

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



**Vliv bioefektorů na výnosové parametry rostlin se zaměřením
na zvýšení příjmu fosforu z půdy**

Doktorská disertační práce

Autor: Ing. Zlata Holečková

Školitel: prof. Ing. Jiří Balík. CSc., dr. h. c.

Konzultant: Ing. Martin Kulhánek. Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „Vliv bioefektorů na výnosové parametry rostlin se zaměřením na zvýšení příjmu fosforu z půdy“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne:

.....

Podpis

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu doktorské disertační práce prof. Ing. Jiřímu Balíkovi, CSc., dr. h. c. a odbornému konzultantovi Ing. Martinovi Kulhánkovi, Ph.D. za pomoc a spolupráci v průběhu doktorského studia a tvoření publikací. Dále bych chtěla poděkovat za odborné připomínky prof. Ing. Daniele Pavlíkové, CSc. a prof. Ing. Václavu Vaňkovi, CSc.

Děkuji také všem členům katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin za poskytnutou pomoc a příjemné zázemí v průběhu mého doktorského studia. Největší dík patří mé rodině a přátelům, kteří mi byli velkou oporou v průběhu doktorského studia.

Obsah

1. ÚVOD.....	1
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE - BIOEFEKTORY	2
2.1. Houbové bioefektory	2
2.1.1. <i>Trichoderma</i> sp.....	4
2.1.2. <i>Trichoderma harzianum</i>	5
2.1.3. <i>Penicillium bilaii</i>	6
2.1.4. <i>Rhizophagus irregularis</i> , popřípadě kombinace s jinými organismy.....	7
2.1.5. <i>Glomus mosseae</i> , popřípadě kombinace s jinými organismy.....	8
2.2. Bakteriální bioefektory	9
2.2.1. <i>Pseudomonas</i> sp., popřípadě kombinace s jinými organismy.....	10
2.2.2. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	12
2.2.3. <i>Pseudomonas jessenii</i> , popřípadě kombinace s jinými organismy	13
2.2.4. <i>Paenibacillus mucilaginosus</i> , popřípadě kombinace s jinými organismy.....	14
2.2.5. <i>Bacillus subtilis</i>	14
2.3. Bioefektory na bázi extraktů z rostlin.....	16
2.3.1. <i>Ascophyllum nodosum</i>	17
2.3.2. <i>Sapindus mukorossi</i> , popřípadě kombinace s jinými rostlinnými extrakty.....	18
2.3.3. <i>Quillaja saponaria</i>	19
3. KOLOBĚH FOSFORU	20
3.1. Fosfor v půdě	23
3.1.1. Faktory ovlivňující obsah P v půdě	24
3.2. Formy fosforu v půdě	25
3.2.1. Anorganický fosfor.....	25
3.2.2. Organický fosfor.....	28
3.3. Možnosti stanovení forem půdního fosforu.....	29
3.4. Fosfor v rostlině	30
3.4.1. Požadavky rostlin	30
3.4.2. Příjem fosforu rostlinou.....	31
3.4.3. Absorpce a transport P.....	35
3.5. Mykorrhiza.....	36
4. HYPOTÉZY A CÍLE.....	39
4.1. Hypotézy.....	39
4.2. Cíle práce	39
5. METODIKA PRÁCE	40

5.1. Nádobové a polní pokusy	40
5.1.1. Nádobový pokus 2013 (pokus 1).....	40
5.1.2. Nádobový pokus 2014 (pokus 2 a 3).....	41
5.1.3. Polní pokusy 2014 (pokus 4 a 5)	43
5.1.4. Screening experiment 2015 (pokus 6).....	44
5.1.5. Polní pokus 2015 (pokus 7).....	46
5.1.6. Polní pokus 2016 (pokusy 8 a 9)	48
5.1.7. Nádobový pokus 2017 (pokus 10).....	50
5.2. Analytická stanovení.....	52
5.2.1. Analýzy půdy.....	52
Vodný výluh	52
Stanovení fosforu metodou Mehlich 3.	53
Stanovení kyselé fosfatázy	53
5.2.2. Analýzy rostlin	53
Rozklad na suché cestě	53
5.2.3. Souhrn postupu prací v rámci všech pokusů	53
5.3. Seznam používaných zkratk v praktické části práce.....	55
6. Výsledky práce	57
6.1.	58
6.2.	67
6.3.	74
6.4.	88
7. SUMÁRNÍ DISKUZE.....	109
8. ZÁVĚR	113
9. SEZNAM LITERATURY	115

1. ÚVOD

Potřeba zvýšit zemědělskou produkci se v průběhu posledních šedesáti let projevila masivním používáním minerálních hnojiv. Vzhledem k nárůstu světové populace se očekává růst poptávky po krmivech a potravinách, omezená dostupnost produktivní zemědělské půdy, a vzrůstající závislost na minerálních hnojivech. Je tedy důležité nalézt alternativní strategie pro výživu rostlin.

V roce 2012 vznikl Evropský rámcový program (BIOFEKTOR, funded by the European Commission within the 7th Framework Programme, Grant Agmt. No. 312117, řešený v letech 2012 - 2017) založený na spolupráci především evropských univerzit (12), institutů (2) a distributorů (7). Projekt byl zaměřen na využití tzv. bioefektorů v rostlinné výrobě s hlavním cílem přispět ke snížení vstupů minerálních hnojiv používaných v zemědělství a ke správnému využívání půd různých zeměpisných poloh. Bioefektory mohou být v závislosti na půdně-klimatických podmínkách nástrojem k překonání omezení dostupnosti živin. Mohou obsahovat mikroorganismy (bakterie, houby) nebo i aktivní přírodní sloučeniny, jako jsou výluhy z půdy nebo kompostu, mikrobiální zbytky, rostlinné výtažky, výtažky či výrobky z biologických procesů. Tyto produkty jsou vyvíjeny pro široké spektrum plodin (cílovými plodinami projektu byly kukuřice, pšenice a rajčata).

Hlavním sledovaným prvkem pro testování bioefektorů v rámci projektu byl fosfor. Ten patří mezi nezastupitelné makroprvky nezbytné pro růst a vývin rostlin. Navzdory jeho nezbytnosti v rostlinném metabolismu je jeho přístupný podíl v půdě poměrně nízký, a to i přes akumulaci jeho přístupných forem ve vrchních vrstvách půdy, tj. v oblasti růstu kořenů. Obsah půdního fosforu se mění v závislosti na mateční hornině, textuře a jiných faktorech hospodaření (poměr a druh dodaného P a způsob kultivace půdy). Vliv má dále i aplikace organických a minerálních hnojiv a samozřejmě i biologická aktivita. Právě na biologické aktivitě je působení bioefektorů založeno. Jejich funkce spočívá např. v podpoře růstu kořenů (*Pseudomonas* sp.), rozpouštění fosforečnanů pro rostliny normálně nedostupných (*Trichoderma harzianum*), nebo mohou sloužit i jako zdroj energie pro přirozeně se vyskytující půdní mikroorganismy (výtažky z řas). Vzhledem k tomu, že zdroje kvalitních fosfátů jsou limitované, je třeba hledat nové alternativy k hnojení fosforem. Určitou alternativou by mohlo být právě využití bioefektorů. Tato disertační práce je zaměřena zejména na vliv aplikace bioefektorů na výnosové parametry, obsah a odběr vybraných makro- a mikroprvků kukuřicí, popřípadě pšenicí ozimou.

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE - BIOEFEKTORY

V posledních letech, metody biologické ochrany a využití mikroorganismů přitahují pozornost výzkumu, jako slibná alternativa k chemické kontrole. Biologická kontrola s použitím antagonistických mikroorganismů se ukázala jako životaschopná alternativa. Ačkoli používání pesticidů je tradiční metoda, jejich vedlejší environmentální účinky a postupná odolnost patogenu vůči účinné látce stimulují hledání alternativních strategií hubení patogenů. Jednou z alternativ je využití rodů *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* a *Bacillus* pro jejich antagonistické působení. Antagonistické bakteriální izoláty obsahují antibiotika, která inhibují zóny růstu patogena. Rozvoj tzv. mikrobiálních biokontrolních činidel, v této práci tzv. bioefektorů stoupá vzhledem k možnému využití těchto látek v ekologickém zemědělství (El-Gremi et al., 2017). Jedním z hlavních významů aplikace bioefektorů by mělo být zvýšení dostupnosti živin, zejména fosforu, rostlinou (Lošák et al., 2016).

V této kapitole je uveden výběr mikroorganismů, podílejících se na mobilizaci P v půdě se zaměřením na mikroorganismy studované v disertační práci.

2.1. Houbové bioefektory

Bioefektory mikrobiálního původu lze rozdělit na dvě hlavní skupiny, podle toho, jakou účinnou složku obsahují: houbovou a bakteriální. V minulosti již bylo uskutečněno mnoho studií, kde byl pozorován vliv aplikace různých druhů hub na rostlinu, proto na začátku této části (2.1.), v tabulce 1. jsou uvedeny některé z nich. Dále jsou podrobněji popsány houby, které byly využity v rámci této disertační práce, popř. projektu.

Tab. 1: Bioefektory jako houby, které podporují růst rostlin a rostlinnou produkci.

Houba	Pokusné podmínky	Vliv na rostlinu	Zdroje
<i>Trichoderma</i> spp.	Laboratorní podmínky	Zvýšení růstu a produkce semen sóji	Paradiso et al. 2017
	Laboratorní podmínky	Zvýšení růstu u <i>Vigna unguiculata</i>	Chagas et al. 2016
<i>Trichoderma harzianum</i>	Nádobový pokus	Zvýšené klíčení a růst semenáčků pšenice	El-Gremi et al. 2017
	Skleníkové a laboratorní podmínky	Zvýšení výnosu rajčat Zvýšení délky nadzemní a kořen. části, sušiny a výnosu semen <i>Cajanus cajan</i>	Buysens et al. 2016
	Nádobový pokus	Zvýšení růstu u <i>Brassica juncea</i>	Gupta et al. 2016
	Nádobový pokus	Zvýšení délky kořenů, růstu rostlin a sušiny u <i>Brassica nigra</i>	Ahmad et al. 2015
<i>Penicillium bilaii</i>	Rhizoboxový pokus	Zvýšení délky kořenů kukuřice	Gomez-Munoz et al. 2017
	Polní podmínky	Zvýšení výnosu zrna pšenice	Ram et al. 2015
	Polní podmínky	Zvýšení délky kořenů a obsahu P v kořenech hrachu	Vessey a Heisinger 2001
	Polní podmínky	Zvýšení výnosu vojtěšky	Beckie et al. 1998
<i>Rhizophagus irregularis</i>	Nádobový pokus	Kratší délka kořenů, ale větší množství kořenových vlásků u pšenice	Lazarevic et al. 2018
	Maloparcelový pokus	Zvýšení výnosu u manioku	Ceballos et al. 2013
<i>Glomus mosseae</i>	Nádobový pokus	Zvýšení růstu rostlin, výnosu sušiny v nadzemní a kořen. hmotě u tabáku	Yuan et al. 2016
	Nádobový pokus	Zvýšení růstu rostlin, větší průměr stonků a kořenů u <i>Citrus tangerine</i>	Liu a Wu 2014
	Nádobový pokus	Zvýšení růstu rostlin a výnosu zrna u rýže, vyšší hmotnost nadzemní a kořen.části	Wang et al. 2012

(Holečková et al., 2017).

2.1.1. *Trichoderma* sp.

Trichoderma spp. je volně žijící vláknitá houba vyskytující se téměř ve všech půdách a na různých stanovištích. Rod *Trichoderma* zahrnuje druhy, které jsou v současné době používány jako bioefektory (Hermosa et al., 2012; Dominguez et al., 2016). Houby z rodu *Trichoderma* mají dlouhotrvající a různorodé účinky na rostliny. Tyto houby jsou známé díky produkci několika enzymů a antibiotik. Tomuto druhu jsou přičítány mnohé fyziologické, antimykotické či insekticidní účinky. Působí mimo jiné proti širokému spektru rostlinných patogenů. *Trichoderma* spp. kolonizuje kořeny a parazituje na patogenu, ze kterého získává živiny. Tyto houby podporují rychlost růstu a vývoj rostlin, rozpouštění živin v půdě a následný příjem živin (Harman et al., 2004a; Raja, 2007; Do Vale et al., 2012; Ferrigo et al., 2014; Galletti et al., 2015; El-Gremi et al., 2017). Dále také zvyšují odolnost vůči abiotickým či biotickým stresům, příjem a využití živin, produktivitu plodin (Yedidia et al., 2001; Howell, 2003; Harman et al., 2004a; Galletti et al., 2015). Dennis a Webster (1971) uvádějí, že houby rodu *Trichoderma* spp. mají charakteristickou vůni a některé izolované látky z těchto hub produkují těkavé složky, které působí inhibičně na růst jiných hub. Např. acetaldehyd byl identifikován jako inhibiční metabolit *Trichodermy viride*. Ke zvýšení růstu rostlin, a tedy i kořenů dochází např. v důsledku jeho silné antipatogenní aktivity, biosyntézou hormonů, zlepšením příjmu živin z půdy, vývojem kořenů, zvýšením rychlosti metabolismu sacharidů a zvýšením fotosyntézy (El-Gremi et al., 2017). Růst podporuje také produkce enzymů. Hlavní hydrolytické enzymy vylučované touto houbou jsou proteázy, chitinázy a endochitinázy (Do Vale et al., 2012). Endochitinázy jsou proteiny podílející se na degradaci chitinu. Chitinázy se rozdělují na dvě hlavní skupiny podle jejich aktivity: endochitinázy a exochitinázy. Endochitinázy jsou rozděleny na chitinázy, které štěpí chitin náhodně uvnitř řetězce. A exochitinázy jsou subklasifikovány na chitobiosidázy a chitobiázy. Všechny tyto enzymy působí vzájemně, synergicky a komplementárně na chitin a na degradaci buněčné stěny (Duo-Chuan, 2006; Do Vale et al., 2012).

Princip kooperace mezi rodem *Trichoderma* a rostlinou lze vysvětlit několika způsoby:

- **Soutěž o prostor** - *Trichoderma* spp. roste rychleji na povrchu kořene než jiné druhy hub v půdě. Ostatní houby proto mají menší šanci prosadit se na stejném kořeni;

- **Soutěž o živiny** - *Trichoderma* spp. bere patogena jako zdroj potravy a živin. Proto omezuje rozvoj patogenů;

- **Parazitismus patogenů** - *Trichoderma* spp. roste kolem mycelia patogenu. Buněčné stěny patogenu jsou rozděleny, a tímto následkem je patogen zničen;

- **Posílení rostlin** - *Trichoderma* spp. zlepšuje kořenový systém a zvyšuje tvorbu kořenových vlásků, v důsledku toho mohou být živiny a voda lépe absorbovány. To vede k lepším výnosům a silnějším plodinám;

- **Indukovaná rezistence** - *Trichoderma* také posiluje obranný mechanismus nadzemních částí rostlin, boj proti chorobám např. padlí. Tento proces se nazývá indukovaná systémová rezistence (ISR) (Anon., 2014).

2.1.2. *Trichoderma harzianum*

T. harzianum je mykoparazitická vláknitá houba, která produkuje a vylučuje celou řadu extracelulárních hydrolytických enzymů používaných k degradaci buněčné stěny (Do Vale et al., 2012). *Trichoderma* má schopnost kolonizovat kořeny rostlin v různých typech půdy a pH, a tím podporovat také růst rostlin či stimulovat systémové obranné reakce u kukuřice (Harman et al., 2004b; Ferrigo et al., 2014). Tento kmen je nejpopsanějším a nejvíce se vyskytujícím kmenem *Trichodermy* na světě. První studie probíhaly od roku 1980 a byly provedeny Gary Harmanem z Cornellovy univerzity ve Spojených státech (Raja, 2007; Anon., 2014). Jedním z účinků aplikace kmene T22 je zvýšení růstu rostlin, a to i v rostlinách za stresových podmínek. Ke zvýšení růstu dochází nepřímo v důsledku jeho silné anti-patogenní aktivity, a přímo prostřednictvím: 1) indukce biosyntézy hormonů, 2) zlepšení solubilizace a příjmu živin z půdy, 3) vývojem kořenů, 4) zvýšením rychlosti metabolismu sacharidů, a 5) zvýšením fotosyntézy (El-Gremi et al., 2017). Houba roste v širokém rozmezí teplot (10 až 34 °C), při hodnotě pH 4 až 8,5. Hlavní hydrolytické enzymy vylučované touto houbou jsou proteázy, chitinázy a endochitinázy (Do Vale et al., 2012). Tato houba je také hlavní složkou v několika komerčně vyráběných biofungicidech. Biofungicid je určen pro aplikaci na list, na osivo a do půdy. V půdě se využívá k ošetření a pro potlačení různých chorob, které jsou způsobeny patogeny, jako je *Botrytis*, *Fusarium* a *Penicillium* spp. Tato skupina fungicidů má být využita zejména v boji proti škůdcům, pro zlepšení zdraví rostlin a monitorování životního prostředí (Samuels et al., 2014; Gomes et al., 2015). El-Gremi et al. (2017) publikují, že kmen T22 je schopen zlepšit výkonnost fotosyntézy a podpořit růst rajčat. Po aplikaci došlo ke zvýšení výšky rostlin, fotosyntézy a celkovému obsahu chlorofylu. Celkově aplikace tohoto kmene zmírnila vliv řady biotických a abiotických stresů.

Ahmad et al. (2015) provedli studii, kde byl pozorován vliv zasolení půdy na brukev po aplikaci *T. harzianum*. Studie zahrnovala nádobový experiment s Brukví sítinovitou (*Brassica juncea*, L. kul. Varuna). Stres způsobený zasolením půdy způsobuje u rostlin menší a pomalejší růst, změnu fyzikálně-biochemických vlastností rostlin a následný pokles výnosu biomasy. Výsledky ukázaly, že sazenice rostlin, které byly ošetřeny *T. harzianum*, byly

podstatně odolnější vůči stresovým podmínkám způsobených salinitou, oproti neošetřeným rostlinám. Harman et al. (2004) pozorovali účinky kmene T22 na kořenový systém, nadzemní část, velikost a množství kořenových vlásků u kukuřice. Sazenice z ošetřených semen měly větší kořeny a výhonky než sazenice nenaočkované. Kořenové systémy u rostlin, které vyrostly ze semen ošetřených touto houbou, byly téměř dvakrát delší, než u kontrolních rostlin. Naočkování zvýšilo také růst kořenových vlásků a hlavních kořenů. Celková plocha a objem kořenů v přítomnosti kmene T22 byly přibližně dvakrát větší než u kontrolních rostlin.

2.1.3. *Penicillium bilaii*

Mikroorganismus *Penicillium bilaii* je houba, která žije ve spojení s kořeny rostlin a bylo prokázáno, že zvyšuje rozpustnost a absorpci fosforu u některých plodin (Karamanos et al., 2010; Gomez-Munos et al., 2017). Některé druhy *Penicillium* mohou uvolňovat fixovaný fosfor (P) v půdě a zpřístupňovat je rostoucím rostlinám. Ve srovnání s jinými živinami je P nejméně mobilní a je dostupný rostlinám ve většině půd. P-solubilizující houby hrají důležitou roli v celosvětovém cyklu. *P. bilaii* se používá jako očkovací inokulant pro zlepšení účinnosti P u různých plodin, jako je např. pšenice, kukuřice, řepka, fazole, sója, luštěniny. Tato půdní houba je schopna rozpustit minerální fosfáty a zvýšit příjem fosfátů (Nakahara et al., 2004; Richardson et al., 2011; Gomez-Munoz et al., 2017). Na solubilizaci P se podílejí tři hlavní mechanismy: acidifikace půdy, uvolňování anionů organických kyselin a uvolňování fosfomonoesterázy a fytázy (Gomez-Munoz et al., 2017). Cunningham a Kuiuack (1992) prokázali, že hlavními kyselými metabolity produkovanými *P. bilaii* jsou kyselina šťavelová a kyselina citronová. Díky těmto produkovaným organickým kyselinám může *P. bilaii* zvýšit dostupnost fosfátu do rostliny.

Gomez-Munoz et al. (2017) provedli rhizoboxové pokusy s kukuřicí, kdy byla testovací rostlina pěstována po dobu 27 dnů. V tomto pokusu byl inokulován *P. bilaii*, kmen ATCC 20851 na zrno samostatně nebo v kombinaci s kalem z odpadních vod. Během počátečních fází růstu zvýšilo očkování semen *P. bilaii* výšku kukuřice. Na konci pokusu však tento účinek ustal. Růst kořene byl zvýšený u naočkovaného osiva *P. bilaii* nebo u inokulace v kombinaci s kalem. Aplikace samostatného kalu byla méně účinná. Kolonizační studie provedené při sklizni ukázaly, že *P. bilaii* nebylo možno detekovat v rhizosféře kukuřice, ale zůstal na místě očkování. Na konci tohoto pokusu inokulace *P. bilaii* neprokázala žádný účinek na výšku výhonku ani na nadzemní biomasu. Inokulace splaškových kalů s *P. bilaii* nevedla ke zvýšení příjmu fosforu, a tak se ukázala být méně účinná než inokulace semen. V této studii vyšší růst kořenů nevedl k vyššímu příjmu P, pravděpodobně kvůli silnému nedostatku živin

v půdě. Ram et al. (2015) provedli v Indii polní pokusy v letech 2009-2011 s cílem vyhodnotit účinek inokulace semen s *P. bilaii* na pšenici při různých dávkách fosforu na obsah P v listech a výnosu zrna zavlažované pšenice. Studie ukázala potenciál použití *P. bilaii* jako biologických inokulantů spolu s 50 % doporučené dávky hnojiva P, která produkovala výnos pšenice podobný 100% dávce P, když nebylo použito *P. bilaii*. Je však zapotřebí více takových dlouhodobých studií provedených na různých typech půdy, které se liší v dostupnosti P, v závislosti na pH. Karamanos et al. (2010) provedli sérii 47 pokusů s pšenicí jarní (*Triticum aestivum*, L.). Pokusy probíhaly ve třech préríjních provinciích v letech 1989 a 1995 a zahrnovaly také aplikaci *P. bilaii*. Ze 47 pokusů byla zjištěna reakce na aplikaci P-hnojiva ve 33 případech. Tyto účinky ale nelze přičítat koncentraci P v půdě, půdní organické hmotě, textuře nebo povětrnostním podmínkám a byly pouze považovány za náhodné události. Vliv na příjem fosforu měla jen aplikace P-hnojiva. Vessey a Heisinger (2001) popisují pokusy na hrachu (*Pisum sativum*, L.), které byly provedeny na dvou lokalitách v Kanadě. Naočkování tímto organismem v kombinaci s P-hnojivem způsobilo prodloužení délky kořenů a zvýšení obsahu P v kořenech oproti kontrole, kde nedošlo k aplikaci P-hnojiva. Dále se Gulden a Vessey (2000) zaměřili na pozorování tvorby kořenových vlásků u hrachu po naočkování *P. bilaii*. Pokus byl založen na aplikaci mikroorganismu v kombinaci s P-hnojivem. V tomto experimentu byly zkoumány účinky *P. bilaii* na růst a morfologii kořene hrachu (*Pisum sativum*, L.) pěstovaného ve třech rozdílných množstvích dodaného P (0, 1, 10 mg/l). Podíl kořenových vlásků byl významně vyšší u hrachu naočkovaného *P. bilaii* ve srovnání s kontrolními rostlinami. Rozdílné množství dodaného P nemělo vliv na podíl kořenových vlásků ani na jejich délku. Kořenové vlásky u hrachu, které byly naočkované *P. bilaii* byly v průměru o 33,3 % delší než u rostlin nenačkovaných. Beckie et al. (1998) použili *P. bilaii* při očkování vojtěšky v kombinaci s P-hnojivem a z výsledků pokusů vyplývá, že k největší reakci na očkování došlo na počátku vegetačního období. V roce následujícím po očkování výnos naočkované vojtěšky vzrostl v průměru o 3 % oproti nenačkovaným rostlinám.

2.1.4. *Rhizophagus irregularis*, popřípadě kombinace s jinými organismy

Další možností použití bioefektorů, kromě aplikace jednoho účinného mikroorganismu, je kombinace více různých účinných mikroorganismů. Jedním z používaných přípravků kombinace arbuskulárních mykorrhizních hub *Rhizophagus irregularis* a *Glomus mosseae*.

Během posledního desetiletí se výrazně zvýšila aplikace arbuskulárních mykorrhizních hub (AMF). Až dosud bylo obtížné ověření úspěšnosti očkování, protože specifické kmeny hub nemohly být detekovány v kolonizovaných kořenech. Očkování AMF se stále více používá

jako nástroj biologického hnojení v zemědělství a zahradnictví (Sýkorová et al., 2012). *Rhizophagus irregularis* je všudypřítomná AMF, která vytváří symbiotický vztah s kořeny většiny rostlin. *R. irregularis* patří mezi sledovaný druh houby, z toho důvodu, že dokáže v krátké době kolonizovat kořeny hostitelské rostliny. Tyto houby zajišťují rostlině lepší příjem živin (zejména anorganických ortofosfátových iontů P, dusíku, síry). Vznikající symbióza může vést ke zvýšení růstu rostlin (Tisserant et al., 2013; Campos et al., 2015). V poslední době byla vyrobena inokula kmene mykorhizní houby *Rhizophagus irregularis* s úmyslem jeho použití v oblastech tropického klimatického pásma. Jednou z globálně důležitých potravinářských komodit tropů je maniok. Během experimentu byl hodnocen efekt sériově vyráběné očkovací látky na výnos rostlin manioku na dvou lokalitách v Kolumbii. Významný vliv očkování *R. irregularis* na výnos nastal na obou lokalitách. Na první lokalitě se zvýšil výnos bez ohledu na hnojení fosforem. Na druhé lokalitě bylo dosaženo nejvyššího výnosu u varianty inokulace AMF a 50 % běžně aplikovaného P. Přesto, že očkování mělo za následek větší produkci potravin, z ekonomické analýzy vyplynulo, že očkováním nedosáhneme větší návratnosti investic než u konvenčního pěstování (Ceballos, 2013; Schweiger, 2014).

2.1.5. *Glomus mosseae*, popřípadě kombinace s jinými organismy

Yuan et al. (2016), provedli studii a nádobový pokus s houbami *Trichoderma harzianum* a *G. mosseae* a jejich vlivu na výskyt bakteriálního vadnutí tabáku, způsobeného bakterií *Ralstonia solanacearum*, ale také jejich vlivu na růst rostlin a sušinu nadzemní či kořenové části rostlin. V rámci pokusu bylo založeno několik variant: naočkování jednotlivými houbami nebo naočkování v kombinaci s „bio-organickým“ hnojivem. Hnojivo bylo vyrobeno z hovězího hnoje a kompostu v poměru 1:1. Dále byly přidány řepkové pokrutiny a všechny složky byly podrobeny aerobní mikrobiální fermentaci. Výsledky ukázaly, že výskyt onemocnění u rostlin ošetřených s integrovanou aplikací *G. mosseae* a *T. harzianum* byl nejnižší, ve srovnání s kontrolní variantou o 68,2 %. Výsledky dále ukázaly, že *G. mosseae* měla také pozitivní vliv na mikrobiální kolonizaci rhizosféry. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) ukázala, že použití této houby samostatně nebo v kombinaci změnilo různorodost mikrobiální komunity v rhizosféře. Výsledky ukázaly, že kolonizace kořenů *G. mosseae* se zvýšila během prvních 5 týdnů po naočkování, poté se snížila. Nejvyšší míra mykorhizální kolonizace 75,8 %, byla dosažena při aplikaci *G. mosseae* + organickým hnojivem v 5. týdnu vegetace. Během celého experimentálního období (8 týdnů) byla kořenová kolonizace *G. mosseae* u této varianty významně vyšší než naočkování pouze *G. mosseae*, což naznačuje, že bioorganické hnojivo výrazně podporuje

kolonizaci *G. mosseae*. Dále aplikace zvýšila výšku rostlin tabáku, sušinu nadzemní hmoty rostlin i sušinu kořenů. Liu a Wu (2014) popisují pozitivní vliv mykorhizního očkování *G. mosseae* na výrazně vyšší růst rostlin, průměr stonků a kořenů a na hmotnost čerstvé hmoty rostlin Mandarinky tanžerinské (*Citrus tangerina*). U naočkovaných rostlin byl také zjištěn vyšší obsah chlorofylu v listech, ve srovnání s nenačkovanými rostlinami. Také Latef a He (2014) provedli nádobový pokus, kde byl vyhodnocen vliv inokulace *G. mosseae* na růst a některé biochemické aktivity v kořenech a výhoncích pepře (*Capsicum annuum*, L. cv. Zhongjiao 105). Autoři došli k závěru, že očkování *G. mosseae* zlepšilo u rostlin jejich růst a toleranci vůči salinitě prostřednictvím produkce fotosyntetických pigmentů a hromadění organických rozpuštěných látek. Dále inokulace snížila oxidační stres a zvýšila antioxidační aktivitu systému. Wang et al. (2012) uskutečnili studii, jejíž součástí byl nádobový pokus, kde byl sledován vliv naočkování účinnou látkou na rýži. Rýže (*Oryza sativa*, L.) byla naočkována mykorhizní houbou *G. mosseae*. Vegetativní růst a reprodukční vlastnosti byly porovnány u naočkovaných a nenačkovaných rostlin. Sazenice rýže, které byly naočkovány, rostly statisticky průkazně lépe než sazenice nenačkované. Zvýšila se výška rostlin (o 34 %), hmotnost nadzemní biomasy (o 122 %), hmotnost kořenové biomasy (o 590 %), a výnos zrna (o 9,7 %) ve sklizňové fázi. Rýže naočkováná *G. mosseae* přijala více živin pomocí kořenového systému, což bylo zásadní pro dosažení maximální produkce zrna. Symbióza mykorhizních hub a rýže by tedy mohla být přínosem pro růst plodin a výnos zrna.

2.2. Bakteriální bioefektory

Také v případě bakterií bylo již v minulosti uskutečněno mnoho studií, kde byl pozorován vliv aplikace různých druhů bakterií na rostlinu, a tak na začátku této části (2.2.), v tabulce 2. jsou uvedeny některé z nich. Dále jsou podrobněji popsány bakterie, které byly využity v rámci této disertační práce, popř. projektu.

Tab. 2: Bioefektory jako bakterie, které podporují růst rostlin a rostlinnou produkci.

Bakterie	Pokusné podmínky	Vliv na rostlinu	Zdroje
<i>Pseudomonas</i> spp.	Laboratorní, skleníkové a polní podmínky Polní podmínky Nádobové a polní podmínky Laboratorní podmínky	Zvýšené klíčení, délky nadzemní a kořenové části, výnosu kukuřice Zvýšení výnosu zrna a množství slámy u ječmene Zvýšené klíčení, růstové parametry a výnos kukuřice Stimulace růstu u rostlin rajčat	Kifle a Laing, 2016 Fröhlich et al. 2012 Nezarat a Gholami 2009, Gholami et al. 2009 Gravel et al. 2007
<i>Pseudomonas jessenii</i>	Skleníkové a polní podmínky Skleníkové podmínky	Zvýšené výnosy u <i>Cicer arietinum</i> Zvýšení růstu rajčat	Valverde et al. 2006 Etlbany a Smalla 2013
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	Laboratorní podmínky	Zvýšený růst nadzemní a kořenové části rýže	He et al. 2013
<i>Bacillus subtilis</i>	Polní podmínky Polní podmínky	Zvýšení absorpce makro a mikroživin, růstu rajčat Zvýšení hmotnosti rostlin v čerstvém i suchém stavu <i>Brassica oleracea</i>	Altuhaish et al. 2014 Turan et al. 2014
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	Nádobový pokus	Zlepšení růstu řízků <i>Poncirus trifoliata</i>	Wang et al. 2016
<i>Rhizophagus intraradices</i>	Skleníkové podmínky Polní podmínky	Zvýšení růstu rostlin, počtu listů, výšky rostlin, délky nadzemní a kořenové části rostlin <i>Camellia sinensis</i> Zvýšení růstu rajčat	Sharma a Kayang 2017 Mohamed et al. 2016

(upraveno dle Holečková et al., 2017).

2.2.1. *Pseudomonas* sp., popřípadě kombinace s jinými organismy

Pseudomonas sp. je všudypřítomná bakterie žijící v zemědělských půdách, dobře přizpůsobená růstu v rhizosféře. Bakterie z rodu *Pseudomonas* jsou vhodné jako biokontrolní činidlo podporující růst, vývoj a výnos mnoha druhů plodin (Travaglia et al., 2015; Vallabhaneni, 2016). Tyto bakterie se využívají jako bioefektor, které společně s minerálními hnojivy může sloužit jako účinný přístup k zvyšujícím se nárokům rostlin na živiny. Tyto mikroorganismy mohou zvýšit dostupnost deficientních nebo imobilních živin v půdě po rozpuštění jejich minerálních forem. Například *Pseudomonas putida* může podporovat růst

rostlin solubilizací P, biologickou fixací dusíku, zvýšením dostupnosti stopových prvků, jako jsou Fe a Zn, a tvorbou regulátorů růstu rostlin. Použití *P. putida* zlepšilo růst a výnos různých plodin, jako jsou fazole, hrach, rýže, rajčata a pšenice. Proto bylo použití těchto bakterií navrženo jako udržitelné řešení pro zlepšení rostlinné produkce. Účinek aplikace *P. putida* buď samostatně, nebo v kombinaci s přísadkou fosforu zlepšil růst rostlin, příjem živin (N, P, K) a antioxidační aktivitu (Israr et al., 2016). Na univerzitě v KwaZulu-Natal v Pietermaritzburgu byly provedeny laboratorní, skleníkové a polní pokusy v sezónách 2010 - 2012, kdy byly studovány účinky osmi kmenů diazotrofních bakterií na růst a výnos kukuřice. Kukuřičná semena byla ošetřena *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas* sp. (kmeny B5, A3, A6, A61), *Burkholderia ambifaria*, *Enterobacter cloacae* nebo *Pantoea ananatis*, jejichž cílem bylo stimulovat růst rostlin a udržovat nebo zvyšovat výnosy i při snižování dávky hnojení N. Všechny diazotrofní bakterie zvýšily klíčení zrn kukuřice a *Pseudomonas* sp. (B5) a *B. megaterium* výrazně zvýšily délku nadzemní části rostlin. *Pseudomonas* sp. (B5) a *Pseudomonas* sp. (A3) výrazně zvýšil délku kořenů. Ošetření zrn s vybranými diazotrofními bakteriemi vedlo ke zvýšení jejich klíčivosti, ale ve srovnání s neošetřenou kontrolou nezpůsobily žádné významné zvýšení výnosu zrna, sušiny, výšky rostliny či obsahu chlorofylu. To mohlo být kvůli vysoké konkurenci původní půdní mikroflóry, jelikož úspěch mikrobiálního očkování závisí na kolonizaci a konkurenční schopnosti aplikovaných mikroorganismů. Kořenová exudace, kolonizace kořenů jinými bakteriemi a zdraví půdy mohou také ovlivnit účinnost bakteriálního očkování (Kifle a Laing, 2016). Ferreira et al. (2013), Liu et al. (2015), uvádějí pozitivní účinek inokulace zrn s diazotrofními bakteriemi na sušinu a výnos kukuřice. Fröhlich et al. (2012) publikují pozitivní působení bakterie rodu *Pseudomonas* při pěstování ječmene. Při aplikaci bakterií v polních podmínkách došlo k nárůstu výnosu zrn (až o 20 %) a rovněž ke zvýšení hmotnosti slámy. Také ve skleníkových podmínkách vykazovaly rostliny vyšší výnos a lepší růst. Yusran et al. (2009) uvádějí, že po aplikaci bakterií *Pseudomonas* a *Bacillus amyloliquefaciens* (jednotlivě nebo v kombinaci) do půdy došlo u nádobového pokusu k výraznému zlepšení stavu kořenů rajčat. Ty byly zdravější a vykazovaly významně vyšší kolonizaci arbuskulárními mykorhizními houbami. Travaglia et al. (2015) provedli studii, kdy aplikovali *Azospirillum* sp. a *Pseudomonas* sp. na osivo nebo vzrostlé rostliny kukuřice v laboratorních i polních podmínkách. Během těchto pokusů bylo pozorováno několik parametrů - klíčení, rozvoj a růst kořenů a kořenových vlásků, růst nadzemní části rostlin, listová plocha, fotosyntetické pigmenty a vliv postřiku herbicidu (glyfosát) na rostlinu v kombinaci s naočkováním zrn nebo postřikem na rostliny touto bakterií. Naočkování bakterií v kombinaci s přítomností herbicidu výrazně zlepšilo

klíčení rostlin a tvorbu primárních kořenů i kořenových vlásků. Rostliny inokulované *Azospirillum* sp. a *Pseudomonas* sp. vykazovaly větší listovou plochu a větší nadzemní a kořenovou část rostlin, než nenačkované rostliny. Listová inokulace zvýšila také celkový obsah chlorofylu a karotenů. Výsledky polního pokusu ukázaly významné snížení akumulace herbicidu ve formě soli v listech kukuřice, ve srovnání s kontrolními rostlinami, a také zmírnění hromadění herbicidu v zrnech. Kromě toho, bylo pozorováno zvýšení výnosu plodin (*Azospirillum* 11,1 % a *Pseudomonas* 47,5 %). Nenačkované varianty měly průměrný výnos zrna 1021,5 kg zrna/ha. A ošetřené rostliny měly průměrný výnos 1135,0 kg zrna/ha (*Azospirillum*) a 1502,5 kg zrna/ha (*Pseudomonas*). To znamená, že aplikace biologických látek na kukuřici zvýší nejen růst plodin, vývoj a výnos, ale takélepší geochemické cykly půdy. Dále také přispívá ke snížení dávek minerálních hnojiv a zkracuje přetrvávání xenobiotických látek používaných v zemědělské praxi. Tato studie také prokázala schopnosti bakterie degradovat glyfosát v laboratorních i polních podmínkách.

2.2.2. *Bacillus amyloliquefaciens*

Bacillus amyloliquefaciens je gram-pozitivní, aerobní bakterie, produkující endospóry (Kröber et al., 2014; Chowdhury et al., 2015; Zhang et al., 2016) a látky podporující růst rostlin a potlačení chorob přenášených půdou v zemědělství. Tato bakterie podporuje růst rostlin, založený především na produkci sekundárních metabolitů potlačujících konkurenční mikrobiální patogeny (bakterie, plísňe, viry či hlístice) a choroby vyskytující se v rhizosféře rostlin. Dále také podporuje rozvoj kořenů a zlepšuje klíčení semen, kolonizuje kořeny rostlin a dokáže stimulovat růst svého hostitele. Použití těchto bakterií nabízí velký potenciál pro zvýšení výnosu a snížení chorob rostlin způsobených četnými mikroorganismy (Chen et al., 2007; Burkett-Cadena et al., 2008; Blom et al., 2012; Fan et al., 2012; He et al., 2013; Talboys et al., 2014; Lagerlöf et al., 2015). *B. amyloliquefaciens* produkuje mnoho metabolitů, jako např. enzymy (chitinázy, deaminázy, fytázy, peroxidázy a proteázy, fosfatázy, celulózy), bílkoviny (kasein, elastin), želatinu, škrob, dusitany, eskulin a arbutin, adenin, guanin, hypoxanthin, pektin, testosteron, tyrosin, a mnoho typů antibiotik (např. bacillomycin, fengycin, difficidin) a dalších látek (Priest et al., 1987; He et al. 2013; Chowdhury et al., 2015; Lagerlöf et al., 2015; El-Gremi et al., 2017). Díky produkci mnoha metabolitů působí *B. amyloliquefaciens* např. antifungálně, antibakteriálně nebo antinematocidně.

Vzhledem k těmto vlastnostem, se stále častěji *B. amyloliquefaciens* používá jako prostředek biologické ochrany v zemědělství. Bakterie také snižují vliv abiotických

stresových podmínek v rostlině, jako je sucho, zasolenost nebo nedostatek živin v rostlině (Koumoutsi et al., 2004; Chen et al., 2009; He et al., 2013; Kröber et al., 2014; Lagerlöf et al., 2015). Chen et al. (2007), Blom et al. (2012). He et al. (2013) uvádějí, že *B. amyloliquefaciens* je známý svou schopností podporovat růst rostlin produkcí indolyl-3-octové kyseliny (IAA) a giberelinů. Dále bylo zjištěno, že kyselina mléčná je hlavní složkou kořenových výměšků kukuřice (Baudoín et al., 2003), soji (Yang et al., 2012), lupiny (Egle et al., 2003), rýže (Aulakh et al., 2001), a že tato kyselina, sacharidy (Liang et al., 2016) a další kořenové výměšky slouží především jako zdroj uhlíku a energie pro *B. amyloliquefaciens*.

He et al. (2013) se zabývali ve své studii vlivem očkování *B. amyloliquefaciens* na růst rostliny rýže za stresových podmínek způsobených zasolením po dobu 30 dní. Tato studie vycházela z předpokladu, že použití mikroorganismů poskytuje alternativní technologii pro zlepšení schopnosti tolerance vůči stresu v rostlinách. Výsledky laboratorních pokusů ukázaly, že u naočkovaných rostlin došlo v porovnání s kontrolními rostlinami, k lepšímu růstu nadzemní části rostlin, ale také části kořenové. Analýzy této studie mimo jiné prokázaly, že přítomnost deaminázy v bakteriích zmírňuje účinek soli na chlorofyl, a tak podpora růstu rostlin ve stresových podmínkách způsobených salinitou byla z velké části připsána činnosti deaminázy, kterou bakterie produkují.

2.2.3. *Pseudomonas jessenii*, popřípadě kombinace s jinými organismy

Pseudomonas jessenii je fluorescenční, gram-negativní bakterie. Eltlbany a Smalla (2013) studovali účinek přídatku *P. jessenii* (kmen RU47) a *Bacillus amyloliquefaciens* (kmen FZB42) na růst rostlin v prostředí přirozeně se vyskytujících bakterií a houbových kolonií v rhizosféře a půdě u rajčat a kukuřice. V rámci této studie byl proveden skleníkový pokus, který zahrnoval tři varianty (kontrola, RU47 a FZB42). Hodnoceny byly parametry růstu rostlin. RU47 zvýšil růst rostlin rajčat ve srovnání s kontrolní variantou, zatímco FZB42 zvýšil růst kukuřice. Pomocí DGGE (elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu) bylo zjištěno, že účinnost RU47 a FZB42 byla jednoznačně ovlivněna bakteriálním složením rhizosféry. Tato bakterie byla také aplikována ve dvou oblastech Španělska (Castilla y Leon a Andalucia), kde Valverde et al. (2006) provedli studii s cílem nalézt užitečné bioefektory. V rámci tohoto projektu byly provedeny skleníkové a polní pokusy s cizrnou, kde bylo testováno jednodruhové a dvojitě (koinokulace) očkování v kombinaci s P-hnojivem. Rostliny, které byly ve skleníkových podmínkách naočkované *P. jessenii* (kmen PS06), měly o 14 % vyšší hmotnost sušiny než nenačkovaná kontrolní varianta. Dvojitě očkování *P. jessenii* s *Mesorhizobium ciceri* vedlo k poklesu sušiny výhonků oproti naočkování pouze s *M. ciceri*.

V polních podmínkách byly rostliny naočkovány pouze *M. ciceri* v jednorázové nebo dvojité inokulaci. Naočkovány rostliny měly vyšší výnos čerstvé biomasy než ostatní varianty. Očkování *P. jessenii* nemělo významný vliv na růst rostlin. Koinokulace však měla významný vliv na výnos semen, a to o 52 % vyšší než neinokulovaná kontrolní varianta. Tyto údaje naznačují, že *P. jessenii* může působit synergicky s *M. ciceri* při podpoře růstu cizrný.

2.2.4. *Paenibacillus mucilaginosus*, popřípadě kombinace s jinými organismy

Paenibacillus mucilaginosus je bakterie, která se již od roku 1990 široce využívá v zemědělství jako bioefektor pro jeho schopnost mineralizace fosforu, draslíku a také pro schopnost fixace dusíku. Tato bakterie je součástí biogeochemického cyklu draslíku, fosforu a jiných prvků. Je schopna degradovat nerozpustné půdní minerály s uvolněním živin (draslíku a ve vodě rozpustného fosforu), užitečných pro rostliny. *P. mucilaginosus* se ale také využívá během procesu čištění odpadních vod (Ma et al., 2012; Lu et al., 2014; Tang et al., 2014b). Některé kmeny mají schopnosti antagonistické nebo naopak podporují růst rostlin. Na základě uvedených poznatků byly přípravky obsahující tuto bakterii úspěšně použity při pěstování tabáku, rajčat a podzemnice olejné (Lu et al., 2014).

Wang et al. (2016) zkoumali účinky kombinovaného naočkování arbuskulární mykorhizní houbou (*Rhizophagus intraradices*) s rhizobakteriemi podporujícími růst rostlin (*P. mucilaginosus*) na růst sazenic citrusů za podmínek nedostatku fosforu. Pokus byl proveden pro srovnání růstu, morfologie kořene a dalších fyziologických proměnných u sazenic citronečnicku trojlistého (*Poncirus trifoliata*, L.), které byly naočkovány *R. intraradices* nebo *P. mucilaginosus* nebo oběma mikroorganismy současně. Délka kořenů se značně prodloužila po dvojitěm naočkování. Naopak, po naočkování rostlin pouze *R. intraradices* se délka kořene výrazně snížila. U sazenic, které byly inokulované kombinací *R. intraradices* a *P. mucilaginosus*, došlo ke zvýšení koncentrace chlorofylu v listu a zvýšené kořenové aktivitě ve srovnání s těmi, které buď nebyly naočkovány vůbec, nebo byly naočkovány pouze jedním z nich. Kombinované očkování zvýšilo výšku rostlin, průměr stonku, sušinu nadzemní i kořenové části rostlin. Celkové koncentrace N a P nebo odběr živin v klíčících rostlinách byly podstatně vyšší u jednodruhového i kombinovaného naočkování.

