

ПРОИЗВОДСТВО НА БИОТОРОВЕ

Съдържание

ВЪВЕДЕНИЕ	1
ПРОИЗВОДСТВО НА ИНОКУЛАНТИ	4
НОСИТЕЛИ	9
Сухи инокуланти (прахове)	10
Гранули	15
Течни инокуланти	15
Полимерно-базирани носители (клетъчна имобилизация)	16
Други носители	18
Обещаващите нови технологии за развитие на носителите	19
СВЪРЗВАЩИ ВЕЩЕСТВА	22
ДОБАВКИ	23
ПАКЕТИРАНЕ.....	24
ЛИТЕРАТУРА.....	24

ВЪВЕДЕНИЕ

Екологичните проблеми, като например замърсяването на сладководни води, енергоспестяването и ерозията на почвата, принуждават фермерите да представят стратегии за развитие, които имат по-малко замърсяващи въздействия. Използването на екосъобразни практики се насърчава от доброволно сертифициране (напр. GlobalGAP или схеми за биологично земеделие), както и от правно обвързващи разпоредби (например Директива 2009/128 на ЕС за прилагане на практики за Устойчиво управление на вредителите). В този контекст, намаленото използване на химически торове съпроводено с широка употреба на органични торове, се счита за задължителен път за намаляване на тежестта върху околната среда, произтичащ от досегашните практики. В последните години, химическите пестициди и торове играят съществена роля за насърчаване на развитието на селските райони, но имат кратка история в съвременното селско стопанство. Незабавното им действие и асоциираните ниски разходи налагат и широката им употреба. От друга страна, токсичните им ефекти върху околната среда, растенията, животните и човешкия бит отклониха фокуса към по-екологично ориентирани решения. Освен това, проблемът с развитието на резистентност в насекомите срещу често използваните пестициди все още не е решен. По този начин практики като Интегрираното Управление на Вредителите (ИУВ; Integrated Pest Management - IPM) придобиват по-голяма значимост.

ПРОИЗВОДСТВО НА БИОТОРОВЕ

Биоторовете са жизнено важен сегмент от ИУВ. Те могат да бъдат от изключителна финансова значимост: частично да заменят някои агрохимикали, които от своя страна стават все по-скъпи и тяхното подобрене в светлината на разширяващите се искания за по-екологосъобразни селскостопански практики не е рентабилно. Терминът "Биотор" обикновено се отнася до продукт, съдържащ почвени микроорганизми, който при приложение върху растенията, стимулира техният растеж. Въпреки това, терминът се използва погрешно като често се използва за синоним на широк спектър от продукти, като например зелен или животински тор, съвместно отглеждане на земеделски култури или биологично обогатени химически торове. Vessey (2003) определи "Биоторовете" като "субстрат, който съдържа живи микроорганизми, които при прилагане върху семена, повърхности на растения или почва, колонизират ризосферата или вътрешността на растението и стимулират растежа му чрез увеличаване наличието на основни хранителни компоненти". Микроорганизмите, които те съдържат, се наричат още Ризобактерии Стимулиращи Растежа на Растенията (PCPP) (Plant Growth Promoting Rhizobacteria or PGPR) и упражняват ползотворен ефект върху растението гостоприемник след инокулация.

Ентузиазмът за употребата на тези продукти се повишава благодарение на подобрената ефективност на усвояване на хранителните добавки и увеличаващата се потребност на обществото за по-зелени технологии и намаляване на разходите свързани с агрохимикали. Освен това биоторовете и фитостимулантите притежават и други полезни въздействия, като ефективни биоинокуланти. И наистина микроорганизми като *Rhizobium* и *Glomus* spp. са доказали своята ефективност при намаляване на болестите при някои видове растения. Практиката на инокулиране на растения с PCPP може да се проследи до 20-ти век, когато продукт съдържащ *Rhizobium* sp. е патентован. За микоризните гъби, въпреки че се използват като биоторове от няколко десетилетия, още в края на 50-те години на миналия век е доказано, че стимулират растежа на растенията чрез усвояването на фосфор. Оттогава изследователските усилия в тази област постоянно се разширяват, което води до селектирането на различни щамове, които демонстрират и множество други полезни характеристики.

Политиките, в подкрепа на устойчивото развитие на селските райони и научните изследвания в тази област, подобриха адекватността и последователността на микробното инокулиране. Те доведоха до включването на няколко щамове, които се използват едновременно за биоконтрол и за биофертизация. Такива са микоризните и PCPP препарати, които се предлагат на пазара в няколко страни. Въпреки увеличеното използване на микробните инокуланти, особено тези, които действат като фитостимулатори и биоторове, тяхното потребление е често възпрепятствано поради флукуациите и несъответствието на резултатите между лабораторните, оранжерийни и полеви изследвания. Обяснението зад тези противоречия се крие в непълното разбиране на сложните взаимоотношения, установени между отделните компоненти на системата: растение, микроорганизми и условия на околната среда (и по-специално тези на почвата). Освен това, липсата на правилни формулировки и скъпите и бюрократични процедури

ПРОИЗВОДСТВО НА БИОТОРОВЕ

за регистрацията, също са сред факторите, които затрудняват използването на РСРР в по-широк мащаб.

Реалната комерсиализация на РСРР започва през 1995 г. в САЩ и Великобритания с инокулирането на бобови растения с *Rhizobium*. Въпреки това, ентузиазмът за други РСРР нараства с течение на времето и широка гама от нови продукти навлизат на пазара. Повечето РСРР, които не съдържат *Rhizobium* използват бактерии от рода *Azospirillum* (свободно живеещи азотфиксиращи бактерии) или *Bacillus* (фосфат разтварящи микроорганизми (ФРМ) и агенти за биоконтрол. Също така, на много места по света се използват продукти, съдържащи арбускуларни микоризни гъби (АМГ). От друга страна, разнообразието на налични популации на РСРР и АМГ в почвата, широкият им обхват, както и недобре изяснените им механизми на действие води до ограничената им употреба. Също така, практиката показва, че положителните ефекти могат да бъдат специфични при отделните растения и щамове, както и да варират драстично при различни природни условия. В допълнение, след като бъдат внесени в почвата, микроорганизмите са изправени пред конкурентни и често тежки условия, които могат сериозно да намалят благоприятните им ефекти.

Четири основни типа формулировки на биоторове, които са използвани досега, са течни, торфени, гранули и лиофилизирани прахове (Фиг.1). Техният успех зависи от целевата култура, цената, пазарната наличност, екологичните ограничения и сложността им на приложение. Една от основните трудности за индустрията е разработването на подобрена формула, която да съчетава всички гореописани характеристики и която да е подходяща за използване при полеви условия. Освен това, макар че някои микроорганизми могат да изглеждат обещаващи в лабораторни условия, да бъдат произведени за комерсиални цели е трудна задача предвид широкият спектър полеви условия. Някои производители включват поне два вида микроорганизми (напр. *Rhizobium* и АМГ, *Rhizobium* и ФРМ, различни щамове на АМГ или ФРМ) в един продукт. По този начин се увеличават последващите ползи за растенията гостоприемници. Въпреки това, само няколко доклада отразяват положителните им ефекти като коинокуланти. Тяхната ефикасност не е доказана и тяхното производство и комерсиализация създават редица технически трудности. Най-важният аспект при разработването на инокулант е осигуряването на качеството по начин, по който може да се гарантира надеждността на продуктите с максимални шансове за успех. Липсата на последователност в резултатите, получени при полеви условия, поради променливо качество, оказва огромно влияние върху комерсиализацията на биоторовете.

