

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА БИОТЕХНОЛОГИЯ

Марина Стефанова Бадалова

*Изследване на биологичната активност на
ризосферни плесенни щамове в биоминерални
комплекси*

АВТОРЕФЕРАТ

*за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”
професионално направление 5.11. Биотехнологии
Технология на биологично активните вещества*

София, 2017 г.

Дисертационният труд съдържа 174 страници, 15 таблици и 47 фигури. В библиографската справка са включени 309 заглавия, 4 на кирилица и 305 на латиница. Експерименталната работа е извършена в лабораториите на катедра Биотехнология на СУ „Св. Климент Охридски“, Катедра Биохимия на Медицинска Академия, оранжерията на „РОМБ“ ООД- гр.Силистра и фитокамера гр. Силистра - фирма РОМБ ООД.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на катедра Биотехнология към Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“.

Официални рецензенти:

1.
2.



Защитата на дисертационния труд ще се състои на.....г. отчаса вв сградата на Биологически факултет към СУ „Св. Климент Охридски“, гр. София, ул. „Драган Цанков“ № 8. Материалите по защитата се намират на разположение на http://www.unisofia.bg/index.php/bul/universitet_t/fakulteti/biologicheski_fakultet2/doktorantsko_uchilische/pridobivane_na_obrazovatelna_i_nauchna_stepen_doktor

Дисертационният труд е обсъден на разширен учебно-научен съвет при катедра Биотехнология, СУ „Св. Климент Охридски“, на заседание състояло се на г. и е насочен за разкриване на процедура за защита пред научно жури, сформирано със Заповед №..... на Ректора на СУ “Св. Климент Охридски”.

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА БИОТЕХНОЛОГИЯ

Марина Стефанова Бадалова

***Изследване на биологичната активност на
ризосферни плесенни щамове в биоминерални
комплекси***

АВТОРЕФЕРАТ
на дисертация

*за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”
професионално направление 5.11. Биотехнологии
Технология на биологично активните вещества*

Научен ръководител: доц. д-р Валентин Савов

София, 2017 г.

Използвани съкращения

BGL	β-глюкозидаза
b.p.	базови двойки
СВD/СВМ	Целулозо-Свързващ Домен/Въглехидрат-Свързващ Модул / Cellulose Binding Domains/ Carbohydrate-Binding Module
CFU	Колония Образоващи Единици
С-източник	Въглероден източник
EG	Ендоглюканаза
GRAS	Generally Recognized As Safe
IAA/ИОК	Индолил-3-Оцетна Киселина
ITS	Вътрешни Транскрибируеми Спейсери/ Internal Transcribed Spacer
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC-MS	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
АСБ	Абсолютно Суха Биомаса
БАВ	Биологично Активни Вещества
КМЦ	Карбокси Метил Целулоза
КДА-PDA	Картофено-Декстрозен Агар
БКТ	Безклетъчна културална Течност
СОД	Супер оксид дисмутаза
ММ	Молекулна маса
ICN	International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants
ISTH	International Subcommittee on <i>Trichoderma</i> and <i>Hypocrea</i>
СВН II	Целобихидролиза две
6- АПК	6- аминокпеницилинова киселина
ИФОАМ	Международна Федерация на Движенията за Органично Земеделие
МПХС	Модифицирана посевна хранителна среда
ХЕЦ	Хидроксицелулоза
6ПП	6-п-пентил-6Н-пиран-2-он

Изследване на биологичната активност на ризосферни плесенни щамове в биоминерални комплекси

Марина Стефанова Бадалова

Анотация

В настоящата дисертация са разработвани и прилагани методи и техники за скрининг, които ще дадат възможност за прогнозиране на биосинтеза на първични и вторични метаболитни продукти в условия на дълбочинно и твърдофазово култивиране; проучени са бисинтетичните възможности на щамове *T. asperellum TV-SL-45*, *T. asperellum TH* и *T. reesei G27* като имобилизирани култури и съхранението им в тази форма, тествани са физиологичните ефекти върху биометричните показатели на различни растителни обекти *in vivo*, с цел евентуално разработване на бъдещ микробиален препарат, прилаган в растениевъдството с един наистина благоприятен ефект за околната среда.

Чрез молекулярни техники като ДНК (fingerprinting) анализ (Arisan-Atac et al., 1995), анализ на рибозомалните ДНК вътрешно транскрибируеми участъци (ITS) микромицетни щамове *T. asperellum TV-SL-45* и *T. asperellum TH* са идентифицирани като представители на вида *Trichoderma asperellum*, а щам *T. reesei G27* като представител на вида *Trichoderma reesei*.

Проведени са серия от експерименти с цел изследване на биосинтетичните възможности на щам *T. asperellum TV-SL-45* имобилизиран върху природни и синтетични органо-неорганични матрици. Постигната е успешна имобилизация в хибридни органо-неорганични матрици (варианти 2.1, 2.2 и 5.3) на вегетативен посевен материал от щам *T. asperellum TV-SL-45*, като максималната ендоглюканазна активност е по-висока от тази на свободната култура с около 36 – 50%, която се запазва до 840^{-я} час на култивирането.

Извършен е LC-MS анализ на съдържанието на фитохормони в културални ферментационни течности на среда с индуктор микрицел на изследваните щамове *T. asperellum TV-SL-45*; *T. asperellum TH*, *T. reesei G27*. Изследванията за фитохормонални активности на проби, взети на 96^{-я} час от дълбочинното култивиране, показват стойности за GA₃ и GA₄ от 3÷17 µg/ml, за зеатин и тидиазурон от 230÷300 µg/ml и при трите изследвани щамове.

Синтезираните вторични метаболити при дълбочинни и твърдофазови условия от изследваните микромицетни щамове показват положителен ефект върху фитохромната система на семена на *Lactuca sativa L.* (къдрава салата). Щамове *T. asperellum TV-SL-45*, *T. asperellum TH* и *T. reesei G27* повлияват положително върху биометричните показатели и декоративния вид на растения *Cyclamen persicum* сорт *Halios magenta ecarlate* (Циклама) и *Chrysanthemum grandiflorum* сорт *Branroyal yellow* (Хризантема).

Резултатите получени в това изследване свързани с биосинтезата на първични и вторични метаболитни продукти в условия на дълбочинно и твърдофазово култивиране, бисинтетичните възможности на щамове *T. asperellum TV-SL-45*, *T. asperellum TH* и *T. reesei G27* като имобилизирани култури и съхранението им в тази форма, физиологичните ефекти върху биометричните показатели на различни растителни обекти *in vivo*, допълват научни данни на други автори с цел евентуално разработване на бъдещ микробиален препарат, прилаган в растениевъдството с един наистина благоприятен ефект за околната среда.

УВОД

Целулазните продуценти, намерили основно индустриално приложение, са представители на плесенните гъби.

Предимството на *Trichoderma*, като целулазен продуцент, се състои в синтезата на пълен ензимен комплекс, секретирание на високо количество целулазен протеин, като при това той съставлява почти целия секретирруем екзоклетъчен белтък (Saloheimo and Pakula, 2012).

Ползотворното действие на *Trichoderma* spp. не се ограничава само до синтезата на екзоклетъчни ензими с индустриално приложение, а и като растителни симбионти синтезиращи вторични метаболити, благодарение на които се повишава системната устойчивост на растенията (Yedidia et al., 1999; Shores et al., 2010). Смята се, че този ефект се дължи на присъствието на един или повече дифундиращи растежни фактора – вероятно вторични метаболити и/или фитохормони.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

През последните години се наблюдава повишен интерес по отношение на представителите на род *Trichoderma* във връзка с перспективите за приложението им в биологичното земеделие. Голяма част от представителите на рода са компонент на микробиални препарати, които се използват при биоконтрола, за подпомагане растежа и развитието на много културни и декоративни видове растения.

Целта на настоящата дисертационна работа е: **Изследване на биологична активност на микромицетни щамове от род *Trichoderma* като компоненти на бактериални торове и приложението им в растениевъдството.**

За постигане на поставената цел са формулирани следните задачи:

1. Морфологична и молекулярно- таксономична характеристика на работните щамове от род *Trichoderma*.

2. Определяне на биосинтетичен потенциал на работни щамове от род *Trichoderma*.
3. Култивиране при различни условия на изследваните щамове с цел проследяване синтеза на хидролазни ензими- ендоглюказа.
4. Оценка на ендоглюканазна активност на имобилизирани култури от род *Trichoderma* в природни, модифицирани и хибридни матрици.
5. Изследване на безклетъчни културални течности на изследваните щамове *Trichoderma* за физиологичен ефект и съдържание на фитохормони при различни условия на култивиране.
6. Технологично охарактеризиране на изследваните щамове по отношение на фитохормонален синтез, преживяемост при технологични операции и оптимални дози на третиране при опитни растения.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Микроорганизми

Изследванията по настоящия дисертационен труд са осъществени с ризосферни микромицетни култури *T.asperellum TV- SL-45*, *T.asperellum TH*, които са предоставени от микробиологичната колекция на Нипроруда АД и *T.reesei G27*, предоставена от микробиологичната колекция на Катедра „Биотехнология” на Биологическия факултет към Софийския Университет "Св. Климент Охридски".

2. Хранителни среди

3. Получаване на посевен материал.

4. Култивиране на изследваните щамове при дълбочинни условия.

5. Твърдофазово култивиране на щам продуцентите.

6. Аналитични и биохимични методи.

- *Метод за определяне на ендоглюканазни ензимни активности (Сх-активност), Определяне на ендо-1,4-β-глюканазна активност (Wood and Bhat, 1988).*

- *Спектрофотометрично определяне на разтворим белтък (Белтък(OD280/OD260,L.Iotova, I.Dobrev, I.Ivanov, Practicum in biotechnology, partI,Sofia,2000,132-133,in Bulgarien)*

- *Определяне на остатъчна концентрация на азот чрез реактив на Неслер*
- *Определяне на концентрацията на органичен азот*
- *Определяне на концентрация на фосфор по ванадат - молибдатен метод*

7. Изследване профил на ензимната активност.

8. Методи за генна идентификация- ITS анализ- видова идентификация на щамовете.

9. Метод на имобилизация на микромицетен щам *Trichoderma asperellum TV-SL-45* в различни матрици.

10. Лиофилизация

11. Преживяемост на работни култури в присъствие на консервант „KATHON

12. Изследване на физиологично-активните свойства на щамове *T. asperellum TV- SL-45, T. asperellum TH, T. reesei G27* върху семена от *Lactuca sativa L.* (къдрева салата) –тест за биологична активност *in vivo*.

13. Тестване на изследваните щамове *Trichoderma asperellum TV- SI-45 , Trichoderma asperellum TH, T.reesei G27* върху растителни обекти *in vivo*.

14. Тестване на комбинации от плесенни и бактериални щамове върху растителни обекти *in vivo* върху *Euphorbia pulcherrima*) сорт *Premium Red (Коледна звезда) .*

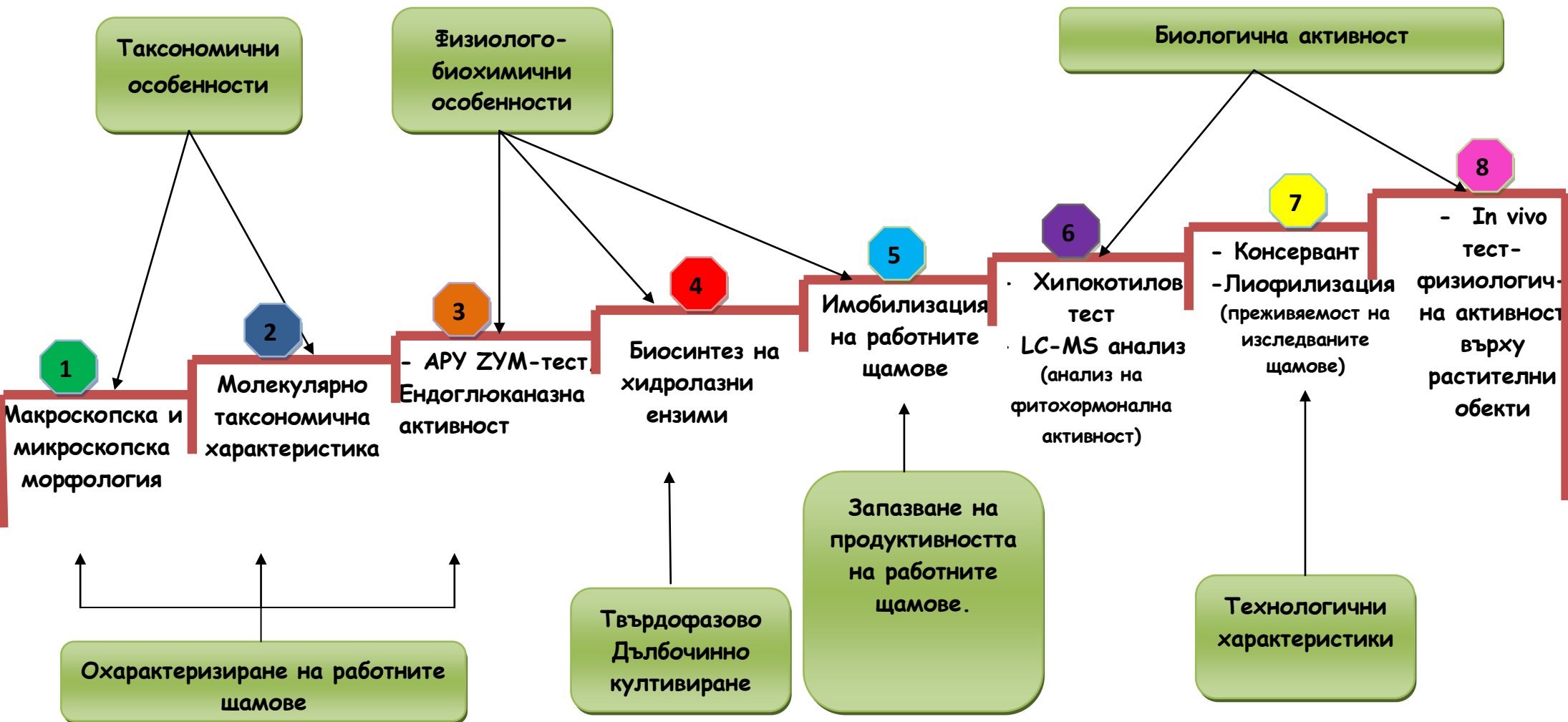
15. LC-MS анализ на съдържанието на фитохормони в културални течности

16. Обработка на резултатите

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В настоящата дисертация са разработвани и прилагани методи и техники за скрининг, които ще дадат възможност за прогнозиране на биосинтеза на първични и вторични метаболитни продукти в условия на дълбочинно и твърдофазово култивиране, проучени са бисинтетичните възможности на изследваните щамове като имобилизирани култури и съхранението им в тази форма, тествани са физиологичните ефекти върху биометричните показатели на различни растителни обекти *in vivo*, за евентуално разработване на бъдещ микробиален препарат прилаган в растениевътството с един наистина благоприятен ефект за околната среда.

Провеждането на експерименталната работа по дисертацията е извършено по следната схема (фиг.1):



Фиг. 1. Схема на експериментална работа.

1. Морфологична и молекулярно- таксономична характеристики на работните щамове от род *Trichoderma*.

Изследваните щамове *T.asperellum* TV-SL-45, *T.asperellum* TH, са диви ризосферни щамове, които са изолирани и предоставени от НИПРОРУДА АД. *T.asperellum* TV-SL-45, *T.asperellum* TH имат близки целулазни активности, докато щам *T.reesei* G27 има несравнимо висок биосинтетичен потенциал. Щам *T.reesei* G27 е селектиран мутантен щам, част от микробиологичната колекция на катедра „Биотехнология“ на СУ (Atev et al., 1983, 1987).

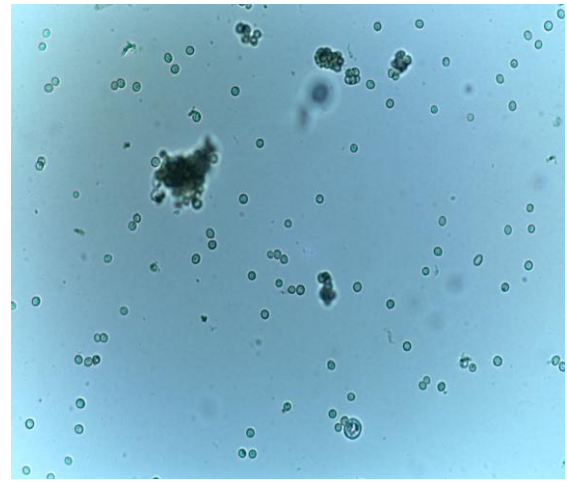
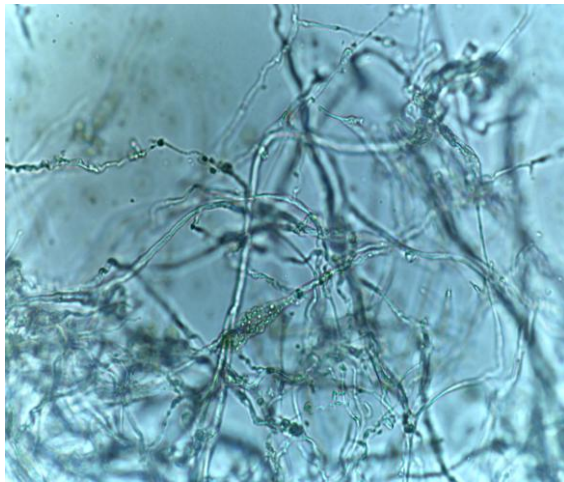
Охарактеризирането на работните щамове *T.viride* SI-45 , *T.harzianum* RZ и *T.reesei* G27 започва с оценка на чистотата на културата и определяне на основни морфологични характеристики.

Представителите на род *Trichoderma* се характеризират с бърз растеж,ярко зелени конидии и разклонена конидиоформна структура(Gams and Bissett [1998](#)).

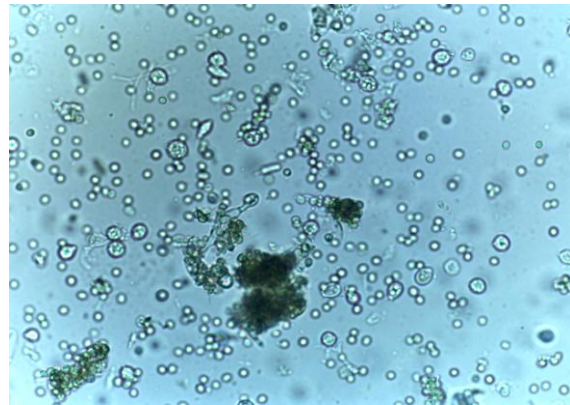
При култивиране на щам *T.viride* SI-45 , щам *T.harzianum* RZ и щам *T.reesei* G27 върху твърда хранителна среда КДА развиват силно разклонен субстратен мицел, до развиването на въздушен мицел.

Субстратния мицел и при трите щама се разпростира радиално- от центъра на колонията към периферията на агара. Въздушният мицел се образува на 30-48-я час от посева и е с белезникав цвят. От 72-^я-96-^я час на посева щама е изпълнил цялата повърхност на петрито (90 mm) с мицел. След 72-^я час настъпва конидиообразуването, като спорите се образуват по цялата повърхност на въздушния мицел, формиращи концентрични кръгове с рамер 5-7 μm .

На фиг 2 а,б,в, е представена микроскопска морфология на работните щамове *Trichoderma* при култивиране върху течна среда за култивиране (т.2.3. методи и материали)



а)



б)



в)

Фиг. 2 Микроскопска морфология на изследваните щамове от род *Trichoderma* :а) *T.reesei* G27 ; б) *T.viride* SL-45; в) *T.harzianum* RZ;

Вегетативната култура при *T.reesei* G27 е с добре развит фин мицел, разклоняващ се в сравнение с другите два работни щам. В мицела са формират жълтозелени спори.

При щам *T.viride* SL-45 мицела е несептиран. Формирани са спори със синьозелено оцветяване, които образуват характерни струпвания. Наблюдават се и формирани много ендоспори с удебелена обвивка за разлика от щам *T.reesei* G27.

При щам *T.harzianum* RZ се наблюдава добре развит несептитан мицел с характерни струпвания с зелен цвят. Тук също се наблюдава формиране на ендоспори, но в по малко количество.

До скоро идентификацията на видовете от род *Trichoderma* се е извършвала изключително на ниво морфологични характеристики (Gams and Bissett, 1998; Summerbell, 2003). Видовото определяне е ставало на базата на морфологията и размера на конидиите, и структурата на конидиеносците. Голям брой литература, със съответните таксономични ключове е посветена на морфолого-базираното определяне (Bissett, 1984, 1991a, b, c, 1992; Gams and Bissett, 1998; Chaverri and Samuels, 2003; Jaklitsch, 2009, 2011; Samuels et al., 2006b, 2012a,b). Въпреки това, този начин за идентификация крие опасност от грешки, които понастоящем се избягват с използването на биохимични и молекулярни методи.

