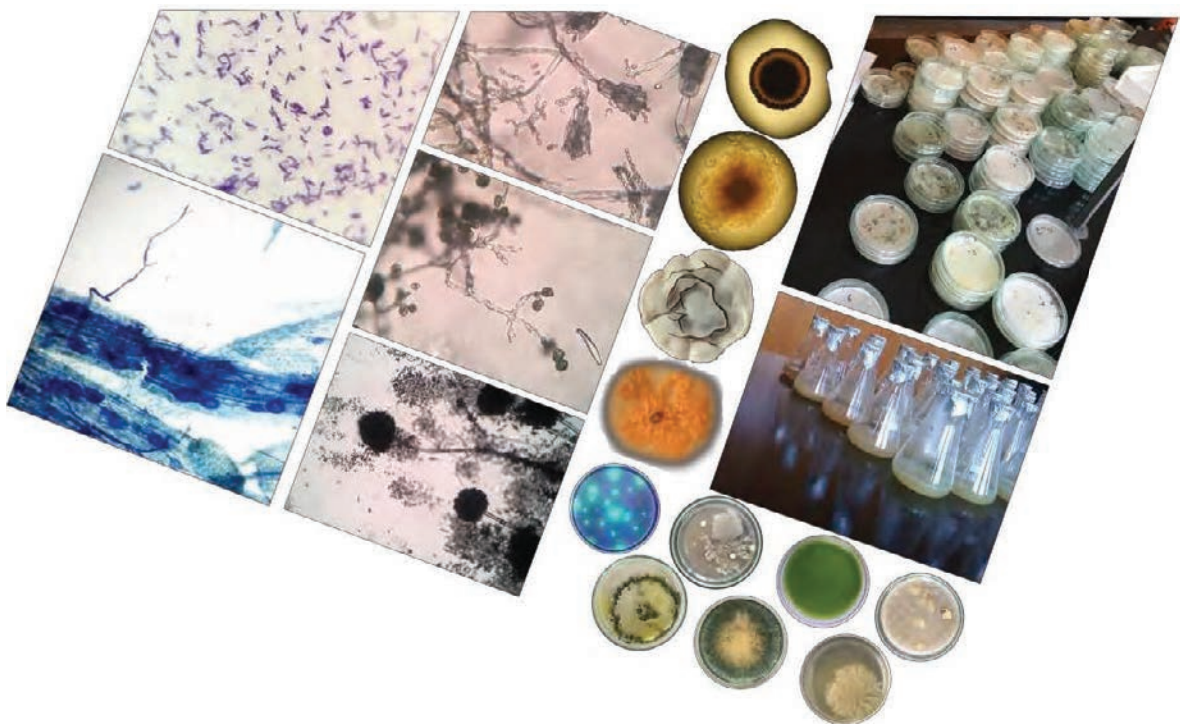




Doc. dr Timea Hajnal Jafari
Doc. dr Dragana Stamenov
Prof. dr Simonida Đurić

PROIZVODNJA I PRIMENA BIOPREPARATA



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Novi Sad, 2020.

Štampanje ovog udžbenika odobrilo je Nastavno – naučno veće Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu na sednici od 07.11.2019.godine. Broj odluke 1000/0102-1279/2/6

CIP - Katalogizacija u publikaciji
Biblioteke Mатице српске, Нови Сад

632

ХАЈНАЛ-Јафари, Тимеа, 1973-

Proizvodnja i primena biopreparata / Timea Hajnal Jafari, Dragana Stamenov, Simonida Đurić. - Novi Sad : Poljoprivredni fakultet, 2020 (Beograd : Donat graf). - 119 str. : ilustr. ; 30 cm. - (Edicija Osnovni udžbenik)

Tiraž 20. - Bibliografija.

ISBN 978-86-7520-484-8

1. Стаменов, Драгана, 1978- [аутор] 2. Ђурић, Симонида, 1967- [аутор]
а) Биопрепарати

COBISS.SR-ID 333023751

EDICIJA OSNOVNI UDŽBENIK

Osnivač i izdavač edicije

Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Trg Dositeja Obradovića 8
21000 Novi Sad

Godina osnivanja

1954.

Glavni i odgovorni urednik edicije

Dr Nedeljko Tica, redovni profesor
Dekan Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu

Članovi komisije za izdavačku delatnost

Dr Ljiljana Nešić, redovni profesor, predsednik
Dr Branislav Vlahović, redovni profesor, član
Dr Milica Rajić, redovni profesor, član
Dr Nada Plavša, redovni profesor, član

Autori

Doc. dr Timea Hajnal Jafari
Doc. dr Dragana Stamenov
Prof. dr Simonida Đurić

Glavni i odgovorni urednik edicije

Dr Nedeljko Tica, redovni profesor
Dekan Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu

Recenzenti

Dr Vesna Lalošević, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Dr Jelica Simeunović, vanredni profesor
Prirodno - matematični fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Izdavač

Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Zabranjeno preštampavanje i fotokopiranje.

Sva prava zadržava izdavač.

Štampanje odobrila

Komisija za izdavačku delatnost,
Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu

Tiraž:

20

Mesto i godina Štampanja

Beograd, 2020.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. RIZOSFERA-POJAM I DEFINICIJA	2
3. MIKROORGANIZMI STIMULATORI BILJNOG RASTA - POJAM I DEFINICIJA	6
4. MIKROBIOLOŠKI PREPARATI	9
Proizvodnja mikrobioloških preparata	12
Formulacije mikrobioloških preparata	14
Tehnike inokulacije	17
Tehnički aspekti proizvodnje	18
Budućnost mikrobnih inokulanata	19
5. PGP MIKROORGANIZMI KAO FITOSTIMULATORI	21
PGPM –producenti auksina	21
PGPM –producenti citokinina	24
PGPM –producenti giberelina	25
PGPM –producenti abscisinske kiseline	27
PGPM –regulatori produkcije etilena	
6. PGP MIKROORGANIZMI KAO BIOFERTILIZATORI	30
PGPM-producenti siderofora	30
PGPM-povećanje dostupnosti hranljivih elemenata	34
PGPM-mineralizacija organske materije	34
PGPM-slabdevanje biljke azotom	36
PGPM-slabdevanje biljke fosforom	39
Bakterije roda <i>Pseudomonas</i> i <i>Bacillus</i>	40
<i>Pseudomonas</i> sp. u biljnoj proizvodnji	41
<i>Bacillus</i> sp. u biljnoj proizvodnji	42
Aktinomicete	44
7. MIKORIZA	47
Endomikoriza	48
Taksonomija mikoriznih gljiva	48
Morfologija i razvoj	48
Kolonizacija korena mikoriznom gljivom	50
Biljke koje formiraju endomikoriznu zajednicu	51
Uticaj mikorize na biljku	52
Mikoriza u poljoprivredi	54
Proizvodnja inokuluma	56
Ektomikoriza	58
Osnovne karakteristike ektomikorize	58
Ektomikorizne gljive	59
Biljke koje formiraju ektomikoriznu zajednicu	60
Faze formiranja ektomikorizne zajednice	61
Uticaj ektomikorize na biljku	61
Ektomikoriza u šumarstvu	62
Jestive ektomikorizne gljive	63
Ostali tipovi mikorize	64
8. ROD TRICHODERMA	67
Taksonomija i biologija	67
Promocija biljnog rasta (PGPF-plant growth promoting fungi)	70
Endofitna aktivnost	71

Povećanje otpornosti na abiotički stress	73
Povećana dostupnost i unos hranljivih materija	73
Produkcija sekundarnih biomolekula	74
Produkcija hormona	75
Pozitivan uticaj na rast biljke	75
9. AUTOTROFNI MIKROORGANIZMI U MIKROBIOLOŠKIM PREPARATIMA	77
Zelene alge- <i>Chlorella</i> spp.	77
Primena <i>Chlorella vulgaris</i> u poljoprivredi	79
Cijanobakterije	80
Primena cijanobakterija u poljoprivredi	81
Specifičnosti proizvodnje algalnih biopreparata	83
10. BIOPESTICIDI	86
Bioinsekticidi	86
Bioinsekticidi na bazi bakterija	86
Bioinsekticidi na bazi gljiva	87
Bioinsekticidi na bazi virusa	88
Bioinsekticidi na bazi protozoa	89
Biofungicidi	89
<i>Bacillus</i> sp. kao biofungicid	91
<i>Pseudomonas</i> sp. kao biofungicid	92
<i>Streptomyces</i> sp. i druge aktinomicete kao biofungicidi	95
<i>Trichoderma</i> sp. kao biofungicid	97
Bioherbicidi	100
Bionematocidi	104
11. LITERATURA	108

PREDGOVOR

Udžbenik ‘Proizvodnja i primena biopreparata’ namenjen je studentima master studija Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu na studijskim programima Zemljište i ishrana biljaka i Organska poljoprivreda. Iz tog razloga udžbenik je napisan prema postojećem kurikulumu za predmet Proizvodnja i primena biopreparata. Zbog nedostatka literature iz ove oblasti na srpskom jeziku, ovaj udžbenik mogu koristiti i studenti osnovnih studija svih studijskih programa biljne proizvodnje, kao i studenti doktorskih studija Agronomije. Želja nam je bila da na pristupačan, a ipak akademski način studentima približimo tajne života korisnih mikroorganizama iz zemljišta koji se u današnjoj modernoj, organskoj, ekološki prihvatljivoj poljoprivrednoj proizvodnji u svetu uveliko koriste.

Pokušale smo da na najbolji način sistematizujemo dosadašnja znanja iz oblasti mikrobioloških preparata, da prikazemo rezultate do kojih smo došle u sopstvenim istraživanjima i da ukažemo na prednosti i mane njihove upotrebe u poljoprivrednoj proizvodnji.

Pored samih studenata, za koje se nadamo da će im udžbenik koristiti u sticanju znanja i polaganju ispita, nadamo se da će naći primenu i biti korisno štivo svim poljoprivrednim proizvođačima koji se upuste u avanturu primene mikrobioloških biopreparata u svojoj proizvodnji. Osim toga verujemo da će i kolegama zainteresovanim za svet mikrobioloških inokulanata dati odgovore na postavljena pitanja i razrešiti nedoumice vezane za oblast primene mikroorganizama u poljoprivrednoj proizvodnji.

Iskreno se zahvaljujemo recenzentima ovog udžbenika, Prof. dr Vesni Lalošević, redovnom profesoru na Departmanu za veterinarsku medicinu Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu i Prof. dr Jelici Simeunović, vanrednom profesoru na Departmanu za Biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, koje su svojim sugestijama i primedbama bitno doprinele da udžbenik dobije svoj konačni oblik.

U Novom Sadu, oktobra 2019. godine.

Autorke

Iz recenzije:

“ Osim toga, ovo naučno delo je koristan izvor najnovijih informacija za širu javnost, pre svega inženjere poljoprivrede ali i ozbiljne proizvođače organske hrane, obzirom da je vrlo

mali broj dostupne literature na srpskom jeziku u našoj zemlji, a da je sve veća potreba potrošača za zdravstveno bezbednom hranom koju će omogućiti šira upotreba biopreparata.”

Prof. dr Vesna Lalošević

Redovni professor

“....delo je od posebnog značaja, s obzirom da detaljno obrađuje primenu mikroorganizama u dobijanju efikasnih biopreparata i njihovo korišćenje u oblasti poljoprivrede. Posebno treba istaći detaljan prikaz određenih grupa tj. rodova i vrsta mikroorganizama (bakterije, aktinomicete, alge, gljive) koji se najčešće koriste u cilju unapređenja poljoprivredne proizvodnje kao i pregled metoda za njihovo dobijanje.”

Prof.dr Jelica Simeunović

Vanredni profesor

1. UVOD

Proizvodnja hrane na održiv način predstavlja jedan od velikih izazova sa kojim je suočena savremena poljoprivreda. Važan aspekt održivosti je i proizvodnja bio-goriva, koja treba da zamene neobnovljive izvore energije. U rešavanju ovih problema, poljoprivredne kulture imaju važno mesto. Međutim, njihov rast je često ograničen pristupačnim oblicima nutrijenata, količinom vode, kao i raspoloživim površinama zemljišta. Za kruženje hranljivih materija u zemljištu, odnosno za snabdevanje biljaka neophodnim nutrijentima, velikim delom su odgovorni mikroorganizmi.

Mikroorganizmi žive u zemljištu, najbrojniji su u rizosferi biljaka gde imaju dovoljno izvora hrane za sebe, a svojom aktivnošću na različite načine potpomažu rast biljaka. Bakterije, gljive, aktinomicete i alge su najznačajnije sistematske grupe mikroorganizama koje učestvuju u pedogenezi, a pri tom čine i značajan deo organske materije u zemljištu tzv. mikrobnu biomasu. Evolutivno su razvili brojne mehanizme koji podržavaju zajednički život, često i obligatne oblike suživota.

Upravo su pozitivni uticaji mikroorganizama na biljke i svojstva zemljišta doveli do stvaranja ideje o primeni selekcionisanih mikroorganizama koji su sposobni da modifikuju i poprave rast i razvoj biljaka. Tako su nastali mikrobiološki preparati, koji kao aktivnu komponentu sadrže efektivne sojeve jedne ili više vrsta mikroorganizama. Važno je istaći da je mikrobiološki preparat proizvod koji je u potpunosti ekološki održiv, bez štetnih uticaja na životnu sredinu i njene članove. Vremenom su se razvile različite formulacije koje putem nekoliko mehanizama delovanja ostvaruju željeni efekat.

Da bi se svojstva mikrobioloških preparata poboljšala, moraju se produbiti saznanja o mikrobnoj ekologiji i rizosferi, gde se zapravo odigravaju sve kompleksne interakcije između mikroorganizama i biljaka. Bolje razumevanje ovih procesa će svakako doprineti i razvoju unapređenih tehnologija proizvodnje mikrobioloških preparata.

2. RIZOSFERA - POJAM I DEFINICIJA

Mikroorganizmi su živi deo zemljišta i aktivno učestvuju u formiranju njegovih svojstava. Bogatstvo raznolikosti mikroorganizama u zemljištu daleko premašuje diverzitet organizama u drugim ekosistemima. Jedan gram zemljišta može biti stanište za više od 10 biliona mikroba, sa više hiljada različitih vrsta. Mikroorganizmi u zemljištu nisu uniformno raspoređeni. Njihov raspored zavisi od brojnih abiotičkih i biotičkih faktora. Najveća brojnost i aktivnost mikroorganizama u zemljištu javlja se na onim mestima koja su bogata nutritivnim elementima, te na taj način obezbeđuju povoljno stanište za umnožavanje mikroorganizama. Za mikroorganizme te najpovoljnije uslove u zemljištu obezbeđuje rizosfera. Za rizosferu se kaže da je to najveći ekosistem na Zemlji, sa ogromnim protokom energije.

Prvi put pojam *rizosfera* uveo je nemački agronom Hiltner (1904), da opiše zonu zemljišta koja se nalazi oko površine korena biljke, a u kojoj su brojnost, aktivnost i metabolizam mikroorganizama određeni i usmereni korenskim izlučevinama. Od tada, ova definicija je pretrpela brojne izmene i dopune, tako da se danas pod ovim pojmom podrazumeva ne samo uzani pojas zemljišta oko korena, već i deo površinskog tkiva korena, kao i svo ono zemljište čije su fizičke, hemijske i biološke karakteristike pod direktnim uticajem korena biljke. Prema jednoj definiciji, rizosfera predstavlja dinamičan sistem u kome zemljišni mikroorganizmi i biljni koren čine jednu celinu (Slika 1).

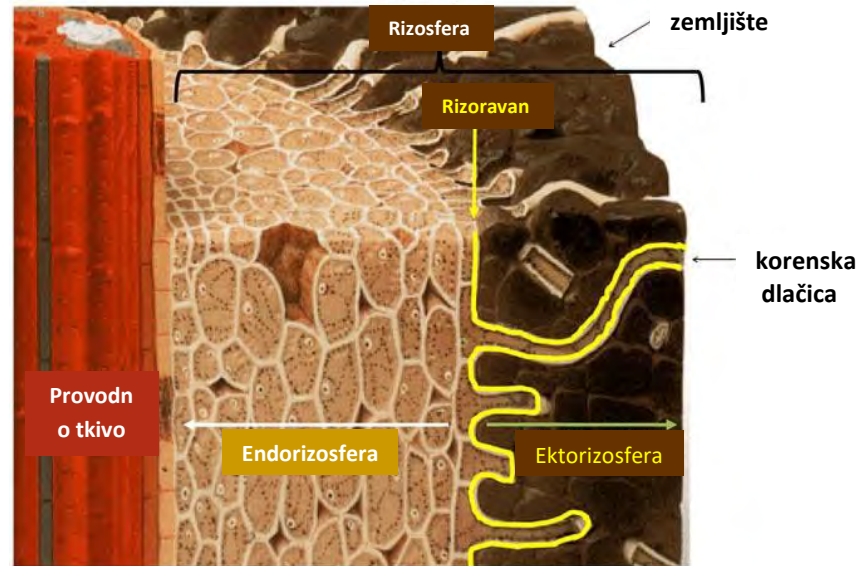


Slika 1. Rizosfera (foto: autori)

Pojam rizosfera potiče od grčke reči „rhiza”, što znači -koren, i reči „sphere”, što znači – zona uticaja. Iako obuhvata pojas širok svega 1-2 mm, a po nekim autorima i znatno širi pojas (oko 5mm), bez definisanih granica, u rizosferi razlikujemo tri zone (Slika 2):

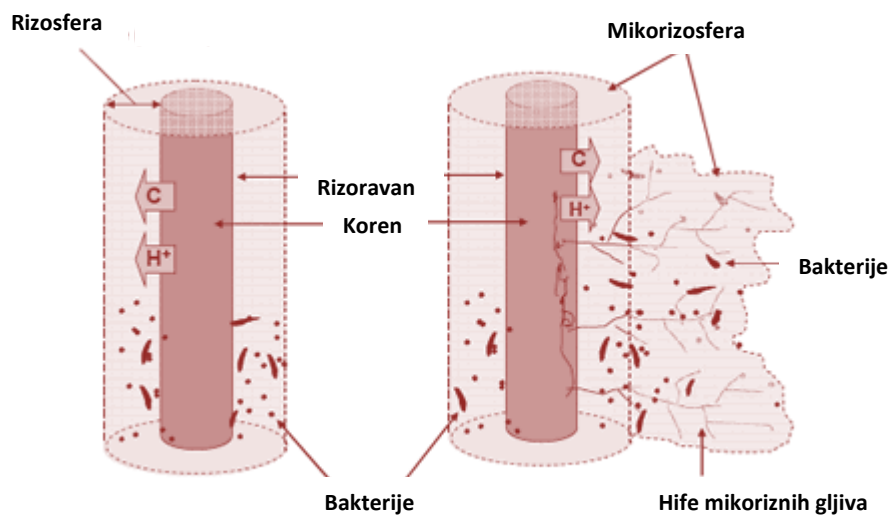
1. Prva zona je spoljašnja zona i naziva se **ektorizosfera**. Ova zona obuhvata uzani sloj zemljišta oko same površine korena.

2. Druga zona se naziva **rizoravan**, i obuhvata samu površinu korena biljke, na koju prijanjaju sitne partikule zemljišta, kao i sami mikroorganizmi.
3. Treća zona se naziva **endorizosfera** ili histosfera, a obuhvata tkivo korena, endodermis i korteks korena, kao i endofitne mikroorganizme koji žive u ovom delu korena.



Slika 2. Zone rizosfere
(preuzeto i prilagođeno: <https://permaculturenews.org>)

Pored ove tri osnovne zone rizosfere, u pojedinim slučajevima, može se javiti još jedna zona. Kod biljaka koje stupaju u simbiotsku zajednicu sa gljivama, javlja se i zona koja se naziva **mikorizosfera** (Slika 3).



Slika 3. Rizosfera i mikorizosfera
(preuzeto i prilagođeno: <http://www.scielo.org.co>)

Struktura bakterijskih zajednica u rizosferi pod uticajem je brojnih biotičkih i abiotičkih faktora. Od svih ovih faktora, uticaj biljke na strukturu mikrobne zajednice je najznačajniji. Biljka svojim izlučevinama, eksudatima, stvara specifične, selektivne

uslove u rizosferi, te na taj način utiče na sastav populacije mikroorganizama. Prema tome, vrsta ili sorta biljke, karakteristike korena i korenskih eksudata, starost biljke, direktno utiču na raznovrsnost i dominantnost određenih vrsta mikroorganizama u rizosferi.

Mikrobiološka aktivnost u rizosferi odvija se pod direktnim uticajem korenovog sistema. Biljka tokom svog života luči velike količine korenskih eksudata, što predstavlja izvor energije i hranljivih nutrijenata, pre svega ugljenika, za mikroorganizme u rizosferi. Korenskim eksudatima u zemljište dospevaju različiti joni, voda, enzimi, primarni i sekundarni metaboliti. Procenjuje se da se 5-60% ugljenika usvojenog u procesu fotosinteze izlučuje kroz korenske eksudate. Prema jednoj definiciji, eksudati su organske materije i joni, koje koren biljke oslobađa u okolno zemljište. Korenske izlučevine se razlikuju prema hemijskom sastavu, tako da razlikujemo dve grupe:

1. Prvu grupu korenskih izlučevina čine jedinjenja niske molekulske težine. Tu spadaju jedinjenja koja se lako rastvaraju u vodi: **prosti šećeri** (glukoza, fruktoza, arabinoza, galaktoza, maltoza, manoza, saharoza, ksiloza, rafinoza, ramnoza, riboza, oligosaharidi), **amino kiseline** (α -alanin, β -alanin, arginin, cistein, glicin, triptofan), **organske kiseline, biljni hormoni, vitamini, fenoli, joni i drugi sekundarni metaboliti**.
2. Drugu grupu korenskih izlučevina čine jedinjenja velike molekulske težine. Tu spadaju različiti **enzimi** (amilaze, peroksidaze, fenolaze, fosfataze, proteaze), **proteini, polisaharidi, steroli, flavonoidi i nukleotidi i brojna druga jedinjenja**.

Prema načinu na koji se oslobađa iz korena, eksudate možemo podeliti na dve grupe:

1. **Pasivni eksudati** - difunduju iz ćelija korena biljke, kao produkti metabolizma koje biljka izbacuje;
2. **Aktivni eksudati** - bivaju sekretovani kroz pore ćelijske membrane i imaju ulogu u stvaranju zaštitnog sloja oko površine korena.

Kvalitativni i kvantitativni sastav eksudata zavisi od biljne vrste, starosti biljke, faze razvoja biljke, kao i brojnih abiotičkih faktora, kao što su pH, temperatura, tip zemljišta. Ove kvalitativne i kvantitativne razlike u eksudatima, uzrokovale su specifične uslove u različitim rizosferama, koje odgovaraju samo određenim vrstama mikroorganizama. Tako da se rizosfere različitih biljnih vrsta, često i u okviru jedne vrste, u zavisnosti od staništa i starosti biljke, upravo zbog ovoga, veoma razlikuju. Tako je utvrđeno da u rizosferi mladih biljaka dominiraju bakterije koje se brzo umnožavaju i koriste lako razgradive materije, dok kod starijih biljaka dominiraju aktinomicete koje se sporije razmnožavaju i usvajaju složenije molekule.

Sa druge strane, dosadašnja istraživanja su pokazala da rizosferni mikroorganizmi mogu uticati na samu eksudaciju korena. Dokazano je da mikorizne gljive povećavaju sekreciju azota, fenola i giberelina, a smanjuju sekreciju šećera, jona kalijuma i fosfora. Osim gljiva, i bakterije utiču na vrstu i količinu eksudata biljnog korena. To je dokazano za bakteriju *Pseudomonas putida*.

U odnosu na okolno zemljište, zbog povoljnih uslova za razvoj, broj mikroorganizama u rizosferi je i do 100 puta veći. Različiti mikroorganizmi, kao što su bakterije, gljive, aktinomicete, protozoe i alge, koegzistiraju u rizosferi sa makroorganizmima kao što su nematode i zglavkari. Od mikroorganizama, najviše su zastupljene bakterije, posebno iz familije *Azotobacteraceae* i *Enterobacteraceae*, potom rodovi *Bacillus*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Rhizobia*, *Agrobacterium*,

Alcaligenes, *Mycobacterium*, *Flavobacter*, *Cellulomonas* i *Micrococcus*, ali i gljive iz roda *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*. Utvrđeno je da je u rizosferi brojnost Gram-, štapićastih, nesporulativnih bakterija iz grupe Proteobacteria i končastih bakterija iz grupe Actinobacteria, daleko veća u odnosu na brojnost Gram+ bakterija (Tabela 1).

Tabela 1. Dominantne populacije mikroorganizama u rizosfernom i okolnom zemljištu

Rizosferno zemljište	Okolno zemljište
<ul style="list-style-type: none"> • Gram- bakterije • Denitrifikatori • Simbiotske bakterije i gljive • Patogeni mikroorganizmi • Manji diverzitet (u poređenju sa okolnim zemljištem) 	<ul style="list-style-type: none"> • Gram+ bakterije • Sporulativni oblici bakterija • Aktinomicete • Saprofitske gljive • Veći diverzitet (u poređenju sa rizosfernim zemljištem)

Takođe, brojnost aerobnih bakterija je nešto manja u odnosu na anaerobne. Ipak, ono što je zaključak brojnih istraživanja, jeste da je raznolikost u vrstama i brojnost pojedinih grupa mikroorganizama usko specifičan i karakterističan za svaku biljnu vrstu. Pošto su u rizosferi bakterije najbrojnije, pokrivaju i do 15% površine korena, smatra se da one u najvećoj meri utiču na fiziologiju same biljke.

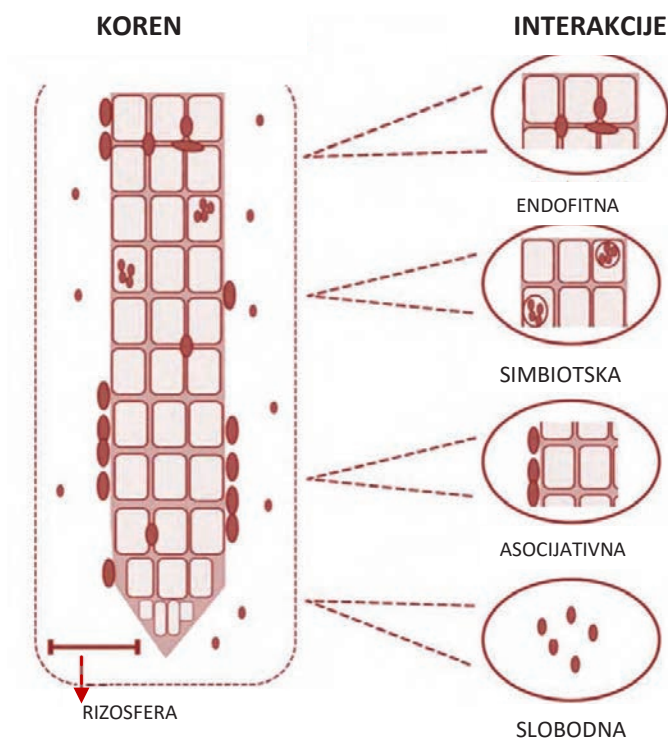
Mikroorganizmi koji žive u rizosferi, mogu imati negativan ili pozitivan uticaj na rast i razviće biljke. Na osnovu načina na koji utiču na biljku, rizosferne mikroorganizme delimo u tri grupe: **korisni** mikroorganizmi, **komensali** i **patogeni** mikroorganizmi. U prvu grupu spadaju mikroorganizmi poznati kao mikroorganizmi stimulatori biljnog rasta, odnosno PGP (skraćenica od Plant Growth Promoting) mikroorganizmi, koji direktnim ili indirektnim putem pozitivno utiču na biljku. U ovu grupu spadaju i saprofitni mikroorganizmi koji vrše razgradnju i mineralizaciju organske materije i imaju ključnu ulogu u procesu pedogeneze i ciklusima kruženja hranljivih elemenata. U drugu grupu rizosfernih mikroorganizama, spadaju mikroorganizmi koji nemaju nikakav uticaj ni na biljku, ali ni na druge mikroorganizme. Patogeni rizosferni mikroorganizmi različitim mehanizmima negativno utiču na rast i razvoj biljke.

3. MIKROORGANIZMI STIMULATORI BILJNOG RASTA

Mikroorganizmi stimulatori biljnog rasta, su grupa mikroorganizama, najviše prisutnih u rizosferi, koji poboljšavaju snabdevenost biljaka hranljivim elementima, pomažu biljci u odbrani od patogena i pojačavaju njenu vitalnost i otpornost u uslovima stresa. Zbog svih ovih osobina, ova grupa mikroorganizama koristi se već dugi niz godina u vidu biopreparata prilikom uzgajanja različitih poljoprivrednih biljnih vrsta.

Pojam PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) je prvi put uveo 1978. godine Joe Kloepper, da definiše heterogenu grupu bakterija, koje se mogu naći u zoni rizosfere, na površini ili u asocijaciji sa korenom biljke, a kada se koriste kao inokulanti imaju značajan uticaj na biljni rast, količinu i kvalitet prinosa poljoprivrednih kultura. Ove bakterije se takođe nazivaju rizobakterije koje pozitivno utiču na zdravlje biljaka (u tom slučaju se koristi termin - PHPR, Plant Health Promoting Rhizobacteria) ili bakterije koje pospešuju nodulaciju (NPR, Nodule Promoting Rhizobacteria). Danas se najviše koristi jedan opštiji termin, *Mikroorganizmi stimulatori biljnog rasta* - PGPM, skraćena od **Plant Growth Promoting Microorganisms**, koji obuhvata i mikroorganizme iz drugih grupa (ne samo bakterije), kao i one mikroorganizme koji se ne nalaze u rizosferi, a koji takođe pospešuju rast biljaka.

PGP mikroorganizmi stupaju u **simbiotske, asocijativne i slobodne** odnose sa biljkama (Slika 4). Interakcija između određene bakterijske vrste ili soja i odgovarajuće biljne vrste ostvaruje se zahvaljujući njihovom specifičnom međusobnom afinitetu i genetički je određena.



Slika 4. Vrste interakcija biljke i PGP mikroorganizama (prema Souza et al., 2015)

PGP mikroorganizmi se prema svojoj aktivnosti mogu podeliti na:

- **biofertilizatore** - povećavaju dostupnost hranljivih materija biljkama;

- **fitostimulatore** - stimulišu rast biljaka putem produkcije hormona;
- **rizomedijatore** - razlažu organske polutante;
- **biokontrolne agense** - kontrolišu bolesti biljaka produkcijom antibiotika i antifungalnih metabolita.

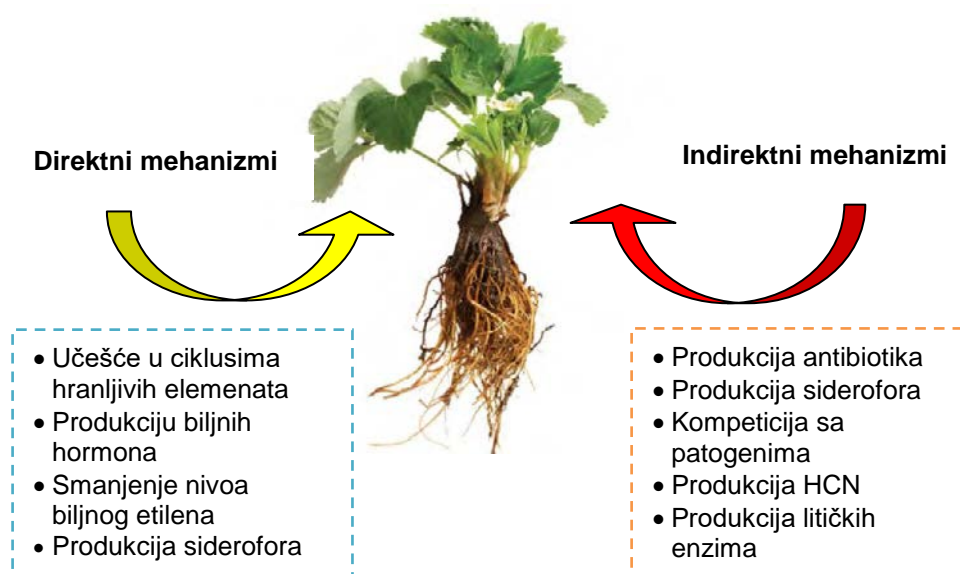
Na osnovu lokacije u rizosferi, ovi mikroorganizmi se mogu klasifikovati u dve grupe:

- **ekstracelularni**, koji žive u ektorizosferi, na površini korena biljke ili u međucelijskom prostoru u korenu biljke;
- **intracelularni**, koji žive u ćelijama korena, i često formiraju specifične strukture.

PGP mikroorganizmi utiču na rast biljke različitim direktnim i indirektnim mehanizmima. **Direktni** mehanizmi podrazumevaju učešće mikroorganizama u ciklusima hranljivih elemenata (zahvaljujući čemu se biljke lakše snabdevaju različitim mikro i makronutrijentima, a pre svega lakodostupnim azotom, fosforom i sumporom), produkciju i stimulaciju sinteze biljnih hormona (auksina, giberelina, citokinina), produkciju siderofora, kao i smanjenje nivoa biljnog etilena. U **indirektni** mehanizme spadaju: kompeticija sa štetnim mikroorganizmima za mesto u određenoj ekološkoj niši, produkcija antibiotika kojima se biljka brani od patogena, produkcija siderofora i cijanida, kao i sinteza enzima koji katalizuju lizu ćelijskog zida fitopatogenih gljiva (Slika 5).

Jasna granica, kao i razlike između ove dve grupe mehanizama, često nisu vidljive. To je zato što u pojedinim slučajevima određeni mehanizmi mogu delovati i kao direktni i kao indirektni. Primer za ovo je produkcija siderofora, koja u isto vreme direktno pomaže biljci da se snabde gvožđem, tako što biljka usvaja bakterijski kompleks siderofor - Fe^{3+} , a pri tom lišava patogene mikroorganizme ovog elementa, čime se sprečava njihovo umnožavanje i rast i indirektno štiti biljku od štetnog uticaja fitopatogena.

I direktni i indirektni mehanizmi imaju pozitivan uticaj na klijavost semena, rast mlade biljke, razvoj korena i nadzemnog dela biljke, povećanje biomase biljke, povećanje težine i kvaliteta semena, kao i samog prinosa, štite biljku od patogena i abiotičkih stresova.



Slika 5. Direktni i indirektni mehanizmi PGP mikroorganizama

PGP mikroorganizmi se mogu primenjivati kao **multiple** (naziva se još i združena inokulacija ili koinokulacija) ili kao **pojedinačni inokulanti**. Prvi način primene, koji je i češći, zasniva se na istovremenoj primeni većeg broja izmešanih vrsta mikroorganizama. Prilikom proizvodnje multiple inokulanata biraju se mikroorganizmi koji međusobno stupaju u korisne odnose (mutualizam i metabioza). Njihova primena aktivira sve one mikrobiološke procese koje obavljaju mikroorganizmi iz smeše. Prilikom proizvodnje i primene pojedinačnih inokulanata, koriste se pojedinačne vrste mikroorganizama, čime se eliminiše mogućnost antagonizma. Primena ovakvih inokulanata intenzivira procese koje taj mikroorganizam obavlja. I jedan i drugi način primene uglavnom daje dobre rezultate.

Na efektivnost PGP mikroorganizama utiču vrsta i starost biljke, korenske izlučevine, klimatski uslovi, fizičko-hemijske i mikrobiološke karakteristike zemljišta, kao i primenjene agrotehničke mere. Ukoliko se unesu u zemljište kao inokulanti ili u vidu nekog biopreparata, PGP mikroorganizmi su izloženi svim napred navedenim faktorima. Osim toga, nakon unošenja inokulanata u zemljište, postoji mogućnost da oni utiču na autohtone mikroorganizme, ali isto tako i da autohtoni mikroorganizmi utiču na inokulante. Kakav će se uticaj ostvariti zavisi od interakcije unutar i između autohtonih populacija, od biljke i zemljišta. Određene grupe mikroorganizama mogu biti stimulisane, druge inhibirane, a dešava se takođe da introdukovani mikroorganizmi ne utiču na strukturu autohtone populacije.



Slika 6. PGP Mikroorganizmi - Sa leve strane: koren bez PGP mikroorganizama; Sa desne strane: koren sa PGP mikroorganizmima (preuzeto i prilagođeno: <https://fungicultura.files.wordpress.com/2013/01/mycorrhiza-shop.jpg>)

Zbog aktuelne zabrinutosti u vezi nepoželjnih dejstava hemijskih sredstava, postoji povećano interesovanje za dublje razumevanje kooperacije između ovih korisnih rizosfernih mikroorganizama i biljaka, kao i načina primene tih saznanja u poljoprivredi.

4. MIKROBIOLOŠKI PREPARATI

PGP mikroorganizmi su predmet mnogobrojnih istraživanja, čiji je glavni cilj pronalaženje adekvatnog načina njihove primene u poljoprivredi, hortikulturi, šumarstvu i zaštiti životne sredine. Usavršavanjem metoda izolacije, morfološke, fiziološko-biohemijske i genetičke determinacije mikroorganizama, omogućena je upotreba mikroorganizama u proizvodnji različitih biopreparata, tačnije mikrobioloških preparata, kojima se veoma uspešno stimuliše rast biljaka i biljke štite od različitih bolesti i štetočina. U novije vreme, mikrobiološki preparati imaju značajnu primenu ne samo u ratarskoj proizvodnji, već se uspešno primenjuju i u hortikulturi i šumarstvu.

Mikrobiološki preparati su sve formulacije koje sadrže jedan ili više efektivnih sojeva mikroorganizama, a primenjuju se sa ciljem da pozitivno utiču na rast, prinos i zdravlje biljke. Formulacije se prave u zavisnosti od potreba koje postoje, a njihova efektivnost, koja pre svega zavisi od samih mikroorganizama, uslovljena je tipom zemljišta, biljnom vrstom, klimatskim uslovima i antropogenim uticajem. Mikroorganizmi u preparatima moraju imati izraženu moć kompeticije sa autohtonom mikrobnom populacijom, visok stepen sposobnosti preživljavanja i adaptacije na novonastale uslove u kojima treba da ostvare svoju najbolju efektivnost.

Postoje različite podele biopreparata, u zavisnosti od kriterijuma koji se definiše.

Ako se kao kriterijum uzmu mikroorganizmi koji se nalaze u njima, mikrobiološki preparati se mogu podeliti na one koji sadrže bakterije, gljive ili alge (Tabela 2). Važan kriterijum za podelu preparata može biti i mehanizam delovanja mikroorganizama na biljke, odnosno proces koji se intenzivira u zemljištu.

Tabela 2. Mikroorganizmi u biopreparatima

Red.broj	Grupa	Mikroorganizmi
Biopreparati koji pospešuju azotofiksaciju		
1	Simbiotski	<i>Rhizobium, Frankia, Anabaena azollae</i>
2	Slobodni	<i>Azotobacter, Beijerinckia, Clostridium, Klebsiella, Anabaena, Nostoc</i>
3	Asocijativni	<i>Azospirillum</i>
Biopreparati koji pospešuju mineralizaciju P		
1	Bakterije	<i>Bacillus megaterium</i> var. <i>phosphaticum</i> , <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus circulans, Pseudomonas striata</i>
2	Gljive	<i>Penicillium sp, Aspergillus awamori</i>
Biopreparati koji pospešuju mobilizaciju nerastvorljivih P		
1	Endomikoriza	<i>Glomus sp., Gigaspora sp.,</i> <i>Acaulospora sp.,</i> <i>Scutellospora sp., Sclerocystis sp.</i>
2	Ektomikoriza	<i>Laccaria sp., Pisolithus sp., Boletus sp.,</i> <i>Amanita sp.</i>
3	Erikoidna mikoriza	<i>Pezizella ericae</i>
4	Orhidna mikoriza	<i>Rhizoctonia solani</i>
PGPM (mikroorganizmi promotori biljnog rasta)		

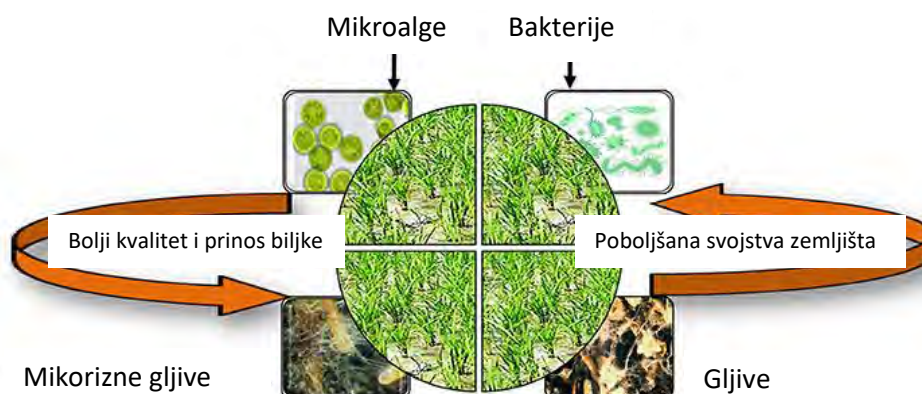
1	Bakterije	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus subtilis</i>
2	Gljive	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Glomus sp.</i>
3	Alge	<i>Chlorella vulgaris</i>

Svi biopreparati, bez obzira na vrstu mikroorganizama koje sadrže, a pozitivno utiču na ishranu biljaka, nazivaju se biofertilizatori. Mehanizmi delovanja mogu biti različiti, od fiksacije elementarnog azota i transformacije organskih i neorganskih oblika makro i mikro nutrijenata, povećavanja pristupačnosti teško pristupačnih oblika nutrijenata. Biofertilizatori mogu da sadrže jednu vrstu mikroorganizama i to su tzv. monovalentni biofertilizatori, dve vrste - bivalentni ili više vrsta - polivalentni biopreparati. Unose se u zemljište, na seme ili nadzemni deo biljke.

Preparati koji sadrže mikroorganizme koji pozitivno utiču na rast i prinos biljke produkcijom aktivnih materija iz grupe hormona rasta, indol sirćetne kiseline i sl. spadaju u biostimulatore.

Preparati sa efektivnim sojevima mikroorganizama koji se koriste u borbi sa fitopatogenim mikroorganizmima i štetočinama su označeni kao biopesticidi. U okviru biopesticida, razlikujemo biofungicide, bioinsekticide, itd.

Mikrobiološki preparati se sve više primenjuju u poljoprivredi, postaju alternativa agrohemikalijama, iako samo u pojedinim slučajevima mogu u potpunosti zameniti mineralna đubriva ili pesticide. O njima se govori i kao o ekološkim proizvodima koji ne zagađuju životnu sredinu a koji veoma pozitivno utiču na brojna svojstva gajenih biljaka i zemljišta (Slika 7).



Slika 7. Interakcija mikroorganizama i biljke

Prednosti biopreparata se mogu predstaviti na sledeći način:

- ✓ nisu toksični i patogeni za ljude, životinje i druge organizme osim ciljanog organizma
- ✓ visoka specifičnost prema ciljanom organizmu
- ✓ efektivni su u malim količinama, brzo se razgrađuju, manje ili uopšte ne zagađuju sredinu
- ✓ nema hazardnih materija i mogu se primenjivati neposredno pre žetve i ubiranja plodova (nema karence)
- ✓ značajno se smanjuje upotreba konvencionalnih preparata, naročito pesticida
- ✓ često korisni mikroorganizmi ostaju aktivni i u sledećoj vegetacionoj sezoni
- ✓ pozitivno utiču i na autohtonu mikrobnu populaciju

Naravno da postoje i određeni nedostaci, od kojih bi izdvojili:

- ✓ vreme i način primene (zavisi od faze razvoja biljke i pojave patogena)
- ✓ osetljivi na temperaturu, sušenje i UV zračenje
- ✓ posebni uslovi skladištenja
- ✓ složen proces proizvodnje i distribucije pojedinih formulacija
- ✓ tržište za pojedine preparate može biti malo - zbog visoke specifičnosti prema ciljanom organizmu
- ✓ cena može biti veća u odnosu na konvencionalne proizvode

Karakteristike idealnog mikrobiološkog preparata bi se mogle formulisati kao sledeće:

- ✓ produženo vreme skladištenja
- ✓ nije fitotoksičan
- ✓ rastvorljiv u vodi
- ✓ može da se primenjuje u različitim ekološkim / klimatskim uslovima (tip zemljišta, padavine, temperature,...)
- ✓ vidljivi rezultati primene (brži razvoj biljke, veći prinos, kvalitet prinosa, dobra kontrola bolesti i štetočina)
- ✓ isplativa primena
- ✓ kompatibilna sa drugim agrohemijskim preparatima
- ✓ nosači jeftini i dostupni

PROIZVODNJA MIKROBIOLOŠKIH PREPARATA

Proizvodnja mikrobioloških preparata se odvija u nekoliko faza (Slika 8).



Korak 1. Uzorkovanje zemljišta



Korak 2. Izolacija mikroorganizama



Korak 3. Karakterizacija mikroorganizama i odabir poželjnih sojeva



Korak 4. Ispitivanje mikrobioloških formulacija na biljkama



Korak 5. Proizvodnja mikrobiološkog preparata



Korak 6. Primena biopreparat

Slika 8. Proces proizvodnje mikrobnihi preparata

To su:

1. Izolacija mikroorganizama
2. Ispitivanje svojstava mikroorganizama
3. Ispitivanje efektivnosti mikroorganizama u kontrolisanim uslovima
4. Ispitivanje efektivnosti mikroorganizama u polukontrolisanim uslovima
5. Ispitivanje efektivnosti mikroorganizama u poljskim uslovima, *in-situ* evaluacija
6. Standardizacija proizvodnje
7. Proizvodnja komercijalnog mikrobiološkog preparata

Mikroorganizmi koji se koriste za proizvodnju preparata se najčešće izoluju iz zemljišta iako i drugi substrati kao što su biljka, voda, mleko, meso i sl. mogu predstavljati izvor mikroorganizama. Izolacija i dobijanje čiste kulture mikroorganizama je složen i dugotrajan proces koji podrazumeva primenu određenih metoda i aseptične tehnike u laboratorijskim uslovima. Nakon dobijanja čiste kulture, vrši se njihova karakterizacija na osnovu brojnih kriterijuma. Ispituju se mnoga morfološka, biohemijska, odgajivačka, kao i genetička svojstva dobijenih izolata. U zavisnosti od potrebe, mogu se definisati i posebni kriterijumi (Tabela 3).

