



АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен
„доктор“

Професионално направление 4.3 Биологически науки
Научна специалност „Микробиология“

**Физиологична и биохимична характеристика на
растително – микробната симбиоза на представители
от род *Pseudomonas***

ГЛОРИЯ БИСЕРОВА ГЕОРГИЕВА

Научен ръководител:
Доц. д-р Траяна Недева

Ръководител катедра:
Проф. д-р Петя Христова

Научен консултант:
Проф. д-р Петя Христова

2024

Дисертационният труд е написан на стандартни машинописни страници и съдържа следните раздели: **Въведение** – 1 стр.; **Литературен обзор** – 45 стр.; **Цел и задачи** – 2 стр.; **Материали и методи** – 20 стр.; **Резултати и обсъждане** – 86 стр.; **Изводи** – 2 стр.; **Приноси** – 1 стр. Включени са **69 фигури** и **10 таблици**. В литературната справка са отразени **347 заглавия**. Експерименталната работа е осъществена в Катедра по обща и промишлена микробиология и микробиологичната лабораторията на фирма РОМБ ООД.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрата по „Обща и промишлена микробиология“, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“ проведено на 27.06.2024г. от 10.30 часа и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“.

Научно жури:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на часа в сградата на Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“.

Материалите, свързани със защитата се намират в катедра „Обща и промишлена микробиология“ и на сайта на Биологически факултет.

Използвани съкращения

- АБА – Абсцисова киселина
- БАВ – Биологично активни вещества
- ЛОС – Летливи органични съединения
- РКВ – Реактивни кислородни видове
- ТЗСС – Тип III секреторна система
- АСС/АЦЦ - 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат деаминаза
- IAA/ИОК – Indole Acetic Acid/Индол оцетна киселина
- PCA – Phenazine-1-carboxylic acid / Феназин-1-карбоксилова киселина
- PGP – Plant Growth Promoting / Стимулиране на растежа на растенията
- PGPF – Plant Growth Promoting Fungi / Филаментозни гъби, стимулиращи растежа на растенията
- PGPM - Plant Growth Promoting Microorganisms / Микроорганизми, стимулиращи растежа на растенията
- PGPR – Plant Growth Promoting Rhizobacteria / Ризобактерии, стимулиращи растежа на растенията
- ADIC - 2-амино-2-дезоксизохоризмова киселина
- ДННА - транс-2,3-дихидро-3-хидроксиантранилово киселина
- АОСНС - 6-амино-5-оксоциклохекс-2-ен-1-карбоксилна киселина
- ННРДС - хексахидрофеназин-1,6-дикарбоксилна киселина
- ТНРСА - тетрахидрофеназин-1,6-карбоксилна киселина
- ВГСs - биосинтетични генни кълъстери
- АНЛs - N-ацил хомосеринови лактони
- ПАМР - Pathogen Associated Molecular Patterns / Патоген асоциирани молекулярни модели
- РРРС - Pattern Recognition Receptors - идентифицирани рецепторите за разпознаване на модели

ВЪВЕДЕНИЕ

Нашето съвремие поставя на дневен ред необходимостта от грижа към природата и почвата като един от нейните пет компонента. Непрестанното нарастване на човешкото население и пропорционално увеличаващата се индустриализация застрашават глобалната екосистема на нашата планета с недостиг на хранителни ресурси и прогресивно увеличаващи се отрицателни ефекти върху околната среда. Необходими са нови стратегически решения и тяхното широко прилагане, за да се подобрят селскостопанските добиви и устойчивост, така че нуждите на човешката популация да могат да бъдат посрещнати с възможно най-малко въздействие върху околната среда.

Част от решението може да бъде използването на основен и важен компонент във функционирането на екосистемата - растително-микробната симбионтна система и в частност специализираният микробен компонент - бактерии, стимулиращи растежа и развитието на растението. Бактериите, стимулиращи растежа и развитието на растението колонизират в ризосферата и упражняват своя положителен ефект върху растителния партньор посредством различни механизми. Сред тях, представители на тези, принадлежащи към род *Pseudomonas* се превърнаха в основен фокус на изследванията за подобряване на общото развитие на растенията и биоконтрол на растителните заболявания (Singh *et al.*, 2013). Бактериите, принадлежащи към род *Pseudomonas* притежават потенциал за приложение в редица биотехнологични производства, насърчаване на растежа и развитието на растенията, биоремедиация и биологичен контрол, (Dimkic *et al.*, 2022). Този широк набор от характеристики обаче, е видово- (дори щамово-) специфичен. Търсенето на щамове с изразен потенциал за насърчаване на растежа и развитие на растенията и доказването на този потенциал на моделни системи от растения с икономическа значимост е добра алтернатива за целенасочено моделиране на ризосферния хабитат в търсенето на екологично-издържани решения за устойчиви земеделски практики.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основна цел на настоящия дисертационен труд е подбор и изследване на бактериални щамове, принадлежащи към род *Pseudomonas* за изучаване на феномена растително – микробна симбиоза и доказване на PGP-потенциала им.

За постигане на поставената цел са формулирани следните задачи:

1. Скрининг на изолати от род *Pseudomonas* за наличие на PGP – потенциал:
 - 1.1. Комплексно биохимично охарактеризиране на пет изолата чрез мултиензимен анализ (системи API 20NE и API ZYM);
 - 1.2. Анализ на ключови PGP-характеристики: биосинтеза на литични и антиоксидантни ензими, продукцията на желязо-свързващи протеини (сидерофори) и фитохормони, биологична N₂-фиксация.
2. Доказване на PGP-потенциала на избраните щамове:
 - 2.1. Оптимизиране на процеса на култивиране по отношение на C, N и P източник, индукция на биосинтезата на ИОК и мащабиране на ферментационния процес;
 - 2.2. Изследване на продукцията на феназин-1-карбоксилна киселина и сидерофори;
 - 2.3. Оценка на изследваните щамове като агенти за биоконтрол – определяне на антигъбна активност;
 - 2.4. Оптимизиране на запазването и стабилността на биологично активните ферментационни продукти на избраните щамове при лиофилизация и разпръскателно сушене.
3. Изучаване на растително-микробната симбиоза на избраните щамове с моделни растителни системи от технически култури и декоративни растения в различни фази на вегетационен период:
 - 3.1. Мониторинг на ефективността на прорастане на семена: оценка на ефекта на избраните щамове върху биометричните показатели на кореновата система на техническите култури царевица, соя и пшеница;
 - 3.2. Оценка на растително-микробната симбиоза със саксийни декоративни растения иглика, хризантема и циклама: изследване на ефекта на свежи и изсушени култури от избраните щамове (поединично и в комбинация) върху растителните корени (чрез поливане) и върху филосферата им (чрез листно пръскане).

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Микроорганизми

Обект на настоящия дисертационен труд са шамове, предоставени от микробиологичната колекция на фирма "РОМБ ООД": *Pseudomonas chlororaphis* 1S4, *Pseudomonas yamanorum* 1046, *Pseudomonas yamanorum* Or5, *Pseudomonas yamanorum* G-52, *Pseudomonas yamanorum* R6.

За оценка на антигъбна активност са използвани шамове филamentosни гъби: *Fusarium proliferatum* C1, *Fusarium oxysporum* F6, *Fusarium solani* F7.

2. Хранителни среди

- 2.1 Хранителни среди за поддържане на шамовете и определяне на техните биохимични характеристики: МПА (Месопептонен агар) HiMedia, КДА, HiMedia, ПДГ- пептон – 5 g/L, дрождев екстракт - 5 g/L, глюкоза - 6 g/L, агар – 2%;
- 2.2 Агаризирани хранителни среди, използвани за аналитични цели- Скорбелен агар, Млечен агар, CAS – агар, LB агар, среда на Пиковска
- 2.3 Течни среди, използвани за аналитични цели- NFb – среда
- 2.4 Хранителни среди за провеждане на периодично дълбочинно култивиране:
 - ферментационна среда за *Pseudomonas* – 5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3 g/l, KH_2PO_4 – 1 g/l, MgSO_4 – 0,5 g/l, пептон – 5 g/l, дрождев екстракт – 1 g/l; МПБ HiMedia.
 - Модифицирани ферментационна среда за *Pseudomonas* с добавен L-триптофан (HiMedia)- 0,01%; 0,02%;0,04%.
 - Ферментационни среди за изследване на оптимално съотношение на въглерод, азот и фосфор, съставени по следната схема (3 x 3 = 9 варианта) (виж стр. 6):

3. Периодично дълбочинно култивиране на изследваните шамове в колба и биореактор.

4. Методи за мониторинг на култивационните процеси:

- 4.1 Методи за проследяване на динамиката на растеж на бактериалните култури.
- 4.2 Метод за количествено определяне на разтворим белтък
- 4.3 Метод за количествено определяне на остатъчни захари
- 4.4 Метод за определяне на колония-образуващи единици (CFU, colony forming units)

C↓	N →		1		2		4	P↓
1	I.	$\frac{1}{2}N:\frac{1}{2}C:\frac{1}{2}P = 1:1:1$	IV.	$N:\frac{1}{2}C:\frac{1}{2}P = 2:1:1$	VII.	$2N:\frac{1}{2}C:\frac{1}{2}P=4:1:1$	1	
2	II.	$\frac{1}{2}N:C:P = 1:2:2$	V.	$N:C:P = 2:2:2$	VIII.	$2N:C:P = 4:2:2$	2	
4	III.	$\frac{1}{2}N:2C:2P = 1:4:4$	VI.	$N:C:P = 2:4:4$	IX.	$2N:2C:2P=4:4:4$	4	

5. Методи за оценка на клетъчна морфология
 - 5.1 Доказване на принадлежност по Грам
6. Ензимологични анализи
 - 6.1 Определяне на ключови ензимни характеристики чрез системата ApiZYM
 - 6.2 Определяне на асимилационните характеристики чрез системата API 20 NE
 - 6.3 Протеолитична активност
 - 6.4 Амилолитична активност (American society of microbiology, 2012).
 - 6.5 Каталазна активност (American Society for Microbiology, 2016).
 - 6.6 Биосинтезата на сидерофори (Aroga & Verma, 2017)
 - 6.7 Определяне солубилизацията на фосфор Shahid et al. (2015).
7. Определяне на индол–оцетна киселина Gusmiaty & Payangan (2019)
8. Определяне на феназин-1-карбоксилна киселина Raio et al., 2017.
9. Изследване на способността на микроорганизмите да осъществяват биологична азотфиксация
10. HPLC анализ за количествено определяне на фитохормони (ThermoScientific Co, САЩ) .
11. Генетично определяне на щамова принадлежност (Macrogen Europe – 16sRNA; ITS regions)
12. Тестове за прорастване на растителни семена
 - 12.1 Прорастване на семена в рулони (Draves et al., 2022).
 - 12.2 Тестове с растения – съдови експерименти
13. Методи за определяне на антигъбна активност
14. Методи за получаване на сух препарат от представители на р. *Pseudomonas*
 - 14.1 Разпрашително сушене
 - 14.2 Лиофилизация

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Растително-микробната симбиоза е в основата на прилагането на микробни препарати в земеделието. Растенията отделят чрез кореновата си система ексудати, които съдържат широк спектър от неорганични и органични съединения, привличащи PGPR и микоризни видове, насърчаващи достъпа на хранителни вещества и осигуряващи защита срещу биотичен и абиотичен стрес. Такъв тип координирана комуникация между растенията и ризосферните микроорганизми, чрез която те осъществяват своя PGP-ефект е обект на проучване в настоящия труд. В него са анализирани потенциалните възможности на пет щама, принадлежащи към род *Pseudomonas* да упражняват PGP-ефект.

1. Скрининг на изолати от род *Pseudomonas* за наличие на потенциал за насърчване на растежа на растенията (PGP)

В биохимичния скрининг са включени 5 щама от род *Pseudomonas*. Три от тях са предоставени от микробиологичната колекция на фирма РОМБ ООД – *Pseudomonas chlororaphis* 1S4, *Pseudomonas putida* Or5 и *Pseudomonas putida* 1046, а останалите два – *Pseudomonas yamanorum* R6 и *Pseudomonas yamanorum* G-52 са изолирани в хода на настоящия труд, чрез прилагане на стандартен протокол за изолация от почвени проби.

Проведена е серия от анализи за формиране на PGP профила на изследваните щамове, която включва морфологично охарактеризиране, ключови биохимични показатели, общоприети за доказване на PGP потенциал и генетични анализи.

1.1 Морфологично охарактеризиране на изолатите

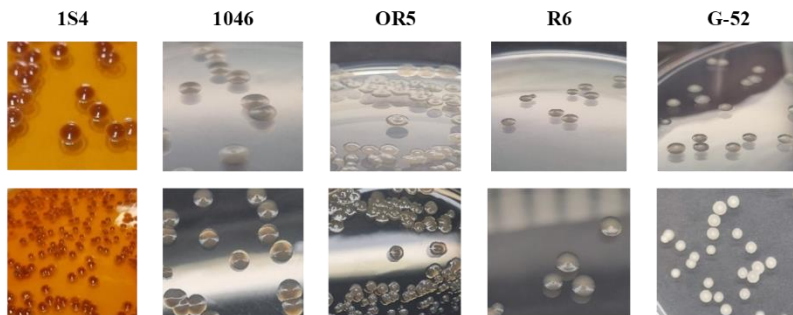
Всички изследвани обекти показват типичните морфологични характеристики на представители на род *Pseudomonas*: Грам-отрицателен статус, облигатно аеробен метаболизъм, пръчковидна форма с размери 0,5 – 3,0 μm . Движат се посредством единичен полярен флагелум, в някои случаи може да се наблюдават повече от два флагелума. Образуват непрозрачни, лъскави, плоски, с неправилни ръбове колонии. Един от обектите продуцира пигмент, което е видово-специфична особеност. (Фиг. 1)

С помощта на модифицирана методика за определяне принадлежност по Грам (Buck, 1982) беше доказано, че и петте изследвани щама са Грам-отрицателни (Фиг. 2).