2.2.5. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je všudypřítomná gram-pozitivní bakterie běžně se vyskytující ve vodě, půdě, vzduchu a zbytcích rozkládajících se rostlin. Avšak, primární zastoupení těchto bakterií se nachází v půdě (Kunst et al., 1997; Tam et al., 2006). Bakterie produkuje endospóry, které jí umožňují snášet a překonat extrémní teplotní a suché období. *B. subtilis* produkuje řadu

proteáz a dalších enzymů, které mu umožňují degradovat řadu přírodních substrátů, což přispívá ke koloběhu živin. Tato bakterie je považována za benigní organismus, neboť nemá vlastnosti, které způsobují onemocnění a nepůsobí patogenně či toxicky na člověka, zvířata nebo rostliny (Kolektiv autorů, 1997; Kunst et al., 1997). Claus a Berkeley (1986) uvádějí, že *B. subtilis* není považován za rostlinného patogena. Nicméně, existuje několik publikací, které spojují *B. subtilis* s výskytem některých chorob u rostlin. Bergeyova příručka systematické bakteriologie uvádí, že *B. subtilis* dokáže rozložit pektin a polysacharidy rostlinných pletiv, a že tento mikroorganismus může způsobit měkkou hnilobu na bramborových hlízách. Avšak, tento fakt není průkazně podložen a podrobnější informace nebyly získány. Katz a Demain (1977), Korzybski et al. (1978) uvádějí, že *B. subtilis* produkuje široké spektrum antibakteriálních a antifungálních sloučenin, např. antibiotika, jako je difficidin a oxydifficidin, které mají účinnost proti širokému spektru aerobních a anaerobních bakterií. López-Valdez et al. (2011), Ma et al. (2015) uvádějí, že tato bakterie je široce využívanou v zemědělství k podpoře růstu rostlin a může být slibným přístupem k ochraně rostlin před chorobami.

Orio et al. (2016) publikují fakt, že aplikace bakterie *B. subtilis* má silný vliv proti houbovému patogenu *Setophoma terrestris* způsobujícímu růžovou nemoc kořenů u cibule, oproti kontrolním variantám bez aplikace této bakterie. Brutti et al. (2015) provedli studii, kde využili rhizobakterie podporující růst rostlin při produkci rajčat. Před sadbou byly mikroorganismy naočkovány do substrátu. Sazenice rajčat byly pěstovány za použití dvou různých substrátů. První substrát byl složen ze 70 % rašeliny a 30 % perlitu. Druhý substrát byl složen z 20 % rašeliny, 20 % perlitu a 60 % kompostu. Očkování bylo provedeno mikroorganismy: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* nebo přípravkem Bioroot, což je komerční produkt obsahující *B. subtilis*, *P. fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, kvasnice, řasy a *Nocardia*. Naočkování zvýšilo plochu listů, sušinu nadzemní části rostlin i kořene, objem kořenů a kořenové větvení ve srovnání s kontrolní variantou bez očkování, a proto autoři doporučují očkování jako alternativu využitelnou ke snížení závislosti pěstitelů rajčat na minerálních hnojivech. Altuhaish et al. (2014) provedli polní pokus s cílem zkoumat vliv přípravku s obsahem *B. subtilis*. Výsledek ukázal, že životnost bakterií měla během skladování tendenci klesat, ale významně neomezovala účinek na růst a produkci rostlin rajčat. Aplikací přípravku se zvýšil příjem makro a mikroživin, a následně růst rostlin. Tento výzkum naznačuje, že aplikace tohoto mikroorganismu zlepšuje růst a produkci. Během pokusu nebyl zaznamenán vliv rozdílného skladování biofaktorů (0 a 3 měsíce) na růst rostlin. Turan et al. (2014) provedli skleníkový pokus, kde byly pozorovány účinky

naočkování *Bacillus megaterium* (kmen TV 91C), *Pantoea agglomerans* (kmen RK 92) a *Bacillus subtilis* (kmen TV 17C) na růst, obsah živin a hormonů sadbového zelí. Semena zelí byla inkubována dvě hodiny při 28 °C. Nejvyšší koncentrace N a P byly zaznamenány v biomase zelí po naočkování *B. megaterium*, zatímco po naočkování bakterií *B. subtilis* Ca, Na, Fe a naočkování bakterií *P. agglomerans* zvýšilo koncentraci K, Mg a Mn. Obsah hormonů v klíčících rostlinách zelí byl významně ovlivněn aplikací mikroorganismů. *B. subtilis* snížil obsah kyseliny abscisové ve srovnání s jinými ošetřeními. Očkování zvýšilo čerstvou a suchou hmotnost nadzemní rostlinné hmoty a kořene, průměr stonku, hodnoty obsahu chlorofylu a plochu listů semenáčků zelí ve srovnání s kontrolní variantou. Největší vliv na vybrané parametry u rostlin zelí mělo naočkování *B. megaterium*, následně *P. agglomerans* a *B. subtilis*. López-Valdez et al. (2011) provedli skleníkový pokus, kde naočkovali semena slunečnice (*Helianthus annuus*, L.) bakterií *B. subtilis*. V rámci pokusu byl sledován vliv naočkování na stimulaci růstu rostlin, půdní vlastnosti a emise skleníkových plynů (oxid uhličitý, oxid dusný) u čtyřech variant (nenaočkovaná + nehnojená, nehnojená, hnojená močovinou, naočkovaná + hnojená močovinou). Kontrolní variantou byla nenaočkovaná semena slunečnice a nehnojená půda. Po jednom měsíci byla délka kořenů, čerstvé a suché hmotnosti kořenů slunečnice významně vyšší a delší u rostlin z varianty naočkované + hnojené, oproti ostatním variantám. Nicméně, při sklizni nebyl pozorován žádný pozitivní vliv mezi variantami na počet a hmotnost semen. Obsah celkového N v rostlině byl výrazně vyšší u varianty, která byla naočkovaná a hnojená močovinou, než u nenaočkovaných a nehnojených rostlin. Rychlost produkce CO₂ nebyla ovlivněna ošetřením, ale množství emisí N₂O bylo významně vyšší u variant, kde byla do půdy aplikovaná močovina. Závěrem této studie je fakt, že vliv aplikace *B. subtilis* na růst slunečnice byl pozitivní, ale jen dočasně. Rathi et al. (2015) uvádějí, že *B. subtilis* může být použit jako součást hnojiva využitelného v ekologickém zemědělství, aplikován na semena plodin nebo přímo do půdy, kde kolonizuje rhizosféru. Ačkoli jsou zveřejněny rozsáhlé zprávy o pozitivních účincích této bakterie na rostlinu (růst, výnos, odolnost proti onemocnění), nebyly tyto pozitivní účinky dosud dostatečně podloženy.

2.3. Bioefektory na bázi extraktů z rostlin

Jako biokontrolní činidlo lze také kromě živých mikroorganismů (bakterie, houby) využít také tzv. aktivní přírodní sloučeniny (výtažky z rostlin). Také v této kapitole je uvedeno a více popsáno několik zástupců z rostlinné říše, které jsou hojně využívány.

2.3.1. *Ascophyllum nodosum*

Ascophyllum nodosum jsou hnědé mořské řasy, které patří do skupiny *Phaeophyceae* a jsou bohatým zdrojem fenolických sloučenin s antioxidačními a antimikrobiálními vlastnostmi (Kadam et al., 2015b). Hnědé řasy jsou bohatým zdrojem biologicky aktivních sloučenin, jako jsou polysacharidy, peptidy, omega-3 mastné kyseliny, karotenoidy, fenolické látky, vitamíny a minerály. Laminarin je polysacharid zastoupený 0 - 35 % v sušině řas (Kadam et al., 2015a; Michalak et al., 2016). Řasy obsahují vysoké procento popelovin, dále bílkoviny, antioxidanty, minerální látky a anorganické soli absorbované z mořské vody (Rioux et al., 2007). Z pohledu zemědělství jsou považovány za alternativní organická hnojiva, novou generaci konkurenčních hnojiv a růstových stimulatorů oproti běžným agrochemikáliím (Kadam et al., 2015a; Elansary et al., 2016). Extrakty z mořských řas *A. nodosum* jsou určeny pro specifické rostlinné orgány - listy a kořeny. Extrakty mají pozitivní účinky při aplikaci do půdy, protože redukuje množství škodlivých bakterií, plísní, hmyzu a parazitů (Craigie, 2011). Dále Rayirath et al. (2009) publikují, že výtažek z hnědých mořských řas *A. nodosum* zvyšuje odolnost rostlin proti vlivům (stresovým faktorům) okolního prostředí, jako je sucho, zasolení a mráz. Podle Elansary et al. (2016) aplikace *A. nodosum* zlepšilo růst polních plodin, ovocných plodin a zelenin. Tyto studie rovněž uvádějí lepší růst, obsah chlorofylu, výnos ovoce, obsah sacharidu a odolnost vůči listovým a půdním patogenům.

Tandon a Dubey (2015) provedli studii, kde byl v polních podmínkách na sóju aplikován extrakt z *A. nodosum*. Zkoumali vhodnou dávku přípravku v kombinaci s hnojivem NPK a jeho účinky na obsah chlorofylu, počet trifoliálních listů, počet lusků, délku kořenů, výnos a další parametry. Aplikace *A. nodosum* výrazně ovlivnila počet trifoliálních listů, plochu listů a index listové plochy. Dále byl po aplikaci ovlivněn obsah chlorofylu. Závěrem této studie bylo, že použitím biostimulantů extrahovaných z *A. nodosum* lze optimalizovat použití minerálních hnojiv, čímž se sníží dopad znečištění životního prostředí a zvýší se úrodnost půdy. Použití takových biostimulantů musí být kombinováno se všemi dostupnými moderními agronomickými postupy a je jednou z možných alternativních strategií v zemědělství v budoucnu s cílem maximalizovat výnosový potenciál a kvalitu plodin. Sen et al. (2015) aplikovali *A. nodosum* (granule nebo postřik) v polních pokusech s pšenicí v kombinaci s plošnou aplikací N, P, K hnojiv. Aplikace *A. nodosum* zvýšila výnos sušiny, výnos slámy a zrna, obsah N v zrna a slámě oproti kontrolní variantě, kde byla aplikována pouze hnojiva. Vyšší obsah bílkovin v zrna byl u variant, kde byla *A. nodosum* aplikována formou postřiku, a nejvyšší obsah přístupných živin N, P, K pro rostlinu byl stanoven

u kontrolní varianty. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u variant, kde byl extrakt aplikován formou postřiku. Postřik extraktu z mořských řas stimuloval metabolické procesy v listu a podporoval rychlost fotosyntézy.

2.3.2. *Sapindus mukorossi*, popřípadě kombinace s jinými rostlinnými extrakty

Sapindus mukorossi (neboli mýdelník) je léčivý strom rostoucí od mírných po subtropické oblasti. Tento strom má šupinatou borku a lichožpeřené listy. Hlavní látky izolované z těchto rostlin jsou saponiny. Mýdelníky se již od starověku pěstují pro své plody, které obsahují velké množství saponinu. Tato látka je obsažena nejen v plodech, ale v menším množství v celé rostlině, která ho produkuje pro svou ochranu proti živočišným škůdcům. Účinky saponinů jsou však rovněž např.: antibakteriální, insekticidní nebo fungicidní (Upadhyay a Singh, 2012; Li et al., 2013; Heng et al., 2014). Výtažky z těchto rostlin obsahují polyfenolické látky (flavonoidy, antokyany, taniny a fenolické kyseliny) s variabilními fenolickými strukturami, které se souhrnně nazývají jako flavonoidy. Působí jako antioxidanty a vykazují antifungální a antimikrobiální vlastnosti, zejména proti gram-pozitivním bakteriím. Antioxidační vlastnosti rostliny jsou v přímém vztahu k výskytu a koncentraci různých typů fenolických sloučenin. Antioxidanty mimo jiné inhibují replikaci virů (Li et al., 2013; Heng et al., 2014; Singh a Kumari, 2015). Extrakt ze stromu *S. mukorossi* se také používá jako tzv. biosmáčedlo, což je jedna z nejpoužívanějších přírodních povrchově aktivních látek. Biosmáčedla mají velké výhody jako ekologická alternativa k syntetickým povrchově aktivním látkám (Tmakova et al., 2016) a jsou netoxické (Basu et al., 2015).

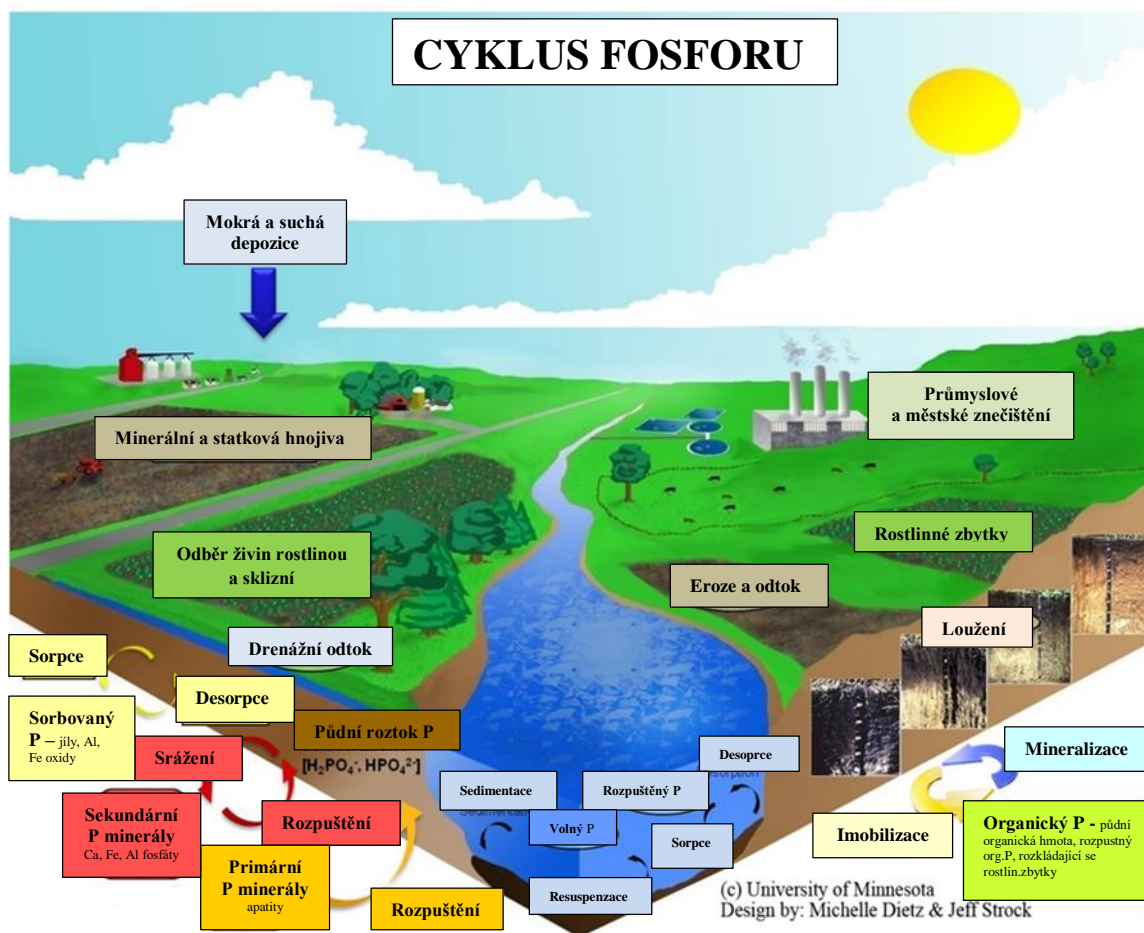
Barkatullah et al. (2015) provedli studii, která byla zaměřena na zkoumání alelopatického potenciálu vodných extraktů *S. mukorusii* proti plevelům *Pennisetum americanum* a *Setaria italica*. Pozorována byla účinnost vodných extraktů z listů a plodů o koncentracích 5 % nebo 10 %, extrakty horké vody, na intoxikaci půdy, klíčení, čerstvou a suchou hmotnost, a celkový růst testovaného druhu. Rostlinné výtažky významně inhibovaly klíčivost a celkový růst všech testovaných druhů. Aktivita extraktu závisela na koncentraci a době trvání extrakce. Nejvyšší aktivity byly tedy zaznamenány u extraktů s 10 % koncentrací. Výsledky ukázaly, že *S. mukorusii* je významně allelopatický vůči testovaným druhům a inhibuje jejich klíčení i celkový růst. Upadhyay a Singh (2011) zkoušeli molluskocidní aktivitu *Sapindus mukorossi* a *Terminalia chebula* práškem z plodů proti hlemýžďi *Lymnaea acuminata*. Aktivní složkou prášku byl saponin a kyselina třísllová. Molluscicidy rostlinného původu získávají zvláštní význam ve srovnání se syntetickými prostředky, protože jsou účinnější, levnější a bezpečnější pro necílové organismy.

2.3.3. *Quillaja saponaria*

Také endemický strom *Quillaja saponaria* rostoucí v Chile obsahuje množství triterpenoidních saponinů, které se z této rostliny izolují a využívají. Saponiny obsažené v této rostlině jsou používány jako zemědělská smáčedla. Jedná se o látky, které jsou využívány v hornictví, zemědělství, v koželužnictví, farmaceutickém, kosmetickém a potravinářském průmyslu. Prokázané vlastnosti těchto látek jsou: antioxidační, pesticidní, antimikrobiální, cytotoxické a imunostimulační. Protože výtažky z této rostliny dokáží inhibovat replikaci virového genomu, omezují tak šíření viru do neinfikovaných buněk a mají také účinek antivirový (Roner et al., 2007; Adiguzel Zengin, 2013; Grandon et al., 2013; Maier et al., 2015; Schlotterbeck et al., 2015). Saponiny se řadí do skupiny sekundárních rostlinných metabolitů, které se skládají ze sacharidové části, glykosidicky spojené s hydrofobním aglykonem (sapogeninem), které často vykazují insekticidní účinky (De Geyter et al., 2012).

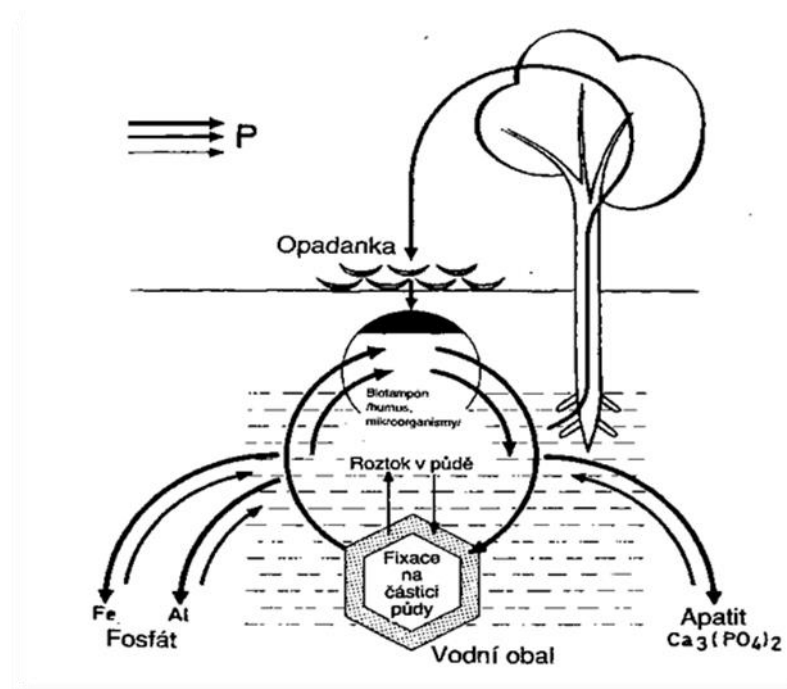
3. KOLOBĚH FOSFORU

Fosfor (P), je důležitou základní složkou energetického metabolismu všech forem života. Přírodní biogeochemický cyklus fosforu je masivní, ale velmi pomalý (obrázek 1). Lidská činnost (těžba, zemědělství, krmení zvířat, spotřeba domácností) výrazně zintenzivňuje přírodní cyklus fosforu, který má za následek některé vážné ekologické problémy, jímž dnes čelí moderní společnost. Zvláštní pozornost je věnována celkovému množství fosforu v zemědělské půdě, pohybu a transformaci fosforu v půdě, protože tyto fosforové toky v souvislosti s odvětvím zemědělství představují významné položky, které dominují antropogennímu cyklu fosforu. Výsledky ukazují, že globální vstup fosforu na zemědělskou půdu, a to jak anorganických a organických forem z různých zdrojů, nemohou kompenzovat odběr fosforu sklizní a ztráty erozí a odtokem. Čistá ztráta fosforu ze světové orné půdy se odhaduje na 10,5 milionu tun P ročně, což je téměř polovina fosforu vytěženého za rok (Mackey a Paytan, 2009; Liu a Chen, 2014).



Obr. 1: Cyklus fosforu (upraveno podle Dietz a Strock, 2010).

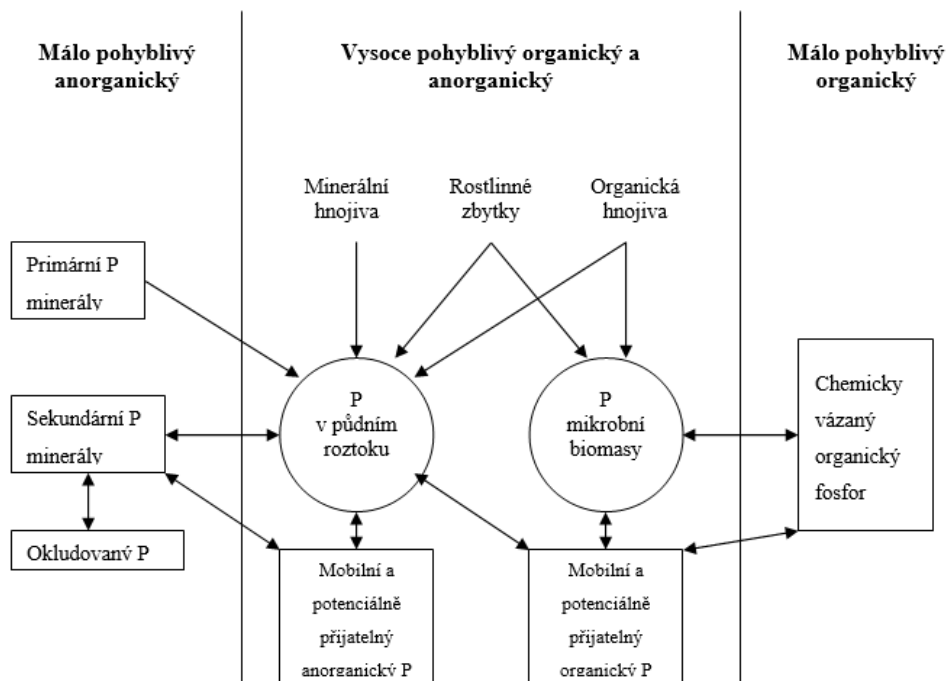
Cyklus fosforu je příkladem jednoduchého otevřeného koloběhu. Na obrázku 2 je znázorněn malý, uzavřený cyklus fosforu probíhající v rámci ekosystému. Fosfor je podstatnou částí protoplazmy, vstupuje do sloučenin s nukleotidy a nukleovými kyselinami a prochází ekosystémy v různých variantách. Jeho původním zdrojem je rozpad hornin, avšak některé horniny obsahují fosforu jen málo. Dobře je popsána fixace P v půdě ve formě, kterou rostliny nemohou asimilovat. Fosfor je zachycen ve formě nerozpustných sloučenin, ve velmi kyselém prostředí vzniká nerozpustný fosforečnan (fosfát) s Fe, Al a Mn, naproti tomu při nadbytku Ca se tvoří fosforečnan vápenatý (apatit) (Duvigneaud, 1988; Ruttenberg, 2014). Je-li půda bohatá na organickou hmotu a jsou-li v ní procesy díky aktivitě mikrobiálních populací rychlé, je půda stále znovu zásobována asimilovatelným P, který nemá čas se fixovat, tím spíše, že humus vytváří komplexy s Al a Fe a činí je neofenzivními. Tak humus spolu s pedoflorou regulují zásobování P ve fytocenóze, a tím i v celé biocenóze. To ovšem nezabraňuje ztrátám P vyluhováním, zvláště v erodované půdě, tyto ztráty jsou v menší míře výhodné, protože se tak zásobují vodní ekosystémy a umožňuje v nich vývoj živých organismů. Vzhledem k tomu, že zásoby P končí neodvratně na dně oceánu, je fosfor naléhavým problémem pro příští generace (Duvigneaud, 1988; Mackey a Paytan, 2009).



Obr. 2: Cyklus fosforu v ekosystému (upraveno dle Duvigneaud, 1988).

Fosfor je důležitý makroprvek a přesné stanovení frakcí fosforu v environmentálních matricích, jako jsou přírodní vody a půdy, je nezbytné pro pochopení biogeochemického

cyklu tohoto prvku (Worsfold et al., 2005). Biologická část cyklu P je řízena primárně bakteriálním a houbovým rozkladem, imobilizací a mineralizací a sekundárně odběrem rostlinami (Cross a Schlesinger, 1995). Mezi reakce ovládající cyklus P v půdě patří solubilizace, srážení, sorpce, desorpce, loužení, imobilizace a mineralizace. Např. desorpce je závislá na hodnotě pH. Pokud je hodnota pH vyšší, zvyšuje se desorpce a naopak. Sorpce a desorpce P je ovlivněna také koncentrací P v půdním roztoku a teplotou. Zvýšení koncentrace solí zvyšuje sorpci P a snižuje desorpci. Míra sorpce a desorpce P se zvyšuje s teplotou (Soinne, 2009; Nash et al., 2014). Obrázek 3. znázorňuje fakt, že v půdách se fosforečnany vyskytují v mnoha sloučeninách podle toho, z jakého zdroje a jakým způsobem se do půdy dostávají a v jaké fázi půdního cyklu se nachází (Stewart a Sharpley, 1987).



Obr. 3: Cyklus fosforu v půdě v závislosti na rychlosti jednotlivých přeměn (Kulhánek, 2006).

3.1. Fosfor v půdě

Larcher (1988), Orcutt a Nilsen (1996) uvádějí, že rostlinné živiny jsou v půdě obsaženy v roztoku nebo vázané. V půdním roztoku je rozpuštěn jen nepatrný podíl (méně než 0,2 %) celkové půdní zásoby živin. Asi 98 % biogenních prvků, obsažených v půdě, je uloženo v opadu, humusu a těžko rozpustných anorganických sloučeninách, nebo zabudováno v minerálech. Ty tvoří živinovou zásobu, která se stává přístupnou rostlinám velmi pomalu např. zvětráváním nerostů a mineralizací humusu. Zbývající 2 % živin jsou vázána na půdní koloidy.

Fosfor v půdě patří mezi nezastupitelné makrobiogenní prvky nezbytné pro růst a vývin rostlin a nemůže být nahrazen jiným prvkem. Přes jeho nezbytnost v rostlinném metabolismu je jeho obsah v půdě poměrně nízký (Schachtschabel et al., 1992; Mengel, 1996; Blume et al., 2002). Celkové množství fosforu v půdě kolísá mezi hodnotami 0,01 - 0,15 %. Vyšší obsah P vykazují půdy s vyšším obsahem organické hmoty. Zatímco půdy lehké s malým obsahem organické hmoty mají obsah P nízký (Vaněk et al., 2012). Dle Schillinga (2000) může být v půdách bohatých na humus toto rozmezí překročeno. Vyšší obsah fosforu je přítomen u většiny půd v povrchových vrstvách, protože se zde vyskytuje zvýšená biologická aktivita způsobující akumulaci organického materiálu.

Většina přístupného P pro rostliny se nachází ve vrchní vrstvě půdy, zhruba do 20 cm. Z této vrstvy také rostlina přijme největší množství P (Barber et al., 1988). Vyšší koncentrace P v povrchové vrstvě půdy je způsobena také aplikací P hnojiv a rozkladem rostlinných zbytků na povrchu půdy (Soenne, 2009). Fosfor, který se dostane do půdy, se v závislosti na podmínkách (především hodnotě pH a činnosti půdních mikroorganismů) velmi rychle váže s ionty Fe, Al a Ca a vytváří relativně stabilní sloučeniny anorganických fosfátových minerálů (apatity, vivianit, variscit, strengit). Fosfor se tedy stává součástí půdního sorpčního komplexu. Výhodou je, že tyto stabilní formy půdního fosforu lze najít v celém rozmezí hodnot pH různých půd. V zásaditých půdách tvoří P sloučeniny s vápníkem. V půdách s hodnotou pH 6 - 8,5 P reaguje s Ca a vzniká fosforečnan vápenatý, hydroxyapatit, nebo oktokalciium fosfát. V kyselých půdách tvoří P sloučeniny s železem a hliníkem. Celý proces je výsledkem chemických a biologických mechanismů v půdě a je ovlivněn množstvím různých faktorů (Gregory 2006; Nash et al., 2014). Ke zvýšené mobilitě sorbovaného fosforu může přispívat vyvápňení půd (Schachtschabel et al., 1992), ale i například aktivita půdních hub žijících v mykorhize (Jones et al., 1991). V přírodě se fosfor vyskytuje vždy ve svém nejvyšším oxidačním stupni, tj. pětimocný ve formě aniontu kyseliny fosforečné PO_4^{3-} .

(Vaněk et al., 2016). Ve sloučeninách pak téměř výhradně tvoří orthofosforečnany nebo v menším množství také pyrofosfáty (Mengel, 1991). Z hlediska vazeb P v půdě můžeme vytvořit tyto tři základní skupiny: anorganické sloučeniny fosforu, organicky vázaný fosfor a výměnně sorbovaný fosfor (Balík et al., 2002).

Množství P v půdním roztoku je extrémně nízké vzhledem k jeho snadné vazbě. Z tohoto důvodu, je fosfor obvykle druhou (za dusíkem) nejvíce limitující živinou pro rostlinný růst (Gardner et al., 1985). Podle McGechana a Lewise (2002) závisí množství fosforu vázané v jednotlivých frakcích v daném čase především na době aplikace hnojiva včetně vlivu i dříve provedených zásahů.

Poutání fosforu v půdě je podmíněno v podstatě třemi druhy sorpční schopnosti půdy:

1. *chemickou sorpcí* - srážení fosfátových iontů z půdního roztoku dvojmocnými kationty za vzniku méně rozpustných sekundárních anorganických fosfátů; s trojmocnými kationty mohou vznikat těžce rozpustné fosfáty,
2. *fyzikálně chemickou neboli výměnnou adsorpcí* - poutání fosfátových iontů na povrchu jílových a koloidních částic,
3. *biologickou sorpcí* - imobilizace fosforu životní činností organismů (Richter, 2007).

Z hlediska fosforu v půdě se příkládá největší význam chemické a výměnné sorpci (McGechan a Lewis, 2002). Macháček (2002) uvádí, že stupeň přístupnosti P rostlinám závisí na chemických, fyzikálně-chemických a fyzikálních vlastnostech daného typu půdy, na sezónní dynamice jejího vodního, vzdušného a teplotního režimu, na biologické aktivitě půdy, na druhu rostliny, atd.

3.1.1. Faktory ovlivňující obsah P v půdě

Vliv má často aplikace organických a minerálních hnojiv. Obsah půdního fosforu se však může měnit v závislosti na mateční hornině, textuře a jiných faktorech hospodaření (poměr a druh dodaného P a způsob kultivace půd). Uvedené vlivy pak působí i na relativní obsahy organických a minerálních forem fosforu (Ivanič et al., 1984; Sharpley, 1995; Nash et al., 2014). Nejen z hlediska ekologického nejsou na prvním místě důležité dávky minerálních hnojiv, ale jejich účinnost. Starší literatura uvádí, že například dusík z minerálních hnojiv je využitelný ze 60 % dodaného množství a fosfor je využíván až z 25 %. Tyto údaje platily snad při relativně nízké úrovni minerálního hnojení, kdy se množství použitých hnojiv počítalo na desítky kilogramů čistých živin NPK na hektar. V současnosti, kdy uvažujeme o dávkách NPK v řádové úrovni stovek kilogramů na hektar, musíme počítat s mnohem nižší účinností aplikovaných živin (Vrba a Huleš, 2007). Na množství organického fosforu v půdě mohou mít vliv přírodní (podnebí, vegetace, půdní typ) a antropogenní faktory (střídání

plodin a hnojení). Významným zdrojem organického P jsou také rostlinné a živočišné zbytky (Sims a Pierzynski, 2005). Faktorem ovlivňujícím dostupnost fosforu v půdě je také pedogeneze. Rovněž geochemické a biologické procesy mohou regulovat dostupnost fosforu v půdě. Ve většině přírodních ekosystémů mohou geochemické procesy rovněž ovlivnit dlouhodobou distribuci fosforu v půdě, ale v krátkodobém horizontu ovlivňují distribuci P v půdě převážně biologické procesy (Cross a Schlesinger, 1995). Samotná pedogeneze může být ovlivněna využíváním půdy a hospodařením s půdou (Soenne, 2009). Převážná část celkového P v půdách je pro rostliny nepřijatelná (Gardner et al., 1985; Voplakal, 2001; Vaněk et al., 2012). Fosfor je při nízkých hodnotách pH nedostupný díky přeměně na nerozpustné fosfáty železa a hliníku. Při vysokých hodnotách pH reaguje fosfor s vápníkem a stává se také nerozpustným (Gardner et al., 1985).

3.2. Formy fosforu v půdě

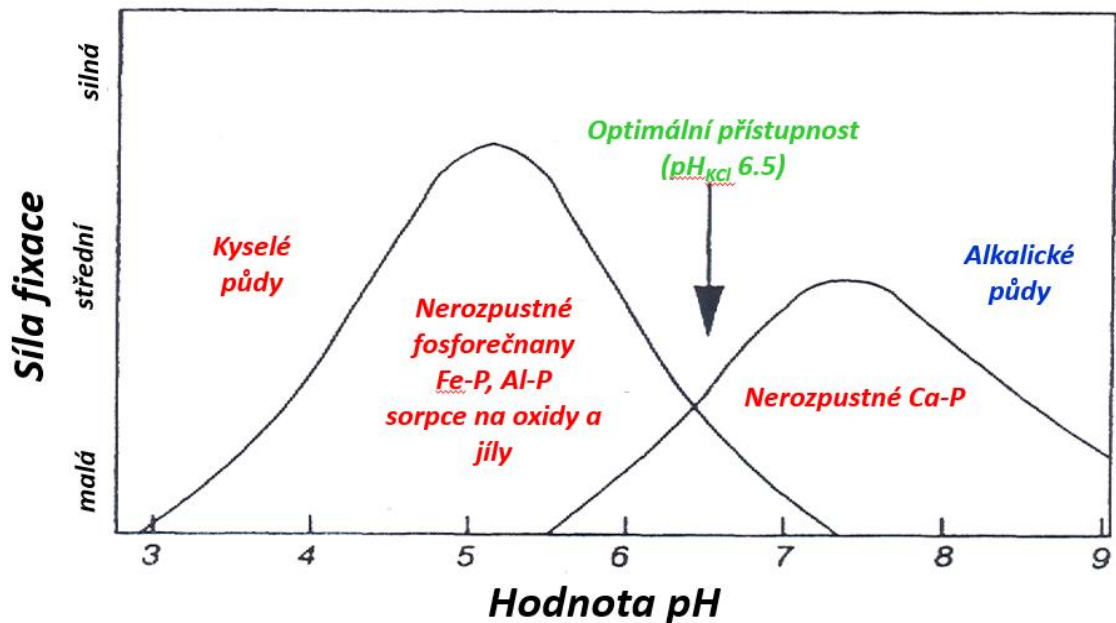
Z environmentálního aspektu je důležitá informace o celkové koncentraci rozpustných forem fosforu, tj. anorganického a organického, které jsou mobilní složkou v půdě, a tím i předmětem možného úniku fosforu z půdy pozemku (Matula, 2012). Jak již bylo řečeno, dynamiku půdního fosforu ovlivňuje velké množství faktorů biologických, chemických i fyzikálních. Výsledkem je množství různých forem půdního fosforu a velké množství jeho sloučenin. Z chemického hlediska lze formy fosforu rozdělit na organický, anorganický a celkový; z hlediska biogeochemického cyklu na labilní, dostupný a sorbovaný (Vaněk et al., 2016). V následujícím textu bude zaměřena pozornost zejména na fosfor anorganický a organický.

3.2.1. Anorganický fosfor

V půdě se vyskytují následující anorganické frakce fosforu:

1. půdní roztok obsahuje extrémně malé množství rozpustného fosforu, jako jsou ortofosfáty (HPO_4^{2-} a H_2PO_4^-),
2. fosfor obsažený v minerálech, jako např. apatity a Ca-, Mg-, Fe-, Al-fosfáty,
3. nestabilní zásoby složené z P absorbovaného na půdních koloidech a Fe- a Al-fosfáty v rovnováze s fosfátem v roztoku (Ivanič et al., 1984).

Přístupnost fosforu a iontová forma závisí na hodnotě pH (graf 1). V kyselých půdách je převládajícím iontem H_2PO_4^- a v půdě, která má pH vyšší než 7 převládá HPO_4^{2-} (Soenne, 2009).



Graf 1: Vliv pH na přístupnost fosforu v půdě (upraveno dle Troeh a Thompson, 2005).

Anorganický fosfor (P_i) zahrnuje apatity, sekundární sraženiny tvořené s Ca, Fe a Al a volné fosfátové ionty ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}). Apatit je primární minerál a je agronomicky nejvýznamnějším přirozeným zdrojem fosforu v půdě. Mezi anorganický fosfor patří také oxidy Fe, které jsou vázány v půdě na matrice, např. goetit (Compton a Cole, 1998). Fosfátové ionty $H_2PO_4^-$ jsou pro rostlinu dostupné při hodnotách pH 6,5 - 7,5 (Orcutt a Nilsen, 1996). Anorganický P se transformuje a následně začleňuje do organického fondu prostřednictvím biologického cyklu. Rostliny a mikroby čerpají P, který je potřebný pro jejich růst a po úhynu živých organismů se imobilizovaný P vrací zpět do půdy prostřednictvím mineralizace mikrobů (Soenne, 2009). Apatity se vyskytují rozptýleně ve všech magmatických horninách. Jsou to vápenaté sloučeniny sestávající se ze tří molekul $Ca_3(PO_4)_2$ a jedné molekuly chloridu, fluoridu nebo hydroxidu vápenatého a podle doprovodné sloučeniny se odvozuje jejich název - chlorapatit apod. V menší míře se vyskytují v půdách také primární minerály fosforečnanu železa a příměsí Mn - tripity nebo vodnaté fosforečnany hliníku - wavelity. V málo provzdušených, zamokřených půdách se také může vyskytovat fosforečnan železnatý - vivianit $Fe_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$. Zvětráváním apatitů i jiných primárních fosfátových minerálů se uvolňují anionty kyseliny ortofosforečné, které přecházejí do jiných, tzv. sekundárních, velmi rozmanitých forem minerální nebo organické povahy, z nichž některé slouží jako zdroj fosforu pro výživu rostlin. Sekundárními vysráženými a adsorbovanými fosforečnany - převažujícími anorganickými sloučeninami P v půdách slabě

kyselých až alkalických, jsou soli vápenaté, které vznikají v půdách při chemických reakcích původně rozpustných sloučenin, či uvolňováním kyseliny fosforečné: $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Tyto reakce mohou vést až ke vzniku apatitů. V neutrálních půdách nejčastěji vzniká stabilnější sloučenina nazývaná oktokalciumfosfát. V alkalickém prostředí ($\text{pH} \geq 7,5$) vznikají soli kationtů Ca a Mg, zejména hydroxylapatit. V kyselém prostředí ($\text{pH} \leq 6$) vzhledem ke zvyšující se rozpustnosti a přítomnosti iontů Al a Fe v půdním roztoku se tvoří soli těchto kationtů - variscit a strengit. Tvorba solí kyseliny fosforečné v půdě závisí na pH prostředí a má významný dopad na chování P v půdě a dostupnost P rostlinám. Minerální vápenaté sloučeniny P mohou za příznivých podmínek postupně uvolňovat P do půdního roztoku, a tím zajistit výživu rostlin. Sloučeniny Al a Fe mají naopak velmi malou rozpustnost a zvláště sloučeniny Fe jsou pro většinu rostlin nepřijatelné (Orcutt a Nilsen, 1996; Richter, 2007; Vaněk et al., 2012).

Podíl minerálních sloučenin fosforu v půdě značně kolísá v závislosti na druhu a typu půdy, hloubce profilu půdy, úrovni fosforečného hnojení a podobně. V našich podmínkách mírného pásma obsah fosforu v minerálních vazbách tvoří zpravidla více jak polovinu veškerého množství P v zemědělsky využívaných půdách. Převážná část minerálních sloučenin fosforu v půdě je ve formách ve vodě nerozpustných, a proto fosfor z těchto sloučenin je pro rostliny málo přístupný. Podíl vodorozpustných sloučenin je velmi malý a činí jen asi 0,8 - 8 mg P na 1 kg na vzduchu vyschlé půdy (Marschner, 2012). Tvoří je fosforečnany jednomocných kationtů, dihydrogenfosforečnan vápenatý aj. Kromě již zmíněných původních primárních minerálů se v půdě vytvořily v důsledku jejich zvětrávání nové sekundární fosfátové minerály. Děje se tak převážně chemickými reakcemi, tj. srážením volných fosfátových iontů v půdním roztoku, minerálními sorbenty, především ionty a aktivními sloučeninami Ca, Al a Fe. Tvorba a rovnovážný stav mezi jednotlivými formami minerálních fosforečnanů závisí také, a to ve značné míře, na půdní reakci. Se stoupající hodnotou pH se zvyšuje množství Ca-fosfátů (Richter, 2007; Vaněk et al., 2012).

Koloidní jílové částice a humusové látky přitahují ionty svými povrchovými náboji a poutají je vratnou vazbou. Půdní koloidy tak působí jako iontoměniče. Jak jílové minerály, tak humusové koloidy nesou záporné náboje, takže primárně poutají kationty. Na některých kladně nabitých místech se mohou hromadit anionty, ale sorpce kationtů vždy převyšuje sorpci aniontů. Silněji nabité ionty jsou zpravidla poutány pevněji, např. ionty Ca^{2+} oproti K^+ . Z iontů se stejným nábojem jsou ionty málo hydratované poutány pevněji než ionty více hydratované. Díky této adsorpční vazbě se na povrchích silně nabobtnalých jílových a humusových micel hromadí velká množství iontů. Tento iontový plášť znamená přechodné

stádium mezi pevnou půdní fází a půdním roztokem. Po přidání iontů nebo po jejich odběru z půdního roztoku nastává výměna iontů. Ionty pevněji poutané koloidními částicemi jsou jimi také silněji přitahovány a nahrazují na jejich povrchu jiné ionty, poutané volněji. Schopnost adsorpce klesá v řadě kationtů Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , K^+ , Na^+ a v řadě aniontů PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , NO_3^- a Cl^- (Larcher, 1988). Michalík (2001) uvádí, že rychlost příjmu jednotlivých iontů je různá. Vysoká rychlost příjmu je charakteristická pro ionty $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$, NH_4^+ , HPO_4^{2-} , NO_3^- , K^+ , Cl^- , naproti tomu Mg^{2+} , Ca^{2+} a SO_4^{2-} vstupují do buněk kořene relativně pomalu. Adsorpční vazba iontů minerálních živin má mnoho výhod. Živiny, uvolněné při zvětrávání nerostů a rozkladu humusu, jsou tak zachycovány a chráněny před vyplavením z půdy. Přitom se udržuje nízká a poměrně stálá koncentrace půdního roztoku (Larcher, 1988).

Jednotlivé formy anorganického fosforu je možné stanovit metodou sekvenční extrakce, která byla postupem času různě modifikována, jako např. metoda Chang a Jackson (1957) podle Hedley et al. (1982).

3.2.2. Organický fosfor

Organický fosfor představuje podstatnou část z celkového obsahu P v půdě. V jeho zastoupení jsou mezi různými půdami značné rozdíly (od 10 do 80 %). Z organických fosfátů, které byly v půdě identifikovány, nacházíme nejčastěji fytin (m-inositol-hexafosfát), dále fosfolipidy, nukleové kyseliny a nukleoproteidy, fosforylované pyrimidinové sloučeniny a fosforylované sacharidy. Největší část organicky vázaného P tvoří fytin a jeho soli fytáty, přičemž v kyselých půdách převládají fytáty železa a hliníku, v půdách zásaditých fytát vápníku. Fytin je chemicky velmi málo reaktivní a půdou téměř nemigruje. Je pokládán za potenciální zdroj P využitelného pro rostliny (Richter, 2007). Soli kyseliny inositolhexafosforečné (fytinu) - fytáty tvoří největší podíl (až 50 %) organicky vázaného fosforu (Balík et al., 2002). V půdách s travním porostem převládá organicky vázaný fosfor a dosahuje někdy až 80 % z veškeré zásoby P v půdě (Richter, 2007).

Orthofosforečnanové estery jsou sloučeniny, které mají esterovou vazbu spojující PO_4^{3-} skupinu s organickou částí a jsou dále rozděleny do mono- a diesterů v závislosti na počtu esterových skupin, připojené ke každé PO_4^{3-} skupině. Nejvíce zastoupenými estery ve většině půd jsou monoestery, včetně fosfátů sacharidů, fosfoproteinů, mononukleotidů a inositolfosfátů. Menší zastoupení v půdách mají diestery, včetně nukleových kyselin, fosfolipidů a aromatických sloučenin. Polyfosfáty, jako je ADP a ATP, patří také do skupiny sloučenin organického fosforu (Soenne, 2009; Nash et al., 2014). K organickým formám fosforu řadíme především relativně mobilní fosfolipidy, inosity a fulvokyseliny. Více

stabilní formy jsou pak zastoupeny huminovými kyselinami (Sharpley, 1995). Jednotlivé formy organického fosforu v půdě jsou ovlivněny geochemickými vlastnostmi půdy, fyzikálními a klimatickými faktory, včetně teploty a srážek. Neméně důležitým faktorem je také vliv pěstovaných plodin na dané půdě (Nash et al., 2014).

Fosforylované sacharidy, zejména triózy a hexózy a fosforylované pyrimidinové sloučeniny jsou biochemicky nejvýznamnější a nejreaktivnější organické sloučeniny P v půdě. Jsou nositeli velkých kvant biochemicky využitelné energie, která je potřebná při mnoha reakcích v půdě. Protože vazba mezi fosfátem a organickou složkou je bohatá na energii, je zároveň málo stabilní a fosfátový iont se z těchto látek snadno uvolňuje a stává se pro rostliny dobře využitelný (Richter, 2007). Rostliny přitom nejsou schopny přímo přijímat organicky vázaný fosfor. Při jeho rozkladu proto mají značný význam enzymy (fytázy) produkované rostlinami, mikroorganismy i hyfami mykorhizy (Balík et al., 2002).

