

Факултет Пољопривредни

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

32/22-8.1.

(Број захтева)

23.12.2020.

(Датум)

Веће научних области
биотехничких наука

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације и о одређивању ментора

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

„Халотолерантне микробне заједнице – диверзитет и способност стимулације биљног раста“
(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Мелиорације земљишта

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

1. Милица, Јеврем, Драгојевић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета,
студијски програм):
Биолошки факултет, Биологија

Универзитет у Београду

3. Година завршетка
претходног нивоа студија: 2013.

4. Година уписа на докторске студије: 2016/2017.

5. Назив студијског програма
докторских студија: Пољопривредне науке, модул Мелиорације земљишта

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: др Јелена Јовичић - Петровић

Звање: ванредни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације

1. Milinkovic, M., Lalevic, B., **Jovicic-Petrovic, J.**, Golubovic-Curguz, V., Kljujev, I., Raicevic, V. (2018): Biopotential of compost and compost products derived from horticultural waste – effect on plant growth and plant pathogens' suppression. *Process Safety and Environmental Protection*, 121: 299-306.
2. Karličić, V., Radić, D., **Jovičić-Petrović, J.**, Lalević, B., Morina, F., Golubović Ćurguz, V., Raičević, V. (2017): The possibility of using overburden waste for London plane (*Platanus x acerifolia*) growth: The Role of Plant growth promoting microbial consortia. *IFOREST-Biogeosciences and Forestry*, 10: 692 – 699.
3. Radić, D., Pavlović, V., Lazović, M., **Jovičić-Petrović, J.**, Karličić, V., Lalević, B., Raičević, V. (2017): Copper-tolerant yeasts: Raman spectroscopy in determination of bioaccumulation mechanism. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 21885 – 21893.
4. Kljujev, I., Raicevic, V., **Jovicic-Petrovic, J.**, Vujovic, B., Mirkovic, M., Rothballer, M. (2018). *Listeria monocytogenes* – Danger for health safety vegetable production. *Microbial Pathogenesis*, 120: 23-31.
5. **Jovičić-Petrović, J.**, Jeremić, S. Vučković, I., Vojnović, S., Bulajić, A., Raičević, V., Nikodinovic-Runic, J. (2016): *Aspergillus piperis* A/5 from plum-distilling waste compost produces a complex of antifungal metabolites active against the phytopathogen *Pythium aphanidermatum*. *Archives of Biological Sciences*, 68: 279-289.

Обавештавамо вас да је Наставно-научно веће Пољопривредног факултета

на седници одржаној 23.12.2020. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Душан Живковић

- Прилог
1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
 2. Извештај Комисије

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 32/22-8.1.
Датум: 23.12.2020. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 51. и 52. Правилника о правилима докторских академских студија и члана 44. Статута Пољопривредног факултета, Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 23.12.2020. године, донело је

ОДЛУКУ

I ПРИХВАТА СЕ тема докторске дисертације коју је поднела **МИЛИЦА ДРАГОЈЕВИЋ, мастер** и одобрава израда дисертације под насловом: **«ХАЛОТОЛЕРАНТНЕ МИКРОБНЕ ЗАЈЕДНИЦЕ – ДИВЕРЗИТЕТ И СПОСОБНОСТ СТИМУЛАЦИЈЕ БИЉНОГ РАСТА».**

II За ментора се именује др Јелена Јовичић-Петровић, ванредни професор Универзитета у Београду – Пољопривредног факултета.

III На одлуку о прихватању теме докторске дисертације и одређивању ментора сагласност даје одговарајуће Веће научних области Универзитета у Београду.

Образложење

Наставно-научно веће факултета разматрало је и усвојило Извештај о позитивној оцени научне заснованости теме докторске дисертације коју је поднела Милица Драгојевић, мастер.

Наставно-научно веће факултета је приликом доношења одлуке оцењивало да ли је реч о оригиналној идеји и да ли је тема од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

Сходно изнетом одлучено је као у диспозитиву.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Душан Живковић)

Доставити: кандидату, ментору, Институту за прехранбену технологију и биохемију, Студентској служби и архиви.

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Број:

Дана 17.11.2020. године

Београд – Земун

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА

Предмет: Извештај Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Милице Драгојевић

На основу члана 44. Став 1. Правилника о правилима докторских студија Пољопривредног факултета, а на предлог одговарајућег већа катедре и мишљења одговарајућег наставно-научног већа института, Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 28.10.2020. године донело је одлуку бр. 32/20-5.2. да се образује Комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Милице Драгојевић**, мастер биолога, под насловом:

„Диверзитет халотолерантних микробних заједница и способност стимулације биљног раста“.