Tabela 3. Kriterijumi selekcije za pojedine mikroorganizme

<i>Rhizobium</i> i <i>Bradyrhizobium</i>	<i>Azotobacter</i> i <i>Azospirillum</i>	Razlagači fosfata
Potencijal fiksacije N	Fiksacija većih količina N/g substratu (hranljiva podloga)	Sposobnost razgradnje fosfata u tečnoj hranljivoj podlozi
Kompeticija sa autohtonim rizobiumima	Ekskrecija amonijuma	Produkcija organskih kiselina
Produkcija siderofora, vitamina, auksina	Brži rast, preživljavanje i moć kompeticije	Produkcija fosfataza
Produkcija bakteriocina i drugih sekundarnih metabolita	Tolerancija na širi spektar pH i temperature	Produkcija siderofora

Odabrani sojevi određene vrste mikroorganizama sa poželjnim svojstvima se koriste u eksperimentima sa biljkama. Prvo se izvode ogledi u kontrolisanim, zatim polukontrolisanim uslovima, a na kraju i u poljskim uslovima. Ispitivanja se vrše na različitim biljnim vrstama, u različitim proizvodnim uslovima. Ova faza u proizvodnji preparata je najduža i traje nekoliko godina.

Na osnovu rezultata se ocenjuje efektivnost primenjenih mikroorganizama na biljke merenjem brojnih parametara (elementi prinosa i kvaliteta gajene biljke), kao i uticaj na autohtonu mikrobnu populaciju, mikrobiološku aktivnost zemljišta i sl. Ispituju se različite formulacije i doze mikrobiološkog inokuluma, način, vreme primene u cilju optimizacije primene.

Poslednja faza je komercijalna proizvodnja mikrobiološkog preparata. Ona podrazumeva proizvodnju na veliko u fermentorima u strogo kontrolisanim uslovima. Proizvod se na tržištu prodaje sa zaštićenim komercijalnim nazivom.

Formulacije mikrobioloških preparata

Odabir adekvatnog nosača je veoma važna faza u procesu proizvodnje i formulisanja mikrobioloških preparata (Slika 9). Nosač je izvor nutrijenata, štiti mikroorganizme od isušivanja i obezbeđuje njihovo postepeno oslobađanje. Efektivni mikroorganizmi nakon primene, moraju da opstanu u dovoljno velikom broju uz period prilagođavanja koji će biti najmanje stresan.

Postoji velik broj nosača na tržištu. Najčešće su to materijali koji su jeftini, lako dostupni, prirodni, biorazgradivi, koji će obezbediti sporo oslobađanje mikroorganizama koji su fiziološki aktivni.

Najčešće se koriste organski i neorganski prirodni materijali, kao što su talk, vermikulit, perlit, alginat (u kombinaciji sa skrobom, huminskim kiselinama) itd., a od sintetičkih polimer poliakrilamid, poliuretan.

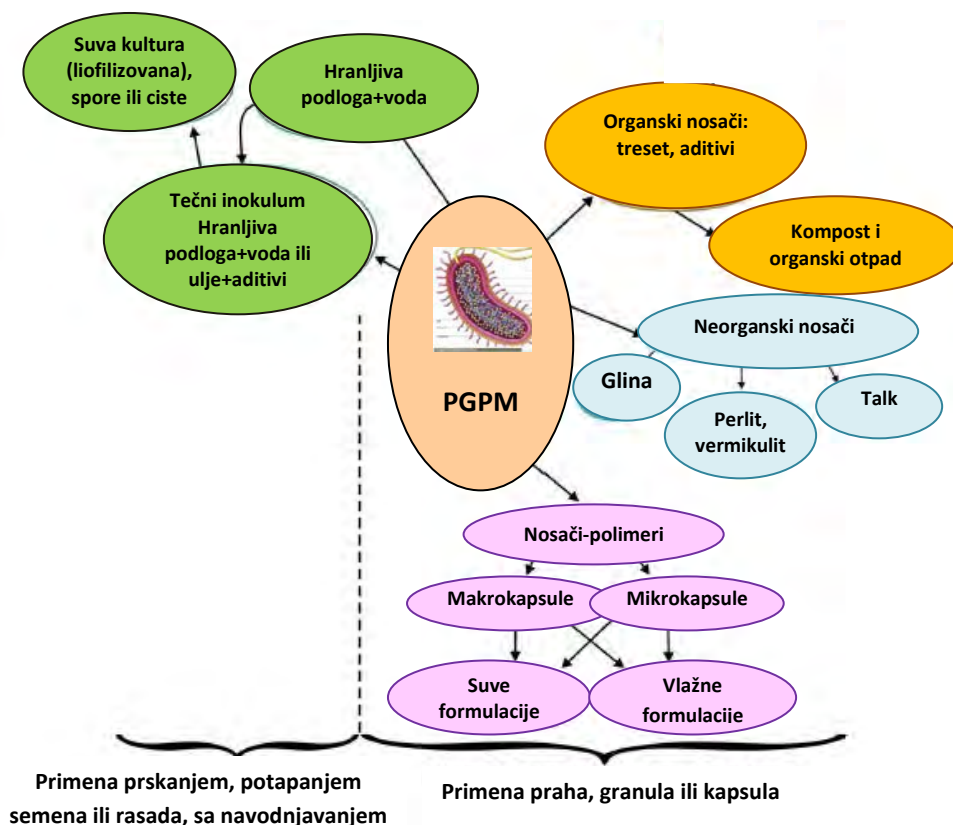
Treset, glina i razne tečnosti su najviše korišćeni nosači u proizvodnji konvencionalnih biopreparata u **čvrstom i tečnom stanju**.

Treset je kompleksna organska materija koja se koristi kao nosač u proizvodnji biopreparata sa rizobiumima, odnosno simbiotskim azotofiksatorima. Iako je treset bogat hranljivim materijama, često postoje velika variranja u kvalitetu samog treseta, što znatno menja i kvalitet samog finalnog proizvoda. Kod biopreparata sa tresetom lošijeg kvaliteta, procenat preživljavanja bakterija tokom skladištenja je nizak, mogućnost kontaminacije je visoka, a rok trajanja kratak (6 meseci).

Glineni materijali se takođe puno koriste kao nosači u formulacijama u obliku granula, suspenzija ili praha. To su odlični materijali koji služe za proizvodnju tzv. suvih inokuluma. Ovi nosači obezbeđuju odlične uslove za preživljavanje mikroorganizama, formiranjem povoljnog mikrohabitata sa dovoljno nutrijenata koje obezbeđuje duže vreme trajanja i skladištenja.

Tečne formulacije su inokulumi koji koriste hranljivu podlogu koja se priprema uglavnom u vodi, ali i u mineralnim i organskim uljima. Broj mikroorganizama u ovim formulacijama najčešće iznosi 2×10^9 CFU/ mL (broj formiranih kolonija po mililitru od *Colony Forming Units per milliliter*), što omogućava nižu dozu primene uz povećanu efikasnost. U ove formulacije se mogu dodati i **aditivi** kao što su šećeri, glicerol, celuloza (carboxymethyl cellulose-CMC), arabik guma ili sintetički aditivi. Njihovim dodavanjem se poboljšava i produžava preživljavanje mikroorganizama. Formulacije se primenjuju potapanjem ili prskanjem semena i rasada, pre setve i sadnje, ili se primenjuju folijarno, prskanjem nadzemnog dela biljke. Na ovaj način se obezbeđuje direktan kontakt biljke i mikroorganizama, što povećava stopu preživljavanja mikroorganizama na biljci.

Tečne formulacije imaju dugo vreme skladištenja (do dve godine). Primena je jednostavna i jeftina, najčešće uz pomoć mašina na velikim površinama. Od nedostataka bi izdvojili neujednačenu distribuciju mikroorganizama na biljnom materijalu (kada se primenjuju folijarno). Osim toga, zahtevaju niske temperature skladištenja, te su ti troškovi veći u odnosu na čvrste formulacije.

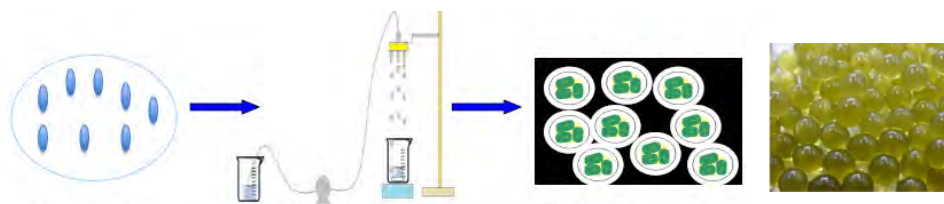


Slika 9. Formulacije mikrobioloških preparata u poljoprivredi (prema Bashan et al., 2014)

Biokapsulacija je novija tehnologija proizvodnje biopreparata gde se mikroorganizmi inkapsuliraju tj. stavljaju u kapsulu koja ih fizički štiti od brojnih uticaja sredine, i obezbeđuje postepeno i produženo oslobađanje u zemljište. Brzina oslobađanja mikroorganizama iz matriksa je u direktnoj korelaciji sa biološkom aktivnosti mikroorganizama. Kapsule se mogu skladištiti na sobnoj temperaturi, a vreme skladištenja se značajno može produžiti dodavanjem nutrijenata u kapsulu. Kod biopreparata na bazi kapsula smanjena je mogućnost kontaminacije. Za inkapsulaciju mikroorganizama koriste se različiti materijali, prirodni i sintetički polimeri kao što su: alginati, agar i agaroza, skrob, kukuruzni sirup u čvrstom stanju, zatim poliakrilamid, polistiren i poliuretan od veštačkih materijala. Za zaštitu mikroorganizama se koriste gume i proteini. Zajednička odlika svih materijala je niska viskoznost i odlična rastvorljivost.

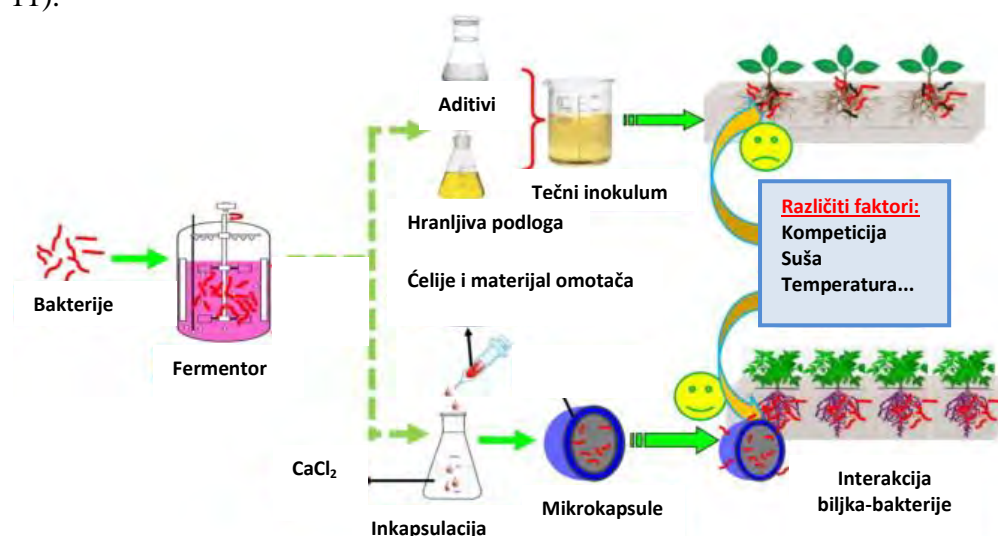
Natrijum alginat se najviše koristi za inkapsulaciju mikroorganizama. Dobije se preparat sa imobilisanim mikroorganizmima koji se koriste u različite svrhe. Natrijum alginat je prirodni polimer koji se sastoji od dva monomera (D-manuronska kiselina i α -L-guluronska kiselina). Dobija se iz mrkih algi *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborean* i *Eklonia cava*. Proizvodnja alginata nije isključivo vezana za alge. Postoje i bakterije koje mogu da produkuju ekstracelularni alginat kao što je *Azotobacter vinelandii* i nekoliko sojeva *Pseudomonas* spp.

Proces inkapsulacije je jednostavan (Slika 10). Rastvor alginata se meša sa ćelijama mikroorganizama, nakon čega se smeša ubacuje u rastvor CaCl_2 , koncentracije između 0.05 i 0.1 M. Za oko 20 do 30 minuta, u rastvoru se formiraju gelirane loptice sa imobilisanim mikroorganizmima.



Slika 10. Šematski prikaz inkapsulacije mikroorganizama (prema Schoebitz et al., 2013)

Najznačajnija prednost primene inkapsuliranih mikroorganizama je sporo otpuštanje mikroorganizama, odlično preživljavanje u realnim uslovima primene (Slika 11).







Slika 11. Inkapsulacija – prednosti primene (prema Yanhui et al., 2015)

Oblaganje semena mikroorganizmima je takođe sve zastupljenija formulacija mikrobnih preparata. Postoji nekoliko načina oblaganja semena (Tabela 4). Svaki način ima određene prednosti, kao i nedostatke.

Bio-priming je jednostavna metoda potapanja semena u tečnu suspenziju mikroorganizama određen vremenski period. Nakon potapanja, seme se suši (ponekad i u vakum-u) da bi se sprečilo klijanje. Na ovaj način se najčešće oblaže seme povrtarskih kultura, jer se sa malom zapreminom inokuluma tretira velika količina semena. Kod film oblaganja se u tečni inokulum sa mikroorganizmima dodaje neki aditiv kao što je celuloza, biljno ili parafinsko ulje i polisaharidi. U proizvodnji leguminoza se najviše koristi seme obloženo rizobiumima u vlažnom tresetnom nosaču. Peletirano seme nije našlo široku komercijalnu primenu zbog složenije tehnologije proizvodnje, iako je ovo najpoželjniji način primene mikroorganizama od strane proizvođača i potrošača. Ovakvo seme se jednostavno primenjuje. Idealan oblik za sporogene mikroorganizme zbog boljeg preživljavanja.

Tabela 4. Načini oblaganja semena mikroorganizmima

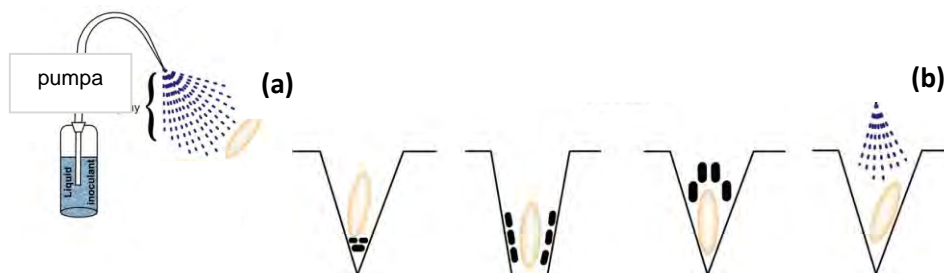
	Bio-priming	Film oblaganje	Tretirano tresetom	Peletiranje
--	-------------	----------------	--------------------	-------------

Tretirano seme				
Način/metod oblaganja semena	Seme potopljeno u suspenziju m.o.	Suspezija m.o. sa aditivima	Inokulum u tresetu, nanosi se na seme	Komercijalni proces
Primena	Eksperimentalne svrhe; ograničena komercijalna upotreba	Uglavnom u eksperimentalne svrhe	Inokulumi sa rizobiumima (pre setve)	Slabo se primenjuje u praksi
Preživljavanje m.o.	Dobro, duži vremenski period	Kratko	Promenljivo	Slabo (osim kod sporogenih m.o.)

Inokulacija semena mikroorganizmima je sve značajnija na globalnom tržištu, a potražnja novih načina tretmana semena i tehnologija raste. Biološki tretmani semena odnosno tretirano seme je naročito zastupljeno na dalekom Istoku (Azija).

Tehnike inokulacije

Inokulacija semena je najčešće primenjivana tehnika inokulacije. Jednostavna je i koristi se mala količina inokuluma (Slika 12a). Pre setve, seme se tretira sa tresetnim inokulumom, sa ili bez dodate vode i/ili aditiva. Sušenje se izvodi *in-situ*. Svako seme mora biti obloženo sa inokulumom, a obzirom da se koriste male količine, na ovaj način se smanjuje i broj mikroorganizama koji se nanosi na seme. To može umanjiti željeni efekat uspešne inokulacije. Ako se inokulum ne nanese dobro na seme, ono može biti delimično ili potpuno odstranjeno prilikom setve. Isto tako, prilikom klijanja semena ono može da se izdigne na površinu zemljišta i da dovede do sušenja i smrti primenjenih mikroorganizama u inokulumu. Mora se voditi računa o odabiru inokuluma, odnosno koji mikroorganizmi se koriste, jer određeni proizvode materije koje inhibiraju klijanje semena, ili čak i seme biljaka može proizvoditi antimikrobne materije koje štetno deluju na mikroorganizme. Fungicidi i insekticidi koji se koriste za oblaganje semena takođe mogu štetno da deluju na mikroorganizme.



Slika 12. Tehnike inokulacije: inokulacija semena (a); inokulacija zemljišta (b) (prema Bashan et al., 2014)

Inokulacija zemljišta se koristi kada se velika populacija odnosno količina inokuluma introdukuje u zemljište. Obično se koriste inokulumi u čvrstom stanju, u obliku granula (0.5–1.5 mm) koji se stavljaju ispod, pored ili iznad semena prilikom setve (Slika 12b). Prednost ove tehnike inokulacije je mogućnost kontrole mesta primene inokuluma kao i primenjene doze. Na ovaj način je izbegnuto oštećenje semenskog materijala, a mikroorganizmi u inokulumu su zaštićeni od štetnog delovanja pesticida koji su naneti na seme. Naročito kulture sa sitnim semenom imaju koristi od ove tehnike inokulacije, jer su izložene visokoj koncentraciji inokuluma.

Tehnički aspekti proizvodnje mikrobioloških preparata

U ovom poglavlju će se opisati neke specifičnosti industrijske proizvodnje preparata, odnosno proizvodnje na veliko.

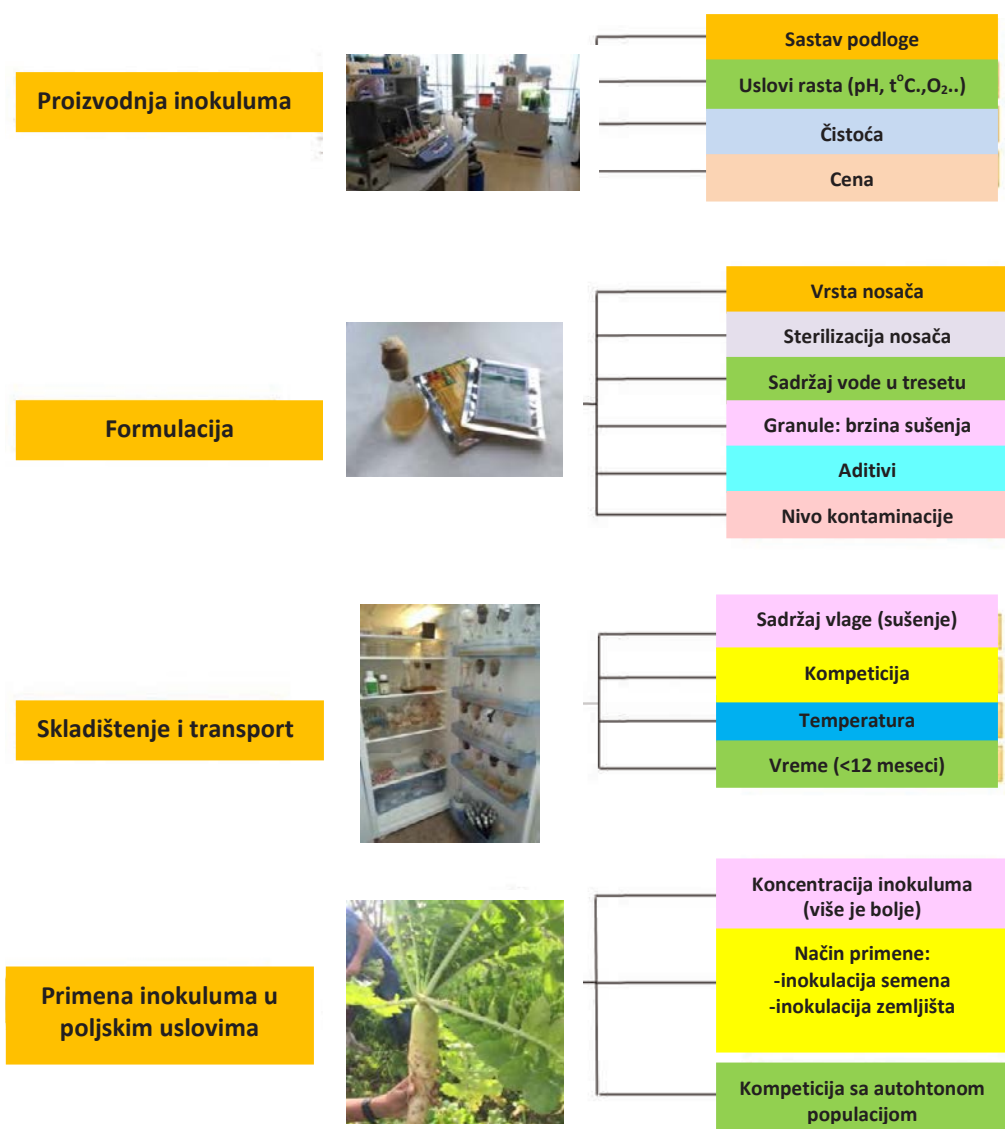
Svaki proizvodni proces započinje sa umnožavanjem mikroorganizama u odgovarajućoj podlozi. U laboratorijskim uslovima se koriste različite hranljive podloge, dok se u industriji često koriste nusproizvodi prehrambene industrije kao što su (kukuruzni sirup, slad, surutka) uz određene modifikacije. Svakako da je proces gajenja mikroorganizama koja je označena kao fermentacija suočena sa brojnim izazovima i podešavanjima, no industrija je razvila protokole za svaku vrstu ili soj koji se koristi kao inokulant.

Važan korak u proizvodnji inokuluma je i sterilizacija nosača, pogotovo ako želimo produžiti vreme skladištenja preparata. U praksi se najviše koristi sterilizacija autoklaviranjem i tindalizacijom, kao i gama zracima (dugotrajan proces pri kojem se ne menjaju fizička i hemijska svojstva nosača). Bez obzira na koji način se sterilizacija vrši, ovaj korak svakako poskupljuje proizvodnju. Sterilizacija je značajna u proizvodnji inokuluma koje sadrže sporo rastuće PGP mikroorganizme, kao što su simbiotski azotofiksatori iz roda *Bradyrhizobium* spp. Na ovaj način se kontaminacija inokuluma od strane brzo rastućih mikroorganizama eliminiše.

Produženje vremena skladištenja se postiže pre svega smanjenjem sadržaja vlage (dehidratacija) u formulacijama i /ili skladištenjem na nižim temperaturama. U potpuno suvim formulacijama, mikroorganizmi su u latentnoj fazi sa usporenim metabolizmom i ne postoji opasnost od kontaminacije. Nedostatak suvih formulacija je to što je sam proces dehidratacije, a kasnije i rehidratacije, odnosno oživljavanja mikroorganizama vodom, veoma stresan za mikroorganizme, naročito za asporogene.

Kod vlažnih formulacija, kada se treset koristi kao nosač, optimalan sadržaj vlage je između 40-50%. Da bi se dodatno poboljšalo preživljavanje mikroorganizama, u preparate se mogu dodati aditivi (najčešće polisaharidi). Tada i preparati sa manjim inicijalnim brojem mikroorganizama imaju duže vreme preživljavanja, odnosno duže vreme skladištenja.

Veliki broj faktora utiče na kvalitet mikrobiološkog preparata od faze proizvodnje do primene u poljskim uslovima (Slika 13).



Slika 13. Faktori koji utiču na kvalitet inokuluma

Važno je istaći, bez obzira na vrstu ili formulaciju mikrobiološkog preparata, da bi preparat bio uspešan, moraju biti zadovoljeni određeni zajednički interesi proizvođača i potrošača. Za potrošača je pre svega važno svojstvo praktičnost i jednostavna primena, da ne remeti rutinu i uobičajene agrotehničke mere, koje uključuju npr. dezinfekciju semenskog materijala ili primenu pesticida. Za proizvođače je dodatan bonus produženo vreme skladištenja (da traje više od jedne sezone).

Budućnost mikrobnih inokulanata

Da bi se mikrobiološki preparati koristili i našli sve širu primenu u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji, svakako treba raditi na njihovom unapređenju. Oblasti od interesa su sledeće:

1. procena postojećih i ocena budućih nosača
2. popravka ili optimizacija preparata koji su pokazali dobre rezultate primenom u polju (uslovi primene, količina inokuluma, odnos i izbor nosača i mikroorganizama i sl.)
3. poboljšati preživljavanje mikroorganizama u inokulumu

4. poboljšati vreme skladištenja.
5. formulacija polivalentnih inokuluma koji sadrže različite vrste mikroorganizama sa PGP svojstvima ili kombinacija PGP mikroorganizama sa onima koji se primenjuju u kontroli patogena i štetočina.
6. dodavanje aditiva u preparate
7. kreiranje inokuluma koji je "farmer friendly", lak za upotrebu - ne uključuje brojne korake u njihovoj primeni
8. cena preparata mora biti konkurentna da bi opstala na tržištu
9. upotreba "lokalnih" mikroorganizama. Koncept proizvodnje mikrobioloških preparata se zasniva na izolaciji mikroorganizama iz zemljišta ili supstrata u koji će se i vratiti u mnogo većem broju. Tada preparati ispoljavaju najveću efikasnost. Međutim, na globalnom nivou, u svetu razvijene trgovine mnogi "lokalni" sojevi se često primenjuju u različitim ekološkim uslovima u odnosu na one odakle su potekli pa i njihova efikasnost varira.
10. primena mikrobni metabolita, ekstrakata mikroorganizama bez živih ćelija.

5. PGP MIKROORGANIZMI KAO FITOSTIMULATORI - PRODUCENTI BILJNIH HORMONA

Jedan od najvažnijih mehanizama, kojim PGP mikroorganizmi pozitivno utiču na rast i razvoj biljaka, je produkcija fitohormona. Mikroorganizmi koji produkcijom hormona stimuliraju rast i povećavaju prinos biljke, nazivaju se **fitostimulatori**. Dosadašnja istraživanja su pokazala da veliki broj različitih vrsta bakterija i gljiva može da produkuje fitohormone: auksine, citokinine, gibereline, abscisinsku kiselinu i etilen.

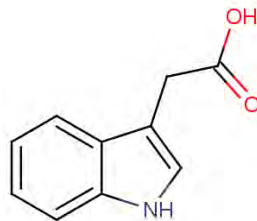
Fitohormoni su organske materije, koje već u malim koncentracijama utiču na sve biohemijske i fiziološke procese u biljci i na taj način kontrolišu i deluju na rast i razvoj biljaka. Osim toga, fitohormoni utiču na sposobnost biljaka da adekvatno reaguju na svoju okolinu. Imaju značajnu ulogu u procesu klijanja semena, formiranja korena i cvetnih pupoljaka, diferencijaciji ksilema i floema i formiranja plodova.

Biljke se snabdevaju hormonima na dva načina: **endogeno**, hormonima produkovanim iz sopstvenog tkiva i **egzogeno**, hormonima koji su produkovani od strane PGP mikroorganizama.

PGPM - PRODUCENTI AUKSINA

Fitohormoni iz grupe auksina (grčki "auxein," što znači rasti, povećavati se), utiču na niz fizioloških procesa koji direktno deluju na razvoj biljaka.

Fiziološki najaktivniji auksin u biljkama je indol-sirćetna kiselina (indole-acetic acid, IAA) (Slika 14), za koju je utvrđeno da stimuliše izduživanje ćelija, njihovu deobu i diferencijaciju, utiče na fotosintezu, stvaranje pigmenata, biosintezu različitih metabolita, stimuliše klijanje semena i podiže otpornost biljaka na stresne uslove.



Slika 14. Auksin (Indol-sirćetna kiselina, IAA)

Produkcija auksina od strane bakterija, povezivana je ranije sa infekcijama biljaka. Put biosinteze IAA prvi put izučavan je kod bakterija koje su izazivale tumor i gale kod biljaka, jer se smatralo da je upravo auksin, kojeg je sintetisala bakterija, a koji je potom bio usvojen od strane biljke, bio odgovoran za patološke promene u morfologiji i razviću biljaka. Međutim, daljim istraživanjem, otkriveno je da osim fitopatogenih mikroorganizama, sposobnost da produkuju IAA imaju i mikroorganizmi koji upravo ovim putem promovišu rast biljaka. Može se stoga zaključiti da uticaj egzogenog auksina na razviće biljaka može biti pozitivan ili negativan.

Okolo 80% od ukupnog broja ispitivanih zemljišnih bakterija, ima sposobnost produkcije IAA (Slika 15). Od PGP mikroorganizama koji produkuju IAA, vrste roda *Azospirillum* su najviše ispitivane. Druge IAA produkujúće bakterije pripadaju rodovima *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Streptomyces* i dr., kao i vrste *Alcaligenes faecalis* i *Acetobacter diazotrophicus*.

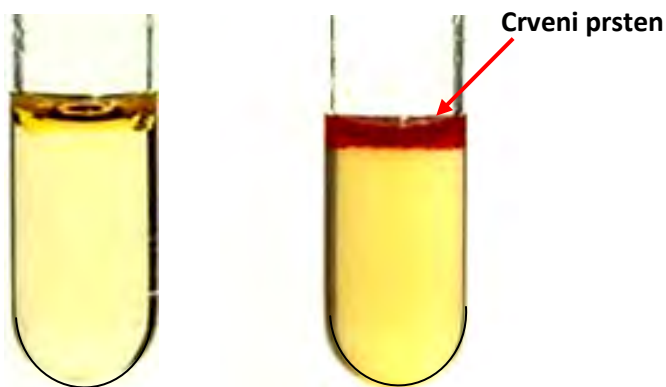
U biljkama i mikroorganizmima, IAA se nalazi u konjugovanoj formi, retko kao slobodno jedinjenje. Uloga ovih konjugata je da učestvuju u transportu i skladištenju IAA, te na taj način direktno utiču na nivo koncentracije IAA u ćeliji. Kod bakterije *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* utvrđeno je prisustvo IAA-Lizin konjugata.

Biosinteza IAA je veoma složen proces. Glavni prekursor za sintezu IAA je triptofan, i do sada je opisano pet različitih puteva biosinteze IAA iz ovog jedinjenja (Slika 16). Naziv svakog puta izveden je iz imena intermedijarnog jedinjenja, te tako razlikujemo:

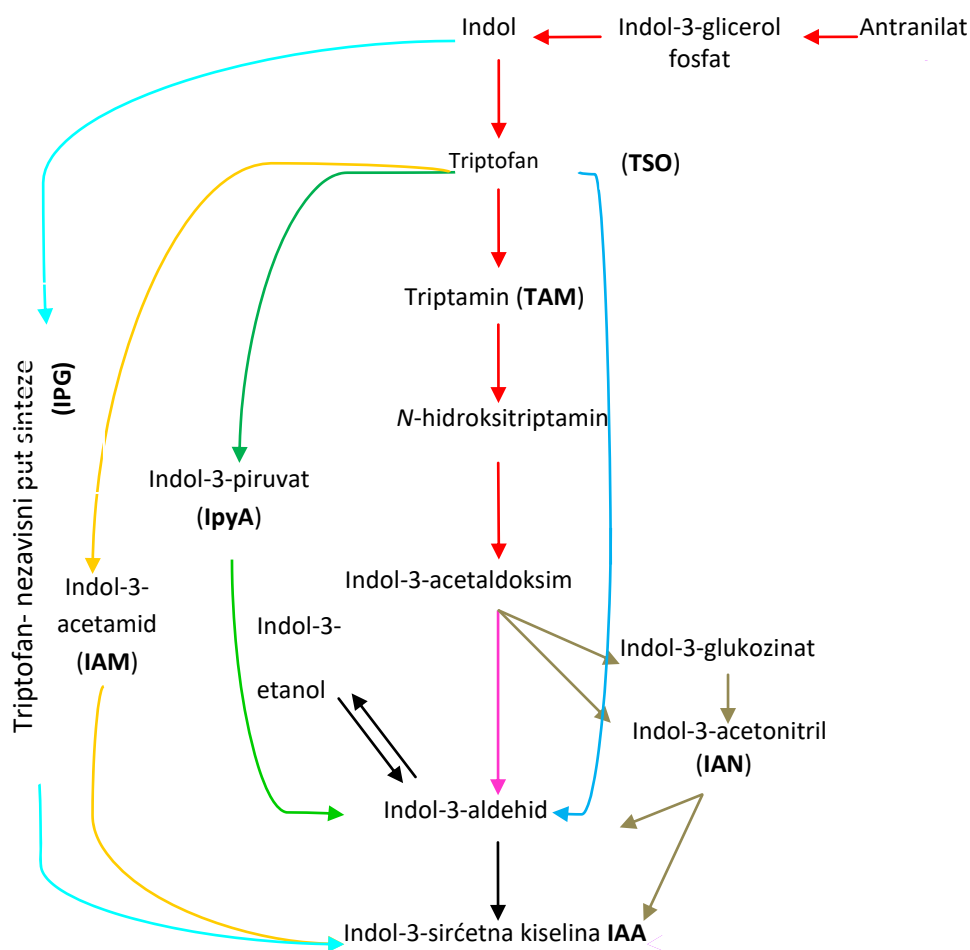
- **IpyA** (indol-3-piruvat) put - opisani kod biljaka i kod bakterija;
- **TAM** (triptamin) put - opisani kod biljaka i kod bakterija;
- **IAN** (indol-3-acetonitril) put - opisani kod biljaka i kod bakterija;
- **IAM** (indol-3-acetamid) put - utvrđen samo kod bakterija;
- **TSO** (Tryptophan side chain oxidation) put - utvrđen kod nekih bakterija roda *Pseudomonas*.

Za bakterije roda *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Enterobacter* i *Klebsiella* karakterističan je indol-3-piruvat i indol-3-acetamid put biosinteze IAA.

Osim ovih puteva sinteze, istraživanja su pokazala da se kod nekih biljaka i bakterija IAA može sintetisati i bez triptofana kao prekursora. U tom slučaju, sinteza IAA se odvija preko indola (Ind) i indol-3-glicerol fosfata (**IPG**), a kao prekursor ovim jedinjenjima javlja se antranilat.



Slika 15. Dokazivanje produkcije indola u triptofan bujonu:
levo-nema produkcije indola; desno-pojava crvenog prstena dokaz je produkcije indola



Slika 16. Biosinteza indol-sirćetne kiseline (IAA)
(prema Quittenden et al., 2009.)

Da li će mikroorganizmi proizvoditi IAA, i u kojoj meri, zavisi od više različitih faktora. Faktori koji utiču na sintezu IAA kod mikroorganizama, mogu se razvrstati u dve grupe: **ekološki** i **genetički** faktori.

Ekološki faktori podrazumevaju uticaj kiselosti sredine, osmotski pritisak, dostupnost ugljenika, prisustvo biljnih ekstrakata i triptofana u rizosferi. Kod vrsta roda *Azospirillum*, produkcija IAA se povećava u uslovima smanjene raspoloživosti ugljenikom, povećanja kiselosti i tokom stacionarne faze. Kod roda *Pseudomonas* povećanje produkcije faktora stresa (RpoS sigma) u toku stacionarne faze, intenzivira produkciju IAA. Kod pojedinih vrsta roda *Rhizobium*, prisustvo flavonoida u rizosferi, produkovanih od strane biljke, stimuliše sintezu IAA. Kod mnogih bakterija uočeno je da produkcija IAA značajno raste ukoliko bakterija živi na biljci ili u njenom prisustvu. Na ovaj način je potvrđena značajna uloga biljke u produkciji IAA kod bakterija.

Značajnu ulogu u regulaciji intenziteta sinteze IAA ima koncentracija triptofana, prekursora IAA. Triptofan dospeva u rizosferu razgradnjom starih delova korena biljke ili eksudacijom korena, kao i raspadanjem mikroorganizama. Utvrđena je pozitivna korelacija između količine triptofana i intenziteta sinteze IAA kod bakterija roda *Azospirillum*, *Pantoea*, *Pseudomonas* i *Rhizobium*. Osim triptofana, na biosintezu IAA utiče i koncentracija IAA, intermedijarnih jedinjenja, kao i prekursora triptofana. Prisustvo ovih jedinjenja u većoj količini inhibira sintezu IAA.

Na intenzitet sinteze i produkcije IAA značajno utiče lokacija gena odgovornih za njenu sintezu u genomu mikroorganizma. Kod bakterija, geni mogu biti lokalizovani na hromozomu ili na plazmidu. Plazmidi su u bakterijskoj ćeliji prisutni u više kopija, što znači i veći broj kopija gena, u odnosu na gene smeštene na hromozomu. To dalje znači da će se veća količina IAA produkovati kod onih bakterija kod kojih se geni odgovorni za sintezu IAA nalaze na plazmidima. Kod bakterije *Pseudomonas savastanoi*, geni za sintezu IAA su smešteni na plazmidima, dok su kod bakterije *Pseudomonas syringae* smešteni na hromozomalnoj DNK. U prvom slučaju utvrđena je znatno veća produkcija IAA.

PGP mikroorganizmi, koji produkuju IAA, utiču na povećanje površine korena, i to povećanjem broja korenskih dlačica i bočnog korenja. Ovim putem PGP mikroorganizmi indirektno utiču na bolje snabdevanje biljke mineralnim materijama i vodom, povećava se i količina eksudata u zemljištu, što dalje dovodi do većeg broja PGP mikroorganizama u rizosferi. Sa druge strane, iako se već decenijama smatra da su ove morfološke promene na korenu posledica aktivnosti PGP mikroorganizama producenata IAA, ogledi na izmenjenim sojevima, koji ne produkuju IAA, su pokazali da nije samo hormon odgovoran za spomenute promene na korenu. Prema " aditivnoj hipotezi", azotofiksacija, fosfat solubilizacija, produkcija 1-aminociklopropan-1-karboksilat (ACC) deaminaze i IAA su zajedno odgovorni za promociju biljnog rasta i povećanje prinosa.

Auksini učestvuju u ćelijskoj deobi, diferencijaciji i formiranju sprovodnih snopića biljaka. Ova tri procesa odvijaju se i prilikom formiranja nodula, što ukazuje na značajnu ulogu auksina u nodulaciji. Promena u koncentraciji auksina u ćelijama biljke, jedan je od preduslova za stvaranje nodula. Osim što učestvuju u formiranju nodula, auksini imaju važnu ulogu i u održavanju njihove funkcionalnosti. Koncentracija auksina u nodulama, veća je u odnosu na koncentraciju u samom korenu. Primena egzogene IAA, produkovane od strane PGP mikroorganizama, u malim količinama može stimulisati nodulaciju kod biljaka, dok u većim količinama je inhibira.

Egzogena IAA ima pozitivan uticaj i na druge parametre rasta kod biljaka. Inokulacija pšenice bakterijama roda *Pseudomonas*, stimuliše rast biljke i to redukcijom usvajanja toksičnih jona i povećanjem koncentracije auksina. U uslovima suše, koinokulacija pasulja sa hormon produkujućim bakterijama roda *Rhizobium* i *Pseudomonas*, rezultirala je povećanjem mase i visine biljke, kao i brojem nodula. Primena PGP auksin produkujućih bakterija dovela je do povećanja broja izdanaka i mahuna kod pasulja, povećanja mase korena pšenice, kukuruza, prinosa šećerne repe, soje, dužine stabla i korena deteline i suve i sveže mase engleskog ljulja, prinos pšenice, stimulisala rast pirinča i sadnica četinara.

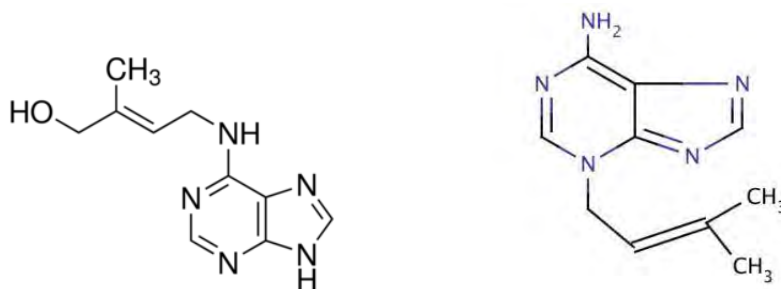
PGPM - PRODUCENTI CITOKININA

Citokinini su druga važna grupa fitohormona, koji su u prirodi prisutni u malim količinama. Pod uticajem ovog fitohormona u biljkama se stimuliše deoba ćelija, morfogeneza, rast lateralnih pupoljaka, olistavanje, regulacija meristemske aktivnosti, inhibicija rastenja korena, uklanjanje apikalne dominacije, usmeravanje transporta i akumulacija asimilata, klijanje semena, diferencijacija hloroplasta, akumulacija hlorofila, otvaranje stoma, starenje listova, kao i razviće korena i korenskih dlačica.

Mnogi rizosferni mikroorganizmi produkuju citokinine: *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium* spp., *Rhodospirillum rubrum*, *Bacillus subtilis*, *Azospirillum* sp., *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter beijerinckii*, *Pseudomonas putida*. Produkcija citokinina utvrđena je i kod *Cyanobacteria*, rodovi *Anabaena*, *Chlorogloeopsis*, i *Calothrix*, mrkih i crvenih algi, kao i kod kvasaca (*Saccharomyces*

spp. i *Schizosaccharomyces* spp.). Oko 90% izolovanih bakterija iz rizosfere različitih biljaka ima sposobnost da proizvode citokine. Za većinu ovih bakterija se smatra da su promotori biljnog rasta. Međutim, osim njih, utvrđeno je i da fitopatogeni mikroorganizmi također sintetiziraju citokine.

Mikroorganizmi proizvode citokine slične onim koje proizvode biljke. Najčešći citokinini proizvedeni od strane bakterija su: izopentiladenin, trans-zeatin, cis-zeatin i njihovi ribozidi (Slika 17). Pojedine vrste bakterija mogu da proizvode više vrsta citokinina, kao na primer, *Rhizobium* spp. koji proizvode dva vrsta citokinina. Kod bakterije *Pseudomonas fluorescens* dokazana je sposobnost proizvodnje različitih citokinina: izopentiladenozin, Z-R i dihidrozeatin ribozid (DHZ-R).



Slika 17. Citokinin Zeatin (levo) i izopentiladenin (desno)

Fiziološkim analizama utvrđeno je da adenin i izopentil alkohol povećavaju bioaktivnost citokinina. Osim toga, pH 6.5, temperatura od oko 32°C, dobra aeracija, potpomažu sintezu derivata citokinina.

Uloga citokinina sintetisanih od strane bakterija u razvoju biljaka, kao i mehanizmi stvaranja citokinina kod mikroorganizama još uvek nisu sasvim razjašnjeni. PGP mikroorganizmi proizvode više od 30 jedinjenja iz grupe citokinina. Biljke usvajaju citokine proizvedene od strane PGP mikroorganizama, te se na taj način ostvaruje pozitivan efekat. Međutim, prema nekim autorima, količina citokinina koju proizvode PGP mikroorganizmi je nedovoljna da bi mogla imati bilo kakav efekat na biljku. Sa druge strane, prisustvo pojedinih materija, kao što je kinetin, intenzivira produkciju citokinina kod mikroorganizama do nivoa koji može pozitivno uticati na razvoj biljke.

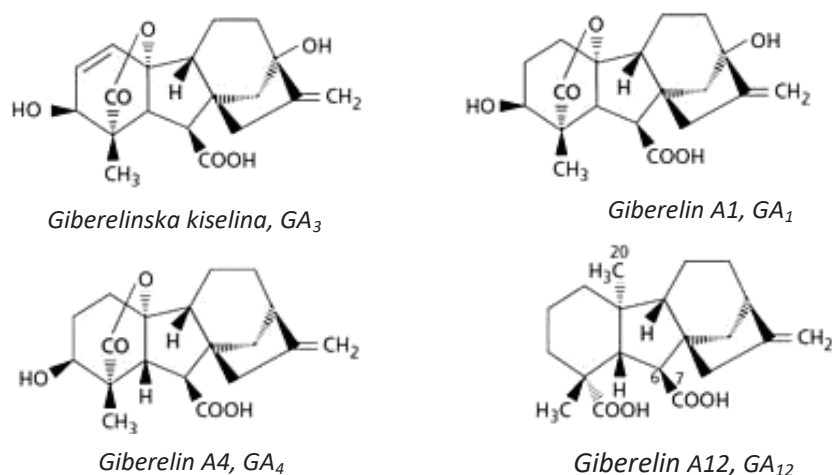
Pozitivan efekat primene mikroorganizama, koji proizvode citokine, potvrđuju rezultati pojedinih istraživanja. Tako je na primer, primena *Azotobacter chroococcum*, bakterije koja sintetizira citokine i prekursore citokinina izopentil alkohol i adenine, imala pozitivan efekat na rast kukuruza i rotkvice u kontrolisanim i poljskim uslovima. Primena izmenjenog soja bakterije *Pseudomonas fluorescens* G20-18, koji proizvode manje količine citokinina od divljeg tipa, nije imala pozitivan efekat na rast pšenice i rotkvice, za razliku od divljeg tipa, gde je utvrđen pozitivan efekat. Utvrđeno je da egzogeni citokinini povoljno utiču na rast biljke time što sprečavaju degradaciju hlorofila i fotosintetičkih proteina.

PGPM - PRODUCENTI GIBERELINA

Giberelini su veoma značajna grupa hormona koji pozitivno utiču na razvoj biljke, a pre svega stimulišu klijavost semena, utiču na izduživanje stabla, cvetanje, razvoj ploda i korena. Otkriveni su 1926. g. u Japanu, radom fiziologa Kurosava (Kurosawa) na gljivi *Giberelle fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*), koja parazitira na pirinču. Stablo biljaka pirinča zaraženo ovom gljivom, bilo je veoma izduženo, zbog čega su biljke bile

pošle i nisu donosile plod. Otkriveno je da je uzrok tome parazitska gljiva koja u tkivu domaćina izlučuje hormon, koji je kasnije po njoj i dobio naziv giberelin.