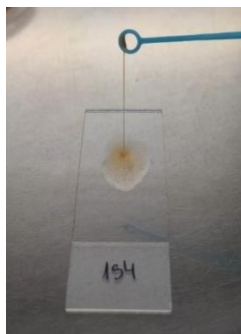
1.2 Асимилационни характеристики

Асимилационните характеристики на изследваните щамове са определени чрез биохимични тестове с помощта на системата API 20 NE. Установено, че три от

изследваните щамове редуцират нитрати до молекулярен азот – 1S4, 1046, G-52. Два от щамовете (G-52 и 1046) показват положителен тест за L-аргинин дехидролаза. Само щам 1S4 осъществява хидролиза на ескулин чрез β -глюкозидаза. По отношение на спектъра от въглеродни източници, петте щама асимилират по-голямата част от тях, с изключение на малтозата, а щам 1S4 не асимилира и манитол и адипинова киселина, но единствен усвоява желатин (Фиг. 3).



Фигура 1. Макро морфология на изследваните микроорганизми.



Фигура 2. Доказване на Грам принадлежност на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4. Онагледяване на положителна реакция за Грам-отрицателна култура чрез тест с 3% KOH.



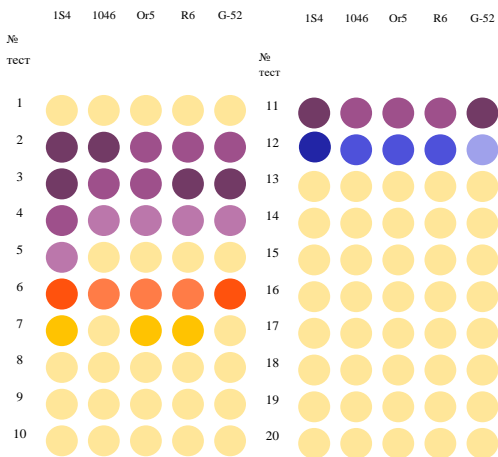
A



Фигура 3. Биохимичен тест за определяне на асимилационни характеристики чрез системата API 20 NE. А – щам 1S4, Б – щам 1046, В – щам G-52, Г – щам R6, Д – щам Or5.

1.3. Генериране на ензимен профил

Мултиензимният профил на изследваните изолати е определен по полуколичествен микрометод чрез системата ApiZYM (BioMerieux, Inc.).

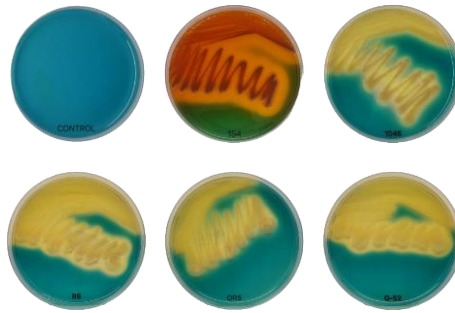


Фигура 4. Мултиензимен анализ (микротест) на представителите на р *Pseudomonas* чрез системата ApiZYM..

Генерираният ензимен профил показва, че и петте изолата продуцират алкална и кисела фосфатаза, естераза и естераза-липаза, в различни концентрации.

1.4. Продукция на желязо-свързващи протеини – сидерофори

След проведен анализ е установено, че и петте щама образуват жълтеникава хало зона (Фиг. 5), индикатор за синтез на сидерофори, с най-добре изразен капацитет за това при изолат 1S4.



Фигура 5. CAS-анализ за определяне на сидерофори.

1.5. Биосинтеза на литични ензими

Резултатите от анализа за протеолитична активност (Фиг. 7) показват наличие на активни протеази при изолати 1S4, R6, Or5 и G-52, визуализирани чрез отчетливата хало зона около посева. Наблюдават се количествени разлики при различните представители, с най-голям размер на хидролитичната зона отново при изолат 1S4.

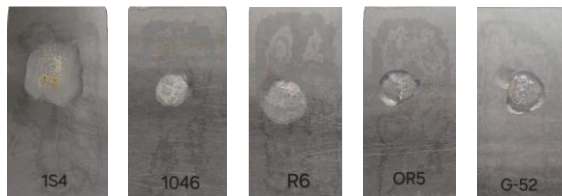


Фигура 6. Анализ за протеолитична активност.

Амилитичната активност е друга важна PGP-характеристика, която допълва PGP – профила. Наличие на амилитична активност е наблюдавано при три от изследваните представители – 1S4, 1046 и R6.

1.6. Каталазна активност

Каталазите участват в антиоксидантната защита на клетките, а така също и в процесите на развитие и диференциация на клетките. Четири от петте изолата (1046, R6, Or5 и G-52) показват ясно изразена положителна реакция (Фиг. 8.)



Фигура 7. Анализ на каталазна активност

1.7. Солубилизация на неорганични фосфор-съдържащи съединения

Фосфорът е основен елемент за растежа и развитието на растенията и основен компонент на хранителните цикли в почвата. Въпреки че общото количество фосфор в почвите е високо, по-голяма част от него е във форма, неусвоима от растенията (Wang *et al.*, 2022). И при петте изолата се наблюдава хало зона около посева, индикатор за протичане на фосфатазна активност (Фиг. 8).



Фигура 8. Солубилизация на фосфор.

1.8. Осъществяване на биологична азотфиксация

Представители на род *Pseudomonas* имат редица PGP – свойства, като при много от тях се открива и способността да фиксират азот (Singh *et al.*, 2023). Петте представителя на род *Pseudomonas* демонстрират способност да фиксират азот в различна степен (Табл. 2).

Таблица 1. Капацитет за азотфиксация на изследваните щамове.

Щам	N (ppm)
1S4	133,488
1046	50,126
Or5	40,008
R6	39,448
G-52	36,648

При осъществения анализ става ясно, че най-голям потенциал при азотфиксация демонстрира щам *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 – 133,488 ppm, последван от *Pseudomonas yamanorum* 1046 – 50,126 ppm.

1.9. Биосинтеза на фитохормони

Фитохормоналният профил на петте изследвани микроорганизма и продукцията на ретарданти, оказващи влияние върху растежа и развитието на растенията е представен в Табл. 3. При проведения HPLC анализ бе установено, че и петте изолата продуцират по-голямата част от изследваните регулатори, а основната разлика между тях е количествена: аминокicloпропан-1-карбоксилна киселина (ACC) - *Ps. yamanorum* 1046 – 393,39 ng/ml, транс-зеатин - *Ps. chlororaphis* 1S4 – 89,89 ng/ml, гиберелин A8 - *Ps. yamanorum* 1046 – 106,02 ng/ml, индол-оцетната киселина (ИОК) - *Ps. yamanorum* 1046 – 105,31 ng/ml. Анализите за наличие на ретарданти показват, че най-голямо количество се наблюдава при щам *Ps. chlororaphis* 1S4, следван от щам *Ps. yamanorum* 1046.

Таблица 2. HPLC-анализ за количествено определяне на продуцираните от щамовете фитохормони.

Фитохормон \ Щам	1S4	1046	Or5	R6	G-52
	ng/ml				
Аминоциклопропан карбоксилна киселина	149,56	396,39	132,19	82,46	32,76
Даминозид	208,95	1,29	1,57	0,34	0,28
Малеинов хидразид	3,43	4,44	11,50	6,62	1,90
транс - Зеатин	89,89	30,37	7,80	5,86	47,38
Гиберелин A8	10,57	106,02	17,45	69,57	11,56
GR5	25,75	5,92	13,09	24,08	1,28
Индол оцетна киселина	13,99	105,31	10,34	11,62	80,71
Тидиазурон	0,63	1,46	1,35	0,02	0,02
Аксимидол	0,55	0,52	0,04	0,02	0,06
Жасминова киселина	12,23	19,62	28,82	9,39	14,02
Стригол	0,55	0,66	3,10	-	-
Оробанхол	0,43	0,51	0,43	-	-
Паклобутразол	0,62	1,74	9,74	0,28	0,10
Флуридон	2,16	4,17	2,38	1,04	0,46
Флурпримидол	0,78	1,64	1,86	0,27	0,22
Нафталеноцетна киселина	75,72	63,20	278,72	19,28	237,64
Униконазол	1,10	2,80	1,41	0,39	0,10
Абсцисинова киселина	7,65	3,07	5,76	4,65	1,63

Обобщената биохимична характеристика на изследваните изолатите е представена в Табл. 4.

Таблица 3. Биохимична характеристика на изследваните щамове от род *Pseudomonas*.

Система ApiZYM						
№	Щам	<i>Ps chlororaphis</i>	<i>Ps yamanorum</i>	<i>Ps yamanorum</i>	<i>Ps yamanorum</i>	<i>Ps yamanorum</i>
	Ензим	1S4	Or5	R6	G-52	1046
1	Контрола					
2	Алкална фосфатаза	+++	++	++	++	+++
3	Естераза (C 4)	+++	++	+++	+++	++
4	Естераза Липаза (C 8)	++	+	+	+	+
5	Липаза (C 14)	+	-	-	-	-
6	Левцин ариламидаза	+++	++	++	+++	++
7	Валин ариламидаза	+	+	+	-	-
8	Цистин ариламидаза	-	-	-	-	-
9	Трипсин	-	-	-	-	-
10	α -химотрипсин	-	-	-	-	-
11	Кисела фосфатаза	+++	++	++	+++	++
12	Нафтол-AS-BI-фосфохи- ролаза	+++	++	++	+	++
13	α -галактозидаза	-	-	-	-	-

14	β-галактозидаза	-	-	-	-	-
15	β-глюкоронидаза	-	-	-	-	-
16	α-глюкоронидаза	-	-	-	-	-
17	β-глюкозидаза	-	-	-	-	-
18	N-ацетил-β-глюкозаминидаза	-	-	-	-	-
19	α-манозидаза	-	-	-	-	-
20	α-фукозидаза	-	-	-	-	-
Система Api 20 NE						
1	NO3 Редуциране на нитрати до нитрити Редуциране на нитрати до азот	- +	- -	- -	- +	- +
2	TRP Производство на индол (триптофан)	-	-	-	-	-
3	GLU Ферментация (глюкоза)	-	-	-	-	-
4	ADH Аргинин дихидролаза	-	-	-	+	+
5	URE Уреаза	-	-	-	-	-
6	ESC Хидролиза (β-глюкозидаза) (ескулин)	+	-	-	-	-
7	GEL Хидролиза (протеаза) (желатин)	+	-	-	+	-

8	PNGP β -галактозидаза (пара-нитрофенил- β -D-галактопиранозидаза)	-	-	-	-	-
9	[GLU] Асимилация (глюкоза)	+	+	+	+	+
10	[ARA] Асимилация (арабиноза)	+	+	+	+	+
11	[MNE] Асимилация (маноза)	+	+	+	+	+
	[MAN] Асимилация (манитол)	-	+	+	+	+
12	[NAG] Асимилация (N-ацетил-глюкозамин)	+	+	+	+	+
13	[MAL] Асимилация (малтоза)	-	-	-	-	-
14	[GNT] Асимилация (калийев глюконат)	+	+	+	+	+
15	[CAP] Асимилация (капринова киселина)	+	+	+	+	+
16	[ADI] Асимилация (адипинова киселина)	-	+	+	+	+
17	[MLT] Асимилация (малат)	+	+	+	+	+
18	[CIT] Асимилация (тринатриев цитрат)	+	+	+	+	+
19	[PAC] Асимилация (фенилоцетна киселина)	+	+	+	+	+
20	OX Оксидаза	+	+	+	+	+
Ензимни активности						
1	Амилолитична активност	+	-	+	-	+

2	Протеолитична активност	+	+	+	+	-
3	Каталазна активност	+/-	+	+	+	+
Други PGP-свойства						
1	Синтез на сидерофори	+	+	+	+	+
2	Солубилизация на фосфор	+	+	+	+	+
3	Синтез на пигменти	+	-	-	-	-
4	Азотфиксация	+	+	+	+	+
Температурен профил						
1	Растеж при 4°C	+	+	+	+	+
2	Растеж при 37°C	+	-	-	-	-
		(липсва пигмент)				

Резултатите от биохимичната характеристика са обработени чрез онлайн софтуер ABIS (https://www.tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html), предназначен за биохимична идентификация на микроорганизми. Съгласно ABIS резултатите, всички изследвани щамове са определени като представители на род *Pseudomonas*. Видовото определяне варира между 80 и 99%, поради необходимост от надграждане на биохимичния профил с допълнителни анализи. За потвърждаване на идентификацията, базирана на биохимични данни бе проведен и генетичен анализ на изолатите(т. 1.10).

1.10. Генетичен анализ

Култури от петте изолата бяха подложени на генетичен анализ от Macrogen, и определени като: *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 – 99%; *Pseudomonas yamanorum* 1046 - 99%; *Pseudomonas yamanorum* Or5 - 99%; *Pseudomonas yamanorum* R6 - 99% и *Pseudomonas yamanorum* G-52 - 99%. Като обект на по-нататъшните изследвания бяха избрани видовете *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046.

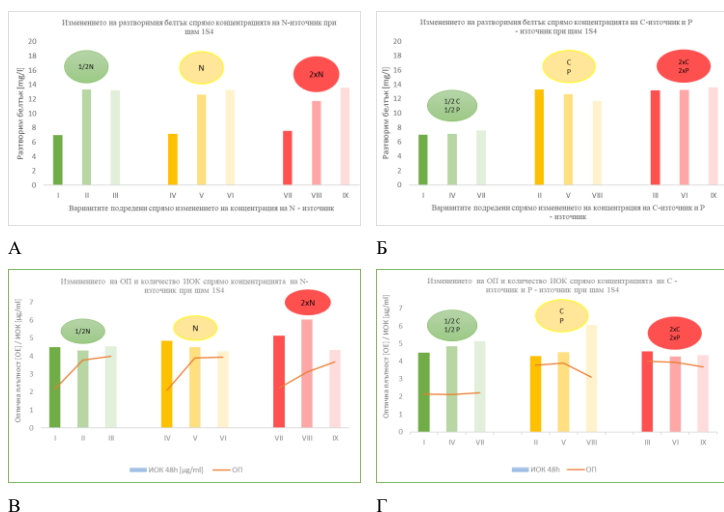
2. Доказване на PGP-потенциал на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046

За потвърждение и по-задълбочено проучване на двата подбрани щама – *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046, те бяха подложени на редица допълнителни тестове, които позволяват изучаване на поведението им в различни условия на култивационния процес, а в последствие - и при изследване на взаимодействието им с моделни тест растения.

2.1. Оптимизиране на процеса на култивиране

Оптимизация на С, N и P източник

За подбор най-подходяща хранителна среда е проведен експеримент по оптимизацията на базовите концентрации на С, N и P източник в системата на периодично култивиране на колби, допълнително мащабирана в 5 L биореактор. Данните са отчетени след 48-часов период на култивиране и представени на Фиг. 9 и Фиг. 10.