- **Молекулярно- таксономична характеристика-определяне на видова принадлежност на работните щамове от род *Trichoderma*.**

Молекулярни техники като ДНК (fingerprinting) анализ (Arisan-Atac et al., 1995), анализ на рибозомалните ДНК вътрешно транскрибируеми участъци (ITS), както и генни фрагменти кодиращи транслационно удължаващият фактор 1-алфа (*tef1*), ендохитиназата (*chi18-5*, известен и като *ech42*), РНК-полимераза II (*rpb2*) и калмодулин (*cal1*) (Kullnig-Gradinger et al., 2002; Druzhinina et al., 2008) намират приложение при точната идентификация на видове от род *Trichoderma*.

От предложените маркери, ITS е предпочитан от миколозите, поради което се използва в Barcode of Life Data Systems – уеб база данни за генна идентификация на видове (<http://www.barcodinglife.org/>; Ratnasingham and Hebert, 2007; Schoch et al., 2012). Този метод е с най-висока възпроизводимост до ниво вид, за детерминиране на видова идентификация на работните щамове.

В настоящата дисертация е извършен секвенционен анализ по ITS

рибозомалните гени с цел потвърждаване на видовата принадлежност на използваните щамове *T.viride* SL-45, *T.harzianum* RZ и *T.reesei* G27.

В резултат на този анализ за щам *T.viride* SL-45 е получена консенсус последователност, състояща се от 660 b.p., *T.harzianum* RZ- 672 b.p. и *T.reesei* G27-622 b.p. Получените секвенции са обработени с програма TrichOKey v.2 и са сравнени със секвенциите в GenBank DNA database, използвайки BLAST алгоритъм.

След анализиране на новополучената секвенция в GenBank DNA database, с BLAST алгоритъм се установява, че щам *T.viride* SL-45 показва висок процент на сходство с референтна култура *T.asperellum* CBS 433.97 (100%), което потвърждава неговата принадлежност към вида *T.asperellum* (табл. 1).

При щам *Trichoderma harzianum* RZ за BLAST анализ в GenBank DNA database са използвани 680bp, получени след секвениране и обработка. Установено е, че при щам *Trichoderma harzianum* RZ се наблюдава 98% сходство с референтна култура *T.asperellum* CBS 433.97. Същият е процентът на сходство и с други щамове от вида *T.asperellum*, което потвърждава неговата принадлежност към вида *T.asperellum* (табл. 1).

При щам *Trichoderma reesei* G27 за BLAST анализ в GenBank DNA database са използвани 622bp, получени след секвениране и обработка. Установено е, че изследваният щам има 98% сходство с референтна култура *T.reesei* strain QM6a. Същият е процентът на сходство и с други щамове от вида *T.reesei*, което потвърждава неговата принадлежност към вида *T.reesei* (табл. 1).

Табл.1. Видова принадлежност *T.viride* SL-45; *Trichoderma harzianum*; *T.reesei* G27.

Щам	Сходство с референтна култура %	Видова принадлежност
<i>T.viride</i> SL-45	100% сходство с <i>Trichoderma asperellum</i> CBS 433.97	<i>Trichoderma asperellum</i>
<i>Trichoderma harzianum</i> RZ	98% сходство с <i>Trichoderma asperellum</i> CBS 433.97	<i>Trichoderma asperellum</i>
<i>Trichoderma reesei</i> G27	98% <i>Trichoderma reesei</i> strain QM6a.	<i>Trichoderma reesei</i>

3. Определяне на биосинтетичен потенциал на изследваните щамове от род *Trichoderma*.

3.1. Изследване на ензимния профил на изследваните щам продуценти.

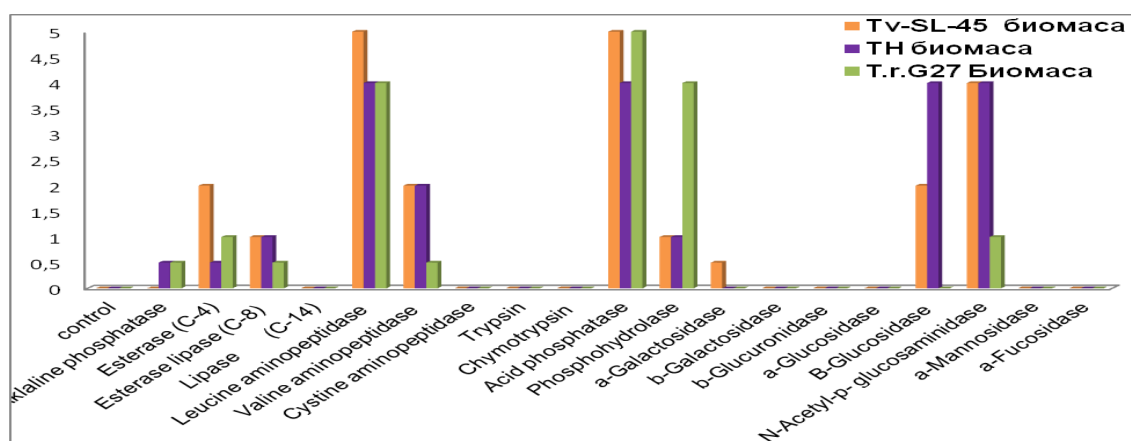
Изучаването на ензимния профил на видове от род *Trichoderma* е ключов фактор за определяне на техните характеристики и приложението им като съставна част на биопрепарати (Kudashev, I.S., 1956).

Поради тази причина на трите изследвани щамове са извършени анализи за определяне на 19 основни ензимни активности с API ZYM (BioMerieux, France).

Свежа 24-часова култура на изследваните щамове *T.asperellum TV-SI-45*, щам *T.asperellum TH* и щам *T.reesei G27* се центрофугира за 20 мин на 5000 rpm. Получената безклетъчна културална течност (БКТ) от трите щамове се анализира, като остатъчната утайка от биомаса се промива двукратно и се ресуспендира в API суспензионна среда. Въз основа на това са конструирани следните варианти:

- 1.1. *Trichoderma asperellum TV-SL-45* - биомаса;
- 1.2. *Trichoderma asperellum TV-SL-45* - БКТ;
- 1.3. *Trichoderma asperellum TH* - биомаса;
- 1.4. *Trichoderma asperellum TH* - БКТ;
- 1.5. *Trichoderma reesei*- биомаса;
- 1.6. *Trichoderma reesei*- БКТ;

Получените данни за ензимна активност на щамове *T.asperellum TV-SI-45*, *T.asperellum TH*, *T.reesei G27* са представени на фиг. 3,4.



Фиг. 3. Ензимен профил на изследваните щамове *Trichoderma*, получен чрез API ZYM тест- културална течност .

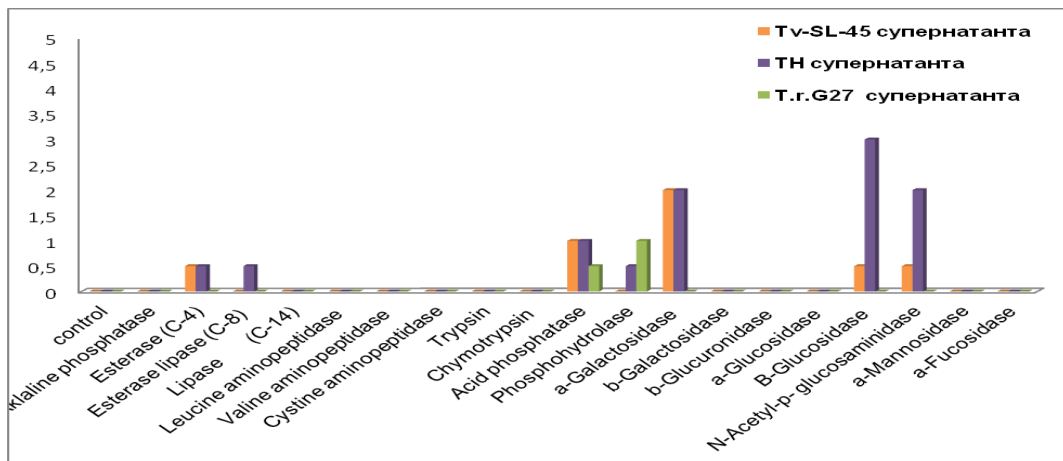
Установено е, че представители на шамове от род *Trichoderma* имат висока способност да трансформират фосфора в почвата в сравнение с бактериите (Nahas, E., 1999). Както киселите, така и алкалните фосфатази съществуват в почвата, като активността им зависи от диапазоните на рН, при които те са активни. Те се синтезират от представители на род *Trichoderma* в отговор на сигналите от отсъствието на Р в почвата (Peleg, Y., 1996). При почва инокилирана с шамове от род *Trichoderma*, се наблюдава разграждане на фиксирания почвен фосфор и на допълнително внесения такъв. Това води до високи добиви и до подобряване развитието на продуктивността на различни посеви (Abd-Alla, M.H., 1994; El-Komy, H.M.A., 2005; Illmer, P. Et.al., 1995; Rudresh, D.L, 2005)

От проведеня анализ (фиг. 3) при вариант щам *T.asperellum TV-SI-45* се отчитат високи нива на левцин аминопептидаза, кисела фосфатаза и N-Ацетил-р-глюкозаминдаза. Наблюдават се и средни нива на синтеза на ензимите естераза, валин аминопептидаза и β -глюкозидазна активност. При *T.asperellum TH*, са отчетени високи нива на левцин аминопептидаза, кисела фосфатаза, β -глюкозидаза и N-ацетил-р-глюкозаминдаза. Също така се наблюдават и средни нива на валин аминопептидаза. При щам *T.reesei G27* се установяват високи нива на левцин аминопептидаза, кисела фосфатаза и фосфохидролаза.

При всички изследвани шамове се наблюдава много добре изразена фосфатазна активност по отношение на кисела фосфатаза, което се потвърждава с резултати получени и от други автори (Altomare, et.al, 1999).

Въпреки, че метода е полуколичествен тази данни ни насочват за допълнителни анализи определящи работните шамове като значими за приложение при производството на биопрепарати, подобряващи растежа и развитието на растенията подобрявайки фосфорното им хранене.

За да се установи каква част от изследваните ензимни активности са извънклетъчни, е направен анализ и на безклетъчни културални течности на трите изследвани щамове.



Фиг. 4. Ензимен профил на изследваните щамове *Trichoderma*, получен чрез API ZYM тест- безкултурална течност .

Резултатите от Фиг. 4 показват, че при *T.asperellum TV-SI-45* са отчетени средни нива на α - галактозидаза и ниски стойности на кисела фосфатаза. При *T.asperellum TH* са отчетени средни нива α - галактозидаза , β -глюкозидаза, N-ацетил-p- глюкозаминдаза и ниски нива на кисела фосфатаза. При вариант *T.reesei G27* супернатанта се наблюдават единствено ниски стойности на кисела фосфатаза и фосфохидролаза.

2.2. Определяне на биосинтетичен потенциал на работни щамове от род *Trichoderma* по отношение на хидролазни ензими (ендоглюканаза).

Представители на род *Trichoderma* синтезират поредица от екстрацелуларни ензими, които са отговорни за биодеградацията на целулозата, също така са фактори за инхибиране на растителните патогенни клетки (Reese ET., 1956). Представители от този вид са не само един от най-широко използваните срещу болести по растенията (Markovich & Koponova, 2003), но също така могат да подобряват растежа и добивите на културите.

В следствие на това представители на род *Trichoderma* поставят основи за повишаване на биосинтетичните възможности на биообектите, качествено и количествено композиране на хранителните среди, и оптимизацията на хидролизните процеси (Mandels M., 1957; Mandels M., 1960; Mandels M., 1962).

Проведено е дълбочинно култивиране с цел определяне на биосинтетичния потенциал на хидролазни ензими на работните щамове в течна хранителна среда на Манделс и на ферментационна среда с индуктор микрицел.

Активността на целулазните ензими и освободения екзоклетъчен протеин са определяни на всеки 24 часа, от началото на ферментацията до 144-^я час. Резултатите са представени на таблица 2.

Табл.2 Разтворим белтък Екзоклетъчен протеин [mg/ml] и специфична ендоглюканазна активност [IU/mg] при дълбочинно култивиране на изследвани щамове *Trichoderma*.

щам час	<i>Trichoderma asperellum TV-SL-45</i>				<i>Trichoderma asperellum TH</i>				<i>Trichoderma reesei G27</i>			
	Среда Манделс		Среда с Индуктор		Среда Манделс		Среда с Индуктор		Среда Манделс		Среда с Индуктор	
	Конц. б-к mg/ml	Спец иф. а-ст IU/mg	Конц. б-к mg/ml	Специ ф. а-ст IU/mg	Конц. б-к mg/ml	Специ ф. а-ст IU/mg	Конц. б-к mg/ml	Специ ф. а-ст IU/mg	Конц. б-к mg/ml	Специ ф. а-ст IU/mg	Конц. б-к mg/ml	Специ ф. а-ст IU/mg
24	1,600	0,030	4,850	0,011	1,950	0,015	5,350	0,024	5,650	0,393	4,940	0,024
48	1,550	0,046	5,900	0,014	1,470	0,052	5,530	0,024	3,950	0,504	6,980	0,018
72	1,440	0,048	6,170	0,266	1,170	0,050	6,120	0,354	3,850	0,038	9,340	0,685
96	1,090	0,075	7,300	0,748	1,220	0,055	7,030	0,962	3,840	0,024	14,330	3,077
120	1,040	0,062	6,300	0,647	1,070	0,049	6,670	0,756	2,480	0,067	15,600	3,173
144	-	-	5,210	0,472	-	-	5,430	0,554	-	-	13,240	2,421

При култивиране на течна хранителна среда Манделс се синтезират определено количество хидролазни ензими [IU/mg]. Установено, че максимална ендоглюканазна специфична активност на течна среда на Манделс, при *T.asperellum TV-SL-45* (0,075 IU/mg), *T.asperellum TH* (0,055 IU/mg), се наблюдава на 96-^я час от началото на ферментацията, а при *T.reesei G27* (0,504 IU/mg), на по-ранен час 48-^{ми} от началото на ферментацията. Данните получени от дълбочинна ферментация на течна среда на Манделс с индуктор микрицел

показват , че максимална ендоглюканазна специфична активност , при *T.asperellum TV-SL-45* (0,748 IU/mg), *T.asperellum TH* (0,962 IU/mg), се наблюдава на 96-я час от началото на ферментацията, а при *T.reesei G27* (3,173 IU/mg), на 120-я час от началото на ферментацията.

По отношение на екзоклетъчния протеин най високи стойности отново се наблюдават при щам *T.reesei G27* (15,600 mg/ml), на 120-я час от началото на ферментацията на течна хранителна среда на Манделс с индуктор микрицел. При щамове *T.asperellum TV-SL-45* (7,300 mg/ml), *T.asperellum TH* (7,030 mg/ml), се наблюдава на 96-^я час култивирането.

Изследваните щамове *T.asperellum TV-SL-45*, *T.asperellum TH*, които са диви ризосферни щамове имат близки целулазни активности и количество екзоклетъчен протеин, докато мутантният щам *T.reesei G27* има несравнимо висок биосинтетичен потенциал.

2.3. Анализирание на културални течности на изследваните щамове за съдържание на фитохормони

Значителна част от изследванията през последните години се фокусират върху ролята на микробно продуцираните метаболити с фитохормонална активност, и влиянието на тези метаболити върху растежа на различни растителни видове. Проучванията касаят и редица микромицетни видове от род *Trichoderma* (Sofo et al., 2011).

Синтеза на вторични метаболити е важна биохимична характеристика, въз основа на което изследваните щамове *T.asperellum TV-SL-45* ; *T.asperellum TH*, *T.reesei G27* са култивирани на течна хранителна среда Манделс за 24 часа на клатачен апарат при оптимални условия, за да се установи наличие на вторични метаболити с фитохормонална природа. Получените културални течности са центрофугирани за 20 min на 5000 rpm, за разделяне на натрупаната биомаса от течната фаза, и са подложени на LC-MS анализ.

Концентрациите на анализиранията вещества са определени на базата на индивидуални калибрационни криви. Получените резултати са представени в табл3.

Табл. 3. Растежни регулатори [$\mu\text{g/ml}$], продуцирани от изследваните щамове при култивиране на среда Манделс.

<i>compound</i>	<i>Trichoderma asperellum TV-SL-45</i>	<i>Trichoderma reesei G27</i>	<i>Trichoderma asperellum TH</i>
GIBBERELIC ACID GA3	2.60	0.42	3.403
INDOLE-3-PROPIONIC ACID	17.219	13.046	9.475
PACLOBUTRAZOL	2.416	1.211	1.975
UNICONAZOLE	0.411	0.381	0.408
INDOLE-3-BUTYRIC ACID	n.d.	n.d.	3.500
FLURPRIMIDOL	1.039	0.578	0.701
GIBBERELLIN A4	n.d.	n.d.	n.d.
N(2-CHLORO-4-PYRIDYL)-N-PHENYLUREA	1.933	1.250	1.697
GIBBERELLIN A7	0.211	0.109	0.084
trans-ZEATIN	39.309	174.205	41.255
(±)-cis,trans-ABSCISIC ACID	3.049	0.930	2.097
2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID	0.953	1.774	1.318
THIDIAZURON	29.143	26.695	4.755

Резултатите са с грешка $\pm 1.3\%$ RSD

Данните представени в Табл.3 показват, че количеството GA3 при щамове *T.asperellum TV-SL* – 2.60 $\mu\text{g/ml}$, *T.asperellum TH* – 3.403 $\mu\text{g/ml}$ при щам *T.reesei G27*- 0.42 $\mu\text{g/ml}$ е значително по-ниско. Синтез на GA4 не се наблюдава и при трите щамове. Относно GA7 се установява синтеза и при трите анализирани щамове, като *T.asperellum TV-SL-45* – 0,211 $\mu\text{g/ml}$ е с най-високи стойности, спрямо (*T.asperellum TH* 0,084 $\mu\text{g/ml}$ и *T.reesei G27* - 0,109 $\mu\text{g/ml}$) . Индол- 3 пропионовата киселина също се синтезира и от трите щамове, като при *T.asperellum TV-SL- 45* са най- високи стойностите – 17,219 $\mu\text{g/ml}$, при *T.reesei G27* - 13,046 $\mu\text{g/ml}$ и *T.asperellum TH* – 9,475 $\mu\text{g/ml}$. Цитокинина транс зеатин се синтезира и от трите изследвани щамове във високи концентрации (*T.reesei G27* – 174,205 $\mu\text{g/ml}$, последван от *T.asperellum TH* – 41,255 $\mu\text{g/ml}$ и *T.asperellum TV-SL-45*- 39,309 $\mu\text{g/ml}$). Тидиазурона се синтезира във високи концентрации при щамове (*T.asperellum TV-SL-45*- 29,143 $\mu\text{g/ml}$ и *T.reesei G27* – 26,695 $\mu\text{g/ml}$), а при щам *T.asperellum TH*- 4,755 $\mu\text{g/ml}$. Абсцисиевата киселина се синтезира и от трите щамове като при щам *T.asperellum TV-SL-45*

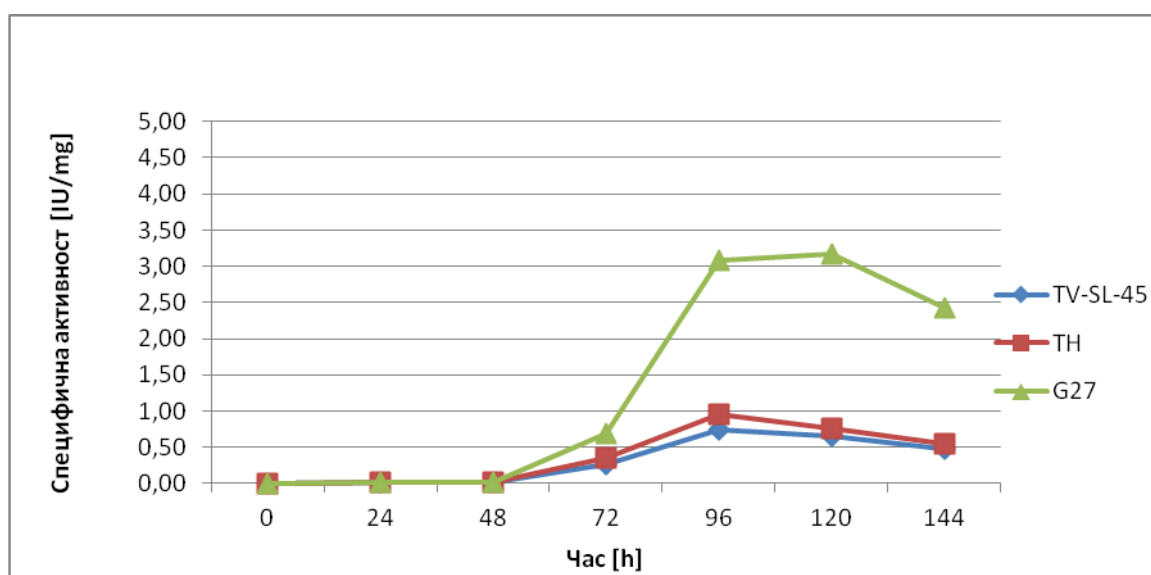
количеството е най- високо - 3,049 $\mu\text{g/ml}$, последван от щам *T.asperellum TH*- 2,097 $\mu\text{g/ml}$ и *T.reesei G27* – 0,930 $\mu\text{g/ml}$.

