



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

Депарتمان за Фитомедицину и заштиту
животне средине



Мариа Гал

дипл. инж. пољопривреде

**АНТИМИКРОБНИ И БИОДЕГРАДАЦИОНИ
ПОТЕНЦИЈАЛ ОДАБРАНИХ КОРИСНИХ
МИКРООРГАНИЗАМА**

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2026.



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

**Департман за Фитомедицину и
заштиту животне средине**



Кандидат:
Мариа Гал

Ментор:
проф. др Мила Граховац

**АНТИМИКРОБНИ И БИОДЕГРАДАЦИОНИ
ПОТЕНЦИЈАЛ ОДАБРАНИХ КОРИСНИХ
МИКРООРГАНИЗАМА**

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2026.

КОМИСИЈА ЗА ОДБРАНУ МАСТЕР РАДА

1. Др Мила Граховац, редовни професор

Ужа научна област: Фитопатологија

Пољопривредни факултет, Нови Сад

- Ментор -

2. Др Драгана Шуњка, редовни професор

Ужа научна област: Фитофармација

Пољопривредни факултет, Нови Сад

- Председник –

3. Др Марта Лоц, доцент

Ужа научна област: Фитопатологија

Пољопривредни факултет, Нови Сад

- Члан -

САДРЖАЈ

Contents

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ТЕМЕ	3
2.1. <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i>	3
2.2. <i>MEYEROZYMA CARIBBICA</i>	8
2.3. <i>TRICHODERMA VIRENS</i>	10
2.4. <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	13
2.5. АГРОНОМСКИ ЗНАЧАЈ И ЕКОТОКСИКОЛОШКИ АСПЕКТИ ПРИМЕНЕ ПЕСТИЦИДА	15
2.5.1. Појам пестицида и класификације пестицида	15
2.5.2. Токсиколошки аспекти примене пестицида	17
2.5.3. Судбина пестицида	18
2.5.4. Појам биодеградације и биоремедијације	22
3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА	26
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА	28
4.1. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА ПРИМЕЊЕНИ У ОГЛЕДУ ИСПИТИВАЊА АНТИМИКРОБНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА БИОАГЕНСА	28
4.1.1. Материјал коришћен за припрему и постављање огледа	28
4.1.2. Сојеви фитопатогене гљиве	29
4.1.3. Сојеви биоагенса	29
4.1.4. Поступак ревитализације сојева фитопатогене гљиве <i>Botrytis cinerea</i> и одабраних сојева биоагенса	30
4.1.5. Припрема суспензије биоагенса	31
4.1.6. Постављање огледа	31
4.1.7. Оцена огледа испитивања антимикробног потенцијала биоагенса	34
4.1.8. Статистичка обрада података	34

4.2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА ПРИМЕЊЕНИ У ОГЛЕДУ ИСПИТИВАЊА БИОДЕГРАДАЦИОНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА БИОАГЕНСА	35
4.2.1. Опрема и хемикалије коришћени у испитивању	35
4.2.2. Поступак ревитализације одабраних сојева биоагенса.....	37
4.2.3. Припрема раствора аналитичких стандарда	37
4.2.4. Припрема КДА храњиве подлоге са пестицидима.....	38
4.2.5. Припрема суспензије биоагенса.....	39
4.2.6. Постављање огледа испитивања биодеградационог потенцијала биоагенса	39
4.2.7. Оцена огледа испитивања биодеградационог потенцијала биоагенса	40
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	43
5.1. РЕЗУЛТАТИ ОГЛЕДА ИСПИТИВАЊА АНТИМИКРОБНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА БИОАГЕНСА.....	43
5.2. РЕЗУЛТАТИ ОГЛЕДА ИСПИТИВАЊА БИОДЕРГАДАЦИОНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА МИКРООРГАНИЗАМА	52
5.3. ДИСКУСИЈА – ИСПИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА БИОАГЕНСА	58
5.4. ДИСКУСИЈА – ИСПИТИВАЊЕ БИОДЕГРАДАЦИОНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА БИОАГЕНСА.....	61
6. ЗАКЉУЧАК.....	64
7. ЛИТЕРАТУРА.....	67

РЕЗИМЕ

АНТИМИКРОБНИ И БИОДЕГРАДАЦИОНИ ПОТЕНЦИЈАЛ ОДАБРАНИХ КОРИСНИХ МИКРООРГАНИЗАМА

дипл. инж. **Мариа Гал**

Фитопатогене гљиве врсте *Botrytis cinerea* сврставају се међу најштетније проузроковаче болести биљака, посебно њихових плодова, како у пољу тако и у складишту. Мере борбе против овог патогена базирају се на примени синтетских пестицида. Међутим, већ годинама је присутан тренд проналажења алтернативних решења која ће потенцијално редуковати примену пестицида а истовремено, на оптималном нивоу контролисати економски значајне паразитне болести биљака. Примена корисних микроорганизама као биоагенаса који кроз различите механизме редукују раст и развој, а самим тим и штетност патогена, може представљати адекватно решење. Уочено је да ови биоагенси потенцијално могу бити ефикасни и у биоремедијацији екосистема, посебно резидуа перзистентних пестицида који се сматрају једним од најопаснијих загађивача и дисруптора читаве биосфере. Овај рад је за циљ имао да испита антимикробни потенцијал одабраних сојева биоагенса из групе бактерија, филаментозних гљива и квасаца кроз огледе двојних и вишеструких култура, ради идентификације појединачних и комбинованих ефеката примењених микроорганизама. Поред тога испитан је и биодеградациони потенцијал поменутих биоагенаса, њиховим гајењем на храњивим подлогама обogaћеним пестицидима.

Кључне речи: *Botrytis cinerea*, биоагенси, антимикробни потенцијал, пестициди, биоремедијација

SUMMARY

ANTIMICROBIAL POTENTIAL AND BIODEGRADATION CAPACITY OF SELECTED BENEFICIAL MICROORGANISMS

B.Sc. Maria Gal

Phytopathogenic fungi belonging to *Botrytis cinerea* species are classified among the most damaging plant pathogens, particularly affecting fruits both in the field and during post-harvest storage. Control measures against this pathogen primarily rely on the application of synthetic pesticides. However, there has been a long-standing trend toward finding alternative solutions that could potentially reduce pesticide usage while effectively suppressing economically significant parasitic plant diseases at an optimal level. The application of beneficial microorganisms, which restrict pathogen growth, development, and subsequent harmfulness through various mechanisms, represents a viable solution. It is hypothesized that these bioagents may also exhibit efficiency in ecosystem bioremediation, particularly concerning residues of persistent pesticides, which are considered among the most dangerous pollutants and disruptors of the entire biosphere. This study aimed to evaluate the antimicrobial potential of selected bioagent strains comprising - bacteria, filamentous fungi, and yeasts - through dual and multiple culture assays to identify individual and combined effects of the applied microorganisms. Additionally, their biodegradation potential was examined by culturing these bioagents on nutrient media enriched with pesticides.

Keywords: *Botrytis cinerea*, bioagents, antimicrobial potential, pesticides, bioremediation

1. УВОД

Савремена пољопривредна производња суочава се са сталним изазовом очувања приноса и обезбеђивања довољних количина хране за растућу светску популацију. На том путу, усеви су константно изложени деловању различитих штетних организама који изазивају значајне економске губитке. Према научним подацима, највећи узрочник губитка приноса у биљној производњи су коровске биљке, које су одговорне за чак 34% укупних штета. Одмах иза корова по деструктивном утицају долазе инсекти са 18%, као и различити биљни патогени (узрочници болести) који чине 16% губитака (Oerke, 2006). Како би се ови губици свели на минимум, у пољопривредну праксу уведена је примена пестицида. Употреба пестицида показала се као изузетно ефикасна мера у управљању усевима и сузбијању болести, штеточина и корова. Ова мера је допринела високој производној ефикасности, драстично смањујући потребу за физичком радном снагом и укупне трошкове ангажовања пољопривредне механизације.

Синтетисане супстанце, пестицидног карактера, сматране су својевремено идеалним решењем за борбу против штеточина, фитопатогених микроорганизама и корова, међутим, почетком 90-тих година прошлог века, започето је детаљно анализирање и испитивање активних супстанци пестицида, ради утврђивања њихове штетности по здравље људи и екосистем (Bagi и Bodnar, 2014).

Примена пестицида у пољопривредној производњи данас представља изузетно актуелну тему, како унутар аграра тако и у сферама екологије и заштите људског здравља. Иако су широј јавности већ познати штетни ефекти ових једињења, савремене тежње су усмерене ка проналажењу трајног решења за овај изазов. Европским зеленим договором постављени су темељи за превазилажење овог проблема. Буђењем свести о токсиколошким последицама резидуа пестицида у храни и пратећим екотоксиколошким ризицима, као једна од главних идеја чији корени већ постоје у органској производњи, издаваја се концепт производње *pesticide-free* пољопривредних производа (Vuković i Šunjka, 2021).

Спровођење токсиколошких и екотоксиколошких анализа проистекло је из побуђене свести о угрожености људског здравља и биодиверзитета, упознавањем са деструктивним последицама које могу проузроковати токсични пестицидни молекули, у иницијалном, непромењеном или метаболисаном облику, као остаци хербцида у храни, води, земљишту, али и приликом њихове синтезе и примене на терену (Vuković i Šunjka, 2021; Šovljanski i Lazić, 2007).

Са економског и еколошког аспекта, овај проблем је постао централна тачка међународних стратегија, међу којима се посебно истиче „Европски зелени договор“ (*European Green Deal*) и његова пратећа стратегија „Од поља до стола“ (*Farm to Fork*). Европска унија је поставила јасне и ригорозне циљеве, са првобитном тежњом да се употреба и ризик од хемијских пестицида преполове до 2030. године. Иако имплементација ових мера у пракси наилази на велике изазове, Зелени договор је покренуо глобалну транзицију ка одрживој пољопривреди и заштити биља (Ziehmman et al., 2024).

Као једни од носилаца ове еколошко-аграрне револуције, корисни микроорганизми (биоагенси) сматрају се потенцијалним решењем проблема везаних за примену синтетских пестицида. У току су истраживања која ће омогућити оптимизацију синтезе препарата на бази самих микроорганизама или њихових метаболита, као и оптимизацију начина примене. Овај рад се бави испитивањем потенцијала појединих корисних микроорганизама за примену у заштити биља и животне средине са два аспекта – биоремедијација екосистема и примена антагонистичких биоагенса у борби против проузроковача биљних болести. Кроз огледе испитивања биодергационог и антимикробног потенцијала постављени су темељи за развој технологије која би могла допринети концепту *pesticide-free* пољопривредне производње уз истовремено чишћење агроекосистема од перзистентних загађивача као што су резуде пестицида.

2. ПРЕГЛЕД ТЕМЕ

Бројне студије и истраживања указали су на изузетне бенефите и резултате које су корисни микроорганизми постигли у огледима испитивања антимикробног потенцијала. Ова истраживања за циљ имају да се допринесе развоју алтернативних решења која би смањила употребу перзистентних, синтетичких пестицида. Међутим, новија истраживања фокусирана су и на решавање проблема депозита ових супстанци, које су се током вишедеценијских примена акумулирале у земљишту, подземним и водама у рекама и каналима, те с тим у вези испитивање биодеградационог потенцијала корисних микроорганизама представља важан сегмент овог истраживања. Зато је потребно проучити својства микроорганизама са освртом на проблематику коју обухвата тема овог рада, као и својства и динамику пестицида, с обзиром да бројни биотски и абиотски услови утичу на њихову судбину и самим тим потенцијалне штете које могу да проузрокују.

2.1. *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*

Bacillus amyloliquefaciens сврстава се у комплекс врста *B. subtilis*, а даља, ужа категоризација своди се на припадност организационој групи *B. amyloliquefaciens*. Поред саме ове врсте по којој је ова таксономска категорија и добила назив, ту су сврстане, на основу филогенетске анализе поређењем генома и појединачних генетских секвенци, и врсте: *B. siamensis*, *B. velezensis* и *B. nakamurai* (Ngalimat et al., 2021). *B. amyloliquefaciens* бактеријска врста, први пут је изолована из земљишта 1943. године (Ngalimat et al., 2021).

То су Грам-позитивне бактерије, које поседују способност образовања ендоспора (Chowdhury et al., 2015; Ngalimat et al., 2021; Luo et al., 2022; Zalila-Kolsi et al., 2023), односно латентне форме бактеријске ћелије обавијене дебелим вишеслојним зидом. Узрок формирања овакве творевине јесу неповољни услови средине, као што су недостатак воде или органске материје као извора хране. Кретање бактеријске ћелије омогућавају флагеле перитрихалног распореда (флагеле су равномерно распоређене

по површини ћелије) (Ngalimat et al., 2021). Колоније ове бактерије у виду биофилма ендифитно насељавају корење биљака, окупирајући ризосферу и успостављајући стабилне популације (Luo et al., 2022; Reva et al., 2004; Zalila-Kolsi et al., 2023).

Ове бактерије перзистирају у различитим срединама, што се може приписати њиховој широкој еколошкој валенци, па су тако изоловане из земљишта, слатководних и морских акватичних екосистема и седимента, животињских екскремената, атмосфере, биљних органа, продуката пчела, дроге и лекова, дигестивног тракта живине и риба. За њихову егзистенцију оптималне температуре се крећу у интервалу између 30°C и 37°C, што се односи на лабораторијске услове и гајење на подлогама као што су Luria–Bertani (LB), храњиви агар (NA), Reasoner's 2A agar (R2A), триптиказа сојин агар (TSA), триптон глукозни агар са екстрактом квасца (TGY) (Ngalimat et al., 2021).

Бактерије рода *Bacillus* препознате су као потенцијални стимулатори раста и развоја биљака и као биоагенси који ступају у антагонистичке односе са фитопатогеним микроорганизмима. Сојеви *B. amyloliquefaciens* показали су изузетне резултате у испитивањима која су се бавила овим темама (Luo et al., 2022; Reva et al., 2004; Zalila-Kolsi et al., 2023).

Сојеви ове бактерије поспешују фиксацију азота која се врши у биљкама посредством азотофиксирајућих бактерија, на чију активност и бројност позитивно утичу. Примарна функција ових бактеријских сојева, која је углавном заједничка за читав микробиом земљишта, јесте минерализација органске материје (Luo et al., 2022) којим се уз реакцију амонификације (Luo et al., 2022; Zalila-Kolsi et al., 2023) органски облици азота (аминокиселине и хетероциклична једињења) превode у неоргански нитратни облик. Велики удео фосфата налази се у земљишту у форми нерастворљивих соли, а додатно смањење концентрације узрокују микроорганизми који усвајају доступне облике фосфата (Luo et al., 2022). Бактеријски сојеви секрецијом нискомолекуларних органских киселина интензивно разграђују алуминијум и гвожђе фосфате (Luo et al., 2022; Zalila-Kolsi et al., 2023) образујући металне хелатне комплексе и слободне фосфате. На тај начин директно снабдевају биљку овим неопходним елементом, а истовремено минерализују органске молекуле нуклеинских киселина и фитата одговарајућим фосфатазама и фитазама. Слично фосфору, и дефицит калијума се и поред уношења вештачких и органских ђубрива

често јавља, а његова доступност се повећава активношћу микроорганизама (Luo et al., 2022). Бактерије *B. amyloliquefaciens* продукују и сидерофоре (Luo et al., 2022; Zalila-Kolsi et al., 2023), специфична једињења изузетног афинитета према гвожђу и са његовим тровалентним фери – обликом, ниске растворљивости, образује хелате које биљка може да апсорбује а истовремено на овај начин гвожђе се имобилише тако да га микроорганизми не могу усвојити (Luo et al., 2022).

Широк спектар позитивних ефеката које генерише индол-сирћетна киселина (ауксин) и испарљива органска једињења са функцијом сигналних молекула, чију синтезу и допремање биљкама врше бактерије *B. amyloliquefaciens*, чини их битним сегментом у коначном формирању приноса и квалитета пољопривредних производа (Reva et al., 2004; Luo et al., 2022; Zalila-Kolsi et al., 2023). Међу испарљивим органским једињењима значајни су тиофен, 2,3-бутандион, 3-хидрокси-2-бутанон (ацетоин) и 1,3-пентадиен као фунгицидни и фунгистатични агенси (Luo et al., 2022). 2-нонанон и 2-хептанон имају најјачи фунгитоксични ефекат у категорији испарљивих органских једињења према Zalila-Kolsi et al., (2023), док се 2,3-бутандион и ацетоин поспешују раст биљке.

Осим функције биостимулатора и биођубрива, бактерије *B. amyloliquefaciens*, одговорне су за спровођење биолошке заштите биљака од паразитних организама (Luo et al., 2022; Chowdhury et al., 2015; Ngalimat et al., 2021; Reva et al., 2004; Zalila-Kolsi et al., 2023). Проучено је више механизма инхибиције и сузбијања фитопатогених микроорганизама: директна компетција за простор, храну и воду, антибиоза и индуковање отпорности код биљке. *B. amyloliquefaciens* карактерише брза и доминантна колонизација станишта – ризосфере биљке, формирање компактног биофилма захваљујући сурфактину који поспешује кретање и ширење, као и сидерофорама, које редукују доступност неопходних нутритијената. Удруженим ефектом ових функција постиже се компетитивна супериорност у односу на патогена и инхибиција његовог развоја и размножавања (Luo et al., 2022; Chowdhury et al., 2015; Ngalimat et al., 2021).

У последњих неколико година употреба врста из рода *Bacillus* као агенса за контролу проузроковача биљних болести постала је актуелна тема у свету науке и аграра. Дошло се до сазнања да бројне врсте производе антимикробна једињења, а она карактеристична за *B. amyloliquefaciens* продукт су експресије чак 9% гена у

геному бактерије (Chowdhury et al., 2015; Luo et al., 2022). Механизам антибиозе обухвата производњу бројних антифунгалних једињења: цикличне липопептиде, сурфактин, итурин, бациломицин D и фенгицин (Chowdhury et al., 2015; Luo et al., 2022; Kadaikunnan et al., 2015; Zalila-Kolsi et al., 2023). Иако је познато да се експресија гена одвија кроз процесе транскрипције и транслације, при чему важну улогу имају рибозоми на којима се обавља повезивање аминокиселина у пептидне ланце, наведена једињења се синтетишу без њиховог учешћа. Ту функцију рибозома преузимају нерибозомалне пептидне синтетазе. У неким огледима евидентно је повећана продукција ових једињења приликом интеракције са фитопатогеним гљивама (Chowdhury et al., 2015). Поликетид синтазе нерибозомалним путем продукују антибактеријска једињења бацилаен који инхибира синтезу протеина код прокариота, макролактин који ремети деобу ћелије и формирање ћелијског зида, и дифицидин - инхибитор синтезе протеина и дисруптор ћелијског зида и мембране (Chowdhury et al., 2015; Luo et al., 2022). Антибактеријску активност испољавају и дипептид бацилизин, као и рибозомално синтетисани бактериоцин (Chowdhury et al., 2015; Luo et al., 2022).

Производња пептидних прекурсора лантибиотика условљена је регрутацијом рибозомских подјединица. Ова једињења, чији су познатији представници мерсацидин и амилолизин значајна су за сузбијање неких Грам-позитивних бактерија попут *Listeria* sp. и *S. aureus*, као и плантазолицин (Chowdhury et al., 2015) са нематоцидним и бактерицидним дејством (Luo et al., 2022) и амилоциклици чији генски кластери су недавно откривени (Chowdhury et al., 2015).

Поред претходно наведених липопептида и поликетидна, механизам антибиозе заснива се и на литичким ензимима: протеиназама, хитиназама, β -1,3 и β -1,4-глуканазама, α -амилази (по којој је бактерија и заслужила свој назив) (Ngalimat et al., 2021), липазама, пероксидазама, пектиназама, целулазама, аминотрансферазама (трансаминазе), ксиланазама (лиза полисахарида), барназама које разлажу РНК. Ефикасност ових ензима као антибиотских агенаса лежи у способности лизе (разлагања) сложених полимерних макромолекулских компоненти ћелија патогена, којима се постиже потпуна деструкција паразита (Zalila-Kolsi et al., 2023).