Кандидат је дана 06.11.2020. године одбранила пријављену тему докторске дисертације, а потписан записник је предат у Студентску службу истог дана. На основу усаглашених мишљења свих чланова Комисије, председник Комисије др Јелена Јовичић-Петровић, ванредни професор (Одлука број 21-15/1 од 06.11.2020. године) подноси:

ИЗВЕШТАЈ

1 Основни подаци о кандидату и дисертацији

1.1 Биографија кандидата

Милица Драгојевић рођена је 06.11.1988. год у Ваљеву, где је завршила основну школу и Ваљевску гимназију. Основне академске студије је завршила на Биолошком факултету Универзитета у Београду, модул Биологија. Мастер студије, модул Микробиологија, уписала је 2010. године на истом факултету и мастер рад под називом: Одређивање антимикубног ефекта прополиса на одабране Грам негативне бактерије одбранила 2013. године и тиме стекла звање мастер биолог. Специјалистичке академске студије, модул Микробиологија, уписала је исте године на Биолошком факултету у Београду. Специјалистички рад под називом: Изолација и карактеризација врста *Azotobacter* sp. из различитих земљишта, реализован је у сарадњи са Катедром за Еколошку микробиологију, Пољопривредног факултета у Београду и одбрањен 2015. године.

Докторске студије је уписала 2016/2017 године на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду на студијском програму Пољопривреда, модул Мелиорације земљишта. 23.09.2020. године поднела је пријаву теме докторске дисертације (бр. 21/15). До сада је резултате својих истраживања саопштила на две конференције међународног значаја (Прилог 1).

1.2 Предлог теме докторске дисертације

Предложени наслов теме докторске дисертације: **„Диверзитет халотолерантних микробних заједница и способност стимулације биљног раста“** не пружа потпуно јасну слику о предмету истраживања. Комисија предлаже да се прихвати пријава теме докторске дисертације под измењеним насловом који гласи: **„Халотолерантне микробне заједнице – диверзитет и способност стимулације биљног раста“**, сматрајући да се кроз овај наслов концизно и јасно обухвата предмет истраживања и циљ тезе.

2 Прелмет и циљ дисертације

2.1 Предмет и програм истраживања

Природне слатине са јединственом флором и фауном представљају високо вредна станишта са аспекта очувања биодиверзитета, међутим, секундарна салинизација земљишта као последица антропогених утицаја постаје растући глобални проблем. Према подацима FAO (2015), секундарна салинизација земљишта погађа 3,8 милиона ha у Европи. Слана земљишта имају високу електричну проводљивост (EC), низак водни потенцијал и прекомерну концентрацију јона соли што отежава преживљавање биљних и других облика живота (Egamberdieva et al., 2019). Процењује се да се сваке године 1-2% плодних земљишта деградира широм света због салинитета (Etesami and Beattie, 2018), као и да ће се у наредних 35 година са различитим степеном сланости суочити 50% земљишта на Земљи (Thiem et al., 2018).

Биљке заслањених станишта, халофите, поседују капацитете за толеранцију повећаног салинитета у земљишту, који су настали еволутивним прилагођавањем животу на екстремном станишту (Hryniewicz et al., 2019). Способне да преживе и размножавају се при концентрацијама јона натријума и хлора које су токсичне за већину биљака, халофите привлаче пажњу не само као модел организми за испитивање механизма толеранције на стрес соли, већ и као храна за људе и стоку, извор влакана и горива (Hryniewicz et al., 2019). Утицајем на минерализацију и кружење нутријената, халофите побољшавају услове у микро стаништима и као значајан извор органске материје доприносе очувању читавог екосистема заслањених станишта (Li et al., 2018).

Истраживања халофита углавном су фокусирана на молекуларне, биохемијске и физиолошке механизме који су у основи адаптација на повећане концентрације соли у станишту. Поред генетски детерминисане основе, отпорност халофита на стрес солима је нераскидиво повезана са сложеним еколошким процесима који су под утицајем разноврсних заједница микроорганизама које насељавају биљна ткива и органе (Ruppel et al., 2013; Tkacz et al., 2020). Скуп свих асоцираних микроорганизама представља микробиоту биљке која проширује капацитете биљке за адаптацију на услове у станишту (Bulgarelli et al., 2013; Schlaeppi and Bulgarelli, 2015). Колективни геном асоцираних микробних заједница, микробиом, вишеструко превазилази геном биљке домаћина и посматра се као његов продужетак или други биљни геном (Turner et al.,

2013; Schlaeppli and Bulgarelli, 2015). Биљке могу да утичу на структуру и функцију микробиома, који представља кључну детерминанту здравља и продуктивности биљке и доприноси бољој адаптацији биљке на локалне услове средине (Yuan et al., 2016.; Akyol et al., 2020). Микробне заједнице су коеволуирале заједно са биљком домаћином и њихова структура се развијала под притиском јединствених услова на станишту. Усавршавање метода и техника молекуларне биологије омогућило је упознавање састава и диверзитета микробиома што је основа за разумевање биљно-микробних као и међусобних микробних интеракција (Schlaeppli and Bulgarelli, 2015).