Giberelini pripadaju grupi diterpenoida, sa 19 ili 20 C-atoma, a često ih označavaju i kao giberelinske kiseline. Zato se obeležavaju sa GA (Giberellic Acid) sa brojem u supskriptu, koji označava redosled njihovog otkrića. Ovoj grupi pripada više od 130 različitih molekula. Najpoznatiji je giberelin GA3 (giberelinska kiselina), a najaktivniji u biljkama je GA1, koji je odgovoran za izduživanje izdanaka. Kao i ostali hormoni, i giberelini uglavnom deluju zajedno sa ostalim hormonima (Slika 18).



Slika 18. Giberelini

Gibereline ne proizvode samo više biljke i gljive, već i bakterije. Sposobnost da proizvode gibereline prvi put je kod bakterija opisana kod *Azospirillum brasilense*, a nešto kasnije i kod *Rhizobium*. Danas je proizvodnja giberelina utvrđena kod mnogih rizosfernih bakterija uključujući: *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, i *Xanthomonas*. Bakterije *Bacillus pumilis* i *Bacillus licheniformis* proizvode četiri različite vrste giberelina. Sposobnost proizvodnje giberelina utvrđena je i kod mnogih mikromiceta (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium funiculosum*, *Verticillium sp.*, *Rhizopus stolonifer* i *Schizophyllum commune*). Aktivni proizvođači fitohormona utvrđeni su i među fitopatogenim gljivama: *Ustilago mayis*, *Sphaceloma manihoticola*, *Cercospora rosicola*, *Botrydiploia theobromae*, *Fusarium semitectum*, *F. acuminatum*, *F. anguoides*, *F. avenaceum*, *F. chlamydosporum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme* i mikoriznim bazidiomicetama.

Giberelini stimulišu razmnožavanje bakterija roda *Azotobacter*, *Pseudomonas*, i *Lactobacillus*, pojedinih kvasaca i micelijalnih rizosfernih gljiva. Giberelini podstiču azotofiksaciju kod cijanobakterija roda *Anabaena*. Takođe, stimulišu formiranje litičkih enzima kod pojedinih bakterija i gljiva.

Pozitivan uticaj giberelin-proizvodičkih bakterija na rast i razvoj biljaka, u uskoj je vezi sa povećanjem sadržaja giberelina u biljnom tkivu. U ogledu sa kukuruzom, u varijantama gde je primenjena bakterija *Azospirillum*, utvrđena je veća količina slobodnog giberelina GA₃, u odnosu na kontrolu, gde nije bila primenjena inokulacija. Osim toga, dokazano je da prisustvo *Azospirillum* može da utiče na metabolizam endogenog giberelina u tkivu biljaka. Giberelin proizvodička bakterija *Acinetobacter calcoaceticus* promovise rast krastavca, kineskog kupusa i jestive hrizanteme. Dokazan je

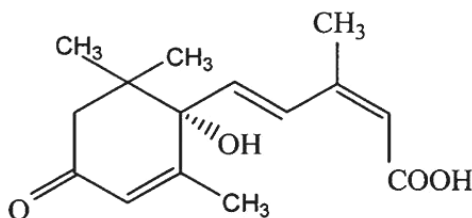
i pozitivan efekat primene bakterija roda *Bacillus* (*B. licheniformis* i *B. pumilus*) kod sadnica bora (*Pinus pinea*), i to upravo produkcijom giberelina.

Mehanizam promocije biljnog rasta od strane giberelin produkujućih bakterija još uvek nije sasvim objašnjen. Pretpostavlja se da bi to moglo biti povećanjem koncentracije giberelina u biljci samom produkcijom giberelina, dekonjugacijom giberelina iz korenovih eksudata ili prevođenjem neaktivnog oblika giberelina u aktivni. Smatra se da giberelini produkovani od strane mikroorganizama povećavaju gustinu korenskih dlačica i na taj način pospešuju apsorpciju hranljivih materija i vode iz zemljišta.

Koncentraciju giberelina u nodulama veća je u odnosu na sam koren. U nodulima, koncentracija giberelina menja se pod uticajem mikroorganizama, i to na dva načina: utiču na metabolizam biljne produkcije giberelina ili sami produkuju gibereline. Na primer, inokulacija pasulja (*Phaseolus lunatus*) sojevima bakterije *Bradyrhizobium* sp., dovela je do značajnog internodalnog izduživanja, za razliku od varijante gde je biljka bila inokulisana drugim sojem iste bakterije. Merenjima sadržaja giberelina, utvrđena je povećana koncentracija giberelina GA1, GA19, GA20 i GA44 u nodulima, koja je dovela do izduživanja stabla biljke. U drugom slučaju, primena *Rhizobium leguminosarum*, bakterije koja produkuje auksine i gibereline, dovela je do bržeg rasta i razvoja korena, kao i do povećanja prinosa biljke pirinča.

PGPM - PRODUCENTI ABSCISINSKE KISELINE (ABA)

Abscisinska kiselina (ABA) je ubikvitaran biljni hormon, koji je u niskim koncentracijama neophodan za normalan rast i diferencijaciju ćelija (Slika 19). Veće koncentracije abscisinske kiseline neophodne su za regulaciju vodnog režima kod biljaka (kontrola otvaranja stoma). Osim toga, zaustavlja rastenje pupoljaka, izaziva dormanciju i sazrevanje semena, starenje i opadanje listova (apsicija), utiče na sintezu rezervnih proteina u kotiledonima.



Slika 19. Abscisinska kiselina, ABA

U poslednje vreme, abscisinska kiselina (ABA) se intenzivno proučava, jer je utvrđeno da predstavlja univerzalni "stresni hormon" čija akumulacija, posebno u korenu, pomaže biljkama da se adaptiraju na stresne faktore spoljašnje sredine, kao što je suša, visoka i niska temperatura, visoka koncentracija soli i jona.

ABA sintetišu sve više biljke, ali i pojedini rodovi mahovina, algi, gljiva i bakterija. Hormon je prvi put izolovao Addicott, 1936. godine iz kuglica (ploda) pamuka. Iako se u literaturi već uvrstio termin *abscisinska kiselina*, prvobitan naziv *dormin* je više odgovarajući za ovaj hormon, jer je danas poznato da je zapravo etilen hormon koji izaziva apscisiju (opadanje listova, cveta, semena, ploda i dr.), a da se pomenuta apscisija ploda pamuka zbog koje je ABA dobila ime desila zahvaljujući sposobnosti ABA da stimuliše proizvodnju etilena.

Prisustvo abscisinske kiseline u biljnom tkivu i u rizosferi je od izuzetnog značaja za biljku, koja se nalazi u uslovima stresa usled nedostatka vode. Utvrđeno je da u

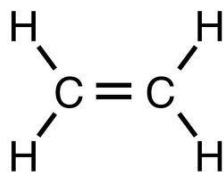
uslovima suše, prisustvo ABA u biljnom tkivu predstavlja signal da se biljka odupre nedostatku vode putem zatvaranja stoma i inhibicije rasta. Osim toga, ABA ima značajnu ulogu u grananju korena, sintezi rezervnih proteina u semenu, klijanju i u usvajanju i transportu hranljivih materija u biljci.

Sposobnost da produkuje fitohormon ABA, utvrđena je kod pojedinih PGP vrsta (*Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*) kao i kod nekoliko fitopatogenih gljiva, *Cercospora rosicola* i *Cercospora cruenta*, *Agrocybe praecox*, *Rhizoctonia solani*, *Ceratocystis coerulescens*, *Schizophyllum commune*, *Monilia* sp., *Fusarium culmorum*. Utvrđeno je da pojedine endofitne bakterije, *Achromobacter xylosoxidans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Brevibacterium halotolerans* i *Lysinibacillus fusiformis*, u uslovima povećanog saliniteta, produkuju ovaj fitohormon. Takođe, utvrđena je sposobnost produkcije i kod *Polyporus* sp., *Trametes versicolor*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*. Rezultati pojedinih istraživanja ukazuju da i pojedine vrste *Cyanobacteria*, kao i predstavnici zelenih (*Ulva* sp.), mrkih (*Fucus* sp., *Laminaria* sp.) i crvenih (*Porphyra* sp.) algi, produkuju ABA.

Efekat primene ABA produkujućih bakterija na biljku, do sada je malo istraživano. Ipak, svi dobijeni rezultati ukazuju da ABA produkujući PGP mikroorganizmi utiču na nivo ABA hormona u biljci, povećavajući ili smanjujući njenu koncentraciju u biljci. Inokulacija kukuruza sa bakterijom *Azospirillum lipoferum*, stimulisala je biljni rast u uslovima suše. Takođe, soj *A. brasilense* Sp 245 je uticao na povećanje nivoa ABA kod biljke *Arabidopsis* sp. Kod nekih biljaka, prisustvo egzogenog ABA hormona izaziva drugačiji efekat. Primer za ovo je inokulacija ABA produkujućim bakterijama, koja je dovela je do smanjenja koncentracije ABA hormona u korenu i listu paradajza, kao i u listu pirinča.

PGPM - REGULATORI PRODUKCIJE ETILENA

Etilen je veoma važan fitohormon za rast i razviće biljke (Slika 20). Učestvuje u procesu sazrevanja plodova, starenja listova i cvetova, a u uslovima stresa za biljku, reguliše odgovor biljke na nepovoljne uslove.



Slika 20. Etilen

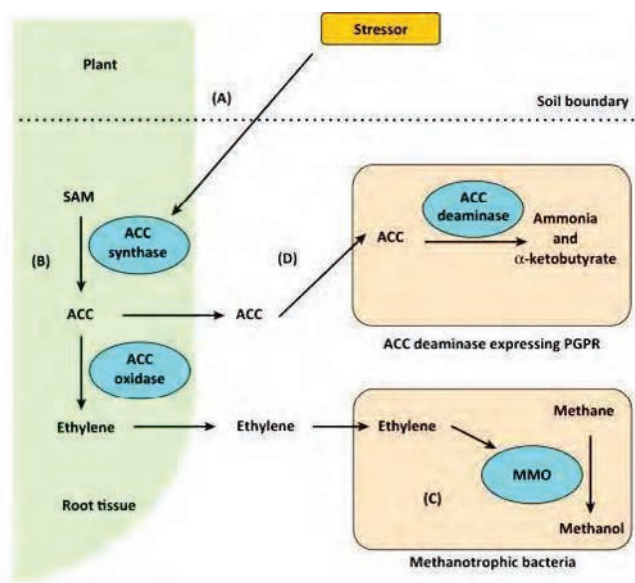
Za sintezu etilena u tkivu biljaka odgovorna su tri enzima:

- 1) S-adenozil-L-metionin (SAM) sintetaza, koja katališe prevođenje metionina do SAM;
- 2) 1-aminociklopropan-1-karboksilna kiselina (ACC) sintetaza, koja reguliše hidrolizu SAM do ACC i 5'-metiltioadenozina;
- 3) ACC oksidaza, koja metaboliše ACC do etilena, ugljen-dioksida i cijanida.

Tokom većeg dela života biljke, produkcija etilena u biljnom tkivu je minimalna. Međutim, u specifičnim situacijama dolazi do povećane akumulacije ovog fitohormona, što može prouzrokovati inhibiciju rasta biljke, pa čak i njenu smrt. U uslovima stresa za biljku, kao što je to niska temperatura, suša, prisustvo teških metala, infekcija patogenom, biljka sintetiše 1-aminociklopropan-1-karboksilat (ACC), koji je prekursor etilena. Deo

sekretovanog ACC se ponovo reapsorbuje putem korena, gde se prevodi u etilen. Akumulacija etilena u korenu biljke dovodi do niza negativnih efekata, a pre svega do slabijeg rasta korena, što za posledicu ima slabiju sposobnost biljke da usvaja vodu i hranljive elemente. PGP mikroorganizmi proizvode enzim, koji može da reguliše nivo biljnog hormona, etilena, tako što degradira prekursor ovog hormona. Istraživanja su pokazala da PGP mikroorganizmi proizvode ACC deaminazu (1-aminociklopropan-1-karboksilat- deaminaza) koja hidrolizuje ACC, što rezultira smanjenjem nivoa etilena u korenu, a dalje stimulacijom rasta korena (Slika 21). Bakterije mogu da koriste proizvode ove hidrolize, amonijum i α -ketobutirat, kao izvor azota i ugljenika za svoj rast.

Produkcija ACC deaminaze utvrđena je kod *Bacillus firmus*, *Bacillus globisporus*, *Bacillus circulans*, *Alcaligenes* sp., *Variovorax paradoxus*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas putida* i *Enterobacter cloacae*.



Slika 21. Regulacija nivoa etilena u biljnom tkivu bakterijama koje proizvode ACC deaminaze

(preuzeto: <https://www.cell.com/trends/plant-science>)

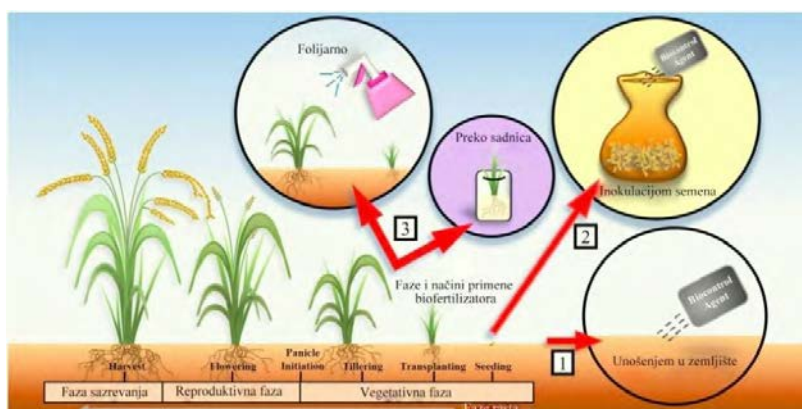
Efekat ACC deaminaze produkovane od strane PGP mikroorganizama, posebno dolazi do izražaja u stresnim uslovima za biljku. Smatra se da se kontrolisanjem nivoa produkcije etilena kod biljaka, može značajno povećati poljoprivredna proizvodnja.

Mikroorganizmi su takođe sposobni da sintetišu etilen. To su pre svega bakterije *Escherichia coli*, *Cryptococcus albidus*, *Pseudomonas syringae*, *Chromobacterium violaceum* i *Ralstonia solanacearum*, fototrofne cianobakterije iz roda *Synechococcus*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Scytonema* i *Cylindrospermum*, mikorizne gljive *Cenococcum geophilum*, *Hebeloma crustuliniforme* i *Laccaria laccata*, fitopatogeni *Botrytis cinerea* i *Fusarium oxysporum* i mikromicete *Acremonium falciforme* i *Penicillium digitatum*. Produkcija etilena utvrđena je i kod algi, i to iz rodova *Porphyra*, *Acetabularia*, *Codium* i *Dunaliella*.

6. PGP MIKROORGANIZMI KAO BIOFERTILIZATORI

Povećanje plodnosti zemljišta, jedna je od strategija koja se primenjuje sa ciljem da se poveća poljoprivredna proizvodnja. **Biofertilizatori** su preparati koji putem različitih mehanizama povećavaju plodnost zemljišta. **Inokulacija** je proces unošenja mikroorganizama u zemljište sa ciljem da se intenziviraju i ubrzaju procesi transformacije organske materije, kako bi se biljka lakše snabdela neophodnim nutrijentima. U toku ovih procesa PGP mikroorganizmi obezbeđuju biljke nutritivnim elementima i tako direktno pospešuju biljni rast. Na ovaj način može se poboljšati snabdevenost biljaka azotom, fosforom, kalijumom, sumporom i gvožđem. Primenom PGP mikroorganizama može se smanjiti ili čak u potpunosti izbeći upotreba hemijskih đubriva na bazi ovih elemenata. Zato je uloga i primena biofertilizatora u organskoj proizvodnji, gde se isključuje mogućnost primene hemijskih preparata, velika.

Biofertilizatori se primenjuju prilikom sadnje ili setve, ili u različitim fazama života biljke, tokom vegetativnog ili reproduktivnog perioda (Slika 22). Vreme i način primene biofertilizatora zavisi od vrste biopreparata, mikroorganizma, biljne vrste na koju se primenjuje, ekoloških uslova i efekta koji se želi postići.



Slika 22. Primena biofertilizatora

(preuzeto i prilagođeno: <https://www.milorganite.com/lawn-care/organic-lawn-care/organic-vs-synthetic>)

Različiti su mehanizmi kojima mikroorganizmi povećavaju plodnost zemljišta i snabdevenost biljke neophodnim elementima. Na ovom mestu biće objašnjeni najvažniji mehanizmi, a to su: produkcija siderofora i učešće u ciklusima hranljivih elemenata (ugljenika, azota i fosfora).

PGPM - PRODUCENTI SIDEROFORA

Gvožđe je esencijalni element neophodan za rast svih živih organizama. Biljke i mikroorganizmi zahtevaju velike količine gvožđa za svoje potrebe, te je kompeticija za ovim elementom u zemljištu velika. Ima važnu ulogu u fotosintezi, azotofiksaciji, nitrit i sulfat redukciji, u biosintezi hlorofila, DNK i RNK. Gvožđe je neophodno za formiranje biofilma kod mikroorganizama, jer reguliše pokretljivost mikroorganizama i učestvuje u formiranju polisaharidnog matriksa.

Uprkos činjenici da je gvožđe jedan od četiri najrasprostranjenija elementa u prirodi, količina lako dostupnog gvožđa u zemljištu je veoma mala. Biljke usvajaju gvožđe u obliku ferio jona (Fe^{2+}), a u zemljištu ono je najčešće prisutno u obliku feri jona

(Fe^{3+}), odnosno u vidu oksida i hidroksida gvožđa (crvenkasta i žuta boja zemljišta potiče od njihovog prisustva). Količina lako dostupnog gvožđa je znatno manja od količine ukupnog gvožđa u zemljištu, tako da biljke ostaju uskraćene za ovaj važan element čak i u zemljištima bogatim gvožđem. Sa druge strane, u anaerobnim uslovima i kiselom zemljištu, zemljištima koja su plavljena, velike količine fero jona (Fe^{2+}), nastale redukcijom iz feri (Fe^{3+}) jona, mogu imati toksično dejstvo na biljku. Najčešće forme u kojima se gvožđe nalazi u zemljištu su hidroksidi, oksihidroksidi i oksidi.

Oko 30% agronomskih kultura širom sveta pokazuje simptome hloroze nastalih usled nedostatka gvožđa. Da bi prevazišle problem nedostatka ovog važnog elementa, biljke, ali i mikroorganizmi (gljive i bakterije), produkuju siderofore. Siderofore (od grčke reči „*sīdēros*“ gvožđe, „*φορος*“ nositi) se definišu kao visokoafinitetna Fe^{3+} -helatna jedinjenja relativno male molekulske težine (oko 200 do 2000 Da), u kojima su atomi metala uhvaćeni od strane elektronegativnih atoma vezanih za jedan organski radikal. Siderofore su peptidi koji sadrže bočne lance i funkcionalne grupe visokog afiniteta prema jonima gvožđa. Uloga siderofora je da izazove otpuštanje jona gvožđa iz oksida i hidroksida gvožđa i da ga veže formirajući **Fe^{3+} -siderofora kompleks** (Slika 23). Ovaj kompleks biva transportovan ili do površine korena ili do ćelije mikroorganizma, gde zahvaljujući prisustvu specifičnih membranskih receptora dolazi do redukcije Fe^{3+} jona u Fe^{2+} jon, koji potom biva usvojen.

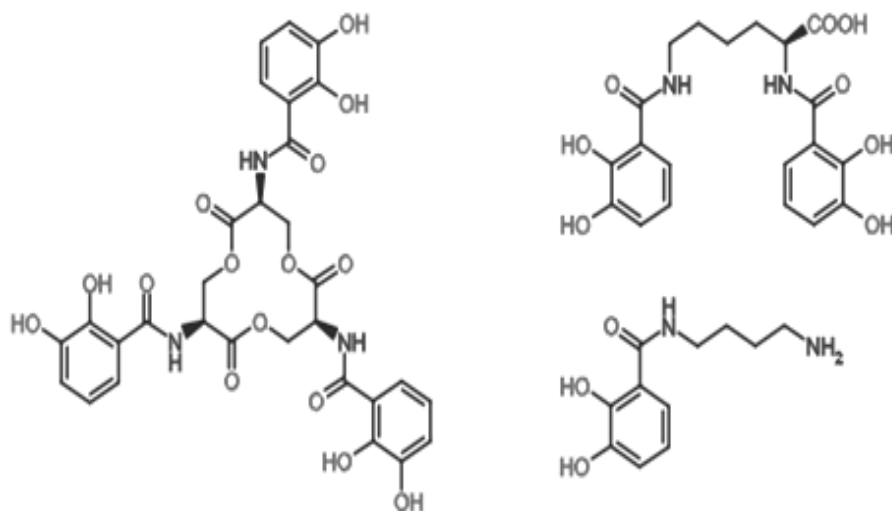


Slika 23. Usvajanje Fe putem siderofora

Ovakav način usvajanja je naročito prisutan kod biljaka koje rastu na karbonatnom zemljištu. Iako je primarna uloga siderofora da učine gvožđe dostupnim, one formiraju komplekse i sa drugim esencijalnim elementima, kao što su Mo, Mn, Co i Ni, što omogućava asimilaciju ovih elemenata od strane mikroorganizama i korena biljke. Siderofore mogu da formiraju stabilne komplekse i sa teškim metalima, kao što su Cd, Cu, Pb, Zn, a to ima velikog značaja u procesu bioremedijacije.

Istraživanja siderofora mikrobiološkog porekla počela su pre oko pet decenija, i do danas je utvrđeno da većina aerobnih i fakultativno anaerobnih mikroorganizama sintetišu najmanje jednu vrstu siderofora. Tako *Ustilago sphaerogena* sintetiše ferihrom, *Streptomyces pilosus* i *Streptomyces coelicolor* deferoksamin, *Fusarium roseum* fuzarinin, *Burkholderia cepacia* ornibaktin, *Echerichia coli* enterobaktin, *Bacillus subtilis* bacilibaktin, *Azotobacter vinelandii* azotobaktin, *Pseudomonas aeruginosa* pioverdin i dr. Kao najbolje producente siderofora među PGP mikroorganizmima, navode se vrste roda *Pseudomonas*. Zato su ove bakterije, posebno fluorescentni pseudomonasi, našli veliku primenu prilikom uzgajanja biljaka na karbonatnom zemljištu gde je dostupnost gvožđa izuzetno mala. Kao dobri producenti siderofora utvrđeni su i pojedini sojevi aktinomiceta.

Različite vrste PGP mikroorganizama produkuju različite siderofore (Slika 24). Siderofore se najčešće klasifikuju na osnovu liganda čiji je zadatak da heliraju jon gvožđa. Najveći broj siderofora pripada grupi kateholata (fenolata), hidroksamata i karboksilata. Limunska kiselina se takođe može ponašati kao siderofora. Danas je poznato više od 500 različitih tipova siderofora, od kojih je 270 strukturno opisano i ispitano. Vrste roda *Pseudomonas* produkuju siderofore koje sadrže hidroksamat i kateholat funkcionalnu grupu. Bakterije *Agrobacterium tumefaciens*, *Paracoccus denitrificans* i *Erwinia carotovora* produkuju kateholate, hidroksamate produkuju gljive i bakterije, dok karboksilate gljive razdela *Zygomycetes* i bakterije *Rhizobium meliloti* i *Staphylococcus hyicus*.



Slika 24. Različite grupe siderofora (levo enterobaktin; desno azotohelin (gore) i aminohelin (dole))

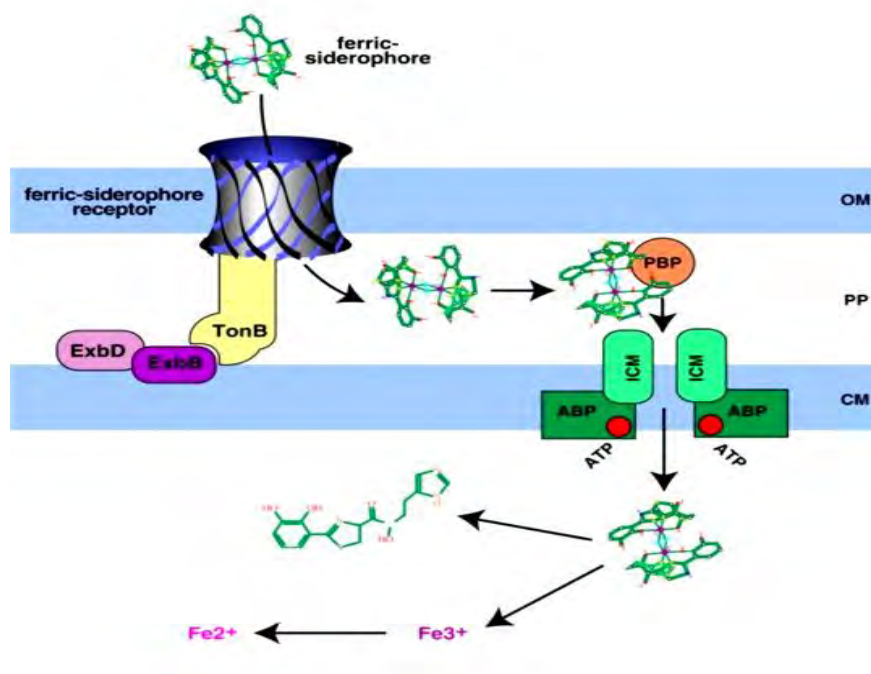
Da bi uneli Fe^{3+} - siderofor kompleks u svoju ćeliju, mikroorganizmi koriste različite sisteme. Bez obzira o kom sistemu usvajanja kompleksa je reč, za sve važi da siderofore prvo formiraju komplekse sa jonima gvožđa, a potom, uz pomoć različitih receptora na ćelijskoj membrani i enzima, dospevaju u unutrašnjost ćelije.

Kod bakterija razlikujemo dva načina usvajanja Fe^{3+} - siderofor kompleksa: transportni sistem Gram-pozitivnih (G+) i Gram- negativnih (G-) bakterija.

G- bakterije (npr. *Escherichia spp.*) imaju TonB - zavisani receptor na spoljašnjoj membrani, koji prepoznaje kompleks Fe^{3+} - siderofor na površini ćelije (Slika 25). Ovaj kompleks biva transportovan putem energetski-zavisnog sistema, koji uključuje proteinske receptore na spoljašnjoj membrani bakterije, periplazmatične proteine i transportne proteine unutrašnje ćelijske membrane. Kada receptor sa spoljašnje

membrane veže Fe^{3+} - siderofor kompleks, on biva privučen proteinima periplazmatskog prostora, koji će vezati i uvući kompleks u periplazmatski prostor i tu ga otpustiti. Potom će kompleks biti transportovan kroz citoplazmatsku membranu putem ATP - vezujućeg transportnog sistema (ATP - binding cassette (ABC) transport system), do citoplazme. Na kraju, redukcijom Fe^{3+} jona, Fe^{2+} jon biva oslobođen iz kompleksa.

Za razliku od G- bakterija, G+ bakterije (npr. *Bacillus* spp.), nemaju spoljašnju membranu, što znači da one ne poseduju receptore karakteristične za ovu membranu, a koji su neophodni za usvajanje Fe^{3+} - siderofor kompleksa. Ulogu da prepoznaju i vežu Fe^{3+} - siderofor kompleks, kod G+ bakterija, imaju proteinski receptori, koji su po tipu slični periplazmatskim receptorima G- bakterija. Ovi receptori su kod G+ bakterija u direktnoj vezi sa spoljašnjom sredinom, jer ne postoji periplazmatski prostor. Kada ovi receptori za sebe vežu Fe^{3+} - siderofor kompleks, on potom biva transportovan ABC transportnim sistemom u citoplazmu ćelije, da bi se na kraju na isti način kao i kod G- bakterija, Fe^{2+} jon otpustio iz kompleksa.



Slika 25. Usvajanje Fe^{3+} - siderofor kompleksa; *OM - spoljašnja membrana; PP - periplazmatski prostor; CM - citoplazmatska membrana (preuzeto: <http://www.ohsu.edu/xd/education>)

Gljive poseduju drugačiji mehanizam za usvajanje i transport Fe^{3+} - siderofor kompleksa: siderofor - Fe^{3+} kompleks biva transportovan kroz membranu, i pri tome se Fe^{3+} jon oslobađa iz kompleksa i u prisustvu enzima redukuje do Fe^{2+} . Oslobođen siderofor biva potom opet aktiviran.

Ono što PGP mikroorganizme čini korisnim za biljke, jeste to što biljke mogu da usvoje bakterijski Fe^{3+} - siderofor kompleks. Iako je, prema pojedinim navodima, količina gvožđa koju biljka usvoji na ovaj način, veoma mala u odnosu na potrebe koje biljka ima, ima i onih koji smatraju da je ovaj način snabdevanja biljke gvožđem veoma važan. Iz tog razloga, u mikrobiološkim laboratorijama izvode se brojna istraživanja sa ciljem izolacije mikroorganizama koji proizvode siderofore (Slika 26).



Slika 26. Sposobnost izolata da produkuje siderofore detektuje se narandžastom zonom na CAS (chrom - azurolo S) podlozi (u ovom slučaju izolati *Pseudomonas* sp. P12 i P1) (foto: autori)

Primena siderofor produkujućih bakterija u vidu različitih biofertilizatora dala je dobre rezultate u uzgajanju mnogih biljnih vrsta. Primena *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus subtilis* dala je pozitivne efekte na parametre prinosa krmnog bilja, a primena *Pseudomonas* soja GRP3 pri uzgajanju mungo pasulja u uslovima slabe snabdevenosti zemljišta gvoždem. Takođe, simptomi nedostatka Fe kod jagoda inokulisanih ovom bakterijom, bili su slabiji u odnosu na jagode koje nisu bile inokulisane. Primena bakterije koja produkuje siderofore, *Pseudomonas chlororaphis*, povećala je klijavost semena kukuruza i biomasu korena biljke.

PGP mikroorganizmi koji produkuju siderofore, štite biljku od patogenih gljiva. Predpostavlja se da je to zato što siderofore produkovane od strane PGP mikroorganizama, imaju daleko veći afinitet prema Fe^{3+} nego patogene gljive. Usled nedostatka gvožđa, patogenim gljivama je onemogućeno da se razmnožavaju i rastu u rizosferi biljke. Tako su bakterije roda *Bacillus*, koje produkuju siderofore, potisnule rast fitopatogenih gljiva *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Bipolaris maydis* i *Cercospora zea-maydis* prilikom uzgoja kukuruza. U *in vitro* uslovima, siderofor-produkujuća bakterija *Azospirillum brasilense*, pokazala je antifungalno dejstvo prema fitopatogenoj gljivi *Colletotrichum acutatum*.

PGPM - POVEĆANJE DOSTUPNOSTI HRANLJIVIH ELEMENATA

Za ishranu biljaka od velike važnosti je dinamika odvijanja procesa mineralizacije i imobilizacije, a koji su pod kontrolom mikroorganizama. U toku ovih procesa PGP mikroorganizmi obezbeđuju biljne asimilative i na taj način direktno pospešuju biljni rast.

PGPM-mineralizacija organske materije

Plodnost je najvažnije svojstvo zemljišta. Prema jednoj definiciji, to je sposobnost zemljišta da zadovolji potrebe biljaka u elementima ishrane, vodi, da obezbedi njihove korenove sisteme dovoljnim količinama vazduha, toplote i povoljnom fizičko-hemijskom sredinom za normalan porast i razvoj. Organska materija, kao deo čvrste faze zemljišta, je jedan od najvažnijih faktora koji utiču na plodnost zemljišta.

Udeo organske materije u površinskom sloju zemljišta zavisi od biljne vrste, karakteristika zemljišta, ekoloških uslova, a varira od 3 do 6 %. Organsku materiju zemljišta čine živi organizmi (biljke, životinje, mikroorganizmi), ostaci uginulih organizama u različitim fazama raspadanja (aktivni deo) i humusne materije (stabilni deo)

organske materije). Živi organizmi čine do 5% organske materije zemljišta. Raznovrsnost biljaka, životinja i mikroorganizama, kao žive komponente organske materije zemljišta, zavisi najviše od fizičkih i hemijskih svojstava zemljišta, klimatskih faktora i agrotehničkih mera. Ostaci uginulih biljaka, životinja i mikroorganizama čine oko 30-50% od ukupne organske materije zemljišta. Organski ostaci u poljoprivrednom zemljištu najvećim delom potiču od biljaka, koji najviše dospevaju u zemljište nakon žetve. Na taj način, sa biljnim ostacima u zemljište dospeva celuloza, lignin, hemiceluloza, proteini, masti, voskovi, prosti šećeri i skrob. Osim biljnih ostataka, u poljoprivrednom zemljištu značajan udeo u organskoj materiji imaju i ostaci mikrobiološkog porekla (0,1 do 3%), koji su po hemijskom sastavu uglavnom proteini, a u manjoj meri lipidi i polisaharidi. Ovaj deo organske materije, tzv. aktivni deo, predstavlja glavni izvor hranljivih elemenata kako za mikroorganizme, tako i za biljku. Pored aktivnog dela, postoji i pasivni, odnosno stabilni deo organske materije, humus. Pod humusom se podrazumeva grupa specifičnih organskih materija koje se stvaraju u procesu humifikacije organskih ostataka. Humusne materije imaju niz značajnih uloga u zemljištu. Osim što utiču na sam proces formiranja zemljišta, značajan je njihov uticaj na održavanje različitih svojstava zemljišta, među kojima je plodnost jedna od najvažnijih.

Transformacija organskih ostataka u zemljištu, odvija se kroz dva procesa: **humifikaciju** i **mineralizaciju**. Humifikacija je složen proces razgradnje organske materije, pri čemu prvo nastaju prosta jedinjenja iz kojih se kasnije, putem kondenzacije i polimerizacije, sintetišu veoma složena organska jedinjenja, poznata pod nazivom humusne materije ili samo humus. Mineralizacija je razlaganje organskih ostataka i humusa do krajnjih produkata, tj. dolazi do oslobađanja ugljenika, azota, sumpora, fosfora i drugih mineralnih elemenata.

Odlučujuću ulogu u procesima humifikacije i mineralizacije organske materije u zemljištu imaju mikroorganizmi. Glavni značaj mikroorganizama u zemljištu ogleda se u neprekidnom kruženju biljnih hraniva, stvaranju humusa, očuvanju stabilne strukture zemljišta, uključeni su i u ciklusima najvažnijih makro i mikro elemenata.

Organska jedinjenja ugljenika u zemljište dospevaju uglavnom s biljnim ostacima, u vidu žetvenih ostataka. Po hemijskom sastavu, organska jedinjenja ugljenika su monosaharidi, polisaharidi (celuloza, hemiceluloza, skrob, pektin), lignin, lipidi, voskovi i smole. Njihova transformacija u zemljištu odvija se različitom brzinom u zavisnosti od hemijskog sastava, mikrobiološke aktivnosti, tipa zemljišta i ekoloških uslova. Biljke ne mogu da usvajaju ugljenik iz organske forme, tako da je uloga mikroorganizama u obezbeđivanju biljke ovim elementom veoma važna. Iako se u prirodi ne nalazi u velikoj količini, svega oko 0,1%, ugljenik (C) spada u najvažnije elemente jer ulazi u sastav celokupnog organskog sveta. U prirodi se javlja u slobodnom i vezanom stanju. U slobodnom stanju je u obliku dijamanta i grafita, a u vezanom je u obliku neorganskih (oksidi i karbonati) i organskih (ugljeni hidrati, proteini, lipidi i dr.) jedinjenja. Mikrobna biomasa C čini oko 1-5% organskog ugljenika u zemljištu. U intenzivnoj proizvodnji, koja podrazumeva primenu plodoređa i plodosmenu, mikrobna biomasa C je oko 1%. Mikrobna biomasa C je u pozitivnoj korelaciji sa prinosom žitarica u organskoj proizvodnji.

Transformacija celuloze zauzima značajno mesto u biološkom kruženju ugljenika u prirodi i neposredno utiče na stvaranje humusa u zemljištu. To je složen i spor proces u prirodi. Mikroorganizmi koji razlažu celulozu nazivaju se jednim imenom celulolitski (ili celulolitički) mikroorganizmi. Razlaganje celuloze vrši se uz pomoć enzima: endoglukanaze, egzoglukanaze (celodekstrinaze i celobiohidrolaze) i β -glukozidaze. Posebno je veliki značaj gljiva (*Trichoderma* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.) i aktinomiceta (*Streptomyces* spp., *Actinomyces* spp.) u razlaganju

celuloze i lignina, dveju osnovnih gradivnih komponenti biljnih tkiva, s obzirom da se time u velikoj meri uslovljava plodnost zemljišta. Gljive proizvode velike količine celuloza direktno u stanište (Slika 27). Sa aspekta biljne proizvodnje najvažnija uloga heterotrofnih mikroorganizama je produkcija ugljenik-dioksida (CO₂) kao biljnog asimilativa i sinteza humusa.



Slika 27. Razlaganje celuloze (foto: autori)

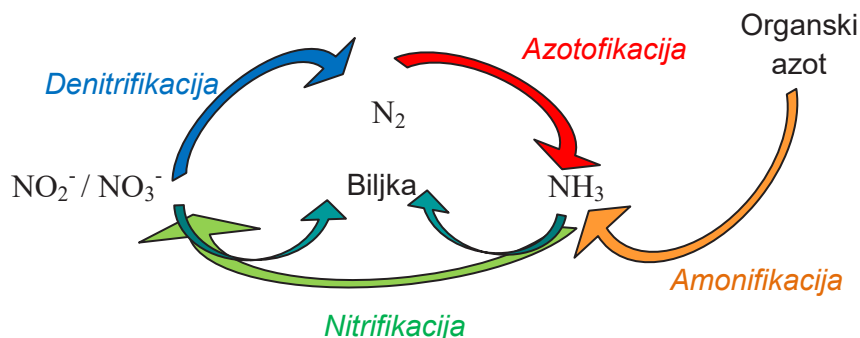
U zemljištu, naročito u poljoprivrednim ekosistemima, bakterije- razlagači celuloze takođe zauzimaju važno mesto, ali su u odnosu na gljive, bakterije znatno slabiji razlagači celuloze. Među značajnije razlagače celuloze ubrajaju se bakterije *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Cellvibrio* spp. i *Cellulomonas* spp.

Za proizvodnju biopreparata sa ciljem da se ubrza mineralizacija organske materije, koriste se najčešće bakterije roda: *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megatherium*, *B. licheniformis*, *B. pulvinus*), *Paenibacillus* (*P. macerans*, *P. polymixa*, *P. amylolyticus*), *Cellvibrio flavescens*. Od gljiva, najviše se koriste saprofitne gljive iz roda *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phenorochoete*, *Flamulina* i dr.

PGPM - snabdevanje biljke azotom

Iako azot čini oko 78% zapremine vazduha, biljke ne mogu da usvajaju ovaj elementarni azot. Da bi bio dostupan biljkama, azot mora biti fiksiran u obliku jedinjenja vodonika ili kiseonika, odnosno u formi nitrata i amonijaka. Prelazak azota iz jednog u drugi oblik odvija se kroz niz reakcija, koje sve zajedno čine biogeochemijski ciklus kruženja azota u prirodi.

Biogeochemijski ciklus azota je od suštinskog značaja za poljoprivrednu proizvodnju, kao i za prirodne ekosisteme. Zbog česte obrade zemljišta, u agroekosistemima ovaj ciklus je poremećen, te nedostatak azota predstavlja ograničavajući faktor u proizvodnji biljaka. Mikroorganizmi koriste organske i neorganske izvore azota i tako obezbeđuju kruženje ovog elementa u prirodi. Mikrobiološka transformacija azota protiče kroz nekoliko faza: **amonifikacija**, **nitrifikacija**, **denitrifikacija** i **azotofiksacija** (Slika 28). Tokom tih faza, N se prevodi u oblik koji biljka može lako da usvoji. Zato je uloga mikroorganizama u ciklusu kruženja N, odnosno u snabdevanju biljaka ovim elementom, presudna.



Slika 28. Mikrobiološka transformacija azota

U poslednjih 20 godina, različiti sojevi azotofiksatornih bakterija se nalaze na tržištu u vidu biofertilizatora, a veoma značajnu primenu našli su u organskom sistemu proizvodnje. Prva primena mikrobiološkog preparata na bazi simbioznih azotofiksatora, bila je 1896.godine u Nemačkoj, i to na leguminoznim biljkama. Kasnije se ova ideja prenela i u druge okolne države, a danas se primena biopreparata na bazi azotofiksatora smatra kao jedna redovna fertilizaciona mera za mnoge leguminoze, i to posebno u organskoj proizvodnji.

Mikroorganizmi koji učestvuju u procesu simbiozne azotofiksacije (**simbiozni azotofiksatori**), bakterije iz rodova *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorizobium* i *Azorhizobium*, (sa zajedničkim imenom *Rizobium*) prodiru u koren ili stablo leguminoznih biljaka, formirajući pritom izraštaje, koji se nazivaju noduli ili kvržice (Slika 29). Rizobijumi su endofitni mikroorganizmi i pojedinih neleguminoznih biljaka.



Slika 29. Kvržice
(foto: J. Marinković)

Poznati su biopreparati koji sadrže *Bradyrhizobium japonicum*, za uzgajanje soje, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, za proizvodnju graška, *Rhizobium meliloti* i *Sinorhizobium meliloti* za proizvodnju lucerke i dr. (Tabela 5).

Tabela 5. PGP mikroorganizmi koji pomažu snabdevanje biljke azotom

PGP mikroorganizam	Odnos sa biljkom	Količina vezanog N godišnje (kg/ha)	Biljka domaćin
--------------------	------------------	-------------------------------------	----------------

<i>Bradirhizobium japonicum</i> <i>B. elkanii</i>	simbioza	180	soja
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	simbioza	50-120	grašak
<i>R. meliloti</i> <i>Sinorhizobium meliloti</i>	simbioza	50-460	lucerka
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifoli</i>	simbioza	45-670	detelina
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaesoli</i>	simbioza	25-120	pasulj
<i>Frankia</i> spp.	simbioza	2-300	Fam. Betulaceae, Rosaceae, Myricaceae, Rhamnaceae i dr.
<i>Azotobacter</i> spp. <i>Aospirillum</i> spp. <i>Dexia</i> spp. <i>Beijerinckia</i> spp.	asocijativna	20-100	kukuruz, šećerna repa, paprika, paradajz i dr.

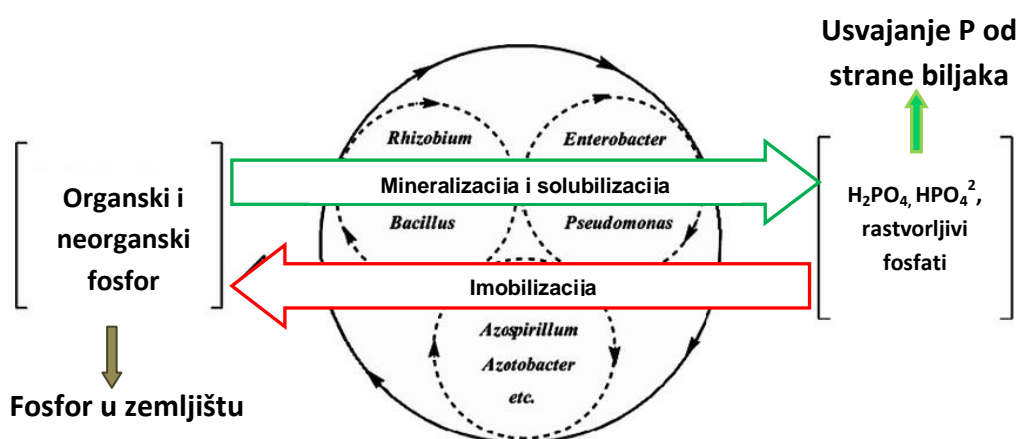
PGP bakterije koje fiksiraju azot u rizosferi neleguminoznih biljaka bez direktnog kontakta sa biljkom jesu **slobodni azotofiksatori**. Slobodni azotofiksatori pripadaju rodovima *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Dexia*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* i *Pseudomonas*, i takođe značajno povećavaju snabdevenost biljaka azotom. Jedan od najviše proučavanih slobodnih azotofiksatora je *Azospirillum* sp., izolovan iz zemljišta siromašnog azotom. Količina fiksiranog azota ovim putem u području umerenog klimata iznosi 20-60 kg, a po nekim rezultatima i do 150 kg/ha. Slobodni azotofiksatori mogu pozitivno uticati na rast mnogih neleguminoznih biljaka kao što je to kod rotkve, pirinča, kukuruza i dr., ali i leguminoznih, npr. crvene deteline. Na taj način biljne kulture se mogu gajiti sa manjom upotrebom hemijskih đubriva, jer je utvrđeno da ovi biopreparati mogu da obezbede i do 50% potreba biljaka za azotom.

Asocijativni azotofiksatori žive u bliskoj zajednici sa biljkom, na površini biljke ili u samom njenom tkivu, ali pri tom ne dolazi do morfoloških promena na telu biljke, kao u slučaju simbiozne azotofiksacije. Danas se proizvode biopreparati na bazi bakterija iz ove grupe, i to najviše iz sledećih rodova: *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* i *Rhizobium*, pri čemu se broj vrsta i rodova bakterija koje se upotrebljavaju u ovu svrhu svakim danom sve više povećava. Asocijativni mikroorganizmi koji kolonizuju unutrašnje biljno tkivo korena, stabla ili lista, su takođe sposobni da fiksiraju azot, i da na taj način pozitivno utiču na rast biljke. Mikroorganizmi pirinča, kukuruza, šećerne trske, kao što su *Azotobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azoarcus* spp., *Enterobacter asburiae* i *Burkholderia* spp. u slučaju nedostatka izvora azota u zemljištu fiksiraju azot iz atmosfere. Biopreparati na bazi ovih bakterija koriste se u proizvodnji suncokreta, mrkve, luka, šećerne repe, paradajza, pšenice i pirinča, jer mogu da obezbede oko 30% azota potrebnog za normalan rast i razvoj ovih biljaka.