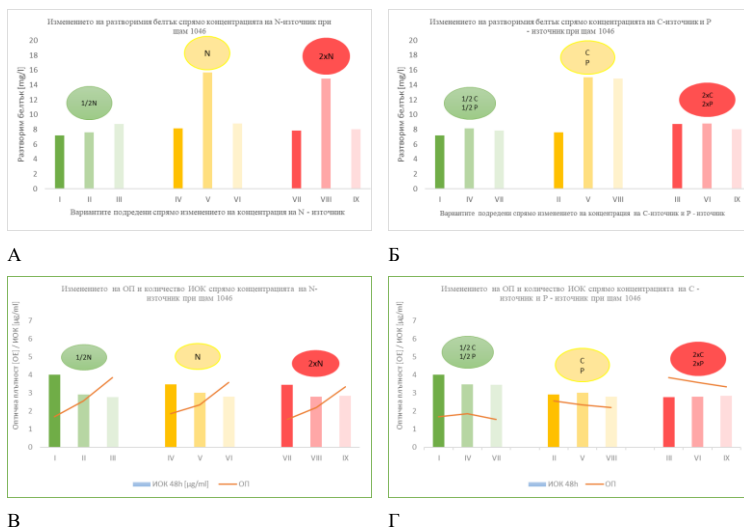
Фигура 9. Периодично дълбочинно култивирането на щам *Pseudomonas chlororaphis* 1S4; А: Изменение на количеството екзозлетъчен белтък спрямо N източник; Б: Изменение на количеството екзозлетъчен белтък спрямо С и Р източници; В: Изменение на оптичната плътност и количеството продуцирана ИОК спрямо N източник; Г: Изменение на оптичната плътност и количеството продуцирана ИОК спрямо С и Р източници.

На Фиг. 9 А и Б е представено натрупаното количество екзоклетъчен белтък от щам 1S4 при различните варианти, в рамките на 48 часов период. Резултатите са представени в три групи според работните концентрации на N източник: 25% или 1/2 част, 50% (1 част) и 100% (2 части), съответно. Най-високата стойност на този показател е 13,6 mg/ml при вариант IX.

При параметъра оптична плътност (Фиг. 9, В и Г) най-ниски са стойностите при 1/2С и 1/2Р, при останалите варианти оптичната плътност е по-висока и със съизмерими стойности от 4 ОЕ.

При индикатора количество ИОК ($\mu\text{g/ml}$) се открие само един вариант (VIII) с по-високи стойности на този параметър - 6,05 $\mu\text{g/ml}$.

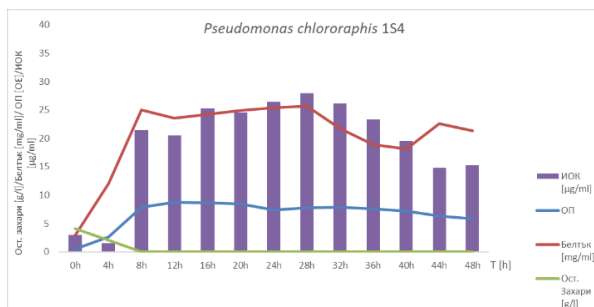
Най-добри резултати за всички параметри са постигнати във вариантите с двойни концентрации на трите източника. Разликата между тях и вариантът с т. нар. базова концентрация (V) обаче, икономически не оправдава промишленото им прилагане. Поради тази причина при щам 1S4 като оптимален вариант се откроява V-тия, изчислен спрямо вложените източници на N, С и Р и максимални стойности на измерените индикатори.



Фигура 10. Периодично дълбочинно култивирането на щам *Pseudomonas yamanorum* 1046; А: Изменение на количеството екзоклетъчен белтък спрямо N източник; Б: Изменение на количеството екзоклетъчен белтък спрямо С и Р източници; В: Изменение на оптичната плътност и количеството продуцирана ИОК спрямо N източник; Г: Изменение на оптичната плътност и количеството продуцирана ИОК спрямо С и Р източници.

При шам *Ps. yamanorum* 1046 максимални стойности са отчетени при вариант V – 15,0 mg/ml и VIII – 14,8 mg/ml. Най-високите стойности на ИОК са наблюдавани при вариантите с ½C и ½P, където оптичната плътност е най-ниска - ИОК варира между 3,0 и 4,0 µg/ml.

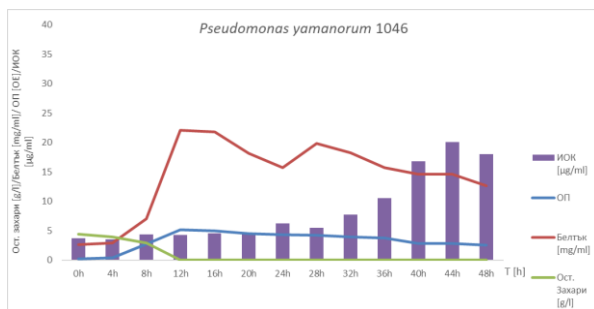
Така подобреният вариант V на ферментационната среда е мащабиран в 5 L бioreактор. При култивирането на шам *Ps. chlororaphis* 1S4 се наблюдава около 4 h lag-фаза, последвана от фазата на интензивен растеж (log-фаза) и в периода от около 8 h до 24 - 28 h културата се намира в стационарно състояние. Следва фазата на отмиране - лизис се наблюдава след 40 h от култивационния процес, когато количеството на екзоклетъчния белтък рязко се покачва (Фиг. 11).



Фигура 11. Периодично дълбочинно култивиране на шам *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 в 5 L бioreактор.

Мониторингът на параметъра количество продуцирана ИОК показва съществена разлика в хода на мащабирането на процеса - максималните стойности на ИОК от същия продуцент достигат до 27,9 µg/ml на 28 h.

Характерът на растеж на периодичната култура от шам *Ps. yamanorum* 1046 проявява някои различия спрямо шам *Ps. chlororaphis* 1S4. При *Ps. yamanorum* 1046 се наблюдава по-дълга lag фаза, която продължава около 8 часа. Експоненциалната фаза е кратка и въглеродния източник се изчерпва за около 4 h (в периода 8 и 12 h). По-кратка по продължителност е и стационарната фаза (около 12 h), след което културата започва да лизира. По отношение на продукцията на ИОК се наблюдава същия модел на нарастване в хода на мащабирането на процеса, но в края на стационарна фаза. Максималните стойности на ИОК се достигат на 44 h – 20 µg/ml.



Фигура 12. Периодично дълбочинно култивиране на щам *Pseudomonas yamanorum* 1046 в 5 L биореактор.

Оптимизиране на биосинтезата на фитохормони

Фитохормоните са от съществено значение за насърчаване на растежа и развитието на растенията. Когато физиологичният прекурсор на ИОК – L-триптофанът, присъства в средата, бактериите повишават количествата на продуцираната от тях ИОК (Raut *et al.*, 2017).

Ефективността на L-триптофана е проследена при двата щама при различни концентрации на индуктора. Подбрани са три концентрации въз основа на литературна справка — 0,01%, 0,02% и 0,04% (Bharucha *et al.*, 2013), които са добавени към основната ферментационна среда. Ефектът на тези концентрации е оценен по отношение на контролни варианти без добавен индуктор. Продължителността на култивационния процес е 168 h (7 дни) предвид факта, че целевия продукт на култивирането е вторичният продукт ИОК. В хода на изследванията са използвани два различни по източници на индуктора: синтетичен L-триптофан и L-триптофан с микробиологичен произход.

Експерименталните резултати са показани на Фиг. 13 и Фиг. 14. Видно е, че и двата щама демонстрират сходни тенденции в динамиката на параметрите OD₆₀₀, pH и количество екзоцелуларен протеин, независимо от вида на индуктора. Наблюдава се стабилно увеличение на OD₆₀₀ (2 до 4 AU) до 24 h на култивирането, поддържане на pH стойностите в диапазона 4 - 6 и концентрацията на извънклетъчния протеин от около 8 - 10 mg/ml за вариантите със синтетичния индуктор и до 20 mg/ml за комплексната, богатата на протеини смес от микробиологично продуцирания L-триптофан. Тези данни показват, че периодът на култивиране от 168 h води до жизнеспособни култури със силен потенциал за биосинтеза на ИОК по време на стационарната фаза на растеж.

Динамиката на целевото производство на ИОК е проследена за същия период от 168 h. Експерименталните резултати за щам *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 с индуктор синтетичен L-триптофан са илюстрирани на Фиг. 13. Прави впечатление, че при

контролния вариант максималното количество ИОК от 4,2 $\mu\text{g/ml}$ е отчетено в края на процеса, на 168 h. С включването на индуктора в средата и с повишаване на неговата концентрация се наблюдава тенденция за увеличаване на добивите. При варианта с 0,01% L-триптофан, максималното количество продукт е 4,6 $\mu\text{g/ml}$, при 0,02% е малко над 5,0 $\mu\text{g/ml}$, а при 0,04% достига до 6,5 $\mu\text{g/ml}$.

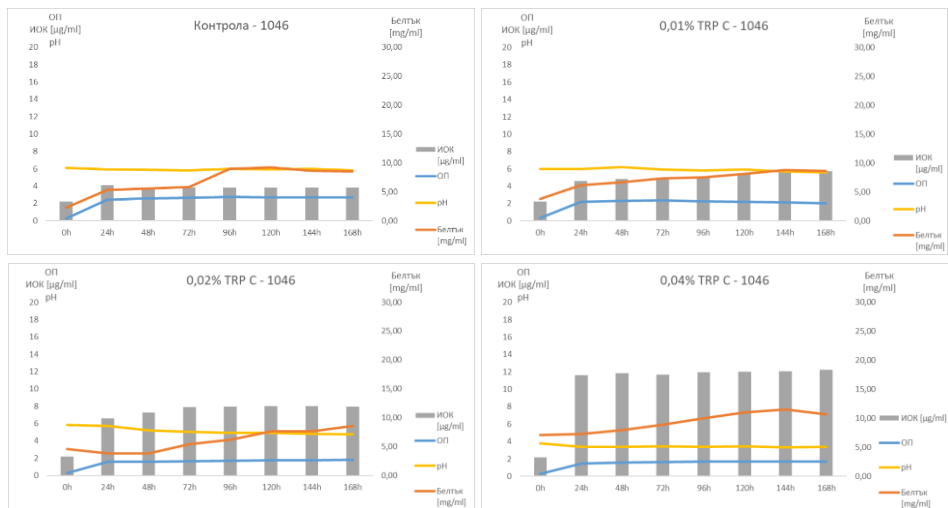


Фигура 13. Периодично култивиране на щам *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 с добавен индуктор синтетичен L-триптофан в концентрации 0,01%, 0,02% и 0,04%.

Вторият щам - *Pseudomonas yamanorum* 1046 е култивиран при аналогични условия и показва следните зависимости от добавянето на нарастващи концентрации на индуктора L-триптофан. При концентрация 0,01% синтетичен L-триптофан, количеството на ИОК нараства с развитие на култивационния процес, достигайки своята максимална стойност от 5,7 $\mu\text{g/ml}$ на 168 h. Във варианта, индуциран с 0,02% синтетичен L-триптофан, се забелязва тенденция за поддържане на относително постоянна концентрацията на ИОК след 72 часа, с максимум на 168 h от 8,0 $\mu\text{g/ml}$. При максималната концентрация на индуктора са достигнати максимални добиви ИОК от 12,3 $\mu\text{g/ml}$.

Като обща тенденция за ефекта на синтетичния L-триптофан върху биосинтезата на ИОК се наблюдава повишаване на добивите на ИОК с увеличаване на концентрацията на синтетичния L-триптофан в култивационната среда, независимо от щам-

продуцент. Това показва, че синтетичният L-триптофан е ефективен индуктор за повишаване на продукцията на изследваното БАВ.



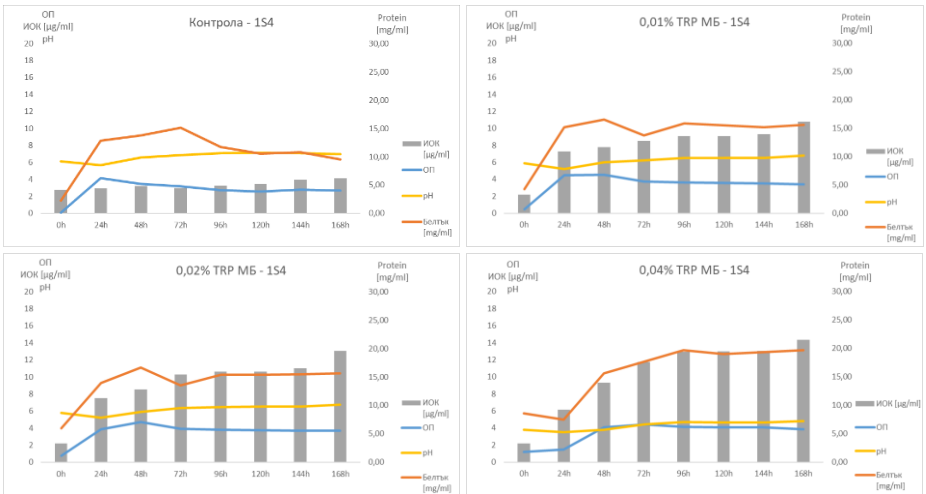
Фигура 14. Периодично култивиране на шам *Pseudomonas yamanorum* 1046 с добавен индуктор синтетичен L-триптофан в концентрации 0,01%, 0,02% и 0,04%.

При шам *Ps. chlororaphis* 1S4 тенденцията за увеличаване на количеството на целевия продукт с увеличаване концентрацията на индуктора, наблюдавана при синтетичния индуктор се запазва и при прилагането на микробен триптофан. Максималните добиви на ИОК при варианта с 0,01% индуктор са 10,8 µg/ml. При варианта с 0,02% микробен триптофан количеството ИОК към 168 h е малко над 13,0 µg/ml. С най-високо добиви отново е най-високата концентрация на индуктора 0,04% – 14,4 µg/ml.

При шам *Pseudomonas yamanorum* 1046 се наблюдава подобна зависимост. Количествата на продукта ИОК се увеличават с увеличаване на концентрацията на индуктора. При концентрация от 0,01% се отчитат 6,5 µg/ml ИОК, при 0,02% - 9,7 µg/ml и 16,9 µg/ml при най-високата концентрация на микробен триптофан.

