije zasnivaju se na upotrebi biljaka i mikroorganizama (bakterija, gljiva i algi) za prečišćavanje zagađenog zemljišta ili vode, pri čemu se može koristiti živa ili neživa biomasa. Mikroorganizmi koji se koriste u bioremedijaciji mogu biti autohtoni ili alohtoni (Bala i sar., 2022; Vega-Páez i sar., 2019). U bioremedijacione metode ubrajaju se bioventilacija, biobarbortiranje, fitoremedijacija i bioaugmentacija, koje se vrše *in situ*, kao i „land farming”, kompostiranje, bioreaktori i biogomile, koje se vrše *ex situ* (Sharma i sar., 2024).

Biološke metode remedijacije su ekološki i estetski prihvatljivije i jeftinije u odnosu na konvencionalne fizičko-hemijske metode. One ne dovode do narušavanja fizičkih, hemijskih i bioloških svojstava zemljišta i ne zahtevaju tešku mehanizaciju. Generalno, biološke metode mogu se primeniti na većim površinama u odnosu na konvencionalne metode, koje s druge strane mogu biti efektivne za veće površine sa manjim stepenom zagađenja, odnosno za male površine jako zagađenog zemljišta (Sánchez-Castro i sar., 2023; Alori i sar., 2022).

1.2.1. Fitoremedijacija zemljišta

Fitoremedijacija je bioremedijaciona metoda koja se bazira na upotrebi biljaka i asociраних mikroorganizama za ekstrakciju ili smanjenje dostupnosti zagađivača u zemljištu, sa ciljem smanjenja njihovih toksičnih efekata. Različite metode fitoremedijacije se mogu primeniti za različite tipove organske i neorganske kontaminacije, kao i raznolike tipove životne sredine i ekološke faktore koji u njima vladaju. Mnoge biljne vrste su testirane do sada, a odabir zavisi od vrste zagađivača, stepena kontaminacije, ekoloških faktora itd. Puno je faktora od kojih zavisi uspeh fitoremedijacije, a koji nisu do kraja istraženi. Idealan kandidat za fitoremedijaciju je brzo-rastuća, metal-rezistentna biljka, sposobna da produkuje veliku biomasu i ima dobro razvijen korenski sistem, a pritom nije primamljiva kao hrana herbivorima, pri čemu bi se smanjio ulazak metala u lance ishrane. Prema mehanizmu dejstva na kontaminante razlikuju se fitoekstrakcija, fitostabilizacija, rizofiltracija, fito- i rizodegradacija i fitovolatilizacija (Kafle i sar., 2022).

Fitoekstrakcija označava proces u kome biljke apsorbuju toksične metale iz zemljišta, vode ili sedimenata i transportuju ih u nadzemne delove gde ih akumuliraju. Nadzemna biomasa se dobija košenjem, a akumulirani metali se zadržavaju u njoj i na taj način određena frakcija metala se eliminiše iz zemljišta. Ovo je u teoriji najefikasniji način uklanjanja metala iz

zemljišta, međutim u praksi efikasnost zavisi od mnogo faktora uključujući dostupnost, koncentraciju i vrstu metala, karakteristika zemljišta kao i kapacitet biljke da apsorbuje i akumulira metale u nadzemnim delovima. Određene biljne vrste označene su kao hiperakumulatori, zbog sposobnosti da prežive i akumuliraju stotinama ili hiljadama veće koncentracije metala u odnosu na biljke koje nisu hiperakumulatori. Osnovna ideja fitoekstrakcije je dobijanje biomase koja je obogaćena toksičnim metalima i lako se sakuplja jednostavnim košenjem, a koja se zatim odlaže na bezbedno mesto i iz koje se mogu ekstrahovati akumulirani metali (Sharma i sar., 2023). Problem sa hiperakumulatorskim vrstama je što su uglavnom spororastuće i male mase, tako da je apsolutna količina ekstrahovanih metala mala. Biljke koje produkuju veliku biomasu imaju manje izraženu sposobnost akumulacije metala, međutim količina ekstrahovanih metala je, upravo zbog značajne biomase, velika i uporediva sa hiperakumulatorskim vrstama (Yan i sar., 2020). Problem sa fitoekstrakcijom je što su visoke koncentracije metala u nadzemnim delovima jako toksične, a s druge strane prisutna je i ponovna kontaminacija zemljišta opalim listovima u kojima su akumulirani metali, kao i opasnost od ulaska metala u lance ishrane ukoliko herbivori koriste ove biljke u svojoj ishrani.

Fitostabilizacija predstavlja proces stabilizacije metala od strane biljaka tako što se vrši njihova inaktivacija i imobilizacija u zoni rizosfere. Cilj fitostabilizacije je smanjenje dostupnosti metala i sprečavanje njihovog curenja u podzemne vode ili disperzije na veće udaljenosti vetrom. Pozitivan efekat ove vrste fitoremedijacije ogleda se u sprečavanju ulaska metala u lance ishrane čime je njihova toksičnost smanjena. Za razliku od fitoekstrakcionih metoda, dobijenu toksičnu biljnu biomasu nije potrebno posebno odlagati ni tretirati, međutim metali se ne uklanjaju iz supstrata, već se samo privremeno vrši njihova stabilizacija (Yan i sar., 2020). **Rizofiltracija** je metoda u kojoj se koriste biljke koje akumuliraju metale u svojim korenovima, ali ih ne translociraju u nadzemne delove pri čemu su oni zadržani ispod zemlje. Poželjno je da biljke koje se koriste za rizofiltraciju imaju dobro razvijen korenski sistem, imaju sposobnost akumulacije toksičnih metala i nisu teške za manipulaciju (Sabreena i sar., 2022). **Fitovolatizacija** je strategija koja se bazira na procesu evapotranspiracije kada se usvojeni zagađivači transformišu u isparljiva jedinjenja i otpuštaju u atmosferu preko listova. Odabir biljaka sa visokom stopom evapotranspiracije može se primeniti za detoksifikaciju isparljivih organskih jedinjenja i nekih metala poput selena, žive i arsena. Međutim, ovom metodom se ne vrši trajno uklanjanje zagađivača s obzirom da su i dalje prisutni u životnoj sredini, samo su prešli iz zemljišta u gasoviti oblik i nalaze se u atmosferi odakle se mogu ponovo precipitirati u zemljište (Yan i sar., 2020). **Rizodegradacija** predstavlja proces biodegradacije organskih zagađujućih supstanci u rizosferi enzimima produkovanim od strane rizosfernih mikroorganizama. Rizodegradaciju razlikujemo od fitodegradacije koja predstavlja proces degradacije takođe organskih zagađivača, ali enzimima biljaka koje ih preuzimaju korenom. Može se koristiti za prečišćivanje zemljišta, ali i površinskih i dubinskih voda (Sabreena i sar., 2022).

1.2.1.1. Fitoremedijacija potpomognuta mikroorganizmima

Mikrobiom ima esencijalnu ulogu u razviću i preživljavanju biljaka, kroz produkciju fitohormona, solubilizaciju nutrijenata i ublažavanje abiotičkog i biotičkog stresa. Često se koristi izraz „holobiont” kojim se potencira na značaju zajednice biljke domaćina i njenog asociiranog mikrobioma. Uočen je potencijal metal-rezistentnih PGP (eng. „*Plant growth-promoting*”) bakterija da promovišu rast u uslovima kontaminacije metalima, kao i da povećaju fitoremedijacioni potencijal biljaka, što predstavlja jednu od strategija u bioremedijaciji zemljišta sa ovim tipom zagađenja. Naime, toksični metali inhibiraju, ili čak onemogućavaju rast brojnih mikroorganizama koji nisu adaptirani na date uslove. Poznata je i činjenica da metali menjaju strukturu i brojnost mikrobnih populacija u zemljištu, ali i da njihov efekat

zavisi od ostalih faktora prisutnih u zemljištu (Jarosławiecka i Piotrowska-Seget, 2022). Toksični metali predstavljaju jak selekциони pritisak, te su se stoga kod bakterija koje uspevaju da žive u kontaminiranim sredinama, razvili mehanizmi koji im omogućavaju da se adaptiraju na date uslove. Neki od poznatih mehanizama i gena uključenih u rezistenciju na toksične metale kod različitih klasa bakterija obuhvataju: hemijske modifikacije i poznate gene *cue* za Cu i *mer* za Hg, zatim hemijske modifikacije i efluks i poznate gene *ars* za As i Sb, *cop* za Cu i *pco* za Cu, efluks i poznate gene *chr* za Cr, *cnr* za Co i Ni, *cus* za Ag i Cu, *czc* Cd, Co i Zn, *czt* za Co i Zn, *ncc* za Ni, Co i Cd, *sil* za Ag, *tcr* za Cu i *znt* za Zn i efluks i sekvencijaciju i poznate gene *pbr* za Pb (Gillieatt i Coleman, 2024). U tom smislu, kandidati su često traženi među nativnom populacijom asociiranih rizosfernih mikroorganizama biljaka koje rastu u takvim uslovima. Međutim, još jedan od otežavajućih faktora u primeni bakterija u tehnikama fitoremedijacije je i podatak da se veliki broj metal-rezistentnih vrsta, čija je DNK detektovana prilikom analize ukupne DNK prisutne u metalima opterećenom zemljištu, ne može izolovati i gajiti u laboratorijskim uslovima, te stoga se ne može koristiti ni kao inokulant (Jarosławiecka i Piotrowska-Seget, 2022).

Bakterije mogu poboljšati fitoremedijacioni potencijal biljaka kroz povećanje biodostupnosti metala i apsorpcije od strane biljaka, kao i stimulacijom rasta i povećanjem biomase i dužine i površine korena, i samim tim doprineti količini usvojenih metala. Osim toga, pomažu biljkama smanjivanjem ispoljavanja efekata fitotoksičnosti izazvanim toksičnim metalima, omogućavajući opet bolji rast i preživljavanje u teškim uslovima, kao što je kontaminacija metalima (Khanna i sar., 2019). Rizobakterije mogu imati dva suprotna efekta na usvajanje metala od strane biljaka, zavisno od toga da li dovode do povećanja odnosno smanjenja biodostupnosti metala. Ukoliko dovode do povećanja dostupnosti metala, rezultat će biti povećana apsorpcija metala od strane biljaka (Abou-Shanab i sar., 2008; Ma i sar., 2009), veća akumulacija u biljnim tkivima i samim tim veća toksičnost metala, s obzirom da je toksičnost uslovljena ne samo ukupnom koncentracijom metala u zemljištu već i koncentracijom dostupnih formi. Ukoliko dovode do smanjenja dostupnosti metala, rezultat će biti smanjena apsorpcija metala od strane biljaka, smanjena akumulacija u biljnim tkivima i redukcija toksičnosti metala (Awan i sar., 2020; Mitra i sar., 2018).

Mobilnost i solubilnost metala značajno uslovljavaju efikasnost njihove ekstrakcije od strane biljaka. Bakterije mogu povećati mobilnost, odnosno izvršiti mobilizaciju metala, kroz sekreciju organskih kiselina, biosurfaktanata ili siderofora, ili kroz proces biometilacije metala koji dovodi do njihove volatizacije (Wang i sar., 2022). Mobilizacijom metala, bakterije čine metale dostupnijim i time podstiču procese fitoekstrakcije i akumulacije metala u biljnim tkivima. Organske kiseline male molekulske mase, kao što su npr. oksalna, limunska, sirćetna, mravlja i druge, proizvode kako bakterije tako i korenovi biljaka. U zemljištu su prisutne u koncentracijama od 0,01 do 5 mM. Povećavaju mobilnost metala snižavanjem pH vrednosti zemljišta i formiranjem kompleksa sa metalima (Schwab i sar., 2008). Zhang i sar. (2022a) pokazali su da *B. wiedmannii* FSL W8-0169 izolovan iz rizosfere biljke *Solanum nigrum*, hiperakumulatora Cd, stimuliše rast ove biljke u uslovima povišene koncentracije Cd, smanjuje nivo oksidativnog stresa, ali takođe dovodi do veće akumulacije Cd u korenovima. Ova bakterija proizvodi siderofore, organske kiseline i ima sposobnost fiksacije azota, ali ne proizvodi indol-3-sirćetnu kiselinu, ne solubilizuje fosfate i nema 1-aminociklopropan karboksilat deaminaznu aktivnost. Povećano usvajanje i akumulacija Cd u korenovima je rezultat veće produkcije organskih kiselina od strane ovog soja, a koja je pod uticajem Cd. Takođe, komparativna genomika u odnosu na srodne vrste, pokazala je da su transpozabilni elementi imali važnu ulogu u adaptaciji ove bakterije na preživljavanje u uslovima zagađenja metalima, što je u saglasnosti sa idejom da na kontaminiranim staništima treba tražiti bakterijske kandidate za primenu u fitoremedijaciji.

Biosurfaktanti produkovani od strane mikroorganizama, mogu se podeliti u dva tipa: biosurfaktante male molekulske mase, u koje spadaju glikolipidi i lipopeptidi, i biosurfaktante velike molekulske mase, u koje spadaju polisaharidi i lipoproteini (Carolin i sar., 2021). Biosurfaktanti su amfifilične supstance koje imaju hidrofilni i hidrofobni kraj i samim tim mogu da adsorbuju između dve faze različite polarnosti. Biosurfaktanti su površinski aktivne supstance koje se ekskretuju ekstracelularno i redukuju površinski napon. Mogu se primeniti u bioremedijaciji zbog svojstava da solubilizuju i povećavaju dostupnost hidrofobnih zagađivača, kao i da formiraju micele i grade komplekse sa metalnim jonima unutar njih, tako da kao rezultat imaju desorpciju metala sa zemljišnog matriksa i njihovu solubilizaciju i povećanje biodostupnosti (Eras-Muñoz i sar., 2022; Etesami, 2018). Dva bakterijska roda kod kojih je najviše izučavana produkcija biosurfaktanata su *Pseudomonas* i *Bacillus* (Antonioli Júnior i sar., 2022). Prema podacima iz literature, lipopeptidi, ramnolipidi i softrolipidi imaju najveći potencijal primene u bioremedijaciji (Eras-Muñoz i sar., 2022). Vrste roda *Bacillus* odlikuje produkcija raznih klasa lipopeptida, uključujući surfaktin, lihenisin, fengicin, iturin, kurstakin, bacilomicin D, pumilacidin, dok vrste roda *Pseudomonas* produkuju pseudofaktin II, amfizin, siringafaktin, viskosin (Carolin i sar., 2021). Siderofore mogu biti jako korisno sredstvo u fitoremedijaciji, s obzirom na to da mogu graditi komplekse sa raznim metalima uključujući Ag^+ , Al^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} , Cu^{2+} , Eu^{3+} , Ga^{3+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Tb^{3+} , Tl^+ i Zn^{2+} , a sa često većim afinitetom nego sa gvožđem, pri čemu povećavaju njihovu mobilnost (Ahmed i Holmström, 2014). Neke bakterije imaju enzime koji mogu vršiti metilaciju metala poput As, Hg, Pb ili Cd, dovodeći pritom do njihove volatizacije, što predstavlja način detoksifikacije metala u zemljištu, mada se oni sada nalaze u isparljivom obliku u atmosferi (Pongratz i Heumann, 1999; Zhang i sar., 2015).

S druge strane, bakterije takođe mogu vršiti stabilizaciju metala i time smanjiti njihovu dostupnost u zemljištu i samim tim i adsorpciju i akumulaciju u biljnim tkivima. Mehanizmi kojima se smanjuje dostupnost metala obuhvataju imobilizaciju na negativno naelektrisanim funkcionalnim grupama koje se nalaze na površini bakterijske ćelije (karboksilna, hidroksilna, sulfonatna, aminska i amidna), zatim precipitaciju metala (fosfatna precipitacija, karbonatna precipitacija, precipitacija neorganskim kiselinama produkovanim od strane bakterija), alkalizaciju i procese formiranja kompleksa sa metalima (ekstracelularne polimerne supstance (EPS) formiraju komplekse sa metalima) (Wang i sar., 2022). Bakterije koje solubilizuju fosfate mogu imobilisati metale, tako što nastaju stabilni fosfatni minerali, pa tako dejstvom soja *Leclercia adecarboxylata* koji solubilizuje fosfate, olovo je imobilisano u neorganske fosfate kao što su olovo hidroksiapatit i piromorfit (Teng i sar., 2019). Ekstracelularne polimerne supstance su gelozne supstance koje se produkuju na površini bakterijskih ćelija i sastoje se od polisaharida, proteina, nukleinskih kiselina i lipida. Imaju sposobnost da zadrže metale kroz elektrostatičke i hidrofobne interakcije koje ostvaruju sa njima (Hou i sar., 2013). Takođe, vezuju metalne sulfide i okside i sa njima formiraju organske metalne komplekse (Etesami, 2018).

Bakterije mogu vršiti biotransformaciju metala i organskih jedinjenja prevodeći ih pritom u manje opasnu formu. Kroz reakcije oksido-redukcije ili metilacije bakterije menjaju oblik metala i njihovu toksičnost i mobilnost. Primer za biotransformaciju metala od strane bakterija su hrom, kadmijum i živa. Cr (VI) je mobilan i izuzetno toksičan, a usvaja se kroz sulfatne transportere, zbog strukturne sličnosti CrO_4^{2-} sa SO_4^{2-} . Cr (III) je manje toksičan i manje mobilan, a ćelijska membrana je nepermeabilna za njega. Na pH vrednostima iznad 5,5 gradi nesolubilne hidrokside/okside (Thatoi i sar., 2014). Neke bakterije poseduju enzime koji mogu vršiti aerobnu odnosno anaerobnu redukciju Cr (VI). Aerobna redukcija Cr (VI) je vezana za solubilne proteine i uglavnom koristi NAD(P)H kao elektron-donora, dok anaerobna podrazumeva učešće membranske hromat reduktazne aktivnosti pomoću komponenti poput flavin reduktaza, citohroma i hidrogenaza koje mogu biti deo elektron transportnog lanca i koristiti hromat kao terminalnog akceptora elektrona (Thatoi i sar., 2014). Soj *Pseudomonas*

chengduensis MBR formira biofilm na koji se adsorbuje Cd (II), a zatim redukuje u Cd (0) i detektuje u obliku guste mase nanočestica prisutnih na površini biofilma (Wang i sar., 2020). Bakterije učestvuju u biotransformacijama žive, uključujući procese metilacije i demetilacije i oksidacije i redukcije, pomoću različitih enzima. Bakterije utiču na dostupnost, ali i toksičnost žive, s obzirom da se dejstvom mikroorganizama dobijaju npr. metilovane forme koje su mnogo toksičnije od jona ili se pak redukcijom Hg (II) dobija manje toksična, isparljiva forma Hg (0). Gen za enzim Hg (II) reduktazu, koji redukuje Hg (II) u Hg (0), nalazi se u *mer* operonu i prisutan je kod nekih bakterija. Jedan od pristupa u fitoremedijaciji podrazumeva kreiranje transgenih biljaka sa željenim fenotipom. Upravo je i gen iz *mer* operona testiran od strane Sone i sar. (2017) kada su kreirali transgenu biljku *Arabidopsis thaliana* koja konstitutivno i pod kontrolom promotora gena za ubikvitin ekspirira bakterijski MerC ili MerC koji je fuzionisan sa biljnim SNARE proteinom (engl. „*N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*“) i pokazali da akumulira više žive nego biljke divljeg tipa kada su izložene neorganskoj ili metil-živi, dok je rast bio približno sličan. Fuzija MerC sa SNARE (SYP121) proteinom obezbedila je lokalizaciju transportera MerC u plazma membrani, dok je bez nje on uglavnom bio lokalizovan u endoplazmatičnom retikulumu i frakcijama Goldžijevog aparata. Ista grupa pokazala je i da je ektopična ekspresija MerC-SYP121 u epidermisu korena pod kontrolom promotora specifičnog za epidermalne ćelije korena dovoljna za povećanu akumulaciju Hg u odnosu na biljke divljeg tipa (Uraguchi i sar., 2019). Osim Hg, ekspresija Mer-SYP121 u *A. thaliana* doprinosi povećanoj akumulaciji i Cd (Kiyono i sar., 2012).

Bioakumulacija i biosorpcija metala od strane bakterija predstavljaju mehanizme detoksifikacije metala, jer na taj način redukuju njihovu toksičnost. Biosorpcija ne zahteva energiju i predstavlja pasivnu imobilizaciju metala adherencijom na površinu ćelija. Biološki adsorbenti (biosorbenti), koji mogu biti žive ili mrtve ćelije bakterija, gljiva ili algi, uklanjaju toksične metale iz kontaminiranog medijuma, a čitav proces zavisi i od spoljašnjih faktora poput temperature, pH, količine biomase, koncentracije metala, dužine kontakta, ali i tipa metala i tipa biomase (živa/neživa). Odvija se kroz formiranje koordinacionih kompleksa, fizičku adsorpciju, helaciju, izmenu jona i neorgansku precipitaciju od strane konstituenata ćelijskog zida, uglavnom karboksilne, hidrokisilne, fosfatne i sulfhidrilne grupe (Hassan i sar., 2010). Meta-analiza brojnih istaživanja na temu biosorpcije metala od strane bakterija, urađena je od strane Fathollahi i sar. (2021). Uočeno je da je efikasnost biosorpcije od strane bakterijskih sojeva ide sledećim redom: Cd(II) > Cr(III) > Pb(II) > Zn(II) > Cu(II) > Ni(II) > Mn(II). Različiti bakterijski filumi imaju različite sposobnosti biosorpcije, a pokazalo se da od tri analizirana filuma Firmicutes, Proteobacteria i Actinobacteria, generalno najefikasnije su Firmicutes, ako se posmatra i živa i mrtva biomasa. Građa ćelijskog zida značajno utiče na sposobnost biosorpcije, koja je generalno veća kod Gram pozitivnih, zahvaljujući strukturi ćelijskog zida. Zbog toga, mrtva biomasa Proteobacteria ima manju sposobnost biosorpcije od žive biomase, dok to nije primećeno kod Firmicutes. Najveća efikasnost biosorpcije kod sva tri filuma je na blago kiselom pH, dok visoka temperatura smanjuje efikasnost biosorpcije esencijalnih Cu(II) i Zn(II), a povećava efikasnost za neesencijalne Cd(II) i Cr(III). Najveća efikasnost biosorpcije neesencijalnih metala je pri kratkom vremenu kontakta (2h), dok je za esencijalne pri dužem vremenu kontakta (>24h). Efikasnost biosorpcije je manja na većim inicijalnim koncentracijama metala, a sa povećanjem količine biomase, efikasnost raste do određene granice (Fathollahi i sar., 2021). Biosorpcija raznih metala, uključujući Ni, Cd, Cr, Pb, Cu, Hg, As pokazana je između ostalih, i kod nekih vrsta *Bacillus* sp., među kojima i *B. cereus* i *B. thuringiensis* (Chen i sar., 2015; Huang i sar., 2013; Dong i sar., 2013).

Za razliku od biosorpcije, bioakumulacija predstavlja aktivan proces, pri čemu se metali usvajaju pomoću transportnih proteina i akumuliraju unutar bakterijske ćelije. Primenom bakterija sa sposobnošću bioakumulacije ili biosorpcije, mogla bi se smanjiti količina metala dostupna za usvajanje od strane biljaka, s obzirom da bi se oni nalazili ili vezani za površinu ili unutar bakterijske ćelije. U istraživanju Mitra i sar. (2018), *Enterococcus* sp. je za 72h rasta

uklonio preko 95% Cd prisutnog u medijumu i akumulirao ga unutar ćelije, što je uočeno kao elektron-guste granule unutar bakterijskih ćelija na transmisionom elektronskom mikroskopu. Inokulacija semena pirinča ovim sojem i gajenje u zemljištu zagađenom kadmijumom, imala je za rezultat smanjeno usvajanje i akumulaciju Cd u biljkama, upravo zbog sekvestracije Cd od strane ovog soja, i bolji rast klijanaca zbog smanjene izloženosti Cd, i ublažavanja simptoma fitotoksičnosti.

1.3. Usvajanje toksičnih metala i efekat na rast i fiziologiju biljaka

Izloženost toksičnim metalima dovodi do niza štetnih efekata na biljku, kao što su inhibicija klijanja semena, rastežnja i razvića, ometanje usvajanja nutrijenata, oksidativni stres, oštećenje ćelijskih struktura i ukoliko se radi o ekstremnoj dozi toksičnih metala, sa kojom biljka ne može da se izbori, dovode i do smrti biljke. Metali se mogu akumulirati u različitim biljnim tkivima u kojima interferiraju sa esencijalnim procesima metabolizma i fotosinteze. Toksične metale čine prelazni metali i metaloidi sa atomskom gustinom većom od 4 g/cm^3 . Prema ulozi koju ostvaruju u biološkim sistemima mogu se podeliti na esencijalne i neesencijalne. Esencijalni elementi, poput bakra, cinka, kobalta, gvožđa, mangana, molibdena i selen, imaju funkciju u redoks procesima, stabilizaciji molekula putem elektrostatičkih interakcija, enzimskih kofaktora i osmoregulatora, i potrebni su u malim količinama za normalno funkcionisanje ćelije. Neesencijalni elementi poput arsena, kadmijuma, žive, olova, plutonijuma, antimona, vanadijuma i tungstena nemaju poznatu ulogu u ćeliji, a osim toga karakteriše ih izuzetna toksičnost čak i pri jako niskim koncentracijama zbog čega ostvaruju niz fitotoksičnih efekata na biljku. Zbog velike reaktivnosti, i esencijalni i neesencijalni elementi, postaju štetni kada su prisutni u koncentracijama iznad praga tolerancije biljke. Prag tolerancije varira kod različitih biljaka, a granične koncentracije u zemljištu je nekada teško sa sigurnošću utvrditi jer zavise od dostupnosti metala, a ne samo od ukupne koncentracije. Organizmi koji žive u zemljištu pogođeni su samo biodostupnom frakcijom metala, a ne frakcijom koja se nalazi vezana za zemljišni matriks, te prema tome nije dostupna za usvajanje. Dostupnost metala zavisi od svojstava zemljišta uključujući pH, redoks potencijal, teksturu, količinu organske materije ali i prisustva biljnih vrsta i korenskih eksudata, kao i svojstava samog metala. Međutim, biodostupnost treba posmatrati kao dinamičan proces koji ima tri komponente: 1) sredinsku dostupnost - obuhvata totalnu koncentraciju metala u zemljištu, uključujući i dostupne i potencijalno dostupne frakcije, koje mogu postati dostupne desorpcijom iz zemljišnog matriksa kroz fizičko-hemijski kontrolisane procese desorpcije; 2) sredinsku biodostupnost koja predstavlja količinu metala rastvorenog u vodi koja se nalazi u porama zemljišta i koji mogu usvojiti biljke i drugi zemljišni organizmi; 3) toksikološku biodostupnost koja može izazvati fiziološki indukovane procese bioakumulacije (Kim i sar., 2015). Prava koncentracija dostupne frakcije metala ne uključuje samo rastvorene vrste već i one koje se nalaze u kompleksu sa rastvorenom organskom materijom ili neorganskim jonima (Cl^- , OH^- , SO_4^{2-} , HCO_3^-), naročito u blago kiselim do alkalnim uslovima (Kim i sar., 2015). Uobičajeni simptomi toksičnosti metala su hloroza, inhibicija rasta i smanjena biomasa, smanjena stopa fotosinteze i poremećena asimilacija nutrijenata. Ukoliko je toksičnost tolika da prevazilazi sposobnost biljke da popravi nastala oštećenja, na kraju dolazi do smrti biljke.

Reaktivne kiseonične vrste (eng. „*reactive oxygene species*“ ROS) nastaju u aerobnim uslovima i kao nusproizvodi metaboličkih puteva u organelama sa izraženim oksidativnim metabolizmom poput hloroplasta, mitohondija i peroksizoma. Pojava kiseonika u atmosferi omogućila je nastanak respiratornog metabolizma i efikasne sisteme za dobijanje energije koji koriste O_2 kao krajnjeg akceptora elektrona, ali negativna posledica je rizik od oksidativnog oštećenja. Mada je molekul O_2 nereaktivan, od njega mogu nastati ROS, koji imaju potencijal da oštete biomakromolekule i izazovu smrt ćelije. Redukcijom kiseonika jednim elektronom nastaje superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Na niskoj pH, dešava se dismutacija superoksidnog radikala,

koji predaje dodati elektron drugom superoksidnom radikalima i uz protonaciju daje vodonik peroksid (H_2O_2). Superoksidni radikal može biti samo protonovan pri čemu nastaje perhidroksilni radikal ($HO_2\bullet$). U prisustvu metala poput bakra ili gvožđa, kroz Fentonovu reakciju Haber-Weiss mehanizmom nastaje najreaktivnija vrsta u biološkim sistemima, hidroksilni radikal ($OH\bullet$). Singletni kiseonik (1O_2) se formira nakon fotoekscitacije hlorofila i njegove reakcije sa O_2 (Gill i Tuteja, 2010).

Kada su biljke izložene nepovoljnim uslovima sredine, različitim oblicima abiotičkog stresa poput visoke temperature, suši, nedostatku nutrijenata, povišenom salinitetu, metala i drugih zagađivača, dolazi do stvaranja ROS. Toksični metali izazivaju niz negativnih efekata na biljke, uključujući inhibiciju fotosinteze usled oštećenja na fotosintetskom aparatu, zatim inhibiciju fotosistema II (PSII) kao i opadanje nivoa fotosintetskih pigmenta hlorofila *a* i *b* i karotenoida. Akumulacija sekundarnih metabolita (flavonoidi, antocijanini, tanini, lignini, fenolne kiseline i drugi), kao i aktivacija enzimskih i neenzimskih antioksidanasa javljaju se kao odgovor na povišeni nivo ROS koji se javlja nakon izlaganja toksičnim elementima (Al Souki i sar., 2021). Kada nivo ROS premaši odbrambene mehanizme, za ćeliju se kaže da je u stanju oksidativnog stresa. Povišen nivo ROS može dovesti do peroksidacije lipida, oksidacije proteina, inhibicije enzima, oštećenja na molekulima nukleinskih kiselina, aktivacije programirane ćelijske smrti i na kraju do smrti biljke (Sharma i sar., 2012). Metali imaju citotoksično i genotoksično dejstvo na biljke, ali i druge organizme. Glavne karakteristike koje su zaslužne za njihovu toksičnost su: visok afinitet za negativno naelektrisane grupe u ćeliji poput sulfhidrilnih, fosfatnih i hidroksilnih, zatim dovode do pojačane produkcije ROS koji izazivaju oksidativni stres, u kompeticiji su za usvajanje esencijalnih jona pri čemu dovode do disbalansa jona i poremećaja osmotske regulacije (Barra Caracciolo i Terenzi, 2021).

Biljke su tokom evolucije razvile brojne mehanizme koji im omogućavaju usvajanje nutrijenata iz zemljišta, čak i kada su oni prisutni u minimalnim koncentracijama, transport i čuvanje u različitim ćelijskim strukturama. Usvajanje metala iz zemljišta predstavlja kompleksan proces u kome su uključeni brojni proteini i jedinjenja sa različitim funkcijama koji su lokalizovani u različitim ćelijskim delovima. Glavni koraci u procesu akumulacije metala su mobilizacija metala, usvajanje iz zemljišta, skladištenje u odgovarajućim delovima biljne ćelije i sekvenciranje, ulazak u ksilem, transport u nadzemne delove i čuvanje u ćelijama listova. Biodostupni metali mogu se kretati kroz korenov sistem biljke kroz intercelularne prostore apoplastom ili prolazeći kroz ćelije – simplastom. Inicijalna barijera za translokaciju je ćelijski zid ćelija korena, koji je i prva struktura koja dolazi u kontakt sa metalima u zemljištu. Na njemu se većina metalnih jona adsorbuje, jer se zahvaljujući pozitivnom naelektrisanju, vezuju za negativno naelektrisane funkcionalne grupe konstituenata ćelijskog zida kao što su karboksilna, hidroksilna i fosfatna grupa. Osim toga, korenovi sekretuju razne korenske eksudate, u koje spadaju jedinjenja male molekulske mase (aminokiseline, šećeri, fenoli) i jedinjenja velike molekulske mase (proteini i polisaharidi), koji heliraju metale u zemljišnom matriksu i onemogućavaju njihovo usvajanje. Prema tome, kretanje metala kroz apoplast je moguće samo ako se nalaze u obliku nekatjonskih metalnih helata. Ulazak metala iz apoplasta korena u ksilem korena je takođe sprečen zahvaljujući postojanju nepermeabilnog suberinog sloja u ćelijskim zidovima endoderma (Pasricha i sar., 2021).

1.3.1. Transporteri uključeni u procese usvajanja, detoksifikacije i translokacije metala

S obzirom na to da je potencijalna šteta uzrokovana toksičnim metalima u ćeliji velika, biljke su razvile različite mehanizme za njihovo usvajanje i održavanje njihovih koncentracija u strogo definisanim granicama. Generalno, tolerancija biljaka prema metalima bazira se na mehanizmima kojima se izbegava usvajanje metala, odnosno mehanizmima neutralizacije ukoliko se metali usvoje. Razlika između hiperakumulatora i biljaka koje to nisu ogleda se u

većoj apsorpciji metala iz podloge, zatim efikasnijoj translokaciji iz korena u nadzemne delove i izraženoj sposobnosti akumulacije toksičnih metala u listovima. Mehanizmi koje su ove vrste razvile, a koji su uključeni u detoksifikaciju metala uključuju heliranje i sekvestraciju metala, transport iz citoplazme i čuvanje u manje aktivnim odeljcima (vakuole, lisne petiole, trihomi). (Memon i Merakli, 2023; Sabreena i sar., 2022). Prihvaćeni kriterijumi za definisanje neke biljke kao hiperakumulatora su: > 100 µg/g za kadmijum, talijum i selen, > 300 µg/g kobalta, bakra i hroma, > 1 000 µg/g nikla, arsena, olova i retkih zemnih elemenata, > 3 000 µg/g cinka ili > 10 000 µg/g mangana po suvoj masi lista, kada rastu u svom prirodnom staništu. Još jedan od kriterijuma, pored navedenih, je i odnos koncentracije metala u nadzemnom i podzemnom delu, kada je veći od 1 ukazuje na sposobnost efikasne translokacije metala iz korena u nadzemni deo biljke. Razvoj genomike omogućio je otkriće brojnih gena za metalotransportere i njihovu identifikaciju. Uopšteni pristup je da se funkcije metalotransportera mogu podeliti u dve grupe koje podrazumevaju transportere uključene u usvajanje metala poput ZIP (eng. „*Zinc-regulated, Iron-regulated transporter-like proteins*”), NRAMP (eng. „*Natural resistance-associated macrophage protein*“) i YSL (eng. „*Yellow stripe-like*“) proteina, odnosno transportere sa funkcijom efluksa metala kakvi su CDF (eng. „*Cation diffusion facilitators*“) i HMA (eng. „*Heavy metal ATPase*“) proteini (Liu i sar., 2022).

ZIP transporteri (eng. „*Zinc-regulated, Iron-regulated transporter-like proteins*“) predstavljaju familiju proteina prisutnih kod prokariota, arhea i eukariota. Imaju esencijalnu ulogu u usvajanju i održavanju homeostaze cinka, ali osim cinka imaju ulogu u održavanju homeostaze drugih metala kod biljaka. Osim Zn^{2+} , mogu transportovati i druge dvovalentne katjone Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} i Ni^{2+} . IRT (engl. „*Iron-regulated transporters*“) su važni transporteri gvožđa i članovi ZIP familije transportera. Osim Fe^{2+} , mogu transportovati i jone Zn^{2+} , Mn^{2+} i Cd^{2+} (Ajeesh Krishna i sar., 2020). Članovi ove familije transportera pokazuju različit obrazac ekspresije u listovima i korenovima biljke *Poncirus trifoliata* L. Raf. u zavisnosti od dostupnosti Zn, Mn ili Fe (Fu i sar., 2017). Kod biljaka roda *Miscanthus* nije poznat ni broj ni način regulacije ekspresije ovih gena.

NRAMP familija proteina (eng. „*Natural resistance-associated macrophage protein*“) predstavlja konzervisanu familiju voltažno-zavisnih sekundarnih transportera koji za transport koriste protonski gradijent. Prisutni su kod svih organizama i verovatno su bili prisutni kod zajedničkog pretka. Podeljeni su u nekoliko evolutivnih klada, a divergirali pre pojave eukariota. NRAMP proteine biljaka odlikuje evolutivna konzerviranost i funkcionalna redundantnost (Liu i sar., 2022). Ime dodeljeno ovim proteinima ne odgovara funkcijama koje obavljaju, s obzirom da su prisutni i kod organizama koji nemaju makrofage, mada su prvi put opisani u fagozomima inficiranih makrofaga miša, dok je kod sisara NRAMP1 protein ekspimiran isključivo na fagocitnim ćelijama. NRAMP proteini imaju važnu funkciju u transportu esencijalnih metala (Mn, Fe, Zn) kroz plazminu membranu i tonoplast, ali mogu transportovati i neke toksične metalne jone poput Cd i Ni. Broj NRAMP proteina varira kod različitih biljnih vrsta. Kod biljaka roda *Miscanthus* nije poznat ni broj ni način regulacije ekspresije ovih gena.

YSL transporteri (eng. „*Yellow stripe-like*“) pripadaju oligopeptidnim transporterima koji vrše transport kompleksa metala sa fitosideroforoma (metal-PS) ili nikotianaminom (metal-NA) u citoplazmu kroz plazminu membranu ili iz ćelijskih organela i kuplovani su sa simpotom protona (Colangelo i Gueriot, 2006). Najbolje okarakterisani pripadnik ove grupe transportera je ZmYS1 kod kukuruza koji vrši transport Fe-PS i čija je ekspresija povećana u uslovima deficijencije gvožđa (Roberts i sar., 2004). Osim Fe-PS mogu transportovati i Fe-NA, ali i Zn, Ni i Cu (Colangelo i Gueriot, 2006).

CDF familija transportera (eng. „*Cation diffusion facilitator*“), koja kod biljaka ima i drugi naziv - MTP (eng. „*Metal tolerance proteins*“), je uključena u efluks metala, uključujući Fe, Zn i Mn, van citoplazme bilo u neki intracelularni odeljak ili u apoplast. Postoje kod svih živih organizama, i građeni su od 4 - 6 transmembranskih domena i N- i C-terminusa koji se

nalaze u citoplazmi. Na osnovu potvrđenih odnosno pretpostavljenih supstratnih specifičnosti, CDF transporteri kod svih organizama, podeljeni su u tri klastera: Zn-MTP, Mn/Fe-MTP i Fe/Zn-MTP (Alejandro i sar., 2023). Kod različitih biljaka postoji različit broj ovih transportera, pa se kod najčešće izučavanih biljaka *A. thaliana* i pirinča nalazi 12 odnosno 10 MTP transportera, mada može varirati između 9 i 19. Na osnovu filogenetskih analiza sa *A. thaliana*, MTP transporteri su podeljeni u 7 različitih grupa (Gustin i sar., 2011).

