

# Ispitivanje održivosti mikrobnih pripravaka na raznovrsnim prirodnim materijalima

---

**Bikadi, Bernarda**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:806064>

*Rights / Prava:* [Attribution-ShareAlike 4.0 International / Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-10**

REPOZITORIJ

**PTF**

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

**dabar**  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Bernarda Bikadi**

**ISPITIVANJE ODRŽIVOSTI MIKROBNIH PRIPRAVAKA NA  
RAZNOVRSNIM PRIRODNIM MATERIJALIMA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2021.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane  
Katedra za biologiju i mikrobiologiju  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

### Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Nastavni predmet:** Opća mikrobiologija

**Tema rada** je prihvaćena na XI redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2020./2021. održanoj 14. rujna 2021.

**Mentor:** doc. dr. sc. Lidija Dujmović

**Pomoć pri izradi:** Maja Ižaković, mag. ing. asistent

### Ispitivanje održivosti mikrobnih pripravaka na raznovrsnim prirodnim materijalima

Bernarda Bikadi, 0113133490

**Sažetak:** Predmet istraživanja ovog rada je mogućnost primjene supstrata koji se nalaze u prirodi, dakle koji nisu sintetskog podrijetla, primjerice alginita, vermikulita, zeolita i dijatomejske zemlje u poboljšanju uzgoja povrtnih kultura. Navedeni supstrati bi poslužili kao nosači biomase mikroorganizama koji zbog svojih enzimatskih svojstava imaju sposobnosti aktivnih ekoloških pesticida i insekticida, te bioloških gnojiva. Mikroorganizmi koji se koriste u ovom radu su plijesni iz rodova *Trichoderma* i *Beauveria*, te bakterijske vrste *Bacillus thuringiensis* i *Azotobacter chroococcum*. Cilj rada je ispitati preživljavanje, odnosno broj živih stanica bakterija i spora plijesni, na navedenim supstratima tijekom zadanog vremena u uvjetima primjene. Kao najbolji supstrat pokazao se alginit, a najbolju održivost na njemu imala je bakterija *Azotobacter chroococcum*.

**Ključne riječi:** alginit, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma* spp.

**Rad sadrži:** 50 stranica  
14 slika  
2 tablice  
1 prilog  
39 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- |                                    |               |
|------------------------------------|---------------|
| 1. prof. dr. sc. Tihomir Moslavac  | predsjednik   |
| 2. doc. dr. sc. Lidija Dujmović    | član-mentor   |
| 3. doc. dr. sc. Mirela Lučan Čolić | član          |
| 4. prof. dr. sc. Vinko Krstanović  | zamjena člana |

**Datum obrane:** 30. rujna, 2021.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Department of Food and Nutrition Research**  
**Subdepartment of Biology and Microbiology**  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program of Food Engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** General Microbiology

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. XI held on september 14, 2021.

**Mentor:** *Lidija Dujmović*, PhD, assistant prof.

**Technical assistance:** *Maja Ižaković*, mag. ing. asistent

### Study of Microbial Preparations Viability on Various Natural Materials

*Bernarda Bikadi*, 0113133490

**Summary:** The subject of this paper is the possibility of using substrates that are found in nature, ie not of synthetic origin, such as alginite, vermiculite, zeolite and diatomaceous earth in improving the cultivation of vegetable crops. These substrates would serve as carriers of biomass of microorganisms which, due to their enzymatic properties, have the ability of active ecological pesticides and insecticides, as well as biological fertilizers. The microorganisms used in this work are molds from the genera *Trichoderma* and *Beauveria*, and the bacterial species *Bacillus thuringiensis* and *Azotobacter chroococcum*. The aim of this study was to examine the survival, ie the number of living cells of bacteria and mold spores, on these substrates during a given time under application conditions. Alginite proved to be the best substrate, and it had the best viability on it the bacterium *Azotobacter chroococcum*.

**Key words:** alginite, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, *Trichoderma* spp.

**Thesis contains:** 50 pages  
14 figures  
2 tables  
1 supplement  
39 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. <i>Tihomir Moslavac</i> , PhD, prof.             | chair person |
| 2. <i>Lidija Dujmović</i> , PhD, assistant prof.    | supervisor   |
| 3. <i>Mirela Lučan Čolić</i> , PhD, assistant prof. | member       |
| 4. <i>Vinko Krstanović</i> , PhD, prof.             | stand-in     |

**Defense date:** September, 30, 2021.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem svojim roditeljima na strpljivosti i toleranciji tijekom mog studiranja, mojoj vječitaj baki Mici na savjetima o primjeni mog rada u vrtlarstvu, te Kristijanu na razumijevanju i podršci. Najviše se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Lidiji Dujmović na nesebičnoj pomoći i vremenu, koje mi je podarila kao i na znanju i savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Ovaj rad je izrađen u sklopu projekta pod nazivom „Razvoj inovativnih tehnologija proizvodnje organskih gnojiva i supstrata“ a koji je suradnja između Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek i Fakulteta agrotehničkih znanosti u Osijeku, voditelja prof. dr. sc. Zdenka Lončarića.



# Sadržaj

1. UVOD .....	2
2. TEORIJSKI DIO .....	6
2.1. PRIRODNI SUPSTRATI .....	6
2.1.1. Alginit .....	6
2.1.2. Vermikulit.....	9
2.1.3. Zeolit.....	10
2.1.4. Dijatomejska zemlja.....	13
2.2. MIKROBNI PRIPRAVCI .....	16
2.3. MIKROORGANIZMI .....	18
2.3.1. <i>Azotobacter chroococcum</i> .....	19
2.3.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	22
2.3.3. <i>Trichoderma</i> spp .....	23
2.3.4. <i>Beauveria bassiana</i> .....	25
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	30
3.1. ZADATAK.....	30
3.2. MATERIJAL I METODE .....	30
3.2.1. Mikrobiološke vrste .....	30
3.2.2. Održavanje mikrobnih kultura na čvrstim nosačima .....	31
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	34
4.1. ODRŽIVOST BAKTERIJE <i>AZOTOBACTER CHROOCOCCUM</i> .....	34
4.2. ODRŽIVOST BAKTERIJE <i>BACILLUS SUBTILIS</i> .....	35
4.3. ODRŽIVOST PLIJESNI RODA <i>TRICHODERMA</i> .....	36
4.4. ODRŽIVOST PLIJESNI <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> .....	37
5. ZAKLJUČCI .....	40
6. LITERATURA .....	44
7. PRILOZI.....	50

## **Popis oznaka, kratica i simbola**

**PTF**            **Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**



## **1. UVOD**

Energetska kriza u svijetu nametnula je potrebu istraživanja, racionalizacije i supstitucije novih i obnovljenih izvora energije gotovo u svim područjima čovjekove gospodarske djelatnosti. Takav je slučaj i u proizvodnji mineralnih dušičnih gnojiva. Velik utrošak energije i njezina neobnovljivost u proizvodnji mineralnih dušičnih gnojiva, njihova visoka cijena proizvodnje kao i opasnost od onečišćenja životne sredine utjecala je na smanjenje primjene mineralnih dušičnih gnojiva u proizvodnji ekonomski značajnih biljaka. Tradicionalna uniformna gnojidba umjetnim gnojivima često dovodi do preobilne ili nepotpune gnojidbe tim važnim elementom. Preobilna gnojidba može uzrokovati povećano ispiranje nitrata, a time i nepotrebne troškove i onečišćenje okoliša. Nepotpuna gnojidba opet dovodi do smanjenja prinosa. Primjenom suvremenih mjera koje je poljoprivredna znanost razradila, a praksa posljednjih desetljeća prihvatila, postižu se visoki prinosi u proizvodnji kulturnog bilja. Međutim, ista ta znanost danas upozorava da se vrhunski rezultati proizvodnje i visoka biološka kakvoća proizvoda neće moći trajno postizati u poljoprivredi bez primjene organskih gnojiva i bioloških zaštitnih preparata (Lenart, 1998.).

Biološko suzbijanje biljnih bolesti uglavnom obuhvaća primjenu komercijaliziranih bioloških pripravaka biofungicida i bioinsekticida na bazi anatagonističkih mikroorganizama čiji se antagonizam s uzročnicima biljnih bolesti ili biljnim patogenima temelji na interakcijama antibioze, kompeticije, parazitizma i inducirane biljne rezistentnosti. S obzirom na ekološki povoljne učinke biofungicida, te na sve veće uspjehe u njihovoj komercijalizaciji, biološko suzbijanje biljnih patogena postaje vrlo bitan segment u integriranoj zaštiti bilja, iako se u Hrvatskoj vrlo slabo primjenjuje. S obzirom da integrirana zaštita bilja kao dio integrirane proizvodnje (NN, 137/2012) uključuje primjenu svih raspoloživih metoda zaštite bilja integriranih u odgovarajuće mjere kojima se sprječava razvoj populacije štetnih organizama, održava uporaba sredstava za zaštitu bilja i drugih oblika suzbijanja na razini koja je ekonomski i ekološki opravdana, te smanjuju ili svode na najmanju moguću mjeru rizici za zdravlje ljudi i za okoliš, time je biološko suzbijanje biljnih bolesti svakako važan segment u primjeni integrirane zaštite bilja u biljnoj proizvodnji. Stoga se integriranu zaštitu bilja često definira kao sustav zaštite bilja koji obuhvaća primjenu bioloških, biotehničkih, kemijskih i fizikalnih mjera zaštite bilja te ostalih agrotehničkih mjera pri čemu je uporaba kemijskih sredstava za zaštitu bilja ograničena na najnužniju mjeru potrebnu za održanje populacije štetnih organizama ispod razine gospodarske štete. Sve više se i u svijetu i kod nas govori o važnosti

biološke borbe protiv štetočina bilja, uključujući biljne patogene odnosno bolesti. Komercijaliziran je veliki broj bioloških pripravaka ili biopesticida, od kojih jedan dio pripada u sredstva za suzbijanje biljnih patogena, koje često jednim imenom nazivamo biofungicidima i bioinsekticidima (Miličević i Kaliterna, 2014.). Cilj ovog rada bio je uzgojiti te umnožiti mikrobne vrste bakterija *Azotobacter chroococcum* i *Bacillus subtilis* te plijesni roda *Trichoderma* i vrste *Beauveria bassiana*. Mikrobna biomasa pomiješana je sa nosačima u smislu pripravaka koji bi poslužili kao biološki pesticidi i insekticidi, te kao mikrobiološko gnojivo. Trebalo je pratiti broj živih stanica u pripravcima tijekom određenog vremena na prirodnim supstratima kao što su alginit, vermikulit, zeolit i dijatomejska zemlja u smislu određivanja održivosti navedenih pripravaka.



## **2. TEORIJSKI DIO**

---

## 2.1. PRIRODNI SUPSTRATI

### 2.1.1. Alginit

Alginit je mineral prirodnog podrijetla koji je nastao iz mješavine biomase fosilnih algi i erodiranog vulkanskog tufa prije 4-5 milijuna godina. U to su se vrijeme u Karpatskom bazenu, gdje je postojao panonski jezerski sustav, događale snažne vulkanske aktivnosti.