Очевидно синтезът на ИОК зависи от екзогенната концентрация на L-триптофан и се регулира положително от присъствието на този индуктор. Трябва да се отбележи, че индуцирането на производството на ИОК с триптофан от микробен произход е много по-ефективно в сравнение със синтетичния вариант: концентрациите на ИОК

на културите с микробен триптофан надвишават тези в културите със синтетичния индуктор с 34 %.



Фигура 15. Периодично култивиране на щам *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 с добавен триптофан с микробен произход в концентрации 0,01%, 0,02% и 0,04%.



Фигура 16. Периодично култивиране на щам *Pseudomonas yamanorum* 1046 с добавен индуктор микробен триптофан в концентрации 0,01%, 0,02% и 0,04%.

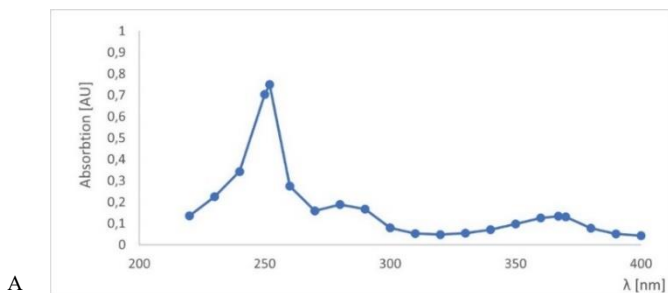
2.2. Продукция на феназин-1-карбоксилна киселина

Свойствата на биоконтролен агент, които шам *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 проявява срещу растителните микопатогени от род *Fusarium*, повдига въпроса за потенциалните фактори, които допринасят за този ефект. Продукцията на феназинови пигменти е свойство, което се свързва с антигъбното действие, дължащо се на техните антибиотични функции. Проучването на продукцията на феназин-1-карбоксилна киселина (РСА) от шам *Ps. chlororaphis* 1S4 е извършено на 24 h култури. В процеса на работа, при екстрахирането на продукта от изсушената утайка са наблюдавани директно с просто око и под микроскоп (увеличение 40x) кристални структури, типични за феназиновите производни (Фиг. 17).

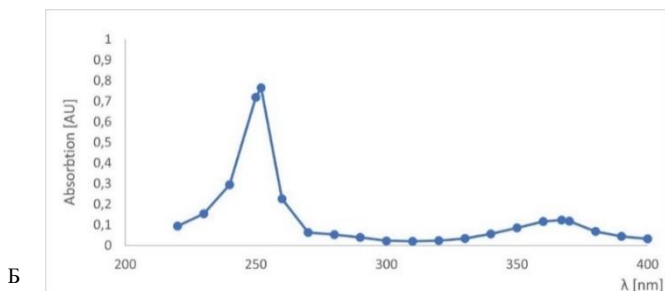


Фигура 17. Кристална структура на феназин-1-карбоксилна киселина, изолирана от 24 h култура на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4А) директно наблюдение Б) наблюдение под светлинен микроскоп, при увеличение 40x.

Построяването на спектралната крива на РСА в разтвор на 0,1N NaOH разкрива два абсорбционни максимума – при 252 nm и при 367 nm (Фиг. 33-А). Спектрална крива е построена както на нативна, така и на стерилизирана 24 h култура. Целта на стерилизацията е да се оцени запазването на спектралния профил (т.е. качеството/количеството на РСА), която по литературни данни е термоустойчива, поради наличието на 3 спрегнати ароматни ядра в структурата ѝ. Спектърът на поглъщане на РСА се запазва изцяло (Фиг. 33-Б) и този факт доказва термоустойчивостта ѝ.



А

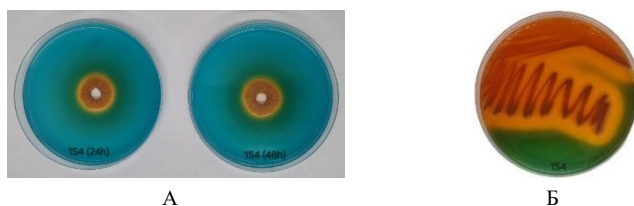


Фигура 18. УВ спектрална крива на феназин-1-карбоксилна киселина, изолирана от 24 h култура *Pseudomonas chlororaphis* 1S4. А - свежа/филтрирана културална течност, Б - стерилизирана културална течност.

На база на спектралните криви може да се предположи, че при периодичното култивиране на шам *Ps. chlororaphis* 1S4 за период от 24 h – 48 h в подходяща за щама хранителна среда, се стимулира продукцията на PCA, на която се дължи значителния инхибиторен ефект на щама срещу гъбните растителни патогени.

2.3. Продукцията на сидерофори

Способността на шам *Ps. chlororaphis* 1S4 да продуцира сидерофори е доказана по време на биохимичния скрининг. В допълнение на този анализ са изпитани два варианта на културална течност (24 h и 48 h) за оценка на динамиката на продукцията. Установи се, че продукцията е идентична и при двата варианта (Фиг. 22-А)



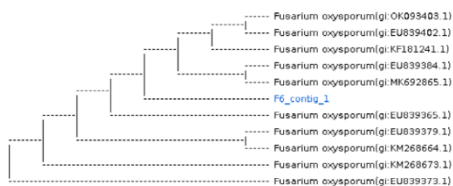
Фигура 19. Продукция на сидерофори от шам *Pseudomonas chlororaphis* 1S4. А - тест на 24 h култура (ляво) и на 48 h култура (дясно); Б - посев на 24 h култура върху CAS-агар.

2.4. Антигъбна активност на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046

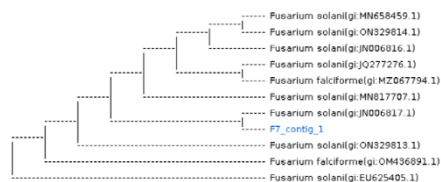
Представителите на род *Pseudomonas* притежават способността да произвеждат

БАВ с ефект на боифунгициди срещу икономически значими фитопатогени (Leon *et al.*, 2009). В настоящия труд е изследван антагонистичния ефект на *Ps. chlororaphis* 1S4 и *Ps. yamanorum* 1046 срещу икономически значими патогени от род *Fusarium*. Тествани са 24 h и 48 h периодични култури от всеки щам, като е оценен инхибиторният им ефект върху растежа и развитието на три вида от род *Fusarium* – *Fusarium proliferatum* C1 – изолат, предоставен от микробиологичната колекция на фирма РОМБ ООД и два представителя, изолирани в хода на настоящия дисертационен труд – *Fusarium oxysporum* F6 и *Fusarium solani* F7. Двата щам са изолирани през лятото на 2022 година от поле със силно заболяла царевица от региона на Северна България и са подложени на генетичен анализ на ITS регионите на 18S рРНК гените. Резултатите от този генетичен анализ на изолираните гъбни представители, морфологично определени като *Fusarium sp.*, са с достоверност 99,0%, като е показано на Фиг. 20.

- *Fusarium oxysporum* F6;



- *Fusarium solani* F7;

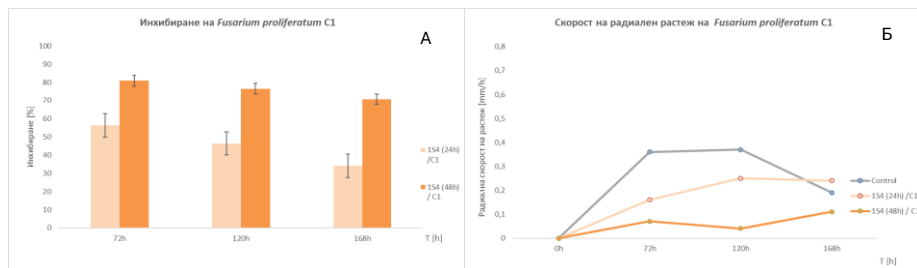


Фигура 20. Генетичен анализ на изолати от плесенни гъби, принадлежащи към род *Fusarium*.

За проследяване на ефекта на двата подбрани щама срещу представителите на род *Fusarium*, е проведено изследване за антигъбна им активност в *in vitro* условия. Оценката на инхибиторния капацитет е формирана въз основа на проследяване на параметъра радиална скорост на растеж на колонииите на патогенните представители и изчисляване на ефекта на инхибиране (в %). Резултатите са представени на Фиг. 21 - 27.

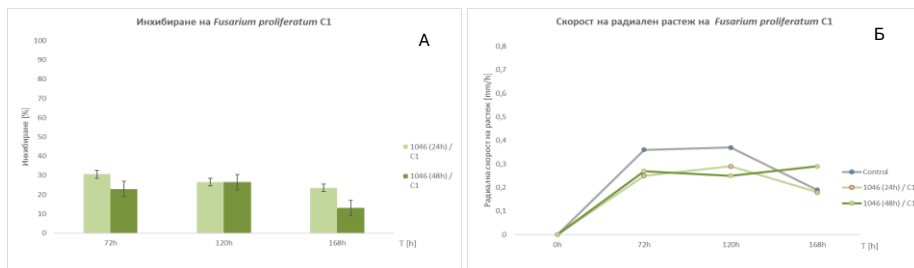
Максимален инхибиторен ефект срещу *F. proliferatum* C1 се наблюдава при вариант *Ps. chlororaphis* 1S4 (48 h) през първите 72 часа от експеримента, като се отчита над 80% инхибиране на растежа. При 24 h култура се запазва зависимостта за намаляване на ефекта във времето, с максимална стойност 56,31% в първите 72 часа (Фиг. 21А).

При показател радиална скорост растеж, за период от 168 часа, се наблюдава над 5-кратно забавяне при третиране с 48 h култура на *Ps. chlororaphis* 1S4 в първите 72 часа и 9-кратно такова в рамките на периода между 72 и 120 час (Фиг. 21Б).



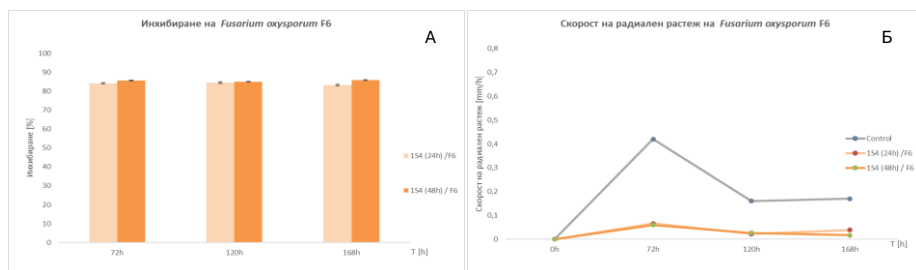
Фигура 21. Инхибиране (%) на растежа на *Fusarium proliferatum* C1 от щам *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 (А) и динамика на радиалната скорост на растеж на колонииите на щам *Fusarium proliferatum* C1 (Б).

Инхибиторният ефект на щам *Pseudomonas yamanorum* 1046 срещу *Fusarium proliferatum* C1 е по-слаб в сравнение с щам *Ps. chlororaphis* 1S4. Максималните стойности на инхибиране (30,56%) са регистрирани на 72 час при 24 h култура. При радиалната скорост на растеж не се наблюдават съществени изменения в динамиката на развитието на третираната гъбна култура (< 2 пъти) в сравнение с нетретираната контрола.



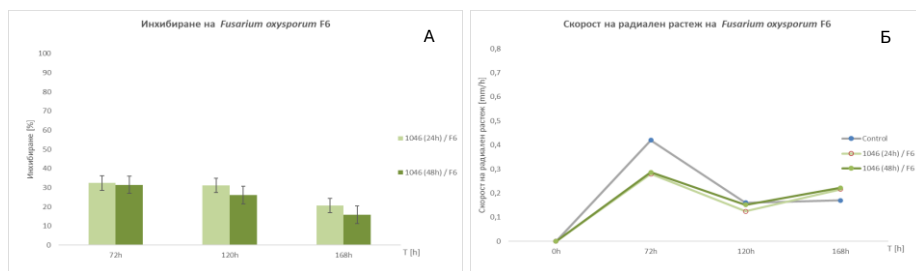
Фигура 22. Инхибиране (%) на растежа на *Fusarium proliferatum* C1 от щам *Pseudomonas yamanorum* 1046 (А) и динамика на радиалната скорост на растеж на колонииите на щам *Fusarium proliferatum* C1 (Б).

Инхибиторният ефект на двата щама срещу дивия щам *Fusarium oxysporum* F6 е оценен при експериментална постановка, като при *F. proliferatum* C1. Получените резултати са представени на Фиг. 23 и 24.



Фигура 23. Инхибиране (%) на растежа на *Fusarium oxysporum* F6 от щам *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 (A) и динамика на радиалната скорост на растеж на колонииите на щам *Fusarium proliferatum* C1 (Б).

Ps. chlororaphis 1S4 демонстрира силен инхибиторен ефект срещу *F. oxysporum* F6. Наблюдава се инхибиране от над 85%, при 48 h култура. Прави впечатление обаче, че разликата с 24 h култура е само 1%, което прави икономически неоправдано прилагането на варианта *Ps. chlororaphis* 1S4 (48 h). По отношение на радиалната скорост на растеж, 48 h култура забавя развитието на *F. oxysporum* F6 между 7 и 10 пъти. При варианта *Ps. chlororaphis* 1S4 (24 h) максималното забавяне на растеж на гъбния тест обект е 7 пъти.



Фигура 24. Инхибиране (%) на растежа на *Fusarium oxysporum* F6 от щам *Pseudomonas yamanorum* 1046 (A) и динамика на радиалната скорост на растеж на колонииите на щам *Fusarium oxysporum* F6 (Б).