Микроорганизми отпорни на соли означавају се као халотолерантни и уколико имају способност да стимулишу раст биљака можемо их означити као НТ-PGPR (*Halotolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Ови микроорганизми су присутни и преживљавају у заслањеним земљиштима, ризо и ендоризосфери халофита. Присуство одређених особина као што су способност производње егзополисахарида, АСС деаминазе, производња осмолита, побољшање усвајања нутријената и активност антиоксидативних ензима као и одржавање односа $K^+:Na^+$ чине их погодним кандидатима за стимулацију раста у сланом окружењу. Поред тога способност НТ-PGPR да фиксирају елементарни азот, производе сидерофоре, растварају нерастворљиве нутријенте и обезбеђују заштиту од фитопатогена, додатно повећава значај корисних микроба у пољопривредним системима, посебно у условима повећаног садржаја соли (Zahir et al., 2019).

Продукција биљних хормона (Egamberdieva et al., 2019), олакшавање исхране биљке солубилизацијом К, Р, и продукцијом сидерофора (Dodd and Pérez-Alfocea, 2012; Etesami and Beattie, 2018), неки су од механизма којима НТ-PGPR олакшавају преживљавање халофитама и гликофитама (Etesami and Beattie, 2018) у условима стреса изазваног салинитетом. Такође делујући као заштитни сунђери егзополисахариди (EPS) у комплексу биофилма побољшавају активност водног капацитета у земљишту у условима сланости и суше (Costa et al., 2018). Показано је да је EPS екстраховани из *Alcaligenes latus* апсорбовао 1000 пута више воде од властите суве тежине, док је способност упијања воде из соја *Pseudomonas aeruginosa* CMG1421 била 400 пута (Jamil and Ahmed, 2008). Формирање биофилма у земљишним агрегатима или на површини корена карактерише висока концентрација коренских ексудата, сигналних молекула, садржаја органске материје и воде. Овај комплекс делује као сила привлачења у избору и успостављању микробног диверзитета (Arora et al., 2020).

Један од најистакнутијих PGP (*Plant Growth Promoting*) механизма је снижавање нивоа етилена који се појачано лучи у стресним условима као што су суша или повишен салинитет тла (Etesami and Beattie, 2018). Ризобактерије које продукују ензим АСС деаминазу могу да утичу на смањење нивоа етилена деаминацијом аминокиселине 1-карбоксилне киселине (АСС) која је директан прекурсор етилена код биљака и тиме могу да ублаже ефекте стреса солима код биљака (Penrose and Glick, 2003; Egamberdieva et al., 2019).

Имајући у виду адаптације халофита и асоциране микробиоте на живот у заслањеним стаништима, ризосфера и ендоризосфера халофита представљају драгоцен извор НТ-PGPR које потенцијално могу да олакшају раст усева на заслањеним земљиштима (Etesami and Beattie, 2018). Способност преживљавања у условима повећане салинизације удружена са механизмима који могу стимулативно деловати на раст и повећану отпорност биљке чини употребу НТ-PGPR оправданом алтернативном стратегијом за побољшање толеранције усева на стрес солима (Dodd and Perez Alfocsa, 2012; Akyol et al., 2020). На овај начин НТ-PGPR се појављују као ефикасни биолошки алати за ублажавање токсичних ефеката високих концентрација соли и побољшавају раст биљака, истовремено поправљајући деградирано слано земљиште (Arora et al., 2020).

Инокулација семена бактеријама из групе HT-PGPR утиче на клијање и рани развој клијанаца у условима повишене концентрације соли (Zhou et al., 2017), а ове фазе раста су најосетљивије на абиотички стрес. Истраживања су указала да HT-PGPR као биоинокуланти представљају еколошки прихватљиву и одрживу методу за побољшање продуктивности сланих агроекосистема (Fatima and Arora, 2019), због чега је од изузетне важности избор одговарајуће формулације биоинокуланта. Развој и примена нових техника инкапсулације PGPR доприноси ефикаснијем преживљавању у земљишту и постепено ослобађање, што обезбеђује продужено деловање инокуланта (Schoebitz and López Belchí, 2015). Истраживања указују на предности употребе инкапсулисаних инокулума у односу на течне у погледу колонизације корена и ефеката на раст у условима стреса изазваног повећаном салинизацијом (Bhise and Dandge, 2019).