Fosforylace a defosforylace organických látek jsou nejdůležitějším článkem přeměny energie v procesu látkového metabolismu v půdě. Zvýšené množství fosforu v půdě snižuje energetické ztráty (ve formě tepla) a zlepšuje produktivitu všech endoergických pochodů, především humifikaci. Tím fosfor působí na zlepšení bilance půdní organické hmoty a naopak půdní humus zlepšuje fyziologickou využitelnost fosforu z půdy i hnojiv, zejména tím, že jej chrání před reakcemi s Ca a těžkými kovy. Mechanismus tohoto účinku se většinou vysvětluje tvorbou chelátových vazeb mezi složkami půdního humusu a minerálními sorbenty fosfátových iontů. Ochranný účinek humusu na fyziologickou funkci půdního fosforu je tedy nepřímý, ale velmi významný a je podstatou tzv. „humusového efektu“, který se projevuje tím, že přijatelnost P rostlinami za přítomnosti humusových látek v půdním prostředí vzrůstá. Organicky vázaný fosfor může mít za určitých podmínek značný význam pro potenciální využitelnou zásobu P v půdě (Richter, 2007). Nahromaděný organický P je přístupný zvýšením aktivity fosfatázy a může také usnadnit uvolnění anorganického P v půdě s vysokou sorpční kapacitou (Compton a Cole, 1998).

3.3. Možnosti stanovení forem půdního fosforu

Základem různých forem fosforu v půdě jsou sloučeniny kyseliny trihydrogenfosforečné (H_3PO_4) a jen v menší míře vazby kyseliny difosforečné ($H_4P_2O_7$). Sloučeniny fosforu, sloužící jako potenciální zdroj pro výživu rostlin a půdních mikroorganismů, jsou minerální a organické.

Metody používané ke stanovení půdního fosforu se rozdělují podle sloučenin - forem půdního fosforu, které chceme stanovit, na tzv. kinetické metody, které tvoří samostatnou skupinu

a zabývají se stanovením ukazatelů dynamiky fosforu v půdě, a statické metody, mezi které řadíme:

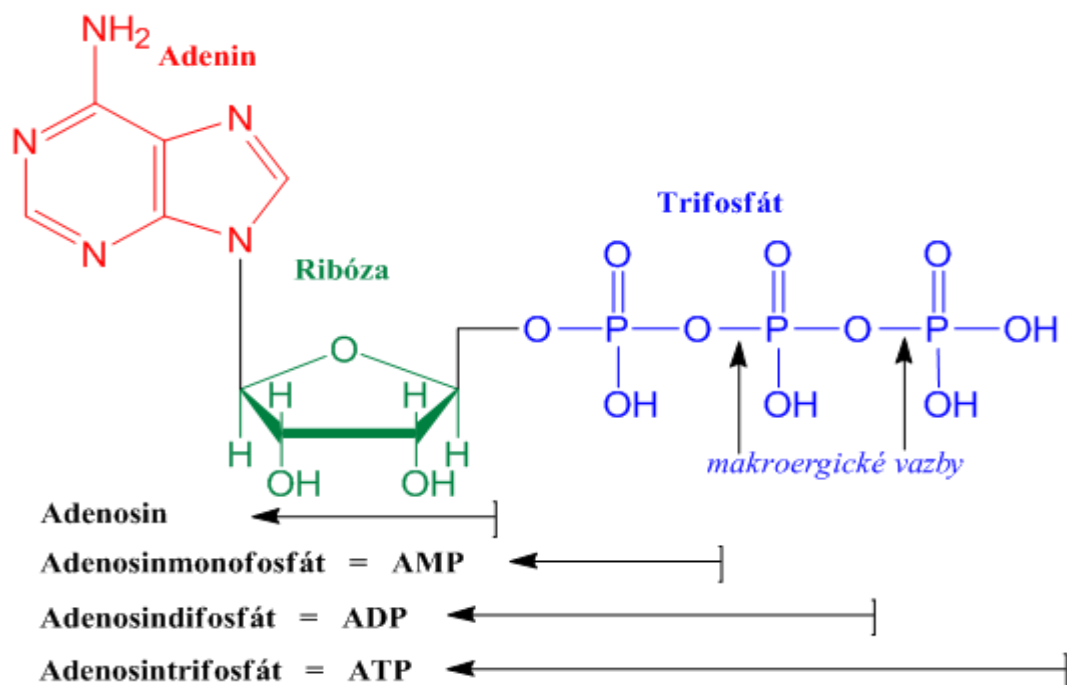
- metody ke stanovení celkového fosforu,
- metody ke stanovení fosforu vázaného v anorganických a organických sloučeninách,
- frakcionační stanovení fosforu vázaného v anorganických sloučeninách,
- metody pro stanovení různých forem přístupného fosforu (Macháček, 2002).

V dále uvedených kapitolách budou jednotlivé analýzy popsány podrobněji.

3.4. Fosfor v rostlině

3.4.1. Požadavky rostlin

Fosfor patří mezi esenciální prvky. Je potřebný pro rostlinu, aby její životní cyklus byl kompletní, a žádný jiný prvek ho nemůže nahradit. Fosfor se v rostlině vyskytuje např. v membránových fosfolipidech, nukleových kyselinách (DNA, RNA) a nukleotidech nebo adenosinfosfátech (ATP, ADP, AMP – obrázek 4). Je transportován buď jako anorganický fosfát, nebo jako fosfátový sacharid. Příjem fosforu je vyšší v místech výskytu mykorrhizy (Gardner et al., 1985; Michalík, 2001; Lack a Evans, 2005; Öpik a Rolfe, 2005; Ruttenberg, 2014).



Obr. 4: Strukturální vzorec adenosinfosfátů (Vaněk et al., 2016).

3.4.2. Příjem fosforu rostlinou

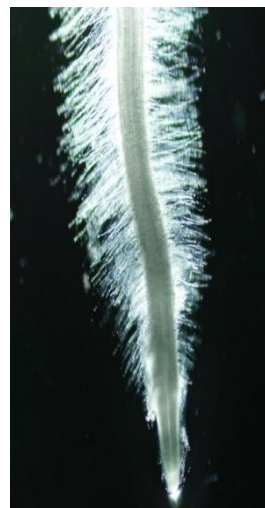
Rostlinná buňka tvoří složitý dynamický systém, který zahrnuje celou řadu vzájemně integrovaných a podmíněných subsystémů a prvků. Pro všechny živé systémy je nejcharakterističtější vlastností neustálá výměna látek a energie s vnějším prostředím. Pro dobrý růst a vývin rostlinné buňky musí rostlina nepřetržitě vykonávat činnost spojenou se spotřebou energie na zabezpečení celé řady životně nevyhnutelných pochodů. To platí také pro realizaci membránového transportu iontů a jejich akumulaci v cytoplazmě (NH_4^+ , K^+ , NO_3^- , H_2PO_4^- a HPO_4^{2-}) a transportu metabolitů a iontů v rámci buňky, pletiv a orgánů (Michalík, 2001). V příjmu vody a živin rostlinou hraje hlavní roli kořenový systém. Při omezeném příjmu živin lze očekávat nižší růst rostlin, ale také nižší výnosy. V limitujících podmínkách mohou rostliny vytvářet odlišné strategie pro získání živin z půdy: některé rostlinné druhy zvětšují velikost kořenového systému, zatímco jiné druhy zvyšují absorpční schopnost na jednotku kořene. Příjem iontů také závisí na selektivitě a genotypu. Některé minerální prvky jsou přijímány přednostně a jiné omezeně nebo vůbec. Mezi jednotlivými rostlinnými druhy jsou zřetelné odlišnosti v příjmu jednotlivých iontů. Nedostatečný příjem živin může být způsoben vysokými teplotami a nízkou půdní vlhkostí, ale také menším kořenovým systémem i samotným větvením kořenů (Mariotti a Ercoli, 1996; Gregory, 2006; Schröder et al., 2011). Dostatečná hustota kořenů a kořenových vlásků dokáže zachytit rozptýlené živiny (fosfor) v půdním prostředí, které jsou vzdálenější od povrchu kořenů (Gregory 2006).

Na obrázku 5 je znázorněn vliv P na strukturu kořenového systému. Vlevo je zobrazen kořenový systém, který je dostatečně zásobený P. Naopak, vpravo je kořenový systém, který má k dispozici omezené množství P. Tento fakt potvrdili např. u lupiny (López-Bucio et al., 2003).

Dostatek P



Mírný nedostatek P



Obr. 5: Vliv mírného nedostatku P na kořenový systém rostliny (Vaněk et al., 2016).

Je složité definovat přístupnost živin a vody pro rostlinu jednoznačně, protože příjem závisí na rostlinných a půdních vlastnostech, ale také na klimatických podmínkách a jejich interakcích (De Willigen a Van Noordwijk, 1987; Countinho et al., 1996).

Fosfor je přijímán rostlinami ve formě aniontů kyseliny trihydrogenfosforečné, převážně ve fosfátové formě H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} a PO_4^{3-} (Öpik a Rolfe, 2005; Vaněk et al., 2012). Fosfor je absorbován primárně jako jednomocný iont H_2PO_4^- a méně jako dvoumocný iont HPO_4^{2-} , který převládá při neutrálním pH nebo vyšším. Všeobecně platí, že anionty H_2PO_4^- a HPO_4^{2-} vstupují do vnitřního prostoru buněk aktivně v symportu s H^+ , anebo v antiportu s OH^- . Kořeny aktivně absorbují P z velice nízkých koncentrací v půdním roztoku. Fosfor je v rostlině pohyblivý, a je distribuován ze starších částí rostliny do mladších částí. Mladé listy nebo vyvíjející se plody mohou být vyživovány labilním P starších rostlinných pletiv i přesto, že je půdní zdroj P přerušen (Gardner et al., 1985; Larcher, 1988; Schilling, 2000; Michalík, 2001). I podle dalších autorů je příjem jednotlivých forem P silně závislý na hodnotě pH půdy (Gardner et al., 1985; Michalík, 2001; Vaněk et al., 2012). Kromě koncentrace P ve vnějším prostředí má na příjem fosfátů vliv také teplota prostředí, přítomnost aniontů, kationtů, inhibitorů, fyziologický stav rostliny a podobně. Snížení teploty na 2 - 4 °C výrazně snižuje příjem fosfátů i jejich metabolismus. Postupně v závislosti na čase jsou rostliny schopné částečně se přizpůsobit na podmínky snížené teploty, což se projevuje zvýšenou metabolickou přeměnou P (Michalík, 2001; Mackey a Paytan, 2009). Michalík (2001) uvádí pozitivní vliv kationtů Ca^{2+} a Mg^{2+} na příjem fosfátů, naopak K^+ snižuje jejich příjem, ale také transport do nadzemních orgánů. Mengel a Kirby (1987), Schröder et al. (2011) uvádějí, že výskyt

mykorhizy na kořenech rostlin přispívá k vyšší mobilizaci fosforu i za nepříznivých podmínek.

Fosfáty v rostlině nejsou redukovány. Kořenové buňky obsahují fosfátové přenašeče v plazmatické membráně, a buď jsou přijaty xylémovými cestami jako anorganický fosfor, nebo jsou esterifikovány přes hydroxylovou skupinu na sacharidy nebo jiné sloučeniny uhlíku. Fosfáty přijaté kořeny jsou rychle začleněny do fosfátových sacharidů nebo jsou propuštěny do xylému jako anorganický fosfor. Kořeny rostlin jsou často v symbiotickém sdružení s mykorhizními houbami, a tím jsou fosfáty z půdy lépe sorbovány. Fosfáty jsou nezastupitelnou složkou nukleových kyselin a mnoha součástí energetického a látkového metabolismu, které jsou využívány v celé rostlině (Larcher, 1988; Michalík, 2001; Lack a Evans, 2005).

V půdním roztoku je fosforu velmi málo, je proto důležité, aby se po jeho odčerpání z roztoku dostatečně rychle doplňoval z pevné fáze půdy. Rostliny jsou schopny přijímat fosfor i při velmi nízké koncentraci v půdním roztoku. Musí však překonávat značný koncentrační gradient. Příjem fosforu je aktivní proces, vyžadující dostatek energie (Vaněk et al., 2012). Orcutt a Nilsen (1996) uvádějí, že nedostatek Si v rostlině má za následek snížení začlenění P do ADP, ATP či fosforylovaných sacharidů, což ovlivňuje růst rostlin.

Při nízkých teplotách mohou mít rostliny k dispozici málo energie pro příjem P. Současně je značně omezena mineralizace organických sloučenin fosforu v půdě. Rostliny tak mohou přechodně vykazovat nedostatek P i při jeho dostatečném obsahu v půdě. Rostliny mají schopnost do určité míry příjem fosforu ovlivňovat. Pokud je v jejich pletivech jeho nedostatek, aktivují v membránách kořenů fosfatázy a přenašeče s vysokou afinitou k fosforečnanům s cílem zlepšit příjem P. Také mají snahu zvětšit prostor, ze kterého mohou fosfor získat zvýšeným růstem kořenů na úkor nadzemní biomasy a větším množstvím vlásečnicových kořínků. Vytvoření bohaté kořenové soustavy je důležitým předpokladem pro příjem fosforu. Zvyšuje se také kořenová sekrece, umožňující zvýšení rozpustnosti, a tím přijatelnosti P v rhizosféře. Rostliny vydávají do prostředí větší množství iontů H^+ a dále organické kyseliny (jablečná, citronová), které zvyšují rozpustnost fosforečnanů. Byl zaznamenán také výdej vysokomolekulárních látek, enzymů, které s mikroflórou uvolňují fosfor z organických sloučenin. Zvýšená sekrece jednodušších organických látek (aminokyseliny, sacharidy) působí příznivě na vyšší výskyt mikroorganismů, včetně mykorhizy. Na příjem fosforu rostlinami působí příznivě dostatečná vlhkost půdy, hodnota pH půdy, dostatek organických látek v půdě, dobrá biologická činnost a samozřejmě přiměřený obsah přijatelného P v půdě (Vaněk et al., 2012). Viditelné symptomy nedostatku

fosforu jsou poněkud opačné oproti N a S. Listy rostlin jsou tmavě zelené až modrozelené a rostliny jsou zakrnělé. Na starších listech je vidět nedostatek živiny jako první, vzhledem k přesunu P do mladších pletiv. Dalšími příznaky nedostatku jsou poruchy reprodukčních procesů (zpožděné kvetení), menší vzrůst, tmavě zelené nebo bronzově fialové zbarvení listů (obrázek 6), u jehličnanů zasychnutí špiček jehlic (Larcher, 1988).



Obr. 6: Projevy nedostatku P u kukuřice - nádobový pokus s bioefektory 2013 (Holečková, 2013).

Dlouhodobý deficit fosforu vyvolává hluboké poruchy fosforečného a dusíkatého metabolismu, což způsobuje snížení syntézy bílkovin a zvýšení podílu nízkomolekulárních N-sloučenin, zejména amidů, volných nukleotidů, alantoinů. Dlouhodobý deficit také snižuje celkový příjem a jeho metabolismus a následně také intenzitu transportu fosforu z kořenů do nadzemních orgánů. Do určité míry jsou rostliny schopné adaptovat se na podmínky nízké hladiny fosforu tím, že vytvářejí dodatečné kořeny. Je také známo, že pokud rostliny rostou v podmínkách nízké hladiny živin, potom živiny potřebné pro růst a vývoj získávají z vnějšího prostředí. Ve vztahu k fosforu rostliny mají schopnost vyrovnávat stálou hladinu cytoplazmatického P, která je soustavně doplňována díky jeho příjmu z vnějšího prostředí a translokací z jiných částí rostliny. Z hlediska zabezpečení optimálního výživného režimu v polních podmínkách, důležitá úloha připadá na vodní režim v půdě. Dobré vláhové podmínky se projevují na zvýšení migrace fosfátů v půdě, ale zároveň optimální vodný režim

buňky bezprostředně ovlivňuje i funkční procesy buňky, spojené s akumulací fosfátů. Deficit vody natolik sníží příjem P, že jeho koncentrace v xylémovém exudátu se vyrovná vnějšímu prostředí. Stres způsobený vodním deficitem způsobuje plazmolýzu buněk, destrukci plazmodezem a následkem toho se ruší aktivní transport fosfátů do cytoplazmy. Za těchto podmínek se příjem P uskutečňuje převážně pasivně (Michalík, 2001).

Hnojení fosforem zvyšuje nejen výnosy a příjem P, ale také prodlužuje délku kořenů. Zvýšený příjem P rostlinou může být způsoben vyšší koncentrací fosforu v médiu, prodloužením kořenů nebo oběma případy (Richter, 2004; Vaněk et al., 2012; Zhang et al., 2012). Li et al. (2009) uvádějí, že deficiencie P v půdě často způsobuje rostlinám narušení vodního režimu a samotný transport vody v důsledku snížení kořenové hydraulické vodivosti a zvýšené produkce ethylenu. Také Radersma et al. (2005) uvádějí souvislost vodního režimu s deficiencí fosforu. Nižší obsah vody v půdě způsobil u kukuřice pokles dostupnosti P ke kořenům, následně pokles úrody, snížení kořenového růstu a současně růstu plodin. Redukce vodního režimu a suchá půda může způsobit také nedostupnost mikrobiálního fosforu v půdě rostlinám, ale opětovným dodáním vody do půdy může dojít opět ke zvýšení přístupnosti P (Tang et al., 2014a).

V osvojovací schopnosti zemědělských plodin jsou značné rozdíly. Mezi plodiny s nízkou schopností patří cibule, česnek, rajče, brambory a kukuřice. Na druhou stranu extrémní osvojovací schopnost vykazuje řepka olejka, která je schopna dosahovat dobrých výnosů i při nízké zásobě labilního fosforu v půdě. Většina fosforu osvojeného řepkou je z více jak 80 % uložena v semenu, a tím je výnosem semene transportována sklizní z pozemku. Půda je ochuzovaná o dostupné formy P. V případě, že se výživnému stavu půd nevěnuje patřičná pozornost, řepka je plodinou, která má schopnost snižovat zásobu fosforu v půdě až do deficitní oblasti pro ostatní plodiny (Matula, 2012).

3.4.3. Absorpce a transport P

Absorpce iontů je považována za první etapu příjmu živin. Konkrétně absorpce fosforu může být proces aktivní, který vyžaduje energii, nebo pasivní. Během aktivní sorpce pronikají ionty cytoplazmatickou membránou, díky energeticky bohatým fosfátovým vazbám, které jsou produkovány dýcháním. Uskutečňuje se proti koncentračnímu gradientu transportované látky, a proto se vyžaduje spotřeba metabolické energie a vždy se ho účastní membránové bílkoviny. Tento aktivní transport (vykonávají jej iontové pumpy) je závislý na procesech - respirace a fotosyntézy - dodávajících energii buďto přímo, prostřednictvím membránových potenciálů vytvářených elektronovým tokem, anebo nepřímo hydrolýzou ATP. Pasivní transport se děje po koncentračním spádu, i když velmi často rostlina musí hromadit ionty

a dopravovat je proti koncentračnímu spádu. Mezi mechanismy pasivního transportu patří tyto: difúze, osmóza, elektroosmóza, Donnanova rovnováha, ulehčená difúze. Celková kapacita pasivní absorpce má dvě složky: 1) vnější prostor definovaný jako dutiny v kořenovém pletivu a mezibuněčné prostory, 2) volný prostor - buňky vystavené iontům ve vodě ve vnějším prostoru. Propustnost membrány je dána její anatomickou stavbou a chemickou strukturou. Přítomnost určitého typu fosfolipidů určuje rozdílný stupeň přístupnosti (Gardner et al., 1985; Larcher, 1988; Michalík, 2001). Dále se transport iontů realizuje přes různé kompartmenty buňky a membrány, které do určité míry plní úlohu „bariéry“ pro ionty vstupující do vnitřní části buňky. Pro příjem živin, a zvláště to platí pro ionty dusíku a fosfátové ionty, je charakteristická selektivita a genetická podmíněnost. Z kvantitativního aspektu je příjem živin závislý na struktuře a uspořádání pletiva kořene, ekologických podmínkách a metabolické aktivitě kořenového systému. Díky soustavnému růstu kořenů, a tím také zvětšováním adsorpčního povrchu, se nepřetržitě vytvářejí nové podmínky pro příjem živin z dalších prostorů v půdě. I přesto, že mnohé procesy příjmu živin mají všeobecnou platnost, nevylučuje se specifický průběh procesů ve vztahu k jednotlivým konkrétním iontům. Vzhledem ke značné heterogenitě pletiv a buněk kořenového systému, rozdílné chemické struktury a biologické funkce jednotlivých iontů, konkrétním agroekologickým podmínkám, během kterých se uskutečňuje příjem iontů a fyziologické a biologické aktivitě buněk kořenového systému, není možné formulovat univerzální mechanismus příjmu iontů, který by platil pro různé ionty a zohledňoval různé podmínky výživy. Všeobecně platí, že příjem a transport živin v kořeni je selektivní proces, který je významnou složkou udržování rovnováhy iontů v kořeni. Kořeny rostlin se musí přizpůsobovat různým koncentracím iontů ve vnějším prostředí tím, že mění režim jejich příjmu. Mimo jiné, buňky kořenů rostlin ve snaze zachovat stálou hodnotu pH cytoplazmy regulují příjem a vylučování iontů (Michalík, 2001).

3.5. Mykorhiza

Mykorhiza je symbiotické společenství mezi kořeny rostlin a houbou, kdy sacharidy (organický C) vytvořené při fotosyntéze jsou transportovány do kořenů a jsou převzaty houbami a živiny jsou absorbovány houbovými hyfami z půdy a jsou převedeny do rostlin. Velká většina rostlin, přes 90 %, využívá tohoto společenství při získávání živin. Při mykorhizním procesu dochází k vylučování enzymů a příjmu živin. Mykorhizní houby interagují s ostatními houbami v půdě, inhibují volně žijící houby podílející se na rozkladu rostlinné hmoty, a tak mohou preventivně chránit rostlinu před patogenní houbou nebo

napadením bakteriemi. Tvorba mykorhizních společenství se vyskytuje u většiny kvetoucích druhů polních plodin a to je velice přínosné. Na půdách s nízkým obsahem minerálních živin a bez mykorhizy, rostou plodiny podstatně méně a mají nižší toleranci vůči stresu. Vyskytují se ale také rostlinné druhy, které jsou s mykorhizou spojeny velice vzácně. Jedná se hlavně o druhy plevelů, brukvovité (*Brassicaceae*), merlíkovité (*Chenopodiaceae*) a třtiny (*Carex* spp.). Mykorhiza je vysoce efektivní při absorbování živin z půdy, zvláště u dusíku, fosforu a zinku. Zdroje dusíku a fosforu jsou často lokálně omezeny a houbové hyfy jsou schopny absorbovat tyto živiny efektivněji a z mnohem větší rozlohy půdy, než samotné kořeny, což vede ke zvýšení růstu rostlin (Orcutt a Nilsen, 1996; Lack a Evans 2005; Gregory 2006; Öpik a Rolfe, 2005; Balík et al., 2008). Stribley et al. (1980) provedli studii, kde byl pozorován vliv mykorhizy na odběr P rostlinou, na 10 různých půdách a v kombinaci s přídatkem 5 různých dávek P. U mykorhizních rostlin došlo k lepšímu růstu nadzemní hmoty rostlin, ale také k vyšší koncentraci P v rostlinných pletivech.

Nezávisle na existujících rozporných názorech je možné konstatovat, že kořenová mykorhiza je schopná se aktivně zúčastňovat procesů zpřístupňujících fosfáty z nerozpustných sloučenin. Díky tomu, že mycelium částečně proniká přes buněčnou stěnu kořenových vlásků a vniká do pletiva, zvyšuje celkový adsorpční povrch kořenového systému (Michalík, 2001).

Nejběžněji se vyskytující mykorhiza je **arbuskulární mykorhiza (AM)**, známá také jako endomykorhiza nebo vesikulo-arbuskulární mykorhiza. Tento typ mykorhizy se vyskytuje u 70 % rostlin (Orcutt a Nilsen, 1996). Gregory (2006) uvádí, že AM se vyskytuje u téměř 80 % mykorhizních rostlin, zahrnujících keře, stromy, byliny nebo trávy. U AM proniknou houbové hyfy přes buněčnou stěnu do kortexu kořene a tvoří hmotu zkroucených a rozvětvených hyf uvnitř buněk, známé jako arbuskuly. AM se vyskytuje u většiny bylenných rostlin, tropických stromů a některých dřevin mírného pásma. Mnoho rostlin s AM může přežít bez mykorhizy, zvláště na půdách bohatých na živiny (Lack a Evans 2005; Öpik et al., 2005). Díky tomuto typu mykorhizy kořeny rostlin produkují širokou škálu organických látek (organické kyseliny, enzymy, růstové hormony, sacharidy, ...), které se uvolňují do půdního okolí rostliny (Orcutt a Nilsen, 1996). Např. fytázy a další kyselé fosfatázové enzymy jsou uvolňovány poměrně ve velkém množství mnoha mikroorganismy, a tím dojde ke zpřístupnění organických forem P, jako jsou fytáty, což může být až 50 % celkového půdního P (Gregory 2006).

Druhým nejrozšířenějším typem mykorrhizy je **ektomykorrhiza (EM)**, při které houbové hyfy tvoří hustou hmotu kolem vnějších krátkých absorpčních kořenů, ale nepronikají do buněčných stěn. Tento typ mykorrhizy se vyskytuje zhruba u 10 % rostlin (Orcutt a Nilsen, 1996). A to zejména u jehličnanů, hlavně u borovicovitých (*Pinaceae*), břízovitých (*Betulaceae*) či bukovitých (*Fagaceae*), u stromů mírného pásma a některých tropických stromů, rostoucích zejména na půdách živinami chudých a kyselých. Rostliny s EM mohou přežít v případě, pokud alespoň v určité části jejich životního cyklu jsou s tímto společenstvím spojené. Rostliny s ektomykorrhizou jsou schopny strávit organickou hmotu tvořenou organickým dusíkem a fosforem, který je za běžných podmínek nedostupný pro rostliny. To je obzvláště důležité na půdách kyselých a chudých na živiny, ve kterých tyto mykorrhizy umožňují rostlinám absorbovat téměř všechny živiny jako dostupné pro rostliny (Orcutt a Nilsen, 1996; Lack a Evans 2005; Öpik et al., 2005; Gregory 2006). Mezi další druhy mykorrhizy, které se rostlin vyskytují, ale méně často patří erikoidní a orchideoidní (Balík et al., 2008; Brundett, 2009).

Fosfor v půdě je pro většinu rostlin špatně dostupný. Lépe a rychleji však P přijímají mykorrhizní rostliny, které akumulují P ještě lépe, pokud dochází k větvení a rozšiřování jejich kořenového systému. Mykorrhizní rostliny dokáží absorbovat až 3 krát více P během stejného období, oproti nemykorrhizním rostlinám (Orcutt a Nilsen, 1996). Kořeny v podstatě mobilizují dříve nedostupný P tím, že vesikulo-arbuskulární houby vylučují organické kyseliny, a tím rozpouští půdní P. Většina P (80-90 %) zůstává naakumulována v houbových hyfách. Tento P se může mobilizovat a transportovat do rostliny v případě deficiencie (Orcutt a Nilsen, 1996).

4. HYPOTÉZY A CÍLE

4.1. Hypotézy

Po aplikaci bioefektorů do půdy předpokládáme vyšší mobilizaci fosforu z hůře dostupných forem v půdě, a tím i zvýšení výnosů, obsahu P v nadzemní hmotě rostlin i jeho odběru zejména na stanovištích, kde je fosfor limitujícím prvkem.

Aplikace bioefektorů ovlivní i dostupnost dalších makro- a mikroprvků. To povede k jejich zvýšenému obsahu v nadzemní hmotě rostlin i k jejich zvýšenému odběru.

V ekologickém zemědělství je možno používat pouze fosforečná hnojiva s obtížně přístupným P - mleté fosfáty. Proto lze předpokládat velmi pomalé uvolňování P z těchto hnojiv. Aplikace bioefektorů spolu s těmito P-hnojivy povede k rychlejšímu uvolňování P, a tím i k lepší výživě a vyššímu odběru P rostlinou, na stanovištích s jeho nedostatkem.

Po lokální injektážní aplikaci N-hnojiva metodou CULTAN, vznikne stabilní N-Depo v půdě. Rostlinné kořeny porostou směrem k depu. Při aplikaci BE mezi osivo a depo dojde při prorůstání kořenů směrem k depu k jejich snadnější inokulaci.

Většina studií zabývajících se bioefektory spočívá ve výsledcích laboratorních testů, popřípadě nádobových pokusů. V polních pokusech lze však předpokládat odlišné, méně průkazné výsledky.

4.2. Cíle práce

Cílem této disertační práce je posoudit vliv aplikace bioefektorů samotných nebo v kombinaci s P-hnojivy při pěstování rostlin (kukuřice, pšenice) a jejich vliv na výnos, růstové parametry nadzemní a kořenové části rostlin, odběr vybraných prvků rostlinou a obsah prvků v nadzemní hmotě rostlin, a to v rámci nádobových a polních pokusů.

5. METODIKA PRÁCE

V této části jsou podrobně popsány veškeré pokusy, které byly v rámci této práce uskutečněny, přičemž je na konci této kapitoly uveden seznam zkratk plynoucích z metodické části. Většina pokusů byla založena podle společných metodik projektu Bioefektor.

5.1. Nádobové a polní pokusy

5.1.1. Nádobový pokus 2013 (pokus 1)

Součástí experimentní části bylo založení nádobového pokusu 6.6.2013, kdy bylo do nádob o objemu 5 litrů zaseto vždy 5 zrn kukuřice (*Zea mays*, odrůdy *Colisée*, KWS, Basilej, Švýcarsko). Půda byla získána ze stanoviště v Humpolci (pokusná stanice VÚRV, Humpolec), ze stejného pozemku, ze kterého byla odebrána půda také v následujícím roce. Podrobnější popis stanoviště, včetně souřadnic odběru zemin, je uveden v tabulce 4 (Humpolec A).

Substrát byl dle metodiky projektu sestaven z půdy (kambizem) a křemenného písku v poměru 2:1 (3225 g půdy + 1665 g písku), čímž došlo ke snížení obsahu P (Mehlich 3) na velmi nízký (49 mg P/kg). Každá varianta byla realizována v pěti opakováních. Po dvou týdnech pěstování byly rostliny kukuřice vyjednoceny na finální počet tří rostlin na nádobu. Ke všem variantám byla aplikována stejná dávka N (0,5 g N/nádobu) a K (0,85 g K/nádobu). Dusík byl dodán ve formě dusičnanu vápenatého (DV) a draslík v podobě K-hnojiva Patentkali (Ptk) při založení pokusu. Podrobný popis variant je uveden níže, v tabulce 3.

Tab. 3: Schéma nádobového pokusu 2013.

č.v.	Označení varianty	N	P	K	BE1	BE3
			(g/nádobu)			(ktj/nádobu)
1.	BE0 + NK	0,5	-	0,85	-	-
2.	BE1 + NK	0,5	-	0,85	1,12 x 10 ⁸	-
3.	BE3 + NK	0,5	-	0,85	-	8,75 x 10 ⁸
4.	BE0 + JSP + NK	0,5	0,25	0,85	-	-
5.	BE1 + JSP + NK	0,5	0,25	0,85	1,12 x 10 ⁸	-
6.	BE3 + JSP + NK	0,5	0,25	0,85	-	8,75 x 10 ⁸
7.	BE0 + TSP + NK	0,5	0,25	0,85	-	-
8.	BE1 + TSP + NK	0,5	0,25	0,85	1,12 x 10 ⁸	-
9.	BE3 + TSP + NK	0,5	0,25	0,85	-	8,75 x 10 ⁸

BE0 – voda, BE1 – Trium P, BE3 – RhizoVital 42, JSP – jednoduchý superfosfát, TSP – trojitý super fosfát

Vzhledem k tomu, že v rámci tohoto pokusu, měly být testovány tři bioefektory, z nichž jeden (Proradix - BE2) byl dodán o dva týdny později, a na místo mletého fosfátu byl dodán jednoduchý superfosfát, jsou podrobněji vyhodnoceny pouze růstové parametry. Dle původního plánu pokusů bylo cílem testovat vliv aplikace bioefektorů na mobilizaci P z mletého fosfátu. Firmou LANDOR (Švýcarsko) byl chybně doručen jednoduchý superfosfát se stejným obsahem P, a proto byla metodika upravena na testování jednoduchého superfosfátu.

Bioefektory byly aplikovány v místně zasetého zrna ve formě zásobního roztoku v dávce 25 ml na nádobu (5 ml zásobního roztoku na každé zrno). Výše uvedené bioefektory byly testovány v kombinaci s P-hnojiv: jednoduchý superfosfát (JSP) a trojitý superfosfát (TSP), v dávce 0,25 g P/nádobu. Všechny varianty byly srovnávány s kontrolními, složenými z neaktivního bioefektoru (vody ve stejném objemu jako aplikovaný roztok BE) a uvedených P-hnojiv, včetně neaktivního bioefektoru s P nehnojenou variantou. Rostliny byly v pravidelných intervalech měřeny a po sklizni byla vážena a hodnocena nadzemní část i kořenová část rostliny. Nadzemní biomasa i kořeny byly po sklizni, která proběhla 7.8.2013 dále sušeny a zpracovány pro následné analýzy.

5.1.2. Nádobový pokus 2014 (pokus 2 a 3)

Také v roce 2014 byl založen nádobový pokus, konkrétně 30.4.2014. Do nádob o objemu 5 litrů bylo zaseto vždy 5 zrn kukuřice (*Zea mays*, odrůdy *Colisée*). Půda byla získána ze stanovišť Humpolec a Lukavec (pokusná stanice VÚRV, Humpolec). Podrobnější popis stanošť, včetně souřadnic odběru zemin pro pokus, je uveden v tabulce 4.

Tab. 4: Klimatické a půdní vlastnosti stanovišť Humpolec A a Lukavec A.

	Humpolec A	Lukavec A
Stanoviště a jeho souřadnice	(49°33'14'' s.š.; 15°21'00'' v.d.)	(49°34'17'' s.š.; 14°59'20'' v.d.)
Průměrná roční teplota (°C)	7,0	7,7
Průměrné roční srážky (mm)	665	666
Nadmořská výška (m.n m.)	525	610
Půdní typ	kambizem	kambizem
Půdní druh	písčito-hlinitá	hlinito-písčitá
pH_{CaCl2}	5,7	5,4
Obsah P_{Mehlich3} (mg/kg)	80 (vyhovující obsah)	120 (vysoký obsah)

Substrát byl stejně jako v předchozím roce, namíchan z půdy (kambizem) a křemenného písku v poměru 2:1 (3325 g suché půdy + 1665 g písku). Tím se snížil obsah P na stanovišti Humpolec na velmi nízký (48 mg P/kg) a na stanovišti Lukavec na vyhovující (80 mg P/kg) Každá varianta byla realizována v pěti opakováních. Po dvou týdnech pěstování byly rostliny kukuřice vyjednoceny na finální počet tři rostlin na nádobu. Ke všem variantám byla aplikována stejná dávka N (0,5 g N/nádoba) a K (0,85 g K/nádoba). Dusík byl dodán ve formě dusičnanu vápenatého (DV) a draslík v podobě K-hnojiva Patentkali (Ptk). V pokusu byly testovány tři bioefektory v kombinaci se dvěma P-hnojivy (0,25 g P/nádoba). Jako bioefektory byly použity: BE0 - voda (stejný objem vody, jako bioefektorového roztoku), BE1 -Trianum P, BE2 - Proradix a BE3 - RhizoVital 42.

Bioefektory byly aplikovány lokálně pipetou, 5 ml ke každému zrnu (25 ml/nádoba). Výše uvedené bioefektory byly testovány v kombinaci hnojivy: mletý fosfát (MF) a trojitý superfosfát (TSP), kterými byla dodána stejná dávka P. Všechny varianty (tabulka 5) byly srovnávány s kontrolními, složenými z neaktivního bioefektoru (vody) a uvedených P hnojiv, včetně neaktivního bioefektoru s P nehnojenou variantou.

Tab. 5: Schéma nádobového pokusu 2014 pro stanoviště Humpolec A i Lukavec A.

č.v.	Označení varianty	N	P	K	BE1	BE2	BE3
			(g/nádoba)			(ktj/nádoba)	
1.	BE0 + NK	0,5	-	0,85	-	-	-
2.	BE1 + NK	0,5	-	0,85	1,12 x 10 ⁸	-	-
3.	BE2 + NK	0,5	-	0,85	-	9,08 x 10 ⁹	-
4.	BE3 + NK	0,5	-	0,85	-	-	8,75 x 10 ⁸
5.	BE0 + MF + NK	0,5	0,25	0,85	-	-	-
6.	BE1 + MF + NK	0,5	0,25	0,85	1,12 x 10 ⁸	-	-
7.	BE2 + MF + NK	0,5	0,25	0,85	-	9,08 x 10 ⁹	-
8.	BE3 + MF + NK	0,5	0,25	0,85	-	-	8,75 x 10 ⁸
9.	BE0 + TSP + NK	0,5	0,25	0,85	-	-	-
10.	BE1 + TSP + NK	0,5	0,25	0,85	1,12 x 10 ⁸	-	-
11.	BE2 + TSP + NK	0,5	0,25	0,85	-	9,08 x 10 ⁹	-
12.	BE3 + TSP + NK	0,5	0,25	0,85	-	-	8,75 x 10 ⁸

BE0 – voda, BE1 – Trianum P, BE2 – Proradix, BE3 – RhizoVital 42, MF – mletý fosfát, TSP – trojitý super fosfát

Rostliny byly v pravidelných intervalech měřeny a po sklizni byla vážena a hodnocena nadzemní část i kořenová část rostliny. Nadzemní biomasa i kořeny byly po sklizni, která proběhla 13.8.2014, dále sušeny a zpracovány pro následné analýzy.

5.1.3. Polní pokusy 2014 (pokus 4 a 5)

Ve stejných oblastech (Humpolec a Lukavec, pokusná stanice VÚRV), kde byla odebrána půda pro nádobový pokus, byly provedeny také polní pokusy. V tabulce 6 je uvedena charakteristika výše uvedených stanovišť, včetně jejich souřadnic.

Tab. 6: Klimatické a půdní vlastnosti pokusných stanovišť Humpolec B a Lukavec B.

	Humpolec B	Lukavec B
Stanoviště a jeho souřadnice	(49°33'14'' s.š.; 15°21'24'' v.d.)	(49°34'20'' s.š.; 14°59'18'' v.d.)
Průměrná roční teplota (°C)	7,0	7,7
Průměrné roční srážky (mm)	665	666
Nadmořská výška (m.n m.)	525	610
Půdní typ	kambizem	kambizem
Půdní druh	písčito-hlinitá	hlinito-písčitá
pH_{CaCl2}	5,1	4,8
Obsah P_{Mehlich3} (mg/kg)	77 (nízký obsah)	75 (nízký obsah)

Polní pokusy byly založeny 23.4.2014 na stanovišti v Humpolci, 25.4.2014 na stanovišti Lukavec a byly realizovány obdobně jako pokusy nádobové (schéma v tabulce 7). Testovanou rostlinou byla rovněž kukuřice (*Zea mays*, odrůdy *Colisée*) a její výsevek byl 95 tis. zrn na hektar. V tomto polním pokusu byl rovněž hodnocen vliv aplikace bioefektoru v kombinaci s P-hnojivem. Během polního pokusu byly na parcelky o výměře 31,5 m² aplikovány dva bioefektory: BE2 - Proradix a BE3 - RhizoVital 42. Bioefektory byly aplikovány buď samostatně, nebo v kombinaci s mletým fosfátem (MF) a trojitým superfosfátem (TSP), s dávkou P 26 kg/ha v obou hnojivech. Pokusy byly hnojeny jednotně dusíkem (120 kg N/ha v LAV) a draslíkem (50 kg K/ha v Ptk) při seti. Pro účely polního pokusu byly založeny stejné kontrolní varianty jako u nádobového pokusu. Bioefektory byly aplikovány dvěma způsoby. Prvním způsobem byla plošná aplikace 9 litrů roztoku bioefektoru na parcelu: 22,7 kg/ha Proradixu a 2 l/ha RhizoVitalu (dávka na parcelu byla ředěna v 9 litrech vody). Plošná aplikace byla provedena bezprostředně po výsevu. Proradix 6,6x10¹⁰ ktj/parcela, RhizoVital 2,5x10¹⁰ ktj/parcela. Druhým způsobem byla lokální aplikace injektážním aplikátorem GFI 3A (Maschinen und Antriebstechnik GmbH, Güstrow, Německo), který aplikuje roztok do hloubky cca 10 cm. Touto technikou bylo aplikováno 10x nižší množství Proradixu 2,27 kg/ha a nižší dávka 1,5 l/ha RhizoVitalu. Lokální aplikace byla

provedena ve fázi 5. rozvinutého listu. Všechna hnojiva byla zapravena do půdy před setím, do hloubky 10 cm. Polní pokus byl sklizen 18.9.2014 na stanovišti v Humpolci a 21.9.2014 na stanovišti v Lukavci.

Tab. 7: Schéma polního pokusu 2014, s aplikacemi bioefektorů a hnojiv.

č.v.	Označení varianty	Aplikace	BE2 (kg/ha) BE3 (l/ha)	N	P (kg/ha)	K
1.	Nulová kontrola	0	0	120	0	50
2.	Kontrola (BE0)	plošná	0	120	0	50
3.	MF	plošná	0	120	26	50
4.	TSP	plošná	0	120	26	50
5.	BE2 + MF	plošná	22,7	120	26	50
6.	BE2 + TSP	plošná	22,7	120	26	50
7.	BE2 + MF	lokální	2,27	120	26	50
8.	BE2 + TSP	lokální	2,27	120	26	50
9.	BE3 + MF	plošná	2	120	26	50
10.	BE3 + TSP	plošná	2	120	26	50
11.	BE3 + MF	lokální	1,5	120	26	50
12.	BE3 + TSP	lokální	1,5	120	26	50

BE0 – voda, BE2 – Proradix, BE3 – RhizoVital 42, MF – mletý fosfát, TSP – trojitý super fosfát

Z každé varianty bylo sklizeno 20 průměrných rostlin ze dvou středních řad každé parcelky ke zjištění výnosu. Reprezentativní vzorek tří vybraných rostlin z každé parcelky byl usušen a jemně namlet pro další analýzy.

5.1.4. Screening experiment 2015 (pokus 6)

Vzhledem k neprůkazným účinkům bioefektorů byl v květnu 2015 založen rozsáhlejší nádobový pokus, při kterém bylo testováno 11 bioefektorů. Pokus byl realizován ve vegetační hale v období 24.5. - 10.6.2015, a testovací rostlinou byla kukuřice (*Zea mays*, L., odrůda Colisée). Kukuřice byla pěstovaná v 0,5kg na vzduchu usušené zemině odebrané ze stanoviště Bubnov (okres Žamberk). Podrobnější informace o lokalitě s velmi nízkým obsahem P, kde byla půda odebrána, se nacházejí v tabulce 8. Do každé nádoby byla zasetá 4 zrna kukuřice a 30.4.2015 byly rostliny vyjednoceny dvě rostliny na nádobu.

Tab. 8: Klimatické a půdní vlastnosti stanoviště Bubnov

Stanoviště a jeho souřadnice	Bubnov	
	(50°08'39'' s.š.; 16°30'53'' v.d.)	
Průměrná roční teplota (°C)	8,1	
Průměrné roční srážky (mm)	675	
Nadmořská výška (m.n m.)	590	
Půdní typ	kambizem	
Půdní druh	hlinito-písčítá	
pH _(CaCl₂)	5,2	
Obsah P _{Mehlich3} (mg/kg)	22 (nízký obsah)	

Dávky bioefektorů byly použity dle pokynu výrobce a byly aplikovány v kombinaci s hnojivy (čistírenský kal - ČK, tuhá frakce digestátu - TFD a mletý fosfát - MF). Tyto varianty byly hodnoceny proti kontrolním variantám, bez hnojiva. Schéma pokusu je uvedeno níže, v tabulce 9.

Tab. 9: Schéma zkušebního nádobového pokusu v roce 2015.

č.v.	Označení BE	Varianta	BE0	ČK	TFD	MF
1.	BE0	Kontrola	✓	✓	✓	✓
2.	BE2	Proradix	✓	✓	✓	✓
3.	BE3	RhizoVital 42	✓	✓	✓	✓
4.	BE4	RhizoVital 45	✓	✓	✓	✓
5.	BE5	Muci	✓	✓	✓	✓
6.	BE6	RhizoVital 42 + Muci	✓	✓	✓	✓
7.	BE7	Super Fifty	✓	✓	✓	✓
8.	BE8	NemaTec	✓	✓	✓	✓
9.	BE9	LamVita	✓	✓	✓	✓
10.	BE10	Biological Fertilizer OD	✓	✓	✓	✓
11.	BE11	OMG (<i>Trichoderma</i>)	✓	✓	✓	✓
12.	BE12	Combi-Product (<i>Trichoderma harzianum</i> + <i>B. subtilis</i> + Zn + Mn)	✓	-	-	✓

BE0 – voda, ČK – čistírenský kal, TFD – tuhá frakce digestátu, MF – mletý fosfát

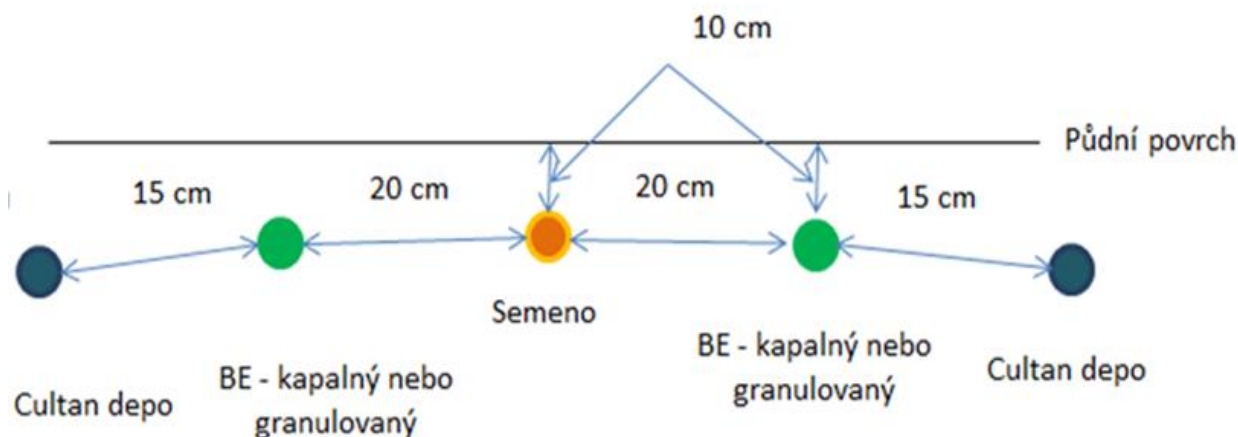
Každá varianta byla provedena ve čtyřech opakováních. Ke všem variantám bylo aplikováno stejné množství dusíku ve formě roztoku dusičnanu amonného (0,05 g N/nádobu). Dávka fosforu v dodaných hnojivech byla vypočtena vždy na 0,015 g P na 0,5 kg zeminy, tj. na nádobu. Dávka dusíku a fosforu činila součet přidávaných hnojiv a roztoků. Ke kontrole fosfor přidáván nebyl. Jednocení ze čtyř rostlin na dvě proběhlo 30.4.2015. Sklizeň pokusu se konala 10.6.2015. Rostliny byly usušeny, namlety a použity pro další analýzy.