Описана је примена бактерије у прехранбеној индустрији. Значај ове бактерије за прехранбену индустрију огледа се у поседовању гена за синтезу трансглутаминазе

који је веома важан елемент у технолошким процесима. Тиме је превазиђен проблем ниске продуктивности и скупе производње, јер процес експресије и синтезе се одиграва након клонирања и трансфера тог гена у индустријски веома активну *Escherichia coli*. Пектиназе и протеазе своју функцију проналазе у процесима ферментације који су један од кључних корака у технолошким процесима прераде хране, а уз то сурфактин, фенгизин и итурин као фактори антибиотске одбране биљке, делују и на патогене у храни. Осим у прехранбеној, продукти гена ове бактерије своју примену могу пронаћи и у фармацеутској индустрији, с обзиром на широк спектар једињења са фармаколошким ефектом која синтетишу: аминокбутерна киселина (GABA), поли- γ -глутаминска киселина (γ -PGA), бациломицин Lb који поседује антиканцерогена својства. Поред изолованих биоактивних једињења, примена живих ћелија соја *B. amyloliquefaciens* (као пробиотика) испољава значајан терапеутски ефекат на људска и животињска обољења (Zalila-Kolsi et al., 2023).

Конкретно, огледом на салати изведен је закључак да сојеви *B. amyloliquefaciens* немају утицај који је статистички значајан, на састав микробиолошке флоре у ризосфери биљака (Zalila-Kolsi et al., 2023), док патогени организми могу драстично променити структуру и диверзитет локалних ризосферних микроорганизама. Истовременим присуством биоагенса и патогена такве велике варијације су редуковане и контролисане (Chowdhury et al., 2015). У другом раду је пак изведен закључак о оптималном бенефитном дејству ове бактерије на заступљеност, функцију и структуру микробиома ризосфере, што је резултирало стимулацијом раста биљке и инхибицијом развоја и величине популације патогена (Luo et al., 2022). У раду Zalila-Kolsi et al. (2023) истраживачи тврде да је доказана теза о промени састава и структуре микробиома.

Поред антибиозе као механизма сузбијања фитопатогених микроорганизама, врсте ризобактерија које припадају роду *Bacillus*, а међу њима и *B. amyloliquefaciens*, поседују својство индукције отпорности (Luo et al., 2022; Chowdhury et al., 2015; Reva et al., 2004) код биљака путем сигналних молекула јасномске киселине и етилена (за разлику од системске стечене отпорности коју индукују патогени, а главна компонента сигналних путева је салицилна киселина). Улогу иницијатора индукције отпорности могу имати микробиолошка испарљива органска једињења (Luo et al., 2022; Chowdhury et al., 2015), као и бактеријски протеини (као што је основна јединица бактеријске флагеле – флагелин) или циклични липопептиди од

којих се посебно издваја сурфактин (најзаступљенији) (Chowdhury et al., 2015), и итурин (Luo et al., 2022), које детектују рецептори на мембранама биљних ћелија (Chowdhury et al., 2015). Активирани гени наведеним стимулусима, експресијом гена, покрећу процесе синтезе и акумулације заштитних једињења: суберина, лигнина, калозе (полимера глукозе који се депонују у ћелијским зидовима), као и литичких ензима попут β -1,3-глуканазе, полифенол оксидазе која феноле преводи у агресивне хиноне, пероксидаза и фенилаланин амонијак-лиазу (Luo et al., 2022). Регулација биљне генске експресије повезане са отпорношћу на неповољне абиотске факторе постиже се одређеним продуктима метаболизма бактерије (Luo et al., 2022; Zalila-Kolsi et al., 2023). Бројна једињења међу којима и спермидин (Luo et al., 2022), али и присуство саме бактеријске ћелије, стимулишу повећање или смањење активности експресије гена. На тај начин подстичу синтезу ензима, штите биљку од реактивних врста кисеоника (Luo et al., 2022; Zalila-Kolsi et al., 2023) попут пероксидазе, каталазе (Luo et al., 2022) и ензима одговорних за синтезу глутатиона и за уклањање натријумових јона из ћелије (Luo et al., 2022; Zalila-Kolsi et al., 2023), као и повећану акумулацију пролина и нискомолекуларних угљених хидрата (Zalila-Kolsi et al., 2023). Тиме се подиже ниво отпорности биљке на сушу или високе концентрације соли, и самим тим на оксидативни стрес (Luo et al., 2022; Zalila-Kolsi et al., 2023).

2.2. MEYEROZYMA CARIBBICA

Радови бројних истраживача указују на антимикробни потенцијал квасца *Meyerozyma caribbica*, путем антибиозе и конкуренције за простор и хранљиве материје. Zhang et al. (2023) известили су о способности овог квасца да производи антифунгално једињење фенетил алкохол против фитопатогене гљиве *Corynespora cassiicola* као и да је надјача у међусобним конкуритивним односима, показујући већу ефикасност него неки синтетички фунгициди. Други аутори приказују добре резултате у огледима испитивања антагонистичке, биоконтролне активности овог квасца према *Penicillium expansum* служећи се механизмом антибиозе, истим тим испарљивим органским једињењем - 2-фенилетанолом, (Zhang et al., 2026; Dudaš et al., 2026), као и конкуренцијом за хранљиве материје (Dudaš et al., 2026). *Meyerozyma caribbica* ефикасно је редуковао клијање спора, издуживање клицине цеви, раст мицелије у оба случаја (Zhang et al., 2026).

Meyerozyma caribbica се посебно издваја као врста квасца чији сојеви поседују ензиме за разградњу хексоза, али и пентозних простих шећера, чији полимери граде целулозу и хемицелулозу. Кроз процес ензимске хидролизе и затим ферментације, у којој ови микроорганизми користе продукте хидролизе као супстрат за генерисање енергије и основни извор угљеника, добијају се производи анаеробне оксидације као што су етанол, ксилитол, арабитол. Ова особина из тог разлога, чини ову врсту квасца неизоставном компонентом у секвенцама реакција у прехранбеној и фармацеутској индустрији и производњи биогорива (Muynarsk et al., 2026; Alencar et al., 2023). Поред тога, одређени сојеви производе хидролитичке ензиме: амилазу, ксиланазу, целулазу, испарљива органска једињења попут фенилетанола, ацеталдехида, а уз то акумулирају липиде који се декларишу као погодна сировина за производњу биодизела. Ови ензими, уз хитиназе и глуканазе, и испарљива органска једињења алкохола и естара, посредују у антибиотским процесима, као и у процесу хиперпаразитизма или компериције за неопходне елементе синтезом сидерофора и мембранских транспортера (Muynarsk et al., 2026).

Морфолошке карактеристике *Meyerozyma caribbica* обухватају образовање мат белих колонија и формирање биофилма, док је од физиолошких особина важно напоменути да се квасац размножава пупљењем. Неки сојеви поседују веома велику еколошку пластичност, што омогућава оптималан раст и развој колонија и при температурама 37°C – 40°C. Исто тако, сам микроорганизам и његови хидролитички ензими су показали висок ниво толеранције на ниске температуре с обзиром да су неки сојеви пронађени и на Антарктику. Ови подаци сугеришу да постизање добрих резултата не би требало да изостане применом овог биоагенса пре и након бербе, приликом складиштења, у различитим климатским условима (Muynarsk et al., 2026).

Високу ефикасност ова врста квасца је показала и у инхибицији раста гљива проузроковача трулежи, из родова *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Rhizopus* и *Botrytis*. Код *Penicillium* врста забележена је и редукција синтезе микотоксина. Антагонистички однос према патогенима успоставља директном конкуренцијом за храну и простор, окупирајући оштећења кроз која неки паразити и сапрофити остварују продор. Индукује отпорност код биљака које покрећу синтезу литичких ензима β -1,3-глуканазе и других једињења усмерених против патогена (Muynarsk et al., 2026). Најзначајнијим механизмом сматра се индуковање отпорности биљака, које активирају гене за синтезу протеина везаних за патогенезу, односно литичких

ензима глуканаза и хитиназа, затим пероксидаза и ензима полифенолоксидаза који каталишу полимеризацију лигнина, флавоноида и других фенолних једињења и секундарних метаболита. Протективни утицај показују и кроз оптимизацију и стимулацију сигналних путева који представљају посебне кораке у процесима чији је резултат синтеза ових супстанци и заштита биљке (Muynarsk et al., 2026).

Постоје подаци, поткрепљени резултатима појединих огледа, о биодеградационој активности квасца *M. caribbica* који потврђују способности појединих сојева да разграђују остатке перзистентних полутаната као што су пестициди и тешки метали, самостално или у синергији са другим микроорганизмима. Утврђено је да ови сојеви поседују одговарајуће ензиме којима кидају ароматичне прстенове фенолних једињења попут лигнина, те аналогно томе, је могућа и разградња таквих пестицидних молекула. Механизам биодеградације органохлорних инсектицида заснован је на ензимским редокс реакцијама, при којима се редукује атом хлора до Cl⁻ јона стабилне конфигурације племенитог гаса и оксидише се ароматични прстен. На сличан начин се одвија и разградња органохлорних хербицида, док и саме угљоводонике, алифатичне и ароматичне, више или мање сложене, квасац метаболише и експлоатише као енергетска једињења, уз синтезу биосурфактаната који доприносе повећаној доступности угљоводоничних супстрата. Осим директне детоксикације, оксидативни стрес узрокован овим абиотским факторима бива неутралисан посредством ових микроорганизма, њиховим сопственим ензимима или иницирањем појачане синтезе ензима и фенола у биљци (Muynarsk et al., 2026). Јони метала имају тенденцију да се вежу за негативно наелектрисане анјонске функционалне групе на ћелијским зидовима квасаца и на тај начин повећају биоремедијациону активност имобилизацијом ових јона (Muynarsk et al., 2026; Amorim et al., 2018). Јака адхезиона моћ условљена стварањем биофилма омогућава сојевима овог квасца да се вежу за вештачке полимере (нпр. полиетилен) и врше њихову директну разградњу, а уз то повећава имобилизацију метала и смањује њихову токсичност (Muynarsk et al., 2026).

2.3. *TRICHODERMA VIRENS*

Тржиштем биолошких препарата тренутно доминирају препарати на бази гљива из рода *Trichoderma* што потврђује и податак да 50-60% комерцијално доступних биопестицида садржи управо врсте из овог рода као активну компоненту. Осим као агенси у биолошкој контроли болести, ове гљиве показују и високу ефикасност као

биостимулатори и помотори раста и развоја биљака, а посебно кореновог система. Брза и ефикасна колонизација уз различите, еколошки фаворизоване механизме деловања, чине ове биопрепарате веома конкуритивном алтернативом синтетским фунгицидима (Guzmán-Guzmán et al., 2023; Djonović et al., 2007).

Род *Trichoderma* сврстан је у ред *Hypocreales* унутар раздела *Ascomycota*. Ова филаментозна гљива је изолована из земљишта, а њен широкоспектрални потенцијал вишеструких примена - од хемијске и прехранбене индустрије, биоремедијације воде и земљишта, све до улоге антагонисте у контроли различитих фитопатогених микроорганизама, поправљању квалитета земљишта и биостимулатора биљака - чини ову групу микроорганизама једним од најзначајнијих биоагенса у пољопривредној производњи (Tripathi et al., 2013).

Пестициди, поред тешких метала, силикона, пластике, полиароматичних угљоводоника (РАНs), полихлорисаних ароматичних угљоводоника, представљају једну од најзначајнијих група загађивача животне средине. Препознат је и интензивно проучаван процес биоремедијације тешких метала кроз процесе биоаккумуляције у отпадним водама уз активни транспорт ових јона у ћелију гљиве, као и кроз процесе биосорпције путем негативно наелектрисане површине ћелијског зида и процесе ензимске трансформације металних једињења у испарљиве облике. Паралелно с тим активно се изучава и потенцијал гљива из рода *Trichoderma* да врше биодеградацију пестицида. Симбиотска интеракција гљива из рода *Trichoderma* са биљкама резултирала је интензивнијом акумулацијом токсичних једињења присутних у земљишту (фитобијална ремедијација), захваљујући стимулишућем гљивичном дејству на раст биљке, редукцију оксидативног стреса, као и њеној повећаној толерантности. Бројни истраживачи су кроз огледе потврдили хипотезу о резистентности на фунгициде и способности екстрацелуларне ензимске разградње перзистентних, органохлорних ароматичних инсектицида као што су DDT, диелдрин, ендосулфан, пентахлорфенол, хлордан, линдан, затим органофосфата (хлорпирифос и дихлорвос) и неких фунгицида (карбендазим) (Tripathi et al., 2013).

Bisht et al. (2019) наглашавају предност филаментозних гљива у односу на бактерије која се манифестује у процесима биоремедијације. Наиме, аутори су објаснили да ове гљиве својим неспецифичним екстрацелуларним ензимима успешно

трансформишу пестицидне молекуле, посебно чврсто адсорбоване липофилне пестициде на органским и неорганским фракцијама земљишта, у мање токсична једињења. То се за бактерије не може тврдити, јер је њихова ензимска активност ограничена искључиво на унутарћелијску средину, и оне своју улогу разлагача обављају након ослобађања трансформираних пестицидних супстанци из земљишног комплекса.

Познато је да је основни однос у који ова гљива ступа са фитопатогеним гљивама хиперпаразитизам. Овај процес се реализује кроз синтезу екстрацелуларне хитиназе, глуканазе и протеиназе, након остварења контакта са фитопатогеним гљивама, са циљем разградње ћелијских компоненти патогена (Baek et al., 1999; Djonović et al., 2007). У паразитизам су, осим мицелија и хифа патогена, укључене и дормантне презимљавајуће структуре које формирају фитопатогене гљиве (Howell, 2006). Једна од карактеристика ове гљиве јесте и да образује специфичне структуре које се обавијају око хифа патогена након препознавања лектинских молекула или других компоненти ћелија фитопатогених гљива (Mukherjee et al., 2003). Сапрофитна природа *T. virens* омогућава јој експлоатацију широког спектра супстрата чак и без доступности живог домаћина. Антибиотске ефекте показали су поједини секундарни метаболити које производе различити сојеви овог биоагенса (Howell, 2006; Djonović et al., 2007). Глиотоксин ефикасан је против широког спектра бактерија и гљива, док је глиовирин јак инхибитор фитопатогених гљива *Pythium* и *Phytophthora*, а код виридола је препознат хербицидни потенцијал. Третмани семена овом гљивом или апликација у земљиште, обезбедили су заштиту корена од проузроковача трулежи (*Rhizoctonia* и *Pythium*) или увенућа (*Verticillium* и *Fusarium*) (Howell, 2006). Откривено је да је *T. virens*, путем протеинских или гликопротеинских елицитора, индуковала повећану активност пероксидаза, синтезу фитоалексина (Howell, 2006; Hanson и Howell, 2003) и хидролитичких ензима (Mukherjee et al., 2003) усмерених против фитопатогених гљива, док је сам биоагенс имун на њихово дејство. Лимитирајући фактор овог механизма јесте што је заштита ограничена само на коренов систем. Индиректни механизам одбране састоји се у усвајању и интрацелуларној ензимској разградњи ексудата клијајућег семена који стимулишу клијање спора фитопатогених гљива. На овај начин спречава се активација инокулума присутног у земљишту и последично пропадања клијанаца (Howell, 2006).

2.4. *BOTRYTIS CINEREA*

Botrytis cinerea један је од најзначајнијих факултативних паразита који инфекције остварује пре и после бербе, током складиштења, на воћу, поврћу, цвећу, ратарским културама као што је сунцокрет, у пољу, стакленицима и пластеницима (Williamson et al., 2007). Припада фамилији *Sclerotiniaceae* и разделу *Ascomycetes*. Полифагна природа овог патогена може се уочити прегледом укупног броја биљака домаћина (Chen et al., 2023; Bi et al., 2023) који превазилази цифру од 1400 биљних врста на глобалном нивоу (Chen et al., 2023).

Овај патоген карактерише се високим нивоом отпорности према различитим неповољним условима спољашње средине (висок УВ индекс, суша, екстремне температуре), што јој омогућавају дормантне бесполне споре – конидије и склероције, посебне структуре којима презимљава проузроковач сиве трулежи (Chen et al., 2023; Williamson et al., 2007). Складиштење представља посебан проблем који се тешко превазилази, јер је овај патоген изузетно отпоран на ниске температуре (Williamson et al., 2007).

У оквиру 35 врста гљива које припадају роду *Botrytis*, некротрофних патогена, као најштетнија врста издваја се проузроковач сиве трулежи *Botrytis cinerea*. Повољни супстрати за развој ове гљиве обухватају све органе биљке, док мекша ткива попут генеративних органа - цветова и плодова воћа и поврћа - представљају места на којима се најчешће манифестују симптоми а уједно су и најпогоднији извор хранљивих материја (Bi et al., 2023). Ипак, највише се ова болест јавља на плодовима бобичастог воћа као што су плодови винове лозе и јагоде, а од поврћа на броколију, салати и пасуљу (Williamson et al., 2007).

Главни симптом на листовима, стаблу и плодовима јесте појава влажне трулежи, док је на латицама цветова присутна некротична пегавост или влажна трулеж, а у влажним условима, се убрзо након примарне инфекције образује сива маса конидија. За ову гљиву је карактеристична латентна инфекција, при чему се симптоми испољавају после одређеног времена. Таква врста инфекције може се јавити у зараженом семену, па се симптоми уочавају труљењем стабла зељастих биљака, или након продора и инфекције цветова, што је праћено заразом суседних плодова (Williamson et al., 2007).

Животни циклус *B. cinerea* започиње клијањем склероција, дормантних мицелија обложених слојевима глукана и на самој површини меланином. Образују се у и на ткиву заражених биљака. Осим склероцијама, патоген се током неповољних услова средине, током зиме, одржава и у форми мицелије у угнутом биљном ткиву. На склероцијама образују се спороносни органи - конидиофоре са једноћелијским конидијама. Полни циклус, иако се ретко јавља у природи, има значај у погледу генетског диверзитета ове врсте. Гљива образује и микроконидије са функцијом полних ћелија спермација које врше оплодњу склероција из којих ће се развити отворена плодносна тела апотеције са аскусима са двоћелијским аскоспорама (Williamson et al., 2007).

Примарне инфекције остварују конидије које клијају, луче екстрацелуларни матрикс ради боље адхезије, образују инфективну хифу и на њој апресорију. Овим структурама врши се директан, ензимско-механички продор кроз кутикулу и епидермис биљке, кроз стомине отворе или повреде на ткиву листа (Bi et al., 2023). Ипак, продор у биљно ткиво патоген најчешће врши кроз основу цвета, жиг и стубић тучка, круничне листиће или кроз пукотине на плодовима. Одлучујући фактор који утиче на клијање конидија јесте релативна влажност ваздуха, чија минимална вредност треба да износи 93% да би се инфекција успешно развила. Трансмисија конидија врши се воденим капима, анемохорно, екстремитетима инсеката, а они доприносе и повећаним заразама оштећењем биљног ткива. Исто тако, велики значај има и неправилно резивање и заламање заперака без примене дезинфекционих средстава (Williamson et al., 2007).

Током раних фаза инфекције, *B. cinerea* ослобађа ензиме и токсине који разграђују ћелијске зидове и уништавају ткиво домаћина, изазивајући снажан оксидативни прасак. Међутим, ова паразитна активност индукује хиперсензитивну реакцију код биљке, чиме патоген искоришћава програмирану смрт здравих ћелија домаћина као извор хране за даљу инвазију (Bi et al., 2023; Williamson et al., 2007).