Програмом докторске дисертације је предвиђено упознавање са ризобактеријским диверзитетом код биљака на заслањеном станишту применом молекуларних и стандардних микробиолошких метода. Са друге стране, заслањена земљишта су екстремно неповољна станишта и стога могу бити селективна за присуство корисних микробних популација које поседују различите PGP карактеристике.

Изолација бактерија ће се вршити на основу два критеријума: толеранције на присуство различитих концентрација NaCl и способности продукције ензима АСС деаминазе. Селекција ће обухватити испитивање способности изолата да продукују индол-3-сирћетну киселину, сидерофоре, солубилизују једињења фосфора, калијума и цинка, продукују егзополисахариде. Поред тога, испитаће се да ли изоловане бактерије формирају биофилмове или се одликују неким другим механизмима стимулације биљног раста. Ради бољег разумевања биљно-микробних интеракција у стресним условима, испитиваће се утицај конзорцијума најбоље окарактерисаних HT-PGPR на клијање семена одабраних усева у присуству различитих концентрација NaCl и могућности њихове инкапсулације.

Предлаже се да план и програм истраживања обухвати следеће фазе:

- Прва фаза: Упознавање и сагледавање диверзитета микробиома аутохтоних халофита са локалитета природне слатине Слано Копово. Применом метода метагеномике добиће се свеобухватна слика таксономског диверзитета микробних заједница у земљишту, ризосфери и ендоризосфери различитих биљака са заслањених станишта. Упоредиће се диверзитет микроорганизама на различитим таксономским нивоима, присуство патогена и ретких врста међу узорцима ризосфере различитих биљних врста.
- Друга фаза: Изолација и селекција сојева за даљи ток истраживања. У оквиру ове фазе, извршиће се изолација халотолерантних и АСС деаминаза позитивних бактерија из узорака земљишта, ризосфере и ендоризосфере халофита. Карактеризација ће обухватити испитивање својстава стимулације биљног раста изолата.
- Трећа фаза: Испитивање утицаја концентрације NaCl на испољавање PGP својстава. Циљ ове фазе је да се испита да ли сојеви задржавају својства у присуству повећаних концентрација соли.
- Четврта фаза: Молекуларна идентификација на основу секвенци 16S rRNA гена изолата селектованих на основу PGP својстава.
- Пета фаза: Испитивање утицаја одабраних сојева на клијање усева у присуству различитих концентрација NaCl.
- Шеста фаза: Инкапсулација сојева који су показали најбоље карактеристике током претходних фаза и испитивање вијабилности у току чувања инкапсулата.

2.2 Научни циљ истраживања

Истраживања о могућностима повећања толеранције биљака према повећаним концентрацијама соли у земљишту не доприносе само бољем разумевању физиологије и еволуције биљака, већ олакшавају производњу усева и ремедијацију заслањених земљишта. До данас, највећи број истраживања искључиво је фокусиран на карактеризацију низа гена повезаних са стресом на соли код биљака и побољшањем толеранције биљака на соли користећи приступ генетске модификације. Међутим, овим приступом дошло се до само мањег успеха, често занемарујући улогу микроорганизама у биљној екофизиологији. Екофизиолошки приступ сугерише да је заједница микроба која је повезана са биљкама можда кључни фактор за разумевање прилагођавања биљака станишту. Због тога је као основни научни циљ докторске дисертације постављено проучавање микробног диверзитета у ризосфери биљака на заслањеним земљиштима.

Поред упознавања диверзитета, истраживања у оквиру ове дисертације имају за циљ испитивање PGP ефеката ризобактерија како би се ти механизми потенцијално искористили код пољопривредних усева на секундарно заслањеним земљиштима. Сагледавајући важност избора формулације инокуланта, за циљ дисертације је постављено испитивање могућности инкапсулације одабраних бактеријских сојева. Полазећи од ризосфере и ендоризосфере халофита као ресурса, очекивани резултат ове дисертације је формирање колекције окарактерисаних и идентификованих НТ-PGPR које, имајући у виду растући проблем секундарне салинизације земљишта, могу да буду алтернативни начин за ублажавање ефеката стреса солима код усева.

3 Основне хипотезе од којих се полази у истраживању

Докторска дисертација се темељи на следећим радним хипотезама:

Прва хипотеза: Литературни извори потврђују велики диверзитет ризомикробних заједница у заслањеним земљиштима, које играју важну улогу у сакупљању угљеника, кружењу нутријента и побољшању услова у микро-стаништима и тако доприносе очувању екосистема.