5.1.5. Polní pokus 2015 (pokus 7)

Dne 18.5.2015 byl založen polní pokus 7 na stanovišti v Humpolci (pokusná stanice VÚRV, v.v.i.). Podrobnější popis pokusného stanoviště je uveden v tabulce 6 (Humpolec B) Testovací rostlinou byla kukuřice (*Zea mays*, L. odrůdy *Colisée*). Založeno bylo 14 variant (tabulka 10) ve čtyřech opakováních, přičemž výměra jednotlivých parcelek byla 31,5 m². Během polního pokusu byly na parcelky aplikovány dva bioefektory: BE2 - Proradix a BE3 - RhizoVital 42. Jednotlivé varianty jsou podrobně popsány níže.

Hlavním cílem polního pokusu bylo ověřit strategii aplikace bioefektorů pro úsporu nákladů. Bioefektory byly vždy aplikovány v pásech (hloubka 10 cm) do řádků vedle semen (obrázek 7).

Obr. 7: Princip lokální aplikace metodou



V pokusu byly použity dvě formy bioefektorů: 1) kapalina (BE2/BE3 kap), kde aplikační dávka byla 9 litrů roztoku na parcelu nebo 2) granulovaná forma (BE2/BE3 gran), kde byly granule vyrobeny postříkem zásobního roztoku PDX/RV na pemzu 0 - 3 mm, Palkowitschia sro, Česká republika). Konečná dávka BE2 byla vždy 2,27 kg/ha a BE3 1,5 l/ha. Bioefektory byly aplikovány 4 dny po zasetí kukuřice a byly kombinovány se třemi způsoby hnojení

dusíkem: 1) 80 kg N/ha 3 dny před výsevem + 60 kg N/ha u 2-3 rozvinutých listů (N1), 2) lokální aplikace 140 kg N/ha pomocí strategie CULTAN ve fázi 2-3 rozvinutého listu (obrázek 7; lokální N) a 3) 80 kg N/ha ve fázi 2-3 rozvinutého listu + 60 kg N/ha (N2). Dusík byl dodán plošně ve formě ledku amonného s vápencem (LAV) a lokální aplikací, metodou CULTAN ve formě dusičnanu amonného s močovinou (DAM).

Cílem metody CULTAN je tvorba zásobárny, neboli tzv. “depa” amoniakálního dusíku v půdě za použití vysokotlakého vstřikování. Kořeny rostlin rostou kolem depa, což snižuje toxicitu amoniaku. V důsledku toho je příjem N kontinuální a rostliny mají zásobu N k dispozici po celou dobu vegetace, což šetří náklady ve srovnání s běžně používanou opakovanou aplikací N (Sommer, 2005).

Tab. 10: Schéma polního pokusu 2015, s aplikacemi bioefektorů a hnojiv

č.v.	Označení varianty	BE aplikace	BE2 (kg/ha)/ BE3 (l/ha)	N (kg/ha)	N aplikace
1.	Kontrolní varianta	-	0	0	-
2.	N1	-	0	80 + 60 + 0	plošná
3.	N2	-	0	0 + 80 + 60	plošná
4.	Lokální N	-	0	0 + 140 + 0	lokální
5.	N1 + BE2 kap	lokální	2,27	80 + 60 + 0	plošná
6.	N1 + BE3 kap	lokální	1,5	80 + 60 + 0	plošná
7.	N1 + BE2 gran	lokální	2,27	80 + 60 + 0	plošná
8.	N1 + BE3 gran	lokální	1,5	80 + 60 + 0	plošná
9.	Lokální N + BE2 kap	lokální	2,27	0 + 140 + 0	lokální
10.	Lokální N + BE3 kap	lokální	1,5	0 + 140 + 0	lokální
11.	Lokální N + BE2 gran	lokální	2,27	0 + 140 + 0	lokální
12.	Lokální N + BE3 gran	lokální	1,5	0 + 140 + 0	lokální
13.	N2 + BE2 kap	lokální	2,27	0 + 80 + 60	plošná
14.	N2 + BE3 kap	lokální	1,5	0 + 80 + 60	plošná

N1 - 80 kg N/ha 3 dny před setím + 60 kg N/ha ve fázi rozvinutého 2-3 listu, N2 - 80 kg N/ha ve fázi rozvinutého 2-3 listu + 60 kg N/ha, BE2 - Proradix, BE3 – RhizoVital, kap – kapalná forma, gran – granulovaná forma

Pokus byl sklizen 11.9.2015. Z každé varianty bylo sklizeno 20 rostlin ze dvou středních řad každého pozemku pro odhad výnosu silážní kukuřice. Reprezentativní vzorek tří vybraných rostlin z každé parcely byl usušen a jemně namlet pro další analýzy.

5.1.6. Polní pokus 2016 (pokusy 8 a 9)

V roce 2016 byly založeny polní pokusy s kukuřicí (odráda KXB 4132 – Kartagos, KWS, Velké Meziříčí, ČR). Jednotlivé pokusy byly založeny na stanovišti v Lípě (9.5.2016, ÚKZÚZ, Brno) a v Humpolci (10.5.2016, VÚRV, v.v.i., Praha-Ruzyně).

Podrobnější popis pokusných stanovišť je uveden v tabulce 11.

Tab. 11: Klimatické a půdní vlastnosti pokusných stanovišť Humpolec C a Lípa.

	Humpolec C	Lípa
Stanoviště a jeho souřadnice	(49°33'20'' s.š.; 15°21'11'' v.d.)	(49°33'43'' s.š.; 15°32'10'' v.d.)
Průměrná roční teplota (°C)	7,0	7,7
Průměrné roční srážky (mm)	665	632
Nadmořská výška (m.n m.)	525	505
Půdní typ	kambizem	kambizem
Půdní druh	písčito-hlinitá	hlinito-písčitá
pH_{CaCl2}	5,7	5,9
Obsah P_{Mehlich3} (mg/kg)	71 (nízký obsah)	72 (nízký obsah)

Celý pokus zahrnuje 13 variant a každá varianta byla založena ve čtyřech opakováních. Velikost jedné parcelky byla 30 m² (3 x 10 m, 4 řádky na parcelku) a schéma pokusu je uvedeno tabulce 12. Aplikace bioefektorů a hnojiv je popsána níže. Celá dávka dusíku byla vypočítána na 190 kg N/ha. Na základě obsahu půdního N_{min} (29,3 kg/ha) bylo aplikováno pouze 161 kg N/ha minerálních hnojiv. Dusičnan vápenatý (DV) byl použit z regionálních zdrojů (LOVOCHEMIE, Lovosice, Česká republika) a síran amonný s inhibitorem nitrifikace DMPP NovaTec (SA). Celková dávka dusičnanu vápenatého byla rozdělena na dvě dílčí (107 kg N/ha před výsevem a 54 kg N/ha ve stádiu pátého vyvinutého listu). První (větší) dávka byla aplikována krátce před setím jako zdroj dostupného N pro klíčící rostliny. Druhá dávka byla aplikována během vegetace, aby byl zajištěn přísun N během vegetace. Celková dávka síranu amonného byla aplikována 9.5.2016 nebo 10.5.2016, krátce před výsevem.

Příjem amonné formy N rostlinami či mikroorganismy a její přeměna na formu amidickou vede k vyloučení H⁺ iontů organismy do rhizosféry. Z tohoto důvodu může dojít ke zlepšení solubilizaci Ca-fosfátů jako vedlejšího efektu (Neumann a Römheld, 2002).

Tab. 12: Schéma polního pokusu 2016, s aplikací bioefektorů a hnojiv.

č.v.	Označení varianty	BE	N-hnojivo	N (kg/ha)	P-hnojivo	P (kg/ha)
1.	0 + 0 + 0	0	0	0	0	0
2.	0 + DV + 0	0	DV	107+54	0	0
3.	0 + SA + 0	0	SA	161	0	0
4.	0 + DV + MF	0	DV	107+54	MF	130
5.	0 + SA + MF	0	SA	161	MF	130
6.	0 + DV + TSP	0	DV	107+54	TSP	130
7.	0 + SA + TSP	0	SA	161	TSP	130
8.	BE2 + DV + MF	plošně	DV	107+54	MF	130
9.	BE2 + SA + MF	plošně	SA	161	MF	130
10.	BE5 + DV + MF	plošně	DV	107+54	MF	130
11.	BE5 + SA + MF	plošně	SA	161	MF	130
12.	BE13 + DV + MF	plošně	DV	107+54	MF	130
13.	BE13 + SA + MF	plošně	SA	161	MF	130

DV - dusičnan vápenatý, SA - síran amonný s inhibítorem nitrifikace, MF - mletý fosfát, TSP - trojitý superfosfát, BE2 - Proradix, BE5 - MUCI, BE13 - CombiFect A

Fosfor byl aplikován jako granulovaný fosfát - Granuphos 18 % P₂O₅ (7,9 % P - LANDOR, Birsfelden, Švýcarsko) v dávce 130 kg P/ha, a to 9.5. nebo 10.5.2016, krátce před výsevem kukuřice. Jako kontrolní varianta byl aplikován trojitý superfosfát (21% P) při stejné aplikační dávce a době. V pokusu byly aplikovány tři bioefektory: BE2 - Proradix, BE5 - Muci a BE12 - CombiFect A.

Příprava a aplikace bioefektorů byla následující:

Proradix - 65 g na parcelu (30 m²), CombiFect A - 3 g na parcelu, a Muci - 450 ml na parcelu, byly aplikovány vždy ředěné v 10 l vody na parcelu. Bioefektory a hnojiva byly zapraveny do půdy (10 cm hloubka) s výsevem.

Hodnocené parametry byly: výška rostlin po 10 týdnech vegetace (19.7.2016), výnos nadzemní biomasy silážní kukuřice ve stádiu mléčné zralosti 13.9.2016 (Lípa) a 14.9.2016 (Humpolec), obsah vybraných makro a mikroprvků v nadzemní biomase. Příjem makro a mikroživin byl počítán z výnosu sušiny kukuřice a obsahu živin v nadzemní biomase.

5.1.7. Nádobový pokus 2017 (pokus 10)

V roce 2017 byl založen nádobový pokus s pšenicí jarní (*Triticum aestivum* L., odrůda *Granny*), která byla zasetá 12.4.2017 do hloubky 2,5 cm při množství 25 zrn na nádobu. Objem nádob byl 5 litrů, a celková hmotnost sušiny substrátu měla 5 kg. Substrát pro testovanou rostlinu byl připraven smícháním zeminy a křemenného písku v poměru 2:1. Zemina byla odebrána na stanovišti Cítov (okr. Mělník). Podrobnější informace o stanovišti, kde byla odebrána půda do pokusu, jsou uvedeny v tabulce 13.

Tab. 13: Klimatické a půdní vlastnosti stanoviště Cítov.

Stanoviště a jeho souřadnice	Cítov (50°23'01'' s.š.; 14°25'98'' v.d.)
Průměrná roční teplota (°C)	7,7
Průměrné roční srážky (mm)	632
Nadmořská výška (m.n m.)	505
Půdní typ	černozem
Půdní druh	hlinitá
pH_{CaCl2}	7,7
Obsah P_{Mehlich3} (mg/kg)	14,4 (nízký obsah)

Celý experiment obsahuje 9 variant (tabulka 14) v šesti opakováních. Do všech nádob byl v době zakládání pokusu ve stejné dávce aplikován dusík (1,5 g N/nádoba) ve formě dusičnanu amonného (DA). A dále bylo do vybraných variant aplikováno P-hnojivo (0,25 g P/nádoba) ve formě mletého fosfátu (MF) nebo trojitého superfosfátu (TSP - 21% P, Unicom, Čáslav). Podrobnější popis jednotlivých variant je znázorněn v tabulce 15. Každá varianta měla 6 opakování. Po zasetí rostlin byly lokálně aplikovány do hloubky 10 cm bioefektory: BE2 - Proradix v dávce 135 mg/nádoba a BE13 - CombiFect B v dávce 200 mg/nádoba. Po 9 dnech byly všechny nádoby vyjednoceny na 20 rostlin na nádobu a 6x během vegetace byla provedena randomizace. Pokus byl sklizen 4.7.2017.

Tab. 14: Schéma nádobového pokusu 2017.

č.v.	Označení varianty	N- hnojivo	Množství N g/nádoba	P-hnojivo	Množství P g/nádoba	BE
1.	BE0 + DA + 0	DA	1,5	0	0	0
2.	BE0 + DA + MF	DA	1,5	MF	0,25	0
3.	BE0 + DA + TSP	DA	1,5	TSP	0,25	0
4.	BE2 + DA + 0	DA	1,5	0	0	BE2
5.	BE2 + DA + MF	DA	1,5	MF	0,25	BE2
6.	BE2 + DA + TSP	DA	1,5	TSP	0,25	BE2
7.	BE13 + DA + 0	DA	1,5	0	0	BE13
8.	BE13 + DA + MF	DA	1,5	MF	0,25	BE13
9.	BE13 + DA + TSP	DA	1,5	TSP	0,25	BE13

DA - dusičnan amonný, MF - mletý fosfát, TSP - trojitý superfosfát, BE0 - voda, BE2 - Proradix, BE13 - CombiFect B

5.2. Analytická stanovení

Z uvedených pokusů byly průběžně odebrány vzorky půdy a rostlinného materiálu, které byly následně analyzovány na obsah vybraných prvků.

U vstupních vzorků i u vzorků odebraných během vegetace i po sklizni byly uskutečněny následující analýzy:

- Vodný výluh - stanovení obsahu P v půdním roztoku.
- Mehlich 3 - metoda normovaná v ČR pro stanovení přístupného P, K, Ca a Mg v zemědělských půdách (Mehlich, 1984).

V neposlední řadě byly monitorovány výnosové ukazatele sledovaných plodin, případné rozdíly v zaplevelení, podíly sušiny rostlin z jednotlivých variant, celkové obsahy P v nadzemní hmotě a kořenech rostlin.

V níže uvedené tabulce 15 je uveden souhrn analýz a procesů, které byly provedeny během všech uskutečněných pokusů.

Tab. 15: Souhrn prací na pokusech

Pokus	Rok	Mehlich 3*	Hmotnost nadzem. části	Hmotnost kořen. části	Suchý rozklad	Výška rostlin	Fosfatáza
Pokus 1	2013	✓	✓	✓	✓	✓	
Pokus 2	2014	✓	✓	✓	✓	✓	
Pokus 3	2014	✓	✓		✓		
Pokus 4	2014	✓	✓		✓		
Pokus 5	2015	✓	✓	✓	✓	✓	
Pokus 6	2015	✓	✓		✓		
Pokus 7	2015	✓	✓		✓		
Pokus 8	2016	✓	✓		✓		
Pokus 9	2016	✓	✓		✓		
Pokus 10	2017	✓	✓	✓	✓	✓	✓

* metoda byla použita pouze u vstupních odběrů pro stanovení obsahu prvků

5.2.1. Analýzy půdy

Vodný výluh

Extrakty jsou zhotoveny dle Luscombe et al. (1979). K 10 g vzorku je doplněno 50 ml demineralizované vody. Vzorky jsou třepány 2 hodiny a následně filtrovány. Vzniklé extrakty jsou analyzovány. Takto připravený vzorek je analyzován optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES, Varian VistaPro, Victoria, Austrálie, dále jen ICP-OES).

Stanovení fosforu metodou Mehlich 3.

Vzorek pro stanovení P metodou Mehlich 3 byl připraven následujícím postupem. Byl použit extrakční roztok dle Mehlich (1984) složený z CH_3COOH ($c = 0,2 \text{ mol/l}$), NH_4F ($c = 0,015 \text{ mol/l}$), HNO_3 ($c = 0,013 \text{ mol/l}$), NH_4NO_3 ($c = 0,25 \text{ mol/l}$) a EDTA ($c = 0,001 \text{ mol/l}$). Poměr zeminy a vyluhovadla činil 1:10 (10g zeminy, 100 ml vyluhovadla). Třepání probíhalo po dobu 10 min. Takto získaný roztok byl filtrován a následně byly extrakty analyzovány na obsah fosforečnanů. Obsah fosforečnanů byl opět měřen ICP-OES.

Stanovení kyselé fosfatázy

Stanovení kyselé fosfatázy bylo provedeno dle metodiky Tabatabai a Bremner (1969). Principem této metody je inkubace půdy v roztoku s p-nitrofenylfosfátem (PNP-P) a obsah vzniklého p-nitrofenolu je stanoven spektrofotometricky.

5.2.2. Analýzy rostlin

Rozklad na suché cestě

Rozklad na suché cestě se skládá ze čtyř základních kroků - sušení, zuhelnění, zpopelnění a loužení popela. Do křemenných kádinek je navážen 1 g vzorku, poté jsou kádinky přemístěny na teflonovou plotnu a překryty hodinovými sklíčky. Teplota plotny je po každé hodině zvyšována. Nejprve je nastavena na $160 \text{ }^\circ\text{C}$, dále na $220 \text{ }^\circ\text{C}$, $280 \text{ }^\circ\text{C}$, až na $350 \text{ }^\circ\text{C}$. Po odstranění sklíček jsou kádinky přemístěny do muflové pece, kde jsou přibližně 14 hodin. Po vyndání z pece přidáme do kádinek 1 ml 65% HNO_3 . Roztok je při $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 hodinu odpařován, následně jsou kádinky vloženy do muflové pece na 1 hodinu při teplotě $550 \text{ }^\circ\text{C}$.

Po vyjmutí z pece a vychladnutí je vzorek převeden do roztoku pomocí 1,5% HNO_3 a ultrazvuku. Roztok je přelit do 20 ml zkumavky a po rysku doplněn 1,5% HNO_3 . Po promíchání je vzorek připraven pro měření optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES, Varian, VistaPro, Austrálie) (upraveno dle Mader et al., 1998).

5.2.3. Souhrn postupu prací v rámci všech pokusů

V průběhu všech nádobových pokusů bylo během vegetace hodnoceno několik parametrů (tabulka 17). Po založení porostu byla sledována deficiencie živin, zejména P a napadení porostu chorobami a škůdci. V průběhu každého nádobového pokusu byla několikrát uskutečněna náhodná randomizace a před sklizněmi pokusů byla měřena výška všech rostlin. Během pokusů byly v pravidelných intervalech všechny nádoby váženy a zalévány stejným objemem vody. Po sklizni pokusů byla oddělena nadzemní část od kořenové části a obě části

byly zváženy, jak v čerstvém stavu, tak po vysušení. Po vysušení byly rostlinné vzorky namlety a použity pro následné analýzy.

V průběhu všech polních pokusů bylo hodnoceno napadení porostu chorobami a škůdci. Během sklizně bylo sklizeno 20 rostlin, které byly následně zváženy, a byl vypočten přibližný hektarový výnos rostlin. Dále byly vybrány tři rostliny, které byly nadrceny, usušeny, namlety a tyto vzorky byly použity pro následné analýzy.

Po sklizni všech nádobových a polních pokusů bylo vypočítáno procento suché hmotnosti, stanoven obsah vybraných makro- a mikroživin v nadzemní biomase rostlin a vypočítán jejich příjem.

5. 3. Seznam používaných zkratk v praktické části práce

VÚRV - Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i (Praha – Ruzyně, Česká republika)

ÚKZÚZ - Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (Brno, Česká republika)

DV - dusičnan vápenatý (15 % N, Lovochemie, Lovosice, Česká republika)

LAV - ledek amonný s vápencem (27 % N, Lovochemie, Lovosice, Česká republika)

DAM 390 - dusičnan amonný s močovinou (30 % N, Lovochemie, Lovosice, Česká republika)

DA - dusičnan amonný (34 % N, Merck, Praha, Česká republika)

SA - síran amonný s inhibítorem nitrifikace DMPP NovaTec (21% N, COMPO EXPERT, Münster, Německo)

Ptk - Patentkali (24,6 % K, 6 % Mg, Kali und Salz GmbH, Kassel, Německo)

MF - mletý fosfát (7,9 % P, Sebald Zement GmbH, Pommelsbrunn, Německo, od r. 2016

LANDOR, Birsfelden, Švýcarsko)

JSP - jednoduchý superfosfát (7,5 % P, LANDOR, Birsfelden, Švýcarsko)

TSP - trojitý superfosfát (21 % P, Agropodnik Hradec Králové, Česká republika)

ČK - čistírenský kal (ČOV, Praha, Česká republika)

TFD - tuhá frakce digestátu (ZD Krásná Hora, Krásná Hora n. Vltavou, Česká republika)

ktj - kolonie tvořící jednotku

BE0 - voda (tzv. neaktivní bioefektor)

BE1 - Trianum P (*Trichoderma harzianum*, kmen T-22, Koppert Biological Systems, Berkel en Rodenrijs, Nizozemsko), $1,0 \times 10^9$ ktj/gram

BE2 - Proradix (*Pseudomonas* sp., kmen DSMZ 13134, Sourcon Padena GmbH & Co.KG, Tübingen, Německo), $6,6 \times 10^{10}$ ktj/gram

BE3 - RhizoVital 42 (*Bacillus amyloliquefaciens*, kmen FZB42, ABiTEP, Berlín, Německo), $2,5 \times 10^{10}$ ktj/gram

BE4 - RhizoVital 45 (*B. amyloliquefaciens*, kmen FZB45, ABiTEP GmbH, Berlín, Německo)*

BE5 - Muci (*Paenibacillus mucilaginosus*, ABiTEP GmbH, Berlín, Německo)*

BE6 - RhizoVital 42 + Muci (*B. amyloliquefaciens* FZB42 + *Paenibacillus mucilaginosus*, ABiTEP GmbH, Berlín, Německo)*

BE7 - Super Fifty (*Ascophyllum nodosum*, BioAtlantis Ltd., Tralee, Irsko)*

BE8 - NemaTec (Výtažek z *Laminaria* ssp., BioAtlantis Ltd., Tralee, Irsko)*

BE9 - LamVita (Výtažek z *Laminaria* ssp., BioAtlantis Ltd., Tralee, Irsko)*

BE10 - Biological Fertilizer OD (*Penicilium bilalii*, Bayer CropScience, Malchow, Německo)*

BE11 - Trichoderma OMG (*Trichoderma harzianum*, kmen OMG-08, Anhalt University of Applied Sciences, Bernburg, Německo)*

BE12 - CombiFect A (*Trichoderma harzianum* + *Bacillus subtilis* + Zn + Mn, Anhalt University of Applied Sciences, Bernburg, Německo)*

BE13 - CombiFect B (*Trichoderma* OMG 16 + *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, Anhalt University of Applied Sciences, Bernburg, Německo)*

* ktj nebo koncentrace účinné látky výrobcem neuvedeny

6. Výsledky práce

Holečková, Z., Kulhánek, M., Balík, J. 2017. Use of active microorganisms in crop production - a review. *Journal of Food Processing & Technology*. 8 (10). 696.

Holečková, Z., Kulhánek, M., Hakl, J., Balík, J. 2018. Use of active microorganisms of *Pseudomonas* genus during cultivation of maize in field conditions. *Plant, Soil and Environment*. 64. 26-31.

Holečková, Z., Kulhánek, M., Balík, J. 2018. Influence of bioeffectors application on maize growth, yields and nutrient uptake. *International Journal of Plant Sciences*. In press

Holečková, Z., Kulhánek, M., Balík, J. 2018. Microorganisms in plant protection. *International Journal of Plant Sciences*. In press

6.1.

Holečková, Z., Kulháněk, M., Balík, J. 2017. Use of active microorganisms in crop production - a review. *Journal of Food Processing & Technology*. 8 (10). 696.

Jedním z výstupů disertační práce byl literární přehled zaměřený na shrnutí aktuálních poznatků o využití mikroorganismů v rostlinné produkci. Protože jsou fosfor a jiné živiny a jejich přírodní zdroje vzácné a limitované, je nutné najít alternativní strategii pro zvýšení dostupnosti živin pro rostliny. Jedním z možných způsobů by mohlo být použití takzvaných bioefektorů, které by měly zlepšit mobilizaci živin z méně dostupných forem v půdě, zlepšit růst rostlin a přispět k rozvoji mykorrhizy. V tomto článku je podrobně popsáno několik bakterií a hub, které jsou nejčastěji využívány jako aktivní složka bioefektorů v rostlinné produkci, z nichž vybrané byly aplikovány v nádobových a polních pokusech v rámci této disertační práce. Jedná se o souhrn faktů a výsledků mnoha zahraničních studií, které byly provedeny v rozdílných podmínkách (polní, nádobové, skleníkové, laboratorní), s různými druhy testovacích rostlin a s různými způsoby aplikace (inkrustace semen, aplikace na listy a další). Většina autorů, kteří popisují pozitivní vliv aplikace bioefektorů, publikuje výsledky získané z pokusů, které byly uskutečněné v laboratorních podmínkách, nebo se jednalo o pokusy nádobové. V těchto podmínkách mohou přípravky a jejich účinné látky (mikroorganismy) působit odlišně, nežli v podmínkách polních, a proto je třeba se na tuto oblast ještě více zaměřit. Z tohoto důvodu je pozitivní vliv aplikace bioefektorů v rostlinné produkci stále nedostatečně podložen a popsán.

Use of Active Microorganisms in Crop Production – A Review

Zlata Holečková*, Martin Kulhánek and Jiří Balík

Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic

Abstract

Phosphorus, other elements and natural resources are scarce, and so it is necessary to find alternative strategy to increase availability of nutrients for plants. One possible way could be application of so-called bioeffectors (BE) which should improve the mobilisation of nutrients (especially phosphorus) from less available forms in soil, improve plant growth and contribute to mycorrhiza development. BEs are commercially supplied products which contain active substances (live microorganisms and active natural compounds). BEs can be used in organic agriculture, because their application represents no risk for the environment. Several studies and experiments are focused on impact of bioeffectors' application and their active compounds on plants. Experiments were performed under different conditions (field, pot, greenhouse), on various testing plants and on various bioeffectors. These BEs have been used as a fertilizer, fungicide or molluscicide and they were applied either to soil, seed or leaf. Application should increase growth of root system and above-ground part of plants and also nutrient uptake. These products are developed for a wide variety of crops (e.g. maize, wheat, tomatoes, rape, spinach, grass, ornamentals). This review summarizes the most recent knowledge in this scientific field.

Keywords: Bioeffector; Microorganisms; Soil; Nutrients; Crop production

Introduction

Most of the nutrients found in soil are in for plants inaccessible forms, therefore our society and crop production depend on commercially produced fertilizers. Even commercially produced fertilizers used in agriculture are produced from natural nutrient resources and as such are limited in availability. The most limited nutrient for plant production and agriculture is phosphorus with its natural reserves estimated for fifty years. For these reasons, it is necessary to find an alternative strategy for future generations that would help in better availability and use of plant nutrients in the application of lower input of commercially/industrially supplied products and would also be environmentally friendly.

Phosphorus (P) is an essential, non-renewable nutrient for plant development and growth. Plants acquire P from soil solution as orthophosphate anions. However, orthophosphate is very reactive and may be immobilised through precipitation or adsorption, making P highly insoluble and unavailable to plants. The majority of P fertilizers are currently derived from rock phosphate, which is predicted to become increasingly scarce in the future. Research and development on the efficient use of other available sources of P is therefore crucial [1-3]. Phosphorus deficiency is one of the major limiting factors for decreased agricultural production [4]. Due to a growing world population it is expected that demand for food and feed will increase. Limited availability of productive agricultural land and increasing dependence on mineral fertilizers make it necessary to develop alternative strategies for plant nutrition [5,6]. BEs can contribute, depending on soil and climate conditions, to overcome limitations in the availability of nutrients. These compounds contain microorganisms such as bacteria or fungi and active natural substances (extracts from soil, compost or seaweeds, microbial residues, plant extracts). These products are developed for a wide variety of crops (e.g. crops, grass, ornamentals, grass). Their effective use should cause the mobilisation of nutrients from less bioavailable forms in soil [5] and further support root growth [7,8] and mycorrhiza development [9]. Microorganisms may play an important role in enhancing availability of P to plants and have been proven to enhance uptake directly by extending the root system (e.g. mycorrhizal associations), increasing mobilisation of orthophosphate from soil organic and inorganic phosphorus, and stimulating root growth [1].

Mycorrhiza is highly effective in absorbing nutrients from the soil, especially for nitrogen and phosphorus. Nitrogen and phosphorus are often limited in supply and fungal hyphae are able to absorb these nutrients more efficiently and from greater area of soil than the roots, which leads to increased plant growth. This causes mutually beneficial linkage between plants and fungi, the sugars (organic carbon) formed during photosynthesis are transported to the roots and the fungi are taken and the nutrients are absorbed by fungal hyphae from the soil and are transported into plants [10,11]. Arbuscular mycorrhizal fungi colonise most agricultural species (exceptions include *Brassica* spp., and *Lupinus* spp.) and play an important role in the phosphorus nutrition of many farming systems worldwide, especially on soils with low available phosphorus [3].

Literature Review

Examples of plant strategies for phosphorus obtaining:

- a) Growth of roots
- b) Root exudates (acidic phenolics)
- c) Mycorrhiza
- d) Cooperation with microorganisms (P-solubilization).

One alternative strategy in plant production can be use of unmycorrhizal organisms' P mobilizing nutrients, which should help to increased nutrient availability for plants. These substances are so-called bioeffectors.

*Corresponding author: Zlata Holečková, Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, Prague 165 21, Czech Republic, Tel: +42024362430; E-mail: holeckovaz@af.czu.cz

Received September 13, 2017; Accepted October 03, 2017; Published October 09, 2017

Citation: Holečková Z, Kulhánek M, Balík J (2017) Use of Active Microorganisms in Crop Production—A Review. J Food Process Technol 8: 696. doi: 10.4172/2157-7110.1000696

Copyright: © 2017 Holečková Z, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Bioeffectors

In the last two decades, increased interest in sustainable agricultural practices has seen the growing development and use of commercial microbial inoculants for increasing crop productivity and resource use efficiency. Microbial inoculants mainly include free-living bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi [12]. Development of the BEs increases due to the potential use of these substances in organic farming and also because of the limited natural resources of nutrients [13].

These products are divided into three main groups, according to which of active substances or microorganisms they contain. BEs addressed comprise fungal strains of *Trichoderma*, *Penicillium* as well as bacterial strains of *Bacillus*, *Pseudomonades*, *PaeniBacillus* and *Rhizophagus* with well-characterized root growth promoting and nutrient-solubilising potential. Natural extraction products of seaweed, compost and plant extracts, as well as their purified active compounds with protective potential against biotic and abiotic stresses are also tested in various combinations [5].

Fungal bioeffectors: As mentioned above BEs can be divided into two main groups namely fungal and bacterial. Several fungal representatives have been selected and described further in this section and in Table 1. There are selected bacteria and their impact on crop production.

***Trichoderma* spp.:** The genus *Trichoderma* spp. are wild filamentous fungi occurring in most soil types and different habitats. *Trichoderma* is a fungal genus that includes species that are currently being used as BEs or as biofertilizers [14,15]. The *Trichoderma* is known for producing enzymes and antibiotics. These species are attributed to a variety of physiological, antifungal and insecticidal effects. It acts against a broad spectrum of plant pathogens. These fungi increase plant growth and development, but also development of root system [7,8,13,16,17]. It has also been observed that selected *Trichoderma* strains can improve plant nutrients' uptake [18]. Increased growth occurs due to its strong anti-pathogenic activity, biosynthesis of hormones, improving nutrient uptake from the soil, root development by increasing metabolism rate of carbohydrates and increased photosynthesis [13]. The main hydrolytic enzymes secreted by the fungus are proteases, chitinases and endochitinases [16]. Chitinase are produced by e.g. bacteria, algae, fungi, plants, insects, nematodes, molluscids, vertebrates, including man and certain viruses [19].

***Trichoderma harzianum*:** *T. harzianum* is wild filamentous fungus that occurs in soil. *Trichoderma* belongs to fungi that includes species that are currently being used as biological control agents or as biofertilizers [14,15]. It has also been observed that selected *Trichoderma* strains can improve plant nutrient uptake [18]. Buysens

et al. [20] used *T. harzianum* in study on potato were conducted in a greenhouse or *in vitro* conditions. Experiments were conducted at two sites in Belgium 2009-2012. The objective of this study was to investigate the impact on potato yield of the co-inoculation of *R. irregularis* (strain MUCL 41833) and *T. harzianum* (strain MUCL 29707) applied to a cover crop (*Medicago sativa*) preceding potato planting or to potato at planting. In both trials we observed that the most advantageous agricultural practice to increase potato yield was the inoculation of a preceding cover crop with both microorganisms. Inoculation with beneficial microorganisms increased potato tuber weight in both trials compared to the non-inoculated treatments. This was mainly attributed to improved arbuscular mycorrhizal fungi colonization of potato plants. The inoculation via cover crop seems a more efficient strategy as compared to the direct inoculation at potato plantation. However, difference between these strategies on potato production may not be solely attributed to Arbuscular mycorrhizal fungi colonization rates but could also be due to higher N availability, but it was not tested. Gupta et al. [21] conducted a study and pots experiment focused on the non-target effects of a microbial consortium comprising three selected bioinoculants: *Bacillus megaterium* (strain MTCC 453), *Pseudomonas fluorescens* (strain MTCC 9768) and *Trichoderma harzianum* (strain MTCC 801), on the resident as well as active microbial community structure in pigeon pea (*Cajanus cajan*) rhizosphere. The treatment was found to result in a significant increase in shoot length (1.2-fold), root length (1.3-fold), dry mass (2.4-fold) and grain yield (2.5-fold) of pigeon pea plants with the application of microbial consortium over control plants. The use of chemical fertilizers also led to improvement in plant parameters over control but upto a lesser extent than that with the microbial consortium. The performance of the consortium was found to be about 1.2-fold better than the recommended dose of chemical fertilizers in terms of grain yield. Ahmad et al. [22] conducted a pot experiment with *Brassica juncea* (var. Varuna) respectively focused on influence of soil salinity on brassica after application of *T. harzianum*. Stress caused by soil salinity causes the plants smaller and slower growth, change of plant physical and biochemical properties and decrease in yields of biomass. Results showed that the seedling plants were treated with *T. harzianum* were significantly more resistant to stress conditions caused by salinity, compared to untreated plants.

***Penicillium bilaii*:** Microorganism *P. bilaii* is a soil fungus that lives in symbiosis with plant roots and has been shown to increase the dissolution and absorption of phosphorus in certain crops [1,23]. Some *Penicillium* species can also release fixed phosphorus (P) in the soil and make it available to growing plants. Compared with other nutrients, P is the least mobile and available to plants in most soils. P-solubilizing fungi play an important role in the global phosphorus cycle and can supply P to plants in an environmentally friendly and sustainable

Fungi	Experimental conditions	Effect on the plant	References
<i>Trichoderma</i> spp.	Laboratory conditions	Improve growth and seed production of soybean	Paradiso et al. [79]
	Laboratory conditions	Growth promoter of cowpea	Chagas et al. [74]
<i>Trichoderma harzianum</i>	Pot experiment	Improve germination and seedling growth of wheat	El-Gremi et al. [13]
	Greenhouse and laboratory conditions	Increase potato yield	Buysens et al. [20]
	Pot experiment	Increase shoot and root length, dry mass and grain yield of Pigeon pea	Gupta et al. [21]
	Pot experiment	Increase growth of <i>Brassica juncea</i>	Ahmad et al. [22]
	Pot experiment	Increase root length, growth and shoot dry weight in <i>Brassica nigra</i> and melon	Galletti et al. [7]
<i>Penicillium bilaii</i>	Rhizobox experiment	Increase root length of maize	Gomez-Munoz et al. [1]
	Field conditions	Increase grain yield of wheat	Ram et al. [2]
	Field conditions	Increase root length and P-content in root of pea	Vessey and Helsingier [26]
	Plot experiment	Increase yield of alfalfa	Beckle et al. [28]

Table 1: BEs as promoting fungi of crop production.

Bacteria	Experimental conditions	Effect on the plant	References
<i>Pseudomonas</i> spp.	Laboratory, greenhouse and field conditions	Increased germination, shoot and root length, grain yield of maize	Kife and Laing [30]
	Field conditions	Increased grain yield and straw weight of barley	Fröhlich et al. [34]
	Pot experiment and field conditions	Improves germination, growth parameters and yield of maize	Gholami et al. [75], Nezarat and Gholami [78]
	Laboratory conditions	Growth stimulation of tomato plants	Gravel et al. [76]
<i>Pseudomonas jessenii</i>	Greenhouse and field conditions	Increase yield and shoot dry weight of chickpea	Valverde et al. [35]
	Greenhouse conditions	Increase growth of tomato	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Laboratory conditions	Increase root and shoot growth of rice	He et al. [41]
<i>Bacillus subtilis</i>	Field conditions	Increase macro and micro nutrient absorption, growth and plant production	Altunhalil et al. [54]
	Field conditions	Increase fresh and dry shoot and root weight	Turan et al. [55]
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	Pot experiment	Improve growth of trifoliate orange seedlings	Wang et al. [56]
<i>Rhizopagus intraradices</i>	Greenhouse conditions	Increase the plant growth, number of leaves, plant height, shoot and root length and weight of tea	Sharma and Kayang [80]
	Field conditions	Increase growth of tomato	Mohamed et al. [62]

Table 2: BEs promoting bacteria of crop production.

manner. *P. blattii* is used as a seed inoculant to improve P efficiency in a variety of crops such as wheat, maize, rape, bean, soya, legumes and alfalfa. This soil fungus is able to solubilize mineral phosphates and enhance plant uptake of phosphate [1,3,24]. Three mechanisms are involved by P-solubilizing microorganisms: acidification of the soil, release of organic acid anions and release of phosphomonoesterase and phytase [1]. Cunningham and Kutack [25] demonstrated that the major acidic metabolites produced by *P. blattii* are oxalic and citric acid and so *P. blattii* may increase the availability of phosphate to the plant by releasing organic acids. Gomez-Munoz et al. [1] conducted rhizobox experiments with maize, which was grown for 27 days in rhizoboxes enabling studies of root growth in addition to plant and soil parameters. In this experiment inoculated *P. blattii* (strain ATCC 20851) either at the seed or the sewage sludge patch. At early growth stages, *P. blattii* inoculation of seeds increased maize shoot length. However, at the end of experiment, the effect had ceased. Root growth was increased by seed *P. blattii* inoculation alone and in combination with sewage sludge, whereas patch inoculation was less effective. Colonization studies performed at harvest showed that *P. blattii* could not be detected in the maize rhizosphere but stayed at the place of inoculation. *P. blattii* did not colonise the rhizosphere extensively but merely stayed at the place of inoculation. At the end of this experiment inoculation of *P. blattii* showed no effect on shoot length or shoot biomass. Inoculation of sewage sludge with *P. blattii* did not result in an increase in phosphorus uptake and thus proved to be less effective than seed inoculation. These findings confirm that *P. blattii* application can promote root growth, increasing potential plant adsorptive capacity. While, in this study, the higher root development did not result in an increased P uptake, presumably due to severe limitations in the soil nutrient content, it remains an open question. Ram et al. [2] were conducted field experiments during 2009-2011 to evaluate the effect of seed inoculation with *Penicillium blattii* on wheat at different rates of phosphorus fertilizer on P content in leaves and grain yield of irrigated wheat in India. The study showed potential of using *P. blattii* as bio-inoculants along with 50% of recommended P fertilizer dose that produced wheat yield similar to 100% P when no *P. blattii* was used. However, more such long-term studies are needed on different soil types varying in P availability, pH and P fixation capacity. Karamanos et al. [23] conducted a series of 47 experiments with spring wheat. Experiments were carried out in the three prairie provinces in 1989 and 1995 and included the application of *P. blattii*. Of the 47 trials was found the reaction to the P-fertilizers in 33 cases. These effects can not be attributed to the concentration of P in the soil, soil organic matter, texture or weather

conditions and are considered a random event. Effect on the intake of phosphorus was only P-fertilizers. Vessey and Hetsinger [26] describes experiments on pea (*Pisum sativum*) that were established at two locations in Canada. Inoculation of this organism in combination with a phosphorus fertilizer caused a prolongation of root length and increased the phosphorus content in the roots compared to the control which has been performed by phosphorus fertilizer. Gulden and Vessey [27] mainly focused on observation of formation of root hairs in pea after inoculation *P. blattii*. The experiment was based on the application of the microorganism and P-fertilizer. In this experiment, the effects were investigated by *P. blattii* on growth and morphology of the root of the pea grown in three different quantities delivered phosphorus (0, 1, 10 mg l⁻¹). The proportion of root hair was significantly higher in pea inoculated *P. blattii* compared with control plants. Different quantities of supplied phosphorus did not affect the proportion of root hairs or their length. Root hairs in pea, which were inoculated *P. blattii* were on average 33.3% higher than for uninoculated plants. Beckie et al. [28] used the *P. blattii* for inoculation alfalfa in combination with P-fertilizers and the results of the experiments show that the greatest response to inoculation occurred at the beginning of the growing season. In the year following vaccination yield of vaccinated alfalfa grown on average by 3% compared to uninoculated plants (Table 1).

Bacterial bioeffectors: Several promising bacterial representatives have been selected and described further in this section and in Table 2. There are selected fungi and their impact on crop production.

***Pseudomonas* spp.:** *Pseudomonas* sp. is ubiquitous in agricultural soils, well adapted to growing in the rhizosphere. *Pseudomonas* well suited as biocontrol and growth-promoting agents [29]. These bacteria are a component biofertilizers, which use along with mineral fertilizers may serve as an effective approach for enhancing the crop nutrient requirements, thereby leading to the sustainable crop production. Biofertilizers consist of beneficial microbes, which form colonies in soils and promote plant growth by increasing nutrient availability when applied as a seed dressing or on plant surfaces. These microorganisms can enhance the availability of deficient or immobile nutrients in soils after solubilizing their mineral forms. For example, *Pseudomonas putida* can promote plant growth by P-solubilization, biological nitrogen fixation, availability of trace elements such as Fe and Zn and the production of plant growth regulators. Use of *P. putida* has improved the growth and yield of various crops such as bean, pea, rice, tomato and wheat. Therefore, use of this bacteria has been suggested as a sustainable solution for improving crop production. Factor *P. putida* either alone

or in combination with addition of phosphorus improved the plant growth, plant uptake (N, P, K) and antioxidative activity [4]. Laboratory, greenhouse, and field experiments were conducted at University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, in the 2010/2012 seasons to study the effects of eight strains of diazotrophic bacteria on the growth and yield of maize. Maize seeds were treated with *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas* sp. (strains B5, A3, A6, A61), *Burkholderia ambifaria*, *Enterobacter cloacae* and *Pantoea ananatis*, aiming to stimulate plant growth, and maintain or increase yields while reducing the need for N fertilization. All the diazotrophic bacteria increased germination of maize seed, and *Pseudomonas* sp. (B5) and *B. megaterium* significantly increased shoot length. *Pseudomonas* sp. (B5) and *Pseudomonas* sp. (A3) very significantly increased root length and seed vigor index. Seed treatments with selected diazotrophs resulted in increases in seed germination, but they caused no significant increases in grain yield, dry weight, plant height and chlorophyll content when compared to the untreated control. This may have been due to high competition from the indigenous soil microflora, given that success of microbial inoculation depends on the colonization and competitive ability of the inoculants. Plant roots exudates, colonization of roots by other bacteria, and soil health may also influence the efficiency of bacterial inoculations [30-32] conducted the positive effect of seed inoculation with diazotrophic bacteria on shoot dry weight and yield of maize has been reported by many researchers, for example Kifle and Laing [30]. The most closely related bacteria are *Pseudomonas fluorescens*. Knot et al. [33] reported the fact that application of *Pseudomonas* sp. increases germination of *Poa pratensis* seeds in laboratory conditions, especially 2-4 years old seeds. Also Fröhlich et al. [34] researched the positive effects of this product in growing barley. When *Pseudomonas* used in field conditions grain yield and weight of the straw increased. Also in the greenhouse conditions plants showed greater yield and better growth. Yusran et al. [9] reported that application of Proradix and RhizoVital (individually or in combination) into soil in pot trial led to improved state of tomato roots. They were healthy and showed significantly higher colonization by arbuscular mycorrhizal fungi.

***Pseudomonas jessenii*:** *P. jessenii* is a fluorescent, gram-negative bacteria and this bacteria was applied in two regions of Spain, Castilla y Leon and Andalusia was conducted study by Valverde et al. [35] with aim to find useful biofertilizers for staple grain-legumes, chickpea. In this study were made pot, greenhouse and field experiments, where was tested single and dual inoculations or in combination with phosphate fertilizer on chickpea growth. Under greenhouse conditions, plants inoculated with *P. jessenii* (strain PS06) yielded a shoot dry weight 14% greater than the uninoculated control treatment, but it was not correlated with shoot P contents. Dual inoculation of *P. jessenii* with *Mesorhizobium ciceri* resulted in a decrease in shoot dry weight with respect to the single *M. ciceri* inoculation. Under field conditions, plants inoculated with *M. ciceri*, in single or dual inoculation, produced higher nodule fresh weight, nodule number and shoot N content than the other treatments. Inoculation with *P. jessenii* had no significant effect on plant growth. However, the co-inoculation treatment ranked the highest in seed yield (52% greater than the uninoculated control treatment) and nodule fresh weight. These data suggest that *P. jessenii* can act synergistically with *M. ciceri* in promoting chickpea growth. Eltbany and Smalla [36] conducted a study in which the effect was observed adding *Pseudomonas jessenii* (strain RU 47) and *Bacillus amyloliquefaciens* (strain FZB42) on the growth of plants in an environment of naturally occurring bacteria and fungal colonies on rhizosphere as well as in the surrounding soil with tomato and corn plants. A greenhouse experiment was conducted with two different kinds of plants (tomato and maize). The experiment consisted of three

variants (control, *P. jessenii* and *B. amyloliquefaciens*), and each variant had four repetitions. Parameters evaluated were plant growth. *P. jessenii* increased the growth of tomato plants compared to control, while *B. amyloliquefaciens* increased the growth of maize plants. It was found that the both microorganisms was clearly influenced by rhizosphere bacterial composition.

