UTICAJ MIKROBNIH AGENASA BIOLOŠKE ZAŠTITE BILJAKA OD BOLESTI NA MIKROBIOM ZEMLJIŠTA

Jozef Gašparovski

Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

E-mail: jozef.gasparovsky@gmail.com

Izvod

Mikrobiološki preparati za kontrolu biljnih bolesti poslednjih godina dobijaju sve veću važnost i njihova upotreba se značajno povećava. Kao aktivnu materiju najčešće sadrže bakterije, gljive i viruse i pružaju niz pogodnosti bez štetnih efekata za ljude i životnu sredinu. Pozitivno utiču na zemljišni mikrobiom, i njihovom primenom se broj mikroorganizama u zemljištu i njihovi biohemijski procesi mogu dodatno stimulirati. Aplikacija mikrobioloških preparata može modifikovati zemljišni mikrobiom i ima direktan i indirektan uticaj na fizičko-hemijske i biohemijske procese u zemljištu. Primenom preparata se poboljšava ciklus kruženja hranljivih materija u zemljištu, održava se njegova plodnost, mikroorganizmi proizvode enzime koji povećavaju otpornost biljaka prema nepovoljnim uslovima sredine i prema biljnim bolestima. Takođe, primena ovih preparata može smanjiti brojnost patogena u zemljištu.

Ključne reči: mikrobiom zemljišta, mikrobiološki preparati, biljne bolesti

UVOD

Suzbijanje bolesti u konvencionalnoj poljoprivrednoj proizvodnji se najčešće izvodi hemijskim preparatima. Njihova česta upotreba dovodi do mnogih problema, kao što su ostaci u hrani koji negativno utiču na zdravlje ljudi i životinja, pojava rezistentnosti patogena na hemijska jedinjenja, zagađenje životne sredine, neželjeno suzbijanje korisnih organizama, kontaminacija podzemnih voda.

Mikroorganizmi kao biološki pesticidi u poslednjoj dekadi imaju sve značajniju ulogu u zaštiti biljaka od bolesti i predstavljaju dobru alternativu hemijskim preparatima. Mikrobiološki preparati za kontrolu biljnih bolesti, kao aktivne materije sadrže korisne bakterije, gljive ili viruse. Oni su visoko selektivni, odnosno deluju na ciljane organizme nenanoseći štetu drugim korisnim organizmima (Kumari i sar., 2014). Mogu se koristiti u organskom konceptu poljoprivredne proizvodnje

i ekološki su prihvatljivi. Agensi biološke zaštite, odnosno korisni mikroorganizmi kao biopesticidi, prilikom primene stupaju u interakciju sa biljkom, ciljanim patogenom i postojećom mikroflorom. Mehanizam delovanja mikrobioloških pesticida zasnovan je na kolonizaciji biljke i kompeticiji za ekološku nišu sa patogenim mikroorganizmima. Osim toga, korisni mikroorganizmi koji su aktivna materija bipreparata često proizvode materije koje sprečavaju ili usporavaju razvoj patogena. Korisni mikroorganizmi osim što poboljšavaju kvalitet biljnih proizvoda kao i kondiciju samih biljaka, višegodišnjom primenom utiču i na kvalitet zemljišta i značajno ga unapređuju - proizvode hidrolitičke enzime koji povećavaju otpornost biljaka prema nepovoljnim uslovima životne sredine (Kour i sar., 2020) i povoljno utiču na mikrobiom zemljišta (Gupta i Dikshit, 2010). Zbog toga je važno zameniti konvencionalne preparate sa mikrobiološkim kada god je to moguće.