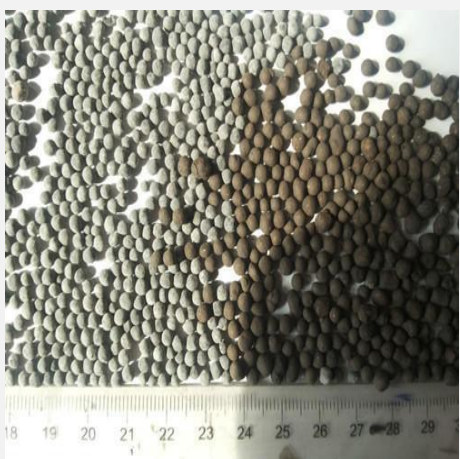
ПРОИЗВОДСТВО НА БИТОРОВЕ



А



Б



В



Г

Фиг. 1. Видове формулировки на биоторове: А - течен; Б - торф, В - гранули и Г - капсулирани лиофилизирани прахове.

ПРОИЗВОДСТВО НА ИНОКУЛАНТИ

Разработването на ефективен инокулант представлява многоетапна процедура, включваща прикрепването на един или повече щамове микроорганизми в определен носител, заедно с свързващи агенти и/или други добавки, които осигуряват защитата на клетките по време на съхранение и транспортиране. Тъй като инокуланти често се съхраняват при не-оптимални условия (например, висока температура, излагане на светлина), те трябва да имат удължен срок на съхранение, т.е. микроорганизмите трябва да бъдат жизнеспособни и да притежават способност да оцелява при неблагоприятни

ПРОИЗВОДСТВО НА БИОТОРОВЕ

условия. Добрата формулировка също трябва да осигури ефективно интегриране на микроорганизмите в почвата и да засили тяхната активност, за да се извлекат максимални ползи след инокулирането на растенията гостоприемници. За да бъде лесно приет от фермерите, инокулантът трябва да бъде икономичен и лесен за работа и използване, за да гарантира, че микроорганизмите се доставят по най-адекватния начин и форма. Изготвянето на формулировката е решаващ въпрос, но за съжаление са проведени ограничени брой изследвания по този въпрос. Наличните данни показват, че от 80-те години на миналия век повечето изследвания върху *Rhizobia* са съсредоточени върху бактериалната геномика и физиология и по-малко от 1% върху формулировъчните аспекти на инокулантите. При всички случаи има реална необходимост от подобряване на инокулантите, за да може да продължи ефективното разработване и комерсиализация на нови биоторове, които да бъдат по-успешни, по-стабилни във времето, с по-добро качество и да отговарят на всички други селскостопански нужди.

Идеална формулировка не съществува и очевидно всеки тип биотор има свои собствени предимства и ограничения. Съществуват обаче някои критични стъпки, които трябва да бъдат взети под особено внимание по време на производството на биоторове. Изборът, направен при тези стъпки, може да предреша успеха или неуспеха на инокулацията. Подборът на микроорганизмите, които трябва да бъдат инокулирани, е от решаващо значение. Някои от най-важните желани характеристики на инокулиращия щам (бактериален или гъбен) включват неговата генетична стабилност, способност му да бъде полезен за целевите култури, да бъде конкурентен на природните микробни популации, да мигрира от мястото на инокулация до растението гостоприемник и да е способен да оцелява при неблагоприятни условия в почвата без присъствието на гостоприемника. Други важни характеристики, които са от особено важно значение по време на производството, са способността на щамата да се култивира в лабораторни условия (изключение правят АМГ, които не могат да се развиват без растение гостоприемник), възможността да расте или оцелява в носители (по време на концентриране или съхранение), върху семена и в почва, както и да бъде съвместими с агрохимичните продукти, които биха се използвали върху посевите. Живият инокулант също трябва да може да преодолее различните технологични процеси по време на производството и да запази своите функционални свойства. Бактериалните инокуланти обикновено се култивират в течна среда, за да се достигнат високи добиви от биомаса. Съставът на средата и условията на растеж (температура, рН, разбъркване, аериране и т.н.) са пряко свързани с физиологично-биохимичните свойства на конкретния щам и вида на инокуланта, който ще се произвежда. Получените бактериални култури се използват за инокулиране на разнообразни носители (капсулиране или импрегниране на торф и гранули) или след прибавянето на подходящи добавки да се получат активни течни формулировки. Мащабното производство на еднородни бактериални култури в биореактори, е много широко разпространена практика (Фиг.2).

ПРОИЗВОДСТВО НА БИТОРОВЕ



Фиг.2. Масово производството на *Azolla*

Веднъж след като е избран специфичният щам/ове за инокулума, може да бъде дефинирана стандартизирана производствена процедура. Въпреки това, за биоторовете, за разлика от от биопестицидите, производствените разходи са сериозна бариера. Това се дължи на факта, че цената на биоторовете не трябва да надвишава тази на конвенционалните. Следователно, като растежна среда за РСРР, трябва да се използват евтини суровини (напр. суроватка, водни утайки, компост и др.). Друг подход за намаляване на производствените разходи е използването на агро-индустриални остатъци, обогатени със скален фосфат. По време на компостирането или ферментацията, свободните или имобилизирани микроорганизми, които произвеждат органични киселини, се добавят към матрицата, подобрявайки разтворимостта на фосфата и по този начин увеличават достъпа му до растенията.

Наскоро използването на биофилми също беше приложено като възможно средство за получаване на ефективни инокулуми. Биофилмът се състои от микробни клетки, вградени в полимерна матрица (известна като извънклетъчна полимерна субстанция ЕПС) и адхезирани към инертна или жива повърхност, която осигурява структура и защита на бактериалната култура. Три основни типа биофилми се наблюдават в почвата: бактериални (включително *Actinomycetes*), гъбни и гъбно-бактериални. Както бактериалните, така и гъбните биофилми се формират на абиотични повърхности. Гъбните колонии влизат в ролята на биотична повърхност при сформирването на гъбно-бактериалните биофилми. Мнозинството от бактерии, намиращи