Slana voda iz Panonskog mora zajedno s finim plutajućim česticama prodrla je u porozne sedre. Unutar kratera takvog eruptiranog vulkanskog stošca razmnožila se vrlo rijetka zelena alga *Botryococcus braunii*. Alge i druge plutajuće čestice smjestile su se na dnu kratera. Dobiveni mineral poznat je pod imenom alginit. Alge su se razvile u anaerobnim uvjetima. Dotok tople vrele vode na 12-14 °C koji sadrži ugljikov dioksid i rezultirajuća konstantna temperatura vode u moru dali su pozitivnu ulogu za masovnu proliferaciju algi *Botryococcus braunii*. Alginit spada u kategoriju uljnih škriljaca, ali ima jedinstvene i pojedinačne osobine koje su uzrokovale promjenu osnovnih uljnih škriljevaca u smislu njegovih fizikalnih i kemijskih svojstava. Alginit, s čistoćom većom od 90%, može se naći samo u Mađarskoj ili točnije u Karpatskom bazenu.

**Slika 1** prikazuje osnovni sastojak algi vrste *Botryococcus braunii* po čemu je alginit i dobio ime



**Slika 1** Alga *Botryococcus braunii* (<https://alchetron.com/Botryococcus-braunii>, 2021.)



**Slika 2** Različite granulacije alginita

(<https://www.facebook.com/Alinit-Kft-453476958033809/photos/>, 2021.)

### **Svojstva alginita - jedinstvenog dara sa Zemlje**

pH vrijednost alginita doseže vrlo slabu alkalnu vrijednost. Kad se mjeri u 25 ml 0,01 M otopine  $\text{CaCl}_2$ , pH je 7,6. Njegova umjerena lužnatost povoljno utječe na poboljšanje kiselog tla. Primjena alginita u alkalnim tlima ne povećava pH vrijednost. Sadržaj karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ) alginita iznosi oko 22 %. Čestice vapnenca vrlo su fine, lako topljive i stoga iznimno brzo djeluju. Tekstura alginita dokazuje distribuciju veličine čestica od 54 % gline, 40 % mulja i manje od 6 % pijeska. Prema njemačkoj klasifikaciji (AG Boden 2005) odgovara teksturi tla "blago muljevita glina", što objašnjava veliku sposobnost zadržavanja vode i hranjivih tvari. Nadalje, Alinit sadrži 10% vermikulita/klorita i većinu makro i mikro hranjivih tvari neophodnih za složeno poboljšanje i kondicioniranje tla, kao i za razvoj biljaka. Alinit sadrži 15 - 25 % humusa algi, 5 - 15 % karbonata, sadržaj biljnih hranjivih tvari (N, P, K, Mg, Ca) povišen je u usporedbi s tlom najbolje kvalitete. Alinit može zamijeniti industrijska gnojiva. Organska tvar zajedno sa glinenim mineralnim smektitom također su razlog velikog kapaciteta zadržavanja vode.

Sastav alginita prikazan je **Tablicom 1**.

**Tablica 1** Primarni sastojci alginita

Materijal	udio
Organske tvari	20 %
Dušik (N <sub>2</sub> )	2 g/kg
Fosfor P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	3,7 g/kg
Kalij K <sub>2</sub> O	7 g/kg
Magnezij Mg	30 g/kg
Kalcij Ca	60 g/kg

Alginit može apsorbirati i držati daleko više od polovice vlastite težine, bez curenja ili isparavanja. Zapravo, jedna tona alginita može pohraniti najmanje 630 litara vode, od čega je 410 litara u svakom slučaju dostupno biljkama. Nakon što se uskladišti, ova voda ostaje na raspolaganju za opskrbu biljaka dovoljnim količinama vode, što im omogućuje da izdrže razdoblja suše. Ciklus zadržavanja i ispuštanja vode može se ponavljati zauvijek. On ima sposobnost uklanjanja smrada nastalog raspadanjem organske tvari i tekućih izlučevina pa se stoga primjenjuje u nastambama za stoku. Smanjenjem razine neugodnih mirisa i plinova u hranilištima za stoku, povećava se higijena stoke za mužnju, uzgoj peradi, čak i kućnih pasa i mačaka.

Alginit izvanredno poboljšava kakvoću tla stoga se preporučuje za uporabu u poboljšanju tla svugdje gdje postoji potreba za vezanjem i zadržavanjem vode i hranjivih tvari. To se odnosi na svu obrađenu zemlju, osobito na rastresito, pjeskovito tlo. On poboljšava kvalitetu tla u smislu povećanog sadržaja organske tvari. Alginit ispunjava ekološke standarde organske obrade tla koji propisuju isključivu uporabu prirodnih materijala. S visokim kapacitetom zadržavanja, alginit ometa istjecanje hranjivih tvari iz tla. U kompostu pomiješanom s alginitom povećava se sadržaj hranjivih tvari, uključujući mikronutritivne elemente, kao i sadržaj humusa. Kompost nema mirisa i smanjuje se sadržaj patogenih mikroorganizama. Trajanje kompostiranja znatno je kraće. I na kraju ovaj dar s neba ima i ljekovita svojstva pa se mulj koji se spravlja u lječilištima koristi protiv reumatskih oboljenja, psorijaze, artritisa i sl.

(<https://www.facebook.com/Alginit-Kft-453476958033809/photos/>, 2021.).



### 2.1.2. Vermikulit

Vermikulit je prirodni mineral (magnezij-aluminij-željezo-silikat) koji se vadi u raznim zemljama svijeta, uključujući SAD i Južnu Afriku. Ime je dobio po latinskom „vermiculare“, što znači uzgoj crva, i engleskom sufiksu „ite“ koji znači mineral ili stijena. Kada se vermikulit zagrije na vrlo visoke temperature, on se širi u dugačke niti nalik malim crvima. To je lagan, netoksičan sterilan materijal koji ne propada s vremenom. Ima neutralni pH. Inače se koristi kao izolacijski materijal u građevini. Za uporabu u hortikulturi, prodaje se u obliku laganih mrko-zlatnih pahuljica. Vermikulit može apsorbirati tri ili četiri puta veću težinu vode i također privući različite biljne hranjive tvari poput kalija, magnezija i kalcija. Ove ga kvalitete čine korisnim za razmnožavanje i za sadnju biljaka koje se najbolje snalaze u vlažnom kompostu, uključujući i sobne biljke. Služi i za prijenos i čuvanje mikroorganizama. Vermikulit pomaže u prozračivanju tla istovremeno zadržavajući vodu i hranjive tvari koje zatim oslobađa. Vermikulit je stoga koristan u sjetvi i razmnožavanju sjemena. Također se može dodati kompostu kućnih biljaka. Budući da vermikulit zadržava vodu, a zatim se cijedi poput spužve, izvrstan je za dodavanje u kompost kućnih biljaka za koje se čini da ih uvijek treba zalijevati. Korijeni biljke mogu uzeti vlagu kada im je potrebna. Vermikulit također prozračuje kompost, što pomaže spriječiti njegovo sabijanje ili stvaranje kora. Vermikulit također štiti sadnice od prigušivanja i drugih gljivičnih bolesti. Također pomaže u izolaciji od promjena temperature i vlage u staklenicima. Koristi se i kao sredstvo protiv zgrušavanja u gnojivima (<https://en.wikipedia.org/wiki/Vermiculite>, 2021.).

Kao sredstvo za poboljšanje tla treba ga primijeniti tamo gdje je izvorno tlo teško ili ljepljivo, preporučuje se nježno umiješati vermikulit u tlo u količini do jedne polovice volumena tla. Time se stvaraju zračni kanali i omogućuje mješavini tla da diše. Miješanjem vermikulita u cvjetnjacima i povrtnjacima ili u lončanicama osigurat će se potreban zrak za održavanje snažnog rasta biljaka. Tamo gdje su tla pjeskovita, miješanje vermikulita u tlo omogućit će tlu da zadrži vodu i zrak potreban za rast. Za čuvanje lukovica i korjenastih usjeva treba ga usipati u posude oko lukovica. Apsorpcijska moć vermikulita djeluje kao regulator koji sprječava plijesan i fluktuaciju vlage tijekom razdoblja skladištenja. Ne upija vlagu iz unutrašnjosti uskladištenih gomolja, ali uzima slobodnu vodu izvana sprječavajući truljenje skladištenja. Vermikulit, sam ili pomiješan s tlom ili tresetom, koristi se za klijanje sjemena; potrebno je vrlo

malo zalijevanja. Često se koristi i kao stelja za razne životinje ili kao medij za inkubaciju jaja (<https://www.gardenersworld.com/how-to-grow-plants/how-to-use-vermiculite/>, 2021.).

**Tablica 2** Kemijski sastav vermikulita

KEMIJSKA ANALIZA	
SiO <sub>2</sub>	34- 6%
MgO	16-35%
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10-16%
H <sub>2</sub> O	8-16%
FeO	6-13%
K <sub>2</sub> O	1- 6%
CaO	1- 5%
Drugo	0,2-1,2%



**Slika 3** Različite granulacije vermikulita

(<https://www.fertilefibre.com/blog/what-is-vermiculite/>, 2016.)

### 2.1.3. Zeolit

Zeolit je naziv dobio od švedskog mineraloga Cronstedt-a u 18 st. Cronstedt je proučavao prirodni zeolit pri naglom zagrijavanju, i njegovim kretanjem pri isparavanju vode. Upotrijebio je grčku riječ koja označava " stijenu koja ključa ", te ju nazvao zeolit.

Zeoliti se u prirodi nalaze u vulkanskim nakupinama i stijenama nastalim taloženjem plinova i para, te u oceanima. Zeoliti su prirodni minerali vulkanskog podrijetla, nastali iz četiri elementa: zemlje, vatre, vode i zraka. Produkt su više milenijskog kemijskog procesa i prirodne reakcije između kondenzata vulkanskih para i oceanske vode u specifičnim geološkim uvjetima. Zeoliti su minerali čije je nastajanje započelo prije 100 milijuna godina, kada su iz mora izranjali vulkani. Prilikom erupcije vulkana, tekuća lava i gusti pepeo, u kontaktu s morskom vodom, formirali su stvrdnutu alumosilikatnu lavu iz koje se, tisuću godina kasnije, počeo formirati zeolit. Zeolit, kao mineral negativnog ionskog naboja, u organizmu djeluje biofizikalno, a ne kemijski ni farmakološki, te prirodno, učinkovito i selektivno detoksicira organizam od pozitivno nabijenih teških metala, radioaktivnih metala, i pesticida. Koristi se sa svrhom smanjivanja toksičnosti mikotoksina u hrani za životinje, osobito aflatoksina, a neki autori navode i njegovo antimikrobno djelovanje. S obzirom na morfološku građu javljaju se u tri osnovna oblika: vlaknasti zeoliti, lisnati i kristalni zeoliti. Zeoliti su prirodni ili sintetički hidratizirani alumosilikati s otvorenom trodimenzionalnom kristalnom strukturom, sačinjenoj od aluminijskih, silicijevih i kisikovih atoma u čijim se porama nalaze molekule vode. Na taj je način omogućena izmjena iona, molekularno filtriranje, apsorpcija, difuzija, dehidracija, reverzibilna dehidracija i kataliza. (<https://www.agroklub.com/stocarstvo/sa-zeolitom-bolje-napreduju-i-biljke-i-zivotinje/23950/>, 2016.)