Mehanizmi delovanja korisnih mikroorganizama na patogene. Mehanizmi delovanja biofungicida se baziraju na indukovanoj otpornosti biljaka, kompeticiji, hiperparazitizmu i antibiozi. Indukovana otpornost aktivira odbrambeni sistem biljke tj. mehanizam borbe za usporavanje infekcije - aktiviraju je stimulusi koje šalju korisni mikroorganizmi (Conrath i sar., 2015), a prepoznaju ih specijalni receptori na biljkama. Kompeticija za hranu i prostor podrazumeva da korisni mikroorganizmi, koji se koriste u borbi sa patogenima kolonizuju biljku koju treba da zaštite tj. zauzmu ekološku nišu pre patogenih mikroorganizama. Parazitizam podrazumeva direktnu interakciju dva organizma pri čemu jedan organizam uzima nutrijente od drugog. U slučaju kada je i ovaj drugi organizam parazit (biljni patogen), tada se odnos naziva hiperparazitizam. Antibioza podrazumeva delovanje korisnih mikroorganizama na biljne patogene produktima sekundarnog metabolizma – antimikrobnim metabolitima. U aktivnost korisnih mikroorganizaa retko kada je uključen samo jedan od nabrojanih mehanizama delovanja i najčešće je u pitanju kombinacija više različitih mehanizama (Köhl i sar., 2019). Priroda interakcije mikroorganizama je izuzetno složen proces i ne može se striktno uklapati u pragmatične naučne kategorije. Novi mehanizmi delovanja i njihove kombinacije mogu biti otkriveni u budućim istraživanjima, sa porastom genomskih i transkriptomskih podataka.

Zemljišni mikrobiom. Zemljišni mikroorganizmi čine od 0,1 do 3% celokupne organske materije zemljišta, odnosno preko 1000kg po hektaru. Zemljišni mikrobiom ima nezamenjivu ulogu u ciklusu kruženja hranljivih materija u zemljištu, održavanju njegove plodnosti i ima direktan i indirektan uticaj na biljke, ali i ceo zemljišni ekosistem. Broj mikroorganizama je uvek veći u zemljištima koja su bogata organskim i glinenim materijama, dok je na lakim i peskovitim zemljištima znatno manji. Istraživanja pokazuju da u vlažim i toplim zemljištima kao što su tropski regioni, ima više mikroorganizama, dok u suvom i hladom tlu njihov broj znatno opada (Molnar i sar., 2003). Osim ovih faktora, na broj mikroorganizama u poljoprivrednom zemljištu utiče i vrsta i sorta useva, primena pesticida i primena mikrobioloških preparata.

Slika 1: Sadržaj biomase zemljišnog mikrobioma u različitim delovima sveta (Fierer, 2017)

Nisu svi mikroorganizmi podjednako zastupljeni u zemljišnom mikrobiomu. Bakterije i gljive su dominantne i obično je njihov broj 102 do 104 puta veći od drugih najzastupljenijih organizama kao što su protozoe i virusi (Fierer, 2017). Međutim, njihov odnos i brojnost se ne može precizno utvrditi za ceo region, jer njihov broj nije isti u svakom uzorku iako se uzima na svega nekoliko santimetara udaljenosti. Na broj mikroorganizama značajno utiče i pH zemljišnog rastvora, sadržaj ugljenika i redoks reakcija rastvora (Fierer, 2017).

Uticaj mikrobioma na zemljišne procese. Mikroorganizmi proizvode atmosferske gasove, na primer ugljen dioksid i metan, ali isto tako ih koriste u hemijskim reakcijama. Utiču na kiselost zemljišta, na brzinu kojom se odvija kruženje hranljivih materija i razgradnja organske materije. Mikroorganizmi imaju direktan uticaj na mnoge procese koji se odvijaju u zemljištu, što je prikazano na slici broj 2.

Slika 2: Biohemijski procesi u zemljištu na koje utiče zemljišni mikrobiom (Fierer, 2017)

Biohemijske reakcije mikrobioma indirektno utiču na ceo ekosistem zemljišta. Istraživanja pokazuju da produkti koje izlučuju mikroorganizmi podstiču rast biljaka, povećavaju njihovu otpornost prema bolestima i nepovoljnim uslovima sredine, utiču na zastupljenost insekata i zglavkara u zemljištu (Wall i sar., 2015). Takođe, mogu povećati dostupnost vode biljkama povećavajući hidrofobnost i provodljivost vode u zemljištu (Yarwood i sar., 2006), vrše redukciju nitrata u amonijačni oblik, razgrađuju toksična jedinjenja i apsorbuju teške metale (Rajkumar i sar., 2012). Kako zemljišni mikrobiom utiče na direktne i indirektne procese u zemljištu, važno je identifikovati sojeve koji utiču na specifične procese. Na primer, poznavanje brojnosti i aktivnosti mikroorganizama koji su odgovorni za nitrifikaciju amonijaka može pomoći u predviđanju sadržaja nitrata u zemljištu (Webster i sar., 2005).