Друга хипотеза: Екофизиолошки приступ сугерише да је заједница микроба која је повезана са биљкама можда кључни фактор за разумевање прилагођавања биљака станишту. Стога изолација и идентификација микробних изолата из ризосфере и ендоризосфере може бити корисна за објашњење механизма толеранције на стрес.

Трећа хипотеза: Заслањивање земљишта, било као природан процес или последица неадекватних агрономских пракси, доводи до деградације земљишта и ограничава биљни раст. Идентификовани и најефикаснији бактеријски сојеви могу имати примену као инокуланти у секундарно заслањеним земљиштима.

Четврта хипотеза: На вијабилност бактеријских инокуланата, која је кључна за успешну примену, потенцијално се може утицати применом адекватних техника инкапсулације.

Ове хипотезе су основа за постављање програма истраживања.

4 Методе које ће се применити у истраживањима

4.1. Узорци земљишта и биљни материјал

Земљиште и биљни материјал за истраживање биће узорковани са подручја природне слатине Слано Копово. Са локалитета природне слатине одабране су

карактеристичне халофите међу којима су сукуленте и лековите биљке: *Salicornia europaea* L., *Suaeda maritima* (L.) Dum., *Camphorosma annua* Pall., *Artemisia santonicum* L., *Limonium gmelinii* (Willd.) O. Kuntze, *Plantago schwarzenbergiana* Schur, *Agrimonia eupatoria* L. и *Hordeum hystrix* Roth.

4.2. Примена метода метагеномике за анализу микробиома

Узорци земљишта, ризо и ендоризосфере халофита ће бити обрађени и анализирани помоћу ZymoBIOMICS® Targeted Sequencing Service for Microbiome Analysis (Zymo Research, Irvine, CA). Секвенцирање метагенома биће урађено пиросеквенцирањем на Illumina MiSeq платформи, док ће биоинформатичка обрада секвенци бити урађена DADA2 пакетом биоинформатичких алата (pipeline). Таксономска анализа биће урађена помоћу Uclust алгоритма, а за анализу састава и диверзитета микробиома биће коришћен Qiime пакет биоинформатичких алата отвореног кода (open-source).

4.3. Изолација и формирање колекције бактерија

Формирање колекције бактерија која ће бити обухваћена истраживањем, започеће изолацијом халотолерантних и АСС деаминаза позитивних бактерија из узорака земљишта, ризосфере и ендоризосфере одабраних биљака. Одвајање ризосфере и ендоризосфере вршиће се према модификованим процедурама описаним у Schlaerri et al. (2014). Изолација халотолерантних бактерија вршиће се методом разређења на месо-пептонском агару са додатком 5%, 10% и 15% NaCl. Изолација АСС деаминаза позитивних бактерија ће се вршити на Dworkin-Foster медијуму према протоколу описаном у Penrose и Glick (2003).

4.4. Карактеризација изолата

Карактеризација изолата започеће одређивањем и описивањем морфолошких, физиолошких и еколошких карактеристика. Стандардним микробиолошким методама испитаће се однос изолата према еколошким факторима: рН вредности, температури и различитим концентрацијама NaCl. У даљем току карактеризације, испитиваће се директна својства стимулације биљног раста. Колориметријски тест са Салковски реагенсом користиће се за испитивање продукције индол сирћетне киселине према протоколу Paten и Glick (2002). Протокол описан код Lakshmanan et al. (2015), користиће се за квалитативно одређивање продукције сидерофора. Способност солубилизације калијума биће одређена на модификованој подлози по Александрову са K-Al-силикатом као јединим извором калијума према Rajawat et al. (2016). За испитивање солубилизације једињења цинка, користиће се медијум са ZnO према Gandhi и Muralidharan (2016), док ће способност изолата за солубилизацију фосфата бити испитана на NBRIP медијуму (National Botanical Research Institute's Phosphate). Квалитативно одређивање продукције егзополисахарида вршиће се према модификованој методи описаној у Paulou et al. (2012). Продукција биофилмова биће испитана колориметријском методом са Кристал виолетом на микротитар плочама према протоколима коришћеним у Вујовић, (2016).

4.5. Испитивање утицаја NaCl на испољавање својстава стимулације биљног раста, покретљивост и продукцију пигмената

Протоколи за испитивање својстава стимулације биљног раста биће поновљени у присуству 3% и 7% NaCl у подлогама. Утицај NaCl на покретљивост биће тестирана према Remonsellez et al. (2018), док ће се утицај на продукцију пигмената пратити спектрофотометријски према Rezaeeyan et al. (2017).