ПРОИЗВОДСТВО НА БИТОРОВЕ

се на корените и в почвата, образуват биофилми. Следователно, прилагането на РСРР щамове, които образуват биофилми, може да бъде успешна стратегия в разработването и производството на биоторове. Докато ектомикоризните гъби могат да бъдат произведени при ферментация, култивирането на инокуланти от арбускуларни микоризни гъби е много по-трудно поради необходимостта от растителен гостоприемник. Първите опити за производство на АМГ се основават на саксийни растения с почвени смеси или аеропоника. С развитието на моноксенните култури в края на 80-те години, става възможно производството на АМГ при строго контролирани условия. Разработени са методи за получаване на спори чрез използване на съвместно култивиране на петри (split-plate) и чрез трансформирани корени от моркови с Ri плазмидна ДНК на *Agrobacterium*. Методът позволява производството на средно около 15 000 спори в петри за период от 4-5 месеца след началото на производствения цикъл. Въпреки това, той се използва предимно за физиологични и лабораторни изследвания. Подобрения на този метод са постигнати чрез периодична смяна на средата в дисталното отделение на всеки втори месец, с паралелно допълване в проксималното отделение на глюкоза. Получените резултати водят до производството на около 65 000 спори след 7 месеца. Въпреки това, тези методи се използват главно за експериментално производство на спори или за поддържане на генни банки. Причината е, че средната годишна цена за производство на една спора достига до 30-50 USD, в зависимост от използвания метод. Масабно *in vitro* производство на микоризни гъби, подходящо за прилагане в търговски мащаби, е разработено наскоро. Метода се основава на няколко ключови фактора: подбор на подходящи трансформирани корени от моркови с Ri плазмидна ДНК на *Agrobacterium* за различни АМГ видове, подбор и поддържане на оптимална среда за растеж и прилагане на процедури за осигуряване на качеството.

Въпреки това, търговски инокуланти, съдържащи видове АМГ, все още се произвеждат главно чрез отглеждане в растения гостоприемници при контролирани условия, с добавянето на различни гъбни структури (спори, мицел) и съдържащи остатъци от микоризни корени на растения, които се използват като посадъчен материал (като на пример сорго, царевица, лук, или *Plantagolanceolata*) (Фиг. 3). Това може да се счита за класически метод, при който субстрати от пясък / почва и / или други материали (напр. зеолит, перлит) се използват за масово производство на абурскуларен микоризен гъбен инокулум в саксии, торбички или легла за широкомащабни приложения. Критични елементи в тази производствена стратегия са:

- i. използване на известни АМГ видове,
- ii. подбор на гостоприемници с кратък жизнен цикъл, адекватно развита коренна система, високо ниво на колонизация с голям набор от арбускуларни микоризни гъби и толерантност към относително ниски нива на фосфор,
- iii. контрол на нивото на минералните добавки в почвата,
- iv. подходяща комбинация от АМГ видове и растения гостоприемници.

С тази техника е възможно да се постигне плътност на инокулума от 80-100 хил. способни да прорастнат спори на литър. Това предполага необходимостта от разреждане на инокулума с носител за получаването на търговски продукт.



Фиг.3. *Plantago lanceolata* коренови нодули

Имайки предвид, че микробните асоциации между бактерии и микоризни гъби, които се срещат естествено в почвата, могат да стимулират симбиозата с растителните видове, вероятно формулировки, включващи два или повече вида различни РСРР, биха засилили благоприятния ефект върху растенията. Микробните консорциуми могат да стимулират растежа на растенията чрез набор от механизми, които подобряват усвояването на хранителни вещества и потискат гъбни патогени. Различните механизми, предложени да обяснят такова стимулиране на растежа, се основават на повишената скорост на циркулация на хранителните вещества. Последното се дължи на по-голямото съдържание на микроорганизми и богато биологичното разнообразие в почвата. Едновременното инокулиране с различни РСРР и / или АМГ често води до повишен растеж и добив, в сравнение с инокулиране с един вид, най-вече чрез подобряване на усвояването на хранителните вещества. Действително, взаимодействията между бактерии и арбускуларни микоризни гъби има позитивен ефект при усвояване на хранителните вещества, особено когато РСРР и N_2 –фиксиращи бактерии са в комбинация. Инокулиране на царевица и райграс с *A. brasilense* и АМГ води до съдържание на N и P сравними с растения, отглеждани с тор. Съвместното инокулиране с различни видове АМГ обикновено е по-ефективно, поради липсата на специфичност за колонизация по отношение на видовете/сортите растения. Синергичното взаимодействие между арбускуларните микоризни гъби и няколко вида РСРР, включително *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, и *Pseudomonas*, също е доказано като благоприятно за растежа на растенията. Подобрена колонизация на корена чрез АМГ се наблюдава, когато микоризните гъби са ко-инокулирани с такъв РСРР. Четири пъти по-голям брой коренови нодули са открити, когато растенията се инокулират със смес, съдържаща *Glomus deserticola* и *Rhizobium trifoli*, в сравнение с единична *R. trifoli*

ПРОИЗВОДСТВО НА БИОТОРОВЕ

инокулация. Засилена микориза и образуване на възли се наблюдава и при инокулиране с ко-капсулиран *R. trifoli* и *Yarrowia lipolytica*. Инокулирането с образуващи нодули *Rhizobia* и АМГ води до повишаване, както на ефективността на поглъщане на фосфор, така и на азот. Прилагането на РСРР като търговски биотор, съдържащ консорциуми от различни видове микроорганизми, често води до намаляване на степента на инфекции, по-добро усвояване на минерали и повишен растеж на растенията. Всички тези примери са показателни за удобството и по-високата приложимост на биоторовете, съставени от два или повече вида микроорганизми, имащи различни механизми за стимулиране на растежа. Възможността за изпитване на няколко щама РСРР и АМГ при различни видове култури и при различни полски условия следва да позволи селектирането на консорциуми, подходящи за търговски цели.

НОСИТЕЛИ

Носителят е субстрата, който служи за доставка на живи микроорганизми от производствения цех до полето. Той е основния елемент (по обем или тегло) на инокуланта и има решаващо значение за поддържането на коректен брой жизнеспособни клетки в добро физиологично състояние. Носителят осигурява временна защита на микробните инокуланти в почвата: физически, чрез създаването на защитна повърхност, състояща се от микропори (микрохабитати) и хранително, чрез осигуряване на определен субстрат. Идеалния носител трябва да притежава следните характеристики:

- ✓ Осигурява подходяща микросреда на целевия микроорганизъм (и).
- ✓ Осигурява необходимите физични и химични свойства: влагоемкост (висок капацитет за задържане на вода), рН буферен капацитет, и лесно регулиране на рН.
- ✓ Стабилност по време на процеса: носителя трябва да бъде химически и физически инертен. Необходимо е да е стерилен или да позволява лесна стерилизация (автоклавиране или други методи), да няма неравности, да позволява лесно смилане и смесване с други вещества (хранителни вещества, помощни средства) със стандартно индустриално оборудване. Също така трябва да се може да се прилага при широк спектър от бактериални или гъбни видове и щамове.
- ✓ Лесно съхранение и инокулация: добрият носител трябва да гарантира адекватен времеви диапазон на използваемост (най-малко 2 - 3 месеца при стайна температура), да се прикрепва здраво към и да може да се съхрани върху семената; да позволява бързо и контролирано освобождаване на микроорганизмите в почвата.
- ✓ Икономически и екологично устойчиви: това предполага по-ниска цена, достъпност, надеждност и качество. Носителят не бива да съдържа токсични материали, трябва да бъде биоразградим, с минимални рискове към околната среда (разпръскване на клетки в атмосферата или в подпочвени води).