Инфективни процес је подржан и синтезом литичких ензима: кутиназа, целулаза, липаза, протеаза (Bi et al., 2023; Williamson et al., 2007), β -1,4-ксилаза, пектиназа (пектин - метилтрансфераза и ендополигалактуроноза) (Williamson et al., 2007) и оксидоредуктаза – ензима регулатора реактивних кисеоничних врста (ROS), којима се деградирају ћелијске компоненте и површински заштитни слојеви биљке. Овај

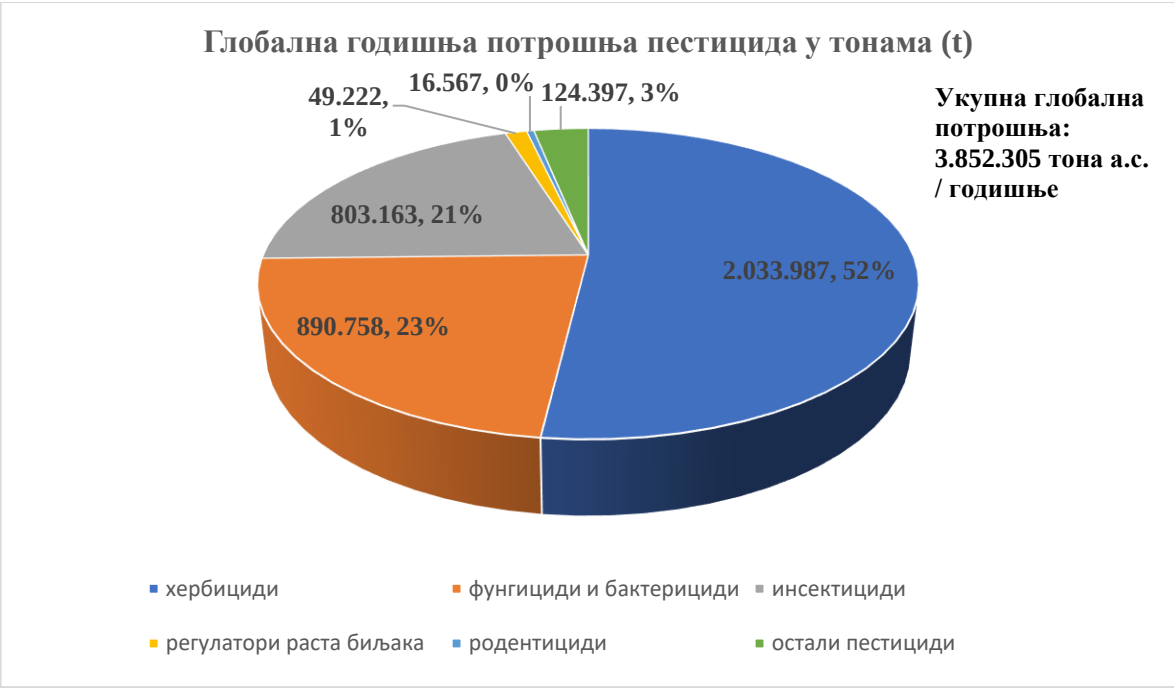
патоген синтетише и фитотоксичне метаболите (ботридијал, ботцинин и оксална киселина) и фитотоксичне протеине, као што су NEP1-лике протеини и BcSPL1 протеин, који индукују програмирану ћелијску смрт и некрозу, а поред тога нормалне физиолошке процесе биљне ћелије нарушава модулацијом pH ћелија (Bi et al., 2023; Williamson et al., 2007). Као одбрамбени одговор, многе биљке синтетишу широк спектар фитоалексина и протеина везаних за патогенезу (PR протеина), једињења токсичних за патогене. Међутим, кроз еволуцију, фитопатогени микроорганизми, па и сојеви гљиве *B. cinerea* су развиле ефикасне методе за разградњу или активно избацивање (ефлукс) биљних токсина ван ћелије гљиве (Bi et al., 2023).

2.5. АГРОНОМСКИ ЗНАЧАЈ И ЕКОТОКСИКОЛОШКИ АСПЕКТИ ПРИМЕНЕ ПЕСТИЦИДА

2.5.1. Појам пестицида и класификације пестицида

Пестициди се дефинишу као хемијски синтетисана једињења чија је сврха да инхибирају, спрече штетно деловање или елиминишу и потпуно униште микроорганизме или макроорганизме који угрожавају гајене биљке које чине основне чиниоце агоекосистема (Šovljanski и Lazić, 2007; Raffa и Chiampro, 2021; Uqab et al., 2016; Barišić, 2024). Кроз процесе формулације, што подразумева припрему смеше активне супстанце пестицида са непестицидним, инертним материјама: растварачима, разређивачима, носачима, сурфактантима, оквашивачима, емулгаторима, стабилизаторима, итд. и као крајњи резултат настаје пестицидни препарат (Šovljanski и Lazić, 2007).

Класификација пестицида може се извршити на основу циљане групе организама које сузбијају и ова подела приказана је у Табели 1. На основу хемијског састава разликују се органски и неоргански пестициди, док се према пореклу могу поделити на синтетичке и биолошке. Категорије су издвојене према разликама у механизмима и начину деловања, токсичности и типу формулације (Šovljanski и Lazić, 2007; Raffa и Chiampro, 2021). Према статистичким анализама утврђено је да 95% укупно коришћених пестицида чине хербициди, фунгициди и инсектициди (Vermelho et al., 2024). На Дијаграму 1, према подацима FAO (2024), приказана је количина годишње потрошње пестицида на глобалном нивоу.



Дијаграм 1. Глобална годишња потрошња пестицида у пољопривреди према намени и циљним групама организама (FAO, 2024)

Табела 1. Класификација пестицида на основу циљане групе организама (Šovljanski и Lazić, 2007; Uqab et al., 2016; Barišić, 2024)

КАТЕГОРИЈА ПЕСТИЦИДА	ГЛАВНИ ЦИЉНИ ОРГАНИЗМИ / НАМЕНА
Хербициди	Корови и непожељна вегетација
Фунгициди и бактерициди	Фитопатогене гљиве и бактерије
Инсектициди	Штетни инсекти и њихови развојни облици
Минерална и заштитна уља	Презимљујући облици штеточина
Регулатори раста биљака (PGR)	Физиолошки процеси биљака (контрола висине стабљике, дефолијација)
Нематоциди	Паразитске нематодe

Акарициди	Штетне гриње и пауци
Дезинфицијенси за земљиште и семе	Стерилизација супстрата и заштита семена од раних инфекција
Родентициди	Штетни глодари (мишеви, пацови, волухарице)
Молускоциди	Пужеви (посебно пужеви голаћи)
Алгициди, репеленти и атрактанти	Алге, одбијање штеточина или њихово привлачење у клопке
Авидици	Птице које праве штете у пољопривредној производњи

Бројни пестициди, а највећим делом они из групе органохлорних инсектицида (Šovljanski и Lazić, 2007) (DDT, карбофуран, карбендазим, метомил, дихлорвос, антрахинон, алдикарб) су искључени из употребе. Разлог је њихова екстремна токсичност и потенцијална штетност коју могу да проузрокују људском здрављу, здрављу животиња и екосистему уопште. Велика перзистентност, односно дуг век полуразградње, омогућава им да дугорочно контаминирају земљиште (Vermelho et al., 2024; Raffa и Chiampo, 2021) и то преко 15 година, испољавајући негативне ефекте на микрофлору и микрофауну земљишта (Vermelho et al., 2024). Експериментално је доказано да одређени пестициди редукују популацију микробиома (Vermelho et al., 2024; Raffa и Chiampo, 2021).

2.5.2. Токсиколошки аспекти примене пестицида

Липосолубилни пестициди имају тенденцију да се након продора концентришу и акумулирају у живим бићима, односно у њиховом масном ткиву. Процес биомагнификације обухвата биоаккумуляцију путем ланца исхране (Šovljanski и Lazić, 2007; Vermelho et al., 2024), при чему се концентрација пестицида у масном ткиву повећава са сваким наредним трофичким нивоом (Šovljanski и Lazić, 2007).

У акватичним екосистемима ови процеси су прилично опасни. Пестициди доспевају у такве екосистеме директно, ради сузбијања акватичне коровске вегетације, и

индиректно спирањем површинским водама и падавинама, дрифтом при прскању, уливањем индустријских вода. Међутим, пестициди који имају кратак биолошки полувек разградње у води, што значи да се релативно брзо елиминишу фотохемијским, хемијским и биолошким процесима из водених екосистема, су неупоредиво мање токсични за живи свет од једињења са дугим полувеком разградње (DT₅₀) као што су органохлорована једињења. У копненим екосистемима су исто тако присутни процеси биоаккумуляције и биомагнификације, због присуства резидуа пестицида у земљишту и атмосфери, и на исти начин може доћи до контаминације виших трофичких нивоа, укључујући домаће и дивље животиње (Šovljanski и Lazić, 2007).

Присуство резидуа у биљкама које се користе у исхрани представља велики токсиколошки ризик. Овај ризик је пак регулисан тиме што је сваком препарату додељена законски утврђена каренца. Поштовањем каренце може да се избегне присуство већих количина остатака пестицида од прописаних максимално дозвољених количина (МДК), а тиме се истовремено и избегавају последице по здравље које ове токсичне материје могу да проузрокују (Šovljanski и Lazić, 2007; Barišić, 2024).

Пестициди свој токсични ефекат на људски организам испољавају изазивањем мутагености, тератогености, канцерогености, деловањем на репродукциону моћ и као ендокрини дисруптори (Šovljanski и Lazić, 2007; Barišić, 2024). Редовно спровођење екотоксиколошких анализа, представља законску обавезу, и обухвата испитивања отровности према пчелама, пернатој, дивљачи, микроорганизмима и кишним глистама, као и за акватични екосистем (Šovljanski и Lazić, 2007). Сагледавајући ове чињенице, редукована употреба пестицида представља рационалну одлуку са циљем да се очува здравље људи, животиња и екосистема уопште, међутим агрономске и економске импликације нису потпуно усаглашене са доношењем такве одлуке, те из тог разлога такав корак је тек у повоју.

2.5.3. Судбина пестицида

Бројне научне студије баве се испитивањем судбине пестицида, након апликације у агроекосистему. Наиме утврђено је да значајан део активне супстанце не доспе на циљано одредиште, односно штеточину, патогени микроорганизам, или коровску биљку (Pimentel, 1995), већ се изгуби приликом и непосредно након апликације, у

атмосфери испаравањем и ношен ваздушним струјама (Bačmaga et al., 2024) или проласком кроз профил биљног покривача, спирањем са биљака, излучевинама корена или путем жетвених остатака доспева у земљиште (Cwielag-Piasecka et al., 2018). За системике тај део пестицида није изгубљен, јер постоји могућност да биљка те количине усвоји кореном (Šovljanski и Lazić, 2007).

Велика екотоксиколошка претња проистиче из велике испарљивости и склоности ка дрифту, приликом апликације и непосредно након ње (Albaseer et al., 2025), као и услед еолске ерозије земљишта (Vermelho et al., 2024). Ове особине проузрокују загађеност атмосфере, а кондензацијом и спирањем падавинама, акумулиране количине пестицида у атмосфери депонују се у земљиште или доспевају до великих водених површина (Albaseer et al., 2025; Vermelho et al., 2024).

Након доспевања у земљиште, пестицид ступа у међусобне интеракције са динамичним трофазним системом минералне (90-95%) и органске (5-10%) фракције земљишта, водених и ваздушних пора, а које уједно доминантно обликују судбину пестицида односно регулишу процесе адсорпције, мобилности (транслокације) и деградације (Šovljanski и Lazić, 2007; Coraja и Gatica-Jeria, 2021).

Кретање, односно транслокација пестицида у земљишту регулисано је процесима дифузије и протока, у воденој и ваздушној фази, вертикално надоле (спирањем) (Šovljanski и Lazić, 2007; Raffa и Chiampo, 2021) или нагоре (порастом нивоа подземних вода) (Šovljanski и Lazić, 2007) и латерално, хоризонталном дисперзијом (Šovljanski и Lazić, 2007; Raffa и Chiampo, 2021).

Адсорпција представља процес кондензације, усвајања (упијања) или везивања разних супстанци у течном или гасовитом стању на минералне и органске компоненте површине земљишта. Те површине су највеће код честица колоидних величина, а управо такве честице сачињавају глину и органске материје (Šovljanski и Lazić, 2007).

Минерална фракција земљишта састоји се из примарних минерала насталих консолидацијом, тачније кристализацијом и хлађењем магме, који су нестабилни и подложни распадању (осим кварца и неких мање значајних, који је врло стабилан и не разграђује се, осим у врло алкалним условима $pH \geq 9$), и секундарних минерала, глине и соли, хидроксида и оксида метала који су крајњи производи разградње, настали у педосфери трошењем и распадањем примарних минерала. Најзначајнији

представници примарних минерала су кварц, фелдспати, оливини, лискуни, амфиболи и пироксени, а од секундарних минерала су минерали глине (Ćirić, 1991; Нојка, 2007) који уједно представљају и реактивни део неорганске фракције земљишта и ступају у интеракције са пестицидима. Алумосиликатна грађа глине, са силикатним тетраедрима и алуминијумским октаедрима, на својој површини носе реактивне групе, негативно наелектрисане, оспособљене да електростатичким силама привлаче катјоне земљишта, протонизована алкална једињења у киселој средини или преко јонских мостова да везује анјоне. У киселој средини се и сама површина глине протонизује те развија способност да адсорбује и киселе анјоне. Дакле, глинени минерали имају велики капацитет адсорпције катјона, односно јоноимењивачки капацитет (Šovljanski и Lazić, 2007).

Органска материја, у чијој грађи учествују хуминске и фулво киселине, на својој површини такође носе реактивне карбоксилне и хидроксилне групе, чијом дисоцијацијом површина органске материје постаје негативно наелектрисана и као и глина способна да у великим капацитетима прима катјоне. Исто тако, на њеној површини налазе се и хидрофобна везивна места, која прихватају и везују неполярна једињења (Šovljanski и Lazić, 2007; Cwielag-Piasecka et al., 2018). Утврђено је да адсорптивни капацитет и диверзитет адсорбованих супстанци у случају органске материје зависи највише од рН земљишног раствора, али и од садржаја и врсте органске материје (Villaverde et al., 2008; Šovljanski и Lazić, 2007; Cwielag-Piasecka et al., 2018).

Тип хемијске везе коју пестициди формирају при адсорпцији на чврсту фазу зависи од поларности самог молекула пестицида. Везе карактеристичне за хидрофилне (поларне) пестициде су дипол-дипол привлачење (стално поларни молекули), координативне везе (метални мостови), јонске и водоничне везе. Са друге стране, липофилни (неполарни) пестицидни молекули формирају хидрофобне везе, док оба типа једињења граде Ван дер Валсове везе (индуковани диполи) и ковалентне везе (Šovljanski и Lazić, 2007).

Адсорпција пестицида на градивне конституенте земљишта вишеструко повећава њихову перзистентност, а смањује биолошку активност јер се његова концентрација у земљишном раствору смањује и он се налази ван земљишног раствора, те биљка није у стању да га усвоји. Адсорбовани пестициди, одржавају земљиште дугорочно

загађеним, и потенцијално фитотоксичним за одређене културе у плодореду (Šovljanski и Lazić, 2007). Са друге стране, земљишта малог/ниског адсорпционог капацитета, тешко ће везати пестициде, који ће се при обимнијим падавинама и наводњавању спирати кроз пропустљив профил земљишта и потенцијално доспети у подземне воде те проузроковати њихово загађење (Pérez-Lucas et al., 2018).

Деградација у земљишту обухвата хемијске и биолошке процесе који токсичне пестицидне супстанце превode у једноставније, мање токсичне и растворљивије метаболите. Најзначајнији хемијски путеви разградње пестицида јесу хидролиза, хидроксилација, деалкилација, дехалогенизација, оксидација, дехидрогенација, кондензација, редукација итд. (Šovljanski и Lazić, 2007; Raffa и Chiampo, 2021). Хемијска деградација одвија се реакцијом пестицида са компонентама земљишног раствора (Šovljanski и Lazić, 2007) јонима метала и хидроксидима метала, сулфатима, сулфитима, карбонатима, фосфатима, амонијум јонима, и нитратним и нитритним јонима, слободним радикалима (Ćirić, 1991) и ваздушне фазе (оксидација кисеоником), док минерална и органска фракција земљишта, заједно са својим адсорптивним комплексом, катализују те реакције (Šovljanski и Lazić, 2007). Управо овако богат састав даје изузетну реактивност земљишном раствору и чини га одговорним за реакције хемијске деградације пестицида (Arias-Estévez et al., 2007). Фотодеградација пестицида се одвија под утицајем електромагнетног сунчевог зрачења у распону спектра од 290 до 450 нанометара, одвија се на површини и у самом површинском слоју земљишта до дубине од 12 милиметара, и овом типу разградње подлежу и адсорбовани и пестициди који се налазе у земљишном раствору (Šovljanski и Lazić, 2007). Биodeградацију у земљишту врше микроорганизми, који пестициде користе као изворе хране и енергије (Šovljanski и Lazić, 2007; Vermelho et al., 2024; Raffa и Chiampo, 2021). Перзистентни пестициди, који поседују велики афинитет према адсорпцији на земљишне колоиде, биће имобилисани и слабије доступни као реактанти у процесима биodeградације, у односу на водорастворљиве пестициде који остају слободни у воденој фази земљишта и подложнији су хемијској и биodeградацији (Islam et al., 2022; Ayenew и Getu, 2025; Raffa и Chiampo, 2021).

Наведени подаци јасно показују да процеси деградације пестицида у земљишту доприносе смањеној загађености агроekосистема, тако што редукују иницијалну концентрацију токсичне супстанце, иако међутим, постоје и примери да су

метаболити пестицида веће токсичности од полазног једињења (Villaverde et al., 2008). Перзистентност се квантификује биолошким полувеком разградње, односно временом које је потребно да се 50% пестицида разради (DT_{50}), и на основу тога се и врши класификација на ниско, умерено и веома перзистентне пестициде (Šovljanski и Lazić, 2007). Перзистентност пестицида је дакле резултанта деловања свих поменутих процеса у земљишту.

Последњих деценија, употреба биопестицида бележи растући значај, што се оправдава подизањем свести пољопривредних произвођача о штетности синтетичких пестицида за људско здравље и животу средину, као и о постојању једнако ефикасних алтернатива (Šunjka и Vuković, 2021). Према подацима појединих аутора, 2023. године, биопестициди су заузимали 7% укупног тржишта средстава за заштиту биља, док је процењено да њихова употреба на глобалном нивоу годишње расте за 10%. Исти аутори у свом раду износе предвиђања да ће се обим тржишта биопестицида између 2040. и 2050. године изједначити са обимом тржишта синтетичких пестицида (Chakraborty et al., 2023). У 2026. години забележено је да приближно 10% глобалног тржишта заузимају биопестициди, у вредности од преко 3 милијарде долара (Malek et al., 2026).

2.5.4. Појам биодеградације и биоремедијације

Путеви деградације у земљишту и води, добро су проучени и своде се на физичко-хемијске реакције, а важан сегмент овог процеса представља и микробиолошка разградња. Потенцијал појединих корисних микроорганизама – биоагенса, експериментално је истражен, а резултати су показали да је биодеградација веома ефикасна (Vermelho et al., 2024; Raffa и Chiampro, 2021).

Биодеградациони потенцијал микроорганизама постаје све актуелнија тема. Појам биодеградације пестицида дефинише се као процес биолошке разградње пестицида коју врше микроорганизми (Singh, 2008; Raffa и Chiampro, 2021) и биљке (Raffa и Chiampro, 2021). Појмом биоремедијације обухватају се технике примене локалне или интродуковане популације микробиома, које ће путевима метаболизма трансформисати токсична пестицидна једињења у нетоксичне производе. Разградња пестицида ограничена је на профил земљишта и подземне воде, а њен интензитет зависи од локалних услова средине као и од састава и заступљености присутних микроорганизама. С обзиром на разлике у доступности кисеоника, процеси

разградње се значајно разликују идући од површинског и незасићеног (земљишта у ком су поре делом испуњене ваздухом, а делом водом, а површински слој садржи највећи проценат кисеоника) слоја, до подземне воде и водом засићеног слоја земљишта (земљиште у ком су све поре потпуно испуњене водом) (Singh, 2008).

Методе које се примењују обухватају третмане и процесе приказане у Табели 2. и углавном се састоје у интродукцији сојева који ефикасније спроводе реакције деградације или у уношењу храњивих материја и кисеоника ради стимулације активности микроорганизама (Vermelho et al., 2024; Singh, 2008; Uqab et al., 2016). Ове методе се могу оптимизовати контролом свих абиотских и биотских услова као и комбиновањем различитих метода (Raffa и Chiampro, 2021). Једна од модернијих метода која укључује детаљно мапирање генома (укључујући плазмиде) и генетички инжењеринг за добијање трансгених биоагенса, представљају савремени приступ који омогућава прецизно идентификовање деградационих метаболичких путева и развој сојева микроорганизама са повећаним капацитетом за разградњу перзистентних пестицида и ремедијацију контаминираниог земљишта (Vermelho et al., 2024; Singh, 2008).