Klinoptilolit je podvrsta zeolita koji se najviše upotrebljava kao lijek u humanoj medicini, zatim značaj ima i u poljoprivredi i hranidbi životinja, proizvodnji deterdženata itd. Njegov veliki značaj ogleda se u tome jer ima osobinu da privlači, adsorbira vodu, plinove, teške metale, kancerogene toksine, organske otrove i druge štetne tvari. Koristi se za detoksikaciju zemljišta, ljudi i životinja zbog svoje adsorpcijske moći. Poznato je da zeolit poboljšava kvalitetu i strukturu zemljišta. Zemljište je prozračnije i rastresitije. Smanjuje kiselost zemljišta tj. regulira pH vrijednost zemljišta. U borbi protiv suše daje dobre rezultate jer ima osobinu vezivanja vlage. Ubrzava rast biljaka, ratarskih, povrtlarskih, voćarskih kultura i cvijeća (Horvat, 2013.). Pljesniva krmiva nanose ogromnu štetu stočarskoj proizvodnji jer plijesan smanjuje hranidbenu energetska iskoristivost krmiva, smanjuju prirast i rast tjelesne mase, utječu na smanjenje proizvodnje kakvoću mlijeka. Na muznim farmama Belja d.d. povećala se dnevna količina mlijeka za dvije litre po kravi, od kada im u hranu dodaju aktivirani zeolit klinoptilolit. I zdravstveno stanje krava se znatno popravilo. Tvrdi su papci, pH buraga je optimalan,

smanjena je acidoza i ketoza, broj somatskih stanica je smanjen. Pospješuje iskoristivost kalcija u organizmu. Zeolit se sastoji od 60% silicijevog dioksida, zbog čega je izuzetno važan u proizvodnji kalcija, koji je neophodan u tijelu za snagu kostiju, koštanu srž, kvalitetu i snagu vezivnog tkiva. Također je sastojak hemoglobina, dijela crvenih krvnih zrnaca. Zeolit čisti zemljište od metala i pesticida. Zadržava i regulira razinu vode u zemljištu čak i višak vode veže za sebe i postepeno ga oslobađa kad biljci ponestane i na taj način se bori za vrijeme suše. Sadrži biogene, mikro elemente kao što su Mg, Ca, Mo, Mn, i na taj način utječe na izgled, zdravlje biljke i jača njenu otpornost u borbi protiv bolesti i štetnika. Utječe na cvjetanje, sazrijevanje, boju i okus. Iz tog razloga se i u cvjećarstvu dosta koristi jer su cvjetovi veći, bujniji i intenzivnije obojeni. Svoju primjenu je našao i prilikom skladištenja voća, povrća i prehrambenih proizvoda. Ima dugotrajno djelovanje čak do 5 godina od njegovog unošenja u zemljište. Ovaj mineral vulkanskog porijekla ima široku primjenu u biljnoj proizvodnji jer pomaže usjevima u sušnim razdobljima, neutralizira i čisti tla te pospješuje stvaranje mikroorganizama i humusa. Vrlo je djelotvoran i kao dodatak u ishrani životinja. Zeolit je dozvoljen u Europskoj uniji za široku uporabu u poljoprivredi za ishranu stoke, kao dodatak stočnoj hrani, zato što veže na sebe sve otrove, između ostalog mikotoksine, pesticide iz probavnog trakta životinja te na taj način im podiže imunitet i oslobađa meso, mlijeko, jaja od spomenutih otrova. Upotrebljava se u poljoprivredi i u ratarstvu, voćarstvu, vinogradarstvu, cvjećarstvu, gdje je našao široku primjenu kod sjetve i sadnje biljaka zato što ima osobinu da povlači na sebe vodu, hranjiva i dušik, zadržava ih u sebi i postupno otpušta dok god traje vegetacija. Povoljno djeluje na biljke ako je jaka suša, one dulje sušno razdoblje lakše podnose. Ako je jako kišovito vrijeme zeolit čuva da se hranjiva ne isperu iz zemlje. Znači, biljke u sebe povuku dosta suhe tvari, aminokiselina, fosfora i kalija. Biljke kojima se dodaje zeolit, imaju jako veliku korijensku masu.

(<https://www.agroklub.com/agro-hobi/upotreba-zeolita-u-biljnoj-proizvodnji/46193/>, 2018.).



Slika 4: Zeolitna stijena (<https://www.agroklub.com/agro-hobi/upotreba-zeolita-u-biljnoi-proizvodnji/46193/>, 2018.)



Slika 5 Različite granulacije zeolita (<https://maricavrtlarica.com/svi-pricaju-o-zeolitu/>, 2018)

### 2.1.4. Dijatomejska zemlja

Dijatomejska zemlja je prirodni, abrazivni prah nastao taloženjem fosiliziranih ostataka dijatomejskih algi u alkalnoj vodenoj sredini (Korunić i sur. 2010.). Sadrži od 70-95% amorfnog silicijevog dioksida te 2-4% minerala glina. Takvi fosilizirani ostaci osim silicija sadrže i druge minerale kao što su fosfor, selen, kalcij, natrij, kalij, magnezij, bakar, cink i željezo. Ugibanjem dijatomejske alge padaju na dno vodenog staništa te stvaraju naslage sedimenta koje čovjek za svoju upotrebu može minirati, mljeti, sušiti i dalje koristiti kao dijatomejsku zemlju (diatomit/kieselgur). Komercijalno je dostupna u tri oblika: granulirana, mljevena te

kalcinirana. Ona ima različite poljoprivredne, hortikulturalne i industrijske namjene. Stabilna je i inertna s drugim tvarima pa nije otrovna (Korunić i sur. 2016.)

Dijatomejske alge ili alge kremenjašice su jednostanični fotosintetski eukarioti. Ove mikroalge pripadaju carstvu *Protista*, razredu *Bacillariophyceae*. Pronalaskom fosila dokazano je da dijatomeje postoje unatrag 150 do 200 milijuna godina. Glavna karakteristika algi kremenjašica je građa zaštitne ljuštore od organskog matriksa i amorfnog silicija koji potpuno štiti citoplazmatski dio stanice. Stanište dijatomeja su vodene površine svih klimatskih područja, dakle nalazimo ih u slatkovodnim, morskim te vlažnim kopnenim staništima. Žive pojedinačno ili u kolonijama zvjezdastog, vrpčastog ili lepezastog oblika gdje je svaka individualna stanica veličine od 2-500 mikrometara. Kao fotosintetski organizmi stvaraju prema procjenama oko 25% kisika uz organske tvari (Werner i Stangier, 1976.). Procjenjuje se kako svaki peti udah dugujemo upravo dijatomejama (Mann, 2010.). Također proizvode dugolančane masne kiseline pa su izvor energetske bogatih molekula koje su hrana svim članovima prehrambenog lanca vodenih ekosustava od zooplanktona do kitova. Istraživanje ovih vrsta omogućava široku primjenu u različite svrhe; od nanotehnologije, medicine, akvakulture, vinarstva, kozmetičke industrije, izrade izolacijskih materijala, monitoringa vode, proizvodnje biogoriva i mnogih drugih.

Mogu također biti u simbiozi s cijanobakterijama u svrhu fiksiranja dušika. Od velike ekološke važnosti bile su još početkom 20. stoljeća kada su služili kao jedan od prvih bioloških sistema za evaluaciju kvalitete vode i procjene onečišćenja (Kolkwitz i Marsson, 1908.). Upravo zbog svoje osjetljivosti na promjene i onečišćenja u okolišu dijatomeje i drugi fitoplanktoni koriste se za procjenu rizika za okoliš i monitoring slatkovodnog staništa. Kako su jedan od glavnih izvora hrane u morskom hranidbenom lancu, istraživanje učinka onečišćenja na dijatomeje može pomoći u predviđanju utjecaja onečišćenja na cijeli hranidbeni lanac. Dokazano je da silicijev dioksid povoljno djeluje na kosti, tetive, kožu hrskavice, krvne žile i vitalne organe organizma stoke i kućnih ljubimaca pa se stoga može dodavati prehrani različitih životinja (mačke, psi, perad, goveda, ovce, koze, svinje, konji i td.). Pospješuje rad probave, povoljno utječe na metabolizam, vitalnost, produktivnost životinja. Negativno nabijene čestice dijatomejske zemlje pomažu apsorpciji teških metala, pesticida te ostataka lijekova. Još jedna primjena dijatomejske zemlje je za smanjenje populacije nametnika kućnih ljubimaca poput grinja, buha i parazita pa se primjenjuje posipanjem u uzgajalištima ili na mjestima gdje borave

kućni ljubimci. Djeluje osim kao insekticid i kao repelent. Može se direktno na krzno ljubimca posipati izbjegavajući područje očiju a pomaže i u kontroli mirisa te upijanju vlage. Osim za kućne ljubimce koristi se i u nastambama drugih životinja za kontrolu buha, krpelja, grinja i dr. Jednako kako se koristi za kućne ljubimce može se upotrebljavati za kontrolu insekata (buhe, mravi, pauci, žohari) u domu. Nije toksična, ne oštećuje površine niti ostavlja mrlje. Primjenjuje se posipanjem po namještaju i površinama te usisavanjem nakon nekoliko dana djelovanja. Također dobro upija ulje iz masnih mrlja, čisti metal i sanitarije, upija neugodne mirise u hladnjacima, kantama za smeće i obući. Dijatomejska ili infuzorijska zemlja se može koristiti kao prirodni fizikalni insekticid u obliku inertnog prašiva koje nije štetno za toplokrvne organizme (Korunić i sur., 2016.). Inertni zaprašivači u obliku finog praha uništavaju voštani sloj egzoskeleta, amorfni silikati apsorbiraju vosak kutikule, uslijed čega kukac gubi vodu, te ugiba u konačnici od dehidracije (Barčić i Maceljki, 2002.) Taj se efekt zove „Zacherov efekt“ kojeg su opisali Zacher i Kunike 1931. Ovo je ekološki način suzbijanja nametnika jer nema štetnih rezidua ili kemijskih ostataka, a insekti ne razvijaju imunitet niti postaju tolerantni na ovaj insekticid. Primjenjuju se doze od 0,1 - 1 kg po toni skladištene žitarice. Dijatomejska zemlja također djeluje protiv puževa, lisnih uši, gusjenica, voćnih mušica i drugih. (Korunić i sur., 2016.).



**Slika 6** Dijatomejska zemlja

(<https://hr.domesticfutures.com/garden-safe-diatomaceous-earth-958> , 2021.)

### 2.2. MIKROBNI PRIPRAVCI

Mikrobiološki preparati kao aktivnu tvar u svom sastavu imaju žive mikrobiološke organizme iz prirode koji imaju sinergijski efekt na rast i razvoj uzgajanih kultura, potpomažu razvoju biljaka u stresnim uvjetima, stimuliraju prirodne procese i aktiviraju obrambene mehanizme biljaka i njihovu otpornost na pojedine bolesti. Mikrobiološki organizmi povećavaju mikrobiološku aktivnost u tlu, potpomažu procese razlaganja organskih ostataka i aktiviraju hranjive materije iz tla, povećavaju dostupnost i mobilnost makroelemenata (prvenstveno fosfora koji je odgovoran za rast i razvoj samih biljaka) te aktiviraju mehanizme prirodne obrane biljaka od napada različitih patogena. Višestrukom primjenom ovih preparata prirodnim putem se vrši suzbijanje patogena u tlu i razvija se zdrav eko sustav za proizvodnju povrća, bez negativnih i štetnih efekata kemijskih proizvoda. Kako bi plodovi zadovoljili što veći broj kriterija, proizvođači su primorani upotrebljavati sredstva kojima je svrha očuvanje proizvoda od korova, bolesti i štetnika, ali nisu sva sredstva jednako pogodna za okoliš. Naime, većinom se upotrebljavaju toksična kemijska sredstva (pesticidi) koja osim okoliša oštećuju i ljudski organizam kako samim unosom u organizam tijekom hranjenja tako i primjenom na biljke preko kože ili dišnog sustava. Tijekom zadnjih nekoliko godina, kako su ljudi postali svjesniji visokih cijena i štetnosti pesticida, pažnja je preusmjerena na primjenu bioloških načina suzbijanja što nas dovodi do spajanja biologije i farmacije te nastanka biopreparata.

