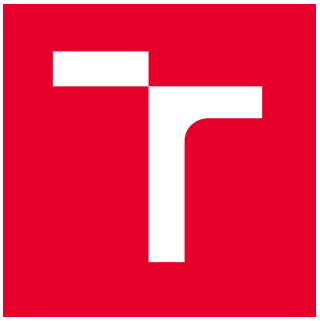


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

NOVÉ TRENDY VE VÝZKUMU A VÝVOJI NOSIČŮ MIKROORGANISMŮ PRO ZEMĚDĚLSKÉ APLIKACE

NEW TRENDS IN RESEARCH AND DEVELOPMENT OF AGRICULTURAL BIOINOCULANTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE — **Martin Roháč**

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — **doc. Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**

SUPERVISOR

BRNO 2025

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání bakalářské práce

Číslo práce:	FCH-BAK2081/2024	Akademický rok: 2024/25
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student:	**Martin Roháč**	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace	
Studijní obor:	bez specializace	
Vedoucí práce:	**doc. Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**	

Název bakalářské práce:

Nové trendy ve výzkumu a vývoji nosičů mikroorganismů pro zemědělské aplikace

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma: i. výzkum a vývoj gelových bioinokulantů pro zemědělské aplikace, ii. metody inkrustace bioinokulantů na osiva.
2. Navrhnout a realizovat experiment zaměřený na ověření využitelnosti originálního konceptu samo–enkapsulace bakterií rodu Azotobacter v jimi produkovaném alginátu při nanášení vrstvy gelového bioinokulanty na vybraná modelová osiva.
3. Provést komplexní morfologickou a materiálovou analýzu vytvořených povrchových vrstev, navrhnout a realizovat pilotní otestování biologického účinku vrstev (např. v rámci vlivu na klíčivost semen).
4. Na základě realizovaných výsledků diskutovat využitelnost konceptu samo–enkapsulace při inkrustaci osiv, navrhnout další perspektivní směry využití tohoto konceptu v rámci moderních zemědělských technologií.

Termín odevzdání bakalářské práce: 26.5.2025:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Martin Roháč student	doc. Ing. Petr Sedláček, Ph.D. vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Táto práca sa venuje problematike nosičových systémov mikroorganizmov pre agronomické aplikácie. V súčasnosti sa do popredia dostáva výskum a vývoj alternatívnych hnojív na báze živých organizmov. Cieľom tejto práce bolo navrhnúť a pripraviť vhodný bioinokulant s použitím mikroorganizmu *Azotobocter vinelandii*, ktorý patrí do skupiny tzv. PGPR. Bioinokulant bol pripravený mokrou cestou princípom chemického sieťovania alginátu, produkovaného A. vinelandii, a chloridu vápenatého. Zároveň boli pripravené bioinokulanty pozostávajúce z lyofilizovaných kmeňov vybraného mikroorganizmu. Tieto bioinokulanty boli nanesené na semená modelovej rastliny, ktorou bol hlávkový šalát, a v priebehu dvoch týždňov bol pozorovaný vplyv na klíčenie semena. V optimalizačnej časti práce bol pozorovaný negatívny vplyv pôvodnej koncentrácie chloridu vápenatého (2 % hm.) na klíčivosť semien. Toto zistenie malo vplyv na použitie nižších koncentrácií v príprave bioinokulantov mokrou cestou. V procese práce boli vykonané experimenty na posúdenie vybraných PGPR efektov. Na záver experimentu bola vykonaná morfologická analýza povrchových vrstiev na semenách metódou SEM. Prínosom tejto práce je optimalizácia bioinokulantov a overenie ich účinku priamo na modelových rastlinách, čím udáva podklad, pre budúci výskum.

Kľúčové slová

Azotobacter vinelandii, bioinokulant, gélový inokulant, lyofilizované kultúry, baktérie podporujúce rast rastlín, chlorid vápenatý, šalát hlávkový.

Abstract

This thesis focuses on the use of carrier systems of microorganisms within agronomic applications, focusing on bio-based fertilizers. The creation of alternative, living organism-based fertilizers is gaining more and more attention due to harmful effects of traditional fertilizers. The aim of the presented work was to prepare and design a suitable bioinoculant from the microorganism *Azotobacter vinelandii*, belonging to the so-called PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) group of microorganisms. Preparation of the bioinoculant was performed by a wet procedure involving chemical cross-linking of alginate, which is an extracelular product of *A. vinelandii* metabolism, with calcium chloride. Bioinoculants consisting of lyophilized strains of the desired microorganism were prepared in parallel. These bioinoculants were applied to a model plant *Lactuca sativa* (lettuce) to evaluate their impact on seed germination over a two-week period. During optimization, it was observed that thie initial calcium chloride chloride (2 % w/w) negatively affected germination, promting the investigation of lower concentrations in subsequent formulations. Additional experiments assessed PGPR activity and quantified indole-3-acetic acid (IAA) production. Morphological observation of the seed surface layers was made at the end of the experiment using scanning electron microscopy (SEM). The novelty of this work lies in the refined bioinoculant production process and the direct validation of its biological efficacy on a model plant, establishing a foundation for further agricultural applications and research.

Keywords

Azotobacter vinelandii, bioinoculant, gel inoculant, lyophilized cultures, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, calcium chloride.

ROHÁČ, Martin. *Nové trendy ve výzkumu a vývoji nosičů mikroorganismů pro zemědělské aplikace*. Online, bakalářská práce. Petr SEDLÁČEK (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025. Dostupné z: https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/162238. [cit. 2025-05-26]

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brně a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

Poďakovanie

Týmto by som chcel poďakovať doc. Petrovi Sedláčkovi PhD. za mnohé návrhy a rady v rámci vypracovania tejto práce. Veľká vďaka patrí taktiež môjmu konzultantovi Ing. Martinovi Súkeníkovi, ktorého praktické rady a návrhy mi veľmi pomohli. Ďakujem tiež Barbore Bečkovej, ktorá pri mne vždy stála. Nakoniec by som chcel poďakovať mojim rodičom za ich neochvejnú podporu v štúdiu.

Obsah

1 Úvod 8
2 Teoretická časť 9
2.1 *Plant growth-promoting rhizobacteria* 9
2.2 Mechanizmy účinku pôdnych baktérií 9
2.2.1 Priame mechanizmy 10
2.2.2 Nepriame mechanizmy 11
2.3 Nosiče bioinokulantov 13
2.3.1 Charakteristiky vhodných formulácií inokulantov 13
2.3.2 Formulácie inokulantov 14
2.4 Tradičné inokulanty 15
2.4.1 Prvá generácia inkulantov 15
2.4.2 Kvapalné inokulanty 15
2.4.3 Inokulanty využívajúce organické nosiče 15
2.5 Polymérne inokulanty 16
2.5.1 Enkapsulované formulácie 16
2.5.2 Makro- a mikro-alginátové formulácie 16
2.5.3 Laponitové íl/polyetylénoxid gélové guličky 17
2.6 Metódy aplikácie bioinokulantov 18
2.6.1 Inokulácia semien 18
2.6.2 Inokulácia pôdy 18
2.6.3 Foliárna/vzdušná aplikácia inokulantu 18
3 Súčasný stav riešenej problematiky 19
4 Experimentálna časť 20
4.1 Prehľad použitých mikroorganizmov, chemikálií a prístrojov 20
4.1.1 Použité mikroorganizmy 20
4.1.2 Použité chemikálie 20
4.1.3 Použité prístroje 20
4.1.4 Použité rastliny 21
4.2 Optimalizačné experimenty 21
4.2.1 Kultivácia bakteriálnych kultúr 21
4.2.2 Pozorovanie klíčenia semienok na Petriho miskách 24
4.2.3 Pozorovanie klíčenia na Petriho miskách a v pôde 24

4.2.4 Test vplyvu salinity na klíčivosť semien 25
4.2.5 Optimalizácia sledovania účinku gélových inokulantov v agare 25
4.3 Príprava gélových inokulantov a sledovanie ich vplyvu na rast v agare 26
4.4 Testovanie biologického účinku vrstiev inokulantu 27
4.4.1 Morfologická analýza povrchových vrstiev na semienkach 27
4.4.2 Posúdenie bakteriálnej aktivity kultúry po aplikácii na semienka 27
4.4.3 Príprava agarových platní pre posúdenie PGPR efektov 27
4.4.4 Analýza produkcie siderofórov 28
4.4.5 Meranie obsahu kyseliny indoloctovej 29
4.4.6 Analýza produkcie fosfátov 29
5 Výsledky a diskusia 30
5.1 Výber typu inokulantu a jeho optimalizácia 30
5.1.1 Pozorovanie semienok obalených inokulantom na Petriho miskách 30
5.1.2 Pozorovanie rastu semien v pôde 30
5.1.3 Vplyv zasolenia na rast rastliniek 31
5.1.4 Optimalizácia agarového experimentu 33
5.2 Príprava originálneho gélového inokulantu 34
5.3 Povrchová morfologická analýza obalených semienok 39
5.4 Zhodnotenie PGPR efektov *A. vinelandii* po aplikácii na semená 41
5.4.1 Analýza produkcie siderofórov 41
5.4.2 Analýza produkcie rozpustných fosfátov 41
5.4.3 Meranie množstva kyseliny indoloctovej 42
6 Záver 43
7 Zoznam použitej literatúry 45
8 Zoznam použitých skratiek 54
9 Zoznam príloh 55

1 Úvod

Modernizáciou spoločnosti a konštantne sa zvyšujúcou životnou úrovňou súčasne rastie populácia na planéte. Zároveň v modernej civilizácii vplyvom rozvoja a dostupnosti zdravotníctva klesá úmrtnosť a predlžuje sa doba života. S rastom populácie súčasne stúpa dopyt po potravinách. Problémom je nedostatočná rozloha poľnohospodárskych pôd hlavne v krajinách s vysokou hustotou zaľudnenia.

Nemenej dôležitým problémom sú súčasné metódy využitia hnojiva v poľnohospodárstve. Prevažujú stále tzv. priame alebo tradičné hnojivá ako sú liadky (zdroje dusíka), superfosfáty (zdroje fosforu) a draselné hnojivá väčšinou vo forme síranov a chloridov. Nevýhodou použitia priamych hnojív je ich efekt na úrodnosť pôdy. Vplyvom použitia veľkých koncentrácií tradičných hnojív nastáva pokles biodiverzity a mikrobiálnej aktivity pôdy, vplyvom čoho dochádza k strate úrodnosti.

V posledných rokoch sa do popredia dostávajú nové postupy hnojenia, a súčasne aj nové hnojivá samotné. Veľmi atraktívnou sa javí problematika PGPR alebo rizobaktérie podporujúce rast rastlín (z angl. *plant growth-promoting rhizobacteria*). Medzi PGPR patria baktérie žijúce v symbióze s rastlinnými koreňmi (napr. baktérie rodu *Rhizobium* symbiotické s koreňmi bôbovitých rastlín) alebo baktérie voľne sa vyskytujúce v rizosfére (rod *Azotobacter*). Rastliny samotné nie sú schopné biologickej fixácie dusíka, netvoria látky rozpúšťajúce zlúčeniny obsahujúce fosfor a horčík. Zároveň pre efektívnu reguláciu rastu a i rast samotný využívajú fytohormóny a vitamíny. Niektoré druhy pôdnych baktérií sú schopné tieto látky rastlinám sprostredkovať buď formou symbiózy alebo vylúčením daných látok ako odpadných produktov. Pre sprístupnenie týchto efektov rastlinám (napr. v pôdach, kde je daných baktérií nedostatok) je potrebné pôdne baktérie do pôdy vhodne dopraviť. Jednou z metód aplikácie mikroorganizmov do pôdy je bioinokulácia.

Dôležitými aspektami bioinokulácie sú prítomnosť veľkého množstva PGPR v bioinokulante, a súčasne získanie čo najväčšej pozitívnej odozvy na rast rastliny vplyvom inokulantu. Bioinokulant sa skladá z kultivovaných druhov PGPR a nosiča, ktorým je materiál (väčšinou biodegradabilný), ktorý poskytuje ochranu a výživu baktériám pred a počas ich aplikácie do pôdy. Významnou prekážkou v tomto prístupe je spôsob aplikácie baktérií, aby si maximálne množstvo baktérií udržalo viabilitu počas doby skladovania a v procese aplikácie, a zároveň aby ich pozitívny účinok na rast rastliny bol čo najväčší. Metód aplikácie baktérií na rastliny existuje niekoľko. Aplikovať bioinokulant je možné na nadzemnú časť rastliny alebo na koreňový systém. Jednou z metód, ktoré v súčasnosti rastú na význame je aplikácia bioinokulantu priamo na semeno, pretože je tým zaistený priamy kontakt s rastlinou od prvotnej fázy rastu. V neposlednom rade je súčasne jedným z hlavných cieľov cenová dostupnosť bioinokulantu pre poľnohospodársku prax.

2 Teoretická časť

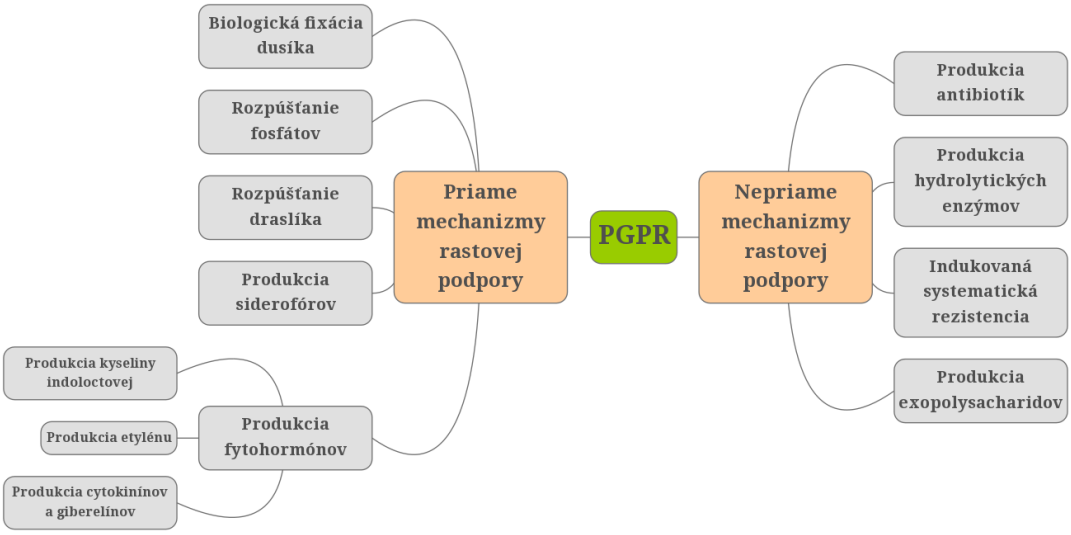
2.1 *Plant growth-promoting rhizobacteria*

Rizosféra je definovaná ako zóna obklopujúca korene rastlín, v ktorej existujú komplexné vzťahy medzi rastlinou, pôdnymi mikroorganizmami a pôdou samotnou. Rozdiely fyzikálnych, chemických a biologických vlastností pôdy v tesnej blízkosti koreňových systémov sú zodpovedné za zmeny v mikrobiálnej diverzite v pôde, nárast počtu a aktivity mikroorganizmov v koreňovom prostredí [1]. Rastlinné korene vylučujú malé, potenciálne užitočné molekuly do pôdneho prostredia. Tieto látky, tzv. koreňové exsudáty zhŕňajú široké spektrum látok ako sú ióny, voľný kyslík, voda, enzýmy, sliz, a rôzne uhlíkové metabolity ako sú sacharidy (glukóza, arabinóza, fruktóza, sacharóza), organické kyseliny (citrónová, jablčná, šťaveľová) a aminokyseliny (alanín leucín, methionín atď.) [2].

Mikroflóra rizosféry zahŕňa zároveň škodlivé a prospešné zložky s potenciálom vplývať na rast rastlín a výťažnosť plodín. Medzi priaznivo vplývajúce pôdne baktérie sa zaraďujú symbiotické baktérie (napr. *Rhizobium*), niektoré aktinomycéty (napr. *Streptomyces*), mykorízne huby (napr. *Glomus intraradices*) a voľne žijúce baktérie (napr. *Azotobacter*), ktoré zvyšujú dostupnosť živín, potom svojim mechanizmom priamo pozitívne vplývajú na rast rastlín alebo potláčajú vplyv parazitických patogénov [3].

2.2 Mechanizmy účinku pôdnych baktérií

Mechanizmy účinku PGPR je nevyhnutné pochopiť pre kontrolu a maximalizáciu procesov, ktoré výrazne obohacujú produktivitu a výťažnosť rastlín. Tieto mechanizmy je možné deliť na základe širokého spektra parametrov. Jedným z najpoužívanejších parametrov pre delenie je založené na priestorovej lokalizácii (priebeh v rámci alebo mimo rastliny) [4–7]. Priame mechanizmy zahŕňajú tie, ktoré vplývajú na hladinu rastových regulátorov. Dôvodom môže byť vylučovanie rastových regulátorov priamo mikroorganizmami, ktoré sú následne integrované do rastliny [8; 9]. Nepriamy mechanizmus vyžaduje prítomnosť obranných metabolických procesov rastliny, ktoré odpovedajú na signál vyslaný baktériou, vplývajúci na rastlinu. Dôležitými mechanizmami patriacimi do tejto skupiny sú: vyvolanie systémovej rezistencie voči rastlinným patogénom (biotický stres) a ochrana pred nepriaznivými podmienkami prostredia (abiotický stres) [8; 10].



Obrázok 1: Schématický diagram znázorňujúci efekt PGPR na rast rastlín [11]

2.2.1 Priame mechanizmy

2.2.1.1 Biologická fixácia atmosférického dusíka

Dusík tvorí 78 % atmosféry, no pre rastliny zostáva nedostupný. Žiadny rastlinný druh nie je schopný diazotrofie alebo biologickej fixácie dusíka (BNF) do formy využiteľnej rastlinami (NH_4^+ vo vode) [12]. Baktérie disponujúce schopnosťou viazať vzdušný dusík je možné zaradiť do dvoch skupín. Prvá skupina zahŕňa baktérie, žijúce v symbióze s koreňom rastliny disponujúce schopnosťou infikovať korene a vytvoriť na nich uzliny napr. kmene *Rhizobia*. Tieto baktérie sa často označujú aj ako hľuzkovité baktérie a žijú v symbióze s koreňmi bôbovitých rastlín. Druhou skupinou sú tzv. voľne-žijúce fixátory dusíka, ktoré nedisponujú špecifickosťou k rastline. Príkladmi týchto baktérií sú *Azospirillum, Azotobacter, Burkholderia, Herbaspirillum, Bacillus* a *Paenibacillus*. Napriek neprenikaniu voľne-žijúcich dusíkových fixátorov cez pletivá rastliny je medzi rastlinou a baktériami zriadený veľmi blízky vzťah, kedy baktérie žijú dostatočne blízko koreňov rastliny natoľko, aby atmosférický dusík, ktorý baktérie samé nespotrebujú, bol prijatý koreňovým systémom rastliny [13–15].

2.2.1.2 Rozpúšťanie fosfátov

Fosfor je esenciálna živina pre rast a vývoj rastliny. Pre správny rast rastlín je potrebné pravidelné hnojenie pôdy rozpustnými formami anorganického fosforu [16]. Rastliny sú schopné absorbovať len monobázické (napr. Na_2HPO_4) a dibázické formy fosfátov (napr. NaH_2PO_4), ktoré sú rozpustnými formami fosfátov [17] . Mikroorganizmy sprístupňujú fosfor v pôde rozpúšťaním komplexných fosfátov (napríklad Ca_3PO_4, P_2O_5, $AlPO_4$), a tým zjednodušujú jeho príjem rastlinám. Primárny mechanizmus rozpúšťania je založený na sekrécii organických kyselín mikroorganizmami, ktoré vznikajú ako vedľajší produkt metabolizmu sacharidov. Organizmy prebývajúce v rizosfére využívajú cukry z koreňových exsudátov a metabolizujú ich za vzniku organických kyselín [18; 19]. Spomínané kyseliny vylúčené mikroorganizmami pôsobia ako dobré

chelatačné činidlá dvojmocných Ca^{2+} katiónov, sprevádzajúcich uvoľňovanie fosfátov z nerozpustných fosfátových zlúčenín. Množstvo mikroorganizmov, rozpúšťajúcich fosfáty, znižuje pH okolia sekréciou organických kyselín ako sú octová, mliečna, jablčná, jantárová, vínna, glukónová, 2-ketoglukónová, šťaveľová a citrónová [20; 21].

2.2.1.3 Produkcia fytohormónov

Fytohormóny, primárne auxíny, riadia značné množstvo fáz rastu a rozvoja rastlín ako sú napríklad predlžovanie buniek, delenie buniek, diferenciáciu pletív a podpora apikálnej dominancie. Konkrétnym zástupcom zo skupiny auxínov je kyselina indol-3-octová (IAA), produkovaná niekoľkými kmeňmi PGPR a je preukázané, že použitím rizobaktérií, produkujúcich IAA, nastane pozitívny efekt na rast rastliny [22–24]. Primárne účinky IAA sú stimulácia rapídnych a zároveň aj dlhodobých rastových procesov v rastline. Rastliny dlhodobo ošetrené IAA disponujú rozvinutejšími koreňmi, čo rastline umožňuje lepšie prijímať živiny [10]. IAA je vo väčšine pôdnych mikroorganizmov syntetizovaná v metabolických dráhach závislých na L-tryptofáne, ktorý je jej prekurzor. L-tryptofán je vylučovaný rastlinami ako koreňový eksudát [13].

Niektoré druhy PGPR sú schopné produkovať cytokiníny, giberelíny alebo obe pre podporu rastu rastlín [25]. Podobne ako v prípade IAA, reakcia rastliny na exogénne aplikácie cytokinínov pozitívne vplýva na delenie buniek, rozvoj koreňa, tvorbu koreňových vláskov, a ďalej inhibujú elongáciu primárneho koreňa a podporujú iniciáciu výhonkov [22; 26; 27].

Giberelíny ovplyvňujú dormanciu semien, germináciu, kvetnatosť, dozrievanie ovocia a zvyšovanie hustoty koreňových vláskov. Momentálne je známych 136 rôznych chemických zlúčenín spadajúcich do kategórie prirodzene sa vyskytujúcich giberelínov. Kyselina giberelová (GA3) je medzi baktériami najčastejšie syntetizovaná [28]. Auxíny podporujú rast koreňa a podzemných častí rastlín, čím zvyšujú ich adsorpčný povrch a zvyšujú príjem živín. Tento jav zvyšuje produkciu giberelínov. Kombináciou týchto hormónov rastlina benefituje [29].

2.2.2 Nepriame mechanizmy

2.2.2.1 Produkcia sideroforov

Železo je pre rastliny esenciálna živina. Vystupuje ako kofaktor množstva enzýmov, potrebných pre dôležité fyziologické procesy ako sú respirácia, fotosyntéza a fixácia atmosférického dusíka takže jeho nedostatok sa prejavuje závažnými metabolickými modifikáciami. Železo je v pôde pomerne bohato zastúpené, ale pre rastliny a pôdne mikroorganizmy častokrát ostáva neprístupné. Najčastejšie sa v pôde vyskytuje v stave Fe^{3+}, a jeho oxidy a hydroxidy sú nerozpustné vo vode. Existujú dva mechanizmy pre efektívnu absorpciu železa. Prvá zahŕňa vylučovanie organických zlúčenín schopných chelatovať železo, následkom čoho sa stáva rozpustným vo vode, difúziou sa pohybuje smerom k rastline, redukuje sa a je absorbované prostredníctvom transportného systému rastliny. Druhou metódou je absorpcia komplexu tvoreného organickou zlúčeninou a katiónom Fe^{3+}, kedy sa železo redukuje vo vnútri rastliny a následne sa ľahko vstrebáva [30].