HMA transporteri (eng. „*Heavy metal ATPase*“) poznati i kao P_{1B}-ATPaze predstavljaju podfamiliju transportera P-tipa, koji vrše aktivni transport jona kroz biološke membrane. Ovi transporteri obavljaju transport prelaznih metala uključujući Cu, Zn, Cd, Pb i Co kroz biološke membrane i široko su rasprostranjene kod različitih organizama, uključujući i biljke. ATPaze P-tipa su velika grupa enzima, koji funkcionišu kao biološke pumpe i koriste ATP kako bi ispumpavale različite vrste katjona kroz membrane, nasuprot njihovom elektrohemijском gradijentu i nalaze kod svih eukariotskih ćelija, kao i kod bakterija. Ovi transporteri važni su za zaštitu biljke od stresa izazvanog metalima jer učestvuju u procesima usvajanja, transporta, distribucije, raspoređivanja metala u odgovarajuće ćelijske delove i detoksifikacije metala. Osim toga, neophodni su za transport esencijalnih jona poput Cu²⁺ i Zn²⁺. Broj HMA transportera varira među biljnim vrstama, pa je npr. kod *A. thaliana* pronađeno osam, kod *Oryza sativa* devet, kod *Zea mays* i *Sorghum bicolor* po jedanaest ovih transportera (Zhiguo i sar., 2018).

ABC transporteri (eng. „*ATP-binding cassette*“) predstavljaju jednu od najvećih familija proteina kod biljaka. Osim kod biljaka, prisutni su i kod svih ostalih organizama. ABC transporteri su membranske pumpe uključene u primarni transport za čiji rad je neophodan ATP, a funkcionišu i kao eksporter i kao importer. U početku je njihova uloga povezivana samo sa procesima detoksifikacije, odnosno transporta u vakuole radi sekvestracije, međutim, sada je poznato da su uključeni u translokaciju raznih supstrata, uključujući lipide, fitohormone, karboksilate, teške metale itd. kroz razne membrane u ćeliji. Time su uključeni u brojne i raznovrsne procese od vitalnog značaja za biljku, uključujući razviće i ishranu biljke, transport hormona poput auksina i abscisinske kiseline, odgovor na biotički i abiotički stres, depoziciju lipida na površini, što je važno za formiranje kutikule, razviće semena i polena, regulaciju otvaranja i zatvaranja stoma i generalno komunikaciju sa spoljašnjom sredinom (Kang i sar., 2011). Mada članovi ABC subfamilije nisu prisutni kod biljaka, genomi biljaka sadrže znatno veći broj gena (preko 100) za ABC transportere od svih drugih organizama, što se povezuje sa terestrijalnim i sesilnim načinom života biljaka, dok se kod različitih biljnih vrsta razlikuje broj prisutnih članova iz svake subfamilije (Banasiak i Jasiński, 2022).

MATE transporteri (eng. „*Multidrug and toxic compound extrusion*“) su prvo opisani kod bakterija (*Vibrio parahaemolyticus* i *Escherichia coli*) kao efluks pumpe koje im omogućavaju rezistenciju na lekove. Osim kod bakterija, prisutni su i kod biljaka, životinja i gljiva. Međutim, samo kod biljaka su prošli ekspanziju broja gena kroz tandemske i segmentalne duplikacije, što je rezultovalo u velikom broju ovih gena kod ovih organizama. Među različitim biljnim vrstama postoji različit broj *MATE* gena, npr. kod *A. thaliana* postoji 56 *MATE* transportera, kod *Oryza sativa* 52, kod *Zea mays* 49, kod *Glycine max* 117 (Qiao i sar., 2020). Brojnost ovih gena u saglasnosti je i sa raznovrsnošću funkcija koje proteini njima kodirani imaju. Do sada nije poznat ni tačan broj, a još manje funkcija *MATE* proteina kod većine biljnih vrsta. Broj *MATE* gena nije poznat ni za jednu vrstu roda *Miscanthus*. Prvi okarakterisani *MATE* gen bio je kod model biljke *A. thaliana* i nazvan je *AtDTX1* (eng. „*Arabidopsis thaliana Detoxification 1*“). Kodirao je transporter na plazminoj membrani koji vrši efluks raznih supstrata poreklom od samih biljaka odnosno egzogenog porekla iz citoplazme, uključujući norfloksacin, etidijum bromid, biljne alkaloida (berberin i palmatin), jone Cd²⁺, i na taj način učestvuje u mehanizmima detoksifikacije (Li i sar., 2002). Naziv dat ovom proteinu se zadržao i danas, tako da su osim kao *MATE* poznati i kao *DTX* proteini (eng. „*Detoxification*“-*DTX*). *MATE* transporteri imaju bar jedan MatE domen (pfam 01554; IPR002528) i najčešće 12

transmembranskih domena. Na osnovu sličnosti amino-kiselinske sekvence podeljeni su u prokariotske NorM i DinF i eukariotske eMATE subfamilije (Upadhyay i sar., 2019). Neke od poznatih funkcija, osim detoksifikacije ksenobiotika, obuhvataju i transport sekundarnih metabolita biljaka (Shoji sar., 2009), odgovor na biotički (Zhang i sar., 2021) i abiotički stres (Huang i sar., 2021), homeostazu gvožđa (Wang i sar., 2016), regulaciju nivoa i transport fitohormona (Li i sar., 2014) razviće, diferencijaciju raznih struktura i rasteenje (Won i sar., 2009). Ekspresija ovih gena je dinamična, zavisi od tkiva, stadijuma razvića, faktora sredine i biljne vrste, a tačna regulacija ekspresije nije dovoljno istražena.

1.4. COBRA-like protein

Ćelijski zid je dinamična struktura koja kod biljaka pruža mehaničku potporu i određuje mehanička svojstva, ali i oblik ćelije koji je važan za njenu funkciju, služi kao barijera i kontroliše procese ćelijske deobe i rasta. Takođe, uključen je u komunikaciju ćelije sa spoljašnjom sredinom i njenu odbranu (Li i sar., 2019; Sajjad i sar., 2023). S obzirom da se kod biljaka ćelijski zid formira zajedno sa ćelijskom deobom i da nema morfogenih kretanja ćelija, morfogeneza i trodimenzionalna struktura organa kod biljaka zavise od ćelijskih deoba i ćelijske ekspanzije. Ćelijska ekspanzija zavisi od promena koje se dešavaju i u citoskeletu i u ćelijskom zidu (Benfey i sar., 1993). Oblik ćelije i smer ćelijske ekspanzije delom su kontrolisani orijentacijom celuloznih mikrofibrila (Sangi i sar., 2021). Celulozne mikrofibrile sintetišu se na granici ćelijske membrane i ćelijskog zida od strane membranskog celulozo sintaznog kompleksa (eng. “*Cellulose synthase complex*”- CSC) nazvanog rozeta, za koga se smatra da je sačinjen od 18-24 CESA proteina (Haigler i Roberts, 2019). Celuloza je najzastupljeniji biopolimer na Zemlji i ulazi u sastav primarnih i sekundarnih ćelijskih zidova. Mada je dosta truda uloženo u istraživanje molekularnih mehanizama produkcije i depozicije celuloze, ovi procesi i dalje nisu do kraja jasni. Poznato je da su celulozne sintaze (CESA), KORRIGAN (KOR), NAC transkripcioni faktor, chitinase-like geni (CTL), fascilin-like arabinogalaktan geni (FLA) i MYB transkripcioni faktori neki od faktora u procesu biosinteze celuloze i asembliranja (Sajjad i sar., 2023). Osim njih, izdvaja se još jedna grupa gena koja reguliše procese biosinteze ćelijskog zida i ćelijske ekspanzije, a to su *COBRA-like* geni.

Prvi put su otkriveni kod *A. thaliana*, izučavanjem različitih mutanata sa poremećenom morfogenezom korena. *Cobra* mutanti imali su abnormalnu ekspanziju ćelija, u različitom stepenu u različitim ćelijskim slojevima korena, pri čemu je dijametar korena bio veći dok je nadzemni deo bio isti kao kod divljeg tipa biljaka. Najveća ekspanzija bila je u epidermisu gde su ćelije imale 15 puta veću površinu na presecima tkiva, dok su ćelije korteksa i stele imale 2,5 odnosno 3,9 puta veću površinu u odnosu na divlji tip, dok nije uočena razlika u broju ćelija (Benfey i sar., 1993). U drugom istraživanju, takođe sa *A. thaliana* mutantima za *COBRA* gen, *cob* mutanti ne ispoljavaju polarizovanu longitudinalnu ekspanziju, već se ćelije šire radijalno. Ovaj mutant ima manju sintezu celuloze u korenovima, koju prati poremećena orijentacija ćelijskih ekspanzija. Dakle, ovaj protein reguliše orijentaciju ekspanzije ćelija korena zavisno od depozicije celuloze (Schnidelman i sar., 2001).

COBRA-like geni pripadaju multigenskoj familiji gena specifičnih za biljke. Kodiraju glukozilfosfatidilinozitol (GPI) - ukotvljene proteine koji se sekretuju u Goldži aparat, a kasnije transportuju u plazma membranu gde modulišu procese asembliranja i kristalizacije lanaca celuloze (Sangi i sar., 2021). COBRA proteini poseduju četiri konzervirana domena: N-terminalni domen za targetovanje proteina, domen koji služi za vezivanje ugljenih hidrata, CCVS domen i hidrofobni C-terminalni domen, pri čemu se N- i C-terminalni domeni isecaju nakon translacije. Domen za vezivanje ugljenih hidrata interaguje sa kristalnom celulozom, a za CCVS domen je pretpostavljeno da učestvuje u formiranju disulfidnih veza i vezivanje metalnih jona (Qiu i sar., 2023). Kod različitih biljaka nalazi se različit broj *COBL* gena, pa je kod *A. thaliana*

pronađeno je 12, kod *Oryza sativa* 10, kod *S. bicolor* 9, dok za vrste roda *Miscanthus* nema dostupnih informacija. Filogenetske analize pokazale su da su dve grupe *COBL* gena prisutne i kod monokotiledonih i kod dikotiledonih biljaka, što ukazuje na su članovi *COBL* familije gena nastali kroz duplikaciju koja se odigrala pre odvajanja ove dve grupe biljaka. Grupa I gena kodira duže proteine, ali se kod nje nalazi manje egzona nego kod grupe II (Sajjad i sar., 2023). Kod *S. bicolor* *SbBC1* kodira COBRA-like protein koji je uključen u biosintezu celuloze u sekundarnom ćelijskom zidu i utiče na mehanička svojstva. Mutanti sa gubitkom funkcije ovog gena imaju izmenjenu strukturu ćelijskog zida i redukovanu čvrstinu stabla i listova, koji se lako lome pri savijanju (Li i sar., 2019).

Istraživanja su pokazala da su COBRA-like proteini uključeni i u druge važne fiziološke i razvojne procese kod biljaka, kao i u odgovoru na stres. Naime, zabeležena je uloga *COBL* gena i u ranim stadijumima razvijanja ploda kod paradajza (Cao i sar., 2012), određivanju arhitekture lista (Gao i sar., 2013), regulaciji razvoja korenskih dlaka (Li i sar., 2022; Hochholdinger i sar., 2008), rast polenske tube (Li i sar., 2013). Zaheer i sar. (2022) identifikovali su 5 *COBL* gena kod *Triticum aestivum* i analizirali njihovu ekspresiju u uslovima suše. Pokazali su da ovi geni menjaju ekspresiju u odgovoru na sušu, kao i da poseduju cis-elemente koji odgovaraju na sušu (WRKY, ABRE i DRE). Kod topole, *COBL* geni takođe menjaju ekspresiju u odgovoru na stres, pri čemu različiti članovi daju različite obrasce ekspresije u odnosu na vrstu stresa, dok su neki članovi visoko ekspimirani u svim testiranim tipovima stresa (hladnoća, toplotni stres, suša i salinitet). Osim toga, pronađeni su i cis-elementi koji se povezuju sa odgovorom na stres. Takođe, *COBL* geni su pokazivali tkivno-specifičnu ekspresiju (Sajjad i sar., 2023). Kod još jedne drvenaste biljke (*Liriodendron chinense*), *COBL* geni pokazuju tkivno-specifičnu ekspresiju, kao i različit obrazac ekspresije u odnosu na različite vrste abiotičkog stresa (toplota, hladnoća i suša) (Qiu i sar., 2023).

1.5. Bakterije koje promovišu rast biljaka

Zemljište sadrži izuzetno bogatu i raznovrsnu zajednicu mikroorganizama, pa je brojnost samo bakterijskih ćelija u 1 g zemljišta preko 10^{10} , a procenjen broj bakterijskih vrsti u 1 g zemljišta kreće se između 10^3 i 10^4 (Raynaud i Nunan, 2014). Interakcije biljaka i zemljišnih mikroorganizama su u najvećem broju slučajeva prolazne i kratkotrajne, ali ipak neki mikroorganizmi uspeju da ostvare dugotrajniju asocijaciju sa biljkom i oni predstavljaju centralni i neophodan deo mikrobioma. Definisane vrste koje pripadaju tom mikrobiomu značajno je za razumevanje procesa koji su specifični za vrstu mikroorganizama koji stupaju u interakciju sa biljkom (Santoyo i sar., 2022). Takođe, neke vrste imaju ulogu u organizovanju i održavanju kompozicije mikrobioma, jer održavaju i ostale vrste na korenu, a njihovim uklanjanjem dolazi do drastične promene strukture mikrobioma (Niu i sar., 2017). Bakterije, koje se nalaze u mikrobiomu biljke, interaguju sa biljkama i učestvuju u različitim signalnim procesima koje indukuju u biljci. Prema efektu koji ostvaruju na biljku i bakteriju ove interakcije mogu biti pozitivne, negativne ili neutralne.

Ulazak u interakciju sa biljkama i kolonizacija korena predstavlja kompleksan i dinamičan proces koji počinje sa rizodepozicijom odnosno sekrecijom korenskih eksudata koji sadrže razna jedinjenja male ili velike molekulske mase. Jedinjenja male molekulske mase mogu pripadati raznim klasama uključujući šećere, aminokiseline, fenolna jedinjenja, organske kiseline i sekundarne metabolite, dok su jedinjenja velike molekulske mase proteini ili kompleksni ugljeni hidrati. Korenski eskudati služe kao nutrijenti i izvor energije rizosfernim bakterijama. Biljke izluče čak do 30% ugljenika fiksiranog u procesu fotosinteze kroz korenske eskudate, što ukazuje na njihov veliki značaj za funkcionisanje biljke. Pokazano je da su bakterije rizosfere 10-1000 puta brojnije od onih u zemljištu koje se ne nalazi u blizini korenova (Glick, 2014). Kompozicija korenskih eksudata nije konstanta i u velikoj meri odražava potrebe

biljke u datom trenutku. Primer za to je i *M. × giganteus* gajen u zemljištu zagađenom ugljovodonicima kao posledica aktivnosti naftne industrije. Tada je uočena povećana učestalost bakterijskih rodova koji imaju sposobnost da degraduju naftne ugljovodonike u zemljištu u kome je rastao *M. × giganteus* u odnosu na isto kontrolno zemljište u kome nije bilo *M. × giganteus* (Nebeská i sar., 2021).

Bakterije koje promovišu rast biljaka su heterogena grupa bakterija koja pripada različitim rodovima, a među najistaknutijim i najviše istraživanih su *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*. Mogu naseljavati filosferu, tj. listove, stablo, cvetove, plodove (filobakterije), odnosno unutrašnjost biljnih tkiva, endosferu (endofite) ili su asocirane sa korenom (rizobakterije). Upravo su korenske zajednice najbogatije jer zona oko korena predstavlja nutrijentima bogatu sredinu. U zavisnosti od prisnosti veze koju ostvaruju sa korenom razlikuju se 3 odeljka: rizosfera, rizoravan i endosfera korena. Termin rizosfera prvi je upotrebio nemački mikrobiolog Lorenc Hiltner 1904. godine, definišući njime odeljak zemljišta koji je pod uticajem korena biljaka. Osim toga, uveo je, prema analogiji sa terminom mikoriza, i termin "bakterioriza" za bakterijske zajednice koje su asocirane sa korenom (Smalla i sar., 2006). Termin rizobakterije koje promovišu rast biljaka prvi put se u literaturi pojavio 80tih godina prošlog veka, a veću popularnost stekao je tridesetak godina kasnije kada raste broj istraživanja na ovu temu, a u vezi upravo sa povećanjem svesti o potrebi da se zaštiti životna okolina i traganjem za ekološki prihvatljivim alternativama za hemijskim đubrivima i drugim agrotehničkim merama, koji su u prošlosti masovno korišćeni, iako su štetna po okolinu i njihova primena nije održiva. S obzirom da su biljke sesilni organizmi, kroz evoluciju su razvile mehanizme koji im omogućavaju da se prilagode novonastalim nepovoljnim uslovima sredine bilo da su u pitanju abiotički ili biotički stresori (Cejudo i sar., 2021).

PGPR (eng. „*Plant growth promoting rhizobacteria*”) su slobodno-živeće zemljišne bakterije koje pozitivne efekte na biljku ostvaruju putem direktnih ili indirektnih mehanizama. U direktne mehanizme spadaju solubilizacija fosfata i kalijuma, povećanje dostupnosti gvožđa, fiksacija atmosferskog azota i produkcija fitohormona koji stimulišu rast biljke. Indirektni mehanizmi podrazumevaju zaštitu biljke od abiotičkog i biotičkog stresa. Na osnovu efekta koji ostvaruju, označene su kao: a) biofertilizatori (povećavaju dostupnost nutrijenata biljkama), b) fitostimulatori (produkuju biljne hormone koji stimulišu rast i razviće), c) rizoremedijatori (utiču na dostupnost polutanata), d) biopesticidi (inhibiraju biljne patogene) (Manoj i sar., 2020). Biofertilizatori svoje dejstvo ostvaruju kroz solubilizaciju fosfata, fiksaciju azota, sintezu siderofora. Fosfor se u zemljištu nalazi u dve forme, u vidu organskih i neorganskih fosfata. Iako je prisutan u dovoljnoj količini u zemljištu, fosfor brzo prelazi u nesolubilne forme stvaranjem kompleksa sa gvožđem, aluminijumom i kalcijumom, tako da se u kiselim zemljištima nalaze nesolubilni fosfati aluminijuma i gvožđa, a u alkalnim nesolubilni fosfati kalcijuma (Damo i sar., 2022). Ove forme su nedostupne biljkama zbog čega je fosfor zajedno sa azotom i kalijumom među glavnim ograničavajućim faktorima za rast biljaka. Generalno, biljke su u stanju da usvajaju samo negativno naelektrisane primarne ($H_2PO_4^-$) i sekundarne (HPO_4^{2-}) ortofosfatne jone, koji čine manje od 20% ukupnog P čak i u zemljištima bogatim fosforom (Cui i sar., 2022). Glavni mehanizmi kojima mikroorganizmi vrše solubilizaciju fosfata su sekrecija ekstracelularnih enzima poput fosfomonoesteraze, fitaze, fosfataze, C-P liaze (biohemijska mineralizacija), otpuštanje P tokom degradacije supstrata (biološka mineralizacija) i sekretovanje jedinjenja koja mogu rastvarati minerale poput siderofora, egzopolisaharida, organskih kiselina, protona, hidroksilnih jona. Glavne organske kiseline koje produkuju mikroorganizmi su glukonska, 2-keto glukonska kiselina, sirćetna, oksalna, fumarna, jabučna, mlečna i druge. Kao i protoni, organske kiseline doprinose opadanju pH vrednosti okolnog zemljišta i otpuštanja imobilisanog P. Siderofore su molekuli male molekulske mase sa različitim funkcionalnim grupama (hidroksamat, kateholat, α -hidroksikarboksilat) koji imaju veliki afinitet vezivanja Fe^{3+} , ali mogu vezati i Al^{3+} i druge metalne jone, pri čemu omogućavaju preživljavanje bakterija u uslovima ograničene dostupnosti gvožđa. Međutim, heliranjem metala,

doprinose i otpuštanju fosfata iz njihovih kompleksa pri čemu se povećava njihova dostupnost biljkama za usvajanje (De Zutter i sar., 2022; Cui i sar., 2022; Ghosh i sar., 2015).

Azot je pored fosfora i kalijuma najznačajniji makronutrijent za biljke i takođe predstavlja ograničavajući faktor za rast biljaka. Iako je prisutan u atmosferi u velikom procentu (78%), N₂ je forma koju biljke ne mogu usvojiti. Međutim, pomoću bakterija koje vrše procese biološke fiksacije azota, biljke dobijaju amonijak koji mogu usvojiti. Biološka fiksacija azota predstavlja enzimsku transformaciju atmosferskog N₂ u amonijak dejstvom nitrogenaznog kompleksa. Može biti ostvarena kroz simbiotsku asocijaciju između bakterija *Rhizobium sp.* i *Frankia sp.* i leguminoznih odnosno aktinorizalnih biljaka, odnosno kroz slobodnu azotofiksaciju od strane bakterija koje pripadaju različitim rodovima (Vocciante i sar., 2022).

Siderofore su organska jedinjenja male molekulske mase (200-2000 Da) produkovana od strane bakterija, biljaka i gljiva, a njihova produkcija je naročito indukovana u uslovima nedostatka gvožđa. Bakterijske siderofore formiraju stabilnije komplekse sa gvoždem od biljnih i fungalnih. Primarna uloga siderofora je vezivanje gvožđa (Fe(III)), ali osim njega mogu vezivati i druge elemente poput Mo, Mn, Co, Ni, Cd, Cu, Pb, Zn, Al, Th, U, Pu (Ahmed i Holmström, 2014). Efikasnost vezivanja esencijalnih mikronutrijenata poput Co, Cu, Mn, Sn i Zn je slična ili veća u odnosu na efikasnost vezivanja gvožđa, ali je manja u slučaju Al i Hg (Majewska i sar., 2024). Postoji više stotina različitih tipova siderofora, a prema prirodi funkcionalnih grupa dele se na tri familije: hidroksamati, kateholati i karboksilati. Bakterije koje proizvode siderofore mogu biti korisne biljkama na više načina: u smislu ishrane jer gvožđe vezano za siderofore može iskoristiti i biljka, zatim one takođe mogu doprineti i solubilizaciji fosfata jer heliranjem metala fosfati se oslobađaju iz kompleksa i bivaju dostupni biljkama, ili u smislu biokontrole fitopatogena (npr. pioverdin kod *Pseudomonas sp.*, pseudobaktin kod *P. fluorescens*, bacilibaktin kod *B. subtilis*, rizobaktin kod *Rhizobium meliloti*, stafiloferin A kod *Staphylococcus sp.*, enterobaktin kod *E. coli*) (Ahmed i Holmström, 2014; Cui i sar., 2022; Deb i Tatung, 2024). Prema tome, siderofore se mogu uvrstiti i u direktne i u indirektno mehanizme stimulacije rasta biljaka. Zbog sposobnosti da vežu metale, bakterije koje proizvode siderofore mogu uticati na dostupnost metala i samim tim naći primenu u tehnikama bio- i fitoremedijacije. Nakon vezivanja metala, ekstracelularno formirani kompleks siderofora - metal može imati dve mogućnosti: može ostati van ćelije pri čemu metal ostaje sekvstriran u vanćelijskom prostoru, a bakterija na taj način biva zaštićena od toksičnosti metala, odnosno može biti usvojen od strane bakterijske ćelije, jer receptori sa niskom specifičnošću mogu, pored kompleksa gvožđe - siderofora vezati i ovaj kompleks, pri čemu dolazi do akumulacije metala unutar bakterijskih ćelija. Prema tome, pod određenim uslovima siderofore mogu stimulisati stabilizaciju odnosno ekstrakciju metala od strane mikroorganizama. Bakterije mogu da vrše solubilizaciju metala iz minerala u zemljištu, povećavajući pritom njihovu biodostupnost i samim tim usvajanje i akumulaciju metala u biljnim tkivima, a na taj način stimulišu procese fitoekstrakcije metala.

Produkcijom fitohormona poput različitih klasa auksina, zatim citokinina, giberelina, ali i poliamina, brasinosteroida, jasmonata, salicilne kiseline, strigolaktina i abscisinske kiseline, PGPR utiču na rast, razviće i metaboličke procese u biljci. Stimulacija korena je izuzetno važan efekat koji PGPR imaju na biljku domaćina. Preko korena se usvajaju voda i nutrijenti, ali je i mesto prvog kontakta sa polutantima iz zemljišta kojima je direktno izložen. Na nivou korena se vrši zadržavanje polutanata i štetnih materija, ali deo njih se ipak usvoji. Ćelijski zid ćelija korena deluje kao prva barijera ulasku metala. Povećanjem dužine i površine korena dejstvom PGPR, biljke dosežu do većih dubina i lakše dođu do vode koja se duže zadržava u dubljim slojevima zemlje, što je od velikog značaja naročito u uslovima suše. Takođe, veća površina korena znači i veću površinu kojom se mogu usvajati nutrijenti, što je opet naročito od značaja ukoliko se radi o nekom siromašnom zemljištu. Stimulacija rasta korena od strane PGPR je prvenstveno efekat indol-3-sirćetne kiseline (eng. „*Indole-3-acetic acid*”-IAA) koji bakterije proizvode (Backer i sar., 2018). Osim produkcije IAA, pokazano je da PGPR modulišu

ekspresiju gena koji odgovaraju na auksin (eng. „*Auxin-responsive genes*”) kod biljaka, u koje spadaju i geni važni za arhitekturu korena, poput *Aux/IAA* (Ambreetha i sar., 2018). PGPR mogu proizvoditi nekoliko klasa auksina, ali je najpotentniji IAA. Auksini su uključeni u gotovo sve aspekte rasta, razvića i odgovora na okolinu biljke, a efekte ostvaruju kroz SCF^{TIR1/AFB1-3}-Aux/IAA-ARF signalni modul u nukleusu. Veoma značajna uloga u inicijaciji primarnih i lateralnih korenova, a stimuliše i izduživanje epidermalnih korenskih dlaka, formiranje lateralnih i razviće adventivnih korenova na dozno zavisani način. (Fu i sar., 2015). Veoma je važna uloga na ćelijskom nivou u stimulaciji ćelijske deobe, elongacije i diferencijacije, i ključni je hormon u regulaciji rasta i razvića, kao i signalni molekul u uslovima stresa. Svojstvo produkcije IAA od strane PGPR je posebno važno u uslovima stresa kada je inače poremećena produkcija auksina u samoj biljci (Zhan i sar., 2017).

U normalnim koncentracijama, etilen ima esencijalnu ulogu u normalnom razviću kod biljaka i učestvuje u procesima poput formiranja adventivnih korenova i korenskih dlaka, ubrzava klijanje semena, i prekida mirovanje semena (Park i sar., 2017; Feng i sar., 2017; Corbineau i sar., 2014). Kada je prisutan u povišenim koncentracijama deluje kao hormon stresa i izaziva defolijaciju, inhibiciju izduživanja korena i izdanka, destrukciju hlorofila, senescenciju listova, abscisiju listova i epinastiju, dakle inhibira rastenje i razviće biljke i može dovesti čak i do smrti biljke (Shahid i sar., 2023; Yang i sar., 2008). Prema pretpostavljenom modelu, etilen se oslobađa u vidu dva pika nakon izlaganja biljke stresu, prvi manji je odgovoran za transkripciju gena koji su bitni u zaštitnim odgovorima biljke, dok je drugi znatno veći i odgovoran je za štetne efekte etilena (Singh i sar., 2015). Štetni efekti etilena na rastenje i razviće biljke u stresnim uslovima može biti donekle smanjen dejstvom enzima ACC (1-aminociklopropan-1-karboksilat) deaminaze, koji degraduje direktan prekursor etilena, ACC, u α -ketobutirat i amonijak. Ovaj enzim proizvode pripadnici sva tri domena života: Bacteria, Archaea i Eukarya. Među bakterijama, *AcdS* gen koji kodira za ACC deaminazu nađen je kod Actinobacteria, Deinococcus, Thermus i tri klase Proteobacteria (α , β , γ). Bakterije filuma Chlorobi, Bacteroidetes i Firmicutes imaju ACC deaminaznu aktivnost, ali *AcdS* gen nije pronađen. S druge strane, kod nekih organizama je nađen gen, ali nije detektovana aktivnost enzima (Singh i sar., 2015). Osim u ublažavanju efekata stresa na biljku, ACC deaminazna aktivnost rizosfernih bakterija doprinosi i biokontroli raznih patogena i stimuliše nodulaciju kod leguminoznih biljaka (Singh i sar., 2022; Nascimento i sar., 2016). Samim tim što redukuje nivo etilena, sprečava da dođe do inhibicije rasta korena i rasta generalno, omogućava veću toleranciju stresnih uslova. Sa bolje razvijenim korenskim sistemom i većom otpornošću na stres, biljke su potencijalno u stanju da usvoje i akumuliraju veće količine zagađivača iz podloge.

Međutim, regulacija koncentracije etilena od strane bakterija koje proizvode ACC deaminazu nije tako jednostavna i zavisi od više faktora, kako je objašnjeno u Glick (2014). Ukratko, IAA proizveden endogeno kao i od strane bakterija, osim što stimuliše proliferaciju i elongaciju ćelija i samim tim podržava rastenje biljke, stimuliše i ekspresiju enzima ACC sintaze koji je uključen u sintezu ACC, što dalje vodi ka sintezi etilena. Očekivalo bi se na osnovu ovoga, da bakterije koje proizvode IAA dovode na kraju do inhibicije rasta biljke, međutim to nije tako jednostavno i ne dolazi do toga, jer postoji negativna povratna sprema između etilena i IAA signalne transdukcije, odnosno rastuća koncentracija etilena inhibira dalju IAA signalizaciju i aktivaciju ACC sintaze. Takođe, rastuća koncentracija ACC-a indukuje ekspresiju ACC deaminaze kod bakterija i posledično redukciju nivoa etilena. Prema tome, kada bakterije proizvode i IAA i ACC deaminazu, nivo etilena u biljkama biće očekivano manji nego kada bakterije proizvode samo IAA. Kako stres dovodi do aktivacije ACC oksidaze, enzima takođe uključenog u konverziju ACC u etilen, a imajući u vidu da ovaj enzim ima veći afinitet vezivanja ACC-a od ACC deaminaze, količina etilena zavisice od odnosa prisutne ACC oksidaze i ACC deaminaze (Glick, 2014).

Kada je biljka izložena dugotrajno nepovoljnim uslovima, postaje podložnija infekcijama jer je njen sistem zaštite oslabljen, zbog toga što se dosta resursa ulaže u borbu sa stresom. PGPR pomažu biljci sa kojom su asociirane u borbi sa biotičkim stresom koji izazivaju patogene bakterije i gljive, nematode i insekti. Različite bakterijske vrste mogu inhibirati i sprečiti infekciju patogenim vrstama gljiva i bakterija kroz produkciju antibiotika, bakteriocina, enzima koji razlažu zid gljiva, siderofora ali i kroz interferenciju signalne transdukcije kod patogena i ometanje mehanizama komunikacije „quorum sensing“ ili indukciju sistemske rezistencije kod biljke domaćina (Javed i sar., 2024). Bakterije roda *Bacillus* proizvode širok spektar antimikrobnih jedinjenja različite strukture, a najznačajniji su neribozomalno sintetisani peptidi i lipopeptidi (fengicin, polimiksin, bacitracin, iturin, surfaktin, kurstakin i drugi) poliketidna jedinjenja (bacilen, dificidin, makrolaktin, amikumacin), bakteriocini (klasa I, II i III) i siderofore (Fira i sar., 2018; Wang i sar., 2024a). Bakterije roda *Pseudomonas*, takođe proizvode lipopeptide (viskozin, siringomicin, amfizin, tolasin) i poliketide (mupirocin, pioluteorin, floroglucinol), ali i druga jedinjenja sa više antimikrobnih efekata poput pirolnitrina i fenazin-1-karboksilne kiseline, kao i isparljiva jedinjenja poput HCN (Mehmood i sar., 2023; Wang i sar., 2024a). Enzimi sa antifungalnim dejstvom, jer razlažu ćelijski zid gljiva, proizvodjeni od strane bakterija su proteaze, celulaze, glukanaze i hitinaze (Tran i sar., 2022). Enzimi poput laktonaza i acilaza, degraduju signalne molekule patogena N-acil-homoserin laktone koji su uključeni u „quorum sensing“ i samim tim sprečavaju aktivnosti regulisane ovim mehanizmom kao što je ispoljavanje virulentnih faktora, formiranje biofilma, sporulacija i drugih. Siderofore, osim uloge u usvajanju gvožđa, mogu inhibirati patogene gljive smanjujući im dostupnost gvožđa jer ga bakterijske siderofore vezuju sa većim afinitetom od fungalnih. Još jedan od mehanizama koji doprinose zaštiti od infekcija je indukovana sistemska rezistencija (ISR) koju izazivaju razni bakterijski molekuli poput LPS (lipopolisaharidi), flagela, siderofora, salicilne kiseline, VOC (eng. „*Volatile organic compounds*“) a koji pruža biljci zaštitu od više klasa patogena jer im omogućava da budu pripremljene za susret sa patogenima (Javed i sar., 2024).

2. CILJEVI RADA

Biljke aktivno selektuju mikroorganizme sa kojima ostvaruju interakcije, koji su deo njihovog mikrobioma, a njihov broj, vrsta i osobine zavise kako od uslova sredine u kojoj biljka živi, tako i od vrste biljke i bakterije. *Miscanthus × giganteus* je poznat po svom fitoremedijacionom potencijalu, te tako nakon gajenja na odlagalištu flotacione jalovine rudnika koju karakteriše prisustvo visokih koncentracija toksičnih metala, postavljeni su ciljevi ovog istraživanja:

1. Izolacija i karakterizacija rizobakterija iz rizosfere *M. × giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine rudnika olova, bakra i cinka
2. Ispitivanje sposobnosti izolata da promovišu rast *M. × giganteus* gajenog u flotacionoj jalovini
3. Ispitivanje sposobnosti izolata da pospešuju fitoremedijacioni potencijal *M. × giganteus* gajenog u flotacionoj jalovini
4. Utvrđivanje antioksidativnog odgovora i prisustva oksidativnih oštećenja kod *M. × giganteus* gajenog u flotacionoj jalovini
5. Analiza transkriptoma i diferencijalno eksprimiranih gena *M. × giganteus* tretiranog bakterijama izolovanim iz njegove rizosfere
6. Ispitivanje efekta tretmana *M. × giganteus* njegovim rizobakterijama na ekspresiju gena uključenih u rast i razviće biljke i usvajanje metala iz podloge

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Izolacija bakterijskih sojeva i medijumi za njihov rast

Uzorkovanje supstrata radi izolacije rizobakterija izvršeno je iz uzoraka supstrata donetih sa odlagališta flotacione jalovine rudnika metala (SGŠ 44°06'35'', IGD 20°29'37''), koji su se nalazili na različitoj udaljenosti od korena biljaka *Miscanthus × giganteus*, gajenih na ovoj lokaciji. Prema FAO klasifikaciji zemljišta, odlagalište flotacione jalovine rudnika metala kategoriše se kao flotasol, koji pripada grupi tehnosola (Gerasimova i Reinsch, 2015). U ovom rudniku eksploatišu se rude olova, cinka, bakra i u manjem obimu srebra. Tom prilikom sakupljene su tri frakcije supstrata (R (rizosfera) - supstrat direktno pričvršćen za koren biljke; S - supstrat u blizini korena, ali nije direktno vezan za njega; B (od eng. „*bulk soil*”) - supstrat koji se nalazi dalje od polja *M. × giganteus* i na kome nema drugih biljaka niti bioloških ostataka. Uzorci su uzeti poštujući tehnike sterilnog rada, smešteni u sterilne plastične kese i čuvani na hladnom mestu prilikom transporta u laboratoriju. U 10 g supstrata iz rizosfere je dodato 30 ml sterilne destilovane vode i povremeno mešano tokom 30 min, kako bi se dobila suspenzija. Uzorci su obeleženi kao:

A – uzorak flotacione jalovine

B – rizom biljke star jednu godinu

C – rizom biljke star 2 godine i 3 meseca, nije đubren

D – rizom biljke star 2 godine i 3 meseca, đubren sa NPK (15:15:15) jednom godišnje

E – rizom biljke star 1 godinu i 6 meseci rasta zajedno sa travom pored vode na odlagalištu

F – rizom biljke star 1 godinu i 6 meseci rasta zajedno sa travom dalje od vode

Iz ovako pripremljenog stoka, napravljena su serijska razređenja (0 , 10^{-2} i 10^{-4}) u fiziološkom rastvoru, a zatim zasejana na Petri šolje sa različitim hranljivim podlogama. Šolje su inkubirane tokom sedam dana na 30°C , praćen je rast kolonija koje su okarakterisane morfološki (boja, veličina i oblik), testirane su na aktivnost katalaze nakapavanjem 3% vodonik peroksida i praćenjem pojave mehurića i bojene po Gramu. Bojenje po Gramu urađeno je standardnom metodom: ezom je napravljen razmaz tečne kulture po mikroskopskoj pločici a zatim je preparat fiksiran provlačenjem kroz plamen. Fiksirani preparat je bojen prvo bojom kristal violet tokom 1-2 min, zatim Lugolovim rastvorom tokom 1 min. Obezbojavanje je izvršeno ispiranjem 96% alkoholom a obezbojavanje prekinuto ispiranjem vodom, nakon čega su obojene safraninom u trajanju od 30 s - 1 min. Pločice su posmatrane pod svetlosnim mikroskopom. U ovom koraku odabrani su izolati za dalju karakterizaciju. Za izolaciju sojeva iz roda *Bacillus*, deo uzoraka je termalno inaktiviran na 80°C tokom 15 min.

Medijumi korišćeni za izolaciju i rast bakterija bili su sledeći: Luria Bertani medijum (LB) koji sadrži: tripton (10 g/l, *LabM Lankašir, Velika Britanija*), ekstrakt kvasca (5 g/l, *LabM, Velika Britanija*), NaCl (5 g/l, *NRK inženjering, Srbija*); Hranljivi medijum (8 g/l, *Torlak, Srbija*); King's B medijum (43 g/l, 15 ml glicerola, *HIMEDIA, Indija*), Citrimid agar (43,5 g/l, 10 ml glicerola, *TM MEDIA, Indija*); Pikovskaya's agar (31,3 g/l, *TM MEDIA, Indija*) U medijume je dodavan nistatin (finalna koncentracija 50 $\mu\text{g/ml}$, *Hemofarm, Srbija*) da bi se sprečio rast gljiva. Čvrste podloge za rast bakterija pripremane su dodavanjem 1,5% agara u tečni medijum, pre sterilizacije u autoklavu u trajanju od 15 min na 121°C . Svi izolati su gajene na optimalnoj temperaturi za rast (30°C). Izolati su čuvani u odgovarajućim medijumima za rast sa 15% glicerola na -80°C .

