



**Софийски Университет „Св. Климент Охридски“**  
**Биологически факултет**  
**Катедра „Биотехнология“**

**Теодора Владимирова Георгиева**

**ИЗСЛЕДВАНЕ ФИТОХОРМОНАЛНАТА АКТИВНОСТ НА  
ЩАМОВЕ ОТ РОД *PSEUDOMONAS* И КОНСТРУИРАНЕ НА  
БИОНАНОФОРМУЛИ ЗА ПОДОБРЯВАНЕ ПРОДУКТИВНОСТТА  
НА РАСТЕНИЯТА**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

*на дисертация за присъждане на научната и образователна степен „Доктор“  
Професионално направление 5.11 Биотехнологии ДП Технология на биологично  
активните вещества*

София, 2019 г.



Дисертацията е написана на 122 печатни страници и включва 32 фигури и 19 таблици. Цитирани са 217 литературни източника.

Изследванията по дисертацията са извършени в катедра „Биотехнология” при Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”, Химически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”, фирма „РОМБ” ООД, София.

Дисертационният труд е обсъден и насрочен за защита на заседание на разширен съвет на катедра „Биотехнология” при Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”, проведено на ..... г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на **19.09.2019** от **10:00** часа в **зала 260** Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”, бул. „Драган Цанков” №8.

Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се на сайта на Биологическия факултет.

**Софийски Университет „Св. Климент Охридски“**  
**Биологически факултет**  
**Катедра „Биотехнология“**

**Теодора Владимирова Георгиева**

**ИЗСЛЕДВАНЕ ФИТОХОРМОНАЛНАТА АКТИВНОСТ НА ЩАМОВЕ ОТ  
РОД *PSEUDOMONAS* И КОНСТРУИРАНЕ НА БИОНАНОФОРМУЛИ ЗА  
ПОДОБРЯВАНЕ ПРОДУКТИВНОСТТА НА РАСТЕНИЯТА**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

на дисертация за присъждане на научната и образователна степен „Доктор“ Професионално  
направление 5.11 Биотехнологии ДП Технология на биологичноактивните вещества

**Научен ръководител:**  
**Доц.д-р Валентин Савов**

**Рецензенти:**  
**Доц. Траяна Спасова Недева**  
**Проф. Екатерина Георгиева Филчева**

### **Използвани съкращения и означения:**

ACC	-	1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (деаминаза)
Cfu	-	Колонообразуващи единици
CPPU	-	N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea
DNS	-	Динитросалицилова киселина
DO	-	Разтворен кислород
GA	-	Гиберелинова киселина
HCN	-	Цианиди
NBRIP	-	National Botanical Research Institute's phosphate media
MS среда	-	Murashige and Skoog
PGPR	-	Подпомагащи растежа и развитието на растенията ризобактерии
PGP активности	-	Подпомагащи растежа на растенията активности
PGP микроорганизми	-	Подпомагащи растежа на растенията микроорганизми
PSI	-	Фосфат солубилизиращ индекс
TZ	-	Транс зеатин
ИОК/IAA	-	Индолоцетна киселина
КДА	-	Картофрно-декстрозен агар
ЛОС	-	Летливи органични съединения
МПА	-	Месопептонен агар
МПБ	-	Месопептонен бульон
ПС	-	Протекторна среда
СЕМ	-	Сканиращ електронен микроскоп
ТЕМ	-	Трансмисионен електронен микроскоп
ХС	-	Хранителна среда

## I. Увод

Нарастващата нужда от безопасни и здравословни храни и проблемите, които произтичат от замърсяването на околната среда, са довели до възникване и развитие на органичното земеделие. Органичното земеделие се основава на разработването и прилагането на биоторове и стимулиращи растежа на растенията органични вещества. Използването на химически торове в големи количества, води до увеличаване на производителността на селскостопанските стоки, но в същото време те водят до неблагоприятен ефект върху почвата. Прекомерното използване на изкуствени торове и други агрохимикали за увеличаване на добива, може да доведе до замърсяване на подпочвените води и изчерпване на хранителните вещества в почвата, което е предпоставка за намаляване на добивите. Използването на различни технологии за производство на биоторове може да предотврати този проблем. Биоторовете от микроорганизми могат да заместят химическите торове. Те са по-евтина и благоприятна алтернатива за околната среда. Биоторовете, наричани още микробни инокуланти, не осигуряват директно хранителни вещества на културните растения. Те представляват биологични препарати, които съдържат живи или латентни клетки на полезни почвени микроорганизми. Инокулацията с полезни почвени микроорганизми е обещаващ метод за повишаване на почвеното плодородие, тъй като по този начин се увеличава достъпа на растенията до редица важни елементи, като азот, фосфор и калий. Това от своя страна ще доведе до значително намаляване в използването на синтетични торове. Микроорганизмите участват в процесите на азотфиксация, разтваряне на неразтворимите в почвата фосфати, трансформиране на комплексна органична биомаса в минерални съединения, които се използват от растенията, както и синтеза на растежни фактори, като аминокиселини, витамини и др. Микроорганизмите подпомагат растенията да абсорбират по-голямо количество хранителни вещества, които, дори и да присъстват естествено в почвата, в някои случаи не могат да бъдат асимилирани, защото са в неразтворима форма.

Ризобактериите са група ризосферни бактерии, които оказват благоприятен ефект върху растежа на растенията. Наложената в последното десетилетие абривиатура PGPR в най-общ смисъл означава бактерии, които в някои случаи по неизвестен механизъм, стимулират растежа на растенията. Тези бактерии стимулират растежа на растенията по различен механизъм, но обикновено го повлияват чрез разтваряне на фосфора, повишаване на усвояването на хранителни вещества, продукция на растежни хормони или продукция на различни антимикробни съединения, които действат по различни начини. Повечето идентифицирани биоконтролни щамове *Pseudomonas* продуцират противогъбни метаболити, като освен антагонистичен ефект, оказват влияние и върху растителната защитна система.

Нанотехнологиите са друга област на биотехнологиите с обещаващо значително приложение в селскостопанските проучвания при решаването на важни селскостопански проблеми, каквито са детекцията на замърсители, болести по растенията, пестициди и патогени. В наши дни, когато селскостопанските научни работници се изправят пред основни предизвикателства като намалена продукция, недостиг на хранителни вещества и климатични промени, нанотехнологиите предлагат обещаващи прецизни приложения. Тази иновативна технология включва широки приложения, като контрол на заболяванията по растенията,

повишен прием на хранителни вещества, подобрен в растежа на растенията, както и забавено освобождаване на агрохимикали. Интересно е, че популярността на стратегията, базирана на наночастиците нараства в селскостопанския сектор, като резултат на уникалните ѝ възможности, сравнени с тези на биопестицидите.