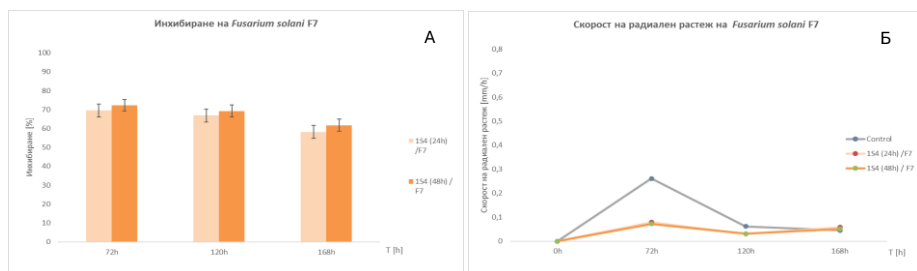
Ефектът на *Ps. yamanorum* 1046 срещу *F. oxysporum* F6 е представен на Фиг. 24. Щам *Ps. yamanorum* 1046 има по-слаб инхибиторен ефект срещу изолат *F. oxysporum* F6 в сравнение с щам *Ps. chlororaphis* 1S4. Тук се запазва зависимостта, която се наблюдава при *F. proliferatum* C1; по-активна е културата на *Ps. yamanorum* 1046 (24 h), като

максималните стойности на този показател са 32,38% през първите 72 часа от процеса. Вариантът *Ps. yamanorum* 1046 (48 h) достига максимално инхибиране от 31,49%. И при двата варианта се наблюдава намаляване на ефекта на инхибиране във времето.

Спрямо втория показател – радиалната скорост на растеж, шам *Ps. yamanorum* 1046 повлиява този показател най-силно през първите 72 часа от експеримента, забавяйки развитието на патогена по-малко от два пъти.

Резултатите от теста за антигъбна активност на представителите от род *Pseudomonas* срещу изолат *Fusarium solani* F7 са представени на Фиг. 25 и Фиг. 26.

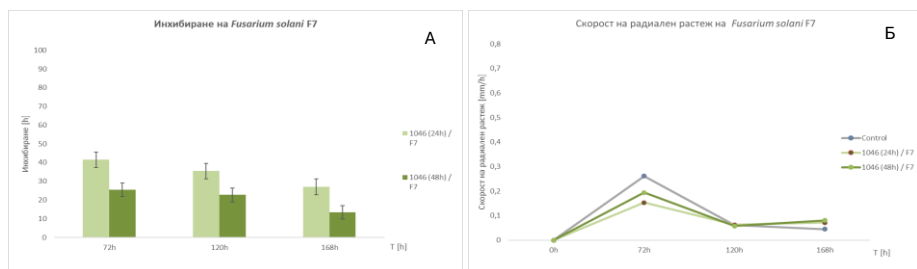
Ps. chlororaphis 1S4 демонстрира силен инхибиторен ефект и срещу шам *F. solani* F7. Отново по-силен инхибиращ ефект е представен от културата на *Ps. chlororaphis* 1S4 (48 h) – 72,31%, ефект, който се запазва до 120 h от експеримента. При *Ps. chlororaphis* 1S4 (24 h) максималният ефект на потискане е 69,54%. В рамките на първите 72 часа от процеса радиалната скорост на растеж на третираните култури е 4 пъти по-ниска и при двата варианта на *Ps. chlororaphis* 1S4 – 24 h и 48 h.



Фигура 25. Инхибиране (%) на растежа на *Fusarium solani* F7 от шам *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 (A) и динамика на радиалната скорост на растеж на колонииите на шам *Fusarium solani* F7 (B).

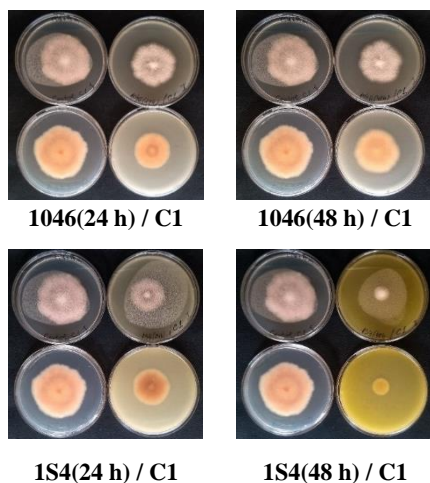
Шам *Ps. yamanorum* 1046 запазва тенденцията си за по-силна инхибиторна активност при по-младата култура. Максималното инхибиране на *F. solani* F7 се наблюдава при вариант *Ps. yamanorum* 1046 (24 h) – 41,43%. При радиалната скорост на растеж не се наблюдава значителна разлика спрямо контролния вариант, като стойностите по отношение на контролата са 35% по-ниски в сравнение с варианта с максимално инхибиране.

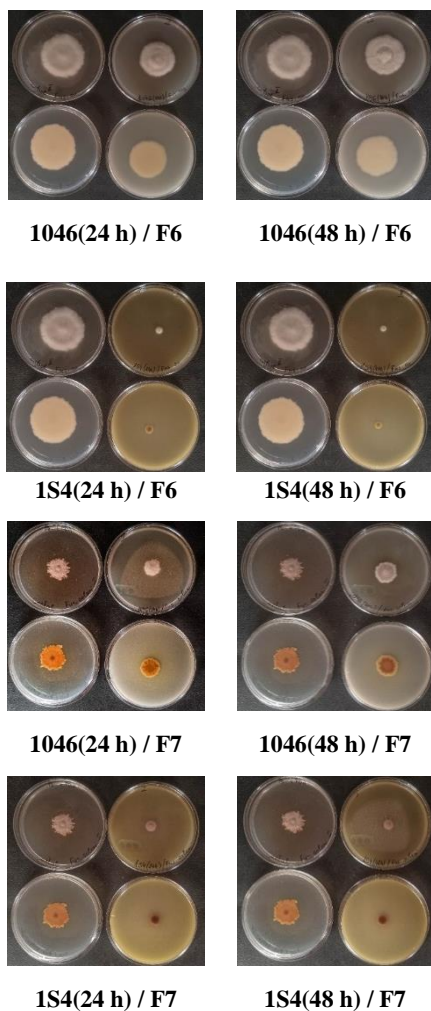
При проведения скрининг за наличие на антигъбна активност на шамовете *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046, по-високи стойности на инхибиране са отчетени при *Ps. chlororaphis* 1S4. Максималните стойности на инхибиране на *F. proliferatum* C1 са 80,85%, на *F. oxysporum* F6 – 85,92% и на *F. solani* F7 – 72,31%. Разликата между културите *Ps. chlororaphis* 1S4 (24 h) *Ps. chlororaphis* 1S4 (48 h) са практически незначителни срещу дивите шамове *F. oxysporum* F6 и *F. solani* F7 (от порядъка на 3%).



Фигура 26. Инхибиране (%) на растежа на *Fusarium solani* F7 от щам *Pseudomonas yamanorum* 1046 (А) и динамика на радиалната скорост на растеж на колонииите на щам *Fusarium solani* F7 (Б).

Отчетена е значителна разлика в скоростта на развитие на фитопатогените представители в тестовите и контролните варианти, третирани с *Ps. chlororaphis* 1S4. Тя достига до 10 пъти по-бавно развитие при щам *F. oxysporum* F6 и варира между 4 и 7 пъти при останалите два гъбни представителя. Този щам демонстрира потенциал за приложение като биоконтролен агент с фунгициден ефект. Щам *Ps. yamanorum* 1046 показва по-слаба антигъбна активност, достигаща до максимална стойност 41,43% при щам *F. solani* F7. Радиалната скорост на растеж е слабо повлияна при всички тестови варианти. При щам *Ps. yamanorum* 1046 се наблюдава ясно изразена зависимост на по-висока ефективност при 24 h часовата култура, което е икономически по-подходящия вариант за третиране. Илюстрация на коментираните по-горе зависимости може да се види и на Фиг. 42.



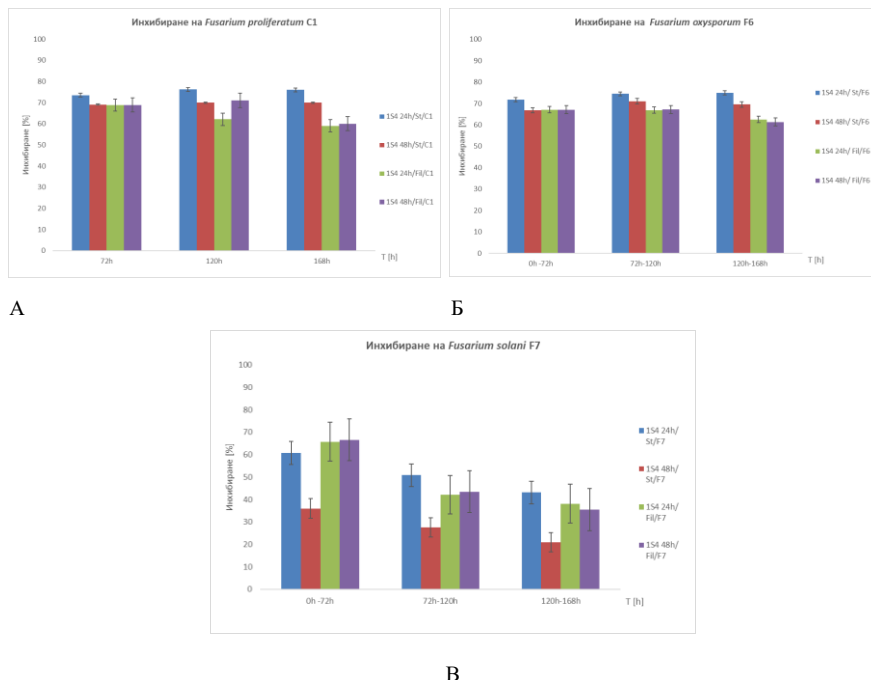


Фигура 27. Снимков материал, визуализиращ резултатите от антигъбната активност на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046 срещу растителни патогени от род *Fusarium*.

Ясният инхибиторен ефект срещу представителите от род *Fusarium* подчертава потенциала на щам *Ps. chlororaphis* 1S4 да бъде интегриран в устойчивите земеделски

практики.

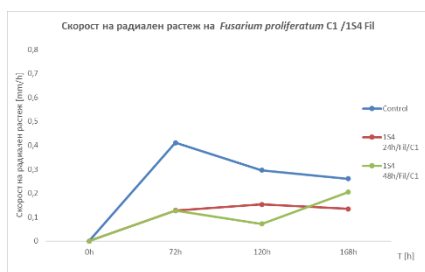
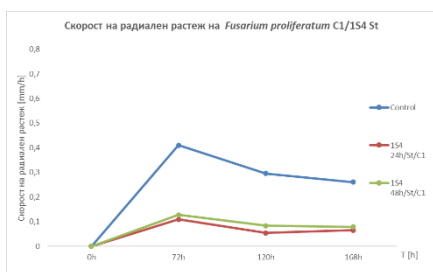
Тъй като РСА и сидерофорите са екзоцелетъчни метаболити, двата варианта на културална течност – 24 h и 48 h, са подложени на процеси за елиминиране на бактериалната биомаса - филтрация/стерилизация на културална течност. Така обработените култури са тествани за фунгициден ефект срещу представителите от род *Fusarium*. Резултатите от експеримента са представени на Фиг. 28.



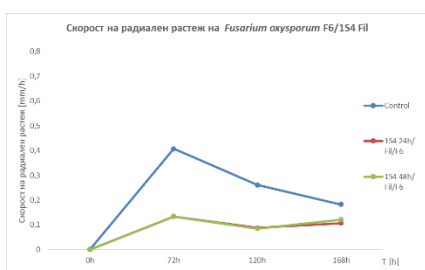
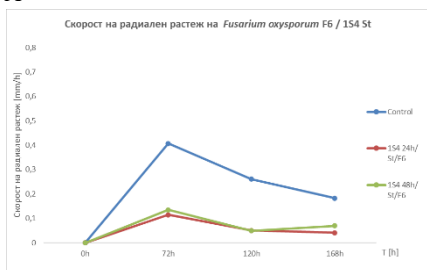
Фигура 28. Инхибиторен ефект на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 – стерилизирана (St) и филтрирана (Fil) култура срещу: А - *Fusarium proliferatum* C1, Б - *Fusarium oxysporum* F6 и В - *Fusarium solani* F7. Инхибиторният ефект е изчислен спрямо растежа на нетретирана контрола.

Инхибирането на растежа на *Fusarium proliferatum* C1 се запазва при използването на филтрат от културалната течност с ефективност в диапазона 60,06 – 71,25%. При експериментите с *Fusarium oxysporum* F6, максимален инхибиращ ефект е постигнат с 48 h филтрат на културална течност – 67,18%. Растежът на *Fusarium solani* F7 е инхибиран най-ефективно от 48 h филтрат на *Ps. chlororaphis* 1S4 (с 66,62%). В първите 72 часа от процеса радиалната скорост на растеж е три пъти по-ниска спрямо контролната.

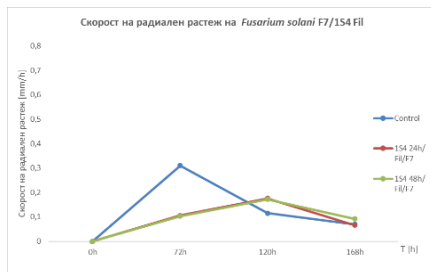
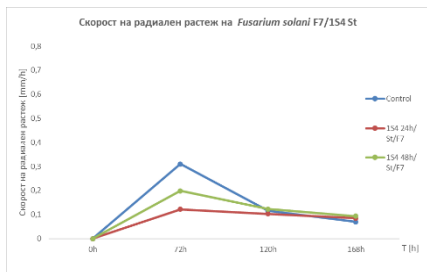
При прилагането на стерилизирана култура *Ps. chlororaphis* 1S4 срещу щам *F. proliferatum* C1 е постигнат инхибиторен ефект в диапазона 69,05% - 76,25%, като най-висока стойност е отчетена при вариант *Ps. chlororaphis* 1S4 (24 h) St. Радиалната скорост на растеж е 4 пъти по-ниска от контролната - резултати, които са съизмерими с тези при нестерилизирана културалната течност на *Ps. chlororaphis* 1S4. При този гъбен вид се наблюдава интересно явление – при 24 h култура на *Ps. chlororaphis* 1S4 инхибирането на гъбния патоген се увеличава след обработка, която включва премахване на клетъчната биомаса: при *Ps. chlororaphis* 1S4 (24 h) – 56,31%, при *Ps. chlororaphis* 1S4 (24 h) Fil – 68,81% и при *Ps. chlororaphis* 1S4 (24 h) St – 76,25%. При *F. oxysporum* F6 максималният инхибиращ ефект е отчетен при вариант *Ps. chlororaphis* 1S4 (24 h) St – 74,97%, с вариране на ефекта в границите 66,86% - 74,97%. Антигъбната активност на *Ps. chlororaphis* 1S4 срещу щам *F. solani* F7 също се запазва. Максимален инхибиращ ефект се наблюдава при 24 h стерилизирана култура, постигайки 60,80% потискане. Радиалната скорост на растеж на *F. solani* F7 е слабо повлияна, с 37% намаляване спрямо контролния вариант.