Broj mikroorganizama u zemljištu i njihovi biohemijski procesi se mogu dodatno stimulirati i primenom mikrobioloških preparata. Efekat mikrobne inokulacije na promenu mikrobiološke aktivnosti u zemljištu zavisi od fizičko-hemijskih osobina zemljišta, biljne vrste, sposobnosti adaptacije introduciranih mikroorganizama i dr. (Dobbelaere i sar., 2003).

Istraživanja uticaja agenasa biološke zaštite na mikrobiom zemljišta. Na sertifikovanim površinama za organsku proizvodnju Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad sprovedeno je istraživanje uticaja mikrobioloških preparata na mikrobiom zemljišta. Zemljište je nakon žetve tretirano sa mikrobiološkim preparatima za kontrolu biljnih bolesti i poboljšanje plodnosti zemljišta - preparatom na bazi azotofiksirajućih bakterija, fosfomineralizatora, gljive *Trichoderma* i dr. (preparat 1) i preparatom na bazi fulvo i huminskih kiselina (preparat 2). Oko 60% biofungicida koje se nalaze na tržištu sadrže gljivu *Trichoderma harzianum*, kao aktivni agens (Hajnal-Jafari i sar., 2020). Preparat 2 podstiče rast i razvoj bakterija i u svom sastavu sadrži fulvo i huminske kiseline. Parcela je nakon žetve tretirana sa oba preparata. Brojnost ispitivanih grupa mikroorganizama određivana je metodom agarnih ploča (Trolldenier, 1996) na odgovarajućim hranljivim podlogama: hranljivi agar za ukupan broj bakterija, krompirov-dekstrozni agar za gljive, sintetički agar za aktinomicete, CMC agar (Kasing, 1995) za celulolitičke mikroorganizme, skrobni agar (Rodina, 1965) za amilolitičke mikroorganizme, Fjodorov agar za *Azotobacter* i mesopeptonski agar za aminoheterotrofe (Đurić, 2015). Rezultati su pokazali da primena preparata 1 nije uslovlila značajnu promenu ukupnog broja bakterija u prvom roku uzorkovanja (avgust) ni sa jednom od primenjenih doza. Jedino je primena preparata 2 uslovlila statistički značajno povećanje broja bakterija u odnosu na kontrolnu parcelu. U drugom roku uzorkovanja (septembar) rezultati su pokazali da su svi primenjeni tretmani uticali na povećanje ukupnog broja bakterija u zemljištu.

Brojnost gljiva i aktinomiceta u zemljištu se statistički značajno povećala u prvom i drugom roku uzimanja uzorka u odnosu na kontrolu u ispitivanom zemljištu. Kombinovanjem ova dva preparata i pojedinačnim tretiranjem ostvareni su slični rezultati.

Jedan od najznačajnijih rodova iz grupe azotofiksatora je rod *Azotobacter*. Brojnost roda *Azotobacter* sp. u ovim istraživanjima bila je relativno visoka i kretala se od 79,43 x 10² do 168,92 x 10² ćelija u gramu apsolutno suvog zemljišta. Ovo je jedina grupa mikroorganizama čija brojnost nije bila promenjena nakon primene preparata 1 i preparata 2. Aplikacija mikrobioloških preparata modifikuje zemljišni mikrobiom i može imati direktni antagonistički uticaj na biljne bolesti. U eksperimentu koji su sprovedi Xiong i sar. (2016), praćen je uticaj primene bioloških preparata za kontrolu bolesti na učestalost pojave *Fusarium oxysporum*, gustinu populacije patogena u zemljištu i promene u zemljišnom mikrobiomu. *Fusarium* spp. su jedni od najznačajnijih prouzrokovaca bolesti koji se nalazi u zemljištu i često je ograničavajući faktor u gajenju pojedinih biljnih vrsta (Klein i sar., 2016).

Ispitivano je zemljište na kojem je prethodno gajena vanila, te je u zemljištu pronađena gljiva *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. Zemljište je tretirano preparatima koji sadrže amino kiseline, inokulum *Bacillus amyloliquefaciens* W19 i *Trichoderma guizhouense*, dok je druga parcela tretirana hemijskim preparatima. Rezultati istraživanja pokazali su da je došlo do znatnog smanjenja brojnosti prouzrokovaca bolesti na parceli tretiranoj mikrobiološkim preparatima u odnosu na parcelu tretiranu fungicidom za 18,75%. Rezultati su dobijeni analiziranjem genetskog profila mikroorganizama koji su izolovani iz ispitivanog zemljišta.