ПРОИЗВОДСТВО НА БИОТОРОВЕ

Изборът на носител определя физическата форма на инокуланта, като е видно че универсален, подходящ за всички видове микроорганизми носител, не съществува (Таблица 1). Носителите могат да бъдат от различен произход (органични, неорганични или синтетични) и могат да бъдат класифицирани в четири основни категории:

- ✓ Почви: торф, въглища, глини, лигнит, неорганична почва
- ✓ Растителни отпадъчни материали: дървени въглища, компост, животинска тор, целулоза, соево брашно, соево и фъстъчено масло, пшенични трици, пресована кал, царевични кочани
- ✓ Инертните материали: вермикулит, перлит, смлян фосфат, бентонит, калциев сулфат, полиакриламидни гелове, алгинатни перли
- ✓ Обикновени лиофилизирани микробни култури и изсушени бактерии: могат да бъдат по-късно включени в твърд носител или използвани в текущото им състояние

Също така е възможно да се произведат носители, направени от комбинация от посочените материали: смес от почва и компост, от почва, торф, кора и люспи, и други. Обикновено се използват четири форми за дисперсия: сух инокулант (прахове), суспензии (прахови инокуланти, суспендирани в течност), гранули и течности. Торфът е най-често използваният носител, особено за бактериални инокуланти. Въпреки това, той не е лесно достъпен в световен мащаб и неговото използване има неблагоприятно въздействие върху околната среда и екосистемата, от която се добива. Това подчертава необходимостта от разработване на нови формулировки, използващи алтернативни материали, които да могат да се конкурират със съществуващите такива.

Сухи инокуланти (прахове)

Сухите инокуланти се доставят с помощта на почвени, органични или инертни носители. В много части на света, инокулантите се формулират с помощта на торф (почвен носител). Торфът се състои от частично разградена флора, натрупана през годините. Той осигурява хранителна и защитна среда за голямо разнообразие от микроорганизми, които могат да се развиват и образуват микроколонии, както на повърхността на частиците, така и в порите. За да бъде подходящ за употреба, торфът не трябва да е токсичен (за микроорганизми, растения, животни и хора), да е силно адсорбиращ, да позволява лесна стерилизация, да има високо съдържание на органични вещества и водоподдържащ капацитет и да бъде пазарно достъпен. Торфът има широко разпространение заради лесната си достъпност. Въпреки това, неговата обработка е скъпа, тъй като изисква няколко етапа, преди да може да се използва като носител за инокулант. Полученият торф трябва да бъде филтриран от по-грубия материал преди да се изсуши бавно и стигне до смес с приблизително 5% влажност. Тази стъпка на дехидратация е от решаващо значение, тъй като тя може да доведе до образуването на токсични съединения. Процесът трябва да се извършва при възможно най-ниски температури, като следва да не надвишава 100°C. Въздушно сушене е предпочитаният метод вместо ползването на пещ. Видът на торфа и желаният размер на частиците

ПРОИЗВОДСТВО НА БИОТОРОВЕ

определят степента на сушене. Трябва да се вземе под внимание, че съдържанието на влага трябва да бъде съобразено с последващото прибавяне на течна култура, така че крайното съдържание в субстрата да отговаря на търсеното ниво. След изсушаване торфът се смилва, обикновено минава през поне 250 мм сито. Обикновено торфените отлагания имат ниско рН, което трябва да бъде коригирано до рН 6.5-7.0. След това торфът се стерилизира и към него се прибавя нужното количество течен инокулант.

В случая на бактериален инокулант, обикновено е приемливо окончателно съдържание на влага от 40-55%. Инокулираният торф се инкубира за определен период от време, за да позволи размножаването на бактериите в носителя. Тази стъпка, наричана също зреене или втвърдяване, е от голямо значение, тъй като подобрява степента на оцеляване на бактериите по време на съхранението и върху семената. Торфът може да се използва за арбускуларни микоризни гъби и за ектомикоризни инокуланти, въпреки че последните не са широко използвани, с изключение в случая на регенериране на горски масиви. Ектомикоризните микроорганизми се култивират в среда, съдържаща глюкоза, като генерираните спори се използват за инокулация. Мицелни чисти култури са предпочитани, тъй като потискат растежа на патогени и други контаминанти. Ектомикоризните инокуланти могат да бъдат получени и като се използва носител, направен от вермикулит и 5-10% торф, овлажнен със соли и хранителна среда, съдържаща глюкоза. Тази формулировка осигурява силен буфериращ капацитет (поддържане на рН под 6) и подобрява производството на фулвинова киселина, която стимулира растежа.

ПРОИЗВОДСТВО НА БИОТОРОВЕ

Таблица 1. Предимства и ограничения при най-често срещаните носители

Носител	Предимства	Ограничения
Торф	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Подходящ за широк спектър от микроорганизми: бактерии, АМГ, ектомикоризни микроорганизми ➤ Защитна хранителна среда ➤ Съдържанието на влага може да се регулира за подобряване на растежа и оцеляването на бактериите по време на съгъстяване, съхранение и инокулация ➤ Силен буфериращ капацитет 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Трудно достъпна ➤ Силно отрицателно въздействие върху околната среда и екосистемите ➤ Скъпа инвестиция за добив ➤ Токсични съединения, отделяни по време на сушене и стерилизация ➤ Висока променливост в състава и качеството в зависимост от произхода ➤ Приложение на семена: контакт с други химични съединения (токсичност)
Течност	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Лесен за работа и приложение ➤ Лесно регулиране на добавките необходими за подобряване на растежа или оцеляването на клетките ➤ Съставът е лесно определим и контролируем ➤ Висока клетъчна концентрация → ниска повтораемост на приложение на препарата 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Липса на защита на носителя: ниска жизнеспособност по време на съхранение и върху семена ➤ Ниски температури за съхранение (4 °C) ➤ Ограничен срок на годност ➤ По-чувствителни към стресови условия
Гранули	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Лесен за съхранение, манипулиране и прилагане ➤ По-концентриран от торф ➤ Количествата за приложение се оценяват лесно ➤ Приложение в почва: няма директен контакт с други химични съединения (липса на токсичност) ➤ Особено ефективен при стресови условия на околната среда 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Обемисти: високи разходи за транспорт и съхранение ➤ По-високи количества при приложение ➤ Често се използват нестерилни носители

ПРОИЗВОДСТВО НА БИТОРОВЕ

Лиофилизирани капсулирани клетки

- Подходящ за всички видове клетки (всички размери)
- Клетките са защитени в хранителна обвивка срещу механични и екологични стресове, както и срещу антагонистични видове
- Бавно и контролирано отделяне на микроорганизмите, когато черупката се разгради
- Голямо разнообразие от полимери: нетоксични, биоразградими
- Висока концентрация на клетки → ограничено пространство за съхранение
- Съхранение при стайна температура (лиофилни капсули)

- Високи производствени разходи
- Серия от комплексни промишлени процеси
- Необходимост от специфично оборудване
- Физиологични, морфологични и метаболитни промени, настъпващи в обвивките
- Множество прилагания са необходими, ако щамове, не могат да се установят в почвата.
- Няма налични търговски продукти

НАНОТОРОВОЕ

Инокулираният торф обикновено се прилага на полето преди процеса на сеитбата директно върху семената. Необходимото количество продукт е относително малко. Въпреки това, контролът на количеството микроорганизми, използвани за едно семе, е труден, тъй като те са в пряк контакт и с останалите химикали, с които са покрити семената. Покритието на семена може да се извършва чрез машини (циментови смесители и механични машини за разбъркване). Тази процедура позволява инокулирането на голям брой семена. Основният недостатък на торфа произтича от променливостта на качеството и състава му, които са зависими от източника. Торфът е неопределен и сложен по състав материал, като според източника му, способността да поддържа растежа и оцеляването на клетките варира. Токсични съединения също могат да бъдат освободени по време на стерилизация, което влияе отрицателно върху растежа и шансовете за оцеляване на желаните микроорганизми. Това може да доведе до предизвикателства, при гарантирането на качество и резултати на място, както и при определяне на оптимални условия за съхранение или изготвяне на инструкции за употреба. Независимо от тези ограничения, торфът остава стандартът, с който се оценява всеки друг материал.