3.2. Biohemijska karakterizacija izolovanih sojeva

3.2.1. Testiranje aktivnosti egzoenzima

Egzoenzimi čija aktivnost je testirana su amilaza, proteinaza, lipaza, ksilanaza i mananaza. Za testiranje aktivnosti amilaze i proteinaze korišćena je podloga koja sadrži 0,8% Hranljivi medijum, 0,4% NaCl i 1% agar u koju su dodati: 0,5% skrob (za amilazu) odnosno 0,4% želatin (za proteinazu). Za testiranje aktivnosti ksilanaze i mananaze, korišćen je osnovni medijum koji sadrži 0,2% ekstrakt kvasca, 0,5% pepton, 0,5% MgSO₄, 0,05% NaCl, 0,015% CaCl₂ i 2% agar u koji su dodati: 0,1% ksilan iz drveta breze (za ksilanazu) odnosno 1% „Locust bean gum“ (za mananazu). Za testiranje aktivnosti lipaze korišćena je podloga koja sadrži 0,5% pepton, 0,3% ekstrakt kvasca i 1,5% agar i 1% tributirat, koji je dodat nakon autoklaviranja. Po 2 µl tečne kulture, dobijene nakon rasta u trajanju od 16h u LB medijumu na 30°C, 180 rpm, izolata naneto je na Petri šolje sa odgovarajućim medijumima za testiranje aktivnosti amilaze, proteinaze, ksilanaze i mananaze. Aktivnost amilaze uočava se kao pojava svetlih zona oko kolonija na tamno plavoj podlozi, nakon preliivanja Lugolovim rastvorom (0,3% I₂ i 0,7% KI). Aktivnost proteinaze uočena je kao svetla zona oko kolonija na beloj podlozi, nakon preliivanja 1% vodenim rastvorom taninske kiseline. Aktivnost ksilanaze i mananaze detektuje se kao zona prosvetljenja oko kolonija na crvenoj podlozi nakon preliivanja 0,2% za ksilanazu, odnosno 0,1% rastvorom Kongo red boje za mananazu tokom 15 min, nakon čega je usledilo ispiranje 1M NaCl. Aktivnost lipaze uočena je kao zona prosvetljenja oko poteza rasta bakterija. Prečnik zona izmeren je za sve, osim za lipazu, čija aktivnost je potvrđena samo kvalitativno. Za sve enzime, osim za lipazu, izračunata je relativna aktivnost korišćenjem formule:

$$RA=(r_2^2\pi-r_1^2\pi)/r_1^2\pi$$

RA - relativna aktivnost, r₁-poluprečnik kolonije, r₂-poluprečnik zone aktivnosti

3.2.2. Testiranje sposobnosti rasta u ekstremnim uslovima

Odabrani sojevi testirani su na rezistenciju na osmotski stres, salinitet i toplotni stres. Pretkultura je napravljena zasejavanjem bakterija u LB medijum i inkubiranjem na 30°C, 180 rpm tokom 16h. Iz pretkulture je zatim pripremljen 1% inokulum prebacivanjem 50 µl u 5 ml svežeg LB medijuma i inkubiranjem na 30°C, 180 rpm tokom 2h. Iz ovako pripremljene kulture, uzeto je 100 µl i inokulisano u 10 ml odgovarajućeg LB medijuma za testiranje na rezistenciju na osmotski stres, salinitet ili toplotni stres. Za testiranje sposobnosti rasta u uslovima suše i rezistenciju na osmotski stres, u LB medijum dodat je polietilen glikol (PEG6000) u rastućim koncentracijama (15, 20, 25, 32,6%) i inkubirano na 30°C, 180 rpm tokom 24h. Za testiranje sposobnosti rasta u uslovima povećanog saliniteta, u LB medijum dodat je NaCl (5, 7 ili 13%) i bakterije gajene na 30°C, 180 rpm tokom 24h. Za testiranje rasta u uslovima toplotnog stresa, bakterijske kulture su gajene u LB medijumu na temperaturi od 50, 60 ili 70°C uz aeraciju 180 rpm tokom 24h. Nakon inkubacije, u svakom testu je određivan bakterijski rast kao CFU (eng. „*colony forming units*“)/ml, utrljavanjem 100 µl kulture sterilnim štapićem na Petri šolje sa LA medijumom i prebrojavanjem poraslih kolonija. Broj poraslih kolonija iskorišćen je za dobijanje CFU/ml prema formuli:

$$CFU/ml=(\text{broj izbrojanih CFU} \times \text{faktor razređenja})/\text{zapremina kulture zasejane na Petri šolju}$$

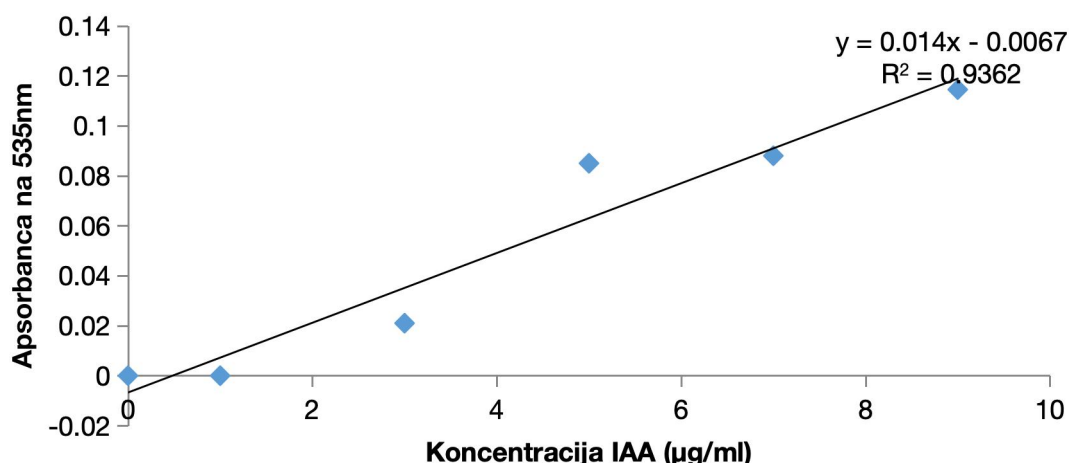
3.2.3. Testiranje sposobnosti rasta u prisustvu toksičnih metala

Za testiranje sposobnosti rasta u prisustvu toksičnih metala, bakterije su gajene u LB medijumu sa dodatkom jednog od metala/metaloida (NiCl₂, CdSO₄, Pb(C₂H₃O₂)₂, CuSO₄, ZnSO₄,

NaAsO₂, MnCl₂) tokom 72h na 30°C, uz aeraciju 180 rpm, pri čemu je rast praćen merenjem OD_{600nm} i određivanjem CFU/ml na svakih 24h. Metali/metaloidi dodavani su u LB medijum u rastućim koncentracijama, počev od 1 mM pa do 15 mM, pri čemu je određena minimalna inhibitorna koncentracija (eng. „*minimal inhibitory concentration*“ - MIC) za svaki metal/metaloid kod svakog od testiranih izolata. Za kontrolu uzete su bakterije gajene u čistom LB medijumu, bez dodatka metala/metaloida.

3.2.4. Određivanje prisustva osobina koje promovišu rast biljaka

Za kvantitativno određivanje produkcije indol-3-sirćetne kiseline (eng. „*Indole-3-Acetic Acid*“ – IAA), sojevi su inokulisani u tečni LB hranljivi medijum u koji je dodat L-triptofan (2 mg/ml) i inkubirani na 30°C, uz aeraciju 180 rpm tokom sedam dana. Koncentracija produkovanog IAA merena je svakog dana prema protokolu (Guardado-Fierros i sar., 2024). Dnevno je uzimano 2 ml kulture i centrifugirano na 13000 rpm u trajanju od 5 min. 1 ml supernatanta prebačen je u nove epruvete, zatim je dodato 3 ml Salkowski reagensa: 1 ml 0,5M FeCl₃ u 50 ml 37% HClO₄, i smeša je inkubirana u mraku tokom 30 min. Nakon inkubacije, izmerena je apsorbancija na 535 nm. Kao blank je korišćen 1 ml LB medijuma dodat u 3 ml Salkowski reagensa. Koncentracija produkovane IAA (µg/ml) izračunata na osnovu standarde krive (Slika 2) konstruisane koristeći rastvore sa rastućom koncentracijom IAA.



Slika 2. Standardna kriva za određivanje koncentracije IAA

Aktivnost 1-aminociklopropan-1-karboksilat (eng. „*1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid*“ -ACC) deaminaze određena je kvalitativno, prema protokolu (Siddikee i sar. 2011). Prekonoćna kultura sojeva u LB medijumu je najpre centrifugirana (20 min, 4 000 rpm). Čelije su zatim isprane sa 1 ml 10 mM MgSO₄, zatim opet centrifugirane i nakon centrifugiranja resuspendovane u 650 µl MgSO₄. 250 µl ovako pripremljene bakterijske suspenzije dodato je u 1,2 ml SMN medijuma (za 1 l medijuma: 0,4 g KH₂PO₄, 2 g K₂HPO₄, 0,2 g MgSO₄, 0,1 g CaCl₂, 5 mg FeSO₄, 2 mg H₃BO₃, 5 mg ZnSO₄, 1 mg Na₂MoO₄, 3 mg MnSO₄, 1 mg CoSO₄, 1 mg CuSO₄, 1 mg NiSO₄, 1 g glukoza, 1 g saharoza, 1 g Na-acetat, 1 g Na-citrat, 1 g jabučna kiselina, 1 g manitol) sa dodatkom ACC-a u finalnoj koncentraciji od 5 mM, a zatim inkubirano tokom 72h na 150 rpm. Uzorci su nakon inkubacije centrifugirani (20 min, 4000 rpm), talog resuspendovan u 100 µl Tris-HCl pufera (0,1 M, pH 8,5) i dodato 3 µl toluena uz vorteksovanje u trajanju od 10 min. Zatim je dodato 10 µl 0,5 M ACC-a i 100 µl Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5) i usledila je inkubacija u trajanju od 30 min na 30°C, 150 rpm. Nakon inkubacije, dodato je 690 µl 0,56 M HCl i 150 µl 0,2% 2,4-dinitrofenilhidrazina (u 2N HCl) i inkubirano još 30 min na 30°C. Na kraju dodato je 1 ml 2N NaOH i zabeležena promena boje iz žute u braon, što je označavalo pozitivnu reakciju.

Za određivanje sposobnosti solubilizacije neorganskog fosfata korišćen je Pikovskaya's agar (za 1 l medijuma: 10 g glukoza, 5 g $\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$, 0,5 g $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$, 0,2 g NaCl, 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g KCl, 0,5 g ekstrakt kvasca, 0,002 g MnSO_4 i 0,002 g FeSO_4 , 15 g agar; pH 7) sa dodatkom indikatorske boje, bromfenol plave, u finalnoj koncentraciji 0,06%. Tečne kulture svakog od testiranih sojeva u LB medijumu centrifugirane su (13000 rpm, 5 min), isprane, i na kraju talog resuspendovan u fiziološkom rastvoru. 10 μl suspenzije inokulisano je u centar Petri šolje, nakon čega su inkubirane sedam dana na 30°C. Sposobnost solubilizacije fosfata detektovana je kao obezbojena zona oko kolonija na ljubičastoj podlozi.

Za testiranje sposobnosti produkcije siderofora, korišćen je esej, razvijen od strane Schwyn i Neilands (1987) koji koristi hrom azurol S (eng. „Chrome Azurol-S”-CAS). Ukratko, za 1 l CAS medijuma, pomešani su rastvor 1 i rastvor 2 nakon autoklaviranja. Rastvor 1 sadržao je 60,5 mg CAS rastvorenog u 50 ml destilovane vode, pomešanog sa 10 ml rastvora FeCl_3 (1 mM u 0,1 mM HCl) i rastvorom heksadeciltrimetilamonijumbromida (HDTMA) (72,9 mg u 40 ml vode). Rastvor 2 sadržao je 15 g agara, 30,24 g piperazin-N,N'-bis(2-etansulfonska kiselina)-PIPES-a i 12 g 50% NaOH u 750 ml destilovane vode (pH 6,8). LA medijum je razliven u Petri šolje i nakon stezanja, polovina je isečena a na prazno mesto razliven CAS medijum. Bakterije se presejavaju na LA medijum uz granicu sa CAS medijumom i Petri šolje se ostave na 30°C preko noći. Promena plave boje CAS medijuma oko zone rasta bakterija u žutu, narandžastu ili roze boju označavalo je pozitivan rezultat i sposobnost produkcije siderofora.

Za testiranje sposobnosti slobodne azotofiksacije, korišćen je polučvrsti NFb medijum: 5 g DL-malic acid, 0,5 g K_2HPO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g NaCl, 0,02 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2 ml rastvora mikronutrijenata (0,4 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0,12 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4 g H_3BO_3 , 1 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ i destilovana voda do 1000 ml), 2 ml rastvora bromtimol plavo (0,5% in 0,2N KOH), 4 ml Fe(III) EDTA (1,64%), 1 ml rastvora vitamina (10 mg biotina, 20 mg pirodoksal-HCl i destilovane vode do 0,1 l) (Döbereiner i Day, 1976). Epruvete koje sadrže 5 ml NFb soft medija (0,7 % agar) su inokulisane sa 100 μL bakterijskog uzorka i inkubirano sedam dana na 30°C. Pojava bele pelikule nalik velu u plavom medijumu značila je pozitivan rezultat odnosno da je bakterija azotofiksator.

3.2.5. Testiranje antimikrobne aktivnosti

Antagonističko dejstvo na rast odabranih biljnih patogena: *Pseudomonas syringae*, *P. fuscovaginae*, *Burkholderia glumae*, *B. cepacia*, *Xanthomonas oryzae*, *X. arboricola* i *Erwinia carotovora* testirano je metodom difuzije u banarićima. Zasejan je 1% inokulum svakog od testiranih biljnih patogena u soft LA agaru (7 g agara na 1 l medijuma) i razliven je preko tankog sloja podloge sa bunarićima, u koje je nalivano po 50 μl prekonocne tečne bakterijske kulture, gajene u LB medijumu na 30°C, uz aeraciju 180 rpm tokom 16h, odnosno supernatanta dobijenog centrifugiranjem prekonocne bakterijske kulture (13000 rpm, 10 min). Petri šolje su zatim inkubirane 24h na 30°C, nakon čega je izmeren prečnik zone bez rasta testiranog patogena oko bunarića.

3.2.6. Test pokretljivosti bakterija

Za testiranje pokretljivosti odabranih sojeva po tipu plivanja, ronjenja i trzanja, tri različite podloge su pripremljene. Podloga za testiranje pokretljivosti po tipu plivanja sadržala je 10 g triptona, 5 g NaCl i 3 g agara po litru. Podloga za testiranje pokretljivosti po tipu ronjenja sadržala je 8 g Hranljivog medijuma, 5 g glukoze i 5 g agara po litru. Podloga za testiranje pokretljivosti po tipu trzanja sadržala je 10 g triptona, 5 g ekstrakta kvasca, 10 g NaCl i 10 g agara po litru. Po 0,5 μl tečne bakterijske kulture inokulisano je na centar Petri šolje sa podlogom za testiranje pokretljivosti plivanjem i ronjenjem, dok je za testiranje pokretljivosti trzanjem jedna kolonija zabodena u centar

Petri šolje. Nakon inkubacije od 24h do 48h na 30°C, izmeren je dijametar zone pomeranja bakterija na Petri šoljama.

3.2.7. Određivanje sposobnosti formiranja biofilma

Formiranje biofilma određeno je u mikrotitarskim pločama sa ravnim dnom, tako što je u svaki bunarić naliveno 180 µl TSB medijuma (eng. „*Tryptic soy broth*”-TSB), (30 g/l, *TM MEDIA, Indija*) i 20 µl bakterijske kulture (podešene na gustinu od 0,5 McFarland). Soj *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 služio je kao pozitivna kontrola, a sterilni TSB medijum kao negativna. Mikrotitarske ploče su inkubirane ukupno 48h na 30°C, a formirani biofilm izmeren na 24h i 48h. Nakon inkubacije, ploče su isprane sterilnim 1xPBS puferom, koji sadrži NaCl (8 g/l), KCl (0,2 g/l), Na₂HPO₄ (1,44 g/l) i KH₂PO₄ (0,245 g/l), pH 7,2) tri puta kako bi se odstranile slobodne bakterijske ćelije. Ćelije koje su pričvršćene za podlogu su, zatim fiksirane zagrevanjem na 65°C tokom 30 min. Biofilm je obojen dodavanjem 200 µl 0,1% Kristal violet boje i inkubiranjem u trajanju od 30 min na sobnoj temperaturi. Boja je onda dobro isprana vodom a ploče osušene na 65°C. Rastvor koji sadrži 96% etanol i aceton u odnosu 4:1 dodat je u svaki bunarić, a zatim je izmerena OD na 595 nm. Interpretacija dobijenih rezultata izvršena je koristeći granične (eng. „*cut-off*“) vrednosti na osnovu koje se razlikuju biofilm-produkujući sojevi od onih koji tu sposobnost nemaju. „*Cut-off*“ (OD_c) vrednost definisana je sabiranjem srednje vrednost optičke gustine izmerene u kontrolnom bunariću na talasnoj dužini od 595 nm sa tri vrednosti standardne devijacije optičke gustine kontrolnih bunarića:

$$\text{„Cut-off“ OD}_c = \text{OD kontrolnog bunarića} + 3 * \text{SD kontrolnog bunarića}$$

Dobijena „*cut-off*“ vrednost iskorišćena je za grupisanje bakterijskih sojeva u 4 kategorije prema sposobnosti formiranja biofilma, na osnovu sledećih kriterijuma:

- $\text{OD} \leq \text{OD}_c$ – bez produkcije biofilma (kategorija 0 ili -)
- $\text{OD} \leq \text{OD}_c \leq 2 \times \text{OD}_c$ – slaba produkcija biofilma (kategorija 1 ili +)
- $2 \times \text{OD}_c \leq \text{OD} \leq 4 \times \text{OD}_c$ umerena produkcija biofilma (kategorija 2 ili ++)
- $4 \times \text{OD}_c \leq \text{OD}$ izražena produkcija biofilma (kategorija 3 ili +++)

3.3. Molekularna identifikacija odabranih izolata

3.3.1. Izolovanje genomske DNK

Jedna kolonija je uzeta sa čvrste podloge, zasejana u tečni LB medijum i inkubirana na 30°C, uz aeraciju na 180 rpm tokom noći. Zatim je 1,5 ml prekonocne kulture centrifugiran (13000 rpm, 5 min), supernatant je odbačen, a talog resuspendovan u 500 µl TE pufera (10 mM Tris pufer, 1 mM EDTA, pH 7,6) sa dodatkom 10 µl lizozima (200 µg/ml) i inkubiran 30 min na 37°C. Nakon inkubacije, dodato je 100 µl 5 M NaCl i dobro vorteksovano. Zatim je dodato 250 µl 3% cetiltrimetilamonijum bromid (CTAB) pufera (1 M Tris, 1,4 M NaCl, 20mM EDTA, 3% polivinilpirolidon (PVP), pH 8,0) i usledila inkubacija na 65°C. Nakon inkubacije, dodato je 800 µl hloroforma, smeša je vorteksovana i centrifugirana (13000 rpm, 10 min). Supernatant je prebačen u nove tube, a zatim je dodat natrijum acetat (pH 5,0) u zapremni jednakoj 1/10 zapremine supernatanta. Zatim je dodata jednaka zapremina hladnog izopropanola i centrifugirano (13000 rpm, 15 min), tečna faza je odlivena i dodat je 1 ml 96% hladnog etanola, a zatim opet centrifugirano (13000 rpm, 10 min). Tečna faza je odlivena, a talog dobro osušen na 37°C. Talog u kome se nalazi izolovana DNK je resuspendovan u 50 µl TE pufera sa dodatkom RNaze (1 µl stoka koncentracije 10 mg/ml dodat u 49 µl TE pufera) i inkubiran 15 min na 37°C. Izolovana DNK čuvana je na -20°C do upotrebe.

Jedna kolonija je uzeta sa čvrste podloge, zasejana u tečni LB medijum i inkubirana na 30°C, 180 rpm tokom noći. Zatim je 1,5 ml prekonoćne kulture centrifugiran (13000 rpm, 5 min), supernatant je odbačen, a talog resuspendovan u 500 µl TE pufera (10 mM Tris pufer, 1 mM EDTA, pH 7,6), vorteksovano i centrifugiran (13000 rpm, 5 min). Supernatant je odliven, nakon čega je dodato 500 µl E1 pufera (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8) i vorteksovano. Zatim je dodato 250 µl 2% SDS-a (eng. „*Sodium dodecyl sulfate*“-SDS), promešano i dodato 50 µl Proteinaze K iz stoka (20 mg/ml) i inkubirano 30 min na 37°C. Nakon inkubacije, dodato je 200 µl fenola, dobro vorteksovano a zatim centrifugirano 10 min na 13000 rpm. Gornja faza je prebačena u nove mikrotube, a zatim mu je dodat 1 ml izopropanola, smeša dobro promućkana i centrifugirana 20 min na 13000 rpm. Celokupna tečna faza je odbačena, a DNK koja se nalazi u talogu, isprana je sa 1 ml 70% hladnog etanola, nakon čega je uzorak centrifugiran na 13000 rpm, 5 min. Tečna faza dobijena nakon centrifugiranja je odbačena, talog osušen na 37°C, nakon čega je resuspendovan u 50 µl TE pufera sa dodatkom RNaze (1 µl stoka koncentracije 10 mg/ml dodat u 49 µl TE pufera) i inkubiran 15 min na 37°C. Izolovana DNK čuvana je na -20°C do upotrebe.

3.3.2. Umnožavanje DNK fragmenata lančanom reakcijom polimeraze

Izolovana genomska DNK korišćena je za umnožavanje i sekvenciranje ciljnih gena PCR reakcijom. Gen za *16S rRNK* umnožen je korišćenjem univerzalnih prajmera (Tabela 1) i KapaTaq DNK polimerazu (KapaBiosystems, Inc., SAD) i PCR aparat (Applied Biosystems, SAD). Program korišćen za amplifikaciju obuhvatao je: inicijalnu denaturaciju (94°C, 30 s), hibridizaciju (50°C, 30 s), elongaciju (72°C, 90 s) i finalnu elongaciju (72°C, 7 min). Identifikacija bakterija iz roda *Bacillus* do nivoa vrste vršena je dodatnim PCR reakcijama u kojima je umnožavan gen za *tuf* elongacioni faktor (Tabela 1). Korišćen je program gde je temperatura hibridizacije bila na 55°C / 1 min. Identifikacija bakterija iz roda *Pseudomonas* do nivoa vrste vršena je dodatnim umnožavanjem gena za B subjedinicu DNK žiraze, *gyrB* i sigma faktor 70, *rpoD*. Program za umnožavanje *gyrB* i *rpoD* gena je imao hibridizaciju na 59,5°C odnosno 60°C. Utvrđivanje sinteze antibiotika širokog spektra fenazin-1-karboksilne kiseline (eng. „phenazine-1-carboxylic acid“-PCA), pirolinitrina i pioluteorin kod izolata koji pripadaju rodu *Pseudomonas* urađeno je korišćenjem prajmera koji umnožavaju *phcA* gen odnosno *prnD* gen odnosno *pltC* gen (Tabela 1). Umnožavanje DNK fragmenata PCR metodom i pravljenje reakcione smeše objašnjeno je detaljnije u tekstu koji sledi. PCR reakcija u kojoj su korišćeni prajmeri za *phcA* i *pltC* gen imala je hibridizacija na 67°C / 45 sec dok je za *prnD* gen hibridizacija je bila na 68°C / 60 sec.

Dobijeni PCR produkti testirani su na 1% agaroznom gelu i prečišćeni korišćenjem komercijalnog kita za prečišćivanje PCR produkata QIAquick PCR Purification Kit/250 (QIAGEN GmbH, Nemačka) prema protokolu proizvođača. Prečišćeni PCR fragmenti poslani su na uslužno sekvenciranje u Macrogen (Macrogen, Holandija). Dobijene sekvence su analizirane pomoću NCBI (eng. „National Center for Biotechnology Information“) baze podataka, BLAST programom (Basic Local Alignment Search Tools) (Altschul i sar., 1997) za pretraživanje homologe nukleotidne sekvence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Tabela 1. Naziv i sekvence prajmera korišćenih u ovom radu

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
UNI16F	5'- GAGAGTTTGATCCTGGC -3'
UNI16R	5'- AGGAGGTGATCCAGCCG -3'
tufGPF	5'- ACGTTGACTGCCCAGGACAC -3'
tufGPR	5'- GATACCAGTTACGTCAGTTGTACGGA -3'
gyrBF	5'- MGGCGGYAAGTTCGATGACAAAYTC -3'
gyrBR	5'- TRATBKCAGTCARACCTTCRCGSGC -3'
rpoDF	5'- AAGGCGARATCGAAATCGCCAAGCG -3'
rpoDR	5'- GGAACWKGCAGGAAGTCGGCACG -3'
PhcA-F	5'- TTGCCAAGCCTCGCTCCAAC -3'
PhcA-R	5'- CCGCGTTGTTCTCGTTCAT -3'
PRN-F	5'- GGGGCGGGCCGTGGTGATGGA -3'
PRN-R	5'- YCCCGCSGCCTGYCTGGTCTG -3'
PLTC1-F	5'- AACAGATCGCCCCGGTACAGAACG -3'
PLTC1-R	5'- AGGCCCGGACACTCAAGAAACTCG -3'

3.3.4. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Elektroforeza totalne DNK i PCR umnoženih fragmenata rađena je na 1% agaroznom gelu. Gelovi su pravljani rastvaranjem agaroze u $1 \times$ TAE (40 mM Tris–acetat, 1 mM EDTA) puferu uz dodavanje etidijum bromida (0,5 μ g/ml). Kao pufer za elektroforezu korišćen je $1 \times$ TAE pufer. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela. Veličine fragmenata DNK dobijenih posle umnožavanja fragmenta PCR reakcijom određivane su na agaroznim gelovima upoređivanjem dužine pređenog puta DNK fragmenta koji se analizira u odnosu na dužinu puta koji su prešli DNK fragmenti poznate veličine (standard). Korišćeni su sledeći DNK standardi: „Gene Ruler TM DNA 1 kb Ladder Mix“ i „GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, SAD).

3.4. Tretman rizoma *M. × giganteus* i ogledi u saksijama

Rizomi korišćeni u ovom radu uzeti su iz nezagađenog zemljišta sa eksperimentalnog polja Instituta za primenu nuklearne energije u Beogradu, na kome je klon *M. × giganteus* u kontinuitetu gajen duži niz godina. Nakon iskopavanja, rizomi su detaljno isprani od čestica zemlje i isečeni, a zatim postavljeni na sterilnu papirnu vatu, pokriveni aluminijumskom folijom i držani u mraku na sobnoj temperaturi u trajanju od 7 dana, uz povremeno zalivanje. Nakon 7 dana, rizomi jednakih masa (20 - 25 g) i broja pupoljaka, su površinski sterilisani u 0,8 % rastvoru natrijum hipohlorita u trajanju od 15 min, nakon čega su dobro isprani u sterilnoj vodi više puta u trajanju od 45 min. Nakon sterilizacije, rizomi su potopljeni i inkubirani u pripremljenom bakterijskom inokulumu (biljke označene kao Mix), odnosno sterilnom LB medijumu (biljke označene kao Kontrola), u trajanju od 1h. LB medijum je uzet kao kontrola jer je taj medijum korišćen za gajenje bakterija prilikom pripreme inokuluma, kako bi bilo sigurno da svi uočeni efekti potiču od samih bakterija, a ne od hranljivih supstanci prisutnih u medijumu. Za pripremu bakterijskog inokuluma za tretman

rizoma *M. × giganteus* najpre je napravljena pretkultura za svaki od 6 odabranih izolata, u 10 ml tečnog LB hranljivog medijuma, gajena preko noći na 30°C, 180 rpm. Svež LB medijum, 200 ml je zasejan sa 200 µl (1% inokulum) pretkulture i gajen 16h na 30°C, 180 rpm. Dobijenim bakterijskim kulturama podešen je OD_{600nm} = 1 za svaki od šest izolata, a zatim su kulture pomešane u istom odnosu gde je dobijen bakterijski konzorcijum (označen kao Mix) i tim su tretirani rizomi. Bakterijski sojevi korišćeni za pripremu inokuluma bili su *Pseudomonas chlororaphis* Bo, *Bacillus toyonensis* Co, *B. safensis* Do, *Arthrobacter* sp. B21, *B. aryabhatai* B22 i *B. thuringiensis* F4.

Flotaciona jalovina koja je korišćena kao supstrat gajenje *M. × giganteus* u saksijama je homogenizovana intenzivnim mešanjem i sušena na vazduhu tokom dve nedelje. 3 kg supstrata dodato je u saksije zapremine 3 L (dimenzije: visina 20 cm, dijametar: 15 cm). Po jedan rizom sađen je u svaku saksiju, na 2/3 dubine saksije. Nakon sađenja, 50 ml bakterijske suspenzije (Mix), odnosno sterilnog LB medijuma (Kontrola) dodato je u supstrat oko rizoma. Biljke su gajene u komori za gajenje biljaka sa fotoperiodom 16/8h, temperaturom 22°C, vlažnošću vazduha od 35% i zalivane sa 150 ml vode na svakih 72h. Raspored saksija bio je potpuno nasumičan i menjan u toku trajanja eksperimenta. Za svaki tretman (Mix i Kontrola) postavljeno je po 5 saksija, a eksperiment je ponovljen u dva vremenski nezavisna ponavljanja. Biljke su gajene u trajanju od 3 meseca, nakon čega su korenovi odvojeni od biljaka, detaljno isprani i deo, kao i deo listova, odmah samleveni u tečnom azotu pomoću avana i tučka. Izolacija RNK iz korenova usledila je odmah nakon mlevenja u tečnom azotu. Izolovana RNK, kao i ostatak mlevenih korenova i listova čuvan je na -80°C do trenutka korišćenja. Deo listova iskorišćen je za određivanje relativnog sadržaja vode. Ostatak sveže biljne mase osušen je do konstantne težine na vazduhu, podeljen na korenove, stabla, listove i rizome i korišćen za određivanje sadržaja mikro- i makroelemenata.

3.5. Određivanje parametara rasta *M. × giganteus*

Korenovi i nadzemni delovi su fizički razdvojeni. Korenovi su detaljno isprani prvo običnom, pa zatim destilovanom vodom, određena je ukupna dužina, dužina glavnih i lateralnih adventivnih korenova, sveža i suva masa. Dužina korenova određena je pomoću software-a Leica Application Suite (Leica Q Win software, Leica Microsystems, Nemačka). Kod nadzemnog dela biljke određen je broj listova, visina biljaka, sveža i suva masa listova i stabala. Procenat inhibicije rasta (%) izračunat je korišćenjem formule:

$$\text{Inhibicija rasta (\%)} = [((\text{suva masa (tretman)} \times 100) / (\text{suva masa (kontrola)})) - 100]$$

3.6. Određivanje parametara stresa

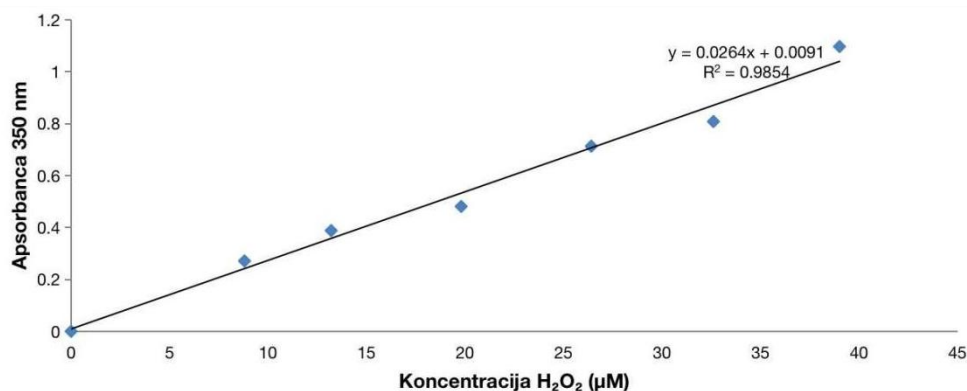
3.6.1. Određivanje relativnog sadržaja vode

U cilju određivanja relativnog sadržaja vode u listovima (eng. „Relative Water Content“ - RWC) RWC, isečeni su delovi listova dužine 5 cm, na 5 cm od vrha lista sa tri različite biljke iz istog tretmana i odmah je izmerena sveža masa (eng. „Fresh weight“- FW). Listovi su zatim obmotani vlažnom papirnom vatom i inkubirani u zatvorenoj Petri šolji tokom 24h na sobnoj temperaturi, nakon čega je izmerena njihova turgidna masa (eng. „Turgid weight“-TW). Najzad, listovi su sušeni na 80°C u trajanju od 24h, nakon čega je izmerena njihova suva masa (eng. „Dry weight“- DW). Relativni sadržaj vode izračunat je prema formuli:

$$\frac{\text{FW}-\text{DW}}{\text{TW}-\text{DW}} \times 100\% = \text{RWC (\%)}$$

3.6.2. Određivanje sadržaja vodonik peroksida

Za određivanje sadržaja H_2O_2 korišćena je spektrofotometrijska metoda prema Junglee i sar. (2014) koja se zasniva na oksidaciji kalijum jodida (KI) od strane H_2O_2 u kiselom medijumu, pri čemu se jodidni joni (I^-) oksiduju prvo u jod (I_2) a zatim se formira trijodid u reakciji joda i jodidnih jona (I_3^-) koji menja boju rastvora u žuto. U 150 mg tkiva listova ili korenova samlevenih u tečnom azotu dodato je 0,25 ml kalijum-fosfatnog pufera (10 mM, pH 5,8), 0,25 ml 0,1 % TCA i 0,5 ml 1M KI a zatim su uzorci homogenizovani na ledu u trajanju od 10 min, pri čemu su bili zaštićeni od svetlosti. Nakon homogenizacije, uzorci su centrifugirani 15 min na 12000 x g i 4°C. Supernatant je prebačen u nove tube i inkubiran dodatnih 20 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je izmerena apsorbancija na 350 nm. Koncentracija H_2O_2 je izračunata iz standardne krive (Slika 3), zatim preračunata na svežu masu biljnog tkiva i izražena kao $\mu\text{mol/g}$ sveže mase.



Slika 3. Standardna kriva za određivanje koncentracije vodonik peroksida.

3.6.3. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije

Za određivanje nivoa lipidne peroksidacije u listovima i korenovima korišćen je TBAR esej, koji se zasniva na reakciji malondialdehida (MDA), sekundarnog proizvoda oksidacije polinezasićenih masnih kiselina, sa tiobarbituratnom kiselinom (eng. „*Thiobarbituric acid*”- TBA) pri čemu nastaje produkt crvene boje sa maksimumom apsorpcije na 532 nm (Heath i Packer, 1968). U 200 mg biljnog tkiva samlevenog u tečnom azotu dodato je 0,75 ml 0,1% trihlorsirćetne kiseline (eng. „*Trichloroacetic acid*”- TCA), a zatim su tube centrifugirane 15 min na 14000 rpm i 4°C. Nakon centrifugiranja, 0,5 ml supernatanta prebačeno je u nove tube i dodato 0,75 ml 0,5% TBA u 20% TCA. Tube su zatim inkubirane 30 min na 95°C, a nakon inkubacije ohlađene na ledu pa centrifugirane 15 min na 10000 rpm i sobnoj temperaturi. Apsorbancija supernatanta merena je osim na 532 nm i na 600 nm, radi korekcije za nespecifičnu apsorbciju interferirajućih jedinjenja. Koncentracija MDA izračunata je na osnovu ekstinkcionog koeficijenta za MDA (155 mM/cm) i izražena je kao nmol/g sveže mase.

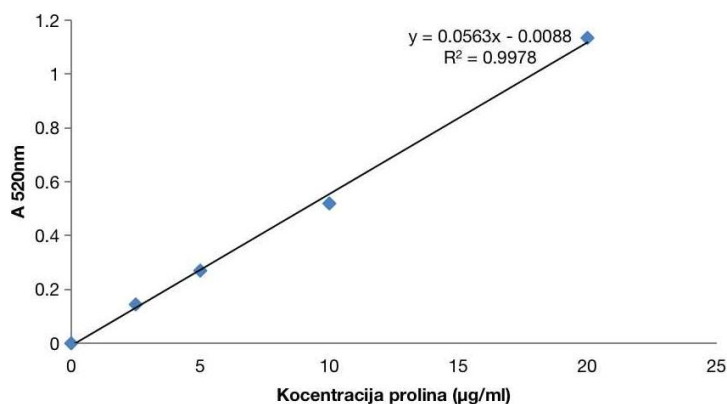
3.6.4. Određivanje sadržaja prolina

Za određivanje sadržaja prolina, u 100 mg biljnog tkiva samlevenog u tečnom azotu dodato je 2 ml 3% sulfosalicilne kiseline i inkubirano na ledu uz povremeno vorteksovanje. Zatim su uzorci centrifugirani 15 min na 14000 rpm i 4°C, nakon čega je 1 ml supernatanta prebačen u staklene epruvete sa zapašaćem. U supernatante je dodato po 1 ml kiselog ninhidrina i 1 ml glacijalne sirćetne kiseline i inkubirano tokom 1h u vodenom kupatilu na 100°C. Reakcija zaustavljena kratkom inkubacijom epruveta na ledu, a zatim je usledila inkubacija na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 min. Reakciona smeša prebačena je u tube u koje je prethodno dodato 2

ml toluena, a zatim su tube dobro promešane i vorteksovane. Po 1 ml iz gornje faze uzet je za merenje apsorbance na 520 nm. Kao blank korišćen je toluen. Sadržaj prolina određen je iz formule:

$$\mu\text{mol prolina/g biljnog tkiva} = [(\mu\text{g prolina/ml} \times \text{ml toluena u smeši})/115,5 \mu\text{g}/\mu\text{mol}]/[(\text{g biljnog tkiva}/5)]$$

Iz standardne krive (Slika 4) određen je $\mu\text{g prolina/ml}$.

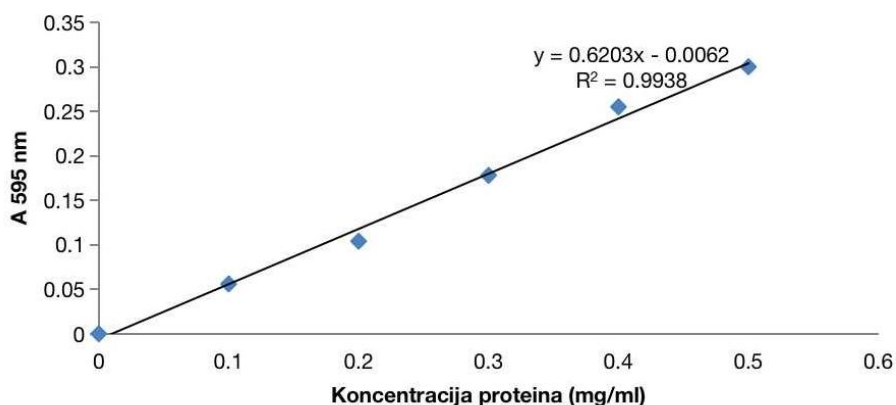


Slika 4. Standardna kriva za izračunavanje koncentracije prolina

3.7. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima

3.7.1. Priprema enzimskog ekstrakta i određivanje koncentracije proteina

Po 200 mg uzoraka listova i korenova samlevenih u tečnom azotu korišćeno je za ekstrakciju proteina. U mikrotube sa uzorcima postepeno je dodavan hladan kalijum-fosfatni pufer (50 mM, pH 7) sa dodatkom EDTA (1 mM). Uzorci su sve vreme držani na ledu uz povremeno kratko vorteksovanje. Nakon homogenizacije, centrifugirani su 30 min na 13000 rpm i 4°C. Supernatant koji sadrži ekstrahovane proteine prebačen je nove mikrotube a koncentracija proteina određena je Bradfordovom metodom (Bradford, 1976). U 750 μl Bradfordovog reagensa (Sigma-Aldrich, SAD) dodato je 25 μl ekstrakta proteina i nakon inkubacije u trajanju od 5 min na sobnoj temperaturi izmerena je apsorbance na 595 nm. Koncentracija proteina dobijena je preračunavanjem sa standardne krive (Slika 5). Proteinski ekstrakti čuvani su na -80°C do trenutka korišćenja.