PGPM - snabdevanje biljke fosforom

Dinamika fosfora u zemljištu je tesno povezana sa dinamikom biološkog ciklusa u kojem mikroorganizmi imaju centralnu ulogu. Fosfor se u prirodi nalazi u zemljištu, biljkama, životinjama i mikroorganizmima u vidu različitih organskih i neorganskih jedinjenja. Najveće rezerve fosfora nalaze se u zemljištu. I pored velike količine fosfora koji se nalazi u zemljištu (400-1200 mg/kg), samo mali deo nalazi se u obliku koji je biljkama dostupan (0,08-0,25%). Najveći deo fosfora u zemljištu (oko 95-99%) nalazi se u obliku nerastvorljivog neorganskog fosfata (apatit) ili u vidu organskih jedinjenja (inozitol fosfat, fosfomonoestar, fosfotriestar), što biljke ne mogu da usvoje. Zato se unos fosfornih mineralnih đubriva smatra kao jedna obavezna agrotehnička mera sa ciljem da se obezbedi adekvatno snabdevanje biljke ovim elementom. Međutim, nedostatak ovakvog unosa fosfora u zemljište je to što dolazi do apsorpcije većeg dela unesenog fosfora od strane minerala i precipitacije sa jonima Fe i Al u kiselim, i jonima Ca u alkalnim zemljištima. Fosfor postaje nedostupan biljkama. Procenjuje se da oko 80% fosfora, unetog na ovaj način u zemljište, ne bude iskorišteno od strane biljaka. Biljke mogu da usvoje fosfor samo ukoliko se nalazi u vidu jona ortofosforne kiseline ($H_2PO_4^-$ i HPO_4^{2-}). Stoga su transformacije jedinjenja fosfora, a koja su pod uticajem mikroorganizama, od velikog značaja za biljke.

Mikroorganizmi, koji utiču na stepen snabdevenosti biljke fosforom putem **mineralizacije** organskih jedinjenja fosfora, **imobilizacijom** pristupačnog fosfora kao i **rastvaranjem** nerastvorljivih minerala fosfora, označeni su kao **fosfat solubilizujući mikroorganizmi** (Phosphate Solubilizing Microorganisms, PSM) (Slika 30). U ovu grupu mikroorganizama spadaju bakterije roda *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Erwinia*, gljive roda *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, kao i mikorizne gljive. Oni to čine sekrecijom organskih kiselina koje vezuju fosfat svojim hidroksil i karboksil grupama i smanjuju pH vrednost sredine i time utiču na veze u nerastvorljivim formama. Dodatni mehanizmi delovanja su oslobađanje H^+ jona, produkcija helatora i neorganskih kiselina, sekrecija enzima, fosfataza kao i egzopolisaharida.



Slika 30. Uloga mikroorganizama u ciklusu kruženja fosfora u prirodi (prema Mohammadi and Sohrabi, 2012.)

Organska jedinjenja fosfora u zemljištu predstavljaju značajnu rezervu ovog hraniva za biljke, ali tek pošto se mineralizuju. Od organskih jedinjenja fosfora, u zemljištu su najprisutniji inozitol-fosfati (fitati), fitin, nukleoproteini, fosfolipidi, glukozofosfati, adenzin-di-fosfat (ADP) i adenzin-tri-fosfat (ATP). Uloga mikroorganizama u transformaciji ovih jedinjenja je nezamenjiva, a katališu je enzimi fitaza, nukleaza, fosfolipaza i fosfataza. Ustanovljeno je da oko 70% mikroorganizama koji vrše mineralizaciju organskih jedinjenja fosfora poseduju fosfatazu, 20% lecitinazu, 40% fitazu, 40% ribonukleazu i 30% dezoksiribonukleazu. Veliki broj bakterija u zemljištu ima sposobnost da oslobađa ortofosfat iz organskih fosfata: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Aspergillus*, ali i gljive roda *Rhizopus*, *Penicillium*, kao i mikorizne gljive.

Mikroorganizmi mogu transformisati teško rastvorljiva jedinjenja fosfora direktnim ili indirektnim putem. Direktan uticaj na povećanje količine pristupačnog fosfora za biljke imaju mikorizne gljive i pojedine bakterije, kao što je to *Bacillus calcis*, koja direktno iz tercijarnog kalcijum-fosfata koristi kalcijum, nakon čega se oslobađa primarni ili sekundarni fosfat kalcijuma. Indirektna transformacija tercijarnih kalcijum-fosfata odvija se hemijskim putem, produkcijom organskih kiselina. Značajan broj bakterija u rizosferi različitih biljaka ima sposobnost da rastvara teško rastvorljiva jedinjenja fosfora : *Azotobacter chroococcum* u rizosferi pšenice, *Bacillus circulans* i *Cladosporium herbarium* kod pšenice, *Enterobacter agglomerans* kod paradajza.

Brojni pozitivni rezultati primene PSM, kako u svetu, tako i u našoj zemlji, potvrđuju opravdanost upotrebe ovih mikroorganizama za proizvodnju biopreparata. Prva komercijalna proizvodnja biofertilizatora na bazi PSM počela je 50-ih godina prošlog veka, a nastavlja se uspešno i danas. Inokulacija kukuruza bakterijama roda *Bacillus*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas* i *Flavonobacterium*, čije kulture odlikuje aktivnost kisele, neutralne i /ili alkalne fosfomonoesteraze, dovodi do povećanja dužine biljke, mase suve materije, sadržaja ukupnog fosfora u biljci kukuruza, kao i do povećanja ukupnog broja bakterija, biomase ugljenika i fosfora i aktivnosti alkalne fosfataze. Primena PSM je dala veoma dobre rezultate i prilikom uzgajanja čajevca (*Camellia sinensis* L), soje, deteline, pšenice, crnog luka. Primena fosfosolubilizujućih bakterija može da smanji upotrebu mineralnog đubriva i do 50%, a da to ne ugrozi prinos kukuruza.

Efikasnost ove grupe bakterija najizraženija je ukoliko se primeni u koinokulaciji sa mikoriznim i nemikoriznim gljivama, kao i sa bakterijama drugačijih fizioloških karakteristika, poput azotofiksatora.

BAKTERIJE RODA *PSEUDOMONAS* I *BACILLUS*

Kao što je napred navedeno, velika je raznovrsnost PGP mikroorganizama u zemljištu. Bakterije, koje spadaju u ovu grupu, pripadaju sledećim rodovima: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Frankia*, *Burkholderia*, *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Vario-vovax*, *Xanthomonas*, *Phyllobacterium* i drugi.

Između njih, bakterije roda *Pseudomonas* i *Bacillus* su najviše proučavane i našle su najveću primenu u poljoprivrednoj proizvodnji.

Pseudomonas spp. u biljnoj proizvodnji

Bakterije roda *Pseudomonas* su gram negativne, aerobne, štapićaste bakterije i pripadaju razdelu γ – Proteobacteria (Slika 31). Njihova PGP aktivnost dobro je poznata već duži niz godina.



Slika 31. *Pseudomonas* spp. (foto: autori)

Rasprostranjenost ovog roda je velika, jer su mnogobrojne vrste izolovane iz rizosfere različitih biljaka, iz različitog zemljišta širom sveta, a takođe se mogu naći i u barama, otpadnim vodama, pa i u hrani. Najefektivnije vrste ovog roda su fluorescentni pseudomonasi. Ova grupa bakterija direktnim i indirektnim mehanizmima pomaže u održavanju prirodnih svojstava zemljišta, podstiče rast biljaka i pozitivno utiče na prinos poljoprivrednih kultura.

Pojedine vrste ovog roda proizvode metabolite kao što su antibiotici i vodonikcijanid (HCN), neke proizvode siderofore sa velikom afinitetom za apsorpciju Fe^{3+} , a neke biljni hormon auksin (Tabela 6). Svi ovi metaboliti snažno utiču na sredinu, time što inhibiraju rast pojedinih štetnih mikroorganizama, a sa druge strane biljkama povećavaju raspoloživost hranljivih materija. Osim ovih metabolita, pseudomonasi proizvode fitohormon, indol-sirćetnu kiselinu, koja pozitivno utiče na rast i razvoj korena različitih biljaka, povećavajući dužinu korena za 35-50% u odnosu na biljke koje nisu bile inokulisane.

Tabela 6. PGP aktivnost vrsta roda *Pseudomonas*

Vrsta	PGP aktivnost
<i>Pseudomonas</i> sp.	- produkcija indol-sirćetne kiseline, siderofora, egzopolisaharida, HCN, proteaze, želatinaze, lipaze, celulaze, ACC deaminaze, azotofiksacija, solubilizacija fosfata i teških metala.
<i>P. putida</i>	- produkcija indol-sirćetne kiseline, siderofora, egzopolisaharida, HCN, fitaze, fosfat solubilizacija, rezistentnost na Pb i Cd .
<i>P. aeruginosa</i>	- produkcija indol-sirćetne kiseline, siderofora, egzopolisaharida, HCN, ACC deaminaze, fosfat solubilizacija.
<i>P. fluorescens</i>	- produkcija ACC deaminaze, fosfonoacetat

	hidrolaze, fosfat solubilizacija, indukuje sistematsku otpornost, indol-sirćetna kiselina, siderofore.
<i>P. jessenii</i>	- produkcija ACC deaminaze, indol-sirćetne kiseline, siderofora, solubilizacija teških metala, fosfat solubilizacija.

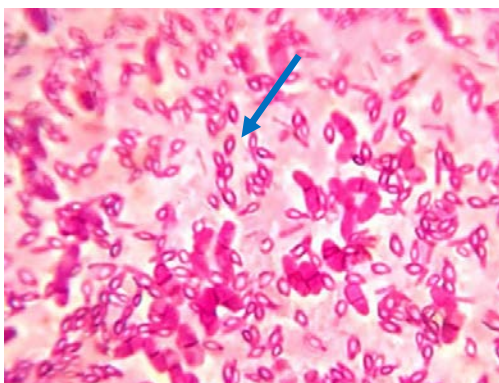
Biljke u uslovima suše ili preterane vlažnosti, proizvode etilen, koji u većoj koncentraciji negativno utiče na samu biljku, i može dovesti do njenog venuća pa i smrti. Bakterije roda *Pseudomonas* mogu da sintetišu ACC deaminazu, koji uklanja prekursor etilena, i na taj način smanjuje njegovu koncentraciju, te pomaže biljci da prevaziđe nepovoljne uslove i izbegne izlaganje prevelikoj količini ovog jedinjenja.

Osim što svojim sekundarnim metabolitima pomažu rast i razvoj biljke, bakterije ovog roda povećavaju dostupnost neophodnih elemenata, prevodeći ih u oblik koji biljka lako usvaja iz zemljišta. Dokazano je da su pojedini sojevi roda *Pseudomonas* sposobni da razlažu teško rastvorljiva fosforna jedinjenja i da na taj način biljku obezbeđuju neophodnim hranivom. Takođe, iako retko, pseudomonasi mogu da fiksiraju elementarni azot, čime obezbeđuju biljku ovim neophodnim elementom.

Do danas je utvrđen pozitivan efekat primene pseudomonasa u proizvodnji šećerne trske i repe, leblebije, kukuruza, pšenice, pirinča, artičoke, različitog krmnog bilja, krompira, luka, paradajza, paprike i drugih ratarskih i povrtarskih kultura.

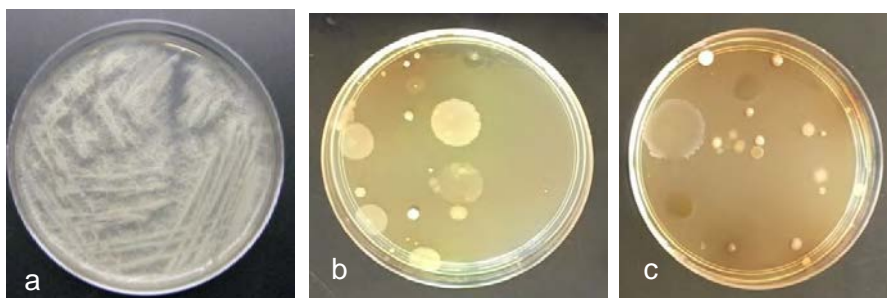
***Bacillus* spp. u biljnoj proizvodnji**

Bakterije roda *Bacillus* su gram pozitivne, štapičaste, aerobne ili fakultativno anaerobne bakterije, koje u nepovoljnim uslovima formiraju endospore (Slika 32 i 33).



Slika 32. *Bacillus* spp. (endospore) (foto: autori)

Bacillus je najrasprostranjeniji rod bakterija u rizosferi, a njegova PGP aktivnost poznata je već godinama. Brojnost bakterija ovog roda varira od 10^6 u hladnijim, do 10^7 i više u gramu zemljišta, u toplijim oblastima. U rizosfernom zemljištu *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis* i *Bacillus firmus*, su najprisutnije vrste ovog roda (Slika 33).



Slika 33. *Bacillus mycoides* (a), *Bacillus subtilis* (b), *Bacillus megaterium* (c)
(foto: autori)

Poznato je da ove bakterije sintetišu veliki broj sekundarnih metabolita kojim utiču na svoju okolinu, povećavajući na taj način pristupačnost hranljivih materija biljkama (Tabela 7). Pojedine vrste ovog roda proizvode biljne hormone, kao što su indol-sirćetna kiselina, citokinini i giberelini. Osim toga bakterije ovog roda proizvode i siderofore, ACC deaminazu, a razlažu i različita organska i neorganska jedinjenja fosfora, kalijuma i cinka, te na taj način povećavaju dostupnost ovih važnih elemenata biljkama.

Bakterije roda *Bacillus* povećavaju prinos i rast različitih biljnih vrsta. Introdokcija bacilusa imala je pozitivne efekte na prinos sirka, kukuruza, pirinča, paradajza, paprike, luka, krastavaca i drugog povrća, malina, pšenice, engleskog ljujla i drugog krmnog bilja, šećerne repe i ječma.

Unošenje *Bacillus* spp. u rizosferu paprike pokazalo se kao dobra alternativa hemijskim đubrivima prilikom uzgajanja ove biljke u staklenicima. Takođe, primena *Bacillus* spp. imala je pozitivan efekat na prinos, rast i ishranu malina u uslovima organske proizvodnje. *Bacillus* spp. izolovan iz rizosfere zelenog čaja (*Camellia sinensis*) ima sposobnost da proizvode IAA i da na taj način stimuliše rast biljke. Do statistički značajnog povećanja rasta paradajza u toku dve vegetacione godine, došlo se unošenjem *Bacillus amyliquesfaciens*. Pri tom je povećana površina listova, broj listova, kao i težina korena i stabla. Primena *Bacillus subtilis* dovela je do značajnog povećanja mase stabla i korena, kao i visine stabla kod belog luka. U jednom ogledu inokulisano je seme kukuruza sa *Bacillus amyliquesfaciens*. Biljke su gajene u uslovima limitiranim količinama fosfora. Inokulisane biljke su imale bolji rast nego neinokulisane. Pojedina istraživanja su utvrdila pozitivan efekat inokulacije *Bacillus licheniformis* na prinos paradajza i paprike.

Tabela 7. PGP aktivnost bakterija roda *Bacillus*

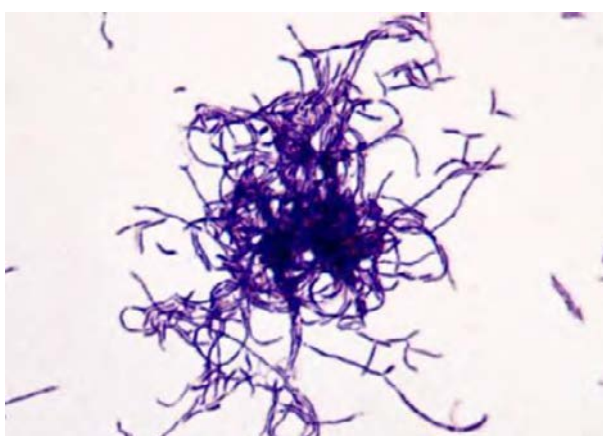
Vrsta	PGP aktivnost
<i>Bacillus sp.</i>	- produkcija indol-sirćetne kiseline, egzopolisaharida, siderofora, HCN, amonijaka, amilaze, urease, želatinaze, lipaze, celuloze, antifungalna aktivnost, rastvaranje fosfata (fosfat-solubilizacija)
<i>B. subtilis</i>	- antifungalna aktivnost, produkcija indol-sirćetne kiseline, fitaze, rastvaranje fosfata
<i>B. licheniformis</i>	- produkcija D – α / glicerofosfataze, auksina, citokinina, giberelina
<i>B. megaterium</i>	- produkcija ACC deaminaze, siderofora, HCN, rastvaranje fosfata

<i>B. mucilaginosus</i>	- produkcija HCN, razgradnja organske materije.
<i>B. pumilus</i>	- rastvaranje fosfata
<i>B. polymyxa</i>	- rastvaranje fosfata

Svi ovi rezultati istraživanja, podupiru ideju da se preparati na bazi bakterija roda *Bacillus*, mogu uspešno koristiti u poljoprivredi, kao adekvatna zamena ili dopuna hemijskim preparatima. To opravdava ideju da se ove bakterije koriste u proizvodnji različitih mikrobioloških preparata.

AKTINOMICETE

Aktinomicete su jedna od glavnih komponenti mikrobiološke zajednice u zemljištu. One pripadaju velikoj i široko rasprostranjenoj grupi gram pozitivnih aerobnih, micelarnih bakterija koje imaju važnu ulogu u kruženju materije (Slika 34).



Slika 34. Aktinomicete (foto: autori)

Prema brojnim naučnicima, aktinomicete su vrlo aktivni razlagači organske materije i to zahvaljujući sposobnosti da produkuju brojne enzime. Mogu da razlažu lignin, pektin, najotpornije materije humusa, stvarajući na taj način neophodne asimilative za biljku.

Aktinomicete produkuju antibiotike, fitohormone (auksine, gibereline i citokinine), siderofore i vitamine, koji deluju povoljno na rast različitih biljaka. Osim toga, koriste prekursor etilena kao izvor azota i ugljenika, odnosno produkuju ACC deaminazu, te na taj način smanjuju njegovu koncentraciju (Tabela 8). Osobina koja ih još čini dobrim kandidatima za proizvodnju biopreparata jeste njihova sposobnost da uspešno kolonizuju koren biljke.

Primenom bakterija roda *Streptomyces* u biljnoj proizvodnji pospešuje se klijanje i početni rast biljaka (Slika 35). Vrste *Streptomyces olivaceoviridis*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces rochei* i *Streptomyces* spp. koje produkuju IAA, poboljšavaju klijanje semena, rast mlade biljke i bolje ukorenjavanje paradajza.



Slika 35. Bolja klijavost semena Engleskog ljlja inokulisanog izolatom *Streptomyces* sp. A1 u odnosu na kontrolu (foto: autori)

U proizvodnji drvenastih sadnica koriste se vrste roda *Frankia*. To je simbiozna azotofiksirajuća aktinomiceta, koja na korenu ovih biljaka formira nodule i pomaže biljci da se snabde dovoljnim količinama azota. Njena primena je naročito značajna u zemljištima gde nema dovoljno autohtonih aktinomiceta. Ovi biopreparati sadrže spore ili delove micelijuma ove bakterije. Neke vrste ovog roda proizvode enzime celulaze, pektinaze i proteaze, i na taj način aktivno učestvuju u ciklusima kruženja elemenata i značajno doprinose snabdevanju biljaka neophodnim nutrijentima.

Do sada je, primena aktinomiceta dala dobre rezultate u uzgajanju graška, paprike i drugog povrća, leblebije, pšenice, soje, krmnog bilja, vinove loze i dr.

Tabela 8. PGP aktivnost različitih vrsta aktinomiceta

Vrsta	PGP aktivnost
<i>Streptomyces viridificans</i> , <i>S. coelicolor</i> , <i>S. griseus</i> , <i>S. albobinaceus</i> , <i>S. caviscabies</i> , <i>S. setonii</i> , <i>S. virginiae</i>	- produkcija hitinaze
<i>Thermonospora</i> spp. <i>Actinoplanes philippinensis</i> , <i>Streptomyces clavuligerus</i>	- produkcija celulaze
<i>Nocardia</i> spp.	- produkcija peptidaze i proteaze
<i>Microbiospora</i> spp.	- produkcija ksilanaze
<i>Nocardia autotrophica</i>	- produkcija lignaze
<i>Thermomonospora curvata</i>	- produkcija amilaze
<i>Streptomyces</i> spp.	- produkcija indol-sirćetne kiseline, siderofora, HCN, lipaze, ureaze, želatinaze, proteaze, lipaze, celulaze, siderofora i β -1-3-glukanaze
<i>Streptomyces olivaceoviridis</i> , <i>S. rimosus</i> , <i>S. rochei</i> , <i>S. griseoviridis</i> , <i>S.</i> <i>lydicus</i> , <i>S. viridis</i> , <i>S. oelicolor</i> , <i>S. olivaceus</i> , <i>S. geysiriensis</i>	- produkcija indol-sirćetne kiseline
<i>Streptomyces fulvorobeus</i> ,	- produkcija fenazina

<i>S. luridiscabiei</i> , <i>S. fimicarius</i> , <i>S. griseus</i> , <i>S. mediolani</i> , <i>Micromonospora matsumotoense</i>	
<i>Streptomyces</i> , <i>Actinopolyspora</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Micromonospora</i>	-produkcija siderofore tipa kateholati.
<i>Streptomyces cavurensis.</i> , <i>Saccharopolyspora spp.</i> , <i>Nocardiopsis</i> <i>spp.</i> , <i>Nocardia spp.</i>	-produkcija anti-fungalnih metabolita
<i>Frankia spp.</i>	-azotofiksacija
<i>Micromonospora endolithica</i>	-rastvaranje fosfata
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	-produkcija biljnih hormona

Aktinomicete imaju značajnu ulogu i u procesu mineralizacije organske materije. Pripadaju grupi celulolitskih mikroorganizama, što znači da razlažu celulozu, te se mogu primenjivati sa ciljem ubrzavanja procesa razlaganja organske materije. U mikrobiološkim laboratorijama se vrše različita biohemijska ispitivanja sa ciljem detekcije i izolacije aktinomiceta koje proizvode enzim celulazu (Slika36).

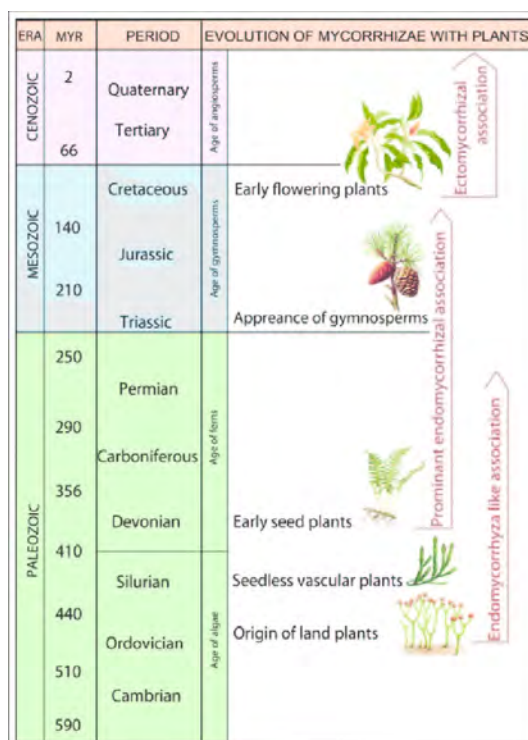


Slika 36. Dokazivanje sposobnosti produkcije celulaze detektuje se obezbojenom zonom oko kolonije *Streptomyces* spp. na CMC agaru (karboksi metil celulozni agar) (foto: autori)

7. MIKORIZA -SIMBIOZA IZMEĐU BILJAKA I GLJIVA

Najjednostavnija definicija ili opis mikorize je korisna zajednica odnosno simbioza koja se uspostavlja između biljaka i gljiva. Pojam "mikoriza", koji u bukvalnom prevodu znači "gljiva koren", uvodi Albert Bernhard Frank davne 1885. godine. U svom radu prvi put opisuje značajnu mutualističku zajednicu, između korena drveća i gljiva.

Ova asocijacija se pojavila zajedno sa kolonizacijom Zemlje kopnenim biljkama (Slika 37). O tome svedoče brojni fosilni ostaci mikoriznih gljiva pronađeni u Vinskonsinu, SAD, procenjene starosti oko 460 miliona godina (Ordovician period).



Slika 37. Evolutivni razvoj mikorize (prema Barman et al., 2016)

Da li se ova zajednica razvila kao mutualistička ili iz parazitskog odnosa, još nije poznato. Vremenom je biljka odnosno unutrašnjost ćelija endodermisa i egzodermisa postala stanište za ove gljive. Nastaju ćelije korteksa korena u kojoj se nalaze gljive. To dovodi do stvaranja arbuskula, koje su tipične strukture za mikorizne gljive. Vremenom ove gljive postaju sve zavisnije od svojih domaćina i razvija se obligatni životni ciklus. No, i biljka ima koristi od ove interakcije. Hife gljiva povećavaju ukupnu površinu korena, što je pre svega važno za usvajanje hranljivih materija i vode iz zemljišta.

Postoji šest tipova mikorize iako većina terestričnih biljaka formira **endomikoriznu** simbiotsku zajednicu sa gljivama. Drugi najzastupljeniji tip je **ektomikoriza**. Biljke koje formiraju ovaj tip mikorize su drvenaste biljke, a gljive sa kojima žive u simbiozi spadaju u askomikote i bazidiomikote koje formiraju makroskopska plodonosna tela i mogu se izolovati i gajiti odvojeno od biljke domaćina. U ostale tipove mikorize spadaju **ektoendomikoriza**, **erikoidna**, **arbutoidna** i **orhidna** mikoriza.

ENDOMIKORIZA

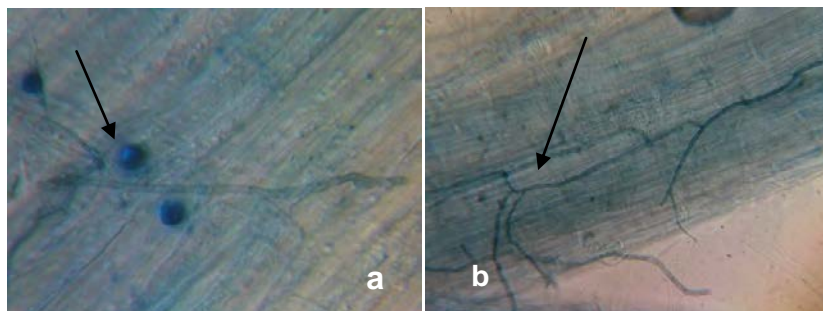
Taksonomija mikoriznih gljiva

Mikorizne gljive su na osnovu analize DNA sekvence svrstane u poseban razdeo (phylum) gljiva, Glomeromycota. Noviju klasifikaciju su predložili Redecker et al. (2013), koji su vršili analizu ribozomalnih RNA gena: 18S (SSU), ITS1-5.8S-ITS2 (ITS), i/ ili 28S (LSU). Na osnovu ove klasifikacije, mikorizne gljive su svrstane u 4 reda, 11 familija i 25 rodova. Na osnovu (http://www.amf-phylogeny.com/amphylo_species, septembar 2018) opisano je 315 vrsta mikoriznih gljiva. Mikorizne gljive su svrstane u phylum Glomeromycota, grupisane u 4 reda i 12 familija.

Najznačajnije vrste mikoriznih vrsta spadaju u rodove *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora* i *Gigaspora*.

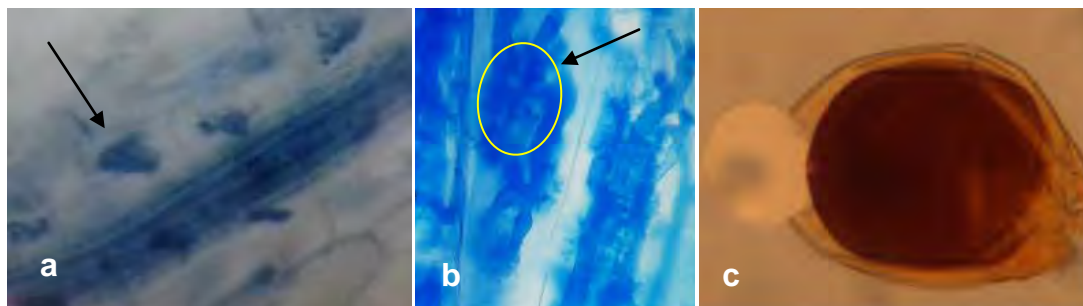
Morfologija i razvoj

Sve mikorizne gljive imaju određene vegetativne karakteristike: vezikule, arbuskule, intra i ekstraćelijske hife, spore (Slika 38 i 39).



Slika 38. Vezikule (a) i intraćelijske hife (b) - *Glomus* spp.
(foto: autori)

Formiranje vezikula je uslovljeno vrstom gljive ali je i pod uticajem delovanja abiotičkih faktora. Mogu se formirati u velikom broju, ali postoje i slučajevi kada se one ne formiraju. Najčešće su izduženog, elipsoidnog oblika, i služe za skladištenje rezervne materije.

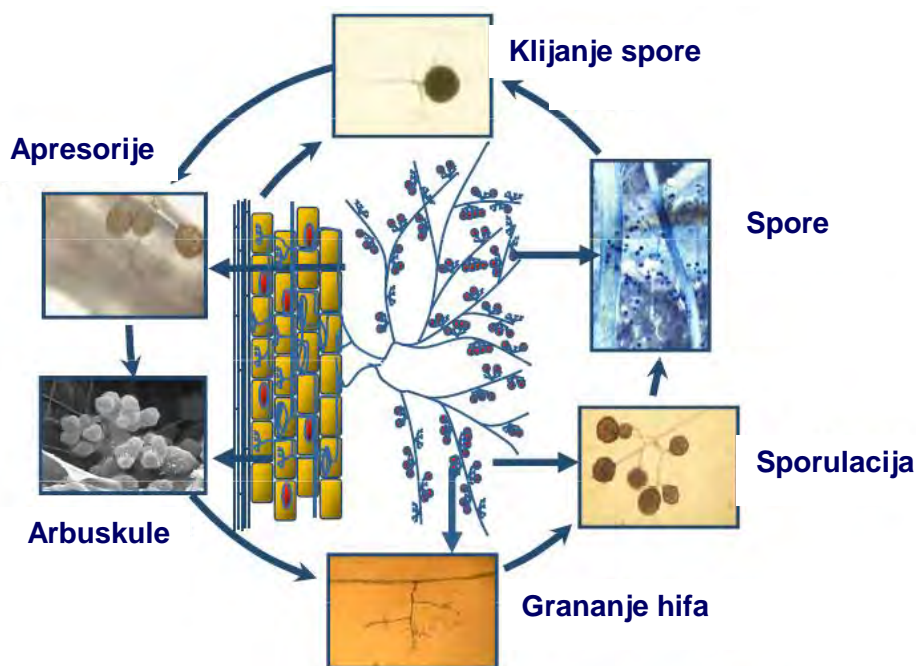


Slika 39. Arbuskule (a i b) - (foto: autori) i spora (c) - (prema Berutti et al., 2014)

Arbuskule su granate strukture, značajno povećavaju površinu gljive odnosno kontaktnu površinu između biljke i gljive. Na taj način se obezbeđuje brz i efikasan transfer nutrijenata kao što su fosfor i cink iz zemljišta u biljku.

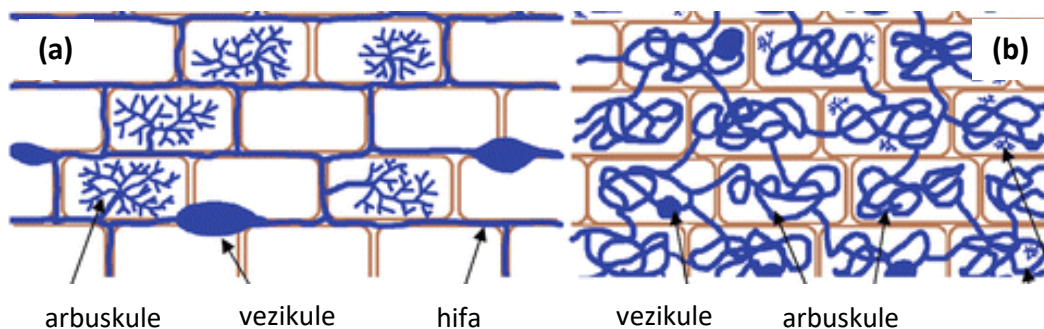
Intraćelijske hife uglavnom rastu paralelno sa korenom biljke, debljina im varira između 1,5 go 4 μm . Povezuju se i formiraju mrežu hifa sa različitim uglovima grananja.

Spore mikoriznih gljiva su krupne. Mogu se formirati pojedinačno ili u agregatima na specijalizovanim sporonosnim hifama, najčešće terminalno pozicionirane. Ponekad se mogu formirati u korenu i tada najverovatnije imaju ulogu vezikula. Mogu dostići veličinu do 500 μm u prečniku, sa značajnim rezervama lipida, ugljenih hidrata i izuzetno rigidnim i debelim omotačem koji sadrži hitin i u nekim slučajevima i β (1–3) glukan. Spore sadrže veliki broj jedara, tako da je i veličina genoma različita i može varirati od 16.54 Mb (*Glomus intraradices*) do 1058.4 Mb (*Scutellospora pellucida*).



Slika 40. Šematski prikaz živornog ciklusa endomikorizne gljive (prema Porcel et al., 2012)

Klijanjem spore nastaje hifa (Slika 40). Razvoj hife je praćen deobom jedara i potrošnjom rezervne materije koja se nalazi u spori. Dolazi do grananja i formiranja mreže hifa putem anastomoze. Ukoliko nije prisutna biljka-domaćin, može doći do prestanka rasta hifa, verovatno zbog odsustva signalnih molekula koje proizvodi biljka. Međutim, ukoliko je domaćin prisutan, dolazi do simbioze, i hifa nastavlja da raste unutar korena i zemljišta, što opet dovodi do formiranja spora. Hife unutar mikoriznih korenova mogu biti različite morfologije, neke se više granaju i formiraju arbuskule (Arum-tip) ili se uvijaju (Paris-tip) (Slika 41). Morfologija hifa pre svega zavisi od same gljive, ali i od biljke domaćina. I pored ove genetske specifičnosti, može doći do odudaranja od uobičajene morfologije kod određene biljke odnosno mikorizne gljive.



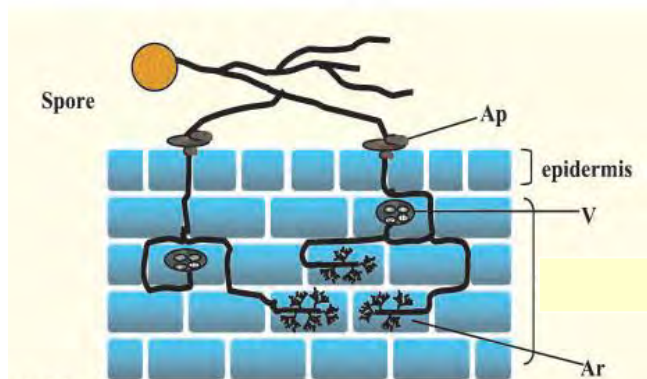
Slika 41. Formiranje arbuskula: Arum tip (a); Paris tip (b)
(prema Deguchi et al., 2017)

Kolonizacija korena mikoriznom gljivom

Kolonizacija korena biljke mikoriznom gljivom i formiranje efektivne simbiozne zajednice je kompleksan proces koji se sastoji iz nekoliko etapa i uslovljen je brojnim faktorima biotičke i abiotičke prirode.

Uspostavljanje simbiotske zajednice započinje sa fazom pre-kolonizacije odnosno prepoznavanja. Kolonizacija korena se može izvršiti sa hifom koja je nastala klijanjem spore, sporokarpa ili od delova inficiranog korena. Prepoznavanje se vrši putem sekrecije signalnih molekula iz grupe flavonoida i strigolaktona.

Hifa raste prema korenu sve dok ne uspostavi direktan kontakt. Nakon 2-3 dana na korenu se formiraju apresorije (male otekline ili druge morfološke promene na epidermisu korena) koje ukazuju da je došlo do prepoznavanja domaćina od strane gljive (Slika 42). Dolazi do penetracije odnosno prodiranja kroz epidermis i egzodermalne ćelije, hifa raste, grana se i prolazi kroz srednji i unutrašnji korteks korena. Ove granate strukture hifa se nazivaju infektivne niti iz kojih će se razviti arbuskule. Faza traje oko dva dana, a njihova uloga je u razmeni i transportu nutrijenata između simbionata. Sa starenjem infektivnih jedinica, počinje proces formiranja vezikula. Formiranje vezikula je uslovljeno gljivom, ali i uslovima spoljašnje sredine, pre svega od sadržaja fosfora u zemljištu. Mikorizne gljive iz rodova *Scutellospora* i *Gigaspora* nikad ne formiraju vezikule. Na ovaj način se formira značajna fungalna biomasa u korenu biljke i može iznositi između 4 i 17% od ukupne suve mase korena. Ove procene su rađene na osnovu sadržaja hitina ili zapremine gljive u korenu.

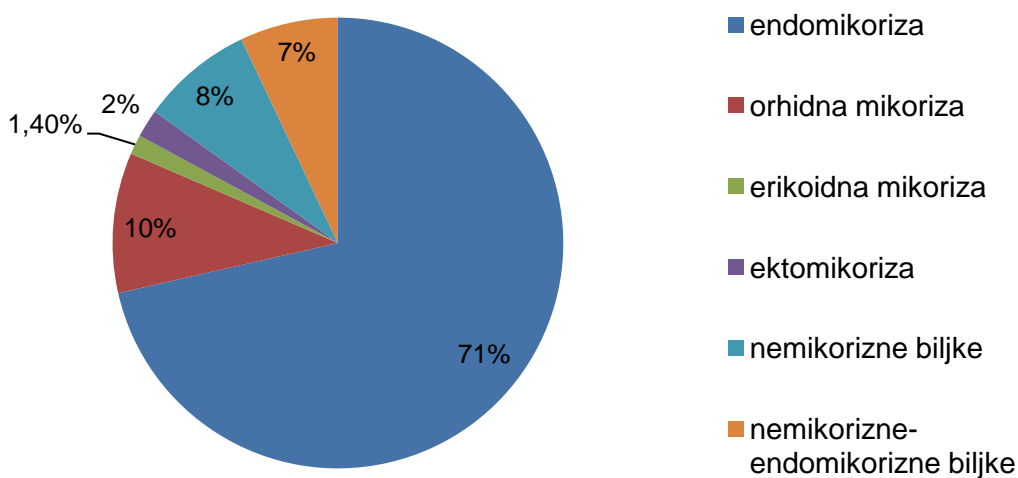


Slika 42. Kolonizacija korena biljke mikoriznom gljivom: Ap-apresorije; V-vezikule; Ar-arbuskule (prema Gadkar et al. 2001)

Hife van korena takođe nastavljaju sa rastom, zahvataju sve veću zapreminu zemljišta oko korena. Ovaj proces je pre svega iniciran zbog sve veće potrebe gljive za organskim ugljenikom. Eksternalne micelije su važne i za proces formiranja spora, jer se preko njih vrši translokacija svih rezervnih materija kao što su ugljeni hidrati i lipidi. Sporulacija je takođe uslovljena brojnim faktorima od kojih bi izdvojili samu biljku, intenzitet radijacije, defolijaciju i primenu đubriva, pre svega fosfornih. Na primer, smanjena radijacija značajno smanjuje intenzitet fotosinteze odnosno produkciju organske materije, pa je i sporulacija usporena zbog manje količine hranljivih materija koje se prenese do spora u zemljištu. Povećana količina fosfornih đubriva, takođe smanjuje kolonizaciju korena mikoriznom gljivom, kao i broj spora koja se formira po biljci.

Biljke koje formiraju endomikoriznu zajednicu

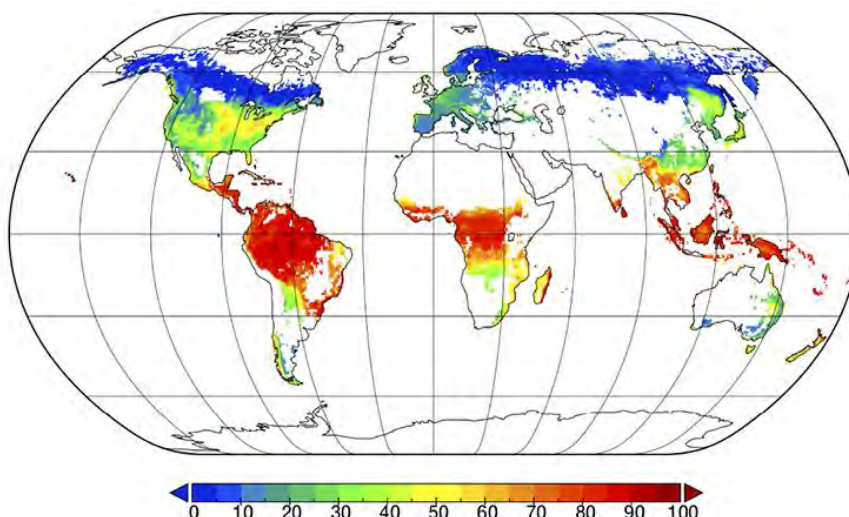
Broj biljnih vrsta koje formiraju mikoriznu zajednicu je izuzetno velik. Procenjuje se da oko 80% kopnenih biljaka živi u asocijaciji sa nekom mikoriznom gljivom (Slika 43). Trappe (1987) je na osnovu brojne literature napravio prvu sveobuhvatnu analizu biljnih vrsta koje stupaju odnosno ne stupaju u mikoriznu asocijaciju. Od 5020 ispitanih dikotiledonih vrsta, 50% su formirale mikorizu, a 17% nije uspostavio ni jedan tip mikorizne infekcije. Među monokotiledonim biljkama od ukupno 1487 ispitanih biljnih vrsta 49% je formiralo mikoriznu zajednicu, dok je 21% svrstano u ne-mikorizne biljke. Od tada pa do danas, spisak biljnih vrsta raste.



Slika 43. Procentualna zastupljenost biljaka koje formiraju različite tipove mikorize

Može se zaključiti da je endomikoriza zastupljena u visokom procentu u ekosistemima sa bogatim diverzitetom biljaka, pre svega Angiospermae. Isto tako i većina Gymnospermae, zimzelene drvenaste biljne vrste, spadaju u ovu grupu mikoriznih vrsta, osim vrste iz familije *Pinaceae*.

Endomikorizna simbiotska zajednica dominira u toplijim krajevima gde je brža razgradnja organske materije i gde biljke rastu u uslovima limitirane ishrane fosforom (Slika 44).



Slika 44. Procenat biljne biomase koja formira endomikoriznu zajednicu (preuzeto: <https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/forest-microbiome-mapping>)

Upravo iz razloga što je mikoriza sveprisutna u prirodi, navodi na zaključak da i većina poljoprivrednih kultura spada u ovu grupu. U tabeli 9, je prikazan spisak poljoprivrednih kultura od značaja za naš klimatski pojas, ali i one koje su značajne na globalnom nivou.

Tabela 9. Spisak najznačajnijih biljnih vrsta koje formiraju endomikoriznu zajednicu

Žitarice	- pšenica, ječam, proso, kukuruz, pirinač, sve trave, engleski ljulj, šećerna trska
Leguminoze	- lucerka, detelina, pasulj, grašak, soja, sočivo, kikiriki, bob
Povrće	- šargarepa, celer, lukovi, krompir, krastavac, patlidžan, paprika, paradajz, bundeva, tikvica
Voće	- kupina, malina, jagoda, jabuka, višnja, kajsija, trešnja, breskva, kruška, šljiva, smokva, orah, maslina, citrusi, badem, avokado, banana, kokos, kafa
Cveće	- ruža, ljubičica, neven, hrizantema, kamelija, geranijum, forzicija, magnolija
Uljane kulture, industrijske biljke	- suncokret, lan, pamuk, konoplja, hmelj, duvan, slatki krompir

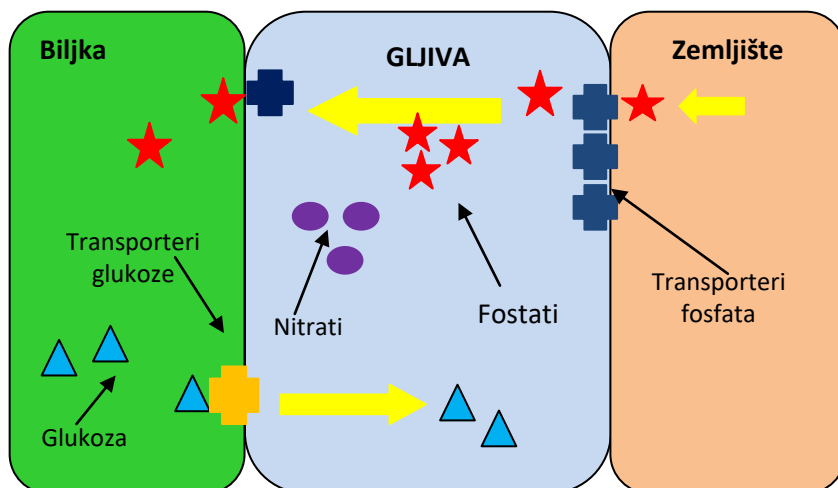
Spisak biljaka koje ne formiraju mikoriznu zajednicu je mnogo manji. Biljke iz familija *Chenopodiaceae*, zatim kupusnjače iz familije *Brassicaceae* (kupus, brokoli, karfiol, kelj), karanfil iz familije *Caryophyllaceae*, biljke iz familija *Polygonaceae*, *Juncaceae* i *Proteaceae* su ne-mikorizne biljke.

Uticaj endomikorize na biljku

Endomikorizne gljive imaju višestruko pozitivan uticaj na biljke sa kojom žive u simbiozi, a da bi se taj uticaj i što više ispoljio potrebno je da i određeni uslovi budu zadovoljeni. Pre svega, sprovođenje agrotehničkih mera sa minimalnom obradom

zemljišta, smanjena upotreba mineralnih đubriva, primena plodoređa i racionalna upotreba pesticida.