Въглища, глини и неорганични почви (т.е. лапили, вулканична пемза или диатомит) са налични в различни области и могат да се използват като носители. Количеството на инокулирани микроорганизми в тях зависи от мястото им на произход (около 10^2 - 10^3 CFU g^{-1}), но обикновено е по-ниска, отколкото в органични носители. Вермимулит, перлит и бентонит също са налични в повечето страни, но тяхното приложение като цяло е ограничено поради трудностите при подготовката на ефективна формула. В действителност въздействието на тези носители върху жизнеспособността и растежа на бактериите зависи от рН, йонната сила и електролита в разтвора. Разширената глина е тествана като носител за АМГ. Микоризни корени, смесени с почва, също се използват за инокулации с АМГ. Сред другите неорганични съединения, стъклени перли също са предложени за инокулация на АМГ. Смес от органични и неорганични компоненти успешно повишава активността и срока на годност на *Burkholderia* sp. Приложимостта на по-голямата част от споменатите по-горе носители зависят от възможността за абсорбцията на микроорганизмите от веществото/матрицата на носителя. Тази стратегия за инкорпориране има някои недостатъци, особено по отношение на оцеляването на микроорганизмите и тяхната защита по време на транспортиране, съхранение и обработка. Независимо от това, няколко процедури с различни носители, използващи подобен подход, са патентовани:

- (i) Белгийски патент No. 521,850 за използване на диатомит и колоиден силициев диоксид за *Rhizobium*,
- (ii) Британски патент No. 1.777.077 за използването на бентонит за *Rhizobium*,
- (iii) Френски патент No. 1.180.000 използване на сок, към които са добавени вещества с адсорбиращо действие, като целулоза, костно брашно, каолин, или силикагел, при производството на препарати, богати на бактерии от групата *Azotobacter*,
- (iv) Патент на САЩ No. 4956295 за стабилизиране на изсушени бактерии, разпръснати в прахообразни носители, като изсушените жизнеспособни бактерии се смесват с прахообразен носител, съставен основно от неорганична сол с ниска влажност,

НАНОТОРОВОЕ

заедно с малък дял от силикагел. Неорганичните соли могат да бъдат натриеви или калциеви карбонати, бикарбонати, сулфати или фосфати.

Гранули

За да се преодолеят недостатъците на торфа, интересът към други типове формулировки нараства, особено към гранулираните инокуланти. Гранулите са изработени от торфов пелет или малки топчета, калцити или силициеви зърна, които са залети със залепващ материал и след това смесени с прахообразен инокулум. По този начин гранулите се покриват или импрегнират с нужния микроорганизъм (и). Размерът на гранулите варира, но връзката между началната плътност на микробната популация и качеството на крайния продукт е пряка: колкото по-добра е началната микробна популация, толкова по-добър е продуктът. Гранулите имат много предимства пред торфа. Те са с по-ниска запрашеност, по-лесни са за употреба и съхранение. Мястото и процесът на приложение могат лесно да се контролират и трудностите при инкорпорирани на семената се преодоляват: инокулантът се разпръсква в браздата в близост до семето, за да се улеснят взаимодействията със страничните корени, но не е в пряк контакт с химикалите или потенциално токсични пестицидите. Използването на гранули се лимитира от факта, че те са по-обемисти, а разходите за транспорт и съхранение са по-високи.

По-честото използване на гранулирани инокуланти на *Rhizobia*, вместо торф или течни инокуланти, е оценено в няколко научни изследвания, с вариращи резултати. Няколко обзорни доклада демонстрират, че гранулираното прилагане на *Rhizobia* не увеличава образуването на нодули или фиксиране на N_2 в сравнение с другите форми (торф и семенно покриване). Други изследвания за инокулиране на бобови растения показват, че гранулираните формулировки са по-добри от продуктите базирани на торфени и течен инокуланти по отношение на броя и теглото на образуваните нодули, натрупване на N, фиксиране на N_2 (% Ndfa) и общото производство на биомаса. Ползите от използването на гранулирани инокуланти са особено явни при почви с изявени условия на външен стрес, като висока киселинност, влага, или ниски температури.

Течни инокуланти

Течните инокуланти са базирани на водни среда, минерални или органични масла, водно-маслени или полимерни суспензии. Тези продукти се използват лесно както върху семена така и при директно нанасяне в почвата, което води до тяхното широко разпространение в последното десетилетие. Поради високите клетъчни концентрации, те са често използвани при инокулация на бобови растения (в САЩ и Канада, например). Тази им характеристика позволява прилагането на по-ниско количество инокулант без да се променя общата ефективност. Въпреки това, редица ограничения намаляват тяхното използване: инокуланти на базата на течни култури нямат защитата от носител и бързо губят жизнеспособност върху семето. Те изискват по-специални условия за съхранение (ниски температури) и като цяло имат ограничен срок на годност. Също така течните

НАНОТОРОВЕ

инокуланти са по-чувствителни към стрес от околната среда и оцеляват трудно в носителя. Прилагането на някои други компоненти (захароза, глицерол, гума арабика, PVP) може да подобри оцеляването на микроорганизми в течни инокуланти.

Полимерно-базирани носители (клетъчна имобилизация)

Напредъкът във формулировките води до нови методи за имобилизиране на микроорганизми, които изглеждат особено обещаващи. Процесът на имобилизация обхваща различни форми на свързване на клетката с матрица. Тук се включват флокулация, адсорбция върху повърхности, ковалентно свързване с носители, омреждане на клетки, и капсулиране в полимерен гел. Капсулирането се е доказал като най-обещаващата техника за развитие на бактериални носители. Веднъж капсулирани, живите клетки са защитени в хранителна обвивка (или капсула) срещу механичен и екологичен стрес (например рН, температура, органичен разтворител, или токсин), както и антагонистични видове. Когато се инкорпорират в почвата, почвените микроорганизми бавно разграждат капсулите и постепенно се освобождават в големи количества. Обикновено това се случва по време на поникването на семената или разсада. Различни видове клетки могат да бъдат капсулирани, включително бактерии, гъбни спори, или малки хифални сегменти. По този начин процедурата за капсулиране представлява обещаваща технология за развитие на единични и многокомпонентни продукти, като ФРБ-АМГ или *Rhizobia*-АМГ базирани такива.