Biopreparati su „prirodni neprijatelji“ štetnih organizama i prirodni pesticidi koji su pripremljeni za biološko suzbijanje bolesti i štetnika.

Prednosti upotrebe biopreparata su:

- ne zagađuju okoliš i podzemne vode,
- povoljno djeluju na tlo te popravljaju njegova svojstva,
- bolesti i štetnici ne mogu postati rezistentni na njih
- djeluju na više od 95 % bolesti i štetnika na svim kulturama
- ne postoji karenca nego se proizvodi mogu konzumirati odmah nakon tretiranja
- potpuno sigurni za rukovanje prilikom tretiranja,
- osiguravaju sigurnu ekološku proizvodnju gdje su poticaji viši i za 200 %



- široka primjena promiče njihov blagotvoran učinak i veće korištenje resursa

Iako se radi o sredstvima koja su efikasna u borbi protiv patogenih gljiva kao i svako sredstvo, tako i ovo posjeduje određene prednosti i nedostatke. Radi se o sredstvima čija su baza organizmi koji su prirodnog podrijetla. Ova sredstva omogućavaju razvoj održive poljoprivrede primjenom bioloških agensa u programima integrirane zaštite bilja. Ova sredstva ne narušavaju biodiverzitet s obzirom da se radi o organizmima koji su prirodnog podrijetla. Primjenom ovih sredstava smanjujemo potrebu za kemijskim sredstvima uslijed kojih može doći do uništavanja organizama koji nisu ciljane skupina. Ova sredstva su upravo zbog toga manje štetna od kemijskih preparata. Osim ovoga, prednost biofungicida je svakako kraća karenca i radna karenca, te njihova široka primjena u svim tipovima biljne proizvodnje. Primjenom biofungicida možemo trajno unijeti dobre organizme u tlo, te samim time obogatiti tlo, biodiverzitet i osigurati se kroz izvjestan broj generacija. No kao i sve i ovi preparati imaju brojne nedostatke. Prije svega radi se o preparatima koji se teže uvode u primjenu. Za razliku od kemijskih sredstava koji imaju širok spektar djelovanja u ovom slučaju radi se o sredstvu koji ima uzak spektar djelovanja. Za razliku od kemijskih sredstava djelovanje biofungicida je znatno sporije i njihova primjena je moguća isključivo u slučaju prevencije. S obzirom da se radi o sredstvima čija su baza organizmi iz prirode sasvim je logično da im je i rok trajanja znatno kraći od kemijskih sredstava, te da im je cijena nešto viša. Još neki od nedostataka ovih sredstava je potreba za višekratnom primjenom, te sniženje pragova štetnosti. U današnje vrijeme sve više jača svijest za proizvodnjom zdrave hrane, što dovodi u pitanje korištenje kemijskih fungicida i insekticida. Zbog zahtjeva tržišta na sve više površina se uzgajaju poljoprivredni proizvodi po ekološkim uvjetima proizvodnje što uključuje primjenu bioloških pripravaka koji sadrže korisne mikroorganizme.

Kukci šire bolesti i uzrokuju oštećenja i razaranje zrna žitarica. Stoga je suzbijanje štetnih kukaca iznimno važno u poljoprivredi, a i u sprječavanju bolesti kod ljudi (Duraković, 1996.). Različite vrste bakterija danas se upotrebljavaju radi sprječavanja šteta koje uzrokuju kukci. Bakterija *Bacillus thuringiensis* u biopreparatima koristi se radi suzbijanja štetnih gusjenica na djetelini, crvi na sjemenju, kukaca koji buše zrnje kukuruza, crva koji napadaju kupus i listove duhana itd. Ta vrsta bakterija sintetizira proteinske kristale otrovne za probavni sustav kukaca. Korisna gljiva *Beauveria bassiana* je entomopatogena i prirodno raste u tlima diljem svijeta, te ima parazitsko djelovanje na različite vrste člankonožaca.

Ime je dobila po talijanskom entomologu Agostinu Bassiju koji ju je 1815. godine otkrio kao uzročnika bolesti zvane „white muscardine disease“ koja se pojavila na jedinkama *Bombyx mori* (dudov svilac), uništavajući pri tome cijelo tijelo ovih korisnih insekata. Dakako, ovo otkriće dovelo je do ideje korištenja *B. bassiana* - e kao entomopatogene gljivice. Za uspješnu zaštitu usjeva od bolesti, potrebno je djelovati preventivno, a najefikasnije je djelovati u samu srž biljke. Pripravak na bazi *Trichoderma* spp. najučinkovitije je aplicirati na samo sjeme, jer je upravo to vrlo jednostavna i efektivna metoda. Netom prije sjetve, sjeme je potrebno obasipati suhim puderom ili prahom koji sadrži gljivice roda *Trichoderma*. Tretiranje sjemena ovim prahom potrebno je provesti u kontroliranim uvjetima, te u toplim i vlažnim uvjetima. Ova metoda ima potencijalne prednosti u odnosu na obično tretiranje sjemena, upravo zbog toga jer rezultira bržim i ujednačenijim pojavljivanjem sadnica (Šimanović, 2018.).

### 2.3. MIKROORGANIZMI

Mikroorganizmi su najstariji stanovnici zemlje i prethodnici su svih živih organizama. Moglo bi se reći da su kosmopolitni organizmi rasprostranjeni u svim životnim sredinama i klimatskim zonama, u zraku, vodi i tlu. Populacije mikroorganizama u tlu značajne su za razlaganje organske tvari i osiguranje hranjivih sastojaka biljkama – posebna znanstvena disciplina (mikrobiologija zemljišta) proučava sve ove složene procese i odnose u tlu koje je specifična životna sredina po biotičkim i abiotičkim kao i ekološkim uvjetima. Bez mikroorganizama tlo bi bilo mrtvo tlo (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). U tlu je zastupljen velik broj mikroorganizmima, koji čine veoma funkcionalne mikrobiocenoze koje su prilagođene uvjetima u tlu i zajedno s florom i faunom daju tlu svojstva živog organizma (Jarak i Čolo, 2005.). Mikroorganizmi čine od 0,1 do 3% cjelokupne organske tvari u tlu. Najviše mikroorganizama ima u gornjim slojevima, a s dubinom tla broj se smanjuje. Uloga mikroorganizama u razlaganju organske tvari i nastajanju humusa je vrlo važna. U korisnu mikrobnu populaciju rizosfere ubrajamo mikroorganizme koji imaju pozitivan utjecaj na biljke. Jedni od najznačajnijih mikroorganizama su biološki fiksatori dušika. U prirodi postoji kružni tok dušika gdje je atmosfera izvor dušika kojega u tlo transformiraju mikroorganizmi prilikom procesa koji se naziva fiksacija dušika. Biološka fiksacija dušika je proces u kojem posebne

skupine mikroorganizama usvajaju elementarni dušik iz atmosfere i reduciraju ga do amonijaka.

### 2.3.1. *Azotobacter chroococcum*

*Azotobacter chroococcum* je slobodno živa bakterija koja posljednjih godina privlači pozornost znanstvenika i poljoprivrednika mnogih zemalja jer veže dušik iz zraka i poboljšava rast biljaka i prinos žitarica, uljarica i povrtlarskih kultura. Osim toga ova bakterija ima odlike fungicida, sposobnost razgradnje pesticida i produkcije biljnih hormona (Narula, 2000). Zbog navedenih odlika moguća je njezina primjena kao biološkog gnojiva u poljoprivredi. Konačno, to je potencijalni mikroorganizam za pročišćavanje zagađene okoline i vraćanje zemljinog zdravlja.

*Azotobacter chroococcum* je bakterija koja je sposobna vezati dušik iz zraka i pomoću svog enzimskog sustava nitrogenaza reducirati molekularni dušik iz atmosfere do amonijaka i ostalih važnih spojeva što sadrže dušik (Beijerinck, 1901). Zbog toga svojstva ona je interesantna kao potencijalni sastojak biološkog gnojiva (Šantek i Marić, 1995).

Primjena bakterije *Azotobacter chroococcum* kao mikrobnog gnojiva značajno povećava sadržaj suhe tvari, ukupan sadržaj dušika i prinos suncokreta, kukuruza, pšenice, (Emam i sur., 1986), šećerne repe (Mrkovački i sur., 2001) i ostalih povrtlarskih i ratarskih kultura.

Bakterije vrste *Azotobacter chroococcum* su asporogene, gram negativne, heterotrofne i dosljedni su aerobi. Optimalna reakcija sredine za uzgoj bakterije *Azotobacter chroococcum* je neutralne vrijednosti, a optimalna temperatura varira od 25-30° C. U ostarjelim kulturama stanice *Azotobacter chroococcum* proizvode netopivi crni pigment melanin (Narula, 2000).

*Azotobacter chroococcum* ne proizvodi endospore, ali formira debelo obrubljene ciste kao dio njezinog životnog ciklusa. Ciste su stanice u fazi mirovanja. Nastaju iz vegetativnih stanica kada se bakterija nađe u nepovoljnim uvjetima. Svrha stvaranja cista je preživljavanje isušivanja, nedostatka hranjiva i mehaničkih oštećenja. Kada se stanica prevede u oblik ciste u njoj se zaustavljaju svi metabolički procesi. Mogućim dolaskom u povoljne uvjete bakterija opetovano prelazi u stanje vegetativne stanice. Bakterijske stanice u stanju cista pokazuju veliku otpornost na djelovanje kemikalija. Ciste sadržavaju velike količine kalcija, ali ne i dipikolinske kiseline. Kalcij je taj koji omogućuje otpornost na isušivanje. Dok su u stanju cista,

stanice ne mogu fiksirati dušik. Mnogi znanstvenici diljem svijeta već dugi niz godina proučavaju bakteriju *Azotobacter chroococcum*, tako da primjerice u Indiji postoji i standard o uzgoju i nacjepljivanju bakterije *Azotobacter chroococcum*. Najvažnija osobina bakterije *Azotobacter chroococcum* je sposobnost vezanja slobodnog dušika iz zraka pomoću enzima nitrogenaze pri uzgoju na podlogama bez izvora dušika uz nužno prisustvo organskog ugljika kao izvora energije, a to mogu biti: glukoza, saharoza, neki alkoholi, primjerice manitol, organske kiseline, i sl. Bakterije ove vrste imaju najveću respiratornu aktivnosti jer su sposobne vezati i do 30 mg dušika iz zraka pri oksidaciji 1 g ugljikohidrata. Za aktivnost enzima nitrogenaze nužno je prisustvo molibdena ili vanadija koji mogu biti zamijenjeni i željezom. Bakterija *Azotobacter chroococcum* koristan je zemljišni mikroorganizam koji ima pozitivan utjecaj na rast i razvoj biljaka. Njezina prisutnost u zemlji označava plodnu i obrađivanu zemlju. U šumskom zemljištu gotovo da je i nema U neobrađenom i toksičnom zemljištu također nije prisutna. Njezin broj u obrađivanom zemljištu se kreće od nekoliko tisuća do nekoliko desetaka tisuća u gramu zemljišta (Narula, 1990.).

### **Mogućnosti primjene**

#### **Vežanje dušika iz zraka**

U klimi umjerenog pojasa mikroorganizmi u jednoj godini vežu 20-40 kg dušika iz zraka po hektaru. Najveći dio vezanog dušika dostupan je biljkama tek nakon uginuća i liziranja stanica bakterija. Mnogi autori pokušali su praktično primijeniti to svojstvo vezanja dušika iz zraka putem *Azotobacter chroococcum*, te njen vrlo važan pozitivan učinak u proizvodnji koji ističe Narula, (1990.).