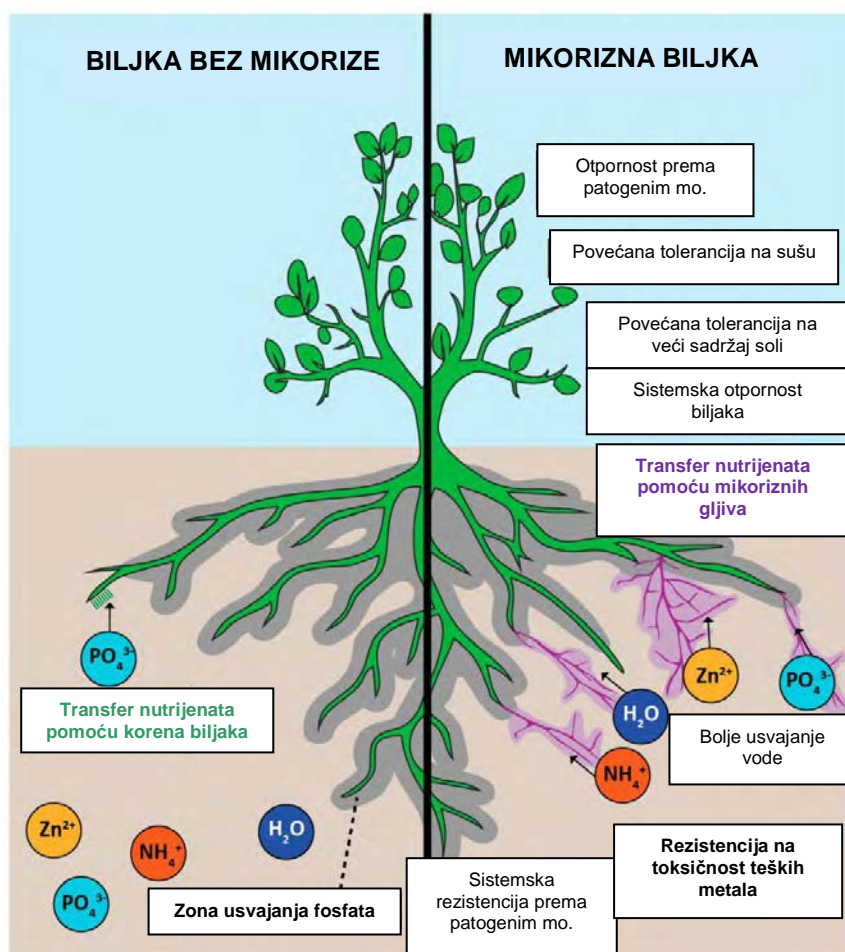
Mikorizne gljive značajno poboljšavaju snabdevanje biljke fosforom iz zemljišta, koji je relativno nepristupačan za biljke. Na ovaj način biljka može da obezbedi i do 90% potreba za fosforom. Za transport fosfora, ali i drugih nutrijenata su važni molekuli transporteri preko kojih se vrši usvajanje iz zemljišta i dalja translokacija do biljnih ćelija (Slika 45).



Slika 45. Transport nutrijenata uz pomoć endomikorize

To je moguće zbog toga što se vanćelijske hife gljive šire oko korena biljke prožimajući veću zapreminu zemljišta iz koje usvajaju fosfor. Isto tako, u zemljištima sa manje pristupačnog fosfora, dešava se i transfer nutrijenata biljka- biljka pomoću hifa mikorizne gljive.

Mikorizne gljive štite biljku i od stresa koji nastaje usled deficita vode. Ta zaštita se ostvaruje putem brojnih mehanizama, a u najznačajnije spadaju: povećano usvajanje vode hifama, promena hormonskog statusa biljke, promena provodljivosti stoma, povećan turgor smanjuje osmotski potencijal listova, poboljšana ishrana biljaka i brži oporavak biljke nakon suše zbog konstantne veze između zemljišta i korena (Slika 46).



Slika 46. Pozitivni efekti endomikorizne kolonizacije (prema Jacott et al., 2017)

Mikorizne biljke se bolje oporavljaju od stresa koji je izazvan povećanim sadržajem soli, naročito u zemljištima sa niskom koncentracijom fosfora. Gljive utiču na promenu fiziologije biljaka, povećano je usvajanje vode i nutrijenata u biljku. Važan mehanizam odbrane je i smanjeno usvajanje jona natrijuma i hlora, kao i sprečen transfer jona u nadzemni deo biljke.

Gljive mogu da promene i koncentraciju metala u biljci tako što vrše imobilizaciju metala u ćelijskom zidu intra i ekstraćelijskih hifa, zatim heliranjem metala produkcijom organskih molekula kao što je glomalin ili vrše kompartmentaciju unutar ćelije gljive. Na taj način, mikorizne gljive smanjuju koncentraciju metala u zemljištu oko korena i stvaraju bolje uslove za rast biljaka.

Značajno se može povećati pristupačnost mikroelemenata kao što su bakar i cink, kao i elemenata u tragovima (bor i molibden). Mikorizne gljive mogu da usvajaju i pojedine organske oblike azota, koje biljke ne mogu usvojiti.

Povećavaju otpornost biljke prema fitopatogenim organizmima, pre svega produkcijom fenolnih jedinjenja koje se vezuju za ćelijski zid i na taj način postaju teže razgradive putem enzima koje proizvode npr. patogene gljive.

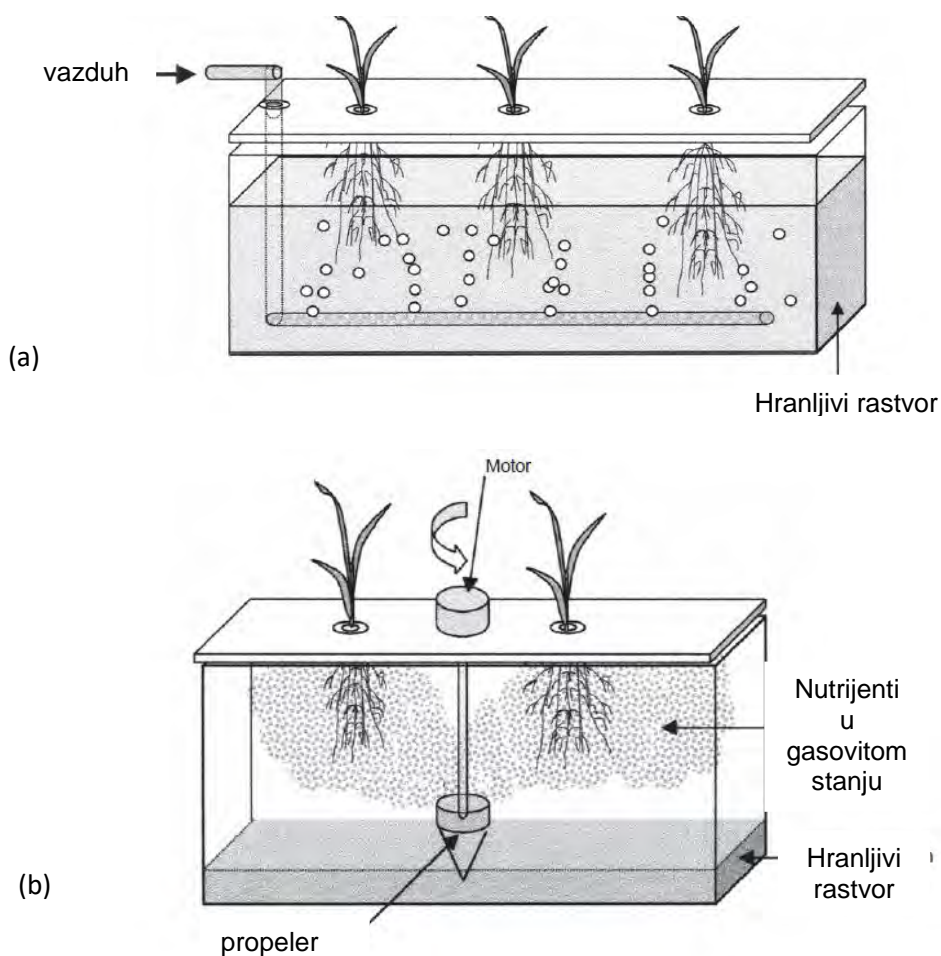
Endomikoriza u poljoprivredi

Obzirom da većina poljoprivrednih kultura spada u mikorizne biljke i da su dokazani pozitivni efekti gljive na biljku, primena inokuluma koji sadrže mikorizne gljive mogu biti od velike koristi. Međutim, proizvodnja biopreparata sa mikoriznom gljivom nije lagan niti jednostavan proces. Važan je i pravilan odabir mikorizne gljive za svaku biljku, jer iako gljiva može imati brojne koristi, nije sigurno da će se ona i ostvariti.

Proizvodnja inokuluma sa mikoriznom gljivom je uglavnom usmerena na upotrebu u hortikulturi, povrtarstvu, prekrivanju travnatih površina (golf-tereni), bioremedijaciji zemljišta, i u istraživanju.

Najveći proizvođači mikoriznih biopreparata se u Evropi nalaze u Nemačkoj, Italiji, Španiji, Velikoj Britaniji, Francuskoj, Češkoj, Austriji, Belgiji, Estoniji i Švajcarskoj.

Komercijalna proizvodnja inokuluma na bazi mikorizne gljive koja je namenjena za upotrebu u poljoprivredi u poljskim uslovima bazira se na proizvodnji u supstratu (u posudama sa supstratom - zemljište i pesak 1:1), bez supstrata (hidroponik i aeroponik kutije) i u *in-vitro* sistemu (Slika 47). Sva tri načina proizvodnje su rasprostranjena, naročito u Evropi i Aziji. Proizvodnja u supstratu podrazumeva velika ulaganja kako manuelnog rada tako i proizvodnju posuda, sadnog materijala, koji su praćeni visokim troškovima održavanja i transporta. Bez obzira na sve ovo navedeno, ovaj način proizvodnje je i dalje najzastupljeniji. Međutim, sve više pažnje se posvećuje i *in-vitro* sistemu proizvodnje inokuluma, u strogo kontrolisanim uslovima, gde je izuzetno smanjena mogućnost kontaminacije.

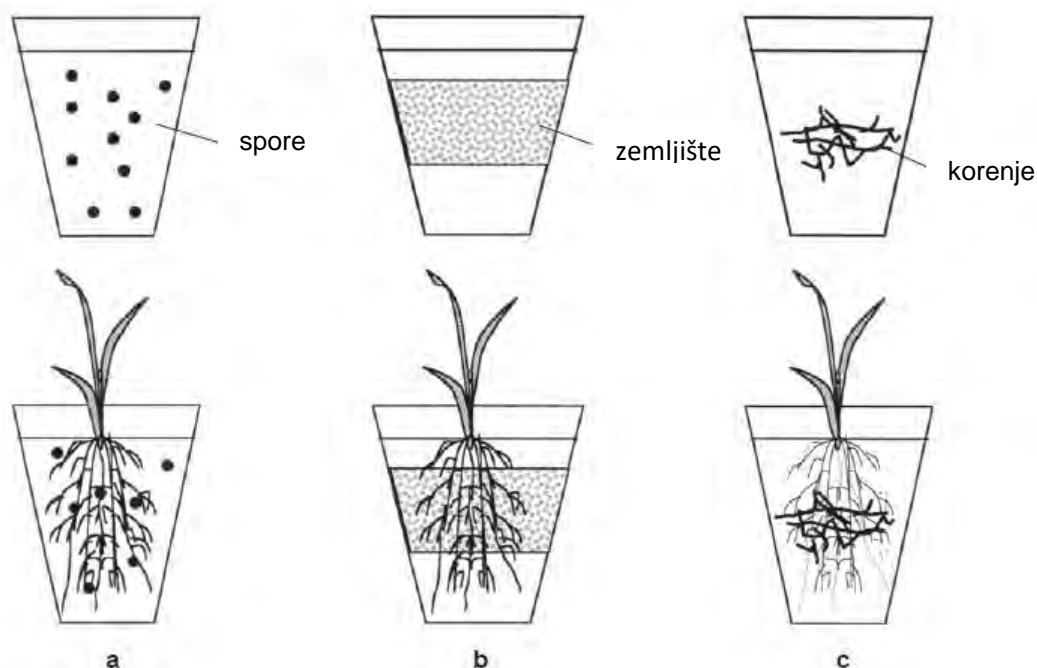


Slika 47. (a) Hidroponski i (b) aeroponski sistem proizvodnje VAM inokuluma (prema Habte i Osorio, 2001)

Proizvodnja inokuluma

Proizvodnja inokuluma sa mikoriznom gljivom se može se vršiti na nekoliko načina, sa ciljem dobijanja starter kulture (Slika 48). Za tu svrhu se mogu koristiti:

- ✓ spore mikorizne gljive (a),
- ✓ zemljište (b) i
- ✓ koren biljaka zaražen mikoriznom gljivom (c).



Slika 48. Dobijanje starter kulture mikorizne gljive (prema Habte i Osorio, 2001)

Proizvodnja starter kulture sa sporama je dugotrajniji proces, pa se najčešće koristi u eksperimentalne svrhe. U praksi se mnogo više koriste metode gde se u zemljište koje sadrži spore i miceliju gljive sadi biljka domaćin. Treći način je metoda gde se koristi koren biljaka sa mikoriznom gljivom. Najbitniji koraci koji se primenjuju u proizvodnom procesu, mogu se predstaviti na sledeći način:

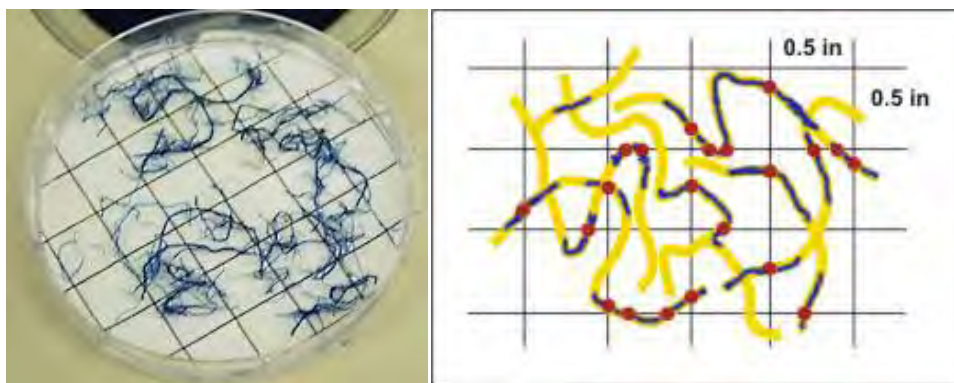
1. Uzorkovanje zemljišta/biljnog materijala

Uzorcima zemljišta se uzimaju u polju iz rizosfere biljaka koji su u fazi cvetanja ili biljaka starosti 2 do 3 godine (drvenaste kulture), sa dubine 10-15 cm. Iz ovog zemljišta se mogu izolovati spore mikoriznih gljiva ili se u zemljište direktno može izvršiti sejanje ili sadnja biljaka. Postoji nekoliko metoda izolacije spora mikoriznih gljiva iz zemljišta, ali se u praksi najviše primenjuje tzv. metoda vlažnog prosejavanja i dekantovanja (wet sieving and decanting method). Dobijene spore se razvrstavaju po veličini i morfologiji. Vršiti se identifikacija (ovaj korak može da izostane ukoliko se inokulum pravi sa poznatom vrstom mikorizne gljive). Izvršiti se sterilizacija površine spora i pripremi se za dalji postupak dobijanja starter inokuluma. Spore se dodaju u sterilan supstrat (zemljište+pesak, 1:1), dobro se pomeša i doda seme ili rasad biljke domaćina. Tako pripremljene posude se drže u staklenicima nekoliko nedelja u zavisnosti od vrste biljke domaćina, dok se ne razviju mlade biljke. Najčešće korišćene biljke domaćini u umerenom klimatskom pojasu su jagoda (*Fragaria* sp.), kukuruz (*Zea mays*), lukovi

(*Allium* spp.), i kikiriki (*Arachis hypogaea*). Korišćenjem zemljišta, pa i inficiranog korena biljaka, ubrzava se proces proizvodnje starter kulture, jer izostaje korak izolacije spora.

2. Priprema starter inokuluma

Mlade biljke se izvade nežno iz posuda zajedno sa korenom. Izvrši se provera stepena kolonizacije korena mikoriznom gljivom. Ta provera podrazumeva bojenje reprezentativnih uzoraka korena, i mikroskopsku proveru prisustva vezikula, arbuskula, intra i ekstraćelijskih hifa (Slika 49). Osim toga se traže i spore. Vezikule, arbuskule, intra i ekstraćelijske hife i spore se zajedničkim imenom nazivaju **infektivne propagule**. Ukoliko se utvrdi prisustvo svih navedenih propagula, koren tih biljaka se usitnjava i služi kao starter inokulum ili starter kultura. Dobra starter kultura mora da sadrži 500 infektivnih propagula mikorizne gljive po kilogramu supstrata. Starter kultura ne sme da sadrži patogene i parazitske organizme. Mogu se napraviti i starter kulture koje sadrže samo spore mikoriznih gljiva.



Slika 49. Određivanje procenta kolonizacije korena mikoriznom gljivom (prema Giovanetti i Mosse, 1980)

Mala količina starter kulture se meša u sterilan substrat, nakon toga se zaseje seme ili rasad biljke domaćina. Ovako pripremljene posude veće zapremine se ostave 3 do 4 meseca u polukontrolisanim uslovima.

3. Dobijanje inokuluma mikorizne gljive

Nakon nekoliko meseci se opet odstranjuju biljke sa korenom i vrši dalja priprema i pravljenje konačne formulacije preparata sa gljivom. Preparati najčešće sadrže pogodan nosač (može biti i supstrat) i deo fino usitnjenog biljnog materijala, kao i infektivne propagule mikorizne gljive. Inokulum se suši da sadrži 5% vlage ili manje.

4. Primena inokuluma

Količina inokuluma koja će se primeniti direktno u zemljište zavisi od kvaliteta inokuluma. Ako jedan gram inokuluma sadrži 4-8 infektivnih propagula, primena 50g/kg zemljišta uglavnom može dovesti do brze kolonizacije korena ciljanih biljaka. Inokulumi koji su dobijeni korišćenjem zaraženog korena su efektivniji, pa se i sa manjom količinom inokuluma mogu postići dobri rezultati. Tada se primenjuje količina od 0,5-1g/kg zemljišta.

EKTOMIKORIZA

Ektomikoriza je drugi najučestaliji tip mikorize. Pojavljuje se pre oko 100 miliona godina, u periodu Krede, i prati nastanak kopnenih drvenastih vrsta.

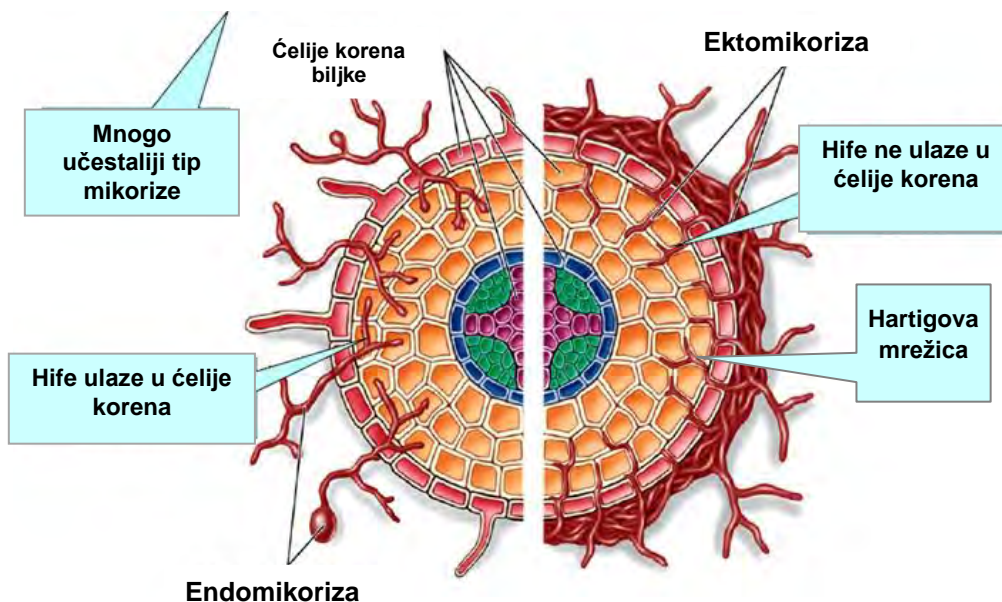
Osnovne karakteristike ektomikorize

Svaka ektomikorizna zajednica ima sledeće karakteristike:

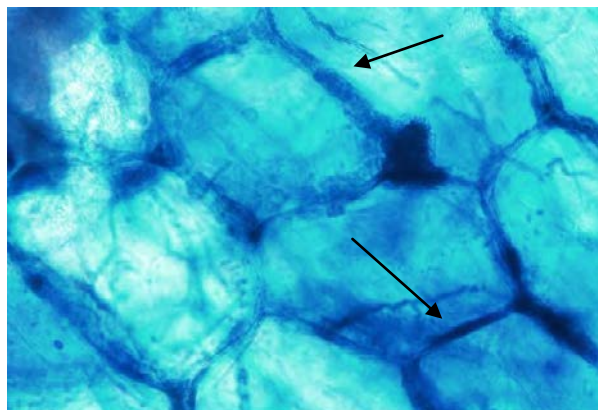
1. korenov sistem biljke je kompletno prekriven opnom koju formira splet hifa odnosno višeslojna micelija gljiva koja može biti debljine do 100 μm , uglavnom 50 μm (Slika 50);

2. hife ne ulaze u u ćeliju; prodiranjem hifa gljive kroz međucelijski prostor epidermisa i spoljašnjeg korteksa korena nastaje Hartigova mreža (Slika 51);

3. mreža hifa koja čini eksternu miceliju (prožima veliku zapreminu zemljišta, veza korena biljke i sa sporokarpom gljive);



Slika 50. Razlika između endo i ektomikorize- šematski prikaz (preuzeto: www.bioexampreparation.com)



Slika 51. Hartigova mrežica (foto: J. Dulić)

Ektomikorizne gljive

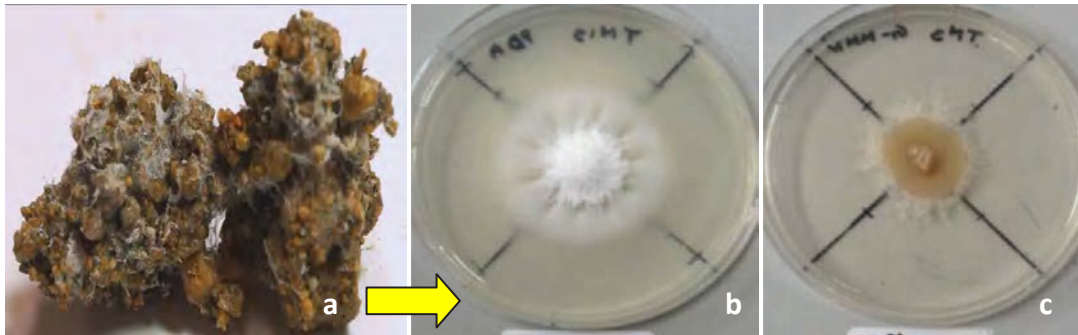
Velik broj ektomikoriznih gljiva je identifikovano. Spominje se najmanje 65 rodova sa 5000 do 6000 vrsta. Oko dve trećine pripadaju kolu Basidiomycota (Slika 52), ostatak kolu Ascomycota osim roda *Endogone*, rod tartufa iz kolu Zygomycota, sa neseptiranom i granatom hifom koja može formirati i endomikorizu. Većina gljiva stvara nadzemna plodnosna tela, a manji broj podzemna (tartufi). U ektomikorizne gljive spadaju i pečurke kao što su *Amanita* spp., *Boletus* spp., *Tricholoma* spp. *Lactarius*, *Russula*, *Laccaria*, *Thelephora*, *Rhizopogon*, *Pisolithus*, *Scleroderma* i drugi.



Slika 52. Ektomikorizne gljive (foto: autori)

Ektomikorizu, kao obligatni oblik simbioze, karakteriše i specifičnost između gljive i biljke. Mikorizna gljiva je specifična samo za jedan ili nekoliko fitobionata. Mikorizne gljive ispoljavaju specifičnost prema biljci domaćinu, ali ona uglavnom nije visoka ili jako izražena (npr. *Amanita muscaria* stupa u mikoriznu zajednicu sa više od 20 biljnih vrsta). Sa druge strane, i biljke ispoljavaju veći ili manji stepen specifičnosti prema mikoriznim gljivama. Određene biljne vrste mogu stupiti u ektomikoriznu asocijaciju sa preko 100 različitih vrsta gljiva (npr. *Picea abies*). Vrlo često se na korenu jedne biljke mogu pronaći mikorizne gljive koje pripadaju različitim rodovima odnosno vrstama što može ponekad dovesti i do kompeticije. Isto tako, starenjem biljke se takođe menja diverzitet mikoriznih gljiva. Određene vrste su prisutne kod mladih biljaka, druge u fazi potpune fiziološke zrelosti.

Ove gljive mogu rasti i odvojeno bez prisustva domaćina, što je dokazano i rastom u Petri kutijama u laboratorijskim uslovima (Slika 53).

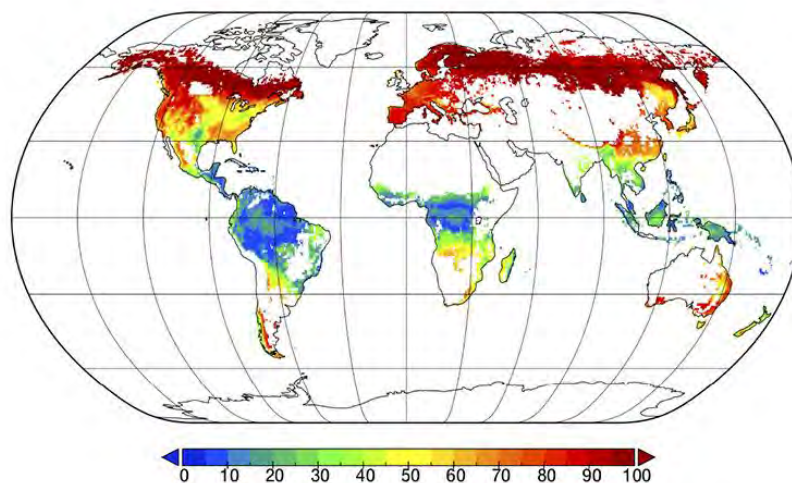


Slika 53. (a) *Tricholoma matsutake* – micelarna masa sa agregatima zemljišta i korenom biljke domaćina; (b i c) kolonije gljive različite morfologije na različitim hranljivim podlogama - 80 dana nakon inokulacije (prema Islam i Shoji, 2013)

Biljke koje formiraju ektomikoriznu zajednicu

Ektomikorizna zajednica se smatra za najsavršeniji oblik simbioze između viših biljaka i gljiva. Ogroman im je ekološki značaj, iako svega oko 3% biljnih vrsta, uglavnom višegodišnje drvenaste vrste formiraju ektomikorizu. Bez obzira na relativno mali broj biljnih vrsta koje formiraju ektomikorizu, ove simbioze teritorijalno pokrivaju ogromne površine, rasprostranjene su u svim šumskim ekosistemima.

Ektomikorizna simbiotska zajednica dominira u hladnijim krajevima, u šumskim sastojinama gde je sporija razgradnja organske materije i gde ima puno stelje (Slika 54).



Slika 54. Procenat biljne biomase koja formira ektomikoriznu zajednicu (preuzeto sa <https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/forest-microbiome-mapping>)

Ukupno je identifikovano 43 biljnih familija sa 140 rodova koje formiraju ektomikorizu. Najznačajnije su familije *Pinaceae*, *Fagaceae*, *Dipterocarpaceae* i *Caesalpinoideae*. Na severnoj hemisferi to su biljke kao što su bor (*Pinus*), omorika (*Picea*), jela (*Abies*), topola (*Populus*), vrba (*Salix*), bukva (*Fagus*), breza (*Betula*) i hrast (*Quercus*). Na južnoj hemisferi to su biljke iz rodova *Eucalyptus* i *Nothofagus* iz familije *Dipterocarpaceae*, koje dominiraju u kišnim šumama južne Amerike, Afrike i jugoistočne Azije.

Faze formiranja ektomikorizne zajednice

Ektomikoriza se razvija postepeno i započinje fazom preinfekcije odnosno ostvarivanjem kontakta između korena biljke i gljive. Gljive inficiraju sekundarne i tercijarne korenove drveća. Počinje intenzivniji rast gljive oko korena prodirući i u meristem. Tako se formira višeslojni omotač-micelija. Hife iz omotača dalje nastavljaju svoj rast prema unutrašnjosti korena, između ćelija epidermisa i korteksa korena. U toku rasta luče enzime pektinaze koje pomažu mehaničko prodiranje i širenje hifa kroz koren. Na taj način se formira Hartigova mreža. Hife nikada ne prodiru u ćelije, ali mogu u potpunosti da opkole ćelije i da na taj način onemogućavaju kontakt sa drugim ćelijama korena. Putem Hartigove mreže se vrši razmena nutrijenata i drugih molekula između biljke i gljive.

Kolonizacija biljke sa ektomikoriznom gljivom dovodi i do promene morfologije korena. Obzirom da je koren obavijen debljim slojem micelije, ćelije apikalnog dela korena se sporije dele, sporije je izduživanje ćelija, a samim tim i rast korena. Ćelije korteksa više rastu u širinu, te je koren koji je inficiran gljivom kraći i deblji u odnosu na neinficiran koren. Onemogućeno je i stvaranje korenskih dlačica, a rast korena je uvek praćen i rastom micelije oko nje. Na taj način je sprečena kolonizacija korena sa nekom drugom gljivom. Mikorizna gljiva pojačano raste, grananje hifa je izraženo, te one preuzimaju funkciju korenskih dlačica.

Faze razvoja ektomikorize i karakteristične morfološke promene koje prate razvoj se mogu i vremenski odrediti.

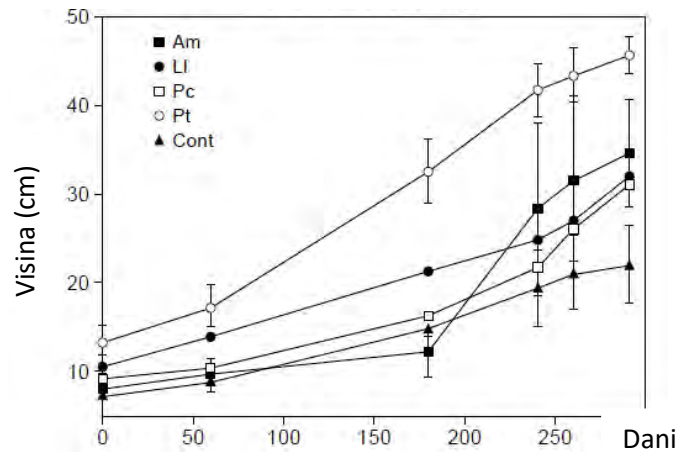
Vreme	Faza razvoja	Morfološke karakteristike/promene
0–12 h	Preinfekcija	Kontakt između hife i korena
12–24 h	Inicijacija simbioze	Kačenje hife za epidermis
24–48 h	Kolonizacija gljivom	Formiranje prvih slojeva omotača; prodiranje hifa između ćelije epidermisa
48–96 h	Stvaranje simbioze	Intenzivan rast hife i stvaranje omotača; početak stvaranja Hartigove mreže
96 h–7 dana	Uspostavljena simbioza mreže	Potpuno formiran omotač oko korena ; završen rast Hartigove mreže

Uticaj ektomikorize na biljku

Ektomikoriza pozitivno utiče na rast biljke (Grafikon 1), a te koristi se ostvaruju putem nekoliko mehanizama.

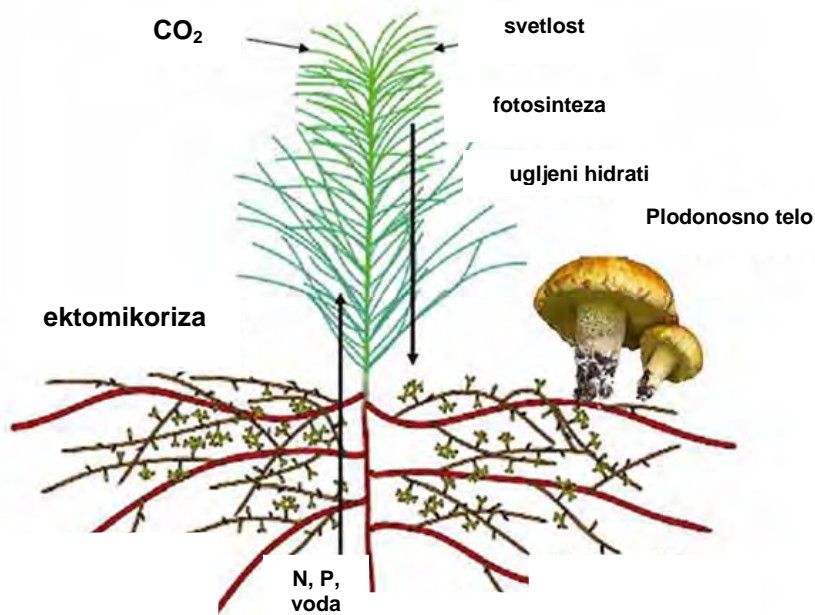
Formiranje debelog, višeslojnog omotača hifa stvara mehaničku barijeru i sprečava prodiranje teških metala u biljku, onemogućava i smanjuje mogućnost infekcije drugim fitopatogenim i/ili parazitskim organizmima.

Povećana je otpornost biljke prema stresnim uslovima, kao što je suša ili povećana koncentracija soli u zemljištu. Mikorizna gljiva dovodi do promena u fiziologiji biljke domaćina, kao što je promena provodljivosti vode, osmoregulacije, intenziteta fotosinteze i na taj način minimizira negativne posledice stresa.



Grafikon 1. Uticaj ektomikorize na visinu rasada kestena (*Castanea sativa*): *Amanita muscaria* (Am), *Laccaria laccata* (LI), *Pisolithus tinctorius* (Pt), *Piloderma croceum* (Pc) i kontrola (Cont) (preuzeto iz Martins et al., 1996)

Poboljšana je ishrana biljke naročito fosforom i azotom (Slika 55). Osim neorganskog oblika ovih nutrijenata, ektomikorizne gljive mogu da usvajaju i neke organske oblike azota, kao što su amino kiseline i manji molekuli proteina.



Slika 55. Uticaj ektomikorize na biljku
(Preuzeto: https://www.americanforests.org/wp-content/uploads/2014/10/3.-Diagram-of-seedling-and-ectomycorrhizal-fungi-CCripps_web.jpg)

Ektomikoriza u šumarstvu

Inokulanti sa ektomikoriznom gljivom se mogu koristiti u rasadnicima kao i prilikom rasađivanja sadnog materijala. Proces proizvodnje inokulanata je započeo Moser (1958) u Austriji, Takacs (1967) u Argentini, a u Australiji Theodorou i Bowen (1973).

Proizvodnja velikih količina inokuluma suočena je sa brojnim poteškoćama. Pre svega, inokulumi često u poljskim uslovima nemaju očekivan efekat. Najteži zadatak je odabrati gljive koje će imati visoku moć kompeticije sa autohtonom populacijom, a u isto vreme i izraženu adaptabilnu sposobnost, kako u procesu proizvodnje tako i u stvarnim uslovima koje su određene tipom i karakteristikama zemljišta, klimatskim uslovima i sl.

Jedan od prvih uspešnih inokuluma koji se puno koristio u šumarstvu je preparat sa gljivom *Pisolithus tinctorius* (Slika 56).



Slika 56. (A) Plodonosno telo *Pisolithus tinctorius* (Pt); (B) razvoj korena rasada bora sa inokulumom koji sadrži Pt; (C) koren bora bez inokuluma (preuzeto: <https://wiki.bugwood.org/Archive: Forestnursery>)

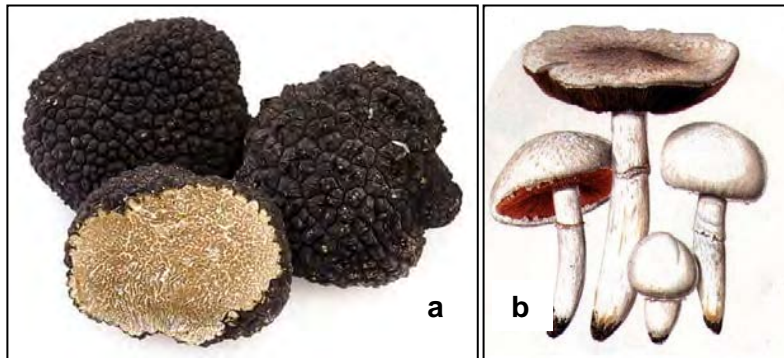
Postoje različite formulacije inokuluma, kao i tehnike koje se koriste za inokulaciju. Najviše se koriste čvrsti inokulumi sa adekvatnim nosačem koji sadrže spore i micelijum gljive. Za nosače se koriste različite materije kao što su vermikulit, treset, alginat u koji se dodaje hranljivi rastvor. Vermikulit je odlična podloga, dobro aerisana gde je micelija zaštićena, dok se dodavanjem treseta podešava pH, obično između 4.8 i 5.5. Hranljivi rastvor obezbeđuje ugljenik i azot (odnos C:N između 50 i 60), a dodaje se u količini koji je potreban za razvoj micelije. Proizvodnja inokuluma u čvrstom stanju je suočena sa brojnim problemima, jer zahteva velik proizvodni prostor, teško je održati konstantne uslove prilikom proizvodnje. Upravo iz tih razloga su se javili i prvi pokušaji pravljenja tečnih formulacija i gelova. Velika prednost je ujednačenost sastava i mogućnost kontrole hranljive podloge, kao i drugih uslova u procesu proizvodnje.

Međutim, bez obzira na postojanje raznih inokuluma sa ektomikoriznim gljivama, oni nisu našli primenu u tolikoj meri kao preparati sa endomikoriznom gljivom. Jedan od razloga je i da često izostane željeni pozitivan efekat inokulacije u realnim uslovima.

Jestive ektomikorizne gljive

Velika komercijalna vrednost ektomikoriznih gljiva leži i u činjenici da su brojni predstavnici jestivi, a pojedine gljive kao što su tartufi imaju posebno mesto u gastronomiji pojedinih zemalja (Slika 57). Još uvek se uglavnom traže i ubiru u svojim prirodnim staništima, a to su šume sa sastojinama iz rodova *Corylus*, *Quercus*, *Carpinus* i *Castanea*. Cena crnih tartufa (*Tuber melanosporum*) se kreće po nekoliko hiljada eura po kilogramu, što predstavlja odličan izvor zarade. Komercijalna proizvodnja tartufa se vrši sa inficiranim sadnicama drveća iz rodova *Quercus* i *Corylus*, a naročito je razvijena u Francuskoj i Italiji. Osim tartufa, komercijalno se eksploatišu i gaje još neke

ektomikorizne gljive kao što su matsutake gljiva (*Tricholoma matsutake*), vrganj (*Boletus edulis*), rujna mlečnica (*Lactanus celiciosu*), crna truba (*Cantharellus cibarius*).

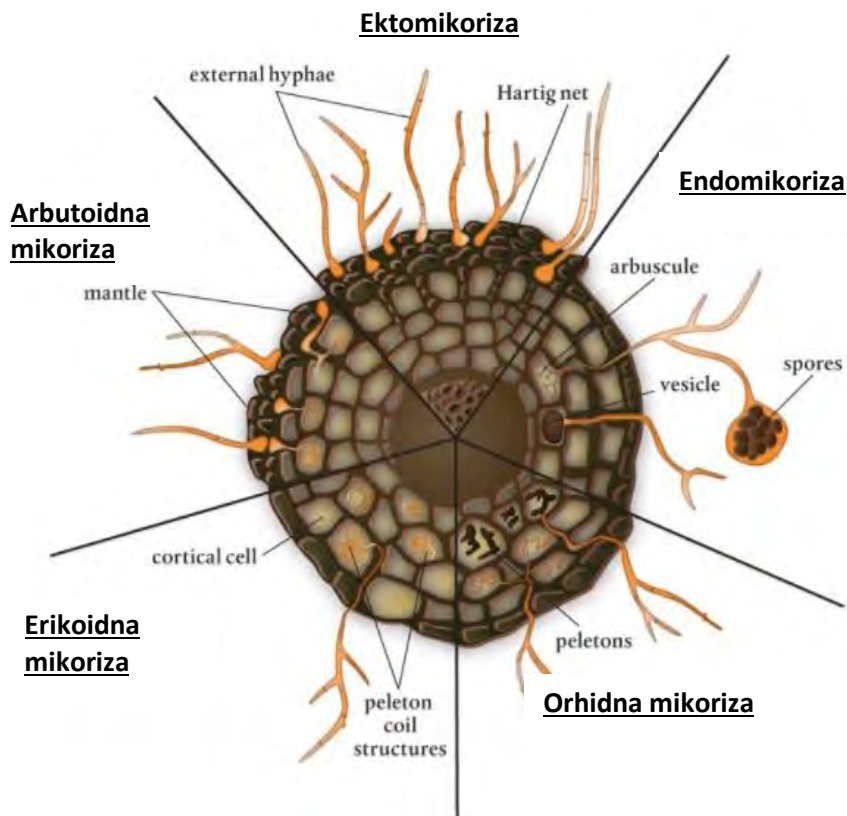


Slika 57. Tartufi (a) i vrganj (b)
(preuzeto: www.mirkotartufi.it)

OSTALI TIPOVI MIKORIZE

Ektoendomikoriza ima karakteristike endo i ektomikorize. Omotač oko korena je tanji ili može biti odsutan, dok je Hartigova mreža dobro razvijena, ali hife mogu da ulaze u ćelije. Gljive koje formiraju ekto i endomikorizu mogu formirati i ovaj kombinovan tip. Na jednoj biljnoj vrsti formira ektomikorizu, a na drugoj endomikorizu.

Arbutoidna mikoriza nastaje na korenu biljaka iz nekoliko rodova (*Arbutus*, *Arctostaphylo*, *Comarostaphylis*) iz familije *Ericaceae*, potfamilija *Arbutoidea*. Mikorizu formiraju sa ektomikoriznim gljivama iz rodova *Cortinarius*, *Hysterangium*, *Laccaria*, *Tricholoma* i *Phaeocollybia* iz razdelu Basidiomycota. Osnovne karakteristike arbutoidne mikorize su slične kao ektomikorize, samo što se dodatno razvija unutarćelijska mreža uvijenih hifa u ćelijama korteksa korena. Preko tih hifa se vrši razmena nutrijenata između gljive i biljke u oba smera (Slika 58).



Slika 58. Različiti tipovi mikorize
(preuzeto i prilagođeno: <https://lovethesoilbeneathyourfeet.wordpress.com>)

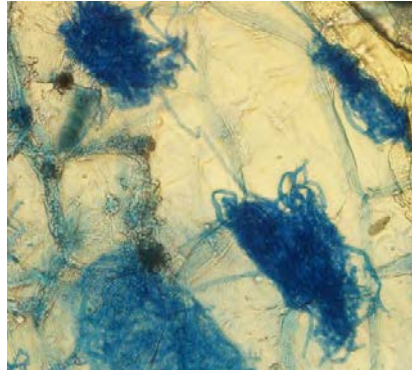
Erikoidna mikoriza se razvija na većini biljaka iz familije *Ericacea* sa gljivama iz razdela Ascomycotina. Ova mikoriza se uglavnom može naći u ekosistemima gde vladaju nepovoljni uslovi, naročito u kiselim zemljištima. Ova mikoriza se posebno izdvaja po tome što znatno doprinosi regulaciji usvajanja gvožđa, mangana i jona aluminijuma, koji su u značajnijoj meri zastupljeni u kiselim zemljištima. Karakteristika ove mikorize je formiranje spleta uvijenih hifa u spoljašnjim ćelijama korenskih dlačica. Preko njih se vrši razmena nitrijenata.

Orhideje čine 10% od svih cvetnih vrsta na Zemlji. Svrstane su u preko 800 rodova sa preko 25000 vrsta u familiju *Orchidaceae*. Ove biljke rastu na različitim staništima, a razlikujemo autotrofne i heterotrofne oblike. Orhideje takođe stupaju u simbiotsku zajednicu sa mikoriznim gljivama iz kola Basidiomycota i formiraju tzv. **orhidni tip mikorize** (Slika 59).



Slika 59. Orhidna mikoriza
(foto: autori)

Mikosimbiont zelenih autotrofnih orhideja su efektivni saprofiti koji uglavnom pripadaju rodu *Rhizoctonia*, dok heterotrofne formiraju zajednicu sa ektomikoriznim gljivama. Gljive inficiraju biljku i ulaze u koren kroz korenske dlačice. Rastu prema unutrašnjosti korena, kroz ćelije epidermisa i ulaze u korteks gde formiraju mrežu uvijenih hifa tzv.pelotone (Slika 60).



Slika 60. *Rhizoctonia* pelotoni u ćelijama korena orhideje
(foto: J. Dulić)

8. Rod TRICHODERMA

Taksonomija i biologija

Naziv *Trichoderma* potiče od latinskih reči “thrix” što znači kosa i “derma” što znači koža.

Vrste gljiva iz roda *Trichoderma* se smatraju kosmopolitskim i preovlađujućim stanovnicima različitih ekosistema u širokom rasponu klimatskih zona. Međutim, dok su neke vrste sveprisutne, druge su ograničene na određene geografske oblasti. To je gljiva koja je prisutna u svim tipovima zemljišta i jedna je od najrasprostranjenijih gljiva koje se mogu kultivirati u *in-vitro* uslovima. Mnoge vrste iz ovog roda mogu se okarakterisati kao “**oportunistički avirulentni biljni simbiozi**”.