От получените резултати може да се направи извода, че при проби на безклетъчна културална течност на щамове *T.asperellum TV-SL-45* ; *T.asperellum TH*, *T.reesei G27* при култивиране на среда Манделс, същите продуцират метаболити с фитохормонална природа.

4. Култивиране при различни условия на изследваните щамове с цел проследяване синтеза на хидролазни ензими- ендоглюказа

- **Дълбочинно култивиране.**

Дълбочинното култивиране на микроорганизми е най-разпространеният способ за получаване на хидролазни ензими. При този метод клетките на продуцента са разпределени в обема на хранителната среда, като параметрите на ферментационния процес се контролират, на базата на резултати от текущия анализ. Хидролазните ензими се секретират директно в разтвора и филтратът на културалната течност е източник за изолирането им. (New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering- Microbial Cellulase system Properties and Applications, MGBG, National University of Ireland, edited by Vijai G. Gupta, Elsevier,2016).



Фиг.5. Специфична ендоглюканазна активност [IU/mg] при дълбочинно култивиране на щамове *T.asperellum TV-SL-45*, *T.asperellum TH*, *T.reesei G27* .

Според Lau MW. et.al., 2012; Sipos B. et al., 2010; Klein-Marcuschamer D. et.al.,2012; Delabona Pda S. et.al., 2012 представители на рода *Trichoderma* проявяват най- висока ендоглюканазна активност между 96^{-я} и 120^{-я} час от началото на ферментацията.

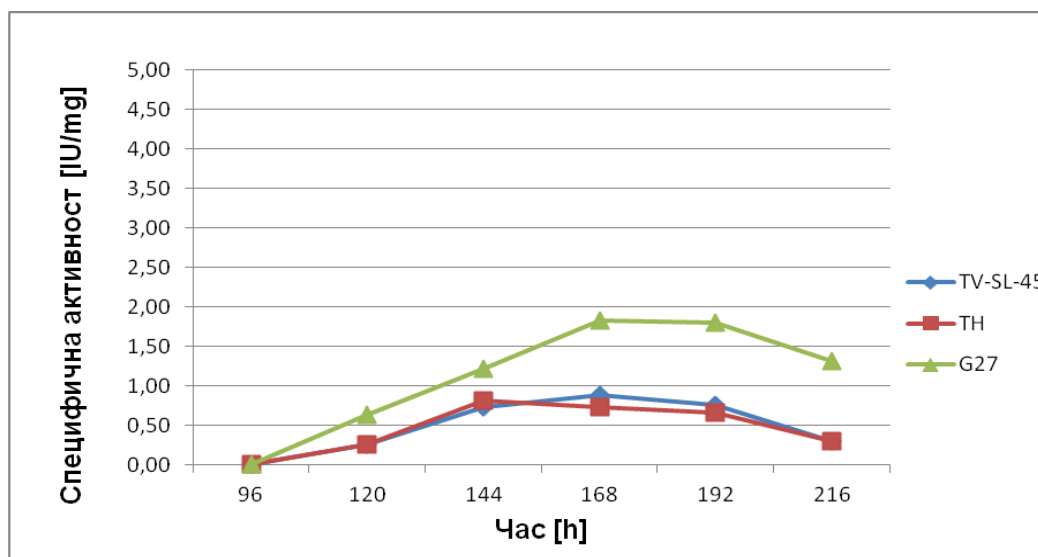
От проведените експерименти (фиг.5) е установено, че изследваните щамове *T.asperellum TV-SL-45*; *T.asperellum TH* имат близки специфични активности, докато щам *T.reesei G27*, получен вследствие мутагенно третиране (Atev et al., 1983, 1987) проявява значително по-висока специфична активност [3,173 IU/mg]. Максимална синтеза и най- висока специфична активност, при двата ризосферни щама *T.asperellum TV-SL-45* [0,748 IU/mg]; *T.asperellum TH* [0,962 IU/mg] се наблюдава на 96-я час, а при щам *T.reesei G27* е на 120-я час от началото на ферментационния процес.

- **Твърдофазово култивиране.**

Щам *Trichoderma veride* се използва и като потенциален биологичен агент за оползотворяване на селскостопанските отпадаци или агроиндустриалните отпадаци на принципа на твърдофазовата ферментация (BAI Zhihui, et.al., 2008).

При култивиране в условия на дълбочинна ферментация могат да се оптимизират и постигат оптимални условия на култивиране на съответния щам, но тези условия се различават от естествените условията в природата. Именно поради тази причина е извършен сравнителен експеримент в условия на твърдофазово култивиране на работните щамове , имитиращо ризосферата.

Култивирането се провежда на твърд водонерзтворим субстрат зеолит и целулозни субстрати- микрицел и пшенични трици. Влажността на субстрата е 60%. Посевът е осъществен с споров посевен материал - 20% спрямо обема на хранителна среда с индуктор. Активността на целулазните ензими и освободения екзоклетъчен протеин са определяни на всеки 24 часа до 216^{-ти} час. Резултатите са представени на фиг.6.



Фиг.6. Специфична ендоглюканазна активност [IU/mg] при твърдофазово култивиране на щамове *T.asperellum* TV-SL-45 ;*T.asperellum* TH ;*T.reesei* G27 .

Въз основа на получените резултати е определена специфична ензимна активност на изследваните щамове, като най високи стойности наблюдаваме при щам *T.reesei* G27 (1,829 IU/mg) - 168-час , последвана от щам *T.asperellum* TV-SL-45 (0,882 IU/mg) -168-я час и *T.asperellum* TH(0,819 IU/mg) -144- час на култивирането.

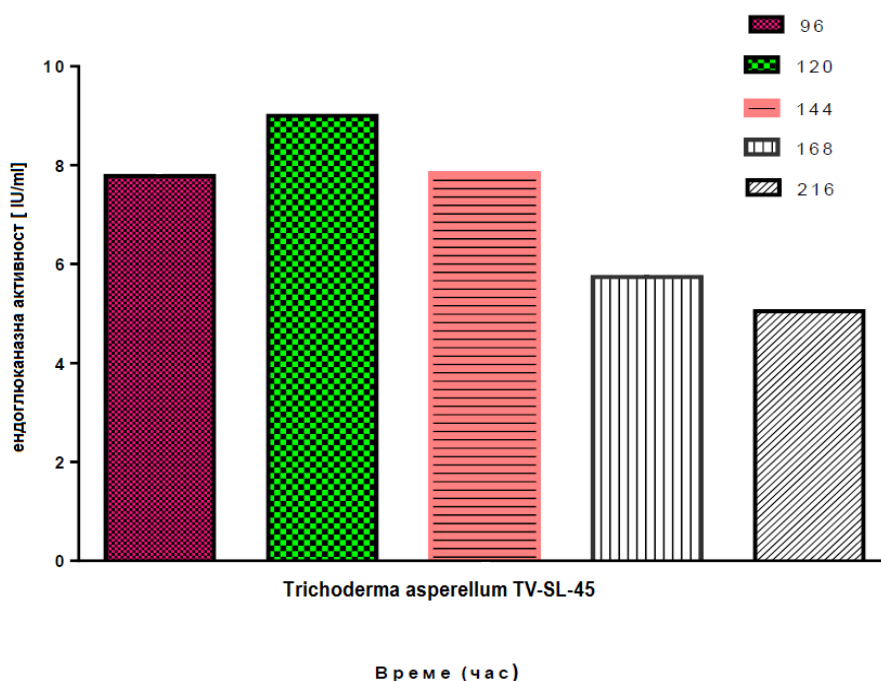
Стойностите за специфичната ендоглюканазна активност в условия на твърдофазовото култивиране при почвените изолати *T.asperellum* TV-SL-45 и *T.asperellum* TH се запазват спрямо тези при дълбочинното култивиране, но в по- късен час от култивационния процес (144-и и 168-и). При селектирания щам *T.reesei* G27 култивиран при твърдофазово култивиране се наблюдава спад на специфичната ендоглюканазна активност с до 73 %, спрямо резултатите при дълбочинно култивиране.

4. Оценка на ендоглюканазна ензимна активност на имобилизирани култура от род *Trichoderma* в природни, модифицирани и хибридни матрици .

След извършена експериментална работа и получени резултати по точка 1, 2, 3 е избран технологично значим щам продуцент *T.asperellum* TV-SL-45 ,

който е с доказана: ендоглюканазна активност; продуцент на GA3,GA7, ауксини, гиберилини и цитокинини.

Култивирането на щам *T.asperellum TV-SL-45* е осъществено при дълбочинни условия в хранителни среда, съдържаща индуктора микрицел за синтезата на изследвания хидролазен ензим- целулаза. Култивирането на щама е осъществено за период от 216 часа при оптимални условия за продуцирането на целулазен ензим. На всеки 24 часа са взимани проби ,и е определена ензимната му активност по отношение на ендоглюканазна активност. Получените резултати са представени на Фиг. 7.



фиг.7. Ендоглюканазна ензимна активност [IU/ml] на щам *T.asperellum TV-SL-45*.

От проведените експерименти е установено, че максималната ендоглюканазна активност на щам *T.asperellum TV-SL-45* е 8,98 [U/ml] на 120-я час. След достигане на максимална ензимна синтеза, съответните активности започват да намаляват до края на ферментационния процес (216-я час). Най-вероятно това се дължи на частичен лизис на изследваната култура в резултат на натрупването в културалната течност на съответния екзоклетъчен хидролазен ензим.

Въз основа на получените резултати, по отношение на биосинтетичните възможности на щам *T.asperellum TV-SL-45* при дълбочинно култивиране, са конструирани и последващите експерименти, като всички данни са сравнени с тези получени от свободните неимобилизирани култури.

4.1. Подбор на природни и модифицирани зеолити като матрици за имобилизация на изследвания щам

Един от съвременните методи в биотехнологията е имобилизирането на микроорганизми към подходящи носители. Свързването на клетки от микроорганизми към определени носители има много преимущества пред използването на свободни клетки. При всяка имобилизационна процедура, стремежът е запазване на ензимната активност на щамовете на максимално високо ниво.

Проведени са серия от експерименти с цел изследване на биосинтетичните възможности на щам *T.asperellum TV-SL-45* имобилизиран по метода на адсорбцията върху зеолити. Установено е, че силата на взаимодействие между съответната микробна клетка и дадения носител зависи от специфичните характеристики и свойства на природния или модифициран с метални йони зеолит. Въз основа на това са проведени експерименти с два типа зеолити - природни и модифицирани. От модифицираните с метални йони зеолити са изследвани два различни: с желязни и медни йони, по отношение на способността им да адсорбират микромицетни клетки. В конструираният опит, при различните варианти зеолитите инокулирани със спорова суспензия на изследвания щам са добавяни в количество 0,75 g към 30 ml посевна среда на Манделс. Дълбочинното култивиране е осъществено за 24 часа с цел адсорбиране на спорите на микромицетите към изследвания природен или модифициран с метални йони зеолит.

Така имобилизираните култури са пренесени в Ерленмайерови колби от 500 ml с 150 ml ферментационна среда без пшенични трици с цел проучване на биосинтетичните възможности на имобилизирания *T.asperellum TV-SL-45*. Култивирането е осъществено на клатачен апарат при 28oC и 250 об/min.

По метода на адсорбция при използването на природен и модифицирани зеолити , са конструирани 4 варианта на имобилизация, като поради включването на микроелементи в матрицата (модифициран зеолит) е направена корекция и на солевия състав на класическата посевна среда. Въз основа на това са конструирани още 4 варианта за провеждане на експеримента(табл.4)

Табл.4. Конструирани варианти с природни и модифицирани зеолити.

№	Вариант
1.1.	Имобилизация на вегетативен посевен материал получен на среда на Манделс върху природен зеолит.
1.2.	Имобилизация на вегетативен посевен материал получен на среда на Манделс върху модифициран с железни йони зеолит.
1.3.	Имобилизация на вегетативен посевен материал получен на среда на Манделс върху модифициран с медни йони зеолит.
1.4.	Имобилизация на вегетативен посевен материал получен на среда на Манделс върху смес от природен и модифициран зеолит.
1.5.	Имобилизация на вегетативен посевен материал получен на „Нова” среда върху природен зеолит.
1.6.	Имобилизация на вегетативен посевен материал получен на „Нова” среда върху модифициран с железни йони зеолит.
1.7.	Имобилизация на вегетативен посевен материал получен на „Нова” среда върху модифициран с медни йони зеолит.
1.8.	Имобилизация на вегетативен посевен материал получен на „Нова” среда върху смес от природен и модифициран зеолит.

Графично са представени данните по отношение на отчетената ендоглюканазна ензимна активност във времето за отделните варианти на експеримента, сравнени със свободната култура- (Фиг.18, табл.8).

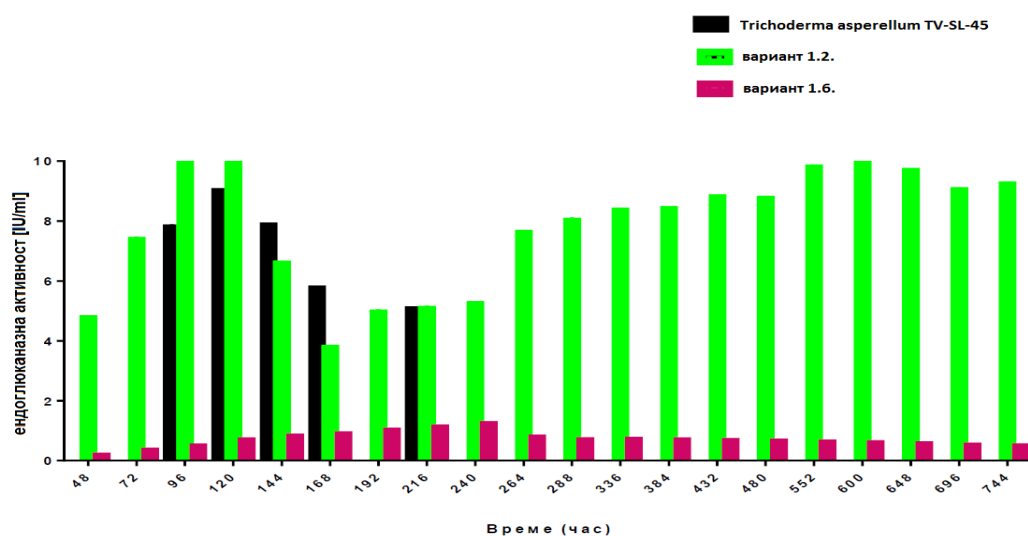
При вариант 1.1. (Имобилизация на вегетативен посевен материал получен на среда на Манделс върху природен зеолит) и вариант 1.5. (Имобилизация на вегетативен посевен материал получен на „Нова” среда върху природен зеолит), се наблюдават много ниски стойности на

ендоглюканазна активност, които към 120-тия час са почти 12 пъти по-ниски, от тези на свободната култура.

Аналогични са и резултатите при варианти 1.3 (имобилизация на вегетативен посевен материал получен на среда на Манделс върху модифициран с медни йони зеолит) и 1.7 (имобилизация на вегетативен посевен материал получен на „Нова” среда върху модифициран с медни йони зеолит) като са отчетени много ниски стойности на ензимна активност. Сравнявайки ги с тези на свободната култура те са 9 пъти по-ниски от нея..

От резултатите, получени за 436-часовия култивационен период е установено, че при варианти 1.4 и 1.8 отнова са отчетени много ниски стойности на ендоглюканазна активност, които сравнени със свободната култура са приблизително 18 пъти по-ниски от нея.

Интересен резултат е получен при вариант на имобилизация 1.2-Имобилизация на вегетативен посевен материал получен на среда на Манделс върху модифициран с железни йони зеолит. При него е постигната ендоглюканазна активност 19,7 [IU/ml.] към 96-тия час от култивирането. Тази стойност е повече от 2 пъти по-висока от тази на свободната култура. Отчетената висока ензимна активност се запазва около 9 [IU/ml.] в продължение на целия период на култивиране на имобилизирания щам, който е 744 часа(фиг.8).



Фиг. 8. Ендоглюканазна ензимна активност [IU/ml] на свободна култура и варианти на имобилизация 1.2. и 1.6. на щам *T.asperellum* TV-SL-45.

Обобщените данни от проведените експерименти са представени в таблица 5.

Табл. 5. Ендоглюканазна ензимна активност [IU/ml] на изследвания щам *T.asperellum TV-SL-45* имобилизиран при осемте варианта с природен и модифициран зеолит.

Щам продуцент	Варианти на имобилизация с зеолити							
	1.1.	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8
<i>Trichoderma asperellum TV-SL-45</i>	-	+	-	-	-	-	-	-

„ + ” развитие на културата и наличие на биосинтетична активност;

„ - ”, ниска или липса на биосинтетична активност;

От получените данни се вижда, че оптималния вариант за имобилизиране на подбрания щам е 1.2. (Имобилизация на вегетативен посевен материал получен на среда на Манделс върху модифициран с железни йони зеолит). При всички останали новоконструирани варианти е отчетена много ниска или липса на ендоглюканазна активност.

Въз основа на тези данни може да се направи заключението, че модифицираните със желязо природни зеолити се оказват подходящ адсорбент-носител при изследвания щам *T.asperellum TV-SL-45*.

4.2. Синтез на нови хибридни матрици на основата на различни неорганични компоненти и прекурсори чрез използване на зол-гелния метод.

Wang *et al.* (2005) посочват силициевите матрици като ефективни носители за имобилизация на база физическо включване, чиито размер на порите благоприятства задържането на клетките в биокаталитичната система и не затруднява дифузията на хранителните вещества и синтезираните метаболитни продукти при процесите на дълбочинно култивиране. Редица научни колективи установяват благоприятното влияние на зол-гелни матрици, съдържащи калциев алгинат (Ca-алгинат), върху механичната стабилност и биологичната активност на имобилизираните клетки. Като част от планираната

експериментална дейност са синтезирани няколко варианта на хибридни материали, съдържащи като основен компонент силициев диоксид, внесен чрез SiO_2 прекурсор – TEOS и TEOS- NH_2 . Част от SiO_2 прекурсор е замествана с различни органични компоненти.

Чрез използването на зол-гелния синтез са конструирани нови хибридни матрици, които са използвани за провеждане на имобилизация на изследвания микромицетен щам *T.asperellum TV-SL-45*.

Табл.6. Конструирани варианти с неорганични хибридни матрици.

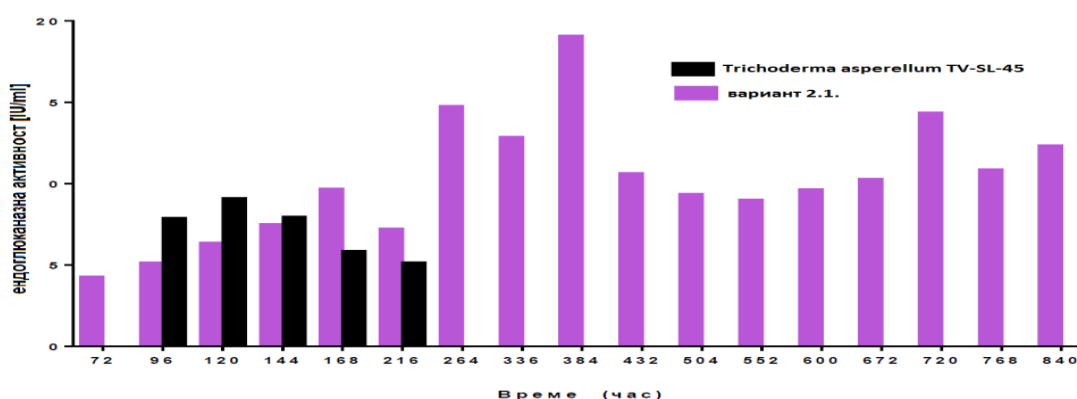
№	вариант
2.1.	Матрица изградена от 5% микрицел (индуктор) и неорганичен прекурсор TEOS;
2.2.	Матрица изградена от 5% микрицел (индуктор) и неорганичен прекурсор TEOS- NH_2 ;
3.1.	Матрица изградена от 5% микрицел (индуктор), неорганичен прекурсор TEOS и 10 % PEO;
3.2.	Матрица изградена от 5% микрицел (индуктор), неорганичен прекурсор TEOS- NH_2 и 10 % PEO;
4.1.	Матрица изградена от 10% микрицел (индуктор), неорганичен прекурсор TEOS и 10 % PEO;
4.2.	Матрица изградена от 10% микрицел (индуктор), неорганичен прекурсор TEOS- NH_2 и 10 % PEO;
5.1.	Матрица изградена от 5% микрицел (индуктор), неорганичен прекурсор TEOS и 5 % калциев алгинат;
5.2.	Матрица изградена от 5% микрицел (индуктор), неорганичен прекурсор TEOS и 10 % калциев алгинат ;
5.3.	Матрица изградена от 5% микрицел (индуктор), неорганичен прекурсор TEOS и 15 % калциев алгинат

Новосъздадените хибридни матрици с имобилизирана *in situ* вегетативна култура на щам *T.asperellum TV-SL-45* са проучени по отношение на ендоглюканазна активност.