Sideroféry sú zlúčeniny s nízkou molekulovou hmotnosťou, zvyčajne nižšou ako 1 kDa, ktoré obsahujú funkčné skupiny schopné reverzne viazať železo. Najbežnejšími funkčnými skupinami sú hydroxamáty a katecholy, v ktorých vzdialenosť medzi zúčastnenými skupinami je optimálna

pre väzbu so železom. Baktérie produkujúce sideroféry zvyčajne patria do rodu *Pseudomonas*, medzi ktorými sú najlepšie preštudované druhy *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas aeruginosa*, vylučujúce pyochelínové a pyoverdínové typy siderofórov [31]. Pôdne baktérie produkujúce sideroféry zlepšujú zdravie rastlín v rámci rôznych úrovní. Zlepšujú výživu rastlín vstrebateľným železom, inhibujú rast iných mikroorganizmov vylučovaním antibiotických molekúl a bránia rastu patogénov obmedzením dostupnosti železa pre ich využitie, najmä hubám, ktoré nie sú schopné absorbovať komplex sideroféru a železa [32].

2.2.2.2 Antibiotické účinky

Jeden z účinných mechanizmov, ktorým PGPR zabraňujú proliferácii fytopatogénov je syntéza antibiotík. Antibiotiká zahŕňajú heterogénnu skupinu organických zlúčenín s nízkou molekulovou hmotnosťou, ktoré sú škodlivé pre rast alebo metabolické aktivity iných mikroorganizmov [33]. Mechanizmus účinku spočíva v inhibícii syntézy bunkových stien patogénov, ovplyvnení membránových štruktúr buniek a inhibícii tvorby iniciačných komplexov na malej podjednotke ribozómu [34]. PGPR patriace k rodom *Bacillus* a *Pseudomonas* zastávajú dôležitú funkciu v supresii patogénnych mikroorganizmov produkciou antibiotík. Baktérie rodu *Bacillus* syntetizujú široké spektrum baktericídnych a fungicídnych antibiotík. Zlúčeniny ako subtilin, subtilosin A, TasA a sublancin sú tvorené v ribozómoch buniek. Ostatné látky ako bacilysin, chlorotetain, mycobacillin a lipopeptidy patriace do skupín surfactinu, iturinu a fengycinu sú tvorené neribozomálnymi peptidovými syntetázami alebo polyketidovými syntetázami [35].

2.2.2.3 Produkcia lytických enzýmov

Enzýmy degradujúce bunkovú stenu ako sú β-1,3-glukanáza, chitináza, celuláza a proteáza vylučované biokontrolnými kmeňmi PGPR disponujú priamym inhibičným efektom na rast hýfov hubových patogénov degradáciou bunkovej steny. Chitináza degraduje chitín, ktorý je významným komponentom bunkovej steny húb. β-1,3-glukanáza dokáže ľahko degradovať bunkovú stenu patogénu *Fusarium oxysporum* [36]. Enzýmy degradujúce bunkovú stenu, produkované pôdnymi baktériami ovplyvňujú štrukturálnu integritu stien cielených patogénov [37].

2.2.2.4 Indukovaná systematická rezistencia

Niektoré kmene poskytujú hostiteľskej rastline alternatívny spôsob ochrany pred chorobami prostredníctvom indukovanej systematickej rezistencie (ISR). Je to proces, kedy ošetrenie rastlín pomocou PGPR vyvolá zvýšenú obranyschopnosť rastliny, čím sa zníži závažnosť alebo výskyt ochorenia spôsobeného patogénmi [38]. Kmeň *Pseudomonas*, patriaci medzi PGPR, je známy induktor systematickej rezistencie u rastlín ako sú karafiát, reďkovka a arábkovka. Indukujúci determinant je tzv. „O–antigénny bočný reťazec [39]“, lipopolysacharid lokalizovaný na povrchu gramnegatívnych baktérií [40]. Indukujúce pôdne baktérie produkujú v rastlinných koreňoch signál, ktorý sa systematicky šíri v rámci rastliny, a zvyšuje tým defenzívnu kapacitu vzdialených pletív voči infekcii patogénmi [41].

2.3 Nosiče bioinokulantov

Množstvo PGPR je extenzívne citovaných v literatúre, no len malé množstvo kmeňov sa komerčne používa ako biovstup pre poľnohospodársku prax, pravdepodobne kvôli ich nevhodnej formulácii [42–44]. Krátko po inokulácii bakteriálnych suspenzií do pôdy bez vhodného nosiča dochádza k rapídnemu znižovaniu ich populácie. Tento fenomén, spoločne s nedostatočnou produkciou bakteriálnej biomasy, náročnou udržateľnosťou aktivity v rizosfére a dostatočnou viabilitou buniek v čase aplikácie môže zabrániť tvorbe dostatočnej populácie PGPR v pôde. Prahové množstvo buniek (pre každý druh jedinečné) je nevyhnutné dosiahnuť pre získanie cielenej pozitívnej odpovede rastliny, napr. pre druh *Azospirillum brasilense* je dané množstvo 10^6-10^7 buniek na rastlinu [45]. Inherentná heterogenita pôdy je kľúčovou prekážkou pre baktérie, ktoré si v pôde nedokážu nájsť vhodné útočisko. Tieto nechránené inokulované baktérie musia súperiť s často lepšie adaptovanou prirodzenou mikroflórou a čeliť predátorom v pôdnej mikrofaune. V dôsledku toho zohráva hlavnú úlohu formulácia (nosič) inokulantu, sprostredkujúca vhodnejšie prostredie, a súčasne poskytujúca dlhodobú fyzickú ochranu, čím zabraňuje rapídnemu zmenšovaniu populácie PGPR, ktorá je do pôdy aplikovaná. Inokulanty pre rozsiahle použitie musia byť navrhnuté tak, aby poskytovali spoľahlivý zdroj baktérií, ktoré prežijú v pôde a sú dostupné pre rastliny [46]. Prvým krokom v navrhovaní inokulantu je zvolenie vhodného bakteriálneho kmeňa pre dosiahnutie požadovaného efektu na cielenú rastlinu. Následne je dôležitý návrh špecifickej formulácie inokulantu pre danú rastlinu a metódu jeho aplikácie. Zvolená formulácia a metóda aplikácie determinuje potenciálny úspech inokulantu [44].

2.3.1 Charakteristiky vhodných formulácií inokulantov

Pre navrhnutie vhodného inokulantu je potrebné brať do úvahy záujmy farmárov a výrobcov. V praxi ide vždy o dosiahnutie maximálneho výťažku plodín. Hlavné praktické vlastnosti inokulantu, požadované farmármi je kompatibilita inokulantu so zaužívanými postupmi v poľnohospodárskej praxi. Ďalšími dôležitými vlastnosťami biohnojiva je jednoduchosť jeho použitia, kompatibilita s farmárskym vybavením, dostatočná odolnosť počas skladovania, schopnosť práce v rôznych podmienkach a typoch pôdy a schopnosť dlhodobého prežívania a postupného uvoľňovania PGPR v pôde podľa požiadaviek rastliny [44]. Vhodný nosič by mal pozitívne vplývať na rast cieleného mikroorganizmu alebo mikroorganizmov, udržiavať potrebné množstvo živých buniek v dobrom fyziologickom stave dostatočne dlhú dobu [47], a disponovať dostatočným množstvom mikroorganizmov v čase inokulácie, aby bola dosiahnutá požadovaná pozitívna odpoveď rastliny [48].

2.3.1.1 Chemické a fyzikálne charakteristiky

Nosič inokulantu by mal byť sterilný alebo byť lacno sterilizovateľný, čo najviac fyzikálne a chemicky uniformný, konzistentnej kvality šarže a vhodný pre najširšie možné spektrum PGPR. Konzistencia vlastností surového materiálu je nevyhnutná. Nosič je hlavná ingrediencia v produkcii inokulantu. Ak sa konzistencia líši, zavedený proces kontroly kvality daných inokulantov nie je možné upraviť pre každú dávku surového materiálu pri priemyselnej výrobe inokulantu [47].

2.3.1.2 *Kvality výrobku*

Je požadované, aby náročnosť výroby inokulantov nebola vysoká. Výrobok musí umožňovať adíciu živín, disponovať jednoducho prestaviteľným pH a byť vyrobený z nízko-nákladového materiálu z vhodného zdroja s dobrou dostupnosťou [49].

2.3.1.3 *Manipulačné vlastnosti v praxi*

Dobré inokulanty umožňujú jednoduchosť manipulácie, poskytujú rýchle a kontrolované uvoľňovanie baktérií do pôdy a môžu byť aplikované štandardnou sejúcou technikou. Málo farmárskych praxí disponuje špecializovanou technikou, schopnou aplikovať vysokoúčinný inokulant do pôdy, hlavne v konzervatívnych farmárskych komunitách [48].

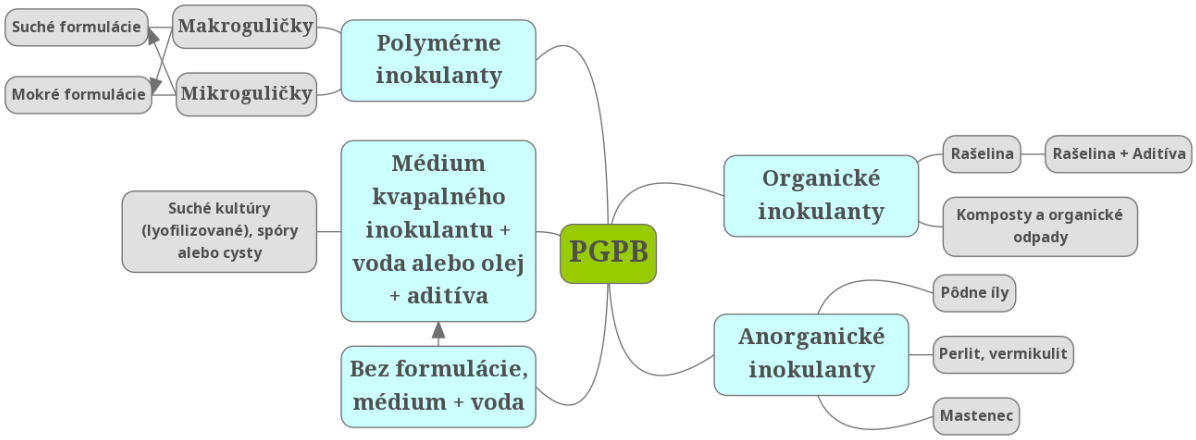
2.3.1.4 *Šetrnosť k životnému prostrediu*

V súlade so súčasnými environmentálnymi obavami týkajúcich sa aplikácií látok, ktoré menia charakter pôdy, inokulant by mal byť netoxický, degradovateľný, nezanechávajúci uhlíkovú stopu a neznečisťujúci. Aplikácia musí minimalizovať environmentálne riziká, ako sú napr. únik škodlivých látok do pôdy a ovzdušia [44].

2.3.1.5 *Dlhodobé skladovanie*

Inokulant by mal disponovať dostatočnou trvanlivosťou. Výdrž jeden až dva roky pri izbovej teplote sú bežným kritériom, potrebným pre úspešnú integráciu do poľnohospodárskeho distribučného systému v rozvinutých krajinách [49; 50].

2.3.2 Formulácie inokulantov



Obrázok 2: Formulácie inokulantov pre poľnohospodárske a environmentálne aplikácie [44]

Výkonnosť inokulantu je najbežnejšou prekážkou v jeho komercializácii. Bakteriálny kmeň, ktorý podáva spoľahlivé výsledky v laboratórnom prostredí nemusí dosahovať podobné výsledky v praxi mimo laboratória. Zložitou výzvou vo výrobe komerčne využiteľného inokulantu je príprava vhodnej formulácie, ktorá by dosahovala podobné výsledky aj v praxi [47]. Každá formulácia musí byť stabilná počas výroby, distribúcie, podobu skladovania a transportu ku farmárom, najmä ak je hlavnou zložkou živý organizmus náchylný na zmeny v porovnaní s poľnohospodárskymi

chemikáliami. Dôležitou funkciou inkulantu je jeho účinok v type pôdy, do ktorej je očkovaný [44].

2.4 Tradičné inokulanty

2.4.1 Prvá generácia inkulantov

Najstaršou metódou inokulácie semien a rastlín je použitie čistej bakteriálnej suspenzie. Táto metóda je vykonávaná hlavne vo výskumných centrách, pretože nie je časovo ani pracovne náročná. Metóda bez použitia vonkajšej pridanej látky nie je praktická pre poľnohospodárske aplikácie, pretože viabilita buniek bez použitia nosiča rýchlo klesá. V laboratórnych podmienkach je možné dosiahnuť určitej pozitívnej odozvy no v praxi je náročné dosiahnuť optimálne podmienky pre bakteriálne kultúry, z dôvodu nekontrolovateľných vonkajších vplyvov [44].

2.4.2 Kvapalné inokulanty

Kvapalné inokulanty sú vylepšeným derivátom predchádzajúcej formulácie, ktoré odstraňujú niektoré limitujúce faktory. V podstate sú to bakteriálne kultúry obohatené látkami, ktoré môžu zlepšiť lepivosť, stabilizáciu alebo povrchové a disperzné vlastnosti [51]. Hlavnou výhodou týchto inokulantov oproti tuhým je jednoduchá úprava zloženia. Na rozdiel od tuhých inokulantov umožňujú výrobcovi pridať potrebné množstvo živín, bunkové protektanty a látky zodpovedné za tvorbu spór. Spóry zvyšujú viabilitu buniek počas doby skladovania, čím sa po aplikácii zlepšuje výkonnosť bioinokulantu. Ďalšou výhodou je súčasne dlhšia doba trvanlivosti oproti tuhým inokulantom. Nevýhodami kvapalných inokulantov sú kratšia trvanlivosť (v prípade, kedy je vyššia teplota ohrozujúcim faktorom), potreba dlhodobého skladovania v chladnom prostredí a zvýšená cena výroby, čím je ich použitie obmedzené len pre rozvinuté krajiny [47]. Bežným aditívom býva sacharóza, ktorá zlepšuje schopnosť prežitia, najmä kmene rhizóbií, ale zároveň aj baktérií rozpúšťajúcich fosfáty ako je *Pantoea* sp. [52]. Množstvo aditív je polymérneho charakteru s vysokou molekulovou hmotnosťou ako sú karboxy-metyl celulóza, arabská guma a polyvinylpyrolidón [44].

2.4.3 Inokulanty využívajúce organické nosiče

Štandardným organickým nosičom PGPR je rašelina [44]. Fyzický vzhľad rašelinovej formulácie (pevný – prášok, peleta alebo kvapalný – kaša) môže mať vplyv na účinnosť inokulácie. V hrášku očkovanom kmeňmi *Rhizobia* v miernom pásme vykazovala populačná dynamika druhu *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* rovnaký vzor medzi tuhými formuláciami, a to iniciálny pokles trvajúci 2-5 dní nasledovaný nárastom trvajúcim 2 mesiace. Naproti tomu počet pôdnych populácií, pochádzajúce z kvapalných formulácií, klesol takmer na nulu z dôvodu nadmernej vlhkosti pôdy v jarnom období [53]. Granulované očkovacie látky aplikované do pôdy zvýšili produkciu semien, v porovnaní s inokulantami aplikovanými na osivo, buď vo forme tuhého alebo kvapalného rašelinového nosiča [54]. Alternatívou rašelinových nosičov sú lignit, drevené uhlie, koksový prach a komposty rôzneho pôvodu a zloženia, pôdy zmiešané s rôznymi organickými látkami a vermikulit. Mnohé z nich boli klasifikované ako horšie nosiče v porovnaní s rašelinou [46; 51]. Rašelina ako materiál je pre výrobu nosiča intenzívne študovaný a sú známe parametre ako optimálne pH, vlhkosť, kvalita, štandardy kontroly kvality a súčasne riziká, týkajúce sa zdravia

a bezpečnosti. Niektoré organické odpadné materiály fungujú podobne alebo lepšie ako rašelina ako nosiče, ale ich limitáciou je dostupnosť surového materiálu. Nemôžu tvoriť základňu pre veľký priemysel, hlavne ak je surovina šarže variabilná. Dostupnejším zdrojom sa javí byť kal z priemyslu odpadových vôd, ktorý dokáže poskytnúť takmer neobmedzené množstvo surového materiálu, ale touto metódou zatiaľ neboli inokulanty pripravené [55].

2.5 Polymérne inokulanty

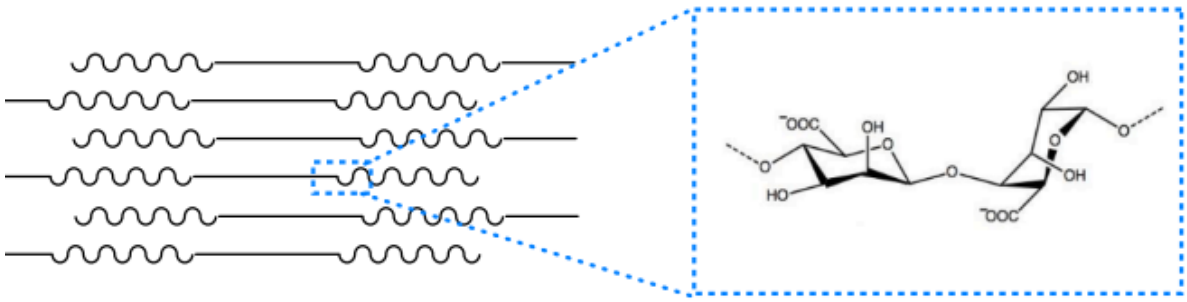
Syntetické formulácie založené na báze polymérnych látok poskytujú značné výhody oproti rašeline. Výhody zahŕňajú dlhšiu trvanlivosť, dostatočná doba prežitia baktérií, adekvátna hustota buniek v inokulante, jednoduchosť výroby a všeobecne zlepšená výkonnosť [46; 55]. Pre poľnohospodárske a environmentálne aplikácie sa využívajú primárne alginát, agar, λ- a κ-karagénan, pektín, chitosan, fazuľová guma a patentované polyméry. Potenciálne výhodné vlastnosti polymérnych inokulantov sú možnosť skladovania vo vysušenej podobe pri izbovej teplote, poskytujú konzistentnú kvalitu šarže a lepšie prostredie pre baktérie, manipulácia je jednoduchá a prispôsobivá potrebám konkrétneho mikroorganizmu, a pre zlepšenie krátkodobého života baktérií je možné obohatiť zmes potrebnými živinami. Hlavnou nevýhodou použitia polymérnych látok ako nosičov inokulantov je vysoká cena materiálu v porovnaní s rašelinou a organickými látkami. Z dôvodu vysokých nákladov na výrobu v súčasnej dobe neexistujú komerčne dostupné polymérne inokulanty [55].

2.5.1 Enkapsulované formulácie

Enkapsulácia mikroorganizmov do polymérnej matrice je v súčasnej dobe v experimentálnom štádiu. Hlavným princípom v imobilizácii bakteriálnych buniek je zachytenie živých mikroorganizmov do polymérnej matrice a udržanie ich viability. Tieto formulácie sú schopné produkcie mnohých zlúčenín pre priemyselné aplikácie ako napr. organické kyseliny, aminokyseliny, enzýmy a vitamíny [44].

2.5.2 Makro- a mikro-alginátové formulácie

Alginát je najčastejšie sa vyskytujúci materiál, použitý vo väčšine enkapsulovaných formulácií mikroorganizmov. Tento prirodzene sa vyskytujúci polymér je dostupný hlavne z mnohých druhov makrorias a to vo veľkom množstve [56; 57]. Je to lineárny aniónový polysacharid známy svojou vlastnosťou gélovať v prítomnosti iónov. Najbežnejším gélovacím mechanizmom je prostredníctvom iónového zosieťovania polysacharidových reťazcov s katiónmi kovov s vysokou valenciou, ako je napr. Ca^{2+} [58]. Výhodou alginátových formulácií je ich netoxický charakter, biodegradabilita, dostupnosť v prijateľnej cene a postupnosť uvoľňovania zachytených baktérií do pôdy, ktorá je riadená štruktúrou polymérnej matrice [59; 60].



Obrázok 3: Štruktúra alginátu [61]

2.5.2.1 Makro-alginátové perličky

Technológia makro-alginátových perličiek (1–4 mm v priemere) bola použitá na enkapsuláciu vybraných PGPR a mykoríznych húb. Enkapsuláciu mikroorganizmu *Bacillus subtilis* v alginátových perličkách obohatených o humínové kyseliny mala za následok vyššiu viabilitu baktérií a minimálnu stratu bioaktivity buniek počas doby piatich mesiacov. Touto metódou bol demonštrovaný pozitívny efekt na rast šalátu [62]. Alginátové formulácie vyriešili mnohé problémy asociované s bežnými rašelinovými inokulantmi, avšak táto metóda má dve hlavné nevýhody. Prvou je nutnosť ošetrenia semienok v procese siatia, čím sa farmárom pridáva v procese krok navyše. Druhou je vzdialenosť, ktorú musia enkapsulované baktérie v pôde uraziť, aby sa dostali na úroveň rastlín (v prípade nanesenia bioinokulantu na povrch semena pred siatím by mal byť tento problém vyriešený). Čím väčšia je táto vzdialenosť, tým viac negatívnym vplyvom, ako sú konkurencia s inými pôdnymi mikroorganizmami a absencia vody, PGPR musia čeliť [44].

2.5.2.2 Mikro-alginátové perličky

Hypotéza týkajúca sa mikro-alginátových perličiek je, že guľôčky dosahujú malých rozmerov (50–200 μm v priemere), ale súčasne sú schopné zachytiť dostatočné množstvo baktérií, potrebných na inokuláciu semienok. Semienka sú obaľované tzv. guličkovým práškom a ďalej distribuované ako „vylepšené semienka“. Pred-obaľovanie semienok je však priemyselne náročný proces takže zatiaľ sa v praxi nevyužíva [44].

2.5.3 Laponitové íl/polyetylénoxid gélové guličky

Laponit (Lap) je syntetický nanoíl. Pelety z laponitu sieťujú pri hydratácii. Lap sa vo veľkej miere využíva v biomedicínskom inžinierstve [63; 64]. Laponit sa taktiež úspešne používa ako materiál pre povrchovú úpravu semien. Polyetylénoxid (PEO) je jedným z najrozšírenejších syntetických polymérov tvoriacich nanokompozitné hydrogély [65]. Silikáty používané v polymérnych nanokompozitoch zvyčajne zlepšujú schopnosť sieťovať spolu s mechanickou stabilitou hydrogélového systému. PEO a Lap sa vo veľkej miere využívajú z dôvodu schopnosti vytvárať reverzibilné hydrogély (hydrogély, ktoré vplyvom vonkajších podmienok reverzibilne menia svoje fyzikálne a chemické vlastnosti) [66]. PEO tiež preukázal, že zvyšuje toleranciu rastlín voči vonkajšiemu stresu. Má hydrofilné vlastnosti, čím dokáže zadržiavať a kontrolovane uvoľňovať vodu, čím znižuje stres rastliny v období sucha [67].