Табела 2. Методе оптимизације биоремедијације (Raffa и Chiampro, 2021; Singh, 2008)

Природно слабење - биодеградацију врши аутохтона микрофлора земљишта	
<i>In situ</i> методе аеробна разградња на самој загађеној површини	Биостимулација – инкорпорација разноврсних органских материја ради стимулације биодеградационе активности постојеће, аутохтоне микробиолошке популације
	Биоаугментација – апликација одређених бактеријских сојева и ензима ради оптимизације разградње пестицида
	Биовентилација – активно уношење кисеоника и храњивих материја, путем пумпи или дуваљки, или пасивно деловањем атмосферског притиска, кроз бушотине у профилу земљишта, у зони изнад подземних вода. Овим поступком се интензивира раст популације и самих микроорганизама, као и аеробна оксидација и даље ензимска разградња и минерализација загађивача у контаминираниом земљишту
	Биобарботажа – уношење кисеоника (ваздуха) под одговарајућим притиском кроз бушотине, у земљиште засићено водом (земљиште испод нивоа подземне воде) и самим тим и у саме

	подземне воде. На тај начин се поспешује метаболичка активност аеробних микроорганизама у засићеном земљишту и подземним водама, а истовремено межурићи ваздуха преносе испарљиве пестициде у незасићену зону где се наставља њихова разградња
	Биореактори – стимулација биодеградационе активности и метаболизма микроорганизама формирањем смеше контаминираног земљишта и отпадних вода
Ex situ методе загађено земљиште се транспортује на локацију где ће се вршити пречишћавање	Биофилтрирање – из земљишта се извлачи (вакуум пумпе) загађени ваздух испарљивим пестицидима. Та смеша ваздуха и пестицидних испарења се пропушта кроз биофилтер (сачињен из земље, компоста, тресета) са одабраним популацијама микроорганизама који аеробно метаболишу пестициде
	Компостирање – формирање смеше органских отпадака и контаминираног земљишта у циљу интензивирања метаболизма микроорганизама
On-site методе контаминираног земљиште се пречишћава у непосредној близини контаминираног места	Биохрпе (бионагомилавање) – представљају гомиле загађеног земљишта прожете цевима које гомилу снабдевају кисеоником и нутритивно обогаћеном водом
	<i>Landfarming</i> третман – базиран на постизању континуиране аерације периодичном обрадом загађеног земљишта распоређеног на великим површинама
	<i>On-site</i> компостирање <i>On-site</i> биореактори

Механизам биодеградације који користе микроорганизми заснован је на ензимској разградњи (Vermelho et al., 2024; Raffa и Chiampo, 2021; Singh, 2008). Органски пестициди сачињени су највећим делом из угљеничних, ароматичних и хетероароматичних прстенова, и других есенцијалних неметала пре свега, али и метала (одређене специфичне групе пестицида). Имајући у виду тај податак, може се закључити да пестициди представљају добар супстрат за експлоатацију од стране микроорганизама, ради добијања енергије ензимском разградњом кроз циклусе метаболизма (Vermelho et al., 2024; Raffa и Chiampo, 2021; Singh, 2008; Uqab et al., 2016). Ензими којима се разграђују пестициди су: нитроредуктазе, естеразе, лаказе, оксидоредуктазе и пероксидазе, супероксид дисмутаза, каталаза (Šovljanski и Lazić, 2007; Vermelho et al., 2024; Raffa и Chiampo, 2021), а производи ових ензимских

реакција су угљен-диоксид, вода, минерална једињења, оксиди и енергија (Raffa и Chiampo, 2021; Singh, 2008; Uqab et al., 2016).

Процес биодеградације обухвата секвенцу реакција, уз примену наведених екстра- или интрацелуларних ензима, које се могу хронолошки расподелити у 3 основна корака: превођење пестицидних молекула у водорастворљива једињења кроз реакције оксидације, хидролизе и редукције; водорастворни метаболити се у реакцијама коњугације кондензују са аминокиселинама и угљеним хидратима у циљу даљег снижавања отровности (Raffa и Chiampo, 2021); последњи корак обухвата добијање нетоксичних производа угљен-диоксида, воде, различитих оксида, минерала, минерализацијом пестицидних материја (Raffa и Chiampo, 2021; Singh, 2008). Ко-метаболизмом се исто тако спроводи модификација пестицида, али производе ових реакција микроорганизам не користи у својим биосинтетским процесима и осталим функцијама, већ их чини доступним другим организмима и процесима (Raffa и Chiampo, 2021).

До сада је испитивана биодеградациона способност корисних филаментозних гљива, квасаца, бактерија и биљака (Raffa и Chiampo, 2021), а идентификоване су и микроалге које су се показале као ефикасни биоремедијациони агенси (Vermelho et al., 2024).

Детерминишући утицај на одвијање процеса биоремедијације имају карактеристике микроорганизма, физичко-хемијске карактеристике пестицида, пре свега афинитет према адсорпцији и растворљивост у води (што имплицира смањену доступност за микроорганизме) (Raffa и Chiampo, 2021), као и фактори средине: тип земљишта, температура, рН вредност земљишта, садржај влаге, порозност земљишта (Vermelho et al., 2024; Raffa и Chiampo, 2021; Singh, 2008).

3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА

Задатак истраживања које чини основу овог мастер рада јесте да се испита активност појединачног или синергистичког деловања, молекуларно потпуно окарактерисаних сојева микроорганизама врста *B. amyloliquefaciens*, *M. caribbica* и *T. virens* на сојеве фитопатогене гљиве *B. cinerea* проузроковача сиве трулежи бројних ратарских, повртарских воћарских култура као и трулежи винове лозе, издвојене из узорака јабуке, јагоде и винове лозе *in vitro*. Поред тога, задатак је и да се испита капацитет наведених сојева корисних микроорганизама за деградацију одабраних пестицида из групе хербицида, инсектицида и фунгицида.

Основни циљ истраживања овог мастер рада је да се издвоје корисни микроорганизми који имају капацитет да контролишу развој проузроковача сиве трулежи, фитопатогене гљиве *B. cinerea* самостално или као конзорцијум, а истовремено имају способност деградације појединих пестицида.

Наведена својства дефинисала би сој (сојеве) микроорганизама из трајне колекције микробиолошких култура Лабораторије за биолошка истраживања и пестициде, Одељења за биолошка истраживања у фитопатологији, Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду, који су потпуно молекуларно окарактерисани, као потенцијалне активне материје за формулацију биолошких препарата намењених за заштиту јабуке, јагоде и винове лозе од проузроковача сиве трулежи - *B. cinerea*. Вредност потенцијалног производа била би значајно увећана чињеницом да се његовим уношењем у агроекосистем не утиче само на заштиту биљака од *B. cinerea* уз редуковање потребе за третманима синтетичким фунгицидима, већ се утиче на биоремедијацију свих супстрата (биљка, плод, земљиште) које активна материја тј. корисни сој (сојеви) микроорганизма колонизују, деградирајући остатке пестицида у њима.

Анализирани резултати ових огледа могу послужити за даља истраживања у области технологије формулације пестицида на биолошкој бази, ради имплементације ових сојева корисних микроорганизама као потенцијалних компоненти, тачније активних супстанци биопрепарата. Одрживост примене ових препарата огледа се у способности ових сојева да редукују популацију штетног организма, уз истовремену биоремедијацију супстрата – земљишта, биљке, плода – што директно резултира редукијом примене синтетских препарата и ослобађањем агроекосистема од загађења које се акумулирало током вишедеценијског периода.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

4.1. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА ПРИМЕЊЕНИ У ОГЛЕДУ ИСПИТИВАЊА АНТИМИКРОБНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА БИОАГЕНСА

4.1.1. Материјал коришћен за припрему и постављање огледа

Припрема и постављање огледа у ком су испитивани ефекти антимикробног потенцијала одабраних биоагенса против фитопатогене гљиве *B. cinerea* захтевао је следећи материјал:

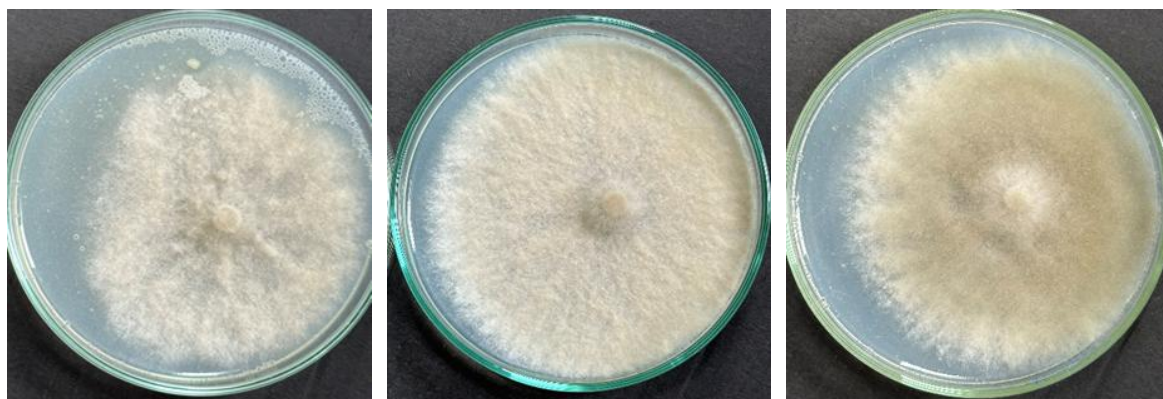
- 1 l аутоклавиране КДА (кромпир - декстрозни агар) подлоге припремљене са 20% агара
- 48 стерилних Петри посуда и одређен број Петри посуда потребних за ревитализацију микроорганизама коришћених у огледу
- Седам дана старе колоније одабраних сојева *B. cinerea* изолованих из јабуке, јагоде и винове лозе
- Пет дана старе колоније биоагенса *T. virens* DAR7
- Два дана старе колоније биоагенса бактеријског соја *B. amyloliquefaciens* ABO2 и соја квасца *M. caribbica* BBJ
- Секач мицелије (борер)
- Бактериолошка еза
- Копљаста игла
- Скалпел – лабораторијски нож
- Стерилне епендорф тубице од 1,5 ml
- Стерилна дестилована вода
- Стерилни *Tween* – сурфактант за припрему суспензије спора
- Шаблони 1, 2 и 3 на основу којих се обавља засејавање патогена и биоагенса на подлогу

4.1.2. Сојеви фитопатогене гљиве

У истраживању су коришћена три соја фитопатогене гљиве *Botrytis cinerea* изолована из узорака три различите биљне врсте (Табела 3) (Слика 1, 2 и 3), доказане патогености која су молекуларно потпуно окарактерисана, са секвенционираним геномом и дефинисаним стабилним особинама. Сојеви фитопатогене гљиве коришћене у огледу су део трајне колекције микробиолошких култура Лабораторије за биолошка истраживања и пестициде, Одељења за биолошка истраживања у фитопатологији, Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду.

Табела 3. Сојеви фитопатогене гљиве *B. cinerea* употребљени у огледу испитивања антимикробног потенцијала биоагенаса

Шифра соја	Врста фитопатогене гљиве	Биљна култура из које потиче сој гљиве
R9	<i>Botrytis cinerea</i>	јабука
MJoKi3	<i>Botrytis cinerea</i>	јагода
A121/1	<i>Botrytis cinerea</i>	винова лоза



Слика 1, 2 и 3. Контролне варијанте са колонијама фитопатогене гљиве *B. cinerea* сојева R9 (Var1), MJoKi (Var9) и A121/1 (Var17) редом

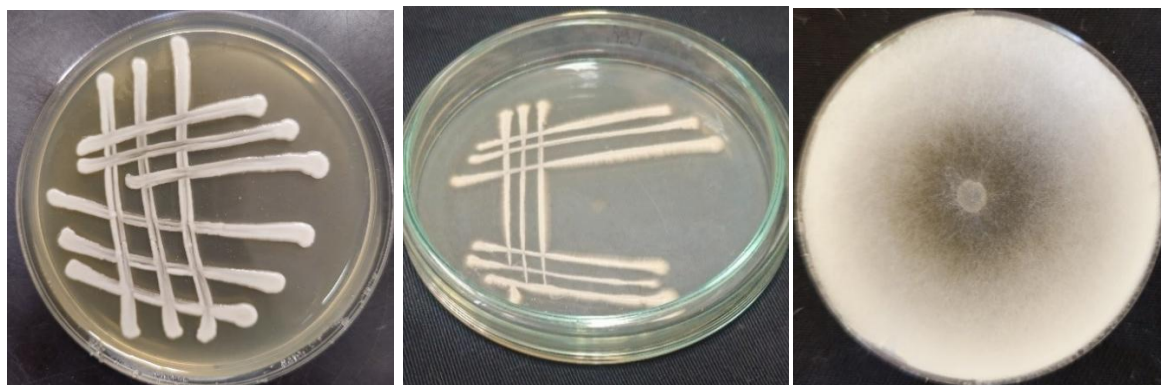
4.1.3. Сојеви биоагенса

Испитан је антимикробни потенцијал три одабрана, потпуно молекуларно окарактерисана, соја биоагенса (Табела 4) (Слика 4, 5 и 6), који припадају различитим таксономским категоријама (различита царства) и различитим морфолошким групама, против сојева наведене фитопатогене гљиве, у огледима две три и четири различите културе микроорганизама. Сојеви корисних микроорганизама коришћених у огледу су део трајне колекције микробиолошких

култура Лабораторије за биолошка истраживања и пестициде, Одељења за биолошка истраживања у фитопатологији, Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду.

Табела 4. Сојеви корисних микроорганизама употребљени у огледу испитивања антимикробног потенцијала биоагенса

Шифра соја	Врста микоорганизма	Таксономска припадност
ABO2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	царство <i>Bacteria</i> – бактерија
BBJ	<i>Meyerozyma caribbica</i>	царство <i>Fungi</i> – квасац
DAR7	<i>Trichoderma virens</i>	царство <i>Fungi</i> – филаментозна гљива



Слика 4, 5 и 6. Колоније ревитализованих биоагенса *B. amyloliquefaciens* ABO2, *M. caribbica* BBJ и *T. virens* DAR7 редом

4.1.4. Поступак ревитализације сојева фитопатогене гљиве *Botrytis cinerea* и одабраних сојева биоагенса

Први корак обухватао је припреме за извођење огледа и подразумевао је ревитализацију сојева *B. cinerea* и одабраних сојева бактерије *B. amyloliquefaciens*, квасца *M. caribbica* и гљиве *T. virens* из трајне колекције микробиолошких култура Лабораторије за биолошка истраживања и пестициде. Поступак ревитализације се састојао у засејавању сојева микороорганизама из колекције на стерилну КДА (кромпир - декстрозни агар) хранљиву подлогу, претходно разливену у стерилне Петри посуде. Сојеви фитопатогене гљиве *B. cinerea* засејани су 7 дана пред извођење огледа, постављањем исечка мицелије, копљастом иглом, на централну позицију хранљиве подлоге. На исти начин је засејан и биоагенс *T. virens* DAR7 5 дана пред постављање огледа, док су суспензије биоагенса *B. amyloliquefaciens* ABO2 и *M. caribbica* BBJ засејане уз употребу езе, методом фракционог исцртавања,

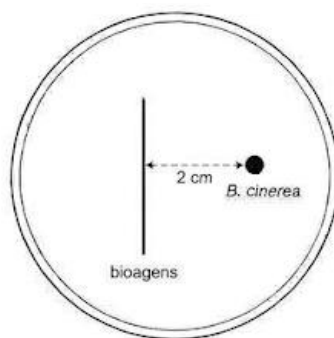
2 дана пред постављање огледа. Петри посуде са засејаним микроорганизмима на храњивим подлогама, инкубиране су на 25°C.

4.1.5. Припрема суспензије биоагенса

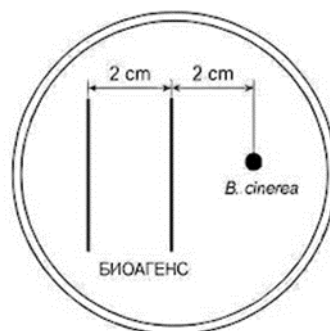
Поступак испитивања антимикробног потенцијала биоагенса захтевао је припрему суспензије сојева корисних микроорганизама из ревитализованих чистих култура у Петри посудама, непосредно пред постављање огледа. Према посебним протоколима суспензије су припремљене растварањем колонија у 1000 µl стерилне воде. Суспензија биоагенса *B. amyloliquefaciens* ABO2 припремљена је уношењем два пуна захвата бактериолошке езе у 1000 µl стерилне дестиловане воде (10^7 ћелија/ml – концентрација ћелија у суспензији), док је суспензија биоагенса *M. caribbica* BBJ припремљена додавањем једног пуног захвата колонија чисте културе у 1000 µl стерилне дестиловане воде (10^7 ћелија/ml -концентрација ћелија у суспензији). *T. virens* DAR7 суспензија филаментозне гљиве добијена је скупљањем колоније и спора биоагенса стерилним скалпелом и дисперговањем у 1000 µl стерилне дестиловане воде са додатком 0,1 % Tween 80 сурфактанта (10^7 спора/ml – концентрација спора у суспензији).

4.1.6. Постављање огледа

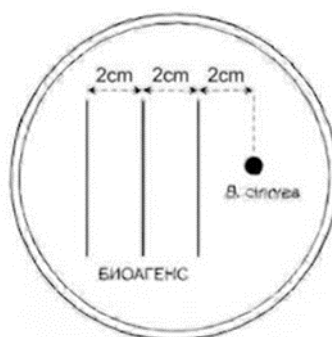
Коришћењем борера направљени су једнаки исечци мицелије сваког од сојева гљиве *B. cinerea* пречника 3 mm. Исечени дискови су потом постављани на претходно стерилисану и затим разливену КДА храњиву подлогу, на места прецизно дефинисана одговарајућим шаблонима (Слика 7, 8 и 9).



Слика 7. Шаблон 1 на папиру који имитира дно Петри кутије - обележено место са десне стране где се засејава кружни исечак мицелије и са леве стране једна линија за варијанте са једним биоагенсом.



Слика 8. Шаблон 2 на папиру који имитира дно Петри кутије - обележено место са десне стране где се засејава кружни исечак мицелије и са леве стране две паралелне линије за варијанте са два биоагенса.



Слика 9. Шаблон 3 на папиру који имитира дно Петри кутије - обележено место са десне стране где се засејава кружни исечак мицелије и са леве стране три паралелне линије за варијанте са три биоагенса.

За део огледа у ком су испитивани ефекти биоагенса у двојној култури, оглед је постављен на следећи начин: на удаљености 2 cm од кружног фрагмента мицелије одређеног соја гљиве *B. cinerea*, бактериолошком езом су, у виду вертикалне линије дужине 5 cm, засејани биоагенси који припадају бактеријама и квасацима, док је биоагенс *T. virens* DAR7 засејан постављањем кружног исечка мицелије на подлогу (Слика 7). Поступак засејавања микроорганизама приказан је на сликама 10 и 11.

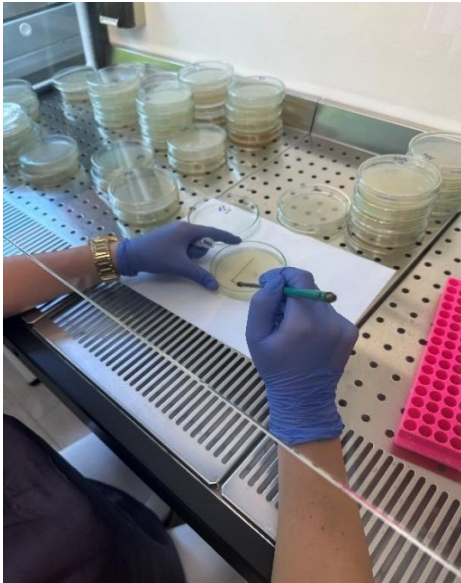
Засејавање фитопатогене гљиве и биоагенса у варијантама огледа у којима су испитивани ефекти синергистичког деловања два биоагенса или синергистичко деловање сва три биоагенса, обављено је на основу шаблона 2 и 3 (Слика 8 и 9). Биоагенси су засејавани на растојању 2 cm од кружног исечка мицелије гљиве *B. cinerea* док је међусобно растојање између самих биоагенса износило 2 cm. У зависности од варијанте огледа тројне културе, биоагенси су засејани у виду две

паралелне вертикалне линије дужине 5 cm, или у виду једне вертикалне линије у комбинацији са кружним исечком мицелије у случају варијанти са сојем *T. virens* DAR7 (Слика 8). Варијанте огледа које су захтевале засејавање сва три биоагенса постављене су у виду две паралелне вертикалне линије дужине 5 cm и постављањем кружног исечка мицелије соја *T. virens* DAR7 (Слика 9).

Свака варијанта је припремљена у два понављања, а контролну варијанту су чиниле Петри кутије у које је засејан само фрагмент мицелије одабраних сојева фитопатогене гљиве *B. cinerea*, без засејавања биоагенса. Петри кутије су потом инкубиране при 25°C, уз свакодневно праћење стања и активности агенса.