Osim što se brojnost prouzrokovaca bolesti smanjila, brojnost korisnih mikroorganizama se značajno povećala u odnosu na kontrolnu parcelu. *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes*, *Firmicutes*, *Lysobacter* su bili najzastupljeniji, čineći 71,34% od ukupne bakterijske populacije. Ipak, najznačajniju ulogu u uništavanju *Fusarium* spp. ima *Lysobacter*, koji je u negativnoj korelaciji sa patogenom. U tretiranom zemljištu mikrobiološkim preparatima i amino kiselinama pronađeno je šest puta više genoma *Lysobacter* u odnosu na zemljište tretirano hemijskim preparatima. Ove bakterije proizvode ekstracelularne enzime koji imaju antagonističko delovanje na prouzrokovace bolesti u zemljištu (Exposito i sar., 2015) i smatra se da igraju ključnu ulogu u suzbijanju *Fusarium* spp. u ovom eksperimentu. Treba imati na umu da dobre agrotehničke mere kao i korisni efekti primenjenih biostimulatora kao što su amino, fulvo i huminske kiseline, imaju nezamenjiv pozitivni uticaj na rast populacije i adaptaciju korisnih mikroorganizama koji se nalaze u zemljištu. Zbog toga se preporučuje da se u formulacijama mikrobioloških preparata za kontrolu biljnih bolesti pored inokuluma mikroorganizama nalaze i biostimulišuće materije (Hoffman i sar. 2006; Dobbelaere i sar., 2003). Istraživanja koja se odnose na uticaj korisnih mikroorganizama kao agenasa biološke kontrole biljnih bolesti donedavno su bila otežana zbog ograničenih mogućnosti raspoloživih metoda istraživanja. Međutim, ovo se drastično promenilo sa primenom novih generacija metoda za sekvenciranje - Next Generation Sequencing (NGS), kao što su

metagenomika i metatranskriptomika, koje su omogućile da se identifikuju sastav i funkcije mikrobioma (Köhl i sar., 2019). Dalji koraci u sakupljanju podataka dobijenih metabolomikom i signalomikom će upotpuniti sliku o interakcijama između agenasa biološke kontrole koji se unose u životne sredine i postojećeg mikrobioma. Poznavanje ovih interakcija omogućiće bolje određivanje momenta primene agenasa biološke zaštite, potrebne formulacije preparata i načina aplikacije, što će umanjiti pojavu neuspešnih tretmana. Očekuje se da će tri nova dostignuća imati značajan uticaj na biokontrolu biljnih bolesti. Najpre, funkcionalna analiza će obezbediti prebiotski pristup – primenom specifičnih supstanci modifikovaće se sastav prisutnog mikrobioma sa ciljem da se podstakne mikrobiološko suzbijanje biljnih patogena. Sa druge strane, predviđa se selekcija i primena tzv. pomoćnih sojeva mikroorganizama koji sami po sebi nemaju potencijal za biokontrolu, ali pomažu naseljavanje, opstanak i antagonistička svojstva bioloških agenasa *in situ*. Takođe, smatra se da će se osnovni mikrobiomi dizajnirati tako da se sastoje od nekoliko bioloških agenasa koji kombinuju različite mehanizme delovanja (Köhl i sar., 2019). Kako navode Gopal i sar. (2013), transfer “indivudalno skrojenih” osnovnih mikrobioma će postati održiva strategija u kontroli biljnih bolesti.

LITERATURA

- Conrath U., Beckers G. J. M., Langenbach C. J. G., Jaskiewicz M. R. (2015): Priming for enhanced defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53 97–119. 10.1146/annurev-phyto-080614-120132.
- Dobbelaere S., Vanderleyden J., Okon Y. (2003): Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22, 107-149.
- Đurić S., Stamenov D., Hajnal-Jafari T. (2015): Uticaj zaoravanja žetvenih ostataka i primene mikrobioloških preparata na brojnost mikroorganizama u zemljištu. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Exposito, G.R., Postma, J., Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I. (2015): Diversity and activity of *Lysobacter* species from disease suppressive soils. *Frontiers in Microbiology* 6 (145) 0.3389/fmicb.2015.01243.
- Fierer N. (2017): Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15: 579–590.
- Gopal M., Gupta A., Thomas G. V. (2013): Bespoke microbiome therapy to manage plant diseases. *Front. Microbiol.* 4:355. 10.3389/fmicb.2013.00355.
- Gupta, S., Dikshit, A., (2010): Biopesticides: an ecofriendly approach for pest control. *J. Biopest.* 3, 186–188.
- Hajnal-Jafari T., Stamenov D., Đurić S. (2020): Proizvodnja i primena biopreparata. Univerzitet u Novom Sadu Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2020.