Slika 5. Standardna kriva za određivanje koncentracije proteina.

3.7.2. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Za određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) primenjena je metoda koja se zasniva na redukciji NBT-a (eng. „*nitrobluetetrazolium*”) do formazana od strane superoksidnih radikala koji nastaju od molekularnog kiseonika dejstvom riboflavina i metionina (Beauchamp i Fridovich, 1971). Tom prilikom dolazi do promene boje iz žute u plavu, a količina produkovanog formazana meri se spektrofotometrijski na 560 nm. Rezultat aktivnosti SOD je opadanje intenziteta plave boje zbog manje količine prisutnih superoksid radikala i samim tim manje redukovano NBT-a. U test tube dodato je: 25 µl enzimskog ekstrakta, 1305 µl kalijum-fosfatnog pufera (50 mM, pH 7,8), 10 µl 11,25 mM NBT-a, 150 µl 130 mM metionina i 10 µl 300 µM riboflavina. Po dodatku riboflavina smeša je promešana, a tube inkubirane 30 min u mraku. U kontrolnu i blank tubu dodato je 1330 µl kalijum-fosfatnog pufera (pH 7,8, 50 mM), 10 µl 11,25 mM NBT-a, 150 µl 130 mM metionina i 10 µl 300 µM riboflavina, a nakon mešanja blank tuba je inkubirana u mraku, dok je kontrolna tuba izložena uniformnom osvetljenju u trajanju od 30 min. Nakon inkubacije izmerena je apsorbance na 560 nm. Dobijene vrednosti apsorbance uvrštene su u formulu:

$$\text{inhibicija redukcije NBT-a (\%)} = \frac{A(\text{kontrola}) - A(\text{test})}{A(\text{kontrola})} \times 100 \%$$

S obzirom da je 50% inhibicije NBT-a jednako 1U aktivnosti SOD, aktivnost SOD dobijena je iz sledeće formule:

aktivnost SOD (U) = $\frac{1U}{50\%}$ x inhibicija NBT-a (%). Aktivnost SOD je finalno izražena kao U/mg proteina.

3.7.3. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze

Za određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX) u kivete je dodato 1443 µl kalijum-fosfatnog pufera (50 mM, pH 7), 25 µl enzimskog ekstrakta, 15 µl 50 mM askorbata, 17 µl 880 mM H₂O₂ (Nakano i Asada, 1981). Smeša je promešana, a zatim je meren pad apsorbance na 290 nm tokom 5 min u intervalima od 15 s. Aktivnost APX izračunata je korišćenjem ekstinkcionog koeficijenta za askorbat (2,8 mM/cm) i izražena kao U/mg proteina pri čemu je 1U = 1 µmol/min.

3.7.4. Određivanje aktivnosti peroksidaze

Za određivanje aktivnosti peroksidaze (POD) korišćen je test koji se bazira na redukciji H₂O₂ od strane peroksidaze pri čemu dolazi do oksidacije α-naftola i tom prilikom nastaje ljubičasto obojen kompleks (Guilbault i Kramer, 1964). Direktno u kivete dodato je: 675 µl 10 mM H₂O₂, 50 µl 2 mM α-naftola i 25 µl enzimskog ekstrakta. Formiranje ljubičasto obojenog produkta praćeno je spektrofotometrijski kao porast apsorbance na 620 nm tokom 5 min u intervalima od 15 s. Aktivnost POD izračunata je korišćenjem ekstinkcionog koeficijenta za nastali produkt (18 mM/cm) i izražena kao U/mg proteina pri čemu je 1U = 1 nmol/min.

3.7.5. Određivanje aktivnosti glutatjon reduktaze

Za određivanje aktivnosti glutatjon reduktaze (GR), u kivete je dodato 1375 µl kalijum-fosfatnog pufera (0,025 mM, pH 7,8), 25 µl enzimskog ekstrakta, 50 µl 15 mM oksidovanog glutatjona i 50 µl 3,6 mM NADPH. Nakon mešanja smeše, praćen je pad apsorbance na 340nm tokom 5 min u intervalima od 15 s. Aktivnost enzima izračunata je korišćenjem ekstinkcionog koeficijenta za NADPH (6,22 mM/cm) i izražena kao U/mg proteina pri čemu je 1U = 1 nmol/min (Schaedle i Bassham, 1977).

3.7.6. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze (CAT) određena je pomoću amonijum-heptamolibdata koji sa H₂O₂ formira kompleks žute boje (Goth, 1991; Hadwan i Abed, 2016). Ovaj test primenjuje korekcionni faktor (kontrolne tube) kako bi se eliminisala interferencija koja potiče od amino kiselina i proteina prisutnih u uzorku. U test tube dodato je: 671 µl kalijum-fosfatnog pufera (50 mM, pH 7), 5 µl enzimskog ekstrakta i 74 µl 3% H₂O₂. U kontrolne tube dodato je 745 µl kalijum-fosfatnog pufera (50 mM, pH 7) i 5 µl enzimskog ekstrakta. Kao standard je korišćeno 676 µl kalijum-fosfatnog pufera (50 mM, pH 7) i 74 µl 3% H₂O₂. Kao blank korišćeno je 750 µl kalijum-fosfatnog pufera (50 mM, pH 7). Sve tube su vorteksovane, a zatim inkubirane na 37°C u trajanju od 3 min, nakon čega je u svaku tubu dodato po 750 µl 32,4 mM amonijum molibdata. Apsorbanca na 405nm je izmerena, a aktivnost katalaze izračunata iz formule:

$$\text{aktivnost (kU)} = \frac{2,303}{t} \times \left[\log \frac{A(\text{standard})}{A(\text{test})-A(\text{kontrola})} \right] \times \frac{V_t}{V_s}$$

t- vreme inkubacije; V_t- ukupna zapremina u test tubi; V_s- zapremina enzimskog ekstrakta u test tubi. Aktivnost katalaze je izražena kao kU/mg proteina.

3.8. Određivanje sadržaja metala u biljnim tkivima

Biljni materijal je prethodno podeljen na različite delove (koren, stablo, list i rizom) i osušen na vazduhu do konstantne težine, a zatim samleven u mlinu do finog praha. Prah je zatim razložen u 65% azotnoj kiselini na 150°C, prema standardu (metod 3051 (USEPA 1998)). Koncentracija mikroelemenata (Cu, Zn, Mn, Ni) i toksičnih (Pb, Cd, Cr) elemenata u biljnom materijalu i supstratu uzetom sa odlagališta flotacione jalovine rudnika metala određena je na atomskom absorpcionom spektrofotometru (Shimadzu AA -7000) koristeći poznate standarde za poređenje vrednosti apsorbance. Rezultati analize sadržaja metala u biljnom uzorku i supstratu (Rakić i sar., 2021) iskorišćeni su za izračunavanje biokoncentracionog faktora (BCF), translokacionog faktora (TF) i indeksa usvajanja prema sledećim formulama (Pidlisnyuk i sar., 2020):

$$\text{BCF} = (\text{sadržaj elementa u celoj biljci (mg/kg)}) / (\text{početni sadržaj elementa u podlozi (mg/kg)})$$

$$\text{TF} = (\text{sadržaj elemenata u nadzemnoj biomasi (mg)}) / (\text{sadržaj elementa u korenu (mg)})$$

$$\text{Indeks usvajanja (mg)} = \text{koncentracija elementa (mg/kg)} \times \text{suva masa (kg)}$$

3.9. Izolacija ukupne RNK iz biljnog materijala i sekvenciranje

Delovi korenova iz obe eksperimentalne grupe (Mix i Kontrola) uzeti su dok je biljka još uvek bila intaktna, detaljno isprani običnom i sterilnom destilovanom vodom, a odmah samlevani u tečnom azotu korišćenjem avana sa tučkom. 70-80 mg spraćenog biljnog materijala uzeto je za ekstrakciju ukupne RNK pomoću komercijalno dostupnog kita RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Čistoća, integritet i koncentracija izolovane RNK određene su pomoću NanoPhotometer spektrofotometra (IMPLEN, Nemačka). Uzorci su čuvani na -80 °C do daljeg korišćenja. Ukupna iRNK sekvencirana je korišćenjem platforme NovaSeq 6000 PE150 u Novogene Co. Ltd. (Velika Britanija). Dobijeni rezultati sekvenciranja deponovani su u SRA (eng. „Sequence Read Archive”-SRA) bazi sa pristupnim brojem PRJNA1026082.

3.10. Analiza podataka dobijenih sekvenciranjem RNK

Podaci dobijeni RNK sekvenciranjem filtrirani su kako bi se odstranila očitavanja nedovoljnog kvaliteta. Za “čista” očitavanja izračunati su Q20, Q30 i sadržaj GC parova (Cock i

sar., 2010, Erlich i sar., 2008, Jiang i sar., 2011). Kako referentni genom za *M. × giganteus* nije dostupan, očitavanja su poravnata sa genomom *M. luteoriparius* korišćenjem HISAT2 software-a. Stringtie je korišćen za asembliranje seta izoformi transkripata iz svakog bam fajla dobijenog iz mapiranja. featureCounts je korišćen za brojanje mapiranih sekvenci svakog gena, uključujući i poznate i nove gene. Zatim, izračunat je RPKM (eng. „Reads Per Kilobase per Million mapped reads”) za svaki gen na osnovu broja mapiranih sekvenci i dužine gena (Trapnell i sar., 2010). Analizi diferencijalne ekspresije gena (DEG) prethodila je normalizacija broja očitavanja za svaku sekvenciranu biblioteku metodom Trimmed Mean of M values (TMM) (Dillies i sar., 2013). Analiza DEG između biljaka tretmana Mix i Kontrole urađena je pomoću DGESeq R paketa, a p vrednosti podešene Benjamini i Hochberg metodom (Anders i Huber, 2010). Korigovana p vrednost od 0,005 i $|\log_2(\text{fold change})| = 1$ određeni su kao granična vrednost za značajnu diferencijalnu ekspresiju (Robinson i sar., 2010). Funkcionalna karakterizacija DEG-ova urađena je pomoću ClusterProfiler R paketa, tako što su GO termini sa korigovanim p vrednošću manjom od 0,05, koji se odnose na neki od tri aspekta uključujući molekularnu funkciju, ćelijsku komponentu ili biološki proces, dodeljeni DEG-ovima. ClusterProfiler R paket je korišćen za analiziranje pripadnosti DEG KEGG pathways bazi (Kanehisa i Goto, 2000; Yu i sar., 2012).

3.11. Analiza diferencijalno eksprimiranih gena metodom kvantitativnog PCR-a kome

prethodi reverzna transkripcija (RT-qPCR)

Verifikacija povišene ekspresije odabranih DEG na osnovu rezultata RNK sekvenciranja izvršena je metodom kvantitativnog PCR kome prethodi reverzna transkripcija (RT-qPCR). Uzimajući u obzir GO analizu i padj vrednost, odabrani su geni koji kodiraju sledeće proteine: „Multidrug and toxic compound extrusion protein” -MATE 14, 16, 35, 40, „COBRA-like protein 1“, „chitinase-like protein 1“, „Heavy metal-associated isoprenylated plant protein” - HMA 7, 32, 33, „Early nodulin-93“, „Peroxidase 70“, „Auxin-responsive protein SAUR36“, „Pectinesterase 1“, „Pectinesterase inhibitor PPE8B“, „Galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase“. Prajmeri su konstruisani pomoću PrimerBLAST alata dostupnog na veb-sajtu NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) i nalaze se u Prilog 1. Specifičnost dizajniranih prajmera je potvrđena elektroforezom RT-qPCR produkata na agaroznom gelu. RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD) je korišćen za sintezu cDNK iz ukupne RNK izolovane iz korenova biljaka *M. × giganteus* iz obe eksperimentalne grupe (Mix i Kontrola) prema uputstvu proizvođača. Najpre je ukupna RNK prečišćena od genomske DNK dodavanjem 1 µg RNK, 1 µl 10 x Reakcionog pufera sa MgCl₂, 1 µl (1U) DNaze I, bez RNaza (#EN0521) i vode do 10 µl u sterilne tube bez RNaza. Smeša je zatim inkubirana 30 min na 37°C, nakon čega je dodat 1 µl 50 mM EDTA i inkubirano još 10 min na 65°C. Za sintezu prvog lanca cDNK, u sterilne tube bez nukleaza dodato je redom: između 0,1 i 5 µg ukupne prečišćene RNK, 1 µl oligo (dT)₁₈ prajmera i vode bez nukleaza do 12 µl. Kako bi se uklonile sekundarne strukture, tube su nežno promešane, kratko centrifugirane i inkubirane 5 min na 65°C, a zatim ohlađene na ledu. U tube je zatim dodato redom: 4 µl 5 x Reakcionog pufera, 1 µl RiboLock inhibitora RNaza (20 U/µl), 2 µl 10 mM dNTP Mix-a i 1 µl RevertAid M-MuLV reverzne transkriptaze (200 U/µl). Tube su nežno promešane i kratko centrifugirane, a zatim inkubirane 60 min na 42°C. Reakcija je zaustavljena zagrevanjem na 70°C tokom 5 min. Istovremeno, sintetisane su i RT- kontrole koje su sadržale sve komponente reakcione smeše osim enzima reverzne transkriptaze. Za RT-qPCR korišćen je SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Masačusets, SAD) i PCR aparat sa 96 bunarića StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD). Reakciona smeša sadržala je 5 µl SYBR Green Master Mix-a, forward i reverse prajmer svaki pojedinačno u finalnoj koncentraciji 400 nM, 2 µl uzorka (svi uzorci su podešeni na istu koncentraciju) i vode bez nukleaza do finalne zapremine od 10 µl. Kao kontrole korišćene su NTC (eng. „no-template control”) kontrola, koja sadrži sve komponente reakcione smeše osim matrice i služi za detekciju kontaminacije reagenasa, kao i RT- kontrola,

dobijena u koraku sinteze cDNK, kojom se detektuje kontaminacija genomskom DNK, mada su i sami prajmeri dizajnirani tako da obuhvataju granicu egzon-egzon čime je mogućnost umnožavanja genomske DNK značajno umanjena. Obe eksperimentalne grupe (Mix i Kontrola) imale su tri biološka ponavljanja od čega je svaki analiziran u dva tehnička ponavljanja. Program po kome su se reakcije odvijale obuhvatao je inicijalnu denaturaciju na 95°C u trajanju od 10 min, 40 ciklusa na 95°C u trajanju od 15 s i 60°C u trajanju od 1 min. Odnos ekspresije odabranih transkriptata kod Mix u odnosu na Kontrolu, normalizovan u odnosu na referentni gen Sb02g041180, izračunat je prema Pfaffl metodi (2001).

3.12. Identifikacija *MATE* i *COBRA-like* gena

S obzirom da genom *M. × giganteus* nije dostupan u NCBI Genome Database, kao ni za vrstu *M. sinensis*, dok za *M. sacchariflorus* postoji referentni genom koji nije anotiran, za pretragu gena *MATE* (eng. „*Multidrug and toxic compound extrusion*“ – *MATE*) i *COBRA-like* korišćen je genom sledeće najrodnije vrste za koju je dostupan referentni genom, a koji je takođe i anotiran, i to je referentni genom *M. lutarioriparius* (GenBank GCA_904845875.1) (Miao i Feng, 2021). Konsenzusne sekvence *MatE* i *COBRA* domena preuzete su sa Conserved Domain Database (CDD, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>) i korišćene za pretraživanje referentnog proteoma *M. lutarioriparius* pomoću BLASTP alata. Kako bi se dobio što tačniji broj *MATE* i *COBRA-like* gena, rezultati dobijeni BLASTP pretragom manuelno su filtrirani na prisustvo konzerviranih *MatE* (Pfam: PF01554) odnosno *COBRA* (Pfam: PF04833) domena, respektivno, koristeći HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) i Conserved Domain Database (CDD, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>). Pretpostavljene *MATE* sekvence su, takođe, proverene na prisustvo tipičnih karakteristika *MATE* transportera, kao što su prisustvo *MatE* domena, 8-12 transmembranskih domena i klasifikaciju kao *MATE_like* superfamilija (Zhang i sar., 2021). Fizički parametri kao što su molekulska težina (MW), teoretska izoelektrična tačka (pI), ukupan broj negativno naelektrisanih ostataka (Asp + Glu), ukupan broj pozitivno naelektrisanih ostataka (Arg + Lys), indeks nestabilnosti, alifatični indeks i GRAVY (engl. Grand average of hydropathicity) određeni su pomoću ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Za predikciju subcelularne lokalizacije korišćen je Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>).

3.13. Filogenetska analiza *MATE* i *COBRA-like* proteina

56 *MATE* and 12 *COBRA-like* sekvenci *A. thaliana* su preuzeti iz TAIR baze i baza dostupnih kod NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.arabidopsis.org>) i iskorišćene za konstruisanje dva posebna filogenetska stabla zajedno sa *MATE* i *COBRA-like* sekvencama *M. lutarioriparius* dobijenim nakon filtriranja BLASTP rezultata. MEGA X software (www.megasoftware.net) korišćen je za konstruisanje filogenetskog stabla maximum likelihood metodom. Primenjeni su sledeći parametri: Test of phylogeny: Bootstrap method, Number of bootstrap replications: 1000, Substitutions type: Amino acid, Model/method: Jones-Taylor-Thornton (JTT) model, Rates among sites: Uniform rates, Gaps/missing data treatment: Complete deletion, ML heuristic method (Niu et al., 2015).

3.14. Statistička analiza

Svi testovi su sprovedeni u najmanje tri biološka ponovka i ponovljena kroz najmanje dva tehnička ponovka. Dobijeni podaci su najpre testirani na jednaku varijansu koristeći Levene test i na normalnu raspodelu koristeći Shapiro-Wilk test. Podaci su zatim podvrgnuti one-way analizi varijanse (ANOVA), a srednje vrednosti upoređene korišćenjem Student t-testa, sa stepenom

statističkog značaja $p < 0.05$. Sve statističke analize, kao i vizuelizacija rezultata, urađeni su korišćenjem odgovarajućih biblioteka Python-a verzije 3.9.7, dostupnog na <https://www.python.org> (Hunter, 2007; Virtanen i sar., 2020).

3.15. Analiza glavnih komponenti

Za parametere oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite urađena je analiza glavnih komponenti - PCA (eng. "*Principal component analysis*" - PCA) analiza kojom se redukuje dimenzionalnost podataka što doprinosi u razumevanju obrazaca i veza koji postoje među njima.

4. REZULTATI

4.1. Izolacija i karakterizacija bakterija za osobine koje promovišu rast biljaka

Prikupljeni uzorci su primenom mikrobioloških metoda izolacije dali 75 izolata iz frakcije R koja obuhvata rizosferu *Miscanthus × giganteus* i nijedan iz frakcija S i B. Na osnovu morfoloških (boja, oblik, veličina), biohemijskih (katalaza test, sinteza egzopolisaharida, sinteza antibakterijskih sekundarnih metabolita) i bojenja po Gramu izolati su klasifikovani u šest grupa i izabran je po jedan predstavnik iz svake grupe za dalju karakterizaciju, označeni kao Bo, Co, Do, F4, B21 i B22. Svih šest izolata imalo je pozitivnu katalaza reakciju, bili su pozitivni po Gramu osim izolata Bo koji je bio Gram negativan i nijedan nije sintetisao egzopolisaharide.

Izvršena je karakterizacija odabranih sojeva za osobine koje im omogućavaju da u direktnoj interakciji sa biljkom promovišu njen rast kako u optimalnim, tako i u uslovima abiotičkog ili biotičkog stresa. Rezultati testiranja sposobnosti sinteze odabranih egzoenzima pokazali su da svi izolati produkuju najmanje dva od pet testiranih egzoenzima. Najveću produkciju egzoenzima imao je izolat Do kod kog je detektovana aktivnost svih pet testiranih egzoenzima (Slika 6).

Svi izolati, osim Bo, bili su otporni na osmotski stres i mogli da rastu u medijumu sa dodatkom PEG6000, i to u najvišoj testiranoj koncentraciji (32,6%). Izolat Do se opet pokazao kao najotporniji na različite vrste stresa, jer je jedini od svih testiranih izolata mogao, pored medijuma sa dodatkom PEG6000 (32,6%), da raste i u uslovima povišene koncentracije soli (7% NaCl), kao i na povišenoj temperaturi od 50°C (optimalna temperatura za rast ovog soja je 30°C) (Slika 6).

Rizobakterije su izolovane iz rizosfere *M. × giganteus* koji je rastao na odlagalištu flotacione jalovine rudnika metala, pa je određena minimalna inhibitorna koncentracija metala i metaloida na kojima je najmanje jedan od izolata pokazao rast. Nijedan od izolata nije mogao da raste u medijumu sa dodatkom HgSO₄, BaCrO₃, CdSO₄ ili ZnSO₄. Najviša tolerisana koncentracija bila je 12 mM, što predstavlja veoma visoku koncentraciju, i to je uočeno kada je MnCl₂ dodat u medijum, kod izolata Bo, Co i Do (Slika 6).

Analiza osobina bakterija koje ih direktno vezuju za promociju rasta biljaka pokazala je da su svi izolati sintetisali indol-3-sirćetnu kiselinu (IAA), gde je najveća produkcija detektovana sedmog dana kod izolata B22 i iznosila je 70,309 µg/ml. Sposobnost sinteze 1-aminociklopropan-karboksilat (ACC) deaminaze zabeležena je kod svih sojeva, osim kod soja B22. Sposobnost solubilizacije fosfata imali su sojevi Bo, Do i B22, a najizraženiju produkciju siderofora imao je izolat B21. Sposobnost fiksacije azota imali su sojevi Do, B21, B22 i F4 (Slika 6).

Analiza antimikrobne aktivnosti odabranih šest izolata na neke od biljnih patogena pokazala je da je najosetljiviji patogen bio je *P. syringae*, protiv kog su svi testirani izolati bili aktivni. Najotporniji patogen bio je *P. fuscovaginae*, na kog je samo izolat Do ostvario inhibitorno dejstvo. Svaki od izolata imao je antagonističko dejstvo na rast najmanje četiri biljna patogena, ali je svaki pokazao različitu kombinaciju patogena čiji je rast inhibirao. Produkcija fenazin-1-karboksilne kiseline (PCA) zabeležena samo kod soja Bo, dok produkcija pirolnitrina i pioluteorina nije zabeležena ni kod jednog izolata (Slika 6).

Svi izolati imali su sposobnost kretanja po tipu plivanja, ronjenja i trzanja. Najveći dijometri uočeni su u slučaju pokreta po tipu plivanja i kretali su se od 1,45 do 4,06 cm. Prosečna vrednost od 1,41 cm za ronjenje ukazuje da je ovaj tip kretanja najslabiji (Slika 6).

Svih šest testiranih sojeva pokazalo je izvestan stepen produkcije biofilma, međutim nijedan soj nije formirao jak biofilm ni posle 48 sati (Slika 6).

	Bo	Co	Do	B21	B22	F4
Amilaza	8	24	26.5	-	13.06	5.25
Proteinaza	2.01	32	15	24	15	13.06
Ksilanaza	-	5.25	1.25	-	8.3	9.56
Mananaza	0.89	-	3	13.06	-	-
Lipaza	+	-	+	-	-	-
Salinitet (%)	-	-	7	-	-	-
Osmotski stres (%)	-	32.6	32.6	32.6	32.6	32.6
Toplotni stres (°C)	-	-	50	-	-	-
Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ (mM)	-	6	4	4	-	-
CuSO ₄ (mM)	2	1	2	-	-	-
NiCl ₂ (mM)	-	2	-	-	-	-
MnCl ₂ (mM)	12	12	12	-	-	-
NaAsO ₂ (mM)	-	2	-	4	2	4
Produkcija IAA (µg/ml)	36.762	35.405	59.476	14.976	70.309	41.929
Aktivnost ACC deaminaze	+	+	+	+	-	+
Solubilizacija fosfata	+	-	+	-	+	-
Produkcija siderofora (mm)	0.6	0.8	0.5	1	-	-
Slobodna N fiksacija	-	-	+	+	+	+
Produkcija PCA	+	-	-	-	-	-
<i>P. syringae</i>	+	+	+	-	-	-
<i>P. fuscovaginae</i>	-	-	+	-	-	-
<i>B. plantari</i>	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i>	+	+	-	-	+	-
<i>B. glumae</i>	+	-	-	-	+	-
<i>X. arboricola</i>	-	-	-	-	-	-
<i>X. oryzae</i>	-	-	+	+	-	+
<i>E. carotovora</i>	-	+	-	+	-	+
<i>P. syringae</i> (supernatant)	+	+	+	+	+	+
<i>P. fuscovaginae</i> (supernatant)	-	-	-	-	-	-
<i>B. plantari</i> (supernatant)	-	-	+	+	+	+
<i>B. cepacia</i> (supernatant)	+	-	-	+	-	+
<i>B. glumae</i> (supernatant)	+	+	-	-	-	-
<i>X. arboricola</i> (supernatant)	+	+	+	-	-	-
<i>X. oryzae</i> (supernatant)	+	-	-	-	-	+
<i>E. carotovora</i> (supernatant)	+	-	-	-	-	-
Plivanje (cm)	4.06	3.75	3.9	3.5	1.45	2.75
Ronjenje (cm)	1.85	1.05	1.85	1.3	1.4	1.05
Trzanje (cm)	1.06	1.85	1.05	0.75	1.15	2.45
Biofilm (24h)	-	+	-	++	+	++
Biofilm (48h)	+	++	+	+	++	++
Ukupno	24	23	26	19	17	19

Slika 6. Karakteristike odabranih sojeva bakterija koje im omogućavaju da promovišu rast biljaka u optimalnim i/ili uslovima abiotičkog i biotičkog stresa. Obojeni (narandžasti) kvadrati ukazuju na prisustvo osobine kod izolata. Vrednosti nekih osobina su dodatno predstavljene i broječanim vrednostima. Red Ukupno predstavlja ukupan broj osobina koje su detektovane kod svakog soja.

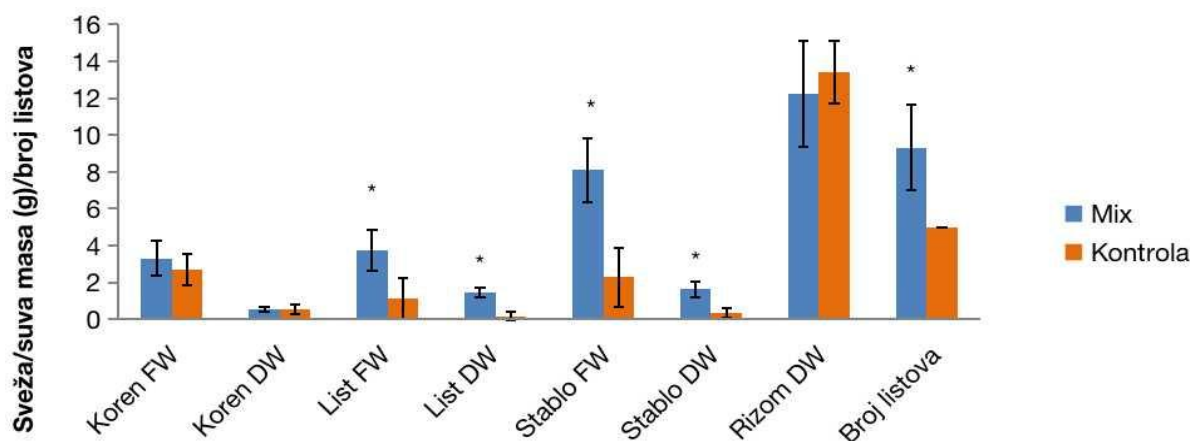
4.1.1. Molekularna identifikacija izolata

Nakon analize sekvenci *16S rRNK*, *tuf*, *gyrB* i *rpoD* gena izolati su determinisani kao sledeće vrste: Bo - *Pseudomonas chlororaphis*, Co - *Bacillus toyonensis*, Do - *B. safensis*, B21 - *Arthrobacter* sp., B22 - *B. aryabhatai* i F4 - *B. thuringiensis*.

4.2. Efekat tretmana *Miscanthus × giganteus* konzorcijumom bakterija izolovanim iz njegove rizosfere

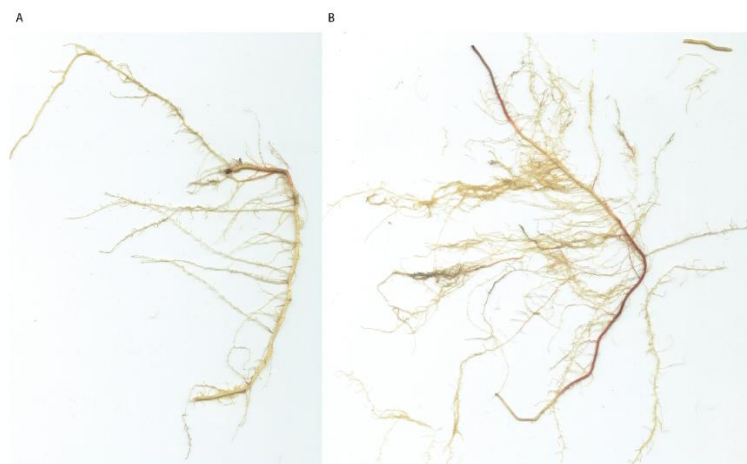
4.2.1. Promocija rasta *M. × giganteus* tretiranog konzorcijumom bakterija

U poređenju sa Kontrolom, biljke tretirane bakterijskim konzorcijumom (Mix) imale su veći procenat rasta (100% posađenih rizoma je poraslo kod Mix, u odnosu na 60% kod Kontrole). Osim toga, nadzemni deo biljke iz eksperimentalne grupe Mix iznikao je mesec dana ranije u odnosu na Kontrolu. Ove biljke su imale značajno veći ukupan broj listova po stablu (u proseku 9,33 kod Mix u odnosu na 5 kod Kontrole), zelenije listove sa manje vidljivih oštećenja. Tretirane biljke bile su i značajno veće visine (u proseku 70,67 cm po stablu kod Mix, u odnosu na 23,67 cm po stablu kod Kontrole) i imale su značajno veću suhu i svežu masu listova i stabala (Slika 7, Prilog 8). Sve vrednosti predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja \pm SD (SD-standardna devijacija). Zvezdice predstavljaju statistički značajne razlike između biljaka iz eksperimentalnih grupa Mix i Kontrola.



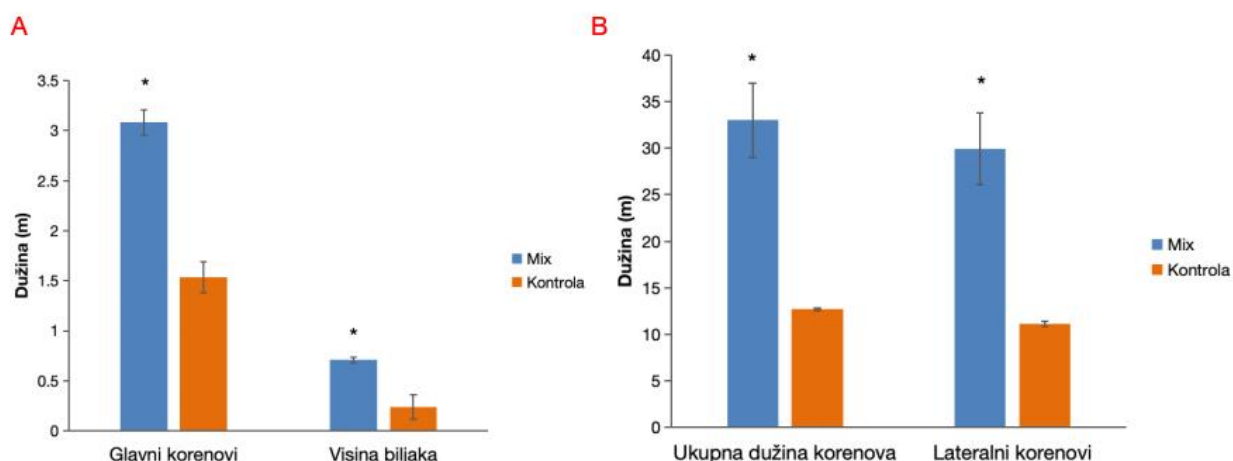
Slika 7. Parametri rasta tretiranih (Mix) i netretiranih (Kontrola) biljaka *Miscanthus × giganteus* gajenih u supstratu sa odlagališta flotacione jalovine rudnika Pb/Zn/Cu u centralnoj Srbiji.. (Studentov t-test, * $p < 0,05$). DW-suva masa; FW-sveža masa.

Biljke tretirane bakterijskim konzorcijumom imale su znatno razvijeniji korenski sistem (Slika 8B) u odnosu na koren biljke iz kontrole Slika 8A.



Slika 8. Skenirani reprezentativni korenovi biljaka Kontrole (A) i Mix (B).

Ukupna dužina korenova bila je značajno veća kod biljaka iz grupe Mix u odnosu na Kontrolu (Slika 9B, Prilog 8). Isto je uočeno i za dužinu glavnog (3,08 m kod Mix u poređenju sa 1,54 m kod Kontrole) i lateralnih korenova (29,92 m kod Mix u poređenju sa 11,16 m kod Kontrole) (Slika 9A i 9B, Prilog 8).

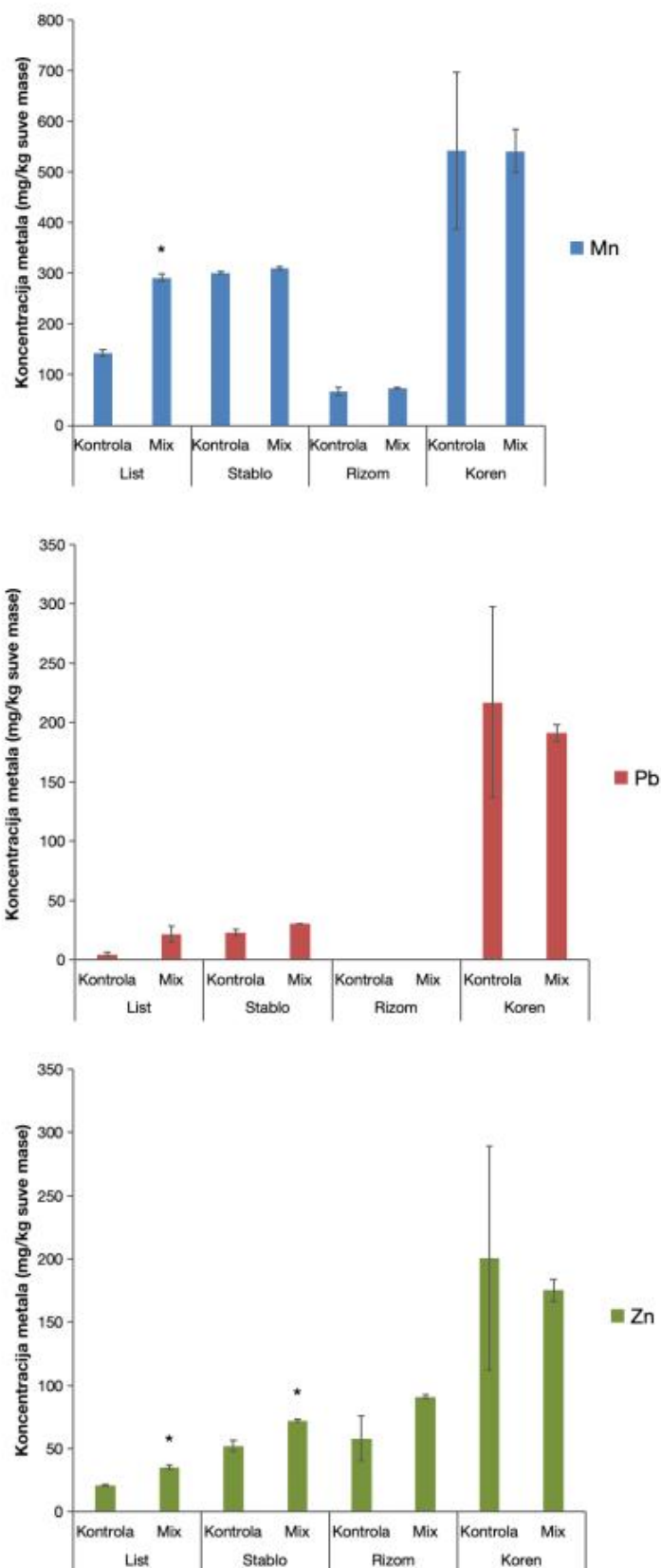


Slika 9. Dužine korenova i visine biljaka tretiranih (Mix) i netretiranih (Kontrola) biljaka *Miscanthus × giganteus* gajenih u supstratu sa odlagališta flotacione jalovine rudnika Pb/Zn/Cu u centralnoj Srbiji. (Studentov t-test, *p < 0,05).