#### **Proizvodnja biljnih faktora rasta**

*Azotobacter chroococcum* luči biljne faktore rasta kao što su: giberelini, citokinoni, indol octena kiselina itd. (Narula, 1990.).

Fiziološki aktivne tvari su one koje u određenim uvjetima imaju isti stimulacijski ili inhibicijski učinak na fiziološke i biokemijske procese u biljci, a što rezultira metabolitskim i morfološkim promjenama. Fitohormoni ili biljni hormoni su regulatori procesa rasta i razvitka, a dijele se u 5 grupa: auksini, giberelini, citokinini, apsicinska kiselina i etilen.

#### **Biološka kontrola patogenih gljiva i nematoda**

Zemljišne gljive, najčešći nametnici na zrnju ječma (*Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium* itd.) izazivaju lošu humifikaciju, tj. stvaraju nepovoljne oblike kao što su: krenska i apokrenska

kiselina, čime pojačavaju kiselost zemljišta što se nepovoljno odražava na rast azotofiksacijskih i nitrifikacijskih bakterija (Sharma, 1987.).

Antagonističko djelovanje bakterije *Azotobacter chroococcum* na fitopatogene gljive proučavali su mnogi ali nije razjašnjeno uzrokuju li to siderofore ili antibiotici. Bakterija *Azotobacter chroococcum* ima i fungistatično djelovanje. Naime, ona promovira rast biljke u početnom stadiju time što inhibira razvoj *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. i *Penicillium* sp. koji su vrlo često prisutni na sjemenu i sintetiziraju brojne toksične sastojke (Sharma, 1987.).

### **Proizvodnja siderofora**

Siderofore su spojevi niske molekularne mase koje nastaju pri nestašici željeza, a služe kao prenosioci Fe (III) u mikrobnim stanicama. U dodatku izvornog željeza za proizvodnju stanica siderofore mogu djelovati kao faktori rasta i u nekim slučajevima kao potencijalni antibiotici. Željezo je četvrti po važnosti element zemljine kore i prijeko je potrebno za rast svih živih bića. Također je važan sastojak enzima kao što su peroksidaze, katalaze, hidrogenaze i ključnih elemenata u vezanju dušika, hidrogenaza i dinitrogenaza reduktaze (Narula, 2000.).

### **Sinteza alginata i biorazgradive plastike**

Bakterije iz roda *Azotobacter* imaju još jednu pozitivnu osobinu. One stvaraju ekstracelularnu tvar sluzave ili želatinozne prirode. Ta tvar može stajati čvrsto priljubljena kao sloj oko stanice i naziva se kapsula ili se može slobodno odijeliti od stanice pa se naziva sluz ili gumasta masa i služi kao sirovina za proizvodnju biološki razgradivih plastičnih masa (Oppenheim i Marcus, 1970.).

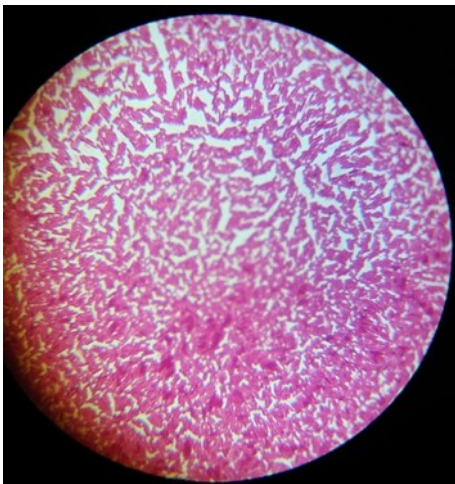
Osim navedenih svojstava, bakterije iz roda *Azotobacter* imaju sposobnost:

- biološke razgradnje pesticida (lindana), fenolnih spojeva i sl. (Gupta i Narula, 1996.);
- otapanja fosfata (Kumar i Vivek, 1998.);
- proizvodnje enzima (Narula, 2000.);
- proizvodnje vitamina B12 i C vitamina (Sankaram i Sundara, 1962.);
- primjene u ribnjacima za hranidbu riba; (Narula, 2000.)
- povećavanja sadržaja planktona u vodi (Narula, 2000.).

Osobine i mogućnosti primjene bakterije *Azotobacter chroococcum* su neiscrpan izvor za istraživanje mnogim znanstvenicima.

### 2.3.2. *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* je široko rasprostranjena, aerobna, štapićasta kristalomorfna, sporogena, gram pozitivna bakterija koja nastanjuje tlo te se obično koristi kao biološki insekticid. *Bacillus thuringiensis* se također javlja u probavnom traktu leptira, na lisnim površinama, u vodenim okruženjima, u okruženjima bogatim insektima te mlinovima za brašno i objektima za skladištenje zrna. Za ovu bakteriju može se reći da živi u svim kopnenim ekosistemima, jer ona tijekom sporulacije formira spore koje su otporne na sušu i općenito na visoke temperature.



**Slika 7** Mikroskopski prikaz bakterije *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis*, kao entomopatogena bakterija spominje se prvi puta 1901. od strane japanskog biologa Ishiwataria Shigetanea i to kod gusjenica leptira *Bombyx mori* (dudov svilac). Otkrio ju je na način da je s mrtvih gusjenica izolirao uzrok bolesti tada nazvane „sotto disease“ (sudden collapse disease). Bolest je bila odgovorna za gubitak brojnih svilaca u Japanu i okolici. Shigetane je tada toj novoj i nepoznatoj bakteriji dao ime *Bacillus sotto* (sotto jap. collapse), referirajući pri tome na paralizu koju ta bakterija uzrokuje u dodiru s ciljanim organizmom (Jantoš, 2019.). Životni ciklus ove bakterije karakteriziraju dvije faze koje uključuju vegetativnu diobu stanica i nastanak spora. Vegetativna stanica ima oblik štapića, dugačka je oko 2 – 5  $\mu\text{m}$  a široka oko 1  $\mu\text{m}$ . Tijekom ovog ciklusa, odvija se proces rasta stanice te se stanica dijeli u dvije uniformne stanice kćeri. Nastankom nepovoljnih uvjeta (nedostatak hranjivih tvari) dolazi do sporulacije. Sporulacija je formiranje endospora u sporangijima. Endospore su vrlo otporne na nepovoljne uvjete, a u toku sporulacije bakterija kao dodatak

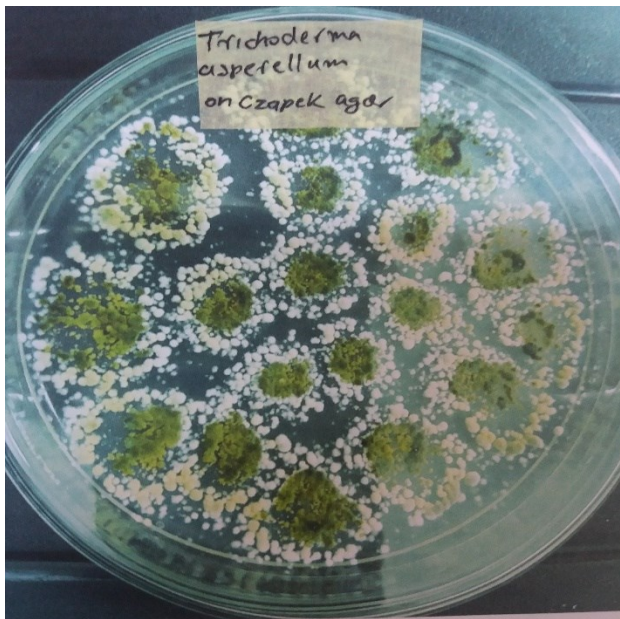
endospori proizvodi parasporalno tijelo koje sadrži jedan ili više proteina kristalne forme. Tijekom sporulacije, unutar svojih stanica, *Bacillus thuringiensis* tvori kristalni protein koji se naziva beta endotoksin te posjeduje insekticidna svojstva i komercijalni je sastojak formulacije preparata. *Bacillus thuringiensis* producira različite varijante ovih proteina u velikom broju te također veliki broj toksina s insekticidnim djelovanjem. Mehanizam djelovanja bakterije *Bacillus thuringiensis* kao biološkog insekticida je specifičan. Navedeni proces narušava osmoregulacijski mehanizam stanične membrane, uzrokujući bubrenje i razaranje stanica probavila. Zbog povećanog ulaska vode, epitelne stanice se rastvaraju i izbacuju svoj sadržaj u unutrašnjost probavnog trakta. Crijevo postaje paralizirano. Tijekom tog razdoblja, ličinka prestaje s ishranom i dolazi do mješanja hemolimfe s sadržajem crijeva. Posljedica toga je uspostavljanje uvjeta za sazrijevanje spora bakterije *Bacillus thuringiensis*. Vegetativne stanice korisne bakterije *Bacillus thuringiensis* iz crijeva ličinke i uobičajene bakterije crijevnog trakta prodiru kroz oštećenu stjenku crijeva u tjelesnu šupljinu, odnosno hemolimfu, uzrokujući septikemiju, što uz primarno gladovanje dovodi do uginuća ličinke (Jantoš, 2019.).

### 2.3.3. *Trichoderma* spp.

Plijesni roda *Trichoderma* su dobro znane kao nesavršene gljivice, brzo rastuće u kulturama te kao dobri proizvođači zelenih spora. Rasprostranjene su u svim tlima širom svijeta, obično u korijenju kultura, tlu i biljnom otpadu. Gljivice ovoga roda bile su poznate kao biološki agenti u kontrolni biljnih bolesti. No nakon pokusnog apliciranja 1930. godine *Trichoderma* je postala popularna i u zaštiti usjeva od napada biljnih patogena jer se kroz ovo istraživanje spoznalo kako su dio njenih sekundarnih metabolita kako hlapivi tako i ne hlapivi antibiotici. Kada je u pitanju način djelovanja gljivice ovog roda ono se zasniva na 2 procesa a to su mikoparazitizam i antibioza. Mikoparazitizam je zasnovan na odnosu micelija antagonista i patogena nakon čega izlučevine enzima obavljaju degradaciju staničnog zida domaćina. Osim ovoga, gljivice roda *Trichoderma* poznate su po lučenju snažnog hidrolitičkog multienzimskog kompleksa (hitinaza, beta-1,3-glukonaza, beta-1,6-glukonaza, alfa-1,3 glukonaza), proteaza te celulaza. Njihovo djelovanje u poljoprivredi je višestruko, pa tako gljivice ovoga roda imaju ulogu u protekciji usjeva od bolesti, djeluju kao vrhunski inhibitori rasta, razvijaju imunosni sistem