## II. Цел и задачи

*Целта на дисертационната работа е изследване на ризосферни щамове от род *Pseudomonas*, физиолого-биохимични, генетични и културални характеристики за доказване на PGP-активност и конструиране на бионаноформули за подобряване продуктивността на растенията.*

За постигане на поставената цел са формулирани следните задачи:

1. Физиолого-биохимично и молекулярно-генетично охарактеризиране на щамове от род *Pseudomonas*.
2. Изследване на основни активности при избраните щамове свързани с подобряването растежа и развитието на растенията (PGP-активности).
  - Тестване на основни PGP- активности при изследваните щамове
  - Тестване потенциала на изследваните щамове за биоконтрол при тест патогенни микроорганизми.
  - Изследване на безклетъчни културални течности на използваните щамове за съдържание на вещества с фитохормонален ефект.
3. Култивиране при различни условия на изследваните щамове с цел оптимизиране на процеса и натрупване на биомаса.
4. Мащабиране на процесите на култивиране и технологичните процеси за съхранение на получената биомаса на селектирани щамове от изследваните микроорганизми.
5. Проследяване влиянието на процеса на лиофилизация върху запазване на жизнеспособността на клетките.
6. Изследване на различни варианти от получените културални течности на щамове от род *Pseudomonas* за физиологичен ефект при растения.
7. Провеждане на *in vivo* тестове с растения за проследяване ефекта на получените субстанции от изследваните щамове по отделно и в комбинация с Хуминови вещества.
8. Оценка въздействието на наноматериали върху развитието на щамове от р. *Pseudomonas* и формирането на биоактивни наноформули.
  - Оценка на ефектите на формираните био-наноформули от представителите на р. *Pseudomonas* при *in vivo* експерименти с опитни растения.

### **III. Материали и методи**

#### **1. Микроорганизми**

Обект на изследване в настоящата дисертация са ризосферни бактерии от род *Pseudomonas*, изолирани от почвени проби, част от колекцията на катедра Биотехнология на Биологически факултет към СУ „Св. Климент Охридски“.

#### **2. Хранителни среди, буфери и разтвори**

#### **3. Методи за култивиране и съхранение на изследваните микроорганизми**

#### **4. Физиологични и биохимични методи за определяне**

#### **5. Генетични методи за идентификация на ДНК**

#### **6. Аналитични методи за определяне на PGP- активности на щамове от род *Pseudomonas*.**

#### **7. Проследяване динамиката на растеж на изследваните щамове при култивиране**

- в лабораторни условия на клатачен апарат;
- в лабораторен биореактор;
- в биореактори за мащабирано производство.

#### **8. Постферментационни процеси и методи.**

#### **9. Методи за сушене на получените културални течности от изследваните щамове *Pseudomonas*.**

#### **10. Хроматографски методи**

- LC-MS анализ на съдържанието на фитохормони в културални течности;
- GC/FID анализ за определяне количеството на ментолни съединения в екстракти на *Mentha piperita*.

#### **11. Проучване на наносубстанции от въглеродни нанотръбички и наночастици от метални оксиди.**

#### **12. Микроскопски методи за проследяване влиянието на наноматериалите върху третираните клетки.**

#### **13. Методи за оценка на биологичната активност на бактериални щамове върху развитието на тест растения, самостоятелно и в комбинации.**

#### **14. Обработка на резултатите.**



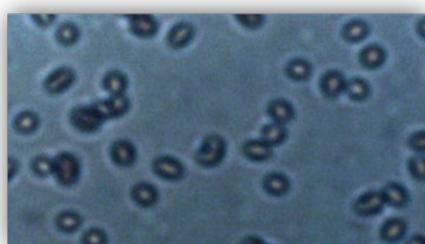
#### IV. Резултати и обсъждане

##### 1. Щамове продуценти. Физиолого-биохимична характеристика и молекулярно генетична идентификация на работните щамове от род *Pseudomonas*.

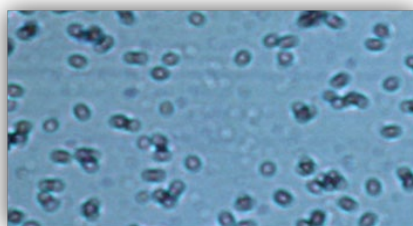
За осъществяване целта на настоящия дисертационен труд са включени пет щамове от род *Pseudomonas*: *Ps. putida* ВТСС1046 и ризосферните изолати Or2, Or5, Rsb22 и 1S4. Щам *Pseudomonas putida* ВТСС1046 е подбран от колекцията на НБПМК, където е описан с потенциал за разграждане на ароматни въглеводороди и техни производни. Останалите щамове са ризосферни изолати, събрани в колекциите на катедра Биотехнология (БФ, СУ) и катедра Инженерна геология (МГУ) и предоставени за изследване.

###### 1.1 Физиологична характеристика и ензимен профил

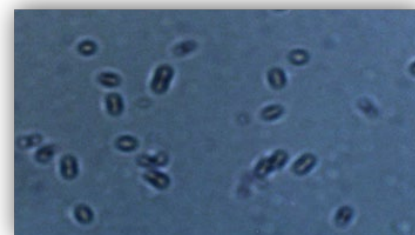
Установени характеристики на представители от групата *Pseudomonas putida* показват, че са Грам отрицателни пръчковидни бактерии, в някои случаи с наличие на камшичета. Срещат се и видове с овална форма. Намират се в повечето местообитания-почви и води, където съдържанието на кислород е високо. Развиват се оптимално при 25-30°C и лесно могат да бъдат изолирани (Espinosa-Urgel et.al.2000).



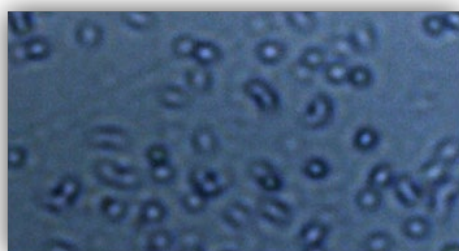
*Pseudomonas sp.* Or5



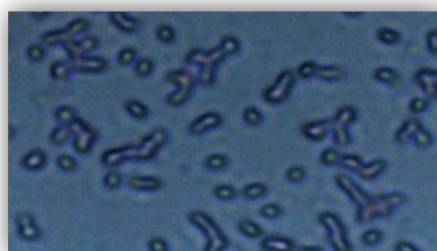
*Ps. putida* ВТСС1046



*Pseudomonas sp.* Or2



Щам Rsb22



Щам 1S4

Фиг 1. Микроскопски снимки на изследваните щамове след оцветяване по Грам.

Новоизолираните ризосферни бактерии първоначално са характеризирани, съгласно класическите подходи, базиращи се на набор от различни морфолого-физиологични и биохимични тестове. Всичките щамове са Грам (-), каталазо-положителни и оксидаза – положителни, неспорообразувачи и се развиват добре в аеробни условия. Изолатите показват

много добър растеж в диапазона 25 - 30°C на хранителна среда МПБ. Морфологично се отличават от типичните бацили с по-къси пръчки, леко овални и с характерна кривина (фиг. 1). Групирани са предимно по двойки, като се наблюдават и единични клетки.