Prvi opis gljive *Trichoderma*, na osnovu morfoloških osobina, datira još iz 1794. godine od strane nemačkog naučnika Persoon-a. Dalji radovi na identifikaciji pripisuju se Tulasne i Tulasne (1865). Oni kod vrsta iz roda *Trichoderma* otkrivaju postojanje seksualnog stadijuma (teleomorf) koji je isti kao kod vrsta iz roda *Hypocrea*. Zbog prisutne sličnosti čak predlažu i spajanje rodova koje nije prihvaćeno. Zbog toga se u poslednjih 200 godina rodovi *Trichoderma* i *Hypocrea* tretiraju kao odvojeni, sa mnogim vrstama koje imaju aseksualni stadijum (anamorf) i seksualni stadijum (teleomorf) i pripadaju istoj vrsti (Tabela 10), (Slika 61).

Tabela 10: Klasifikacija rodova *Trichoderma* i *Hypocrea*

Taksonomske kategorije	Aseksualni stadijum (anamorf) konidije	Seksualni stadijum (teleomorf) askospore
Carstvo	Fungi	Fungi
Razdeo	Deutromycota	Ascomycota
Podrazdeo	Deutromycotina	Ascomycotina
Klasa	Hyphomycetes	Pyrenomycetes
Red	Monilliales	Spheriales
Familija	<i>Monillicaceae</i>	<i>Hypocreaceae</i>
Rod	<i>Trichoderma</i>	<i>Hypocrea</i>



Slika 61: Anamorf i teleomorf vrste *Trichoderma balearicum* (prema Jaklitsch and Voglmayr, 2014)

Međutim, različite vrste koje pripadaju rodovima *Trichoderma* i *Hypocrea* bilo je teško razlikovati morfološki. Čak je predloženo da se taksonomija smanji na samo jednu vrstu, *Trichoderma viride*. Stoga je od 1969. godine pokrenut razvoj koncepta identifikacije vrsta iz ovih rodova. Nakon toga, otkrivene su brojne nove vrste

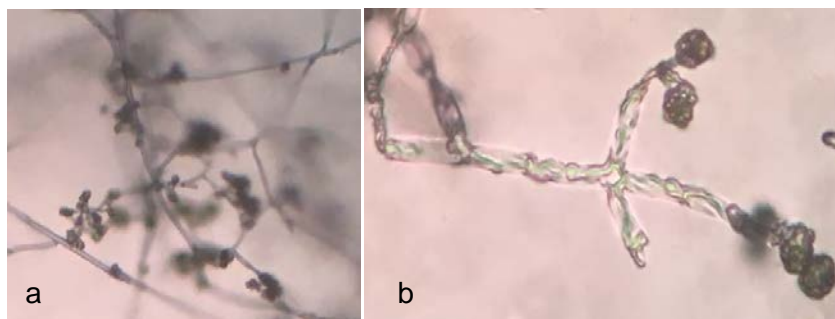
Trichoderma i *Hipocrea*, a do 2006. godine rodovi su obuhvatili više od 200 filogenetski definisanih vrsta. Poslednjih godina, identifikacija novih vrsta je značajno olakšana razvojem oligonukleotidnog barkoda (TrichOKEI) i prilagođenog alata za pretraživanje sličnosti (TrichoBLAST), oba dostupna na internetu na adresi www.isth.info.

Taksonomija roda *Trichoderma* je značajnije napredovala uvođenjem molekularnih tehnika u proces identifikacije vrste. Počevši od 2013, revidirani Međunarodni kodeks Nomenklatura za alge, gljive i biljke (ICN) je propisao da pojedinačne vrste pleomorfnih (polimorfnih) gljiva više ne nose dva imena nego jedno. *Trichoderma* je stariji naziv i ima prioritet u odnosu na *Hipocrea*, mada se u literaturi i dan danas nalaze oba.

Današnja taksonomija roda *Trichoderma* je sledeća:

Carstvo:	Fungi
Razdeo:	Ascomycota
Podrazdeo:	Pezizomycotina
Klasa:	Sordariomycetes
Red:	Hypocreales
Familija:	<i>Hypocreaceae</i>
Rod:	<i>Trichoderma</i> Person
Vrsta:	<i>Trichoderma</i> sp.

Vrste ovog roda često parazitiraju na drugim gljivama, saprofiti su na živoj i mrtvoj organskoj materiji, u zemljištu i rizosferi, u sunderima, endofiti na drvenastim i zeljastim biljkama, što potvrđuje njihovu sposobnost da zauzmu različite ekološke niše. *Trichoderma* vrste rastu kao tipične gljive sa hifama prečnika 5–10 µm. Većina vrsta brzo raste, proizvode krupne, višecelijske konidije i imaju septiranu hifu (Slika 62).



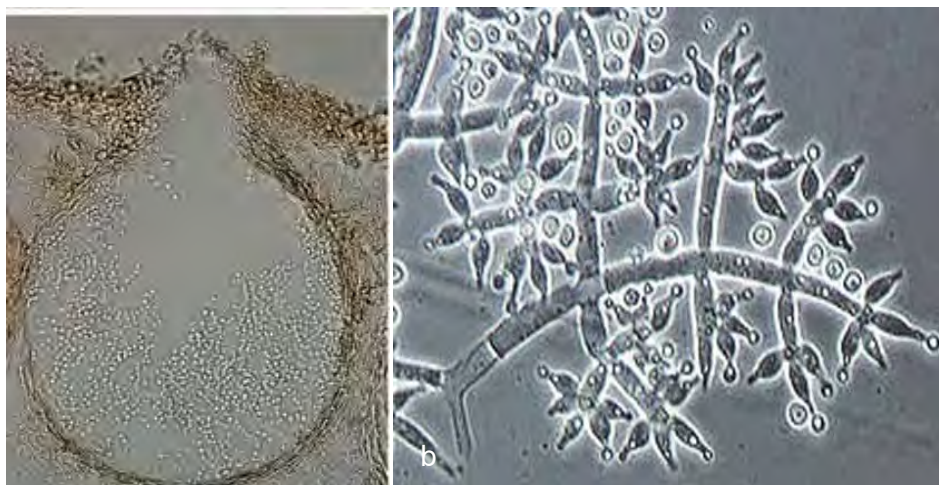
Slika 62: Izgled vazdušne micelije (a) i konidiofore sa konidijama malinastog izgleda (b) (foto: autori)

Vrste ovog roda proizvode široku paletu pigmenata, od svetlo zelenkasto-žute do crvenkaste boje, mada su neke od njih i bezbojne. Slično tome, konidijalna pigmentacija varira od bezbojne do različitih zelenih nijansi, a ponekad i sive ili braon boje (Slika 63).



Slika 63: Izgled kolonije *Trichoderma* spp. sa zelenom nijansom konidija (foto: autori)

Identifikacija vrsta unutar roda je teška zbog malog variranja morfoloških karakteristika vrsta roda *Trichoderma*. Većina laboratorijskih sojeva stvara aseksualne spore kao što su konidije i hlamidospore, a u njihovom prirodnom okruženju neke formiraju askospore u peritecijama. Konidiofore *Trichoderma* spp. se pojavljuju kao naspramne grane koje zauzimaju piramidalni oblik završavajući se sa jednim ili nekoliko fialida (Slika 64). Iako su hlamidospore kod vrsta ovog roda odavno otkrivene, trenutno razumevanje genetske osnove za njihovo formiranje i proliferaciju je oskudno. Međutim, hlamidospore se u velikoj meri proizvode u tečnoj kulturi i predstavljaju aktivne propagule (delovi gljive koji mogu da izvrše infekciju – sve vrste spora, delovi hife ili talusa) u nekim komercijalnim formulacijama na bazi *Trichoderma* spp.



Slika 64 : Peritecije sa askosporama (a) i piramidalni oblik konidiofore (b)
(prema Jaklitsch and Voglmayr, 2014)

Trichoderma sp. je sposobna da raste u zemljištu koje ima pH u rasponu od 2,5 - 9,5, iako većina bolje raste u blago do umereno kiselom okruženju.

Veliki broj vrsta je visoko prilagođena aseksualnom životnom ciklusu. U odsustvu mejoze, plastičnost hromozoma je normalna, a različiti sojevi imaju različit broj i veličinu hromozoma. Većina hifa je višejedarna, sa nekim vegetativnim ćelijama koje imaju i preko 100 jedara. Različiti aseksualni genetski faktori, kao što su paraseksualna rekombinacija (rekombinacija genetskog materijala u okviru jedne hife), mutacije i drugi procesi, doprinose varijaciji između jedara u jednom organizmu (talus). Tako su gljive

veoma prilagodljive, brzo se razvijaju i postoji velika raznolikost u genotipu i fenotipu divljih sojeva.

Dok su divlji sojevi veoma prilagodljivi i mogu biti heterokariotski (sadrže jedra različitih genotipova unutar jednog organizma i stoga vrlo varijabilni), sojevi koji se koriste u komercijalnoj poljoprivredi su, ili bi trebali biti, homokariotski (jedra su genetski slična ili identična). Ovo, zajedno sa strogom kontrolom varijacija kroz genetsku manipulaciju, omogućava da ovi komercijalni sojevi budu genetski različiti i nepromenjivi. To je izuzetno važna stavka kontrole kvaliteta inokuluma za svaku kompaniju koja želi komercijalizovati ove organizme.

Komercijalni sojevi (izolati) *Trichoderma* sp. u poljoprivrednoj proizvodnji prvenstveno se koriste u funkciji promocije biljnog rasta (PGPF – plant growth promoting fungi) i kao biofungicidi, odnosno biokontrolni agensi.

Pored ove dve najznačajnije i najmasovnije upotrebe, *Trichoderma* spp. se koriste za komercijalnu proizvodnju celulaza i drugih enzima koji razgrađuju kompleksne polisaharide. Često se koriste u prehrambenoj i tekstilnoj industriji za ove svrhe. Na primer, celulaze iz ovih gljiva se koriste u "biostoniranju" ("kamenovanju") denim tkanina da bi se stvorila meka, bela tkanina - denim od kamena. Enzimi se takođe koriste u hrani za živinu, kako bi se povećala svarljivost hemiceluloza iz ječma ili drugih useva. *T. reesei* se koristi za proizvodnju celulaze i hemicelulaze, *T. longibratum* za dobijanje ksilanaze, a *T. harzianum* za proizvodnju hitinaze.

Još jedna vrlo značajna primena izolata *Trichoderma* vrsta je i u medicini. Naime vrsta *T. polysporum* proizvodi imunosupresant Ciklosporin A (CsA), inhibitor kalcineurina, koji se koristi u terapiji sprečavanja odbacivanja organa kod transplantacija.

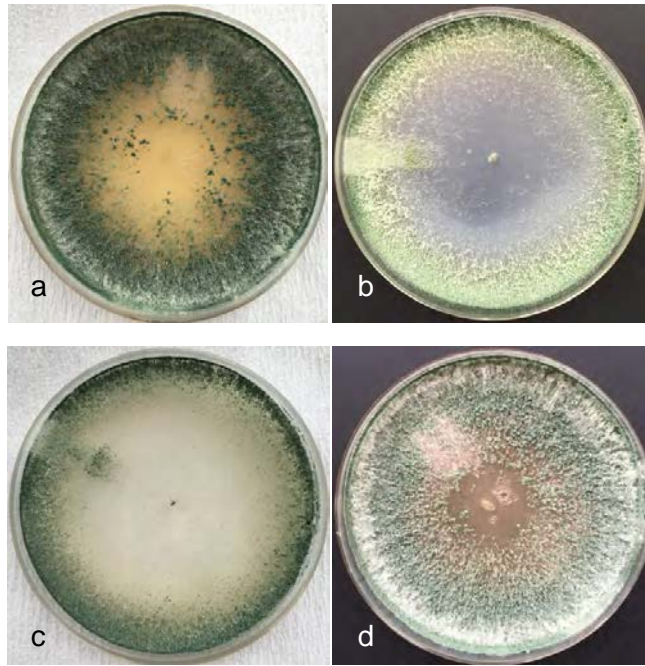
Promocija rasta biljaka (PGPF – plant growth promoting fungi)

Trichoderma spp., kao kosmopolitske vrste zemljišnih gljiva, na različite načine utiču na promociju biljnog rasta. Ova sposobnost naročito je važna za poljoprivrednu proizvodnju gde se danas primenjuje veliki broj komercijalnih preparata sa čistom kulturom odabranih sojeva *Trichoderma* sp. ili u kombinaciji sa drugim, kompatibilnim promotorima biljnog rasta iz grupa bakterija, aktinomiceta ili drugih gljiva.

Promociju biljnog rasta ova gljiva ostvaruje putem nekoliko različitih mehanizama, a to su:

- endofitna aktivnost,
- povećanje otpornosti na abiotički stres,
- povećanje dostupnosti i unosa hranljivih materija,
- produkcija sekundarnih biomolekula,
- produkcija biljnih hormona.

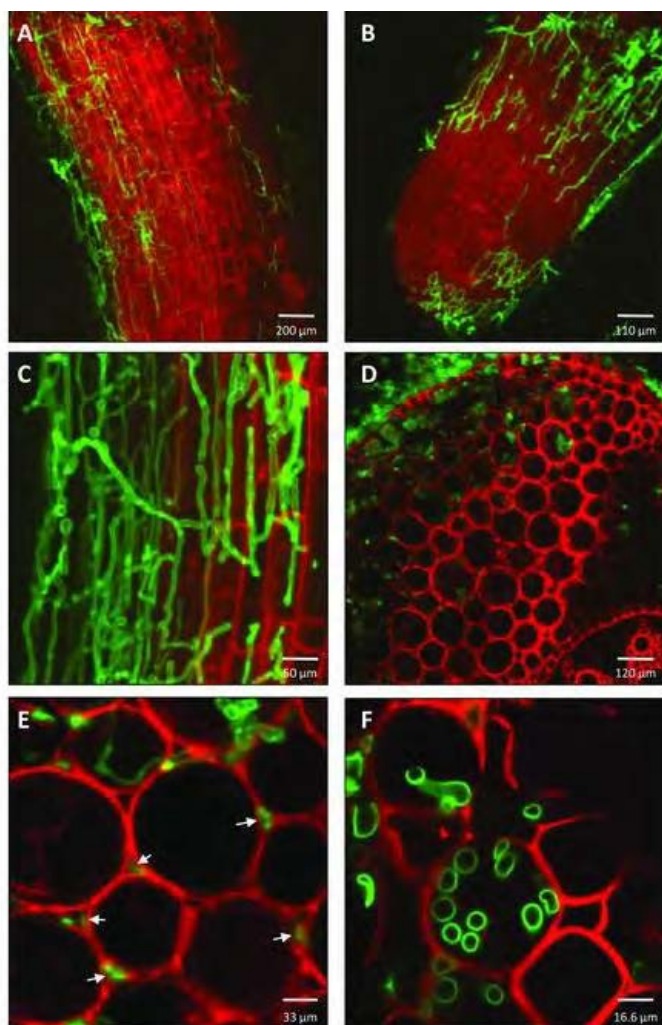
Ako se uzmu u obzir svi mehanizmi promocije biljnog rasta kojima raspolažu gljive iz roda *Trichoderma*. i rezultati dosadašnjih ispitivanja, kao najbolje PGP vrste izdvajaju se *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. virens*, *T. longibrachiatum* (Slika 65).



Slika 65. *T. asperellum* (a); *T. atroviride* (b); *T. harzianum* (c)
T. longibrachiatum (d) (foto: autori)

Endofitna aktivnost

Endofitizam predstavlja sposobnost mikroorganizama da prodru u tkivo biljaka i žive u metabiotičkom ili mutualističkom odnosu sa biljkom, a da pri tome ne izazovu oboljenje. Mehanizam uspostavljanja zajednice sličan je mikoriznim gljivama. Hifa *Trichoderma* spp. naseljava koren biljke u zoni korenske dračice. Polako prodire kroz epidermis i korteks korena da bi na kraju formirala hife unutar ćelija korteksa (Slika 66).



Slika 66: Koren kukuruza sa hifama *T. virens* (A); hife *T. virens* u epidermalnim ćelijama korena kukuruza (B); vrh sekundarnog korena (C); Poprečni presek primarnog korena koji pokazuje unutrašnju kolonizaciju epidermalnih i kortikalnih slojeva u blizini vaskularnog sistema (D); hife u međučelijskom prostoru (E); intracelularna kolonizacija ćelija korteksa hifama *T. virens* (F). Slike su dobijene konfokalnim mikroskopom. (prema Lopez et al., 2018)

Neke vrste gljive iz roda *Trichoderma* (*T. taxi*, *T. aethiopicum*, *T. flagellatum*, *T. hamatum*) sposobne su da stupaju u povremenu ili stalnu endofitnu zajednicu sa različitim biljnim vrstama. Od drvenastih biljaka se izdvajaju kakao, tropske liane i sl., a od zeljastih biljaka bokvica i kukuruz.

Smatra se da najveći broj mehanizama promocije biljnog rasta proističe iz endofitnog odnosa biljke sa gljivom *Trichoderma* spp. Pre svega, koren biljke mehanički je zaštićen od fitopatogena. Zatim, prisustvo gljive u korenu indukuje sekundarnu otpornost na fitopatogene. Koren biljke sa gljivom prožima veću zapreminu zemljišta, što omogućava biljci da bude obezbeđena većom količinom vode i nutrijenata. Gljiva sintetiše siderofore, sekundarne metabolite i biljne hormone čime direktno utiče na rast i razviće biljke domaćina.

Povećanje otpornosti na abiotički stress

U okviru abiotičkih faktora koji izazivaju stres kod biljaka, istraživanja su pokazala da primena vrsta iz roda *Trichoderma* može da poveća otpornost biljaka na sušu, visoku temperaturu i povećanu koncentraciju soli u zemljištu.

Mehanizam povećanja otpornosti na sušu zasniva se na činjenici da biljke, koje na svom korenu imaju hife *Trichoderma* spp., mogu da usvajaju kapilarnu vodu koja je jače vezana za pore zemljišta. Istovremeno sama zapremina zemljišta koju prožima koren sa gljivom je veća pa je i količina vode na raspolaganju veća.

Visoke temperature i suša kod biljaka izazivaju stres što dovodi do stvaranja slobodnih kiseoničnih radikala, koji imaju negativno dejstvo na ćelijske membrane, odvijanje enzimskih reakcija i oksidativnu fosforilaciju. U biljkama sa trihodermom u uslovima stresa, ustanovljeno je povećanje koncentracije enzima kao što su razne peroksidaze, hitinaze, β -1,3-glukanaze, hidroperoksidaze i lipoksigenaze. Ovi enzimi su odgovorni za sintezu fitoaleksina i fenola koji su u biljci "hvatači" destruktivnih kiseoničnih radikala. Takve biljke su otpornije na sušu i visoke temperature.

Povećana koncentracija soli (NaCl) u zemljištu, kod biljaka izaziva osmotsku sušu, smanjenu koncentraciju hlorofila usled povećanja koncentracije hlorofilaze, smanjen rast nadzemnog dela i korena, kao i povećanu osetljivost biljaka na patogene. Biljke koje su pre izlaganja većim koncentracijama soli tretirane preparatima na bazi *Trichoderma* spp. pokazale su sposobnost izmene u odvijanju fizioloških i biohemijskih procesa. Ovo je dovelo do obnavljanja ćelijske homeostaze, izbacivanja toksina iz ćelija i stimulacije ponovnog rasta nadzemnog dela i korena biljke. Te biljke su imale više hlorofila od netretiranih, bolju evapotransporaciju i bile su boljeg kondicionog stanja.

Povećana dostupnost i unos hranljivih materija

Trichoderma spp. povećava mineralizaciju organskih oblika hranljivih materija produkcijom organskih kiselina, rasvorljivost i dostupnost nutrijenata i njihovo usvajanje od strane biljke.

Inokulacija semena krastavca vrstom *T. viride* uslovlila je povećanje usvajanja azota, fosfora i kalijuma usled povećanja mase korena (Slika 67). *Trichoderma* spp. je najefikasnija kod mobilizacije fosfata. Inokulacija semena povrtarskih kultura vrstama *T. asperelum* i *T. harzianum* uslovlila je povećanje usvajanja fosfora za 30 – 90%, a pozitivan efekat se odrazio i na usvajanje mikroelemnata kao što su bakar, cink, mangan, kalcijum i natrijum.



Slika 67: Promena arhitekture korena biljke inokulisane sa *Trichoderma* spp. (T- inokulacija sa *Trichoderma* spp.; Ø- kontrola)

Sposobnost gljive *Trichoderma* spp. da sintetiše siderofore obezbeđuje biljku pristupačnim oblicima gvožđa.

Produkcija sekundarnih biomolekula

Sekundarni biomolekuli su jedinjenja male molekulske mase, koja nisu od vitalnog značaja za rast i razviće organizma, ali se proizvode kao reakcija na različite stimulanse iz spoljašnje sredine. Gljive iz roda *Trichoderma* spp. stvaraju veliki broj sekundarnih biomolekula koji pozitivno utiču na biljku.

Prema ulozi, ova jedinjenja se mogu podeliti u dve grupe:

1. sekundarni biomolekuli odgovorni za kontrolu fitopatogena u rizosferi biljaka
2. sekundarni biomolekuli u funkciji promocije biljnog rasta

Prema hemijskom sastavu dele se na:

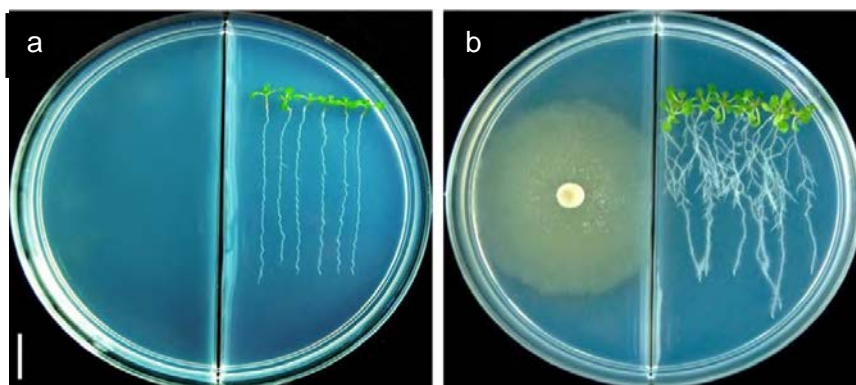
1. neribozomalne peptide
2. poliketide
3. terpenoide
4. isparljive organske molekule

Neribozomalni peptidi su velika grupa važnih sekundarnih biomolekula koji nastaju spajanjem više aminokiselina izvan ribozoma. Najznačajniji neribozomalni peptidi koje sintetiše gljive iz roda *Trichoderma* su: **peptabiotici**, **epiditiodioksipiperazini** i **siderofore**. Peptabiotici su grupa od preko 1000 različitih jedinjenja sa 4 – 21 aminokiseline, kod kojih je utvrđena antimikrobna i citotoksična aktivnost. Epiditiodioksipiperazini su grupa reaktivnih sekundarnih biomolekula koji pripadaju biotoksinima. Vrsta *T. virens* sintetiše **gliotoksin** i **gliovirin**, biotoksine odgovorne za antifungalne osobine ove vrste. Siderofore su Fe – helirajući biomolekuli. Novija istraživanja utvrdila su da postoji 12 -14 različitih siderofora (po hemijskom sastavu), koje sintetiše vrste *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. gamsii*, *T. hamatum*, *T. virens*, *T. harzianum*, *T. polysporum* i *T. reesei*.

Poliketidi su grupa strukturno različitih sekundarnih biomolekula kao što su: antibiotici – tetraciklini i makrolidni; mikotoksini – aflatoksin i fumozini; pigmenti – bikaverin i fuzarubin; kao i statini - lovastatin i kompaktin (snižavaju nivo holesterola u krvi kod ljudi). O njima se malo zna i delimično su uključeni u antifungalne karakteristike gljiva iz roda *Trichoderma*.

Terpenoidi su najrasprostranjenija grupa sekundarnih biomolekula u prirodi. Sastoje se od većeg ili manjeg broja izoprenskih jedinica (C₅H₈), mogu biti isparljivi i neisparljivi. Terpenoidi koji su identifikovani kod *Trichoderma* spp. su isparljivi tetraciklični diterpeni – **harzianodinon**, seskviterpeni iz grupe trihotecena – **trihodermin** i **harzianum A**, i triterpen **viridin**. Istraživanja su pokazala da ovi terpenoidi igraju važnu ulogu u komunikaciji na molekularskom nivou između gljive i korena biljaka, tokom formiranja endofitne zajednice.

Isparljive organske molekule čine jedinjenja iz grupe alkohola, ketona, alkana, alkina i pirona. Najznačajniji je 6-fenil-piron (6-PP), nezasićeni lakton (šećer) mirisa na kokos, kome se pripisuju antifungalna i PGP svojstva, a sintetiše ga vrste *T. virens*, *T. atroviride* i *T. harzianum* (Slika 68).



Slika 68: Uticaj isparljivih biomolekula na razvoj korena: (a) 12 dana stari klijanci *Arabidopsis sp.* tretirani sterilnom vodom, (b) 12 dana stari klijanci *Arabidopsis sp.* inokulisani sa *T. virens* Tv29.8 (prema Lopez-Bucio, 2015)

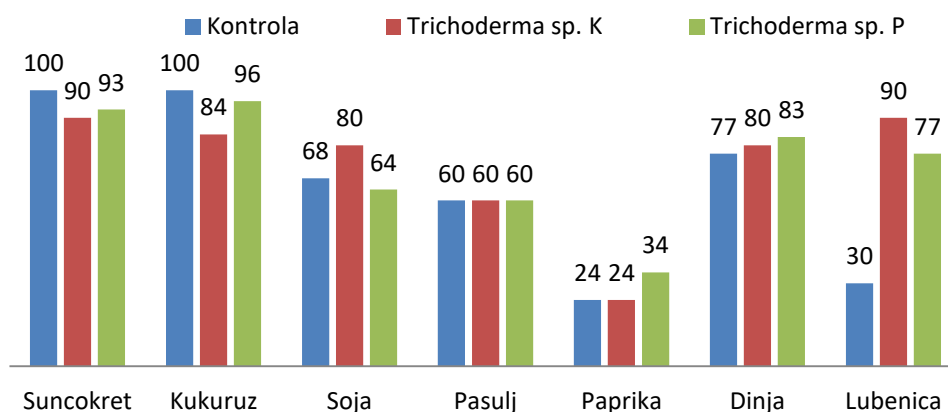
Produkcija biljnih hormona

Vrste *T. atroviride*, *T. asperellum* i *T. harzianum* su sposobne da sintetišu i izlučuju indol sirćetnu kiselinu (IAA). Pored ove osobine, novija istraživanja ukazuju na sposobnost ovih vrsta da svojim prisustvom u rizosferi indukuju sintezu IAA od strane biljke i na taj način promovišu biljni rast.

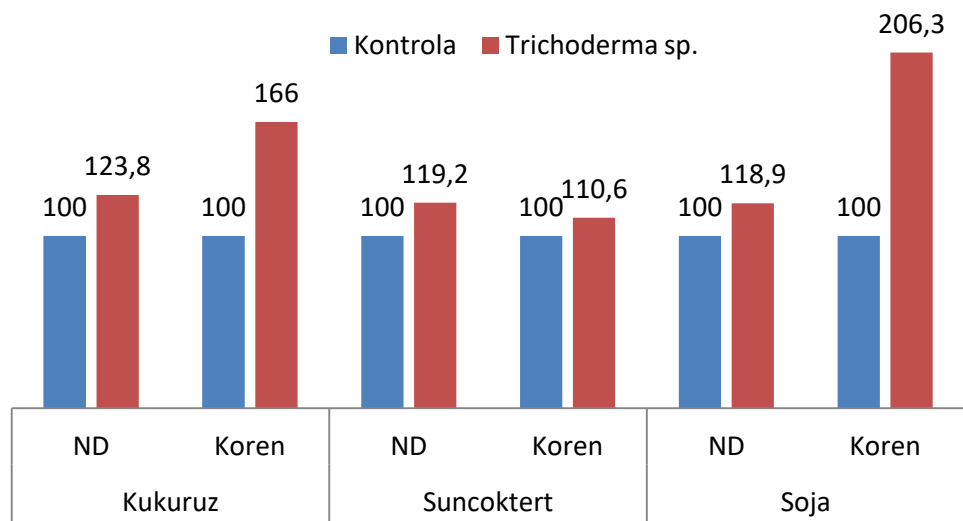
Pozitivan uticaj na rast biljke

Postoje dokazi da je sposobnost izolata *Trichoderma spp.* da promoviše rast biljaka povezana sa njihovom sposobnošću kompeticije sa autohtonom mikrobnom populacijom u rizosferi biljaka i sposobnosti da rastu endofitno unutar biljnog tkiva.

Kao rezultat aktivnosti *Trichoderma spp.*, kod biljaka se promocija biljnog rasta registruje u vidu povećanja rasta i razvoja. U fazi klijanja dolazi do povećanja procenta klijavosti semena, povećanja energije klijanja i smanjenja vremena potrebnog za izbijanja klice (Grafikon 2). Kod mladih biljaka pozitivan efekat uočava se na korenu i stablu biljaka (Grafikon 3). Kod korena dolazi do povećanja dužine, uvećanja broja bočnih korenova, povećanja zapremine zemljišta koju koren prožima, kao i povećanja sveže i suve mase korena. Nadzemni deo biljke takođe reaguje povećanjem sveže i suve mase. Povećava se površina lista, visina stabla, broj i masa plodova (cvetova, mahuna) po biljci.



Grafikon 2: Uticaj Inokulacije semena sa *Trichoderma* sp. na klijavost suncokreta, kukuruza, soje, pasulja, paprika, dinje i lubenice (K- koncentrovana suspenzija, P – preporučena suspenzija)



Grafikon 3: Uticaj inokulacije semena sa *Trichoderma* sp. na visinu nadzemnog dela i dužinu korena kukuruza, suncokreta i soje.

9. AUTOTROFNI MIKROORGANIZMI U MIKROBIOLOŠKIM PREPARATIMA

Autotrofni mikroorganizmi su svi oni koji koriste sunčevu energiju kao izvor energije u procesu sinteze organske materije. Taj proces je poznat kao fotosinteza, a kao krajnji proizvod nastaju ugljeni hidrati i kiseonik. Ugljene hidrate koriste za potrebe svog metabolizma (izgradnja ćelije, skladištenje rezervne materije), a kiseonik se kao nusproizvod oslobađa iz ćelije. Proces fotosinteze je potpomognut pigmentima koji su smešteni u ćeliji. Od kombinacije dominantnih fotosintetičkih i dopunskih pigmenata zavisi i njihova boja, koja može biti zelena, žuta, cvena, mrka. Među autotrofnim mikroorganizmima postoje predstavnici koji su mikroskopskih dimenzija različite ćelijske organizacije, ali i makroskopskih veličina koje su vidljive golim okom i izgledom podsećaju na biljke. Od mikroorganizama, u ovim procesima učestvuju eukariotski organizmi - alge, a od prokariota - cijanobakterije.

Alge i cijanobakterije su našle široku primenu i ljudi ih koriste od davnina. Pre svega kao hranu, ali i kao izvor boja, u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, koriste se u ishrani životinja, a veliku primenu su našli i u raznim oblastima poljoprivredne proizvodnje. Alge se sve više koriste kao izvor lipida za proizvodnju biodizela odnosno mazuta.

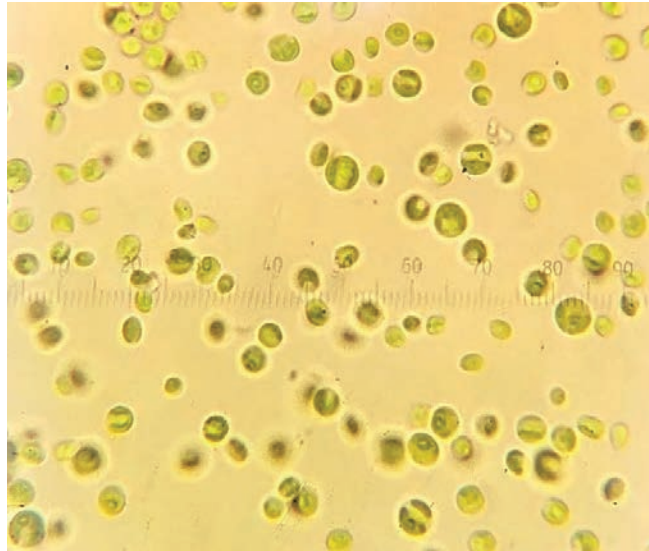
Mikroalge, gde spadaju alge i cijanobakterije, se smatraju precima biljaka. Prvo su živele u vodenim sredinama, a pretpostavlja se da su postale terestrične u Paleozoiku, pre oko 450 miliona godina. Najstariji fosilni ostatak mikroalge - cijanobakterije je pronađen u Zapadnoj Australiji i procenjene je starosti od 3,4 biliona godina.

Do današnjih dana je opisano oko 40000 predstavnika mada postoje i procene koje su višestruko veće.

U ovom poglavlju će se razmatrati značaj mikrotalusnih algi i cijanobakterija, s obzirom na značaj i praktičnu primenu u poljoprivrednoj proizvodnji. Najznačajnije vrste koje su našle primenu su zelena alga *Chlorella vulgaris* i cijanobakterija *Spirulina platensis*.

ZELENE ALGE - *Chlorella* spp.

Chlorella je rod jednoćelijskih zelenih algi, okruglog do ovoidnog oblika, veličine od 2–10 μm u prečniku, nepokretne su i ne stvaraju zoospore. Imaju ćelijski zid različite debljine, što zavisi od vrste i hloroplast karakterističnog peharastog oblika (Slika 69). Akumulacija skroba, kao rezervne materije se vrši u pirenoidima unutar hloroplasta. Razmnožava se formiranjem autospora (4–8–16) koje su istog oblika kao majka ćelija. Tipičan je autotrofan način ishrane, ali može rasti i u heterotrofnim uslovima i kao miksotrof.



Slika 69. *Chlorella vulgaris*-okrugle pojedinačne ćelije (foto: V.Seman)

Na osnovu morfoloških i molekularnih podataka, rod *Chlorella* obuhvata pet vrsta: *Chlorella vulgaris* Beijerinck, *C. lobophora* Andreyeva, *C. sorokiniana* Shihira et Krauss, *C. heliozoae* Pröschold et Darienko i *C. variabilis*. Novija taksonomska analiza iz 2011. godine, koja je rađena na osnovu morfoloških karakteristika, filogenetskog stabla, sekundarne strukture ITS-2 regije i barcoding-a, uključuje i nove vrste: *C. pituita*, *C. pulchelloides*, *C. colonialis*, *C. singularis*, *C. rotunda*, *C. lewinii* i *C. volutis*. Najznačajnija vrsta koja je našla komercijalnu primenu u brojnim privrednim granama, a prodaje se i kao ‘zdrava hrana’ je *Chlorella vulgaris*.

Chlorella vulgaris ima sledeću klasifikaciju: Domen: Eukaryota, Carstvo: Protista, Podcarstvo: Algae, Razdeo: Chlorophyta, Klasa: Trebouxiophyceae, Red: Chlorellales, Familija: Chlorellaceae, Rod: *Chlorella*, Vrsta: *Chlorella vulgaris*. Holandski istraživač Martinus Willem Beijerinck je otkrio i opisao davne 1890 godine.

Hlorele je izvor brojnih primarnih metabolita kao što su proteini, lipidi ugljeni hidrati, zatim pigmenata, vitamina, mineralnih materija, te sekundarnih metabolita (fenola, terpena i dr.)

Proteini su od izuzetnog značaja, obzirom da su važni za rast ćelije, regulišu metabolizam i sve ćelijske aktivnosti, a značajnu ulogu imaju i u odbrani ćelije od raznih neželjenih uticaja. Sadržaj proteina u ćeliji je visok i kreće se između 42–58% od suve biomase. Oko 30% proteina se izlučuje van ćelije. Kvalitet proteina zavisi od sadržaja i odnosa amino kiselina, a stvara i esencijalne i neesencijalne amino kiseline.

Lipidi su izuzetno heterogena grupa organskih jedinjenja, izgrađeni od masnih kiselina. Veoma važna karakteristika lipida, osim same strukture je i njihova rastvorljivost u polarnim, odnosno nepolarnim rastvaračima. Sadržaj lipida u ćelijama hlorele može biti od svega nekoliko procenata do 40%. Taj udeo može biti veći i od 50% ukoliko se hlorele nađe u nepovoljnim uslovima rasta. Uglavnom su zastupljeni trigliceridi, glikolipidi, voskovi, fosfolipidi, ali i određene količine slobodnih masnih kiselina. Lipidi se sintetišu unutar hloroplasta i čine sastavnu komponentu ćelijskog zida i svih ćelijskih membrana.

Ugljeni hidrati su zastupljeni u obliku prostih i složenih šećera, pre svega skroba i celuloze. Najveće količine čini skrob, koji je smešten u hloroplastu. Izgrađen je od amiloze i amilopektina, i zajedno sa drugim šećerima čine rezervnu materiju koja služi kao izvor energije za ćeliju. Celuloza, zbog karakteristične vlaknaste strukture pruža

zaštitnu barijeru ćeliji. Značajan polisaharid, koji se može naći u ćeliji, je i β 1-3 glukan, sa izraženim koristima po zdravlje ljudi.

Najzastupljeniji pigment u *C. vulgaris* je fotosintetički pigment hlorofil, koji može dostići 1-2% suve mase i nalazi se u tilakoidima. Osim hlorofila a i b, sadrži i značajne količine karotenoida (β -karoten, ksantofili), koji deluju kao dodatni pigmenti. Pojedini pigmenti imaju zaštitnu ulogu, štite molekule hlorofila od degradacije i izbeljivanja tokom izlaganja kiseoniku i jakoj radijaciji.

Od vitamina sadrži vodorastvorljive vitamine B i C, kao i vitamine A, D, E, i K koji su rastvorljivi u lipidima. Takođe proizvodi brojna jedinjenja sa antimikrobnim svojstvima. Hlorelin je prvo jedinjenje izolovano iz vrste *Chlorella vulgaris* koje je delovalo inhibitory na gram pozitivne i gram negativne bakterije.

Primena *Chlorella vulgaris* u poljoprivredi

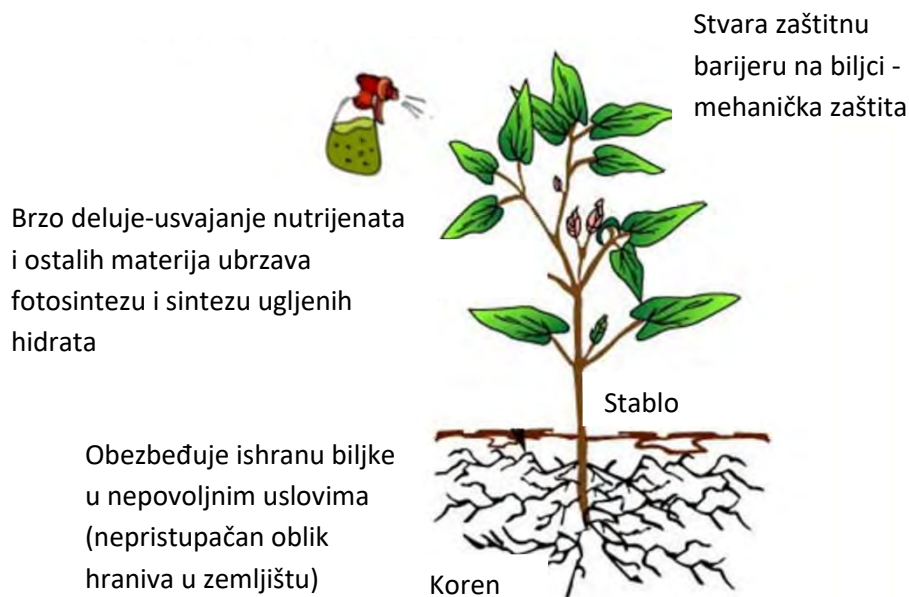
Alge kao biofertilizatori, predstavljaju alternativu za agrohemikalije, koje uzrokuju mnogobrojna zagađenja zemljišta. One povećavaju sadržaj hranljivih materija u zemljištu, luče polisaharide, koji poboljšavaju strukturu zemljišta i bioaktivne supstance, koje poboljšavaju rast biljaka. Algalni ekstraćelijski polisaharidi poseduju adhezivna svojstva i zbog toga se lako pričvršćuju na čvrstu površinu i formiraju zemljišne čestice. Na taj način se značajno smanjuje erozija zemljišta. Agregacija zemljišta i raspored zemljišnih agregata su veoma važni jer direktno utiču na temperature i vodno - vazdušni režim zemljišta.

Korišćenjem živih ćelija algi kao i algalnog ekstrakta, postiže se efekat biofertilizatora, koji je pogodan za poboljšanje parametara rasta kod velikog broja biljnih vrsta (Slika 70). U novije vreme, sve je češća primena živih kultura i vodenog ekstrakta *C. vulgaris*, u vidu folijarne ishrane biljaka. Na ovaj način se biljka obezbeđuje potrebnim i pristupačnim hranljivim materijama, amino kiselinama, vitaminima i enzimima. Folijarna primena obezbeđuje i formiranje algalnog biofilma na nadzemnom delu biljke, koji ima zaštitnu ulogu, smanjuje evapotranspiraciju, pruža mehaničku barijeru, štiti biljku od napada fitopatogenih mikroorganizama i parazita.

Biofertilizatori sa *C. vulgaris* utiču na parametre rasta i imaju fiziološki uticaj na klijanje semena biljaka u medijumu za uzgoj. Postiže se značajno povećava prinosa sveže i suve mase klijanaca kao i sadržaja pigmenta.

Fizioaktivatori su grupe jedinjenja koji se nalaze u algalnom ekstraktu i imaju pozitivan efekat na rast i prinos biljaka. Mehanizam fizioaktivacije se zasniva na nekoliko mehanizama koji se odvijaju paralelno. npr. stimulacija enzimske aktivnosti biljaka koja pospešuje mineralnu ishranu. Za bolju ishranu biljaka su veoma bitni enzimi, naročito nitrat reduktaza i fosfataze. Ako je poboljšano usvajanje nutrijenata iz zemljišta, pre svega azota, fosfora, kalijuma, magnezijuma, mangana i gvožđa, biljka će imati i malo promenjen hemijski sastav. Drugi mehanizam je stimulacija procesa fotosinteze povećanjem sadržaja hlorofila u listovima, kao i veća aktivnost hlorofila. Na ovaj način se povećava sinteza biljne biomase. Formiranje cvetova i plodova je izraženije zbog veće sinteze poliamina, koji stimulišu deobu ćelije. Veći broj cvetova znači i da je procenat polinacije veći, kao i proces formiranja plodova.

Bioaktivatori koji se dobijaju od algi se najčešće primenjuju nakon klijanja semena biljaka, u vidu folijarne primene, mada se može primenjivati i direktno u zemljište (Slika 71).



Slika 70. Folijarna primena algalnih preparata-osnovne prednosti primene

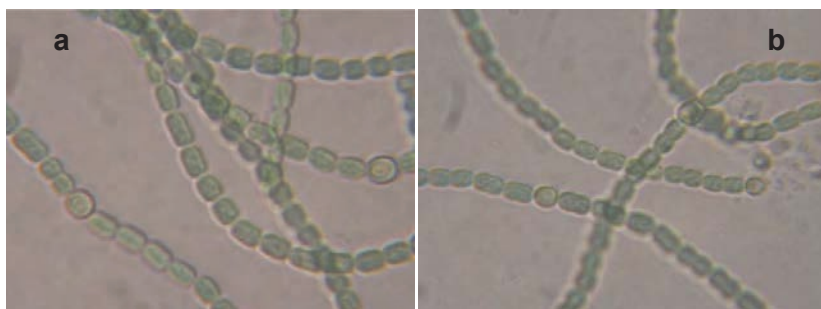


Slika 71. Različiti načini folijarne primene preparata (foto: autori)

CIJANOBAKTERIJE

Cijanobakterije (*Cyanobacteria*) spadaju u fotoautotrofne i azotofiksirajuće organizme. Žive na različitim staništima, u zemljištu, slanim i slatkim vodama. Mogu rasti i na staništima sa ekstremnim uslovima, obzirom da spadaju u grupu mikroorganizama kolonizatora matične stene/supstrata. Rastu u termalnim izvorima, ali ih ima i na Antarktiku. Ipak im odgovaraju više temperature, te su zastupljene i u tropskim krajevima. Spadaju u grupu alkalofilnih mikroorganizama.

Cijanobakterije mogu biti jednoćelijske, iako mnogi predstavnici žive u kolonijama ili formiraju filamente. Nemaju flagele, ali neke cijanobakterije kao *Oscillatoria* se kreće kliznim kretanjem. Postoje vrste koje vrše i proces fiksacije azota u specijalizovanim ćelijama koje se nazivaju heterociste. Najznačajniji rodovi azotofiksirajućih cijanobakterija su *Nostoc* spp. i *Anabaena* spp. (Slika 72), zatim *Aulosira*, *Calothrix*, *Plectonema*.



Slika 72. Nostoc (a) i Anabaena (b)
(foto: autori)

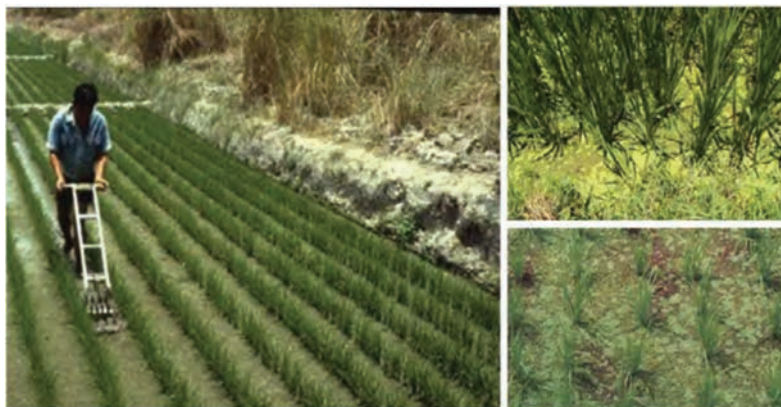
Cijanobakterije su takođe izvor brojnih organskih molekula, ugljenih hidrata, lipida, proteina, ali i pigmenata, vitamina i brojnih drugih metabolički aktivnih jedinjenja (Tabela 11).