Въз основа на това е проведен експеримент за култивиране на имобилизирания щам-продуцент на варианти 2.1 (матрица изградена от 5% микрицел (индуктор) и неорганичен прекурсор TEOS) и 2.2 (матрица изградена от 5% микрицел (индуктор) и неорганичен прекурсор TEOS-NH₂).

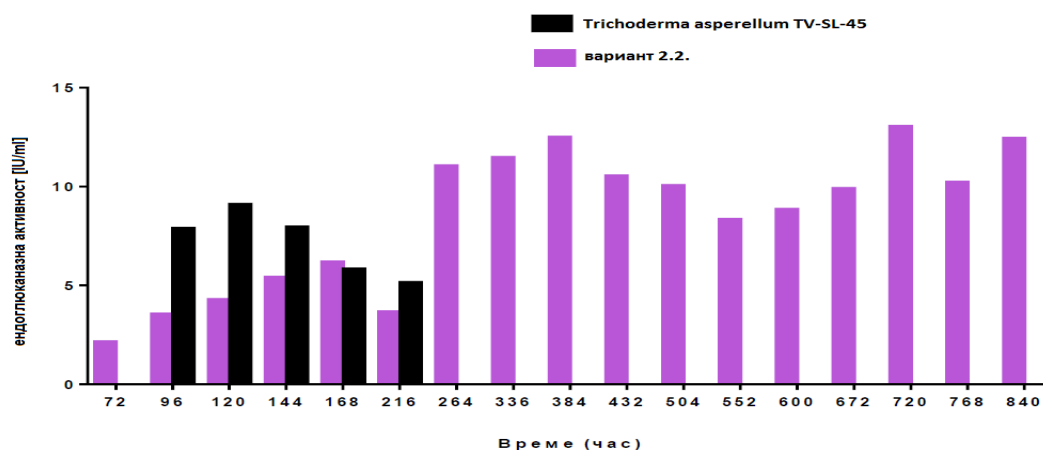
Култивирането на щам *T.asperellum TV-SL-45* е осъществено при дълбочинни условия за период от 840 часа. Култивирането се провежда на клатачен апарат (250 rpm/min.) при температура 28 °C. На всеки 48 часа са взимани проби за анализ и е проследявана динамиката на ензимната активност на изследвания щам.

Получените резултати по отношение на ендоглюканазната ензимна активност [IU/ml] са сравнени със свободната култура и са представени на Фиг. 9 и 10.



Фиг. 9 Ендоглюканазна ензимна активност [IU/ml] на свободна култура *T.asperellum TV-SL-45* и варианти 2.1.

От отразените на фиг.9 резултати се вижда, че отчетената максимална ендоглюканазна активност е на 384-тия час и е приблизително 19[IU/ml.]. Тази стойност е 2 пъти по-висока в сравнение с резултатите, получени за свободната култура. Отчетената висока ендоглюканазна ензимна активност се запазва около 11 [IU/ml.] през целия период на култивиране до 840-я час.



Фиг. 10. Ендоглюканазна ензимна активност [IU/ml] на свободна култура *T.asperellum TV-SL-45* и вариант 2.2.

От получените резултати, е установено, че при вариант 2.2 (Матрица изградена от 5% микрицел (индуктор) и неорганичен прекурсор TEOS-NH₂) максимума на ензимна активност е постигнат на 384-тия час и е 12,5 [IU/ml]. Отчетената активност е с 1,5 пъти по-висока от активността на свободната, не имобилизирана култура. Високата ендоглюканазна ензимна активност се запазва за продължителен период на култивиране от 840 часа.

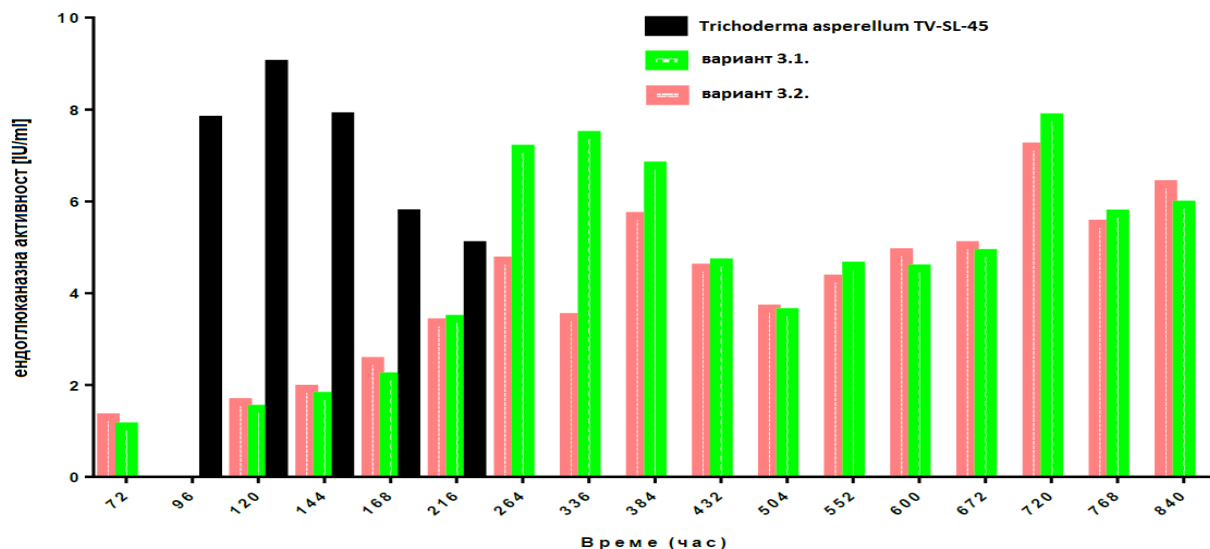
4.3. Изследване влиянието на органичната компонента, влизаща в състава на хибридните матрици при имобилизацията на изследвания щам.

Важно значение за осъществяването на ефективна имобилизация има вида на използвания органичен носител. Той играе роля и при оптимално протичане на масообменните процеси в имобилизираната система. Въз основа на проучени литературни данни от проведени експерименти за изследване влиянието на редица органични съединения, влизащи в състава на хибридните носители върху растежа и развитието на микромицетния щам *T.asperellum TV-SL-45*, PEO и калциев алгинат са определени като най-подходящи органични компоненти, които да бъдат включени в състава на хибридните матрици за имобилизация на вегетативен посевен материал от щам *T.asperellum TV-SL-45*.

Изследване влиянието на процентното съдържание (5, 10 и 15%) на избраните органични компоненти при структурното формиране на новите хибридни матрици и изявата на ензимната активност на щам *T.asperellum TV-SL-45*.

Новосъздадените хибридни матрици с имобилизирани *in situ* култури от изследвания щам са проучени по отношение на способността им за задържане на микробната култура и изявата на ензимната активност.

Отчитана е ендоглюканазна активност при варианти 3.1. и 3.2. на всеки 48 часа в продължение на 840 часа. Дълбочинното култивиране е проведено на колби на клатачен апарат при 250 rpm/min. при температура 28 °C. Получените резултати са представени на фиг. 11.



Фиг. 11. Ендоглюканазна ензимна активност [IU/ml] на свободна култура *T.asperellum TV-SL-45* и варианти 3.1 и 3.2.

От представената фигура се вижда, че при вариант 3.1 (Матрица изградена от 5% микрицел (индуктор), неорганичен прекурсор TEOS и 10 % PEO) максималната ендоглюканазна ензимна активност е измерена на 336-тия час. Стойността и е 7.5. Тя е близка до тази на свободната култура, измерена за 144-тия час. В началните часове на култивирането тя е с около 60% по-ниска от свободната култура. През целия ферментационен процес активността се запазва около 6 [IU/ml].

Отразените в графиката резултати за вариант 3.2 (Матрица изградена от 5% микрицел (индуктор), неорганичен прекурсор TEOS-NH₂ и 10 % PEO) показват, че максималната стойност на ензимна активност е 7,33 [IU/ml], измерена на 720-тия час. Сравнявайки я със свободната култура тя е по-ниска от нея.

Отчитана е ендоглюканазна активност на варианти 4.1. и 4.2. на всеки 48 часа в продължение на 672 часа. От получените резултати е установено, че при варианти 4.1(матрица изградена от 10% микрицел (индуктор), неорганичен прекурсор TEOS и 10 % PEO) и 4.2 (матрица изградена от 10% микрицел (индуктор), неорганичен прекурсор TEOS-NH₂ и 10 % PEO) са отчетени стойности по-ниски от тези на свободната не имобилизирана култура с около 28%. Най-висока ендоглюканазна ензимна активност при вариант 4.1 е измерена на 288-ия час от култивирането и е 5 [IU/ml]. През целия ферментационен процес стойностите на ензимна активност са около 4 [IU/ml].

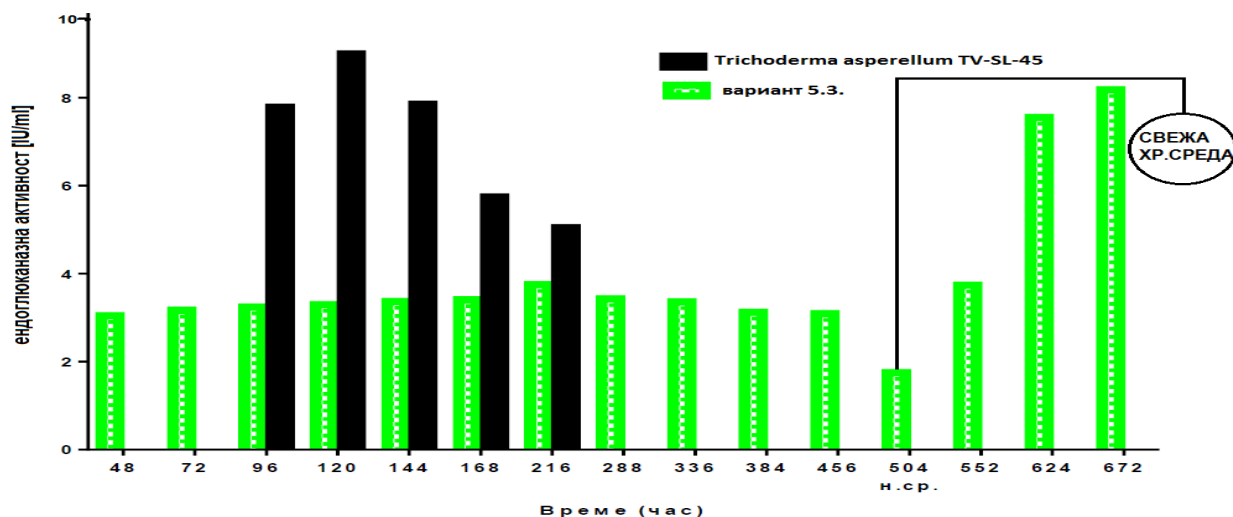
Аналогични са и резултатите, получени за вариант 4.2. Тук максималната активност е 5.4 [IU/ml] и отново е постигната на 288-ия час.

Измервана е ендоглюканазна ензимна активност на вариант 5.1. на всеки 48 часа за период от 672 часа. Култивирането е провеждано при оптимални условия за продуцирането на целевия ензим.

От получените резултати за вариант на имобилизация 5.1 (*матрица изградена от 5% микрицел (индуктор), неорганичен прекурсор TEOS и 5 % калциев алгинат*) е отчетена ендоглюканазна активност, която е 3 пъти по-ниска от стойностите, измерени за свободната култура. Най-висока стойност от 3,36 [IU/ml] е измерена на 288-мия час от култивирането.

На всеки 48 часа са взимани проби от вариант 5.2. за измерване на ендоглюканазна ензимна активност. Периодът на култивиране е 672 часа. Максималната ендоглюканазна активност е отчетена на 288-тия час от ферментационния процес и е 5,6 [IU/ml]. Тя е приблизително с 38% по-ниска от стойностите, измерени за свободната култура.

Отчитана е ендоглюканазната активност при вариант 5.3. на всеки 48 часа. Дълбочинното култивиране е проведено на 250 rpm/min. при температура 28 °C. Получените резултати са представени на фиг.12.



Фиг. 12. Ендоглюканазна ензимна активност [U/ml] на свободна култура *T.asperellum TV-SL-45* и вариант 5.3.

В проведенния експеримент най-висока ензимна активност е измерена при вариант 5.3. (матрица изградена от 5% микрицел (индуктор), неорганичен прекурсор TEOS и 15 % калциев алгинат), в края на култивирането 8.0 [U/ml].-672-ри час. Най-вероятно това се дължи на факта, че на 504-тия час от култивирането имобилизираната култура е прехвърлена в свежа хранителна ферментационна среда, с цел проследяване стабилността на имобилизирания щам *T.asperellum TV-SL-45*. (Фиг.12, вариант 5.3).

Този експеримент ни дава основание да смятаме, че имобилизираният на тази матрица щам е стабилен и може неколкократно да се използва за получаване на ензима целулаза.

От получените резултати може да се види, че по-високото процентно съдържание на органични компоненти в хибридните матрици благоприятства развитието на културата и продуцирането на ензима целулаза. Една от възможните хипотези за обяснение на получените резултати се основава на това, че при по-високото процентно съдържание на органични компоненти се постига по-голяма структурна еднородност и поръзност на матриците, което от своя страна води до подобряване на масообменните процеси и в частност по лесен достъп на индукторите за синтез на хидролазни ензими до имобилизираните продуценти.

Въз основа на получените резултати са представени обобщени данни на всичките варианти на имобилизация в хибридни матрици на щам *T.asperellum TV-SL-45* (табл.7).

Табл.7. Наличие на ендоглюканазна ензимна активност [IU/ml] на изследвания имобилизиран щам *T.asperellum TV-SL-45*.

Щам продуцент	Варианти на имобилизация с зеолити								
	2.1.	2.2.	3.1.	3.2.	4.1.	4.2.	5.1.	5.2.	5.3.
<i>Trichoderma asperellum TV-SL-45</i>	++	++	+	+ -	+ -	+ -	-	-	+

„ + ” развитие на културата и наличие на биосинтетична активност;

„ - ”, ниска или липса на биосинтетична активност;

„ + - ”, ендоглюканазна активност по-ниска от тази на свободната култура;

„ ++ ” ендоглюканазна активност по-висока или съизмерима с тази на свободната култура;

От получените данни може да се направи извода, че е постигната успешна имобилизация с изява на биосинтетична активност при щам *T.asperellum TV-SL-45*. с варианти 2.1(Матрица изградена от 5% микрицел (индуктор) и неорганичен прекурсор TEOS)- 18.0 [IU/ml]-384^{-я} час , 2.2 (Матрица изградена от 5% микрицел (индуктор) и неорганичен прекурсор TEOS-NH2)- 12.5 [IU/ml]- 384^{-я} час и 5.3. (Матрица изградена от 5% микрицел (индуктор), неорганичен прекурсор TEOS и 15 % калциев алгинат) – 8.0 [IU/ml]- 672^{-я} час.

4.4. Оценка на стабилността на новоконструирани биокаталитични системи във времето.

При всички варианти на имобилизация култивирането е провеждано по-дълго (до 840 часа), в сравнение със свободната култура (до 216 часа). Установено е, че дори и в късните часове се наблюдава активност по отношение на активността на целулазния ензим. варианти 2.1- 18.0 [IU/ml]-384^{-я} час , 2.2 - 12.5 [IU/ml]- 384^{-я} час и 5.3– 8.0 [IU/ml]- 672^{-я} час.

Впечатление правят вариантите, при които ендоглюканазната активност се запазва до 840^{-я} час. Това ни дава основание да смятаме, че

имобилизираният щам *T.asperellum TV-SL-45* е стабилен и може неколkokратно да се използва за получаване на ензима целулаза.

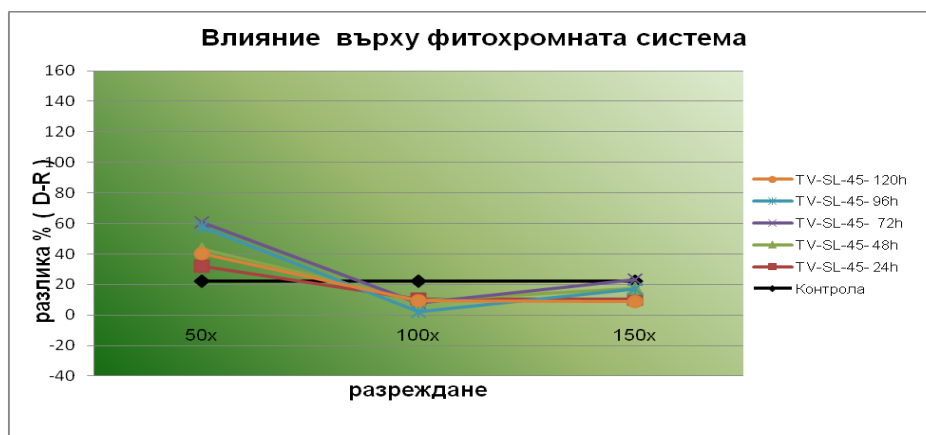
5. Технологично охарактеризиране на изследваните щамове по отношение на фитохормонален синтез, преживяемост при технологични операции и оптимални дози на третиране при опитни растения.

5.1. Провеждане на стандартен хипокотилев тест за биологичен ефект върху семена на *Lactuca sativa L.* (къдрева салата).

За осъществяването на поставената задача е проведен хипокотилев тест, показващ влиянието на синтезираните продукти от изследваните щамове *Trichoderma* върху фитохромната система на *Lactuca sativa L.* (къдрева салата) (Wendy Kuhn Silk, et.al., 1975).

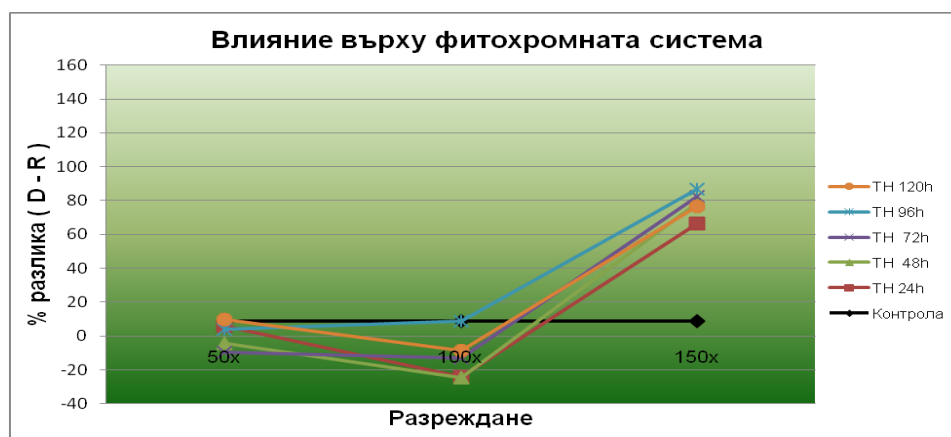
Изследвани са безклетъчни културални течности (БКТ) от проведените дълбочинна и твърдофазова ферментация на *T.asperellum TV-SL-45*, *T.asperellum TH* и *T.reesei G27*. Безклетъчните културални течности на всяка взета проба са разредени 50X, 100X, 150X. Получените резултати за дължината на хипокотила при тъмна и червена светлина (660 nm) като са отчетени на 72-я час от залагането на експеримента. Изчислен е % разлика между дължината на хипокотила на червена (660 nm) и тъмна светлина, за да се определи действието на фитохромната система. Направена е статистическа обработка на получените данни, като е отчетена стандартна грешка и е направен дисперсионен анализ, за да се отчете влиянието на безклетъчните културални течности върху дължината на хипокотила. (Приложение 1)

Резултатите за влиянието върху фитохромната система получени от проведено дълбочинно култивиране на изследваните щамове *Trichoderma* са представени на фиг.13.