- **Биохимичен и ензимен профил на новоизолираните щамове**

Системата за изпитване API 20NE е стандартизирана за идентифициране на грам-отрицателни не-ентерогенни бактерии (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Aeromonas*) въз основа на 8 конвенционални теста, 12 асимилационни теста и база данни (<https://apiweb.biomerieux.com>). Изследваните щамове бяха подложени на първоначално групиране с помощта на система за идентификация API 20NE (Biomerieux, France). Получените резултати показват, че всеки от щамовете се характеризира с щамовоспецифичен профил (Табл.2). Установено, че само два от включените в теста въглеродни източници се усвояват и от петте изследвани щамове и това са глюкоза и натриев глюконат. Въз основа на този резултат може да се конструират варианти на експериментални среди с въглероден източник, усвоим от всеки от изследваните щамове. Получените резултати потвърждават принадлежността на щамовете Or2, Or5, Rsb22 и 1S4 към рода *Pseudomonas*, но получената идентификацията е с много ниска степен на дискриминативност. Ензимният профил на работните щамове беше определен чрез тест системата API ZYM и резултатите са представени на таблица 1. Получените резултати, както и при биохимичния профил, показват щамова специфичност. При щамове *Ps. putida* BTCC1046 и *Pseudomonas sp. 1S4* се наблюдават изразени фосфатазни активности (кисела и алкална фосфатаза), докато при *Pseudomonas sp. Or2* се наблюдава слабо изразена кисела и алкална фосфатаза, а при *Pseudomonas sp. Or5* само слабо изразена кисела фосфатаза. И при петте щамове са отчетени естеразна, естеролипазна, фосфохидролазна и една аминоксидолазна активности. Установените ензимни активности при работните щамове допълват биохимичните им характеристики. Важно е също да се отбележи, че изявата на фосфатазни и фосфохидролазни ензимни активности при ризосферната микрофлора има пряко значение за превръщането на източниците на органичен фосфор в почвата, които са от 30 до 80%, в разтворима и по-лесно усвоима от растенията форма (Caldwell, 2005; Calvo et al, 2014).

Табл. 1 Резултати от биохимични характеристики на петте щамове от род *Pseudomonas* – за асимилация на субстрати (API 20NE) и ензимни активности (API ZYM).

	Щам				
	BTCC1046	Or2	Or5	Rsb22	1S4
<b>API 20NE</b>					
Nitrate reduction	–	+	+	+	–
Indole production	–	–	–	–	–
Glucose Acidification	–	–	–	–	–
Arginine dihydrolase	+	+	+	–	+
Urease	–	–	–	–	–
Esculin hydrolysis	–	+	–	–	–
Protease (gelatin hydrolysis)	–	+	–	–	+
PNG	–	–	–	–	–
GLU	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	–	+
MNE	–	+	–	+	+
MAN	+	+	+	–	+
NAG	+	+	+	–	+
MAL	–	+	–	+	–
GNT	+	+	+	+	+
CAP	+	–	+	–	+
ADI	+	–	+	–	–
MLT	+	–	+	+	+
CIT	+	–	+	+	+
PAC	–	–	–	–	–
OX	+	+	+	+	+
<b>apiweb™ идентификация</b>	<b>на</b>	<b>Род</b> <i>Pseudomonas</i>	<b>Род</b> <i>Pseudomonas</i>	<b><i>Pseudomonas stutzeri</i></b> – 89,3%	<b><i>Pseudomonas fluorescens</i></b> – 99,9%
<b>API ZYM</b>					
Alkaline phosphatase	+	w	–	–	+
Esterase (C4)	w	w	w	+	+
Esterase Lipase (C8)	w	w	w	w	+
Lipase (C14)	–	–	–	–	w
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+
Valine arylamidase	w	–	–	w	w
Trypsin	–	–	–	w	–
Acid phosphatase	+	w	w	–	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	w	w	w	w	+
α-galactosidase	–	–	–	–	–
β-galactosidase	–	–	–	–	–
β-glucuronidase	–	–	–	–	–
α-glucosidase	–	–	–	–	–
β-glucosidase	–	–	–	–	–
N-acetyl-β-glucosaminidase	–	–	–	–	–
α-mannosidase	–	–	–	–	–
α-fucosidase	–	–	–	–	–

‘+’ – положителен; ‘-’ – отрицателен; ‘w’ – слабо положителен; на – не се анализира.

Физиологичното охарактеризиране и данните получени от обработката на биохимичния профил и ензимните активности доказаха принадлежността на изследваните щамове към род *Pseudomonas*. Идентификацията чрез **apiweb™** показва 89,3% сходство на щам Rsb 22 със *Pseudomonas stutzeri* и 99,9% сходство на щам 1S4 с *Pseudomonas fluorescens*.

## 1.2 Молекулярно-генетична идентификация на новоизолираните щамове

Видовата идентификация на всеки нов изолат е първото условие за неговото бъдещо проучване. Изготвянето на молекулярен профил на изследваните щамове е основа за тяхното генетично паспортизиране, което е задължително при евентуалното им технологично приложение. За постигане на по-пълна и коректна видова идентификация на ризосферните изолати е използван един от широко приетите методи видова идентификация чрез секвениране на гена за 16S rRNA и сравнение на получените секвенции със световните бази данни. Два от работните щамове - *Pseudomonas sp.* Or2 и *Pseudomonas sp.* Or5 са първоначално анализирани по този метод. Изолирана е тотална ДНК от щам OR2 и OR5, която се амплифицира, чрез използване на универсални праймери 27F и 1492R за 16S р.ДНК гена. За всеки щам е получен PCR-продукт от 1500 бази и е подложен на двукратна стандартна процедура на секвениране. Чрез прилагането на BLAST алгоритъм получените секвенции са сравнени с депозирани в NCBI. След анализиране на новополучената секвенция се установява, че щам OR2 показва 96% сходство с типова култура *Pseudomonas putida*. Щам OR5 показва 99% сходство с типова култура *Pseudomonas putida*.

Трябва също така да се отбележи, че през последните няколко години базата данни на NCBI е значително обогатена с нови идентифицирани видове по отношение на групата *Pseudomonas putida* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Поради установените значителни разлики в биохимичния профил на тези два щамове, 16S rDNA последователностите бяха повторно анализирани и сравнени с наличната нуклеотидна база данни успоредно с идентификацията на други два изследвани щамове *Pseudomonas sp.* Rsb22 и *Pseudomonas sp.* 1S4.

Принадлежността на двата щамове Or2 и Or5 към групата *Pseudomonas putida* бе потвърдена. Щамът Or2 е дефиниран, като принадлежащ към вида *Pseudomonas taiwanensis* с 99% сходство, докато щам Or5 показва 99% сходство с двата близкородствени вида *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas parafulva*. Поради подобните профили на асимилация с щам *Pseudomonas putida* WTCC1046 (Таблица 2), е прието, че принадлежи към *Pseudomonas putida*. За ясното разделяне на най-близките видове в групата *Pseudomonas putida* е наложително да се използват допълнителни молекулярни методи за идентификация (Wang et al., 2010; Yonezuka et al., 2017).

Получените резултати определиха Rsb22, като принадлежащ към вида *Pseudomonas stutzeri* с 99% сходство при BLAST анализ, докато за щам 1S4 се наблюдават само 82% сходство с вида *Pseudomonas chlororaphis*. Полученият резултат за идентифициране на щам Rsb22 потвърждава резултата от теста API 20NE (Таблица 1). Що се отнася до щам 1S4, идентификационните резултати от API 20NE профила показват принадлежност към *Ps. fluorescens*, а получените 82% сходство при секвенирането на 16S rDNA гена не са достатъчни и са необходими по-дискриминационни молекулярни подходи за правилна идентификация на вида.

Табл. 2. Молекулярно-генетична идентификация на щамове от род *Pseudomonas* на базата на секвенционен 16S р.ДНК анализ.