2.6 Metódy aplikácie bioinokulantov

PGPR môžu byť inokulované priamo na povrch semien alebo aplikované do pôdy. Inkrustácia na povrch semien sa využíva výrazne viac ako aplikácia inokulantov do pôdy. Techniky inkrustácie musia brať do úvahy očkovanie za nepriaznivých podmienok ako sú vystavenie vysokej teplote vo vzduchovom sejúcom prístroji alebo siatie semien pri vysokých teplotách [48].

2.6.1 Inokulácia semien

Metóda priamej inokulácie semien je najbežnejšou a najpraktickejšou technikou. Princíp spočíva v nanesení práškového inokulantu (najčastejšie s využitím rašelinového nosiča) na semená. Po aplikácii inokulantu môže následne prebiehať sušenie pred vysiatím. Každé semeno musí disponovať prahovým množstvom baktérií, a preto sa často pre aplikáciu inokulantu používajú adhézne látky. Adhezíva zahŕňajú arabskú gumu, karboxymetyl celulózu, roztoky sacharózy, rastlinné oleje a ostatné netoxické komerčne dostupné adhézne látky. Nasledujúcou vlastnosťou adhéznych látok je zabrániť uvoľňovaniu inokulantu z povrchu semien počas procesu siatia použitím farmárskej techniky, hlavne prípade práškových formulácií inokulantov. V prípade použitia tekutého inokulantu, je očkovacia látka sprejovo aplikovaná na povrch semien. Táto metóda má niekoľko nevýhod. Každé semeno, môže byť očkované len limitovaným množstvom inokulantu, čo môže byť nedostatočné hlavne v prípade semien malých rozmerov, kedy sa na povrch nedostane potrebné prahové množstvo baktérií. Niektoré druhy osív vylučujú antibakteriálne zlúčeniny prostredníctvom semien, čo môže inhibovať inokulant. Niektoré pesticídy a fungicídy môžu mať škodlivé účinky na inkulant pri súčasnom ošetrení osiva oboma látkami. viabilita baktérií sa vplyvom pesticídov a fungicídov môže znížiť [44].

2.6.2 Inokulácia pôdy

Očkovanie pôdy je metóda, ktorá sa používa ak je potrebné dopraviť veľkú populáciu baktérií do pôdy. Obvykle sú použité granulované formulácie a ich umiestnenie v pôde je pod, nad alebo vedľa semena. Výhodou použitia granulovaných typov miesto práškových je jednoduchosť ich aplikácie, menej sa prášia a masívna inokulácia zlepšuje výkon mikroorganizmov. Zároveň je spôsob výberu metódy závislý na vonkajších podmienkach prostredia, v ktorom sú plodiny pestované [68]. Ďalšou výhodou tejto metódy je šetrnosť k povrchu semien, a súčasne očkovacie látky nie sú vystavené vplyvom pesticídov a fungicídov. Fyzická separácia medzi semenom a očkovacou látkou je prekonaná procesom zakorenenia semien, kedy korene vrastajú do priľahlého inokulantu. Prítomnosťou nadbytku očkovacej látky v okolí semien je dosiahnutý väčší prísun inokulantu, ktorý bol v predošlom prípade limitovaný povrchom semena [44].

2.6.3 Foliárna/vzdušná aplikácia inokulantu

Foliárna, alebo listová aplikácia biostimulantov v čase kvitnutia alebo vzniku plodov cieľových plodín sa javila ako pozitívna z hľadiska podpory rastu a produktivity rastliny. Súčasne bolo pozorované zníženie javu opadávania kvetov [69].

3 Súčasný stav riešenej problematiky

V súčasnej dobe sa dostáva do popredia zobrazovanie charakteru pôdy spolu s analýzou schopnosti vývoja biofilmu a použitím rôznych matematických modelov pre prípravu personalizovanej formulácie mikrobiálneho prípravku a určenie jej výkonu. Výber vhodnej formulácie PGPR zahŕňa zvolenie kultivačného média pre nízkonákladovú produkciu biomasy. Cena média musí byť konkurenčná s cenou výroby chemického hnojiva. Vedľajšie produkty potravinárskeho priemyslu, ako sú srvátkový a sójový šrot, sa využívajú na výrobu potravín a krmív. Tieto produkty sa často vyhadzujú, čo je veľmi škodlivé pre ekosystém. Riešením sa javí využitie týchto znečisťujúcich odpadných produktov ako lacných komponentov kultivačných médií pre výrobu biomasy [70].

Personalizovaná výroba bioinokulantu je nemožná bez znalosti interakcií medzi rastlinou a mikroorganizmami. Metagenomická a metatranskriptonická analýza dokáže ilustrovať účinky vylučovaných metabolitov (cez koreňové exsudáty) na zloženie rizosférických mikrobiálnych komunít. Komplexné metabolomické údaje je možné použiť na zobrazenie súboru sekundárnych metabolitov ktoré uvoľňujú rastliny a PGPB, čo v konečnom dôsledku poskytne koncept o charaktere ich symbiotického vzťahu. V neposlednom rade je dôležité získať informácie aj o zložení pôdy dôkladnou analýzou v laboratóriách. Spojením týchto znalostí je možné zvoliť vhodný mikrobiálny druh pre vyvinutie vhodnej formulácie PGPB [71].

Nevýhodami doteraz pripravovaných bioinokulantov sú krátka trvanlivosť, nestabilita v pôde, náchylnosť na vysychanie a potreba vysokej dávky na pokrytie širokej oblasti. Biohnojivá obsahujúce nanočastice sa javia ako efektívne riešenie všetkých spomenutých problémov [72]. Formulácia nano-biohnojiva zahŕňa obaľovanie biohnojiva v nanopolyméroch. Technológia nanoenkapsulácie by mohla slúžiť ako všestranný nástroj na ochranu PGPR, predĺženie ich trvanlivosti, distribúciu v bioinokulante a reguláciu uvoľňovania z bioinokulantu [73]. Príklady nano-nosičov zahŕňajú nanokapsuly, nanosféry, nanohydrogély, ktoré sú zložené z biopolymérov (celulóza, chitosan a polylaktidy), íl (mezopórový oxid kremičitý a montmorillonit). Do týchto nosičov sú implementované konvenčné pesticídy ako aktívna prísada. Tieto typy nanopesticídov sú považované za viac efektívne, pretože ich nosiče slúžia ako vysoko citlivé platformy, ktoré aktívnu látku uvoľňujú kontrolovane a v pravidelných intervaloch do prostredia [74]. V štúdii vykonanej Xu a kolektívom bol pesticíd azoxystrobín (AZOX) synchrónne enkapsulovaný v novom nano-nosiči zloženého mezospórového oxidu kremičitého (MSN) a karboxymetylchitosanu (CMCS). Táto formulácia bola testovaná pre jej fungicídne účinky proti druhu *Phytophthora infestans*. Výsledkom bolo zistenie, že uvoľňovanie AZOX-u z nosiča bolo pH senzitívne [75].

4 Experimentálna časť

V experimentálnej časti je postupne riešená problematika prípravy originálnej formy gélového bioinokulantu. Z predošlých prác vykonaných na fakulte bol vybraný formát gélového inokulantu vzniknutého pridaním chloridu vápenatého k vyprodukovanej biomase, alginát produkujúcej PGPR kultúry *A. vinelandii*. Pôvodná koncentrácia chloridu, ktorý bol použitý ako sieťovacie činidlo bola 2 % hm.. Predmetom experimentálnej časti bolo optimalizovať pôvodne navrhnutý bioinokulant, optimalizovať aplikáciu týchto bioinokulantov na semienka vybranej rastliny a zhodnotiť krátkodobý efekt na vývoj a rast rastliny.

4.1 Prehľad použitých mikroorganizmov, chemikálií a prístrojov

4.1.1 Použité mikroorganizmy

Pre experimenty boli použité tri kmene baktérie *Azotobacter vinelandii*, z ktorých jeden bol získaný z českej zbierky CCM so zbierkovým číslom CCM 289. Dva kmene boli získané z nemeckej zbierky mikroorganizmov DSMZ so zbierkovými číslami DSM 87 a DSM 720.

4.1.2 Použité chemikálie

Agar, bakteriologický	(HiMedia, India)
(CAS) Chróm Azurol S	(Sigma-Aldrich, Nemecko)
(CTAB) Cetrimónium bromid	(Sigma-Aldrich, Nemecko)
D-glukóza monohydrát	(Lachner, ČR)
Etanol pre UV spektroskopiu (99,8 %)	(Lachner, ČR)
Glycerol bezvodý	(Lachner, ČR)
Hydrogénfosforečnan didraselný	(Lachner, ČR)
Chlorid vápenatý, bezvodý	(Lachner, ČR)
Chlorid železitý heptahydrát	(Lachner, ČR)
Kvasnicový extrakt, prášok	(HiMedia, India)
Kyselina chlorovodíková (37 % obj.)	(Lachner, ČR)
L-tryptofán	(Sigma-Aldrich, Nemecko)
Peptón, bakteriologický	(HiMedia, India)
Piperazín bezvodý	(Sigma-Aldrich, Nemecko)
Síran amónny	(Lachema, ČR)
Síran horečnatý heptahydrát	(Lachner, ČR)
Uhličitan vápenatý	(Penta, ČR)

4.1.3 Použité prístroje

Centrifúga EBA Hettich
Elisa reader Synergy HTX
Hlbokomraziaci box IULUF 490
Iónometer S 50 pM/ISE
Laboratórna sušička Binder
Laboratórna sušička LTE Scientific
Laboratórny digestor Merci

Laminárny box Aura Mini, Bio Air Instruments
Lyofilizátor L10-55 PRO Gregor Instruments
Magentické miešadlo bez ohrevu MMS-3000
Magnetické miešadlo s ohrevom MR Hei-Tec
Nanofotometer PEARL
Rastrovací elektrónový mikroskop ZEIS EVO LS 10
Spektrofotometer HITACHI U-3900H
Trepačka Heidolph
Trepačka temperovaná ES-20
Trepačka temperovaná Tehtnica
Váhy KERN EW620
Váhy S-4002, Denver Instrument
Vákuová naparovačka POLARON

4.1.4 Použité rastliny

Šalát hlávkový Semo

Obrázok 4: Šalát hlávkový - modelová rastlina

4.2 Optimalizačné experimenty

4.2.1 Kultivácia bakteriálnych kultúr

4.2.1.1 Skladovanie bakteriálnych kultúr

Do kryoskúmaviek s 0,5 ml 30 % glycerolu bol pridaný 1 ml kultúry, a skúmavka bola uchovávaná pri -80 °C. Takto boli uchovávané všetky použité kmene.

4.2.1.2 Príprava inokulačného a produkčného média

Inokulačné médium, vhodné pre *A. vinelandii* je modifikované minerálne médium podľa Ashbyho. Bolo pripravené zmiešaním kvasinkového extraktu a príslušný anorganických zlúčenín podľa *Tabuľka 1*. Do Erlenmayerových baniek s objemom 100 ml bolo odmeraných 33 ml média, a toto médium bolo použité ako inokulačné. Do Erlenmayerových baniek s objemom 250 ml bolo odmeraných 100 ml média, obohateného o uhličitan vápenatý. Toto médium bolo následne použité ako produkčné.

*Tabuľka 1: Zloženie inokulačného a produkčného média (*iba v produkčnom médiu)*

H_2O	1000 ml
Kvasinkový extrakt	6,00 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	2,52 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,60 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,30 g
$CaCO_3$*	1,00 g

4.2.1.3 Očkovanie kultúry do média

Do Erlenmayerovej banky s objemom 100 ml bolo pripravených 33 ml inokulačného média. Po sterilizácii média bolo do banky pridaných 1,666 ml glukózy o koncentrácii 40 g/100 ml. Následne bola banka zaočkovaná 0,75 ml rozmrazenej bakteriálnej kultúry z kryoskúmavky. Banka bola uzavretá zátkou a umiestnená na trepačku za miešania 180 rpm pri 30 °C. Po 20–48 hodinách bolo 5 ml kultúry z banky s inokulačným médiom preočkovaných do Erlenmayerovej banky s objemom 250 ml, ktorá obsahovala 100 ml produkčného média. Do banky bolo zároveň pridaných 5 ml glukózy (40 g/100 ml).

4.2.1.4 Príprava lyofilizovaných kultúr

Lyofilizované kultúry boli pripravené po skončení kultivácie. Kultúry boli umiestnené do plastových nádobiek a uzavreté alobalom s dierami. Sušenie prebiehalo podľa postupu v krokoch (*Tabuľka 2*).

Tabuľka 2: Postup pre lyofilizáciu kultúr

Lyofilizácia			
Krok	t (min)	t (°C)	p (hPa)
1	600	-20	1,5
2	600	-15	1
3	450	-10	0,5
4	300	-5	0,5
5	300	0	0
6	600	5	0
7	300	20	0
8	600	30	0
9	0	0	0

4.2.1.5 Aplikácia bioinokulantov na semienka

Na semienka boli v každom experimente aplikované bioinokulanty pripravené z čerstvej kultúry a sieťovacieho činidla alebo z lyofilizovanej kultúry. Bioinokulanty z čerstvej kultúry inak zvané aj bioinokulanty na báze mokrého gélu boli pripravené namočením semienok do čerstvej kultúry a následným namočením do sieťovacieho činidla, ktorým bol $CaCl_2$. Po namočení do chloridu boli semienka vysušené prúdom vzduchu (*Obrázok 5*). Vo variante použitia lyofilizovaných kultúr boli najprv tieto kultúry resuspendované v cca 5 ml vody. Konzistencia vzniknutej suspenzie bola kvapalná s nízkou viskozitou Semienka boli následne namočené do suspenzie. Po namočení boli vysušené prúdom suchého vzduchu. V prípade použitia viacnásobných vrstiev bioinokulantov bol postup opakovaný.

Obrázok 5: Sušenie semienok prúdom vzduchu

4.2.2 Pozorovanie klíčenia semienok na Petriho miskách

Pre daný experiment bol použitý kmeň *A. vinelandii* CCM 289. Bioinokulanty boli pripravené podľa predošlého postupu *4.2.1.5*. Boli prichystané varianty bioinokulantov podľa tabuľky (*Tabuľka 3*). Každý variant bioinokulantu bol umiestnený do Petriho misiek s filtračným papierom na dne. Následne bola pridaná voda a Petriho misky boli uzavreté a utesnené parafilmom. Priebeh rastu bol dokumentovaný po dobu jedného týždňa.

*Tabuľka 3: Počet Petriho misiek pre každé ošetrenie semienok (*kontaminácia pozostávala z ponechania otvorenej Petriho misky v nesterilnom prostredí po dobu 30 min)*

CCM 289	
Ošetrenie	Počet Petriho misiek
Negatívna kontrola	2
1 krát obalené v mokrom géli	2
1 krát obalené v mokrom géli/kontaminované*	2
1 krát obalené v lyofilizovanej kultúre	2

4.2.3 Pozorovanie klíčenia na Petriho miskách a v pôde

V pozorovaní boli použité kmene *A. vinelandii* CCM 289 a DSM 87. Semienka boli obalené podľa predošlého postupu *4.2.1.5*. Jednotlivé ošetrenia boli umiestnené na Petriho misky, tentokrát bez duplikátov (*Tabuľka 4*). Z každého ošetrenia boli taktiež cca 2–3 semienka použité na sledovanie rastu v pôde. Do kvetináču s objemom 40 ml boli zhruba 1 cm pod povrch pôdy umiestnené semienka. Kvetináče boli umiestnené do digestoru, v ktorom boli umiestnené žiarovky simulujúce slnečné žiarenie. Následne boli počas experimentu všetky kvetináče so semienkami zalievané 10 ml vody každý deň.

Tabuľka 4: Počet Petriho misiek pre jednotlivé ošetrenia

Ošetrenie	CCM 289	DSM 87
	Počet Petriho misiek	
1 krát obalené v mokrom géli	1	1
3 krát obalené v mokrom géli	1	1
5 krát obalené v mokrom géli	1	1
7 krát obalené v mokrom géli	1	1
Negatívna kontrola	1	

4.2.4 Test vplyvu salinity na klíčivosť semien

4.2.4.1 Test vplyvu rastúcej koncentrácie roztokov NaCl

Bolo pripravených 5 roztokov s rôznymi koncentráciami NaCl (*Tabuľka 5*) a roztok sieťovacieho činidla chloridu vápenatého o koncentrácii 2 hm.%. Zároveň bol pripravený jeden roztok ako negatívna kontrola. V týchto roztokoch následne prebiehalo meranie pH a konduktivity pomocou iónometra. Po meraní boli roztoky použité ako závlaha v Petriho miskách. Pre každý roztok bola použitá 1 Petriho miska s filtračným papierom na dne. Do každej Petriho misky bolo umiestnených cca 20 semienok bez ošetrenia inokulantom, a následne bola Petriho miska uzavretá a utesnená parafilmom. Rast semienok bol sledovaný a dokumentovaný po dobu 10 dní.

Tabuľka 5: Zloženie pripravených roztokov pre meranie

Meranie	EC (dS/mm)	NaCl (g)	H_2O (ml)
1	0	0	50
2	2	0,064	
3	4	0,128	
4	8	0,256	
5	16	0,512	
6	32	1,024	
7	$CaCl_2$ 2% hm.	-	-

4.2.4.2 Pozorovanie vplyvu rastúcej koncentrácie roztokov $CaCl_2$

Pre zistenie negatívneho vplyvu roztoku sieťovacieho činidla boli pripravené roztoky $CaCl_2$ o koncentráciách 0,5 hm. %, 1 hm. % a 2 hm. %. Bolo pripravených 5 ml roztoku všetkých koncentrácií. Semienka šalátu boli umiestnené na filtračný papier v Petriho miske a zaliate pripravenými roztokmi. V jednej Petriho miske boli semienka zaliate 5 ml vody, a slúžili ako negatívna kontrola. Všetky Petriho misky boli uzavreté vrchnou časťou a utesnené parafilmom. Rast semienok bol sledovaný a dokumentovaný každý deň po dobu jedného týždňa.

4.2.5 Optimalizácia sledovania účinku gélových inokulantov v agare

V rámci zvýšenia pozitívneho účinku vybraných kmeňov PGPR boli navrhnuté rôzne variácie gélových inokulantov (*Tabuľka 6*). V experimente boli použité všetky dostupné kmene *A. vinelandii*. Tieto variácie vznikli použitím rozdielnych koncentrácií sieťovacieho činidla pri procese prípravy gélu (1 hm. % alebo 2 hm. %). Bioinokulanty boli pripravené podľa predpísaného postupu *4.2.1.5*. Finálne vysušené semienka boli pomocou pinzety umiestnené do skúmavky na rozhranie agaru. Pre kontrolu účinku kmeňov na rast šalátu boli semienka v jednom prípade ošetrené čistými kultúrami bez sieťovacieho činidla. Na porovnanie bola pripravená tzv. negatívna kontrola, kedy boli semienka umiestnené do agaru bez akéhokoľvek ošetrenia. Skúmavky boli rozdelené do kadičiek podľa kmeňa a podľa ošetrenia, a následne boli umiestnené do mokrého exsikátora.

Tabuľka 6: Počty skúmaviek pre navrhnuté bioinokulanty

Úprava	CCM 289	DSM 87	DSM 720
	Počet skúmaviek		
1 krát obalené lyofilizovanou kultúrou	6	6	6
3 krát obalené lyofilizovanou kultúrou	6	6	6
1 krát obalené s použitím 2 % $CaCl_2$	6	6	6
3 krát obalené s použitím 2 % $CaCl_2$	6	6	6
1 krát obalené s použitím 1 % $CaCl_2$	6	6	6
3 krát obalené s použitím 1 % $CaCl_2$	6	6	6
1 krát obalené v čistej kultúre	6	6	6
Negatívna kontrola		6	

4.3 Príprava gélových inokulantov a sledovanie ich vplyvu na rast v agare

Podobne ako v prvom experimente boli pripravené rôzne variácie gélového inokulantu. V experimente boli taktiež použité všetky dostupné kmene *A. vinelandii*. Postup obalenia semienok prebiehal taktiež podľa predošlého postupu *4.2.1.5*. Pripravené inokulanty sú zaznamenané v *Tabuľka 7*. Spôsob dokumentácie dát v priebehu experimentu je zobrazený na *Obrázok 6*.

Tabuľka 7: Počty skúmaviek pre navrhnuté bioinokulanty

Úprava	CCM 289	DSM 87	DSM 720
1 krát obalené lyofilizovanou kultúrou	4	4	4
3 krát obalené lyofilizovanou kultúrou	4	4	4
1 krát obalené s použitím 2 % $CaCl_2$	4	4	4
3 krát obalené s použitím 2 % $CaCl_2$	4	4	4
1 krát obalené s použitím 1 % $CaCl_2$	4	4	4
3 krát obalené s použitím 1 % $CaCl_2$	4	4	4
1 krát obalené s použitím 0,5 % $CaCl_2$	4	4	4
3 krát obalené s použitím 0,5 % $CaCl_2$	4	4	4
Negatívna kontrola		4	

Obrázok 6: Metóda dokumentácie priebehu experimentu v agare

4.4 Testovanie biologického účinku vrstiev inokulantu

4.4.1 Morfologická analýza povrchových vrstiev na semienkach

Semienka boli obalené mokrým gélom a lyofilizovanými kmeňmi. Počet obalení bolo 1 a 3. Semienka boli následne ponechané v sušiarni po dobu dvoch týždňov. Následne bola vykonaná analýza na SEM. Na vzorky bola pomocou vákuovej naparovačky POLARON nanesená tenká vrstva zlata o hrúbke približne 10 nm. Následne boli vzorky prenesené a pozorované v rastrovacom elektrónovom mikroskope ZEIS EVO LS 10 v móde sekundárnych elektrónov pri urýchľovacom napätí 5 kV. Nižšie napätie bolo zvolené k minimalizácii nabíjania vzoriek.

4.4.2 Posúdenie bakteriálnej aktivity kultúry po aplikácii na semienka

Na agarových platniach bola pozorovaná bakteriálna aktivita, ktorá sa vplyvom aplikácie kultúry na semienko mohla meniť. Pozorované boli charakteristické vlastnosti PGPB ako sú produkcia siderofórov, rozpúšťanie fosfátov a produkcia kyseliny indoloctovej (IAA).

4.4.3 Príprava agarových platní pre posúdenie PGPR efektov

Pre posúdenie zvolených PGPR efektov boli pripravené agarové misky so špeciálnym zložením pre každý efekt. Na analýzu boli pripravené semená šalátu obalené podľa štandardného postupu *4.2.1.5*.

4.4.3.1 Médiá použité pre analýzy

Tabuľka 8: Zloženie kvapalného King B média

King B médium	
glycerol (1,5 % [v/v])	15 g
peptón	20 g
K_2HPO_4	1,15 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,50 g
voda	1 l

Tabuľka 9: Zloženie roztokov pre prípravu CAS média

Roztok 1 pre CAS médium		Roztok 2 pre CAS médium	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (1 mM)	13,5 mg	Chróm azurol S	121 mg
HCl (10 mM)	41 µl	H_2O	100 ml
H_2O	50 ml		
Roztok 3 pre CAS médium		**Roztok 4 pre CAS médium**	
Cetrimóniumbromid	364,45 mg	Piperazín bezvodý	4,307 g
H_2O	100 ml	HCl (12 M)	6,25 ml

Tabuľka 10: Zloženie Salkowského reagentu

Salkowského reagent	
$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	2,4 g
H_2SO_4	84,2 ml
H_2O	115,8 ml

4.4.4 Analýza produkcie siderofórov

4.4.4.1 Príprava média CAS

Do 250 ml kadičky bolo pridaných 50 ml sterilnej Mili-Q vody. Postupne bolo pomaly pridaných 1,5 ml roztoku 1; 7,5 ml roztoku 2; 6 ml roztoku 3 a približne 6,25 ml roztoku 4. Roztok 4 bol pripravený čerstvo pred zmiešaním. Zmes bola doplnená vodou na 100 ml.