A

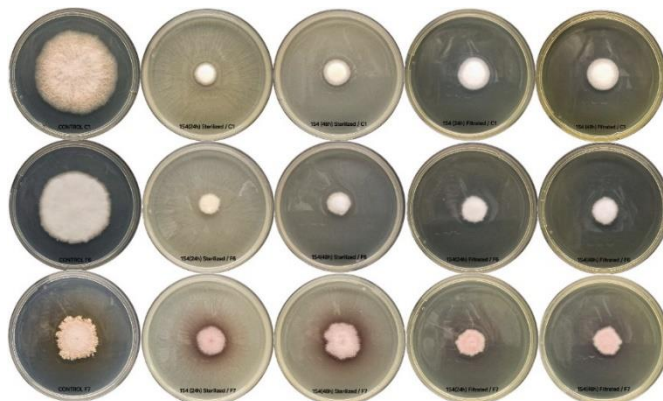


Б



В

Фигура 29. Радиална скорост на растеж на А - *Fusarium proliferatum* C1, Б - *Fusarium oxysporum* F6 и В - *Fusarium solani* F7, третирани с 24 h и 48 h култура на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 във варианти филтрат (Fil) и стерилизирана култура (St).



Фигура 30. Визуално представяне на ефекта на инхибиране на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 – стерилизирана култура и филтрирана културална течност, върху А - *Fusarium proliferatum* C1, Б - *Fusarium oxysporum* F6 и В - *Fusarium solani* F7.

В Таблица 5 е показана корелационната връзка между променливите възраст на бактериалната култура и инхибирането на растежа на гъбните представители от р. *Fusarium*, третирани с различни варианти от бактериалните култури.

Таблица 4. Корелационни коефициенти, демонстриращи връзката на възрастта на културата *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и инхибирането на растежа на растителните патогени от род *Fusarium*.

Възраст на бактериалната култура Данни за гъбния шам (% инхибиране)	24 h			48 h		
	Свежа култура	Стерилизирана култура	Филтрирана култура	Свежа култура	Стерилизирана култура	Филтрирана култура
<i>F. proliferatum</i> C1	0,832306	0,855726	0,804308	0,83894	0,853242	0,795369
<i>F. oxysporum</i> F6	0,750935	0,705175	0,630442	0,760982	0,658245	0,600843
<i>F. solani</i> F7	0,749637	0,851647	0,761761	0,773195	0,842985	0,770122

В хода на нашите експерименти са отчетени корелационни коефициенти в обхвата, отговарящ на силна до много силна корелация, които доказват връзката между възрастта на културата, вида на нейната обработка и ефекта ѝ на инхибиране на гъбния растеж.

- 2.5. Оптимизиране на запазването и стабилността на биологично активните ферментационни продукти от *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046

Лиофилизация

За осъществяване на процес на лиофилизация е проведено периодично култивиране на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046 за период от 24 часа в оптимална за шамовете ферментационна среда с добавен криопротектор 10% сухо мляко. Ефективността на процеса е проследена по критерий запазване на жизнеспособност на културите. Резултатите от процеса на лиофилизация на *Ps. chlororaphis* 1S4 и *Ps. yamanorum* 1046 са представени в Табл. 6.

При лиофилизация на изследваните представители от род *Pseudomonas* се наблюдава намаляване на броя жизнеспособни клетки и при двата шамата. При *Ps. chlororaphis* 1S4 активността намалява само с порядък и половина, а при *Ps. yamanorum* 1046, с два порядъка.

Разпрашително сушене

Изследваните шамове демонстрират висока степен на преживяемост след процес на разпрашително сушене, която е в рамките на два порядъка по-ниски стойности,

спрямо CFU преди процеса на сушене (Табл. 7). Тези данни показват висока ефективност на този процес като подход за получаване на прахообразни биопродукти.

Таблица 5. Резултати от процеса на лиофилизация на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046.

Щам	Общо количество култ. течност [ml]	Маса – лиофилизат [g]	АСВ [%]	CFU преди лиофилизация	CFU след лиофилизация
1S4	320 ml	11,97 g	91,61%	$1 \cdot 10^9$	$6,4 \cdot 10^7$
1046	320 ml	11,80 g	92,04 %	$3,2 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^6$

Таблица 6. Резултати от процес на разпрашително сушене на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046.

Щам	Общо количество култ. течност [L]	Маса – сух продукт [kg]	АСВ [%]	CFU преди сушене	CFU след сушене
1S4	200 L	7,8 kg	89,24%	$4 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^7$
1046	200 L	6,8 kg	87,14%	$2 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^6$

3. PGP-потенциал на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum*: 1046 растително-микробна симбиоза с технически култури и декоративни растения

За оценка на PGP – потенциала на бактериите, обект на изследването в настоящия дисертационен труд са проведени тестове с моделни растителни системи в различни фази на вегетационния им период.

- 3.1. Прорастване на семена от технически култури

Прорастване на семена на царевица (*Zea mays*) в рулони

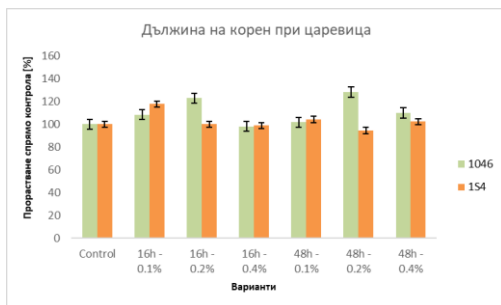
В настоящия дисертационен труд са проведени експерименти с моделна система семена на царевица (*Zea mays*) (Dekalb – DKC 5830 HD (Hybrid 101)), третиран с

бактериални култури на щам *Pseudomonas yamanorum* 1046 и щам *Pseudomonas chlororaphis* 1S4.

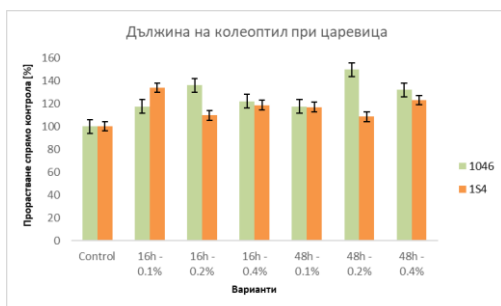
Оценката на PGP – ефекта е формирана на база на растителните биометрични показатели, индекса на жизнестойност и степента на взаимодействие, представена чрез корелационен анализ (Фиг. 31 – 35).

Дължина на корен: стойностите на растежния показател „дължина на корен“ са представени на Фиг. 31. Те визуализират положителния ефект на бактериалните култури върху растителната физиология. При щам *Ps. yamanorum* 1046 този ефект е най-добре представен при третиране с 0,2% разтвор. Наблюдава се повишаване от 22,87% за 16 h култура и 28,33% за 48 h.

При щам *Ps. chlororaphis* 1S4 най-високи стойности за този показател се наблюдават при вариантите, третиран с 0,1% бактериална суспензия, повишаването е със 17,70% за 16 h култура и 4,44% за 48 h.

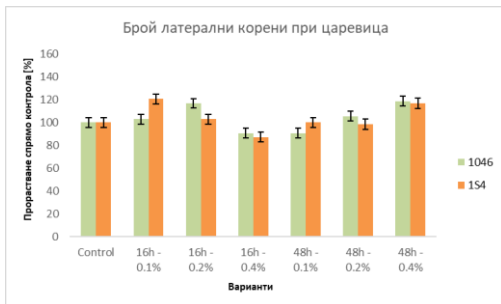


Фигура 31: PGP – ефект на щамове *Pseudomonas yamanorum* 1046 и *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 върху прорастването на семена от царевица, оценен чрез показател дължина на корена.



Фигура 32: PGP – ефект на щамове *Pseudomonas yamanorum* 1046 и *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 върху прорастването на семена от царевица, оценен чрез показател дължина на колеоптила.

Дължина на колеоптил: данните показват, че при шам *Ps. yamanorum* 1046 и трите тествани концентрации демонстрират положителен ефект върху растежа му (Фиг. 47). Стойностите индикират повишаване на този растежен показател между 17,4% и 49,6%. Тенденцията за най-добър стимулиращ ефект на 0,2% концентрация, наблюдавана при дължината на корена, се наблюдава и при този показател. Установено е повишаване от 35,96% за 0,2% и 49,56% за 0,4% суспензия. При шам *Ps. chlororaphis* 1S4 максимален ефект на промотиране се наблюдава при 0,1% концентрация на 16 h суспензия – 33,72%, резултат който се наблюдава и при показателя дължината на корена.



Фигура 33: PGP – ефект на шамове *Pseudomonas yamanorum* 1046 и *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 върху прорастването на семена от царевица, оценен чрез показател брой латерални корени.

Брой латерални корени: третият индекс, използван за оценка на прорастването на царевичните семена показва относително по-нисък стимулиращ ефект 2,78% - 18,60%, при третиране с шам *Ps. yamanorum* 1046.

При шам *Ps. chlororaphis* 1S4 най-високият брой латерални корени е отчетен при вариант на 16 h - 0,1% - 20,45% повече, спрямо контролния вариант.



Фигура 34: PGP – ефект на шамове *Pseudomonas yamanorum* 1046 и *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 върху прорастването на семена от царевица, оценен чрез показател индекс на жизненост.

Индекс на жизненост: Стойностите при вариантите на *Ps. chlororaphis* 1S4 са най-високи за 16 h, при концентрация 0,1% - 1584,58 и за 48h, при концентрация 0,4% - 1138,02.

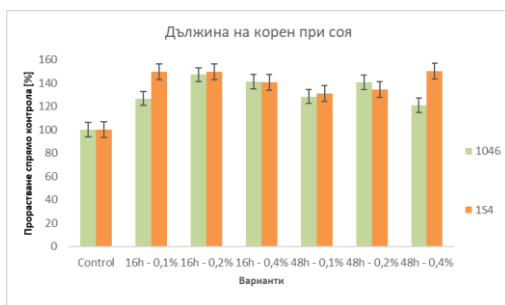
Корелационен анализ: В количествен аспект корелационният коефициент може да бъде оценен като много силен, тъй като стойностите му попадат в границите от 0,9 – 1,0 за 16 h култури, и от 0,4 до 1,0 за 48 h култури (Табл. 8).

Таблица 7. Данни от проведен корелационен анализ на 16 h и 48 h култури на моделните щамове в моделна система царевица.

Корелация	Корен	Колеоптил	Латерални корени	Индекс на жизненост
1046 16h	0,98927	0,99982	0,95572	0,975104
1046 48h	0,89168	0,99194	0,36147	0,907166
1S4 16h	0,78429	0,77401	0,79312	0,736771
1S4 48h	0,60912	0,65450	0,34091	0,543061

Прорастване на семена от соя (*Glycine max* L) в рулони

Като втора растителна моделна система са използвани семена на соя (*Glycine max* L). Растителните биометрични показатели за оценка на кълняемостта на семената, които са следени в процеса са дължина на корен, дължина на епикотил, дължина на хипокотил, всички отчетени процентно спрямо нетретирана контрола. Изчислен е и индекс на жизненост.

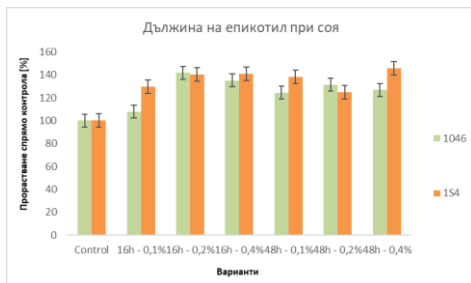


Фигура 35: PGP – ефект на щамове *Pseudomonas yamanorum* 1046 и *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 върху прорастването на семена от соя, оценен чрез показател дължина на корена.

Дължина на корен: Наблюдава се положителния ефект на двата щам при всички варианти на третиране. При щам *Ps. chlororaphis* 1S4 се наблюдава повишаване

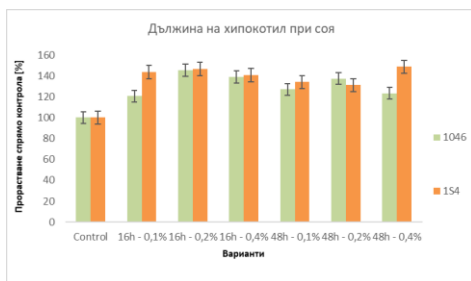
на този показател между 31,20% - 50,34%, като най-висок е ефекта при концентрация 0,4% за 48 h култура.

При шам *Ps. yamanorum* 1046 се наблюдава отново положителен ефект във всички варианти на третиране. Този ефект варира между 20,97% и 47,23%. Най-добър ефект при 16 h култура се наблюдава при 0,2% концентрация – 47,23% повишаване дължината на корена.



Фигура 36. PGP – ефект на шамове *Pseudomonas yamanorum* 1046 и *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 върху прорастването на семена от соя, оценен чрез показател дължина на епикотила.

Дължина на епикотил: *Ps. chlororaphis* 1S4 оказва ефект в границите 24,69% - 45,54%. Най-добрият резултат се наблюдава при варианта – 0,4% 48 h – 45,54%. При *Ps. yamanorum* 1046 най-добър ефект се наблюдава при вариант 0,2% 16 h – 41,90%.



Фигура 37. PGP – ефект на шамове *Pseudomonas yamanorum* 1046 и *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 върху прорастването на семена от соя, оценен чрез показател дължина на хипотила.

Дължина на хипокотил: третият показател е дължината на хипокотила. При третиране с *Ps. chlororaphis* 1S4 най-добър ефект се наблюдава при 0,4% за 48 h – 48,64%. При третиране с *Ps. yamanorum* 1046, най-добри резултати се регистрират при концентрация 0,2% 16h – 45,34%.



Фигура 38. PGP – ефект на шамове *Pseudomonas yamanorum* 1046 и *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 върху прорастването на семена от соя, оценен чрез показател индекс на жизнест.

Индекс на жизнест. Най-високата стойност на индекса при шам *Ps. chlororaphis* 1S4 е регистрирана при вариант 0,4% 48h – 3838,88, последвана от вариант 0,2% 16 h – 3533,73 при контролен индекс 1013. При шам *Ps. yamanorum* 1046 максималната стойност на този показател се наблюдава при вариант 0,2% 16 h – 3385,89, последван от 0,4% 16 h – 2730,08.