***Bacillus amyloliquefaciens*:** *B. amyloliquefaciens* is gram-positive, aerobic, and endospore-forming bacteria, which have been both widely used as producers of commercial chemicals in industry [37-39], and beneficial agents for plant growth promotion and suppression of soil-borne diseases in agriculture. *B. amyloliquefaciens* produces many metabolites such as e.g. enzymes (chitinase, peroxidases and proteases), casein, elastin, gelatin, starch, nitrites, esculin and arbutin, phosphatases, adenine, cellulose, guanine, hypoxanthine, pectin, testosterone, tyrosine, and many types of antibiotics (eg. bacillomycins, fengycin, diflicidin) and other substances [39-42]. Production of antibiotic inhibiting growth of fungal pathogens [13]. Proteins secreted by *B. amyloliquefaciens* (strain FZB42) protects plants against disease by eliciting innate immunity [43]. Furthermore Lagerlöf et al. [40], Talboys et al. [44], Fan et al. [45], Burkett-Cadena et al. [46] report that the *B. amyloliquefaciens* promotes plant growth, based primarily on the production of secondary metabolites suppressing competing microbial pathogens and the diseases occurring in the rhizosphere of plants. It also encourages root development and improves seed germination. It was found that lactic acid is the main component of maize root exudates, and that these acid and other root exudates are a source of carbon and energy for the *B. amyloliquefaciens*. Due to these properties, are often *B. amyloliquefaciens* used as a "bio-fertilizer" and as means of biological protection in agriculture. The bacteria also reduce the influence of abiotic stress conditions at the plant, such as drought, salinity or lack of nutrients in the plant [39-41,47,48]. He et al. [41] dealt in their study with influence of *B. amyloliquefaciens* inoculation on the growth of rice plants under stress conditions caused by salinity for 30 days. This study was based on the assumption that the use of microorganisms provides an alternative technology to improve the ability of stress tolerance in plants. Results of laboratory experiments have shown that the inoculated plants in comparison with the control plants, better growth of the above-ground parts of plants, but also parts of the root. Stimulating root growth and the effective root surface is important for a better water and nutrients uptake, which is the most important tool for coping with stress. Healthy, strong and large enough root system plays an important role in maintaining optimum growth and development under stress conditions. Analysis of this study showed, besides other things, that the presence of deaminase in bacteria mitigates the effect of salt on chlorophyll, thus supporting the growth of plants under stressful conditions caused by salinity was largely credited deaminase activity, which bacteria produce.

***Bacillus subtilis*:** *B. subtilis* is a ubiquitous gram-positive bacterium commonly found in water, soil, air, and decaying plant residues. However, the primary occurrence of bacteria found in soil [49,50]. The bacteria produce endospores, which enable it to endure and overcome extreme temperatures and dry periods. *B. subtilis* produces a series of proteases and another enzyme. This bacterium is considered a benign organism, as it has no properties that cause disease nor is pathogenic or toxigenic for humans, animals or plants [50,51]. *B. subtilis* can be used as part of a fertilizer usable in organic farming which is applied to a crop seed or directly into soil where colonize the rhizosphere. Although reports on extensive positive effects of this bacteria to the plant (growth, yield, disease resistance) have been published, these positive effects are not yet sufficiently verified [52]. Brutti et al. [53]

conducted study and used of plant growth-promoting rhizobacteria in tomato production. Before sowing, the micro-organisms were inoculated into the substrate. Tomato seedlings were grown using two different substrates. The first substrate was composed of 70% peat and 30% perlite by volume. And a second substrate with 20% peat, 20% perlite and 60% compost by volume, both inoculated with *Bacillus subtilis* or *Pseudomonas fluorescens* or Bioroot, which is a commercial product containing *B. subtilis*, *P. fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, yeast, algae and *Nocardia*. Inoculation improved the leaf area, shoot dry weight, root dry weight, radical contact area, volume of roots and root forks compared with the control without inoculation. And so, inoculation can be recommended as an alternative to tomato seedling growers' dependence on synthetic agrochemicals. Because of low soil fertility is caused by continue crop and using chemical fertilizer. Altuhash et al. [54] conducted field experiment and the aim of this research was to investigate the effect of biofertilizer, which contain *B. subtilis* dried by different methods and exposed to different period of storage on nutrient, growth and productivity of tomato plant grown under the field conditions. The result showed that viability of bacterium tended to decline during storage but did not significantly reduce the effect on growth and production of plant. Application of biofertilizer increased total macro and micro nutrient absorption, vegetative growth and plant production. This research suggested that application of biofertilizer improve growth and production and there was no different effect between 0 and 3 months storage of biofertilizers on plant growth. A greenhouse experiment was conducted by Turan et al. [55] to observe the effects of *Bacillus megaterium* (strain TV-91C), *Pantoea agglomerans* (strain RK-92), and *B. subtilis* (strain TV-17C) inoculation on the growth, nutrient, and hormone content of cabbage seedlings. The seeds of cabbage were incubated two hours at 28 degrees C. The highest concentrations for N and P were recorded in *B. megaterium*, while in *B. subtilis* for Ca, Na, and Fe and in *P. agglomerans* for K, Mg, and Mn. The hormone content of cabbage seedlings was significantly affected by application of microorganisms treatments. *B. subtilis* decreased the abscisic acid content compared to the other treatments. Inoculation increased fresh and dry shoot and root weight, stem diameter, seedling height, chlorophyll reading values, and leaf area of cabbage seedlings compared with the control. Highest fresh and dry shoot and root dry weight, stem diameter, seedling height, and chlorophyll reading values of cabbage seedlings were obtained from *B. megaterium* and following *P. agglomerans* and *B. subtilis*.

PaeniBacillus mucilaginosus: *P. mucilaginosus* is a bacterium which has been widely used in agriculture since 1990 as a biological fertilizer. These bacteria take part on the biogeochemical cycle of potassium, phosphorus and other elements. It is able to degrade insoluble soil minerals releasing nutrient ions (potassium and water-soluble phosphorus), useful for plants [55-59]. *P. mucilaginosus* is typical silicate bacteria, has long been used as a biofertilizer in agriculture and has recently shown potential in bioleaching and wastewater engineering [60]. *P. mucilaginosus* is often used in biological fertilizers for its ability of phosphorus and potassium mineralization, and also for the ability of nitrogen fixation [61]. Wang et al. [56] researched the effects of combined inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi (*Rhizophagus intraradices*) and plant growth promoting rhizobacteria (*PaeniBacillus mucilaginosus*) on the growth of citrus seedlings under phosphorus deficient conditions have not been extensively studied. A pot experiment was performed to compare growth, root morphology, and other physiological variables in trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*) seedlings that had been inoculated with *Rhizophagus intraradices*, *PaeniBacillus mucilaginosus* or both. Root length were also considerably

improved by inoculation with dual inoculation however, taproot length was notably reduced by mycorrhizal inoculation. At treatment with zero phosphorus level, seedlings inoculated with a combination of *R. intraradices* and *P. mucilaginosus* yielded the greatest leaf chlorophyll concentrations and fine root activity, in comparison to those had either not been inoculated at all, or inoculated with just one of them. Combined inoculation increased plant height, stem diameter, shoot dry weight, and root dry weight. In addition, total N and P concentrations and uptake in seedlings were substantially improved both by individual and combined inoculation.

Rhizophagus intraradices: *R. intraradices* is an arbuscular mycorrhizal fungus used as a soil inoculant in agriculture and horticulture. Mohamed et al. [62] realized project, which has investigated the early growth rate and establishment of cherry tomato plants as a model system inoculated with *R. irregularis*. After one month of growth, the number of leaves of mycorrhizal tomato seedlings was significantly increased and the height was approximately doubled in response to inoculation compared with non-inoculated tomatoes. Colonna et al. [12] realized experiment, which had the aim was to assess the effect of two commercial inoculants containing arbuscular mycorrhizal fungi alone or arbuscular mycorrhizal fungi in combination with plant growth promoting bacteria (*Rhizophagus intraradices*) on yield components and quality of artichoke (*Cynara cardunculus* subsp. *scolymus*). Overall, inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi or dual inoculation arbuscular mycorrhizal fungi and *R. intraradices* could be considered an effective and sustainable tool to improve yield components with less pronounced positive effects on quality of artichoke. Very often various plant components and extracts are added to the active microorganisms. One of the most widely used ingredients is seaweed. Next chapter describes in detail most commonly used seaweed species.

Algae extracts: Algae extracts are used in crop production as an alternative to conventionally use fertilizers and plant protection. These components have several functions for plant: protection against a broad spectrum of plant diseases and pests, support of plant metabolism, enzyme production, food for positive organisms.

Extracts from seaweed can be a component of the so-called biostimulants, which can enhance the growth, yield, and quality of crops. Algal biostimulant provide added benefit to plants when applied by foliar spray or drenching. Seaweed extracts have been widely used as amendments in crop production systems due to the presence of a number of plant-growth-stimulating compounds. Extract is rich for many nutrients and other substances such as amino acids, vitamins, cytokinins, and auxin and abscisic acid like growth promoting substances and have been reported to stimulate the growth and yield of plants [63], enhance tolerance to environment stress [64], increase nutrient uptake from soil [65], enhance antioxidant properties, and increase activity against broad range of pathogenic viral, bacterial, and fungal diseases and enhanced resistance to insect attack [65,66]. The most known and used algae is *Ascophyllum nodosum*.

Ascophyllum nodosum: *A. nodosum* is a brown seaweed, which is a rich source of phenolic compounds with antioxidant and antimicrobial properties. Algae is a good source of bioactive agents such as laminarin, sulfated polysaccharides, carotenoids, vitamins, minerals and polyphenols [67]. Extracts from seaweed *Ascophyllum nodosum* are intended for the specific plant organs (leaves and roots). Utilization is actual in food production in different regions of the world through their positive effect when applied into the soil, if necessary reduction of harmful bacteria, fungi, insects and parasites [68].

Discussion

From the agricultural industry perspective, they are considered as alternative organic fertilizers to conventional agrochemicals, new generation of competitive fertilizers and growth stimulants [69]. Rioux et al. [70] reported that extract from the seaweed *A. nodosum* and the chemical composition of these algae includes a high percentage of ash, proteins, lipids, polysaccharides, antioxidants, minerals and inorganic salts absorbed from seawater. Furthermore Michalak et al. [71] and Raytrath et al. [72] published that the extract of brown seaweed *A. nodosum* increases the resistance of plants against environmental influences (stress factors), such as drought, salinity and frost. Furthermore Kadam et al. [67] conducted, that *A. nodosum* is also used as fertilizer in the agriculture. Brown algae is a rich source of biologically active compounds, such as polysaccharides, peptides, omega-3 fatty acids, carotenoids, phenolic compounds, vitamins and minerals. One of many important polysaccharides is laminarin, which is contained at 0% to 35% in Algae dry matter [67,69,71]. *A. nodosum* enhanced the growth of field crops, fruit crops and vegetable crops. These studies reported also an improved vegetative growth, chlorophyll content, fruit yield, sugar content and resistance against leaf and soil borne pathogens [69]. Michalak et al. [71] researched the influence of supercritical algal extracts on the growth and development of winter wheat (variety Akteur). As a raw material for the supercritical fluid extraction, the biomass of microalga *Spirulina plantensis*, brown seaweed - *Ascophyllum nodosum* and Baltic green macroalgae was used. It was found that the tested biostimulants did not influence statistically significantly the plant height, length of ear, and shank length. Crop height was similar in all the treated and the untreated plots. There were no significant differences in ear-bearing culms' and barren culms' number between the treated and the untreated plots. Tandon and Dubey [65] conducted study, where used formulation with is extracted from *A. nodosum* in soybean under field conditions. They investigated the appropriate dose of formulation in combination with NPK fertilizers and its effects on chlorophyll content, number of trifoliate leaves, number of pods, number of nodules, root length, yield, and other parameters under field conditions in soybean. Biozyme application greatly influenced number of trifoliate leaves, leaf area, and leaf area index. Also total chlorophyll content and total number of nodules per plant was significantly influenced after application. Conclusion of this study was, that use of biostimulants extracted from *A. nodosum* may optimize the use of chemical fertilizers, thereby reducing the impact of environment pollution and increasing the soil fertility. The use of such biostimulants must be combined with all available modern agronomic practices and it is one of the possible alternative strategies in agriculture, in the future with aim at maximizing the potential of a crop plant to boost crop production, crop quality. Sen et al. [73] used *A. nodosum* (granule or liquid sprays) in field experiments with wheat in combination NPK fertilizers. The application of two liquid sprayings in combination with fertilizers increases in the grain and straw yields, respectively, compared to the control more than 10% [74-80]. Liquid spraying of the seaweed extract stimulates metabolic processes in the leaf and helps the plant exploit nutrients in the leaf. Considerable proportion of photosynthesis is carried out by bacteria on the leaf surface and application of liquid sprays is activated by the liquid spray and the rate of photosynthesis increases as a consequence.

Conclusion

There have been several studies conducted in research of lack of nutrients and bioeffectors application. Some authors report positive impact of bioeffectors application on plant. Other authors do not

identify with it because they do not have enough results and confirming conclusions. Studies and experiments were performed under different conditions, with different preparation and their active ingredients with also different parameters observed. It is therefore important to further develop these alternative plant nutrition strategies in the future.

Acknowledgement

This research was financially supported by the Resource Preservation by Application of bioeffectors in European Crop Production nr. 7. RP 312117.

References

1. Gomez-Munoz B, Filtroff SM, De Neergaard A, Jensen LS, Nicolaisen MH, et al. (2017) *Penicillium bilaie* effects on maize growth and P uptake from soil and localized sewage sludge in a rhizobox experiment. *Biol Fert Soil* 53: 23-35.
2. Ram H, Malik SS, Dhaliwal SS, Kumar B, Singh Y (2015) Growth and productivity of wheat affected by phosphorus-solubilizing fungi and phosphorus levels. *Plant Soil Environ* 61: 122-126.
3. Richardson AE, Lynch JP, Ryan PR, Delhaize E, Smith FA, et al. (2011) Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant Soil* 349: 121-156.
4. Israr D, Mustafa G, Khan KG, Shahzad M, Ahmad N, et al. (2016) Interactive effects of phosphorus and *Pseudomonas putida* on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, nutrient uptake, antioxidant enzymes and organic acids exudation. *Plant Physiol Biochem* 108: 304-312.
5. Neumann G (2012) EU-funded research collaboration on use of bio-effectors in agriculture launched. University of Hohenheim, Germany.
6. Hogenhout SA, Van der Hooft RAL, Terachi R, Kamoun S (2009) Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecul Plant-Microbe Interact* 22: 115-122.
7. Galletti S, Fomasier F, Bianchetta S, Lazzeri L (2015) Soil incorporation of brassica materials and seed treatment with *Trichoderma harzianum*: Effects on melon growth and soil microbial activity. *Ind Crop Prod* 75: 73-78.
8. Ferrigo D, Rialola A, Raspera R, Gausin R (2014) *Trichoderma harzianum* seed treatment controls *Fusarium verticillioides* colonization and fumonisin contamination in maize under field conditions. *Crop Protect* 65: 51-56.
9. Yuzran Y, Weinmann M, Neumann G, Römhild V, Müller T (2009) Effects of *Pseudomonas* sp. Proradix and *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the establishment of arml infection, nutrient acquisition and growth of tomato affected by *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *radicis-lycopersici* Jarvis and Shoemaker. University of California, USA.
10. Lack A, Evans D (2005) Plant biology. Taylor and Francis Group, Abingdon, New York, USA.
11. Öpik H, Rolfe SA (2005) The physiology of flowering plants. Cambridge University Press, Cambridge, USA.
12. Colonna E, Roupheal Y, De Pascale S, Barbieri G (2016) Effects of mycorrhiza and plant growth promoting rhizobacteria on yield and quality of artichoke. *Acta Horticultur* 1147: 43-49.
13. El-Gremi SM, Draz IS, Youssef WAE (2017) Biological control of pathogens associated with kernel black point disease of wheat. *Crop Protect* 91: 13-19.
14. Dominguez S, Rubio MB, Cardoza RE, Gutierrez S, Nicolas C, et al. (2016) Nitrogen metabolism and growth enhancement in tomato plants challenged with *Trichoderma harzianum* expressing the *Aspergillus nidulans* Acetamidase *amsd* gene. *Frontier Microbiol* 7: 1182.
15. Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E (2012) Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiol* 158: 17-25.
16. Do Vale LHF, Gómez-Mendoza DP, Kim MS, Pandey A, Ricart CAO, et al. (2012) Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomic* 12: 2716-2728.
17. Raja U (2007) *Trichoderma Harzianum*. Greenmax Agro Tech, India.
18. Yedidia I, Srivastava AK, Kapulink Y, Chet I (2001) Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* 235: 235-242.
19. Gooday GW (1999) Aggressive and defensive roles for chitinases. Chitin and Chitinases, Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 157-165.

20. Buysens C, Cesar V, Ferrals F, de Brouillets HD, Declercq S (2016) Inoculation of *Medicago sativa* cover crop with *Rhizophagus irregularis* and *Trichoderma harzianum* increases the yield of subsequently-grown potato under low nutrient conditions. *Appl Soil Ecol* 105: 137-143.
21. Gupta R, Bisaria VS, Sharma S (2016) Response of rhizospheric bacterial communities of *Cajanus cajan* to application of bioinoculants and chemical fertilizers: A comparative study. *Europe J Soil Biol* 75: 107-114.
22. Ahmad F, Hashem A, Abd-Allah EF, Alqarawi AA, John R, et al. (2015) Role of *Trichoderma harzianum* in mitigating NaCl stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) through antioxidative defense system. *Frontier Plant Sci* 6: 868.
23. Karamanos RE, Fiore NA, Harapiak TJ (2010) Re-visiting use of *Penicillium bilaii* with phosphorus fertilization of hard red spring wheat. *Canadian J Plant Sci* 90: 265-277.
24. Nakahara S, Kusano M, Fujioka S, Shimada A, Kimura Y (2004) Penipratynolene, a novel nematocide from *Penicillium bilaii* Chalabuda. *BioSci Biotechnol Biochem* 68: 257-259.
25. Cunningham JE, Kulack C (1992) Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl Environ Microbiol* 58: 1451-1458.
26. Vessey KJ, Helsing K (2001) Effect of *Penicillium bilaii* inoculation and phosphorus fertilization on root and shoot parameters of field-grown pea. *Canadian J Plant Sci* 81: 361-366.
27. Gulden RH, Vessey JK (2000) *Penicillium bilaii* inoculation increases root-hair production in field pea. *Agricultural Institute of Canada, Canada* 80: 801-804.
28. Beckle HJ, Schlichte D, Moulin AP, Gledhill GC, Pulkinen DA (1998) Response of alfalfa to inoculation with *Penicillium bilaii* (Provide). *Canadian J Plant Sci* 78: 91-102.
29. Vallabhaneni SD (2016) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in tobacco (*Nicotiana glauca*) seed beds using *Pseudomonas fluorescens*. *Agricultur Res* 5: 137-144.
30. Kiffe MH, Laing MD (2016) Effects of selected diazotrophs on maize growth. *Frontier Plant Sci* 7: 1429.
31. Liu Y, Yan T, Li Y, Cao W, Pang X, et al. (2015) A simple label-free photoelectrochemical immunosensor for highly sensitive detection of aflatoxin B₁ based on CdS-Fe₃O₄ magnetic nanocomposites. *RSC Advance* 5: 19581-19586.
32. Ferreira A, Pires R, Rabelo P, Oliveira R, Luz J, et al. (2013) Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian cerrado under greenhouse and field conditions. *Appl Soil Ecol* 72: 103-108.
33. Knot P, Pančiková J, Raus J, Sochor M (2013) The effect of praxid and headstart treatment methods on germination of *poa pratensis* caryopsis. *Czech University Life Sciences, Prague*. pp. 48-52.
34. Fröhlich A, Buddrus-Schlemann K, Dumer J, Hartmann A, Von Rad U (2012) Response of barley to root colonization by *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 under laboratory, greenhouse, and field conditions. *J Plant Int* 7: 1-9.
35. Valverde A, Burgos A, Físcella T, Rivas R, Velazquez E, et al. (2006) Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* P806 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. *Plant Soil* 287: 43-50.
36. Eltibany N, Smalla S (2013) The effect of *Pseudomonas jessenii* RU47 and *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the rhizosphere microbial community and plant growth of tomato and maize. *Berichte aus dem Julius Kühn-Institut, Prague*.
37. Zhang N, Yang DQ, Kendall JRA, Borriss R, Druzhinina IG, et al. (2015) Comparative genomic analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* reveals evolutionary traits for adaptation to plant-associated habitats. *Frontier Microbiol* 7: 2039.
38. Chowdhury SP, Hartmann A, Gao XW, Borriss R (2015) Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Frontier Microbiol* 6: 780.
39. Kröber M, Wibberg D, Grosch R, Elkmeier F, Verwaaijen B, et al. (2014) Effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing. *Front Microbiol* 5: 252.
40. Ayuke F, Bejal S, Jorge G, Lagerqvist E, Meijer J, et al. (2015) Potential side effects of biocontrol and plant-growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* bacteria on earthworms. *Appl Soil Ecol* 96: 159-164.
41. He P, Hao K, Blom J, Rückert Ch, Vater J, et al. (2013) Genome sequence of the plant growth promoting strain *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9601-Y2 and expression of mersacidin and other secondary metabolites. *J Biotechnol* 164: 281-291.
42. Priest FG, Goodfellow M, Shute LA, Berkeley RCW (1987) *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov, nom. rev. *Int J System Evol Microbiol* 37: 69-71.
43. Kierul K, Voigt B, Albrecht D, Chen XH, Carvalhais LC, et al. (2015) Influence of root exudates on the extracellular proteome of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Microbiol* 161: 131-147.
44. Talboys PJ, Owen DW, Healey JR, Withers PJA, Jones DL (2014) Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. *BMC Plant Biol* 14: 51.
45. Fan B, Carvalhais CL, Becker A, Fedoseyenko D, Von Wirén N, et al. (2012) Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiol* 12: 116.
46. Burkett-Gadena M, Kokalis-Burelle N, Lawrence KS, Van Santen E, Kloepper JW (2008) Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. *Biol Control* 47: 55-59.
47. Chen XH, Borriss R, Scholz R, Schneider K, Vater J, et al. (2009) Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J Biotechnol* 140: 27-37.
48. Koumoutsi A, Chen XH, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, et al. (2004) Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J Bacteriol* 186: 1084-1096.
49. Tam NKM, Uyen NQ, Hong HA, Duc LH, Hoa TT, et al. (2006) The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J Bacteriol* 188: 2692-2700.
50. Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, et al. (1997) The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390: 249-256.
51. EPA (1997) *Bacillus subtilis*: Final risk assessment. Environmental Protection Agency, USA.
52. Rathi N, Singh S, Osborne J, Babu S (2015) Co-aggregation of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* in culture and co-colonization in black gram (*Vigna mungo* L.) roots. *Biocatal Agri Biotechnol* 4: 304-308.
53. Bruti L, Alvarado P, Rojas T, Martensson A (2015) Tomato seedling development is improved by a substrate inoculated with a combination of rhizobacteria and fungi. *Soil Plant Sci* 65: 170-176.
54. Altuhalsh A, Hamim Tjahjoleksono A (2014) Biofertilizer effects in combination with different drying system and storage period on growth and production of tomato plant under field conditions. *Emirate J Food Agri* 26: 716-722.
55. Turan M, Ekinli M, Yildirim E, Gunes A, Karagoz K, et al. (2014) Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. *Turkish J Agri Forest* 38: 327-333.
56. Wang P, Wu SH, Wen MX, Wang Y, Wu QB (2016) Effects of combined inoculation with *Rhizophagus intraradices* and *Paenibacillus muclaginosus* on plant growth, root morphology, and physiological status of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings under different levels of phosphorus. *Sci Horticultur* 205: 97-105.
57. Lu JJ, Wang JF, Hu XF (2013) Genome sequence of growth-improving *paenibacillus muclaginosus* strain KNP414. *Genom Announcement*.
58. Tang J, Qi S, Li Z, An Q, Xie M, et al. (2014) Production, purification and application of polysaccharide-based bioflocculant by *Paenibacillus muclaginosus*. *Carbohydrat Polymer* 113: 463-470.
59. Ma M, Wang Z, Li L, Jiang X, Guan D, et al. (2012) Complete genome sequence of *Paenibacillus muclaginosus* 3016, a bacterium functional as microbial fertilizer. *J Bacteriol* 194: 2777-2778.
60. Wu JG, Wang JF, Zhang XH, Zhang SS, Hu XF, et al. (2010) A *gyrB*-targeted PCR for rapid identification of *Paenibacillus muclaginosus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 739-747.
61. Lu JJ, Xue AQ, Cao ZY, Yang SJ, Hu XF (2014) Diversity of plant growth-

- promoting *Paenibacillus mucilaginosus* Isolated from vegetable fields in Zhejiang. *Annal Microbiol* 64: 1745-1756.
62. Mohamed HA, Barry KM, Measham PF (2016) The role of arbuscular mycorrhizal fungi in establishment and water balance of tomato seedlings and sweet cherry cuttings in low phosphorous soil. *Acta Horticulturae* 1112: 109-115.
63. Smilte D (1991) Seaweeds comes ashore. *Fine Gardening* 22: 31-33.
64. Zhang X, Ervin EH, Schmidt RE (2003) Plant growth regulators can enhance the recovery of Kentucky bluegrass sod from heat injury. *Crop Sci* 43: 952-956.
65. Tandon S, Dubey A (2015) Effects of biozyme (*Ascochylium nodosum*) biostimulant on growth and development of soybean (*Glycine Max* (L.) Merrill). *Communication Soil Sci Plant Anal* 46: 861-874.
66. Turan M, Köse C (2004) Seaweed extracts improve copper uptake of grapevine. *Soil Plant Sci* 54: 213-220.
67. Kadam SU, Pankaj SK, Tiwari BK, Cullen PJ, O'Donnell CP (2015) Development of biopolymer-based gelatin and casein films incorporating brown seaweed *Ascochylium nodosum* extract. *Food Packag Shelf Life* 6: 68-74.
68. Craigie JS (2011) Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *J Appl Phycol* 23: 371-393.
69. Elansary HO, Yessoufou K, Shokralla S, Mahmoud EA, Skalicka-Wozniak K (2016) Enhancing mint and basil oil composition and antibacterial activity using seaweed extracts. *Ind Crop Product* 92: 50-56.
70. Rioux LE, Turgeon SL, Beaulieu M (2007) Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydrat Polymer* 69: 530-537.
71. Michalak I, Chojnacka K, Dmytryk A, Wilk R, Gramza M, et al. (2016) Evaluation of supercritical extracts of algae as biostimulants of plant growth in field trials. *Front Plant Sci* 7: 1591.
72. Rayirath P, Benkel B, Hodges DM, Allan-Wojtas P, Mackinnon S, et al. (2009) Lipophilic components of the brown seaweed, *Ascochylium nodosum*, enhance freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 230: 135-147.
73. Sen A, Srivastava VK, Singh RK, Singh AP, Raha P, et al. (2015) Soil and plant responses to the application of *Ascochylium nodosum* extract to no-till wheat (*Triticum aestivum* L.). *Communication Soil Sci Plant Anal* 46: 123-136.
74. Chagas LFB, De Castro HG, Colonia BGO, De Carvalho MR, Miller LD, et al. (2016) Efficiency of *Trichoderma* spp. as a growth promoter of cowpea (*Vigna unguiculata*) and analysis of phosphate solubilization and indole acetic acid synthesis. *Brazil J Botany* 39: 437-445.
75. Gholami A, Shahsavani S, Nezarat S (2009) The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *Int J Biol Biomed Agri Food Biotechnol Eng* 3: 9-12.
76. Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ (2007) Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem* 39: 1968-1977.
77. Kerroum F, Noureddine K, Eddine HJ, Mebrouk K (2015) Biological control of fusarium crown and root rot disease of tomato by *Trichoderma harzianum* in the west of Algeria. *Int J Sci Natur* 6: 141-146.
78. Nezarat S, Gholami A (2009) Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving seed germination, seedling growth and yield of maize. *Pak J Biol Sci* 12: 26-32.
79. Paradiso R, Arena C, De Micco V, Giordano M, Aronne G, et al. (2017) Changes in leaf anatomical traits enhanced photosynthetic activity of soybean grown in hydroponics with plant growth-promoting microorganisms. *Front Plant Sci* 8: 674.
80. Sharma D, Kayang H (2017) Effects of arbuscular mycorrhizal fungi (amf) on *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze under greenhouse conditions. *J Experiment Biol Agri Sci* 5: 235-241.

6.2.

Holečková, Z., Kulhánek, M., Hakl, J., Balík, J. 2018. Use of active microorganisms of *Pseudomonas* genus during cultivation of maize in field conditions. *Plant, Soil and Environment*.

64: 26-31.

V článku byl hodnocen vliv aplikace bioefektoru Proradix s aktivním mikroorganismem *Pseudomonas sp.* (kmen DSMZ 113134) na výtěžnost sušiny a obsah vybraných živin (P, K, Ca, Mg, S) u kukuřice (*Zea mays*, L.). Mezi lety 2014 a 2016 byl uskutečněn polní pokus se silážní kukuřicí. Aplikace bioefektoru byla provedena samostatně nebo v kombinaci s P-hnojivem (mletý fosfát - MF nebo trojitý superfosfát - TSP) a N-hnojivem (dusičnan amonný s močovinou, dusičnan amonný s vápencem, dusičnan vápenatý nebo síran amonný s inhibítorem nitrifikace), různými způsoby aplikace. Účinky aplikace bioefektoru na zvýšení výnosu sušiny nebyly potvrzeny. Značný vliv na aktivitu bioefektoru a jeho aktivitu měly pravděpodobně půdní a povětrnostní podmínky a konkurence přirozeně se vyskytujících mikroorganismů. Vyšší výnos sušiny byl u variant, kde byla aplikována P-hnojiva. Mezi variantami, kde byl aplikován MF nebo TSP, nebyl významný rozdíl. Tato skutečnost mohla být způsobena tím, že půda měla mírně kyselou hodnotu pH. V takových případech MF vykazuje podobné výsledky jako TSP. Aplikace bioefektoru průkazně zvýšila obsah Mg, K a S v biomase nadzemní kukuřice. Vyšší obsah S byl s nejvyšší pravděpodobností způsoben aplikací síranu amonného. Dále měla aplikace bioefektorů pozitivní vliv na odběr Ca a S rostlinou.

Use of active microorganisms of the *Pseudomonas* genus during cultivation of maize in field conditions

ZLATA HOLEČKOVÁ*, MARTIN KULHÁNEK, JOSEF HAKL, JIŘÍ BALÍK

Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

*Corresponding author: holeckovaz@af.czu.cz

ABSTRACT

Holečková Z., Kulháněk M., Hák J., Balík J. (2018): Use of active microorganisms of the *Pseudomonas* genus during cultivation of maize in field conditions. *Plant Soil Environ.*, 64: 26–31.

The aim of this research is to estimate the influence of a bioeffector (BE) application on dry matter yield and nutrient content (P, K, Ca, Mg, S) in maize (*Zea mays* L.). Between 2014 and 2016, a field experiment with silage maize as a testing plant was realized on sandy loam Cambisol. The application of *Pseudomonas* sp. in combination with phosphorus (rock phosphate (RP) or triple superphosphate (TSP)) and nitrogen fertilizers (ammonium nitrate with urea, ammonium nitrate with limestone, calcium nitrate or ammonium sulfate with a nitrification inhibitor) and with different application strategies was studied. The effects of a bioeffector application on the increase of dry matter yields were not confirmed. An important influence on the BE application and its activity was probably those of soil and site conditions and competition of the researched microorganisms with other present microorganisms. Higher yields of dry matter were shown in treatments where P fertilizers were applied. There was almost no difference between the application of RP and TSP. This could be caused by the fact that the soil had a slightly acidic pH value. In this case, the RP showed similar results to the TSP. The application of bioeffector significantly increased Mg, K and S contents in maize above-ground biomass. An increase of the Ca content was almost significant and a tendency towards a higher average content of phosphorus was also recorded.

Keywords: plant nutrition; bioavailability; biocontrol; bacteria; fungi; organic farming

In past decades, agriculture and crop production were almost completely dependent on mineral fertilizers, and hence on natural sources of nutrients which are scarce and limited. As a result, there is need to develop new alternative ways to improve bioavailability of nutrients from the applied fertilizers. Development of these alternative ways requires understanding of plant-soil relationship, but also good knowledge of agriculture and environment (Whithers et al. 2014). One of many alternative ways is the tested application of products containing live and active microorganisms in plant production. These commercially produced preparations, so-called bioeffectors, contain two main components:

live microorganisms (bacteria or fungi) and active natural compounds (plant and herbal extracts, dried seaweeds and soil and compost extracts).

Pseudomonas well suited as biocontrol and growth-promoting agents (Vallabhaneni 2016). These microorganisms can enhance availability of deficient or immobile nutrients in soils after solubilizing their mineral forms. The use of *P. putida* improved the growth and yield of various crops such as rice, tomato or wheat. The application of *P. putida* either alone or in combination with phosphorus improved plant growth, plant uptake (N, P, K) and antioxidative activity (Israr et al. 2016). Yusran et al. (2009) reported that the application

Supported by the Resource Preservation by Application of Bioeffectors in European Crop Production, Project No. 7. RP 312117.

of *Pseudomonas* sp. and *Bacillus amyloliquefaciens* (individually or in combination) into soil in a pot experiment led to improved state of tomato roots. They were healthy and showed significantly higher colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. Liu et al. (2015) reported a positive effect of seed inoculation with diazotrophic bacteria on shoot dry weight and yield of maize. Products with this composition can be used in both conventional and organic farming and are developed for a wide range of agricultural and ornamental plants (Hogenhout et al. 2009, Neumann 2012). Most nutrients (mainly phosphorus) in soil are in a form that is barely available for plants. The main effect of bioeffectors should be to improve the bioavailability of nutrients for plants (Lošák et al. 2016). These products also contribute to a better plant health because they are also used against various diseases and pests. By promoting plant growth, they contribute to higher yields and better production quality (Janarthanam 2013, Vallabhaneni 2016, El-Gremi et al. 2017, Holečková et al. 2017).

This work has three main aims: (1) to assess the effect of the *Pseudomonas* sp. application in combination with P fertilizers on silage maize yield, and on the content of selected nutrients (P, K, Ca, Mg, S) in field conditions; (2) to confirm a potential of bioeffector Proradix (PDX) to promote maize growth and acquisition of mineral nutrients in soil with satisfactory available P content in the Czech Republic; (3) to test new, costs-saving, ways of bioeffector (BE) application together with different ways of nitrogen application.

MATERIAL AND METHODS

Small-plot field experiment with different ways of application of Proradix (*Pseudomonas* sp., strain DSMZ 113134, 5×10^{10} colony forming units/g, Sourcon Padena, Tübingen, Germany (further only PDX) to silage maize was realized in the years 2014–2016. The small-plot experiment was established at the Humpolec site (49°33'16"N; 15°21'18"E). Characteristics of the experimental field are following: Cambisol, sandy loam, 525 m a.s.l., average yearly temperature and rainfall 8.2°C and 573 mm, $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$: 5.7. The content of bioavailable nutrients in soil estimated using the Mehlich 3 method is: 71 mg P/kg, 180 mg K/kg, 1200 mg Ca/kg and 120 mg Mg/kg. The plot size was

4.20 × 7.50 m. The distance between rows was 70 cm (6 rows per plot) and the number of seeds was 95 000 per ha. Maize seeds were untreated cv. Colisée in 2014 and 2015 and cv. Kartagos in 2016 (both from KWS, Einbeck, Germany). Twenty randomly selected plants from two centre rows were harvested from each plot.

Experimental design A. Different application strategies and combinations with P fertilizers were tested in the experiment A. For broad application, a dose of 22.7 kg/ha of PDX was used (dose per plot was diluted in 9 L of water) and for local application ten times lower amount (2 L of water solution per plot). Local application was conducted using a spike wheels applicator GFI 3A (Maschinen und Antriebstechnik GmbH, Güstrow, Germany). Broad application was conducted with sowing, where PDX was applied into soil to a depth of 10 cm immediately after spraying at soil surface. Local application was done at the 5th developed leaf. All fertilizers were used before sowing and applied in 10 cm soil profile. Two phosphorus fertilizers were applied with sowing – (i) fine milled rock phosphate – RP (7.9% P) and (ii) triple superphosphate – TSP (21% P). The whole experiment was fertilized with nitrogen (120 kg N/ha in calcium ammonium nitrate 27% N) and potassium (50 kg K/ha in Patentkali 24.9% K, 6% Mg) at sowing. The experimental design is shown in Table 1.

Experimental design B. The main aim of the experiment B (Table 2) was to test the cost-saving application strategies of PDX. PDX was always applied in bands (10 cm depth) into the rows next

Table 1. Experimental design A

Treatment	PDX Application	PDX	N	P	K
Zero control	0	0	120	0	50
Water control	broad	0	120	0	50
RP	broad	0	120	26	50
TSP	broad	0	120	26	50
PDX + RP	broad	22.7	120	26	50
PDX + TSP	broad	22.7	120	26	50
PDX + RP	local	2.27	120	26	50
PDX + TSP	local	2.27	120	26	50

PDX – bioeffector Proradix; RP – rock phosphate; TSP – triple superphosphate

doi: 10.17221/725/2017-PSE

Table 2. Shortened experimental design B with terms of bioeffectors and fertilizers application

Treatment	PDX application	PDX		N	N application
		(kg/ha)			
Zero	–	0	0	0	–
N1	–	0	0	80 + 60 + 0	broad
N2	–	0	0	0 + 80 + 60	broad
Local N	–	0	0	0 + 140 + 0	local
N1 + PDX li	local	2.27	2.27	80 + 60 + 0	broad
N1 + PDX gr	local	2.27	2.27	80 + 60 + 0	broad
Local N + PDX li	local	2.27	2.27	0 + 140 + 0	local
Local N + PDX gr	local	2.27	2.27	0 + 140 + 0	local
N2 PDX liquid	local	2.27	2.27	0 + 80 + 60	broad

N1 – 80 kg N/ha 3 days before sowing + 60 kg N/ha at 2–3 developed leaf; N2 – 80 kg N/ha at 2–3 developed leaf + 60 kg N/ha; PDX – bioeffector Proradix (li – liquid; gr – granulated)

to the seeds (Figure 1). Two forms of PDX were used: (i) liquid (PDX li), where the application rate was 9 L of solution per plot or (ii) granulated (PDX gr) form where the granules were made by spraying the PDX stock solution on pumice stone (size 0–3 mm, Palkowitschia s.r.o., Prague, Czech Republic). The final dose of PDX was always 2.27 kg/ha. PDX was always applied 4 days after sowing. The PDX application was combined with three ways of nitrogen fertilizing: (i) 80 kg N/ha 3 days before sowing + 60 kg N/ha at 2–3 developed leaves (N1); (ii) 140 kg N/ha via the CULTAN strategy at 2–3 developed leaves (Figure 1; Local N) and (iii) 80 kg N/ha at 2–3 developed leaves + 60 kg N/ha (N2). For N1 and N2, calcium ammonium nitrate was used.

The aim of the CULTAN method is building of ammonium nitrogen depot in soil using high pressure injection. Roots grow around this reserve decreasing the ammonium toxicity through N uptake from the non-toxic reserve surface. As a result, N uptake is continuous and plants have the N supply available during the entire cropping season, which saves the costs for commonly used repeated N application (Sommer 2005).

Experimental design C. Ammonium releases the H⁺ proton in microorganisms and plants can therefore improve solubilization of Ca-phosphates as a side effect (Neumann and Römheld 2002).

The aim was hence to test the potential of PDX to release phosphorus from rock phosphate improved with ammonium nitrogen fertilizing. The experimental design is shown in Table 3. The source of nitrogen was calcium nitrate – CN (15% N) or ammonium sulfate + dimethylphenylpiperazinium (DMPP) nitrification inhibitor – AS (21% N). CN was applied in two doses (short before sowing) and AS all at once short before sowing. The nitrate form in CN is very mobile in soil. Because of that, the dose was divided in two parts and the first (bigger) part was applied very shortly (one day) before sowing to be the source of available nitrogen for germinating plants. The second part was applied during vegetation to provide the nitrogen supply during vegetation. RP and TSP were applied also in one dose short before sowing. All fertilizers as well as PDX were applied broad.

Maize from all three experiments was always harvested in dough vegetation stage. For experiment A it was on 3rd September, for experiment

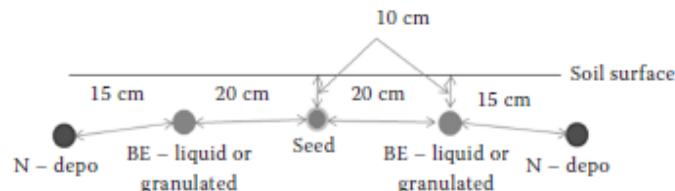


Figure 1. Scheme of the bioeffectors (BE) application together with Local N

Table 3. Experimental design C

Treatment	PDX application	PDX	N (kg/ha)	P
Zero	–	0	0	0
CN	–	0	107 + 54	0
AS	–	0	161	0
CN + RP	–	0	107 + 54	130
AS + RP	–	0	161	130
CN + RP + PDX	broad	22.7	107 + 54	130
AS + RP + PDX	broad	22.7	161	130
CN + TSP	–	0	107 + 54	130
AS + TSP	–	0	161	130

CN – calcium nitrate; AS – ammonium sulfate + dimethylphenylpiperazinium (DMPP) nitrification inhibitor; RP – rock phosphate; TSP – triple superphosphate; PDX – bioeffector Proradix

B on 11th September, and for experiment C on 14th September.

Analyses. Twenty average plants from two centre rows of each plot were always harvested to estimate the silage maize yield. A representative sample of three selected plants from each plot was air dried and finely milled for further analyses. Total content of macronutrients in the above-ground biomass was estimated using dry decomposition (Mader et al. 1998). The extracts were measured by an inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, Varian VistaPro, Victoria, Australia). Nutrient uptake was calculated based on the content of elements in the above-ground biomass and the yield of maize from the small-plot.

Data evaluation. Due to different designs of the experiments each year, the data were analysed by ANOVA, where the year, bioeffector application and P fertilization were included. All analyses were carried out by Statistica ver. 12. software (California, USA) at a significance level of 0.05 (Tukey's *HSD* (honest significant difference)).

RESULTS AND DISCUSSION

Three-way analysis of variance (ANOVA) with interactions between external factors (year, bioeffector and P-fertilizer) was used to investigate differences in yield of dry matter and P, K, Ca, Mg and S content from 2014 to 2016 in the above-ground biomass of maize. Differences in dry matter

yields over years depending on the application of bioeffector and P-fertilizers are shown in Table 4.

The application of bioeffector or P-fertilizers did not significantly affected dry matter yields. On the other hand, only the effect of year was particularly significant for dry matter yield where the highest content was observed in 2016 and the lowest in 2014.

Differences in the element content over years, application of bioeffector and P-fertilizers are shown in Table 5.

The results show that the application of bioeffector significantly increased the potassium, magnesium and sulfur content in maize above-ground biomass. The increase of Ca content was almost significant and a trend towards a higher average content of P was also observed. Also Lošák et al. (2010) described the effect of year in 2-year field experiments with graded fertilizer doses applied to maize. Application of P-fertilizers did not affect the content of any included element. On the other hand, the effect of year was significant for all elements, as the highest content was observed in 2015 and the lowest in 2016. The highest contents of K, Ca and S were probably caused by higher rainfall in 2015 or by site conditions.

Differences in the element uptake over years, application of bioeffector and P-fertilizers yield of dry matter are shown in Table 6.

The data obtained validated the results of nutrient contents mentioned in Table 5. The application of

Table 4. Effect of Proradix (PDX), phosphorus fertilization and year on the yield of biomass

		Dry matter yield (t/ha)
BE	0	18.6
	PDX	16.1
	<i>P</i>	0.478
P-fertilizer	0	15.1
	RP	19.5
	TSP	20.8
	<i>P</i>	0.035
Year	2014	10.8 ^a
	2015	15.1 ^a
	2016	26.7 ^b
	<i>P</i>	< 0.001

RP – rock phosphate; TSP – triple superphosphate. Different letters are significantly different at the 0.05 level

doi: 10.17221/725/2017-PSE

Table 5. Effect of bioeffector Proradix (PDX), phosphorus fertilization and year on the concentration of elements (mg/kg) in maize above-ground biomass

		P	K	Ca	Mg	S
BE	0	2438	13 728 ^a	2688	1453 ^a	789 ^a
	PDX	2539	15 486 ^b	2891	1538 ^b	881 ^b
	<i>P</i>	0.210	< 0.001	0.095	0.049	0.012
P-fertilizer	0	2329	14 883	2878	1481	857
	RP	2416	14 601	2770	1505	820
	TSP	2521	14 338	2721	1500	829
	<i>P</i>	0.197	0.708	0.629	0.905	0.729
Year	2014	2674 ^b	11 072 ^a	1757 ^a	1545 ^b	568 ^b
	2015	2851 ^c	22 031 ^b	5089 ^b	1950 ^c	1464 ^c
	2016	1942 ^a	10 718 ^a	1523 ^a	991 ^a	473 ^a
	<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

BE – bioeffector; RP – rock phosphate; TSP – triple superphosphate. Different letters are significantly different at the 0.05 level

bioeffector significantly increased Ca and S uptake in maize above-ground biomass. The application of P-fertilizers led to a slightly increased P uptake by plants. However, a decreasing tendency in Ca and S uptake was observed. Lower calcium and sulfur intake after application of P-fertilizers, compared to the control treatment, could have been caused by chemical sorption of HPO_4^{2-} and calcium. In case of sulfur, there could have been an antagonistic relation between HPO_4^{2-} and SO_4^{2-} . No effects depending on P fertilizing were significant. On the other hand, an effect of year was significant for all elements, as the highest content was observed in 2015 and the lowest in 2014. Also in this case, the highest nutrient uptake for all nutrients was prob-

ably caused by higher local rainfall in 2015 or by site conditions. Many authors carried out studies and experiments where they applied *Pseudomonas* and the results showed that the application of bacteria increased resistance of plants to many diseases (Mikicinski et al. 2016, Vallabhaneni 2016, Wu et al. 2017). Therefore, a higher uptake of all nutrients in 2015 could have been caused by the fact that plants began to defend themselves more against pathogens and thus they took up more nutrients.