same biljke na određene bolesti, kada je u pitanju razvoj patogenih gljivica *Trichoderma* i tu ima rješenje, a to je da luči brojne enzime koji djeluju preventivno. U konvencionalnoj poljoprivredi došlo je do ozbiljnog narušavanja biodiverziteta, te gljivice ovog roda pomažu u ponovnom uspostavljanju ravnoteže. Poznato je i djelovanje u kontroli korova. Osim gore navedenih prednosti ova gljivica je od iznimne važnosti i kada su u pitanju alternativni izvor energije (Čačić, 2017.). Najbolji stimulator rasta biljaka je uočen kod korištenja benefitne gljive *Trichoderma harzianum* na osnovu brojnih pokusa. Gljivice roda *Trichoderma* od iznimne su važnosti u poljoprivredi, te zbog svojih brojnih prednosti koje posjeduju kako same one, tako i njeni produkti današnju poljoprivrednu proizvodnju bez ove gljivice gotovo je nemoguće zamisliti. (Šimanović, 2018.). Rod *Trichoderma* je prvi puta spomenut 1794. kao zelena plijesan koja raste na oštećenim granama i drugim supstratima. Do kraja 60-ih godina vladalo je uvriježeno mišljenje kako u rodu *Trichoderma* postoje samo dvije vrste: *Trichoderma viride* i *Trichoderma koningii*. Većina gljivica roda *Trichoderma* morfološki je vrlo slična i dugi niz godina sve se svrstavalo pod jednu, *T. viride*. Članovi roda *Trichoderma* od iznimne su važnosti za poljoprivredu jer pogoduju poticanjem razgradnje ostataka biljaka u tlu. Osim ovoga, od iznimne je važnosti *T. reesei*, jer proizvodi enzim za razgradnju celuloze, te je zbog toga zastupljena u biotehnološkoj industriji. Osim ovoga neki članovi roda *Trichoderma* imaju biofungicidalno djelovanje kao npr. *T. harzianum*, *T. asperellum*, itd. Enzimi koje proizvode gljivice roda *Trichoderma*, a pogoduju razgradnji stanične stjenke patogena su celulaza, ksilanaza, pektinaza, glukanaza, lipaze, amilaza, arabinaza i proteaza. Hitinaza je najvažniji litički enzim koji igra ključnu ulogu u razgradnji stanične stjenke drugih patogena i štetnih kukaca. Iznimnu važnost također imaju proteolitički enzimi (endo i egzoproteaza) koji su odgovorni za kontrolu lučenja egzocelularnog enzima. Proteolitički enzimi također kontroliraju enzimatsku aktivnost patogena kao što su *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum* i sl. Oni djeluju po principu mikroparazitizma tijekom kojeg sintetiziraju enzime koji imaju sposobnost razgradnje stanične stjenke patogenih gljiva, također proizvode neke antibiotike, te ulaze u kompeticiju sa patogenima za prostor i hranjive tvari. Stanište ovog roda uglavnom je tlo, dok neki žive na posebnim staništima (Čačić, 2017.).





Slika 8 Uzgoj plijesni vrste *Trichoderma asperellum* na Czapek-ovu agaru (vlastita fotografija)



Slika 8 Tekući uzgoj plijesni roda *Trichoderma* na Malt ekstraktnom bujonu - vlastita fotografija

#### 2.3.4. *Beauveria bassiana*

U kulturi *Beauveria bassiana* raste kao bijela plijesan. Na većini uobičajenih kulturnih medija, proizvodi mnogo suhih, prašnjavih konidija u karakterističnim kuglicama od bijelih spora. Konidiogene stanice *B. bassiana* su kratke i ovoidne, a završavaju u uskom apikalnom

produžetku zvanom rahis. Rahise produžuju nakon stvaranja svakog konidija, što rezultira dugim cik-cak produženjem. Konidije su jednostanične, haploidne i hidrofobne (Jantoš, 2019.).

### Primjena u biološkom suzbijanju insekata

*Beauveria bassiana* može se koristiti kao biološki insekticid za suzbijanje brojnih štetočina poput termita, bijelih muha i mnogih drugih insekata. Kao insekticid, spore se prskaju na pogođene usjeve kao emulgirana suspenzija ili prašak za vlaženje ili se nanose na mreže protiv komaraca kao sredstvo za suzbijanje komaraca.

*Beauveria bassiana* kao vrsta parazitira vrlo širok spektar domaćina člankonožaca. *Beauveria bassiana* je gljiva koja prirodno raste na tlima širom svijeta i djeluje kao parazit na raznim vrstama člankonožaca. Koristi se kao biološki insekticid za suzbijanje brojnih štetočina poput termita, trnovitaka, bijelih muha, lisnih uši i različitih buba. Gljiva *Beauveria bassiana* također se upotrebljava u biološkoj kontroli. Ona kod širokog spektra štetnika uzrokuje tzv. „white muscardine disease“ te ih na taj način zapravo i ubija. Njezina prednost je što ne mora biti ingestirana od strane domaćina, već ga ubija pri samom kontaktu s njegovim tijelom (klijanjem spora). Kada spore dođu u dodir s tijelom domaćina, one počinju klijati, te probijajući kutikulu ulaze u unutrašnjost domaćina te on ubrzo ugiba. Klijanje spora zapravo je proces koji dovodi do ugibanja štetnika ([https://en.wikipedia.org/wiki/Beauveria\\_bassiana](https://en.wikipedia.org/wiki/Beauveria_bassiana), 2021.).



**Slika 9** *Beauveria bassiana* na Czapeko-ovu agaru (vlastita fotografija)



**Slika 10** *Beauveria bassiana* proždire kukce pri uzgoju na Czapek-ovu agaru – vlastita fotograf.

Kada je insekt domaćin „inficiran“ od strane korisne gljive *B. bassiana*, ona rapidno raste u njegovoj unutrašnjosti hraneći se njegovim nutrijentima, te tijekom tog procesa ispušta svoje toksine. Nakon što domaćin naposljetku ugine, *B. bassiana* prekriva njegovo tijelo u obliku bijele plijesni, (**Slika 10**) koja i dalje proizvodi infektivne spore.



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je uzgojiti četiri vrste mikroorganizama na pripadajućim selektivnim čvrstim i tekućim hranjivim podlogama te ih prenijeti na četiri različita prirodna materijala te pratiti njihovu održivost tijekom 12 mjeseci određivanjem CFU/g vrijednosti za svaki mikroorganizam na svakom supstratu jednom mjesečno.

#### 3.2. MATERIJAL I METODE

Mikrobiološke vrste čija održivost je istraživana činile su dvije bakterijske vrste i dva roda plijesni. Bakterija čija biomasa se koristi kao mikrobiološko gnojivo bila je vrste *Azotobacter chroococcum*. Bakterija čija biomasa se koristi kao biološki insekticid bila je vrste *Bacillus thuringiensis*. Plijesni roda *Trichoderma* od kojih vrste *Trichoderma asperellum*, *T. viride*, *T. harzianum*, *T. koningii* i *T. resei* koriste se kao biološki pesticid. Plijesni vrste *Beauveria bassiana* čija biomasa se koristi kao biološki insekticid. Prirodni materijali koji su poslužili kao nosači mikrobne biomase su alginat, vermikulit, zeolit koji se koriste kao poboljšivači tla i dijatomejska zemlja koja se primjenjuje kao biološki insekticid.

##### 3.2.1. Mikrobiološke vrste

###### ***Azotobacter chroococcum***

Bakterijska vrsta *Azotobacter chroococcum* podrijetlom iz kolekcije mikroorganizama PTF-a uzgojena je na *Azotobacter* agaru na čvrstoj hranjivoj podlozi u petrijevoj zdjelici, zatim je porasla biomasa sterilno prenešena u tekuću hranjivu podlogu gdje je inkubirana na tresilici pri 30 °C. Kada je postignuta najveća koncentracija od 10<sup>9</sup> CFU/mL, tekući uzgoj je prenesen na sva četiri prirodna nosača u zastupljenosti od 10 %. Primjerice, na 1 kg prirodnog supstrata inokulirano je 100 mL tekućeg uzgoja. Pripravak se čuvao na sobnoj temperaturi u mraku i laboratorijskim bocama sa čepom načinjenim od staničevine. Jednom mjesečno određivala se brojnost stanica u pripravcima. Kochovom metodom agarnih ploča određivala se CFU/g vrijednost.

Bakterijska vrsta ***Bacillus thuringiensis*** DSMZ podrijetlom iz kolekcije mikroorganizama PTF-a uzgojena je na Standard plate agaru (Biolife Italija) na čvrstoj hranjivoj podlozi u petrijevoj

zdjelici, zatim je porasla biomasa sterilno prenešena u sterilnu tekuću hranjivu podlogu Nutrient broth te inkubirana pri 30 °C.

Plijesni roda *Trichoderma* podrijetlom iz kolekcije mikroorganizama PTF-a uzgojena je na Czapek-ovu agaru na čvrstoj hranjivoj podlozi u petrijevoj zdjelici, zatim je porasla biomasa sterilno prenešena u tekuću hranjivu podlogu Malt extract broth (Biolife, Italija) gdje je inkubirana pri 28 °C.

Plijesni vrste *Beauveria bassiana* podrijetlom iz kolekcije mikroorganizama PTF-a uzgojena je na Czapeko-ovu agaru (Biolife, Italija) na čvrstoj hranjivoj podlozi u petrijevoj zdjelici, zatim je porasla biomasa sterilno prenesena u sterilnu tekuću hranjivu podlogu Potato dextrose broth (Biolife, Italija) te inkubirana pri 28 °C.

#### 3.2.2. Održavanje mikrobnih kultura na čvrstim nosačima

Kada je postignuta najveća koncentracija od  $10^9$  CFU/mL, tekući uzgoj četiri vrste mikroorganizama je prenesen na sva četiri prirodna nosača u zastupljenosti od 10 %. Prirodni materijali korišteni u ovom radu bili su: alginit podrijetlom iz rudnika Gerce u Mađarskoj, vermikulit komercijalni proizvod poduzeća u Krškoj, zeolit komercijalni proizvod i dijatomejska zemlja pod nazivom kieselgur koja se prodaje u Pet shop prodavaonicama za suzbijanje najezde buha na koži kućnih ljubimaca. Na 1 kg prirodnog supstrata inokulirano je 100 mL tekućeg uzgoja. Pripravci su se čuvali na sobnoj temperaturi u mraku u zip vrećicama. Jednom mjesečno određivala se brojnost stanica u pripravcima. Kochovom metodom agarnih ploča određivala se CFU/g vrijednost za svaki mikrobnu vrstu na već navedenim čvrstim sintetskim hranjivim podlogama podrijetlom iz Italije tvrtke Biolife.