Различни видове полимери могат да се използват за капсулиране: естествени (полизахариди, протеинов материал) или синтетични (полиакриламид, полиуретан) и хомо-, хетеро- или ко-полимери. Има повече от 1350 възможни комбинации от полимери, които могат да бъдат приложени за енкапсулация. Изборът обикновено се прави въз основа на техния химически състав, молекулно тегло (твърде ниски или твърде високи молекулни тегла се разглежда като недостатък), и тяхната способност да взаимодействат с други компоненти. Полиакриламид и алгинат са най-често използваните полимери за клетъчна енкапсулация. Алгинатът е по-често предпочитания полимер, тъй като полиакриламидът изисква по-специфични условия за обработка поради неговата токсичност. Алгинатът е естествен, биоразградими и нетоксични субстрат, който образува 3D порест гел, когато се смесва с поливалентни катиони (Ca^{2+}). За да се образуват гранули, бактериалните клетки се диспергират в полимерна матрица, която се отлива в катионен разтвор. Хранителни вещества и други добавки могат да бъдат включени за удължаване срокът на годност и ефикасност на инокуланта. Гранулите минават процес на сушене за последващо улеснено пакетиране и употреба. Различни технологии се прилагат (включително сушене чрез пулверизиране, екструдирание, емулсионна техника, коацервация, екстракция с разтворител / изпаряване, термично желиране, разтваряне на пре-гел), за да се контролира размера, формата и текстурата на перлите. Малки зърна от 10-100 μm (микрокапсулиране) са предпочитани, тъй като те предлагат пряк контакт със семена, докато макрокапсулиране (по-голям размер перли, простиращ се от няколко милиметра до cm) предполага освободените клетки да се движат през почвата към растенията.

НАНОТОРОВЕ

Включването на бактерии в алгинатни перли се използва за различни видове, независимо дали формират или не спори. Много видове АМГ също могат да бъдат захванати в алгинатни матрици или гранули, получени с различни полимери. Спори на микоризни гъби се инкорпорират в алгинатен филм състоящ се от екран от фибростъкло с ПВЦ покритие. Корени от разсад от праз, инокулирани с този алгинатен филм, съдържащ спори на *G. mosseae*, бяха силно колонизирани след няколко седмици на растеж в парникови условия. Подобни резултати са получени със спори, получени от моноксерни култури, фиксирани в гранули. Включване на филаментозни микроорганизми, такива като *Aspergillus* и *Actinomycetes* също е възможно.

Няколко положителни ефекта върху свободните клетки (конвенционални формули) са докладвани при използването на този подход. Освен защита на клетките предоставена от обвивката, различни изследвания при множество условия показват, че капсулирането има многобройни предимства по време на съхранение и при приложение на място. Този процес не представлява стрес за клетките, асептичните условия минимизират замърсяването и носителите са биоразградими и нетоксични. Тъй като гранулите могат да бъдат силно концентрирани, обемът им е малък и следователно, е необходимо ограничено пространство за съхранение и транспорт. Те имат по-дълъг срок на годност, дори могат да се съхраняват изсушени при стайна температура за относително дълъг период от време, лесни са за употреба и с постоянно качество. Когато са микрокапсулирани клетките се разпределят равномерно на целевото място, дори върху малки семена, се гарантира ефективно приложение. В резултат на това, движението на клетките през почвата и възможността им да мигрират извън определената територия са значително намалени. Демонстрирано е също, че капсулиране на ФРБ увеличава техния капацитет за разтворимост на Р и потенциал за стимулиране на растежа на растенията в сравнение със свободни клетки. Ограниченията включват висока производствена цена, усложнен процес на манипулиране на индустриално ниво, и изисквания за специфично оборудване. Освен това могат да настъпят физиологични, морфологични и метаболитни промени в капсулираните клетки, което води до необходимост от повторни приложения на гранулите.

Въпреки факта, че капсулирането изглежда да има относителен успех, по-голямата част от изследванията са проведени в лабораторни условия и до сега няма търговски продукт, които да се предлага на пазара. Едно от обясненията за неприемането на технологията от страна на индустрията може да се окаже високите производствени разходи и техническа обработка. Новите технологии трябва да останат достъпни и ефективни по отношение на разходите, за да се прилагат лесно от производителите и от земеделските производители.

Намаляване на производствените разходи и подобряване на качеството на перлите може да се постигне чрез капсулиране и въздушно сушене на бактериална смес, приготвена от алгинат (3%), стандартно нишесте (44.6%), и модифицирано нишесте (2.4%). Този процес позволява перлите след изсушаване да имат водно съдържание от 7%, размер от 4 mm, и механична устойчивост на около 105 N (характеристики подобни на тези на семена от

НАНОТОРОВЕ

зърно). Капсулираните бактерии могат да се съхраняват при стайна температура или при 4°C без да загубят жизнеспособността си - в състояние са да оцелеят до шест месеца с размер на популацията около 10^8 CFU g⁻¹ (съответстващи на около 10^5 CFU перла⁻¹). При този състав, обаче, могат да възникнат някои проблеми, когато се стандартизира и автоматизира производството на перлите поради вискозитета на сместа и необходимостта от непрекъснато разбъркване на изходната среда. На скоро беше предложена нова процедура, използваща отпадъчна вода от нишестената промишленост, като източник на въглерод за производството на *Sinorhizobium meliloti* при едновременно добавяне на алгинат и соево масло като емулгатор. Получените резултати показват клетъчна жизнеспособност по-висока от 10^9 CFU mL⁻¹ след 9 седмици съхранение. Прибавянето на синтетичен зеолит към сместа от алгинат не подобрява оцеляването на инкорпорираниите микробни клетки, нито физическата структура на перлите.

Различни други полимери също са тествани с АМГ. Карагенанът се използва за капсулиране на АМГ, докато хидроксиетилцелулозата се използва като гел-носител. Два патента са регистрирани:

(i) Френска патентна заявка No. 77.10254 (съответстващ патент на САЩ no. 4.155.737), което позволява използването на полимерен гел на базата на полиакриламиден или със силикагел за различни микроорганизми,

(ii) Патент на САЩ no. 5021350 върху метода за включване на микоризни и актиноризни микроорганизми в полимерна гелна матрица на базата на най-малко един полимер от полизахаридната група, с поне частично омрежване на полимера.

Други носители

Богата гама от материали, естествени и синтетични, са тествани и оценени като алтернативни носители за различни микроорганизми. Основните фактори за използването на други видове носители се оказва тяхната достъпност и цена, а не изискванията за по-добро качество и широко разпространение.

Предлагани са не малко евтини органични матрици, включително от водни утайки, компост, дървени стърготини, захарна тръстика, суроватка или обогатени агроиндустриални отпадъци. Утайката от отпадъчните води може да бъде подходящ носител, но съдържа тежки метали и това създава правен проблем по отношение на използването ѝ. Добра алтернатива на торф е индустриален компост от корковата индустрия. Той поддържа добре оцеляването на различните ризосферни бактерии в продължение на 6 месеца съхранение, както и оцеляването им върху семената. Въпреки това, органичният компост не е приложим за формулировки с АМГ, тъй като може да намали скоростта на формиране на микоризата.