Щам	Молекулярно-генетична идентификация	
	Видово отнасяне	Процент сходство
<b>Rsb 22</b>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<b>99</b>
<b>1S4</b>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<b>82</b>
<b>Or2</b>	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	<b>99</b>
<b>Or5</b>	<i>Pseudomonas putida</i>	<b>99</b>
	<i>Pseudomonas parafilva</i>	<b>99</b>

В обобщение на получените резултати от физиологичната характеристика, ензимният профил и молекулярно-генетичната идентификация е определена принадлежността на щам *Rsb 22* към вида *Pseudomonas stutzeri*, щам *1S4* към *Pseudomonas sp.*, щам *Or2* към вида *Pseudomonas taiwanensis* и на щам *Or5* към вида *Pseudomonas putida*.

## 2. Характеристики определящи щамовете, като микроорганизми подпомагащи растежа и развитието на растенията (PGPR). Биосинтетичен потенциал на изследваните щамове.

### 2.1 Скрининг за разтваряне на неорганични фосфати

Фосфорът е един източниците на енергия, който често ограничава растежа на растенията поради своята слаба разтворимост и фиксиране в почвата. Трансформацията на неразтворими и фиксирани форми на фосфор в разтворими форми е важен аспект при повишаването на фосфора в почвата (Pande et al., 2017). Органичните киселини трансформират неразтворимите фосфатни форми в разтворими форми чрез техните хидроксилни и карбоксилни групи. Тези групи хелират катионите, свързани с фосфора, като по този начин го превръщат в разтворими форми (Kromblekou and Tabatabai 1994). Много различни видове органични киселини са свързани с разтварянето на фосфатите. Преобладаващи форми на органичен фосфор са фитатите (инозитол хекса- и пента-фосфати), които съставляват до 60% от почвения органичен фосфор. За да бъдат усвоени от растенията фитатите първо трябва да се дефосфорилират с фосфатази (Gyaneshwar et al. 2002; Singh & Satyanarayana 2011). Киселинните фосфатази и фитази, синтезирани от ризосферни микроорганизми (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* и *Serratia*), участват в органичното разтваряне на фосфора в почвата (Thaller et al. 1995).

Фосфат-солубилизация индекс (PSI) на изследваните щамове се определя чрез качествен метод за анализ при използване на агар на Пиковская (PVK), (Pikovskaya, 1948) и допълнително сравняване с агарова среда NBRIP. Установено е, че три щамата притежават фосфат-солубилизираща активност измерена като PSI, както при среда PVK, така и при NBRIP (Таблица 4). Най-висок индекс на разтваряне се наблюдава при *Ps. putida* BTCC1046 ( $3.01 \pm 0.134$ ), последвано от *Ps. putida Or5* ( $1.76 \pm 0.095$ ) и *Pseudomonas sp. 1S4* ( $1.47 \pm 0.099$ ). Получените резултати при NBRIP агарова среда са сходни, като два от изследваните щамове не

показаха фосфат солубилизираща активност, на нито една от средите (Таблица 3). Получените резултати са в корелация с резултатите, от проследените ензимни активности, където щамове *Ps. putida* BTCC1046 и *Pseudomonas sp.* 1S4, се отличаваха с фосфатазани и фосфохидролазни ензимни активности. Установената способност на три от изследваните щамове да подобрява разтворимостта на неорганични фосфати е важна характеристика на PGP-ризобактериите.

Табл. 3 Индекс на фосфат-солубилизация при петте изследвани щама от род *Pseudomonas*.

Щам	PSI	
	PVK	NBRIP
<i>Ps. putida</i> BTCC1046	3.01 ± 0.13	2.01 ± 0.16
<i>Ps. taiwanensis</i> Or2	–	–
<i>Ps. putida</i> Or5	1.76 ± 0.09	1.4 ± 0.1
<i>Ps. stutzeri</i> Rsb22	–	–
<i>Pseudomonas sp.</i> 1S4	1.47 ± 0.1	1.49 ± 0.06

Резултатите са представени, като средни стойности със стандартно отклонение (n = 3).

### 2.2 Скрининг за синтез на литични ензими

Продуцирането на литични ензими от почвените микроорганизми се свързва с подобряване на характеристиките на почвата и превръщането на почвените компоненти в усвоима за растенията форма. Също така продукцията на някои литични ензими (хитинази) се свързва и с атагонистичната активност на микроорганизмите срещу различни групи фотопатогени (Chauhan et al., 2015). Синтезата на хидролазни ензими като амилази, целулази, пектинази и протеази се счита като един от механизмите използвани от продуциращите ги ризобактерии да инхибират развитието на други микроорганизми (Dinesh et al., 2015). С цел изследване на потенциала за продуциране на литични ензими, като елемент от PGP-активности е проведен скрининг анализ на петте изследвани щама за тяхната хитинопотолитична, протеолитична и амилитична активност. Нито един от бактериалните щамове не показва амилитична активност. Протеолитичната активност се наблюдава при *Ps. putida* BTCC1046, *Ps. putida* Or5 и *Pseudomonas sp.* 1S4. Бактериалната хитинопотолитична активност се проявява от същите три *Pseudomonas* щамове - BTCC1046, Or5 и 1S4 (Таблица 4).

### 2.3. Качествено определяне синтеза на сидерофори

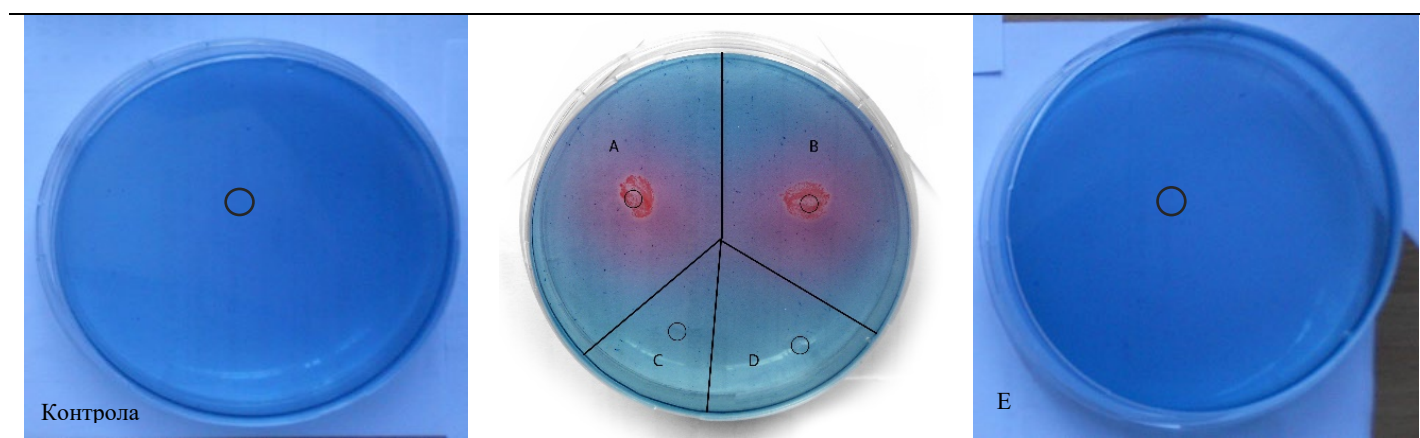
Продукцията на сидерофори се свързва с формирането на разтворими Fe<sup>3+</sup> комплекси, които се включват в активния мембранен транспорт и могат да бъдат приети от растителните или бактериалните клетки (Gamit et al., 2014). Синтезата на сидерофори от бактериалните видове в ризосферата води също и до затрудняване на достъпа до желязо на вредната

микрофлора и се отчитта като значима PGP-характеристика (Deshwal and Kumar, 2013; Bholay et al., 2012).