4.4.4.2 Analýza siderofórov

Médium pre analýzu produkcie siderofórov bolo pripravené podľa článku Adriany Ambrosini [76]. Do 900 ml vody bolo zmiešaných 3 g glycerolu (0,3 % hm.); 4 g peptónu; 0,25 g K_2HPO_4; 0,3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 15 g bakteriologického agaru a pH vzniknutej zmesi bolo upravené na hodnotu 6,8. Následne bola zmes sterilizovaná. Po sterilizácii bolo do média, vychladeného na 50–60 °C, za

mierneho miešania pridaných 100 ml sterilného roztoku CAS. Médium bolo následne vyliate do sterilných Petriho misiek. Po stuhnutí boli na agar umiestnené semená ošetrené lyofilizovanými kultúrami, gélovým inokulantom a pre kontrolu aj neošetrené semená.

4.4.5 Meranie obsahu kyseliny indoloctovej

Postup merania IAA bol vykonaný podľa článku Adriany Ambrosini [76]. Bakteriálna kultúra bola izolovaná zo semienok, ktoré rástli na agarových platniach pre predošlé testy. Každý bakteriálny izolát bol inokulovaný do skúmavky, ktorá obsahovala 2,25 ml sterilného King B média obohateného o sterilných 0,75 ml 2,5 mM tryptofánu. Zmes bola následne inkubovaná 72 hodín pri 30 °C na trepačke s intenzitou 160–180 rpm. Následne bolo 1,5 ml bakteriálnej kultúry umiestnených do Eppendorfovych skúmaviek a bola vykonaná centrifugácia po dobu 10 minút pri 5400 RCF pri laboratórnej teplote. Po skončení bolo 0,75 ml supernatantu umiestnených do nových mikrocentrifugačných skúmaviek, a bolo pridaných 0,75 ml Salkowského reagentu do každej skúmavky. Skúmavky boli ponechané na inkubáciu pri laboratórnej teplote po dobu 30 minút. Po skončení inkubácie bolo 120 µl výsledného inkubovaného roztoku vzorky umiestnených na mikrotitračnú dosku a bola vykonaná multikanálová analýza Elisa. Vo všetkých vzorkách bola taktiež zmeraná absorbancia pri 300–800 nm.

4.4.6 Analýza produkcie fosfátov

Tuhé médium pre analýzu fosfátov bolo pripravené podľa článku Abdallaha Mohameda [77]. Do 1000 ml vody bolo zmiešaných 10 g glukózy; 5 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,2 g KCl, $(NH_4)_2SO_4$ a 15 g bakteriologického agaru. Nakoniec bolo pridaných 5 g $Ca_3(PO_4)_2$ ako jediného zdroja fosforu pre selekciu PSB izolátov. Médium bolo po premiešaní naliate na sterilné Petriho misky. Po stuhnutí boli na agar umiestnené semená ošetrené lyofilizovanými kultúrami, gélovým inokulantom a pre kontrolu aj neošetrené semená.

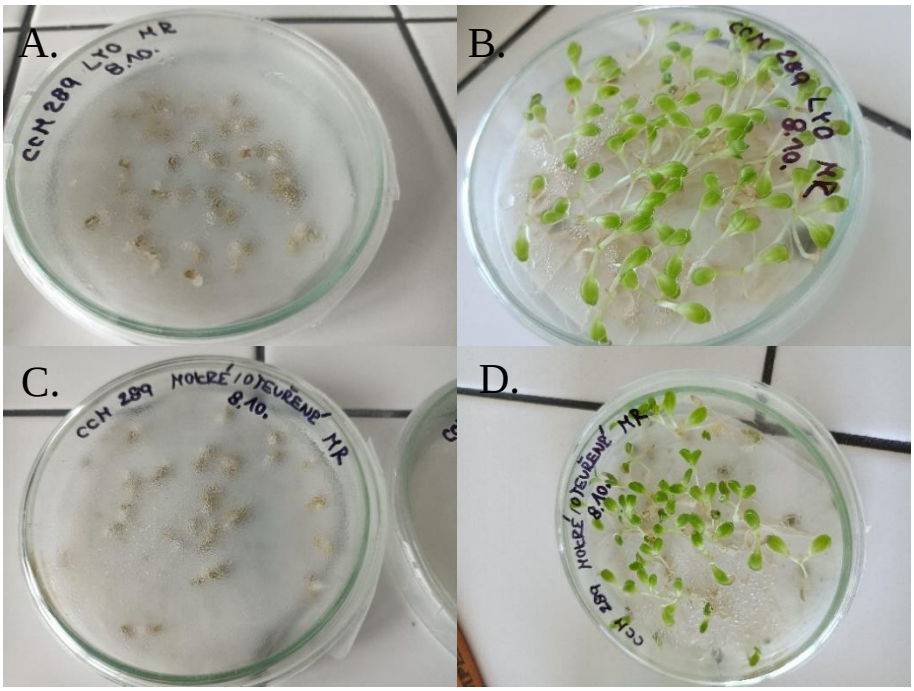
5 Výsledky a diskusia

5.1 Výber typu inokulantu a jeho optimalizácia

Charakter gélového inokulantu bol zvolený podľa vzoru predošlých prác [78]. Na počiatku boli vykonané optimalizačné experimenty, pomocou ktorých bol vybraný postup pre prípravu gélového inokulantu, a súčasne metóda, ktorou by bolo možné sledovať a kvantifikovať mieru jeho účinku.

5.1.1 Pozorovanie semienok obalených inokulantom na Petriho miskách

Pilotným pokusom bolo sledovanie rastu semienok šalátu v Petriho miskách. Semienka ošetrené inokulantom rástli na navlhčenom filtračnom papieri v parafilmom uzavretej Petriho miske (*Obrázok 7*). V oboch pokusoch boli použité semienka rovnakej úpravy (cca 20–30 semienok v každej Petriho miske). Hlavným nedostatkom tohto experimentu bol rast veľkého množstva rastliniek na nedostatočnej ploche, a preto nebolo možné rozlíšiť rozdiely medzi jednotlivými úpravami. Problémom bola súčasne skutočnosť, že Petriho misky s rastlinkami boli uzavreté parafilmom a nebolo možné ich v priebehu pokusu otvoriť, a prípadne kvantifikovať rast rastlín v priebehu experimentu. Celý časový priebeh experimentu je zaznamenaný v *Príloha č.1* .

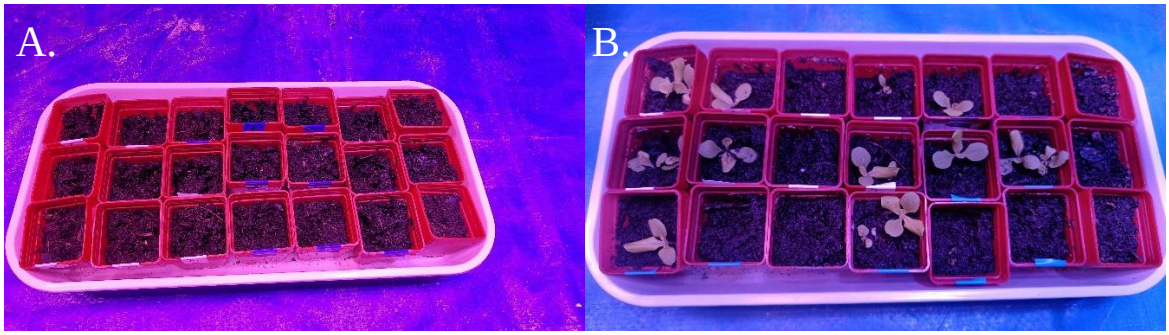


Obrázok 7: Sledovanie vplyvu obalenia semien vrstvou lyofilizovaných kultúr a bioinokulantu pripraveného mokrou cestou. A.– Lyofilizovaný bioinokulant na začiatku; B.– Lyofilizovaný bioinokulant na konci (9. deň); C.– Bioinokulant „mokrou cestou“ na začiatku; D.– Bioinokulant „mokrou cestou“ na konci (9. deň);

5.1.2 Pozorovanie rastu semien v pôde

V tomto experimente boli použité kmene CCM 289 a DSM 87. Tento experiment prebiehal súčasne s opätovným pozorovaním rastu semienok v uzavretých Petriho miskách. V rámci krátkeho trvania

opäť nebolo možné adekvátne sledovať rast rastlín a sledovať rozdiely medzi typmi ošetrenia. Cieľ experimentu bolo stanoviť rozdiely v účinku jednotlivých kmeňov *A. vinelandii*, a súčasne posúdiť vplyv počtu vrstiev, ktorými boli semená ošetrené. V Petriho miskách, podobne ako v predchádzajúcom experimente, nebolo možné sledovať rast z dôvodu veľkého množstva semienok v malej ploche. V prípade pôdy bol problém v nepravidelnom raste semienok v jednotlivých kvetináčoch. Táto skutočnosť bola z veľkej miery ovplyvnená nadmerným polievaním, čo spôsobilo slabý rast. Umiestnenie rastliniek do pôdy neumožnilo podobne ako experiment v Petriho miskách, sledovanie rastu a rozvoja podzemných častí rastlín (*Obrázok 8*). Rozdiely v ošetreniach rôznymi počtami vrstiev inokulantu na semienkach taktiež neboli pozorované, pretože rastliny rástli veľmi nepravidelne a v niektorých prípadoch nerástli vôbec.



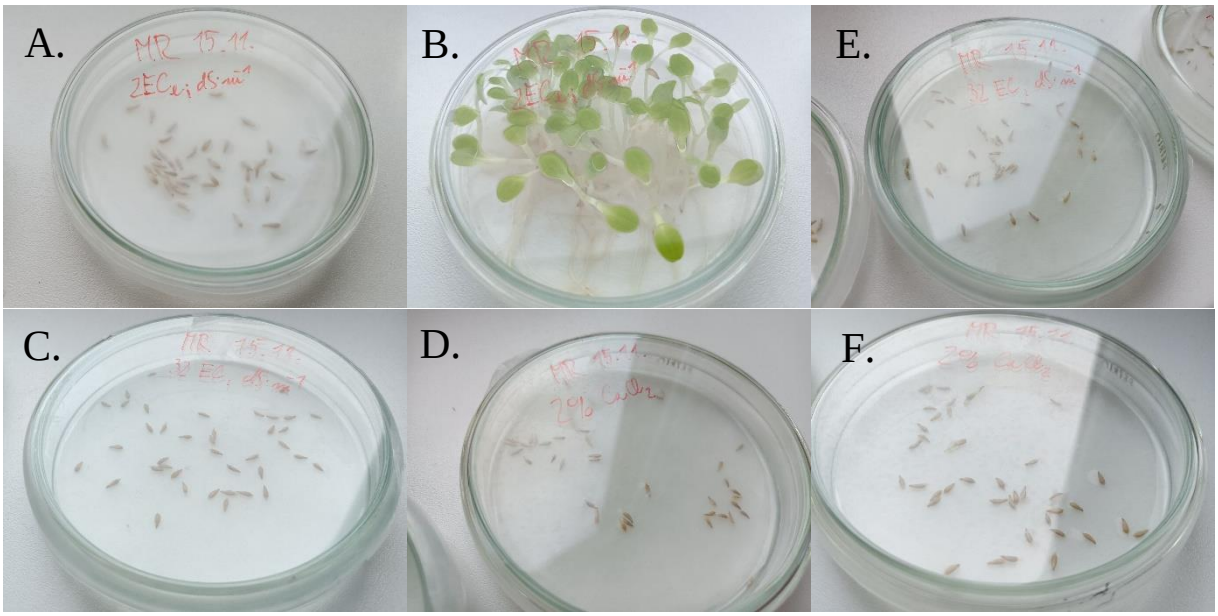
Obrázok 8: Pozorovanie klíčenia semien šalátu v pôde. A.– stav na začiatku experimentu; B.– stav na konci experimentu (11. deň).

5.1.3 Vplyv zasolenia na rast rastliniek

Vplyv zasolenia bol pozorovaný v experimente prípravou roztokov s rôznymi koncentráciami NaCl. Skúška prebehla zároveň pre roztok $CaCl_2$ 2 hm. %, ktorý bol použitý ako sieťovacie činidlo v príprave gélovej štruktúry inokulantu. Pre každý roztok boli zistené hodnoty pH a konduktivity pomocou iónometra S 50 (*Tabuľka 11*). S rastúcou koncentráciou NaCl bolo pozorované zreteľné oslabenie rastu, z dôvodu osmotického stresu, ktorý bol na semienka vyvíjaný (*Obrázok 9*). Cieľom experimentu bolo stanoviť prahovú koncentráciu soli, ktorú sú rastliny schopné vydržať bez úpravy. Pri nižších koncentráciách NaCl boli rastlinky schopné klíčiť a rásť. Pri najvyšších koncentráciách NaCl semienka takmer vôbec nevyklíčili. V Petriho miske s roztokom $CaCl_2$ 2 hm. % nebola pozorovaná žiadna forma klíčenia ani rastu. Toto zistenie spôsobilo, že v nasledujúcich experimentoch boli v príprave gélového inokulantu použité aj nižšie koncentrácie chloridu, aby bolo možné posúdiť jeho vplyv na klíčivosť semien.

Tabuľka 11: Výsledky merania pH a konduktivity

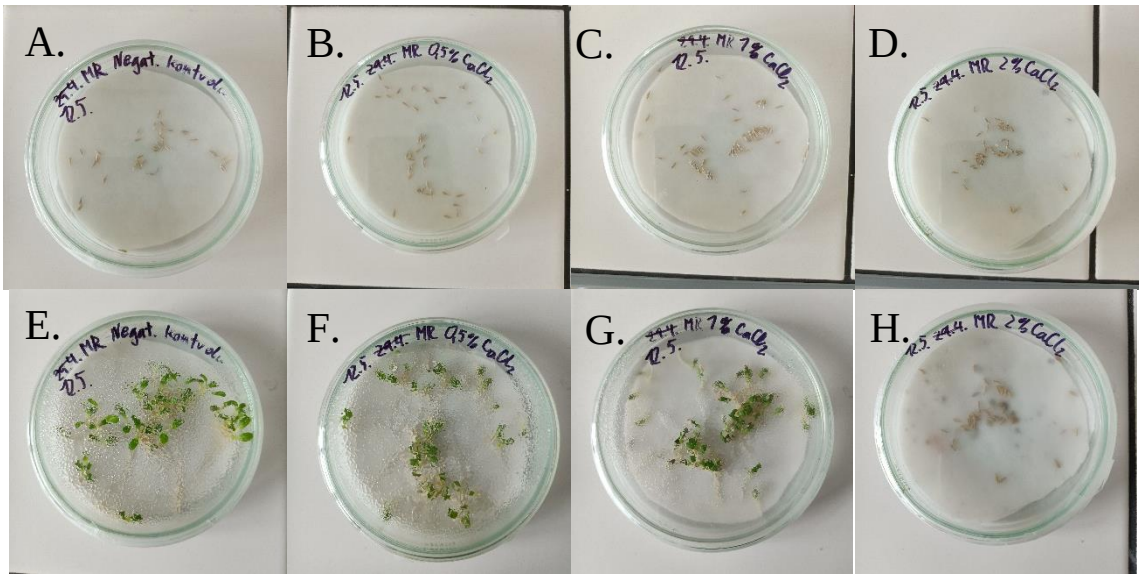
Meranie	EC (dS/mm)	NaCl (g)	H2O (ml)	pH	σ (mS/cm)
1	0	0	50	7,457	0,369
2	2	0,064		7,385	2,83
3	4	0,128		7,271	4,69
4	8	0,256		7,231	9,15
5	16	0,512		7,144	16,83
6	32	1,024		7,114	31,5
7	$CaCl_2$ 2 hm. %	–	–	8,726	28,8



Obrázok 9: Vplyv rastucej koncentrácie soli na klíčenie semien: A.– NaCl 2 EC na začiatku; B.– NaCl 2 EC na konci (11. deň); C.– NaCl 32 EC na začiatku; D.– 32 EC na konci (11. deň); E.– $CaCl_2$ 2 % hm. na začiatku; F.– $CaCl_2$ 2 % hm. na konci (11. deň).

5.1.3.1 Pozorovanie vplyvov rôznych koncentrácií $CaCl_2$ na klíčivosť semien

Pre zistenie miery vplyvu koncentrácie sieťovacieho činidla na inhibíciu klíčenia rastliniek bol vykonaný experiment s použitím 0,5; 1 a 2 % hm. $CaCl_2$. Pozorovaním boli zistené rozdiely v účinnosti klíčenia, kedy rastúca koncentrácia sieťovacieho činidla pôsobila na semienka negatívne. Na obrázkoch sú viditeľné semienka zaliate všetkými koncentráciami chloridu vápenatého na začiatku a na konci experimentu (*Obrázok 10*). V prípade koncentrácie 2 % hm. je viditeľné, že za týždeň semienka nezačali klíčiť. V Petriho miske s koncentráciou chloridu 1 % hm. je vidieť slabšie klíčenie semienok oproti negatívnej kontrole. Zobrazenie klíčenia semienok v priebehu všetkých dní sa nachádza v prílohe

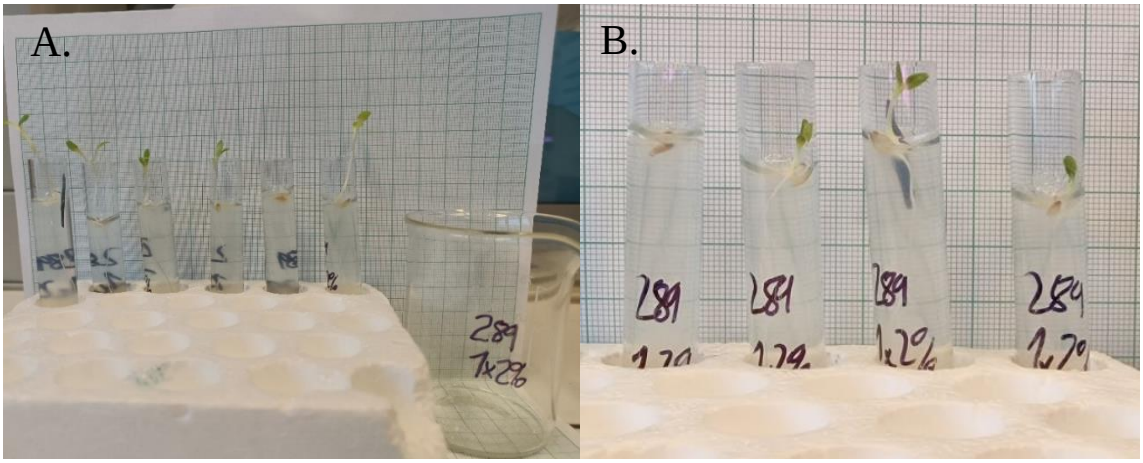


Obrázok 10: Klíčenie semienok pod vplyvom rastúcej koncentrácie chloridu vápenatého v prvý a v posledný deň pozorovania. A.– Negatívna kontrola prvý deň; B.– 0,5 % hm. $CaCl_2$ prvý deň; C.– 1 % hm. $CaCl_2$ prvý deň; D.– 2 % hm. $CaCl_2$ prvý deň; E.– negatívna kontrola 8. (posledný) deň; F.– 0,5 % hm. $CaCl_2$ 8. deň; G.– 1 % hm. $CaCl_2$ 8. deň; B.– 2 % hm. $CaCl_2$ 8. deň;

5.1.4 Optimalizácia agarového experimentu

Motiváciou pre zmenu prostredia experimentu z Petriho misiek bolo sledovanie klíčenia každého semena zvlášť. Dôvodom bola eliminácia pozorovaniu komplikujúcim javom ako prepletanie koreňov alebo nadzemných častí rastlín. Zároveň bolo upustené od sledovania klíčenia semien v pôde, pretože nebolo možné sledovať priebeh klíčenia (hlavne koreňového systému). Gélové prostredie sa javilo ako vhodné, pretože simuluje prostredie s vysokým obsahom vody a v prípade jeho čírosti umožňuje vizuálne pozorovanie klíčenia v čase Formulácie gélového inokulantu, ktorými boli semienka obalené a umiestnené do skúmaviek s agarom boli pozorované po dobu cca 2 týždňov. Predpokladom bola dobrá priehľadnosť agaru v skúmavke, do ktorého bolo semienko umiestnené. Semienka boli umiestnené vždy na hrane stuhnutého agaru, čím bola hranica medzi koreňovou a nadzemnou časťou rastlinky vždy rozlíšiteľná. Takmer u všetkých formulácií bol pozorovaný prvotný rast koreňovej časti po dobu 4 ± 1 deň. Následne v zhruba štvrtom dni bol viditeľný počiatok rastu nadzemnej (zelenej) časti rastlinky. Nedostatkom daného experimentu bola neúplná čírosť agaru, ktorý bol použitý ako médium pre sledovanie a kvantifikáciu rastu. Dáta boli zbierané denným fotením skúmaviek, ktoré boli umiestnené v stojane. Dĺžka koreňa a nadzemnej časti bola zisťovaná pomocou milimetrového papiera, umiestneného za skúmavkami (*Obrázok 11*). Z tohto experimentu boli tiež zhotovené dáta, ale z dôvodu neprehľadného zisťovania dĺžky rastlín v pokuse nie sú výsledky spoľahlivé. Analýza prebehla podobne ako v hlavnom experimente a dáta z neho sú umiestnené v *Príloha č.2* . Problém s čírosťou agaru bol

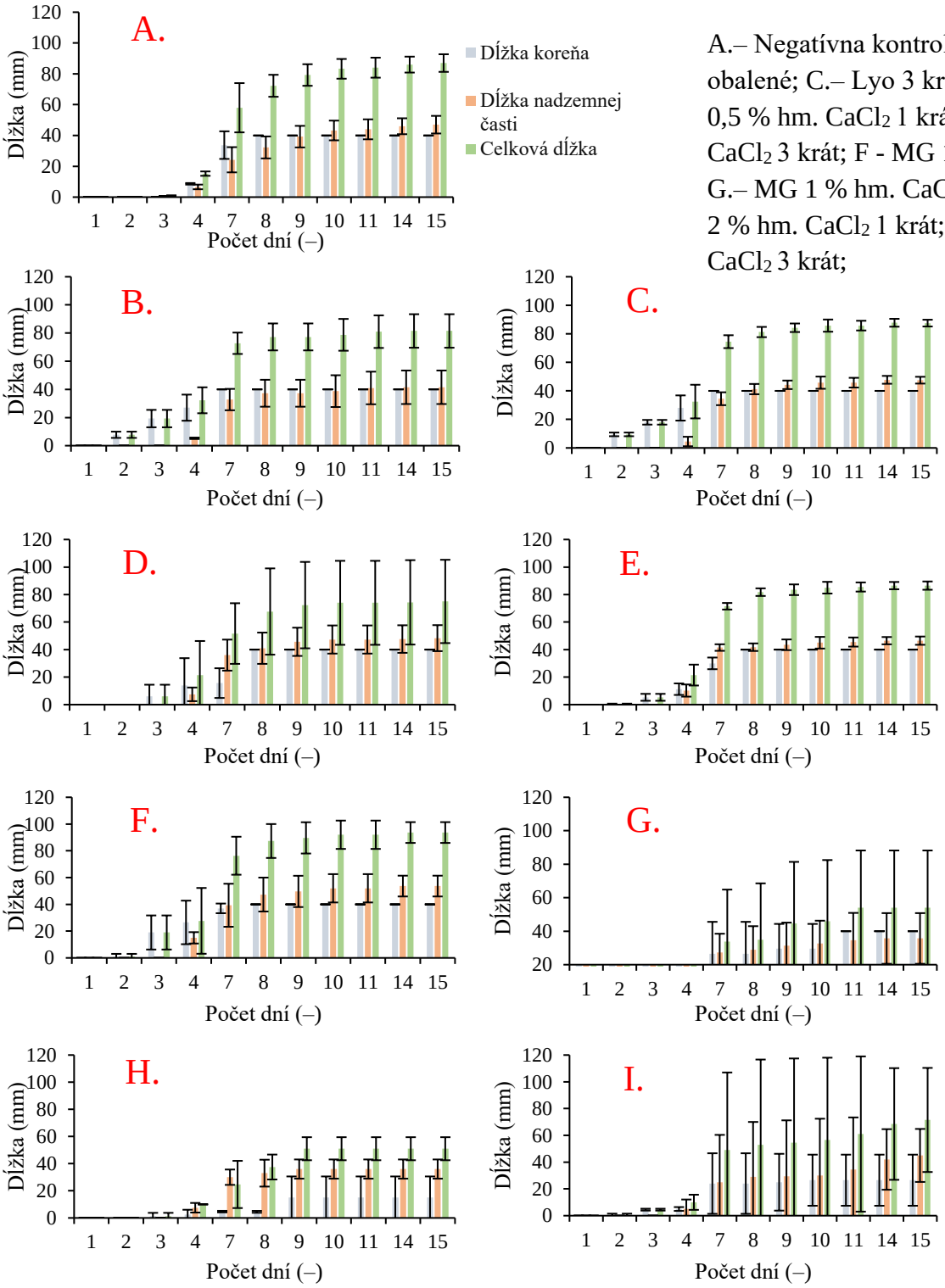
vyriešený zvýšením teploty a tlaku pri rozpúšťaní agaru vo vode. Teplota a tlak mali hodnoty typické pre sterilizáciu agaru, to znamená 121 °C a tlak zhruba 2 MPa.