4.6. Идентификација одабраних сојева

Сојеви који се по својим особинама издвоје током различитих фаза карактеризације биће идентификовани применом молекуларних метода. Применом комерцијаног кита ZymoBIOMICS DNA Miniprep (Zymo Research, USA) вршиће се изолација ДНК испитиваних сојева. Након изолације ДНК, приступиће се умножавању PCR техником и секвенцирању гена за 16SrRNA. Упоредивањем добијених секвенци са секвенцама доступним у GenBank бази података извршиће се идентификација.

4.7. Испитивање утицаја бактеријске инокулације на параметре клијања у условима различите концентрације NaCl

Одабрани сојеви користиће се за инокулацију семена након чега ће се пратити параметри клијања у условима 0-200 mM NaCl. Испитивање ће се вршити према модификованом ISTA протоколу (*International seed Testing Assotiation*, 2020) Од параметара пратиће се: индекс герминације (GI), просечно време герминације (MGT), вигор клијанаца (I и II).

Пратиће се утицај бактеријске инокулације на параметре клијања следећих биљних врста: сунцокрета *Helianthus annuus* L., пшенице *Triticum vulgare* L. и јечма *Hordeum vulgare* L.

4.8. Инкапсулација одабраних сојева

Бактеријски сојеви који покажу најбоље карактеристике у претходом делу истраживања биће инкапсулисани уз примену екструзионе технике инкапсулације и носача на бази полисахарида. Пре и након инкапсулације вршиће се провера бројности бактерија, као и провера виабилности након складиштења на собној и температури од 4°C.

4.9. Методе статистичке обраде података

Добијени резултати биће обрађивани стандардним статистичким методама, применом анализе варијансе.

5 Очекивани резултати и научни допринос

Предложен мултидисциплинаран приступ у истраживању диверзитета халотолерантних микробних заједница, уз примену савремених молекуларних и класичних микробиолошких метода, допринеће разумевању значаја микробног диверзитета у екстремним стаништима, као што су заслањена земљишта. Такође, очекивани резултати предложеног екофизиолошког приступа истраживању ове теме, који у први план поставља механизме стимулације биљног раста и интеракцију биљака са заслањених станишта и HT-PGPR, расветлиће улогу микроорганизама у прилагођавању биљака на заслањена станишта. Анализа ризосферних заједница сукулентних и лековитих биљака са заслањених станишта указаће на специфичност ових интеракција у заслањеним земљиштима, али ће допринети и бољем општем разумевању сложених биљно-микробних интеракција. Значај истраживања о халотолерантним микробним заједницама, која су предмет ове дисертације, произилази и од чињенице да су ово прва истраживања ове врсте у нашој земљи.

Поред научног доприноса, резултати ове дисертације указаће и на могућности практичне примене у савременој пољопривредној производњи. Наиме, заслањена земљишта, као екстремно неповољна станишта, биће коришћена као извор корисних

микробних популација које поседују различите PGP карактеристике. Формирана колекција окарактерисаних HT-PGPR, као један од резултата истраживања, има значајан потенцијал за примену, како у конзервацији и ревегетацији природних слатина, тако и у секундарно заслањеном пољопривредном земљишту, које представља растући проблем који угрожава производњу хране. Проналажење адекватних техника инкапсулације одабраних сојева, даће додатну основу за унапређење пољопривредне праксе примене HT-PGPR као биоинокуланата.

На основу изнетог, Комисија сматра да ће добијени резултати предложене теме докторске дисертације имати како фундаментални, тако и практични значај.

6 Закључак

На основу анализе поднете пријаве теме докторске дисертације, као и на основу јавне одбране научне заснованости теме кандидата Милице Драгојевић, мастер биолога, под насловом: **Диверзитет халотолерантних микробних заједница и способност стимулације биљног раста**, Комисија предлаже измењени наслов теме докторске дисертације: **Халотолерантне микробне заједнице – диверзитет и способност стимулације биљног раста**. Комисија сматра да измењени наслов јасно одражава циљеве, програм и предмет истраживања.

Кандидат полази од прегледа актуелне литературе из области халотолерантних ризосферних заједница и стимулатора биљног раста. Хипотезе од којих кандидат полази, као и циљ рада, правилно су постављени, а методе које кандидат предлаже у потпуности омогућавају реализацију програма истраживања.

Тема докторске дисертације је из уже научне области Еколошка микробиологија.