Israr et al. (2016) reported that this bacteria genus is used as a biological fertilizer which, together with mineral fertilizers, can serve as an effective approach to enhance plant nutrition requirements. And that these microorganisms can increase avail-

Table 6. Effect of bioeffector Proradix (PDX), phosphorus fertilization and year on element uptake (kg/ha) in maize above-ground biomass

		P	K	Ca	Mg	S
BE	0	40.7	219.7	39.2 ^a	22.4	11.8 ^a
	PDX	40.2	251.1	48.2 ^b	24.7	14.5 ^b
	<i>P</i>	0.042	0.020	0.035	0.111	0.041
P-fertilizer	0	38.7	256.8	55.1 ^b	24.0	15.9 ^b
	RP	40.1	214.0	30.8 ^a	22.5	9.9 ^a
	TSP	45.2	202.0	29.5 ^a	23.1	9.9 ^a
	<i>P</i>	0.352	0.238	0.522	0.063	0.310
Year	2014	28.6 ^b	119.8 ^a	18.9 ^a	16.7 ^b	6.16 ^a
	2015	43.6 ^a	334.6 ^c	79.1 ^c	29.4 ^a	22.5 ^c
	2016	50.6 ^a	270.8 ^b	38.7 ^b	25.6 ^a	12.3 ^b
	<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

BE – bioeffector; RP – rock phosphate, TSP – triple superphosphate. Different letters are significantly different at the 0.05 level

ability of deficient or immobile nutrients in soil after dissolution of their mineral forms. This fact has been confirmed for K, Mg and S content, as well as Ca and S uptake. On the other hand, Kifle and Laing (2016) carried out the study, which included experiments with corn where they applied the *Pseudomonas* bacteria. The results showed that the application had a positive effect only on seed germination, not on increased grain yield, dry matter or plant height. This study confirms this fact in the yield of dry matter.

In this research, the influence of bioeffectors on the K, Mg and S content in maize above-ground biomass and also on Ca and S uptake was statistically validated. After P-fertilizers application, Ca and S uptake decreased in contrast to the control treatment without P-fertilizer. A statistically significant effect of experimental year on the content and uptake of all elements and on the yield of dry matter was observed.

REFERENCES

- El-Gremi Shokry S.M., Draz I.S., Youssef W.A.-E. (2017): Biological control of pathogens associated with kernel black point disease of wheat. *Crop Protection*, 91: 13–19.
- Hogenhout S.A., Van der Hoorn R.A., Terauchi R., Kamoun S. (2009): Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 22: 115–122.
- Holečková Z., Kulhánek M., Balík J. (2017): Microorganisms in Plant Protection. *International Journal of Plant Sciences*. (In Press)
- Israr D., Mustafa G., Khalid S.K., Shahzad M., Ahmad N., Masood S. (2016): Interactive effects of phosphorus and *Pseudomonas putida* on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, nutrient uptake, antioxidant enzymes and organic acids exudation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108: 304–312.
- Janarthanam L. (2013): Bioprotectant with multifunctional microorganisms: A new dimension in plant protection. *Journal of Biopesticides*, 6: 219–230.
- Kifle M.H., Laing M.D. (2016): Effects of selected diazotrophs on maize growth. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1429.
- Liu Y.X., Yan T., Li Y.Y., Cao W., Pang X.H., Wu D., Wei Q. (2015): A simple label-free photoelectrochemical immunosensor for highly sensitive detection of aflatoxin B1 based on CdS-Fe₃O₄ magnetic nanocomposites. *RSC Advances*, 5: 19581–19586.
- Mader P., Száková J., Míhlová D. (1998): Classical dry ashing of biological and agricultural materials. Part II. Losses of analytes due to their retention in an insoluble residue. *Analisis*, 26: 121–129.
- Lošák T., Hlušek J., Lampartová I., Elbl J., Múhlbachová G., Čermák P., Antonkiewicz J. (2016): Changes in the content of soil phosphorus after its application into chernozem and haplic luvisol and the effect on yields of barley biomass. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 64: 1603–1608.
- Lošák T., Hlušek J., Filipčík R., Pospíšilová L., Maňásek J., Prokeš K., Buňka F., Kráčmar S., Martensson A., Orosz F. (2010): Effect of nitrogen fertilization on metabolisms of essential and non-essential amino acids in field-grown grain maize (*Zea mays* L.). *Plant, Soil and Environment*, 56: 574–579.
- Mikićinski A., Sobiczewski P., Pulawska J., Maciorowski R. (2016): Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) by a novel strain 49M of *Pseudomonas graminis* from the phyllosphere of apple (*Malus* spp.). *European Journal of Plant Pathology*, 145: 265–276.
- Neumann G. (2012): EU-funded research collaboration on use of bio-effectors in agriculture launched. Press Release. Germany: University of Hohenheim. Available at: <http://www.bioeffector.info/about-bioeffector.html> (accessed on Sep 15, 2014)
- Neumann G., Römheld V. (2002): Root-induced changes in the availability of nutrients in the rhizosphere. In: Waisel Y., Eshel A., Kafkafi U. (eds.): *Plant Roots – The Hidden Half*. New York, Basel, Marcel Dekker, 617–649.
- Sommer K. (2005): *CULTAN-Düngung*. Gelsenkirchen, Verlag Thomas Mann, 218.
- Statistica, StatSoft, Inc. (data analysis software system), version 12.0. (2016).
- Vallabhaneni S.D. (2016): Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in tobacco (*Nicotiana tabacum*) seed beds using *Pseudomonas fluorescens*. *Agricultural Research*, 5: 137–144.
- Withers P.J.A., Sylvester-Bradley R., Jones D.L., Healey J.R., Talboys P.J. (2014): Feed the crop not the soil: Rethinking phosphorus management in the food chain. *Environmental Science and Technology*, 48: 6523–6530.
- Wu H.J., Zhang Y., Zhang H.Y., Gu Q., Gao X.W. (2017): Identification of functional regions of the HrpZPsg protein from *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* that induce disease resistance and enhance growth in plants. *European Journal of Plant Pathology*, 147: 55–71.
- Yusran Y., Weinmann M., Neumann G., Römheld V., Müller T. (2009): Effects of *Pseudomonas* sp. 'Proradix' and *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the Establishment of AMF Infection, Nutrient Acquisition and Growth of Tomato Affected by *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *radicis-lycopersici* Jarvis and Shoemaker. 26–30 August 2009. In: *The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI*. University of California. UC Davis: Department of Plant Sciences. Retrieved November 22, 2014. Available online: <http://eprints.cdlib.org/uc/item/22h2v2h7>

Received on November 11, 2017

Accepted on December 8, 2017

Published online on January 12, 2018

6.3.

Holečková, Z., Kulhánek, M., Balík, J. 2018. Influence of bioeffectors application on maize growth, yields and nutrient uptake. *International Journal of Plant Sciences*. In press

Řada autorů uvádí fakt, že by aplikace bioefektorů měla zlepšit mobilizaci živin (zejména fosforu) z méně dostupných forem v půdě, zlepšit růst rostlin a přispět k rozvoji mykorhizy. V tomto článku jsou shrnuty výsledky vlivu aplikace tří bioefektorů: BE1 - *Trichoderma harzianum*, kmen T-22), BE2 - Proradix (*Pseudomonas* sp., kmen DSMZ 13134), BE3 - RhizoVital (*Bacillus amyloliquefaciens*, kmen FZB42) na porost kukuřice (*Zea mays*, L. var. *Colisée*). Tento článek vyhodnocuje data z provedeného nádobového pokusu 2, který byl uskutečněn v roce 2014. V pokusu byla použita půda ze stanoviště v Humpolci. V rámci pokusu byly porovnávány varianty, kde byl aplikován pouze bioefektor nebo byl aplikován bioefektor v kombinaci s P-hnojivem (mletý fosfát a trojitý superfosfát). Varianty s bioefektory a/nebo P-hnojivem byly porovnávány s variantami kontrolními, které byly nehnojeny P a bez aplikace bioefektorů. Výsledky nádobového pokusu neukázaly významné pozitivní účinky aplikace bioefektorů na růst rostlin, výnos sušiny, obsah vybraných prvků v nadzemní hmotě rostlin a odběr živin rostlinou. Průkazné rozdíly obsahů vybraných živin v nadzemní biomase rostlin byly zjištěny pouze pro N a Ca, přičemž nejvyšší obsah N měly rostliny z variant, kde byl aplikován BE2 s N a K-hnojivem nebo v kombinaci s mletým fosfátem. Rostliny kontrolní varianty, kde nebyl aplikován bioefektor, ani P-hnojivo, dále ještě rostliny varianty, kde byl aplikován pouze mletý fosfát a N a K-hnojivo, obsahovaly nejvíce Ca. Další průkazný rozdíl byl v odběru živin rostlinou, a to v případě N, Ca a S. Nejvíce N odebraly rostliny z kontrolní varianty a z varianty, kde byl aplikován BE2 s N a K-hnojivem. Nejvyšší odběry Ca byly zjištěny na variantách s nejvyšším obsahem Ca, a nejvíce S odebraly rostliny kontrolní varianty. Z výsledků tedy nelze jednoznačně potvrdit pozitivní vliv aplikace bioefektorů.



**International Agency for Development of Culture,
Education and Science**

Level 7/ 30 Collins St, Melbourne, VIC 3000, Australia

www.iadces.org

CERTIFICATE OF ACCEPTANCE

To the organizing committee of the journal «International Journal of Plant Sciences»
ISSN: 1058-5893 E-ISSN: 1537-5315.

Received article: **Influence of Bioeffectors Application on Maize Growth, Yields and Nutrient Uptake.**

Authors: Zlata Holečková, Martin Kulhánek, Jiří Balík

The article received a positive review and was sent for publication in the journal **International Journal of Plant Sciences.**

The edition materials are posted in Scopus and Web of Science.



27.06.2017

Mary Robinson
Executive Editor

Influence of Bioeffectors Application on Maize Growth, Yields and Nutrient Uptake

Zlata Holečková¹, Martin Kulhánek¹, Jiří Balík¹

¹Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, Prague 165 21, Czech Republic.

Corresponding author: e-mail: holeckovaz@af.czu.cz, phone nr.: +42024382430

Abstract

Application of bioeffectors should improve the mobilisation of nutrients (especially phosphorus) from less available forms in soil, improve plant growth and contribute to mycorrhiza development. Bioeffectors should also increase resistance to diseases and pathogens. Consequently, bioeffectors should lead to a higher yields. The aim of this research is to estimate the influence of bioeffector application on plant growth and nutrient uptake of maize (*Zea mays*, *L.* var. Colisee). Three bioeffectors in combination with two phosphorus fertilisers were tested in a pot experiment with cambisol Humpolec. The bioeffectors used were: Trianum (*Trichoderma harzianum*), Proradix (*Pseudomonas sp.*) and RhizoVital (*Bacillus amyloliquefaciens*) in combination with triple superphosphate and rock phosphate. The use of bioeffectors did not positively influence nutrient uptake, dry matter or plant growth. Results of the pot experiments did not show significant positive effects of bioeffector application on plant growth, dry mass or availability of nutrients from less soluble forms in the soil.

Keywords: bioeffector, maize, nutrients, phosphorus, soil.

Introduction

Phosphorus in soil is an irreplaceable macro-element necessary for plant growth and development. Despite its necessity in plant metabolism its content in the soil is relatively low (Mengel 1991; Blume et al. 2010). In the majority of soil types a higher phosphorus content is found in the close-to-surface layers due to increased biological activity, which results in the accumulation of organic material. Application of organic and mineral fertilisers can often influence soil phosphorus amount. The content of phosphorus in soil can vary depending on the nature of parent material, texture and other farming factors (the ratio and type of supplied phosphorus and method of soil cultivation) (Ivanič et al. 1984; Sharpley 1995). Phosphorus in soil can be divided in two basic groups: inorganic phosphorus and

organic phosphorus (Sharpley et al. 1987). The amount of phosphorus bound in the soil fractions depends mainly on the timing of fertilizers application, including the impact of earlier interventions (McGehan and Lewis 2002). The degree of availability for plants depends on chemical, physical-chemical and physical properties of the particular soil type, seasonal dynamics of water, air and temperature regimes, biological activity of soil, the plant species, etc. (Sharpley 1995; Nash et al. 2014). Today's society relies on inorganic phosphorus compounds (fertilisers, feed or food additives) to exploit the limited natural resources of phosphates. For these reasons, there is an overall need to develop more sustainable mechanisms to maintain phosphorus availability for crops and livestock but using a smaller amount of supplied mineral phosphorus, which will lead to improvement of soil functions. Creation of a new strategy requires better public awareness about the consequences of farming approaches on the environment, a better understanding of phosphorus dynamics in the soil-plant relationship, the creation of new innovative technologies to reduce the dependence of the population on mined phosphate and increase the efficiency of phosphorus fertilisation. The development of new strategies is expected to have a significant economical and environmental impact, particularly for future generations (Withers et al. 2014). Due to a growing world population it is expected that demand for food and feed will increase. Limited availability of productive agricultural land and increasing dependence on mineral fertilisers make it necessary to develop alternative strategies for plant nutrition (Hogenhout et al. 2009; Neumann 2012). In 2012 a project was introduced that includes the use of so-called bioeffectors in crop production. This project should contribute to the reduction of mineral fertilisers used in agriculture and to proper and efficient land use and involves testing under real conditions at different geographic locations (Smalla et al. 2012). It is an integrated project focused on the development of new approaches based on activity of live microorganisms and active natural substances (Hogenhout et al. 2009). Bioeffectors can contribute, depending on soil and climate conditions, to overcome limitations in the availability of nutrients. These compounds contain microorganisms (bacteria, fungi) and active natural substances, such as extracts from soil or compost, microbial residues, plant extracts or products of biological processes. These products are developed for a wide variety of crops (e.g. maize, wheat, tomatoes, rape, spinach, grass, ornamentals). Their effective use should cause the mobilisation of nutrients from less bioavailable forms in soil (Neumann 2012; Smalla et al. 2012) and further support root growth (Ferrigo et al. 2014; Galletti et al. 2015) and mycorrhiza development (Yusran et al. 2009). The aim of this study is to evaluate

the effect of bioeffectors on maize plant growth and selected nutrient uptake by the above ground mass of a plant, particularly focusing on phosphorus management.

Materials and methods

Pot experiments were established in a vegetation hall on the 30th of April 2014. Five maize seeds (*Zea mays*, variety Colisée) were sown into the pots (volume 5 L). On the 28th of May 2014, plants were selected on the final count of three per pot.

The tested soil was obtained from experimental stations of the Crop Research Institute (Humpolec site). Further site characteristics are mentioned in Table 1.

Table 1. Characteristics of experimental fields.

Site	Humpolec
Latitude	49°33'15" N
Longitude	15°21'02" E
Altitude (m above sea level)	525
Mean yearly temperature (°C)	7.0
Mean yearly rainfall (mm)	665
Soil type	cambisol
Soil sort	sandy loam
pH ¹⁾	5.1
P (mg/kg) ²⁾	77 (± 10) B ³⁾

¹⁾ Estimated in air-dried soil, 0.01 mol/l CaCl₂, 1:10 w/v

²⁾ Average basic data estimated using Mehlich 3 method

³⁾ Category B = low content

The substrate was composed of soil and quartz sand at a 2:1 ratio. In this experiment three bioeffectors in combination with two fertilisers were tested with the same dose of nitrogen and potassium (Table 2).

Table 2. Scheme of pot experiments.

Treatment No.	Treatment	Treatment No.	Treatment
1	BE0 + NK	7	BE2 + RP + NK
2	BE1 + NK	8	BE3 + RP + NK
3	BE2 + NK	9	BE0 + TSP + NK
4	BE3 + NK	10	BE1 + TSP + NK
5	BE0 + RP + NK	11	BE2 + TSP + NK
6	BE1 + RP + NK	12	BE3 + TSP + NK

Nitrogen was supplied in the form of calcium nitrate (0.50 g N pot⁻¹) and potassium in the form of K-fertilizer Patentkali (0.85 g K pot⁻¹). The effectiveness of bioeffectors was tested using rock phosphate (RP) and triple superphosphate (TSP), which were applied at the same dose of phosphorus (0.26 g P pot⁻¹). All treatments were compared with a control to which was applied only an inactive bioeffector (demineralized water). The experimental plants were harvested on the 13th of August 2014.

Bioeffectors used in the pot experiment, together with the active substance (in parentheses) were: (i) BE 0: Control (water only); (ii) BE 1: Trianum (*Trichoderma harzianum*, strain T-22, 10⁹ spores g⁻¹, Koppert Biological Systems), 0.1175 g pot⁻¹; (iii) BE 2: Proradix (*Pseudomonas sp.*, strain DSMZ 13134, 6.6x10¹⁰ colony forming units (cfu g⁻¹, Sourcon Padena GmbH & Co.KG), 0.1375 g pot⁻¹; (iv) BE 3: RhizoVital (*Bacillus amyloliquefaciens*, strain FZB42, 2.5x10¹⁰ cfu g⁻¹, ABiTEP GmbH), 0.35 ml pot⁻¹. All bioeffectors were applied locally to the seeds in the form stock solution at a dosage of 25 ml per pot (5 ml of stock solution to each seed).

Plant height was measured four times during the experiment (5th of June 2014, 18th of June 2014, 3rd of July 2014, 13th of August 2014). After harvesting the pot experiments, the above ground biomass weight, % of dry mass, the content of macro- and selected micro-nutrients in above ground biomass and their uptake, were measured. For the estimation of nutrients, fine milled above ground dry biomass was analysed via dry decomposition at 500°C. Thereafter, samples were transferred to a solution of 1.5% nitric acid (provided by Mader et al. 1998). The extracts were measured by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (Varian VistaPro, Australia). All results were statistically analysed (tests for the normality of distribution, One way ANOVA, Scheffes test at significance level 0.05) using the statistical software application STATISTICA (StatSoft 2016).

Results

The pot experiment was based on the hypothesis that the application of bioeffectors would increase the amount of available phosphorus and other important nutrients for plants. This would result in better phosphorus and other nutrient uptake, greater plant growth and higher yields (Table 3). Table 3 shows plant height measured during the experiment. It is obvious that in the initial growth stages (recorded on 5th and 18th of June), plant height was influenced mainly by TSP use. On the 18th of June a significant positive effect of rock phosphate application on plant height was recorded as well. In later stages, nonsignificant differences between the studied variants occurred. This was probably due to competition among the plants

in the pots. In terms of plant height variant BE0 showed the smallest plant heights on the 5th and 18th of June and the 3rd of July; however, the impact of the application of various bioeffectors was not statistically verified.

Table 3. Height of maize plants (cm) on specific dates (three plants).

Treatment	Height 5 th June	Height 18 th June	Height 3 rd July	Height 13 th August
1	24.2 ^a	47.8 ^a	88.8 ^a	157 ^a
2	27.2 ^a	56.1 ^a	91.6 ^a	147 ^a
3	26.9 ^a	57.1 ^a	94.6 ^a	152 ^a
4	28.1 ^a	56.5 ^a	95.9 ^a	149 ^a
5	29.3 ^a	65.3 ^b	103 ^a	136 ^a
6	31.3 ^a	66.1 ^b	99.5 ^a	140 ^a
7	32.3 ^a	70.5 ^b	103 ^a	137 ^a
8	31.7 ^a	67.4 ^b	98.0 ^a	134 ^a
9	45.7 ^b	82.1 ^c	102 ^a	135 ^a
10	43.1 ^b	84.4 ^c	105 ^a	126 ^b
11	51.4 ^b	82.4 ^c	102 ^a	128 ^a
12	46.4 ^b	78.3 ^c	99.5 ^a	132 ^a
F-test	42.5	38.3	3.57	4.71
p ≤ *	0.01	0.01	n.s.	0.05

* p = significance level

Figure 1 indicates the average above ground dry biomass yield for each variant (Fig. 1). The highest dry mass weight was recorded for treatment BE1 + TSP. This was probably caused by application of TSP. The lowest weight of dry matter was recorded for treatment 4 (BE3 + NK) and treatment 7 (BE2 + RP + NK). From Figure 1 it is obvious that the application of selected bioeffectors had no statistically significant effect on the dry matter yield.

Figure 1. Dry matter weight of the above ground biomass of maize (g per three plants).

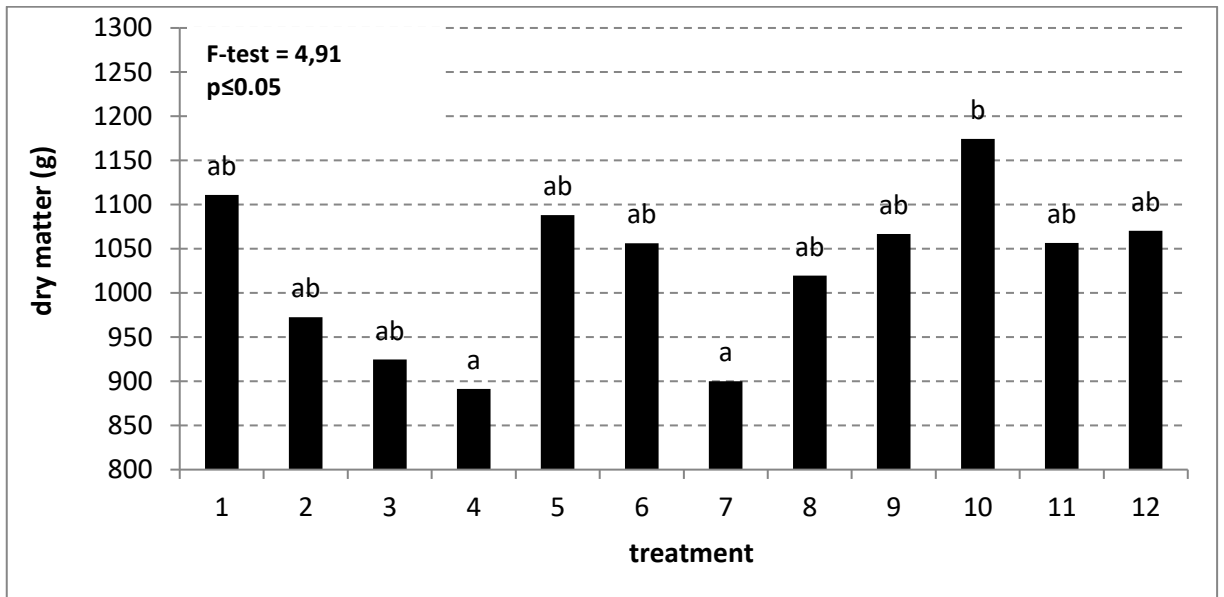


Table 4 lists the nutrients content in the above ground biomass of maize (Table 4). Significant differences between treatments were obtained only for nitrogen and calcium, whereby the nitrogen content under treatment 3 was higher in comparison to treatments 6, 9, 10 and 11. Under treatment 3 the bioeffector BE2 + NK was applied. On the other hand under treatment 6 (BE1 + RP + NK) was applied, under treatment 9 (BE2 + RP + NK) was applied, under treatment 10 (BE1 + TSP + NK) was applied and under treatment 11 (BE2 + TSP + NK) was applied. Calcium content under treatment 1 was significantly higher in comparison to that under treatments 7 and 10. Under treatment 1 (BE0 + NK) was applied, while under treatments 7 and 10, BE2 + RP + NK and BE1 + TSP + NK were applied, respectively. The rest of the results were not statistically significant but the highest contents of analysed elements were found in the following treatments: phosphorus = var. 11; potassium = var. 4; magnesium, sulphur, iron, copper and zinc = var. 1 and manganese = var. 5. The lowest contents of analysed elements were found in the following variants: phosphorus = var. 6; potassium = var. 9; magnesium = 6; sulphur = 6 and 10; iron = var. 2; copper = var. 9 and zinc and manganese = var. 10.

Table 4. Average content of nutrients in plants (mg/kg).

Var.	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn
1	5296 ^{ab}	1031 ^a	12729 ^a	2219 ^b	1259 ^a	529 ^a	57.38 ^a	1.44 ^a	23.49 ^a	29.17 ^a
2	5164 ^{ab}	1033 ^a	12339 ^a	1446 ^{ab}	1043 ^a	470 ^a	21.42 ^a	1.22 ^a	11.16 ^a	24.85 ^a
3	6678 ^b	1260 ^a	12127 ^a	1676 ^{ab}	1215 ^a	497 ^a	32.74 ^a	1.37 ^a	12.49 ^a	32.32 ^a
4	5115 ^{ab}	1038 ^a	13815 ^a	1438 ^{ab}	1032 ^a	458 ^a	54.52 ^a	1.24 ^a	11.66 ^a	29.33 ^a
5	4894 ^{ab}	1033 ^a	11485 ^a	1840 ^{ab}	1197 ^a	457 ^a	50.76 ^a	1.32 ^a	10.27 ^a	32.78 ^a
6	4010 ^a	1011 ^a	11344 ^a	1406 ^{ab}	930 ^a	405 ^a	30.56 ^a	0.95 ^a	9.24 ^a	24.66 ^a
7	5404 ^{ab}	1257 ^a	11862 ^a	1201 ^a	944 ^a	424 ^a	39.83 ^a	0.96 ^a	10.58 ^a	26.46 ^a
8	4836 ^{ab}	1072 ^a	10781 ^a	1534 ^{ab}	1052 ^a	469 ^a	54.85 ^a	1.18 ^a	10.05 ^a	26.78 ^a
9	3583 ^a	1277 ^a	10258 ^a	1293 ^{ab}	913 ^a	444 ^a	39.48 ^a	0.84 ^a	8.74 ^a	28.79 ^a
10	4388 ^a	1270 ^a	10811 ^a	1062 ^a	822 ^a	405 ^a	21.71 ^a	0.92 ^a	7.93 ^a	23.76 ^a
11	4418 ^a	1293 ^a	10478 ^a	1331 ^{ab}	951 ^a	471 ^a	26.16 ^a	0.97 ^a	8.96 ^a	29.38 ^a
12	4808 ^{ab}	1247 ^a	12536 ^a	1392 ^{ab}	988 ^a	413 ^a	32.55 ^a	1.01 ^a	9.23 ^a	32.08 ^a
F-test	6.81	1.73	2.73	4.81	3.28	2.16	1.26	3.68	1.70	1.41
p ≤ *	0.01	n.s.	n.s.	0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

* p = significance level

Table 5 shows the average amount of element uptake by plants for each treatment. This research focused especially on phosphorus because phosphorus sources are limited and bioeffectors are developed specifically to increase phosphorus availability (Table 5). Significant differences between treatments ($p \leq 0.01$) were obtained only for nitrogen, calcium and sulphur, whereby the nitrogen uptake under treatment 3 was higher in comparison to treatment 9. Under treatments 3 and 9, BE2 + NK and BE0 + TSP + NK were applied, respectively. Statistically verified differences in calcium uptake were identified under treatment 1 and treatments 2, 4, 7, 9, 10 and 11. Under treatment 1 the highest uptake of calcium was recorded and BE0 + NK was applied. Under treatments 2, 4, 7, 9, 10 and 11 (BE1 + NK, BE3 + NK, BE2 + RP + NK, BE0 + TSP + NK, BE1 + TSP + NK and BE2 + TSP + NK) were applied, respectively. The final statistically verified difference was of sulphur uptake, whereby the sulfur content under treatment 1 was higher in comparison to treatment 7. Under treatment 1 (BE0 + NK) was applied and under treatment 7 (BE2 + RP + NK) was applied. The rest of results were not statistically significant but the highest uptakes of analysed elements were under the following treatments: phosphorus = var. 10; potassium, magnesium, iron, copper and zinc = var. 1 and manganese = var. 5. The lowest uptakes

of analysed elements were under following variants: phosphorus = var. 4; potassium, magnesium, copper and manganese = var. 7; iron - var. 2 and zinc = var. 10.

Table 5. Average uptake of nutrients by plants (mg per three plants).

Var.	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn
1	5853 ^{ab}	1139 ^a	14114 ^a	2458 ^a	1393 ^a	585 ^b	64.79 ^a	1.61 ^a	26.68 ^a	32.59 ^a
2	5023 ^{ab}	1005 ^a	12013 ^a	1407 ^b	1015 ^a	458 ^{ab}	20.83 ^a	1.19 ^a	10.87 ^a	24.20 ^a
3	6167 ^a	1146 ^a	11116 ^a	1539 ^{ab}	1113 ^a	455 ^{ab}	29.85 ^a	1.25 ^a	11.42 ^a	29.77 ^a
4	4546 ^{ab}	922 ^a	12310 ^a	1285 ^b	921 ^a	408 ^{ab}	48.80 ^a	1.11 ^a	10.36 ^a	26.19 ^a
5	5323 ^{ab}	1124 ^a	12508 ^a	1998 ^{ab}	1301 ^a	497 ^{ab}	55.00 ^a	1.44 ^a	11.16 ^a	35.54 ^a
6	4211 ^{ab}	1062 ^a	12030 ^a	1494 ^{ab}	982 ^a	428 ^{ab}	32.58 ^a	1.00 ^a	9.67 ^a	25.98 ^a
7	4837 ^{ab}	1139 ^a	10657 ^a	1083 ^b	858 ^a	384 ^a	35.93 ^a	0.86 ^a	9.54 ^a	23.22 ^a
8	4942 ^{ab}	1093 ^a	10977 ^a	1557 ^{ab}	1070 ^a	477 ^{ab}	54.95 ^a	1.20 ^a	10.24 ^a	27.20 ^a
9	3829 ^b	1357 ^a	10922 ^a	1380 ^b	973 ^a	472 ^{ab}	42.25 ^a	0.89 ^a	9.30 ^a	30.88 ^a
10	5115 ^{ab}	1489 ^a	12739 ^a	1244 ^b	960 ^a	473 ^{ab}	25.59 ^a	1.07 ^a	9.21 ^a	27.60 ^a
11	4676 ^{ab}	1375 ^a	11087 ^a	1417 ^b	1011 ^a	500 ^{ab}	27.88 ^a	1.04 ^a	9.53 ^a	31.25 ^a
12	5130 ^{ab}	1326 ^a	13345 ^a	1487 ^{ab}	1054 ^a	440 ^{ab}	34.88 ^a	1.07 ^a	9.88 ^a	34.70 ^a
F-test	4.16	2.78	2.00	5.89	3.57	3.31	1.31	3.44	1.675	1.87
p ≤ *	0.01	n.s.	n.s.	0.01	n.s.	0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

* p = significance level

Discussion

To date several studies have evaluated the different effects of bioeffectors on plants and included various different parameters. For example, Yusran et al. (2009) reported that after Proradix and RhizoVital application (individually or in combination) to soil in a pot experiment, a significant improvement in the state of tomato plant roots occurred. The roots were healthier and showed significantly higher colonisation by arbuscular mycorrhizal fungi. In our experiments these parameters are not rated but the health of the plants should improve plant growth and yield. However, we did not confirm a significant positive effect of bioeffector application on maize yield. Kumar et al. (2015) conducted pot experiments to support Pigeon Pea (*Cajanus cajan* L.) plant growth after inoculation with bacteria *Pseudomonas fluorescens*. For the study 75 fluorescent *Pseudomonas* strains from different agro-ecosystems in India were isolated. The isolated strain P17 showed considerable support for growth in terms of root length, dry matter, chlorophyll, carbohydrates, nitrogen, calcium, iron and manganese. *Pseudomonas sp.* strain P17 was identified as a potential rhizobacteria to

support plant growth and increase nutrient uptake. In our experiments we tested *Pseudomonas sp.*, strain DSMZ 13137 and found that it did not have a positive influence on plant growth or nutrient uptake. Further, Chiarini et al. (1998) conducted a pot experiment in greenhouse conditions with *Sorghum bicolor* and inoculation with microorganisms *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter sp.* The results showed that all three microorganisms have the ability to colonise the root system of *Sorghum*, but only the *B. cepacia* and *P. fluorescens* supported plant growth via inoculation with one microorganism only. Dual inoculation had no further effect on plant growth. Our results did not show a positive influence of *Pseudomonas sp.* strain DSMZ 113134 on increasing plant growth or uptake of nutrients. Dual inoculation was not evaluated in our experiments.

In this research was not influence of bioeffectors was confirmed on plant height nor on yield or dry matter weight. Higher values were probably caused by the addition of TSP. Similar plant heights in the later stages could be caused by the correlative stimulating effects of the roots and subsequent growth of the above ground plant parts, or the production of fytohormones (gibberellins, cytokinins, auxins) (Šebánek et al. 1991). Statistically significant differences between treatments on nutrients content in the above ground were obtained only for nitrogen and calcium. And statistically significant differences on uptake of nutrients by plants were obtained only for nitrogen, calcium and sulfur.

Conclusions

Although some positive results in other studies, bioeffectors did not positively influenced maize yields, as well as the macro- and selected microelements content in above ground biomass of plants in our experiments. Results from the pot experiments showed only that the TSP application increased the plant height during the initial growth stages as well as P uptake with above ground biomass of harvested plants. Therefore it is clear that bioeffectors works only in specific conditions and should be further tested.

Acknowledgements

This research was financially supported by the Resource Preservation by Application of bioeffectors in European Crop Production nr. 7. RP 312117.

This manuscript was proof readed by: Proof-Reading-Service.com.

References

- Blume H.P., Brümmer G.W., Horn R., Kandeler E., Kögel-Knabner I., Kretschmar R., Stahr K., Wilke B.M. (2010). Textbook of soil science (Lehrbuch der Bodenkunde) – Scheffer/Schachtschabel. 15. Edition. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg. 593 p.
- Chiarini L., Bevivino A., Tabacchioni S., Dalmastri C. (1998). Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: Root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. *Soil Biology and Biochemistry*. 30 (1): 81-87. DOI: 10.1016/S0038-0717(97)00096-5.
- Ferrigo D., Raiola A., Rasera R., Causin R. (2014). *Trichoderma harzianum* seed treatment controls *Fusarium verticillioides* colonization and fumonisin contamination in maize under field conditions. *Crop Protection*. 65: 51-56. DOI: 10.1016/j.cropro.2014.06.018.
- Galletti S., Fornasier F., Cianchetta S., Lazzeri L. (2015). Soil incorporation of brassica materials and seed treatment with *Trichoderma harzianum*: Effects on melon growth and soil microbial activity. *Industrial Crops and Products*. 75 Part A: 73-78. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.04.030.
- Hogenhout S.A., Van der Hoorn R.A.L., Terauchi R., Kamoun S. (2009). Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 22 (2): 115-122. DOI: 10.1094/MPMI-22-2-0115.
- Ivanič J., Havelka B., Knop K. (1984). Nutrition and fertilization of plants (In Slovak: Výživa a hnojenie rastlín). *Nature Bratislava - SZN Praha*. 482 p.
- Kumar G.P., Desai S., Reddy G., Amalraj E.L.D., Rasul A., Ahmed S.K.M.H. (2015). Seed bacterization with Fluorescent *Pseudomonas* spp. enhances nutrient uptake and growth of *Cajanus cajan* L. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 46 (5): 652-665. DOI: 10.1080/00103624.2015.1005219

Mader P., Száková J., Miholová D. (1998). Classical dry ashing of biological and agricultural materials, Part II. Losses of analytes due to their retention in an insoluble residue. *Analisis*. 26 (3): 121-129. DOI: 10.1051/analisis:1998121.

McGechan M.B., Lewis D.R. (2002). Sorption of phosphorus by soil, Part 1: Principles, equations and models. *Biosystems Engineering*. 82 (1): 1-24. DOI: 10.1006/bioe.2002.0054.

Mengel K. (1991). *Plant nutrition and metabolism (Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze)*. 7. Edition. Gustav Fischer Verlag Jena. 466 p.

Nash D.M., Haygarth P.M., Turne B.L., Condrón L.M., McDowell R.W., Richardson A.E., Watkins M., Heaven M.W. (2014). Using organic phosphorus to sustain pasture productivity: A perspective. *Geoderma*. 221: 11-19. DOI: 10.1016/j.geoderma.2013.12.004.

Neumann G. (2012): EU-funded research collaboration on use of bio-effectors in agriculture launched. Press Release. Germany: University of Hohenheim. Available at <http://www.bioeffector.info/about-bioeffector.html> (accessed on Sep 15, 2014).

Sharpley A.N. (1995). Soil phosphorus dynamics: agronomic and environmental impacts. *Ecological Engineering*. 5 (2-3): 261-279. DOI: 10.1016/0925-8574(95)00027-5.

Smalla K. (2012). EU-funded research collaboration on use of bio-effectors in agriculture launched. First kick-off meeting at University of Hohenheim. Germany: Julius Kühn-Institut. Available at <http://www.jki.bund.de/en/startseite/presse/english-press/eu-funded-research-collaboration-on-use-of-bio-effectors-in-agriculture-launched.html> (accessed on Nov 17, 2014).

Sharpley A.N., Tiessen H., Cole C.V. (1987). Soil phosphorus forms extracted by soil tests as a function of pedogenesis. *Soil Science Society of America Journal*. 51: 362-365. doi:10.2136/sssaj1987.03615995005100020019x.

Šebánek J., Sladký Z., Procházka S., Kutáček M. (1991). *Experimental Morphogenesis and Integration of Plants*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 417 p.

Withers P.J., Sylvester-Bradley R., Jones D.L., Healey J.R., Talboys P.J. (2014). Feed the crop not the soil: rethinking phosphorus management in the food chain. *Environmental Science & Technology*. 48 (12): 6523-6530. DOI: 10.1021/es501670j.

Yusran Y., Weinmann M., Neumann G., Römheld V., Müller T. (2009). Effects of *Pseudomonas* sp. "Proradix" and *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the Establishment of AMF Infection, Nutrient Acquisition and Growth of Tomato Affected by *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *radicis-lycopersici* Jarvis and Shoemaker. 26-30 August 2009. The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI. University of California. UC Davis: Department of Plant Sciences. Available at <http://eprints.cdlib.org/uc/item/22h2v2h7> (accessed on Nov 22, 2014).

6.4.

Holečková, Z., Kulhánek, M., Balík, J. 2018. Microorganisms in plant protection. International Journal of Plant Sciences. In press

Jedním z důvodů využívání bioefektorů v rostlinné produkci, je zvýšení odolnosti rostlin vůči různým onemocněním a patogenům. V tomto článku je podrobně popsáno několik bakterií a hub, které jsou využívány jako aktivní složka bioefektorů v oblasti ochrany rostlin, a které byly aplikovány v nádobových a polních pokusech v rámci této disertační práce. Jedná se o souhrn faktů a výsledků mnoha zahraničních studií, které byly uskutečněny v odlišných podmínkách (polní, nádobové, laboratorní) a s různými druhy testovaných rostlin. Většina autorů uvádí pozitivní vliv aplikace těchto mikroorganismů v rámci ochrany rostlin, ale i přes tento fakt, principy funkce bioefektorů nejsou dosud dostatečně podloženy a objasněny. Literární přehled shrnuje nejnovější poznatky v této vědecké oblasti.



**International Agency for Development of Culture,
Education and Science**

Level 7/ 30 Collins St, Melbourne, VIC 3000, Australia

www.iadces.org

CERTIFICATE OF ACCEPTANCE

To the organizing committee of the journal «International Journal of Plant Sciences»
ISSN: 1058-5893 E-ISSN: 1537-5315.

Received article: **Microorganisms in Plant Protection.**

Authors: Zlata Holečková, Martin Kulháněk, Jiří Balík

The article received a positive review and was sent for publication in the journal
International Journal of Plant Sciences.

The edition materials are posted in Scopus and Web of Science.



27.06.2017

Mary Robinson
Executive Editor

Microrganisms in Plant Protection

Zlata Holečková¹, Martin Kulhánek¹, Jiří Balík¹

¹Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, Prague 165 21, Czech Republic.

Corresponding author: e-mail: holeckovaz@af.czu.cz, phone nb.: +42024382430

Biocontrol agents (BA) are products which contain live microorganisms or their spores as the active substances. Their application could be one possible way that should: i) improve resistance to diseases and pathogens, ii) growth of roots and aboveground biomass and iii) nutrient uptake by plants. The agent's function is based on many different mechanisms. Experiments with BA were carried out under different conditions (fields, pots, greenhouses), with different varieties of tested plants as well as using different application strategies (seed incrustation, application on the leaves and others). Therefore, many different results were published in scientific journals. The aim of this study is to review published results focused on the usage of BA within a plant protection. It might be useful mainly for the ecological farming and healthy food production. This review summarizes the most recent knowledge in this scientific field.

Keywords: biocontrol agents, microorganisms, plant protection, organic farming.

1. Introduction

The enormous growth of Earth's population requires to provide adequate food resources and to find out alternative strategies for a sufficient crop production. One of the crop production's crucial factors is the achievement of effective plant protection. However the plant protection agents can often expose to danger the environment and human health by food chain's pollution with different chemical compounds. The nowadays problem is limited areas of productive agricultural land and an increasing occurrence of plant diseases and pests within the crop production also. It is also necessary to look for other approaches and strategies (Neumann 2012; Hogenhout *et al.* 2009). The use of pesticides is a traditional method but it causes negative side impacts on the environment by progressive resistance of the pathogens to active substance. This process incites a further research to find out more alternative strategies that would eliminate pathogens. Recently, there has been an effort made towards development of harmless products that are based on microorganisms and their influences (bacteria, fungi)

and active natural substances (extracts from soil, compost or seaweeds, microbial residues, plant extracts). The proposal and design of new strategies requires better public discourse about the consequences of the farming impacts on the environment resulting in a better understanding of the soil-plant relationship. It is expected that the development of new strategies will have a significant economical and environmental impact, particularly for future generations (Roy 2017; Withers *et al.* 2014).

2. Microorganisms in plant protection

This chapter lists a selection of microorganisms that are used in the plant protection and crop production. In current time the methods of biological control with the use of microorganisms attract attention of research as a promising alternative to chemical control. Biological protection with the use of antagonistic microorganisms has proved to be a viable alternative. Development of the Biocontrol agents (BA) increases due to the potential use of these substances in organic farming (El-Gremi *et al.* 2017). The current focus on a plant disease management has been shifted from chemical pesticides to more ecofriendly biopesticides in order to reduce an environmental pollution and to minimize the risk of development of pesticide-resistant strains of plant pathogens. Many bacteria have the potential to reduce crop losses through biocontrol mechanism (Vallabhaneni 2016). BAs are divided into two main groups, according to which type of microorganism contain: fungal strains (*Trichoderma*, *Penicillium* and *Sebacinales*) and bacterial strains (*Bacillus* and *Pseudomonas*) (Neumann 2012). BA are highlighted here with more evidences through field or pot experiments and greenhouse studies. The experiments and studies include a broad spectrum of crops such as corn, rice, soybeans, tomatoes, cotton, energy cane, oil palms, millets, oilseeds, banana, coconut, lime, coffee, tea, rubber, flower, spices, herbs, lawns, ornaments, trees, biofuel and forage grass (Janarthanam 2013), sugar beet, tobacco, cucumber, watermelon, muskmelon, cucumber, tropical crops (Choudhary & Johri 2009).

2.1. Fungal BioControl

As mentioned before BA can be divided into two main groups - fungal and bacterial. Several fungal representatives have been selected and described further in this section. At the end of this section (2.1.) in Table 1. There are selected bacteria and their impact on plant protection.

2.1.1. *Trichoderma* ssp.

Strains of the genus *Trichoderma* spp. are wild filamentous fungi occurring in the most of soils and different habitats. *Trichoderma* is a fungal genus that includes species that are currently being used as BA or as biofertilizer (Dominguez *et al.* 2016; Hermosa *et al.* 2012).

Trichoderma is known for producing several enzymes and antibiotics. The varieties of physiological, antifungal and insecticidal effects are attributed to this species. It operates against a broad spectrum of plant pathogens. These fungi increase the growth of plants' above ground biomass as well as the development of the root system (El-Gremi *et al.* 2017; Galletti *et al.* 2015; Ferrigo *et al.* 2014; Do Vale *et al.* 2012; Raja 2007). It has also been observed that selected *Trichoderma* strains can improve plant nutrient uptake (Yedidia *et al.* 2001) which has indirect influence on the plant health as well. The above mentioned increase of growth occurs due to its strong anti-pathogenic activity, biosynthesis of hormones, improving nutrient uptake from the soil, root development, or increasing the rate of carbohydrates metabolism and photosynthesis as well (El-Gremi *et al.* 2017). The main hydrolytic enzymes secreted by the *Trichoderma* strains are proteases, chitinases and endochitinases. The glycoside hydrolase family, including chitinases, and other enzymes are representing 51% of the total secretome (totality of secreted organic molecules and inorganic elements by biological cells, tissues, organs, and organisms). Few representatives are classified in the protease family (8.9%), others (17.6%) are mostly intracellular proteins. The endochitinases are proteins involved in chitin degradation. The mechanism of chitinases action can be divided into two major groups: endochitinases and exochitinases. In general, endochitinases belongs into chitinases that cleave chitin randomly inside the chain. Exochitinases are subclassified into chitobiosidases and chitobiasases. All of these enzymes act in a mutual, synergistic on chitin and on cell wall degradation (Do Vale *et al.* 2012; Duo-Chuan 2006). Chitinases are produced e.g. by bacteria, algae, fungi, plants, insects, nematodes, molluscids, vertebrates, including human and also certain viruses (Gooday 1999). *Trichoderma* is also the main component in several commercially produced biofungicides. The biofungicide is intended to apply in a foliar application, seed protection and into a soil. The soil application is used for the treatment and suppression of various diseases caused by pathogens such as *Botrytis*, *Fusarium*, and *Penicillium* spp. This group of fungicides is used against pests also. It improves a plants' health and environmental monitoring (Gomes *et al.* 2015; Samuels *et al.* 2014). This filamentous fungus increases the resistance of plants against biotic and abiotic stresses and therefore indirectly increases e.g. nitrogen use efficiency. The plants' deep and developed roots allow to withstand drought that was confirmed at e.g. for maize and ornamentals. The above mentioned characteristics are applied as a seed treatment against various pathogens and mycotoxins (Galletti *et al.* 2015; Ferrigo *et al.* 2014; Raja 2007).