Табела 5. Варијанте испитивања антимикуробног потенцијала двојне културе и варијанте вишеструких култура

ВАРИЈАНТЕ	
Вар1	<i>Botrytis cinerea</i> R9 - контрола
Вар2	<i>Botrytis cinerea</i> R9 + ABO2
Вар3	<i>Botrytis cinerea</i> R9 + BBJ
Вар4	<i>Botrytis cinerea</i> R9 + DAR7
Вар5	<i>Botrytis cinerea</i> R9+ABO2+BBJ
Вар6	<i>Botrytis cinerea</i> R9+ABO2+DAR7
Вар7	<i>Botrytis cinerea</i> R9+BBJ+DAR7
Вар8	<i>Botrytis cinerea</i> R9+ABO2+BBJ+DAR7
Вар9	<i>Botrytis cinerea</i> - контрола
Вар10	<i>Botrytis cinerea</i> MjoKi+ABO2
Вар11	<i>Botrytis cinerea</i> MjoKi+BBJ
Вар12	<i>Botrytis cinerea</i> MjoKi+DAR7
Вар13	<i>Botrytis cinerea</i> MjoKi+ABO2+BBJ
Вар14	<i>Botrytis cinerea</i> MjoKi+ABO2+DAR7
Вар15	<i>Botrytis cinerea</i> MjoKi+BBJ+DAR7
Вар16	<i>Botrytis cinerea</i> MjoKi+ABO2+BBJ+DAR7
Вар17	<i>Botrytis cinerea</i> A121/1 - контрола
Вар18	<i>Botrytis cinerea</i> A121/1+ABO2
Вар19	<i>Botrytis cinerea</i> A121/1+BBJ
Вар20	<i>Botrytis cinerea</i> A121/1+DAR7
Вар21	<i>Botrytis cinerea</i> A121/1+ABO2+BBJ
Вар22	<i>Botrytis cinerea</i> A121/1+ABO2+DAR7
Вар23	<i>Botrytis cinerea</i> A121/1+BBJ+DAR7
Вар24	<i>Botrytis cinerea</i> A121/1+ABO2+BBJ+DAR7



Слика 10 и 11. Засејавање микроорганизама уз помоћ одговарајућих шаблона

4.1.7. Оцена огледа испитивања антимикробног потенцијала биоагенса

Оцена огледа извршена је након пет дана од почетка инкубације, употребом лењира са милиметарском скалом и мерењем полупречника колоније сојева фитопатогене гљиве најпре у контролним, а затим и у варијантама двојних и вишеструких култура са засејаним биоагенсима. Ради одређивања процента инхибиције раста сојева фитопатогене гљиве, односно зоне инхибиције, измерене вредности полупречника колоније у контролним и варијантама са биоагенсима, уврштене су у следећу формулу:

$$\text{Inhibition\%} = (r_0 - r) / r_0$$

r_0 -полупречник колоније патогена у контролној Петри кутији у mm

r -полупречник колоније у тесту двојних култура у mm

4.1.8. Статистичка обрада података

Остварени резултати су обрађени методом вишеструке анализе варијансе (Factorial ANOVA) и употребом Данкановог пост хок теста за интервал поверења од 95% у софтверском пакету Statistica 14.0.0.15.

4.2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА ПРИМЕЊЕНИ У ОГЛЕДУ ИСПИТИВАЊА БИОДЕГРАДАЦИОНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА БИОАГЕНСА

4.2.1. Опрема и хемикалије коришћени у испитивању

Припрема и постављање огледа ради испитивања биодеградационог потенцијала биоагенса захтевала је посебну опрему (Табела 5) и хемикалије. Због тога је део истраживања који је обухватао припрему за постављање огледа и читавање резултата огледа, обављен у Лабораторији за биолошка истраживања и пестициде, Департмана за фитомедицину у заштиту животне средине, Пољопривредног факултета у Новом Саду (Слика 13).



Слика 12. Гасни хроматограф са пламено-јонизационим детектором Shimadzu 2010



Слика 13. Лабораторија за биолошка истраживања и пестициде

Опрема коришћена у огледу:

- GC систем - (GC/FID) Shimadzu 2010 са FID детектором (Слика 12)
- Колона - InertCap 5, df. 0,25 μm , 0,32 mm I.D. $\times$ 30 m
- Аналитичка вага - Kern ABJ, минимум тачности 0,1 mg

- Ултразвучно купатило - LLG, UniSONIC 1
- Вортекс - Vortex 2 Genie Digital
- Центрифуга - Sigma
- Turax - Diax 900 (Heidolph, Немачка)
- Лабораторијско стакло - А класе

Хемикалије које су коришћене у огледу обухватају следеће пестициде:

- Фунгицид азоксистробин - аналитички стандард чистоће 98,55% (Dr. Ehrenstorfer)
- Инсектицид делтаметрин - аналитички стандард чистоће 99,4% (Dr. Ehrenstorfer)
- Хербицид метрибузин - аналитички стандард чистоће 99,4% (Dr. Ehrenstorfer)
- Ацетонитрил - HPLC чистоће ("J.T.Baker", Холандија)

Материјал коришћен при постављању огледа:

- Стерилне епендорф тубице од 1,5 ml
- Стерилна дестилована вода
- Бактериолошка еза
- Скалпел – лабораторијски нож
- Пет дана старе колоније биоагенса *T. virens* DAR7
- Два дана старе колоније биоагенса бактеријског соја *B. amyloliquefaciens* ABO2 и соја квасца *M. caribbica* BBJ
- Стерилни Tween 80 – сурфактант за припрему суспензије спора
- Микропипета и стерилни наставци за микропипету
- Стерилни штапићи по Дригалском
- 34 стерилне Петри кутије
- 0,5 l стерилне КДА подлоге припремљене са 15% агара
- Стерилне мензуре за одмеравање подлоге и воде
- Стерилне чаше са магнетом
- Стерилни шприцеви
- Магнетна мешалица
- Водено купатило

4.2.2. Поступак ревитализације одабраних сојева биоагенса

Први корак обухватао је припреме за извођење огледа и подразумевао је ревитализацију сојева биоагенса - бактерије *B. amyloliquefaciens*, квасца *M. caribbica* и гљиве *T. virens* - из трајне колекције микробиолошких култура Лабораторије за биолошка истраживања и пестициде. Поступак ревитализације се састојао у засејавању сојева микороорганизама из колекције на стерилну КДА (кромпир - декстрозни агар) хранљиву подлогу, претходно разливену у стерилне Петри посуде. Биоагенс *T. virens* DAR7 засејан је 5 дана пред извођење огледа, постављањем исечка мицелије копљастом иглом на централну позицију хранљиве подлоге. Суспензије биоагенса *B. amyloliquefaciens* ABO2 и *M. caribbica* BBJ засејане су уз употребу бактериолошке езе, методом фракционог исцртавања, 2 дана пред постављање огледа. Петри посуде са засејаним микроорганизмима на хранљивим подлогама, инкубиране су на 25°C.

4.2.3. Припрема раствора аналитичких стандарда

Ради припреме аналитичких стандарда који ће се користити при оцени огледа односно при читавању резултата, потребно је на аналитичкој ваги одмерити одређене масе сваког од пестицида и затим их растворити у одређеној запремини ацетонитрила, након чега се одлажу у фрижидер (Табела 6). Разблажењем основних раствора стандарда припремљена је серија раствора концентрација које су употребљене за даља испитивања и које представљају радне растворе.

Табела 6. Количине одмерених пестицида на аналитичкој ваги изражене у милиграмима (mg) и концентрације основних раствора (mg/l).

Пестицид	Одмерена количина пестицида (mg)	Аналитички стандард чистоће (%)	Концентрација основног раствора након растварања у ацетонитрилу (mg/ml)
Азоксистробин	5,8	98,55	0,57159
Делтаметрин	5,1	99,4	0,50694
Метрибузин	5,4	99,4	0,53903

4.2.4. Припрема КДА храњиве подлоге са пестицидима

Храњива подлога је за потребе овог огледа препремљена са 15% агара како би се успорио њен прелазак из течне у чврсту фазу. Након аутоклавирања КДА храњиве подлоге су смештене у водено купатило.

Фунгицид азоксистробин активна је материја препарата Quadris, (SC, Syngenta AG), са садржајем активне материје од 250 g/l у формулацији концентроване суспензије. Према препоруци произвођача, теренска концентрација препарата треба да износи 0,5%, те је прорачун за концентрацију која ће се наћи у подлогама за потребе огледа, био усклађен са његовом применом у пракси. То значи да је у 100 ml КДА подлоге додато 0,5 ml, односно да се у 100 ml налази 0,125 g азоксистробина (Табела 7).

За припрему КДА подлоге са делтаметрином коришћен је препарат Decis Expert (EC, Bayer CropScience), који садржи 100 g/l делтаметрина. Препоручена концентрација примене износи 0,0625%, па је у 100 ml КДА подлоге додато 0,0625 ml препарата. У тој количини препарата, односно 100 ml КДА подлоге, налази се 0,00625 g активне материје делтаметрин (Табела 7).

У огледу је коришћен хербицидни препарат Dancor 70 WG (WG, Sumi Agro) који садржи 700 g/kg метрибузина као активну материју у формулацији вододисперзибилних гранула. Препоручена концентрација примене износи 0,75%, те је у 100 ml КДА подлоге додато 0,75 g препарата. У наведеној количини препарата, односно 100 ml PDA подлоге, налази се 0,54 g активне материје метрибузина (Табела 7).

Табела 7. Преглед испитиваних пестицида, концентрација припреме и садржаја активне материје у подлози

Пестицид	Препарат	Садржај активне материје у препарат у	Препоручена концентрација примене у (%)	Препоручена количина препарата која се додаје у 100 ml подлоге	Количина активне материје (g) у подлози
Азоксистробин	Quadris	250 g/l	0,5	0,5 ml	0,125
Делтаметрин	Decis Expert	100 g/l	0,0625	0,0625 ml	0,00625
Метрибузин	Dancor 70 WG	700 g/kg	0,75	0,75 g	0,54

4.2.5. Припрема суспензије биоагенса

Поступак испитивања биодеградационог потенцијала биоагенса захтевао је припрему суспензије сојева корисних микроорганизама из ревитализованих чистих култура у Петри посудама, непосредно пред постављање огледа. Према посебним протоколима суспензије су припремљене растварањем колонија у 1000 μ l стерилне воде. Суспензија биоагенса *B. amyloliquefaciens* ABO2 припремљена је уношењем два пуна захвата бактериолошке езе у 1000 μ l стерилне дестиловане воде (10^7 ћелија/ml – концентрација ћелија у суспензији), док је суспензија биоагенса *M. caribbica* BBJ припремљена додавањем једног пуног захвата колонија чисте културе у 1000 μ l стерилне дестиловане воде (10^7 ћелија/ml - концентрација ћелија у суспензији). *T. virens* DAR7 суспензија филаментозне гљиве добијена је скупљањем колоније и спора биоагенса стерилним скалпелом и дисперговањем у 1000 μ l стерилне дестиловане воде са додатком 0,1 % Tween 80 сурфактанта (10^7 спора/ml – концентрација спора у суспензији).

4.2.6. Постављање огледа испитивања биодеградационог потенцијала биоагенса

Одмерене количине активних супстанци пестицида диспергују се у 10 ml стерилне дестиловане воде у чаши са магнетом и постављају на магнетну мешалицу ради формирања хомогене суспензије. Тако формирана хомогена суспензија додаје се у чашу са магнетом која садржи 90 ml течне КДА подлоге, након чега се смеша даље хомогенизује на магнетној мешалици. Добијена хомогена смеша расподељује се стерилним шприцевима, у обележене Петри посуде (бројеви варијанти од 1 до 17) у запремини од по 10 ml. Након очвршћавања КДА подлоге са пестицидом, на њу се микропипетом наноси 100 μ l претходно припремљене суспензије корисних микроорганизама и размазује се по површини читаве подлоге штапићем по Дригалском, како би се суспензија равномерно распоредила. Контролне варијанте са пестицидима припремљене су разливањем суспензије КДА подлоге и одређеног пестицида без наношења суспензије биоагенса, док су контролне варијанте без пестицида и биоагенса припремљене разливањем чисте подлоге без пестицида у Петри посуде (негативна контрола). Све варијанте су постављене у два понављања, обележене бројевима од 1 до 17 и приказане у Табели 8.

Табела 8. Приказ испитиваних третмана и њихових комбинација (биоагенси, пестициди и контроле)

ВАРИЈАНТЕ	
Вар 1	азоксистробин – контрола почетак огледа
Вар 2	азоксистробин+ ABO2
Вар 3	азоксистробин + BBJ
Вар 4	азоксистробин + DAR7
Вар 5	азоксистробин – контрола крај огледа
Вар 6	метрибузин – контрола, почетак огледа
Вар 7	метрибузин + ABO2
Вар 8	метрибузин + BBJ
Вар 9	метрибузин + DAR7
Вар 10	метрибузин – контрола крај огледа
Вар 11	делтамерин – контрола почетак огледа
Вар 12	делтамерин + ABO2
Вар 13	делтамерин +BBJ
Вар 14	делтамерин + DAR7
Вар 15	делтамерин – контрола крај огледа
Вар 16	негативна контрола – само подлога, почетак огледа
Вар 17	негативна контрола – само подлога, крај огледа

4.2.7. Оцена огледа испитивања биодеградационог потенцијала биоагенса

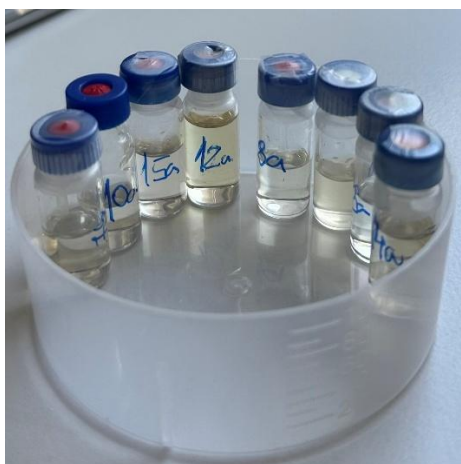
Оцена огледа обављена је седам дана након постављања огледа, методом екстракције азоксистробина, делтаметрина и метрибузина из подлоге кромпир-декстрозног агара. Екстракција пестицида изведена је према следећем протоколу: 10 ml PDA подлоге из Петри посуде пребачено је у кивету запремине 50 ml (Слика 14), након чега је додато 10 ml ацетонитрила. Узорак је хомогенизован на Тургах уређају током 3 минута, а затим мешан на вортексу 5 минута (Слика 15). Након тога је центрифугиран при 3000 обртаја у минути током 5 минута. Добијени супернатант је профилиран кроз мембрански филтер величине пора 0,45 μm (Слика 16), пребачен у вијал (Слика 17) и анализиран применом гасне хроматографије са са детектором са јонизацијом у пламену (GC-FID).

Метода гасне хроматографије заснива се на мерењу површине пика анализиране супстанце на хроматограму, која је директно пропорционална концентрацији пестицида у узорку. Одређивањем површине пика може се израчунати процентуална вредност концентрације пестицида у екстракту добијеном уситњавањем и растварањем подлоге у одговарајућем органском растварачу, ради преласка пестицида из подлоге у раствор (екстракт). Применом компаративне анализе аналитичких стандарда и узорака испитиваних екстраката, добијени су резултати

који представљају површине пикова преведене у процентуалне вредности концентрације пестицида.



Слика 14, 15 и 16. Поступак припреме супернатанта из ког ће се хроматографском методом одредити количина преосталог пестицида: сечење подлоге, вортексовање и филтрирање супернатанта за анализу



Слика 17. Профилтрирани супернатанти у вијалу припремљени за анализу гасном хроматографијом

Провера тачности методе изведена је на узорцима КДА подлоге обогаћеним познатим концентрацијама пестицида (Табела 9), при чему је екстракција спроведена према претходно описаном протоколу. Одређивање концентрације пестицида у подлогама без засејаних биоагенса са пестицидом (контролне варијанте са пестицидом – Вар1, Вар6 и Вар11 у Табели 8) и без додатог пестицида (контролна варијанта без пестицида – Вар16 у Табели 8), обављено је непосредно након

постављања огледа ради дефинисања референтних концентрација пестицида са којима ће се вршити поређење концентрација пестицида у подлогама са засејаним биоагенсима на крају огледа.

Табела 9. Провера тачности методе са процентуално израженим вредностима количине сваког од пестицида у контролним варијантама измереним одмах након постављања огледа

Пестицид	Обогаћена КДА подлога (тачност екстракције, %)
Азоксистробин	91,2
Делтаметрин	83,1
Метрибузин	95,6

У Табелама 10, 11 и 12, представљени су услови у којима се одвија процес одређивања концентрације пестицида у подлогама помоћу гасног хроматографа.

Табела 10. Услови рада GC-FID - одређивање азоксистробина

Температурни услови	150 °C, пораст 30 °C/min до 260 °C, током 16 min
Температура детектора	270 °C
Температура инјектора	250 °C
Инјектована запремина	1 µl
Дужина трајања анализе	19,67 min

Табела 11. Услови рада GC-FID – одређивање делтаметрина

Температурни услови	200 °C током 9 min
Температура детектора	230 °C
Температура инјектора	250 °C
Инјектована запремина	1 µl
Дужина трајања анализе	9 min

Табела 12. Услови рада GC-FID – одређивање метрибузина

Температурни услови	200 °C, пораст 5 °C/min до 250 °C, током 5 min
Температура детектора	250 °C
Температура инјектора	250 °C
Инјектована запремина	1 µl
Дужина трајања анализе	15 min

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

5.1. РЕЗУЛТАТИ ОГЛЕДА ИСПИТИВАЊА АНТИМИКРОБНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА БИОАГЕНСА

Анализом остварених резултата одређивањем зоне инхибиције, утврђено је постојање капацитета испитиваних биоагенса за инхибицију раста испитаних сојева фитопатогене гљиве *B. cinerea*. Процене инхибиције за сваку варијанту двојних и вишестуких култура као и референтна вредност полупречника колоније фитопатогене гљиве у контролним варијантама, приказани су у Табели 14. У Табели 13, приказана је двофакторијална анализа варијансе процената инхибиције пораста различитих сојева фитопатогене гљиве.

Табела 13. Двофакторијална анализа варијансе процената инхибиције пораста различитих сојева фитопатогене гљиве *B. cinerea* у зависности од третмана биоагенсима и њихове интеракције након четири дана инкубације

	SS	DF	MS	F-однос	p-вредност
Извор варијабилности	238922.9	1	238922.9	69989.16	0.000000
ПАТОГЕН	33.7	2	16.9	4.94	0.010348
БИОАГЕНС	122615.4	7	17516.5	5131.21	0.000000
ПАТОГЕН*БИОАГЕНС	145.6	14	10.4	3.05	0.001358
ГРЕШКА	204.8	60	3.4		

* $p \leq 0,05$ – значајан утицај фактора на зависно променљиву

Двофакторијална анализа варијансе показала је да су оба фактора појединачно, као и у интеракцији показали значајан утицај на зависно променљиву ($p \leq 0,05$) док је статистички високо значајан утицај на варијабилност имала примена биоагенса, као и биоагенс у интеракцији са испитиваним сојем патогена (Табела 13).

Како је показао Данканов пост хок тест, сви испитани агенси остварили су значајну инхибицију *B. cinerea*, независно од соја гљиве, самостално и у вишеструкој култури (Табела 14).

Табела 14. Данканов пост хок тест: ефекат примењених биоагенса на пораст колоније сојева R9, MјоKi3 и A121/1 фитопатогене гљиве *B. cinerea* у двојним, тројним и четвороструким културама

Шифра соја фитопатогене гљиве <i>B. cinerea</i>	Биоагенс(и)	% Инхибиције
R9	ABO2	77,50 ^{efg}
R9	BBJ	68,75 ^c
R9	DAR7	75,00 ^{de}
R9	ABO2+BBJ	78,75 ^{efgh}
R9	ABO2+DAR7	80,00 ^{fgh}
R9	BBJ+DAR7	68,75 ^c
R9	ABO2+BBJ+DAR7	80,00 ^{fgh}
MJoKi3	ABO2	81,73 ^h
MJoKi3	BBJ	70,19 ^c
MJoKi3	DAR7	79,80 ^{fgh}
MJoKi3	ABO2+BBJ	79,80 ^{fgh}
MJoKi3	ABO2+DAR7	78,84 ^{efgh}
MJoKi3	BBJ+DAR7	75,00 ^{de}
MJoKi3	ABO2+BBJ+DAR7	76,92 ^{efg}
A121/1	ABO2	76,25 ^{ef}
A121/1	BBJ	64,58 ^b
A121/1	DAR7	80,63 ^{gh}
A121/1	ABO2+BBJ	78,40 ^{efgh}
A121/1	ABO2+DAR7	77,43 ^{efg}
A121/1	BBJ+DAR7	72,15 ^{cd}
A121/1	ABO2+BBJ+DAR7	79,51 ^{fgh}
R9	Контрола	0,00 ^a
R9	Контрола	0,00 ^a
R9	Контрола	0,00 ^a
R9	Контрола	0,00 ^a
R9	Контрола	0,00 ^a
R9	Контрола	0,00 ^a
R9	Контрола	0,00 ^a
MJoKi3	Контрола	0,00 ^a
MJoKi3	Контрола	0,00 ^a
MJoKi3	Контрола	0,00 ^a
MJoKi3	Контрола	0,00 ^a
MJoKi3	Контрола	0,00 ^a
MJoKi3	Контрола	0,00 ^a
MJoKi3	Контрола	0,00 ^a
A121/1	Контрола	0,00 ^a
A121/1	Контрола	0,00 ^a
A121/1	Контрола	0,00 ^a
A121/1	Контрола	0,00 ^a

A121/1	Контрола	0,00 ^a
A121/1	Контрола	0,00 ^a
A121/1	Контрола	0,00 ^a

*Вредности обележене различитим словима се статистички значајно разликују

Резултати испитивања инхибиторног деловања биоагенса на сојеве фитопатогене гљиве *B. cinerea* приказани су појединачно на Графиконима од 1 до 3.