4.2.2. Povećanje fitoremedijacionog kapaciteta *M. × giganteus* tretiranog konzorcijumom bakterija

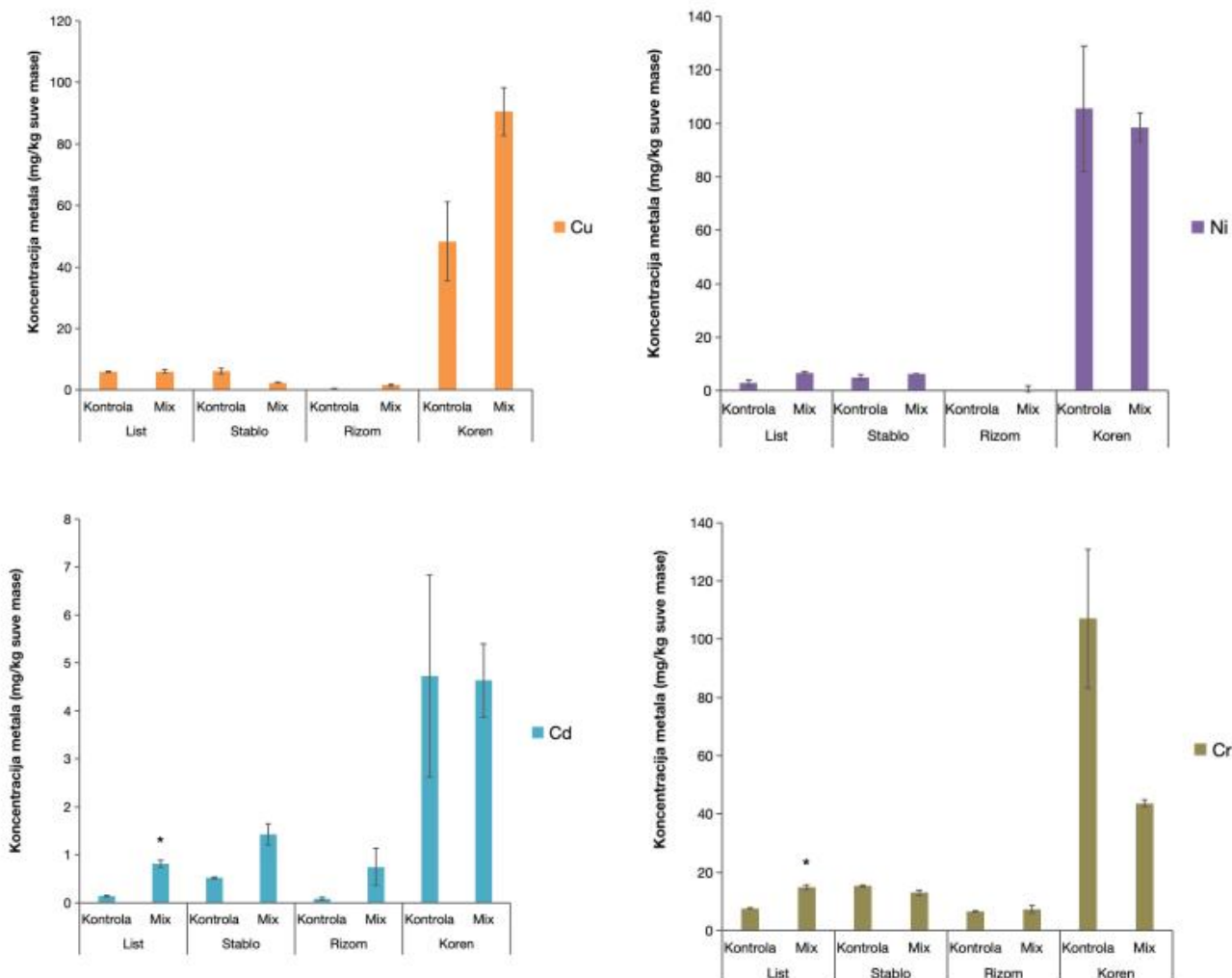
Koncentracije testiranih metala u različitim biljnim delovima (list, stablo, rizom i koren) prikazane su na Slikama 10 (Mn, Pb, Zn) i 11 (Cu, Cd, Ni i Cr) i Prilogu 8. Biljke *M. × giganteus* iz obe eksperimentalne grupe (Mix i Kontrola) akumulirale su višestruko veće koncentracije svih metala u korenovima u poređenju sa nadzemnim delovima, sa najizraženijom razlikom za Ni, Pb, Cu i Cd. Koncentracija Pb u rizomima kod obe eksperimentalne grupe, kao i Ni u rizomima Kontrole bile su ispod granica detekcije. Od svih testiranih metala, biljke *M. × giganteus* iz obe eksperimentalne grupe, akumulirale su najviše Mn. Najizraženija razlika između akumuliranih

koncentracija Mn u poređenju sa drugim metalima, zabeležena je u stablima i listovima i kod Mix i kod Kontrole. Jedini izuzetak bili su rizomi biljaka Mix, koji su akumulirali više Zn nego Mn.



Slika 10. Koncentracije metala (Mn, Pb i Zn) u različitim biljnim delovima (list, stablo, rizom i koren). (Studentov t-test, * $p < 0,05$).

Statistički viša koncentracija Mn (291,56 mg/kg kod Mix u poređenju sa 152,15 mg/kg kod Kontrole), Zn (35,46 mg/kg kod Mix u poređenju sa 20,87 mg/kg kod Kontrole), Cr (14,91 mg/kg kod Mix u poređenju sa 7,58 mg/kg kod Kontrole) i Cd (0,81 mg/kg kod Mix u poređenju sa 0,14 mg/kg kod Kontrole) detektovana je u listovima biljaka Mix u poređenju sa listovima biljaka Kontrole (Slike 10 i 11). Takođe, statistički viša koncentracija Zn detektovana je u stablima biljaka Mix u poređenju sa stablima Kontrole (72,33 mg/kg kod Mix u poređenju sa 52,02 mg/kg kod Kontrole) (Slika 10).



Slika 11. Koncentracije metala Cu i Cd, Ni i Cr u različitim biljnim delovima (list, stablo, rizom i koren). (Studentov t-test, * $p < 0,05$).

Koncentracije akumuliranih metala u svakom biljnom delu pratile su sledeći redosled: koren > stablo > list > rizom za Mn, Pb, Ni i Cd u oba tretmana i Cu i Cr samo kod Kontrole. Kod Mix-a redosled za Cu bio je sledeći: koren > list = rizom > stablo, dok je za Cr bio: koren > list > stablo > rizom. Za Zn, kod oba tretmana, redosled je bio sledeći: koren > rizom > stablo > list. Međutim, ukupna količina ekstrahovanih metala, izražena kao indeks usvajanja (Tabela 2), bila je najveća u rizomima za Mn, Zn i Cr kod oba tretmana i Cd kod biljaka iz grupe Mix. Najveći indeks usvajanja uočen je u korenovima za Pb, Ni i Cu kod oba tretmana, kao i Cd samo kod Kontrole.

Tabela 2. Indeks usvajanja analiziranih metala (mg) u različitim biljnim delovima *M. × giganteus* biljaka iz dve eksperimentalne grupe (Mix i Kontrola), izračunat kao srednja vrednost koncentracije metala (mg/kg suve mase) x srednja vrednost suve mase (kg).

Metal	List		Stablo		Rizom		Koren	
	Kontrola	Mix	Kontrola	Mix	Kontrola	Mix	Kontrola	Mix
Mn	0.026	0.423	0.100	0.506	0.896	0.902	0.310	0.293
Pb	0.001	0.031	0.008	0.050	i.g.*	i.g.*	0.124	0.104
Zn	0.004	0.052	0.017	0.118	0.777	1.115	0.115	0.095
Ni	0.001	0.010	0.002	0.011	i.g.*	0.007	0.060	0.053
Cu	0.001	0.009	0.002	0.004	0.006	0.020	0.028	0.049
Cr	0.001	0.022	0.005	0.021	0.088	0.089	0.061	0.024
Cd	0.000	0.001	0.000	0.002	0.001	0.009	0.003	0.003

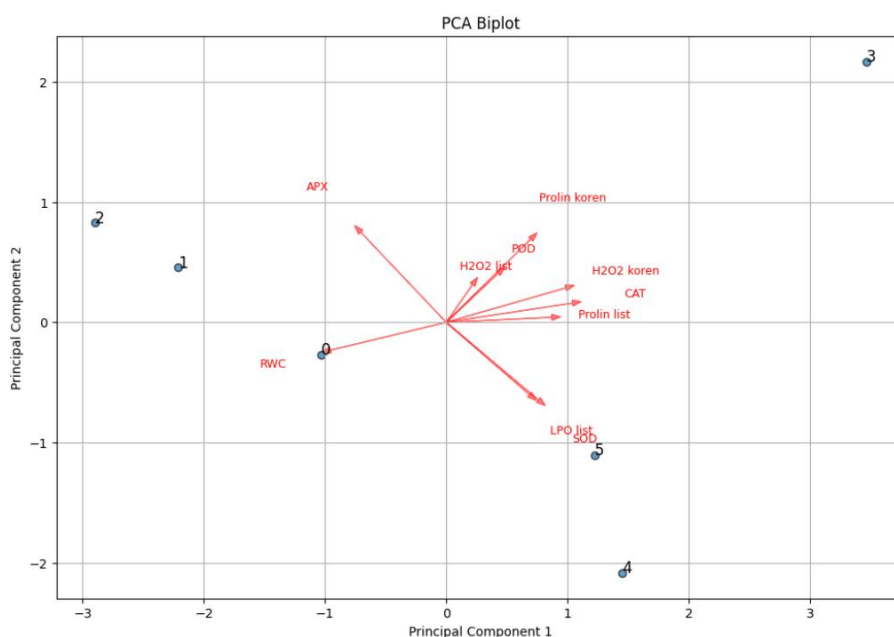
*ig- ispod granice detekcije

U ovom istraživanju, bakterijski tretman doprineo je povećanju TLF vrednosti za sve testirane metale (Tabela 3), a te vrednosti bile su veće od 1 za Mn, Zn, Cr i Cd, što ukazuje da ove bakterije poboljšavaju fitoekstrakcioni kapacitet *M. × giganteus*.

Tabela 3. Translokacioni (TLF) i biokoncentracioni (BCF) faktor za različite metale kod *M. × giganteus* biljaka iz dve eksperimentalne grupe (Mix i Kontrola).

Metal	TLF Kontrola	TLF Mix	BCF Kontrola	BCF Mix
Mn	0.41	3.17	0.003	0.003
Pb	0.07	0.79	<0.001	<0.001
Zn	0.18	1.79	<0.001	<0.001
Ni	0.04	0.38	0.015	0.013
Cu	0.12	0.26	<0.001	<0.001
Cr	0.11	1.81	<0.001	<0.001
Cd	0.07	1.39	0.001	0.001

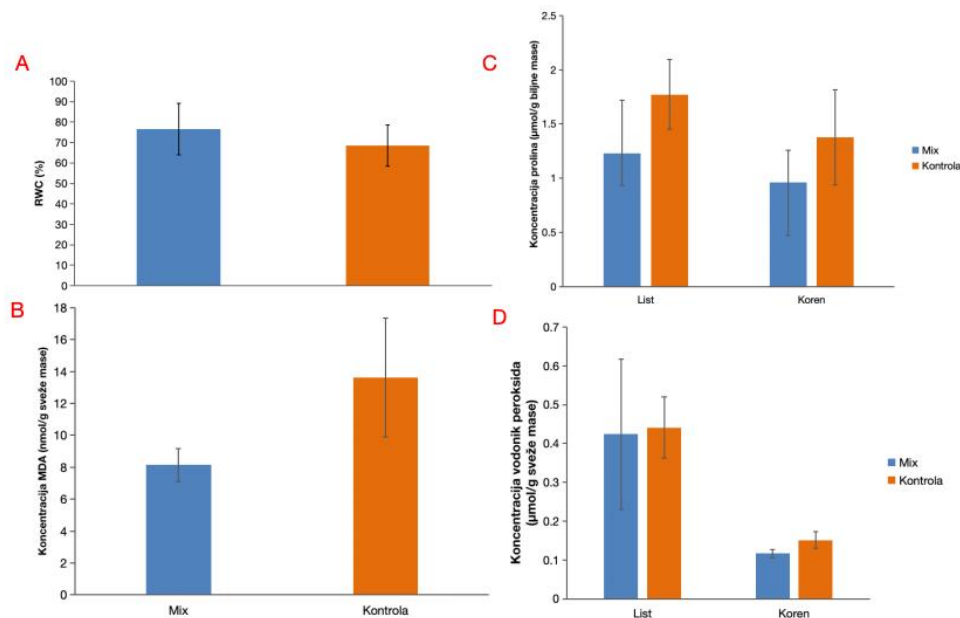
Rezultat za testirane parametre kod biljaka grupe Mix i kontrole prikazan je na Slici 12. Smer i dužina svake strelice prikazuje doprinos svake varijable diskriminaciji u prostoru. Najveći deo varijabilnosti je opisan na prvoj PCA osi (49,9338%), dok je na drugoj PCA osi opisano 18,7467% ukune varijabilnosti uzorka.



Slika 12. Pozicije jedinki (0,1 i 2) tretiranih (Mix), kontrolnih biljaka(3,4,5) u prostoru I i II ose analize osnovnih komponenti.

4.2.3. Parametri stresa kod tretiranih i netretiranih biljaka *M. × giganteus*

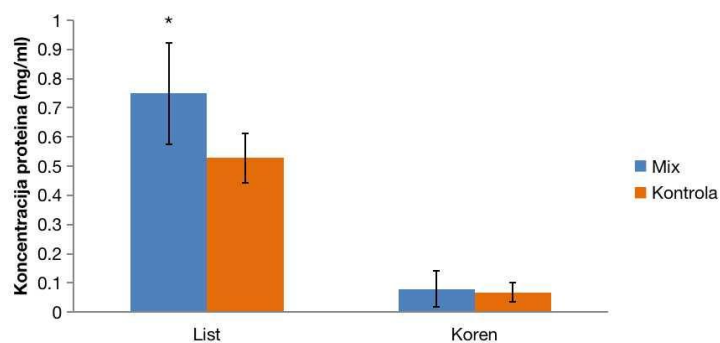
Relativni sadržaj vode bio je blago povišen kod biljaka iz eksperimentalne grupe Mix u odnosu na Kontrolu, dok je koncentracija prolina bila niža u listovima i korenovima ovih biljaka što je i očekivano (Slika 13, Prilog 8). Tretirane biljke imale su nižu koncentraciju MDA, marker lipidne peroksidacije, dok je koncentracija vodonik peroksida u listovima i korenovima biljaka iz obe eksperimentalne grupe bila približno ista. Svi mereni parametri nisu pokazivali statistički značajne razlike (Slika 13). Sve vrednosti predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja \pm SD.



Slika 13. Parametri stresa mereni u listovima i korenu tretiranih (Mix) i netretiranih (Kontrola) biljaka *M. × giganteus*. **A** Relativni sadržaj vode; **B** Koncentracija MDA; **C** Koncentracija prolina; **D** Koncentracija H₂O₂. (Studentov t-test, *p < 0,05).

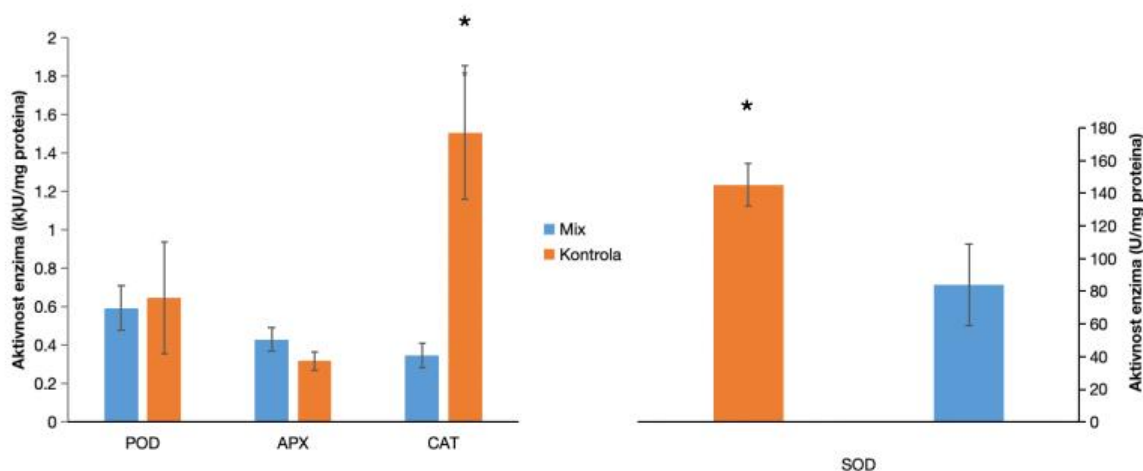
4.2.4 Aktivnost antioksidativnih enzima kod tretiranih i netretiranih biljaka *M. × giganteus*

Koncentracija proteina bila je značajno viša u listovima biljaka tretiranih bakterijskim konzorcijumom u odnosu na kontrolne biljke, dok u korenovima nije bilo razlike između ova dva tretmana (Slika 14, Prilog 8). Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti tri ponavljanja \pm SD. Zvezdice označavaju statistički značajne razlike između biljaka iz eksperimentalnih grupa Mix i Kontrola



Slika 14. Koncentracija proteina u listovima i korenovima biljaka Mix i Kontrola. (Studentov t-test, *p < 0,05).

Aktivnost enzima uključenih u antioksidativnu zaštitu ukazuju na značajno veću aktivnost katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD) kod kontrolnih biljaka u odnosu na tretirane biljke (Slika 15, Prilog 8). Zvezdice označavaju statistički značajne razlike između biljaka iz eksperimentalnih grupa Mix i Kontrola.



Slika 15. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u listovima biljaka Mix i Kontrola. (Studentov t-test, * $p < 0,05$).

4.3. Sekvenciranje transkriptoma i određivanje DEG

Opšti pregled rezultata RNK sekvenciranja prikazan je u Tabeli 4. Kao rezultat sekvenciranja ukupne iRNK generisano je preko 21 milion „sirovih” očitavanja sa oba kraja fragmenta u oba uzorka (Mix i Kontrola). Nakon filtriranja očitavanja sa slabijim kvalitetom, kao i adapterskih sekvenci, dobijeno je 20826287 u Kontrola i 22469139 „čistih” očitavanja u Mix-u. S obzirom da su očitavanja bila visokog kvaliteta, preko 92,5% baza imalo je Q30 skor (eng. „Phred Quality Score”), odnosno preko 92,5% baza očitano je sa preciznošću od 99,9%, rađene su dalje analize. Ukupna stopa mapiranja čistih očitavanja na genom *M. lutarioriparius* bila je 87,36% odnosno 87,07% kod Kontrola, odnosno Mix-a. Procenat jedinstveno mapiranih očitavanja bio je 78,53% odnosno 77,20% za Kontrolu odnosno Mix.

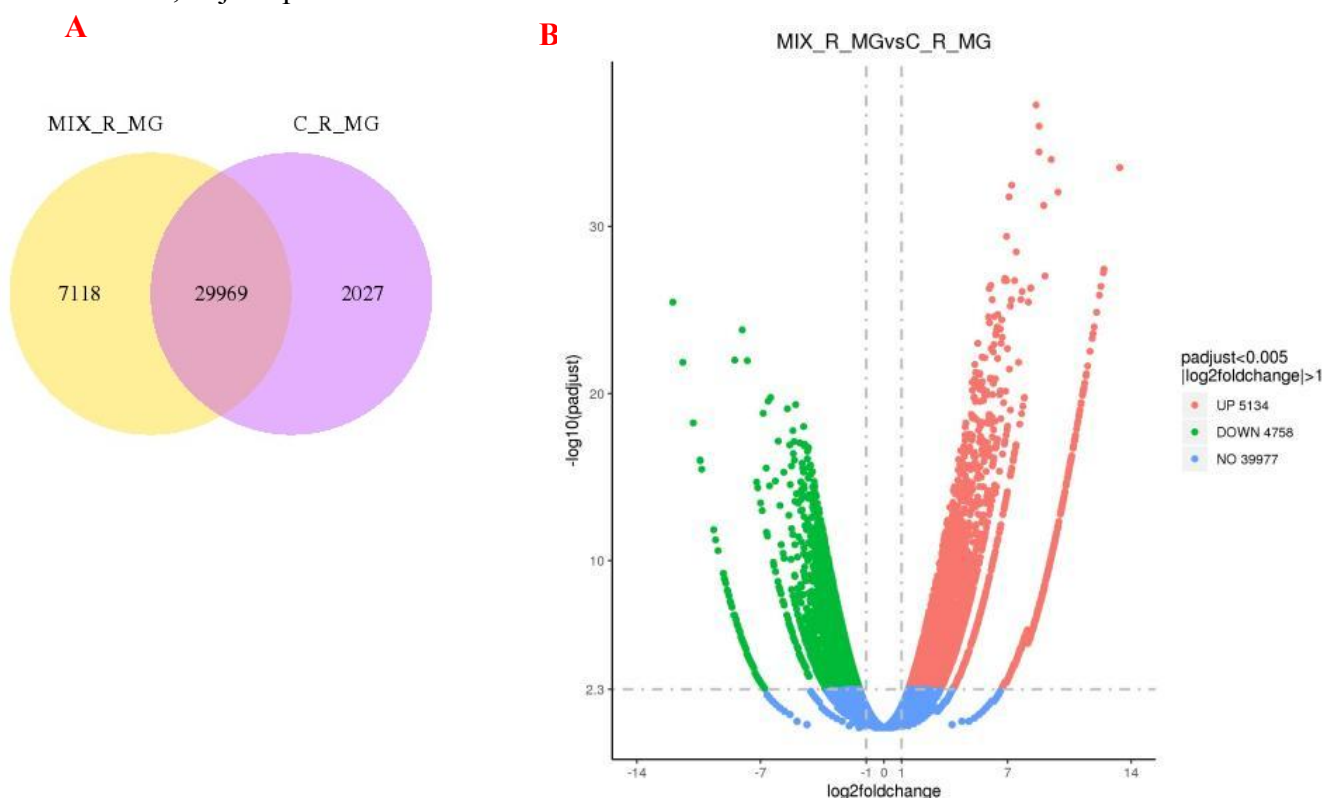
Tabela 4. Opšti pregled rezultata RNK sekvenciranja.

Uzorci	Kontrola	Mix
„Sirova” očitavanja	21146651	22713862
„Čista” očitavanja	20826287	22469139
Q20 (%)	97.18	97.25
Q30(%)	92.52	92.72
GC (%)	54.8	53.6
Ukupno mapirano (%)	87.36	87.07
Jedinstveno mapirano (%)	78.53	77.20

Na Venovom dijagramu (Slika 16A) prikazan je broj koeksprimiranih i jedinstveno eksprimiranih gena u korenovima obe grupe biljaka (Mix i Kontrola). Na Slici 16B, prikazan je broj diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) između dva testirana uzorka, pri čemu su za prag značajnosti uzeti p vrednost korigovana prema Benjamini-Hochberg proceduri ($\text{padj} < 0,005$), kao i

logaritam odnosa ekspresije između Mix i Kontrole (\log_2 fold change ≥ 1). Ukupan broj DEG bio je 9892, od čega je 5134 gena pokazivalo povećanu regulaciju, dok je 4758 pokazivalo sniženu regulaciju u korenovima tretiranih biljaka u odnosu na korenove kontrolnih biljaka (Slika 16B). Hijerarhijska klaster analiza, koristi se za pronalaženje gena sa sličnim obrascima ekspresije pod istim uslovima, pri čemu klasterovanjem gena sa sličnim obrascima ekspresije moguće je otkriti nove funkcije već okarakterisanih gena, odnosno funkcije gena koji nisu okarakterisani (Prilog 2).

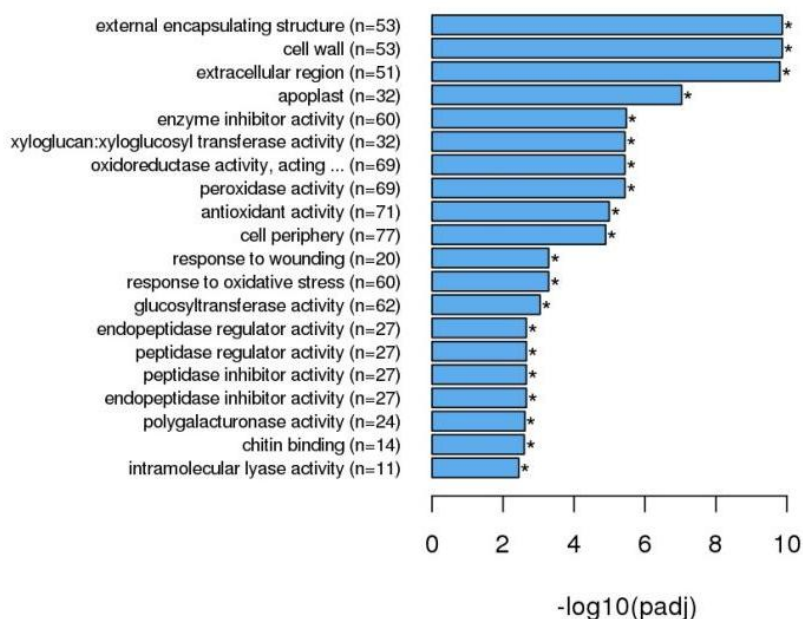
Funkcionalna karakterizacija DEG radi se kroz „enrichment“ analizu, pri čemu se mogu dobiti informacije o biološkim funkcijama ili putevima koji su značajno asocirani sa DEG. Gene Ontology (GO) anotira gene biološkim procesima, molekularnim funkcijama i ćelijskim komponentama. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) anotira gene do nivoa bioloških puteva, kao što su metabolizam, prenos signala i ćelijski procesi. DEG koji su bili up-regulisani kod biljaka grupe Mix u odnosu na Kontrolu, dobili su 32 GO termina koji su prikazani u Prilogu 3. DEG koji su bili down-regulisani kod tretiranih biljaka u odnosu na Kontrolu dobili su 63 GO termina, koji su prikazani u



Slika 16. Venov dijagram pokazuje broj koekspimiranih gena u tretmanima Mix i Kontrola, odnosno jedinstveno eksprimiranih u svakom od tretmana (A). Broj diferencijalno eksprimiranih gena (DEG) između dve eksperimentalne grupe (Mix i Kontrola). DEG su nađeni pomoću edgeR sa pragom značaja $\text{padj} \leq 0.005$ i $\log_2\text{FoldChange} \geq 1.0$ (B).

Prilogu 4. Od 9892 DEG, ukupno 2558 DEG je povezano sa GO terminima, pri čemu je 471 up-regulisani DEG je povezano sa “biološkim procesom”, 206 sa “ćelijskom komponentom”, i 540 sa “molekularnom funkcijom”, dok je 331 down-regulisani DEG je povezan sa “biološkim procesom”, dok je 1010 bilo povezano sa “molekularnom funkcijom” i nijedan sa “ćelijskom komponentom”. Od GO termina koji su dodeljeni DEG (Prilog 3 i Prilog 4), na Slici 17 prikazano je 20 GO termina sa najmanjim padj vrednostima. Dužina stubića predstavlja statističku značajnost svakog GO termina ($*p < 0.05$).

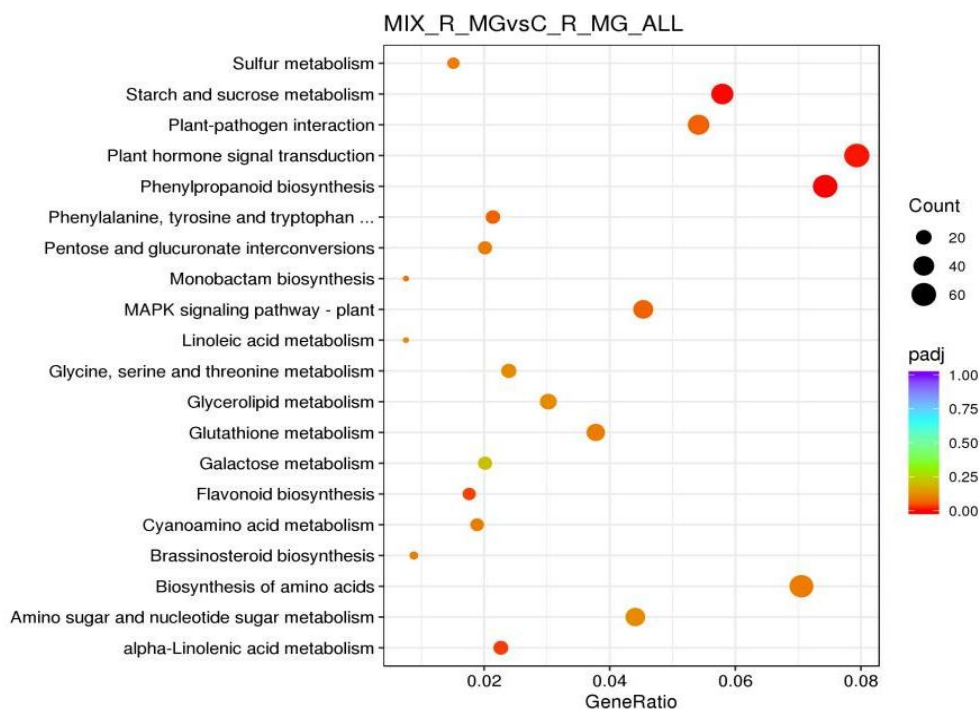
MIX_R_MGvsC_R_MG_ALL(GO)



Slika 17. Rezultati „enrichment” analize DEG.

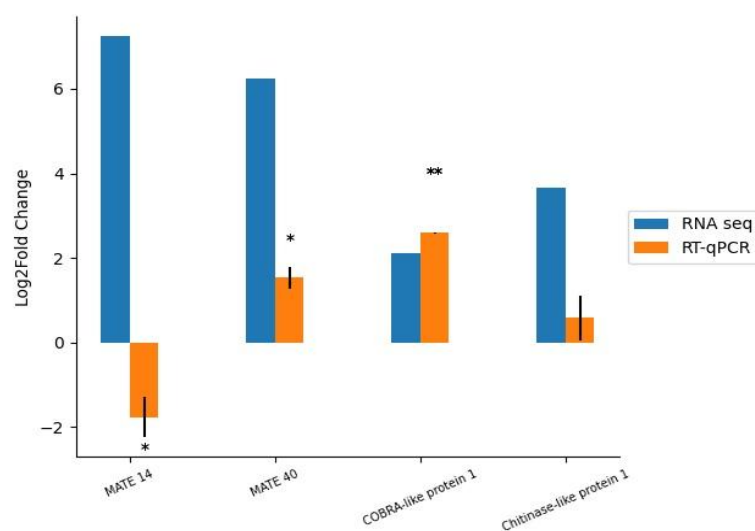
Jedan od GO termina koji su dodeljeni DEG sa povišenom ekspresijom, bio je i GO:0042221 (engl. response to chemical-odgovor na hemikaliju) (Prilog 3), a među DEG kojima je on dodeljen nalazi se i 13 gena koji sadrže konzervirani domen (PF01554) karakterističan za proteine iz familije Multidrug and Toxic compound Extrusion (MATE) protein family. Među GO terminima koji su dodeljeni up-regulisanim DEG nalazio se takođe i GO:0071554 (engl. „cell wall organization or biogenesis“), a jedan od DEG sadržao je konzervirani domen (PF04833) karakterističan za proteine iz COBRA familije proteina. 200 DEG je povezano sa ukupno pet KEGG puteva (Slika 18), uključujući Biosintezu fenilpropanoida (59 DEG), Metabolizam skroba i saharoze (46 DEG), Biljna hormonska signalna transdukcija (63 DEG), Metabolizam alfa-Linoleinske kiseline (18 DEG) i Biosinteza flavonoida (14 DEG) (Prilog 5). Na Slici 18 prikazano je 20 metaboličkih puteva sa najmanjim padj vrednostima, ali je samo pet gore navedenih imalo padj vrednost manju od 0,05. GeneRatio na x osi predstavlja odnos broja DEG u datom putu prema ukupnom broju anotiranih gena u tom putu. Veličina tačaka označava broj DEG u datom putu a boja predstavlja padj vrednost.

U cilju potvrde rezultata RNK sekvenciranja, uobičajeno je testiranje ekspresije odabranih gena i pomoću RT-qPCR analize. Inicijalno je odabrano više gena za RT-qPCR analizu. Međutim, s obzirom na nepostojanje referentnog genoma i transkriptoma *M. × giganteus*, za dizajniranje prajmera je korišćen transkriptom *Sorghum bicolor*. Zbog toga su neki od konstruisanih prajmera (Prilog 1) davali nespecifične produkte ili ih nije bilo pa nisu dalje korišćeni u eksperimentima. U tom smislu, za dalji rad je odabrano četiri gena, za koje su konstruisani prajmeri davali specifične ciljne fragmente, bez nespecifičnih proizvoda. To su bila dva gena iz familije MATE (*MATE14* i *MATE40*), koji su od svih *MATE* gena sa povišenom ekspresijom u biljkama tretiranim bakterijskim konzorcijumom u odnosu na Kontrolu imali najniže padj vrednosti, zatim jedan gen iz COBRA familije (*COBRA-like 1*) koji je takođe bio sa većom ekspresijom kod biljaka iz grupe Mix u odnosu na Kontrolu kao i gen koji kodira *chitinase-like protein 1*.



Slika 18. Rezultati KEGG enrichment analize DEG.

Rezultati RT-qPCR analize (Slika 19) pokazuju značajno veću ekspresiju gena koji kodiraju proteine MATE40 i COBRA-like protein 1 kod biljaka iz eksperimentalne grupe Mix u odnosu na Kontrolu, što je u skladu sa rezultatima dobijenim nakon RNK sekvenciranja. Međutim, ovi rezultati su se razlikovali od rezultata iz RNK sekvenciranja u pogledu intenziteta povećanja ekspresije. Prilikom RNK sekvenciranja log₂ fold change bila je 6,24 odnosno 2,10 za *MATE40* i *COBRA-like 1* gene, dok su RT-qPCR analizom dobijene vrednosti od 1,54 odnosno 2,59. Međutim, RT-qPCR analiza je pokazala smanjenu ekspresiju *MATE14* gena kod biljaka iz grupe Mix u odnosu na Kontrolu, što nije dobijeno u rezultatima RNK sekvenciranja. Gen koji kodira chitinase-like protein 1 nije pokazivao statistički značajnu promenu u ekspresiji između ove dve grupe biljaka. Rezultati RT-qPCR analize prikazani su u vidu srednjih vrednosti ± SEM (SEM-standardna greška srednje vrednosti). Zvezdice označavaju statistički značajne razlike između dve eksperimentalne grupe, Kontrole i Mix (Slika 19).



Slika 19. Poređenje rezultata RNK sekvenciranja i RT-qPCR analize za odabrane gene. (Studentov t-test, *p < 0.05, **p < 0.01).

4.4. Identifikacija *MATE* i *COBRA-like* gena u genomu *Miscanthus lutarioriparius*

Pretraživanje na osnovu homologije kao i predikcija domena (Pfam: PF01554) identifikovala je ukupno 52 gena koji potencijalno kodiraju MATE proteine, ali nakon manuelnog filtriranja po kriterijumu prisustva MatE domena i 8-12 transmembranskih domena, konačan broj gena spao je na 49 kod vrste *M. lutarioriparius*. Dužine pretpostavljenih MATE proteina kretale su se između 400 i 603 aminokiselina, molekularne mase varirale su između 43036.18 i 63540.86 Da, a izoelektrične tačke između 5,34 i 9,79. Većina proteina bila je neutralna ili parcijalno alkalna (Prilog 6). Predikcija subcelularne lokacije potencijalnih MATE proteina dala je rezultat da je 47 njih lokalizovano u ćelijskoj membrani i 2 u vakuoli (Prilog 6). Pretraživanje na osnovu homologije kao i predikcija domena (Pfam: PF04833) identifikovala je ukupno 18 gena koji potencijalno kodiraju COBRA-like proteine kod vrste *M. lutarioriparius*. Dužine predviđenih COBRA-like proteina kretale su se između 360 i 678 aminokiselina, molekularne mase između 40836,4 i 75101,24 Da, dok su se izoelektrične tačke kretale u rasponu između 5,35 i 9,05. Većina proteina bila je parcijalno alkalna ili neutralna (Prilog 7). Predikcija subcelularne lokalizacije dala je rezultat da su svi potencijalni COBRA-like proteini lokalizovani u ćelijskoj membrani (Prilog 7).

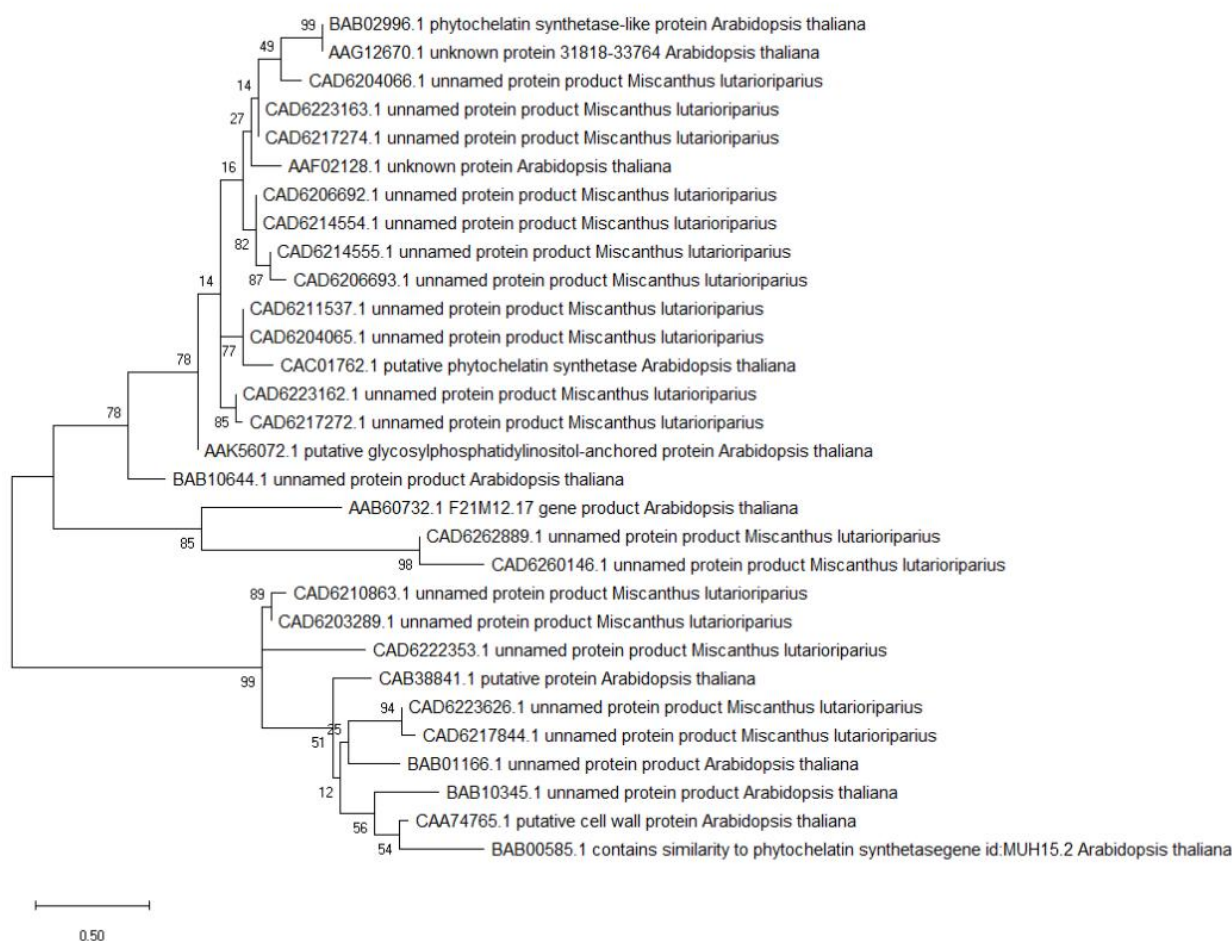
4.5. Filogenetska analiza MATE i COBRA-like proteina

Za konstrukciju neukorenjenog maximum likelihood (ML) filogenetskog stabla, radi proučavanja filogenetskih odnosa *MATE* gena koji pripadaju dvema vrstama, uzete su proteinske sekvence 56 MATE transporterata iz *A. thaliana* i 49 identifikovanih proteinskih sekvenci potencijalnih MATE transporterata iz *M. lutarioriparius*. Na osnovu topologije filogenetskog stabla, MATE transporteri *M. lutarioriparius* i *A. thaliana* grupisani su u 4 subgrupe, sa 2, 10, 7 i 30 članova u svakoj subgrupi kod *M. lutarioriparius*, odnosno 6, 9, 17 i 24 članova u svakoj subgrupi kod *A. thaliana* (Slika 20). Prema rezultatima RNK sekvenciranja, dva transkripta sa povišenom ekspresijom kod biljaka tretiranih bakterijskim konzorcijumom odgovarala su pretpostavljenim proteinima *M. lutarioriparius* CAD6335071.1 i CAD6332924.1, koji su u filogenetskom stablu bili grupisani sa proteinima označenim kao protein DETOXIFICATION 40 (AtDTX40) i protein DETOXIFICATION 14 (AtDTX14) kod *A. thaliana* (Slika 20). Rezultati predikcije subcelularne lokalizacije ukazuju da se ova dva proteina nalaze u ćelijskoj membrani (Prilog 6). RT-qPCR analizom pokazana je povišena ekspresija DTX40, ali ne i DTX14 u korenovima biljaka tretiranih bakterijskom konzorcijumom u odnosu na kontrolne biljke.