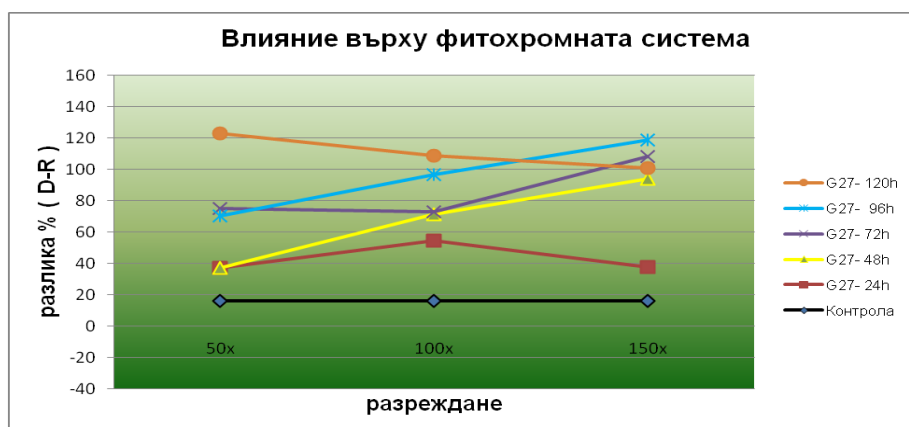
Фиг.13. Фитохромнен ефект на щам *T.asperellum* TV-SL-45 дълбочинна ферментация.

Данните представени на фиг.13 показват, че независимо от времето на култивиране при еднакви разреждания на изследваната БКТ се установява еднотипно действие. При най-слабото разреждане (50x) се наблюдава слабо стимулиране на фитохромната система. Зависимостта е полиноминална по отношение влиянието на периода на ферментация върху формирането на вторични метаболити оказващи въздействие върху фитохромната система на растенията. Очевидно, с увеличаване времето на култивиране се натрупват вещества блокиращи физиологичното въздействие върху растенията. С увеличаване на разреждането не се установява достоверна зависимост за положително влияние, което вероятно се дължи на високи концентрации на продуцираните фитохормони, и при направените разреждания на БКТ не е открита оптимална концентрация на изследваните БКТ.



Фиг.14. Фитохромнен ефект на щам *T.asperellum* TH дълбочинна ферментация.

Данните представени на фиг.14 показват, че при еднакви разреждания на изследваната БКТ от различни часове на култивирането, се установява еднотипно действие, т.е. не се наблюдава зависимост по отношение влиянието на времето на култивиране върху формирането на вторични метаболити оказващи въздействие върху фитохромната система на растенията. При най-високото разреждане (150x) се наблюдава силно стимулиране на фитохромната система. Очевидно с увеличаване на разреждането се установява достоверна зависимост за положително влияние, и при направените разреждания на БКТ е открита оптимална концентрация на изследваните БКТ. При 50x и 100 x разреждания на БКТ от всички часове на култивиране се наблюдава известно подтискане на фитохромния ефект. Това вероятно се дължи на неоптимално рН, висока солева концентрация или продуцирането на вещества с фитохормонален ефект ,които подтискат растежа на хипокотила. Потвърждават се резултати получени от други автори (George Robert Anderson, et.al, 1969).



Фиг.15. Фитохромнен ефект на щам *T.reesei* G27 дълбочинна ферментация.

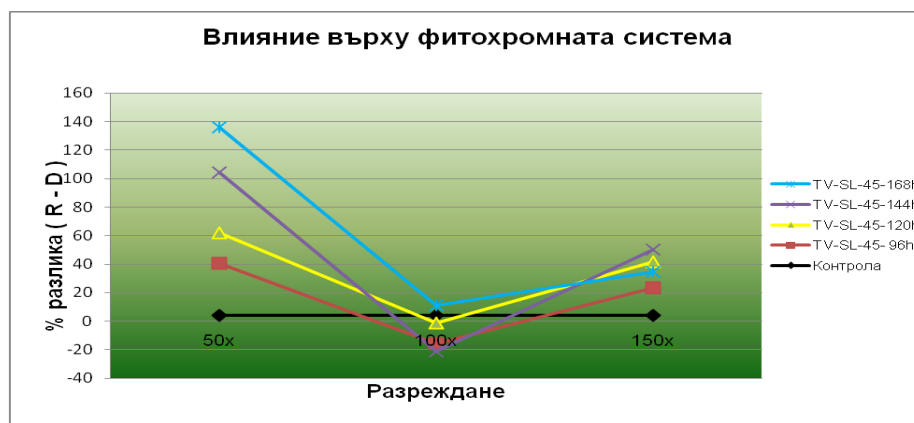
Данните представени на фиг.15 показват, че времето на култивиране е определящ за различното физиологично действие. Зависимостта е полиноминална по отношение влиянието на периода на ферментация върху формирането на вторични метаболити оказващи въздействие върху фитохромната система на растенията. Очевидно, с увеличаване времето на култивиране се натрупват вещества активиращи физиологичното въздействие върху растенията. С увеличаване на разреждането не се установява достоверна зависимост за положително влияние, което вероятно се дължи на

концентрациите на продуцираните фитохормони, и при направените разреждания на БКТ не е открита съществена разлика.

Резултатите получени от проведена твърдофазова ферментация на изследваните щамове *Trichoderma* са представени на фиг.16,17,18.

Продуциране на някои вторични метаболити обикновено се извършва при твърдофазова ферментация и определени условия на средата (Kubicek et al. [2007](#); Tisch and Schmoll [2010](#)).

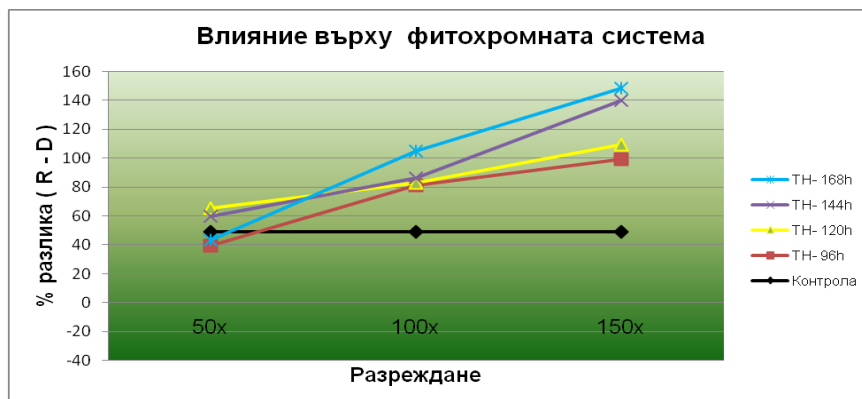
Изследвани са безклетъчни културални течности (БКТ) от проведената твърдофазова ферментация на *T.asperellum* TV-SL-45, *T.asperellum* TH и *T.reesei* G27. Безклетъчните културални течности на всяка взета проба са разредени 50X, 100X,150X. Получените резултати за дължината на хипокотила при тъмна и червена светлина като са отчетени на 72-я час от залагането на експеримента. Получените резултати са представени на фиг.16.



Фиг.16. Фитохромнен ефект на щам *T.asperellum* TV-SL-45 твърдофазова ферментация.

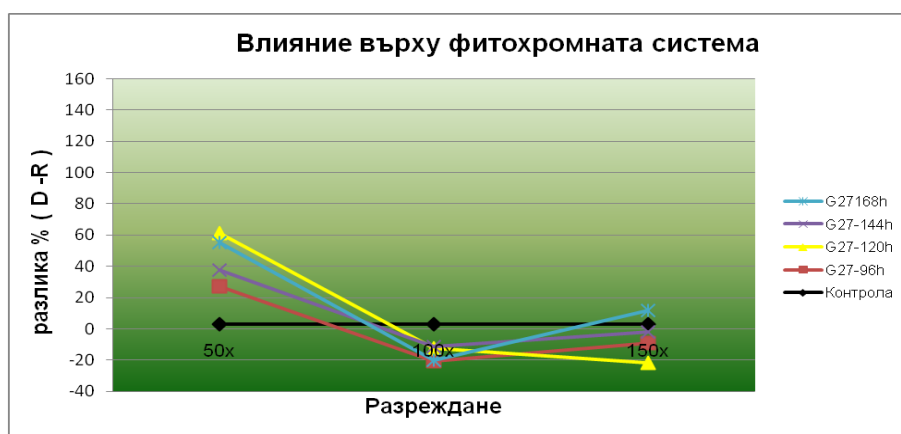
Данните представени на фиг.16 показват, че времето на култивиране е определящ за различно физиологично действие при еднакви разреждания на изследваната БКТ. При най-високия час на култивиране (168 час) се наблюдава силно активиране на фитохромната система, като при всички часове най-слабото разреждане (50x) е със силно стимулиране. Очевидно, с увеличаване времето на култивиране се натрупват вещества активиращи физиологичното въздействие върху растенията. С увеличаване на разреждането се установява достоверна зависимост за подискащо влияние,

което вероятно се дължи направените високи (100x) разреждания на БКТ. Данните показват силно въздействие като кривата на влияние следва така наречения „доза-ефект“.



Фиг.17. Фитохромен ефект на щам *T.asperellum* TH твърдофазова ферментация.

Данните представени на Фиг.17 при щам *T.asperellum* TH също показват, че времето на култивиране е определящ за различно физиологично действие при еднакви разреждания на изследваната БКТ. При най-високия час на култивиране (168 час) се наблюдава силно активиране на фитохромната система, като при всички часове най-високото разреждане (150x) е със силно стимулиране. Очевидно, с увеличаване периода на ферментация се натрупват вещества активиращи физиологичното въздействие върху растенията. С увеличаване на разреждането се установява достоверна зависимост за активиращо влияние. Данните показват силно въздействие като кривата на влияние следва така наречения „доза-ефект“.



Фиг.18. Фитохромен ефект на щам *T.reesei* G27 при твърдофазова ферментация.

Данните представени на Фиг. 18 показват, че времето на култивиране не е определящо за различното физиологично действие при еднакви разреждания на изследваната БКТ. Най-силно активиране на фитохормонната система се наблюдава при 120 час на култивирането. При всички часове най-слабото разреждане (50x) е със силно стимулиране. С увеличаване на разреждането се установява достоверна зависимост за подискащо влияние, което вероятно се дължи направените високи (100x, 150x) разреждания на БКТ. Данните показват силно въздействие като кривата на влияние отново следва така наречения „доза-ефект“

След направения експеримент за установяване на фитохормонален ефект и резултатите в точка 5.2. може да направим извода, че изследваните микромицетни щамове синтезират биологично активни вещества с положителен фитохормонален ефект. За да се определи природата и синтезираното количество на тези продукти е направен LC-MS анализ.

5.2. Анализирание на съдържанието на фитохормони в културални течности на щамове продуценти от род *Trichoderma*.

Вторични метаболити синтезирани от представители на род *Trichoderma* са описани като имащи отношение към стимулирането на растежа на растенията. Cutler et. Al. (1986, 1986) описват изолирането, идентификацията и биоактивността на вторични метаболити на *T. koningii* (кониנגинин А) и *T. harzianum*, действащи като растителни растежни регулатори. Vinale et al. 2008, описват продукцията на вторични метаболити в течна среда от различни биоконтролни щамове *Trichoderma* (*T. harzianum* T22, T39, *T. atroviride* P1, *T. harzianum* A6).

Извършен е LC-MS анализ на съдържанието на фитохормони в културални ферментационни течности на среда с индуктор микрицел на изследваните щамове *T. asperellum* TV-SL-45; *T. asperellum* TH, *T. reesei* G27. В следствие на предварителни тестове са изследвани проби взети на 96-^я час от ферментацията за синтез на вторични метаболити с фитохормонална активност, действащи като растежни регулатори. Концентрациите на

анализираните вещества са определени на базата на индивидуални калибрационни криви. Получените резултати са представени в табл.8.

Табл. 8. Растежни регулатори [$\mu\text{g/ml}$], продуцирани от изследваните щамове при култивиране на среда Мандел с индуктор микрицел.

<i>Compound</i>	<i>Trichoderma asperellum TV-SL-45</i>	<i>Trichoderma reesei G27</i>	<i>Trichoderma asperellum TH</i>
GIBBERELLIC ACID GA3	12.21	1.01	5.50
INDOLE-3-PROPIONIC ACID	17.17	14.14	10.69
PACLOBUTRAZOL	1.21	0.79	0.39
UNICONAZOLE	1.30	0.58	0.19
INDOLE-3-BUTYRIC ACID	0.96	1.59	0.00
FLURPRIMIDOL	4.70	1.18	2.30
GIBBERELLIN A4	8.81	3.48	11.37
N(2-CHLORO-4-PYRIDYL)-N-PHENYLUREA	3.88	1.65	0.30
GIBBERELLIN A7	7.22	3.22	3.48
trans-ZEATIN	240.34	264.62	231.62
(±)-cis,trans-ABSCISIC ACID	9.02	6.14	42.61
2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID	0.71	0.86	n.d
ANCYMIDOL	1.27	0.85	n.d
THIDIAZURON	273.84	299.18	264.24

Резултатите са с грешка $\pm 1.3\%$ RSD

От получените резултати може да се направи извода, че при БКТ на щамове *T.asperellum TV-SL-45* ; *T.asperellum TH*, *T.reesei G27* продуцират известно количество GA3 (*T.asperellum TV-SL-45* – 12,21 $\mu\text{g/ml}$, *T.asperellum TH* - 5,51 $\mu\text{g/ml}$), като количеството на GA3 при щам *T.reesei G27* - 1,01 $\mu\text{g/ml}$ е значително по-ниско. Синтез на GA4 се установява и при трите щамове като при (*T.asperellum TV-SL-45* – 8,81 $\mu\text{g/ml}$, *T.asperellum TH* - 11,37 $\mu\text{g/ml}$), а при щам *T.reesei G27* е значително в по-ниски концентрации- 3,48 $\mu\text{g/ml}$. Относно GA7 се установява положителен резултат и при трите нализирани щамове, като *T.asperellum TV-SL-45* – 7,22 $\mu\text{g/ml}$ е с най-високи стойности, спрямо (*T.asperellum TH* - 3,48 $\mu\text{g/ml}$ и *T.reesei G27* - 3,22 $\mu\text{g/ml}$) . Индол-3 пропионовата киселина също се синтезира и от трите щамове, като на високи стойности се наблюдават при *T.asperellum TV-SL-45* – 17,17 $\mu\text{g/ml}$, последвани от *T.reesei G27* - 14,14 $\mu\text{g/ml}$ и *T.asperellum TH* - 10,69 $\mu\text{g/ml}$. Цитокинина транс зеатин се синтезира и от трите изследвани щамове в високи концентрации (*T.asperellum TV-SL-45* – 240,34 $\mu\text{g/ml}$, *T.asperellum TH* - 231,61 $\mu\text{g/ml}$ и *T.reesei G27* - 264,62 $\mu\text{g/ml}$). Аналогично и количествата на тидиазурона се синтезира в

много високи концентрации и при трите изследвани щама (*T.asperellum TV-SL-45* – 273,84 µg/ml, *T.asperellum TH* - 264,24 µg/ml и *T.reesei G27* - 299,18 µg/ml). Абцисиновата киселина се синтезира и от трите щама като при щам *T.asperellum TH* - 42,61µg/ml, количеството е значително по- високо.

От получените резултати може да се направи заключението, че трите изследвани щамове *T.asperellum TV-SL-45*, *T.reesei G27* и *T.asperellum TH* синтезират високи количества физиологично-активни вещества с фитохормонално действие – гибберелини, цитокинини и абсцисинова киселина. Откриват се и синтезирани БАВ със структура, подобна на структурата на синтетичните съединения паклобутразол, униконазол, флурпримидол и др.

Skoog и Miller (1957) са първите представили ауксин-citoкининовата хипотеза, предполагаща задължително съвместното действие на двата растежни регулатора. Във времето научната представа за ауксин-citoкининовите отношения сериозно се разширява и детайлизира, като се установява, че взаимодействието им в някои случаи може да бъде описано както антагонистично, а в други като синергетично. Във всички случаи, обаче, съотношението между техните нива води до нарастване на меристемната тъкан, което води до диференциране на растителните клетки (Werner et al., 2003; Higuchi et al., 2004; Werner and Schmölling, 2009; Su et al., 2011).

Синтезът на физиологично-активните вещества в различни концентрации при различните работни щамове води до различно действие върху фитохромната система на растенията. Това прави изследваните щамове перспективни за използване като съставна част на биопрепарати, влияещи върху разтежа и развитието на растенията. Положителния физиологичен ефект при твърдофазова ферментация, който най- вероятно се дължи на по-подходяща концентрацията на солевия разтвор и рН в следствие на добавения природен зеолит като твърд субстрат във ферментационната среда (Blazquez MA, et. Al., 2003), определя и бъдещи разработки за създаване на сух микробиален препарат .

6. Технологично охарактеризиране на изследваните щамове *Trichoderma* по отношение на преживяемост при технологични операции и оптимални дози на третиране при опитни растения.

6.1. Оценка на преживяемостта на спорова суспензия на работни култури;

С цел създаването на микробиален препарат е необходимо да се направят допълнителни изследвания за запазване на активността и жизнеспособността на изследваните щамове след добавянето им в търговски препарат с наличие на консервант и преживяемостта им след лиофизация.

• При лиофилизация в присъствие на криопротектори;

В сравнение с други биопрепарати, тези базирани с биоконтролиращи агенти от род *Trichoderma* са търговски предпочитани поради тяхното комплексно действие: стимулират растежа на растенията, за опазване на почвите и спазване на биологиното равновесие (Yedidia I, et.al., 1999). Техните възможности да синтезират антагонистични съединения (протеини, ензими, и антибиотици) и микроелементи (витамини, хормони, и минерали) повишават тяхната ефективност в биоконтрола.

Конидиите произведени от хламидоспори при дълбочинно култивиране трябва да претърпят технологична обработка за изсушаване на течната биомаса (Harman GE, et .al, 1991).

Получаването на сухи микробиални препарати, приложими в биоземеделието, е свързано със загуба на клетки, тъй като различните щамове изискват различни условия на сушене и преживяемостта им е различна.

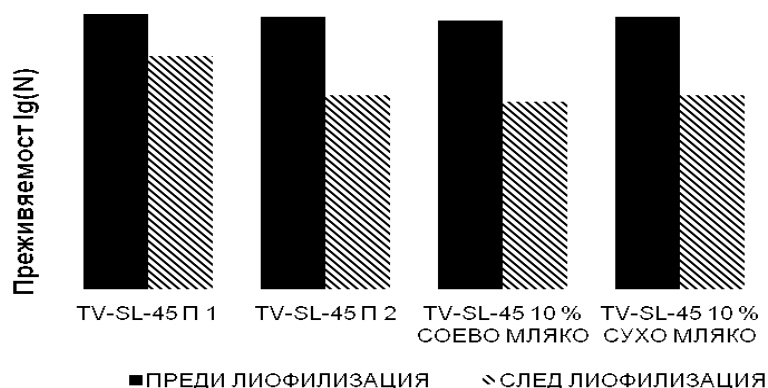
При производството на сухи субстрати се използват пълнители, които от една страна служат за стандартизиране на препаратите, а от друга - действат и като протектори преди сушене. Най-често използваните пълнители са сухо обезмаслено мляко, соево мляко, микронизирано нишесте и други. В тази връзка се проследява жизнеспособността на изследваните щамове при използването на различни типове среди и протектори.

За провеждане на експеримента са използвани спорови суспензии на изследваните щамове, предварително центрофугирани и ресуспендирани в подходяща среда или криопротектор.

За целта на експеримента са подготвени следните варианти: ресуспендиране на изследваните щамове в:

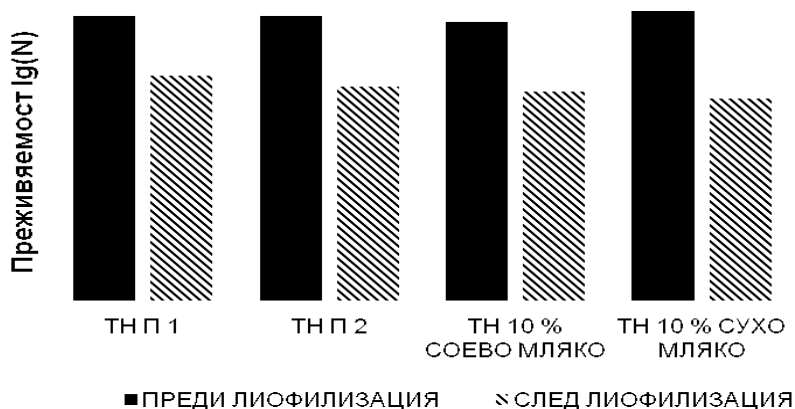
- криопротектор П1;
- криопротектор П2;
- 10% соево мляко;
- 10% сухо мляко;

Преживяемостта на щамовете преди и след лиофилизация са представени на фиг. 29, 30, 31.