Резултати су показали да је најјачи појединачни инхибиторни ефекат на пораст соја R9 фитопатогене гљиве, имао сој *B. amyloliquefaciens* ABO2, са процентом инхибиције 77,50%, али на истом нивоу значајности са биоагенсом *T. virens* DAR7 (Слика 18) (Графикон 1). Ипак, највећа инхибиција пораста колоније R9 соја, постигнута је синергистичким деловањем сојева *B. amyloliquefaciens* ABO2 и *T. virens* DAR7 и синергистичким деловањем сва три соја, при чему је проценат инхибиције износио 80,00% у оба случаја (Слика 19 и Слика 20), али се статистички није значајно разликовао од ефекта *B. amyloliquefaciens* ABO2 и *M. caribbica* BBJ, као и појединачног ефекта *B. amyloliquefaciens* ABO2 (Графикон 1).



Слика 18. Ефекат биоагенса *B. amyloliquefaciens* ABO2 на сој R9 фитопатогене гљиве *B. cinerea* у двојној култури



Слика 19. и 20. Ефекати биоагенса *B. atyloliquefaciens* ABO2 и *T. virens* DAR7 и ефекти сва три биоагенса (*B. atyloliquefaciens* ABO2, *M. caribbica* BBJ и *T. virens* DAR7) на сој R9 фитопатогене гљиве *B. cinerea* у вишеструким културама

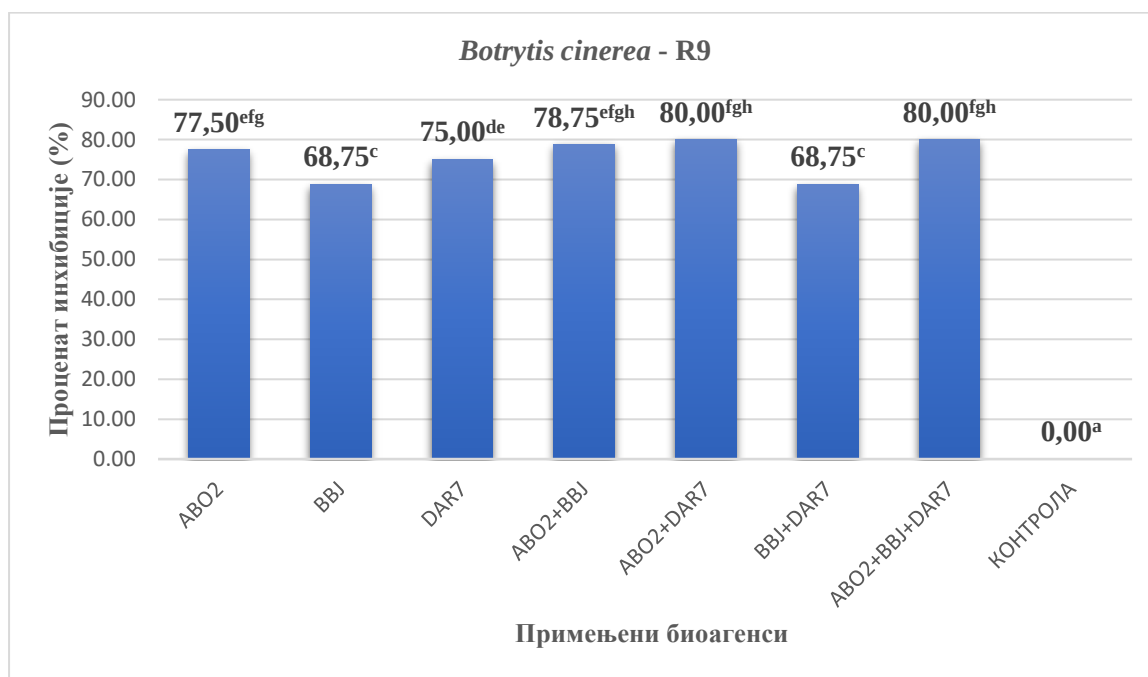
Занимљив резултат је уочен у варијанти где су два биоагенса *M. caribbica* BBJ и *T. virens* DAR7 супресовала раст соја R9, са процентом инхибиције 68,75% (Слика 21), који је једнак проценту инхибиције у варијанти са само једним биоагенсом *M. caribbica* BBJ (Слика 22) (Графикон 1).



Слика 21. Ефекати биоагенса *M. caribbica* BBJ и *T. virens* DAR7 на сој R9 фитопатогене гљиве *B. cinerea* у тројној култури



Слика 22. Ефекат биоагенса *M. caribbica* BBJ на сој R9 фитопатогене гљиве *B. cinerea* у двојној култури



Графикон 1. Ефекат примењених биоагенса *B. amyloliquefaciens* ABO2, *M. caribbica* BBJ и *T. virens* DAR7 у двојним и вишеструким културама на пораст колоније соја R9 фитопатогене гљиве *B. cinerea*.

Испитано је антагонистичко деловање биоагенса на сој MJoKi3 фитопатогене гљиве *B. cinerea* које се манифестовало инхибицијом пораста колоније у свим варијантама. Међутим, највећи инхибиторни ефекат према овом патогеном соју испољио је бактеријски сој *B. amyloliquefaciens* ABO2 (81,73% инхибиције), што је уједно и најбољи резултат међу свим примењеним третманима, како са појединачним тако и

са синергијским дејством биоагенса (Слика 23). Ипак, овај ефекат није био статистички значајно израженији у односу на варијанте са агенсима *T. virens* DAR7, *B. amyloliquefaciens* ABO2 + *M. caribbica* BBJ, *B. amyloliquefaciens* ABO2 + *T. virens* DAR7, где је забележена инхибиција на истом нивоу значајности.



Слика 23. Ефекат биоагенса *B. amyloliquefaciens* ABO2 на сој МјоКи3 фитопатогене гљиве *B. cinerea* у двојној култури

Третирањем патогеног соја МЈоКи3 биоагенсом *T. virens* DAR7 (Слика 24 и 25) и применом комбинованог третмана бактеријом *B. amyloliquefaciens* ABO2 и квасцем *M. caribbica* BBJ, остварени су идентични ефекти у супресији раста колоније патогена са процентом инхибиције у износу од 79,80% (Слика 26).



Слика 24. и 25. Ефекат биоагенса *T. virens* DAR7 на сој МјоКи3 фитопатогене гљиве *B. cinerea* у двојној култури

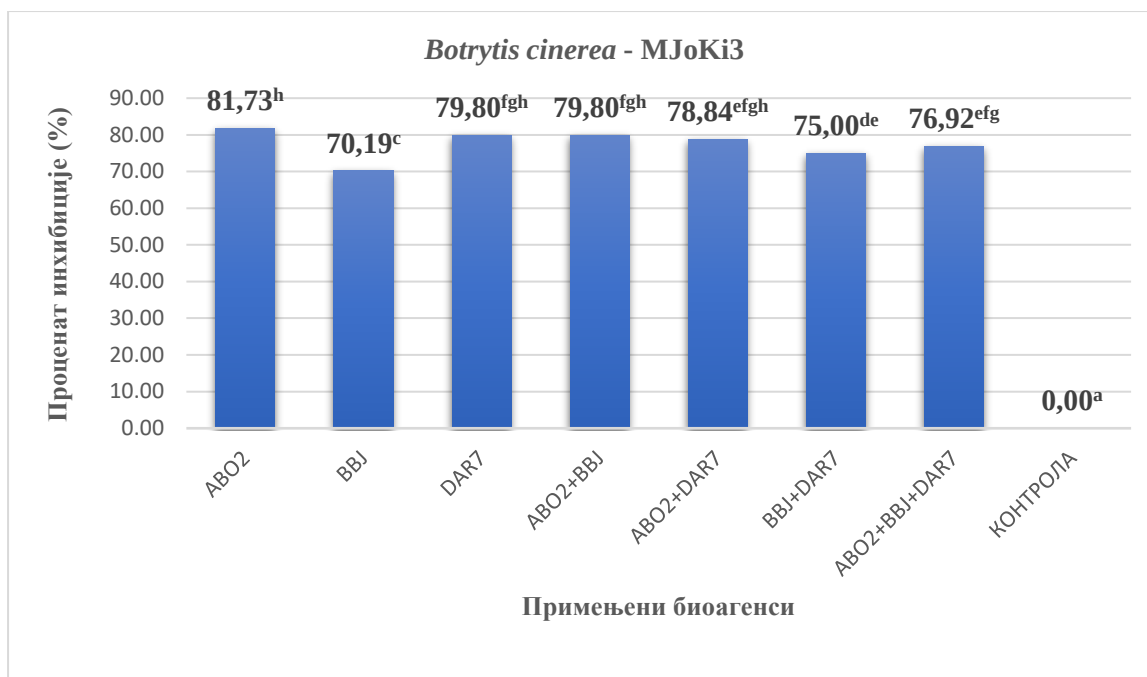


Слика 26. Ефекти биоагенса *B. atyloliquefaciens* ABO2 и *M. caribbica* BBJ на сој МјоКиЗ фитопатогене гљиве *B. cinerea* у тројној култури

Најслабији инхибиторни ефекат од свих третмана МЈоКиЗ патогеног соја, показао је квасац *M. caribbica* BBJ, са 70,19% инхибиције раста патогена (Слика 27), што је ипак значајно бољи резултат у односу на варијанту двојне културе са патогеним сојем R9.



Слика 27. Ефекат биоагенса *M. caribbica* BBJ на сој МјоКиЗ фитопатогене гљиве *B. cinerea* у двојној култури



Графикон 2. Ефекат примењених биоагенса *B. amyloliquefaciens* ABO2, *M. caribbica* BBJ и *T. virens* DAR7 у двојним и вишеструким културама на пораст колоније соја МјоКи3 фитопатогене гљиве *B. cinerea*

Сој филаментозне гљиве *T. virens* DAR7 значајно је редуковао пораст патогена A121/1 (80,63% инхибиције) (Слика 28 и Слика 29) док је приближно јаку супресију раста колоније овог паразита винове лозе, остварио и комбиновани третман сва три биоагенса (79,51%) (Слика 30). Инхибицију на статистички истом нивоу значајности са *T. virens* DAR7 остварили су агенси у следећим вишеструким културама: *T. virens* DAR7, *B. amyloliquefaciens* ABO2 + *M. caribbica* BBJ, *B. amyloliquefaciens* ABO2 + *T. virens* DAR7, *B. amyloliquefaciens* ABO2 + *M. caribbica* BBJ+ *T. virens* DAR7.



Слика 28. и 29. Ефекат биоагенса *T. virens* DAR7 на сој А121/1 фитопатогене гљиве *B. cinerea* у двојној култури

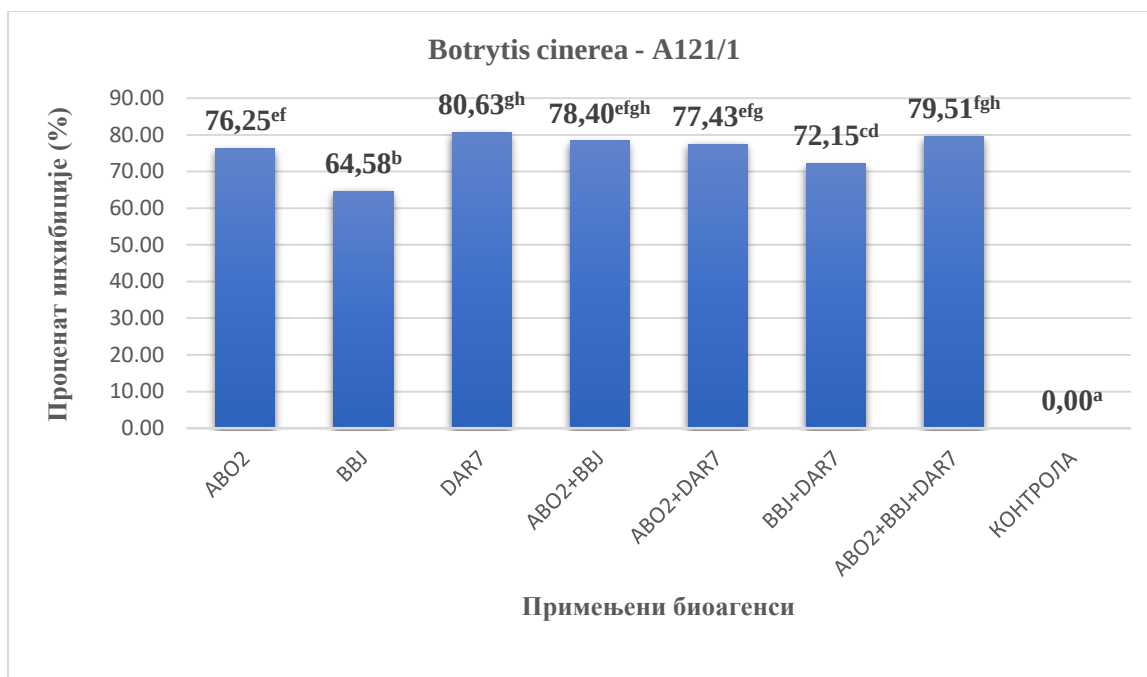


Слика 30. Ефекат комбинације сва три биоагенса (*B. amyloliquefaciens* ABO2, *M. caribbica* BBJ, *T. virens* DAR7) на сој А121/1 фитопатогене гљиве *B. cinerea* у вишеструкој култури

Квасац *M. caribbica* BBJ се и у варијанти са патогеним сојем А121/1 показао као најмање успешан антагонистички микроорганизам од одабраних биоагенаса (64,58%), а уједно је остварио и најслабији инхибиторни ефекат у односу на све остале варијанте (Слика 31).



Слика 31. Ефекат биоагенса *M. caribbica* BBJ на сој А121/1 фитопатогене гљиве *B. cinerea* у двојној култури



Графикон 3. Ефекат примењених биоагенса *B. amyloliquefaciens* ABO2, *M. caribbica* BBJ и *T. virens* DAR7 у двојним и вишеструким културама на пораст колоније соја A121/1 фитопатогене гљиве *B. cinerea*.

5.2. РЕЗУЛТАТИ ОГЛЕДА ИСПИТИВАЊА БИОДЕРГАДАЦИОНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА МИКРООРГАНИЗАМА

Резултати испитивања биодеградиационог потенцијала биоагенса приказани су појединачно на Графиконима од 4 до 6. Негативне контроле чине варијанте без додатих пестицида и без засејаних микроорганизама.

Сви примењени биоагенси су развили колоније (Слике 33, 34 и 35) и показали одређени ниво способности разградње фунгицида азоксистробина. Детаљном анализом резултата може се закључити да је биоагенс *M. caribbica* BBJ метаболисао највећу количину пестицида (11.42%) у предвиђеном временском периоду, док је истовремено и бактеријски сој *B. amyloliquefaciens* ABO2 показао да располаже сличним метаболичким капацитетима имајући у виду да је од укупне количине пестицида разградио преко 10% (Табела 15, Графикон 4), што је потврђеном хроматографском анализом (Слика 32).

Посебно занимљив податак јесте да је детектован одређени биодеградиациони капацитет соја *T. virens* DAR7 филаментозне гљиве (7.08%) (Табела 15) (Графикон

4), који није био инхибиран фунгицидном активношћу азоксистробина, као ни раст мицелије која је колонизовала читаву Петри посуду (Слика 35).



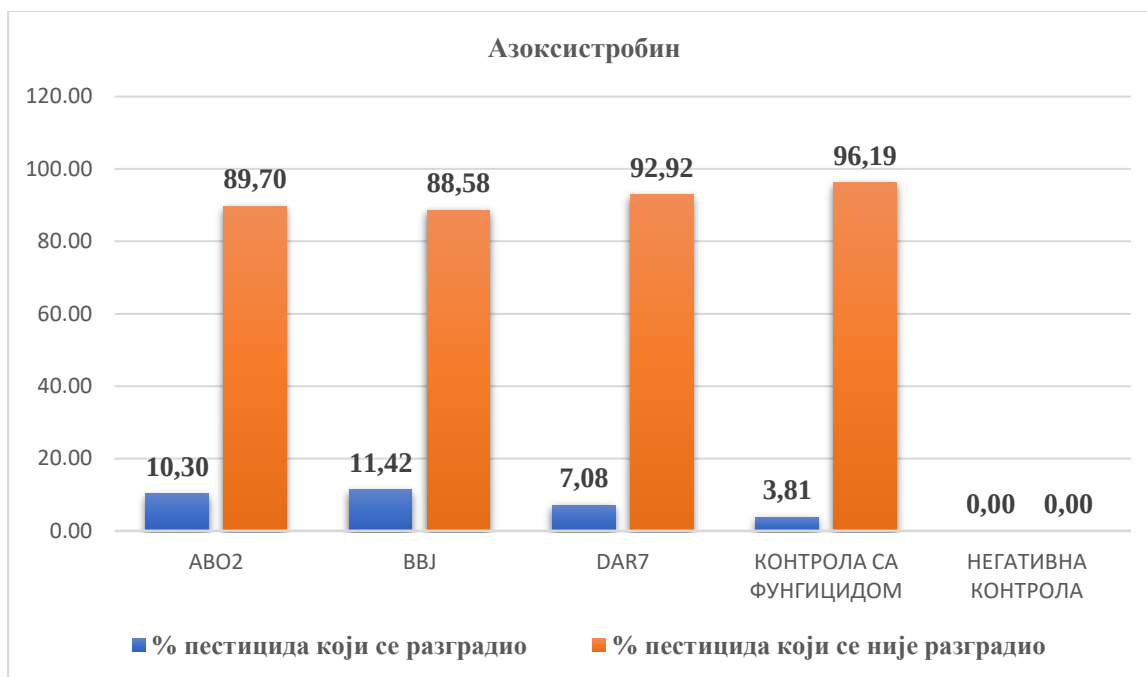
Слика 32. Хроматограм азоксистробин+АВО2 седам дана након постављања огледа

Табела 15. Ефикасност биодеградације азоксистробина под утицајем испитаних сојева микроорганизама

	Контрола 1. дан, површина пика, средња вредност	Површина пика, средња вредност	Коефицијент варијације (%)	Пестицид у подлози након 7 дана, %	Губитак пестицида у подлози након 7 дана, %
Контрола 7. дан	171426	164903,1	2,36	96,19	3,81
АВО2	171426	153769,9	2,19	89,70	10,30
ВВЈ	171426	151843,5	1,97	88,58	11,42
DAR7	171426	159291,9	2,05	92,92	7,08
Негативна контрола	0	0	0,00	0,00	0,00

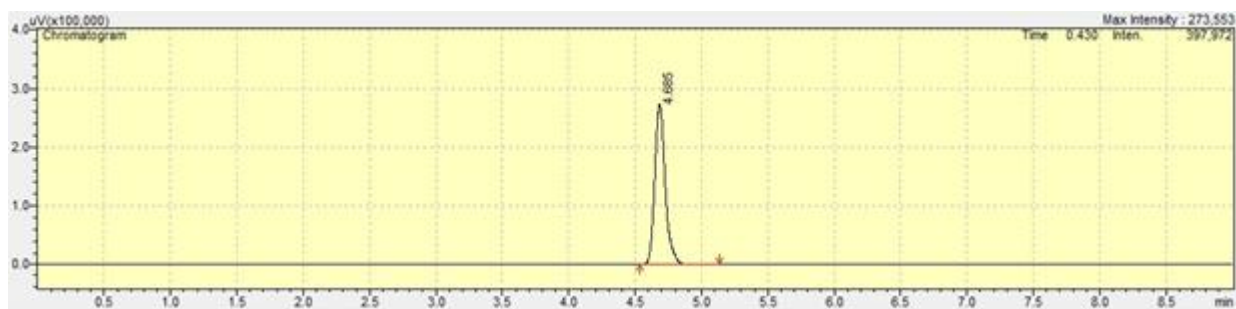


Слика 33, 34 и 35. Колоније биоагенса *B. amyloliquefaciens* АВО2, *M. caribbica* ВВЈ и *T. virens* DAR7 редом, које су се успешно развиле на подлози обogaћеној азоксистробином



Графикон 4. Ефикасност биодеградације фунгицида азоксистробина биоагенсима *B. amyloliquefaciens* ABO2, *M. caribbica* BBJ и *T. virens* DAR7 у поређењу са контролом са и без фунгицида.