Slika 20. Neukorenjeno filogenetsko stablo konstruisano od sekvenci MATE proteina *A. thaliana* i sekvenci pretpostavljenih MATE proteina *M. lutarioriparius*.

Proteinske sekvence COBL proteina *A. thaliana* i *M. lutarioriparius* iskorišćene su za konstrukciju neukorenjenog filogenetskog stabla u cilju razjašnjenja filogenetskih odnosa COBL gena različitih biljnih vrsta. U skladu sa ortolozima *A. thaliana*, pretpostavljeni COBL proteini biljke *M. lutarioriparius* grupisani su u dve subfamilije, subfamiliju 1 i 2. Kao što se vidi sa Slike 21, 13 identifikovanih potencijalnih COBL proteina *M. lutarioriparius* i 7 proteina *A. thaliana* grupisano je u Subfamiliji 1, dok je po 5 proteina *M. lutarioriparius* i *A. thaliana* grupisano zajedno u Subfamiliji 2. Kao i kod Niu i sar. (2015), analiza je pokazala da su COBL geni nastali kao rezultat davnih duplikacija koje su se odigrale još pre odvajanja monokotiledonih i dikotiledonih biljaka. Jedan od transkripata za koji se pokazalo da ima povišenu ekspresiju kod tretiranih (Mix) u odnosu na netretirane biljke, odgovarao je pretpostavljenom proteinu *M. lutarioriparius* CAD6223163., koji je na filogenetskom stablu bio grupisan zajedno sa COBL1: COBRA -LIKE1 protein *A. thaliana* (Accession: AAF02128). Predikcija ćelijske lokalizacije ovog proteina dala je rezultat da je on lokalizovan u ćelijskoj membrani (Prilog 7). RT-qPCR analiza potvrdila je povišenu ekspresiju ovog proteina u korenovima biljaka tretiranih bakterijskom konzorcijumom u odnosu na kontrolne biljke.



Slika 21. Neukorenjeno filogenetsko stablo konstruisano od sekvenci COBRA-like proteina *A. thaliana* i sekvenci pretpostavljenih COBRA-like proteina *M. lutarioriparius*.

5. DISKUSIJA

Zemljište je veoma bogato brojnim vrstama mikroorganizama, tako da 1 g zemljišta može sadržati više od 10^9 mikroorganizama (Torsvik i Øvreås, 2002). Međutim, nisu svi mikroorganizmi prisutni u zemljištu sposobni da kolonizuju koren biljaka, iako dolaze u blizak kontakt sa njima. Mnoga istraživanja ukazala su na to da sastav rizosfernih zajednica nije nasumičan i da biljke aktivno organizuju specifične i kompleksne zajednice mikroorganizama u zoni rizosfere. Zajednice mikroorganizama koje naseljavaju rizosferu su različite i manje raznovrsne od zajednica prisutnih u zemljištu koje se nalazi dalje od korenova (eng. „*bulk soil*”) (Fan i sar., 2017), ali je sastav rizosfernih zajednica uslovljen sastavom zajednica koje se inače nalaze u tom zemljištu (de Ridder-Duine i sar., 2005). Međutim, specifični faktori poput biljnog genotipa kao i zbira abiotičkih faktora određuje sastav mikrobioma do nivoa vrste (Knights i sar., 2021). Odlagališta flotacione jalovine rudnika metala nastale kao nus proizvod rudarenja sadrže visoke koncentracije metala, a osim toga mogu imati i jako malo organske materije i makronutrijenata, kao i jako nepovoljna fizička svojstva. Iako je sadržaj organske materije u flotacionoj jalovini približno isti kao u nezagađenom zemljištu, procenat ukupnog N, dostupnog P i K bio je višestruko manji, pri čemu je koncentracija dostupnog P bila ispod granica detekcije (Andrejić i sar., 2019). Osim toga, koncentracije ukupnih i dostupnih oblika metala, uključujući Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Ni, Cd, Co i Cr, višestruko su više u odnosu na koncentracije ovih elemenata u nezagađenom zemljištu (Andrejić, 2020). Koncentracije nekih od testiranih metala, uključujući Pb, Zn, Cu, i Cd bile su nekoliko puta više od remedijacionih vrednosti za ove metale propisanih Uredbom o graničnim vrednostima zagađujućih, štetnih i opasnih materija u zemljištu ("Sl. glasnik RS", br. 30/2018 i 64/2019), a koje iznose (u mg/kg apsolutno suve materije): 530 za Pb, 720 za Zn, 190 za Cu i 12 za Cd, dok su koncentracije Ni i Co bile iznad granične maksimalne vrednosti propisane istom Uredbom a koje iznose (u mg/kg apsolutno suve materije): 35 za Ni i 9 za Co (Andrejić, 2020; Rakić i sar., 2021; Sl. glasnik RS br. 30/2018 i 64/2019). Koncentracija Mn u flotacionoj jalovini bila je višestruko veća od prosečnih vrednosti za nezagađena zemljišta koje se kreću između 411 i 550 mg/kg (Kabata-Pendias, 2011). Prema navedenoj Uredbi, za Mn nisu propisane ni granična maksimalna ni remedijaciona vrednost (Sl. glasnik RS br. 30/2018 i 64/2019). Sve ovo čini da odlagalište flotacione jalovine rudnika metala predstavlja ekstremnu sredinu za život kako biljaka, tako i mikroorganizama. Rezultati izolovanja bakterija iz supstrata donetog sa odlagališta flotacione jalovine rudnika metala rudnika Pb/Zn/Cu u centralnoj Srbiji pokazali su isto. Naime, izolovan je mali broj bakterijskih izolata, ukupno 75 i pritom su svi bili iz rizosfere korenova *Miscanthus × giganteus* biljaka raslih na ovom odlagalištu flotacione jalovine, dok iz supstrata koji se nalazio u blizini korenova, kao i iz supstrata koji se nalazio daleko od korenova nije izolovan nijedan izolat.

Glavni ciljevi prilikom tretmana zemljišta oštećenog rudarenjem je sprečavanje kontakta ljudi i životinja sa polutantima i stabilizacija otpadnih produkata rudarenja kako se ne bi dalje raznosili putem vode ili vazduha. Uslovi kakvi postoje na odlagalištu flotacione jalovine rudnika metala, značajno otežavaju rast i opstanak svih živih organizama, te je fitoremedijacija bez prethodnog tretmana drugom remedijacionom metodom veoma zahtevan izazov. Za razliku od fizičko-hemijskih metoda, bioremedijacija je isplativa i potpuno ekološki prihvatljiva metoda koja poboljšava kvalitet zemljišta povećanjem plodnosti i sprečavanjem erozije i ispiranja metala (Yan i sar., 2020). Biljke i njihovi povezani mikroorganizmi su ključni igrači u ovom procesu, a razumevanje regrutovanja i faktora pomoću kojih rizobakterije koje podstiču rast biljaka (PGPR) stupaju u interakciju sa biljkama je od suštinskog značaja za fitoremedijaciju uz pomoć bakterija. Mada nije nativan u Evropi, *M. × giganteus* veoma uspešno je domestifikovan, pri čemu uspeva čak i u severnim delovima Evrope i zbog velikih prinosa gaji se za dobijanje biomase. Zbog otpornosti na razne abiotičke i biotičke faktore, ispitivan je potencijal primene *M. × giganteus* u fitoremedijaciji. Prema Andrejić i sar. (2019), *M. × giganteus* gajen na odlagalištu flotacione jalovine rudnika metala Pb/Zn/Cu u centralnoj Srbiji, pokazao je sposobnost da toleriše izuzetno visoke koncentracije metala, kao i nedostatak nutrijenata kao što

su N, P i K kakvim se ovaj supstrat odlikuje. Najveća koncentracija metala je opet detektovana u korenovima sa biokoncentracionim faktorom većim od 1 za Cu i Zn, i manjim od 1 za Pb. Prema ovom istraživanju, *M. × giganteus* ponašao se kao ekskluder za Cu i Pb, ali i za Zn, što se razlikuje u odnosu na Nurzhanova i sar. (2019) kada se ponašao kao akumulator za Zn. Odlagalište flotacione jalovine rudnika metala je izuzetno surova sredina za žive organizme što potvrđuje i naše istraživanje gde iz supstrata nismo izolovali mikroorganizme. Biljke u neposrednu okolinu korena, rizosferu, izlučuju korenske ekskudate koji sadrže različita jedinjenja poput amino kiselina, šećera, faktora rasta, vitamina, masnih kiselina i organskih kiselina koja zbog svog značaja za bakterije kao izvor C i energije deluju kao hemoatraktanti za njihovo privlačenje iz okolnog zemljišta (Santoyo, 2022). Dakle, struktura, sastav i brojnost zajednica mikroorganizama značajno su uslovljene sastavom korenskih eksudata, biljne i bakterijske vrste, nutritivnog statusa, tipa zemljišta i drugih faktora sredine (Souza i sar., 2015; Wang i sar., 2021b). Neke od komponenti prisutnih u korenskim ekskudatima mogu specifično regrutovati određene bakterijske taksone u rizosferu, a zatim te bakterije kroz „quorum sensing“ mehanizme komunikacije regrutuju druge bakterije, kako su pokazali Lin i sar. (2022). Rizosfera *M. × giganteus* u ovom istraživanju je sadržala relativno mali broj i malu raznovrsnost bakterijskih vrsta koje pripadaju rodovima *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Arthrobacter* od koji prva dva roda spadaju u grupu robusnih, sporogenih mikroorganizama sposobnih da prežive u veoma nepovoljnim uslovima sredine. Dodatno svi sojevi osim *Pseudomonas chlororaphis* Bo imali su sposobnost da rastu u uslovima fiziološki indukovane suše što je u skladu sa sredinom iz koje su izolovani. Uprkos činjenici da su sojevi izolovani iz supstrata bogatog toksičnim metalima svi izolovani sojevi nisu mogli da prežive u medijumu sa dodatkom HgSO₄, BaCrO₃, CdSO₄ ili ZnSO₄, bar ne u testiranom opsegu koji se kretao od 1 mM do 15 mM. Čak i najmanja primenjena koncentracija (1 mM) predstavlja značajnu koncentraciju metala, te je stoga moguće da sojevi tolerišu prisustvo ovih metala, samo u koncentracijama manjim od 1 mM. Prema De i sar. (2003), izolati iz morske vode i sedimenata tolerantni na Hg bili su iz rodova *Pseudomonas*, *Proteus*, *Xanthomonas*, *Alteromonas*, *Aeromonas* i *Enterobacteriaceae* i tolerisali su do 50 ppm Hg, što je manje od najmanje koncentracije testirane u ovom istraživanju. Prisustvo zagađenja, uključujući toksične metale značajno utiče na ostvarivanje interakcija biljke sa rizosfernim bakterijama, jer između ostalog, menja i obrazac sekrecije korenskih eksudata. Zadel i sar. (2022) pokazali su u *in vitro* studiji da biljke *M. × giganteus* imaju veće stope ekskrecije korenskih eksudata u odgovoru na prisustvo toksičnih metala (Cd, Pb i Zn), a primećeno je da dolazi i do promene u sastavu korenskih eksudata u pogledu azota i jednog broja organskih kiselina. Takođe, korenski eksudati biljaka tretiranih toksičnim metalima, dodat u medijum za rast ove bakterije ima drugačiji efekat u odnosu na korenske ekskudate kontrolnih biljaka, pri čemu je zaključak da toksični metali značajno utiču na interakciju korena sa rizosfernim bakterijama, kao i da postoji uzajamna korist u ovakvim uslovima za oba člana (Zadel i sar., 2022).

Bakterijski izolati imali su sposobnost solubilizacije neorganskih fosfata, produkcije siderofora, aktivnost ACC deaminaze, produkciju indol-3-sirćetne kiseline i sposobnost slobodne fiksacije azota, što spada u PGP karakteristike. Soj *Bacillus safensis* Do posedovao je sve analizirane PGP osobine, sposobnost rasta na visokoj temperaturi, visokoj koncentraciji soli i u uslovima suše. Osim PGP karakteristika koje mogu direktno stimulisati rast biljke kroz navedene osobine (Trivedi i sar., 2022), izolati su testirani i na prisustvo mehanizama kojima bi potencijalno indirektno doprineli rastu biljaka, kao što je biokontrola patogena. U tom smislu, izolati su testirani na antimikrobnu aktivnost protiv odabranih biljnih patogena, i pokazali zbirno aktivnost protiv svih testiranih patogena. Izolat *P. chlororaphis* Bo sa najjačom antimikrobnom aktivnošću protiv testiranih biljnih patogena, produkovao je fenazin-1-karboksilnu kiselinu (PCA), jedinjenje sa antifungalnim i antibakterijskim dejstvom (Simionato i sar., 2017). Svih šest izolata produkovalo je najmanje dva od pet testiranih egzoenzima koji se, takođe, mogu smatrati indirektnim mehanizmom stimulacije rasta, s obzirom da mogu pružiti zaštitu biljkama od patogenih gljiva i mikroorganizama kroz hidrolizu ćelijskog zida patogena

(Hassan, 2017). Osim u biokontroli, ekstracelularni enzimi poput ksilanaze i mananaze, ali i drugi razlažu komponente ćelijskog zida biljaka i imaju važnu ulogu u probijanju kroz polisaharidnu barijeru korena i uspešnu kolonizaciju korena (Zhang i sar., 2022b).

Prethodna istraživanja su pokazala da brojni faktori utiču na interakciju biljka – bakterija tako da formiranje bakterijskih konzorcijuma u tom smislu može imati povoljni efekat na biljke u odnosu na primenu pojedinačnih sojeva (Domenech i sar., 2006). Tretman biljaka *M. × giganteus* bakterijskim konzorcijumom koji se sastojao od šest odabranih sojeva *Pseudomonas chlororaphis* Bo, *Bacillus toyonensis* Co, *B. safensis* Do, *Arthrobacter sp.* B21, *B. aryabhatai* B22 i *B. thuringiensis* F4 značajno je doprineo rastu i fitnesu biljaka prilikom gajenja u supstratu poreklom sa odlagališta flotacione jalovine rudnika metala. Inokulisane biljke *M. × giganteus* su imale povećanu apsorpciju i akumulaciju svih analiziranih metala. Studija o sposobnosti fitoremedijacije *M. floridulus* pokazuje da ona u velikoj meri zavisi od različitih ekoloških karakteristika rizosfere i drugih bakterijskih zajednica (Wu i sar., 2022). Bakterijska inokulacija različitih vrsta kao što je *Salix atrocinnerea* poboljšala je parametre rasta biljaka i efikasnost fitoremedijacije elemenata u tragovima (Navazas i sar., 2022). Značaj inokulacije bakterijama u poboljšanju potencijala fitoremedijacije je dokumentovan u studiji sa *M. × giganteus* i sojem *B. altitudinis* K-14. Međutim, za razliku od našeg istraživanja, koje je sprovedeno u supstratu poreklom sa odlagališta flotacione jalovine rudnika metala, ova studija je sprovedena na kontaminiranom zemljištu. Ovi potpuno različiti supstrati za rast biljaka obezbeđuju bitno različite uslove rasta, drugačiju početnu zajednicu mikroorganizama, različitu dostupnost hranljivih materija, itd. Značaj sredinskih parametara kao što su karakteristike zemljišta, stepen zagađenja, praksa gajenja, geografska lokacija i slično zajedno sa vrstom biljke su glavni faktori koji doprinose sastavu zajednice mikroorganizama u rizosferi pokazan je u ranije objavljenim radovima (Wu i sar., 2022; Wang i sar., 2021b). Interakcija između biljaka i mikroorganizama je dvosmerna. Transkripcioni odgovor *P. putida* E36 izolovanog iz korena *M. × giganteus* bio je pogođen toksičnim metalima i razlikovao se od onog kada je ovaj izolat bio izložen i toksičnim metalima i ekskudatima korena *M. × giganteus* tretiranog toksičnim metalima (Zadel i sar., 2022).

Naši rezultati su pokazali da tretman bakterijama smanjuje aktivnost katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD) u listovima u odnosu na netretirane biljke. Dodatno, tretman je, iako ne statistički značajno, povećao relativni sadržaj vode, smanjio sintezu prolina i stepen lipidne peroksidacije ukazujući na sveopšti pozitivan efekat na biljke koje su inače navikle da rastu u ovako stresnim uslovima. Na oksidativni stres različite biljke reaguju različito i u smislu aktivnosti antioksidativnih enzima, a razlike postoje i kod pripadnika istog roda. Studija Guo i sar. (2016a) je pokazala da aktivnost SOD u listovima *M. sinensis* i *M. sacchariflorus* pod uticajem Cd stresa je bila veća nego kod *M. floridulus*. Što se tiče CAT, uočeno je povećanje aktivnosti kod *M. sinensis* samo do određene koncentracije Cd, kada je najveća, a zatim sa daljim povećanjem koncentracije aktivnost opada, dok je kod druge dve testirane vrste aktivnost kontinuirano rasla sa povećanjem koncentracije Cd. Prema istraživanju Ezaki i sar. (2008) kod biljaka *M. sinensis* i *Andropogon virginicus*, najmanje tri mehanizma su uključena u toleranciju na Al: transport Al iz korenova u nadzemne delova, supresija akumulacije Al u vrhovima korenova, jer su oni veoma važan region za rast korenova i sprečavanje oksidativnih oštećenja kroz povećanje bazalne aktivnosti enzima SOD i CAT nakon izlaganja Al. Al Souki i sar. (2021) testirali su odgovor tri različita kultivara *M. × giganteus* na rastuće koncentracije metala (Cd, Pb i Zn) u zemljištu. Njihovi rezultati ukazuju da, iako dolazi do smanjenja broja listova, dijametra stabla kao i fotosintetskih pigmenta pod dejstvom metala, *M. × giganteus* je sposoban da toleriše ovu vrstu stresa i tom prilikom povećava se koncentracija fenolnih jedinjenja, flavonoida, tanina i antocijanina, kao i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (SOD, APX i GR). Mada prema Al Souki i sar. (2022), aktivnosti SOD, APX i GR rastu sa povećanjem koncentracije toksičnih metala kod *M. × giganteus* gajenog u saksijama sa zagađenim zemljištem uzetim sa parcela u blizini topionice Pb, koje karakteriše rastuća

koncentracija Pb, prema Bastia i sar. (2023), *M. × giganteus* gajen *in situ*, na istim parcelama, ne beleži povišenu aktivnost enzima APX i SOD u odnosu na biljke gajene na nezagađenom zemljištu. Manja aktivnost ovih enzima se objašnjava činjenicom da su biljke u polju, iz više razloga, akumulirale manje koncentracije metala u listovima, te stoga nisu ni bile u stanju oksidativnog stresa, što se videlo i na osnovu drugih merenih markera stresa.

Smanjena aktivnost enzima SOD i CAT u listovima biljaka Mix u odnosu na listove Kontrole, zabeležena je uprkos povećanim koncentracijama metala (Zn, Mn, Cd i Cr) u listovima Mix biljaka. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Waheed i sar. (2022) koji su pratili antioksidativni odgovor biljke *Eruca sativa* Mill. na rastuće koncentracije Cd. Akumulacija Cd u listovima rasla je sa primenom rastuće koncentracije Cd, ali sa njom su istovremeno opadale aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (SOD, CAT, APX i GPX), a rasle koncentracije neenzimskih antioksidanasa (ukupni askorbat, askorbinska kiselina, dehidroaskorbat, tioli i prolin), te stoga iako je došlo do inhibicije antioksidativnih enzima, druge neenzimske komponente bile su indukovane. Inhibicija enzima CAT i SOD od strane Cd^{2+} zabeležena je i kod životinja, pa je npr. kod pacova ustanovljeno da dva izozima (Mn-SOD i Cu/Zn-SOD) bivaju inhibirani kadmijumom kroz različite mehanizme. Mn-SOD je inhibiran zbog supstitucije mangana kadmijumom, a dodavanjem Mn^{2+} uklanja inhibiciju, dok u slučaju Cu/Zn-SOD inhibicija prolazna, tako da je inhibicija verovatno nastala usled interakcije kadmijuma sa enzimom, pri čemu dolazi do narušavanja topografije i samim tim katalitičke aktivnosti enzima (Casalino i sar., 2002). Kod nekih biljaka, uključujući *M. sinensis*, tretman Cd dovodi do povišene aktivnosti CAT do određene koncentracije, dok sa daljim povećanjem koncentracije primenjenog Cd, aktivnost CAT je opadala (Guo i sar., 2016a). Slično opadanje aktivnosti CAT zabeleženo i kod kukuruza kada je primenjena rastuća koncentracija Cr (Sharma i sar., 2003). Cr dovodi do disbalansa esencijalnih elemenata, zato što u kompeticiji za usvajanje sa Fe i Ca, pri čemu Fe može biti izmenjen iz aktivnih mesta od strane Cr (Abdullah i sar., 2024). S obzirom na to da je katalaza enzim koji sadrži hem grupu, uočeno smanjenje njene aktivnosti kod kukuruza iznad određene koncentracije Cr, može biti usled interakcije Fe i Cr, ili zato što Cr smanjuje dostupnost gvožđa enzimu (Sharma i sar., 2003). Prema Nieboer i Richardson (1980), metali/metaloidi su svrstani u tri klase prema afinitetu vezivanja liganada u vodenom rastvoru: klasu A (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Fr^+ , Be^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ra^{2+} , Al^{3+} , Sc^{3+} , Y^{3+} , lantanidi, aktinidi) koji imaju afinitet prema ligandima sa kiseonik-vezujućim mestom, klasu B (Ag^+ , Au^+ , Cu^+ , Tl^+ , Pd^{2+} , Pt^{2+} , Hg^{2+} , Rh^{2+} , Ir^{3+} , Bi^{3+} , Tl^{3+} , Pb^{4+}) koji imaju afinitet prema centrima koji poseduju azot i/ili sumpor i intermedijarnu klasu (Ti^{2+} , V^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+} , As^{3+} , Sb^{3+} , Sn^{4+}) koji mogu, sa različitim afinitetima, formirati stabilne komplekse sa svim ligandima sa kojima joni klasa A i B formiraju komplekse. Radijus jona Cd(II) je 0,97 Å, što je skoro identično radijusima jona Ca(II) i Na(I), koji imaju 0,99 i 1,02 Å, dok od radijusa Zn, sa kojim pripada istoj koloni periodnog sistema elemenata, ima za 20% veći radijus. Stoga je postulirano da joni Cd^{2+} mogu izmestiti navedene jone iz njihovih bioloških pozicija. Primećeno je npr. da Cd^{2+} može vršiti supstituciju Ca^{2+} u kostima, što je opisano kao „Itai Itai“ bolest, odnosno hronično trovanje kadmijumom, kod ljudi koji su konzumirali hranu i vodu sa obogaćenim sadržajem Cd (Remelli i sar., 2016; Moulis, 2010). Takođe, opšte prihvaćen stav je da su Cd i Ca u kompeticiji za usvajanje na membranama ćelija korena, zbog sličnog radijusa i naelektrisanja. Dodavanje $CaCl_2$ umanjilo je toksične efekte izazvane $CdCl_2$ kod *A. thaliana*, smanjilo usvajanje Cd i dovelo do promena u distribuiranosti Cd u listovima (Zeng i sar., 2017). Podaci o interakcijama Cd i Zn su kontradiktorni, odnosno primećeni su i inhibitorni i stimulatívni efekti na usvajanje i akumulaciju u biljnim tkivima (Kabata-Pendias, 2011). U ovom istraživanju, biljke iz eksperimentalne grupe Mix imale su povišene koncentracije i Zn i Cd u listovima, u odnosu na Kontrolu. Cd ima sposobnost da gradi komplekse preferencijalno sa grupama koje sadrže sumpor, sa naročito visokim afinitetom za sulfhidrilne grupe, ali gradi komplekse i sa grupama koje sadrže azot i kiseonik. Dakle, raznovrsnost potencijalnih liganada u ćeliji za Cd je velika. Prema Singh i sar. (2016), toksičnost metala kod biljaka ostvarena je kroz četiri mehanizma,

uključujući kompeticiju sa nutrijentima za usvajanje na nivou korena, narušavanje strukture i funkcije proteina kroz direktne interakcije sa sulfhidrilnim grupama proteina, zatim izmenu esencijalnih katjona iz njihovih mesta vezivanja što vodi ka narušavanju funkcije proteina i kroz produkciju ROS koji oštećuju makromolekule u ćeliji. Iako je koncentracija metala bila viša, a aktivnost enzima antioksidativne zaštite (SOD i CAT) bila niža u listovima biljaka Mix u odnosu na Kontrolu, nivo lipidne peroksidacije kao i koncentracija H₂O₂ bili su približno isti kod obe eksperimentalne grupe. Osim toga, biljke tretirane bakterijama imale su i značajno veći broj listova koji su bili sa manjim stepenom vidljivih oštećenja.

Analiza transkriptoma u ovom istraživanju pokazala je da tretman bakterijama izolovanih iz rizosfere *M. × giganteus* dovodi do promene u ekspresiji 9892 gena u korenu. Među genima sa povišenom ekspresijom bilo je, između ostalih, i gena koji učestvuju u odgovoru na oksidativni stres, prisustvo toksičnih jedinjenja, organizaciju ili sintezu ćelijskog zida i druge. Među njima bilo je 13 gena koji kodiraju MATE proteine koji učestvuju u odgovoru na toksična jedinjenja i jedan gen koji kodira COBRA-like protein 1 a učestvuje u procesima organizacije i sinteze ćelijskog zida. RT-qPCR analizom pokazali smo da je zaista povišena ekspresija *MATE40* kao i *COBL1* gena prisutna kod biljaka tretiranim bakterijskim konzorcijumom u odnosu na kontrolne netretirane biljke. MATE familija transportera prisutna je kod svih organizama, ali je kod biljaka prošla kroz značajno uvećanje broja kroz tandemske ili segmentalne duplikacije, što ukazuje na posebnu ulogu ovih gena kod biljaka (Santos i sar., 2017). Nalaze se u membranama, gde obavljaju uloge u transportu sekundarnih metabolita, toksičnih jedinjenja i metala, kontroli bolesti i transportu biljnih hormona (Du i sar., 2021; Huang i sar., 2021). Broj *MATE* gena varira među različitim biljnim vrstama i analize genoma i ekspresije ovih gena urađene su kod nekih ekonomski važnih biljaka poput krompira (Huang i sar., 2021), paradajza (Santos i sar., 2017), jabuke (Zhang i sar., 2021), pirinča (Tiwari i sar., 2014), soje (Liu i sar., 2016), kao i kod model-biljke *A. thaliana* (Li i sar., 2002). Funkcionalne analize ovih proteina kao i filogenetske klasifikacije su i dalje nepotpune i nedovoljno jasne. Za vrste roda *Miscanthus* nije poznat broj, raspored po hromozomima, filogenetički odnosi kao ni obrazac ekspresije MATE proteina. Funkcije različitih članova MATE familije su veoma raznolike i značajne za biljku i obuhvataju uloge u razvoju organa, transportu hormona, odbrani od abiotičkih i biotičkih stresora. Međutim, njihova ekspresija zavisi od biljne vrste, specifične vrste stresa, stadijuma razvoja, tkiva i drugih nepoznatih faktora. Način na koji su regulisani je i dalje nejasan. Huang i sar. (2021) su ispitivanjem ekspresije *MATE* gena kod krompira pod uticajem različitih metala (Cu, Cd, Zn, Ni i Pb) tokom različitog perioda izlaganja, primetili da njihova ekspresija zavisi od tipa tkiva, tipa stresora kao i dužine perioda izlaganja stresu. Sivaguru i sar. (2013) istakli su značaj *SbMATE* gena kod *Sorghum bicolor*, koji kodira membranski transporter koji vrši efluks citrata, u vršnim delovima korenova prilikom stresnih uslova izazvanih prisustvom Al. Ekskrecija citrata je lokalizovana u zoni koja su najviše pogođena oštećenjima od strane Al. Ekskudacija citrata u ovoj zoni predstavlja mehanizam tolerancije jer pruža zaštitu ćelijama najosetljivijim na Al. Takođe, primetili su da se oporavak korena dešava uporedo sa ekspresijom *SbMATE*. Kod soje je primećeno da jedan od *MATE* gena, *GmMATE75*, takođe eksprimiran u vrhovima korenova pruža zaštitu od Al. Ekspresija nekoliko *MdMATE* gena kod jabuke aktivirana je u odgovoru na različite vrste patogena, što ukazuje na značaj ovih gena u borbi sa biotičkim stresom (Zhang i sar., 2021).

Imajući u vidu da su korenovi prve strukture koje dolaze u kontakt sa toksičnim metalima, i uopšte detektuju i odgovaraju na sve promene koje se dešavaju u zemljištu, kao i da služe za usvajanje nutrijenata i vode, u ovom istraživanju analizirani su korenovi u smislu uticaja rizobakterija na ekspresiju gena u njima. Prethodno navedeni radovi Wang i sar. (2024b) i Nie i sar. (2021) uočili su da se u korenovima dešavaju komplikovanije i drastičnije promene ekspresije gena pod uticajem toksičnih metala. Zbog toga, odgovor na pitanje mehanizama koji se aktiviraju usled tretmana *M. × giganteus* bakterijskim konzorcijumom, a dovode do boljeg usvajanja metala uz veći rast i manje ispoljavanje simptoma stresa, tražen je u korenovima. Kod

biljaka tretiranih bakterijama, veći broj gena (5134) u korenovima beleži povećanje, a manji broj gena (4758) smanjenje ekspresije u odnosu na kontrolne netretirane biljke. Geni čija se ekspresija razlikuje uključeni su u biosintezu fenilpropanoida, metabolizam skroba i saharoze, signalnu transdukciju biljnih hormona, metabolizam linoleinske kiseline i biosintezu flavonoida. Neki od ovih puteva, poput biosinteze flavonoida, metabolizma skroba i saharoze kao i hormonske signalne transdukcije, aktiviraju se kod drugih vrsta *Miscanthus* u odgovoru na Cd (Wang i sar., 2024b; Guo i sar., 2016b), ali je ovde uočeno da rizobakterije takođe utiču na ove biološke puteve u uslovima povišene koncentracije metala. Dakle, bakterijski konzorcijum modifikuje metabolizam polisaharida i lipida, utiče na signalnu transdukciju i biosintezu sekundarnih metabolita biljaka (u ovom slučaju flavonoida), što se vidi iz KEGG analize. Flavonoidi su sekundarni metaboliti biljaka koji se sintetišu u fenilpropanoidnom putu i imaju važnu ulogu kao antioksidansi, ali i u procesima rasta i razvića korenova. Od količine akumuliranih flavonoida zavisi efekat koji ostvaruju na razviće korenova, što je utvrđeno kod mutanata sa mutacijama u genima za biosintezu flavonoida. Generalno, mehanizmi putem kojih ostvaruju efekat na razviće korena odnose se na regulaciju transporta auksina i akumulaciju u vrhovima korenova (Xu i sar., 2019). Kod *are* mutanata paradajza sa defektnom sintezom flavonola, pokazano je da flavonoli pozitivno regulišu formiranje lateralnih korenova, a negativno formiranje korenskih dlaka, kroz modulaciju transporta auksina i ROS (Maloney i sar., 2014). Od ranije je poznat efekat bakterija na obrazac ili količinu eksudovanih flavonoida od strane biljaka (Dardanelli i sar., 2012).

COBRA-like (*COBL*) geni kodiraju glikozilfosfatidilinozitol (GPI)-ukotvljene proteine koji su specifični za biljke i nalaze se na granici plazma membrana-ćelijski zid. Imaju ulogu u regulaciji ekspanzije ćelijskog zida i depozicije celuloze. Celulozni mikrofibrili su važan faktor u određivanju orijentacije ćelijske ekspanzije, procesa koji je od suštinskog značaja za biljnu morfogenezu (Roudier i sar., 2005). *cobra* mutant kod *A. thaliana* ima poremećenu morfogenezu korena (Benfey i sar., 1993). Broj gena *COBRA-like* familije varira među različitim biljnim vrstama (Li i sar., 2019). Ektopična ekspresija *COBL* gena pamuka *GhCOBL9A* u *A. thaliana*, rezultuje u elongaciji ćelija, zadebljavanju ćelijskog zida i povećanju biomase. Prekomerna ekspresija ovog gena takođe je povezana sa povećanom ekspresijom gena za celuloznu sintazu (*CesA*) i povećanom depozicijom celuloze (Niu i sar., 2018). Uočena je uloga ovih gena pod stresnim uslovima. Zaheer i sar. (2022) identifikovali su pet *COBL* gena kod *Triticum aestivum* koji su menjali ekspresiju u odgovoru na sušu. Prema Bahmani i sar. (2022), pod uticajem Cd dolazi do povećanja dužine i broja korenskih dlaka kao i povećanog nivoa ROS kod *A. thaliana*. Takođe, pod uticajem Cd i ROS dolazi do smanjenja ekspresije tri kinaze (eng. “*Proline-rich elongation-like receptor kinase*”-PERK) i to *PERK5*, *PERK8* i *RHS10*, kao i povećanja ekspresije dva elongaciona faktora *EXPA7* i *EXPA18*, i *COBRA-like 9* (*COBL9*).

Aktivacija *COBL1* gena pod uticajem bakterijskog tretmana mogla bi uticati na povećanje dužine korenova, kao i broja korenskih dlaka što je i potvrđeno našim rezultatima, dok bi povišena ekspresija *MATE40* gena dovela do povećane tolerancije i lakšeg preživljavanja stresnih uslova sredine. Pretpostavljeno je ovom prilikom da je povećanje ekspresije ovih gena vodilo ka povećanju biomase i dužine korenova, pri čemu je rezultat bio bolje usvajanje metala kroz razvijeniji koren i veća količina ekstrahovanih metala zbog veće biomase, kao i veće tolerancije stresnih uslova. Međutim, precizan mehanizam i signalni putevi koji se nalaze u osnovi interakcije biljke i bakterija u ovoj studiji *M. × giganteus* i bakterija njegove rizosfere je sigurno mnogo kompleksniji sa više učesnika u celom procesu i ostaje da se svi oni detektuju u budućim istraživanjima. Dodatno, analiza ekspresije cele familije *MATE* i *COBRA-like* gena u različitim organima *M. × giganteus* u različitim uslovima rasta mogli bi da nam pruže bolji uvid u način na koji ovi geni funkcionišu i kako su regulisani kod ove biljne vrste, a za šta nema podataka. S obzirom na njen značajan fitoremedijacioni potencijal to bi posledično moglo da

bude značajno sa aspekta formulisanja bioloških preparata koji bi sadržavali bakterijski konzorcijum za tretman biljaka pre sadnje i time povećali efikasnost procesa fitoremedijacije.

6. ZAKLJUČCI

1. Bakterije izolovane iz rizosfere *Miscanthus × giganteus* gajenog na flotacionoj jalovini poreklom sa deponije rudnika olova, bakra i cinka pripadaju rodovima *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Arthrobacter*, odnosno identifikovane su vrste *Pseudomonas chlororaphis* Bo, *Bacillus toyonensis* Co, *B. safensis* Do, *Arthrobacter* sp. B21, *B. aryabhatai* B22 i *B. thuringiensis* F4.

2. Svi testirani izolati sintetisali su proteinazu i bar još jedan od pet testiranih egzoenzima, a osim *P. chlororaphis* Bo svi izolati su rasli u prisustvu 32,6% PEG6000 kao simulatora fiziološke suše. Nijedan izolat nije mogao da raste u prisustvu HgSO₄, BaCrO₃, CdSO₄ ili ZnSO₄. Najotporniji od testiranih izolata bio je *B. toyonensis* Co, koji je jedini rastao u medijumu sa Pb(C₂H₃O₂)₂, CuSO₄, NiCl₂, MnCl₂ i NaAsO₂.

3. Najveća produkcija indol-3-sirćne kiseline detektovana je kod soja *B. aryabhatai* B22, 70,309 µg/ml. Ovaj soj je jedini koji ne sintetiše ACC deaminazu, a soj *P. chlororaphis* Bo jedini sintetiše fenazin-1-karboksilnu kiselinu. Sposobnost solubilizacije fosfata je detektovana kod sojeva *P. chlororaphis* Bo, *B. safensis* Do, i *B. aryabhatai* B22. Sojevi *B. safensis* Do, *Arthrobacter* sp. B21, *B. aryabhatai* B22 i *B. thuringiensis* F4 imaju sposobnost fiksacije azota. Produkcija siderofora je detektovana kod svih sojeva osim *B. aryabhatai* B22 i *B. thuringiensis* F4.

4. Antimikrobni potencijal bakterija detektovan je prema odabranim biljnim patogenima gde je najosetljiviji bio *P. syringae* na koji su delovali svi testirani sojevi, a najotporniji *P. fuscovaginae*, na koji je delovao samo *B. safensis* Do. Svi izolati su pokazivali sva tri tipa testirane pokretljivosti plivanje, ronjenje i trzanje. Nakon 48 sati produkcija biofilma različite jačine je detektovana kod svih izolata.

5. Konzorcijum koga čine svih šest izolata kojim su tretirani rizomi *M. × giganteus* pre gajenja u supstratu uzetom sa flotacione jalovine pokazuje sposobnost da promovise rast biljke kroz brži rast, manji stepen vidljivih oštećenja listova, veću visinu, veću svežu i suhu masu listova, stabla i korena. Tretirane biljke imale su statistički značajno veću dužinu glavnih i bočnih korenova.

6. Biljke tretirane bakterijskim konzorcijumom imale su povećan fitoremedijacioni potencijal koji se ogledao u povećanoj akumulaciji toksičnih metala u odnosu na kontrolne biljke. Najveća akumulacija je kod obe grupe biljaka zabeležena u korenovima za sve analizirane metale osim za Zn, Mn i Cr, kao i Cd kod tretiranih biljaka, koji su najviše akumulirani u rizomu.

7. Aktivnost antioksidativnih enzima superoksid dismutaze i katalaze je bila značajno veća kod kontrolnih u odnosu na tretirane biljke. Parametri stresa, vodnog deficita, relativni sadržaj vode, lipidna peroksidacija i koncentracija vodonik peroksida kod tretiranih biljaka ukazuju na zaštitni efekat tretmana, ali nema statistički značajne razlike u odnosu na netretirane biljke.