Комисија за ментора ове дисертације предлаже др Јелену Јовичић-Петровић, ванредног професора Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

7 Име и референце предложеног ментора

Име и презиме ментора: Јелена Јовичић-Петровић

Звање: ванредни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације

1. Milinkovic, M., Lalevic, B., **Jovicic-Petrovic, J.**, Golubovic-Curguz, V., Kljujev, I., Raicevic, V. (2018): Biopotential of compost and compost products derived from horticultural waste – effect on plant growth and plant pathogens' suppression. *Process Safety and Environmental Protection*, 121: 299-306.
2. Karličić, V., Radić, D., **Jovičić-Petrović, J.**, Lalević, B., Morina, F., Golubović Ćurguz, V., Raičević, V. (2017): The possibility of using overburden waste for London plane (*Platanus x acerifolia*) growth: The Role of Plant growth promoting microbial consortia. *IFOREST-Biogeosciences and Forestry*, 10: 692 – 699.
3. Radić, D., Pavlović, V., Lazović, M., **Jovičić-Petrović, J.**, Karličić, V., Lalević, B., Raičević, V. (2017): Copper-tolerant yeasts: Raman spectroscopy in determination of bioaccumulation mechanism. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 21885 – 21893.
4. Kljujev, I., Raicevic, V., **Jovicic-Petrovic, J.**, Vujovic, B., Mirkovic, M., Rothballer, M. (2018). *Listeria monocytogenes* – Danger for health safety vegetable production. *Microbial Pathogenesis*, 120: 23-31.

5. **Jovičić-Petrović, J.**, Jeremić, S. Vučković, I., Vojnović, S., Bulajić, A., Raičević, V., Nikodinovic-Runic, J. (2016): *Aspergillus piperis* A/5 from plum-distilling waste compost produces a complex of antifungal metabolites active against the phytopathogen *Pythium aphanidermatum*. Archives of Biological Sciences, 68: 279-289.

Београд-Земун
Дана 17.11.2020. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

др Јелена Јовичић-Петровић, ванредни професор
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду
Ужа научна област: еколошка микробиологија

др Стева Левић, доцент
Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду
Ужа научна област: биохемија

др Нада Станковић, научни сарадник
Институт за молекуларну генетику и генетичко
инжењерство, Универзитет у Београду
Ужа научна област: молекуларна биологија

Прилог 1 - Списак саопштених и објављених научних и стручних радова кандидата

Dragojević, M., Jovićić-Petrović, J., Kerecki, S., Karličić, V., Raičević, V. (2018). Plant growth promoting characteristics of the genus *Azotobacter*. In B. Uzelac (Ed.), *Book of Abstracts of the 3rd International Conference on Plant Biology (22nd SPPS Meeting)* (pp. 153). Belgrade, Serbia.

Dragojević, M., Raičević, V., Jovićić-Petrović, J. (2020). Microbiome of the halophyte *Hordeum hystrix* Roth. as a source of the halophilic PGP bacteria. *FEMS Online Conference on Microbiology 2020*. <https://doi.org/10.26226/morressier.5f3392ca9d1718ca4c8b2f4c>

Прилог 2 - Списак литературе која ће се користити

Akyol, T.Y., Sato, S., & Turkan, I. (2020). Deploying root microbiome of halophytes to improve salinity tolerance of crops. *Plant Biotechnology Reports*, 14, 143-150.

Arora, N.K, Fatima, T., Mishra, J., & Mishra I. (2020). Halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils. *Journal of Advanced Research*, 26, 69-82.

Bhise, K.K., & Dandge, P.D. (2019). Alleviation of salinity stress in rice plant by encapsulated salt tolerant plant growth promoting bacteria *Pantoea agglomerans* strain KL and its root colonisation ability. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 65, 1955-1968.

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 807-838.

Costa, O.Y, Raaijmakers, J.M., & Kuramae, E.E. (2018). Microbial extracellular polymeric substances: Ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1636.

Dodd, I. C., & Pérez-Alfocea, F. (2012). Microbial amelioration of crop salinity stress. *Journal of Experimental Botany*, 63, 3415–3428.

Egamberdieva, D., Wirth, S., Bellingrath-Kimura, S. D., Mishra, J., & Arora, N. K. (2019). Salt-Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Enhancing Crop Productivity of Saline Soils. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2791.

Etesami, H., & Beattie, G.A. (2018). Mining Halophytes for Plant Growth-Promoting Halotolerant Bacteria to Enhance the Salinity Tolerance of Non-halophytic Crops. *Frontiers in Microbiology*, 9, 148.

FAO (2015) Status of the World's Soil Resources | Main Report Regional Assessment of Soil Changes in Europe and Eurasia

Fatima, T., & Arora, N. K. (2019). Plant growth-promoting rhizospheric microbes for remediation of saline soils. In N.K. Arora, & K. Narendra (Eds), *Phyto and Rhizo Remediation*. Singapore: Springer.

Gandhi, A., & Muralidharan, G. (2016). Assessment of zinc solubilizing potentiality of *Acinetobacter* sp. isolated from rice rhizosphere. *European Journal of Soil Biology*, 76, 1-8.