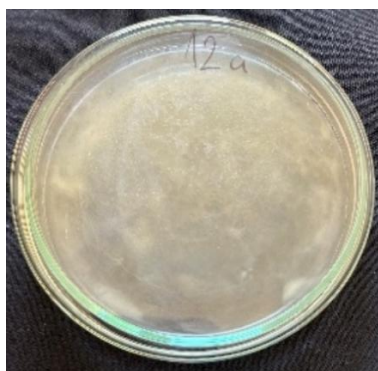
Резултати дела огледа у ком је испитивана подобност инсектицида делтаметрина као супстрата из ког се у процесу метаболизма микроорганизми снабдевају енергијом, показали су да је биодеградациона способност присутна код одабраних биоагенса, као и да раст њихових колонија није супресован овим инсектицидом (Слика 37, 38 и 39). Међутим постоји значајни диверзитет у интензитету и продуктивности међу различитим микроорганизмима. Бактеријски сој *B. amyloliquefaciens* ABO2 испољио је највећу биодеградациону способност, разградњом чак 66% од почетне количине делтаметрина у подлогама на којима се развијао (Слика 36). Слично овој бактерији, и код биоагенса *M. caribbica* BBJ је регистрован задовољавајући степен разградње делтаметрина (55,43%), док је биоагенс *T. virens* DAR7 и у овом случају, класификован као најмање ефикасан дреградациони агенс са 9,11% разграђене количине инсектицида (Табела16, Графикон 5).

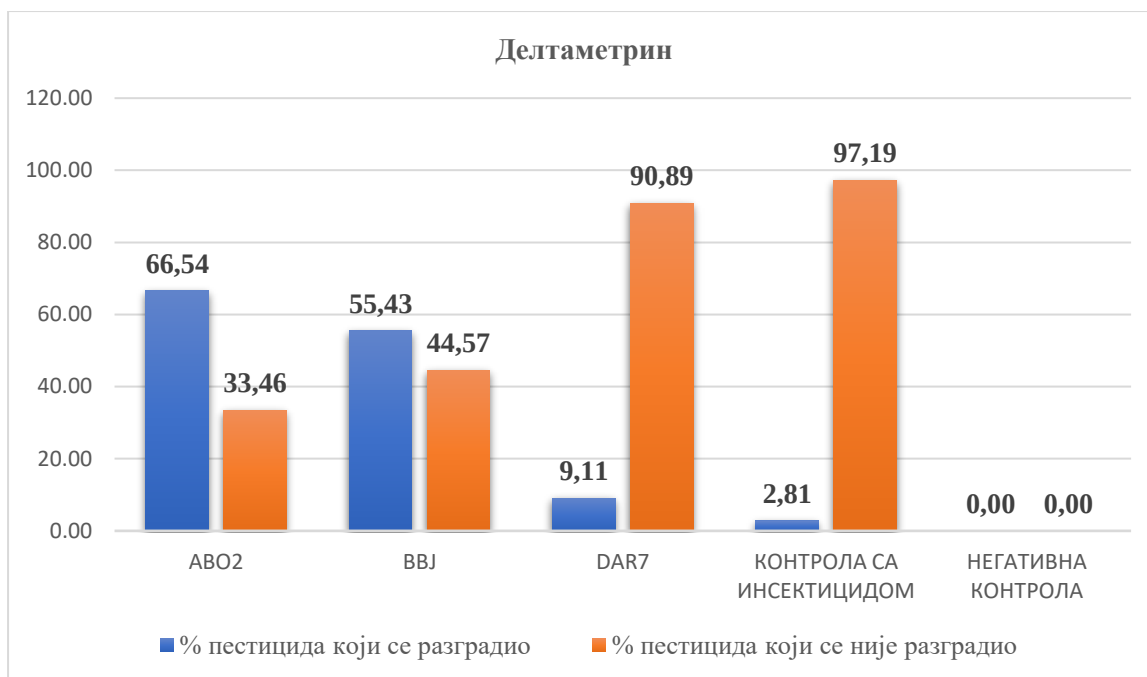


Слика 36. Хроматограм делтаметрин+АВО2 седам дана након постављања огледа

Табела 16. Ефикасност биодеградације делтаметрина под утицајем испитаних сојева микроорганизама

	Контрола 1. дан, површина пика, средња вредност	Површина пика, средња вредност	Коефицијен т варијације (%)	Пестицид у подлози након 7 дана, %	Губитак пестицида у подлози након 7 дана, %
Контрола 7. дан	4501217,8	4374779,7	2,07	97,19	2,81
АВО2	4501217,8	1506001,1	2,23	33,46	66,54
ВВЈ	4501217,8	2006337,2	2,16	44,57	55,43
DAR7	4501217,8	4091217,8	1,99	90,89	9,11
Негативна контрола	0	0	0,00	0,00	0,00

Слика 37, 38 и 39. Колоније биоагенса *B. amyloliquefaciens* АВО2, *M. caribbica* ВВЈ и *T. virens* DAR7 које су се успешно развиле на подлози обogaћеној делтаметрином



Графикон 5. Ефикасност биодеградације инсектицида делтаметрина биоагенсима *B. amyloliquefaciens* ABO2, *M. caribbica* BBJ и *T. virens* DAR7 у поређењу са контролом са и без инсектицида.

Сви примењени биоагенси су показали одређени ниво ефикасности у разградњи хербицида метрибузина и оптималан раст колонија (Слика 41, 42 и 43). Највећи биодеградациони потенцијал је регистрован код бактерије *B. amyloliquefaciens* ABO2 (Слика 40), док је метаболизам хербицида агенса *M. caribbica* BBJ скоро у пола мање интензиван што се може уочити пажљивим тумачењем вредности површине пикова на хроматографу, односно прерачунатих процентуалних вредности која износи 33,68%. Компаративном анализом деградационе активности гљивичног агенса *T. virens* DAR7 у све три варијанте са три различита супстрата, закључује се да је она највиша (најинтензивнија) била у третману са метрибузином (20,62%), и то са значајном разликом у односу на остале две врсте супстрата (азокситробин – 7,08% и делтаметрин – 9,11%) (Табела 17, Графикон 6).

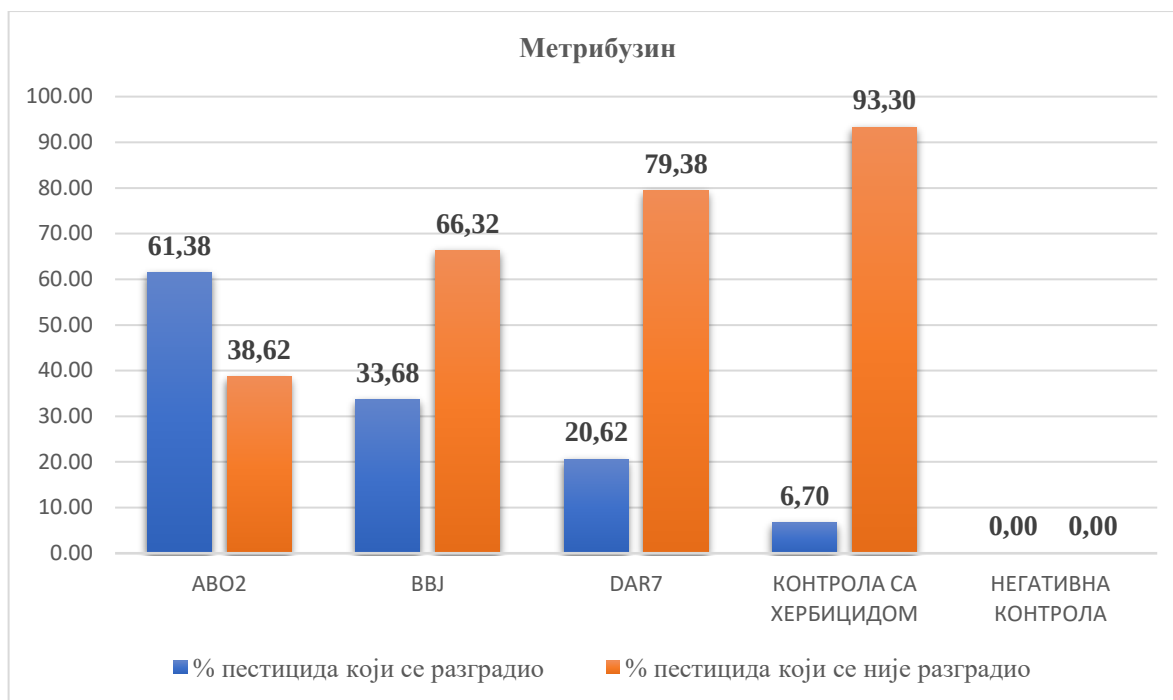


Слика 40. Хроматограм метрибузин+АВО2 седам дана након постављања огледа

Табела 17. Ефикасност биодеградације метрибузина под утицајем испитаних сојева микроорганизама

	Контрола 1. дан, површина пика, средња вредност	Површина пика, средња вредност	Коефицијен т варијације (%)	Пестицид у подлози након 7 дана, %	Губитак пестицида у подлози након 7 дана, %
Контрола 7. дан	745372,3	695416,7	1,19	93,30	6,70
АВО2	745372,3	287851	1,21	38,62	61,38
ВВЈ	745372,3	494356,7	1,32	66,32	33,68
DAR7	745372,3	591661,7	1,16	79,38	20,62
Негативна контрола	0	0	0,00	0,00	0,00

Слика 41, 42 и 43. Колоније биоагенса *B. amyloliquefaciens* АВО2, *M. caribbica* ВВЈ и *T. virens* DAR7 које су се успешно развиле на подлози обогаћеној метрибузином



Графикон 6. Ефикасност биодеградације хербицида метрибузина биоагенсима *B. amyloliquefaciens* ABO2, *M. caribbica* BBJ и *T. virens* DAR7 у поређењу са контролом са и без хербицида.

5.3. ДИСКУСИЈА – ИСПИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА БИОАГЕНСА

Nawrocka et al. (2023) спровели су истраживање везано за антифунгалне ефекте које биоконтролни агенс *T. virens* потенцијално може испољити према проузроковачу сиве трулежи *B. cinerea*. Истраживачи су утврдили да је за инхибицију овог патогена заслужна отпорност код биљака парадајза индукована гљивом *T. virens* и да се она манифестује синтезом антипатогених испарљивих органских једињења. Осим на проузроковача сиве трулежи, испарљива органска једињења која највећим делом чине сесквитерпени, масне киселине и монотерпени, испољавају антифунгални ефекат и на гљиву *Rhizoctonia solani* проузроковача трулежи корена и приземног дела стабла. Детектоване су морфолошке деформације на хифама патогена настале под утицајем наведене смеше једињења чији је састав идентификован гасном хроматографијом (Inayati et al, 2019).

Испитивани су и ефекти других *Trichoderma* врста. У огледу двојне културе са преко 50 различитих сојева *Trichoderma* гљива и проузроковача сиве трулежи биљака *B. cinerea*, идентификовани су сојеви са највећим антифунгалним ефектом. Резултати

молекуларних метода показали су да се ради о сојевима врсте *T. atroviride*, који су синтезом сидерофора, индол-3-сирћетне киселине (ауксин) и хитиназа, супресовали раст колонија фитопатогене гљиве (Bogumil et al, 2013).

На основу бројних радова може се закључити да бактерије рода *Bacillus* располажу импресивним потенцијалом за развој биопрепарата с обзиром на високу ефикасност у сузбијању бројних проузроковача биљних болести. Испитана је ефикасност сојева *B. amyloliquefaciens* на фитопатогену гљиву *B. cinerea* кроз различите огледе са циљем да се идентификују механизми деловања потенцијалних комерцијалних сојева ове бактерије. Огледом двојне културе, бактерија је показала инхибиторни ефекат на пораст колоније патогена, а још већи ефекат супресије пораста патогена постигнут је механизмом антибиозе. Утврђено је да је штетност проузроковача сиве трулежи јагоде значајно редукована извођењем превентивних третмана биљака у односу на куративне третмане (Barakat et al, 2024).

Zhou et al, (2020) указали су на велики проблем који проузроковач сиве трулежи *B. cinerea* прави на воћу и поврћу у складиштима, али су исто тако и понудили решење које је и са еколошког и економског аспекта прихватљиво. У огледу су коришћени плодови винове лозе, који су инокулисани најпре сојем корисне бактерије *B. amyloliquefaciens* а одмах затим и патогеном *B. cinerea*. Идентификовани су ензими полифеол оксидазе, пероксидазе, β -1,3-глюканаза и хитиназе, одговорни за редуковану појаву болести као и величине лезија које формира патоген. Успешна заштита грожђа постигнута је индукцијом отпорности биљке што је резултирало синтезом поменутих антифунгалних ензима.

Широкоспектрална ефикасност појединих сојева *B. amyloliquefaciens* један је од чинилаца одговорних за њихов комерцијални успех. Ji et al, (2013) идентификовали су изолат ове бактерије, карактеристичан по свом неспецифичном деловању према великом броју различитих гљивичних патогена. Утврђено је да овај изолат синтетише итурин, једињење за које је доказано да инхибира клијање спора, издуживање клицине цеви, пораст мицелије као и да узрокује директна оштећења хифа, на 12 испитаних проузроковача биљних болести, међу којима су значајни *B. cinerea*, *Alternaria panax*, *Sclerotinia sclerotiorum*, итд. (Ji et al, 2013).

У истраживањима Xu et al., (2026 / 2027), квасац *Meyerozyma caribbica* је ступио у антагонистичку интеракцију са проузроковачем плаве трулежи *Penicillium digitatum*

који је колонизовао плодове мандарине у складишту. Редуковао је појаву трулежи, величину лезија, клијање спора и издуживање клицине цеви, као и акумулацију реактивних кисеоничних врста у плодовима цитруса повећаном синтезом читавог спектра антиоксидативних ензима и одбрамбених једињења флавоноида, лигнина, фенола (и хинона) и других једињења која уествују у дебљању ћелијског зида, и ензима за разградњу ћелијских зидова патогена (глюканазе, хитиназе). Резултати огледа сугеришу да је механизам индукције отпорости помоћу квасца доминантан механизам за инхибицију овог патогена (Xu et al., 2026 / 2027).

Слична истраживања су спроведена и на плодовима кивија (Qiu et al., 2022) и крушке (Zhang et al., 2026), који су нападнути од стране патогена *Penicillium expansum* после бербе, приликом складиштења. У оба случаја је примењени биоагенс *M. caribbica* индуковањем отпорности код биљака домаћина значајно смањи, појаву лезија, спорулацију и клијање спора, раст мицелије фитопатогене гљиве. Биљка је интензивно вршила синтезу одбрамбених секундарних метаболита као што су феноли (и њиховом полимеризацијом настају лигнини), флавоноиди и бројни ензими који редукују оксидативни стрес (Qiu et al., 2022; Zhang et al., 2026). Осим тога, међу примарним механизмима инхибиције патогена истиче се и конкуренција за хранливе материје и простор (Zhang et al., 2026), док је у лабораторијским огледима на КДА подлогама примећена и синтеза велике количине испарљивих органских једињења, а посебно ефикасним се показало једињење фенилетанол (Qiu et al., 2022)

Dudaš et al., (2026), посебно издвајају сој BBJ биоконтролног агенса *M. caribbica* као изузетно ефикасног у сузбијању проузроковача зелене плесни на плодовима јабуке, али и на плодовима других воћних култура у складиштима. Квасац располаже вишеструким механизмима деловања: индукција отпорности код биљке која синтетише одбрамбене молекуле, механизам антибиозе - синтеза хидролитичких ензима експресијом PR гена (хитиназа) и синтеза испарљивих једињења, посебно фенилетанола, висока конкуритивност за храну и простор. Такође, оглед који су извели ови истраживачи, обухватао је и тестирање способност *M. caribbica* BBJ да метаболише микотоксин патулин ког производи *Penicillium expansum* инокулацијом подлоге у епрувети у којој је претходно растворен микотоксин. Течном хроматографијом, детектован је висок проценат деградације патулина, а затим је идентификован специфичан ген чијом експресијом се синтетишу ензими одговорни за деградационе капацитете овог соја *M. caribbica* (Dudaš и сар., 2026).

5.4. ДИСКУСИЈА – ИСПИТИВАЊЕ БИОДЕГРАДАЦИОНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА БИОАГЕНСА

Потврђена је способност деградације пестицида појединих сојева *Meyerozyma caribbica*. Експериментално је испитана ефикасност соја овог квасца, изолованог из организма пчела, да разграђује хербицид 2,4-D, а поред тога је детектована и синтеза ауксина, те стога је утврђен и потенцијал овог микроорганизма за његобу примену као стимулатора раста биљака. Резултати су показали да постоји варијабилна инхибиција раста сојева одабраних сојева *M. caribbica* под утицајем препоручене дозе 2,4-D, и то између 75% и 90% у зависности од соја. Међутим, истовремено је забележен проценат деградације између 30 и 46% од почетне количине хербицида, и та варијабилност проистиче из физиолошко-биохемијских разлика међу сојевима. Хипотеза која происточе из ове литературе и приказаних резултата, предлаже да способност раста колоније и биодеградациони потенцијал сојева овог квасца нису у корелацији, те да поједини сојеви, иако им је инхибиран пораст у одређеној мери, да су њихова метаболичка активност и ензимски и енергетски капацитети вероватно усмерена на разградњу пестицидне материје и детоксикацију (Oliveira et al., 2025).

Аутори су прикупили податке из бројних извора о биодеградационом потенцијалу различитих гљива и бактерија. Навели су да је велики број врста које припадају роду *Trichoderma* веома ефикасно разградило органохлоне инсектициде, органофосфате, пиретроиде: хлорфенвинфос, хлорпирифос, DDT, диелдрин, пентахлоронитробензен, пентахлорфенол ендосулфан, малатион, β -цифлутрин, β -циперметрин, алетрин. Овакви резултати постигнути су високом метаболичком активношћу, посредовану хидролитичким ензимима, фосфатазама, оксидазама, хидролазама. Осим инсектицида, задовољавајући резултати постигнути су и при метаболисању хербицида глифосата, сулфониуреа, триазина и хлорацетанилиди, користећи их као извор угљеника, фосфора, азота и енергије (Mohapatra et al., 2021).

Једињење 3,4-дихлоранилин (3,4-DCA), значајно токсичнији и перзистентнији метаболит је хербицида линурона, диурона и пропанила. Тестирана је толерантност, као и детоксикациона способност *Trichoderma virens* и *Trichoderma reesei* и идентификовани NAT гени који експресују специфичне ензиме одговорне за метаболизам овог пестицидног метаболита. Концентрација 3,4-DCA раствореног у

КДА подлози, редукована је за 79-85% за само четири дана, док је биоремедијациона ефикасност испитивана у узорцима контаминираног земљишта манифестована разградњом 62-67% пестицидне материје за три дана (Cocaign et al., 2013).

Sharma et al., (2016) испитали су ефикасност *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* и *Trichoderma atroviride* у метаболисању различитих концентрација карбендазима раствореног у КДА подлози и у контаминираном земљишту. Подлога са карбендазимум инокулисана је фрагментима мицелије све три врсте гљиве, ради редовне контроле мерењем раста колоније и интензитета спорулације. Суспензија земљишта и минералне подлоге која садржи карбендазим исто тако је инокулисана мицелијом гљиве, ради праћења деградационе активности. Оцена огледа вршена је методом екстракције помоћу органских растварача а затим применом течне хроматографије утврђена количина преосталог пестицида. Све примењене врсте *T. harzianum*, *T. viride* и *T. atroviride* су оксидацијом и хидролизом деградирале карбендазим и то 86%, 47% и 21% редом, од почетне количине.