**Табл. 4** Скрининг за литични ензимни активности и синтез на сидерофори при изследваните щамове от род *Pseudomonas*.

Щам	Амилолитична активност	Протеолитична активност	Хитинолитична активност	Синтез на сидерофори
<i>Ps. putida</i> BTCC1046	–	+	+	+ (розово оцветена зона)
<i>Ps. taiwanensis</i> Or2	–	–	–	–
<i>Ps. putida</i> Or5	–	+	+	+ (розово оцветена зона)
<i>Ps. stutzeri</i> Rsb22	–	–	–	–
<i>Pseudomonas sp.</i> 1S4	–	+	+	–

‘+’ - Положителен; ‘-’ – Отрицателен



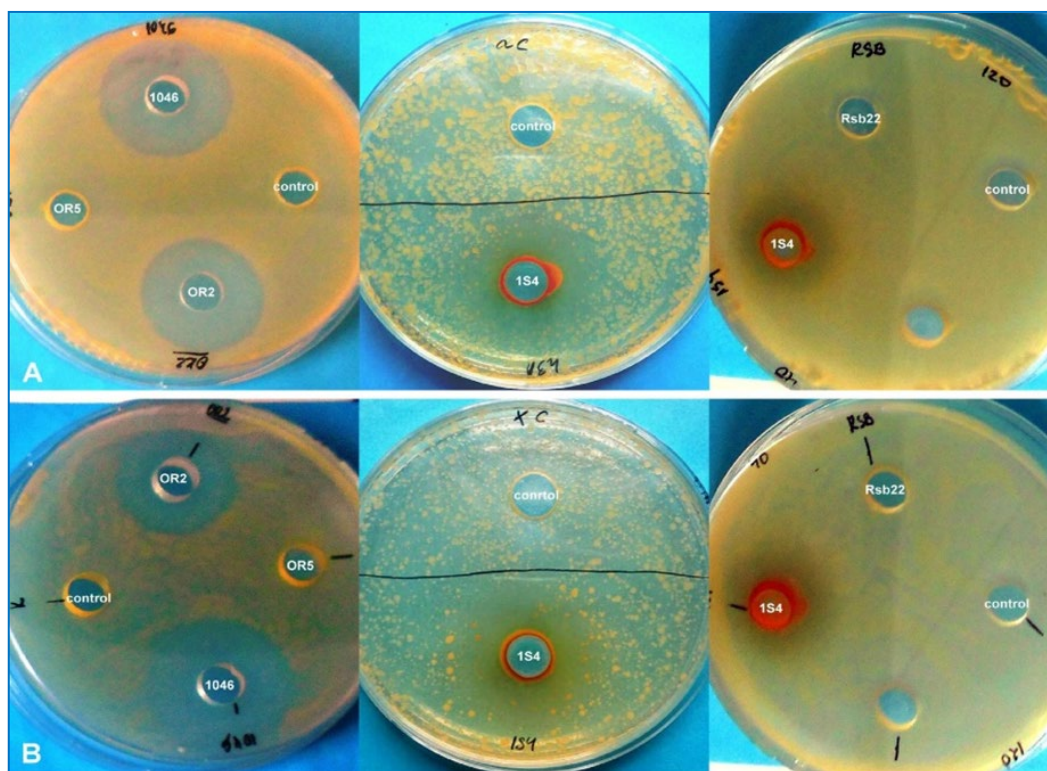
**Фиг.7** Синтез на сидерофори при A) *Ps. putida* BTCC1046; B) *Ps. putida* Or5; C) *Ps. taiwanensis* Or2; D) *Ps. stutzeri* Rsb22; E) *Pseudomonas sp.* 1S4.

Синтезата на сидерофори, литични ензими и вторични метаболити от щамове *Pseudomonas* оказва ефект при биоконтрола на фитопатогени (Nagarajkumar et al., 2004). Много щамове от рода *Pseudomonas* са описани, като синтезиращи сидерофори (Ren et al., 2005; Saraf et al., 2013; Sang et al., 2013). При два от изследваните щамове *Ps. putida* Or5 и *Ps. putida* BTCC1046 беше установена положителната активност за синтеза на сидерофори, изразена като розово оцветена зона (Табл. 5/ Фиг. 7).

## 2.4 Оценка на биоконтролните активности на работните щамове срещу тест-патогени микроорганизми.

2.4.1 Антагонистична активност на работните щамове срещу бактериални фитопатогени *Clavibacter michiganensis* и *Xanthomonas vesicatoria*.

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* се определя, като един от основните причинители на бактериални инфекции по домати, които причиняват сериозни загуби в добива. *Xanthomonas vesicatoria* причинява т. нар. бактериално петнисто заболяване с образуването на лезии по листата, стеблата и плодовете на пипер и домати, което също води до сериозно намаляване на добивите (Кyeon et al., 2016; Kizheva et al., 2011). Антагонистичната активност на изследваните щамове от род *Pseudomonas* срещу двата тест-фитопатогена е определена по метода на дифузия в агар и резултатите са представени на фигура 8.



Фиг. 8 Зони на инхибиране при тестваните щамове срещу *Clavibacter michiganensis* (A) и *Xanthomonas vesicatoria* (B).

Табл. 5 Антагонистична активност срещу фитопатогени *Clavibacter michiganensis* и *Xanthomonas vesicatoria*.

Щам	Инхибиторна зона, mm	
	<i>Clavibacter michiganensis</i>	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
<i>Ps. putida</i> BTCC1046	30.4 ± 1.2	33.0 ± 1.7
<i>Ps. taiwanensis</i> Or2	28.7 ± 0.6	27.7 ± 0.6
<i>Ps. putida</i> Or5	nd	nd
<i>Ps. stutzeri</i> Rsb22	nd	nd
<i>Pseudomonas</i> sp. 1S4	21.0 ± 2.6	21.7 ± 1.5

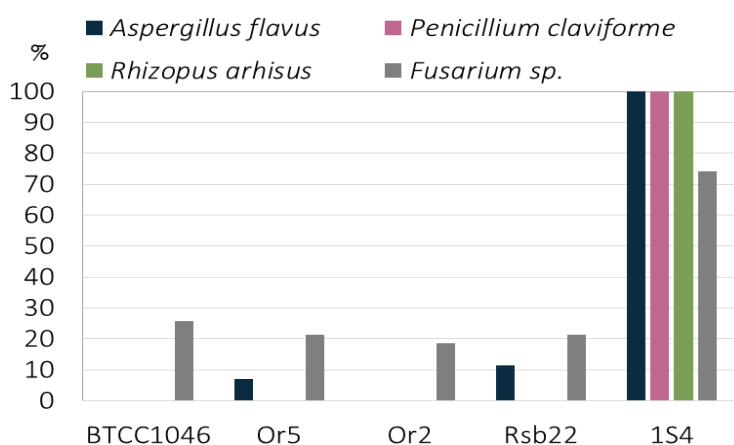
Резултатите са представени, като средни стойности със стандартно отклонение (n = 3) nd – не се открива.