8. Analiza transkriptoma je pokazala 5134 gena sa povećanom ekspresijom u odnosu na 4758 gena sa sniženom ekspresijom kod tretiranih biljaka. Diferencijalno ekspimiranim genima *M. × giganteus* tretiranim bakterijama izolovanim iz njegove rizosfere dodeljeno je 32 GO termina za gene sa povišenom i 64 za gene sa sniženom ekspresijom.

9. Dobijeni rezultati su potvrdili povećanu ekspresiju gena *MATE 40* koji kodira za izbacivanje toksičnih jedinjenja i različitih antibiotika iz biljke i uključen je u njen odgovor na abiotički i biotički stres. Drugi gen sa povećanom ekspresijom bio je *COBRA-like protein 1* koji kodira za glikozilfosfatidilinozitol protein uključen u zadebljavanje ćelijskog zida, ćelijsko izduživanje i povećanje biomase.

7. LITERATURA

- Abdullah, Wani, K. I., Naeem, M., Jha, P. K., Jha, U. C., Aftab, T., & Prasad, P. V. (2024). Systems biology of chromium-plant interaction: insights from omics approaches. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1305179. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1305179>
- Abou-Shanab, R. A., Ghanem, K., Ghanem, N., & Al-Kolaibe, A. (2008). The role of bacteria on heavy-metal extraction and uptake by plants growing on multi-metal-contaminated soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*, 253-262. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9464-x>
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial biotechnology*, *7*(3), 196-208. [10.1111/1751-7915.12117](https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117)
- Ajeesh Krishna, T. P., Maharajan, T., Victor Roch, G., Ignacimuthu, S., & Antony Ceasar, S. (2020). Structure, function, regulation and phylogenetic relationship of ZIP family transporters of plants. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 662. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00662>
- Alejandro, S., Meier, B., Hoang, M. T. T., & Peiter, E. (2023). Cation diffusion facilitator proteins of *Beta vulgaris* reveal diversity of metal handling in dicotyledons. *Plant, Cell & Environment*, *46*(5), 1629-1652. <https://doi.org/10.1111/pce.14544>
- Alori, E. T., Gabasawa, A. I., Elenwo, C. E., & Agbeyegbe, O. O. (2022). Bioremediation techniques as affected by limiting factors in soil environment. *Frontiers in Soil Science*, *2*, 937186. <https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.937186>
- Al Souki, K. S., Liné, C., Douay, F., & Pourrut, B. (2021). Response of Three *Miscanthus* × *giganteus* Cultivars to Toxic Elements Stress: Part 1, Plant Defence Mechanisms. *Plants*, *10*(10), 2035. [10.3390/plants10102035](https://doi.org/10.3390/plants10102035)
- Al Souki, K. S., Liné, C., Moravec, J., Douay, F., & Pourrut, B. (2022). Response of three *miscanthus* × *giganteus* cultivars to toxic elements stress: part 2, comparison between two growing seasons. *Plants*, *11*(7), 945. <https://doi.org/10.3390/plants11070945>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, *25*(17), 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Ambreetha, S., Chinnadurai, C., Marimuthu, P., & Balachandar, D. (2018). Plant-associated *Bacillus* modulates the expression of auxin-responsive genes of rice and modifies the root architecture. *Rhizosphere*, *5*, 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.12.001>
- Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Nature Precedings*, 1-1. <https://doi.org/10.1038/npre.2010.4282.1>
- Andrejić, G. Z. (2020). *Ispitivanje Fitoremedijacionog i Adaptivnog Potencijala Miscanthus X Giganteus (Poaceae) Gajenog na Odlagalištu Flotacione Jalovine na Planini Rudnik* (Doctoral dissertation, University of Belgrade (Serbia)).
- Andrejić, G., Šinžar-Sekulić, J., Prica, M., Dželetović, Ž., & Rakić, T. (2019). Phytoremediation potential and physiological response of *Miscanthus* × *giganteus* cultivated on fertilized and non-fertilized flotation tailings. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*, 34658-34669. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06543-7>
- Antonioli Júnior, R., Poloni, J. D. F., Pinto, É. S. M., & Dorn, M. (2022). Interdisciplinary overview of lipopeptide and protein-containing biosurfactants. *Genes*, *14*(1), 76. <https://doi.org/10.3390/genes14010076>

- Awan, S. A., Ilyas, N., Khan, I., Raza, M. A., Rehman, A. U., Rizwan, M., ... & Brestic, M. (2020). *Bacillus siamensis* reduces cadmium accumulation and improves growth and antioxidant defense system in two wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Plants*, 9(7), 878. <https://doi.org/10.3390/plants9070878>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., ... & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in plant science*, 9, 1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Bahmani, R., Kim, D., Modareszadeh, M., & Hwang, S. (2022). Cadmium enhances root hair elongation through reactive oxygen species in *Arabidopsis*. *Environmental and Experimental Botany*, 196, 104813.
- Bala, S., Garg, D., Thirumalesh, B. V., Sharma, M., Sridhar, K., Inbaraj, B. S., & Tripathi, M. (2022). Recent strategies for bioremediation of emerging pollutants: a review for a green and sustainable environment. *Toxics*, 10(8), 484. <https://doi.org/10.3390/toxics10080484>
- Banasiak, J., & Jasiński, M. (2022). ATP - binding cassette transporters in nonmodel plants. *New Phytologist*, 233(4), 1597-1612. <https://doi.org/10.1111/nph.17779>
- Barling, A., Swaminathan, K., Mitros, T., James, B. T., Morris, J., Ngamboma, O., ... & Moose, S. P. (2013). A detailed gene expression study of the *Miscanthus* genus reveals changes in the transcriptome associated with the rejuvenation of spring rhizomes. *BMC genomics*, 14, 1-16. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-864>
- Barra Caracciolo, A., & Terenzi, V. (2021). Rhizosphere microbial communities and heavy metals. *Microorganisms*, 9(7), 1462. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071462>
- Bastia, G., Al Souki, K. S., & Pourrut, B. (2023). Evaluation of *Miscanthus* × *Giganteus* Tolerance to Trace Element Stress: Field Experiment with Soils Possessing Gradient Cd, Pb, and Zn Concentrations. *Plants*, 12(7), 1560. [10.3390/plants12071560](https://doi.org/10.3390/plants12071560)
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Benfey, P. N., Linstead, P. J., Roberts, K., Schiefelbein, J. W., Hauser, M. T., & Aeschbacher, R. A. (1993). Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development*, 119(1), 57-70.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cao, Y., Tang, X., Giovannoni, J., Xiao, F., & Liu, Y. (2012). Functional characterization of a tomato COBRA-like gene functioning in fruit development and ripening. *BMC plant biology*, 12, 1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-211>
- Carolin C, F., Kumar, P. S., & Ngueagni, P. T. (2021). A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. *Journal of Hazardous Materials*, 407, 124827. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124827>
- Casalino, E., Calzaretto, G., Sblano, C., & Landriscina, C. (2002). Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology*, 179(1-2), 37-50. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00245-7](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00245-7)

- Cejudo, F. J., Sandalio, L. M., & Van Breusegem, F. (2021). Understanding plant responses to stress conditions: Redox-based strategies. *Journal of Experimental Botany*, 72(16), 5785-5788. doi: 10.1093/jxb/erab324
- Chen, Z., Pan, X., Chen, H., Lin, Z., & Guan, X. (2015). Investigation of lead (II) uptake by *Bacillus thuringiensis* 016. *World journal of microbiology and biotechnology*, 31, 1729-1736. doi: 10.1007/s11274-015-1923-1
- Cock, P. J., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L., & Rice, P. M. (2010). The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic acids research*, 38(6), 1767-1771. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1137>
- Colangelo, E. P., & Guerinot, M. L. (2006). Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current opinion in plant biology*, 9(3), 322-330. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.015>
- Corbineau, F., Xia, Q., Bailly, C., & El-Maarouf-Bouteau, H. (2014). Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. *Frontiers in plant Science*, 5, 539. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00539>
- Cui, K., Xu, T., Chen, J., Yang, H., Liu, X., Zhuo, R., ... & Zhu, Y. (2022). Siderophores, a potential phosphate solubilizer from the endophyte *Streptomyces* sp. CoT10, improved phosphorus mobilization for host plant growth and rhizosphere modulation. *Journal of Cleaner Production*, 367, 133110. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133110>
- Cvetković, O., Pivić, R., Dinić, Z., Maksimović, J., Trifunović, S., & Dželetović, Ž. (2016). Chemical investigation of *Miscanthus × giganteus* Greef et Deu. Cultivated in Serbia: A potential renewable source of energy. *Zaštita materijala*, 57(3), 412-417.
- Damo, J. L. C., Ramirez, M. D. A., Agake, S. I., Pedro, M., Brown, M., Sekimoto, H., ... & Ohkama-Ohtsu, N. (2022). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from paddy field soils in Japan. *Microbes and environments*, 37(2), ME21085. 10.1264/jsme2.ME21085
- Dardanelli, M. S., de Córdoba, F. J. F., Estévez, J., Contreras, R., Cubo, M. T., Rodríguez-Carvajal, M. Á., ... & Megías, M. (2012). Changes in flavonoids secreted by *Phaseolus vulgaris* roots in the presence of salt and the plant growth-promoting rhizobacterium *Chryseobacterium balustinum*. *Applied Soil Ecology*, 57, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.01.005>
- De, J., Ramaiah, N., Mesquita, A., & Verlekar, X. N. (2003). Tolerance to various toxicants by marine bacteria highly resistant to mercury. *Marine Biotechnology*, 5, 185-193. <https://doi.org/10.1007/s10126-002-0061-6>
- de Ridder-Duine, A. S., Kowalchuk, G. A., Gunnewiek, P. J. K., Smant, W., van Veen, J. A., & de Boer, W. (2005). Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(2), 349-357. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.005>
- De Zutter, N., Ameye, M., Vermeir, P., Verwaeren, J., De Gelder, L., & Audenaert, K. (2022). Innovative rhizosphere-based enrichment under P-limitation selects for bacterial isolates with high-performance P-solubilizing traits. *Microbiology Spectrum*, 10(6), e02052-22.
- Deb, C. R., & Tatung, M. (2024). Siderophore producing bacteria as biocontrol agent against phytopathogens for a better environment: A review. *South African Journal of Botany*, 165, 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.12.031>
- Dillies, M. A., Rau, A., Aubert, J., Hennequet-Antier, C., Jeanmougin, M., Servant, N., ... & Jaffrézic, F. (2013). A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-

- throughput RNA sequencing data analysis. *Briefings in bioinformatics*, *14*(6), 671-683. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs046>
- Döbereiner, J., & Day, J. M. (1976). Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites.
- Domenech, J., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., Ramos, B., & Gutierrez-Mañero, J. (2006). Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *BioControl*, *51*, 245-258. <https://doi.org/10.1007/s10526-005-2940-z>
- Dong, G., Wang, Y., Gong, L., Wang, M., Wang, H., He, N., ... & Li, Q. (2013). Formation of soluble Cr (III) end-products and nanoparticles during Cr (VI) reduction by *Bacillus cereus* strain XMCr-6. *Biochemical engineering journal*, *70*, 166-172. doi: 10.1016/j.bej.2012.11.002
- Du, Z., Su, Q., Wu, Z., Huang, Z., Bao, J., Li, J., ... & He, H. (2021). Genome-wide characterization of MATE gene family and expression profiles in response to abiotic stresses in rice (*Oryza sativa*). *BMC Ecology and Evolution*, *21*, 1-14.
- Dželetović, Ž. S. (2012). Miskantus (*Miscanthus x giganteus* Greef et Deu.)-proizvodne odlike i produktivnost biomase. *Zaduzbina Andrejevic*.
- Eras-Muñoz, E., Farré, A., Sánchez, A., Font, X., & Gea, T. (2022). Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. *Bioengineered*, *13*(5), 12365-12391. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2074621>
- Erlich, Y., Mitra, P. P., Delabastide, M., McCombie, W. R., & Hannon, G. J. (2008). Alta-Cyclic: a self-optimizing base caller for next-generation sequencing. *Nature methods*, *5*(8), 679-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1230>
- Etesami, H. (2018). Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and environmental safety*, *147*, 175-191. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.032>
- Ezaki, B., Nagao, E., Yamamoto, Y., Nakashima, S., & Enomoto, T. (2008). Wild plants, *Andropogon virginicus* L. and *Miscanthus sinensis* Anders, are tolerant to multiple stresses including aluminum, heavy metals and oxidative stresses. *Plant cell reports*, *27*, 951-961. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0503-8>
- Fan, K., Cardona, C., Li, Y., Shi, Y. U., Xiang, X., Shen, C., ... & Chu, H. (2017). Rhizosphere associated bacterial network structure and spatial distribution differ significantly from bulk soil in wheat crop fields. *Soil Biology and Biochemistry*, *113*, 275-284. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.06.020>
- Farage, P. K., Blowers, D., Long, S. P., & Baker, N. R. (2006). Low growth temperatures modify the efficiency of light use by photosystem II for CO₂ assimilation in leaves of two chilling - tolerant C₄ species, *Cyperus longus* L. and *Miscanthus × giganteus*. *Plant, Cell & Environment*, *29*(4), 720-728.
- Fathollahi, A., Khasteganan, N., Coupe, S. J., & Newman, A. P. (2021). A meta-analysis of metal biosorption by suspended bacteria from three phyla. *Chemosphere*, *268*, 129290. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129290>
- Feng, Y., Xu, P., Li, B., Li, P., Wen, X., An, F., ... & Guo, H. (2017). Ethylene promotes root hair growth through coordinated EIN3/EIL1 and RHD6/RSL1 activity in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(52), 13834-13839. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711723115>

- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology*, *285*, 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Fu, S. F., Wei, J. Y., Chen, H. W., Liu, Y. Y., Lu, H. Y., & Chou, J. Y. (2015). Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant signaling & behavior*, *10*(8), e1048052. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1048052>
- Gao, Y., Bian, L., Shi, J., Xu, J., Xi, M., & Wang, G. (2013). Expression of a conifer COBRA-like gene ClCOBL1 from Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) alters the leaf architecture in tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry*, *70*, 483-491. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.06.013>
- Gerasimova, M., & Reinsch, T. Status of the World's Soil Resources. Annex: Soil groups, characteristics, distribution and ecosystem services.
- Ghosh, P., Rathinasabapathi, B., & Ma, L. Q. (2015). Phosphorus solubilization and plant growth enhancement by arsenic-resistant bacteria. *Chemosphere*, *134*, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.048>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, *48*(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gillieatt, B. F., & Coleman, N. V. (2024). Unravelling the mechanisms of antibiotic and heavy metal resistance co-selection in environmental bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, fuae017. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuae017>
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, *169*(1), 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
- Goth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica chimica acta*, *196*(2-3), 143-151. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90067-M](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90067-M)
- Guardado-Fierros, B. G., Tuesta-Popolizio, D. A., Lorenzo-Santiago, M. A., Rodriguez-Campos, J., & Contreras-Ramos, S. M. (2024). Comparative study between Salkowski reagent and chromatographic method for auxins quantification from bacterial production. *Frontiers in Plant Science*, *15*, 1378079. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1378079>
- Guilbault, G. G., & Kramer, D. N. (1964). 4-Methoxy- α -Naphthol as a Spectrophotometric Reagent Substrate for Measuring Peroxidatic Activity. *Analytical Chemistry*, *36*(13), 2494-2496.
- Guo, H., Hong, C., Chen, X., Xu, Y., Liu, Y., Jiang, D., & Zheng, B. (2016a). Different growth and physiological responses to cadmium of the three *Miscanthus* species. *PloS one*, *11*(4), e0153475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153475>
- Guo, H., Hong, C., Xiao, M., Chen, X., Chen, H., Zheng, B., & Jiang, D. (2016b). Real-time kinetics of cadmium transport and transcriptomic analysis in low cadmium accumulator *Miscanthus sacchariflorus*. *Planta*, *244*, 1289-1302. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2578-3>
- Gustin, J. L., Zanis, M. J., & Salt, D. E. (2011). Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters. *BMC evolutionary biology*, *11*, 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-76>
- Hadwan, M. H., & Abed, H. N. (2016). Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data in brief*, *6*, 194-199. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.12.012>

- Haigler, C. H., & Roberts, A. W. (2019). Structure/function relationships in the rosette cellulose synthesis complex illuminated by an evolutionary perspective. *Cellulose*, *26*, 227-247. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2157-9>
- Hassan, S. E. D. (2017). Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *Journal of advanced research*, *8*(6), 687-695. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.09.001>
- Hassan, S. H., Awad, Y. M., Kabir, M. H., Oh, S. E., & Joo, J. H. (2010). Bacterial biosorption of heavy metals. *Biotechnology cracking new pastures*, 79-110.
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, *125*(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hochholdinger, F., Wen, T. J., Zimmermann, R., Chimot - Marolle, P., Da Costa e Silva, O., Bruce, W., ... & Schnable, P. S. (2008). The maize (*Zea mays* L.) roothairless3 gene encodes a putative GPI - anchored, monocot - specific, COBRA - like protein that significantly affects grain yield. *The Plant Journal*, *54*(5), 888-898. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03459.x>
- Hodkinson, T. R., Klaas, M., Jones, M. B., Prickett, R., & Barth, S. (2015). *Miscanthus*: a case study for the utilization of natural genetic variation. *Plant Genetic Resources*, *13*(3), 219-237.
- Hou, W., Ma, Z., Sun, L., Han, M., Lu, J., Li, Z., ... & Wei, G. (2013). Extracellular polymeric substances from copper-tolerance *Sinorhizobium meliloti* immobilize Cu²⁺. *Journal of hazardous materials*, *261*, 614-620. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.043>
- Huang, F., Dang, Z., Guo, C. L., Lu, G. N., Gu, R. R., Liu, H. J., & Zhang, H. (2013). Biosorption of Cd (II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil. *Colloids and surfaces b: biointerfaces*, *107*, 11-18. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.01.062
- Huang, Y., He, G., Tian, W., Li, D., Meng, L., Wu, D., & He, T. (2021). Genome-wide identification of MATE gene family in potato (*Solanum tuberosum* L.) and expression analysis in heavy metal stress. *Frontiers in Genetics*, *12*, 650500. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.650500>
- Hunter, J. D. (2007). Matplotlib: A 2D graphics environment. *Computing in science & engineering*, *9*(03), 90-95. <http://dx.doi.org/10.1109/MCSE.2007.55>
- Janković, B., Manić, N., Popović, M., Cvetković, S., Dželetović, Ž., & Stojiljković, D. (2023). Kinetic and thermodynamic compensation phenomena in C3 and C4 energy crops pyrolysis: Implications on reaction mechanisms and product distributions. *Industrial Crops and Products*, *194*, 116275. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116275>
- Jaroslawska, A. K., & Piotrowska-Seget, Z. (2022). The effect of heavy metals on microbial communities in industrial soil in the area of Piekary Śląskie and Bukowno (Poland). *Microbiology Research*, *13*(3), 626-642. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13030045>
- Javed, M. A., Saleem, A., Hafeez, A., & Ali, B. (2024). Microbial Traits in Plant Stress Tolerance and Importance for Agriculture. In *Advances in Plant Microbiome Research for Climate-Resilient Agriculture* (pp. 179-198). Apple Academic Press.
- Jiang, L., Schlesinger, F., Davis, C. A., Zhang, Y., Li, R., Salit, M., ... & Oliver, B. (2011). Synthetic spike-in standards for RNA-seq experiments. *Genome research*, *21*(9), 1543-1551. doi:10.1101/gr.121095.111
- Junglee, S., Urban, L., Sallanon, H., & Lopez-Lauri, F. (2014). Optimized assay for hydrogen peroxide determination in plant tissue using potassium iodide. *American Journal of Analytical Chemistry*, *5*(11), 730. 10.4236/ajac.2014.511081

- Kabata-Pendias, A. (2011). Trace Elements in Soils and Plants. by Taylor and Francis Group.
- Kafle, A., Timilsina, A., Gautam, A., Adhikari, K., Bhattarai, A., & Aryal, N. (2022). Phytoremediation: Mechanisms, plant selection and enhancement by natural and synthetic agents. *Environmental Advances*, 8, 100203.
- Kane, J. L., Schartiger, R. G., Daniels, N. K., Freedman, Z. B., McDonald, L. M., Skousen, J. G., & Morrissey, E. M. (2023). Bioenergy crop *Miscanthus x giganteus* acts as an ecosystem engineer to increase bacterial diversity and soil organic matter on marginal land. *Soil Biology and Biochemistry*, 186, 109178.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y., & Martinoia, E. (2011). Plant ABC transporters. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 9. 10.1199/tab.0153
- Kang, S., Post, W. M., Nichols, J. A., Wang, D., West, T. O., Bandaru, V., & Izaurrealde, R. C. (2013). Marginal lands: concept, assessment and management. *Journal of Agricultural Science*, 5(5), 129.
- Kar, S., Weng, T. Y., Nakashima, T., Villanueva-Morales, A., Stewart, J. R., Sacks, E. J., ... & Yamada, T. (2020). Field performance of *Saccharum × Miscanthus* intergeneric hybrids (Miscanes) under cool climatic conditions of northern Japan. *Bioenergy Research*, 13, 132-146.
- Khalid, S., Shahid, M., Niazi, N. K., Murtaza, B., Bibi, I., & Dumat, C. (2017). A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of geochemical exploration*, 182, 247-268. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2016.11.021>
- Khanna, K., Jamwal, V. L., Gandhi, S. G., Ohri, P., & Bhardwaj, R. (2019). Metal resistant PGPR lowered Cd uptake and expression of metal transporter genes with improved growth and photosynthetic pigments in *Lycopersicon esculentum* under metal toxicity. *Scientific reports*, 9(1), 5855. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41899-3>
- Kim, R. Y., Yoon, J. K., Kim, T. S., Yang, J. E., Owens, G., & Kim, K. R. (2015). Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation—a critical review. *Environmental geochemistry and health*, 37, 1041-1061. <https://doi.org/10.1007/s10653-015-9695-y>
- Kiyono, M., Oka, Y., Sone, Y., Tanaka, M., Nakamura, R., Sato, M. H., ... & Inoue, K. I. (2012). Expression of the bacterial heavy metal transporter MerC fused with a plant SNARE, SYP121, in *Arabidopsis thaliana* increases cadmium accumulation and tolerance. *Planta*, 235, 841-850. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1543-4>
- Knights, H. E., Jorin, B., Haskett, T. L., & Poole, P. S. (2021). Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. *Environmental Microbiology Reports*, 13(4), 428-444. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12934>
- Kubit, O. E., Pluhar, C. J., & De Graff, J. V. (2015). A model for prioritizing sites and reclamation methods at abandoned mines. *Environmental Earth Sciences*, 73, 7915-7931. <https://doi.org/10.1007/s12665-014-3949-3>
- Li, L., He, Z., Pandey, G. K., Tsuchiya, T., & Luan, S. (2002). Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 5360-5368. DOI:10.1074/jbc.M108777200
- Li, P., Liu, Y., Tan, W., Chen, J., Zhu, M., Lv, Y., ... & Cai, H. (2019). Brittle Culm 1 encodes a COBRA-like protein involved in secondary cell wall cellulose biosynthesis in sorghum. *Plant and Cell Physiology*, 60(4), 788-801. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy246>

- Li, R., Li, J., Li, S., Qin, G., Novák, O., Pěňčík, A., ... & Qu, L. J. (2014). ADP1 affects plant architecture by regulating local auxin biosynthesis. *PLoS genetics*, *10*(1), e1003954. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003954>
- Li, S., Ge, F. R., Xu, M., Zhao, X. Y., Huang, G. Q., Zhou, L. Z., ... & Zhang, Y. (2013). *Arabidopsis* COBRA - LIKE 10, a GPI - anchored protein, mediates directional growth of pollen tubes. *The Plant Journal*, *74*(3), 486-497. <https://doi.org/10.1111/tpj.12139>
- Li, Z., Zhou, T., Sun, P., Chen, X., Gong, L., Sun, P., ... & Liang, Y. K. (2022). COBL9 and COBL7 synergistically regulate root hair tip growth via controlling apical cellulose deposition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *596*, 6-13. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.01.096>
- Lin, Q., Li, M., Wang, Y., Xu, Z., & Li, L. (2022). Root exudates and chemotactic strains mediate bacterial community assembly in the rhizosphere soil of *Casuarina equisetifolia* L. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 988442. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.988442>
- Liu, J., Li, Y., Wang, W., Gai, J., & Li, Y. (2016). Genome-wide analysis of MATE transporters and expression patterns of a subgroup of MATE genes in response to aluminum toxicity in soybean. *BMC genomics*, *17*, 1-15.
- Liu, W., Huo, C., He, L., Ji, X., Yu, T., Yuan, J., ... & Chen, N. (2022). The NtNRAMP1 transporter is involved in cadmium and iron transport in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Plant Physiology and Biochemistry*, *173*, 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.01.024>
- Ma, Y., Rajkumar, M., & Freitas, H. (2009). Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant-growth promoting bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, *166*(2-3), 1154-1161. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.12.018>
- Majewska, M., Słomka, A., & Hanaka, A. (2024). Siderophore-producing bacteria from Spitsbergen soils—novel agents assisted in bioremediation of the metal-polluted soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11.
- Maloney, G. S., DiNapoli, K. T., & Muday, G. K. (2014). The anthocyanin reduced tomato mutant demonstrates the role of flavonols in tomato lateral root and root hair development. *Plant Physiology*, *166*(2), 614-631. <https://doi.org/10.1104/pp.114.240507>
- Manoj, S. R., Karthik, C., Kadirvelu, K., Arulselvi, P. I., Shanmugasundaram, T., Bruno, B., & Rajkumar, M. (2020). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of environmental management*, *254*, 109779. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109779>
- Mehmood, M. A., Ibrahim, M., Rashid, U., Nawaz, M., Ali, S., Hussain, A., & Gull, M. (2017). Biomass production for bioenergy using marginal lands. *Sustainable Production and Consumption*, *9*, 3-21.
- Mehmood, N., Saeed, M., Zafarullah, S., Hyder, S., Rizvi, Z. F., Gondal, A. S., ... & Kupe, M. (2023). Multifaceted impacts of plant-beneficial *Pseudomonas* spp. in managing various plant diseases and crop yield improvement. *ACS omega*, *8*(25), 22296-22315. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00870>
- Mei, C., Amaradasa, S., Sikaroodi, M., Zhang, X., Gillevet, P., Nowak, J., & Lowman, S. (2021). Potential application of plant growth promoting bacteria in bioenergy crop production. In *Microbiome stimulants for crops* (pp. 109-123). Woodhead Publishing.
- Memon, A., & Meraklı, N. (2023). Structure and function of heavy metal transporting ATPases in Brassica species. In *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*, Volume 7 (pp. 75-99). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-17988-4_5

- Miao, J., Feng, Q., Li, Y., Zhao, Q., Zhou, C., Lu, H., ... & Han, B. (2021). Chromosome-scale assembly and analysis of biomass crop *Miscanthus lutarioriparius* genome. *Nature communications*, *12*(1), 2458. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22738-4>
- Mitra, S., Pramanik, K., Sarkar, A., Ghosh, P. K., Soren, T., & Maiti, T. K. (2018). Bioaccumulation of cadmium by *Enterobacter* sp. and enhancement of rice seedling growth under cadmium stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, *156*, 183-196. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.001>
- Moulis, J. M. (2010). Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biometals*, *23*, 877-896. DOI 10.1007/s10534-010-9336-y
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, *22*(5), 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Nascimento, F. X., Brígido, C., Glick, B. R., & Rossi, M. J. (2016). The role of rhizobial ACC deaminase in the nodulation process of leguminous plants. *International Journal of Agronomy*, *2016*(1), 1369472. <https://doi.org/10.1155/2016/1369472>
- Navazas, A., Mesa, V., Thijs, S., Fuente-Maqueda, F., Vangronsveld, J., Peláez, A. I., ... & González, A. (2022). Bacterial inoculant-assisted phytoremediation affects trace element uptake and metabolite content in *Salix atrocinerea*. *Science of the Total Environment*, *820*, 153088. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153088>
- Nebeská, D., Trögl, J., Ševců, A., Špánek, R., Marková, K., Davis, L., ... & Pidlisnyuk, V. (2021). *Miscanthus x giganteus* role in phytodegradation and changes in bacterial community of soil contaminated by petroleum industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *224*, 112630. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112630>
- Nie, G., Zhong, M., Cai, J., Yang, X., Zhou, J., Appiah, C., ... & Zhang, X. (2021). Transcriptome characterization of candidate genes related to chromium uptake, transport and accumulation in *Miscanthus sinensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *221*, 112445.
- Nieboer, E., & Richardson, D. H. (1980). The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, *1*(1), 3-26. [https://doi.org/10.1016/0143-148X\(80\)90017-8](https://doi.org/10.1016/0143-148X(80)90017-8)
- Niu, B., Paulson, J. N., Zheng, X., & Kolter, R. (2017). Simplified and representative bacterial community of maize roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(12), E2450-E2459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616148114>
- Niu, E., Fang, S., Shang, X., & Guo, W. (2018). Ectopic expression of GhCOBL9A, a cotton glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein encoding gene, promotes cell elongation, thickening and increased plant biomass in transgenic *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics*, *293*, 1191-1204. <https://doi.org/10.1007/s00438-018-1452-3>
- Niu, E., Shang, X., Cheng, C., Bao, J., Zeng, Y., Cai, C., ... & Guo, W. (2015). Comprehensive analysis of the COBRA-like (COBL) gene family in gossypium identifies two COBL s potentially associated with fiber quality. *PLoS One*, *10*(12), e0145725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145725>
- Nurzhanova, A., Pidlisnyuk, V., Abit, K., Nurzhanov, C., Kenessov, B., Stefanovska, T., & Erickson, L. (2019). Comparative assessment of using *Miscanthus x giganteus* for remediation of soils contaminated by heavy metals: a case of military and mining sites. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*, 13320-13333.

- Park, S. H., Elhiti, M., Wang, H., Xu, A., Brown, D., & Wang, A. (2017). Adventitious root formation of in vitro peach shoots is regulated by auxin and ethylene. *Scientia Horticulturae*, *226*, 250-260. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.053>
- Pasricha, S., Mathur, V., Garg, A., Lenka, S., Verma, K., & Agarwal, S. (2021). Molecular mechanisms underlying heavy metal uptake, translocation and tolerance in hyperaccumulators-an analysis: Heavy metal tolerance in hyperaccumulators. *Environmental Challenges*, *4*, 100197. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2021.100197>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, *29*(9), e45-e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pidlisnyuk, V., Mamirova, A., Pranaw, K., Shapoval, P. Y., Trögl, J., & Nurzhanova, A. (2020). Potential role of plant growth-promoting bacteria in *Miscanthus x giganteus* phytotechnology applied to the trace elements contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *155*, 105103. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105103>
- Pongratz, R., & Heumann, K. G. (1999). Production of methylated mercury, lead, and cadmium by marine bacteria as a significant natural source for atmospheric heavy metals in polar regions. *Chemosphere*, *39*(1), 89-102. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00591-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00591-8)
- Priya, A. K., Muruganandam, M., Ali, S. S., & Kornaros, M. (2023). Clean-up of heavy metals from contaminated soil by phytoremediation: A multidisciplinary and eco-friendly approach. *Toxics*, *11*(5), 422.
- Pyter, R. J., Dohleman, F. G., & Voigt, T. B. (2010). Effects of rhizome size, depth of planting and cold storage on *Miscanthus x giganteus* establishment in the Midwestern USA. *Biomass and Bioenergy*, *34*(10), 1466-1470. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.04.014>
- Qiao, C., Yang, J., Wan, Y., Xiang, S., Guan, M., Du, H., ... & Qu, C. (2020). A genome-wide survey of MATE transporters in *Brassicaceae* and unveiling their expression profiles under abiotic stress in rapeseed. *Plants*, *9*(9), 1072. <https://doi.org/10.3390/plants9091072>
- Qiu, C., Chen, J., Wu, W., Liao, B., Zheng, X., Li, Y., ... & Hao, Z. (2023). Genome-wide analysis and abiotic stress-responsive patterns of COBRA-like gene family in *Liriodendron chinense*. *Plants*, *12*(8), 1616. <https://doi.org/10.3390/plants12081616>
- Rakić, T., Pešić, M., Kostić, N., Andrejić, G., Fira, D., Dželetović, Ž., ... & Lozo, J. (2021). Rhizobacteria associated with *Miscanthus x giganteus* improve metal accumulation and plant growth in the flotation tailings. *Plant and Soil*, *462*, 349-363. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04865-5>
- Raynaud, X., & Nunan, N. (2014). Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil. *PloS one*, *9*(1), e87217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087217>
- Remelli, M., Nurchi, V. M., Lachowicz, J. I., Medici, S., Zoroddu, M. A., & Peana, M. (2016). Competition between Cd (II) and other divalent transition metal ions during complex formation with amino acids, peptides, and chelating agents. *Coordination Chemistry Reviews*, *327*, 55-69. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.07.004>
- Roberts, L. A., Pierson, A. J., Panaviene, Z., & Walker, E. L. (2004). Yellow stripe1. Expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. *Plant Physiology*, *135*(1), 112-120. <https://doi.org/10.1104/pp.103.037572>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *bioinformatics*, *26*(1), 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

- Roudier, F., Fernandez, A. G., Fujita, M., Himmelspach, R., Borner, G. H., Schindelman, G., ... & Benfey, P. N. (2005). COBRA, an *Arabidopsis* extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. *The Plant Cell*, *17*(6), 1749-1763.
- Sabreena, Hassan, S., Bhat, S. A., Kumar, V., Ganai, B. A., & Ameen, F. (2022). Phytoremediation of heavy metals: An indispensable contrivance in green remediation technology. *Plants*, *11*(9), 1255. <https://doi.org/10.3390/plants11091255>
- Sánchez-Castro, I., Molina, L., Prieto-Fernández, M. Á., & Segura, A. (2023). Past, present and future trends in the remediation of heavy-metal contaminated soil-Remediation techniques applied in real soil-contamination events. *Heliyon*. 10.1016/j.heliyon.2023.e16692
- Sangi, S., Araújo, P. M., Coelho, F. S., Gazara, R. K., Almeida-Silva, F., Venancio, T. M., & Grativol, C. (2021). Genome-wide analysis of the COBRA-Like gene family supports gene expansion through Whole-Genome Duplication in soybean (*Glycine max*). *Plants*, *10*(1), 167. <https://doi.org/10.3390/plants10010167>
- Santos, A. L. D., Chaves-Silva, S., Yang, L., Maia, L. G. S., Chalfun-Júnior, A., Sinharoy, S., ... & Benedito, V. A. (2017). Global analysis of the MATE gene family of metabolite transporters in tomato. *BMC plant biology*, *17*, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1115-2>
- Santoyo, G. (2022). How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. *Journal of advanced research*, *40*, 45-58. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.11.020>
- Sajjad, M., Ahmad, A., Riaz, M. W., Hussain, Q., Yasir, M., & Lu, M. Z. (2023). Recent genome resequencing paraded COBRA-Like gene family roles in abiotic stress and wood formation in Poplar. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1242836. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1242836>
- Schwab, A. P., Zhu, D. S., & Banks, M. K. (2008). Influence of organic acids on the transport of heavy metals in soil. *Chemosphere*, *72*(6), 986-994. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.047>
- Schaedle, M., & Bassham, J. A. (1977). Chloroplast glutathione reductase. *Plant physiology*, *59*(5), 1011-1012. <https://doi.org/10.1104/pp.59.5.1011>
- Schindelman, G., Morikami, A., Jung, J., Baskin, T. I., Carpita, N. C., Derbyshire, P., ... & Benfey, P. N. (2001). COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in *Arabidopsis*. *Genes & development*, *15*(9), 1115-1127. doi:10.1101/gad.879101
- Shahid, M., Singh, U. B., Khan, M. S., Singh, P., Kumar, R., Singh, R. N., ... & Singh, H. V. (2023). Bacterial ACC deaminase: Insights into enzymology, biochemistry, genetics, and potential role in amelioration of environmental stress in crop plants. *Frontiers in microbiology*, *14*, 1132770. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1132770>
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, *160*(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Sharma, D. C., Sharma, C. P., & Tripathi, R. D. (2003). Phytotoxic lesions of chromium in maize. *Chemosphere*, *51*(1), 63-68. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00325-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00325-3)
- Sharma, J. K., Kumar, N., Singh, N. P., & Santal, A. R. (2023). Phytoremediation technologies and their mechanism for removal of heavy metal from contaminated soil: An approach for a sustainable environment. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1076876. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1076876>

- Sharma, M., Sharma, S., Paavan, Gupta, M., Goyal, S., Talukder, D., ... & Baskoutas, S. (2024). Mechanisms of microbial resistance against cadmium—a review. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, *22*(1), 13-30. <https://doi.org/10.1007/s40201-023-00887-6>
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessaraki, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, *2012*(1), 217037. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Shoji, T., Inai, K., Yazaki, Y., Sato, Y., Takase, H., Shitan, N., ... & Hashimoto, T. (2009). Multidrug and toxic compound extrusion-type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots. *Plant physiology*, *149*(2), 708-718. <https://doi.org/10.1104/pp.108.132811>
- Siddikee, M. A., Glick, B. R., Chauhan, P. S., jong Yim, W., & Sa, T. (2011). Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, *49*(4), 427-434. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.01.015>
- Simionato, A. S., Navarro, M. O., de Jesus, M. L., Barazetti, A. R., da Silva, C. S., Simões, G. C., ... & de Oliveira, A. G. (2017). The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Frontiers in microbiology*, *8*, 1102. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01102>
- Singh, R. P., Shelke, G. M., Kumar, A., & Jha, P. N. (2015). Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to “stress ethylene” produced in plants. *Frontiers in microbiology*, *6*, 149440. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00937>
- Singh, R. P., Ma, Y., & Shadan, A. (2022). Perspective of ACC-deaminase producing bacteria in stress agriculture. *Journal of Biotechnology*, *352*, 36-46. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.05.002>
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2016). Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in plant science*, *6*, 1143. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>
- Sivaguru, M., Liu, J., & Kochian, L. V. (2013). Targeted expression of Sb MATE in the root distal transition zone is responsible for sorghum aluminum resistance. *The Plant Journal*, *76*(2), 297-307.
- Službeni glasnik Republike Srbije, br. 30/2018 i 64/2019
- Smalla, K., Sessitsch, A., & Hartmann, A. (2006). The Rhizosphere: ‘soil compartment influenced by the root’. *FEMS Microbiology Ecology*, *56*(2), 165-165. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00148.x>
- Sone, Y., Uraguchi, S., Takanezawa, Y., Nakamura, R., Pan-Hou, H., & Kiyono, M. (2017). A novel role of MerC in methylmercury transport and phytoremediation of methylmercury contamination. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *40*(7), 1125-1128. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00213>
- Souza, R. D., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology*, *38*, 401-419. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Spence, A. K., Boddu, J., Wang, D., James, B., Swaminathan, K., Moose, S. P., & Long, S. P. (2014). Transcriptional responses indicate maintenance of photosynthetic proteins as key to the exceptional chilling tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus × giganteus*. *Journal of Experimental Botany*, *65*(13), 3737-3747.