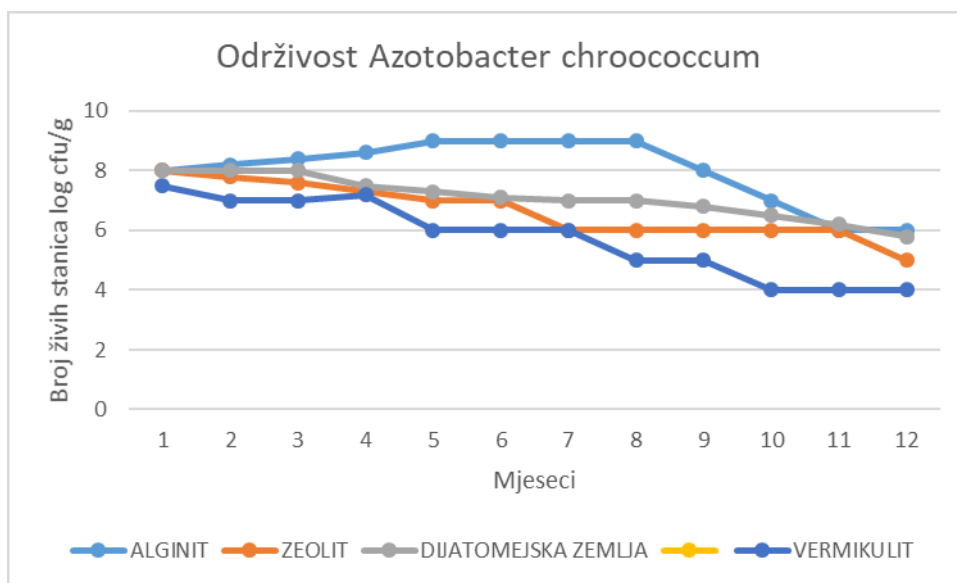




## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. ODRŽIVOST BAKTERIJE AZOTOBACTER CHROOCOCCUM

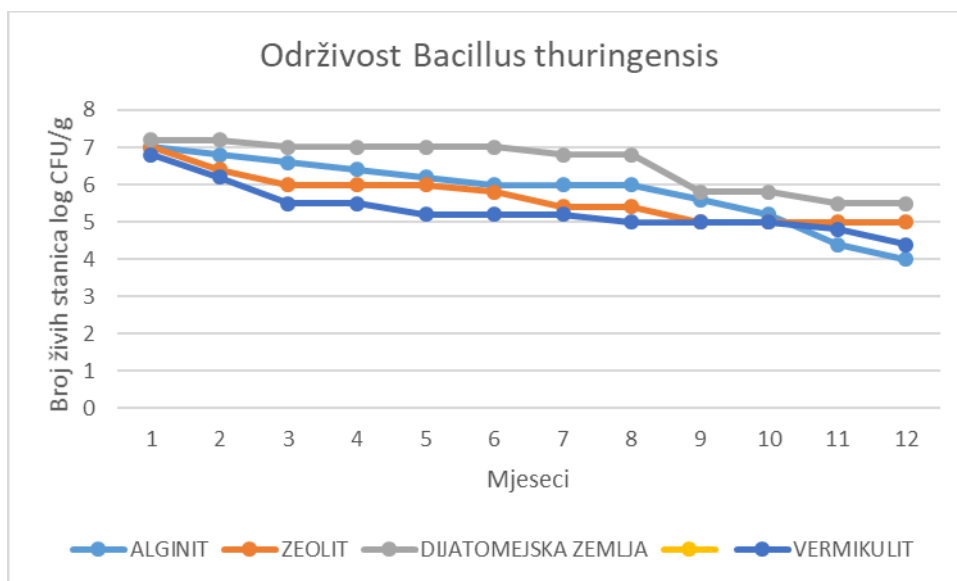
Bakterijska vrsta *Azotobacter chroococcum* najbolje se održala na prirodnom materijalu alginitu, jer je od početne koncentracije CFU  $10^8$ /g nakon godine dana uspjela sačuvati čak  $10^6$  živih stanica, a u nekoliko mjeseci taj se broj čak i povećavao iznad početne koncentracije, što znači da se bakterija i umnožavala, a to je stoga što je alginat dobra podloga koja sadrži i dosta organskog materijala koji *A. chroococcum* može koristiti kao izvor energije, a i molibden koji je nužan za djelovanje enzima nitrogenaze pomoću kojeg ova bakterija fiksira dušik i zraka. Dušik iz zraka joj je bio pristupačan jer je čuvana u boci sa sterilnim čepom načinjenim od celulozne vate. Njena dobra održivost rezultat je i zbog sposobnosti stvaranja cista u koji oblik bakterija prelazi kada se nađe u nepovoljnim ekološkim uvjetima. Na dijatomejskoj zemlji njena koncentracija bila je poprilično konstantna te je na kraju mjerenja iznosila oko  $10^6$  CFU/g. Na zeolitu se njena održivost pokazala malo lošijom, a najlošija je bila na vermikulitu jer je konačna koncentracija iznosila samo  $10^4$  CFU/g. To je zato što je vermikulit anorganska tvar koja nema nikakvih izvora energije koji su nužni za napredni rast mikroorganizama (**Slika 11** )



**Slika 11** Krivulje održivosti bakterije *Azotobacter chroococcum* na različitim prirodnim supstratima

## 4.2. ODRŽIVOST BAKTERIJE BACILLUS THURINGIENSIS

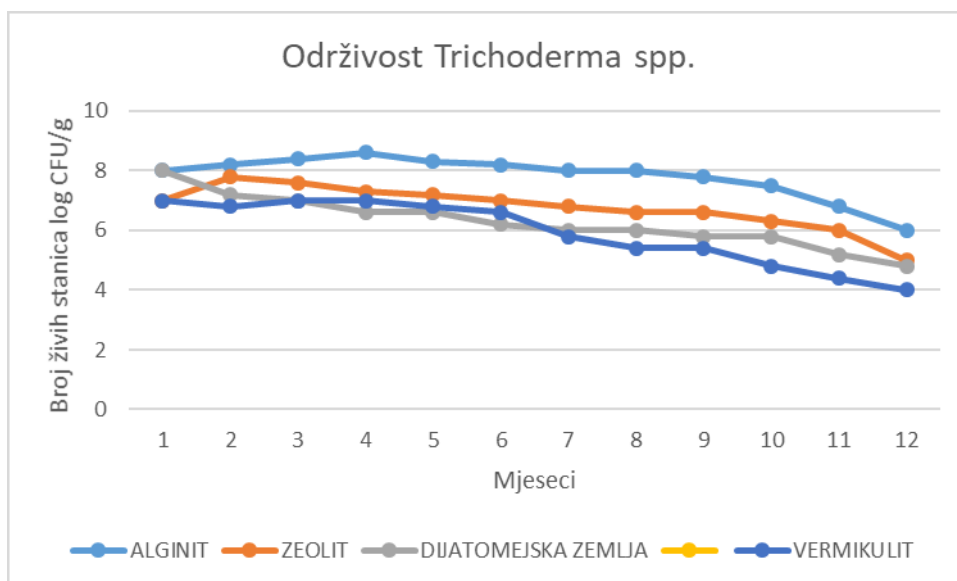
Kao najbolji prirodni materijal i nosač bakterijske biomase pokazala se dijatomejska zemlja koja je zapravo isto mikrobiološkog podrijetla jer je nastala od dijatomejskih algi, a čiji sadržaj silicija pospešuje svojstva tla. *Bacillus thuringiensis* se primjenjuju kao biološki insekticid jer u svom enzimskom sistemu proizvodi enzim hitinazu koji razgrađuje, kako sam riječ kaže – hitin. Kukci imaju oklop i krila koji su načinjeni od hitina, stoga i čvrstoću njihovim staničnim stjenkama daje hitin. Nosač, dijatomejska zemlja ima isto insekticidna svojstva zbog svoje kristalne strukture, tako da je ova kombinacija idealna za primjenu pri proizvodnje zdrave hrane kao neškodljivi biološki insekticid. Na zeolitu i vermikulitu ova bakterija se održala u živom stanju godinu dana zahvaljujući svojoj sposobnosti stvaranja endospora kada se nađe u nepovoljnim ekološkim uvjetima. Neke vrste bakterija roda *Bacillus* imaju sposobnost preživljavanja u praškastom stanju i do 60 godina, primjerice patogena vrsta *Bacillus anthracis* (Slika 12 ).



**Slika 12** Krivulje održivosti bakterije *Bacillus thuringiensis* na različitim prirodnim supstratima

### 4.3. ODRŽIVOST PLIJESNI RODA *TRICHODERMA*

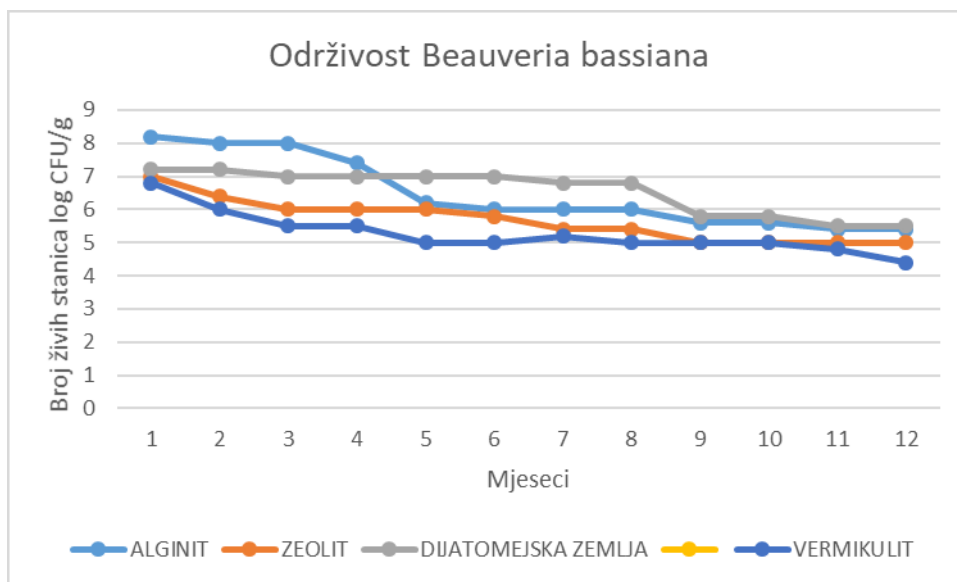
Plijesni roda *Trichoderma* najbolje su se održale na alginitu, koji ima svojstva zadržavanja vlažnosti što pogoduje razvoju plijesni, ali i u svom sastavu ima dosta organske tvari koja također pospješuje rast plijesni. *Trichoderma* se inače primjenjuje kao biološki pesticid i idealan je u borbi protiv biljnih bolesti koje uzrokuju neke druge plijesni, a alginit ima ljekovita svojstva za sva živa bića jer potječe iz nekadašnjeg panonskog mora taloženjem algi i ostalih morskih stanovnika. Kako je *Trichoderma* invazivna plijesan jer osim enzima celulaza sadrži i enzimski kompleks hitinaza, može se reći da se ona hrani sa ostalim mikroorganizmima, te ih na hranjivim agarima jednostavno prerasta. Tako, vjerojatno „pojede“ i humus, načinjen od algi, iz alginita, a i dijatomejske alge iz dijatomejske zemlje. Na supstratima poput vermikulita i zeolita nema organske tvari koje bi *Trichodermi* poslužila kao izvor energije ali se dosta dobro održala jer svi ovi prirodni materijali imaju sposobnost zadržavanja vlažnosti, što pogoduje razvoju plijesni (Slika 13).