Въглища, глини, и неорганични почви (камъни, скали, вулканична пемза, или диатомитна пръст) могат да бъдат използвани където са налични, но микробната концентрация е по ниска, отколкото в органичните носители. В Мадагаскар, производство

НАНОТОРОВЕ

на АМГ се извършва с помощта на специфична вулканична скала. Използване на перлит като носител често дава променливи резултати. Той е подходящ, но по-малко ефикасен от корка и торфа. Неговата ефективност се увеличава, когато се ползва захароза като свързващо вещество.

Гелове от различни химични съединения (включително магнезиев силикат или гел на основата на целулоза) се считат за потенциални кандидати, но никой от тях не е ползван в стопанствата.

Обещаващите нови технологии за развитие на носителите

Водно-маслените емулсии изглеждат атрактивен, но неизползван метод за съхраняване и доставяне на микроорганизми чрез течни формулировки. Маслото улавя водата около организма, като съответно забавя изпаряването на водата. Това е от особено значение, когато се ползват микроорганизми, чувствителни към изсушаване или градински култури, където напоителни системи не са налице. Водно-маслените емулсии позволяват добавянето на субстрати към маслото и / или към водната фаза. По този начин се подобряват клетъчна жизнеспособност и кинетичното освобождаване. Въпреки това, клетъчното утаяване е основен въпрос, които трябва да бъде взет под внимание. Серия от проучвания правят опити да решат този проблем чрез използването на наноматериали. Увеличаването на маслената фаза с помощта на хидрофобни силициеви наночастици по същество премахва клетъчното утаяване и повишава жизнеспособност по време на съхранение.

Неотдавна е предложена нова процедура за капсулиране на вирусни препарати въз основа на прилагането на суперкритични флуидни свойства. Същата идея може да се приложи и за приготвяне на бактериален инокулум. Процесът, наречен ЧГНР (Частичи от Газово Наситени Разтвори), се извършва при ниски температури използвайки въглероден диоксид като суперкритичен флуид. Основните предимства на предложената техника е липсата на отрицателно въздействие върху жизнеспособността на микроорганизмите, и ниската производствена цена. Крайният продукт на процеса са почти сферични частици, които образуват свободно течащ прах, който може да се суспендира във вода. Възможностите на процеса ЧГНР вече успешно са демонстрирани за няколко твърди вещества и течности.

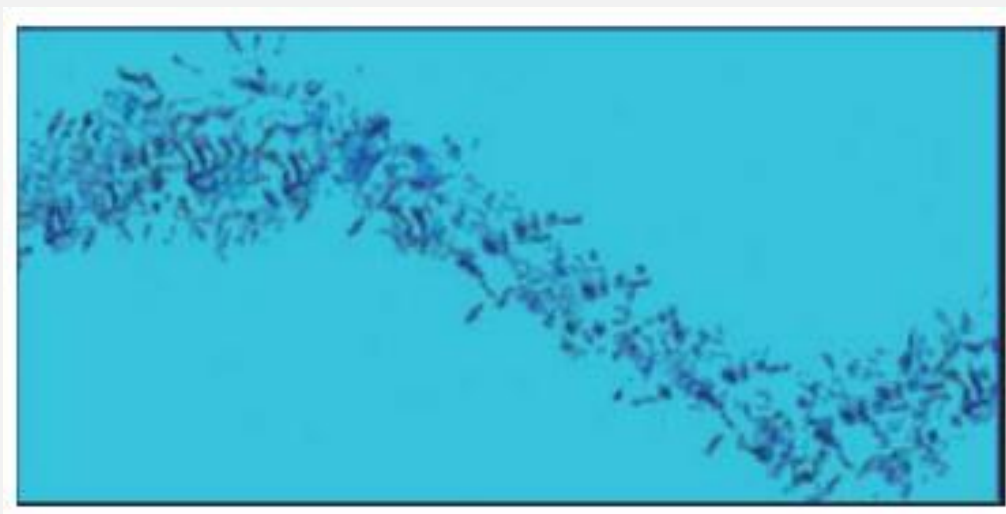
Друга интересна иновация е използването на естественото получаване на бактериални биофилми като възможен носител. Те могат да се прилагат не само за производството на бактериалния инокулум, но и за гъбно-бактериални съобщества. Биофилмите се използват широко в индустрията с различни приложения (например, пречистване на отпадни води, производство на химични съединения). Под внимание се взимат два типа биофилми: биофилми, растящи върху инертни носители (въглен, смола, бетон, глина тухла и пясъчни частици) и биофилми, които се формират в резултат на образуването на агрегат. В първия случай, микроорганизмите се развиват навсякъде около частиците, както и размерът на биофилма расте с времето - обикновено до няколко мм в

НАНОТОРОВЕ

диаметър. Биофилми, образувани чрез агрегиране се нарича гранулирани биофилми и тяхната формация може да отнеме от няколко седмици до месеци.

Има четири фази на развитие на един зрял биофилм: I) първоначално свързване, II) необратимо свързване, III) ранно развитие и IV) съзряване. Особено критично е необратимото свързване, когато клетките се закрепят с повърхността и синтезират извънклетъчни полимерни субстрати (ИПС). Така микроорганизми са защитени от околната среда. ИПС обикновено са формирани от полизахариди, протеини, нуклеинови киселини, или фосфолипиди. Типичен ИПС отделен от бактериални клетки в биофилми, е полизахаридния алгинат (Фиг. 4 и 5).

Скоростта на образуване на биофилми се влияе най-вече от повърхности, клетъчни фактори и околната среда. Неравни повърхности, порести, и по-малко хидрофобни материали са склонни да стимулират формирането на биофилми. Последните се образуват по-лесно в присъствието на оптимална хранителна среда, по-специално при наличието на фосфор, който увеличава адхезионната способност на клетките. Други фактори, влияещи положително върху образуването на биофилми са високата температура, синтезата на ИПС, и повърхностната адхезия. Биореактори за производство на биофилми могат да бъдат сглобени в редица конфигурации, включително за периодично култивиране, с резервоар с непрекъснато разбъркване, кипящ слой, еърлифтен реактор и др..



Фиг. 4. Гъбно - бактериален биофилм (ГББ)

НАНОТОРОВЕ



Фиг. 5. Гъбно-ризобиален биофилм (ГРБ) на пшеничен корен.

Наскоро, с добра практическа ефикасност, се използват биофилми, които се произвеждат в *in vitro* култури, съдържащи както гъбни, така и бактериални щамове. Прилагането на гъбно-ризобиален биофилм води до значително увеличаване на фиксирането на N_2 в соя, в сравнение с традиционния инокулант само от *Rhizobia*. Пшеничен разсад инокулиран с биофилм, формиран от бактерии показва повишен добив при умерено солени почви. Освен това, експериментални данни показват, че биофилмите дават защита на микроорганизмите и осигуряват тяхното оцеляване дори и при стресови условия. Един от основните проблеми с ключово значение е ефективността на РСРР инокулация при селскостопански условия. Показано е, че биофилмиран инокулум позволява на щамовете *Rhizobia* да преживеят при висока соленост (400 mM NaCl) на 10^5 пъти в повече сравнение с *Rhizobia* монокултури. Интересен факт е, че полезните ендوفити в биофилмите осигуряват много по-висока киселинност и синтеза на растителни растежни хормони, отколкото в моно- или смесени култури.