Корелационен анализ: въз основа на осъществения експеримент и получените от него данни за основните биометрични показатели на културата, е проведен корелационен анализ. Резултатите, представени в Табл. 9 доказват положителната връзка между двата микроорганизма, растежните параметри на растителната коренова система и индекса на жизнест. В количествен аспект корелационният коефициент може да бъде оценен като много силен, тъй като стойностите му попадат в границите от 0,86 – 0,99 за 16 h култури и от 0,63 до 0,99 за 48 h култури.

Таблица 8. Данни от проведен корелационен анализ за ефектите на двете култури в моделна система соя.

Корелация Шам	Корен	Епикотил	Хипокотил	Индекс на жизнест
1046 16h	0,99716	0,94062	0,99859	0,96090
1046 48h	0,97399	0,95186	0,96877	0,99714
1S4 16h	0,86691	0,96391	0,89292	0,92395
1S4 48h	0,90701	0,63465	0,82493	0,79099

Прорастване на пшеница в агар

Като трета растителна моделна система са използвани семена на пшеница (*Triticum aestivum*), поставени в агарова среда (Maeda *et al.*, 2021), които се третират с

разтвори на двата бактериални щама в работни концентрации 0,1%, 0,2% и 0,4%. Като контролен вариант са използвани семена, наkisнати във вода. Резултатите от проведения експеримент са изобразени на Фиг. 39 – 42.

При третирането на семената с *Ps. yamanorum* 1046 максимални стойности за параметъра дължина на корен са постигнати при вариант 16 h 0,2% - 46% над контролния вариант. При броя на страничните корени се наблюдава значително повишаване на броя им при същия вариант на третиране – 250%. Третият показател е надземната част и максималните и размери при третиране с щам *Ps. yamanorum* 1046 са постигнати отново при концентрация 0,2% на 16 h култура – 15% повече, спрямо контролата.



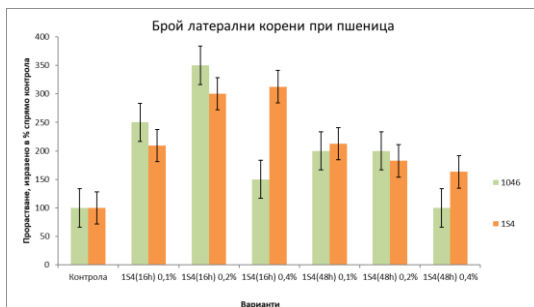
Фигура 39. PGP – ефект на щамове *Pseudomonas yamanorum* 1046 и *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 върху прорастването на семена от пшеница, оценен чрез показател дължина на корен.



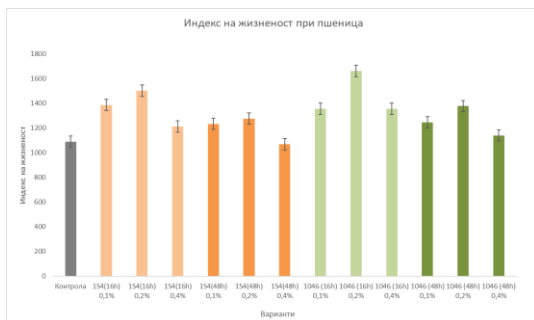
Фигура 40. PGP – ефект на щамове *Pseudomonas yamanorum* 1046 и *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 върху прорастването на семена от пшеница, оценен чрез показател надземна част.

Получените резултат за *Ps. chlororaphis* 1S4 също демонстрират положителния му ефект върху прорастването на пшеничените семена. Първият показател – средна дължина на корена достига максимална стойност при третиране с 16 h 0,2% - 39% над контрола. Максимален резултат за броя на латералните корени е отчетен при варианта на по-

високата концентрация на 16 h култура – 0,4% - 313%. Разликата между стойностите при по-високата концентрация и тези при по-ниската е 13%, което икономически не оправдава прилагането на по-високата концентрация на продукта. При третия показател – надземна част, не се наблюдават големи разлики в сравнение с контролния вариант, като най-високата стойност на този показател е отчетена при 16 h 0,2% - 13% над контрола.



Фигура 41. PGP – ефект на щамове *Pseudomonas yamanorum* 1046 и *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 върху прорастването на семена от пшеница, оценен чрез показател брой латерални корени.



Фигура 42. PGP – ефект на щамове *Pseudomonas yamanorum* 1046 и *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 върху прорастването на семена от пшеница, оценен чрез показател индекс на жизненост.

Следващият показател е индексът на жизненост, който потвърждава положителния ефект на изследваните микроорганизми върху моделната система (Фиг. 59). Най-високата стойност на индекса при *Ps. chlororaphis* 1S4 е регистрирана при вариант 0,2% 16h – 1503,12, сравнена с контролен индекс 1090. *Ps. yamanorum* 1046 достига максимална стойност на този показател при вариант 0,2% 16 h – 1662,59.

Проведеният корелационен анализ показва много висока степен на корелация със стойности между 0,9 и 1,0.

Таблица 9. Данни от проведен корелационен анализ за ефектите на двете култури в моделна система пшеница.

Корелация	Корен	Странични корени	Надземна част	Индекс на жизненост
1046 16h	0,98885	0,99339	0,98198	0,99913
1046 48h	1	0,86603	0,96077	0,99887
1S4 16h	0,93783	0,99865	0,99902	0,96887
1S4 48h	0,96347	0,70898	0,98198	0,95439

На база на проведените опити с прорастване на семена в различни субстрати, получените резултати под формата на биометрични показатели и проведените корелационни анализи, може да се направи заключението, че най-подходящи за използване са вариантите на 16 h култури и при двата щама с оптимална концентрация за третиране – 0,02%.

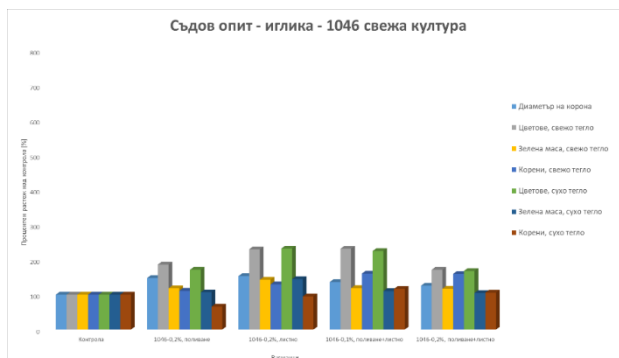
3.2. Оценка на растително-микробната симбиоза със саксийни декоративни растения

Съдов опит с обикновена иглика (*Primula vulgaris*)

За експеримента са използвани свежи 16 h култури на *Ps. chlororaphis* 1S4 и *Ps. yamanorum* 1046. Третиранията на растенията са започнати във фаза разсад (5-6 лист) и осъществени на всеки 20 дни до края на вегетационния период. Изследвани са следните варианти на третиране:

- Контрола – третирана с минерален разтвор за хранене (NPK);
- 1046 – 0,2% - поливане;
- 1046 – 0,2% - листно пръскане;
- 1046 – 0,1% - поливане + листно пръскане;
- 1046 – 0,2% - поливане + листно пръскане;
- 1S4 – 0,2% - поливане;
- 1S4 – 0,2% - листно пръскане;
- 1S4 – 0,1% - поливане + листно пръскане;
- 1S4 – 0,2% - поливане + листно пръскане;

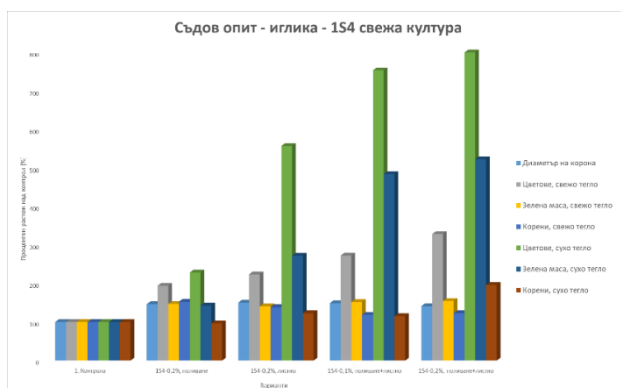
За да се установи ефектът на изследваните микроорганизми са измерени следните биометрични показатели на растенията – диаметър на растението, обиколка на короната, тегло на цветовете, тегло на зелената маса, тегло на корените на свежо/сухо растение.



Фигура 43. Третиране на *Primula vulgaris* със свежа култура на *Pseudomonas yamanorum* 1046.

Получени са следните резултати: най-високи стойности за диаметъра на короната са измерени при варианта, третиран листно с 0,2% *Ps. yamanorum* 1046 – 53%. Спрямо теглото на цветовете, най-тежки са тези във вариант *Ps. yamanorum* 1046 0,1% поливане + листно третиране – 32% над контролата. Най-високо тегло на зелените части е отчетено при растенията, третирани листно с 0,2% разтвор – 43%, а най-високо тегло за корените е отчетено при комбинираното третиране – поливане и пръскане, като между двете концентрации има 1% разлика, максималното повишаване на този показател е 60%.

Всички тези резултати показват влиянието на щам *Pseudomonas yamanorum* 1046 върху философерата на растението и потенциала му за приложение като листен тор.



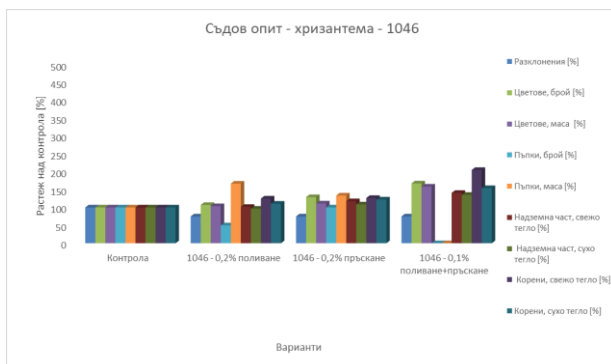
Фигура 44. Третиране на *Primula vulgaris* със свежа култура на *Pseudomonas chlororaphis* 154.

При същите експериментални условия е тестван ефекта на шам *Pseudomonas chlororaphis* 1S4. При първия показател – диаметър на короната, няма значителна разлика между различните варианти. Значителна разлика спрямо контрола се наблюдава при теглото на свежите цветове, които във варианта *Ps. chlororaphis* 1S4 – 0,2% - поливане + листно пръскане, достигат тегло 228% над контролата. При теглото на зелената маса най-високо е при растенията от вариант 0,2% поливане + пръскане – 54%. Максимално тегло на корените от 52% над контролния вариант се наблюдава при третиране само чрез поливане.

Съдов опит с хризантеми (*Chrysanthemum indicum*)

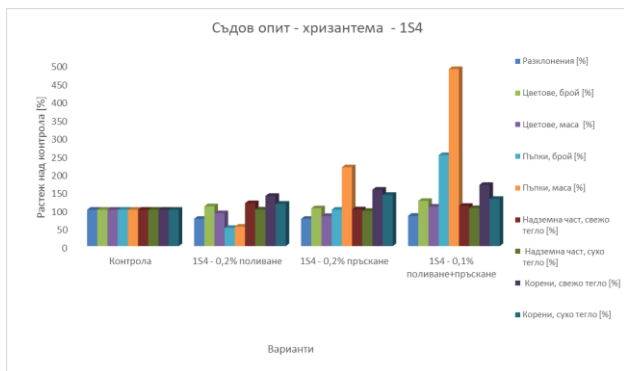
Проведен е съдов опит с растения от вида *Chrysanthemum indicum*. За целите на експеримента са подготвени свежи 16 h култури на *Ps. chlororaphis* 1S4 и *Ps. yamanorum* 1046. Третиранията на растенията започват във фаза разсад и се осъществяват на всеки 20 дни, до края на вегетационния период.

За отчитане ефекта на изследваните шамове са проследени подходящи за растенията и процеса биометрични показатели – брой разклонения, обиколка на растението, брой и маса на цветовете, брой и маса на пъпките, тегло на зелената маса на растението и тегло на изсушената зелена маса, тегло на свежи и сухи корени. Резултати получени по време на експеримента са представени на Фиг. 45 – Фиг. 47.



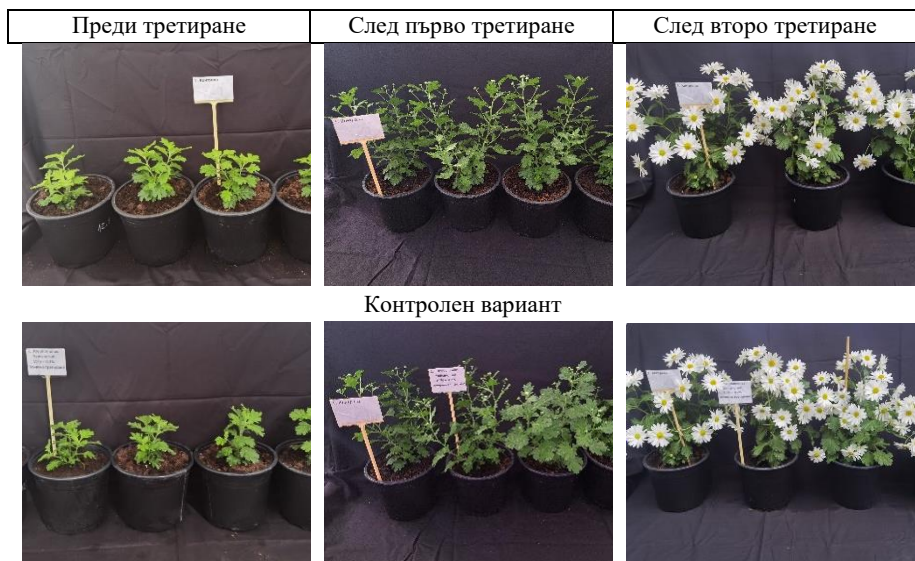
Фигура 45. Третиране на *Chrysanthemum indicum* с шам *Pseudomonas yamanorum* 1046.

При растенията от вида *Chrysanthemum indicum*, шам *Ps. yamanorum* 1046 при вариант на поливане с 0,2% разтвор на културална течност се наблюдават по-висока маса на пъпките, както и по-високо тегло на корените. Това са явления, които се дължат на действието на фитохормоните, продуцирани от микроорганизма.