Най-големите зони на инхибиране са отчетени при *Ps. putida* BTCC1046, последвано от *Ps. taiwanensis* Or2. Зоните на инхибиране, образувани от *Pseudomonas sp.* 1S4 при използваните бактериални фитопатогени са по-малки и без ясен контур, което е предпоставка за по-задълбочено изследване на антагонистичната активност на този щам (Фигура 8А и Б). Щамовете *Ps. putida* Or5 и *Ps. Stutzeri* Rsb22 не са ефективни антагонисти на използваните тестови фитопатогени.

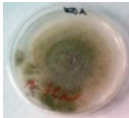
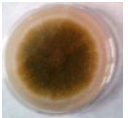
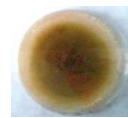
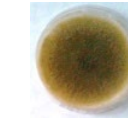
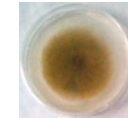
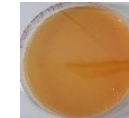
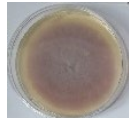


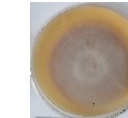
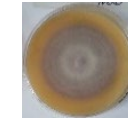
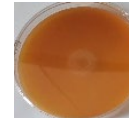
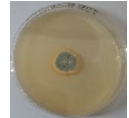
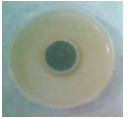

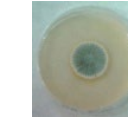
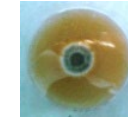
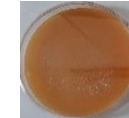





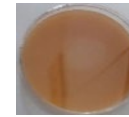
#### 2.4.2 Антигъбна активност на изследваните щамове

Голяма група активни щамове от рода *Pseudomonas* са описани, като биоконтролни агенти в резултат на общата им способност да произвеждат различни антигъбни метаболити (Ligon et al., 2000; Kheirandish and Harighi, 2015). Антигъбната активност на петте изследвани щамове *Pseudomonas* се изследва срещу *Aspergillus flavus*, *Penicillium claviforme*, *Rhizopus arrhizus* и *Fusarium sp.* (изолат) и изчислените ефекти на инхибиране са представени на фигура 9 и 9.1. От получените резултати може да се отбележи, че щамът *Pseudomonas sp.* 1S4 напълно инхибира растежа на три от тестовите плесени *Aspergillus flavus*, *Penicillium claviforme* и *Rhizopus arrhizus*. Щамовете *Ps. putida* Or5 и *Ps. Stutzeri* Rsb22 показват слабо инхибиране само срещу *Aspergillus flavus* от около  $6.83\% \pm 0.15\%$  и  $11.46\% \pm 0.16$ , респективно. Не се наблюдава инхибиращо действие на другите два щамове *Ps. putida* BTCC1046 и *Ps. taiwanensis* Or2 срещу тестовите микромицети, въпреки че те показват най-добре изразена антибактериална активност.



Фиг. 9 Графично представяне ефекта на инхибиране на изследваните щамове спрямо петте тест фитопатогена.

Важно е да се отбележат наблюдаваните ефекти на инхибиране на изследваните щамове *Pseudomonas* срещу *Fusarium sp.* патогенния изолат по царевичата. Повечето от представителите от вида *Fusarium* са известни, като растителни патогени, които причиняват различни заболявания, като кореноплодни, стъбла или плодово гниене в царевича, грах, соя, картофи, диня и др. заболявания на пшеница, овес, ечемик, лимец и други зърнени култури (Parry et al., 1995).

ЕФЕКТ НА ИНХИБИРАНЕ, %						
	Контрола	<i>Ps.putida</i> Or5	<i>Ps.taiwanensis</i> Or2	<i>Ps.putida</i> BTCC1046	<i>Ps.stutzeri</i> Rsb 22	<i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> 1S4
<i>Aspergillus flavus</i> 6-ти ден		 6.96%			 11.39%	 100%
<i>Fusarium sp.</i> 7-ми ден		 21.43%	 18.57%	 25.71%	 21.43%	 74.18%
<i>Penicillium claviforme</i> 7-ми ден						 100%
<i>Rhizopus arhisis</i> 3-ти ден						 100%

Фиг. 9.1 Ефект на инхибиране на растежа на тест-микромциети от изследваните щамове от род *Pseudomonas*.

Три от щамовете *Pseudomonas* демонстрират инхибиране на ефекта срещу *Fusarium sp.* от 21% до 25% . При *Pseudomonas sp.* 1S4 се наблюдава ясно изразена инхибираща ефективност спрямо царевичния ризосферен изолат *Fusarium sp.* (74.18%  $\pm$  0.89). Антигъбната активност на RGP-ризобактериите се счита за важно свойство. Наблюдавания силно изразен ефект на активната култура от *Pseudomonas sp.* 1S4 срещу тестваните патогени може да се свърже с доказаните литични ензимни активности (Таблица 5). Хитинолитичната активност на щама предполага инхибиращото му действие, поради участието на хитиназата в разграждането на клетъчните стени при микромциетите.

## 2.5 Количествено определяне на синтезираните вторични метаболити с фитохормонална активност.

Синтезата на микробни фитохормони от почвени микроорганизми е свързано със сигнални промени в корена и стимулиране растежа на растенията. Наличието на определен фитохормон в супернатанта на микробната култура не е достатъчно, за да докаже функционалната роля на тази молекула при нейното взаимодействие с растението. В редица изследвания се наблюдава корелация между растежа на растенията и концентрацията на хормоните измерени в културалната среда или в колонизираните растителни тъкани при провеждане на експерименти и *in situ* (Sraeren Stijn, 2015).

За оценка на биосинтетичния потенциал на изследваните щамове по отношение на вторични метаболити с фитохормонална активност беше проведено дълбочинно култивиране на изследваните 5 щама *Pseudomonas* в присъствие на въглероден източник глюкоза и азотен

източник дрождев екстракт и пептон. Вида и количеството на въглероден и азотен източник имат отношение към производството на ауксини, и в частност на индол оцетната киселина. Установено е, че глюкозата и пептона повишават количеството на ИОК в културални течности от почвени изолати на *Pseudomonas* и *Rhizobium* (Jeyanthi, V., & Ganesh, P., 2013).

Получените в резултат от проведеното култивиране безклетъчни културални течности бяха количествено анализирани чрез UPLC-MS по отношение на 15 вещества (1-4-CPA; 2-ABA;3-ANC; 4-CPPU;5-FPM; 6- GA3;7-GA4;8-GA7;9-IAA; 10-IBA;11-IPA;12-MH; 13- PBZ; 14-TDZ; 15- TZ), отнесени към различни групи фитохормони както е посочено в т. 9 от материали и методи. Изследваните съединения представляват интерес при различни групи ризобактерии и са едни от най-често установяваните компоненти в културални течности. Получените резултати са представени в таблици 6 – 10, където са отбелязани само установените за всеки щам метаболити. Всеки щам се характеризира с различни фитохормонални активности, като при всички се наблюдава наличие на метаболити от трите основни групи фитохормони – Цитокинини, Ауксини и Гиберелини.

**Табл. 6.** Количествена оценка на установени метаболити с фитохормонална активност при щам *Ps. putida* BTCC1046 в културална течност от 72 часово култивиране.