- Tang, L., & Werner, T. T. (2023). Global mining footprint mapped from high-resolution satellite imagery. *Communications Earth & Environment*, 4(1), 134. <https://doi.org/10.1038/s43247-023-00805-6>
- Teng, Z., Shao, W., Zhang, K., Huo, Y., & Li, M. (2019). Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from heavy metal contaminated soils and their potential for lead immobilization. *Journal of environmental management*, 231, 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.012>
- Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B. P., & Das, N. (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: a review. *Journal of Environmental Management*, 146, 383-399. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.014>
- Tiwari, M., Sharma, D., Singh, M., Tripathi, R. D., & Trivedi, P. K. (2014). Expression of OsMATE1 and OsMATE2 alters development, stress responses and pathogen susceptibility in Arabidopsis. *Scientific reports*, 4(1), 3964.
- Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 5(3), 240-245. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00324-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7)
- Tran, C., Cock, I. E., Chen, X., & Feng, Y. (2022). Antimicrobial *Bacillus*: metabolites and their mode of action. *Antibiotics*, 11(1), 88. doi:10.3390/antibiotics11010088
- Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M. J., ... & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. *Nature biotechnology*, 28(5), 511. doi: 10.1038/nbt.1621
- Trivedi, P., Batista, B. D., Bazany, K. E., & Singh, B. K. (2022). Plant–microbiome interactions under a changing world: responses, consequences and perspectives. *New Phytologist*, 234(6), 1951-1959. <https://doi.org/10.1111/nph.18016>
- Upadhyay, S. K., Srivastava, A. K., Rajput, V. D., Chauhan, P. K., Bhojiya, A. A., Jain, D., ... & Minkina, T. (2022). Root exudates: mechanistic insight of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable crop production. *Frontiers in microbiology*, 13, 916488. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.916488>
- Uraguchi, S., Sone, Y., Kamezawa, M., Tanabe, M., Hirakawa, M., Nakamura, R., ... & Kiyono, M. (2019). Ectopic expression of a bacterial mercury transporter MerC in root epidermis for efficient mercury accumulation in shoots of *Arabidopsis* plants. *Scientific Reports*, 9(1), 4347.
- Vega-Páez, J. D., Rivas, R. E., & Dussán-Garzón, J. (2019). High efficiency mercury sorption by dead biomass of *Lysinibacillus sphaericus*—new insights into the treatment of contaminated water. *Materials*, 12(8), 1296. <https://doi.org/10.3390/ma12081296>
- Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T. E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., ... & Van Mulbregt, P. (2020). SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature methods*, 17(3), 261-272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>
- Voccianti, M., Grifoni, M., Fusini, D., Petruzzelli, G., & Franchi, E. (2022). The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in mitigating plant's environmental stresses. *Applied Sciences*, 12(3), 1231. <https://doi.org/10.3390/app12031231>
- Waheed, A., Haxim, Y., Islam, W., Ahmad, M., Ali, S., Wen, X., ... & Zhang, D. (2022). Impact of cadmium stress on growth and physio-biochemical attributes of *Eruca sativa* Mill. *Plants*, 11(21), 2981. <https://doi.org/10.3390/plants11212981>

- Wang, Z., Qian, C., Guo, X., Liu, E., Mao, K., Mu, C., ... & Liu, H. (2016). ELS1, a novel MATE transporter related to leaf senescence and iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and biophysical research communications*, 476(4), 319-325. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.121>
- Wang, X., Li, D., Gao, P., Gu, W., He, X., Yang, W., & Tang, W. (2020). Analysis of biosorption and biotransformation mechanism of *Pseudomonas chengduensis* strain MBR under Cd (II) stress from genomic perspective. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 198, 110655. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110655>
- Wang, C., Kong, Y., Hu, R., & Zhou, G. (2021a). *Miscanthus*: A fast - growing crop for environmental remediation and biofuel production. *GCB Bioenergy*, 13(1), 58-69.
- Wang, G., Zhang, Q., Du, W., Ai, F., Yin, Y., Ji, R., & Guo, H. (2021b). Microbial communities in the rhizosphere of different willow genotypes affect phytoremediation potential in Cd contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 769, 145224. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145224>
- Wang, Y., Narayanan, M., Shi, X., Chen, X., Li, Z., Natarajan, D., & Ma, Y. (2022). Plant growth-promoting bacteria in metal-contaminated soil: Current perspectives on remediation mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 13, 966226. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.966226>
- Wang, Y., Pei, Y., Wang, X., Dai, X., & Zhu, M. (2024a). Antimicrobial metabolites produced by the plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus* and *Pseudomonas*. *Advanced Agrochem*. <https://doi.org/10.1016/j.aac.2024.07.007>
- Wang, J., Liu, X., Chen, Y., Zhu, F. L., Sheng, J., & Diao, Y. (2024b). Physiological and transcriptomic analyses reveal the cadmium tolerance mechanism of *Miscanthus lutarioriparia*. *Plos one*, 19(5), e0302940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302940>
- Weger, J., Knápek, J., Bubeník, J., Vávrová, K., & Stražil, Z. (2021). Can *Miscanthus* fulfill its expectations as an energy biomass source in the current conditions of the Czech republic?— Potentials and barriers. *Agriculture*, 11(1), 40. <https://doi.org/10.3390/agriculture11010040>
- Won, S. K., Lee, Y. J., Lee, H. Y., Heo, Y. K., Cho, M., & Cho, H. T. (2009). Cis-element-and transcriptome-based screening of root hair-specific genes and their functional characterization in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 150(3), 1459-1473. <https://doi.org/10.1104/pp.109.140905>
- Wu, B., Luo, S., Luo, H., Huang, H., Xu, F., Feng, S., & Xu, H. (2022). Improved phytoremediation of heavy metal contaminated soils by *Miscanthus floridulus* under a varied rhizosphere ecological characteristic. *Science of The Total Environment*, 808, 151995. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151995>
- Xu, Y., Zou, J., Zheng, H., Xu, M., Zong, X., & Wang, L. (2019). RNA-Seq transcriptome analysis of rice primary roots reveals the role of flavonoids in regulating the rice primary root growth. *Genes*, 10(3), 213. <https://doi.org/10.3390/genes10030213>
- Yadav, R., Singh, S., Kumar, A., & Singh, A. N. (2022). Phytoremediation: A wonderful cost-effective tool. In *Cost Effective Technologies for Solid Waste and Wastewater Treatment* (pp. 179-208). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822933-0.00008-5>
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S. N., Ghosh, S., & Chen, Z. (2020). Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Frontiers in plant science*, 11, 513099. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>
- Yang, T. F., Gonzalez-Carranza, Z. H., Maunders, M. J., & Roberts, J. A. (2008). Ethylene and the regulation of senescence processes in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants. *Annals of botany*, 101(2), 301-310. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm229>

- Yu, G., Wang, L. G., Han, Y., & He, Q. Y. (2012). clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OmicS: a journal of integrative biology*, *16*(5), 284-287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
- Zadel, U., Cruzeiro, C., Durai, A. C. R., Nesme, J., May, R., Balázs, H., ... & Radl, V. (2022). Exudates from *Miscanthus x giganteus* change the response of a root-associated *Pseudomonas putida* strain towards heavy metals. *Environmental Pollution*, *313*, 119989. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119989>
- Zaheer, M., Rehman, S. U., Khan, S. H., Shahid, S., Rasheed, A., Naz, R., & Sajjad, M. (2022). Characterization of new COBRA like (COBL) genes in wheat (*Triticum aestivum*) and their expression analysis under drought stress. *Molecular Biology Reports*, 1-9.
- Zeng, L., Zhu, T., Gao, Y., Wang, Y., Ning, C., Björn, L. O., ... & Li, S. (2017). Effects of Ca addition on the uptake, translocation, and distribution of Cd in *Arabidopsis thaliana*. *Ecotoxicology and environmental safety*, *139*, 228-237. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.023>
- Zhan, Y. H., Zhang, C. H., Zheng, Q. X., Huang, Z. A., & Yu, C. L. (2017). Cadmium stress inhibits the growth of primary roots by interfering auxin homeostasis in *Sorghum bicolor* seedlings. *Journal of Plant Biology*, *60*, 593-603. <https://doi.org/10.1007/s12374-017-0024-0>
- Zhang, J., Cao, T., Tang, Z., Shen, Q., Rosen, B. P., & Zhao, F. J. (2015). Arsenic methylation and volatilization by arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase in *Pseudomonas alcaligenes* NBRC14159. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(8), 2852-2860. <https://doi.org/10.1128/AEM.03804-14>
- Zhang, W., Liao, L., Xu, J., Han, Y., & Li, L. (2021). Genome-wide identification, characterization and expression analysis of MATE family genes in apple (*Malus× domestica* Borkh). *BMC genomics*, *22*, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07943-1>
- Zhang, Y., Zhao, S., Liu, S., Peng, J., Zhang, H., Zhao, Q., ... & Chen, C. (2022a). Enhancing the phytoremediation of heavy metals by combining hyperaccumulator and heavy metal-resistant plant growth-promoting bacteria. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 912350. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.912350>
- Zhang, T., Xiong, J., Tian, R., Li, Y., Zhang, Q., Li, K., ... & Tian, B. (2022b). Effects of single-and mixed-bacterial inoculation on the colonization and assembly of endophytic communities in plant roots. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 928367. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.928367>
- Zhiguo, E., Tingting, L. I., Chen, C. H. E. N., & Lei, W. A. N. G. (2018). Genome-wide survey and expression analysis of P1B-ATPases in rice, maize and sorghum. *Rice science*, *25*(4), 208-217. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2018.06.004>

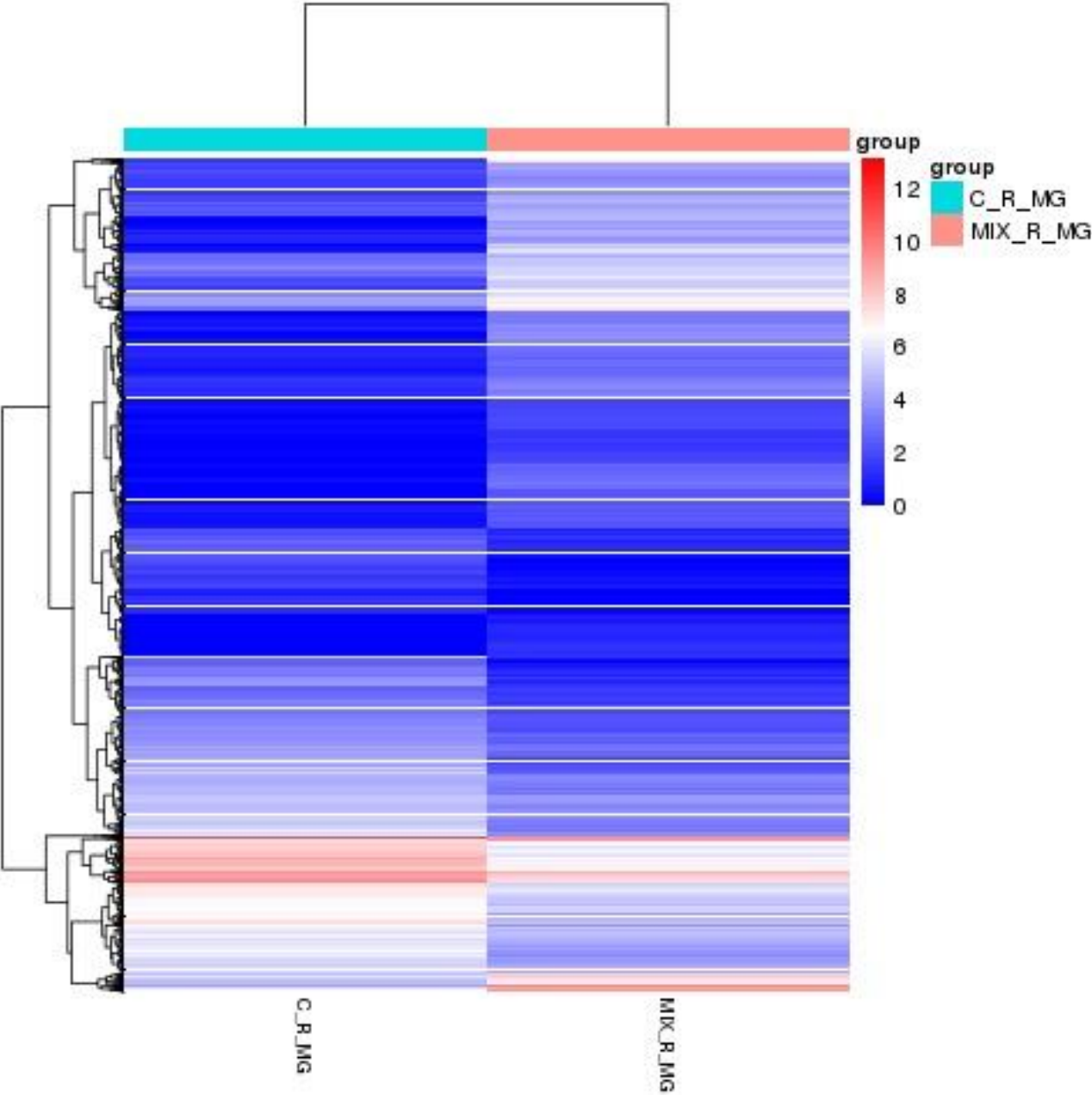
8. PRILOZI

Prilog 1. Sekvence prajmera za RT-qPCR analizu

Gen	Forward primer	Reverse primer	Referenca
<i>MATE 14</i>	CGTCACAGCACATCTTGGGC	GCATCCTCGGGCAATACCTGAT	1
<i>MATE 40</i>	GGTGATCGGGGAACCATGA	CCTGGCTTTCTCCACCTCCTTG	1
<i>COBRA-like protein 1</i>	CCAGGAAGCTGTGTAGAGGGT	ACTAGAGGCGCCAAGCTGTT	1
<i>Chitinase-like protein 1</i>	GCGAGCAGCAGGAGATCGAG	GCCTTGGTGAGCACGTTCT	1
<i>Sb02g041180</i>	TGAGAAAGCTCGGCAGGAAGCATA	TCTTCACCACAGATGTACGCACCA	2
<i>Galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase</i>	TCGTCCTGAAAGCTGTGTCGT	AGGTAGGAGGAAACGGCGTG	1
<i>Pectinesterase 1</i>	GCGCCGACCAACTCGAAGAA	TTGTTGCCACCACAGCGAC	1
<i>Pectinesterase inhibitor PPE8B</i>	GACCACCGGATTCGCCTTCC	AAGGTACGTCTGCGTCTGCG	1
<i>Auxin-responsive protein SAUR36</i>	CAACCCAACGCAACCCAACC	AGCCACACGATGTACCGGAT	1
<i>MATE16</i>	TCTAGGAGGAATGGGCCTGTG	TGAACACCCGATCCTTCGCT	1
<i>MATE35</i>	GTTTCGTCAGGCTCTCGTTTCG	TCGAGACCCGGACACTGATAG	1
<i>HMA7</i>	TCCTCAAGATGAAAGGCGTGCA	ACTGTCTCGGACTTGACGATGG	1
<i>HMA32</i>	TTGCTGCGCGTTTGCTCTTT	GCTGCTCTGGTACACACCATCA	1
<i>HMA33</i>	TCTCCACAAGATCGACGGTGTC	CTTGCCGGCCTTGTTGAGTT	1
<i>Peroxidase 70</i>	GTGACGAAGTCTGAGGCGAA	CTCACCTTCGACAACGCCTA	1
<i>Early nodulin 93</i>	GTGAGCCGTGCATCCCTTGA	CATGGCAGCATCCTCACGCT	1

1- Ovo istraživanje; 2-Barling i sar. (2013)

Prilog 2. Hijerarhijska klaster analiza



Prilog 3. GO termini sa značajno većom ekspresijom kod Mix u odnosu na Kontrolu

Kategorija	GOID	Opis	padj
BP	GO:0006979	response to oxidative stress	4.33E-09
BP	GO:0006073	cellular glucan metabolic process	4.33E-09
BP	GO:0044042	glucan metabolic process	4.33E-09
BP	GO:0044264	cellular polysaccharide metabolic process	4.33E-09
BP	GO:0005976	polysaccharide metabolic process	6.25E-08
BP	GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	8.63E-07
BP	GO:0007017	microtubule-based process	0.000422498
BP	GO:0006928	movement of cell or subcellular component	0.001347721
BP	GO:0007018	microtubule-based movement	0.001347721
BP	GO:0042221	response to chemical	0.03764645
BP	GO:0071554	cell wall organization or biogenesis	0.048266759
CC	GO:0005618	cell wall	5.62E-14
CC	GO:0030312	external encapsulating structure	5.62E-14
CC	GO:0048046	apoplast	4.31E-13
CC	GO:0005576	extracellular region	1.27E-10
CC	GO:0071944	cell periphery	1.02E-06
MF	GO:0046527	glucosyltransferase activity	2.25E-12
MF	GO:0016762	xyloglucan:xyloglucosyl transferase activity	2.25E-12
MF	GO:0004601	peroxidase activity	3.25E-11
MF	GO:0016684	oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor	4.03E-11
MF	GO:0016209	antioxidant activity	4.29E-11
MF	GO:0005507	copper ion binding	1.52E-06
MF	GO:0004650	polygalacturonase activity	0.000169398
MF	GO:0003777	microtubule motor activity	0.00023347
MF	GO:0008092	cytoskeletal protein binding	0.000399726
MF	GO:0008017	microtubule binding	0.000404372
MF	GO:0015631	tubulin binding	0.00091197
MF	GO:0035251	UDP-glucosyltransferase activity	0.008738708
MF	GO:0003774	motor activity	0.008738708
MF	GO:0030976	thiamine pyrophosphate binding	0.016652795
MF	GO:0008194	UDP-glycosyltransferase activity	0.028736639
MF	GO:0008061	chitin binding	0.049108803

Prilog 4. GO termini sa značajno sniženom ekspresijom kod Mix u odnosu na Kontrolu

Kategorija	GOID	Opis	padj
BP	GO:0009611	response to wounding	5.92E-07
BP	GO:0016567	protein ubiquitination	0.0006808
BP	GO:0032446	protein modification by small protein conjugation	0.0006808
BP	GO:1901136	carbohydrate derivative catabolic process	0.003903237
BP	GO:0008037	cell recognition	0.003903237
BP	GO:0009856	pollination	0.003903237
BP	GO:0009875	pollen-pistil interaction	0.003903237
BP	GO:0044706	multi-multicellular organism process	0.003903237
BP	GO:0048544	recognition of pollen	0.003903237
BP	GO:0051704	multi-organism process	0.00394877
BP	GO:0000003	reproduction	0.006841306
BP	GO:0022414	reproductive process	0.006841306
BP	GO:0000272	polysaccharide catabolic process	0.016451755
BP	GO:0015696	ammonium transport	0.016451755
MF	GO:0016838	carbon-oxygen lyase activity, acting on phosphates	6.79E-06
MF	GO:0010333	terpene synthase activity	1.51E-05
MF	GO:0004857	enzyme inhibitor activity	2.09E-05
MF	GO:0016872	intramolecular lyase activity	0.000132529
MF	GO:0016835	carbon-oxygen lyase activity	0.000132529
MF	GO:0016829	lyase activity	0.000317937
MF	GO:0016747	transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl	0.000317937
MF	GO:0004842	ubiquitin-protein transferase activity	0.000493532
MF	GO:0019787	ubiquitin-like protein transferase activity	0.000493532
MF	GO:0004867	serine-type endopeptidase inhibitor activity	0.000682053
MF	GO:0016746	transferase activity, transferring acyl groups	0.001049936
MF	GO:0004866	endopeptidase inhibitor activity	0.001232166
MF	GO:0030414	peptidase inhibitor activity	0.001232166
MF	GO:0061134	peptidase regulator activity	0.001232166
MF	GO:0061135	endopeptidase regulator activity	0.001232166
MF	GO:0030234	enzyme regulator activity	0.00380032
MF	GO:0005509	calcium ion binding	0.00380032
MF	GO:0008519	ammonium transmembrane transporter activity	0.00380032
MF	GO:0016161	beta-amylase activity	0.00380032
MF	GO:0004970	ionotropic glutamate receptor activity	0.00380032
MF	GO:0005230	extracellular ligand-gated ion channel activity	0.00380032
MF	GO:0008066	glutamate receptor activity	0.00380032
MF	GO:0015276	ligand-gated ion channel activity	0.00380032
MF	GO:0022824	transmitter-gated ion channel activity	0.00380032
MF	GO:0022834	ligand-gated channel activity	0.00380032
MF	GO:0022835	transmitter-gated channel activity	0.00380032
MF	GO:0030594	neurotransmitter receptor activity	0.00380032
MF	GO:0004402	histone acetyltransferase activity	0.005205248
MF	GO:0034212	peptide N-acetyltransferase activity	0.005205248
MF	GO:0061733	peptide-lysine-N-acetyltransferase activity	0.005205248
MF	GO:0098772	molecular function regulator	0.005205248
MF	GO:0004888	transmembrane signaling receptor activity	0.005205248
MF	GO:0038023	signaling receptor activity	0.005205248
MF	GO:0060089	molecular transducer activity	0.005205248
MF	GO:0010181	FMN binding	0.005641438
MF	GO:0008373	sialyltransferase activity	0.011837416
MF	GO:0016298	lipase activity	0.011837416
MF	GO:0008171	O-methyltransferase activity	0.013530504
MF	GO:0015075	ion transmembrane transporter activity	0.014039131
MF	GO:0015116	sulfate transmembrane transporter activity	0.020319457
MF	GO:1901682	sulfur compound transmembrane transporter activity	0.020319457
MF	GO:0016702	oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of	0.028716097
MF	GO:0022836	gated channel activity	0.028716097
MF	GO:0022839	ion gated channel activity	0.028716097
MF	GO:0008509	anion transmembrane transporter activity	0.031263854
MF	GO:0008378	galactosyltransferase activity	0.031306332
MF	GO:0019139	cytokinin dehydrogenase activity	0.032822029
MF	GO:0016160	amylase activity	0.035596305
MF	GO:0051213	dioxygenase activity	0.04615987

Prilog 5. Rezultat KEGG analize

KEGGID	Opis	padj
sbi00940	Phenylpropanoid biosynthesis	3.65E-10
sbi00500	Starch and sucrose metabolism	0.001072232
sbi04075	Plant hormone signal transduction	0.003908172
sbi00592	alpha-Linolenic acid metabolism	0.023841373
sbi00941	Flavonoid biosynthesis	0.029687195

Prilog 6. Rezultat predikcije MATE proteina kod *M. lutarioriparius*

Akc. br.	Duž.	HMMER	TMD	CDD	MW	pI	Ind. nest.	Ind. alif.	GRAVY	Lok.
CAD6265104.1	460	MatE, MatE	12	MATE_like	49464.53	5.45	30.89	118.54	0.827	Ć.m.
CAD6229704.1	490	MatE, MatE	11	MATE_like	52431.9	9.79	31.63	116.59	0.703	Ć.m.
CAD6236623.1	485	MatE, MatE	11	MATE_like	51928.39	9.72	32.43	118.41	0.737	Ć.m.
CAD6245590.1	496	MatE, MatE	12	MATE_like	52996.41	5.7	29.91	118.61	0.751	Ć.m.
CAD6202365.1	504	MatE, MatE	12	MATE_like	53945.57	5.81	26.35	119.62	0.709	Ć.m.
CAD6209871.1	501	MatE, MatE	12	MATE_like	53908.61	6.1	26.21	120.52	0.734	Ć.m.
CAD6213426.1	516	MatE, MatE	12	MATE_like	55254.01	6.59	28.82	117.19	0.74	Ć.m.
CAD6332924.1	498	MatE, MatE	12	MATE_like	53900.63	7.94	39.11	116.71	0.617	Ć.m.
CAD6334102.1	472	MatE, MatE	12	MATE_like	50455	8.75	33.98	121.33	0.763	Ć.m.
CAD6247290.1	528	MatE, MatE	12	MATE_like	56482.47	7.87	39.24	113.58	0.619	Ć.m.
CAD6213422.1	430	MatE, MatE	9	MATE_like	46082.01	5.9	31.29	120.28	0.746	Ć.m.
CAD6213428.1	402	MatE, MatE	8	MATE_like	43623.39	8.55	31.25	114.03	0.644	Ć.m.
CAD6212322.1	506	MatE, MatE	10	MATE_like	55055.24	7.07	31.71	114.35	0.667	Ć.m.
CAD6335071.1	508	MatE, MatE	11	MATE_like	53954.57	7.95	27.11	117.32	0.731	Ć.m.
CAD6205678.1	497	MatE, MatE	12	MATE_like	53492.81	5.46	29.11	118.19	0.748	Ć.m.
CAD6265105.1	477	MatE, MatE	12	MATE_like	50813.74	5.34	30.39	118.64	0.72	Ć.m.
CAD6266883.1	496	MatE, MatE	12	MATE_like	53561.52	5.67	24.5	132.16	0.933	Vak.
CAD6269324.1	480	MatE, MatE	12	MATE_like	51945.61	7.56	24.4	131.5	0.911	Vak.
CAD6213424.1	517	MatE, MatE	12	MATE_like	55383.28	7.97	27.82	118.49	0.713	Ć.m.
CAD6204241.1	568	MatE, MatE	12	MATE_like	59280.84	6.5	29.98	117.69	0.664	Ć.m.
CAD6204240.1	568	MatE, MatE	12	MATE_like	59305.83	6.74	29.41	117.69	0.653	Ć.m.
CAD6211704.1	568	MatE, MatE	12	MATE_like	59225.75	7.5	29.87	119.23	0.673	Ć.m.
CAD6334103.1	477	MatE, MatE	12	MATE_like	51066.7	8.74	35.3	119.66	0.703	Ć.m.
CAD6213676.1	487	MatE, MatE	11	MATE_like	52285.27	8.67	31.81	114.95	0.728	Ć.m.
CAD6205871.1	492	MatE, MatE	12	MATE_like	52738.99	9.51	28.62	116.2	0.71	Ć.m.
CAD6241647.1	603	MatE, MatE	12	MATE_like	63540.86	5.88	37.23	104.91	0.554	Ć.m.
CAD6217898.1	462	MatE, MatE	11	MATE_like	49308.91	5.57	31.98	115.17	0.679	Ć.m.
CAD6268753.1	512	MatE, MatE	12	MATE_like	55513.4	8.66	41.77	118.52	0.643	Ć.m.
CAD6245756.1	534	MatE, MatE	11	MATE_like	55651.8	8.72	36.2	115.54	0.725	Ć.m.
CAD6270731.1	522	MatE,	12	MATE_like	56772.93	8.47	40.57	116.99	0.678	Ć.m.

CAD6268725.1	523	MatE	12	MATE_like	56772.88	8.46	40.95	116.77	0.665	Ć.m.
CAD6339418.1	171	MatE, MatE	4	MATE_like						
CAD6209925.1	505	MatE, MatE	12	MATE_like	54717.13	5.74	24.93	109.15	0.688	Ć.m.
CAD6259938.1	567	MatE, MatE	12	MATE_like	59802.49	7.86	38.15	118.27	0.663	Ć.m.
CAD6248936.1	320	MatE	4	MATE_like						
CAD6342516.1	507	MatE, MatE	12	MATE_like	54335.82	5.9	32.26	116.84	0.758	Ć.m.
CAD6265010.1	507	MatE, MatE	12	MATE_like	54321.79	5.9	32.09	116.65	0.758	Ć.m.
CAD6224154.1	542	MatE, MatE	11	MATE_like	57222.37	8.23	32.78	109.48	0.561	Ć.m.
CAD6212323.1	525	MatE, MatE	11	MATE_like	56727.52	6.97	31.58	108.9	0.54	Ć.m.
CAD6227091.1	442	MatE, MatE	11	MATE_like	47110.71	5.5	30.98	111.54	0.573	Ć.m.
CAD6245539.1	547	MatE, MatE	10	MATE_like	59818.5	6.16	28.38	119.45	0.691	Ć.m.
CAD6265145.1	475	MatE, MatE	10	MATE_like	51716.95	8.52	26.88	118.93	0.628	Ć.m.
CAD6218468.1	541	MatE, MatE	11	MATE_like	57278.53	8.36	34.54	110.04	0.569	Ć.m.
CAD6246959.1	135	MatE	2	MATE_like						
CAD6264955.1	535	MatE, MatE	11	MATE_like	55682.11	8.72	36.49	117.7	0.751	Ć.m.
CAD6241649.1	468	MatE, MatE	9	MATE_like	49036.44	8.83	31.8	112.07	0.645	Ć.m.
CAD6265009.1	400	MatE, MatE	10	MATE_like	43036.18	8.44	31.58	122.65	0.932	Ć.m.
CAD6335189.1	491	MatE, MatE	8	MATE_like	51015.31	9.41	29.5	118.94	0.66	Ć.m.
CAD6207761.1	492	MatE, MatE	10	MATE_like	51152.5	9.56	30.68	117.91	0.633	Ć.m.
CAD6202678.1	559	MatE, MatE,	9	MATE_like	58633.86	7.9	29.91	113.27	0.628	Ć.m.
		Polysacch aride biosynthes is C- terminal domain								
CAD6210210.1	541	MatE, Polysacch aride biosynthes is C- terminal domain	9	MATE_like	57157.99	8.22	31.87	111.28	0.557	Ć.m.
CAD6230302.1	485	MatE, MatE	12	MATE_like	52150.66	8.01	35.48	119.03	0.683	Ć.m.

Akc.br. - akcesioni broj; Duž. - dužina proteina (ak); HMMER - detektovani MatE domeni; TMD - detektovani transmembranski domeni; CDD - klasifikacija superfamilije; MW - molekilska težina; pI - teoretska pI; ind. nest. - indeks nestabilnosti; ind. alif. - indeks alifatičnosti; GRAVY - GRAVY indeks; Lok. - ćelijska lokalizacija; ć.m. - ćelijska membrana; Vak. - vakuola

Prilog 7. Rezultat predikcije COBRA-like proteina kod *M. lutarioriparius*.

Akc. br.	Duž.	HMMER	TMD	CDD	MW	pI	Ind. nest.	Ind. alif.	GRAVY	Lok.
CAD6217274.1	456	COBRA	1	COBRA	50617	8.84	32.4	76.12	-0.135	Ć.m.
CAD6217272.1	445	COBRA	1	COBRA	49044.4	8.9	29.35	74.99	-0.071	Ć.m.
CAD6223162.1	445	COBRA	1	COBRA	49136.64	8.9	29.88	76.52	-0.055	Ć.m.
CAD6223163.1	457	COBRA	1	COBRA	50864.37	8.99	31.57	76.81	-0.159	Ć.m.
CAD6214554.1	449	COBRA	1	COBRA	49919.31	8.93	31.04	72.34	-0.173	Ć.m.
CAD6204065.1	446	COBRA	1	COBRA	48817.14	8.83	32.72	75.47	-0.043	Ć.m.
CAD6206692.1	449	COBRA	1	COBRA	49678.96	8.88	31.87	71.49	-0.162	Ć.m.
CAD6211537.1	446	COBRA	1	COBRA	48932.34	8.89	33.8	76.35	-0.038	Ć.m.
CAD6204066.1	452	COBRA	1	COBRA	50661.52	9.05	36.04	79.76	-0.094	Ć.m.
CAD6214555.1	507	COBRA	0	COBRA						
CAD6217844.1	678	COBRA	1	COBRA	75101.24	8.91	42.61	70.24	-0.325	Ć.m.
CAD6223626.1	677	COBRA	1	COBRA	74954.07	8.95	43.38	68.77	-0.342	Ć.m.
CAD6210863.1	621	COBRA	1	COBRA	66695.96	6.86	35.88	78.13	-0.07	Ć.m.
CAD6203289.1	668	COBRA	1	COBR, CBM_2	71626.48	5.75	34.29	79.64	-0.05	Ć.m.
CAD6222353.1	670	COBRA	1	COBRA	71764.47	5.35	41.25	76.63	-0.045	Ć.m.
CAD6262889.1	360	COBRA	1	COBRA	40893.23	5.63	39.33	74.97	-0.289	Ć.m.
CAD6260146.1	360	COBRA	1	COBRA	40836.4	5.75	40.95	75.25	-0.269	Ć.m.
CAD6206693.1	322	COBRA	0	COBRA						

Akc.br. - akcesioni broj; Duž. - dužina proteina (ak); HMMER - detektovani MatE domeni; TMD - detektovani transmembranski domeni; CDD - klasifikacija superfamilije; MW - molekilska težina; pI - teoretska pI; ind. nest. - indeks nestabilnosti; ind. alif. - indeks alifatičnosti; GRAVY - GRAVY indeks; Lok. - ćelijska lokalizacija; ć.m. - ćelijska membrana;

Prilog 8. Vrednosti svih merenih parametara*.

	Jedinica	Mix	Kontrola
Parametri rasta			
Koren FW	g	3,31 ± 0,98	2,68 ± 0,86
Koren DW	g	0,54 ± 0,12	0,57 ± 0,26
List FW	g	3,76 ± 1,1	1,14 ± 1,11
List DW	g	1,45 ± 0,25	0,18 ± 0,20
Stablo FW	g	8,10 ± 1,75	2,30 ± 1,60
Stablo DW	g	1,63 ± 0,42	0,33 ± 0,25
Rizom DW	g	12,25 ± 2,86	13,42 ± 1,71
Broj listova	-	9,33 ± 2,31	5 ± 0
Ukupna dužina korena	m	33,00 ± 3,99	12,70 ± 0,13
Dužina glavnog korena	m	3,08 ± 0,12	1,54 ± 0,15
Dužina lateralnih korenova	m	29,92 ± 3,87	11,16 ± 0,28
Visina biljaka	m	0,71 ± 0,02	0,24 ± 0,12
Koncentracije metala i makroelemenata			
Mn (list)	mg/kg DW	291,56 ± 7,55	142,15 ± 6,62
Mn (stablo)		309,67 ± 3,36	301,07 ± 1,86
Mn (rizom)		73,59 ± 1,88	66,78 ± 8,22
Mn (koren)		541,32 ± 43,12	542,28 ± 154,51
Pb (list)	mg/kg DW	21,60 ± 6,79	4,62 ± 1,78
Pb (stablo)		30,92 ± 0	22,84 ± 2,69
Pb (rizom)		i. g.	i. g.
Pb (koren)		191,27 ± 6,95	217,11 ± 80,36
Zn (list)	mg/kg DW	35,46 ± 1,66	20,87 ± 0,8
Zn (stablo)		72,33 ± 1,13	53,02 ± 4,20
Zn (rizom)		90,98 ± 1,77	57,90 ± 17,74
Zn (koren)		175,31 ± 8,79	200,81 ± 88,68
Cu (list)	mg/kg DW	6,07 ± 0,60	5,98 ± 0,29
Cu (stablo)		2,42 ± 0,15	6,28 ± 0,88
Cu (rizom)		1,62 ± 0,31	0,42 ± 0,25
Cu (koren)		90,51 ± 7,80	48,32 ± 12,76
Cd (list)	mg/kg DW	0,81 ± 0,07	0,14 ± 0,02
Cd (stablo)		1,42 ± 0,22	0,52 ± 0,02

Cd (rizom)		0,75 ± 0,39	0,08 ± 0,03
Cd (koren)		4,63 ± 0,76	4,73 ± 2,10
Ni (list)	mg/kg DW	6,81 ± 0,39	2,88 ± 1,11
Ni (stablo)		6,50 ± 0	5,06 ± 0,97
Ni (rizom)		0,54 ± 1,34	i. g.
Ni (koren)		98,52 ± 5,24	105,52 ± 23,50
Cr (list)	mg/kg DW	14,91 ± 0,73	7,57 ± 0,14
Cr (stablo)		13,04 ± 0,83	15,26 ± 0,43
Cr (rizom)		7,23 ± 1,26	6,53 ± 0,23
Cr (koren)		43,70 ± 1,20	107,10 ± 23,88
Parametri oksidativnog stresa			
RWC	%	76,56 ± 12,71	68,50 ± 10,05
Prolin (list)	μmol/g FW	1,23 ± 0,49	1,77 ± 0,32
Prolin (koren)		0,96 ± 0,44	1,38 ± 0,44
H ₂ O ₂ (list)	μmol/g FW	0,42 ± 0,19	0,44 ± 0,08
H ₂ O ₂ (koren)		0,12 ± 0,01	0,15 ± 0,02
Koncentracija MDA (list)	nmol/g FW	8,15 ± 1,03	13,63 ± 3,72
Koncentracija proteina (list)	mg/ml	0,75 ± 0,17	0,53 ± 0,08
Koncentracija proteina (koren)		0,08 ± 0,06	0,07 ± 0,03
POD	(k)U/mg proteina	0,59 ± 0,12	0,65 ± 0,29
APX		0,43 ± 0,06	0,32 ± 0,05
SOD		83,94 ± 12,98	145,02 ± 24,72
CAT		0,35 ± 0,06	1,51 ± 0,35

*Sve vrednosti su prikazane kao srednja vrednost tri ponavljanja ± SD.

Biografija autora

Mila D. Pešić rođena je 20. decembra 1993. godine u Pirotu gde je završila osnovnu školu. Nakon završetka Pete beogradske gimnazije, školske 2012/2013. godine, upisala je Osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na modulu Molekularna biologija i fiziologija. Diplomirala je 2016. godine sa prosečnom ocenom 8,05, i iste godine upisala Master akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija i fiziologija. Master akademske studije završila je sa prosečnom ocenom 9,33 a master rad pod nazivom „Uticaj mezenhimskih matičnih ćelija periodoncijuma stimulisanih proinflamatornim citokinima na funkcionalnu aktivnost granulocita čoveka“ odbranila sa ocenom 10. Školske 2018/2019. upisala je Doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija prokariota kada počinje sa eksperimentalnom izradom doktorata u laboratoriji Katedre za Biohemiju i molekularnu biologiju. Na istoj katedri, u periodu od 2018. do 2022. godine, bila je angažovana u održavanju praktične nastave iz predmeta Osnovi biohemije i molekularne biologije za studente Osnovnih akademskih studija modula Ekologija. Od juna 2020. do aprila 2022. godine bila je stipendista Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja u oblasti Biotehnologije i poljoprivrede. Od aprila 2022. do ovog trenutka zaposlena je najpre na poziciji istraživač-pripravnik, a potom na poziciji istraživač-saradnik na Institutu za zemljište u Beogradu. Autor ili koautor je 12 bibliografskih jedinica uključujući naučne radove u međunarodnim i nacionalnim naučnim časopisima, kao i saopštenja na nacionalnim ili međunarodnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Mila Pešić _____

број индекса _____ M3005/2018 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Идентификација молекуларних механизма интеракције мискантуса

(Miscanthus × giganteus) и бактерија његове ризосфере

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Мила Пешић

Број индекса: М3005/2018

Студијски програм: Молекуларна биологија, модул: Молекуларна биологија прокариота

Наслов рада: Идентификација молекуларних механизма интеракције мискантуса (*Miscanthus × giganteus*) и бактерија његове ризосфере

Ментор: др Јелена Лозо, редовни професор

Потписани/а _____ Мила Пешић _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Идентификација молекуларних механизма интеракције мискантуса

(*Miscanthus × giganteus*) и бактерија његове ризосфере

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.