Obrázok 11: Metóda získavania dát o klíčení semienok v agare meraním dĺžky koreňovej a nadzemnej časti rastlinky v agare pomocou milimetrového papier. A.– charakter dokumentácie; B.– detailný záber na skúmavky.

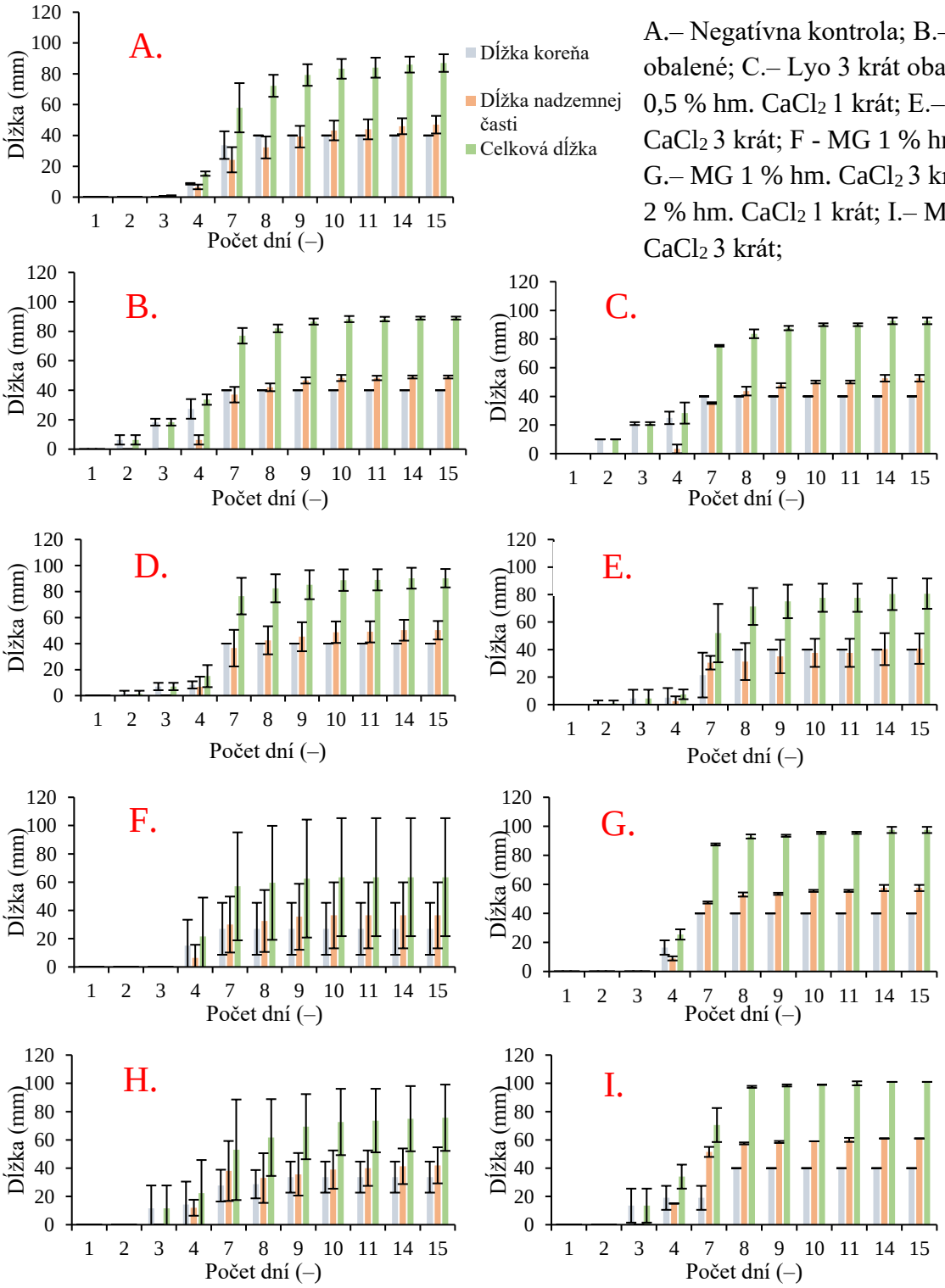
5.2 Príprava originálneho gélového inokulantu

Optimalizáciou čírosti bolo dosiahnuté zlepšenie viditeľnosti jednotlivých rastliniek v agare, a tým sa zlepšilo meranie ich rastu v čase. Experiment bol zopakovaný podľa predlohy minulého, rozdielom bol počet opakovaní pre každé ošetrenie a spôsob fotenia v priebehu. V minulom experimente bol problém s meraním dĺžky koreňa po presiahnutí určitej dĺžky, pretože stojan, v ktorom boli skúmavky fotené nebol priehľadný. Pre každý navrhnutý bioinokulant bola vykonaná analýza dát a zobrazená v grafoch na *Obrázok 12, Obrázok 13 a Obrázok 14.*



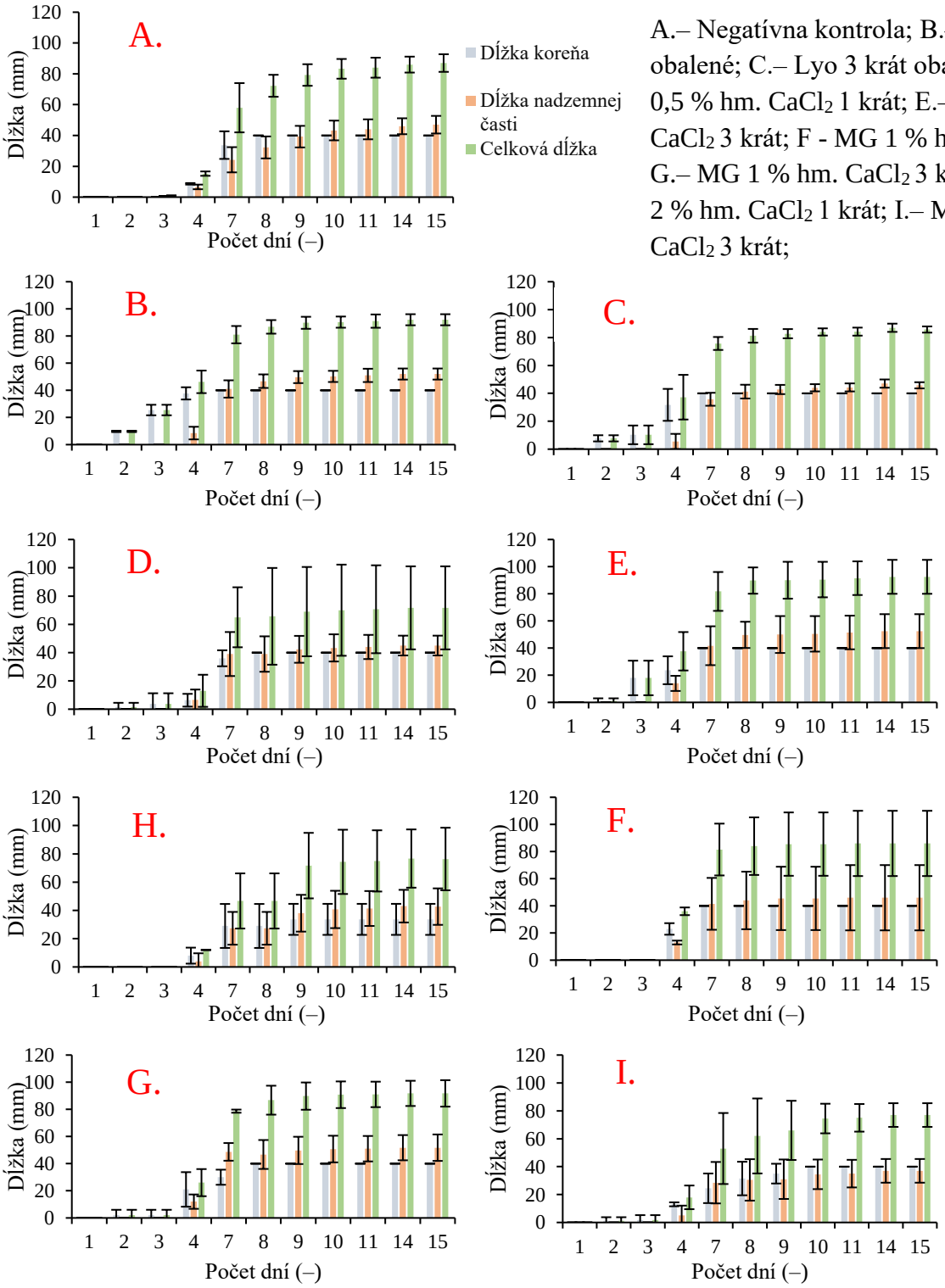
A.– Negatívna kontrola; B.– Lyo 1 krát obalené; C.– Lyo 3 krát obalené; D.– MG 0,5 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; E.– MG 0,5 % hm. $CaCl_2$ 3 krát; F - MG 1 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; G.– MG 1 % hm. $CaCl_2$ 3 krát; H.– MG 2 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; I.– MG 2 % hm. $CaCl_2$ 3 krát;

Obrázok 12: Grafy prírastkov rastlín v priebehu experimentu pre rôzne postupy inokulácie (kmeň CCM 289)



A.– Negatívna kontrola; B.– Lyo 1 krát obalené; C.– Lyo 3 krát obalené; D.– MG 0,5 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; E.– MG 0,5 % hm. $CaCl_2$ 3 krát; F - MG 1 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; G.– MG 1 % hm. $CaCl_2$ 3 krát; H.– MG 2 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; I.– MG 2 % hm. $CaCl_2$ 3 krát;

Obrázok 13: Grafy prírastkov rastlín v priebehu experimentu pre rôzne postupy inokulácie (kmeň DSM 87)



A.– Negatívna kontrola; B.– Lyo 1 krát obalené; C.– Lyo 3 krát obalené; D.– MG 0,5 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; E.– MG 0,5 % hm. $CaCl_2$ 3 krát; F - MG 1 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; G.– MG 1 % hm. $CaCl_2$ 3 krát; H.– MG 2 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; I.– MG 2 % hm. $CaCl_2$ 3 krát;

Obrázok 14: Grafy prírastkov rastlín v priebehu experimentu pre rôzne postupy inokulácie (kmeň DSM 720)

Cieľom experimentu, ktorého výsledky sú zobrazené na predošlých obrázkoch, bolo porovnať účinky jednotlivých variant bioinokulantov na klíčivosť semienok šalátu. Hlavným sledovaným parametrom boli rozdiely medzi negatívnou kontrolou, bioinokulantami pripravenými mokrou cestou a bioinokulantami pripravenými z lyofilizovaných kultúr. Všetky pripravené bioinokulanty boli pripravené s použitím všetkých kmeňov *A. vinelandii*.

Každý bioinokulant bol pripravený v štyroch opakovaniach a priemerné hodnoty boli zaznamenané do grafov. Pre každú priemernú hodnotu bola stanovená smerodatná odchýlka. V niektorých prípadoch boli hodnoty smerodatných odchýliek príliš vysoké pre správnu interpretáciu, a preto boli odľahlé hodnoty odstránené. Pri spracovaní dát bol zobrazený aj každodenný prírastok, ktorý je pripojený v *Príloha č.3*.

Ako inokulanty s pozitívnym účinkom boli stanovené tie, ktoré dosahovali podobných hodnôt ako negatívna kontrola. Predpokladom je, že požadovaný mechanizmus PGPR sa prejaví až po vyklíčení, avšak inokulácia je nutná pred zasadením semena, aby boli PGPR v požadovaný čas rastline dostupné. Nežiadúcim javom by bolo obmedzenie alebo zastavenie klíčenia po nanesení bioinokulantu. Preto boli výsledky klíčenia podobné negatívnej kontrole priaznivé. Bioinokulanty využívajúce lyofilizované kmene, dosahovali stabilných výsledkov s pomerne nízkou odchýlkou. Rastliny v negatívnej kontrole dosahovali na posledný (15.) deň experimentu celkovú dĺžku 87 ± 6 mm. V prípade lyofilizátov s jednou vrstvou bola dosiahnutá hodnota celkovej dĺžky v kmeni CCM 289 82 ± 12 mm. Kmeň DSM 87 dosahoval hodnoty 89 ± 1 mm, a v prípade kmena DSM 720 bola výsledná hodnota 92 ± 4 mm. Porovnateľne priaznivé výsledky dosahovali aj s tromi vrstvami lyofilizovaných kultúr. Výhodou viacnásobného vrstvenia bioinokulantu je zvýšenie počtu PGPR, ktoré sú pre rastlinu dostupné v neskorších štádiách rastu. Kmeň CCM 289 dosiahol výslednú hodnotu celkovej dĺžky 88 ± 2 mm, kmeň DSM 87 hodnotu 93 ± 2 mm a kmeň DSM 720 hodnotu 86 ± 2 mm. Z lyofilizovaných kultúr sa javia všetky varianty ako vhodné bioinokulanty. Je to hlavne z dôvodu neprítomnosti chloridu vápenatého, ktorý má negatívny efekt na klíčivosť semien vplyvom osmotického stresu. Je taktiež nejasné do akej miery sa lyofilizované kmene po resuspendovaní vo vode boli schopné regenerovať do pôvodného stavu pred lyofilizáciou. Zrejmým výsledkov však zostáva skutočnosť, že lyofilizované kmene klíčivosti semienok hlávkového šalátu nebránia, avšak použitie lyofilizátov je v súčasnosti stále ekonomicky neefektívne, a preto je pre masovú výrobu vhodnejšie použitie čerstvých kultúr aj keď taktiež disponujú určitými nevýhodami. Potenciálnym riešením sa javí metóda sprejového sušenia, ktorá je lacnejšia ako lyofilizácia, a súčasne je kultúra vystavená menšiemu množstvu soli v porovnaní s prípravou bioinokulantu mokrou cestou.

V prípade bioinokulantov pripravených mokrou cestou sa medzi všetkými kmeňmi javil ako stabilný variant 3 krát vrstvený gél pripravený s 1 % chloridom vápenatým. Kmeň CCM 289 dosiahol na posledný (15.) deň hodnotu celkovej dĺžky 87 ± 3 mm, kmeň DSM 87 hodnotu 81 ± 11 mm a kmeň DSM 720 hodnotu 93 ± 13 mm. V niektorých kmeňoch dosahovali rôzne varianty bioinokulantov priaznivé výsledky bez značnej súvislosti s ostatnými kmeňmi. Napríklad v prípade kmeňa CCM 289 bol vhodný ešte 1 krát obalená kultúra s použitím 1 % chloridu vápenatého. Celková dĺžka rastliny na posledný deň dosahovala hodnotu 94 ± 8 mm. Kmeň

DSM 87 dosahoval priaznivé výsledky pre 3 krát vrstvený gél s použitím 1 % hm. a aj 2 % hm. chloridu vápenatého. Pre koncentráciu $CaCl_2$ 1 % hm. bola výsledná hodnota 98 ± 2 mm a pre koncentráciu 2 % hm. bola hodnota celkovej dĺžky rastliny 101 ± 1 mm. V týchto dvoch prípadoch bolo potrebné odstrániť odľahlých hodnôt, ktorých dosahovali dve zo štyroch sledovaných rastliniek. Experiment prebiehal vo viacerých opakovaniach aby bolo možné nepriaznivé hodnoty do analýzy nezahrnúť. V kmeni DSM 720 dosahovali priaznivé výsledky taktiež tie vrstvené 1 krát a 3 krát s použitím chloridu vápenatého s koncentráciou 1 % hm.. Výsledná hodnota celkovej dĺžky pre jednu vrstvu gélu bola 86 ± 24 mm a pre tri vrstvy bola výsledná hodnota 92 ± 10 mm.

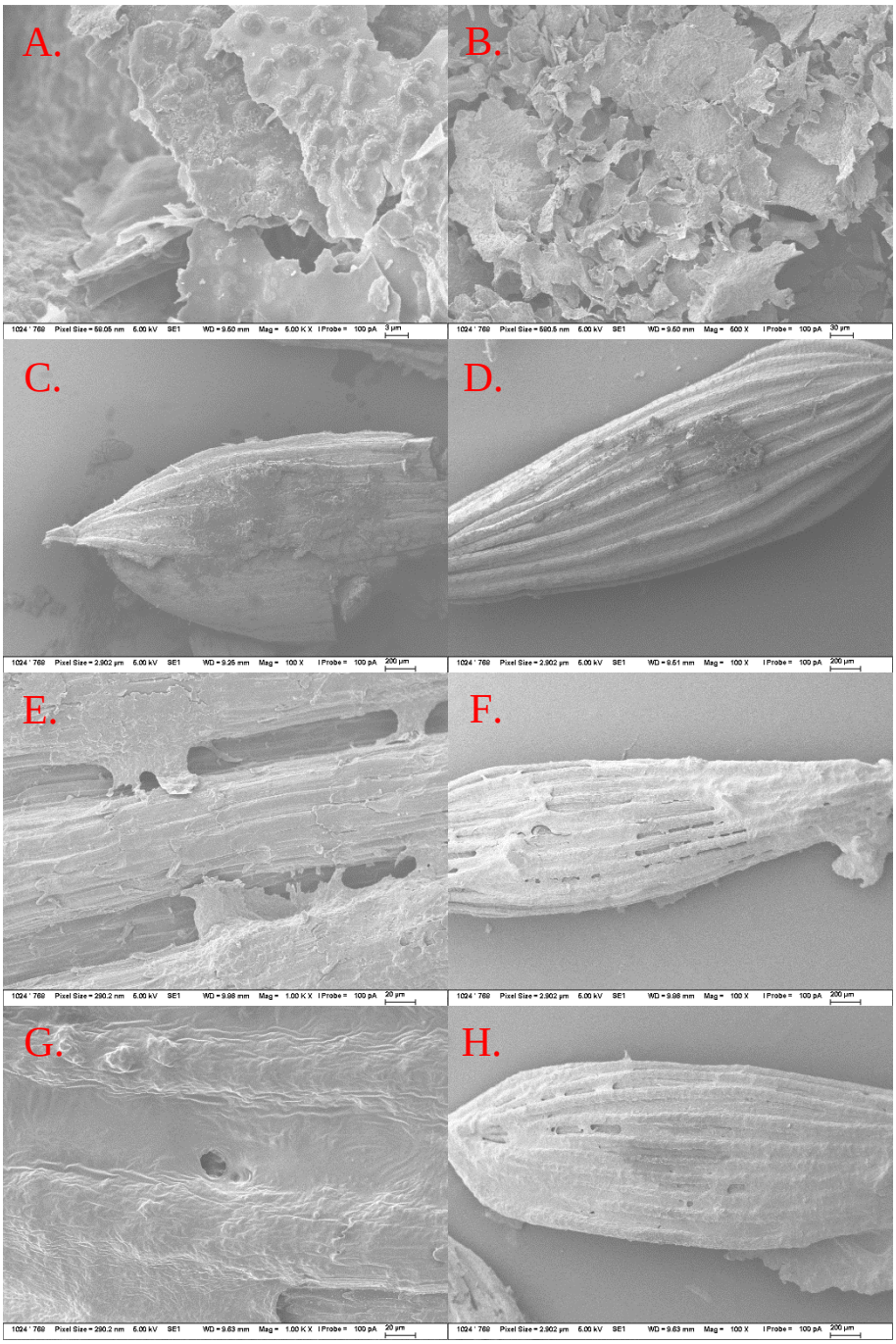
Najvhodnejším kmeňom po analýze sa javil kmeň DSM 720. Všetky inokulanty pripravené s týmto kmeňom mali za následok výslednú hodnotu celkovej dĺžky rastlín na konci experimentu (15. deň) cca 80 mm, čo je porovnateľná hodnota s tou v prípade negatívnej kontroly. Zároveň je dôležité spomenúť, že kmeň DSM 720 po kultivácii tvoril z hľadiska konzistencie najredšiu biomasu, a teda aj sieťovanie s chloridom vápenatým bolo najslabšie z pomedzi všetkých kmeňov. Charakterizácia gélov pripravených v experimente nebola vykonaná, ale už podľa zraku bolo viditeľné, že gély v kmeni DSM 720 nemali optimálnu konzistenciu. Pri práci s nižšími koncentráciami sieťovacieho činidla bol tento jav obzvlášť viditeľný. Lyofilizácia biomasy kmeňu DSM 720 taktiež nebola optimálna z dôvodu jej riedkej konzistencie v mokrom stave.

Pre prípravu bioinokulantou mokrou cestou sú vhodné kmene CCM 289 a DSM 87, pretože tvoria kvalitnú vrstvu gélu. Biomasa vzniknutá po kultivácii týchto kmeňov je konzistenčne vhodná a s chloridom vápenatým vhodne sieťuje. V minulých kapitolách bolo zistené, že vyššia koncentrácia chloridu vápenatého má negatívny vplyv na klíčenie semien. Preto je pozitívnym výsledkom skutočnosť, že príprava gélových vrstiev týchto kmeňov je možná aj s použitím nižších koncentrácií sieťovacieho činidla.

Napriek úprave dát je v značnej časti grafov pozorovaná veľká odchýlka. Hlavnou príčinou je práca s živými organizmami a skutočnosť, že nie vždy sú očakávané výsledky dosiahnuté. Vo väčšine meraní boli z výsledkov odstránené odľahlé hodnoty a aj napriek tomu boli hodnoty odchýliek vysoké. Pre ďalšiu prácu a spoľahlivejšie dáta by bolo do budúcnosti vhodné používať väčšie množstvo rastliniek.