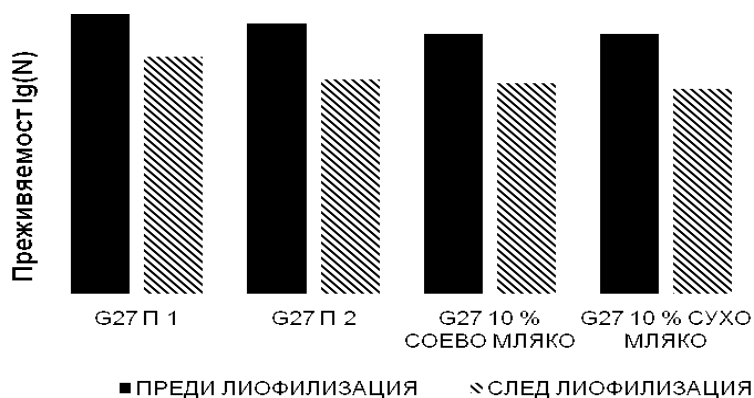
Фиг.19. Преживяемост на щам *T.asperellum* TV-SL-45 преди и след лиофилизация при използване на различни протекторни среди (спори /ml).

При лиофилизацията на щам *T.asperellum* TV-SL-45 (фиг.19) с различни варианти на протекторни среди се наблюдава намаляване броя на жизнеспособните клетки от 1 до 2 порядъка. Най-добро протектиращо действие за запазване жизнеността на клетките се наблюдава при използването на протектираща среда П1.



Фиг. 20. Преживяемост на щам *T.asperellum* TH преди и след лиофилизация при използване на различни протекторни среди (спори /ml).

По отношение на *T.asperellum* TH (фиг.20) може да се каже, че щамът намалява жизнеспособността на клетките, като спадането на броя живи клетки след лиофилизация е около два порядъка. Всички Протектираци среди оказват добри протективни свойства за запазване жизнеспособността на културите.



Фиг.21 Преживяемост на щам *T.reesei* G27 преди и след лиофилизация при използване на различни протекторни среди (спори /ml).

Щам *T.reesei* G27 (фиг.21) , може да се каже, че щамът е по-устойчив на лиофилизиране и жизнеспособността на клетките се запазва, като спадането на броя живи клетки след лиофилизация е около един порядък. Отново наблюдаваме среда П1, че оказва добри протективни свойства за запазване жизнеспособността на културите.

От проведения експеримент става ясно, че най-подходяща протекторна среда за лиофилизация на щамове *T.asperellum TV-SL-45*; *T.asperellum TH* ; *T.reesei G27* е П1

- **В присъствие на консервант „KATHON™”.**

Rohm и Naas откриват активните съставки на консервант Kathon CG в края на 1960-те години. В продължение на повече от тридесет години те разработват чрез напредъка на изотиазолинова химия продукт много повече от консервант. Консерванта „Катон” е регистриран като напълно безвреден и нетоксичен за околната среда , като това му дава право да бъде регистриран в световен мащаб, включително и в Япония.

Въз основа на тази информация е избран консерванта „Катон” за проверка на преживяемостта на изследваните щамове *T.asperellum TV-SL-45*, *T.asperellum TH* и *T.reesei G27*.

За смив на спорова суспензия са използвани физиологичен разтвор и рингелов разтвор, след което е добавен катон в концентрация 0,2 % (0,2 ml/ 100 ml). Проверката на активността на спорите е направена на 20- ят ден от смива, също така на първия и втория месец. Резултатите от проведените анализи са представени в табл.9,10,11.

Табл.9. Жизнеспособност на *T.asperellum TV-SL-45* при наличие на „Катон”.

<i>Trichoderma asperellum TV-SL-45</i>	Спори /ml смив с физиологичен разтвор	Спори /ml смив с рингелов разтвор
Общ брой спори 0 ден	3×10^7	$5,6 \times 10^7$
Общ брой спори 20 ден	1×10^7	$4,3 \times 10^7$
Общ брой спори 30 ден	$5,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
Общ брой спори 60 ден	2×10^5	$3,2 \times 10^5$

Табл.10 Жизнеспособност на *T.asperellum TH* при наличие на „Катон”

<i>Trichoderma asperellum TH</i>	Спори /ml смив с физиологичен разтвор	Спори /ml смив с рингеров разтвор
Общ брой спори 0 ден	6,8 x 10 ⁶	23 x 10 ⁶
Общ брой спори 20 ден	3 x 10 ⁶	4 x 10 ⁶
Общ брой спори 30 ден	2 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶
Общ брой спори 60 ден	4,3 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵

Табл.11. Жизнеспособност на *T.reesei G27* при наличие на „Катон”.

<i>Trichoderma reesei G27</i>	Спори /ml смив с физиологичен разтвор	Спори /ml смив с рингеров разтвор
Общ брой спори 0 ден	3 x 10 ⁶	4,2 x 10 ⁶
Общ брой спори 20 ден	2,2x 10 ⁵	4 x 10 ⁵
Общ брой спори 30 ден	2 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁵
Общ брой спори 60 ден	6 x 10 ⁴	3,7 x 10 ⁴

Действието на консервирания агент върху растежа на микроорганизмите е свързано с влияние върху техните ензимни системи и клетъчната мембрани. За да проявят своето действие консервиращите агенти трябва да проникнат в клетката, преодолявайки клетъчната стена и цитоплазмената мембрана.

Получените данни показват, че добавения консервант ”Катон” в съответните допустими концентрации оказва влияние върху растежа на *T.asperellum TV-SL-45*; *T.asperellum TH*; *T.reesei G27* наблюдава се намаляване на броя на жизнеспособните спори /ml с един до два порядъка за интервал от два месеца, но не води до пълното подтискане на изследваните култури. Ето защо той може да бъде добавен към крайната формула на един биопрепарат, с цел увеличаване трайността на продукта без да се влошат неговите качества и вид.

6.2. Изследване физиологичния ефект на изследваните щамове върху растежните показатели на растения *Cyclamen spp.* (Циклама) и *Chrysanthemum spp.* (Хризантема).

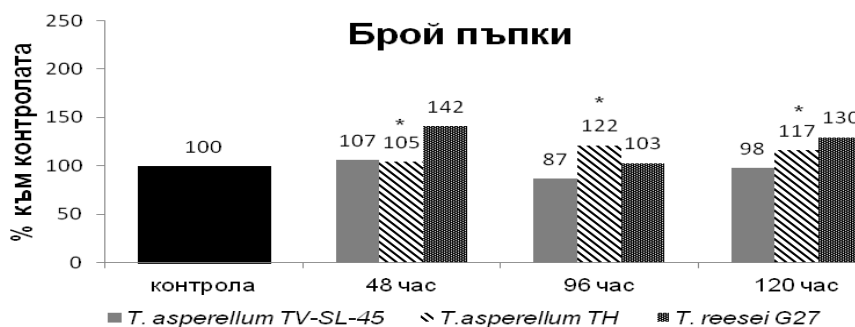
Представители на род *Trichoderma* се разпространяват чрез присаждането на растенията. След колонизиране на корените на растенията (Brotman et al. [2008](#)) и проникането на представителите на рода в тях, по този начин окупират нови нисши. Това взаимодействие на представители от род *Trichoderma* с растенията, води до засилване на кореновата полиферация, подобрява растежа и развитието на растението, и защитава растението срещу токсични въздействия, срещу които *Trichoderma* показва голяма резистентност. Благодарение на това представителите на рода могат да се използват като средства за възстановяване на замърсени почви и води чрез третирането на подходящи растения със спори (Harman et al. [2004](#)).

• Тест с растение *Cyclamen persicum* - сорт - *Halios magenta ecarlate* (Циклама)

- Есенно-зимен сезон- месец Септември – Декември.

Проведени са експерименти с цел изследване влиянието на щамове *T. asperellum* TV-SL-45; *T. asperellum* TH; *T. reesei* G27 върху *Cyclamen persicum* - сорт - *Halios magenta ecarlate* (Циклама).

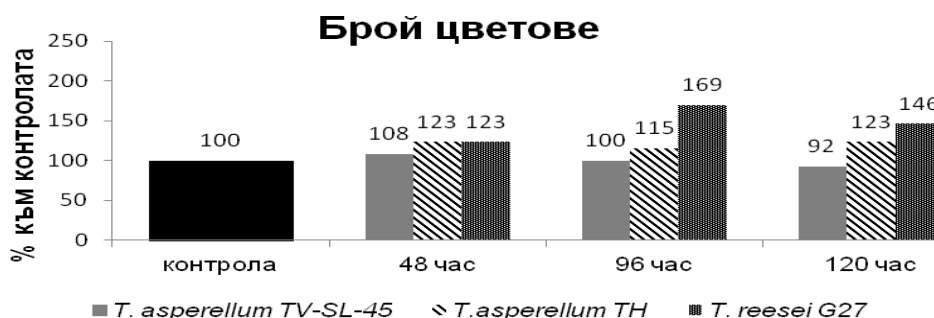
Експериментите са проведени в отворена хидропонна система със субстрат торфено-перлитова смес. Изследваните щамове са приложени като културална течност в концентрация $1 \div 5 \times 10^6$ спори/ml, доза- 2ml/l. Заложени са и контролни варианти, които се поливат с вода. Направена е статистическа обработка на получените данни, като е отчетена стандартна грешка и е направен дисперсионен анализ, за да се проследи въздействието върху вегетативното и генеративно развитие на тестваните растения (Приложение 2).



* $p < 0.05$

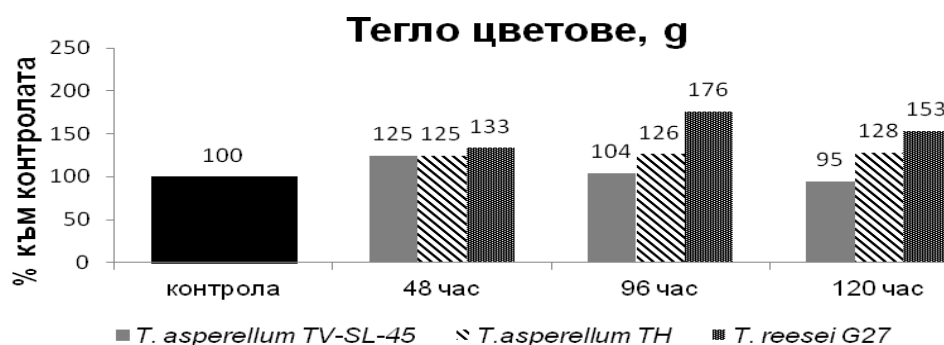
Фиг. 22. Влияние на изследваните щамове *Trichoderma* върху броя пъпки на растение *Cyclamen persicum* - сорт - *Halios magenta ecarlate* (Циклама) след третиране.

Данните от отчитането на броя пъпки (фиг.22) показват, че щамове *T.asperellum TH* и *T.reesei G27* имат положителен ефект върху образуването на цветовете. Най-добър ефект се наблюдава при щам *T.reesei G27*- 48 час-повишаване с 42% спрямо контролния вариант. При щам *T.asperellum TV-SL-45* се наблюдава подтискащ ефект върху формирането на пъпки, вероятно поради изключителното развитие на кореновата система.



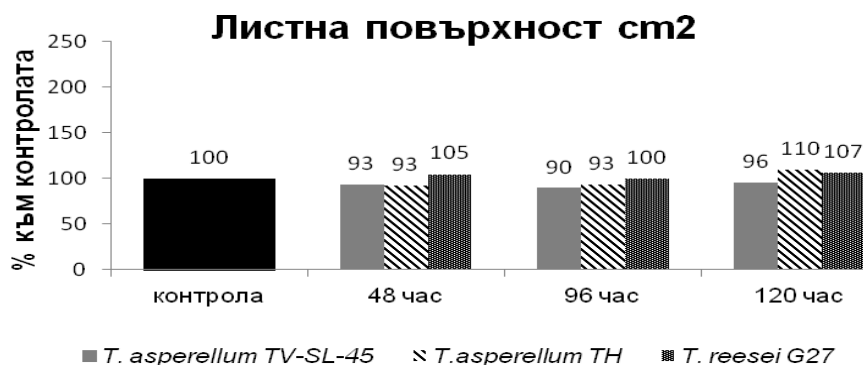
Фиг. 23. Влияние на изследваните щамове *Trichoderma* върху броя цветове на растение *Cyclamen persicum* - сорт - *Halios magenta ecarlate* (Циклама).

Данните от отчитането на броя цветове (фиг.33) са аналогични с тези от броя формирани пъпки. Най- добър ефект се наблюдава при щам *T.reesei G27*- 96 час-повишаване с 69% спрямо контролния вариант. При щам , *T.asperellum TV-SL-45* се наблюдава неутрален до подтискащ ефект върху броя на цветовете.



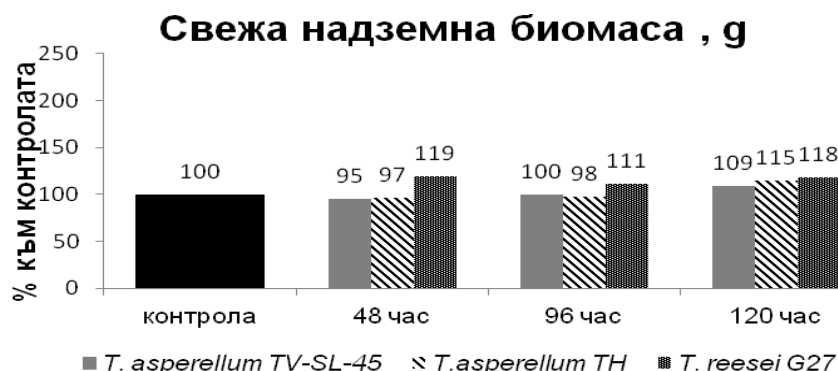
Фиг. 24. Влияние на изследваните щамове *Trichoderma* върху теглото на цветовете на растение *Cyclamen persicum* - сорт - *Halios magenta escarlate* (Циклама).

От получените резултати (фиг.24) след третиране с БКТ опитните щамове *Trichoderma*, ясно се вижда, че теглото на цветовете при щам *T.reesei* G27- 96 час- повишава с 76 % спрямо контролния вариант.



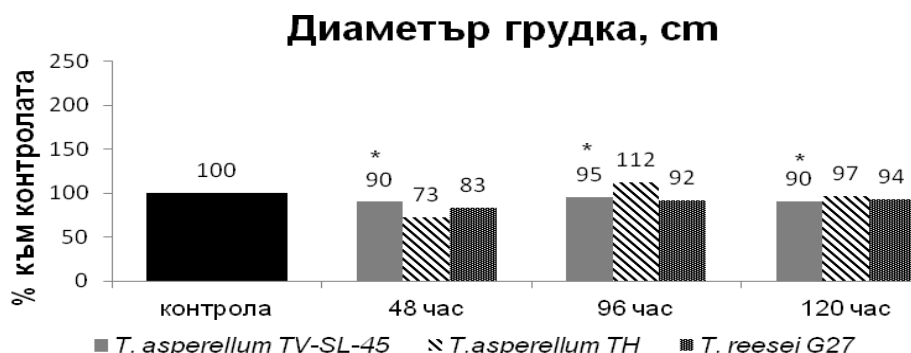
Фиг. 25. Влияние на изследваните щамове *Trichoderma* върху листната повърхност (cm²) на растение *Cyclamen persicum* - сорт - *Halios magenta escarlate* (Циклама).

Данните от отчитането на листната повърхност (фиг.25) показват, че получените резултати в следствие на третиране с БКТ на изследваните щамове са с неутрално до отрицателно действие върху формирането на листа повърхност.



Фиг. 26. Влияние на изследваните щамове *Trichoderma* върху свежата надземна биомаса на растение *Cyclamen persicum*-сорт-*Halios magenta ecarlate* (Циклама).

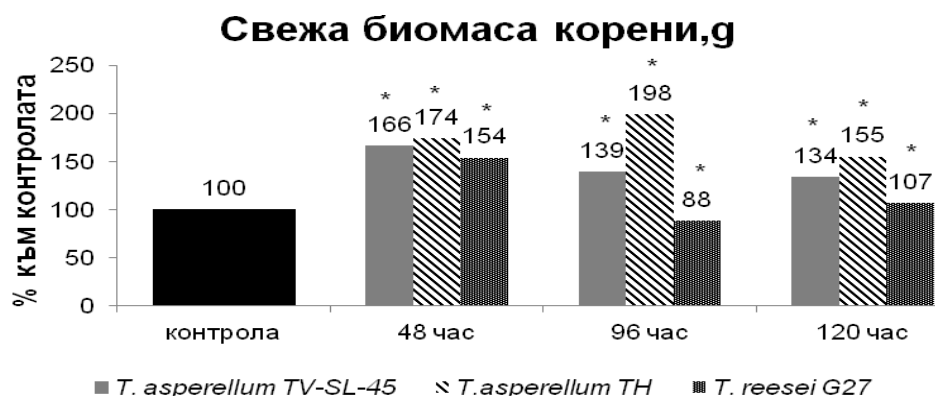
Данните от измерванията на свежата надземна биомаса показват, че получените резултати в следствие на третиране с БКТ на щамове *T.asperellum* TV-SL-45 и *T.asperellum* TH са с неутрално действие спрямо контролния вариант. При щам *T.reesei* G27 БКТ от всеки час от култивирането има положителен ефект върху формирането на надземна биомаса.



* $p < 0.05$

Фиг. 27. Влияние на изследваните щамове *Trichoderma* върху диаметъра на грудка (cm) на растение *Cyclamen persicum* - сорт - *Halios magenta ecarlate* (Циклама).

Данните от отчитането на диаметъра на грудките показват, че получените резултати в следствие на третиране с БКТ на изследваните щамове са с отрицателно действие върху нарастването на грудките, тъй като действието на гиберилините са насочени към цветовете предимно.



* $p < 0.05$

Фиг. 28. Влияние на изследваните щамове *Trichoderma* върху свежата биомаса на корени на растение *Cyclamen persicum* - сорт - *Halios magenta ecarlate* (Циклама).

Данните от измерването на свежата коренова биомаса (фиг.28), показват положителни резултати след третиране с БКТ на щамове *T.asperellum* TV-SL и *T.asperellum* TH. При щам *T.asperellum* TH- 96 час стимулиращия ефект върху кореновата система достига до 98% спрямо контролния вариант.

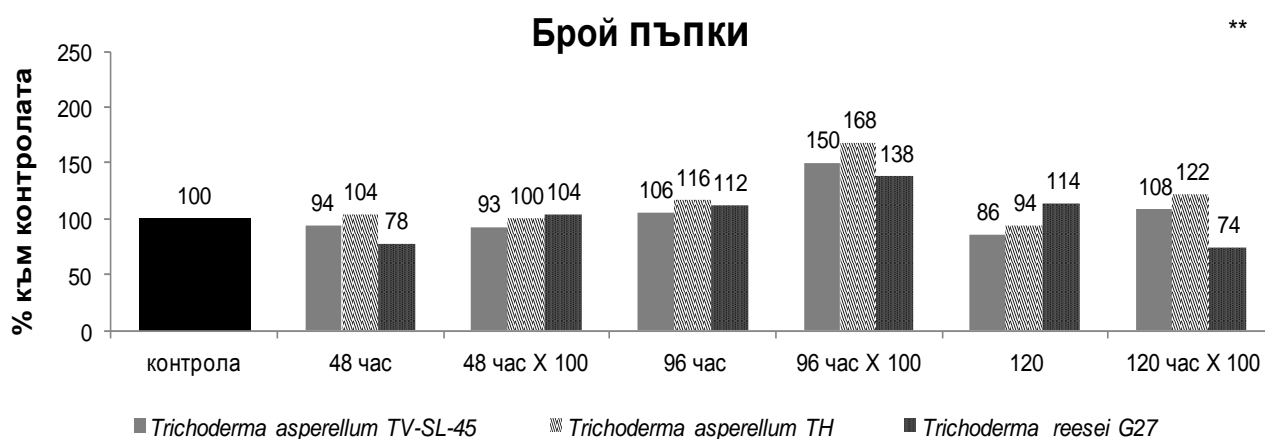
Получените резултати при стойностите на надземната биомаса и нарастването на грудки се дължат най-вероятно на продуцирането на високи количества цитокинини и от трите изследвани щамове. Една и съща концентрация на цитокинини може да стимулира растежа на стъблото и същевременно да потиска нарастването на корените и на образуваните пъпки. Количеството на цитокинините, в тези концентрации потискат растежните процеси на надземната биомаса, но се наблюдава стимулиране при образуването и формирането на пъпки и цветове. Кореновата система е компактна, брадеста, което показва много добър потенциал за прихващане и развитие при засаждане. При щам *T.reesei* G27 – 48 час количеството на броя пъпки е с 41% и броя цветове с 75 % повече спрямо контролните варианти. Това е от изключително значение за декоративния вид на растението *Cyclamen* (Циклама).

• **Тест с растение *Chrysanthemum grandiflorum* - сорт *Branroyal yellow* (Хризантема).**

- Лятно- есенен сезон- месец Май- Септември;

Проведени са експерименти с цел изследване влиянието на изследваните щамове *T.asperellum* TV-SL-45; *T.asperellum* TH; *T.reesei* G27 върху *Chrysanthemum grandiflorum* - сорт *Branroyal yellow* (Хризантема).