2.1.2. *Trichoderma harzianum*

Trichoderma harzianum is wild filamentous fungus; it occurs in soil. *Trichoderma* belongs to the fungi that includes species which are currently used as biological control agents (Dominguez *et al.* 2016; Hermosa *et al.* 2012). Mycoparasitic fungi, such as *T. harzianum*, produce an arsenal of chitin-degrading enzymes to hydrolyze the host cell wall and can also generate high contents of cellulases under appropriate culture conditions (Do Vale *et al.* 2012). Strain T22 was also reported as one enabling to improve the efficiency of photosynthesis and growth of tomatoes (El-Gremi *et al.* 2017). As a notable BA, *Trichoderma harzianum* can antagonize a diverse array of phytopathogenic fungi, including *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. Elucidating the biocontrol mechanism of *T. harzianum* in response to the pathogens enables to be exploited in the control of plant diseases (Yang *et al.* 2009). Vitti *et al.* (2016) researched the influence of *T. harzianum* (strain T-22) application under laboratory conditions on the occurrence of *Cucumber mosaic virus* in tomato. And the results prove that early inoculation of this strain is able to induce a defense response. The reduction of mosaic occurrence affects enzyme (dismutase and catalase) and phytohormones (ethylene, abscisic acid, salicylic acid, and jasmonic acid) production. As well Kerroum *et al.* (2015) carried out a study with tomatoes. This study involved pot experiments and confirmed the antagonistic effect of *T. harzianum* against *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* that causes root crown rot of tomatoes. Altinok & Erdogan (2015) conducted laboratory and pot trials with *T. harzianum*, strains T16 and T23. These strains significantly inhibited growth of the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Ahmad *et al.* (2015) realized a pot trial with *Brassica juncea* testing the influence of soil salinity on brassica after application of *T. harzianum*. Soil salinity stress caused that the plants were smaller with slower growth, changes of plants' physical and biochemical properties and decrease in the biomass yield was found out. Results showed that the seedling plants treated with *T. harzianum* were significantly more resistant to stress conditions caused by salinity in comparison with untreated plants.

2.1.3. *Pythium oligandrum*

The biocontrol agent *Pythium oligandrum*, a soil-inhabiting oomycete, colonizes the rhizosphere of many crop species and it is responsible for the reduction of diseases caused by a number of soil-borne fungal pathogens (Al-Rawahi & Hancock, 1997). *P. oligandrum* promotes plant growth, as a result of interactions' complex, which includes an indirect effect through control of pathogens in the rhizosphere and/or a direct one mediated by plant-induced resistance. The increased plant growth is caused by the interaction between *P. oligandrum*

and roots. It is proved that during this interaction the fungus produces auxin compound - tryptamine (Le Floch *et al.* 2003). This fungus produces an elicitor that activates plant defence reactions (Takenaka *et al.* 2003). Therefore, it is postulated that *P. oligandrum* is able to reduce disease through a plant-mediated resistance mechanism i.e. referred as induced resistance. Hase *et al.* (2008) proved that treatment of tomato roots (*Solanum lycopersicum*) with *P. oligandrum* induces an increased amount of ethylene, reducing the severity of bacterial disease caused by *Ralstonia solanacearum*. Hase *et al.* (2008), Glazebrook (2005) next published that plant growth regulators play important role in the plant defence responses to pathogens i.e. jasmonic acid and salicylic acid. Therefore Hase *et al.* (2008) conducted study and laboratory experiment with the involvement of jasmonic acid and salicylic acid. These acids are dependent on signal transduction pathways in resistance to *R. solanacearum*. The experiments were carried out with tomato roots treated with *P. oligandrum* at two tomato cultivars. The first used tomato cultivar was Micro-Tom, i.e. wild-type and the second one was Moneymaker, the type that does not accumulate a salicylic acid. The occurrence of *R. solanacearum* was suppressed in the both tomatoes cultivars after application of *P. oligandrum*. The enhanced resistance was induced at 5 days after treatment. It seems be proved that *P. oligandrum* generally induces resistance to *R. solanacearum* in tomatoes. Takenaka *et al.* (2003) published conclusions that the application of *P. oligandrum* enhances resistance to root-rot-causing agents *Aphanomyces cochlioides* and *Rhizoctonia solani* in sugar beet. Holmes *et al.* (1998) conducted study and pot experiments, where sugar beet seeds were treated with *P. oligandrum* against damping-off of sugar beet. The results indicated that used of *P. oligandrum* significantly reduced a disease caused by *P. ultimum* but at pH values between 7.0 and 7.5 only.

Table 1. Plant protection promoting fungi as BA against various plant diseases.

Fungi	Experimental conditions	Disease	References
<i>Trichoderma</i> ssp.	Laboratory	Diseases caused by pathogens such as <i>Botrytis</i> , <i>Fusarium</i> or <i>Penicillium</i> spp	Samuels <i>et al.</i> (2014)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Laboratory	<i>Cucumber mosaic virus</i> in tomato	Vitti <i>et al.</i> (2016)
	Laboratory and pot experiments	<i>Fusarium oxysporum</i>	Altinok & Erdogan (2015)
	Laboratory	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Yang <i>et al.</i> (2009)
<i>Pythium oligandrum</i>	Laboratory	<i>Ralstonia solanacearum</i> in tomato	Hase <i>et al.</i> (2008)
	Laboratory	Root-rot caused by <i>Rhizoctonia solani</i> and <i>Aphanomyces cochlioides</i> in sugar beet	Takenaka <i>et al.</i> (2003)
	Laboratory	Damping-off caused by <i>P. ultimum</i> in sugar beet	Holmes <i>et al.</i> (1998)

2.2. Bacterial BioControl

Several promising bacterial representatives have been selected and described further in this section. And also at the end of this section (2.2.) in Table 2. There are selected fungi and their impact on plant protection.

2.2.1. *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas sp. is ubiquitous microorganism in agricultural soils, well adapted to grow in the rhizosphere. *Pseudomonas* is well suited as biocontrol and growth-promoting agents (Vallabhaneni 2016). They are often used as BA because they display a broad range of mechanisms to control diseases (Arseneault *et al.* 2016). The inoculation of seeds or roots with fluorescent *Pseudomonas* has been a widely used in practice to increase plant vigor and

productivity in tobacco. The *Pseudomonas* has a beneficial effect against a wide range of root phytopathogens, e.g. *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* and *Fusarium oxysporum* belong to them. The mechanisms suggested to achieve such inhibition include: production of antibiotics, iron-chelating compounds, hydrolytic enzymes and biosurfactants, competition for favourable nutritional sites or as mycorrhiza helping bacteria (Vallabhaneni 2016). Proteins produced by certain species of *Pseudomonas* increase resistance to *Xanthomonas oryzae var. oryzae* in rice and to Tobacco Mosaic Virus. These proteins cause hypersensitivity reactions, higher expression levels of genes related to defense against pathogens and promoting of growth. Therefore they have a potential for development as protein-type BA. When they are applied to tobacco or rice plants then proteins derived from harpin are able to induce resistance to Tobacco Mosaic Virus and to leaf blight disease in rice with varying degrees. The functional peptide fragments, which were identified there, may result in the effective control of diseases as well as increase a productivity of crops. The condition is that they are developed into a form of microbial pesticides for agricultural applications. This could be an environmentally friendly alternative to some of the chemical pesticides currently in use (Wu *et al.* 2017). The appearance of fluorescent *Pseudomonas* in the rhizosphere microflora depends on characteristics such as soil texture, rhizosphere pH, soil matrix potential, soil water flow, temperature, plant species (Vallabhaneni 2016). Mikicinski *et al.* (2016) used the isolate of *Pseudomonas graminis* (strain 49M) under laboratory and greenhouse conditions but in an orchard also. The aim was to protect apple blossoms and apple terminal shoots. This study identified *Pseudomonas graminis*, strain 49M's ability to suppress the fire blight in an immature pear and apple flower and its fitness on flowers in an orchard. The strain 49M is highly protective against fire blight on different plant tissues (up to 73.3% on flowers and 86.2% on terminal shoots, compared to the controls) during the entire bloom period in an orchard. This is the first report showing that *Pseudomonas graminis* strain 49M is a prospective candidate for a future development as the biopesticide that will be used against the fire blight. Vallabhaneni (2016) conducted a study and his results suggest that the *Pseudomonas fluorescens* utilization to control *Rhizoctonia solani* is the promising strategy of disease management. This statement is supported by the fact that all tested *P. fluorescens* isolates reduced the disease severity in tobacco seed beds. Such reduction was evident due to the decrease of affected seedlings number, decrease in the number of sclerotium formation and symptoms' disappearance of severe disease on seed beds. Nine isolates of *P. fluorescens* were selected and evaluated in terms of their antagonistic activity against *R. solani* under vitro conditions. Knot *et al.* (2013) reported that the *Pseudomonas* increases germination

of *Poa pratensis* seeds under laboratory conditions, especially of 2-4 years old seeds. Yusran *et al.* (2009) reported the application of *Pseudomonas* and *Bacillus amyloliquefaciens* (individually or in a combination) into soil caused that the state of tomato roots improved in a pot trial. They were healthier and significantly higher colonized by arbuscular mycorrhizal fungi.

2.2.2. *Bacillus amyloliquefaciens*

Bacillus amyloliquefaciens is gram-positive, aerobic and endospore-forming bacteria. They are often used as is commercial chemicals in industry (Zhang *et al.* 2016; Chowdhury *et al.* 2015; Kröber *et al.* 2014). They are one of the beneficial agents used for the plant growth promotion and the suppression of soil-borne diseases in agriculture as well. *B. amyloliquefaciens* produces many metabolites such as are e.g. enzymes (chitinase, peroxidases and proteases), casein, elastin, gelatin, starch, nitrites, esculin and arbutin, phosphatases, adenine, cellulose, guanine, hypoxanthine, pectin, testosterone, tyrosine, many types of antibiotics (e.g. bacillomycins, fengycin, difficidin) and other substances (El-Gremi *et al.* 2017; Chowdhury *et al.* 2015; Lagerlöf *et al.* 2015; He *et al.* 2013; Priest *et al.* 1987). Production of antibiotic that inhibit a growth of antifungal pathogens El-Gremi *et al.* (2017), as well as antibacterial and antinematocidal effects for plants and also the ability to produce a wide variety of secondary metabolites, which aims to suppress competing bacteria, fungi, viruses or nematodes in the rhizosphere of plants. Lagerlöf *et al.* (2015), Kröber *et al.* (2014), He *et al.* (2013), Chen *et al.* (2009) and Koumoutsi *et al.* (2004) declare that the bacteria reduce the influence of plant abiotic stress conditions such as drought, salinity or lack of nutrients. Proteins secreted by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 protect plants against disease by eliciting innate immunity (Kierul *et al.* 2015). He *et al.* (2013) reported that *Bacillus amyloliquefaciens* belongs to beneficial soil microorganisms, which colonize the plant roots and stimulate the growth of its host. The use of these bacteria offers great potential to increase the yield and reduce the plant disease caused by numerous microorganisms. Kim *et al.* (2015) reported that these bacteria attract attention by their increasing importance in the last time, particularly by their fungicidal effect. PT14 strain proved its property to be a broad spectrum of antifungal activity against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. Nevertheless this strain was not active against bacterial strains. Furthermore Lagerlöf *et al.* (2015), Talboys *et al.* (2014), Fan *et al.* (2012), Burkett-Cadena *et al.* (2008) reported that *B. amyloliquefaciens* promotes a plant growth that is based primarily on the production of secondary metabolites suppressing competing microbial pathogens and diseases occurring in the rhizosphere of plants. It encourages a root development and improves seed germination

as well. Some plants, e.g. maize (Baudoin *et al.* 2003), soybean (Yang *et al.* 2012), lupin (Egle *et al.* 2003), rice (Aulakh *et al.* 2001) produce a lactic acid in root exudates. This acid with the other root exudates becomes a energy source for *B. amyloliquefaciens*. Chowdhury *et al.* (2015) carried out experiments which demonstrated that FZB42 strain is able to reduce the disease severity of bottom root caused by soil-borne pathogen *Rhizoctonia solani* on lettuce. Kröber *et al.* (2014) reported results of their pot and field experiments which demonstrated that the strain FZB42 is able to effectively colonize the rhizosphere of lettuce (*Lactuca sativa*) and promotes a significant suppression of bottom rot disease caused by *Rhizoctonia solani*.

2.2.3. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis is a ubiquitous gram-positive bacteria commonly found in water, soil, air and decomposition of plant residues. However, the primary presence of these bacteria was found in soil (Tam *et al.* 2006; Kunst *et al.* 1997). The bacteria produce endospores that allow it to endure and overcome some extreme temperatures and dry periods. *B. subtilis* produce a series of proteases and other enzymes. This bacterium is considered a benign organism, as it has not properties that cause disease and is not pathogenic or toxic for humans, animals or plants (Kunst *et al.* 1997). Many years ago Korzybski *et al.* (1978) and Katz and Demain (1977), published that the *B. subtilis* produces a wide spectrum of antibacterial and antifungal compounds and furthermore also antibiotics such as difficidin and oxydifficidin that are effective against the broad range of aerobic and anaerobic bacteria.

These bacteria are widely used in agriculture to promote plant growth. They may be taken into account as a promising approach how to protect plants against diseases (Ma *et al.* 2015). Orio *et al.* (2016) reported that the application of *B. subtilis* had a strong effect against fungal pathogen that causes pink disease of roots (*Setophoma terrestris*) at onions.

Table 2. Plant protection promoting bacteria as BA against various plant diseases.

Bacteria	Experimental sites	Disease	References
<i>Pseudomonas</i> spp.	Laboratory condition	<i>Xanthomonas oryzae</i> in rice and <i>Tobacco Mosaic Virus</i> in tobacco	Wu et al. (2017)
	Greenhouse condition, pot experiment	Fire blight of pear and apple	Mikicinski <i>et al.</i> (2016)
	Laboratory condition	Diseases caused by <i>Rhizoctonia solani</i> in tobacco	Vallabhaneni (2016)
	Laboratory condition, pot experiment	Meloidogyne javanica in tomato	Siddiqui & Shaukat (2004)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Laboratory condition	Disease of bottom root caused by <i>Rhizoctonia solani</i> on lettuce	Chowdhury <i>et al.</i> (2015)
	Greenhouse and field conditions	Rot disease caused by <i>Rhizoctonia solani</i> on lettuce	Kröber <i>et al.</i> (2014)
	Laboratory condition	<i>Erwinia carotovora</i> in <i>Arabidopsis</i>	Ryu et al. (2004)
	Field condition	Tomato mottle virus	Murphy et al. (2000)
<i>Bacillus subtilis</i>	Laboratory condition	Pink disease of roots at onions	Orio et al. (2016)
	Laboratory condition	<i>Erwinia carotovora</i> in <i>Arabidopsis</i>	Ryu et al. (2004)
	Greenhouse and field conditions	Downy mildew in pearl millet	Raj et al. (2003)

3. Conclusions

The current research is focused on the partial replacement of chemicals used in agriculture to protect plants against pests and diseases. Within this context it is examined an usage of BAs,

where e.g. the interactions between organisms leads to damage to other plant pathogen organism.

Many studies reported positive influence of fungal as well as bacterial BAs on plant health and growth, respectively. These studies were mostly realized in laboratory conditions, where many negative factors can be excluded. Therefore, before transferring these technologies in agronomic practice, pot and especially field trials are strongly needed to confirm the laboratory results in field conditions. Nowadays, there are only several studies that confirmed the positive influence of BAs in the pots or fields. Generally, BAs presents the promising way in plant protection, which required further testing.

Acknowledgements

This research was financially supported by the Resource Preservation by Application of bioeffectors in European Crop Production nr. 7. RP 312117.

This manuscript was proof readed by: Proof-Reading-Service.com.

References

Ahmad P., Hashem A., Abd-Allah E.F., Alqarawi A.A., John R., Egamberdieva D., Gucel S. (2015): Role of *Trichoderma harzianum* in mitigating NaCl stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L) through antioxidative defense system. *Frontiers in Plant Science*. 6: 868. DOI: 10.3389/fpls.2015.00868.

Altinok H.H., Erdogan O. (2015): Determination of the In vitro Effect of *Trichoderma harzianum* on Phytopathogenic Strains of *Fusarium oxysporum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 43 (2). 494-500. DOI:10.15835/nbha4329788.

Al-Rawahi A.K., Hancock J.G. (1997): Rhizosphere competence of *Pythium oligandrum*. *Phytopathology*. 87 (9): 951-959. DOI: 10.1094/PHYTO.1997.87.9.951.

Arseneault T., Goyer C., Filion M. (2016): Biocontrol of Potato Common Scab is Associated with High *Pseudomonas fluorescens* LBUM223 Populations and Phenazine-1-Carboxylic Acid Biosynthetic Transcript Accumulation in the Potato Geocaulosphere. *Phytopathology*. 106 (9): 963-970. DOI: 10.1094/PHYTO-01-16-0019-R.

Aulakh M.S., Wassmann R., Bueno C., Kreuzwieser J., Rennenberg H. (2001): Characterization of root exudates at different growth stages of ten rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Plant Biology*. 3 (2): 139-148. DOI: 10.1055/s-2001-12905.

Baudoin E., Benizri E., Guckert A. (2003): Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. 35 (9): 1183-1192. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00179-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00179-2).

Burkett-Cadena M., Kokalis-Burelle N., Lawrence K.S., van Santen E., Kloepper J.W. (2008): Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. *Biological Control*. 47 (1): 55-59. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2008.07.008.

Chen X.H., Borriss R., Scholz R., Schneider K., Vater J., Süssmuth R., Piel J., Koumoutsis A. (2009): Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*. 140 (1-2). 27-37. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.10.011.

Choudhary D.K., Johri, B.N. (2009): Interactions of *Bacillus* spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*. 164 (5): 493-513. DOI: 10.1016/j.micres.2008.08.007.

Chowdhury S.P., Hartmann A., Gao X.W., Borriss R. (2015): Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Frontiers in Microbiology*. 6. 780. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00780.

Do Vale L.H.F., Gómez-Mendoza D.P., Kim M.S., Pandey A., Ricart C.A.O., Filho E.X. F., Sousa M.V. (2012): Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomics*. 12 (17): 2716-2728. DOI: 10.1002/pmic.201200063.

Dominguez S., Rubio M.B., Cardoza R.E., Gutierrez S., Nicolas C., Bettiol W., Hermosa R., Monte E. (2016): Nitrogen Metabolism and Growth Enhancement in Tomato Plants Challenged with *Trichoderma harzianum* Expressing the *Aspergillus nidulans* Acetamidase *amdS* Gene. *Frontiers in Microbiology*. 7:1182. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01182.

Duo-Chuan L. (2006): Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*. 161 (6): 345-360. DOI: 10.1007/s11046-006-0024-y.

Egle K., Romer W., Keller H. (2003): Exudation of low molecular weight organic acids by *Lupinus albus* L., *Lupinus angustifolius* L. and *Lupinus luteus* L. as affected by phosphorus supply. *Agronomie*. 23 (5-6): 511-518. DOI: 10.1051/agro:2003025.

El-Gremi S.M., Draz I.S., Youssef W.A.E. (2017): Biological control of pathogens associated with kernel black point disease of wheat. *Crop Protection*. 91: 13-19. DOI: 10.1016/j.cropro.2016.08.034.

Fan B., Carvalhais C.L., Becker A., Fedoseyenko D., von Wirén N., Borriss R. (2012): Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiology*. 12: 116. DOI: 10.1186/1471-2180-12-116.

Ferrigo D., Raiola A., Rasera R., Causin R. (2014): *Trichoderma harzianum* seed treatment controls *Fusarium verticillioides* colonization and fumonisin contamination in maize under field conditions. *Crop Protection*. 65: 51-56. DOI: 10.1016/j.cropro.2014.06.018.

Galletti S., Fornasier F., Cianchetta S., Lazzeri L. (2015): Soil incorporation of brassica materials and seed treatment with *Trichoderma harzianum*: Effects on melon growth and soil microbial activity. *Industrial Crops and Products*. 75 Part A: 73-78. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.04.030.

Glazebrook J. (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 205-27. DOI: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.

Gooday G.W. (1999): Aggressive and defensive roles for chitinases. In: Jollès P., Muzzarelli R.A.A. (eds.). *Chitin and Chitinases*. Birkhäuser Verlag. Basel. 157-165. DOI: 10.1007/978-3-0348-8757-1_11.

Gomes E.V., Costa M.D., de Paula R.G., de Azevedo R.R., da Silva F.L., Noronha E.F., Ulhoa C.J., Monteiro V.N., Cardoza R.E., Gutierrez S. (2015): The Cerato-Platanin protein

Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. *Scientific Reports*. 5: 1-13. DOI: 10.1038/srep17998.

Hase S., Takahashi S., Takenaka S., Nakaho K., Arie T., Seo S., Ohashi Y., Takahashi H. (2008): Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathology*. 57 (5): 870-876. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2008.01858.x.

He P., Hao K., Blom J., Rückert Ch., Vater J., Mao Z.C., Wu Y.X., Hou M.S., He P.B., He Y.Q. et al. (2013): Genome sequence of the plant growth promoting strain *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9601-Y2 and expression of mersacidin and other secondary metabolites. *Journal of Biotechnology*. 164: 281-291. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.12.014.

Hermosa R., Viterbo A., Chet I., Monte E. (2012): Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*. 158: 17-25. DOI: 10.1099/mic.0.052274-0.

Hogenhout S.A., Van der Hoorn R.A.L., Terauchi R., Kamoun, S. (2009): Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 22 (2): 115-122. DOI: 10.1094/MPMI-22-2-0115.

Holmes K.A., Nayagam S.D., Craig G.D. (1998): Factors affecting the control of *Pythium ultimum* damping-off of sugar beet by *Pythium oligandrum*. *Plant Pathology*. 47: 516-522. DOI: 10.1046/j.1365-3059.1998.00253.x.

Janarthanam L. (2013): Bioprotectant with multifunctional microorganisms: A new dimension in plant protection. *Journal of Biopesticides*. 6 (2): 219-204.

Katz E., Demain A.C. (1977): Peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriological Reviews*. 41 (2): 449-474.

Kerroum F., Noureddine K., Eddine H.J., Mebrouk K. (2015): Biological Control of *Fusarium* Crown and Root Rot Disease of Tomato by *Trichoderma Harzianum* in the West of Algeria. *International Journal of Science and Nature*. 6 (2): 141-146.

Kierul K., Voigt B., Albrecht D., Chen X.H., Carvalhais L.C., Borriss R. (2015): Influence of root exudates on the extracellular proteome of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Microbiology-SGM*. 161: 131-147. DOI: 10.1099/mic.0.083576-0.

Kim Y.G., Kang H.K., Kwon K.D., Seo C.H., Lee H.B., Park Y. (2015): Antagonistic Activities of Novel Peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* PT14 against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63 (48): 10380-10387. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04068.

Knot P., Pancikova J., Raus J., Sochorec M. (2013): The Effect of Proradix and Headstart Treatment Methods on Germination of *Poa pratensis* Caryopsis. In: Book of Abstracts Seed and Seedlings XI. Scientific and Technical Seminar. Czech University Life Sciences Prague. February 7, 2013.

Korzybski T., Kowszyk-Gindifer Z., Kurylowicz W. (1978): Antibiotics isolated from the genus *Bacillus* (Bacillaceae) In: *Antibiotics - Origin. Nature and Properties*. Vol. III. American Society of Microbiolog. Washington. DC. 1529-1661.

Koumoutsi A., Chen X.H., Henne A., Liesegang H., Hitzeroth G., Franke P., Vater J., Borriss R. (2004): Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *Journal of Bacteriology*. 186 (4). 1084-1096. DOI: 10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004.

Kröber M., Wibberg D., Grosch R., Eikmeyer F., Verwaaijen B., Chowdhury S.P., Hartmann A., Puhler A., Schluter A. (2014): Effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing. *Front. Microbiol.* 5:252. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00252.

Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M.G., Bessieres P., Bolotin A., Borchert S. et al. (1997): The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. 390 (6657): 249-256. DOI: 10.1038/36786.

Lagerlöf J., Ayuke F., Bejai S., Jorge G., Lagerqvist E., Meijer J., JohnMuturi J., Söderlund S. (2015): Potential side effects of biocontrol and plant-growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* bacteria on earthworms. *Applied Soil Ecology*. 96: 159-164. DOI: 10.1016/j.apsoil.2015.08.014.

Le Floch G., Rey P., Benizri E., Benhamou N., Tirilly Y. (2003): Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant and Soil*. 257 (2): 459-470. DOI: 10.1023/A:1027330024834.

Ma X., Wang X., Cheng J., Nie X., Yu X., Zhao Y., Wang W. (2015): Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Biological Control*. 90: 34-41. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2015.05.013.

Mikicinski A., Sobiczewski P., Pulawska J., Maciorowski R. (2016): Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) by a novel strain 49M of *Pseudomonas graminis* from the phyllosphere of apple (*Malus* spp.). *European Journal of Plant Pathology*. 145 (2): 265-276. DOI: 10.1007/s10658-015-0837-y.

Murphy J.F., Zehnder G.W., Schuster D.J., Sikora E.J., Polston J.E., Kloepper J.W. (2000): Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against tomato mottle virus. *Plant Disease*. 84 (7): 779-784. DOI: 10.1094/PDIS.2000.84.7.779.

Neumann G. (2012): EU-funded research collaboration on use of bio-effectors in agriculture launched. Press Release. Germany: University of Hohenheim. Available at <http://www.bioeffector.info/about-bioeffector.html> (accessed on Sep 15, 2014).

Orio A.G.A., Brucher E., Ducasse D.A. (2016): A strain of *Bacillus subtilis* subsp *subtilis* shows a specific antagonistic activity against the soil-borne pathogen of onion *Setophoma terrestris*. *European Journal of Plant Pathology*. 144 (1): 217-223. DOI: 10.1007/s10658-015-0762-0.

Priest F.G., Goodfellow M., Shute L.A., Berkeley R.C.W. (1987): *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 37 (1): 69-71.

Raj S.N., Deepak S.A., Basavaraju P., Shetty H.S., Reddy M.S., Kloepper J.W. (2003): Comparative performance of formulations of plant plant promoting rhizobacteria in growth promotion and suppression of downy mildew in pearl millet. *Crop Protection*. 22 (4): 579-588. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00222-3](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00222-3).

Raja U. (2007): *Trichoderma Harzianum*. Greenmax Agro Tech. India. Available at <http://www.greenmaxagrotech.com/enquiry.html> (accessed on Nov 25, 2014).

Roy E. (2017): Phosphorus recovery and recycling with ecological engineering: A review. *Ecological Engineering*. 98: 213-227. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2016.10.076.

Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper J.W., Pare P.W. (2004): Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 134 (3): 1017-1026. DOI: 10.1104/pp.103.026583.

Samuels G.J., Chaverri P., Farr D.F., McCray E.B. (2014): *Trichoderma* online. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory. ARS. USDA. The Regents of the University of California. Available at <http://genome.jgi.doe.gov/Triha1/Triha1.home.html> (retrieved/accessed on Nov 26, 2016).

Siddiqui I.A., Shaukat S.S. (2004): Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. *Journal of Phytopathology*. 152 (1): 48-54. DOI: 10.1046/j.1439-0434.2003.00800.x.

Takenaka S., Nishio Z., Nakamura Y. (2003): Induction of defense reactions in sugar beet and wheat by treatment with cell wall protein fractions from the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Phytopathology*. 93 (10): 1228-32. DOI: 10.1094/PHYTO.2003.93.10.1228.

Tam N.K.M., Uyen N.Q., Hong H.A., Duc L.H., Hoa T.T., Serra C.R., Henriques A.O., Cutting S.M. (2006): The Intestinal Life Cycle of *Bacillus subtilis* and Close Relatives. *Journal of Bacteriology*. 188 (7): 2692-2700. DOI: 10.1128/JB.188.7.2692-2700.2006.

- Talboys P.J., Owen D.W., Healey J.R., Withers P.J.A., Jones D.L. (2014): Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. *BMC Plant Biology*. 14: 51. DOI: 10.1186/1471-2229-14-51
- Vallabhaneni S.D. (2016): Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Seed Beds Using *Pseudomonas fluorescens*. *Agricultural Research*. 5 (2): 137-144. DOI: 10.1007/s40003-016-0207-9.
- Vitti A., Pellegrini E., Nali C., Lovelli S., Sofo A., Valerio M., Scopa A., Nuzzaci M. (2016): *Trichoderma harzianum* T-22 Induces Systemic Resistance in Tomato Infected by Cucumber mosaic virus. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1520. DOI: 10.3389/fpls.2016.01520.
- Withers P.J., Sylvester-Bradley R., Jones D.L., Healey J.R., Talboys P.J. (2014): Feed the crop not the soil: rethinking phosphorus management in the food chain. *Environmental Science & Technology*. 48 (12): 6523-6530.
- Wu H.J., Zhang Y., Zhang H.Y., Gu Q., Gao X.W. (2017): Identification of functional regions of the HrpZ (Psg) protein from *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* that induce disease resistance and enhance growth in plants. *European Journal of Plant Pathology*. 147 (1): 55-71. DOI: 10.1007/s10658-016-0979-6.
- Yang T.Y., Liu G.L., Li Y.C., Zhu S.M., Zou A.L., Qi J.L., Yang Y.H. (2012): Rhizosphere microbial communities and organic acids secreted by aluminum-tolerant and aluminum-sensitive soybean in acid soil. *Biology and Fertility of Soils*. 48 (1): 97-108. DOI: 10.1007/s00374-011-0608-7.
- Yang H.H., Yang S.L., Peng K.C., Lo C.T., Liu S.Y. (2009): Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*. 113 (9): 924-932. DOI: 10.1016/j.mycres.2009.04.004.
- Yedidia I., Srivastva A.K., Kapulnik Y., Chet I. (2001): Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil*. 235: 235-242. DOI: 10.1023/A:1011990013955.

Yusran Y., Weinmann M., Neumann G., Römheld V., Müller T. (2009). Effects of *Pseudomonas* sp. "Proradix" and *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the Establishment of AMF Infection, Nutrient Acquisition and Growth of Tomato Affected by *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *radicis-lycopersici* Jarvis and Shoemaker. 26-30 August 2009. The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI. University of California. UC Davis: Department of Plant Sciences. Available at <http://eprints.cdlib.org/uc/item/22h2v2h7> (accessed on Nov 22, 2014).

Zhang N., Yang D.Q., Kendall J.R.A., Borriss R., Druzhinina I.S., Kubicek C.P., Shen Q. R., Zhang R.F. (2016): Comparative Genomic Analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* Reveals Evolutional Traits for Adaptation to Plant-Associated Habitats. *Frontiers in Microbiology*. 7: 2039. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02039.

7. SUMÁRNÍ DISKUZE

Na téma vlivu aplikace tzv. bioefektorů, resp. využití živých mikroorganismů na růst rostlin bylo provedeno mnoho studií, které zahrnovaly pozorování různých parametrů. Málo z těchto studií se však zaměřovalo komplexně na růst rostlin, jejich výšku, hmotnost nadzemní a kořenové části, obsah vybraných živin v nadzemní hmotě rostlin, popřípadě odběr živin rostlinou. Většina studií byla zaměřena na pozorování růstu, délky a rozsahu kořenového systému, dále na využití těchto přípravků v rámci ochrany rostlin nebo byly studovány spíše genomy živých, aktivních mikroorganismů, které se v těchto přípravcích využívají, popřípadě pokusy byly provedeny v jiných podmínkách a s jinými testovanými rostlinami. Z výše uvedených faktů je vidět, že je souhrn poznatků v této práci rozsáhlý široce zaměřený. Z tohoto důvodu bylo poměrně složité porovnávat výsledky této práce s jinými autory.

Yusran et al. (2009) uvádějí, že po aplikaci přípravku Proradix a RhizoVital (jednotlivě nebo v kombinaci) do půdy došlo u nádobového pokusu s rajčaty k významnému zlepšení stavu kořenů rostlin. Kořeny rostlin byly zdravější, a vykazovaly významně vyšší kolonizaci arbuskulárních mykorhizních hub.

Z výsledků této disertační práce je zřejmý pozitivní vliv aplikace P-hnojiva (zejména TSP) na růst kořenového systému kukuřice i pšenice. Kolonizace arbuskulárních mykorhizních hub však v rámci studie sledována nebyla.

Dále, Kumar et al. (2015) provedli nádobový pokus, během něhož pozorovali vliv inokulace kajanu indického (*Cajanus cajan*, L.) bakterií *Pseudomonas fluorescens*. Pro tuto studii bylo izolováno 75 fluorescenčních kmenů bakterií z rodu *Pseudomonas* z různých agroekosystémů v Indii. Izolovaný kmen P17 vykazoval značnou podporu růstu rostlin a zvýšený příjem živin. Naočkování mělo pozitivní vliv na délku kořenů, sušinu, obsah chlorofylu, sacharidů, na příjem dusíku, vápníku, železa a manganu.

V rámci této disertační práce byly rostliny naočkovány bakterií *Pseudomonas* sp., kmen DSMZ 13137 (přípravek Proradix; BE2) a statisticky průkazný vliv aplikace byl prokázán pouze u nádobového pokusu, který byl založen v roce 2015. Průkazné rozdíly mezi jednotlivými variantami byly pouze u S a Mn. Nejvíce S přijmuly rostliny varianty, které byly naočkovány bioefektorem Proradix a hnojeny čistírenskými kaly. Nejvyšší obsah Mn měly rostliny z kontrolní varianty, bez přídavku hnojiva, pouze s naočkováním Proradixu a rostliny. U ostatních nádobových pokusů, vybraných prvků a sledovaných parametrů nebyl prokázán

pozitivní vliv aplikace bioefektorů. Obsah chlorofylu a sacharidů v rostlinách nebyl v této práci sledován.

Chiarini et al. (1998) provedli nádobový pokus ve skleníkových podmínkách, kde byl hodnocen vliv naočkování mikroorganismy *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* a *Enterobacter* sp. na porost čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor*, L.). Výsledky ukázaly, že všechny mikroorganismy měly vliv na lepší schopnost kolonizovat kořenový systém rostlin. Pozitivní vliv na růst rostlin byl pozorován pouze po naočkování rostlin *B. cepacia* a *P. fluorescens*. Dvojitá inokulace (kombinace dvou mikroorganismů) neměla významný účinek na růst rostlin.

Schopnost kolonizovat kořenový systém rostlin nebo dvojitá inokulace rostlin nebyla v této práci hodnocena a pozitivní vliv na růst nadzemní i kořenové části rostlin měla pouze aplikace trojitého superfosfátu, nikoliv bioefektorů.

Z výsledků, které byly získány během realizace nádobových a polních pokusů, je zřejmé, že nebyl prokázán plošný pozitivní vliv aplikace bioefektorů na výšku rostliny, výnos sušiny, obsah nebo odběr živin rostlinou. Vyšší vzrůst rostlin, zejména v počátečních růstových fázích, kukuřice/pšenice, vyšší hmotnost nadzemní a kořenové části rostlin byl zpravidla způsobem aplikací P-hnojiv (zejména trojitého superfosfátu), u pokusu 10 byl zjištěn pozitivní vliv aplikace Proradixu. Vyrovnaná výška rostlin u všech variant v pozdějších stádiích mohla být způsobena korelačními stimulačními účinky kořenů a následným růstem nadzemních částí rostlin nebo produkcí fytohormonů (gibbereliny, cytokininy, auxiny) (Šebánek et al., 1991). Rozdíly mezi jednotlivými variantami u obsahu živin v nadzemní hmotě rostlin nebyly v porovnání s uskutečněným počtem pokusů významné.

Chen et al. (2007), Fan et al. (2012), Lagerlöf et al. (2015) a další autoři píšou o pozitivním vlivu bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* na růst rostlin, nadzemní i kořenové části rostliny. V našich nádobových a polních pokusech byl potvrzen pozitivní vliv aplikace P-hnojiva, zejména TSP, nikoliv však aplikace samotné bakterie, na vyšší vzrůst rostlin

Harman et al. (2004) pozorovali účinky houby *Trichoderma harzianum* (T22) na kořenový systém, nadzemní část, velikost a množství kořenových vlásků u kukuřice. Rostliny vzešlé z ošetřených semen měly větší kořeny a výhonky než sazenice nenaočkované. Kořenové systémy u rostlin, které vyrostly z ošetřených semen touto houbou, byly téměř dvakrát delší než u kontrolních rostlin. Naočkování zvýšilo také růst kořenových vlásků a hlavních kořenů. Celková plocha a objem kořenů v přítomnosti kmene T22 byly přibližně dvakrát větší než u kontrolních rostlin. Tak významný a pozitivní vliv aplikace této houby na porost kukuřice nebo pšenice, nemůžeme na základě našich výsledků potvrdit.

V rámci této práce nebyla potvrzena ani skutečnost, kterou publikuje několik autorů, že metabolity (organické kyseliny, fosfomonoesterázy a fytázy), které vylučuje *Penicillium bilaii*, dokáží rozpustit minerální fosfáty a zvýšit příjem fosfátů (Nakahara et al., 2004; Richardson et al., 2011; Gomez-Munoz et al., 2017). Nelze potvrdit ani výsledky studie, kterou uskutečnili Ram et al. (2015), kdy uvádějí, že po aplikaci *P. bilaii* v polních podmínkách došlo ke zvýšenému výnosu zrna pšenice. V této práci byla tato houba aplikovaná v nádobovém pokusu a pozitivní výsledky na výnos kukuřice nebyly prokázány.

Spohn et al. (2018) uskutečnili studii, která byla zaměřena na stanovení časových změn v příjmu fosforu (P) u mladých buků (*Fagus sylvatica*, L.) a půdních mikroorganismů na dvou lesních stanovištích s kontrastními zásobami P, s cílem lépe porozumět dynamice P v lesních ekosystémech. V rámci pokusustanovili příjem P rostlinou, příjem půdní mikrobiální biomasou (PMB) a ektomykorhizní houby (EMH) na špičce kořene pětkrát během roku. Dále změřili složení komunity EMH, potenciální aktivitu kyselé fosfatázy a množství genů bakteriální kyselé fosfatázy. Výsledky ukázaly, že mladé stromy rostly lépe v létě a na podzim na místech s nižším obsahem P v půdě, zatímco zvýšený růst rostlin na místech s vyšším obsahem P byl pouze na podzim. Příjem P půdní mikrobiální biomasou byl vyšší v organické vrstvě na místě s nízkým obsahem P, než v organické vrstvě v místě bohatém na P. Tím byla zdůrazněna důležitost mikrobiálního podílu P v organické vrstvě lesních půd s nízkým obsahem P. Výsledky ukazují, že půdní mikrobiální biomasa byla schopna kompenzovat nižší dostupnost P v půdě s nedostatečným obsahem P. Tuto skutečnost nemůžeme potvrdit, i přesto, že byla v pokusu 10 použita půda s nízkým obsahem P. Vyšší aktivita kyselé fosfatázy byla zaznamenána u půdních vzorků variant, kde bylo aplikováno P-hnojivo v kombinaci s bioefektorem.

Ferreira et al. (2018) hodnotili v půdě kontaminované mědí vliv přístupného P a inokulace houbou *Rhizophagus claus*, na aktivitu kyselé fosfatázy. V rámci této studie založili 45denní nádobový pokus, kdy aplikovali různé dávky P v kombinaci bez očkování nebo s naočkováním půdy *Rhizophagus claus*. Ani aplikace P, ani naočkování nemělo vliv na aktivitu kyselé fosfatázy. Naše pokusy ukazují opačné výsledky. V nádobovém pokusu 10 byla použita nekontaminovaná půda s velmi nízkým obsahem P a naočkování bylo provedeno jinými aktivními mikroorganismy, než uvedli Ferreira et al. (2018), došlo ke zvýšení aktivity fosfatázy u variant, kde byla hodnocena kombinace P-hnojiva s naočkováním bioefektorem BE2 a BE13. Obdobné závěry jako Ferreira et al. (2018) mají také Seabra et al. (2018), kteří uskutečnili parcelkový pokus s různými dávkami P a pozorovali vliv aplikace P na růst sazenic mahagonu (*Swietenia macrophylla* King),

v porovnání s kontrolní variantou, bez aplikace P. Závěrem uvádějí, že aktivita kyselé fosfatázy nebyla ovlivněna hnojením P.

Backers et al. (2017) publikovali hodnocení účinků listové aplikace extraktu z řasy *Ascophyllum nodosum* na růst a výnos rostlin bramboru. Aplikovali různé dávky extraktu (0; 0,5; 1; 2 nebo 4 l/ha), a následně hodnotili počet stonků na rostlinu, koncentraci živin v listech, počet hlíz na rostlinu, celkovou a komerční produktivitu brambor. Roztoky obsahující extrakt z řas podporovaly vyšší růst rostlin. U rostlin z variant, kde byla provedena aplikace extraktu v dávce 4 l/ha, došlo nejen ke zvýšené produkci hlíz, ale také ke zvýšení jejich velikosti a tedy i hmotnosti. Naše pokusy s touto řasou nepotvrdily vliv aplikace této řasy na vyšší výnosy kukuřice nebo pšenice.

Aplikaci řasy *Ascophyllum nodosum* využili ve svých pokusech také De Oliviera et al. (2017), kdy pozorovali účinky biostimulantů (huminových kyselin a fulvokyselin; jednoduchého extraktu z řas; zeleninového regulátoru s cytokininem, gibberellinem a auxinem; alkalického extraktu řas) ve srovnání s kontrolní variantou. Biostimulanty bylo ošetřeno osivo bobu obecného (*Phaseolus vulgaris*), a následně byl sledován vývoj kořenů rostlin. Žádný z biostimulantů však nezvýšil poměr nadzemní/kořenové části v porovnání s kontrolou, ani vývoj kořenového systému bobu. Ani naše pokusy nepotvrdily pozitivní vliv aplikace této řasy na vývoj nadzemní nebo kořenové části rostlin u kukuřice. Tento pozitivní vliv měla aplikace trojitého superfosfátu, nikoliv aplikace bioefektorů nebo rostlinných extraktů.

Většina autorů, kteří popisují pozitivní působení bioefektorů, publikuje výsledky získané z pokusů, které byly uskutečněné ve zcela řízených laboratorních podmínkách (Gravel et al. 2007; He et al. 2013; Buysens et al. 2016; Chagas et al. 2016; Paradiso et al. 2017), nebo v částečně řízených podmínkách nádobových pokusů (Ahmad et al. 2015; Gupta et al. 2016; Wang et al. 2016; El-Gremi et al. 2017; Lazarevic et al. 2018). V těchto podmínkách mohou přípravky a jejich účinné látky (mikroorganismy) působit odlišně, nežli v podmínkách polních, a proto je třeba se na tuto oblast ještě více zaměřit. V polních podmínkách dochází pravděpodobně po aplikaci bioefektorů ke konkurenčnímu vztahu mezi účinnou složkou použitých preparátů a půdními, přirozeně se vyskytujícími mikroorganismy na daném stanovišti.

Z tohoto důvodu je pozitivní vliv aplikace bioefektorů v rostlinné produkci nedostatečně podložen a popsán. Je také pravděpodobné, že díky snadnější publikovatelnosti pozitivních výsledků studií dochází k celkovému nadhodnocení potenciální účinnosti bioefektorů.

8. ZÁVĚR

V rámci této disertační práce byla založena řada nádobových i polních pokusů s testováním vlivu bioefektorů na parametry rostlin. Cílem této disertační práce bylo posoudit vliv aplikace bioefektorů samotných nebo v kombinaci P-hnojivy při pěstování rostlin (kukuřice a pšenice) a jejich vliv na výnos, růstové parametry nadzemní a kořenové části rostlin, odběr vybraných prvků rostlinou a obsah prvků v nadzemní hmotě rostlin, a to v rámci nádobových a polních pokusů. Zpočátku byly bioefektory testovány pouze v půdách s nízkým nebo vyhovujícím obsahem P, bez ohledu na další půdní vlastnosti. Vzhledem k řadě neprůkazných výsledků byl v pozdějších fázích práce výběr půd uzpůsoben tak, aby co nejvíce odpovídaly podmínkám, kde byly testované mikroorganismy izolovány. V rámci všech pokusů byl sledován zejména vliv aplikace bioefektorů na růstové parametry rostliny a příjem vybraných živin (zejména P) rostlinou. Během některých pokusů však byla pozorována a hodnocena i řada dalších parametrů.

Průkazný vliv bioefektorů na **výšku rostlin** kukuřice nebyl v *pokusech 1 - 9* pozorován. V roce 2017 (*pokus 10*) byl poprvé založen nádobový pokus s pšenicí. Pouze v rámci tohoto pokusu se prokázal pozitivní vliv aplikace bioefektoru BE2 (Proradix) na fosforem nehnojených variantách, a to jen na počátku vegetace. Ke konci vegetace došlo k vyrovnání výšky rostlin. U nádobových i některých polních pokusů byl prokázán pouze pozitivní vliv aplikace TSP. To potvrdilo fakt, že fosfor byl na sledovaných stanovištích limitující živinou pro růst rostlin.

U **hmotnosti čerstvé nadzemní biomasy** rostlin (kukuřice/pšenice) lze souhrně konstatovat fakt, že aplikace bioefektorů neměla pozitivní vliv na hmotnost nadzemní biomasy rostlin, ani na výnos, a to v rámci nádobových i polních pokusů.

Hmotnost kořenového systému byla pozorována pouze u nádobových pokusů, kdy bylo dosaženo obdobných výsledků, jako u hmotnosti čerstvé nadzemní biomasy rostlin. Z výsledků byl znatelný pouze pozitivní vliv aplikace trojitého superfosfátu na hmotnost kořenové části rostlin, nikoliv však aplikace bioefektorů.

Dále byl hodnocen **výnos sušiny** nadzemní hmoty kukuřice/pšenice. Pozitivní vliv aplikace bioefektorů na výnos sušiny nebyl prokázán v žádném z provedených nádobových nebo polních pokusů. V nádobových pokusech byl nejvyšší výnos sušiny stanoven u variant, kde byl aplikován trojitý superfosfát. Obdobně byl u rozsáhlejšího nádobového *pokusu 6* zjištěn pouze pozitivní vliv tuhé frakce digestátu na výnos sušiny.

V nadzemní hmotě rostlin po sklizni pokusů byly hodnoceny **obsahy makro-** (N, P, K, Ca, Mg, S) **a vybraných mikroprvků** (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, B) **a jejich odběry**. Průkazné výsledky byly zjištěny pouze u nádobových pokusů.

V případě *pokus* 2 byl zaznamenán negativní vliv na obsah vápníku v nadzemní hmotě u variant BE1 + TSP a BE2 + MF. Jediný průkazně pozitivní vliv byl zjištěn u dusíku, a to u BE2 na fosforem nehnojené variantě.