- Hoffman, S., Shultz, E., Csitari, G., Banko, L. (2006): Influence of mineral and organic fertilizers on soil organic carbon pools. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 6, 627-635.
- Jarak M., Srećković M., Govedarica M., Milošević N. (1998): Mikrobiološka aktivnost u zemljištu pod kruškom, dunjom i jabukom, *Jugosl.Voćar.*, 32,121-122, 119-126.
- Kasing A.(1995): Cellulase production. *Practical Biotechnology*.
- Klein, E., Katan, J., Gamliel, A., 2016. Soil suppressiveness by organic amendment to *Fusarium* disease in cucumber: effect on pathogen and host. *Phytoparasitica* 44, 239-249.
- Köhl J., Kolnaar R., Ravensberg W. (2019): Mode of action of microbial biocontrol agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science*, Volume 10, Article 845.
- Kour, D., Rana, K.L., Kaur, T., Sheikh, I., Yadav, A.N., Kumar, V. (2020): Microbe-mediated alleviation of drought stress and acquisition of phosphorus in great millet (*Sorghum bicolor* L.) by drought-adaptive and phosphorus-solubilizing microbes. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 23, 101501.
- Kumari, S., Chourasia, S.K., Jha, M.N., Kant, R., Singh, U., Kumar, P. (2014): Microbial pesticide: a boom for sustainable agriculture. *Int. J. Sci. Eng. Res.* 5, 1394–1397.
- Molnar M., Doll E., Yamamoto A., Hiraoka Y., Kohli J. (2003): Linear element formation and their role in meiotic sister chromatid cohesion and chromosome pairing. *J Cell Sci* 116(Pt 9):1719-31.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M. N. V., Freitas, H. (2012): Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 30, 1562–1574.
- Rodina A.G. (1972): *Methods in Aquatic microbiology*. Ed. Colwell, R. and Zabriskie M. University Park Press, Baltimore and Butterworth and Co Ltd. London.
- Trolldenier G. (1996): Plate Count Technique. In *Methods in Soil Biology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 20-26.
- Wall, D. H., Nielsen, U. N., Six, J. (2015): Soil biodiversity and human health. *Nature* 528, 69–76.
- Webster, G., Embley, T. M., Freitag, T. E., Smith, Z., Prosser, J. I. (2005): Links between ammonia oxidizer species composition, functional diversity and nitrification kinetics in grassland soils. *Environ. Microbiol.* 7, 676–684.
- Xiong, W., Zhao, Q. Y., Xue, C., Xun, W. B., Zhao, J., Wu, H. S. (2016): Comparison of fungal community in black pepper-vanilla and vanilla monoculture systems associated with vanilla *Fusarium* wilt disease. *Front. Microbiol.* 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00117
- Yarwood, R. R., Rockhold, M. L., Niemet, M. R., Selker, J. S., Bottomley, P. J. (2006): Impact of microbial growth on water flow and solute transport in unsaturated porous media. *Water Resour. Res.* 42, W10405.

Abstract

EFFECT OF MICROBIAL BIOCONTROL AGENTS FOR PLANT DISEASES ON SOIL MICROBIOME

Jozef Gašparovski

University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Novi Sad

E-mail: jozef.gasparovsky@gmail.com

Microbiological preparations for the control of plant diseases have become increasingly important in recent years and their use is significantly increasing. They usually contain bacteria, fungi and viruses and provide a number of benefits without harmful effects for people and the environment. They have a positive effect on the soil microbiome, and their application can further stimulate the number of microorganisms in the soil and their biochemical processes. The application of microbiological preparations can modify the soil microbiome and has a direct and indirect impact on the physico-chemical and biochemical processes in the soil. The application of the preparation improves the cycle of nutrients in the soil, maintains its fertility, microorganisms produce enzymes that increase the resistance of plants to adverse environmental conditions and plant diseases. Also, the use of these preparations can reduce the number of pathogens in the soil.

Keywords: soil microbiome, microbiological preparation, plant diseases