Hryniewicz, K., Patz, S., & Ruppel, S. (2019). *Salicornia europaea* L. as an underutilized saline-tolerant plant inhabited by endophytic diazotrophs. *Journal of Advanced Research*, 19, 49–56.

ISTA (2020): International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association. Switzerland.

- Jamil, N., & Ahmed, N. (2008). Production of biopolymers by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine source. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51, 457–64.
- Lakshmanan, V., Shantharaj, D., Li, G., Seyfferth L.A., Sherrieri A. L., & Bais, H.P. (2015). A natural rice rhizospheric bacterium abates arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 242, 1037–1050.
- Li, Y., Kong, Y., Teng, D., Zhang, X., He, X., Zhang, Y. & Lv, G. (2018). Rhizobacterial communities of five co-occurring desert halophytes. *PeerJ*, 6, e5508.
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3795–801.
- Paulo, M. E., Vasconcelos, P. M., Oliveira, S. I., Affe M. H., Nascimento, R., De Melo S. I., De Abreu Roque, M.R., & De Assis S.A. (2012). An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. *Food Science and Technology*, 32, 710-714.
- Penrose, M. D., & Glick, R. B. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase- containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118, 10-15.
- Rajawat, M.V.S., Singh, S., Tyagi, S.P., & Saxena, A.K. (2016). A Modified Plate Assay for Rapid Screening of Potassium-Solubilizing Bacteria. *Pedosphere*, 26, 768-773.
- Remonsellez, F., Castro-Severyn, J., Pardo-Esté, C., Aguilar, P., Fortt, J., Salinas, C., Barahona, S., León, J., Fuentes, B., Areche, C., Hernández, K.L., Aguayo, D. & Saavedra, C.P. (2018). Characterization and salt response in recurrent halotolerant *Exiguobacterium* sp. SH31 isolated from sediments of Salar de Huasco, Chilean Altiplano. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2228.
- Rezaeeyan, Z., Safarpour, A., Amoozegar, A. M., Babavalian, H., Tebyanian, H., & Shakeri, F. (2017). High carotenoid production by a halotolerant bacterium, *Kocuria* sp. strain qwt-12 and anticancer activity of its carotenoid. *EXCLI Journal*, 16, 840-851.
- Ruppel, S., Franken, P., & Witzel, K. (2013). Properties of the halophyte microbiome and their implications for plant salt tolerance. *Functional Plant Biology*, 40, 940-951.
- Schlaeppli, K., Dombrowski, N., Oter, R. G., Ver Loren van Themaat, E., & Schulze-Lefert, P. (2014). Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 111, 585-592.
- Schoebitz, M., & López Belchí, M.D. (2016). Encapsulation Techniques for Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. In N. K. Arora, S. Mehnaz, & R. Balestrini (Eds.),
- Schlaeppli, K., & Bulgarelli, D. (2015). The plant microbiome at work. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28, 212–217. *Bioformulations: for Sustainable Agriculture*. New Delhi: Springer.

Thiem, D., Gołębiewski, M., Hulisz, P., Piernik, A., & Hryniewicz, K. (2018). How Does Salinity Shape Bacterial and Fungal Microbiomes of *Alnus glutinosa* Roots? *Frontiers in Microbiology*, 9, 651.

Tkacz, A., Bestion, E., Bo, Z., Hortala, M., & Poole, P.S. (2020). Influence of plant fraction, soil, and plant species on microbiota: a multikingdom comparison. *mBio*, 11, e 02785-19.

Turner, R. T., James, K. E., & Poole S. P. (2013). The plant microbiome. *Genome biology*, 14, 209.

Вујовић, Б. (2016). *Бактериофаги као агенси у контроли формирања биофилмова Pseudomonas aeruginosa*. Докторска дисертација, Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду.

Yuan, Z., Druzhinina, I.S., Labbé, J., Redman, R., Qin, Y., Rodriguez, R., Zhang, Ch., Tuskan, G.A., & Lin, F. (2016). Specialized Microbiome of a Halophyte and its Role in Helping Non-Host Plants to Withstand Salinity. *Scientific Reports*, 6, 32467.

Zahir Z.A., Nadeem S.M., Khan M.Y., Binyamin R., & Waqas M.R. (2019). Role of Halotolerant Microbes in Plant Growth Promotion Under Salt Stress Conditions. In M. Kumar, H. Etesami, & V. Kumar (Eds.), *Saline Soil-based Agriculture by Halotolerant Microorganisms*. Singapore: Springer.

Zhou, N., Zhao, Sh., & Tian, C.Y. (2017). Effect of halotolerant rhizobacteria isolated from halophytes on the growth of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under salt stress. *FEMS Microbiology Letters*, 364, 11.