5.3 Povrchová morfologická analýza obalených semienok

Pomocou rastrovacej elektrónovej mikroskopie bola zobrazená štruktúra povrchových vrstiev bioinokulantov priamo na povrchu semena šalátu (*Obrázok 15*). V prípade bioinokulantov pripravených mokrou cestou bola na povrchu semien pozorovaná súvislá vrstva gélu, ktorá obalila celé semeno. Naopak v bioinokulantoch s lyofilizovanými kultúrami súvislá vrstva nevznikla. Štruktúra lyofilizovaných kultúr je nepravidelná a nerovnomerne priestorovo rozložená. V príprave tohto typu bioinokulantu spočíval postup v namáčaní semien do suspenzie lyofilizovaných kultúr, avšak tieto kultúry neboli vždy ideálne rozpustené vo vode, tým pádom sa na semená kultúra v priebehu namáčania nedostala. Pre budúce experimenty je nevyhnutná optimalizácia postupu prípravy bioinokulantu založeného na lyofilizovaných kultúrach.

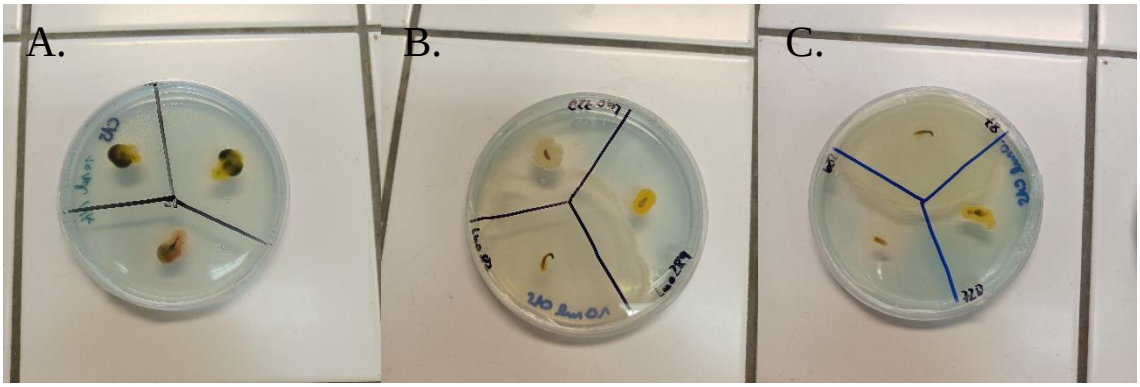


Obrázok 15: Zobrazenie vrstiev bioinokulantov na povrchu semien šalátu. A.– lyofilizovaná kultúra DSM 87 5000krát zv.; B.– lyofilizovaná kultúra DSM 87 5000krát zv.; C.– 1 vrstva inokulantu z lyofilizovaného kmeňa DSM 87 100krát zv.; D.– 3 vrstvy inokulantu z lyofilizovaného kmeňa DSM 87 100krát zv; E.– 1 vrstva inokulantu z mokrého gélu 1000krát zv.; F.– 1 vrstva inokulantu z mokrého gélu 100krát zv.; G.– 3 vrstvy inokulantu z mokrého gélu 1000krát zv.; H.– 3 vrstvy inokulantu z mokrého gélu 100krát zv..

5.4 Zhodnotenie PGPR efektov *A. vinelandii* po aplikácii na semená

5.4.1 Analýza produkcie siderofórov

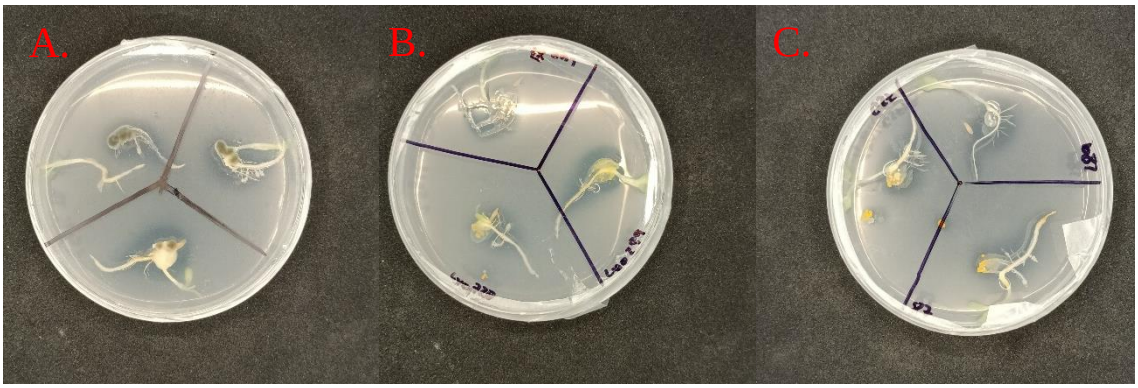
Produkcia siderofórov bola analyzovaná kvalitatívne na agarových platniach. Ich prítomnosť bola stanovená odfarbovaním média obsahujúceho Chróm Azurol S, ktorý bol zložkou gélového média. V experimente išlo o overenie PGPR efektu baktérií po aplikácii na modelovú rastlinu. V médiu v priebehu experimentu dochádzalo ku vzniku odfarbených zón v okolí semien, na ktorých bol nanesený bioinokulant. Pozorovanie prebehlo aj s negatívnou kontrolou, podľa ktorej bola zhodnotená miera tvorby. V prípade negatívnej kontroly je viditeľná značná kontaminácia mikroorganizmami. Zároveň táto kontaminácia dáva určitý falošne pozitívny výsledok. Na obrázkoch (*Obrázok 16*) s použitými bioinokulantmi je viditeľné približne rovnaké sfarbenie biomasy vo všetkých opakovaniach. Taktiež sú pozorovateľné vzniknuté odfarbené zóny v tuhom médiu, čím bola dokázaná prítomnosť vyprodukovaných siderofórov.



Obrázok 16: Agarové platne s médiom pre analýzu produkcie siderofórov. A.– semená bez ošetrenia inokulantom (negatívna kontrola); B.– semená ošetrené inokulantmi z lyofilizovaných kultúr; C.– semená ošetrené inokulantmi pripravenými mokrou cestou

5.4.2 Analýza produkcie rozpustných fosfátov

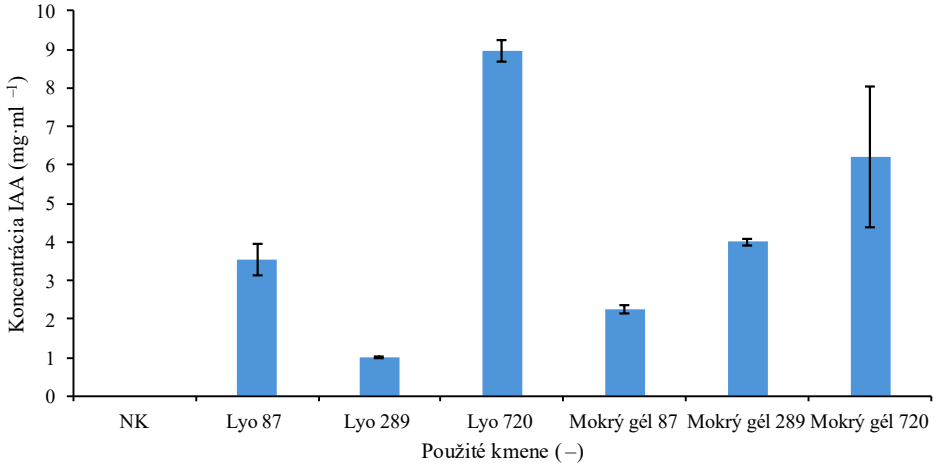
Podobne ako v prípade analýzy vznikajúcich siderofórov boli pripravené platne s médiom pre analýzu tvorby rozpustných fosfátov. Toto médium malo po sterilizovaní a stuhnutí v miske biele hmlisté sfarbenie. Postupným vznikom rozpustných foriem fosfátov sa médium vyčírilo v blízkosti semien. Na obrázku nižšie (*Obrázok 17*) je vidieť vzniknuté číre zóny v okolí všetkých semien, a to aj v prípade negatívnej kontroly. So semienkami sa nepracovalo sterilne, takže je pravdepodobná kontaminácia mikroorganizmami, ktorá spôsobila túto skutočnosť.



Obrázok 17: Agarové platne s médiom pre analýzu produkcie rozpustných fosfátov. A.– semená bez ošetrenia inokulantom (negatívna kontrola); B.– semená ošetrené inokulantmi z lyofilizovaných kultúr; C.– semená ošetrené inokulantmi pripravenými mokrou cestou

5.4.3 Meranie množstva kyseliny indoloctovej

Vzorky pre meranie množstva kyseliny indoloctovej boli odobrané priamo z platní použitých pre analýzu siderofórov a rozpustných fosfátov. Meranie prebiehalo podľa predošlého postupu v kapitole *4.4.5*, a zo vzniknutého absorpčného spektra boli vybrané hodnoty absorbancií pri vlnovej dĺžke 530 nm, kde dosahuje kyselina indoloctová svojho absorpčného maxima. Tieto hodnoty boli stanovené pre negatívnu kontrolu a pre všetky pripravené bioinokulanty (*Obrázok 18*). Najvyššie hodnoty dosahoval v lyofilizátoch a aj v mokrých géloch kmeň DSM 720.



Obrázok 18: Graf zobrazenia koncentrácie kyseliny indoloctovej

6 Záver

V procese vypracovania tejto práce boli pripravené rôzne varianty gélového bioinokulantu a bioinokulantu využívajúceho lyofilizovaných kmeňov. Cieľom bolo pripraviť bioinokulant, ktorý by nebránil rastline v klíčení, a súčasne by jej sprístupňoval PGPR v neskorších fázach rastu. Pre porovnanie bolo pripravených viacero variant bioinokulantov. V úvodnej optimalizačnej fáze práce bolo zistené, že pre stanovenie správnych zložiek bioinokulantu bude potrebné sledovať a dokumentovať každú rastlinu zvlášť. V úvodných experimentoch v Petriho miskách nebolo možné sledovať rozdiely medzi jednotlivými ošetreniami, z dôvodu použitia nadmerného množstva rastlín v každej Petriho miske. Taktiež pri experimente v pôde nebolo možné pozorovať rozdiely v koreňovom systéme hlávkového šalátu.

Prínosným experimentom v optimalizačnej fáze bolo testovanie vplyvu koncentrácie chloridu vápenatého na klíčenie semien. Chlorid vápenatý v koncentrácii 2 % hm. vykazoval jasne negatívne účinky na klíčivosť modelovej rastliny spôsobené osmotickým stresom. V kapitole *5.1.3.1* bol zistený priaznivý trend v prípade znižujúcej sa koncentrácie sieťovacieho činidla na klíčivosť rastlín. Koncentrácia 0,5 % hm. nevykazovala takmer žiadny inhibičný efekt na semená.

Nevýhodou tohto zistenia bol vplyv na charakter vznikajúceho gélu pri použití nižších koncentrácií chloridu vápenatého, obzvlášť na textúru a mechanické vlastnosti. Kmene CCM 289 a DSM 87 boli schopné tvoriť stabilný gél aj s použitím koncentrácie 0,5 % hm., avšak kmeň DSM 720 nie. Bolo to vplyvom konzistencie biomasy, ktorú jednotlivé kmene v procese kultivácie tvorili. Gél s enkapsulovanými bunkami kmeňov CCM 289 a DSM 87 bol na pohľad hustý a viskózny, na rozdiel od kmeňu DSM 720, ktorý produkoval redšiu biomasu oproti predošlým dvom kmeňom. Charakterizácia vznikajúcej biomasy a vznikajúcich gélov však nebola predmetom tejto práce, a tieto závery vychádzajú iba z pozorovaní počas prípravy bioinokulantov.

Hlavným experimentom v práci bola príprava a aplikácia bioinokulantov na semená modelovej rastliny. Optimalizáciou bolo použitie sterilizovaného agaru ako rastovej matrice, čím bolo možné dokumentovať a kvantifikovať rast. Nevýhodou bola výška vrstvy agaru v skúmavkách, do ktorých boli semená umiestnené, pretože korene po istej dobe dorástli až na dno skúmaviek a začali sa zamotávať, čím nebolo možné odčítať hodnotu dĺžky. Tento jav bol eliminovaný stanovením limitnej hodnoty dĺžky koreňa (40 mm), ktorá bola zhodná s výškou vrstvy agaru v skúmavke. Dosiahnutím tejto hodnoty bola stanovená rýchlosť rozvoja koreňového systému. Po dosiahnutí hodnoty 40 mm sa už dĺžka koreňa ďalej nesledovala, a dôraz bol potom kladený už len na dĺžku nadzemnej časti.

Najvhodnejšími pripravenými bioinokulantmi sa stabilne v priebehu experimentu javili tie, využívajúce lyofilizované kmene. Avšak po vyhodnotení snímok z elektrónového mikroskopu bolo zistené, že použitím týchto bioinokulantov semienka neboli obalené po celom povrchu, a teda vplyv mikroorganizmov mohol byť porovnateľný s negatívnou kontrolou. V nadväzujúcich experimentoch by bolo vhodné stanoviť celkové množstvo naneseného inokulantu (napr. vážením), aby bolo overené, či je nanesené množstvo dostatočné napriek necelistvej vrstve na semene. Väčší dôraz bol kladený na bioinokulanty pripravené mokrou cestou. Predpokladom bola slabšia klíčivosť semien, ktoré boli pripravené s použitím chloridu vápenatého s koncentráciou 2 % hm..

Táto skutočnosť bola preukázateľne dokázaná len u kmeňa CCM 289. V ostatných kmeňoch sa aj tieto bioinokulanty javili ako vhodné pre použitie. Nie je možné jasne dokázať vplyv vyššej koncentrácie chloridu vápenatého v pripravených bioinokulantoch na klíčivosť semien. Na druhej strane je možné, že PGP účinok *A. vinelandii* je tak významný, že úplne eliminuje negatívny efekt sieťovacieho činidla. Toto tvrdenie však je iba hypotéza a jej overenie by mohlo byť predmetom budúcich prác.

Na záver experimentov boli overené PGPR efekty použitých kmeňov po ich aplikácii na semená modelovej rastliny. Meranie prebehlo z dôvodu overenia, či sú kmene *A. vinelandii* schopné produkovať sideroféry, rozpúšťať fosfáty a produkovať kyselinu indoloctovú aj vtedy, keď sú súčasťou bioinokulantu aplikovaného na semeno rastliny. Produkcia siderofórov bola dokázaná vo všetkých bioinokulantov a súčasne bolo dokázané aj rozpúšťanie fosfátov. V prípade kyseliny indoloctovej dosahoval najlepšie výsledky kmeň DSM 720 v mokrej aj lyofilizovanej podobe.

Práca vyžadovala viaceré optimalizačné experimenty, kým bolo možné dosiahnuť požadovaných výsledkov. Pre budúce práce bol stanovený podklad ako napr. sledovať rast rastlín vo vhodnom médiu. Taktiež by bolo vhodné do budúcna vykonať analýzu pripravených gélových inokulantov. Príprava bioinokulantov využívajúcich lyofilizované kmene taktiež vyžaduje optimalizáciu pre budúce práce, pretože lyofilizácia je ekonomicky náročný proces, a príprava lyofilizovaných kmeňov zaberá veľa času. Vhodným riešením by mohlo byť sprejové sušenie ako lacnejšia alternatíva.

7 Zoznam použitej literatúry

[1] *The Rhizosphere Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. Online. 2. CRC Press, 2007. Dostupné z: https://doi.org/10.1201/9781420005585. [cit. 2024-12-05].

[2] BERTIN, Cecile; YANG, Xiaohan a WESTON, Leslie A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. Online. *Plant and Soil*. 2003, roč. 256, č. 1, s. 67-83. ISSN 0032-079X. Dostupné z: https://doi.org/10.1023/A:1026290508166. [cit. 2024-12-05].

[3] PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L. a ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. Online. 2003, roč. 26, č. 2, s. 189-199. ISSN 0140-7791. Dostupné z: https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00956.x. [cit. 2024-12-05].

[4] ANTOUN, Hani a PRÉVOST, Danielle. Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Online. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. 2006, s. 1-38. ISBN 1-4020-4002-4. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7_1. [cit. 2024-12-20].

[5] GLICK, Bernard R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Online. *Canadian Journal of Microbiology*. 1995, roč. 41, č. 2, s. 109-117. ISSN 0008-4166. Dostupné z: https://doi.org/10.1139/m95-015. [cit. 2024-12-20].

[6] SIDDIKEE, Md. Ashaduzzaman; CHAUHAN, Puneet. S.; ANANDHAM, R.; HAN, Gwang-Hyun a SA, Tongmin. Isolation, Characterization, and Use for Plant Growth Promotion Under Salt Stress, of ACC Deaminase-Producing Halotolerant Bacteria Derived from Coastal Soil. Online. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010, roč. 20, č. 11, s. 1577-1584. ISSN 1017-7825. Dostupné z: https://doi.org/10.4014/jmb.1007.07011. [cit. 2024-12-20].

[7] VESSEY, J. Kevin. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Online. *Plant and Soil*. 2003, roč. 255, č. 2, s. 571-586. ISSN 0032079X. Dostupné z: https://doi.org/10.1023/A:1026037216893. [cit. 2024-12-20].

[8] GLICK, Bernard R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Online. *Microbiological Research*. 2014, roč. 169, č. 1, s. 30-39. ISSN 09445013. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009. [cit. 2024-12-20].

[9] GOVINDASAMY, Venkadasamy; SENTHILKUMAR, Murugesan; MAGHESHWARAN, Vellaichamy; KUMAR, Upendra; BOSE, Pranita et al. Bacillus and Paenibacillus spp: Potential PGPR for Sustainable Agriculture. Online. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Microbiology Monographs. 2010, s. 333-364. ISBN 978-3-642-13611-5. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2_15. [cit. 2024-12-20].

[10] AERON, Abhinav; KUMAR, Sandeep; PANDEY, Piyush a MAHESHWARI, D. K. Emerging Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agrobiology. Online. *Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems*. 2011, s. 1-36. ISBN 978-3-642-18356-0. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_1. [cit. 2024-12-20].

[11] SHAILENDRA SINGH, Govind Gupta. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. Online. 2015, roč. 07, č. 02. ISSN 19485948. Dostupné z: https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000188. [cit. 2024-12-29].

[12] GUPTA, Govind a SINGH PARIHAR, Shailendra. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. Online. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. 2015, roč. 07, č. 02. ISSN 19485948. Dostupné z: https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000188. [cit. 2024-10-28].

[13] GOSWAMI, Dweipayan; THAKKER, Janki N.; DHANDHUKIA, Pinakin C. a TEJADA MORAL, Manuel. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. Online. 2016, roč. 2, č. 1. ISSN 2331-1932. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500. [cit. 2024-10-28].

[14] *Enterobacter: Role in Plant Growth Promotion*. Online. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. ISBN 978-3-642-20332-9. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9_8. [cit. 2024-12-20].

[15] *Plant–bacteria interactions: Strategies and techniques to promote plant growth*. Online. Viley VCH, 2008. ISBN 978-3-527-31901-5. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/9783527621989.ch3. [cit. 2024-12-20].

[16] VASSILEV, Nikolay; VASSILEVA, Maria; FENICE, Massimiliano a FEDERICI, Federico. Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. Online. *Bioresource Technology*. 2001, roč. 79, č. 3, s. 263-271. ISSN 09608524. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00017-7. [cit. 2024-10-28].

[17] JHA, Chaitanya Kumar; PATEL, Baldev a SARAF, Meenu. Stimulation of the growth of Jatropha curcas by the plant growth promoting bacterium Enterobacter cancerogenus MSA2. Online. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012, roč. 28, č. 3, s. 891-899. ISSN 0959-3993. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s11274-011-0886-0. [cit. 2024-12-21].

[18] GOSWAMI, Dweipayan; DHANDHUKIA, Pinakin; PATEL, Pranav a THAKKER, Janki N. Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in Arachis hypogea by Bacillus licheniformis A2. Online. *Microbiological Research*. 2014, roč. 169, č. 1, s. 66-75. ISSN 09445013. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.004. [cit. 2024-12-21].

[19] GOSWAMI, Dweipayan; PITHWA, Shweta; DHANDHUKIA, Pinakin a THAKKER, Janki N. Delineating Kocuria turfanensis 2M4 as a credible PGPR: a novel IAA-producing bacteria isolated from saline desert. Online. *Journal of Plant Interactions*. 2014, roč. 9, č. 1, s. 566-576. ISSN 1742-9145. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/17429145.2013.871650. [cit. 2024-12-21].

[20] Techniques to study microbial phytohormones. Online. In: *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem*. Springer Cham, 2015, s. 1-27. Dostupné z: https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-24654-3. [cit. 2024-12-21].

[21] RODRÍGUEZ, Hilda a FRAGA, Reynaldo. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Online. *Biotechnology Advances*. 1999, roč. 17, č. 4-5, s. 319-339. ISSN 07349750. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2. [cit. 2024-12-21].

[22] Soil bacteria and phytohormones for sustainable crop production. Online. In: *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem*. Springer Cham, 2015, s. 87-103. Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-13612-2_3. [cit. 2024-12-21].

[23] Potential of PGPR in agricultural innovations. Online. In: *Plant growth and health promoting bacteria*. Springer Berlin Heidelberg, 2010, s. 45-79. Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-13612-2_3. [cit. 2024-12-21].

[24] VESSEY, J. Kevin. Plant and Soil. Online. *Plant and Soil*. Roč. 255, č. 2, s. 571-586. ISSN 0032079X. Dostupné z: https://doi.org/10.1023/A:1026037216893. [cit. 2024-12-21].

[25] KANG, Bin Goo; KIM, Woo Taek; YUN, Hye Sup a CHANG, Soo Chul. Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. Online. *Plant Biotechnology Reports*. 2010, roč. 4, č. 3, s. 179-183. ISSN 1863-5466. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s11816-010-0136-1. [cit. 2024-12-21].

[26] *Phytohormones in Soils Microbial Production & Function*. Online. CRC Press, 2020. ISBN 9780367812256. Dostupné z: https://doi.org/10.1201/9780367812256. [cit. 2024-12-21].

[27] Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. Online. *E3 Journal of Agricultural Research and Development*. 2015, roč. vol.5, č. 2., s. 108-119. Dostupné z: https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=096831b7776955665b024c08148188736aa35635. [cit. 2024-12-21].

[28] KHOSO, Muneer Ahmed; WAGAN, Sindho; ALAM, Intikhab; HUSSAIN, Amjad; ALI, Qurban et al. Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant nutrition and root characteristics: Current perspective. Online. *Plant Stress*. 2024, roč.

11. ISSN 2667064X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100341. [cit. 2024-11-04].

[29] WONG, W. S.; TAN, S. N.; GE, L.; CHEN, X. a YONG, J. W. H. The Importance of Phytohormones and Microbes in Biofertilizers. Online. *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem*. Sustainable Development and Biodiversity. 2015, s. 105-158. ISBN 978-3-319-24652-9. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3_6. [cit. 2024-12-21].

[30] PAYNE, Shelley M. [25] Detection, isolation, and characterization of siderophores. Online. *Bacterial Pathogenesis Part A: Identification and Regulation of Virulence Factors*. Methods in Enzymology. 1994, s. 329-344. ISBN 9780121821364. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35151-1. [cit. 2024-12-21].

[31] HAAS, Dieter a DÉFAGO, Geneviève. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Online. *Nature Reviews Microbiology*. 2005, roč. 3, č. 4, s. 307-319. ISSN 1740-1526. Dostupné z: https://doi.org/10.1038/nrmicro1129. [cit. 2024-12-21].