Фигура 46. Третиране на *Chrysanthemum indicum* с щам *Pseudomonas chlororaphis* 1S4.

При щам *Ps. chlororaphis* 1S4 отново се откроява варианта на комбинация между поливане и пръскане с разтвор с концентрация 0,1% - броя на пъпките са 140%, а масата им - близо 400% по-тежки от контролата. Точно този показател при цъфтящи декоративни растения е особено важен, защото той определя по-голяма част от търговския им вид, изключително важен фактор в подобен тип производство.



Pseudomonas yamanorum 1046 0,2% - поливане



Pseudomonas yamanorum 1046 0,2% - листно третиране



Pseudomonas yamanorum 1046 0,1% - комбинирано поливане и листно третиране



Pseudomonas chlororaphis 1S4 0,2% - поливане



Pseudomonas chlororaphis 1S4 0,2% - листно третиране

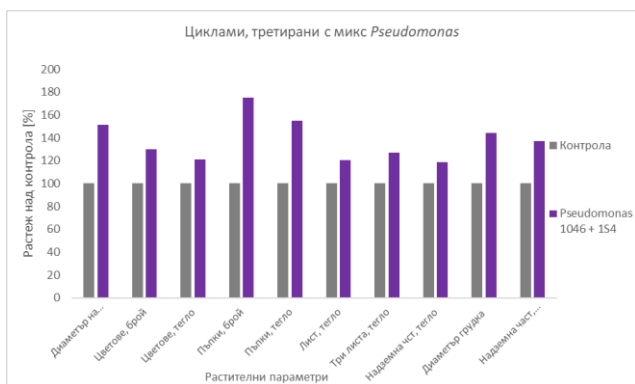


Pseudomonas chlororaphis 1S4 0,1% - комбинирано поливане и листно третиране

Фигура 47. Снимков материал от проведения експеримент по третиране на *Chrysanthemum indicum* с *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046

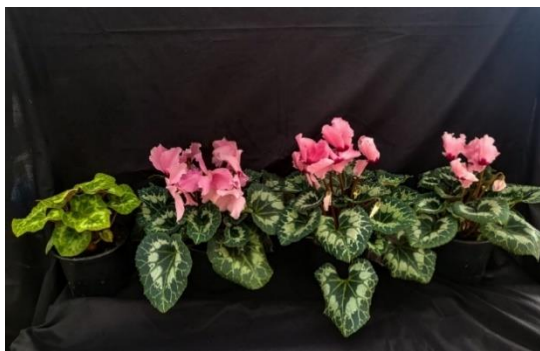
Съдов опит с циклама (*Wadiv cyclamen*)

При трети вариант на моделна система циклама (*Wadiv cyclamen*) е тестван вариант с комбинация от двата щама в концентрация 0,2%, при почвено третиране. Третирането на растенията е стартирано във фаза разсад, поливането с тестовите разтвори се осъществява през 14 дни до края на вегетацията на растението. За да се проследи ефекта на комбинацията от двата щама са следени параметрите диаметър на растението, брой и тегло на цветовете, брой и тегло на пъпките, средно тегло на 3 листа, тегло на надземна част, диаметър на грудката, тегло на суха надземна част. Резултати от експеримента са представени на Фиг. 66 – Фиг. 67.



Фигура 48. Третиране на *Wadiv cyclamen* с комбинация от щамове *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046.

Комбинацията от двата щама демонстрира положителен ефект върху всички следени биометрични показатели на растенията. Диаметърът на короната на растението е с 51% по-голям при третираните варианти. Броя на цветовете и тяхното тегло също се повишават, съответно с 30% и с 21%. Броят на пъпките се увеличава със 75%, а теглото им с 55%. Средното тегло на листата също е повишено с 26%. Диаметърът на грудките е 45% над контролния вариант, а общата изсушена биомаса е по-тежка с 37%. Всички тези показатели и положителните им стойности показват цялостното по-добро развитие на третираните растения и способността на двата щама да работят „в екип“.



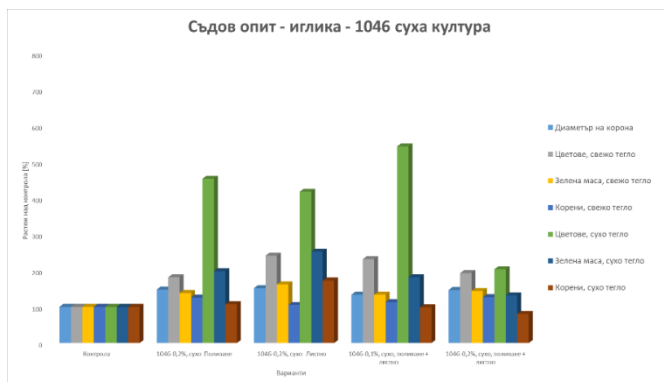
Фигура 49. Снимков материал от проведения експеримент по третиране на *Wadiv cyclamen* с комбинация от шамове *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046.

Съдов опит с иглика (*Primula vulgaris*) и изсушени култури на шамове *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046

PGP – ефектът на сухите прахообразни форми от изследваните микроорганизми е тестван чрез съдов опит върху растителен обект *Primula vulgaris* – иглика. Подбрани са варианти за третиране, които са изпълнени със свежа култура, за да се сравни резултата между двете форми.

Подготвени са разтвори на културите, чрез рехидратиране на прахообразната форма към начален обем (основен разтвор), от който са приготвени необходимите концентрации – 0,1% и 0,2%. Третирането на растенията започва във фаза разсад – 5-6 лист. Осъществява се третиране на всеки 20 дни до края на вегетацията на растенията.

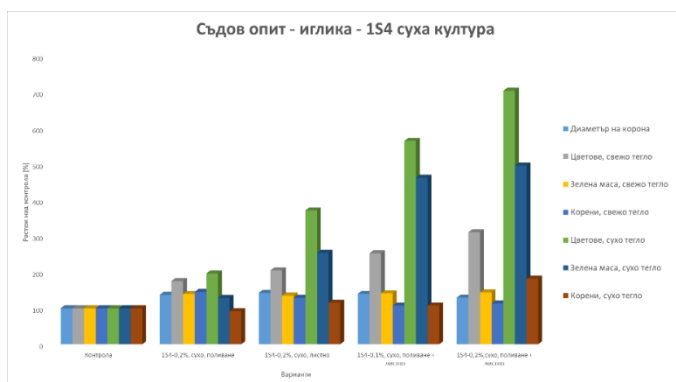
За оценка на ефекта при третиране със сухите варианти на изследваните шамове са проследени биометричните показатели на растенията – диаметър на растението, обиколка, тегло на тегло на свежата и сухата зелена маса, тегло на корените – свежи и изсушени. Резултатите са представени на Фиг. 50 и 51.



Фигура 50. Третиране на *Primula vulgaris* с препарат от *Pseudomonas yamanorum* 1046 в суха форма.

При третиране на тестовите обекти със сухата форма на щам *Ps. yamanorum* 1046 се наблюдават положителни ефекти, като вариант 0,1% поливане + листово третиране теглото на сухите цветове е с 450% по-голямо в сравнение с контролния вариант.

При третиране със сухата форма на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 максимални резултати са постигнати при 0,2% - *Ps. chlororaphis* 1S4 сухо – поливане + листово третиране- над 300% увеличение в теглото на цветовете в свежата им форма и над 700% при изсушените цветове.



Фигура 51. Третиране на *Primula vulgaris* с препарат от *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 в суха форма.

Всички тези растителни показатели демонстрират PGP-ефекта на изследваните микроорганизми след преминаване на процес по разпръскателно сушене.

ИЗВОДИ

В резултат на проведените експерименти и получени резултати са формулирани следните изводи:

1. Изолирани и таксономично идентифицирани са пет щама, принадлежащи към р. *Pseudomonas* и въз основа на физиолого-биохимичните им показатели (синтез на феназинови пигменти, протеолитична и антиоксидантна активност), като индикатори за техния PGP-потенциал, за по-нататъшна работа са подбрани щамовете *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046.
2. Установен е оптимален за двата щама вариант на хранителна среда по отношение на N, C и P за провеждане на високопродуктивен процес с целиви продукт ИОК (в обхват 4,0 – 6,6 µg/ml). При мащабирането на процеса продукцията на ИОК от *Ps. chlororaphis* 1S4 достига 27,9 µg/ml на 28 h от процеса.
3. Изследвано е влиянието на индуктор синтетичен L-триптофан и триптофан с микробен произход върху биосинтезата на ИОК от *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046. Индукторът L-триптофан от микробен произход е по-ефективен с 34 % от синтетичния вариант.
4. Установена е продукцията на феназин-1-карбоксилна киселина (PCA) от щам *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и продукцията на сидерофори от двата изследвани щама
5. Доказан е антагонистичния ефект на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046 срещу икономически значими патогени от род *Fusarium*: *F. proliferatum* C1, *F. oxysporum* F6 и *F. solani* F7. Максимален ефект на инхибиране за *Ps. chlororaphis* 1S4 е отчетен срещу *F. oxysporum* F6 - 85,92% , а за щам *Ps. yamanorum* 1046 - 41,43% срещу *F. solani* F7.
6. Доказана е биологичната активност на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046 при прорастване на семена от зърнено-житни/зърнено-бобови култури, оценена по биометричните показатели на кореновата система на моделните растения. Най-високи стойности и при двата щама са регистрирани при режим на третиране 0,2% концентрация при 16 h култура.
7. Анализът на растително-микробната симбиоза на *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046 и саксийните декоративни растения доказва положителния ефект на свежи и изсушени култури (поединично и в комбинация) от микробния компонент, прилагани върху различни вегетативни части на растителните модели (корени и листа) чрез различни подходи (поливане и/ листно пръскане).
8. Установени са най-ефективните варианти спрямо концентрация и форма на прилагане за различните моделни системи - 0,2% листно пръскане за модел

иглика, 0,1% листно пръскане + поливане за модел хризантема и комбинация от двата микробни представителя, приложени чрез поливане, за модел циклама

ПРИНОСИ

Приноси с оригинален характер

- Доказан е PGP-профила на ризосферните щамове *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046, който е предпоставка за практическото им прилагане в земеделската практика.
- Приложен е икономически рентабилен подход за замяна на индуктор синтетичен L-триптофан с триптофан с микробен произход. Наблюдаван е синергичен ефект по отношение на индуцирането продукция на ИОК между микробния триптофан и другите биокомпоненти в приложената комплексна смес.
- Демонстриран е изявен инхибиторен ефект на щамове *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046 по отношение на микопатогенни видове, принадлежащи към р. *Fusarium* и възможност за използването им като компоненти на препарати за биологичен контрол.
- Конструирани са прототипна серия от свежи и сухи култури *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 и *Pseudomonas yamanorum* 1046 с потенциал за прилагане като екологично целесъобразна алтернатива на конвенционалните торове.

Приноси с потвърдителен характер

- Разработена е схема за проследяване на растително-микробна симбиоза между бактериални представители и моделни растителни системи от зърнено-житни/зърнено-бобови култури и декоративни растения. Въведени са индикатори за проследяване на процеса по отношение на:
 - микробния компонент: възраст, форма, концентрация и поединично/съвместно прилагане;
 - растителния компонент: ефективност на прорастане на семената и промяна на биометричните показатели на различни вегетативни части на растителните модели през различни етапи на вегетационни период;
 - технологията на прилагане: листно пръскане, поливане и комбинация от двата подхода.

ПУБЛИКАЦИИ

1. **Georgieva G.**, Nedeva T., Badalova M., Deleva V., Savov V., (2023). Study of the plant growth-promoting capacity of *Pseudomonas putida* 1046 in a model plant system. In: Chankova S, Danova K, Beltcheva M, Radeva G, Petrova V, Vassilev K (Eds) Actual problems of Ecology. *BioRisk* 20: 115–128. <https://doi.org/10.3897/biorisk.20.97581>
2. **Georgieva G.**, Badalova M., Feyzula F., Nedeva T., (2024). Antifungal Activity of *Pseudomonas chlororaphis* 1S4. (*Accepted*)
3. **Georgieva G.**, Badalova M., Nedeva T., (2024). Induction of Two *Pseudomonas* Strains Indole Acetic Acid Production By Synthetic And Biologically-Produced L-Tryptophane: A Comparative Study. (*Accepted*)

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Постери:
 - **Georgieva G.**, Nedeva T., Badalova M., Deleva V., Savov V. Study of the plant growth-promoting capacity of *Pseudomonas putida* 1046 in a model plant system. INTERNATIONAL SEMINAR OF ECOLOGY- 2022. (29/09 2022)
 - **Georgieva G.**, Badalova M., Nedeva T. Examination of the antifungal activity of *Pseudomonas chlororaphis* 1S4. INTERNATIONAL CONFERENCE KLIMENT'S DAYS 2023. (9/11 2023)
 - **Georgieva G.**, Hristova P., Nedeva T. Evaluating the biochemical properties of *Pseudomonas* strains to explore their potential. Youth Scientific Conference “60 years Department of General and Industrial Microbiology”. (17/11 2023)
 - **Georgieva G.**, Badalova M., Nedeva T. PGP impact of *Pseudomonas chlororaphis* 1S4 and *Pseudomonas yamanorum* 1046 on technical and ornamental plants. INTERNATIONAL SEMINAR OF ECOLOGY- 2024. (26/09 2024) (*Accepted*)

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ

Статия:

1. **Georgieva G.**, Nedeva T., Badalova M., Deleva V., Savov V., (2023). Study of the plant growth promoting capacity of *Pseudomonas putida* 1046 in a model plant system. In: Chankova S, Danova K, Beltcheva M, Radeva G, Petrova V, Vassilev K (Eds) Actual problems of Ecology. BioRisk 20: 115–128. <https://doi.org/10.3897/biorisk.20.97581>

Цитирана от:

1. Ghosoun Habib Sabri Al-Rubaie and Saba Abd Al-Hadi Kadhim Al-Falooji. Chemical and Molecular Detection of New Strains of *Xanthomonas Campestris* pv. *Vesicatoria* and *Pseudomonas putida* Associated with Tomato Crop 2023 *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 1262 032031 DOI 10.1088/1755-1315/1262/3/032031
2. Maity P. Enhancement of rice seed vigor to mitigate cold stress by using indigenous microbes. M.Sc. Thesis, 2023 <https://krishikosh.egranth.ac.in/server/api/core/bitstreams/300b269d-2b32-4a98-8c6b-6f842450fdd1/content>