Име	Време на задържане	m/z	Площ	Концентрация	Мерна единица
CPPU	11.561	246.00	22623	0.02055	ug/ml
GA7	11.869	329.00	10024	0.03371	ug/ml
IAA	6.972	176.00	64144	21.57786	ug/ml

**Табл. 7.** Количествена оценка на установени метаболити с фитохормонална активност при щам *Ps. taiwanensis* Or2 в културална течност от 72 часово култивиране.

Име	Време на задържане	m/z	Площ	Концентрация	Мерна единица
CPPU	11.567	246.00	16717	0.00607	ug/ml
GA4	12.138	331.00	10782	0.01290	ug/ml
GA7	11.803	329.00	37056	0.04985	ug/ml
IAA	6.589	176.00	20327	2.73518	ug/ml

**Табл. 8.** Количествена оценка на установени метаболити с фитохормонална активност при щам *Ps. putida* Or5 в културална течност от 72 часово култивиране.

Име	Време на задържане	m/z	Площ	Концентрация	Мерна единица
CPPU	11.621	246.00	17044	0.02858	ug/ml
IAA	7.106	176.00	26916	9.05430	ug/ml

Табл. 9. Количествена оценка на установени метаболити с фитохормонална активност при щам *Pseudomonas sp.* 1S4 в културална течност от 72 часова култивиране.

Име	Време на задържане	m/z	Площ	Концентрация	Мерна единица
ANC	9.686	257.00	4985	0.00479	ug/ml
CPPU	11.609	246.00	11177	0.01015	ug/ml
GA7	11.900	329.00	4377	0.01472	ug/ml

Табл. 10. Количествена оценка на установени метаболити с фитохормонална активност при щам *Ps. stutzeri* Rsb22 в културална течност от 72 часова култивиране

Име	Време на задържане	m/z	Площ	Концентрация	Мерна единица
CPPU	11.488	246.00	11076	0.01006	ug/ml
GA7	11.807	329.00	11557	0.03886	ug/ml
TZ	0.724	220.00	53118	0.03522	ug/ml

От получените резултати може да се обобщи, че три от изследваните щамове продуцират индол-3-оцетна киселина (IAA), която е растежен регулатор от групата на ауксините (Табл. 6, 7, 8). При изследване на културалните течности на всички щамове се откриват още метаболити с фитохормонална активност и от групите на гибберелини – гибберелинова киселина GA4 и GA7, и цитокинини като N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (CPPU) и транс зеатин (TZ) (Табл. 10).

Биосинтетичната способност на изследваните щамове по отношение на основни групи растежни регулатори е предпоставка те да се класифицират като щамове със сериозен потенциал за повлияване развитието на растенията (PGP-бактериални щамове).

При щам *Ps. putida* BTCC1046 са установени комплекс от PGP-активности, като способност за P-солюбилизация, продуциране на фосфатази и литични ензими, производство на сидерофори и активност срещу два бактериални фитопатогена. Щам *Pseudomonas sp.* 1S4 е доказан, като биоагент със силно изразена антигъбна активност, която се свързва със способността за продуциране на литични ензими и в допълнение проявява способност за P-солюбилизация. Другите два щамове *Ps. putida* Or5 и *Ps. taiwanensis* Or2 също проявяват свойства, свързани с PGP-активността, като синтезата на индол3-оцетна киселина. Прилагането на комбинация от различните изследвани щамове, като биоагенти с различни ефекти при растежа и развитието на растенията се явява по-ефективно решение и обуславя техния потенциал за приложение.

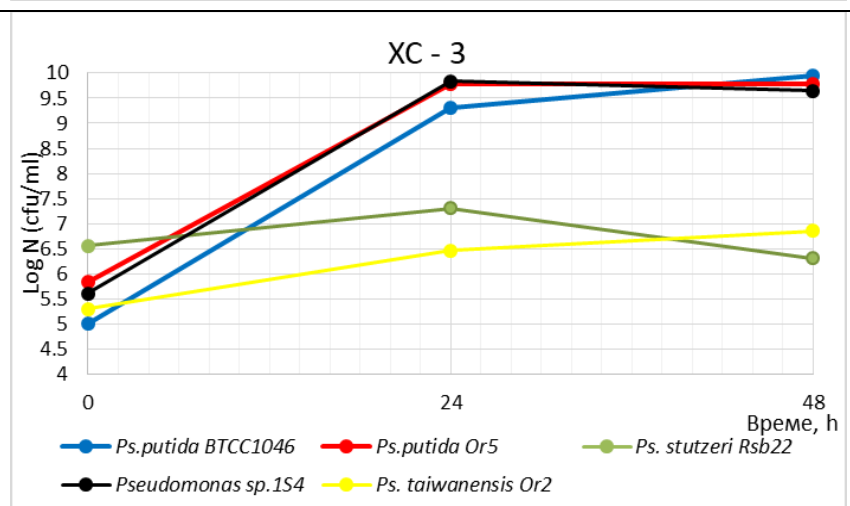
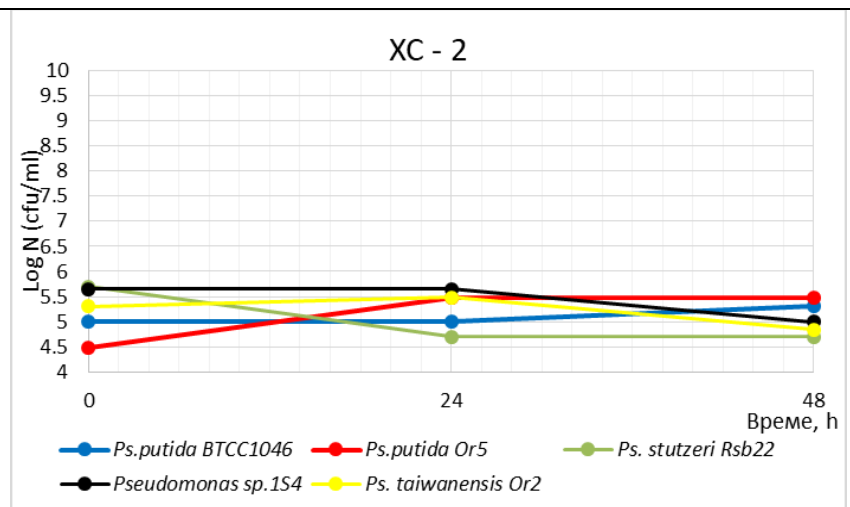
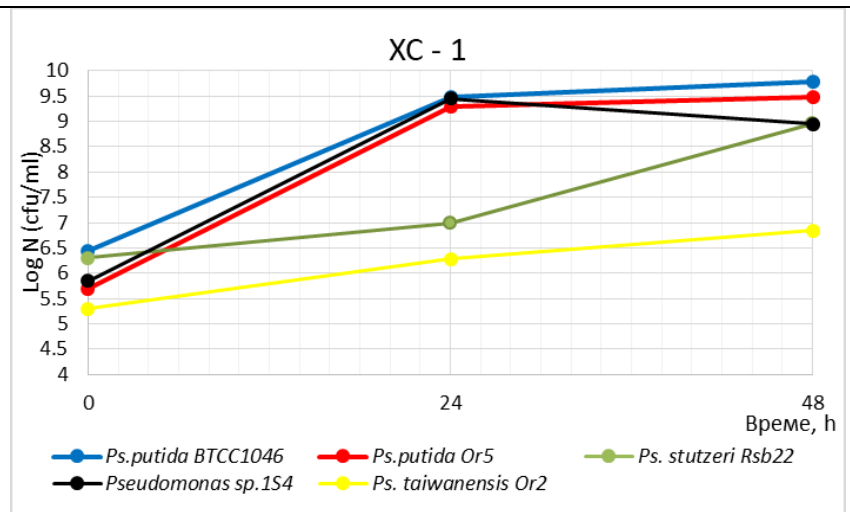
### 3. Изследване на параметрите за култивиране на работните щамове в лабораторни условия.