U screening experimentu (*pokus* 6). Byl zaznamenán průkazně vyšší obsah manganu v nadzemní hmotě rostlin po aplikaci BE2 do nehnojené půdy. V kombinaci s čistírenskými kaly vedla aplikace BE2 ke zvýšení obsahu síry. Nejvíce rozdílů bylo naměřeno při testování bioefektorů v kombinaci s tuhou frakcí digestátu. Zde byl prokázán pozitivní vliv aplikace BE6 na obsah P, Ca, S, Cu, Mn a B v nadzemní hmotě rostlin a aplikace BE5 na obsah P a Fe. Aplikace BE9 v kombinaci s mletým fosfátem vedla ke zvýšeným obsahům bóru v nadzemní hmotě.

V *pokus* 10 (odběr rostlin během vegetace) s pšenicí jarní byl prokázán pozitivní vliv bioefektorů pouze v případě zinku, kdy byly nejvyšší hodnoty zaznamenány u BE12 na fosforem nehnojené variantě. Více rozdílů bylo prokázáno až v rostlinách odebraných v době voskové zralosti. Pozitivní vliv BE2 v kombinaci s MF byl prokázán u síry a u BE13 na fosforem nehnojené variantě v případě zinku. V tomto pokusu byla hodnocena i aktivita kyselých fosfatázy. Zde však aplikace BE nezpůsobila průkazné rozdíly mezi variantami.

Ačkoli autoři publikací zaměřených na bioefektory ve většině případů popisují jejich průkazně pozitivní vliv, v rámci této disertační práce se průkazně pozitivní výsledky vyskytly jen zřídka. Podobně tomu bylo i u výsledků 21 zahraničních partnerů projektu Biofactor, v rámci kterého byla práce řešena. Pozitivní výsledky uváděné v literatuře pocházejí obvykle z krátkodobých laboratorních testů, kdy je využit jiný pěstební substrát, nežli půda. Popis pozitivního vlivu bioefektorů uvedený v mnoha studiích lze přičítat snažší publikovatelnosti průkazně pozitivních výsledků a tlaku firem produkujících tyto výrobky.

9. SEZNAM LITERATURY

Anon. Koppert Biological Systems. Packaging and storage Trianum P - Application Koppert biological systems. The Netherlands. 2014 [cit. 2014-06-15]. Dostupné z <<http://www.trianum.com/en/products/trianum-p.html>>.

Adiguzel Zengin. A. C. 2013. Potential application of *Quillaja Saponaria* Saponins as an antimicrobial soaking agent in leather industry. EGE Universitesi. 23 (1). 55-61.

Ahmad, P., Hashem, A., Abd-Allah, E. F., Alqarawi, A. A., John, R., Egamberdieva, D., Gucel, S. 2015. Role of *Trichoderma harzianum* in mitigating NaCl stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L) through antioxidative defense system. Frontiers in Plant Science. 6. 868.

Altuhaish, A., Hamim, Tjahjoleksono, A. 2014. Biofertilizer effects in combination with different drying system and storage period on growth and production of tomato plant under field conditions. Emirates Journal of Food and Agriculture. 26 (8). 716-722.

Aulakh M. S., Wassmann R., Bueno C., Kreuzwieser J., Rennenberg H. 2001. Characterization of root exudates at different growth stages of ten rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. Plant Biology. 3 (2).139-148.

Balík, J., Kulhánek, M., Černý, J., Száková, J., Pavlíková, D., Čermák, P. 2009. Differences in soil sulfur fractions due to limitation of atmospheric deposition. Plant, Soil and Environment. 55 (8). 344-352.

Balík, J., Pavlíková, D., Tlustoš, P., Vaněk, V., Pavlík, M. 2008. Mobilita prvků a látek v rhizosféře. Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin. Česká zemědělská univerzita v Praze. Power Print Praha. 150 s. ISBN: 978-80-213-1861-8.

Balík, J., Vaněk, V., Pavlíková, D., Kulhánek, M., Jakl, M. 2002. Fosfor v půdě a jeho koloběh v přírodě. In: Sborník z konference „Racionální použití hnojiv zaměřené na problematiku fosforu v rostlinné výrobě“. Praha. KAVR. 26-34. ISBN: 80-213-0957-1.

- Backes, C., Boas, R. L. V., Santos, A. J. M., Ribon, A. A., Bardivieso, D. M. 2017. Foliar application of seaweed extract in potato culture. *Revista de Agricultura Neotropical*. 4 (4). 53-57.
- Basu, A., Basu, S., Bandyopadhyay, S., Chowdhury, R. 2015. Optimization of evaporative extraction of natural emulsifier cum surfactant from *Sapindus mukorossi* - characterization and cost analysis. *Industrial Crops and Products*. 77. 920-931.
- Barber, S. A., Mackay, A. D., Kuchenbuch, R. O., Barraclough, P. B. 1988. Effect Of Soil-Temperature And Water On Maize Root-Growth. *Plant and soil*. 11 (2). 267-269.
- Barkatullah, Ahmad, I., Ibrar, M., Jelani, G. 2015. Allelopathic potential of *Sapindus mukorossi* Gaertn tested against *Pennisetum Americanum* (L.) leeke, *Setaria Italica* (L.) Beauv. and *Lactuca sativa* (L.). *Pakistan Journal of Botany*. 47 (5). 1879-1882.
- Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A. 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. 35 (9). 1183-1192.
- Beckie, H. J., Schlechte, D., Moulin, A. P., Gleddie, S. C., Pulkinen, D. A. 1998. Response of alfalfa to inoculation with *Penicillium bilaii* (Provide). *Canadian Journal of Plant Science*. 78 (1). 91-102.
- Blom, J., Rueckert, Ch., Niu, B., Wang, Q., Borriss, R. 2012. The complete genome of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU B946 contains a gene cluster for nonribosomal synthesis of iturin A. *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology. 194 (7). 1845-1846.
- Blume, H. P., Brümmer, G. W., Schwertmann, U., Horn, R., Knabner, I. K., Stahr, K., Auerswald, K., Beyer, L., Hartmann, A., Litz, N., Scheinost, A., Stanjek, H., Welp, G., Wilke, B. M. 2002a. *Lehrbuch der bodenkunde - Scheffer/Schachtschabel*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg - Berlin. 15. Aufl. 607 p. ISBN: 3-8274-1324-9.

- Brundrett, M. C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*. 320 (1-2). 37-77.
- Brutti, L., Alvarado, P., Rojas, T., Martensson, A. 2015. Tomato seedling development is improved by a substrate inoculated with a combination of rhizobacteria and fungi. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*. 65 (2). 170-176.
- Burkett-Cadena, M., Kokalis-Burelle, N., Lawrence, K. S., van Santen, E., Kloepper, J. W. 2008. Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. *Biological Control*. 47 (1). 55-59.
- Buysens, C., Cesar, V., Ferrais, F., de Boulois, H. D., Declerck, S. 2016. Inoculation of *Medicago sativa* cover crop with *Rhizophagus irregularis* and *Trichoderma harzianum* increases the yield of subsequently-grown potato under low nutrient conditions. *Applied Soil Ecology*. 105. 137-143.
- Campos, C., Cardoso, H., Nogales, A., Svensson, J., Lopez-Raez, J. A., Pozo, M. J., Nobre, T., Schneider, C., Arnholdt-Schmitt, B. 2015. Intra and Inter-Spore Variability in *Rhizophagus irregularis* AOX Gene. *PLoS ONE*. 10 (11). e0142339.
- Ceballos, I., Ruiz, M., Fernández, C., Peña, R., Rodríguez, A., Sanders, I. R. 2013. The in vitro mass-produced model mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, significantly increases yields of the globally important food security crop Cassava. *PLoS ONE*. 8 (8). e70633.
- Chagas, L. F. B., De Castro, H. G., Colonia, B. S. O., De Carvalho, M. R., Miller, L. D., Chagas, A. F. 2016. Efficiency of *Trichoderma* spp. as a growth promoter of cowpea (*Vigna unguiculata*) and analysis of phosphate solubilization and indole acetic acid synthesis. *Brazilian Journal of Botany*. 39 (2). 437-445.
- Chang, S. C., Jackson, M. L. 1957. Fractionation of soil phosphorus. *Soil Science*. 84 (2). 133-144.

- Chen, X. H., Koumoutsi, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, R. W., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, R. P., Vater, J., Süssmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., Borriss, R. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*. 25 (9). 1007-1014.
- Chen, X. H., Borriss, R., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süssmuth, R., Piel, J., Koumoutsi, A. 2009. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*. 140 (1-2). 27-37.
- Chiarini, L., Bevivino, A., Tabacchioni, S., Dalmastri, C. 1998. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: Root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. *Soil Biology and Biochemistry*. 30 (1). 81-87.
- Chowdhury S. P., Hartmann A., Gao X. W., Borriss R. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Frontiers in Microbiology*. 6. 780.
- Claus, D., Berkeley, R. C. W. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins. Baltimore. p. 1105-1139. ISBN: 0-683-07893-3.
- Compton, J. E., Cole, D. W. 1998. Phosphorus cycling and soil P fractions in Douglas-fir and red alder stands. *Forest Ecology and Management*. 110 (1-3). 101-112.
- Countinho, J., Sousa, J. R., Fernandes, M. L. V. 1996. Evaluation of soil test methods for the estimation of plant available phosphorus in the most representative soils from Portugal. V a greenhouse study with soils from north and central regions. In: Van Ittersum, M. K., Venner, G. E. G. T., Geijn, S. C., Jetten, T. H. (eds.). *Book of abstracts 4th ESA-congress*. Vol. I. European society for agronomy. Netherlands. p. 288-289. ISBN: 90-73384-43-5.
- Craigie, J. S. 2011. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*. 23 (3). 371-393.

Cross, A. F., Schlesinger, W. H. 1995. A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. *Geoderma*. 64 (3-4). 197-214.

Cunningham, J. E., Kuyack, C. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58 (5). 1451-1458.

ČSN EN 13651. 2002. Půdní melioranty a stimulanty růstu - Extrakce živin rozpustných v chloridu vápenatém/DTPA (CAD). Český normalizační institut. Praha. 20 s.

De Geyter, E., Smagghe, G., Rahbé, Y., Geelen, D. 2012. Triterpene saponins of *Quillaja saponaria* show strong aphicidal and deterrent activity against the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Pest management science*. 68 (2). 164-9.

De Oliveira, S. M., Umburanas, R. C., Pereira, R. G., De Souza, L.T., Favarin, J. L. 2017. Biostimulants via seed treatment in the promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris*) root growth. *Applied Research & Agrotechnology*. 10 (3). 109-114.

Dennis, C., Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma: II. Production of volatile antibiotics. *Transactions. The British Mycological Society. Cambridge University Press*. 57 (1). 41-48.

De Willigen, P., Van Noordwijk, M. 1987. Roots, plant production and nutrient use efficiency. PhD thesis. Agricultural University Wageningen. Netherlands. 282 p.

Dick, W. A., Tabatabai, M. A. 1984. Kinetic parameters of phosphatases in soils and organic waste materials. *Soil Science*. 137 (1). 7-15.

Dietz, M., Strock, J. Phosphorus cycle [online]. University of Minnesota. 2010 [cit. 2015-04-28]. Dostupné z <<http://swroc.cfans.umn.edu/ResearchandOutreach/SoilManagement/SoilResearch/PhosphorusCycle/index.htm>>.

- Do Vale, L. H. F., Gómez-Mendoza, D. P., Kim, M. S., Pandey, A., Ricart, C. A. O., Filho, E. X. F., Sousa, M. V. 2012. Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomics*. 12 (17). 2716-2728.
- Dominguez, S., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Gutierrez, S., Nicolas, C., Bettioli, W., Hermosa, R., Monte, E. 2016. Nitrogen metabolism and growth enhancement in tomato plants challenged with *Trichoderma harzianum* expressing the *Aspergillus nidulans* acetamidase *amdS* gene. *Frontiers in Microbiology*. 7. 1182.
- Duo-Chuan L. 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*. 161 (6). 345-360.
- Duvigneaud, P. 1988. *Ekologická syntéza*. Academia Praha. 414 p. ISBN: 21-054-88.
- Egle K., Romer W., Keller H. 2003. Exudation of low molecular weight organic acids by *Lupinus albus* L., *Lupinus angustifolius* L. and *Lupinus luteus* L. as affected by phosphorus supply. *Agronomie*. 23 (5-6). 511-518.
- El-Gremi, S. M., Draz, I. S., Youssef, W. A. E. 2017. Biological control of pathogens associated with kernel black point disease of wheat. *Crop Protection*. 91. 13-19.
- Elansary, H. O., Skalicka-Wozniak, K., King, I. W. 2016. Enhancing stress growth traits as well as phytochemical and antioxidant contents of *Spiraea* and *Pittosporum* under seaweed extract treatments. *Plant Physiology and Biochemistry*. 105. 310-320.
- Eltlbany, N., Smalla, S. The effect of *Pseudomonas jessenii* RU47 and *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the rhizosphere microbial community and plant growth of tomato and maize [online]. *Nachwuchswissenschaftlerforum/Young Scientists Meeting 2013. Berichte aus dem Julius Kühn-Institut*. 2013 [cit. 2014-12-23]. Dostupné z <<http://pub.jki.bund.de/index.php/BerichteJKI/article/view/2737/2969>>.
- Fan, B., Carvalhais, C. L., Becker, A., Fedoseyenko, D., von Wirén, N., Borriss, R. 2012. Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiology*. 12. 116.

Ferreira, P. A. A., Tiecher, T., Tiecher, T. L., Rangel, W. D., Soarese, C. R. F. S., Deuner, S., Tarouco, C. P., Giachini, A. J. et al. 2018. Effects of *Rhizophagus clarus* and P availability in the tolerance and physiological response of *Mucuna cinereum* to copper. *Plant Physiology and Biochemistry*. 122. 46-56.

Ferreira, A., Pires, R., Rabelo, P., Oliveira, R., Luz, J., Brito, C. 2013. Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian cerrado under greenhouse and field conditions. *Applied Soil Ecology*. 72. 103-108.

Ferrigo, D., Raiola, A., Rasera, R., Causin, R. 2014. *Trichoderma harzianum* seed treatment controls *Fusarium verticillioides* colonization and fumonisin contamination in maize under field conditions. *Crop Protection*. 65. 51-56.

Fröhlich, A., Buddrus-Schiemann, K., Durner, J., Hartmann, A., von Rad, U. 2012. Response of barley to root colonization by *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 under laboratory, greenhouse, and field conditions. *Journal of Plant Interactions*. 7 (1). 1-9.

Galletti, S., Fornasier, F., Cianchetta, S., Lazzeri, L. 2015. Soil incorporation of brassica materials and seed treatment with *Trichoderma harzianum*: Effects on melon growth and soil microbial activity. *Industrial Crops and Products*. 75 Part A. 73-78.

Gardner, F. P., Pearce, R. B., Mitchell, R. L. 1985. *Physiology of crop plants*. Iowa State University Press. Ames. IA (USA). 321 p. ISBN: 0-8138-1376-X.

Gholami, A., Shahsavani, S., Nezarat, S. 2009. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. 3 (1). 9-12.

Gomes, E. V., Costa, M. D., de Paula, R. G., de Azevedo, R. R., da Silva, F. L., Noronha, E. F., Ulhoa, C. J., Monteiro, V. N., Cardoza, R. E., Gutierrez, S. 2015. The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. *Scientific Reports*. 5. 1-13.

- Gomez-Munoz, B., Pittroff, S. M., de Neergaard, A., Jensen, L. S., Nicolaisen, M. H., Magid, J. 2017. *Penicillium bilaii* effects on maize growth and P uptake from soil and localized sewage sludge in a rhizobox experiment. *Biology and Fertility of Soils*. 53 (1). 23-35.
- Grandon, S. A., Espinosa, B. M., Rios, L. D., Sanchez, O. M., Saez, C. K., Hernandez, S. V., Becerra, A. J. 2013. Variation of saponin contents and physiological status in *Quillaja saponaria* under different environmental conditions. *Natural Products INC*. 8 (12). 1697-1700.
- Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R. J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology & Biochemistry*. 39. 1968-1977.
- Gregory, P. 2006. *Plant roots – Growth, activity and interaction with soils*. Blackwell Publishing Ltd, UK. 318 p.
- Gulden, R. H., Vessey, J. K. 2000. *Penicillium bilaii* inoculation increases root-hair production in field pea. *Agricultural Institute of Canada*. 80 (4). 801-804.
- Gupta, R., Bisaria, V. S., Sharma, S. 2016. Response of rhizospheric bacterial communities of *Cajanus cajan* to application of bioinoculants and chemical fertilizers: A comparative study. *European Journal of Soil Biology*. 75. 107-114.
- Halás, L., Gáborík, Š. 2000. Porovnanie analýz pôd metódami Mehlich III a Mehlich II. *Agrochémia*. 40 (3). 21-24.
- Harman, G. E., Howell, Ch. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004a. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. 2 (1). 43-56.
- Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A., Chen, J. 2004b. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*. 94 (2). 147-153.

- He P., Hao K., Blom J., Rückert Ch., Vater J., Mao Z. C., Wu Y. X., Hou M. S., He P. B., He, Y.Q. et al. 2013. Genome sequence of the plant growth promoting strain *Bacillus amyloliquifaciens* subsp. *plantarum* B9601-Y2 and expression of mersacidin and other secondary metabolites. *Journal of Biotechnology*. 164. 281-291.
- Hedley, M. J., Stewart, J. W. B., Chauhan, B. S. 1982. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fraction induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Science Society of America Journal*. 46 (5). 970-976.
- Heng, W., Ling, Z., Na, W., Youzhi, G., Zhen, W., Zhiyong, S., Deping, X., Yunfei, X., Weirong, Y. 2014. Analysis of the bioactive components of *Sapindus* saponins. *Industrial Crops and Products*. 61. 422-429.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*. 158. 17-25.
- Hoffman, G. 1991. VDLUFA - Methodenbuch band I: Die untersuchung von Böden. Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Vorschungsanstalten -Verlag. Darmstadt. 316 p.
- Holečková, Z., Kulhánek, M., Balík, J. 2017. Use of active microorganisms in crop production - a review. *Journal of Food Processing & Technology*. 8 (10). 696.
- Holliday, V. T., Gartner, W. G. 2007. Methods of soil P analysis in archeology. *Journal of Archaeological Science*. 34 (2). 301-333.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* Species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87 (1). 4-10.
- Israr, D., Mustafa, G., KhanKhalid, S., Shahzad, M., Ahmad, N., Masood, S. 2016. Interactive effects of phosphorus and *Pseudomonas putida* on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, nutrient uptake, antioxidant enzymes and organic acids exudation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 108. 304-312.

Ivanič, J., Havelka, B., Knop, K. 1984. Výživa a hnojenie rastlín. Príroda Bratislava - SZN Praha. 482 p. ISBN: 64-045-84.

Jones, D., Smith, B. F. L., Wilson, M. J., Goodman, B. A. 1991. Phosphate solubilizing fungi in a Scottish upland soil. *Mycological Research*. Cambridge University Press. 95 (9). 1090-1093.

Kadam, S. U., Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P. 2015a. Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *International Journal of Food Science and Technology*. 50 (1). 24-31.

Kadam, S. U., Pankaj, S. K., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., O'Donnell, C. P. 2015b. Development of biopolymer-based gelatin and casein films incorporating brown seaweed *Ascophyllum nodosum* extract. *Food Packaging and Shelf Life*. 6. 68-74.

Karamanos, R. E., Flore, N. A., Harapiak, T. J. 2010. Re-visiting use of *Penicillium bilaii* with phosphorus fertilization of hard red spring wheat. *Canadian Journal of Plant Science*. 90 (3). 265-277.

Katz, E., Demain, A. C. 1977. Peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological Reviews*. 41 (2). 449-474.

Kifle M. H. and Laing M. D. 2016. Effects of selected diazotrophs on maize growth. *Frontiers in Plant Science*. 7. 1429.

Kolektiv autorů. *Bacillus subtilis* final risk assessment [online]. Biotechnology program under the toxic substances control act (TSCA). Attachment I. – Final risk assessment of *Bacillus subtilis*. Environmental Protection Agency. United States. 1997 [cit. 2015-10-23]. Dostupné z <http://www.agriculturedefensecoalition.org/sites/default/files/pdfs/4M_2009_EPA_Website_2009_Bacillus_Subtilis_Final_Risk_Assessment.pdf>.

- Korzybski, T., Kowszyk-Gindifer, Z., Kurylowicz, W. 1978. Antibiotics isolated from the genus *Bacillus* (*Bacillaceae*) In: Antibiotics - Origin. Nature and Properties. Vol. III. American Society of Microbiology. Washington. DC. 1529-1661.
- Koumoutsis, A., Chen, X. H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R. 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*. 186 (4). 1084-1096.
- Kröber, M., Wibberg, D., Grosch, R., Eikmeyer, F., Verwaaijen, B., Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Puhler, A., Schluter, A. 2014. Effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing. *Frontiers in Microbiology*. 5. 252.
- Kulhánek, M. 2006. Transformace fosforu v půdě při různých systémech hnojení a porovnání rozdílných extrakčních metod. Disertační práce. Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin. Česká zemědělská univerzita v Praze. 121 s.
- Kumar, G. P., Desai, S., Reddy, G., Amalraj, E. L. D., Rasul, A., Ahmed, S. K. M. H. 2015. Seed bacterization with fluorescent *Pseudomonas* spp. enhances nutrient uptake and growth of *Cajanus cajan* L. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 46 (5). 652-665.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., et al. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. 390 (6657). 249-256.
- Lack, A., Evans, D. 2005. *Plant biology*. 2nd ed. Taylor & Francis Group. New York. Abingdon. 370 p. ISBN: 0-4153-5643-1.
- Lagerlöf, J., Ayuke, F., Bejai, S., Jorge, G., Lagerqvist, E., Meijer, J., JohnMuturi, J., Söderlund, S. 2015. Potential side effects of biocontrol and plant-growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* bacteria on earthworms. *Applied Soil Ecology*. 96. 159-164.
- Larcher, W. 1988. *Fyziologická ekologie rostlin*. Academia. Praha. 361 s.

- Latef, A. A. H. A., He, C. X. 2014. Does inoculation with *Glomus mosseae* improve salt tolerance in pepper plants? *Journal Of Plant Growth Regulation*. 33 (3). 644-653.
- Lazarevic, B., Losak, T., Manschadi, A. M. 2018. Arbuscular mycorrhizae modify winter wheat root morphology and alleviate phosphorus deficit stress. *Plant, Soil and Environment*. 64 (1). 47-52.
- Li, R., Wu, Z. L., Wang, Y. J., Li, L. L. 2013. Separation of total saponins from the pericarp of *Sapindus mukorossi* Gaerten. by foam fractionation. *Industrial Crops and Products*. 51. 163-170.
- Li, Y. S., Mao, X. T., Tian, Q. Y., Li, L. H., Zhang, W. H. 2009. Phosphorus deficiency-induced reduction in root hydraulic conductivity in *Medicago falcata* is associated with ethylene production. *Environmental and Experimental Botany*. 67 (1). 172-177.
- Liang, T. W., Tseng, S. C., Wang, S. L. 2016. Production and characterization of antioxidant properties of exopolysaccharide(s) from *Peanibacillus mucilaginosus* TKU032. *Marine Drugs*. 14 (2). 40.
- Liu, Y., Chen, J. 2014. Phosphorus cycle. Reference module in earth systems and environmental sciences. from *Encyclopedia of Ecology* 2008. 2715-2724.
- Liu, C. Y., Wu, Q. S. 2014. Relationships between mycorrhizas and antioxidant enzymes in citrus (*Citrus tangerina*) seedlings inoculated with *Glomus mosseae*. *Pakistan Journal of Botany*. 46 (3). 1125-1128.
- Liu, Y., Yan, T., Li, Y., Cao, W., Pang, X., Wu, D., Wei, Q. 2015. A simple label-free photoelectrochemical immunosensor for highly sensitive detection of aflatoxin B₁ based on CdS-Fe₃O₄ magnetic nanocomposites. *RSC Advances*. 5 (25). 19581-19586.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Herrera-Estrella, L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*. 6 (3). 280-287.

López-Valdez, F., Fernández-Luqueño, F., Ceballos-Ramírez, J. M., Marsch, R., Olalde-Portugal, V., Dendooven, L. 2011. A strain of *Bacillus subtilis* stimulates sunflower growth (*Helianthus annuus* L.) temporarily. *Scientia Horticulturae*. 128 (4). 499-505.

Lošák, T., Hlušek, J., Lampartová, I., Elbl, J., Mühlbachová, G., Čermák, P., Antonkiewicz, J. 2016. Changes in the content of soil phosphorus after its application into chernozem and haplic luvisol and the effect on yields of barley biomass. *Acta Universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*. 64 (5). 1603-1608.

Lu, J. J., Xue, A. Q., Cao, Z. Y., Yang, S. J., Hu, X. F. 2014. Diversity of plant growth-promoting *Paenibacillus mucilaginosus* isolated from vegetable fields in Zhejiang, China. *Annals of Microbiology*. 64 (4). 1745-1756.

Luscombe, P. C., Syers, J. K., Gregg, P. E. H. 1979. Water extraction as a soil testing procedure for phosphate. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 10 (11). 1361-1369.

Ma, X., Wang, X., Cheng, J., Nie, X., Yu, X., Zhao, Y., Wang, W. 2015. Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Biological Control*. 90. 34-41.

Ma, M., Wang, Z., Li, L., Jiang, X., Guan, D., Cao, F., Chen, H., Wang, X., Shen, D., Du, B., Li, J. 2012. Complete genome sequence of *Paenibacillus mucilaginosus* 3016, a bacterium functional as microbial fertilizer. *Journal of Bacteriology*. 194 (10). 2777-2778.

Macháček, V. 2002. Metody stanovení obsahu fosforu v půdách. Sborník z konference „Racionální použití hnojiv zaměřené na problematiku fosforu v rostlinné výrobě“. Praha KAVR. 46-49. ISBN: 80-213-0957-1.

Mackey, K. R. M., Paytan, A. 2009. Phosphorus cycle. In: Schaechter M. (ed.) 2009. *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd. ed. Academic Press. Oxford. p. 322-334. ISBN: 978-0-12-373939-1.

Mader, P., Száková, J., Miholová, D. 1998. Classical dry ashing of biological and agricultural materials. Part II. Losses of analytes due to their retention in an insoluble residue. *Analisis*. 26. 121-129.

Maguire, R. O., Sims, J. T. 2002. Measuring agronomic and environmental soil phosphorus saturation and predicting phosphorus leaching with Mehlich 3. *Soil Science Society of America Journal*. 66 (6). 2033-2039.

Maier, C., Conrad, J., Carle, R., Weiss, J., Schweiggert, R. M. 2015. Phenolic constituents in commercial aqueous *Quillaja* (*Quillaja saponaria* Molina) wood extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63 (6). 1756-1762.

Marschner, H. 2012. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic Press. New York. USA. 672 p. ISBN: 978-0-12-384905-2.

Mariotti, M., Ercoli, L. 1996. Effect of soil volume on nitrogen and phosphorus uptake by maize. In: Van Ittersum, M. K., Venner, G. E. G. T., Geijn, S. C., Jetten, T. H. (eds.). *Book of abstracts 4th ESA-congress. Volume I. European society for agronomy. Netherlands*. p. 262-263. ISBN: 90-73384-43-5.

Matula, J. 2012. *Inovace metod kontroly výživného stavu zemědělských půd fosforem z konsensu produkčního a environmentálního aspektu šetrného využívání přírodních zdrojů. Metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha. 55 s. ISBN: 978-80-7427-110-6.*

McGechan, M. B., Lewis, D. R. 2002. Sorption of phosphorus by soil, part 1: Principles, equations and models. *Biosystems Engineering*. 82 (1). 1-24.

Mehlich, A. 1984. Mehlich-3 soil test extractant: A modification of Mehlich-2 extractant. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 15. 1409-1416.

Mehta, N. C., Legg, J. O., Goring, C. A. I., Black, C. A. 1954. Determination of organic phosphorus in soils: I. Extraction method. *Soil Science Society of America Proceedings*. 18. 443-449.

- Mengel, K. 1996. Efficient use soil and fertilizer phosphate. In: Van Ittersum, M. K., Venner, G. E. G. T., Geijn, S. C., Jetten, T. H. (eds.). Book of abstracts 4th ESA-congress. Vol. I. European society for agronomy. Netherlands. p. 286-287. ISBN: 90-73384-43-5.
- Mengel, K. 1991. Ernährung und stoffwechsel der pflanze. Gustav Fischer Verlag Jena. 466 p. ISBN: 3-334-00310-8.
- Mengel, K., Kirkby, E. A. 1987. Principles of plant nutrition. International Potasch Institute. Land Druck AG. Liebenfeld/Bern. 687 p. ISBN: 3906535037.
- Michalík, I. 2001. Molekulárne a energetické aspekty príjmu a asimilácie živín v rastlinách. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre. 158 p. ISBN: 80-7137-836-4.
- Michalak, I., Chojnacka, K., Dmytryk, A., Wilk, R., Gramza, M., Rój, E. 2016. Evaluation of supercritical extracts of algae as biostimulants of plant growth in field trials. *Frontiers in Plant Science*. 7. 1591.
- Mohamed, H. A., Barry, K. M., Measham, P. F. 2016. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in establishment and water balance of tomato seedlings and sweet cherry cuttings in low phosphorous soil. *Acta Horticulturae*. 1112. 109-115.
- Nakahara, S., Kusano, M., Fujioka, S., Shimada, A., Kimura, Y. 2004. Penipratynolene, a novel nematicide from *Penicillium bilaiae* Chalabuda. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 68 (1). 257-259.
- Nash, D. M., Haygarth, P. M., Turner, B. L., Condrón, L. M., McDowell, R. W., Richardson, A. E., Watkins, M., Heaven, M. W. 2014. Using organic phosphorus to sustain pasture productivity: A perspective. *Geoderma*. 221-222. 11-19.
- Nezarat, S. and Gholami, A. 2009. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving seed germination, seedling growth and yield of maize. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 12 (1). 26-32.

Neumann G. 2012. EU-funded research collaboration on use of bio-effectors in agriculture launched [online]. University of Hohenheim. 2012 [cit. 2014-10-15]. Dostupné z <<http://www.bioeffector.info/about-bioeffector.html>>.

Neumann, G., Römheld, V. 2002. Root-induced changes in the availability of nutrients in the rhizosphere. In: Waisel Y., Eshel A., Kafkafi U. (eds.). Plant roots: The Hidden Half. Marcel Dekker. p. 617-649.

Olsen, S. R., Sommers, L. E. 1982. Phosphorus. In: Page, A. L., Miller, R. H. (eds.). Methods of soil analysis. Part 2. 2nd ed. Agronomy Monograph 9. ASA and SSSA. Madison. WI. p. 403-430.

Orcutt, D. M., Nilsen, E. T. 1996. The physiology of plants under stress – soil and biotic factors. Virginia Polytechnic Institute and State University. USA. 696 p. ISBN: 0-471-17008-9.

Orio, A. G. A., Brucher, E., Ducasse, D. A. 2016. A strain of *Bacillus subtilis* subsp *subtilis* shows a specific antagonistic activity against the soil-borne pathogen of onion *Setophoma terrestris*. European Journal of Plant Pathology. 144 (1). 217-223.

Öpik, H., Rolfe, S. A. 2005. The physiology of flowering plants. 4th ed. Cambridge University Press. Cambridge. 392 p. ISBN-13: 978-0-521-66485-3.

Paradiso, R., Arena, C., De Micco, V., Giordano, M., Aronne, G., De Pascale, S. 2017. Changes in leaf anatomical traits enhanced photosynthetic activity of soybean grown in hydroponics with plant growth-promoting microorganisms. Frontiers in Plant Science. 8. 674.

Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A., Berkeley, R. C. W. 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. - nov., nom. rev. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 37 (1). 69-71.

Radersma, S., Lusiana, B., van Noordwijk, M. 2005. Simulation of soil drying induced phosphorus deficiency and phosphorus mobilization as determinants of maize growth near tree lines on a Ferralsol. Field Crops Research. 91 (2-3). 171-184.

Raja, U. *Trichoderma harzianum* [online]. Greenmax Agro Tech. India. 2007 [cit. 2014-05-23]. Dostupné z <<http://www.greenmaxagrotech.com/enquiry.html>>.

Ram, H., Malik, S. S., Dhaliwal, S. S., Kumar, B., Singh, Y. 2015. Growth and productivity of wheat affected by phosphorus-solubilizing fungi and phosphorus levels. *Plant, Soil and Environment*. 61 (3). 122-126.

Rathi, N., Singh, S., Osborne, J., Babu, S. 2015. Co-aggregation of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* in culture and co-colonization in black gram (*Vigna mungo* L.) roots. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 4 (3). 304-308.

Rayirath, P., Benkel, B., Hodges, D. M., Allan-Wojtas, P., Mackinnon, S., Critchley, A. T., Prithiviraj, B. 2009. Lipophilic components of the brown seaweed, *Ascophyllum nodosum*. enhance freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 230 (1). 135-147.

Richter, R. Doplnkový text - Fosfor, význam fosforu, symptomy nedostatku a nadbytku fosforu [online]. Ústav agrochemie a výživy rostlin. MZLU v Brně. 2004 [cit. 2014-08-12]. Dostupné z <http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/biogenni_prvky/p.htm>.

Richter, R. 2007. Fosfor v půdě [online]. Ústav agrochemie a výživy rostlin. MZLU v Brně. [cit. 2015-03-31]. Dostupné z <http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/agrochemie_pudy/puda_p.htm>.

Richardson, A. E., Lynch, J. P., Ryan, P. R., Delhaize, E., Smith, F. A., Smith, S. E., Harvey, P. R. et al. 2011. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and Soil*. 349 (1-2). 121-156 SI.

Rioux, L. E., Turgeon, S. L., Beaulieu, M. 2007. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydrate Polymers*. 69 (3). 530-537.

Roner, M. R., Sprayberry, J., Spinks, M., Dhanji, S. 2007. Antiviral activity obtained from aqueous extracts of the Chilean soapbark tree (*Quillaja saponaria* Molina). *Journal of General Virology*. 88. 275-285.

Ruttenberg, K. C. 2014. The global phosphorus cycle. *Biogeochemistry*. 10. 499-558. In: Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. *Treatise on Geochemistry*. 2nd ed. Elsevier.

Seabra, C. E. B. C., Osiecka, A., Tucci, C. A. F., Minogue, P. J., Pereira, B. F. F., Andersen, P. C. 2018. Influence of phosphorus limitations on the growth, nutrient partitioning and physiology of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) seedlings. *Journal of Plant Nutrition*. 41 (3). 358-370.

Samuels, G. J., Chaverri, P., Farr, D. F., McCray, E. B. *Trichoderma* [online]. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory. ARS. USDA. The Regents of the University of California. 2014 [cit. 2011-02-24]. Dostupné z <<http://genome.jgi.doe.gov/Triha1/Triha1.home.html>>.

Schachtschabel, P., Blume, H. P., Brümmer, G. W., Hartge, K. H., Schwertmann, U. 1992. Scheffer/schachtschabel - lehrbuch der bodenkunde. 13 Aufl. Ferdinand Enke Verlag. Stuttgart. 491 p.

Schilling, G. 2000. Pflanzenernährung und düngung. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart. 464 p. ISBN: 3-8252-8189-2.

Schlotterbeck, T., Castillo-Ruiz, M., Canon-Jones, H., Martin, R. S. 2015. The use of leaves from young trees of *Quillaja saponaria* (Molina) plantations as a new source of saponins. *Economic Botany*. 69 (3). 262-272.

Schröder, J. J., Smit, A. L., Cordell, D., Rosemarin, A. 2011. Improved phosphorus use efficiency in agriculture: A key requirement for its sustainable use. *Chemosphere*. 84 (6). 822-831.

Schweiger, R., Baier, M. C., Müller, C. 2014. Arbuscular mycorrhiza-induced shifts in foliar metabolism and photosynthesis mirror the developmental stage of the symbiosis and are only partly driven by improved phosphate uptake. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 27 (12). 1403-1412.

Sen, A., Srivastava, V. K., Singh, R. K., Singh, A. P., Raha, P., Ghosh, A. K., De, N., Rakshit, A. et al. 2015. Soil and plant responses to the application of *Ascophyllum nodosum* extract to no-till wheat (*Triticum aestivum* L.). *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 46 (1). 123-136.

Sharma, D., Kayang, H. 2017. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze under greenhouse conditions. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. 5 (2). 235-241.

Sharpley, A. N. 1995. Soil phosphorus dynamics: agronomic and environmental impacts. *Ecological Engineering*. 5 (2-3). 261-279.

Sims, J. T., Maguire, R. O., Leytem, A. B., Gartley, K. L., Paulter, M. C. 2002. Evaluation of Mehlich 3 as an agri-environmental soil phosphorus test for the Mid-atlantic United states of America. *Soil Science Society of America Journal Abstract - Nutrient Management & Soil & Plant Analysis*. 66 (6). 2016-2032.

Sims, J. T., Pierzynski, G. M. 2005. Chemistry of phosphorus in soils. In: Tabatabai, A. M., Sparks, D. L. (eds.). *Chemical processes in soil*. Soil Science Society of America Book Series Number 8. SSSA. Madison. p. 151-192. ISBN: 0-89118-843-6.

Singh, R., Kumari, N. 2015. Comparative determination of phytochemicals and antioxidant activity from leaf and fruit of *Sapindus mukorossi* Gaertn - A valuable medicinal tree. *Industrial Crops and Products*. 73. p. 1-8.

Soinne, H. 2009. Extraction methods in soil phosphorus characterisation - Limitations and applications. Academic dissertation. University of Helsinki. Department of applied chemistry and microbiology. Helsinki. 49 p.

Sommer K. 2005. Cultan-düngung. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen. 218 p.

Spohn, M., Zavišić, A., Nassal, P., Bergkemper, F., Schulz, S., Marhan, S., Schloter, M., Kandeler, E., Polle, A. 2018. Temporal variations of phosphorus uptake by soil microbial biomass and young beech trees in two forest soils with contrasting phosphorus stocks. *Soil Biology & Biochemistry*. 117. 191-202.

Stewart, J. W. B., Sharpley, A. N. 1987. Controls on dynamics of soil and fertilizer phosphorus and sulphur. 101-121. In: Follet, R. F., Stewart, J. W. B., Cole. C. V. (eds.) 1987. Soil fertility and organic matter as critical components of production systems. SSSA Spec. Pub. No. 19. American Society of Agronomy. Madison. WI. 166 p.

Stribley, D. P., Tinker, P. B., Snellgrove, R. C. 1980. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the relation of plant growth internal phosphorus concentration and soil phosphate analyses. *Journal of Soil Science*. 31 (4). 655-672.

Sýkorová, Z., Börstler, B., Zvolenská, S., Fehrer, J., Gryndler, M., Vosátka, M., Redecker, D. 2012. Long-term tracing of *Rhizophagus irregularis* isolate BEG140 inoculated on *Phalaris arundinacea* in a coal mine spoil bank, using mitochondrial large subunit rDNA markers. *Mycorrhiza*. 22 (1). 69-80.

Száková, J., Tremlová, J., Pegová, K., Najmanová, J., Tlustoš, P. 2015. Soil-to-plant transfer of native selenium for wild vegetation cover at selected locations of the Czech Republic. *Environmental Monitoring and Assessment*. 187 (6). 358.

Tabatabai, M. A., Bremner, J. M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*. 1 (4). 301-307.

Talboys, P. J., Owen, D. W., Healey, J. R., Withers, P. J. A., Jones, D. L. 2014. Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. *BMC Plant Biology*. 14. 51.

- Tam, N. K. M., Uyen, N. Q., Hong, H. A., Duc, L. H., Hoa, T. T., Serra, C. R., Henriques, A. O., Cutting, S. M. 2006. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *Journal of Bacteriology*. 188 (7). 2692-2700.
- Tandon, S., Dubey, A. 2015. Effects of biozyme (*Ascophyllum nodosum*) biostimulant on growth and development of soybean [*Glycine Max* (L.) Merrill]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 46 (7). 845-858.
- Tang, X., Bernard, L., Brauman, A., Daufresne, T., Deleporte, P., Desclaux, D., Souche, G., Placella, S. A., Hinsinger, P. 2014a. Increase in microbial biomass and phosphorus availability in the rhizosphere of intercropped cereal and legumes under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. 75. 86-93.
- Tang, J., Qi, S., Li, Z., An, Q., Xie, M., Yang, B., Wang, Y. 2014b. Production, purification and application of polysaccharide-based bioflocculant by *Paenibacillus mucilaginosus*. *Carbohydrate Polymers*. 113. 463-470.
- Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A., Balestrinim R., Charron, P., Duensing, N. et al. 2013. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110 (50). 20117-22.
- Tmakova, L., Sekretar, S., Schmidt, S. 2016. Plant-derived surfactants as an alternative to synthetic surfactants: surface and antioxidant activities. *Chemical Papers*. 70 (2). 188-196.
- Travaglia, C., Masciarelli, O., Fortuna, J., Marchetti, G., Cardozo, P., Lucero, M., Zorza, E., Luna, V., Reinoso, H. 2015. Towards sustainable maize production: Glyphosate detoxification by *Azospirillum* sp and *Pseudomonas* sp. *Crop protection*. 77. 102-109.
- Troeh, F. R., Thompson, L. M. 2005. *Soils and soil fertility*. Blackwell Publishing Professional. Iowa. USA. 489 p. ISBN: 081380955X.
- Turan, M., Ekinici, M., Yildirim, E., Gunes, A., Karagoz, K., Kotan, R., Dursun, A. 2014. Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of

cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 38 (3). 327-333.

Upadhyay, A., Singh, D. K. 2012. Pharmacological effects of *Sapindus mukorossi*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 54 (5). 273-280.

Upadhyay, A., Singh, D. K. 2011. Molluscicidal activity of *Sapindus mukorossi* and *Terminalia chebula* against the freshwater snail *Lymnaea acuminata*. Chemosphere. 83 (4). 468-474.

Vallabhaneni S. D. 2016. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in tobacco (*Nicotiana tabacum*) seed beds using *Pseudomonas fluorescens*. Agricultural Research. 5 (2). 137-144.

Valverde, A., Burgos, A., Fiscella, T., Rivas, R., Velazquez, E., Rodriguez-Barrueco, C., Cervantes, E., Chamber, M., Igual, J. M. 2006. Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. Plant and Soil. 287 (1-2). 43-50.

Vaněk, V., Balík, J., Černý, J., Pavlík, M., Pavlíková, D., Tlustoš, P., Valtera, J. 2012. Výživa zahradních rostlin. Academia. Praha. 570 a. ISBN: 978-80-200-2147-2.

Vaněk, V., Balík, J., Pavlík, M., Pavlíková, D., Tlustoš, P. 2016. Výživa a hnojení polních plodin. Profi Press. Praha. 224 s. ISBN: 978-80-86726-79-3.

Vessey, K. J., Heisinger, K. G. 2001. Effect of *Penicillium bilaii* inoculation and phosphorus fertilisation on root and shoot parameters of field-grown pea. Canadian Journal of Plant Science. The Agricultural Institute of Canada. 81 (3). 361-366.

Voplakal, K. Fosfor v půdě [online]. Úroda. Profi Press s.r.o. 2001 [cit. 2014-08-12]. Dostupné z <<http://uroda.cz/fosfor-v-pude/>>.

Vrba, V., Huleš, L. Humus - půda – rostlina [online]. Minerální hnojiva. 15. Biom.cz. 2012 [cit. 2016-01-20]. Dostupné z <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/humus-puda-rostlina-15-mineralni-hnojiva>>.

Wang, L., Ma, F., Zhang, S. J., Zhang, X. 2012. Effect of *Glomus mosseae* inoculation on growth and reproduction on rice. Information technology and agricultural Engineering. Book Series: Advances in Intelligent and Soft Computing. 134. 935-942.

Wang, P., Wu, S. H., Wen, M. X., Wang, Y., Wu, Q. S. 2016. Effects of combined inoculation with *Rhizophagus intraradices* and *Paenibacillus mucilaginosus* on plant growth, root morphology, and physiological status of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings under different levels of phosphorus. Scientia Horticulturae. 205. 97-105.

Worsfold, P. J., Gimbert, L. J., Mankasingh, U., Omaka, O. N., Hanrahan, G., Gardolinski, P. C. F. C., Haygarth, P. M., Turner, B. L., Keith-Roach, M. J., McKelvie, I. 2005. Sampling, sample treatment and quality assurance issues for the determination of phosphorus species in natural waters and soils. Talanta - Analysis of Phosphorus in Environmental and Agricultural Samples. 66 (2). 273-293.

Yang, T. Y., Liu, G. L., Li, Y. C., Zhu, S. M., Zou, A. L., Qi, J. L., Yang, Y. H. 2012. Rhizosphere microbial communities and organic acids secreted by aluminum-tolerant and aluminum-sensitive soybean in acid soil. Biology and Fertility of Soils. 48 (1). 97-108.

Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y., Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant Soil. 235. 235-242.

Yuan, S. F., Li, M. Y., Fang, Z. Y., Liu, Y., Shi, W., Pan, B., Wu, K., Shi, J. X., Shen, B., Shen, Q. R. 2016. Biological control of tobacco bacterial wilt using *Trichoderma harzianum* amended bioorganic fertilizer and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae*. Biological Control. 92. 164-171.

Yusran, Y., Weinmann, M., Neumann, G., Römheld, V., Müller, T. Effects of *Pseudomonas* sp. "Proradix" and *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the establishment of AMF infection.

Nutrient acquisition and growth of tomato affected by *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *radicis-lycopersici* Jarvis and Shoemaker [online]. The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI. University of California. 2009 [cit. 2014-08-12]. Dostupné z <<http://www.escholarship.org/uc/item/8g70p0zt#page-1>>.

Zbiral, J., Němec, P. 1999. Porovnání extrakčních postupů podle Mehlicha II a Mehlicha III pro stanovení přístupného fosforu, draslíku, hořčíku a vápníku v půdách ČR. Rostlinná Výroba. 45. 1-7.

Zhang, Y., Peng, Y., Peng, Y. F., Li, X. X., Chen, F. J., Li, Ch. J. 2012. Fine root patterning and balanced inorganic phosphorus distribution in the soil indicate distinctive adaptation of maize plants to phosphorus deficiency. Soil Science Society of China. Pedosphere. 22. 870-877.