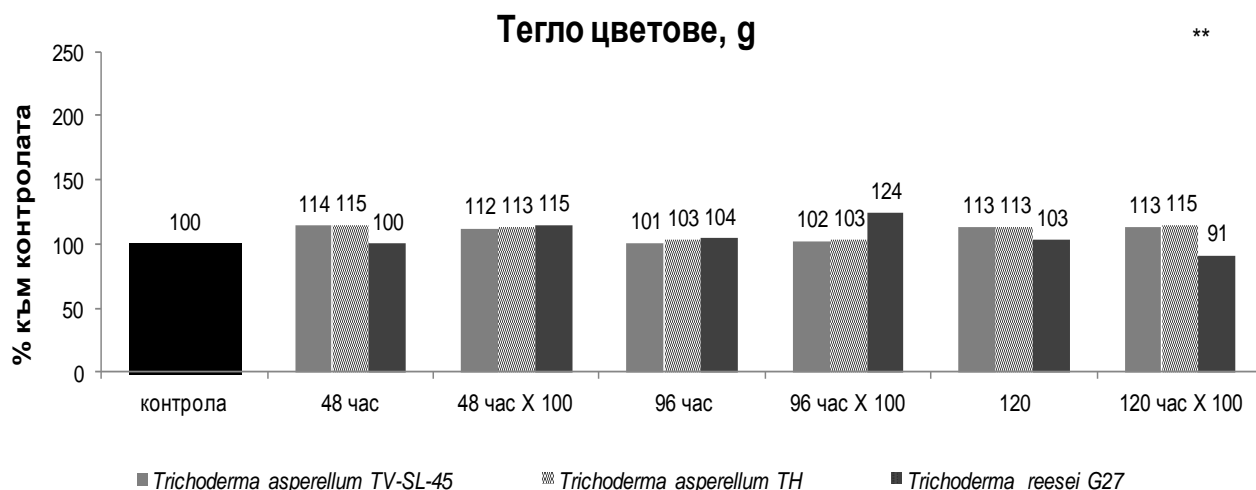
Експериментите са проведени в отворена хидропонна система със субстрат торфено-перлитова смес. Изследваните щамове са приложени като културална течност в концентрация $1 \div 5 \times 10^6$ спори/ml , доза- 2ml/l, като са изследвани и варианти с 100X разреждане на културалната течност. Направена е статистическа обработка на получените данни, като е отчетена стандартна грешка и е направен дисперсионен анализ, за да се проследи въздействието върху вегетативното и генеративно развитие на тестваните растения (приложение 3).



p > 0.05

Фиг. 29. Влияние на изследваните щамове *Trichoderma* върху броя пъпки на растение *Chrysanthemum grandiflorum* - сорт *Branroyal yellow* (Хризантема).

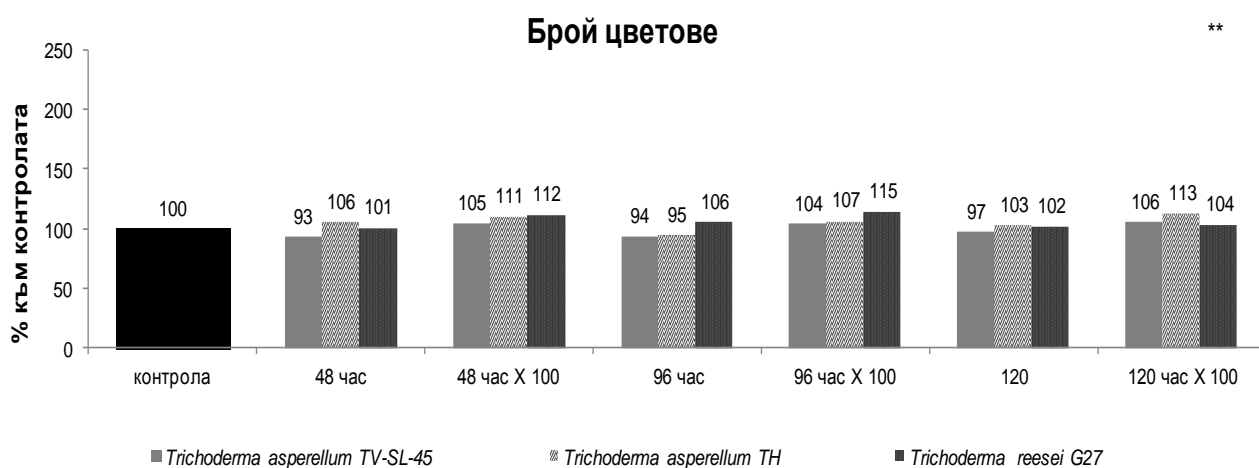
Данните от отчитането на броя пъпки (фиг.29) показват, че при 96 час- 100 пъти разреждане всички щамове имат положителен ефект върху образуването на пъпки. Най- добър ефект се наблюдава при щам *T.asperellum* TH повишаване с 68% спрямо контролния вариант, а щам *T.asperellum* TV-SL-45 с 50% формирането на пъпки.



p > 0.05

Фиг. 30. Влияние на изследваните щамове *Trichoderma* върху броя цветове на растение *Chrysanthemum grandiflorum* - сорт *Branroyal yellow* (Хризантема).

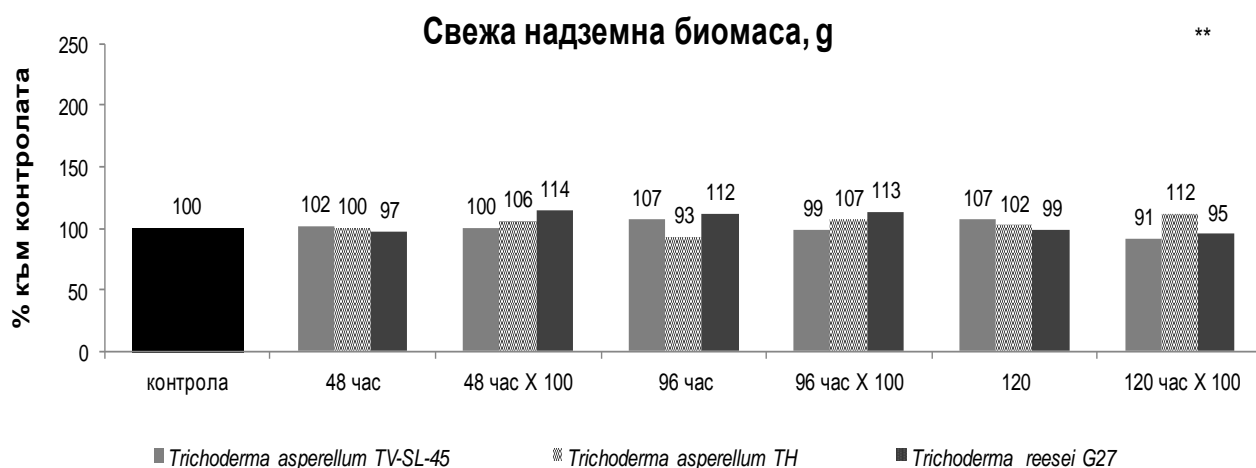
Данните от отчитането на броя цветове (фиг.30) показват положителен ефект при действието на БКТ и на трите щам. Най- добър ефект се наблюдава при щам *T.reesei* G27- 96 час -100 пъти разреждане - повишаване с 15% спрямо контролния вариант.



p > 0.05

Фиг. 31. Влияние на изследваните щамове *Trichoderma* върху теглото на цветове на растение *Chrysanthemum grandiflorum* - сорт *Branroyal yellow* (Хризантема).

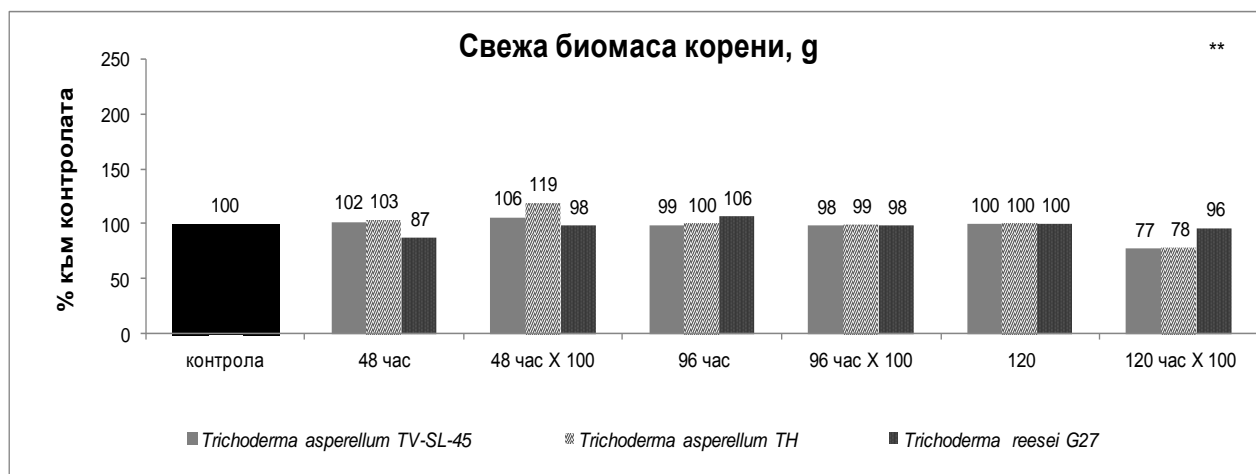
Данните от измерването на биомасата (фиг.31) на цветовете, показват положителни резултати след третиране с БКТ на всеки щамове. При щам *T.reesei* G27-96 час -100 пъти разреждане стимулиращия ефект върху теглото на формираните цветове достига до 24% спрямо контролния вари



p > 0.05

Фиг. 32. Влияние на изследваните щамове *Trichoderma* върху свежата надземна биомаса на растение *Chrysanthemum grandiflorum* - сорт *Branroyal yellow* (Хризантема).

Данните от измерванията на свежата надземна биомаса (фиг.32) показват, че получените резултати в следствие на третиране с БКТ на щамове *T.asperellum* TV-SL-45 има положителен ефект при вариант 96 час и 120 час (7 %), при щам *T.asperellum* TH положителен ефект се наблюдава при вариант 96 час- 100 х (7%) и 120 час- 100х (12%), при щам *T.reesei* G27 БКТ от 48 час- 100х (14 %) и 96 час- 100х (13%)от култивирането има положителен ефект върху формирането на надземната биомаса.



p > 0.05

Фиг. 33. Влияние на изследваните щамове *Trichoderma* върху свежата биомаса на корени на растение *Chrysanthemum grandiflorum* - сорт *Branroyal yellow* (Хризантема).

Данните от измерването на свежата коренова биомаса (фиг.33) показват неутрални до отрицателни резултати след третиране с БКТ на щамове *T.asperellum* TV-SL и *T.reesei* G27. При щам *T.asperellum* TH- 48 час- 100x стимулиращия ефект върху кореновата система достига до 19% спрямо контролния вариант.

И двете тествани разтения на късия ден. Виянието на БКТ на изпитваните щамове върху репродуктивните прояви на растенията, очевидно е свързана със синтеза на метаболитни вещества.

6.3. Определяне на оптимални дози за третиране на опитно растение *Euphorbia pulcherrima* (коледна звезда) с културални течности от плесенни и бактериални щамове.

Бактерии и плесените могат да сформират съобщества в ризосферата. Тези бактериални-плесенни взаимодействия често водят ползотворно действие на борбата с патогени. (P. Frey-Klett, et.al., 2011)

Също така може да се повишава системната устойчивост на растенията (Yedidia et al. 1999; Shores et al. 2010).

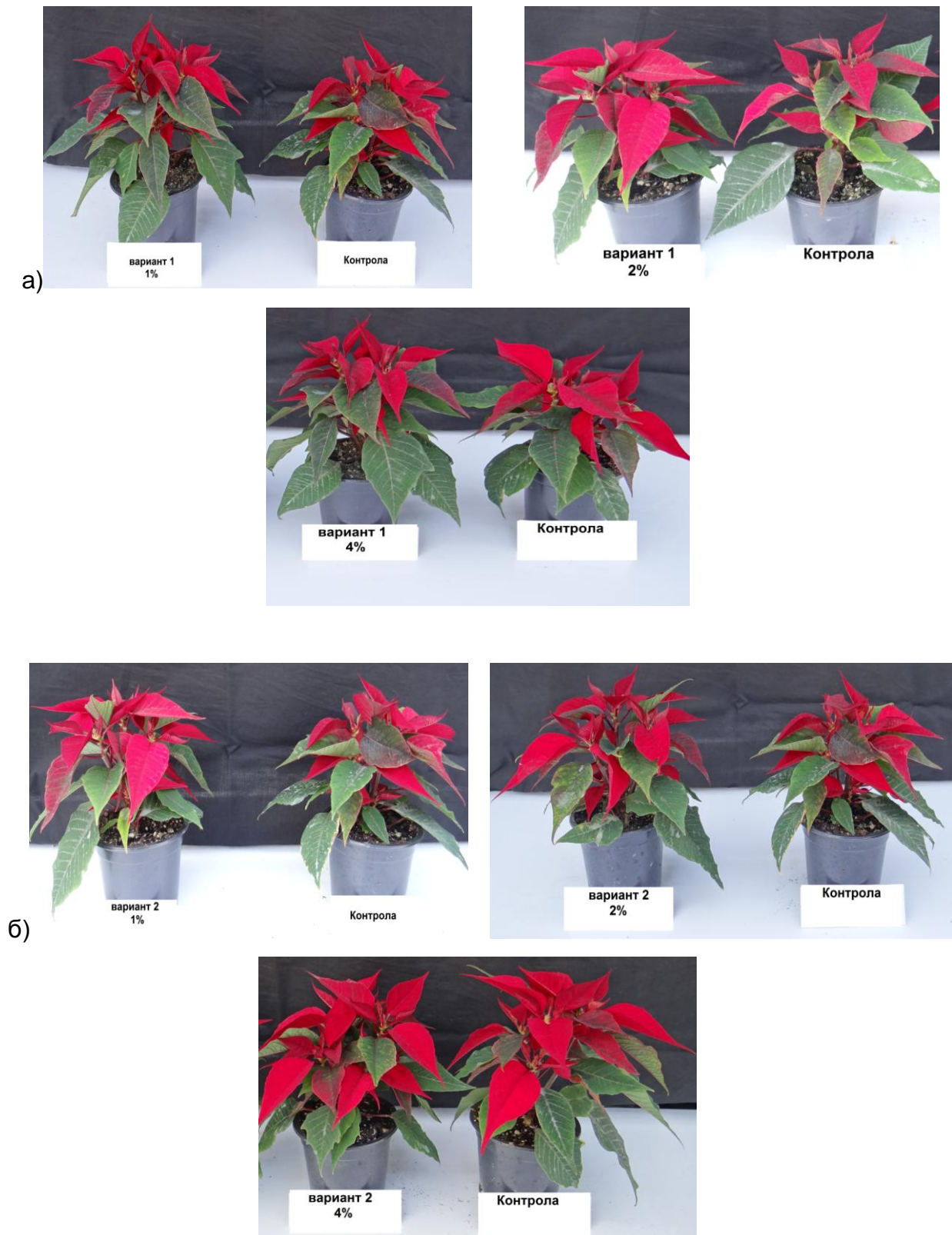
На база данни от дисертационен труд разработен към Софийски Университет, Биологически факултет- катедра Биотехнологии (Цветана

Личева,2013) са подбрани два микса от бактериални щамове с доказан биологиче ефект. Сформирани са два варианта с комбинации на подбраните плесенни и бактериални щамове: 1) Триходерма микс и 2) Триходерма микс+ Бактериален микс I+ Бактериален микс II . Състава на всеки микс е описан в таблица 15 и фиг 34 а), б).

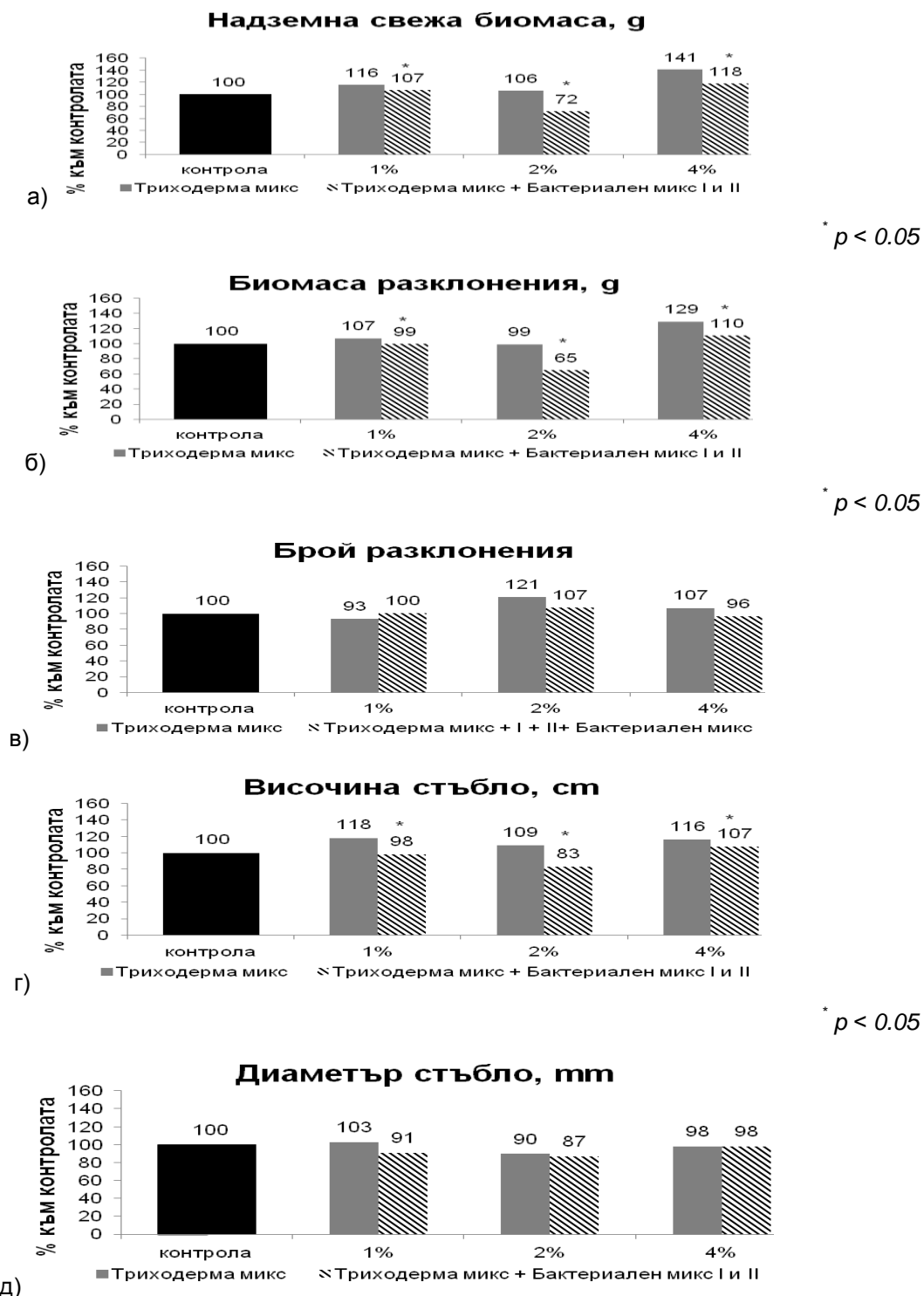
Проведени са експерименти с цел изследване влиянието на различни комбинации и концентрации(1%, 2%, 4 %) на микробиални щамове върху растения коледна звезда (*Euphorbia pulcherrima*) сорт *Already red*. Експериментите са проведени в отворена хидропонна система със субстрат торфено-перлитова смес. Изследваните бактериални щамове са приложени като културална течност в концентрация $1\div 5 \times 10^6$ спори /ml, като се проследява въздействието върху вегетативното и генеративно развитие на тестваните растения. Данните от биометричното измерване са представени на фиг.34, приложение 4.

Табл. 12 . Експериментални миксове използвани за третиране на растение *Euphorbia pulcherrima* сорт *Already red*.