[32] SHEN, Xuemei; HU, Hongbo; PENG, Huasong; WANG, Wei a ZHANG, Xuehong. Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in Pseudomonas. Online. *BMC Genomics*. 2013, roč. 14, č. 1. ISSN 1471-2164. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-271. [cit. 2024-12-21].

[33] DUFFY, Brion; SCHOUTEN, Alexander a RAAIJMAKERS, Jos M. P ATHOGEN S ELF -D EFENSE: Mechanisms to Counteract Microbial Antagonism. Online. *Annual Review of Phytopathology*. 2003, roč. 41, č. 1, s. 501-538. ISSN 0066-4286. Dostupné z: https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095606. [cit. 2024-11-05].

[34] MAKSIMOV, I. V.; ABIZGIL'DINA, R. R. a PUSENKOVA, L. I. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). Online. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011, roč. 47, č. 4, s. 333-345. ISSN 0003-6838. Dostupné z: https://doi.org/10.1134/S0003683811040090. [cit. 2024-11-05].

[35] LECLÈRE, Valérie; BÉCHET, Max; ADAM, Akram; GUEZ, Jean-Sébastien; WATHELET, Bernard et al. Mycosubtilin Overproduction by Bacillus subtilis BBG100 Enhances the Organism's Antagonistic and Biocontrol Activities. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, roč. 71, č. 8, s. 4577-4584. ISSN 0099-2240. Dostupné z: https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4577-4584.2005. [cit. 2024-12-21].

[36] COMPANT, Stéphane; DUFFY, Brion; NOWAK, Jerzy; CLÉMENT, Christophe a BARKA, Essaïd Ait. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, roč. 71, č. 9, s. 4951-4959. ISSN 0099-2240. Dostupné z: https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005. [cit. 2024-12-23].

[37] BUDI, S.W; VAN TUINEN, D; ARNOULD, C; DUMAS-GAUDOT, E; GIANINAZZI-PEARSON, V et al. Hydrolytic enzyme activity of Paenibacillus sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. Online. *Applied Soil Ecology*. 2000, roč. 15, č. 2, s. 191-199. ISSN 09291393. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00095-0. [cit. 2024-12-26].

[38] VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. a PIETERSE, C. M. J. SYSTEMIC RESISTANCE INDUCED BY RHIZOSPHERE BACTERIA. Online. *Annual Review of Phytopathology*. 1998, roč. 36, č. 1, s. 453-483. ISSN 0066-4286. Dostupné z: https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453. [cit. 2024-12-26].

[39] REEVES, Peter R. a CUNNEEN, Monica M. Biosynthesis of O-antigen chains and assembly. Online. *Microbial Glycobiology*. 2010, s. 319-335. ISBN 9780123745460. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374546-0.00018-3. [cit. 2024-12-26].

[40] VAN LOON, L.C. a BAKKER, P.A.H.M. Induced Systemic Resistance as a Mechanism of Disease Suppression by Rhizobacteria. Online. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. 2005, s. 39-66. ISBN 978-1-4020-4002-3. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7_2. [cit. 2024-12-26].

[41] THAKKER, Janki N.; PATEL, Samiksha a DHANDHUKIA, Pinakin C. Induction of Defense-Related Enzymes in Banana Plants Fusarium oxysporum f. sp. cubense: Effect of Live and Dead Pathogenic Strain of Fusarium oxysporum f. sp. cubense. Online. *ISRN Biotechnology*. 2013, roč. 2013, s. 1-6. ISSN 2090-9403. Dostupné z: https://doi.org/10.5402/2013/601303. [cit. 2024-12-26].

[42] GUPTA, Anmol; MISHRA, Richa; RAI, Smita; BANO, Ambreen; PATHAK, Neelam et al. Mechanistic Insights of Plant Growth Promoting Bacteria Mediated Drought and Salt Stress Tolerance in Plants for Sustainable Agriculture. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 23, č. 7. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms23073741. [cit. 2024-12-26].

[43] LOBO, Constanza Belén; JUÁREZ TOMÁS, María Silvina; VIRUEL, Emilce; FERRERO, Marcela Alejandra a LUCCA, María Ester. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. Online. *Microbiological Research*. 2019, roč. 219, s. 12-25. ISSN 09445013. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012. [cit. 2024-12-26].

[44] BASHAN, Yoav; DE-BASHAN, Luz E.; PRABHU, S. R. a HERNANDEZ, Juan-Pablo. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). Online. *Plant and Soil*. 2014, roč. 378, č. 1-2, s. 1-33. ISSN 0032-079X. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x. [cit. 2024-12-26].

[45] BASHAN, Y. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. Online. *Soil Biology and Biochemistry*. 1986, roč. 18, č. 3, s. 297-301. ISSN 00380717. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0038-0717(86)90064-7. [cit. 2024-12-26].

[46] BASHAN, Yoav. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Online. *Biotechnology Advances*. 1998, roč. 16, č. 4, s. 729-770. ISSN 07349750. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0734-9750(98)00003-2. [cit. 2024-12-26].

[47] STEPHENS, J.H.G a RASK, H.M. Inoculant production and formulation. Online. *Field Crops Research*. 2000, roč. 65, č. 2-3, s. 249-258. ISSN 03784290. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00090-8. [cit. 2024-12-26].

[48] DATE, R. A. Advances in inoculant technology: a brief review. Online. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 2001, roč. 41, č. 3. ISSN 0816-1089. Dostupné z: https://doi.org/10.1071/EA00006. [cit. 2024-12-26].

[49] CATROUX, Gérard; HARTMANN, Alain a REVELLIN, Cécile. Online. *Plant and Soil*. Roč. 230, č. 1, s. 21-30. ISSN 0032079X. Dostupné z: https://doi.org/10.1023/A:1004777115628. [cit. 2024-12-26].

[50] DEAKER, R. Legume seed inoculation technology?a review. Online. *Soil Biology and Biochemistry*. 2004, roč. 36, č. 8, s. 1275-1288. ISSN 00380717. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.009. [cit. 2024-12-26].

[51] Development and Evaluation of Liquid Inoculants. Online. In: *Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam*. ACIAR Proceedings, 2002, s. 52-66. Dostupné z: https://www.nhbs.com/inoculants-and-nitrogen-fixation-of-legumes-in-vietnam-book. [cit. 2024-12-29].

[52] TAURIAN, Tania; ANZUAY, María Soledad; ANGELINI, Jorge Guillermo; TONELLI, María Laura; LUDUEÑA, Liliana et al. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. Online. *Plant and Soil*. 2010, roč. 329, č. 1-2, s. 421-431. ISSN 0032-079X. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s11104-009-0168-x. [cit. 2024-12-29].

[53] HYNES, Russell K; JANS, Desirée C; BREMER, Eric; LUPWAYI, Newton Z; RICE, Wendell A et al. Rhizobium population dynamics in the pea rhizosphere of rhizobial inoculant strain applied in different formulations. Online. *Canadian Journal of Microbiology*. 2001, roč. 47, č. 7, s. 595-600. ISSN 0008-4166. Dostupné z: https://doi.org/10.1139/w01-047. [cit. 2024-12-29].

[54] CLAYTON, G. W.; RICE, W. A.; LUPWAYI, N. Z.; JOHNSTON, A. M.; LAFOND, G. P. et al. Inoculant formulation and fertilizer nitrogen effects on field pea: Crop yield and seed quality. Online. *Canadian Journal of Plant Science*. 2004, roč. 84,

č. 1, s. 89-96. ISSN 0008-4220. Dostupné z: https://doi.org/10.4141/P02-090. [cit. 2024-12-29].

[55] JOHN, Rojan P.; TYAGI, R.D.; BRAR, S.K.; SURAMPALLI, R.Y. a PRÉVOST, Danielle. Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. Online. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2010, roč. 31, č. 3, s. 211-226. ISSN 0738-8551. Dostupné z: https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513327. [cit. 2024-12-29].

[56] Online. In: *Alginates from algae.*. 6. WILEY-VCH Verlag GMBH & Co., 2006, s. 215-240. Dostupné z: https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20053218154. [cit. 2024-12-30].

[57] YABUR, Ricardo; BASHAN, Yoav a HERNÁNDEZ-CARMONA, Gustavo. Alginate from the macroalgae Sargassum sinicola as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. Online. *Journal of Applied Phycology*. 2007, roč. 19, č. 1, s. 43-53. ISSN 0921-8971. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10811-006-9109-8. [cit. 2024-12-30].

[58] VARAPRASAD, Kokkarachedu; JAYARAMUDU, Tippabattini; KANIKIREDDY, Vimala; TORO, Claudio a SADIKU, Emmanuel Rotimi. Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review. Online. *Carbohydrate Polymers*. 2020, roč. 236. ISSN 01448617. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116025. [cit. 2025-01-27].

[59] BASHAN, Yoav; HERNANDEZ, Juan-Pablo; LEYVA, Luis a BACILIO, Macario. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. Online. *Biology and Fertility of Soils*. 2002, roč. 35, č. 5, s. 359-368. ISSN 0178-2762. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00374-002-0481-5. [cit. 2024-12-30].

[60] ZOHAR-PEREZ, C.; RITTE, E.; CHERNIN, L.; CHET, I. a NUSSINOVITCH, A. Preservation of Chitinolytic Pantoae agglomerans in a Viable Form by Cellular Dried Alginate-Based Carriers. Online. *Biotechnology Progress*. 2002, roč. 18, č. 6, s. 1133-1140. ISSN 8756-7938. Dostupné z: https://doi.org/10.1021/bp025532t. [cit. 2024-12-30].

[61] TEONG, Siew Ping; CHENG, Ka Wai; ARMUGAM, Arunmozhiarasi; GAO, Shujun; CHAN, Shook Pui et al. Alginate-polyionene: a green and sustainable slow-release antimicrobial interpolymeric complex. Online. *European Polymer Journal*. 2025, roč. 225. ISSN 00143057. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2024.113705. [cit. 2025-01-27].

[62] YOUNG, Chiu-Chung; REKHA, P.D.; LAI, Wei-An a ARUN, A.B. Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. Online. *Biotechnology and Bioengineering*. 2006, roč. 95, č. 1, s. 76-83. ISSN 0006-3592. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/bit.20957. [cit. 2024-12-30].

[63] POYARD, S.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; MARTELET, C.; COSNIER, S.; LABBE, P. et al. A new method for the controlled immobilization of enzyme in inorganic gels (laponite) for amperometric glucose biosensing. Online. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 1996, roč. 33, č. 1-3, s. 44-49. ISSN 09254005. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0925-4005(96)01910-7. [cit. 2024-12-30].

[64] GHADIRI, M.; CHRZANOWSKI, W. a ROHANIZADEH, R. Biomedical applications of cationic clay minerals. Online. *RSC Advances*. 2015, roč. 5, č. 37, s. 29467-29481. ISSN 2046-2069. Dostupné z: https://doi.org/10.1039/C4RA16945J. [cit. 2024-12-30].

[65] DUNDIGALLA, Avinash; LIN-GIBSON, Sheng; FERREIRO, Vincent; MALWITZ, Matthew M. a SCHMIDT, Gudrun. Unusual Multilayered Structures in Poly(ethylene oxide)/Laponite Nanocomposite Films. Online. *Macromolecular Rapid Communications*. 2005, roč. 26, č. 3, s. 143-149. ISSN 1022-1336. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/marc.200400489. [cit. 2024-12-30].

[66] ZEBROWSKI, J; PRASAD, V; ZHANG, W; WALKER, L.M a WEITZ, D.A. Shake-gels: shear-induced gelation of laponite–PEO mixtures. Online. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2003, roč. 213, č. 2-3, s. 189-197. ISSN 09277757. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00512-5. [cit. 2024-12-30].

[67] SCHEXNAILDER, Patrick a SCHMIDT, Gudrun. Nanocomposite polymer hydrogels. Online. *Colloid and Polymer Science*. 2009, roč. 287, č. 1, s. 1-11. ISSN 0303-402X. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00396-008-1949-0. [cit. 2024-12-30].

[68] XAVIER, Ilungo J.; HOLLOWAY, Greg a LEGGETT, Mary. Development of Rhizobial Inoculant Formulations. Online. *Crop Management*. 2004, roč. 3, č. 1, s. 1-6. ISSN 15437833. Dostupné z: https://doi.org/10.1094/CM-2004-0301-06-RV. [cit. 2024-12-30].

[69] SATHISHKUMAR, A.; SAKTHIVEL, N.; SUBRAMANIAN, E. a RAJESH, P. Productivity of Field Crops as Influenced by Foliar Spray of Nutrients: A Review. Online. *Agricultural Reviews*. 2020, č. OF. ISSN 0976-0741. Dostupné z: https://doi.org/10.18805/ag.R-1991. [cit. 2025-02-03].

[70] HOSSAIN, Md Amzad; HOSSAIN, Md Summon a AKTER, Mahmuda. Challenges faced by plant growth-promoting bacteria in field-level applications and suggestions to overcome the barriers. Online. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2023, roč. 126. ISSN 08855765. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102029. [cit. 2025-02-03].

[71] SCHLAEPPI, Klaus a BULGARELLI, Davide. The Plant Microbiome at Work. Online. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*. 2015, roč. 28, č. 3, s. 212-217. ISSN

0894-0282. Dostupné z: https://doi.org/10.1094/MPMI-10-14-0334-FI. [cit. 2025-02-03].

[72] KUMARI, Rima a SINGH, Devendra Pratap. Nano-biofertilizer: An Emerging Eco-friendly Approach for Sustainable Agriculture. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 2020, roč. 90, č. 4, s. 733-741. ISSN 0369-8211. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s40011-019-01133-6. [cit. 2025-02-03].

[73] BERNABEU, Pamela Romina; GARCÍA, Sabrina Soledad; LÓPEZ, Ana Clara; VIO, Santiago Adolfo; CARRASCO, Natalia et al. Assessment of bacterial inoculant formulated with Paraburkholderia tropica to enhance wheat productivity. Online. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018, roč. 34, č. 6. ISSN 0959-3993. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s11274-018-2461-4. [cit. 2025-02-03].

[74] BEHL, Kannikka; JAISWAL, Pranita a PABBI, Sunil. Recent advances in microbial and nano-formulations for effective delivery and agriculture sustainability. Online. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2024, roč. 58. ISSN 18788181. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103180. [cit. 2025-02-09].

[75] XU, Weihui; WANG, Hengxu; LV, Zhihang; SHI, Yiran a WANG, Zhigang. Antifungal activity and functional components of cell-free supernatant from Bacillus amyloliquefaciens LZN01 inhibit Fusarium oxysporum f. sp. niveum growth. Online. 2019, roč. 33, č. 1, s. 1042-1052. ISSN 1310-2818. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1637279. [cit. 2025-02-09].

[76] AMBROSINI, Adriana a PASSAGLIA, Luciane M. P. Plant Growth–Promoting Bacteria (PGPB): Isolation and Screening of PGP Activities. Online. *Current Protocols in Plant Biology*. 2017, roč. 2, č. 3, s. 190-209. ISSN 2379-8068. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/pb.20054. [cit. 2025-04-19].

[77] MOHAMED, Abdallah E.; NESSIM, Maher Georg; ABOU-EL-SEOUD, Islam Ibrahim; DARWISH, Khaled Mohamed a SHAMSELDIN, Abdelaal. Isolation and selection of highly effective phosphate solubilizing bacterial strains to promote wheat growth in Egyptian calcareous soils. Online. *Bulletin of the National Research Centre*. 2019, roč. 43, č. 1. ISSN 2522-8307. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/s42269-019-0212-9. [cit. 2025-05-22].

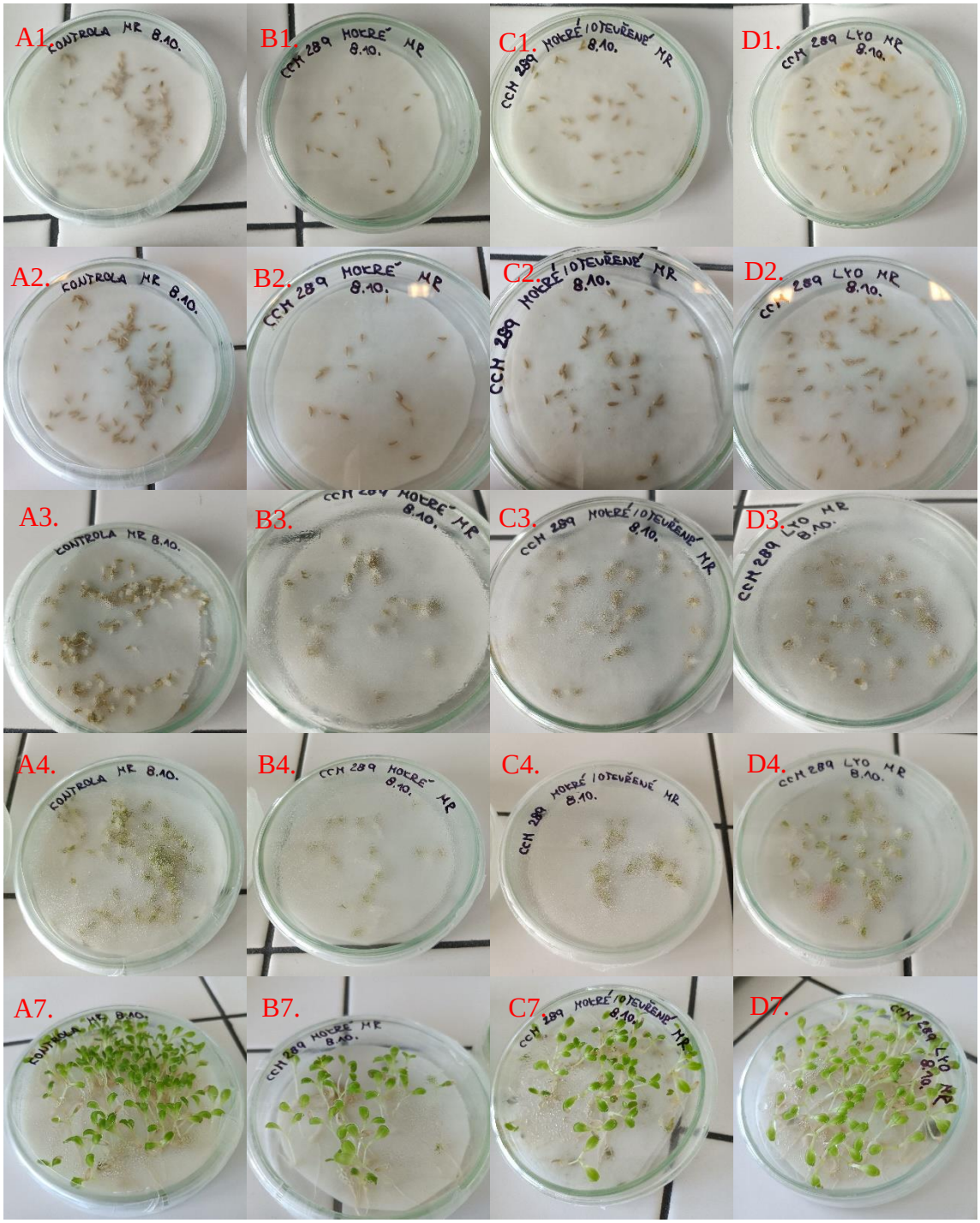
[78] SÚKENÍK, Martin. *Hydrogelové nosiče mikroorganismů v moderních environmentálních aplikacích*. Online, Bakalárska práca, vedoucí doc. Ing. Petr Sedláček PhD. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta Chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, 2021. Dostupné z: https://www.vut.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=231887. [cit. 2025-05-20].

8 Zoznam použitých skratiek

°C – stupeň Celzia
atď. – a tak ďalej
A. vinelandii – Azotobacter vinelandii
AZOX – azoxystrobín
BNF – *biological nitrogen fixation*
bv. – *biological variety*
cca – circa
CCM – *Czech collection of microorganisms*
CMCS – karboxymethyl chitosan
č. – číslo
DSM – *German collection of microorganisms*
DSMZ – *German collection of microorganisms and cell cultures GmbH*
EC – *electrical conductivity*
g - gram
GA3 – kyselina giberelová
hPa - hektopascal
IAA – kyselina indoloctová
ISR – indukovaná systematická rezistencia
kDa – kilodalton
kV - kilovolt
Lap – laponit
mg - miligram
min - minúta
µl – mikroliter
ml - mililiter
mm – milimeter
mM – milimolárny
nm - nanometer
MPa – megapascal
MSN – mezospórový oxid kremičitý
PEO – polyetylén oxid
PGPR – *plant growth-promoting rhizobacteria*
PGPB – *plant growth-promoting bacteria*
pH – vodíkový exponent
PSB – *phosphate-solubilizing bacteria*
RCF – *relative centrifugal force*
sp. – *species*
tzv – takzvane
zv. – zväčšené