**Slika 13** Krivulje održivosti plijesni roda *Trichoderma* na različitim prirodnim supstratima

#### 4.4. ODRŽIVOST PLIJESNI VRSTE *BEAUVERIA BASSIANA*

Kao najbolji prirodni materijal i nosač biomase plijesni *Beauveria bassiana* pokazala se dijatomejska zemlja koja je zapravo isto mikrobiološkog podrijetla od dijatomejskih algi, a čiji sadržaj silicija pospješuje svojstva tla (**Slika 14**). *Beauveria bassiana* se primjenjuju kao biološki insekticidi, a i nosač dijatomejska zemlja ima isto insekticidna svojstva zbog svoje kristalne strukture. *Beauveria bassiana* ima insekticidna svojstva jer u svom enzimskom sistemu proizvodi hitinazu, enzim koji razgrađuje hitin. Na **Slici 10** koja je priložena u Teorijskom dijelu rada vidi se kako ova plijesan “proždire” kukca na hranjivoj podlozi



**Slika 14** Krivulje održivosti plijesni vrste *Beauveria bassiana* na različitim prirodnim supstratima



## **5. ZAKLJUČCI**

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Kao najbolji prirodni materijal koji je poslužio kao nosač mikrobne biomase bakterijske vrste *Azotobacter chroococcum* pokazao se alginit. Primjena ove kombinacije je dvojaka jer je alginit poznat kao izvrstan poboljšivač tla, a u kombinaciji sa bakterijskom vrstom *A. chroococcum* može se primijeniti kao izvrsno biološko gnojivo.
2. Kao najbolji prirodni materijal i nosač bakterijske biomase *Bacillus thuringiensis* i biomase plijesni *Beauveria bassiana* pokazala se dijatomejska zemlja koja je zapravo isto mikrobiološkog podrijetla od dijatomejskih algi, a čiji sadržaj silicija pospješuje svojstva tla. Ta dva mikroorganizma se primjenjuju kao biološki insekticidi, a i nosač dijatomejska zemlja ima isto insekticidna svojstva zbog svoje kristalne strukture, tako da je ova kombinacija idealna za primjenu pri proizvodnje zdrave hrane kao neškodljivi biološki insekticid.
3. Kao najbolji prirodni materijal za očuvanje spora plijesni *Trichoderma* vrste u živom stanju pokazao se opet alginit koji ima svojstva zadržavanja vlažnosti što pogoduje razvoju plijesni, ali i u svom sastavu ima dosta organske tvari koja također pospješuje rast plijesni. *Trichoderma* se inače primjenjuje kao biološki pesticid i idealan je u borbi protiv biljnih bolesti koje uzrokuju neke druge plijesni, a alginit ima ljekovita svojstva za sva živa bića jer potječe iz nekadašnjeg panonskog mora taloženjem algi i ostalih morskih stanovnika.
4. Kao najlošiji supstrat za očuvanje biomase svih radnih mikroorganizama pokazao se vermikulit, mada je on izvrstan poboljšivač tla ali njegov anorganski sastav nije pogodan za trajno čuvanje mikrobne biomase.
5. Najbolje se održala bakterijska vrsta *Azotobacter chroococcum* na sva četiri nosača tijekom godine dana.
6. Treba napustiti konvencionalnu ili tradicionalnu poljoprivredu i posvetiti se zdravom uzgoju voća, povrća i žitarica uz pomoć mikrobnih pripravaka poput onih koji su spravljeni u ovom radu. I ne samo spravljeni nego i provjereni u vlastitom vrtu.







## **6. LITERATURA**

Barčić J, Maceljčki M: *Ekološki prihvatljiva zaštita bilja od štetnika*. Zrinski d.d., Čakovec, 2001.

Beijerinck MW: Über oligonitrophile Mikroben. *Zentralblatt Fuer Bakteriologie Parasite de Infections*, 7: 561-562, 1901.

Čačić B: Korištenje benefitne gljive *Trichoderma* spp. U biološkoj zaštiti poljoprivrednih kultura. *Diplomski rad*, Fakultet agrobiotehničkih znanosti, Osijek, 2017.

Duraković S: *Primjenjena mikrobiologija*. Prehrambeno-tehnološki inženjering, Znanstveno-stručna biblioteka, Zagreb, 1996.

Emam N, Fayez M, Makboul HE: Wheat growth as affected by inoculation with *Azotobacter* isolated from different soils. *Zentralblatt fur Microbiologie* 141, 17, 1986.

Gupta N, Narula N: Biodegradation of lindane by nitrogen fixing soil isolates of *A. chroococcum*. In: *Perspectives in Microbiology*. R.S. Kahlon (Ed.) pp. 116-123, 1996.

Horvat A: Utjecaj dodatka eteričnog ulja komorača (*Foeniculum vulgare* Mill.) u hranu pilića na rast i antioksidativni status. *Diplomski rad*, Poljoprivredni fakultet Osijek, Osijek, 2013.

Jantoš J: Mogućnost suzbijanja skladišnih štetnika benefitnom bakterijom *Bacillus thuringiensis* i benefitnom gljivom *Beauveria bassiana* u laboratorijskim uvjetima. *Diplomski rad*, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Osijek, 2019.

Jarak M, Čolo J: *Mikrobiologija zemljišta*, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2007.

Kolkwitz R, Marsson M: Okiologie der pflanzlichen Saprobien. *Deutsche Botanische Gesellschaft*, 26: 505-519, 1908.

Korunić Z, Cenkowski S, Fields P: Grain bulk density as affected by diatomaceous earth and application method. *Postharvest Biology and Technology*, 13: 81-89, 1998.

Korunić Z, Rozman V, Liška A, Lucić P: A review of natural insecticides based on diatomaceous earth, *Poljoprivreda*, 22:10-18, 2016.

Korunić Z, Rozman V: A synergistic mixture of diatomaceous earth and deltamethrin to control stored grain insects. *In Proceedings of the 10th International Working Conference on Stored Product Protection*, 894-898. Estoril, Portugal, 2010.

Kumar N, Vivek : Phosphate solubilization by *A. chroococcum* strains and their interaction with wheat cultivars. *Doktorski rad*. CCS Haryana Agricultural Universiti Hisar, India, 1998.

Lenart L: Utjecaj uvjeta uzgoja i čuvanja bakterije *Azotobacter chroococcum* na fiziološku aktivnost u uvjetima primjene. *Doktorski rad*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2004.

Mann DG: Discovering diatom species: Is a long history of disagreements about species-level taxonomy now at an end? *Plant Ecology and Evolution*, 143:251–264, 2010.

Miličević T: Biološko suzbijanje biljnih patogena – Današnje stanje u svijetu i mogućnosti primjene. *Glasilo biljne zaštite*, 6: 310-316, 2006.

Miličević T, Kaliterna J: Biološko suzbijanje bolesti kao dio integrirane zaštite bilja. *Glasilo biljne zaštite* 5, 2014.

Mrkovački N, Mezei S, Kovačev L: (1996), Effects of *Azotobacter* inoculation on dry matter mass and nitrogen content in the hybrid varieties of sugar beet. Zbornik radova, Naučni institut za ratarstvo i povrtlarstvo No. 25; p.p. 107-113, 1996.

Narodne novine 137/2012: Pravilnik o integriranoj proizvodnji poljoprivrednih proizvoda.

Narula N: *Azotobacter in Sustainable Agriculture*. Vedams, Academic Books from India, New Delhi, 1990.

Narula N, Gupta KG: Ammonia excretion by *A. chroococcum* in liquid culture and soil in the presence of Mn<sup>+</sup> and clay minerals. *Plant & Soil.*, 93: 205-209, 1986.

Oppenheim J, Marcus, L: Correlation of ultrastructure in *Azotobacter vinelandii* with nitrogen source for growth. *Journal of Bacteriology* 101:1 286-291. 1970.

Sankaram A, Sundara Rao WVB: Synthesis of vitamin B<sub>12</sub> by soil bacteria. *Current Science*, 31: 334-336, 1962.

Sharma PK, Chahal VPS: Antagonistic effect of *Azotobacter* on some plant pathogenic fungi. *Pau research journal*, 27: 638-640, 1987.

Šantek B, Marić V: Temperature and Dissolved Oxygen Concent as Parameters of *Azotobacter chroococcum* Cultivation for Use in Biofertilizers. *Biotehnology Letters*, 17(4), 1995.

Šimanović D: Suzbijanje patogene gljive *Botrytis cinerea* na vinovoj lozi benefitnim gljivama *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma vinelandii*. *Diplomski rad*, Poljoprivredni fakultet Osijek, Osijek, 2018.

Werner D, Stangier E: Silica and temperature dependent colony size of *Bellerochea malleus* f. *biangulata*. *Phycologia*, 15:73—77, 1976.

Vukadinović V, Vukadinović V: *Ishrana bilja*, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 2011.

<https://alchetron.com/Botryococcus-braunii> [17.9.2021.]

<https://www.facebook.com/Alginit-Kft-453476958033809/photos/> [15.9.2021.]

<https://www.fertilefibre.com/blog/what-is-vermiculite> [17.9.2021.]

<https://en.wikipedia.org/wiki/Vermiculite> [17.9.2021.]

<https://www.gardenersworld.com/how-to/grow-plants/how-to-use-vermiculite/>

[17.9.2021.]

<https://www.agroklub.com/stocarstvo/sa-zeolitom-bolje-napreduju-i-biljke-i-zivotinje/23950/> [17.9.2021.]

[https://en.wikipedia.org/wiki/Beauveria\\_bassiana](https://en.wikipedia.org/wiki/Beauveria_bassiana) [17.9.2021.]

<https://www.agroklub.com/agro-hobi/upotreba-zeolita-u-biljnoj-proizvodnji/46193/>  
[17.9.2021.]

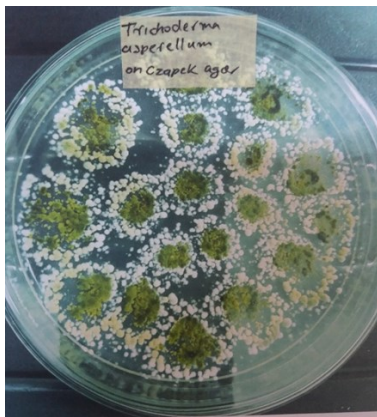
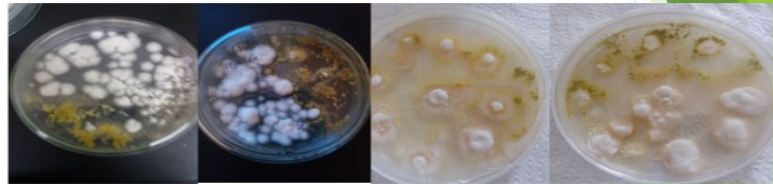
<https://maricavrtlarica.com/svi-pricaju-o-zeolitu/> [20.9.2021.]

<https://hr.domesticfutures.com/garden-safe-diatomaceous-earth-958> [20.9.2021.]



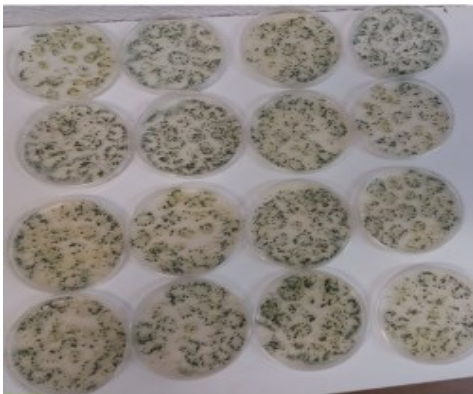


## **7. PRILOZI**

Pesticidna svojstva *Trichoderme* -vlastite fotografije

### Uzgoj plijesni roda *Trichoderma*

► uzgojena na Czapek-ovu agaru



i Malt ekstraktom bujonu



### *Beauveria bassiana*

► *Beauveria bassiana* na Czapek-ovu agaru (vlastita fotografija)



### Uzgoj plijesni *Beauveria bassiana*

► *Beauveria bassiana* uzgojena na Czapek-ovu agaru - spremna za prijenos u tekući Malt ekstrakt bujon



Insekticidna svojstva *Beauverie* - vlastite fotografije

► *Beauveria* i muha



*Beauveria* i smrdljivi martin koji je ove godine svima zadavao muke, osim nama

### Uzgoj plijesni vrste *Beauveria bassiana*

- Plijesni vrste *Beauveria bassiana* uzgojena je na Czapek-ovu agaru na čvrstoj hranjivoj podlozi u petrijevoj zdjelici, zatim je porasla biomasa sterilno prenesena u sterilnu tekuću hranjivu podlogu Potato dextrose bujon te inkubirana pri 28 °C.
- tekući uzgoj je prenesen na sva četiri prirodna nosača u zastupljenosti od 10 %.
- Jednom mjesечно određivala se brojnost stanica u pripravcima.
- Kochovom metodom agarnih ploča određivala se CFU/g vrijednost.