Tabela 11. Jedinjenja poreklom iz cijanobakterija koja stimulišu rast biljaka

Pigmenti	- β -karoten, astaksantin, lutein, zeaksantin, kantaksantin, hlorofil, fikocijanin, fikoeritrin, fukoksantin
Vitamini	- A, B1, B6, B12, C, E, biotin, riboflavin, nikotinska kiselina, pantotemat, folna kiselina
Antioxidanti	- katalaze, polifenoli, superoksid dizmutaza, tokoferoli
Ostalo	- antimikrobna, antifungalna, antivirusna jedinjenja, amino kiseline, proteini, steroli, indol sirćetna kiselina, indol propionska kiselina

Primena cijanobakterija u poljoprivredi

Cijanobakterije su u okviru poljoprivrede naročito značajne u proizvodnji pirinča. Gajenje, odnosno kultivacija cijanobakterija i njihova primena kao fertilizatora u pirinčanim poljima je započela u Japanu. Termin ‘algalizacija’ je upravo označavala proces primene čistih kultura cijanobakterija na poljima malih proizvođača. Azotofiksirajuća cijanobakterija, koja živi u simbiozi sa vodenom paprati *Azolla* sp. se koristila u poljima Vijetnama i Kine, od 11-stog odnosno 14-tog veka, kao zelenišno đubrivo (Slika 73).



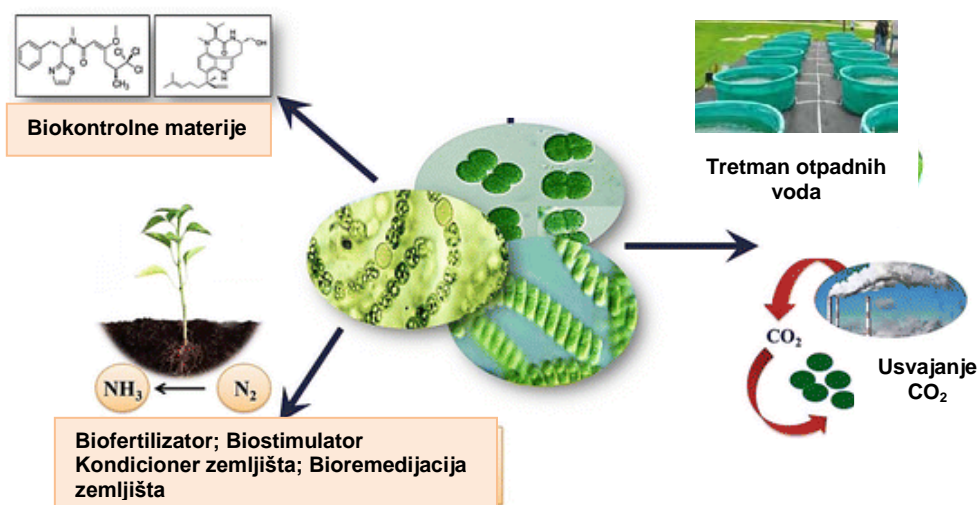
Slika 73. Primena *Azolla* sp.-algalizacija
(preuzeto: <http://theazollafoundation.org>)

Postoji veliki broj biopreparata sa azotofiksirajućim cijanobakterijama, koje u velikoj meri smanjuju upotrebu mineralnih azotnih đubriva. Upotrebom ovih preparata se utiče i na kvalitet zrna pirinča, sa akcentom na sadržaj proteina. Primenuju se inokulumi sa rodovima *Nostoc*, *Anabaena*, *Tolypothrix* i *Aulosira*. Na ovaj način se obezbedi i do 60 kg/ha/sezoni azota. U mnogo manjoj meri se koriste inokulumi sa azotofiksirajućim cijanobakterijama iz rodova *Calothrix*, *Tolypothrix* i *Scytonema* sa ciljem poboljšanja kvaliteta zemljišta i stimulacije rasta gajenih biljaka u neplavljenim sistemima kao što su paradajz, pšenica, kukuruz, salata, pamuk, šećerna trska.

Pored važne uloge u kruženju azota, cijanobakterije su značajne i u procesima razgradnje nepristupačnih, u vodi nerastvoljivih fosfata kao što su $(Ca)_3(PO_4)_2$ (trikalcijum difosfat), $FePO_4$ (gvožđe ortofosfat); $AlPO_4$ (aluminijum fosfat) i $(Ca_5(PO_4)_3(OH))$ (hidroksilapatit). Učestvuju u procesima mineralizacije i razgradnje organskih oblika fosfata/ortofosfata, kao i u mobilizaciji neorganskih fosfata sekrecijom ekstracelularnih fosfataza i organskih kiselina. Od enzima se izdvajaju kisela i alkalna fosfataza, a kao dobri producenti ovih enzima su se izdvojili *Anabaena doliolum*, *A. torulosa*, *Nostoc carneum* i *N. piscinale*.

Cijanobakterije proizvode i veliki broj bioaktivnih jedinjenja koja utiču na rast i razvoj biljaka (Slika 74). Oni uglavnom sadrže fitoregulatorye kao što su giberelini, auksini, citokinini, etilen i abscisinska kiselina. Biljke imaju mnogo koristi od cijanobakterija jer one proizvode materije značajne za unapređenje biljnog rasta (vitamine, aminokiseline, polipeptide), antibakterijske i antifungalne supstance (biokontrolu fitopatogena), kao i polimere egzopolisaharida.

Cijanobakterije su značajne u procesima degradacije pesticida i bioremedijaciji zemljišta koji su zagađeni agrohemikalijama. Biološko uklanjanje ovih materija uz pomoć cijanobakterija se sve više primenjuje. Vrste *Nostoc linckia*, *N. muscorum*, *Oscillatoria animalis* i *Phormidium foveolarum* razgrađuju organofosfatne insekticide kao što je metil-paration. Izuzetno toksičan lindan razgrađuje *Anabaena* sp. ali i vrste iz rodova *Oscillatoria*, *Synechococcus*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Cyanothece*, *Synechococcus* i *Anabaena cylindrica*. Metali kao što su bakar, olovo, cink, nikl, kadmijum i hrom iz zemljišta izdvajaju cijanobakterije *Spirulina platensis*, *Oscillatoria angustissima*, *Microcystis* spp. i *Synechococcus* spp.



Slika 74. Uloga cijanobakterija u poljoprivredi (prema Yadav et al., 2017)

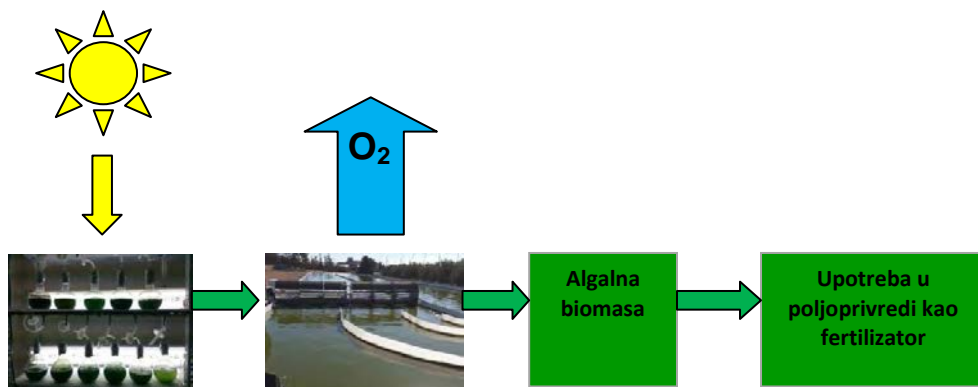
Cijanobakterije pozitivno utiču na proces formiranja strukturnih agregata. Povećavaju kapacitet zadržavanja vode produkcijom egzopolisaharida, koji imaju ulogu lepka. Smanjuju salinitet zemljišta, sprečavaju rast korova, a nakon odumiranja povećavaju sadržaj organske materije u zemljištu. Primenom inokuluma sa cijanobakterijama, sadržaj organske materije se povećava između 5-35%.

Perspektiva primene inokuluma sa cijanobakterijama mnogo zavise od uspeha u procesu selekcije efektivnih kultura cijanobakterija, kao i stepena preživaljavanja i performanse u poljskim uslovima. Bitna je optimizacija proizvodnih uslova koja će obezbediti produkciju maksimalnih količina biomase uz što manje troškove proizvodnje. Razvoj tehnologije, čak i zelenih tzv. low-cost tehnologija, koje će sa jedne strane doprineti prečišćavanju otpadnih voda, a sa druge strane obezbediti značajne količine biljnih nutrijenata (npr. fosfor), su presudne u popularizaciji primene cijanobakterija u budućnosti. Ne treba zanemariti ni mogućnost primene u uslovima suše, u restoraciji suvih zemljišta.

SPECIFIČNOSTI PROIZVODNJE ALGALNIH BIOPREPARATA

Osnovna prednost upotrebe algalne biomase, sastavljene od lipida, ugljenih hidrata i proteina, je to što se može proizvesti veoma brzo u poređenju sa proizvodnjom biomase viših biljaka – dakle, na malim površinama, u velikim količinama i u kratkom vremenskom periodu.

Proizvodnja algi je najčešće povezana sa prečišćavanjem otpadnih voda, odnosno otpadne vode se koriste kao podloga za razvoj algi. Druga specifičnost je da alge mogu da koriste velike količine CO₂, dakle ne postoji potreba za ulaganjem fosilnih goriva (Slika 75).



Slika 75. Konverzija svetlosne energije u algalnu biomasu

Postoje dva velika sistema proizvodnje algalne biomase:

1. otvoreni sistemi
2. zatvoreni sistemi

Otvoreni sistemi podrazumevaju proizvodnju algalne biomase u bazenima različite zapremine (Slika 76). Često se koriste zbog relativno niske cene proizvodnje. Bazeni su najčešće dubine između 20 i 50 cm, a mogu biti sa ili bez sistema za mešanje algalne kulture. Obzirom da su bazeni otvoreni, velika količina zagađivača dospeva u sistem (čestice zemljišta, partikule iz vazduha, mikroorganizmi, itd.), pa se povećava opasnost od kontaminacije. Pošto je izražena i evaporacija, mora se povremeno dodavati voda ili

hranljivi rastvor. Velik problem je i niska koncentracija algi koja se dobija na ovaj način. Brza detekcija, dijagnoza i adekvatan tretman su ključni za održavanje proizvodnje na optimalnom nivou. Na ovaj način se najviše proizvode *Arthrospira* spp. (*Spirulina*) i *Dunaliella* spp.



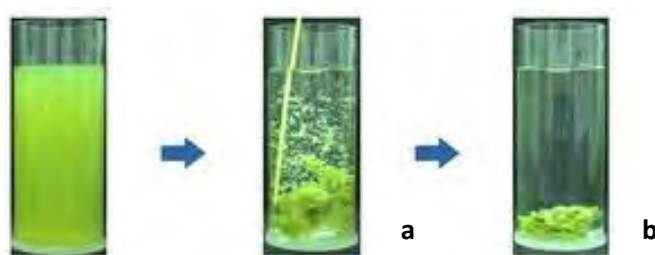
Slika 76. Otvoren sistem proizvodnje algalne biomase
(foto: V.Seman)

Zatvoreni sistemi koji se koriste za proizvodnju algalne biomase se nazivaju bioreaktori ili fotobioreaktori (Slika 77). Ovi sistemi se koriste za fototrofnu kultivaciju algi gde se izvor svetlosti obezbeđuje direktno (sunčevo zračenje) ili indirektno sa veštačkim izvorima svetlosti (LED lampe). Cirkulacija algalne biomase je takva da se obezbedi jednako izlaganje algalne kulture svetlosti. Ovakav sistem proizvodnje je manje izložen delovanju abiotičkih faktora, mnogo je lakša kontrola proizvodnog procesa te je znatno smanjen rizik od kontaminacije. Iako su utrošak energije i troškovi proizvodnje algalne biomase u zatvorenom sistemu veći u odnosu na proizvodnju u otvorenom sistemu, na ovaj način se dobija algalna kultura koja je gušća (veća koncentracija), što kasnije dosta olakšava manipulaciju sa biomasom, i smanjuje druga ulaganja. Održavanje sastava vode u sistemu je lakše jer ono nije izloženo kiši i evaporaciji. Izloženost algalne kulture svetlosti je mnogo ujednačenije nego u otvorenim sistemima. Zatvoreni sistemi mogu biti različiti po veličini, obliku, materijala od kojih se prave, principima rada.



Slika 77. Različiti zatvoreni sistemi kultivacije algi-large scale: flat-vertikalni paneli, horizontalni i vertikalni tubularni fotobioreaktori
(foto: V.Seman)

Ubiranje algalne biomase se vrši pomoću različitih metoda. Najviše se upotrebljavaju metode centrifugiranja, filtracije, flokulacije-agregacija ćelija mikroalgi (sa različitim organskim i neorganskim jedinjenjima, bioflokulacija sa mikroorganizmima, elektro-koagulacija, alkalna flokulacija), sedimentacije i flotacije (Slika 78). Ne postoji jedna univerzalna metoda za ubiranje algalne biomase, svaka ima određene prednosti i nedostatke. U odabiru adekvatne metode se mora voditi računa i o troškovima, jer ona učestvuje sa 20-30% od ukupnih troškova proizvodnje algi.



Slika 78. Proces flokulacije (a) i sedimentacije (b)

Delimično ili potpuno sušenje algalne biomase se izvodi u zavisnosti od potreba (Slika 79). Dobijen proizvod se dalje prerađuje (ekstrakcija različitih metabolita) ili koristi za određenu namenu npr. za đubrenje, kada se alge koriste u svojstvu biofertilizatora i kada se unose u zemljište. Ta biomasa je odličan izvor organske materije, koja se brzo razlaže i značajno poboljšava nutritivni status zemljišta, odnosno usvajanje makronutrijenata i mikronutrijenata od strane biljaka.



Slika 79. Algalna biomasa-vlažna i suva
(foto: V.Seman)

10. BIOPESTICIDI

Biopesticidi su preparati koji se koriste za zaštitu gajenih vrsta biljaka. Ekološki su veoma bezbedni, brzo se razgrađuju i pokazuju visok stepen selektivnosti i efikasnosti u delovanju. Biopesticidi se prave od različitih prirodnih materijala, biljnog i životinjskog porekla, kao i od mikroorganizama. U zavisnosti od toga da li deluju na štetne insekte, gljive, korove ili nematode, možemo ih podeliti na: bioinsekticide, biofungicide, bioherbicide i bionematocide.

BIOINSEKTICIDI

Bioinsekticidi su preparati koji sadrže efektivne sojeve mikroorganizama, koji mogu da se koriste za uništavanje štetnih insekata-biljnih štetočina, ispoljavajući neki od netoksičkih mehanizama delovanja. Zajednička osnovna karakteristika svih bioinsekticida je da se nakon njihove primene ne javlja problem štetnih rezidua kao i rezistencije. Mogu da se koriste u organskoj proizvodnji, ne postoji ni karenca. Svaki insekticid deluje na određeni organizam-vrstu insekta, benigni su za ostale korisne insekte, ne dovode do zagađivanja vode, vazduha i zemljišta.

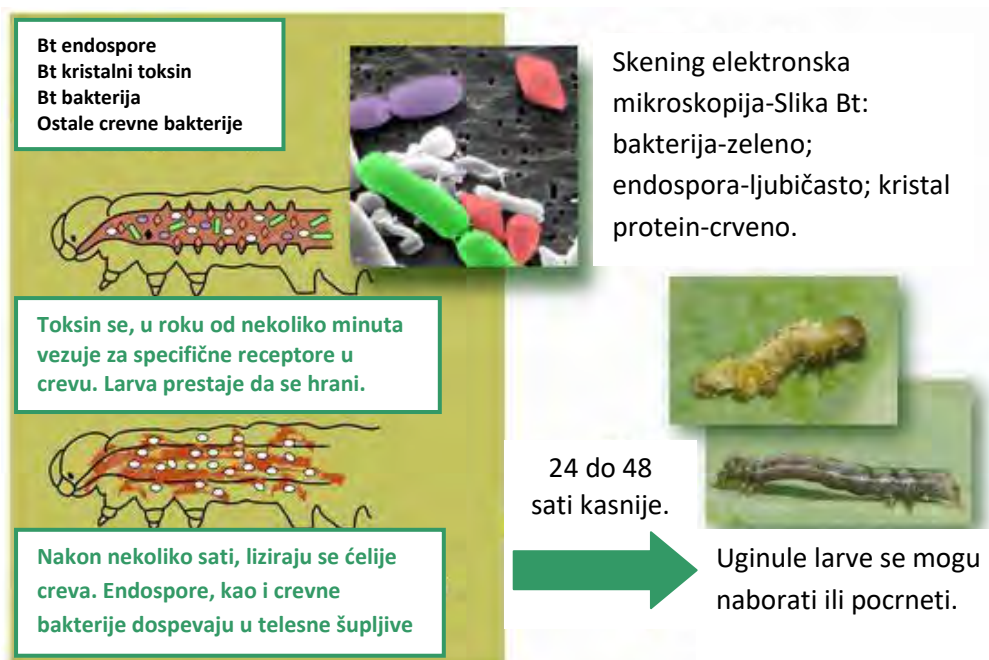
Na tržištu postoji velik broj bioinsekticida koji se proizvode od mikroorganizama i to bakterija, gljiva, virusa i protozoa.

Bioinsekticidi na bazi bakterija

Bacillus thuringiensis je bakterijska vrsta koja se najviše koristi u borbi protiv štetnih insekata.

Bacillus thuringiensis israelensis Bti i *Bacillus sphaericus* 2362 (*Bs*) su izuzetno efikasne u borbi protiv komaraca i drugih diptera. *B. thuringiensis* spp. *kurstaki* i *aizawai*, se koriste u borbi protiv larvi lepidoptera dok je *B. thuringiensis tenebrionis*, aktivan protiv koleoptera (adulta i larvi) i to naročito protiv krompirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata*). *B. thuringiensis japonensis* soj Buibui, je aktivan protiv insekata koji nastanjuju zemjište.

Svi bacilusi produkuju kristalne protein - endotoksine različite toksičnosti, koji ubijaju štetne insekte. Bakterija proizvodi toksin tokom sporulacije, a da bi ostvarila svoj toksičan efekat, mora biti usvojena od strane larve. Nakon što larva usvoji toksin, dolazi do oštećenja crevnog trakta, a potom i do paralize. Larva prestaje da se hrani i umire od posledica kombinovanog efekta izgladnjivanja i oštećenja epitela creva (Slika 80).

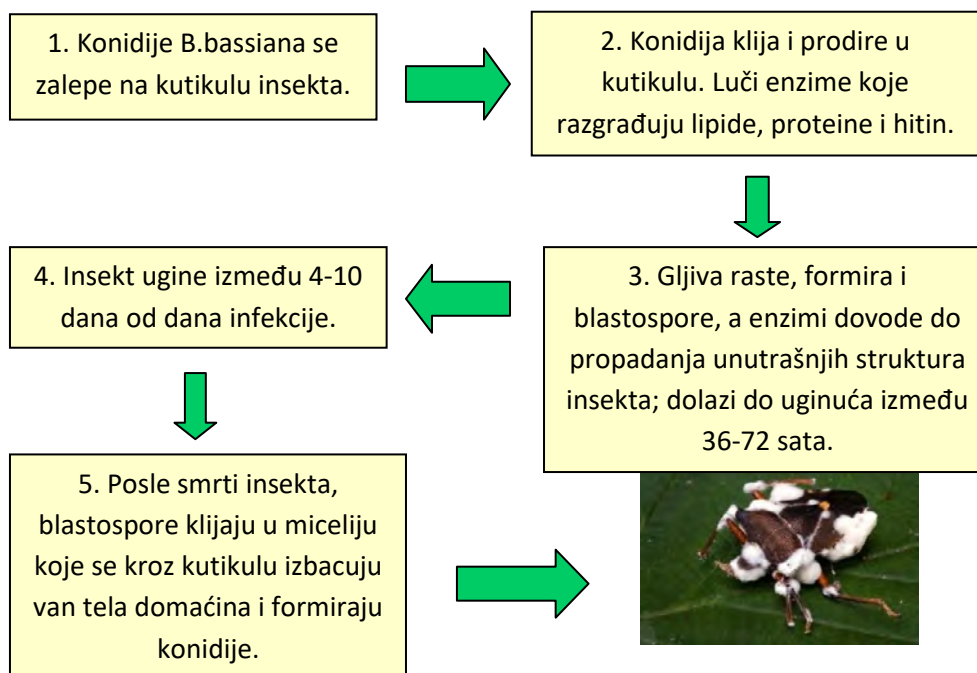


Slika 80. Mehanizam delovanja *Bacillus thuringiensis*
 (Preuzeto i prilagođeno: <https://ipm-info.org/natural-enemies/bacillus-thuringiensis>)

Bioinsekticidi na bazi gljiva

Metarhizium anisopliae Sorokin var. *anisopliae* je veoma značajna i puno primenjivana entomopatogena gljiva. Živi u zemljištu i napada velik broj vrsta insekata. Prvi put ju je opisao Metschnikoff 1879. godine, pod nazivom *Entomophthora anisopliae*. Današnji naziv dobija 1883. godine od strane Sorokina. *Metarhizium* raste u zemljištu, formira filamente i infektivne spore-konidije koje inficiraju insekta - domaćina. *M. anisopliae* ima ogroman potencijal primene, naročito protiv komaraca - vektora malarije.

Beauveria bassiana raste u zemljištu, od peskovitog do šumskog, kao i obradivom. Izolovana je iz inficiranih insekata koji pripadaju različitim rodovima. Uspešna infekcija zavisi od brojnih faktora, kao što je prisustvo domaćina, faza razvoja insekta, uslova spoljašnje sredine, kao što su temperatura i vlažnost. Konidije *B. bassiana* počinju da kličaju oko 10 sati nakon infekcije, a na temperaturu od 25°C se završi za 20 sati. Klijala spora prodire kroz penetrabilne delove kutikule (zglobovi, delovi usnog otvora), produkujući ekstracelularne proteaze i hitinaze. Na taj način se polako inicira proces razgradnje čvrstog omotača insekata koja je praćena rastom hifa. Nakon uspešne penetracije, gljiva brzo prožima unutrašnje organe i tkiva, dodatno produkuje toksine, kao sekundarne metabolite. Veoma brzo dolazi do uginuća insekta (Slika 81).

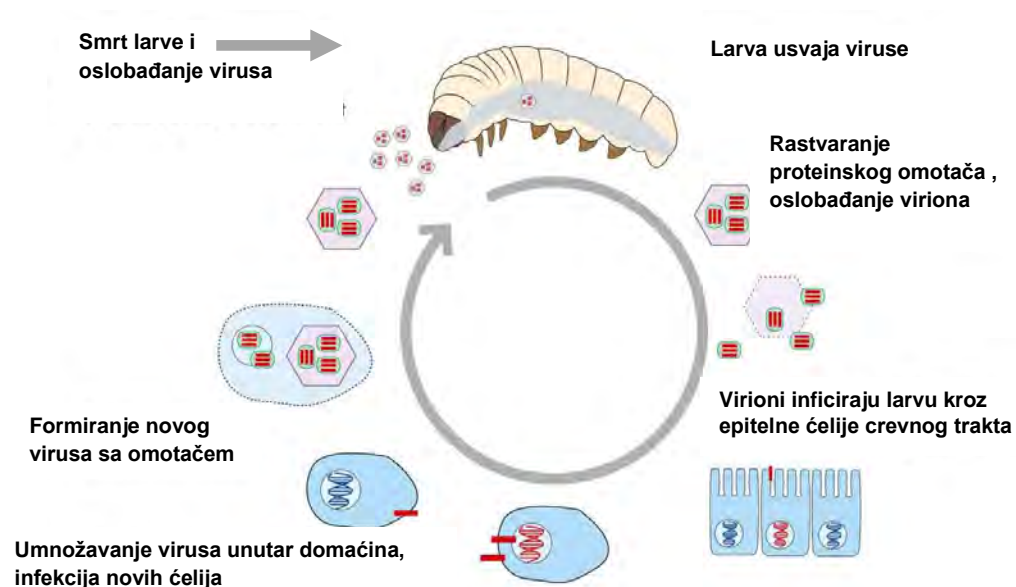


Slika 81. Infektivni ciklus *B. bassiana*

Bioinsekticidi na bazi virusa

Bakulovirusi (*Baculovirus*) su virusi sa duplom heliksom DNK, koji se nalaze u mnogim insektima. Uglavnom su virusi sa izraženom patogenosti. Uprkos tome, bakulovirusi se relativno malo koriste, uglavnom protiv lepidoptera, i to u fazi larve. Nakon ulaska virusa u digestivni trakt larve, dolazi do njihovog širenja po celom telu (Slika 82).

Bakulovirusi su virusi koji su obavijeni sa proteinskim omotačem, koji ga štiti od štetnog delovanja spoljašnje sredine.



Slika 82. Životni ciklus bakulovirusa (preuzeto: www.andermttbiocontrol.com)

Bioinsekticidi na bazi protozoa

Nosema sp. je protozoa koja izaziva različite hronične infekcija kod velikog broja insekata. Biološka aktivnost entomopatogenih protozoa je kompleksna. Rastu isključivo unutar živog domaćina, a neke vrste zahtevaju i neke prelazne domaćine u svom životnom ciklusu.

Nosema locustae je patogena vrsta na skakavcima i jedina je vrsta protozoa koja je registrovana i koristi se u komercijalnom preparatu.

Vairimorpha necatrix je druga vrsta protozoa koja spada u entomopatogene. Produkuju spore koje su infektivne. Klijanjem spora unutar gastrointestinalnog trakta dolazi do masivne infekcije i propadanja organa i tkiva insekata.

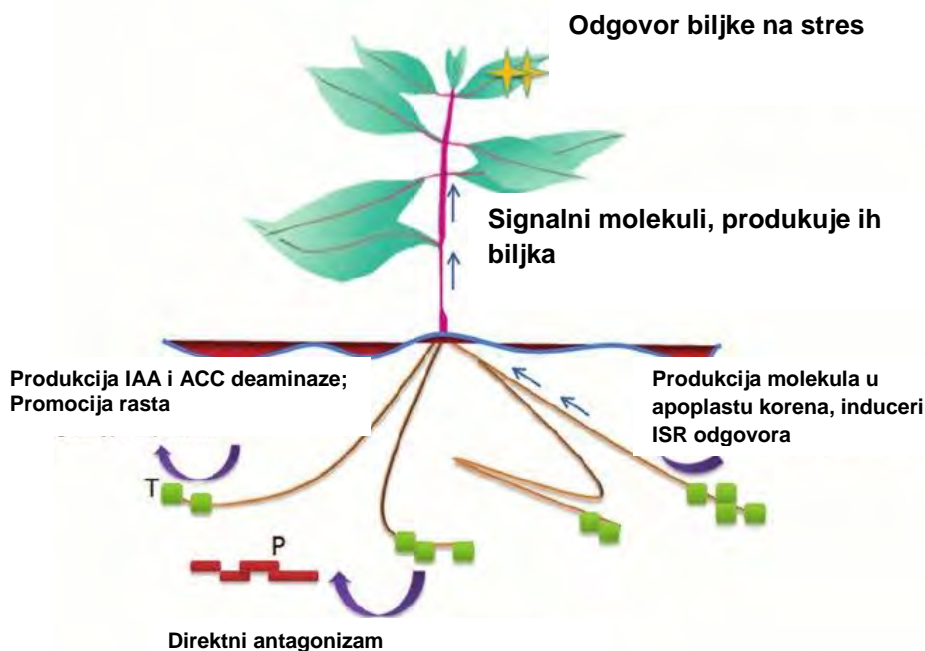
BIOFUNGICIDI

Biofungicidi su mikrobiološki preparati koji se koriste u borbi protiv fitopatogenih gljiva. Za proizvodnju biofungicida najviše se koriste bakterije i gljive.

Mehanizmi delovanja biofungicida se baziraju na kompeticiji, parazitizmu, predatorstvu i amensalizmu.

Kompeticija je vid antibioze gde se mikroorganizmi, koji se koriste u borbi sa patogenima, moraju introdukovati i umnožiti u dovoljnom broju da ostvare željeni efekat. Veoma je važno da se primena mikroorganizama izvrši pre pojave patogena, u protivnom očekivani efekat kontrole može izostati. Dakle, biofungicidi deluju preventivno, a ne kurativno. Parazitizam je vid odnosa kada jedan mikroorganizama živi na račun drugog mikroorganizma, pri čemu ga koristi kao izvor nutrijenata, dok predatorstvo podrazumeva odnos u kom se mikroorganizam hrani sa patogenim. Kada biokontrolni organizam produkuje neki od sekundarnih metabolita, koji deluje toksično ili inhibitorno na rast patogena, govorimo o amensalizmu. Produkcija metabolita sa antibakterijskim i antifungalnim efektom se puno koristi u borbi sa fitopatogenim mikroorganizmima. Različita jedinjenja iz grupe antibiotika i enzimi deluju na ćeliju, odnosno na određene komponente ćelije patogena i time remete njeno normalno funkcionisanje.

Indukovana otpornost se javlja kada se biljke domaćini inokulišu biokontrolnim organizmom sa ciljem izazivanja ovog tipa otpornosti (Slika 83). Tada se u biljci aktivira odbrambeni sistem, tj. mehanizmi borbe za usporavanje infekcije.



Slika 83. Delovanje mikroorganizama na biljku-indukovana sistemska otpornost. T- *Trichoderma* sp.; P-patogen; IAA-indol-3-sirćetna kiselina; ACCD-ACC deaminaza; ET-etilen; JA-jasmonska kiselina; SA-salicilna kiselina; ISR-indukovana sistemska otpornost (prema Hermosa et al., 2012)

Povećana produktivnost biljaka može biti posledica uticaja PGPR sojeva na štetne mikroorganizme i zemljišne patogene. Fluorescentne *Pseudomonas* spp. su među najefikasnijim rizosfernim bakterijama koje utiču na smanjenje intenziteta bolesti izazvanih nekim zemljišnim patogenima. Utvrđeno je da različita strukturna i metabolička jedinjenja mogu izazvati ISR. Tako lipopolisaharidi spoljašnje membrane bakterijske ćelije (LPS), pseudobaktin-siderofore, antibiotici i flagele nekih nepatogenih *Pseudomonas* sojeva mogu indukovati ISR u pojedinim biljnim vrstama. Indukovana sistemska otpornost je zavisna od etilena i jasmonske kiseline i ne dovodi do sinteze PR proteina (proteini koje proizvodi biljka domaćin u stresnim uslovima). Ispoljavanje ISR zavisi od samog odnosa biljke i PGPR soja. ISR je ograničena na nekoliko biljnih vrsta. Zanimljivo je da ISR nije zabeležena kod monokotiledonih biljaka. Do pojave ISR dolazi samo kada populacija bakterija pređe određeni prag koncentracije, koji na primer u slučaju *P. fluorescens* sojeva WCS375 i WCS417 iznosi 10^5 CFU/g korena. Pri nižoj koncentraciji ne dolazi do ispoljavanja otpornosti. Efikasnost indukovane otpornosti je promenljiva, s obzirom da se ispoljava kao odgovor biljke na pokušaj infekcije i da je uslovljena genotipom, fiziološkim statusom biljke i uslovima spoljašnje sredine.

Bacillus subtilis, *Pseudomonas aureofaciens*, *Streptomyces griseoviridis* su bakterije koje se koriste u borbi protiv fitopatogenih gljiva. Mehanizam delovanja ovih bakterijskih vrsta zasnovan je na kolonizaciji korena biljke i kompeticiji sa patogenim mikroorganizmima. Osim toga, često proizvode i aktivne materije koje sprečavaju ili usporavaju rast patogena. Međutim, oko 60% biofungicida koje se nalaze na tržištu sadrže gljivu *Trichoderma harzianum*, kao aktivni agens.

***Bacillus* spp. kao biofungicid**

Prvi biofungicidni preparat na bazi bacilusa proizveden je 1994.godine, u vidu formulacije za tretiranje semena različitih biljaka.

Bakterije ovog roda ispoljavaju različite mehanizme kojima učestvuju u procesu suzbijanja biljnih patogena. Jedna grupa mehanizama direktno deluje na **suzbijanje patogena**, a druga grupa deluje kroz **indukovanje sistemske rezistentnosti biljke**.

Suzbijanje fitopatogena, bacilusi postižu produkcijom isparljivih sekundarnih metabolita sa biokontrolnim osobinama (cijanidi, HCN). Osim toga produkuju i lipopeptide koji ispoljavaju fungicidni efekat, antibiotike (oligomicin A, kanosamin, ksantobacin) sa širokim spektrom delovanja, kao i različite hidrolitičke enzime (fosfataze, dehidrogenaze, hitinaze, proteaze, celulaze, lipaze, β -glukozidaze, N-acetil- β -glukozaminidaze, β -1,3-glukanaze, β -1,4-glukanaze), koji imaju sposobnost razgradnje ćelijskog zida fitopatogena (Slika 84). Pojedine vrste ovog roda produkcijom ekstracelularnih enzima neutrališu razorno delovanje celulaza i proteaza (litički enzimi produkovani od strane fitopatogena) na biljnu ćeliju.



Slika 84. Antagonistički odnosi izolata *Bacillus* sp. B1 i gljiva (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*) -zone inhibicije rasta
(foto: autori)

Značajan mehanizam suzbijanja patogena je i kompeticijski odnos. Ovaj vid odnosa naročito dolazi do izražaja sa fitopatogenim gljivama iz roda *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Aspergillus*, ali i fitopatogenim bakterijama različitih rodova. Bakterije roda *Bacillus* imaju sposobnost da veoma uspešno i brzo kolonizuju rizosferu, da se lako prilagode promenama uslova u zemljištu, kao i da produkuju endosporu u slučaju nepovoljnih uslova. Sve ove osobine im omogućavaju da budu u prednosti u odnosu na druge mikroorganizme, pa i fitopatogene, prilikom zauzimanja nove ekološke niše.

Poznato je da je gvožđe mikronutrijent neophodan za normalan razvoj svih ćelija, pa i ćelija mikroorganizama. U zemljištu ga ima veoma malo, pa je kompeticija za ovim elementom u zemljištu velika. *Bacillus* spp. ima sposobnost da produkuje siderofore, kojima obezbeđuje sebi dovoljne količine gvožđa, a time smanjuje količinu dostupnog mikronutrijenta neophodnog za rast patogena, čime indirektno utiče na njihovu brojnost i aktivnost.

Biljni polisaharidi, koji grade ekstracelularni matriks, mogu da aktiviraju kod pojedinih bacilusa stvaranje biofilma na listovima biljke ili na korenu. Na ovaj način,

putem produkcije ovog sluzavog sloja, bakterije doprinose očuvanju vitalnosti biljke i zaštiti od štetnog uticaja različitih spoljnih faktora, a samim tim i fitopatogena.

Prisustvo *Bacillus* spp. u rizosferi biljke aktivira sistemsku rezistentnost biljke na različite patogene mikroorganizme. Bakterije ovog roda aktiviraju sistemsku rezistentnost kod biljaka putem signalnih puteva koje regulišu jasmonat i etilen, ili direktno putem salicilne kiseline.

Utvrđena je i antifungalna aktivnost bakterija ovog roda, posebno prema fitopatogenima kao što su: *Fusarium oxysporum*, *F.solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* i *Colletotricum* sp. (Tabela 12).

Tabela 12. Vrste roda *Bacillus* kao biopesticidi

Vrsta	Fitopatogen	Biljna vrsta
<i>B. subtilis</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Fusarium</i> spp. <i>Alternaria</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. bakterije	- Povrće, voće, pamuk, soja, kikiriki, grašak, ječam, pšenica, pasulj, jabuke, ruže
<i>B. subtilis</i> var. <i>yloliquefaciens</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Fusarium</i> spp. <i>Alternaria</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Sphaerotheca aphans</i>	- Pamuk, leguminoze, plavi patlidžan, jagode
<i>B. licheniformis</i>	<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>	- Trave
<i>B. pumillus</i>	gljive	- Soja
<i>B. amyloliquefaciens</i>	gljive	- Saksijsko cveće

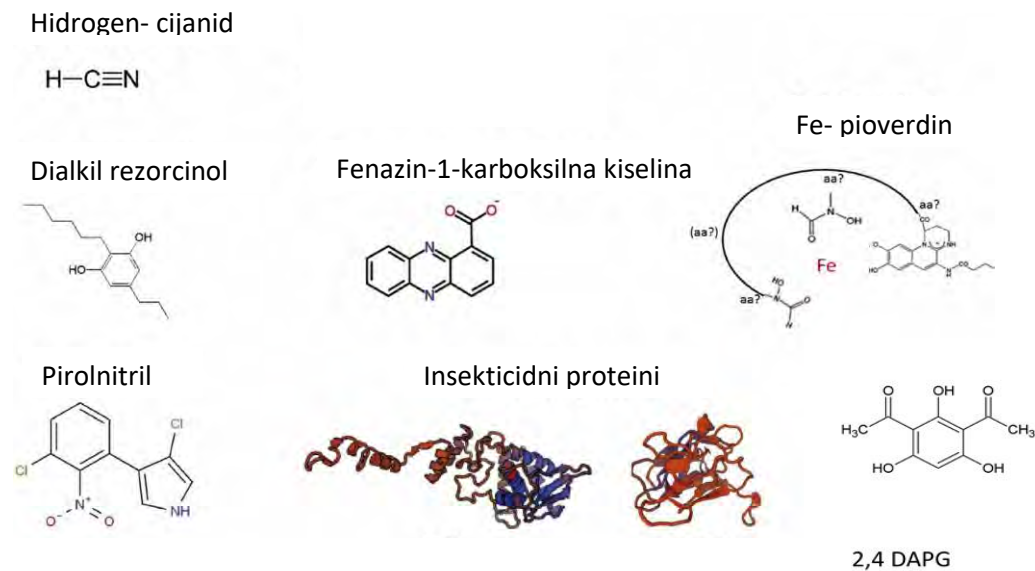
Preparati na bazi *Bacillus subtilis*, obzirom da bacilusi spadaju u sporogene bakterije, su pokazali najveću efikasnost u proizvodnim uslovima. Dobro je preživljavanje bakterija tokom cele vegetacije.

***Pseudomonas* spp. kao biofungicid**

Bakterije roda *Pseudomonas* se već dugi niz godina primenjuju u vidu monovalentnih ili polivalentnih biofertilizatora, i to u proizvodnji različitih biljnih vrsta, pri čemu su zabeleženi veoma dobri rezultati. Poslednjih četrdeset godina, a posebno poslednjih pet godina, *Pseudomonas* spp. se, osim kao promotori biljnog rasta, proučavaju i kao potencijalni biopesticidi, koji se mogu primenjivati u suzbijanju različitih fitopatogena.

Osobina koja čini ove bakterije dobrim faktorom biološke kontrole fitopatogena je pre svega sposobnost ovih bakterija da brzo kolonizuju koren biljke. Najsavremenije metode, kao što je primena zelenog fluorescentnog proteina (Green Fluorescent Protein, GFP) i tehnike na bazi bioluminiscencije, utvrdile su visok nivo sposobnosti kolonizacije korena od strane ovih bakterija. Ono što im omogućava visok stepen kolonizacije korena jeste njihova pokretljivost, brza hemotaksija i adhezija, kao i sposobnost da se izbore sa autohtonim vrstama za prostor i hranljive elemente.

Osim ovoga, veoma značajan mehanizam za suzbijanje fitopatogena, koji ove bakterije poseduju, je sposobnost produkcije velikog broja sekundarnih metabolita kao što su: cijanidi, fenazin, pirolnitrin, pioluteorin, siderofore, 2, 4 DAPG (2,4-Diacetilfloroglucinol) i proteini toksični za insekte (Slika 85).



Slika 85. Sekundarni metaboliti bakterija roda *Pseudomonas*

Cijanovodonik (HCN), isparljivi antimikrobni sekundarni metabolit, koga proizvode pseudomonasi, pomaže u suzbijanju pojavljivanja i širenja mnogih bolesti kod biljaka. Značajna je njegova uloga u suzbijanju bolesti duvana izazvane gljivom *Thielaviopsis basicola*, i mnogih bolesti pšenice prouzrokovanih gljivom *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Ima toksično delovanje na gljive, nematode, insekte i korove.

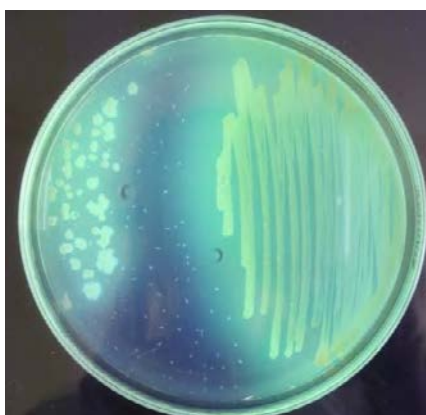
Fenazin pripada grupi heterocikličnih azotnih jarko obojenih pigmenata sa širokim spektrom antibiotskog delovanja. Do sada je opisano 50 različitih fenazina, a pojedini fluorescentni pseudomonasi proizvode čak 10 derivata fenazina. Fenazini imaju toksično dejstvo na bakterije, gljive, protozoe i alge. Iako je prvi put otkriven kod aktinomiceta i arhea iz filuma *Euryarcheota*, danas se zna da ga proizvode i bakterije drugih rodova. Geni za biosintezu različitih derivata fenazina pronađeni su kod mnogih vrsta roda *Pseudomonas*. Najpoznatiji derivati fenazina koje proizvode bakterije roda *Pseudomonas*, a imaju jako antimikrobno dejstvo, su plavi piocijanin (PYO), žuti fenazin-1-karboksilna kiselina (PCA) i narandžasti hidroksi-fenazin (HP). PCA proizvode *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Pseudomonas putida*. Ovaj derivat ima snažno antimikrobno dejstvo na fitopatogene gljive kao što su *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Polyporus* sp., *Sarocladium oryzae*, *Macrophomina phaseolina*, *Pestalotia theae* i vrste roda *Colletotrichum*, kao i na patogene bakterije *Actinomyces viscosus*, *Bacillus subtilis* i *Erwinia amylovora*. Osim toga, produkcija fenazina i njegovih derivata može aktivirati sistemsku rezistentnost biljke na razne fitopatogene. Primer za ovo je produkcija piocijanina, koji učestvuje u aktiviranju sistemske rezistentnosti paradajza prema patogenoj gljivi *Botrytis cinerea*.

Pirolnitril proizvode samo mali broj G- bakterija, uključujući *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonas aureofaciens* i *Pseudomonas fluorescens*). Pirolnitril proizveden od strane

fluorescentnih pseudomonasa ima snažno antagonističko dejstvo prema gljivama, kvascima i G+ bakterijama.

Pioluteorin je metabolit koji je prvo utvrđen kod *Pseudomonas aeruginosa*, a kasnije i kod fluorescentnih pseudomonasa. Ima baktericidno dejstvo, a takođe toksično deluje i na korove, fitopatogene gljive i nematode.

Produkcija siderofora, osim što direktno utiče na biljni rast jer obezbeđuje biljku važnim nutrijentom, to je u isto vreme i jedan veoma snažan mehanizam kojim se može kontrolisati rasprostranjenost fitopatogena. Siderofore lišavaju fitopatogene važnog nutritivnog elementa, gvožđa, te na taj način onemogućavaju njihov rast i razmnožavanje. Siderofore, koje proizvode pseudomonasi, su: piohelin, kvinolobaktin, ornikorugatin i žuti pigment pioverdin (drugi naziv je fluorescin, jer fluorescira) (Slika 86). Primena pseudomonasa koji proizvode siderofore, pokazala se veoma efikasna u borbi protiv fitopatogene gljive *Pythium* sp.



Slika 86. *Pseudomonas* sp.
(fluorescentna boja potiče od fluorescina) (foto: autori)

2, 4 DAPG je prirodno fenolno jedinjenje koga proizvode G- bakterije, najviše iz roda *Pseudomonas*. Ovaj metabolit ispoljava širok spektar antibiotskog delovanja na viruse, bakterije, gljive, a takođe i indukuje sistemsku rezistentnost biljaka prema različitim patogenim mikroorganizmima.

Novija istraživanja su pokazala da *Pseudomonas* spp. mogu proizvoditi proteine koji su toksični za insekte. Ingestija *Pseudomonas chlororaphis*, koji je sadržavao ove proteine, dovela je do smrti larvi roda *Spodoptera* i *Heliothis* (velike štetočine, moljci).

Osim ovih sekundarnih metabolita, utvrđeno je da pseudomonasi proizvode i druge metabolite (oomicin A, antranilat, ciklični lipopeptidi, piohelin, dialkil rezorcinol) sa takođe jakim antimikrobnim dejstvom.

Zbog svih ovih osobina, bakterije roda *Pseudomonas* se danas u svetu koriste u borbi protiv brojnih biljnih patogena (Tabela 13).

Tabela 13. Vrste roda *Pseudomonas* kao biopesticidi

Vrste	Metabolit	Fitopatogen	Biljka
-------	-----------	-------------	--------

<i>P. fluorescens</i>	Fenazin	<i>Gaeumannomyces graminis var. tritici</i>	- Pšenica
	Pioluteorin	<i>Pythium ultimum</i>	- Pamuk krastavci
	Pirrolnitril	<i>Rhizoctonia solani</i>	- Pamuk šećerna repa
		<i>Pyrenophora tritici-repens</i>	- Pšenica
	HCN	<i>Thielaviopsis basicola</i>	- Duvan
	Pioverdin	<i>Pythium ultimum</i>	- Pamuk
	2,4 DAPG	<i>Thielaviopsis basicola</i> <i>Aspergillus niger</i>	- Duvan - Kikiriki
PCA	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	- Pšenica	
<i>P. chlororaphis</i>	Fenazin	<i>Fusarium oxysporum</i>	- Paradajz
	Pirrolnitril	<i>Rhizoctonia solani</i>	- Paradajz
<i>P. aeruginosa</i>	Piocijanin	<i>Septoria tritici</i>	- Pšenica
	2,4 DAPG	<i>Fusarium oxysporum</i>	- Banana
	PCA	<i>Fusarium oxysporum</i>	- Leblebije
<i>P. cepacia</i>	Pirrolnitril	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	- Suncokret
		<i>Colletotrichum truncatum</i>	
<i>P. aurantiaca</i>	2,4 DAPG	<i>Fusarium oxysporum</i>	- Pšenica

U pojedinim državama, *Pseudomonas fluorescens* se koristi kao biološko sredstvo za kontrolu rasta fitopatogenih gljiva roda *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Magnaporthe* i drugih biljnih patogena, povećavajući na taj način prinos i rast biljaka.