Bisht et al. (2019) су испитивали потенцијал 20 врста гљива (представнике родова *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Penicillium* и др.) у толеранцији и биодеградацији ендосулфана и хлоропирифоса. Толеранција гљива тестирана је на подлози са екстрактом земљишта док је ефикасност биодеградације праћена у течној подлози. Квантификација преостале, неразграђене количине пестицида вршена је методом гасне хроматографије. Резултати су показали да је хлоропирифос имао знатно већи инхибиторни ефекат на раст гљива у поређењу са ендосулфаном. Од укупно 20 тестираних врста, њих 10 је показало високу толеранцију и изабрано је за деградационе огледе. Након 15 дана инкубације, утврђено је да су врсте рода *Trichoderma* оствариле умерену до високу деградацију ендосулфана (34–84%) и хлоропирифоса (38–60%), а најуспешније резултате показале су *Trametes hirsuta* са потпуном разградњом ендосулфана и *Cladosporium cladosporioides* са 83,7% деградације хлоропирифоса.

Научници су у свом раду описали активност соја *Bacillus amyloliquefaciens* као промотора раста и развоја биљака, а исто тако и биоремедијациону функцију као разлагача органофосфорних пестицида, што је потврђено секвенционирањем генома и идентификацијом гена који регулишу ову способност бактерије (Meng et al., 2019).

Други аутори су испитивали сој *B. amyloliquefaciens* YP6 за који се показало да органофосфорне инсектициде (у огледу је испитан фоксим) као изворе фосфора, кроз ензимске реакције хидролизе (ензим фосфатаза), оксидације (ензими монооксигеназе и алдехид дехидрогеназа) и редукције (NADPH-цитохром P450 редуктаза). Методе коришћене у огледу су течна хроматографија са масеном спектрометријом за детекцију и анализу количине неразграђеног пестицида у подлогама које су садржале фоксим и које су биле инокулисане бактеријом, и секвенционирање РНК молекула ради индентификације гена који регулишу синтезу хидролитичких ензима, ензима оксидаза и који регулишу синтезу бактеријских флагела и усмерену мобилност (Meng et al., 2019).

6. ЗАКЉУЧАК

На основу спроведених истраживања могу се извести следећи закључци:

- Сви примењени сојеви биоагенса су показали антагонистичко дејство према одабраним сојевима фитопатогене гљиве *B. cinerea* изолованим из плодова јабуке, јагоде и винове лозе.
- Уочено је да је највећи појединачан инхибиторни ефекат на раст колоније патогеног соја *B. cinerea* R9 имао биоагенс *B. amyloliquefaciens* ABO2, који је на истом нивоу значајности са биоагенсом *T. virens* DAR7. Синергистичким дејством два биоагенса (*B. amyloliquefaciens* ABO2 + *T. virens* DAR7) као и синергистичким дејством сва ти биоагенса, остварен је највећи проценат инхибиције раста патогена (80%), који се није статистички значајно разликовао од комбинованог ефекта *B. amyloliquefaciens* ABO2 + *M. caribbica* BBJ, и појединачног ефекта *B. amyloliquefaciens* ABO2.
- Најслабију супресију раста патогена показао је биоагенс *M. caribbica* BBJ, као и комбиновани третман биоагенса *M. caribbica* BBJ + *T. virens* DAR7, са једнаким процентом инхибиције 68,75%.
- При тестирању антагонизма биоагенса према соју *B. cinerea* МјоКиЗ фитопатогене гљиве *B. cinerea* најуспешнију инхибицију раста колоније ове гљиве испољио је биоагенс *B. amyloliquefaciens* ABO2, што је уједно и највећи постигнут проценат инхибиције (81,73%) на нивоу читавог огледа.
- Међутим забележено је да су веома добри резултати, на истом нивоу значајности са ефектима *B. amyloliquefaciens* ABO2, постигнути и у варијантама третмана са агенсима *T. virens* DAR7 и *B. amyloliquefaciens* ABO2 + *M. caribbica* BBJ који су инхибирали раст патогена за 79,8% и у третманима са *B. amyloliquefaciens* ABO2 + *T. virens* DAR7 чији је комбиновани проценат инхибиције износио 78,84%.

- Најмању инхибиторну активност према соју *B. cinerea* МјоKi3 показао је сој *M. caribbica* BBJ у огледу двојне културе.
- У огледу са сојем патогена *B. cinerea* A121/2, примећено је да је биоагенс *B. amyloliquefaciens* ABO2 показао статистички значајно слабији инхибиторни ефекат (76,25%) у односу на претходна два соја патогена.
- Највећи проценат инхибиције (80,63%) резултат је третмана са биоагенсом *T. virens* DAR7, при чему су инхибицију на истом том нивоу значајности остварили и агенси у варијантама вишеструких култура: *B. amyloliquefaciens* ABO2 + *M. caribbica* BBJ (78,40%), *B. amyloliquefaciens* ABO2 + *T. virens* DAR7 (77,43%) и *B. amyloliquefaciens* ABO2 + *M. caribbica* BBJ + *T. virens* DAR7 (79,51%). Биоагенс *M. caribbica* BBJ и у овом случају испољио најслабији инхибиторни ефекат што је уједно и најмањи проценат инхибиције 64,58% забележен за читав оглед.
- Сви сојеви микроорганизама чији је биодеградациони потенцијал испитан, су успешно развили колоније на пестицидом обогаћеним подлогама и њихов раст није био инхибиран присутним ксенобиотицима, а истовремено је забележена и варијабилна ефикасност разградње у зависности од врсте пестицида и врсте биоагенса.
- Најслабији биодеградациони ефекат код свих биоагенса детектован је при разградњи азоксистробина, где су количине разграђеног пестицида износиле 10,30%, 11,42% и 7,08% код *B. amyloliquefaciens* ABO2, *M. caribbica* BBJ и *T. virens* DAR7.
- Најбољи резултати су постигнути при испитивању ефеката деградације делтаметрина, где се као биоагенс са најјачим деградационим потенцијалом издвојио *B. amyloliquefaciens* ABO2 (око 66% пестицида је метаболисао), док је задовољавајући резултат остварио и *M. caribbica* BBJ.
- Као најмање ефикасан биоагенс у разградњи делтаметрина показао се *T. virens* DAR7 који је разградио само 9% овог инсектицида.
- У огледу са метрибузином, је поново најбољи резултат остварио биоагенс *B. amyloliquefaciens* ABO2 деградирајући 61,38% хербицида, док је за половину мање разградио биоагенс *M. caribbica* BBJ (33,68%).
- Биоагенс *T. virens* DAR7 је од свих тестираних пестицида у највећем проценту метаболисао метрибузин (20,61%), иако је за разлику од *B.*

amyloliquefaciens ABO2 и *M. caribbica* BBJ разградио знатно мању количину овог хербицида.

У циљу оптимизације примене биоагенса *B. amyloliquefaciens* ABO2, *M. caribbica* BBJ и *T. virens* DAR7 у заштити биља и агроекосистема, потребно је спровести даља истраживања њиховог биоремедијационог и антимикуробног потенцијала. Иако су у спроведеним огледима показали задовољавајуће ефекте у оба правца, неопходно је утврдити услове под којима ови биоагенси постижу максималне резултате, као и који су потенцијални ограничавајући фактори за остварење истих.

Истраживања су потврдила широки спекат биолошке активности испитаних биоагенса те додатно указала на велики значај микробиома у свим екосистемима, као и велики потенцијал управљања микроорганизмима и њиховом биоактиношћу.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Albaseer, S., King, A. and McCool, C. (2025). Beyond the field: How pesticide drift endangers biodiversity. *Environmental Pollution*, 368, p. 126437.
2. Alencar, B. R. A., Freitas, R. A. A., Guimarães, V. E. P., Silva, R. K., Elsztein, C., Silva, S. P., Dutra, E. D., Morais Junior, M. A., & Souza, R. B. (2023). *Meyerozyma caribbica* isolated from vinasse-irrigated sugarcane plantation soil: A promising yeast for ethanol and xylitol production in biorefineries. *Journal of Fungi*, 9(8), Article 789.
3. Amorim, S. S., Ruas, F. A. D., Barboza, N. R., Neves, V. G. O., Leão, V. A., & Guerra-Sá, R. (2018). Manganese Mn^{2+} tolerance and biosorption by *Meyerozyma guilliermondii* and *Meyerozyma caribbica* strains. *Journal of Environmental Management*, 206, 1148–1155.
4. Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J. C., & García-Río, L. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 123(4), 247–260.
5. Ayenew, B. and Getu, E. (2025). Pesticide Residues, Glyphosate Adsorption and Degradation Characteristics in Ethiopian Agricultural Soils. *Environmental Health Insights*, 19, Article 11786302241311679.
6. Baćmaga, M., Wyszowska, J., & Kucharski, J. (2024). Responses of microorganisms and soil enzymes to pesticide contamination and mitigation strategies. *Agrochimica*, 68(1), 45–62.
7. Baek, J.-M., Howell, C. R., & Kenerley, C. M. (1999). The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*, 35(1), 41–50.
8. Bagi, F. i Bodnar, K. (2014). Fitomedicina. Novi Sad: Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

9. Barakat, I., Chtaina, N., Caidi, K., & Bentata, F. (2024). Biocontrol of grey mold on strawberry fruit by *Bacillus* spp. and study of the mechanisms involved. *Caraka Tani: Journal of Sustainable Agriculture*, 39(2), 311–320.
10. Barišić, A. (2024). *Procjena rizika izloženosti ljudi pesticidima* (Završni rad). Sveučilište u Zadru, Odjel za zdravstvene studije.
11. Bi, K., Liang, Y., Mengiste, T., & Sharon, A. (2023). Killing softly: A roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends in Plant Science*, 28(2), 211–222.
12. Bisht, J., Harsh, N. S. K., Palni, L. M. S., Agnihotri, V., & Kumar, A. (2019). Biodegradation of chlorinated organic pesticides endosulfan and chlorpyrifos in soil extract broth using fungi. *Remediation Journal*, 29(2), 63–77.
13. Bogumił, A., Sas Paszt, L., Lisek, A., Trzcíński, P., & Harbuzov, A. (2013). Identification of new *Trichoderma* strains with antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. *Folia Horticulturae*, 25(2), 123–132.
14. Chakraborty, N., Mitra, R., Pal, S., Ganguly, R., Acharya, K., Minkina, T., Sarkar, A., & Keswani, C. (2023). Biopesticide consumption in India: Insights into the current trends. *Agriculture*, 13(3), Article 557.
15. Chen, T., Zhang, Z., Chen, Y., Li, B., & Tian, S. (2023). *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 33(11), R461–R463.
16. Chowdhury, S. P., Uhl, J., Grosch, R., Alquéres, S., Karmagam, N., Jarek, M., Richert-Pöggeler, K. R., & Borriss, R. (2015). Transcriptome analysis of lettuce roots bacterized with the PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in the presence of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(9), 1000–1012.
17. Coccain, A., Bui, L.-C., Silar, P., Chan Ho Tong, L., Busi, F., Lamouri, A., Mougin, C., Rodrigues-Lima, F., Dupret, J.-M., & Dairou, J. (2013). Biotransformation of *Trichoderma* spp. and their tolerance to aromatic amines, a major class of pollutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15), 4719–4726.
18. Copaja, S. V., & Gatica-Jeria, P. (2021). Effects of clay content in soil on pesticides sorption process. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 66(1), 5086–5092.
19. Ćirić, M. (1991). *Pedologija*. Sarajevo: Svjetlost.

20. Ćwieląg-Piasecka, I., Medyńska-Juraszek, A., Jerzykiewicz, M., Dębicka, M., Bekier, J., Jamroz, E., & Kawałko, D. (2018). Humic acid and biochar as specific sorbents of pesticides. *Journal of Soils and Sediments*, 18(8), 2692–2702.
21. DataIntel. (2026). *Pesticides market analysis report: By type, by application, by region, and segment forecasts*. DataIntel. <https://dataintel.com/report/pesticides-market>
22. Djonovic, S., Vittone, G., Mendoza-Herrera, A., & Kenerley, C. M. (2007). Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma virens* transformants constitutively coexpressing β -1,3- and β -1,6-glucanase genes. *Molecular Plant Pathology*, 8(4), 469–480.
23. Dudaš, T., Celano, G., Budakov, D., Cotugno, P., Grahovac, M., Incerti, O., Stojšin, V., De Angelis, M., Ippolito, A., & Sanzani, S. M. (2026). Efficacy and mode of action of the biocontrol yeast *Meyerozyma caribbica* BBJ against blue mold and patulin production by *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 412, Article 110543.
24. FAO (2024). *Pesticides Use and Trade 1990–2024: FAOSTAT Analytical Brief*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
25. Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., de Los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F. I., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Fadiji, A. E., Hyder, S., Babalola, O. O., & Santoyo, G. (2023). *Trichoderma* Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases-A Review. *Plants* (Basel, Switzerland), 12(3), 432.
26. Hanson, L. E., & Howell, C. R. (2003). Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 94(2), 171–176.
27. Howell C. R. (2006). Understanding the Mechanisms Employed by *Trichoderma virens* to Effect Biological Control of Cotton Diseases. *Phytopathology*, 96(2), 178–180.
28. Hojka, Z. (2007). *Pedologija i agrohemija*. Beograd: *Megatrend univerzitet*
29. Inayati, A., Sulistyowati, L., Aini, L. Q., & Yusnawan, E. (2019). Antifungal activity of volatile organic compounds from *Trichoderma virens*. *AIP Conference Proceedings*, 2120(1), 080012.
30. Islam, M. M., Venkateswarlu, K., Annamalai, P., Parven, A., & Megharaj, M. (2022). Degradation of four pesticides in five urban landscape soils: human and environmental health risk assessment. *Environmental Geochemistry and Health*, 44(12), 4349–4363.

31. Ji, S. H., Paul, N. C., Deng, J. X., Kim, Y. S., Yun, B.-S., & Yu, S. H. (2013). Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. *Mycobiology*, 41(4), 234–242.
32. Kadaikunnan, S., Rejiniemon, T. S., Khaled, J. M., Alharbi, N. S., & Mothana, R. (2015). In-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1), Article 9.
33. Lazić, S. i Šovljanski, D. (2007). *Osnovi fitofarmacije*. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
34. Luo, L., Zhao, C., Wang, E., Raza, A., & Yin, C. (2022). *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. *Microbiological Research*, 259, Article 127016.
35. Malek, R., Wyckhuys, K., Haddaway, N., Bateman, M., Babendreier, D., Gu, B., Saunyan, I., Yang, Q., Wyrwal, L., Kuhlmann, U., & Savilaakso, S. (2026). Global opportunities and challenges to the uptake of biopesticides: An evidence map. *Juno Reports*, 3(1), Article 0001.
36. Meng, D., Zhai, L., Tian, Q., Guan, Z., Cai, Y., & Liao, X. (2019). Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* YP6, a plant growth rhizobacterium efficiently degrading a wide range of organophosphorus pesticides. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(11), 2668–2672.
37. Meng, D., Zhang, L., Meng, J., Tian, Q., Zhai, L., Hao, Z., Guan, Z., Cai, Y., & Liao, X. (2019). Evaluation of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* YP6 in phoxim degradation via transcriptomic data and product analysis. *Molecules*, 24(21), Article 3997.
38. Mohapatra, D., Rath, S. K., & Mohapatra, P. K. (2021). Soil fungi for bioremediation of pesticide toxicants: A perspective. *Geomicrobiology Journal*, 38(1), 1–25.
39. Muynarsk, E. S. M., Santos, A. A., Rüntzel, C. L., Colonia, B. S. O., Penha, R. O., Marques, B. B. V., Silva, D. G. H., & Alves, S. L., Jr. (2026). From discovery to application: Twenty years of *Meyerozyma caribbica*. *FEMS Yeast Research*, 26, Article foag010.

40. Mukherjee, P. K., Latha, J., Hadar, R., & Horwitz, B. A. (2003). TmkA, a mitogen-activated protein kinase of *Trichoderma virens*, is involved in biocontrol properties and repression of conidiation in the dark. *Eukaryotic Cell*, 2(3), 446–455.
41. Nawrocka, J., Szymczak, K., Skwarek-Fadecka, M., & Małolepsza, U. (2023). Toward the analysis of volatile organic compounds from tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) treated with *Trichoderma virens* or/and *Botrytis cinerea*. *Cells*, 12(9), 1271.
42. Ngalimat, M. S., Yahaya, R. S. R., Baharudin, M. M. A., Yaminudin, S. M., Karim, M., Ahmad, S. A., & Sabri, S. (2021). A Review on the Biotechnological Applications of the Operational Group *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms*, 9(3), 614.
43. Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31–43.
44. Oliveira, C. G. d., Santos, A. A. d., Pritsch, E. J. P., Bressan, S. K., Giehl, A., Fogolari, O., Mossi, A. J., Treichel, H., & Alves, S. L., Jr. (2025). Production of indole-3-acetic acid and degradation of 2,4-D by yeasts isolated from pollinating insects. *Microorganisms*, 13(7), Article 1492.
45. Qiu, J., Zhao, L., Jiang, S., Godana, E. A., Zhang, X., & Zhang, H. (2022). Efficacy of *Meyerozyma caribbica* in the biocontrol of blue mold in kiwifruit and mechanisms involved. *Biological Control*, 173, Article 105000.
46. Pérez-Lucas, G., Vela, N., El Aatik, A., & Navarro, S. (2018). Environmental risk of groundwater pollution by pesticide leaching through the soil profile. In *Pesticides - Anthropogenic activities and the health of our environment*.
47. Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 8(1), 17–29.
48. Raffa, C. M., & Chiampo, F. (2021). Bioremediation of Agricultural Soils Polluted with Pesticides: A Review. *Bioengineering*, 8(7), Article 92.
49. Reva, O. N., Dixelius, C., Meijer, J., & Priest, F. G. (2004). Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(1), 39–48.
50. Sharma, P., Sharma, M., Raja, M., Singh, D. V., & Srivastava, M. (2016). Use of *Trichoderma* spp. in biodegradation of Carbendazim. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 86(7), 891–894.

51. Singh, D. K. (2008). Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1731–1740.
52. Tripathi, P., Singh, P. C., Mishra, A., Chauhan, P. S., Dwivedi, S., Bais, R. T., & Tripathi, R. D. (2013). Trichoderma: A potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 15(4), 541–550.
53. Uqab, B., Mudasir, S., & Nazir, R. (2016). Review on Bioremediation of Pesticides. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 7(3), 343.
54. Vermelho, A. B., Moreira, J. V., Akamine, I. T., Cardoso, V. S., & Mansoldo, F. R. P. (2024). Agricultural pest management: The role of microorganisms in biopesticides and soil bioremediation. *Plants*, 13(19), Article 2762.
55. Villaverde, J., Kah, M., & Brown, C. D. (2008). Adsorption and degradation of four acidic herbicides in soils. *Pest Management Science*, 64(7), 703–710.
56. Vuković, S. i Šunjka, D. (2014). Biopesticidi. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
57. Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561–580.
58. Xu, M., Wang, J., Dhanasekaran, S., Jia, M., Hu, C., Lu, M., Chen, H., & Xu, W. (2027). Biocontrol of postharvest citrus green mold by *Meyerozyma caribbica*: Suppression of *Penicillium digitatum* development, enhanced ROS metabolism, induced resistance, and quality preservation. *Food Microbiology*, 141, Article 105249.
59. Zalila-Kolsi, I., Ben-Mahmoud, A., & Al-Barazi, R. (2023). *Bacillus amyloliquefaciens*: Harnessing Its Potential for Industrial, Medical, and Agricultural Applications - A Comprehensive Review. *Microorganisms*, 11(9), 2215.
60. Zhang, M., He, Y., Liang, L., Dhanasekaran, S., Hu, Y., Zhang, X., Li, J., Zhao, L., & Zhang, H. (2026). Study on the biocontrol efficacy of *Meyerozyma caribbica* against blue mold of pears and the mechanisms involved. *Food Microbiology*, 134, Article 104917.
61. Ziehmman, E., Möhring, N., & Finger, R. (2024). Economics of herbicide-free crop production. *Applied Economic Perspectives and Policy*, 46(3), 1162–1182.

62. Zhou, Q., Fu, M., Xu, M., Chen, X., Qiu, J., Wang, F., Yan, R., Wang, J., Zhao, S., Xin, X., & Chen, L. (2020). Application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* NCPSJ7 against *Botrytis cinerea* in postharvest Red Globe grapes. *Food Science & Nutrition*, 8(2), 1143–1154.