Друг нов хоризонт в развитието на носители за РСРР е производството на хибридни материали за инокулиране. Силицият се явява като обещаващ гостоприемник за капсулиране: техниката се основава на дисперсията на бактериалната популация в силикагел и нейното имобилизиране. Клетката може да бъде или уловена в алгинатни микрочастици, покрити със силикагел мембрани или в макрокухини създадени вътре в матрицата на силициев диоксид. Такива хибридни материали подобряват механичните свойства на алгинатната перла, намаляват клетъчното изтичане, и повишават клетъчната жизнеспособност.

Прилагането на бионано технологии може също да осигури нова насока в развитието на носители за биоторове. Наночастици, направени от неорганични или органични материали, се използват в размери 100 nm и по-малко. Интегрирането на цели клетки в

НАНОТОРОВЕ

рамките на хибридни нано структури има многобройни приложения в много области, включително и в селското стопанство. От скоро се произвеждат макроскопски филтри, изработени от радиално организирани въглеродни нанотръби, способни да абсорбират *Escherichia coli*. Тази технология се прилага за отделяне на бактериалните клетки от ферментационните процеси и за доставянето им до растенията. Физическата стабилност и голямата повърхностна площ на нанотръбите, заедно с ниското тегло и рентабилното производство на тези мембрани, може да осигури по високо производството на биоторове.

Използването на наноформулировки може да подобри стабилността на биоторовете и биостимулантите по отношение на изсушаване, топлинен стрес и UV дезактивиране. Добавянето на хидрофобни силициеви наночастици от 7-14 nm в състава на водно-маслената емулсия на биопестицидната гъба *Lagenidium giganteum* намалява изсушаването на мицела. Физическите характеристики на формулировката са подобрени и микроорганизмите са жизнеспособни и активни след съхранение в продължение на 12 седмици при стайна температура.

СВЪРЗВАЩИ ВЕЩЕСТВА

Често в торфа се добавят свързващи вещества, за да се гарантира неговата еднородност при покриването на семената. Слєпващите реагенти използвани в настоящите селскостопански практики са различни полимери: полизахариди (като например гума арабика или карбоксиметилцелулоза), производни на полиалкохоли или казеинатни соли. Важни предпоставки са:

- нетоксичен за семена или микроорганизми,
- лесна дисперсия във вода,
- предлага по-добра адхезия и оцеляване на микроорганизми върху семената.

Те се използват в голямата си част поради способността си да запазват жизнеспособността на *Rhizobia* и на бобовите семена. Въпреки това, малко се знае за точните механизми, отговорни за осигуряване на повишената надеждност от тези полимери. Значителен недостатък е, че когато се прилагат със свързващи реагенти, върху кората на семената се отлага голямо количество торф, което води до по-продължително време на контакт между бактериите и токсичните съединения на кората.

ДОБАВКИ

Други вещества, добавени към състава на инокуланта включват макро- и микроелементи, въглеродни или минерални източници, хормони, а дори и фунгициди. Целта е да се осигурят микроорганизмите със защитен и / или хранителен източник; да се осигури по-добра адхезия към семената, като по този начин да се подобри качеството на инокуланта; да се направи продуктът по-стабилен; да се инактивират токсините или да се подобри оцеляването на щам(овете) след излагане на стресови условия в околната среда (висока температура, изсушаване). Налице е критичното съотношение между жизнеспособността на щамовете и използваните добавки. Някои от тях (като глицерол) подобряват клетъчната жизнеспособност, като предпазват микроорганизмите от изсушаване чрез задържане на значителни количества вода. Така скоростта на изсушаване е значително намалена. Всяка добавка следва да бъде избрана за всеки отделен щам, за да се осигури максимална производителност. Освен това тяхната химическа структура трябва да позволява надеждна и дълготрайна стабилност. Няколко компоненти са тествани, като глина, обезмаслено мляко, ксантан, или натриев алгинат с променливи резултати на оцеляване на щама (овете) по време на съхранение и приложение. Освен това, при добавяне в средата за култивиране и в инокуланта на някои сигнализиращи молекули, се констатира предизвикана желана физиологична активност на използваните микроорганизми. Скорошен доклад пояснява, че някои ризобиялни метаболити повишават ефективността на *Bradyrhizobium* spp. и *Azospirillum brasilense*, когато се третират соя и царевица. Тези метаболити включват главно липохитоолигозахариди (наричани Nod фактори), но също екзополisahариди и растителни хормони. Установено е, че Nod факторите се синтезират от повечето *Rhizobia* и са задължителни при инфекции на корен от бобови растения и образуването на нодули. Доколкото ни е известно, използването на сигнални молекули, за повишаване на производителността на културите е все още лимитирано. Въпреки това няколко бобови посева, съдържащи стимулатори на грудкообразуването (флавоноиди или Nod фактори) се предлагат на пазара в Северна и Южна Америка. Стимуланти на микоризната симбиоза също са идентифицирани. Стриголактоните представляват научно-фундаментален и практически интерес, тъй като се предполага, че играят ключова роля в създаването на микоризна симбиоза. Показано е, че те действат като хормони в растения, и могат да имат роля в пресимбионтния растеж на АМГ. Тяхното нанасяне върху растителни култури може да доведе до положителен ефект върху развитието на симбиотичните взаимоотношения. Необходими са обаче още изследвания, за да се оцени адекватно потенциалът им като стимулатори за развитието на ново поколение микоризни инокуланти.

ПАКЕТИРАНЕ

Опаковъчният материал е друг важен въпрос, който следва да се вземе под внимание, когато се произвежда биотор, тъй като може да се отрази върху качеството на инокуланта. Той трябва да позволява обмен на кислород, но да ограничи преминаването на вода. Трябва да се положи особена грижа при избора на материал за продукт, който следва да бъде стерилизиран. Някои опаковки са подходящи за автоклавиране, но може да се повредят по време на облъчване с йонизиращи лъчения и обратно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Herrmann L & Lesueur D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97:8859–8873
2. Malus E, Sas-Paszt L, Ciesielska J. Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 2012, Article ID 491206
3. Yadav AK, Chandra K. Mass Production and Quality Control of Microbial Inoculants. *Proc Indian Natn Sci Acad*, 2014, 80 (2): 483-489
4. Organic Farming :: Organic Inputs and Techniques: http://agritech.tnau.ac.in/org_farm/orgfarm_biofertilizertechnology.html
5. Biofertilizer Manual by FNCA Biofertilizer, 2006, Japan Atomic Industrial Forum (JAIF)
6. Borkar SG. *Microbes as Biofertilizers and their Production Technology*, 2015, Woodhead Publishing India Pvt. Ltd.