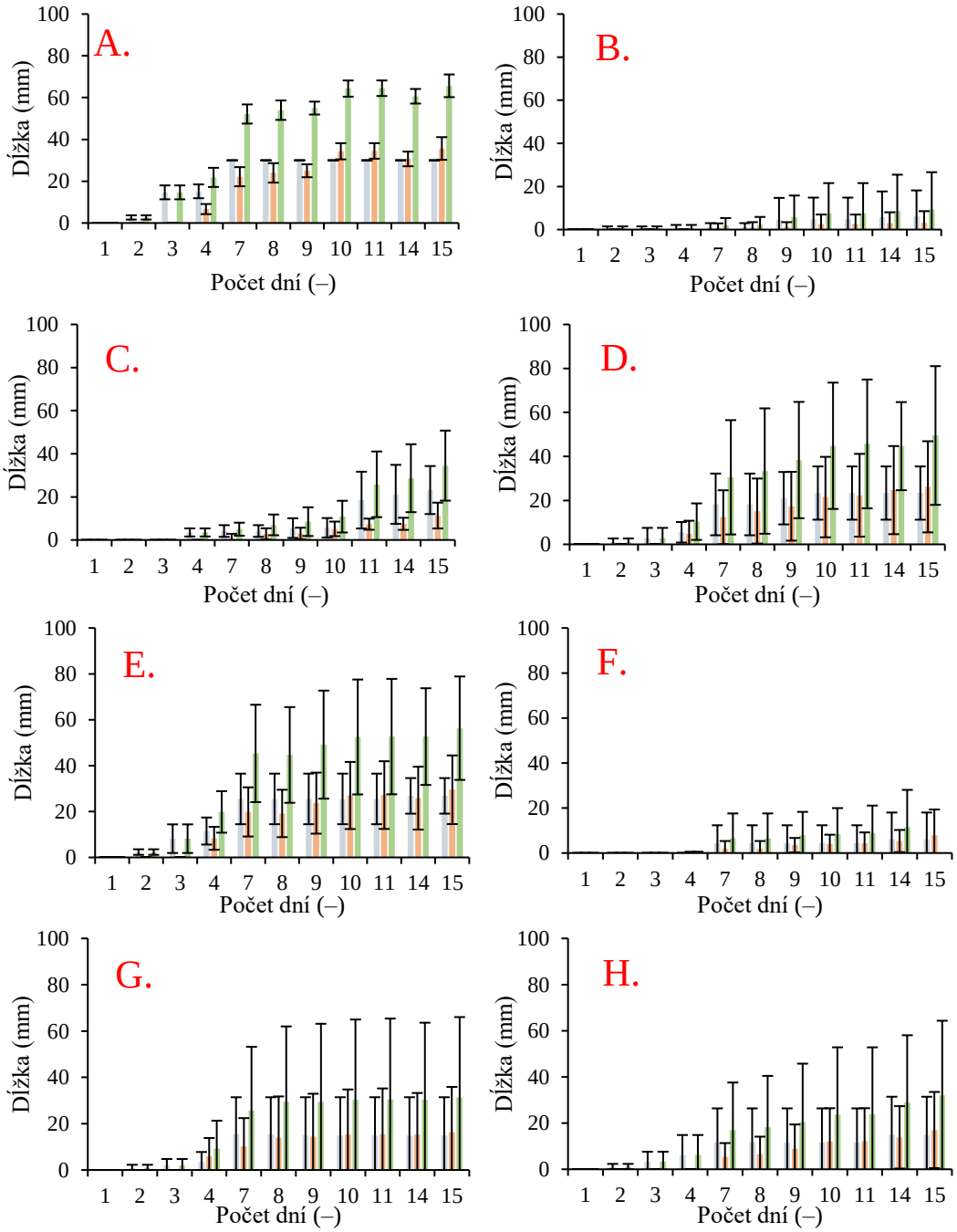
9 Zoznam príloh

Príloha č.1

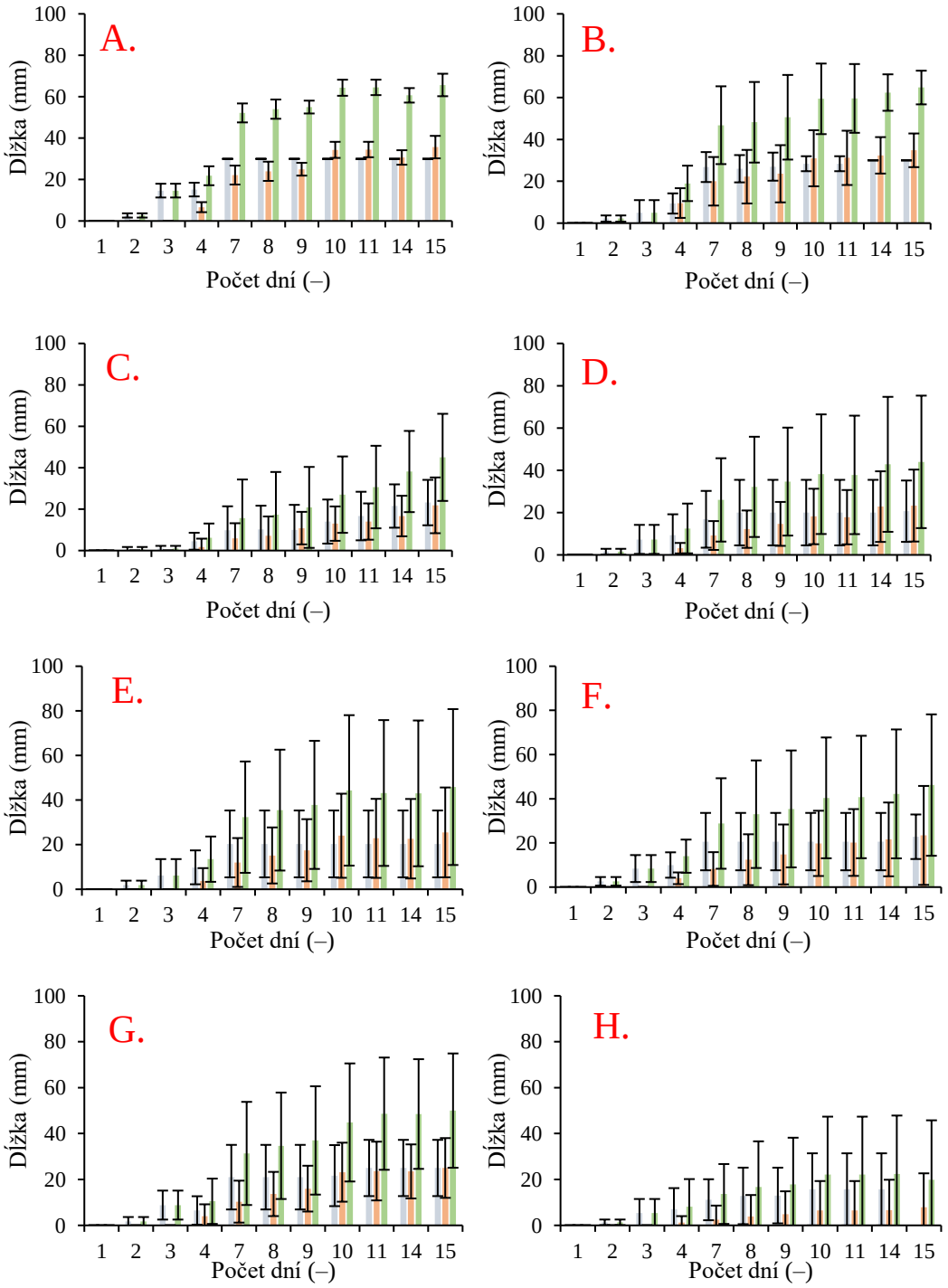


Obrázok 19: Časový priebeh klíčenia semien na Petriho miskách. A1.-A7.– negatívna kontrola v priebehu 7 dní; B1.-B7.– inokulant mokrou cestou v priebehu 7 dní; C1.-C7.– inokulant pripravený mokrou cestou (kontaminovaný) v priebehu 7 dní; D1.-D7.– inokulant z lyofilizovaných kultúr v priebehu 7 dní

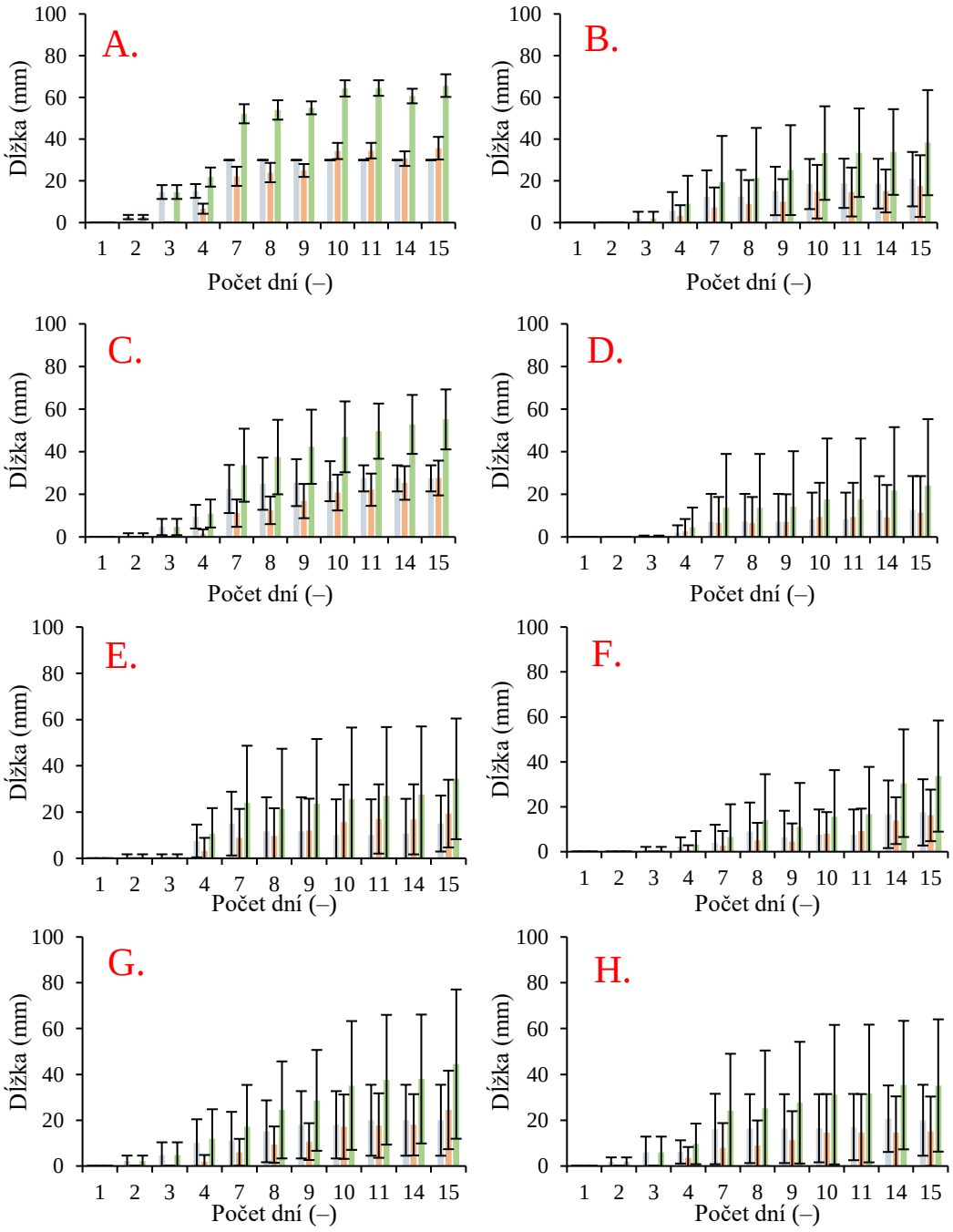
Príloha č.2



Obrázok 20: Kmeň CCM 289. A.– negatívna kontrola; B.– semienko obalené čistou kultúrou; C.– 1 krát obalené lyofilizátmi; D.– 3 krát obalené lyofilizátmi; E.– 1 krát obalené mokrým gélom s $CaCl_2$ 2 % hm.; F.– 3 krát obalené mokrým gélom s $CaCl_2$ 2 % hm.; G.– 1 krát obalené mokrým gélom s $CaCl_2$ 1 % hm.; H.– 3 krát obalené mokrým gélom s $CaCl_2$ 1 % hm..

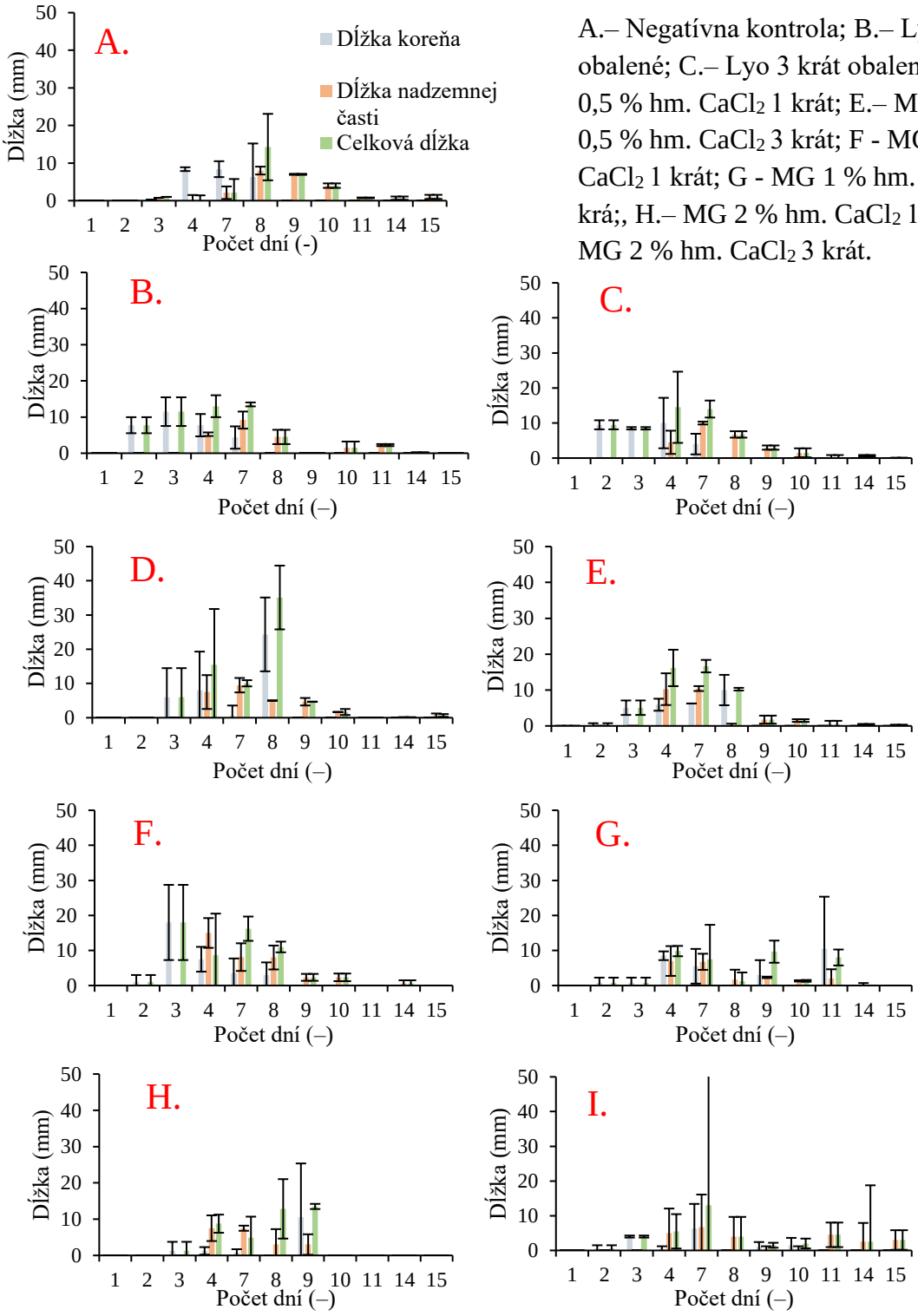


Obrázok 21: Kmeň DSM 87. A.– negatívna kontrola; B.– semienko obalené čistou kultúrou; C.– 1 krát obalené lyofilizátmi; D.– 3 krát obalené lyofilizátmi; E.– 1 krát obalené mokrým gélom s CaCl2 2 % hm.; F.– 3 krát obalené mokrým gélom s CaCl2 2 % hm.; G.– 1 krát obalené mokrým gélom s $CaCl_2$ 1 % hm.; H.– 3 krát obalené mokrým gélom s $CaCl_2$ 1 % hm..



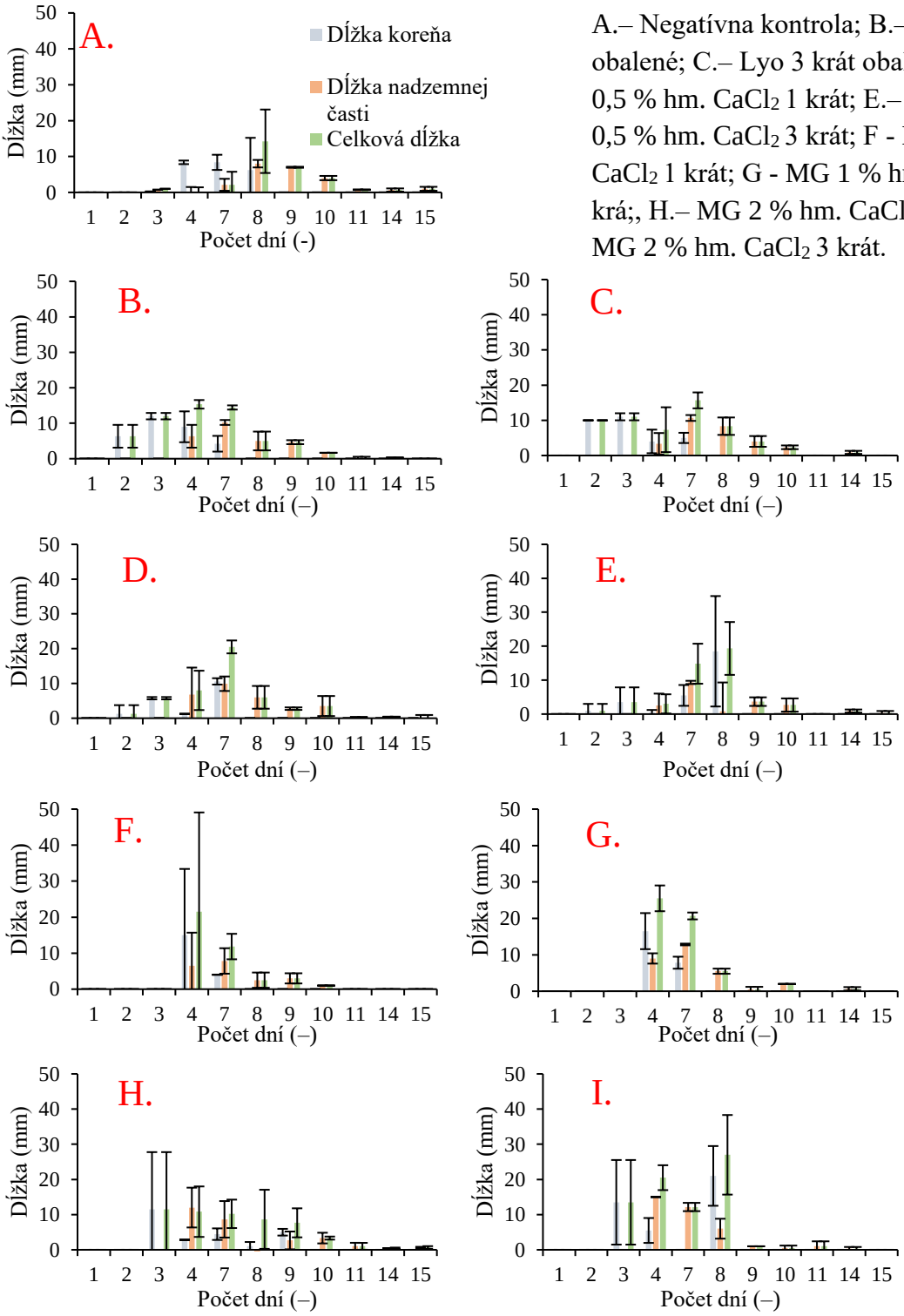
Obrázok 22: Kmeň DSM 720. A.– negatívna kontrola; B.– semienko obalené čistou kultúrou; C.– 1 krát obalené lyofilizátmi; D.– 3 krát obalené lyofilizátmi; E.– 1 krát obalené mokrým gélom s CaCl2 2 % hm.; F.– 3 krát obalené mokrým gélom s CaCl2 2 % hm.; G.– 1 krát obalené mokrým gélom s $CaCl_2$ 1 % hm.; H.– 3 krát obalené mokrým gélom s $CaCl_2$ 1 % hm..

Príloha č.3



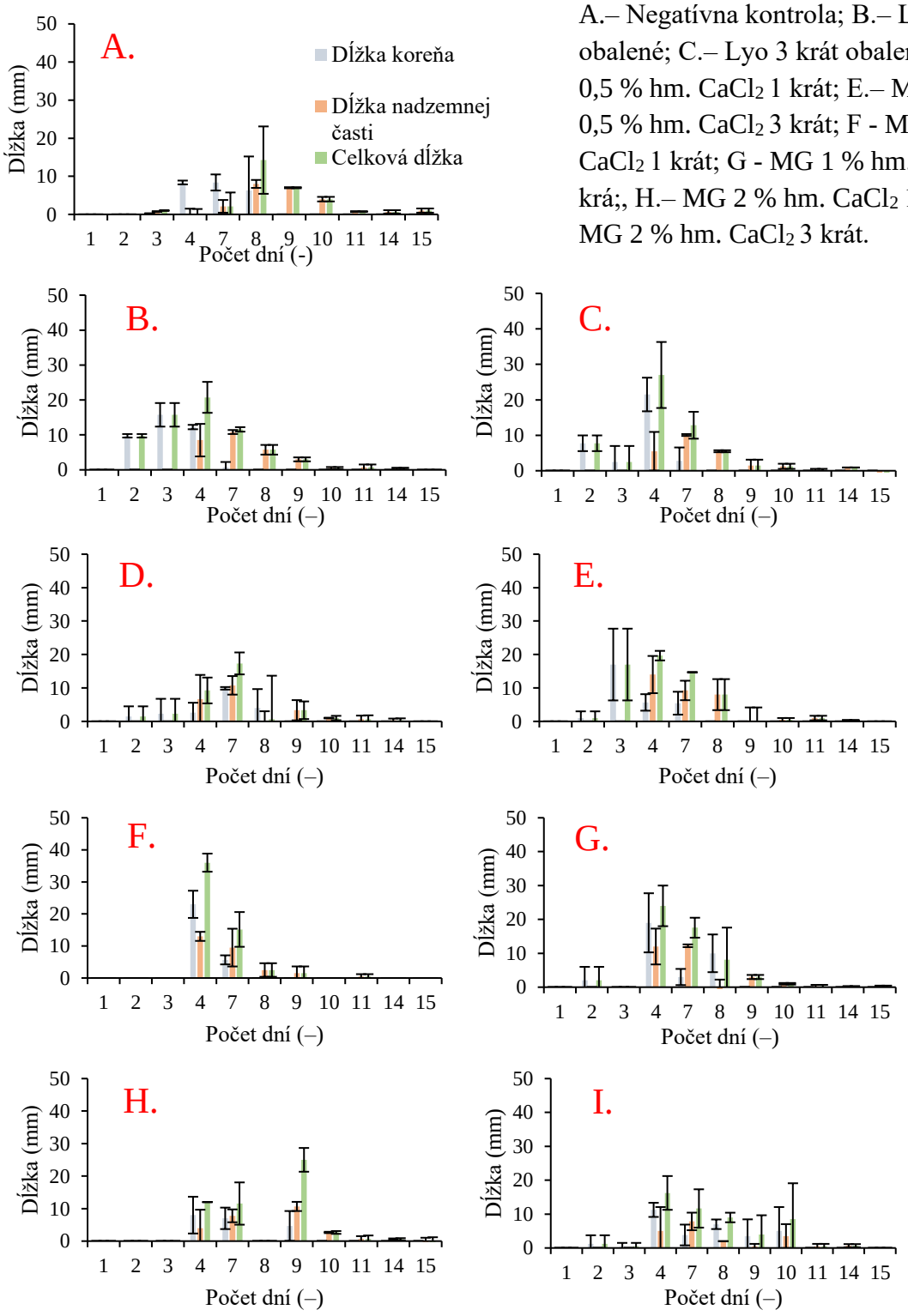
A.– Negatívna kontrola; B.– Lyo 1 krát obalené; C.– Lyo 3 krát obalené; D.– MG 0,5 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; E.– MG 0,5 % hm. $CaCl_2$ 3 krát; F - MG 1 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; G - MG 1 % hm. $CaCl_2$ 3 krá;, H.– MG 2 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; I.– MG 2 % hm. $CaCl_2$ 3 krát.

Obrázok 23: Každodenný prírastok rastlín s použitím kmeňa CCM 289



A.– Negatívna kontrola; B.– Lyo 1 krát obalené; C.– Lyo 3 krát obalené; D.– MG 0,5 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; E.– MG 0,5 % hm. $CaCl_2$ 3 krát; F - MG 1 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; G - MG 1 % hm. $CaCl_2$ 3 krá;, H.– MG 2 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; I.– MG 2 % hm. $CaCl_2$ 3 krát.

Obrázok 24: Každodenný prírastok rastlín s použitím kmeňa DSM 87



A.– Negatívna kontrola; B.– Lyo 1 krát obalené; C.– Lyo 3 krát obalené; D.– MG 0,5 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; E.– MG 0,5 % hm. $CaCl_2$ 3 krát; F - MG 1 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; G - MG 1 % hm. $CaCl_2$ 3 krá;, H.– MG 2 % hm. $CaCl_2$ 1 krát; I.– MG 2 % hm. $CaCl_2$ 3 krát.

Obrázok 25: Každodenný prírastok rastlín s použitím kmeňa DSM 720