Триходерма микс	<i>Trichoderma asperellum TV-SL-45</i>
	<i>Trichoderma asperellum TH</i>
	<i>Trichoderma reesei G27</i>
бактериален микс I	<i>Bacillus subtilis 6 VR</i>
	<i>Bacillus subtilis 8 VR</i>
	<i>Bacillus pumilus 9 VR</i>
	<i>Bacillus turingiensis 13 VR</i>
	<i>Sporosarcina/Bacillus pasteurii PVDM</i>
бактериален микс II	<i>Bacillus amyloliquefaciens 01TR</i>
	<i>Bacillus amyloliquefaciens 03TR</i>
	<i>Bacillus subtilis 04 TR</i>

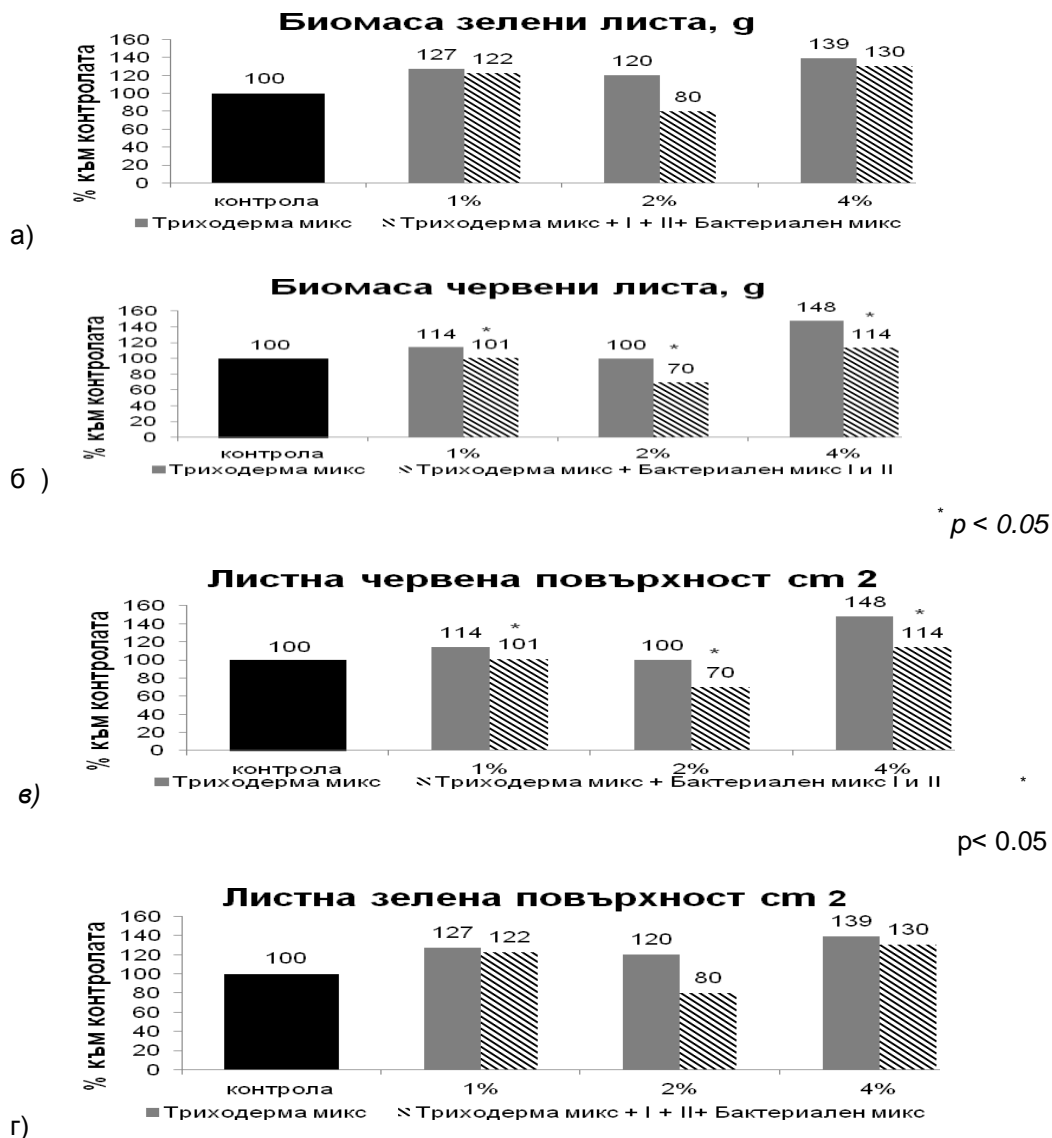


Фиг. 34 Декоративен вид на изследваните варианти на растение *Euphorbia pulcherrima* сорт *Already red* а) вариант 1 (Триходерма микс); б) вариант 2 (Триходерма микс+ бактериален микс I+бактериален микс II).



Фиг.35 .Влияние на експерименталните щамове върху :а) надземна свежа биомаса; б) биомаса на разклонения; в) брой разклонения; г) височина на стъбло; д) диаметър на стъбло на растение (*Euphorbia pulcherrima*) сорт Premium Red.

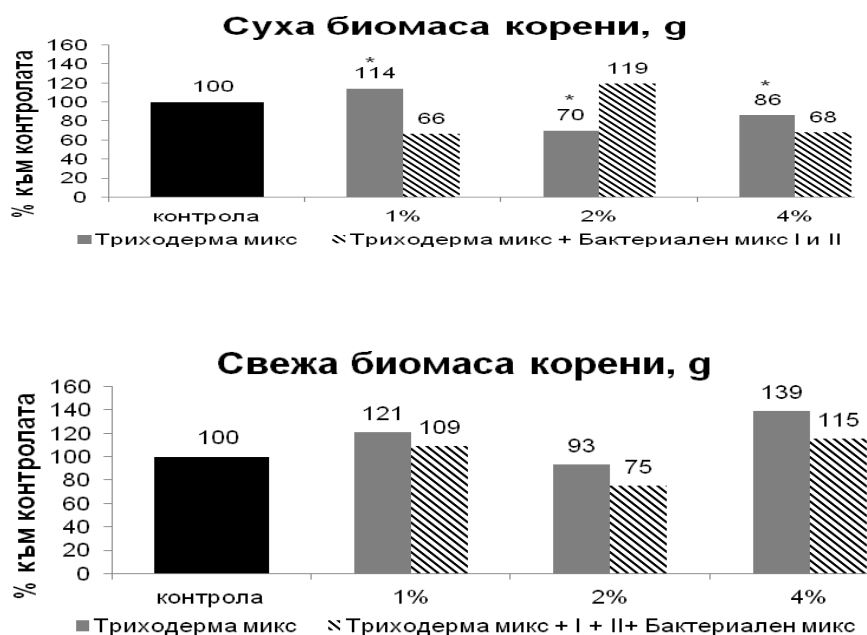
При използване на вариант 1 (Триходерма микс) фиг. 35- концентрация 4%, свежата надземна биомаса се увеличава спрямо контролния вариант. При отчитането на биомасата на разклоненията се наблюдава повишаване спрямо контролата при използване на вариант 1 (Триходерма микс)- концентрация 4%, от данните за броя на разклонения положителен ефект отново се наблюдава при вариант 1 (Триходерма микс), но концентрация 2%. Отчита се увеличаване на височината на стъблото на третираните с концентрация растения с вариант вариант 1 (Триходерма микс) концентрация 1 %.



Фиг.36 .Влияние на експерименталните щамове върху: а) биомаса зелени листа; б) биомаса червени листа; в) листна повърхност червени листа(cm^2); г) листна повърхност зелени листа(cm^2) на растение (*Euphorbia pulcherrima*) сорт Premium Red.

Представени данни на фиг. 36 показват встъпването в генеративна фаза на растението на късия ден. Съотношението между зелени и червени листа показва фазата, в която се намира растението. Относително и номинално площта на червените листа (индикатор за встъпване в генеративна фаза) се повишава при третиране с вариант 1 (Триходерма микс)- концентрация 4% - с 44% над контролата. При отчитане и на съотношението на червени към зелени листа спрямо контролата, се установява, че биомасата на червените листа (48%) и биомаса зелени листа (39%) при третиране с вариант 1 (Триходерма микс)- концентрация 4% нараства спрямо контролата, което демонстрира възможността за въздействие върху цъфтежа на растенията на късия ден.

Използваната комбинация от щамове оказва положително влияние върху вегетативното развитие на третираните опитни. Наблюдава се отражение и върху декоративния вид на растенията.



Фиг.37 .Влияние на експерименталните щамове върху растение (*Euphorbia pulcherrima*) сорт *Premium Red*.

От проведения експеримент при отчитане на свежата биомаса корени се демонстрира, че при използването на концентрация 4% при Триходерма микс има положителен прираст спрямо контролата – съответно 39%. Третираните растения са с по- добре развита коренова система, което е предпоставка за усвояването на повече хранителни вещества. Корените са значително по-дълги

от тези на контролата. Резултатите за сухата биомаса при всички варианти 4% получени при отчитане на резултатите са с инхибиращо действие спрямо контролата.

Като заключение може да се каже, че изпитаните щамове *Trichoderma* влияят умерено върху генеративните прояви на растенията на късия ден.

Щамовете синтезират освен значително количество цитокинини, така и значително количество гиберилини. Стойности от 10-12 $\mu\text{g/ml}$ са твърде съществени и могат да окажат влияние върху растежните процеси на растителния организъм. В някои от измерените физиологични показатели, очевидно са оказали влияние и генеративните процеси на растенията на късия ден. Стойностите са сравними с контролата или формираната биомаса е доста над контролата.

ОСНОВНИ ИЗВОДИ:

1. Микромицетните щамове *T. viride* TV-SL-45 и *T. harzianum* TH са идентифицирани като принадлежащи към вида *Trichoderma asperellum*, а при щам *T. reesei* G27 е потвърдена принадлежността към вида *Trichoderma reesei*.
2. Почвените микромицетни щамове *T. asperellum* TV-SL-45 и *T. asperellum* TH проявяват специфична ендоглюканазна ензимна активност при твърдофазово култивиране съизмерима с тази при дълбочинни условия.
3. Постигната е успешна имобилизация в хибридни органо-неорганични матрици (варианти 2.1, 2.2 и 5.3) на вегетативен посевен материал от щам *T. asperellum* TV-SL-45, като максималната ендоглюканазна активност е по-висока от тази на свободната култура с около 36 – 50%, която се запазва до 840^я час на култивирането.
4. В условия на дълбочинна и твърдофазова ферментация щамове *T. asperellum* TV-SL-45, *T. asperellum* TH и *T. reesei* G27 синтезират хормоноподобни метаболити с положителен стимулиращ биологичен ефект върху фитохромната система на семена на *Lactuca sativa* L. (къдрава салата).

5. При дълбочинно култивиране на трите изследвани щама по отношение на фитохормонални активности са получени стойности за GA₃ и GA₄ в границите на 3÷17 µg/ml, за транс-зеатин и тидиазурон - 230÷300 µg/ml.
6. Изследваните щамове показват максимална преживяемост при лиофилизация на споров материал в протектиращата среда П1 - комбинация от соево мляко - 10%; Na-глутамат - 2,0%; Лактоза - 5,0%; Витамин С - 2,0%.
7. Щамове *T. asperellum TV-SL-45*, *T. asperellum TH* и *T. reesei G27* повлияват положително биометричните показатели и декоративния вид на растения *Cyclamen persicum* - сорт *Halios magenta ecarlate* (Циклама) и *Chrysanthemum grandiflorum* - сорт *Branroyal yellow* (Хризантема).
8. Оптимална концентрация за третиране на растение (*Euphorbia pulcherrima*) сорт *Already red* при варианти *Триходерма микс* и *Триходерма микс + бактериален микс I и II* е 4%.

Справка за приносите

Приноси с научен характер:

1. Определена е видовата принадлежност на ризосферните щамове *T. asperellum TV-SL-45* и *T. asperellum TH* към вида *T. asperellum*.
2. Успешно е имобилизирана вегетативна култура на щам *T. asperellum TV-SL-45* в неорганични и хибридни матрици с повишаване и запазване на ендоглюканазната активност при продължителен процес на дълбочинно периодично култивиране.

Приноси с научно-приложен характер:

3. Установена е биосинтеза на хормоноподобни растежни регулатори от изследваните микромицетни щамове *T. asperellum TV-SL-45*, *T. asperellum TH* и *T. reesei G27* и положителен биологичен ефект върху семена на *Lactuca sativa L* (Къдрава салата).
4. Доказана е положителна биологична активност на изследваните щамове при третиране на растения *Cyclamen persicum* (Циклама), *Chrysanthemum*

grandiflorum (Хризантема) и *Euphorbia pulcherrima* (Коледна звезда), което дава възможност за включването им в биопрепарати за декоративни растения.

5. Конструиран е модел на твърдофазово култивиране на почвените изолати *T. asperellum TV-SL-45* и *T. asperellum TH* с доказана матаболитна активност, което дава възможност за включването им в сухи микробиални торове.
6. Разработена е концепция за иновативни комплексни биопрепарати, за които е установено повлияване развитието на тест растенията при *in situ* експерименти.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ

Публикации в реферирани научни списания

1. **Badalova, M.**, Y. Evstatieva, **L. Mushekova**, **Ts. Licheva**, D. Nikolova, V. Savov (2014) Natural and modified zeolites as matrices for the immobilization of *Trichoderma viride* SL-45. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 20, supp.1, pp.93-96. [SJR2014 – 0,197](#)
2. Evstatieva, Y., **M. Badalova**, G. Chernev, D. Nikolova, V. Savov (2013) New hybrid matrix for immobilization of *Trichoderma viride* SL-45. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 19: 2, pp.120-122 [SJR2013 – 0,174](#)
3. **Elena Velichkova**, **Mariya Yordanova**, **Marina Badalova**, Dilyana Nikolova, Yana Evstatieva (2014) Adherence of *Aspergillus awamori* K-1 and *Trichoderma viride* SL-45 on Loofa Sponge for Production of Hydrolases. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 20, Supp.1, pp.97-99 [SJR2014 – 0,197](#)

УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Badalova M.**, Evstatieva Y., **Yordanova M.**, Chernev G., **Mushekova L.**, Savov V., Nikolova D. (2012) Enhancement of cellulase production by immobilization of *Trichoderma viride* SL-45. 15th European Congress On Biotechnology, Turkey, September 2012, New Biotechnology, 29, S84.

2. Evstatieva Y., **M. Badalova** , G. Chernev, V. Savov, D. Nikolova (2012) New method for immobilization of *Trichoderma viride* SL-45. Младежка научна конференция "Климентови дни" - 2012, Сборник статии, Книжка трета, ISSN: 1314-4960, pp. 76, София, България
3. **Marina Badalova**, Yana Evstatieva, Tsvetana Licheva, Valentin Savov, (2014) Significance of secondary metabolites produced by two *Trichoderma* strains for the biological control of plants. Първа национална конференция по Биотехнология – 30 години Биотехнология в България, 17 – 18 октомври 2014 г., София, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски”, абстракти стр. 74

УЧАСТИЕ В ПРОЕКТИ

1. Проект: Програма „Млади Учени – 2011”; Договор № ДМУ 03/12 “Изследване на биокаталитичната и биосинтетичната активност на имобилизирани микромицетни щамове с неорганични и хибридни материали” 2011 – 2013 г.; Финансиран от ФНИ при МОМН; Ръководител на проекта гл. ас. д-р Яна Евстатиева, участващи докторанти: **Мария Йорданова, Росица Денкова, Марина Бадалова.**
2. Фонд „Научни изследвания” към СУ, Ръководител на проекта: доц. д-р Валентин Савов, „Изследване на възможностите на микромицетни щамове от род *Trichoderma* като компоненти на бактериални торове“, участващи докторанти: **Марина Бадалова**, Срок на договора: 05.2014 – 12.2014 г.

ЦИТИРАНИЯ НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ

Цитирана публикация:

Evstatieva, Y., M. Badalova, G. Chernev, D. Nikolova, V. Savov (2013) New hybrid matrix for immobilization of *Trichoderma viride* SL-45. Bulg. J. Agric. Sci., 19: 2, pp.120-122.

Цитирана от:

1. Ashfaque, M., Solomon, S., & Pathak, N. (2015), Kinetic Study of Immobilized Cellobiase Produced from Immobilized Wild-Type *Trichoderma longibrachiatum*. Sugar Tech, 1-7.

Цитирана публикация:

M. Badalova, **Y. Evstatieva**, L. Mushekova, **Ts. Licheva**, **D. Nikolova**, **V. Savov**, Natural and modified zeolites as matrices for the immobilization of *Trichoderma viride* SL-45., Bulg. J. Agric. Sci., том:20, брой:supp.1, 2014, стр. 93-96.

Цитирана от:

2. Bondi, G., Capra, G.F., Macci, C., Ceccanti, B., Grilli, E., Vacca, S., Duras, M.G., Dessena, M.A., Marras, G., Buondonno, A. and Masciandaro, G., 2016. Biochemical performance of degraded soil recovered by lake-dredged materials (LDM) as pedotechnomaterials. Journal of Soils and Sediments, pp.1-18.

Study of the Biological Activity of Rhizospheric Micromycete Strains in Biomineral Complexes

Marina Stefanova Badalova

Summary

In this dissertation, screening methods and techniques have been developed and applied to predict the biosynthesis of primary and secondary metabolic products in the case of batch and solid state cultivation; the biosynthetic abilities of *T. asperellum TV-SL-45*, *T. asperellum TH* and *T. reesei G27* as immobilized cultures are studied, as well as their storage in immobilized form; their physiological effects on the biometric parameters of different plants *in vivo* are tested in order to assess the possibility to design a future microbial preparation for application in agriculture with a truly beneficial effect on the environment.

By molecular techniques such as DNA fingerprinting (Arisan-Atac et al., 1995) and ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS) analysis, the micromycete strains *T. asperellum TV-SL-45* and *T. asperellum TH* are identified as representatives of *Trichoderma asperellum*, and *T. reesei G27* - as a representative of *Trichoderma reesei*.

A series of experiments is conducted to study the biosynthetic potential of *T. asperellum TV-SL-45* immobilized on natural or synthetic organo-inorganic matrices. Successful immobilization of vegetative material of *T. asperellum TV-SL-45* in hybrid organo-inorganic matrices is achieved (variants 2.1, 2.2 and 5.3) and the maximum endoglucanase activity is 36-50% higher than that of the free culture and is maintained until the 840th hour of cultivation.

An LC-MS analysis of the phytohormone content of culture liquids from the studied strains cultivated on a medium containing Micricel as an inductor is performed. The analyses of samples taken at the 96th hour of the batch cultivation show values for GA3 and GA4 3÷17 µg/ml, for zeatin and thidiazuron - 230÷300 µg/ml for all three strains tested.

The synthesized secondary metabolites by the studied micromycete strains in the conditions of batch and solid-state cultivation have a positive effect on the phytochrome system of *Lactuca sativa L.* (curly salad) seeds. Strains *T. asperellum TV-SL-45*, *T. asperellum TH* and *T. reesei G27* positively affect the biometric parameters and the decorative appearance of *Cyclamen persicum* plants - variety *Halios magenta ecarlate* and *Chrysanthemum grandiflorum* plants - variety *Branroyal yellow*.

The results obtained in this study related to the biosynthesis of primary and secondary metabolic products in the case of batch and solid state cultivation, the biosynthetic abilities of *T. asperellum TV-SL-45*, *T. asperellum TH* and *T. reesei G27* as immobilized cultures are studied, as well as their storage in immobilized form their physiological effects on the biometric parameters of different plants *in vivo* complement the scientific data of other authors who are tested in order to assess the possibility to design a future microbial preparation for application in agriculture with a truly beneficial effect on the environment.

Изказвам най-сърдечна благодарност към научният си ръководител доц. д-р Валентин Савов за гласуваното ми доверие, за научното ръководство, педагогически напътствия и подкрепа при изготвянето на настоящата дисертация. Изказвам огромна благодарност на доц. д-р Диляна Николова и гл.ас. д-р Яна Евстатиева за помощта, подкрепата и вярата в мен. Изключително съм им признателна за напътствията и всестранната помощ във всеки един от етапите при подготовката на дисертационния труд. Едно голямо „благодаря“ на Константин Чакалов и екип за огромната помощ, за изключителните знания и умения, които ми предоставиха за осъществяването на опити с растителни обекти.

Благодаря на гл.ас.д-р Цветана Личева и всички колеги от катедра Биотехнология за техните ценни съвети и подкрепа.

Благодарна съм за огромната подкрепа на моето семейство, особено на дъщеря си и малкия ми син, които бяха една от основните движещи сили за „изработването на настоящия труд“.

Не искам да пропусна някой, затова „Сърдечно Благодаря на Всички !



Основна част от експерименталната работа в настоящата дисертация е осъществена с финансовата подкрепа на фирма РОМБ ООД .

Части от настоящите изследвания са осъществени със средства по Договори за финансиране:

- ✓ ДМУ 03/12; Програма „Млади Учени – 2011““ Изследване на биокаталитичната и биосинтетичната активност на имобилизирани микромицетни щамове с неорганични и хибридни материали” 2011 – 2013 г.; Финансиран от ФНИ при МОМН; Ръководител на проекта гл. ас. д-р Яна Евстатиева.
- ✓ Фонд „Научни изследвания“ към СУ, Ръководител на проекта: доц. д-р Валентин Савов, „Изследване на възможностите на микромицетни щамове от род *Trichoderma* като компоненти на бактериални торове“, Срок на договора: 05.2014 – 12.2014 г.