***Streptomyces* spp. i druge aktinomicete kao biofungicidi**

Bakterije roda *Streptomyces* pripadaju redu Actinomycetales, razdelu Actinobacteria (Slika 87). Poznate su po tome što proizvode antibiotike i gas geozmin, koji zemljištu daje karakterističan miris.

Iz vrste *Streptomyces griseus*, Waksman je 1943. godine izolovao streptomycin, antibiotik koji mikrobicidno deluje na bakterije koje su otporne na delovanje penicilina.



Slika 87. *Streptomyces* sp. (foto: autori)

Bakterije roda *Streptomyces* poseduju različite mehanizme kojima suzbijaju rast i razmnožavanje patogenih mikroorganizama, pa samim tim na taj način štite i biljku od fitopatogena. Svi ti mehanizmi mogu se razvrstati u sledeće grupe:

1. Produkcija antibiotika
2. Produkcija siderofora
3. Sekretija isparljivih materija
4. Produkcija enzima (hitinaza, proteaza, celulaza, β -3 glukanaza)
5. Kompeticija za prostorom i hranljivim nutrijentima
6. Iniciranje sistemske rezistentnosti biljaka prema patogenima

Njihov glavni mehanizam u biokontroli patogena je sposobnost produkcije metabolita, pre svega različitih antibiotika, siderofora i enzima, koji snažno i direktno utiču na brojnost i aktivnost drugih mikroorganizama. Na primer, *S. violaceusniger* produkuje antibiotik geldanamycin, *S. coelicolor* siderofore, a *S. violaceusniger* antifungalni metabolit nigericin i enzim hitinazu. Svi ovi metaboliti utiču na brojnost patogena, tako što ih ili lišavaju hranljivih elemenata (siderofore), razgrađuju njihov ćelijski zid (enzimi, npr. hitinaze) ili imaju mikrobicidno dejstvo (antibiotik). *Streptomyces* sp. je veoma poznat po produkciji veoma velikog broja različitih antibiotika, koji deluju i antibakterijski ali i antifungalno.

Za neke aktinomicete utvrđeno je da produkuju metabolite koji imaju mikrobistatično ili mikrobicidno delovanje na neke fitopatogene (Tabela 14), te da se uspešno mogu koristiti prilikom uzgajanja različitih poljoprivrednih kultura.

Tabela 14. *Streptomyces* spp. i druge aktinomicete kao biofungicidi

Vrsta	Fitopatogen	Biljka
<i>S. vinaceusdrappus</i>	Različite gljive	- Pirinač
<i>S. netropis</i>	<i>Verticillium</i> sp.	- Pamuk
<i>Actinomadura</i> sp. <i>Micromonospora</i> <i>carbonacea</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	- Kod cveća
<i>Micomonospora</i> <i>globosa</i>	<i>Fusarium udum</i>	- Pamuk
<i>S. griseus</i>	<i>Pythium ultimum</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	- Razne biljke
<i>Streptomyces</i> spp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	- Pšenica

<i>Nocardia levis</i>		- Leblebija
<i>Amorphosporangium auranticolor</i>	<i>Phytophthora megasperma</i>	- Soja
<i>Actinoplanes sp.</i>	<i>Pythium aphinidermatum</i>	- Razne biljke
<i>S. violarus</i>	<i>Alternaria alternata</i>	- Razne biljke
<i>S. kasugaensis</i>	<i>Fusarium sp.</i>	- Pirinač
<i>S. griseorubens</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	- Jagode
<i>S. felleus</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
<i>S. platensis</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Botrytis cinerea</i>	
<i>S. pulcher,</i> <i>S. canescens,</i> <i>S. citreofluorescens</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Verticillium albo atrum</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Pseudomonas solanacearum</i>	- Paradajz

Streptomyces spp. kolonizovanjem korena biljaka pre pojave fitopatogenih mikroorganizama, pre svega gljiva, sprečava njihov razvoj u zoni rizosfere, te ih na taj način lišava ne samo prostora već i hranljivih nutrijenata.

Iako su mnogobrojna istraživanja potvrdila opravdanost upotrebe bakterija roda *Streptomyces* u kontroli biljnih patogena, do danas je proizvedeno svega nekoliko biopreparata na bazi ovih bakterija. Poznati su biofungicidi koji sadrže vrste *Streptomyces griseoviridis* i *Streptomyces lydicus*, a primenjuju se direktno u zemljište ili folijarno. Ovi preparati se koriste za kontrolu fitopatogena *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. i *Botrytis* sp. na povrću, ukrasnom i začinskom bilju.

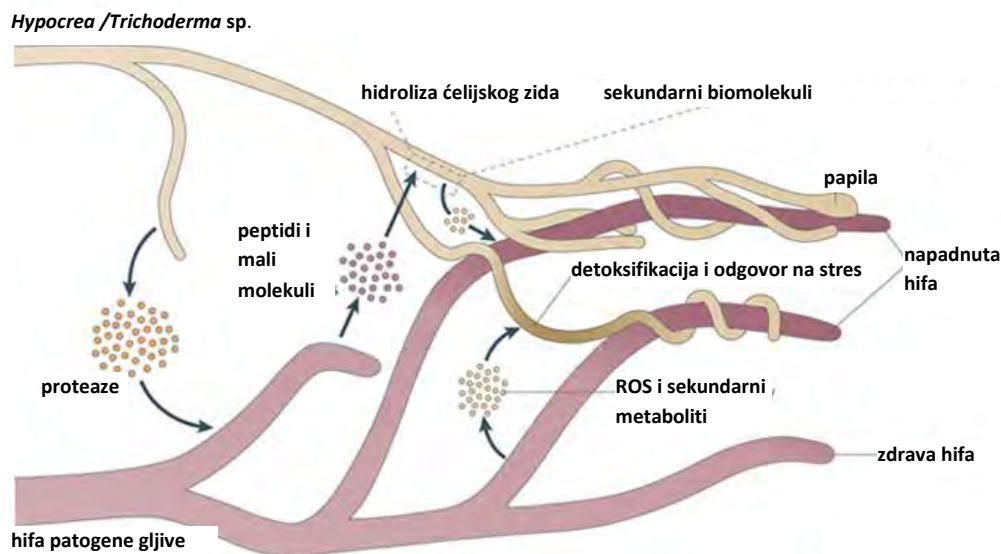
***Trichoderma* spp. kao biofungicid**

Biofungicidno delovanje roda *Trichoderma* sp. zasniva se na antagonističnim odnosima između mikroorganizama: kompeticija, parazitizam, i amensalizam. Pored toga ova gljiva indukuje sistemsku otpornost samih biljaka na prisutne fitopatogene.

Kompeticija, kao biofungicidni mehanizam roda *Trichoderma* spp. prema fitopatogenim gljivama zasniva se na biološkim i fiziološkim karakteristikama samog roda. Brz rast hife, velika produkcija konidija i hlamidospora, rast u širokom rasponu pH vrednosti i temperature, male potrebe za vodom, jednostavni zahtevi za ishranom, osobine su koje vrstama iz roda *Trichoderma* omogućuju da zauzmu više životnog staništa i da se bolje izbore za raspoložive nutrijente. Na taj način sprečavaju rast i širenje fitopatogenih gljiva u zemljištu i ispoljavaju indirektno biofungicidno delovanje.

Mikoparazitizam predstavlja sposobnost vrsta iz roda *Trichoderma* da parazitiraju na hifama fitopatogenih gljiva. *Trichoderma* spp. prepoznaje patogenu gljivu preko malih molekula koji se oslobađaju iz hifa patogena. Neki od ovih molekula mogu biti peptidi koji se oslobađaju dejstvom proteaza koje luči *Trichoderma* spp. pre samog kontakta sa domaćinom. Ovi molekuli se mogu vezati za G protein receptore (kao što je Gpr1, Slika 88) ili receptore za detekciju azota na *Trichoderma* spp. hifama, čime se izaziva signalna kaskada koja sadrži G proteine i aktivirane proteinske kinaze, što može

na kraju uticati na aktivnost još uvek nepoznatih transkripcionih faktora (TFs). Ovi faktori zatim pojačavaju ekspresiju gena koji kodiraju enzime za biosintezu sekundarnih metabolita i za lizu ćelijskog zida. Lektini iz patogene gljive i proteini koji sadrže receptore za vezivanje celuloze iz hifa *Trichoderma* spp. mogu saradivati u vezivanju predatora za plen. Istovremeno, fitopatogena gljiva reaguje formiranjem sekundarnih metabolita i slobodnih kiseoničnih radikala (SKR) koji izazivaju stresni odgovor i detoksikaciju kod *Trichoderma* spp. Sam kontakt *Trichoderma* spp. sa hifama fitopatogene gljive fizički se ostvaruje putem izraštaja na krajevima hife *Trichoderma*, koje liče na papile, i lepe se za hifu domaćina. Nakon prodora u hifu domaćina hraneći se unutrašnjim sadržajem *Trichoderma* spp. parazitira na fitopatogenoj gljivi (Slika 89).

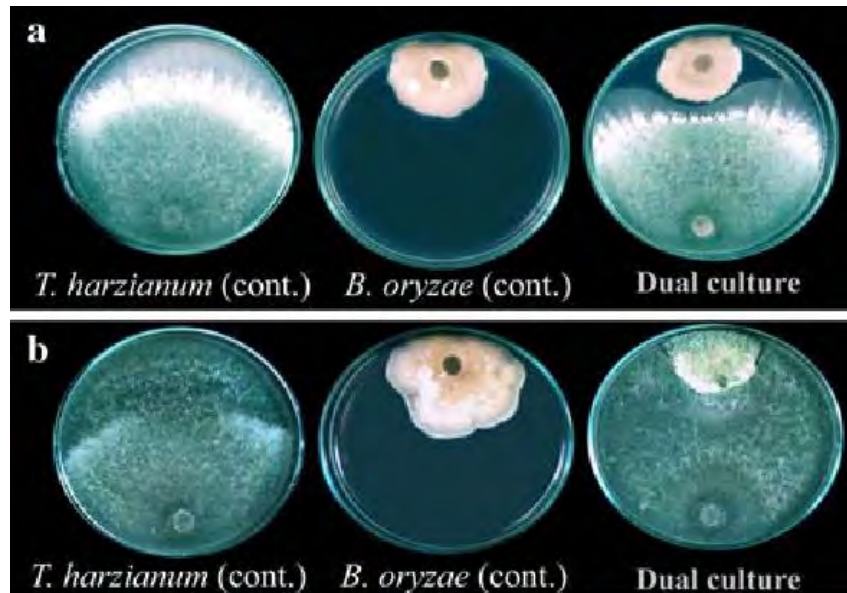


Slika 88. Mehanizam uspostavljanja mikoparazitizma od strane gljiva iz roda *Trichoderma* sp. (prema Druzhinina et al., 2011)



Slika 89. Izgled hife *Trichoderma* spp. omotane oko hife fitopatogene gljive, elektronska snkening mikrofotografija : (preuzeto: <http://allplantprotection.blogspot.com/2012/04/trichoderma-multi-useful-fungi.html>)

Biofungicidna aktivnost roda *Trichoderma* spp. ispoljava se i kroz amensalistički odnos prema patogenim gljivama (Slika 90). Sposobnost vrsta da sintetišu i izlučuju u zemljište široku lepezu sekundarnih biomolekula osnova su ove sposobnosti. Od sekundarnih biomolekula to su antibiotici koji direktno sprečavaju rast patogenih gljiva, zatim petabioli, mikotoksini i različiti isparljivi sekundarni biomolekuli rasta kao što su jedinjenja iz grupe alkohola, ketona, seskviterpena koji usporavaju ili potpuno zaustavljaju rast patogena.



Slika 90. Amensalistički efekat *T. harzianum* na *Bipolaris oryzae* na čvstoj hranljivoj podlozi nakon 6 (a) i 8 (b) dana (prema Abdel-Fattah et al., 2007)

Prisustvo gljiva iz roda *Trichoderma* spp. u rizosferi biljaka dokazano indukuje njihovu sistemsku otpornost, ne samo na patogene već i na abiotički stres. Mehanizam indukcije otpornosti objašnjava se činjenicom da prisustvo *Trichoderma* spp. u rizosferi biljaka aktivira ekspresiju gena u biljci odgovornih za sintezu enzima hitinaza, β -glukozidaza, peroksidaza i enzima oksidativnog stresa čija aktivnost direktno podiže otpornost biljaka.

BIOHERBICIDI

Preparati sa efektivnim sojevima mikroorganizama koji se koriste sa ciljem uništavanja korova su označeni kao mikrobiološki herbicidi. Mikroorganizmi se izoluju sa nadzemnih delova biljaka, ali i iz zemljišta i nanose se u dovoljno velikom broju na korov da mogu izazvati željeni efekat. Postoje procene da se oko 200 različitih biljnih patogeni koristi ili su u fazi ispitivanja kao potencijalni bioherbicidi.

Koncept korišćenja mikroorganizama u kontroli korova se intenzivno ispituje poslednjih 30 godina, iako se prva ideja pojavila već nakon drugog svetskog rata. Postoji velik broj problema koji ograničavaju i u velikoj meri otežavaju upotrebu bioherbicida. Specifičnost primenjenog mikroorganizma prema biljci domaćinu, često sa visokim genetičkim diverzitetom, zatim preživljavanje mikroorganizama, produkcija mikrobnih metabolita, način, doza i vreme primene spadaju u osnovne izazove prilikom formulisanja i primene bioherbicida. Osim toga, interakcija sa hemijskim herbicidima, pravne regulative i ekonomska opravdanost često, u značajnoj meri utiču na masovnu proizvodnju ovih mikrobnih formulacija.

Najveći broj bioherbicida je registrovan u SAD i Kanadi. U Evropskoj Uniji je registrovano 47 novih mikrobnih preparata (biofungicida i bioinsekticida) od 2014 godine, ali ni jedan bioherbicid.

Većina bioherbicida na tržištu su na bazi gljiva (Slika 91). Vrste iz rodova *Colletotrichum*, *Phoma* i *Sclerotinia* se najviše koriste u komercijalne svrhe. Postoje i preparati na bazi bakterija, a u poslednjih desetak godina se sve više pažnje poklanja virusima. Spisak najznačajnijih vrsta mikroorganizama u bioherbicidima je prikazan u Tabeli 15.



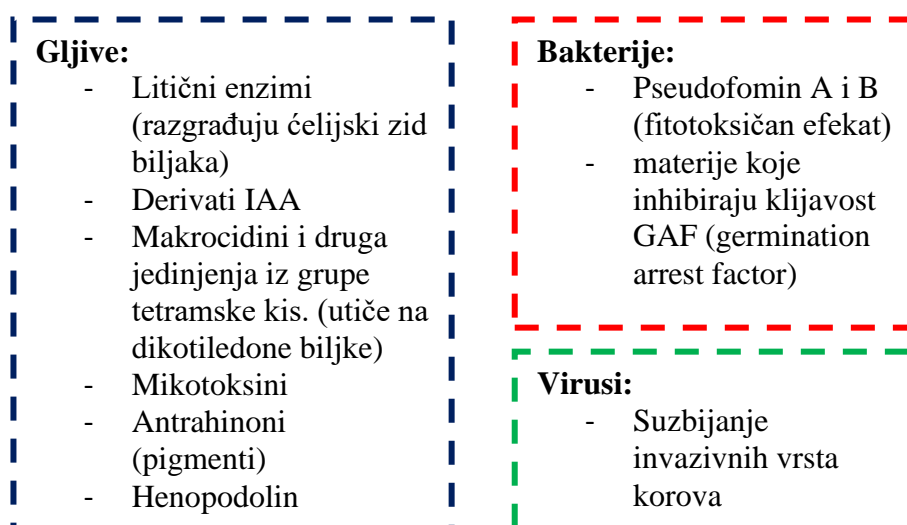
Slika 91. Kolonija *Alternaria*, *Colletotrichum* i *Sclerotinia* na PDA agaru (foto: autori)

Tabela 15. Mikroorganizmi u bioherbicidima

Gljive	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>, <i>C. truncatum</i>, <i>C. coccodes</i> - <i>Alternaria sonchi</i>, <i>A. alternata</i>, <i>A. helianthi</i> - <i>Puccinia thlaspeos</i>, <i>P. lagenophorae</i> - <i>Sclerotinia minor</i> - <i>Fusarium oxysporum</i>, <i>F.nygamai</i> <i>F. tumidum</i> - <i>Verticillium albo-atrum</i> - <i>Phomopsis amaranthicola</i> - <i>Phyllosticta cirsii</i> - <i>Phoma destructiva</i>, <i>P. hedericola</i>, <i>P. nebulosa</i> <i>P. herbarum</i>, <i>P. macrostoma</i> - <i>Mycelia sterile</i>
Bakterije	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tabaci</i>, <i>P. syringae</i> pv. <i>Tagetis</i>, <i>P.s fluorescens</i> strain G2-11 - <i>Xanthomonas spp.</i>, <i>X. campestris</i> pv. <i>poae</i> (JTP482)
Virusi	<ul style="list-style-type: none"> - Tobamovirus - zeleni mozaični virus duvana (TMGMV), Mozaični virus Araujia, Óbuda Virus paprike (ObPV), Pepino Mozaični Virus (PepMV)

Mehanizmi delovanja bioherbicida zavise od samog mikroorganizma koji se nalazi u preparatu i mogu biti različiti. Mikroorganizmi vrše sekreciju ekstracelularnih litičnih enzima i toksina, pod čijim uticajem se razlaže semenski omotač korova, a endosperm koriste kao izvor nutrijenata za svoj razvoj. Na taj način inhibiraju klijanje semena. Kod mladih biljnih klijanaca ulaze kroz međućelijski prostor u unutrašnjost korena gde deponuju toksine koji negativno deluju na deobu ćelije i ćelijsku funkciju.

Produkuju cijanide i organske kiseline, pre svega oksalnu kiselinu, zatim stvaraju kompleksne molekule sa terciarnom strukturom koji štetno deluju na korov. Sekundarni metaboliti iz grupe pigmenta i terpena dovode do nekroze i hloroze listova, te se inhibira rast klijanaca zbog smanjenog intenziteta fotosinteze i produkcije giberelina. Sa druge strane, povećava se sinteza regulatora biljnog rasta tipa auksina i njihovih derivata, abscisinske kiseline i etilena (Slika 92). U biljkama se povećava produkcija hormona stresa, remeti se normalna antioksidativna aktivnost biljke.



Slika 92. Aktivne komponente poreklom iz mikroorganizama u bioherbicidima

Uspešna kontrola korova podrazumeva primenu mikroorganizama, odnosno infektivnih propagula, u periodu kada je korov u najranjivijoj fazi razvoja. Za svaki mikroorganizam i korov mora da se definiše najvirulentniji oblik biljnog patogena i faza razvoja domaćina da bi primenjeni preparat bio najefikasniji. Kao i kod drugih mikrobioloških preparata, efikasnost primene bioherbicida u poljskim uslovima je pod velikim uticajem abiotičkih faktora. Vlažnost listova korova, naročito u periodu nakon primene bioherbicida (prvih 12 sati) je od ključnog značaja da bi se izvršila uspešna infekcija domaćina. Osim vode, važan faktor je i temperatura vazduha. Maksimalna efikasnost bioherbicida se postiže na temperaturama između 25°C i 35°C. Za većinu mikroorganizama, temperatura od 20°C, u kombinaciji sa povećanom vlažnosti vazduha jeste optimalna koja će rezultirati infekcijom.

Promene koje se javljaju na biljci nakon primene bioherbicida mogu biti slabo vidljive do onih koje rezultiraju uginućem (Slika 93). Simptomatologija je uvek rezultat uzajamnog delovanja/odnosa mikroorganizma u preparatu, biljke domaćina i abiotičkih faktora.



Slika 93. Inokulacija korova sa virusom TMGMV: (A) lokalne lezije na listovima-nedelju dana nakon inokulacije, (B) osušene, uginule biljke (prema Charudattan and Hiebert, 2007)

Bioherbicidi se prave kao **tečne i čvrste formulacije**. Tečne formulacije su suspenzije mikroorganizama u vodi, raznim uljima, emulzijama koje se primenjuju prskanjem nakon klijanja korova. Čvrste formulacije se prave sa različitim nosačima kao što su treset, vermikulit, glina, alginat, itd. Ove formulacije se unose u ili na zemljište pre pojave korova, a deluju na seme i klijance biljke domaćina. Obzirom da granulirane čvrste formulacije sadrže suve infektivne propagule, ovi preparati imaju duže vreme skladištenja u odnosu na tečne.

Primenjuju se pomoću različitih aplikatora, prskalica i slične opreme za tu namenu (Slika 94). Može se koristiti i oprema za primenu sintetičkih herbicida uz modifikacije, po potrebi.



Slika 94. Primena bioherbicida u polju. Levo prema desno: sprej karpet aplikator; wiper aplikator; ručna prskalica (prema Charudattan and Hiebert, 2007)

Bioherbicidi se skoro nikada ne koriste kao jedina sredstva u borbi protiv nepoželjnih korova. Primjenjuju se kao alternativno, dopunsko sredstvo, često u kombinaciji sa sintetičkim herbicidima. Istraživanja su pokazala da sinergizam između ovih herbicida može poboljšati kontrolu korova. Kada se mikroherbicidi primenjuju sa sintetičkim (nekoliko dana nakon primene sintetičkih), u većini slučajeva se postiže mnogo bolji rezultat u uništavanju korova (Slike 95 i 96). Međutim, pojedini bioherbicidi ispoljavaju najbolji efekat kada se primenjuju bez sintetičkih herbicida.



Slika 95. Efekat primene gljive *Pyricularia setariae* i herbicida (sethoxydim) na zeleni muhar u stakleniku. Levo prema desno: netretirana kontrola, herbicid, gljiva *Pyricularia setariae* i gljiva plus herbicid (prema Peng and Wolf, 2011).

Efekat primene bioherbicida zavisi i od faze razvoja korova. Najefikasniji su u fazi klijanca ili u ranim fazama razvoja do 3-4 lista. Da bi se uspešno primenili i u kasnijim fazama razvoja korova, doza bioherbicida se mora višestruko povećati (i više od 100 puta).



Slika 96. **A**-Primena herbicida sethoxydim (skoro bez uticaja na biljku); **B**- herbicid plus *Pyricularia setariae* (oštećena biljka), u poljskim uslovima (prema Peng and Wolf, 2011).

Bez obzira na brojne prednosti bioherbicida, oni nisu našli široku primenu u poljoprivredi. U svetu je registrovano svega 17 mikroherbicida. Razlozi su brojni, ali u najvažnije spadaju rizici vezani za primenu i zdravstvenu bezbednost. Ovi preparati imaju fitotoksičan efekat na određenu vrstu ili nekoliko srodnih vrsta korova, moraju se primenjivati u ranim fazama razvoja ili pre masovne pojave korovske vegetacije, primena se mora ponoviti svake sezone. Gljive u preparatima su producenti značajnih količina mikotoksina koji mogu imati štetne (toksične, kancerogene, teratogene) efekte i na ljude kao krajnje konzumente poljoprivrednih proizvoda.

Zbog toga je važno proučavati i vršiti dalja ispitivanja o efikasnosti bioherbicida, šta se dešava sa mikroorganizmima nakon primene, koje toksične metabolite proizvode, koja je njihova dalja sudbina u ekosistemu i lancu ishrane. Na taj način će se otkloniti sve nedoumice oko primene ovih preparata i steći poverenje potrošača.

Da bi se to postiglo, treba raditi na:

1. razvoju protokola za detekciju toksičnih metabolita (i u količinama u tragovima)
2. proceni optimalnog vremena i načina primene formulacija
3. odabiru sojeva mikroorganizama koji su slabi producenti toksina
4. razvoju metoda za evaluaciju mehanizama delovanja svih mikrobnih metabolita (važno za određivanje patogeneze i ulozi u antagonističkim odnosima)

BIONEMATOCIDI

Nematode koje parazitiraju na biljkama spadaju u štetočine koje prouzrokuju velike gubitke poljoprivrednim proizvođačima. Često štete na biljkama ostaju dugo neotkrivene, jer nematode parazitiraju na korenu. Sve gajene kulture su pogođene, ali se naročito izdvajaju korensko krtolaste biljne vrste. Na tržištu postoje sintetički preparati koji se koriste za uništavanje nematoda, ali sve više raste zabrinutost oko njihove primene zbog brojnih štetnih posledica koje imaju. Mikrobiološki nematocidi su alternativna sredstva koja zaslužuje sve veću pažnju potrošača. U proteklih 30 godina, razvijene su brojne mikrobne formulacije nematocida koje se koriste širom sveta.

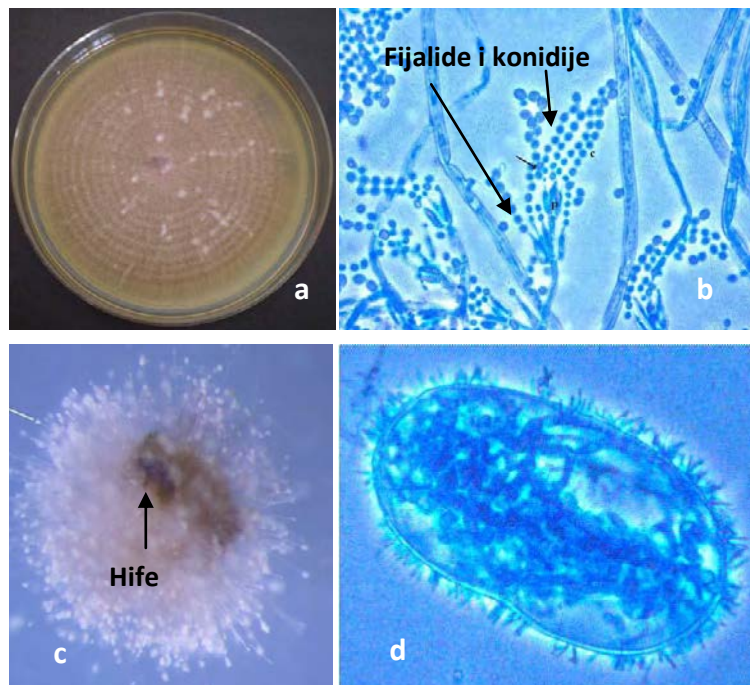
U najrasprostranjenije antagoniste nematoda spadaju gljive i bakterije. Brojne vrste iz obe grupe imaju nematocidna svojstva i koriste se u borbi protiv ovih štetočina (Tabela 16).

Tabela 16. Mikroorganizmi i mehanizmi delovanja u kontroli fitoparazitskih nematoda

Gljive	Mehanizmi delovanja
<i>Aspergillus niger</i>	<ul style="list-style-type: none"> - parazitira na jajima nematode - indukuje sistemsku rezistentnost biljaka protiv parazitskih nematoda - napada ciste nematode i sprečava razvoj larve
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - parazitira na jajima nematode - proizvodi antibiotike (leucinostatin i lilacin), enzime (proteaze i hitinaze) koji razlažu ljusku jaja i sprečava izleganje larvi - razlaganjem hitina se oslobađa amonijak koji je toksičan za juvenilnu fazu nematode
<i>Trichoderma harzianum</i>	<ul style="list-style-type: none"> - proizvode enzime (hitinaze, glukonaze, proteaze) i toksične metabolite - hife prodiru u jaja i kroz juvenilnu kutikulu

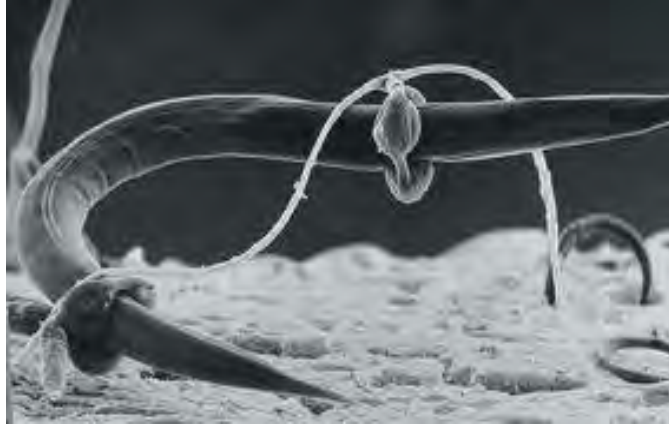
	nematoda
<i>T. viride</i>	- proizvode antibiotike (trihodermin, dermadin, trihoviridin, seskviterpeni, heptalna kiselina)
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	- parazitira na jajima i cistama - proizvode enzime i toksine
Bakterije	
<i>Pasteuria penetrans</i>	- bakterijske spore se zalepe za telo nematode, dolazi do klijanja i penetracije kroz kutikulu; kolonija ispunjava telo i oslobađa velik broj endospora
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	- proizvode antibiotike (fenazine, tropolon, pirolnitrin, piocijanin i 2,4-diacetilfloroglucinol)
<i>Bacillus firmus</i>	- proizvode egzoćelijske enzime - degradacija korenskih eksudata - zaštita korena biljke - produkcija fitohormona
<i>B. thuringiensis</i>	- produkcija toksina
<i>B. subtilis</i>	- produkcija antibiotika (surfaktin i iturin)

Parazitizam (Slika 97) i predatorstvo (Slika 98), kao tipovi antagonizma, su najviše izučavani mehanizmi delovanja mikroorganizama u borbi protiv fitoparazitirajućih nematoda.



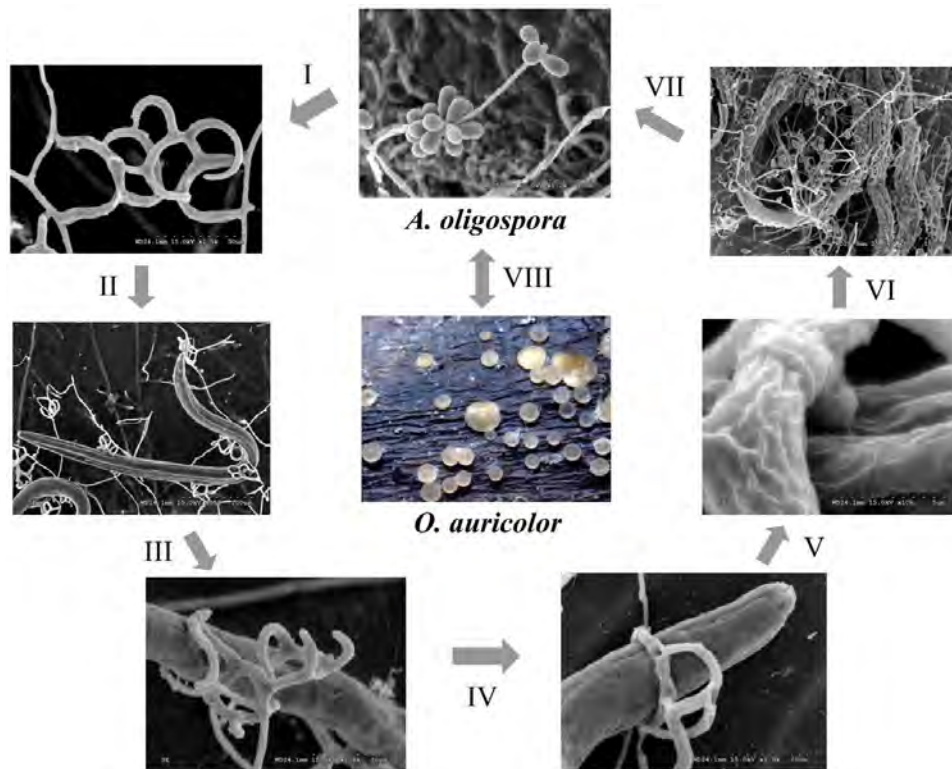
Slika 97. (a) Kolonija i (b) mikroskopski preparat gljive *Paecilomyces lilacinus*; (c i d) jaje nematode *Meloidogyne javanica* inficirano sa hifama *P. lilacinus* (prema Pau et al., 2012)

Gljive su najzastupljeniji heterotrofni mikroorganizmi u zemljištu, čine oko 80% mikrobne biomase. Među njima postoje saprofiti, simbionti, parazitirajući predstavnici (obligatni i fakultativni) i predatori. Nematocidne gljive mogu da se podele u nekoliko grupa: gljive koje formiraju omče, endoparazitske, gljive koje parazitiraju na jajima i ženka nematoda, gljive koje proizvode toksine.



Slika 98. Predatorstvo-gljiva formira omču oko tela nematode (preuzeto: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Nematode_trapping_fungi)

Pojedine nematocidne vrste menjaju način ishrane i prelaze iz jednog u drugi oblik u zavisnosti od uslova sredine i dostupnosti hranljivih materija. Ovakav životni stil zahteva prisustvo specifičnih materija koje obezbeđuju prepoznavanje između gljive i žive ili mrtve organske materije. Lučenjem specijalizovanih proteina iz grupe lektina vrši se prepoznavanje između gljive i domaćina (receptori na kutikuli) i inicira se stvaranje omči (uvijanje hifa). Nakon što se gljiva zakači za telo domaćina nastaju apresorije i započinje proces hvatanja nematode uz pomoć omči. Omče sve više obuhvataju domaćina i intenzivira se produkcija egzoćelijskih enzima iz grupe proteaza, kolagenaza i hitinaza, koji razlažu proteinski egzoskelet nematoda. Polako dolazi do potpune imobilizacije i razgradnje domaćina. Ovaj kompleksan mehanizam hvatanja i uništavanja nematoda je najviše proučavan kod nematocidne gljive *Arthrobotrys oligospora* (Slika 99).



Slika 99. Životni ciklus *Arthrobotrys oligospora*; I-formiranje omči; II-približavanje; III-adhezija; IV-hvatanje; V-penetracija i imobilizacija; VI-varenje; VII-saprofitna faza-anamorf; VIII-seksualna faza-teleomorf (*Orbilia auricolor*) (prema Yang et al., 2011)

Bakterije takođe imaju složene mehanizme prepoznavanje sa domaćinom. Najčešće proizvode isparljiva jedinjenja iz grupe aldehida, ketona, alkohola, alkena, estara, kiselina, heterocikličnih jedinjenja i fenola. Bakterije se lepe na kutikulu nematoda, ali mogu dospeti i u crevni trakt, gde se umnožavaju, formiraju spore, proizvode brojne enzime i sekundarne metabolite (Slika 100).



Slika 100. Endospore *Pasteuria penetrans* na telu nematode *Meloidogyne incognita* (prema Phani et al., 2017)

Mikrobiološki nematocidi se najviše primenjuju tretiranjem semena, biljke ili se unose u zemljište. Preporučuje se primena 2-7 dana pre setve ili sadnje, ili primena u toku vegetacije (može i sa navodnjavanjem). Uglavnom se proizvode kao suve formulacije (u vodi rastvorljiv prah i granule).

11. LITERATURA

1. Abdel-Fattah, G. M., Shabana, Y.M., Ismail, A. E., Rashad, Y.M. 2007. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*, Mycopathology, 164, 81-89. (<https://doi.org/10.1007/s11046-007-9032-9>)
2. Abd-Elgawad M., Askary T.H. 2018. Fungal and bacterial nematicides in integrated nematode management strategies, Egyptian Journal of Biological Pest Control, 28, 74.
3. Anjali, P., Kambale, M., Patil, S. 2016. Terrestrial Orchid Mycorrhiza and Non-Mycorrhizal Endophytes from Kolhapur District (M.S.) – III. International Journal of Life Sciences, Special Issue, 89-97.
4. Barman, J., Aveek, S., Babita, S., Siraj, D. 2016. Mycorrhiza: The Oldest Association Between Plant and Fungi, Resonance, 1093-1104.
5. Bashan, Y., de Bashan, L.E., Prabhu, S.R., Hernandez, J.P. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013), Plant Soil, 378, 1–33.
6. Berutti, A., Borriello, R., Orgiazza, A., Barbera, A.C., Lumini, E., Biancotto, V. 2014. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Their Value for Ecosystem Management. Book Chapter: Biodiversity-The Dynamic Balance of the Planet. Pp.159-191.
7. Brundrett, M.C., Tedersoo, L. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity, New Phytologist.
8. Charudattan, R., Hiebert, E. 2007. A plant virus as a bioherbicide for tropical soda apple, *Solanum viarum*, Outlooks on Pest Management, 167-171.
9. Deguchi, S., Yosuke, M., Chisato, T., Yuki, S., Hajime, O., Yoshimune, O. 2017. Proposal of a New Estimation Method of Colonization Rate of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Roots of *Chengiopanax sciadophylloides*, Mycobiology, 45(1), 1519.
10. Dinesh K. Maheshwari Ed. 2013. Bacteria in Agrobiology: Disease Management, Springer Heidelberg New York Dordrecht London.
11. Druzhinina, Irina S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., Kubicek, C.P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success: Mycoparasitism of *Hypocrea* / *Trichoderma* spp. within the soil community, Nature Reviews, Microbiology, 9, 749-759.
12. Frank, A.B. 1885. Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. Ber Dtsch Bot Ges, 3, 128–145.
13. Gadkar, V., Rakafet, D.S., Talya, K., Yoram, K. 2001. Arbuscular Mycorrhizal Fungal Colonization. Factors Involved in Host Recognition, Plant Physiology, 127, 1493-1499.
14. García-Rodríguez, J.L., Pérez-Moreno, J., Ríos-Leal, D., Saez-Delgado, P., Atala-Bianchi, C., Sánchez-Olate, M., Guillermo P.C. 2017. *In vitro* growth of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus radiata* plantations in Chile, Revista Fitotecnia Mexicana, 40, 4, 415-423.
15. Giovanetti, M., Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular mycorrhizal infection in roots, *New Phytologist*, 97, 447-453.
16. Glick, B. R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and application, Scientifica, 1-15.

17. Grahovac, M., Inđić, D., Lazić, S., Vuković, S. 2009. Biofungicidi i mogućnost primene u savremenoj poljoprivredi, *Pesticidi i fitomedicina*, 24, 4, 245-258.
18. Habte, M., Osorio, N.W. 2001. *Arbuscular Mycorrhizas: Producing and Applying Arbuscular Mycorrhizal Inoculum*. Publisher: College of Tropical Agriculture and Human Resources.
19. Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158, 17-25.
20. Islam, F., Shoji Ohga 2013: Effects of Media Formulation on the Growth and Morphology of Ectomycorrhizae and Their Association with Host Plant. *ISRN Agronomy*. Volume 2013, Article ID 317903, 12 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/317903>.
21. Jacott, C.N., Murray, J.D., Ridout, C.J. 2017. Trade-Offs in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Disease Resistance, Growth Responses and Perspectives for Crop Breeding, *Agronomy*, 7, 75.
22. Jaklitsch, W.M. Voglmayr, H. 2014. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia studies in mycology, 80, 1–87.
23. Jarak, M., Čolo, J. 2007. *Mikrobiologija zemljišta*, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
24. Khan, A., Williams, K.L., Nevalainen, H.K.M. 2006. Infection of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum*, *Biocontrol*, 51, 5, 659–678.
25. Kulkarni, S., Sagar, S.D. 2007. *Trichoderma – A potential biofungicide of the millennium*. Bulletin published by the Dept. of Plant Pathology, U.A.S., Dharwad., 1-20.
26. Laurens, L. 2017. *State of Technology Review-Algae Bioenergy*. IEA Bioenergy Inter-Task Strategic Project. USA.
27. Lopez, G. N., Greenwood, D.R., Milddleditch, M., Winefield, C., Eaton, C., Steyaert, J. M., Mendoza-Mendoza, A. 2018. The Apoplastic Secretome of *Trichoderma virens* During Interaction With Maize Roots Shows an Inhibition of Plant Defence and Scavenging Oxidative Stress Secreted Proteins, April 2018, *Frontiers in Plant Science*, 9, Article 409.
28. Lopez-Bucio, J., Pelagio-Florens, R., Herrera-Estella, A. 2015. *Trichoderma* as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus, *Scientia Horticulturae*, 196.
29. Martins, A., Barosso, J., Pais, M. 1996. Effect of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* Mill., *Mycorrhiza*, 6, 4, 265-270.
30. Mishra, J., Arora, N. K. 2018. Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture, *Applied Soil Ecology*, 125, 35-45.
31. Mohammadi, K., Sohrabi, Y. 2012. Bacterial biofertilizers for sustainable crop production, A review, *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, 7,5, 307-316.
32. Mrkovački, N., Đalović, I., Jarak, M., Bjelić, D., Adamović, D. (2012): Mikroorganizmi u rizosferi: uloga i značaj u održivoj poljoprivredi. *Bilten za alternativne biljne vrste*, 44, 85, 40–49.
33. Noumavo, P. A., Agbodjato, N. A., Baba-Moussa, F., Adjanohoun, A., Baba-Moussa, L. 2016. Plant growth-promoting rhizobacteria: beneficial effects for healthy and sustainable agriculture, *African Journal of biotechnology*, 15, 27, 1452-1463.

34. Pau, C.G., C.T.S. Leong, S.K. Wong, L. Eng, M. Jiwan, F.R. Kundat, Z.F.B.A. Aziz, O.H. Ahmed and N.M. Majid, 2012. Isolation of indigenous strains of *Paecilomyces lilacinus* with antagonistic activity against *Meloidogyne incognita*. *Int. J. Agric. Biol.*, 14: 197–203.
35. Peng, G., Wolf, T.M. 2011. Herbicide-microbial synergy for improved weed control, *Pest Control Technology*, 5 (Special Edit.), 18-27.
36. Persoon, C.H. *Disposita methodica fungorum*. Römer's Neues Mag Bot. 1794,1, 81–128.
37. Phani, V., Shivakumara, T.N., Davies, K.G., Rao, U. 2017. *Meloidogyne incognita* Fatty Acid- and Retinol-Binding Protein (Mi-FAR-1) Affects Nematode Infection of Plant Roots and the Attachment of *Pasteuria penetrans* Endospores, *Frontiers in Microbiology*, 8, 2122.
38. Porcel, R., Aroca, R., Ruiz-Lozano, J.M. 2012. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32,181–200.
39. Prashar, P., Kapoor, N., Sachdeva, S. 2013. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1-15.
40. Premachandra, D., Hudek, L., Brau, L. 2019. Bacteria modes of action for enhancing of plant growth, *Journal of Biotechnology and biomaterials*, 6 (3), 1-8.
41. Quittenden, L.J., Davies, N.W., Smith, J.A., Molesworth, P.P., Tivendale, N.D., Ross, J.J. 2009. Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway. *Plant Physiology*, 151, 1130–1138.
42. Samuels, G. J. 2006. *Trichoderma* : Systematics, the Sexual State, and Ecology, *Phytopathology* 96(2),195-206.
43. Satpati, G.G., Pal, R. 2018. Microalgae- Biomass to Biodiesel, A review, *Journal of Algal Biomass Utilization*, 9, 4, 11-37.
44. Schoebitz, M., López, M.D., Roldán, A. 2013. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization, A review, *Agronomy for Sustainable Development*.
45. Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105, 1413–1421.
46. Shemad, M., Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteri: Current perspective, *Journal of Kings Saud University-Science*, 26, 1-20.
47. Sivasakthi, S., Usharani, G., Saranraj, P. 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)- *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*, A review, *African Journal of Agricultural Research*, 9, 16, 1265-1277.
48. Smith, S., Read, D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd Edition, Elsevier Publishing.
49. Smith, S.E., Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
50. Souza, R., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. P. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils, *Genetics and molecular Biology*, 38, 4, 401-419.
51. Stamenov, D. 2014. Karakterizacija mikoroorganizama promotora rasta i njihovo preživljavanje u rizosferi engleskog ljulja, Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom sadu, Srbija.
52. Tulasne, L.R., Tulasne, C. 1865. *Selecta Fungorum Carpologia: Nectrici – Phacidiei – Peziziei*, Book, Volim 3.

53. Viaene, T., Langendries, S., Beirinckx, S., Maes, M., Goormachtig, S. 2016. *Streptomyces* as a plant's best friend?, *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 8, 1-10.
54. Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N., Wangm E. 2017. Nutrient Exchange and Regulation in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis, *Molecular Plant*, 10, 1147–1158.
55. Weber, O. B. 2014. “Biofertilizers with arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture,” in *Mycorrhizal Fungi: Use in Sustainable Agriculture and Restoration*, Vol Soil biology, 41, eds Z. M. Solaiman, L. K. Abbott, and A. Varma (Berlin: Springer).
56. Yadav, S., Rai, S., Rai, R., Shankar, A., Singh, S., Rai, L.C. 2017. Cyanobacteria: Role in Agriculture, Environmental Sustainability, Biotechnological Potential and Agroecological Impact. In: Singh D., Singh H., Prabha R. (eds) *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. Springer, Singapore
57. Yang, J., Wang, L., Ji, X., Feng, Y., Li, X., et al. 2011. Genomic and Proteomic Analyses of the Fungus *Arthrobotrys oligospora* Provide Insights into Nematode-Trap Formation, *PLoS Pathogens*, 7, 9, 179.
58. Yanhui, H., Zhansheng, W., Liang, T., Yajie, H., Genlin, Z., Chun, L., 2015. Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate. *Applied Clay Science*, 109–110, 68-75.
59. Zaki A. Siddiqui Ed. 2006. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Published by Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.
60. <https://permaculturenews.org>
61. <http://www.scielo.org.co>
62. <https://fungicultura.files.wordpress.com/2013/01/mycorrhiza-shop.jpg>
63. <https://www.cell.com/trends/plant-science>
64. <https://www.milorganite.com/lawn-care/organic-lawn-care/organic-vs-synthetic>
65. <http://www.ohsu.edu/xd/education>
66. <https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/forest-microbiome-mapping>
67. [www. bioexampreparation.com](http://www.bioexampreparation.com)
68. <https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/forest-microbiome-mapping>
69. https://www.americanforests.org/wp-content/uploads/2014/10/3.-Diagram-of-seedling-and-ectomycorrhizal-fungi-CCripps_web.jpg
70. <https://wiki.bugwood.org/Archive:Forestnursery>
71. www.mirkotartufi.it
72. <https://lovethesoilbeneathyourfeet.wordpress.com>
73. <http://theazollafoundation.org>
74. <https://ipm-info.org/natural-enemies/bacillus-thuringiensis>
75. www.andermttbiocontrol.com
76. <http://allplantprotection.blogspot.com/2012/04/trichoderma-multi-useful-fungi.html>
77. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Nematode_trapping_fungi