#### 3.1. Определяне динамиката на развитие на работните щамове в условия на дълбочинно култивиране.

За приложение в практиката на бактериални щамове с RGP-потенциал се изисква получаване на жизнеспособни култури с висока клетъчна плътност и натрупване на биоактивни продукти. Характеристиките на такива щамове се изучават първоначално на лабораторно ниво преди да се премине към разработване на технологии за тяхното промишлено приложение. За проучване на растежните характеристики и оптимизиране на компонентния състав са конструирани три варианта на хранителни среди за дълбочинно култивиране. Компонентният състав на трите варианта хранителни среди е подбран съобразно изискванията на изследваните щамове. Проследяването на растежа на изследваните щамове от род *Pseudomonas* на различните хранителни среди е извършено с цел получаване на високоплътностна култура, като CFU/ml, със запазени биологични активности. Тествани са три варианта хранителни среди, които се различават в състава си спрямо наличието на захари – ХС-1 без добавени захари, ХС-2 със добавена захароза (5g/l) и ХС-3 с добавена глюкоза (5g/l), описани в раздел Материали и методи. За проследяване динамиката на развитие на всеки щам е проведено 48 часово дълбочинно култивиране в колби на клатачен апарат. Развитието на културата е проследено чрез периодично вземане на проби и определяне на общия брой микроорганизми по метода на Кох, като показател за динамиката на развитие на щамовете (cfu/ml). Получените резултати за развитието на щамовете при трите варианта хранителни среди са представени на фигура 10. Паралелно е проследено и изменението на количеството на въглеродните източници – глюкоза (ХС-3) и захароза (ХС-2), като резултатите са представени на фигура 11.

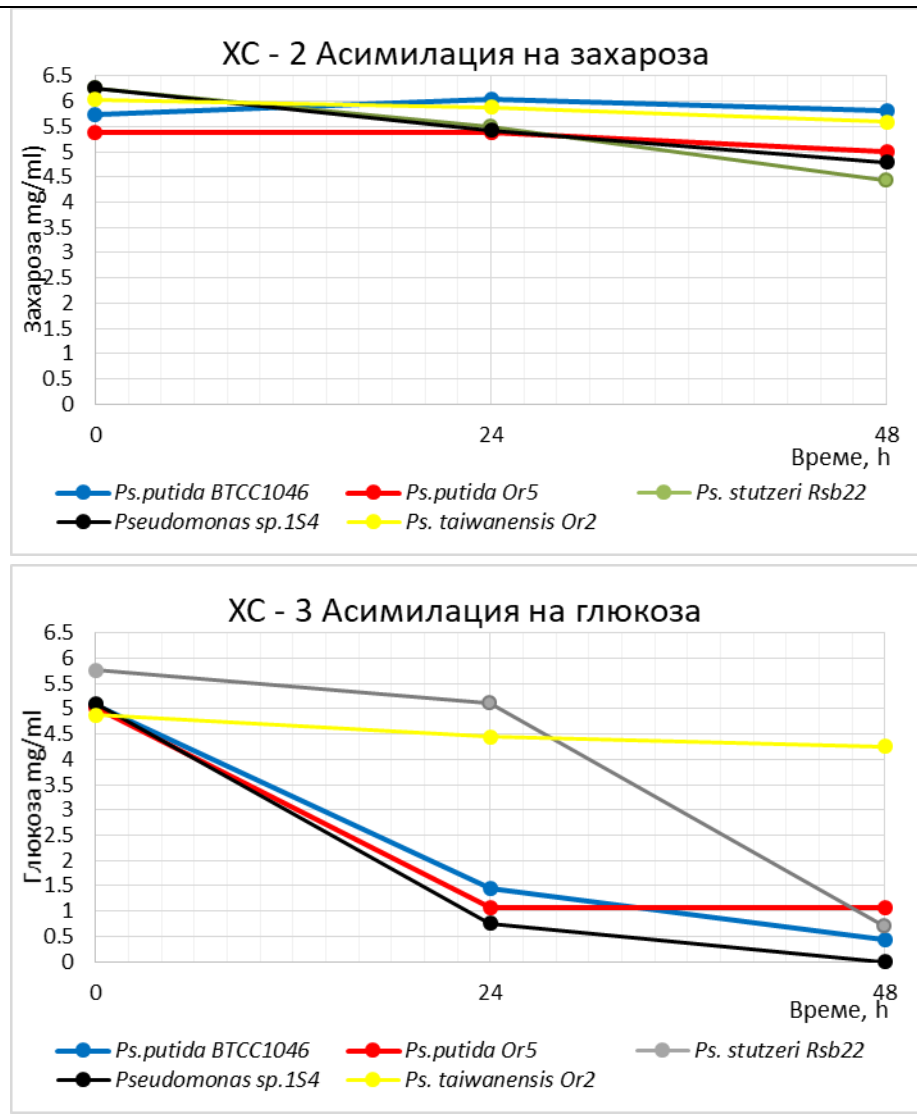
От трите варианта на хранителни среди изследваните щамове показват добри характеристики на растеж при ХС-1 и ХС-3. Щамове *Ps. putida* ВТСС1046, *Ps. putida* Or5 и *Pseudomonas sp.* 1S4 показват най-високи стойности при ХС-3, където на 24-ти час достигат клетъчна плътност от  $10^9$  CFU/ml, като я запазват висока до края на култивирането. Трите щамове бързо усвояват въглеродният източник глюкоза (фиг.10 В) и на 24-ти час почти 60–70% от началното количество е асимилирано, като концентрациите са под 2 mg/ml.

При щам *Ps. stutzeri* Rsb22 натрупването на биомаса при ХС-1, където не са включени захари достига клетъчна плътност от  $10^9$  CFU/ml (фиг 10А). Докато наличието на глюкоза в ХС-3 и асимилирането и след 24-я час, води до понижаване на клетъчната плътност с 2 порядъка в сравнение с ХС-1 (фиг. 10В и 11Б). Усвояването на компонентите на средата е предпоставка за натрупване на биомаса, но също и за насочване на метаболизма в посока на производство на вторични метаболити. Важно от технологична гледна точка е използването на достъпни и икономически изгодни хранителни среди за развитие на щамовете с цел улесняване на производството им в промишлени условия.



Фиг. 10 Проследяване динамиката на развитие на петте щама при А) XC -1 без добавени захари; Б) XC-2 с добавена захароза и В) XC -3 с добавена глюкоза.

Щам *Ps. taiwanensis* Or2 показва най-слабо развитие както при XC-1, така и при XC-3, като клетъчната концентрация се покачва само с един порядък до  $10^6$  CFU/ml. Наличието на въглероден източник-глюкоза при XC-3 не оказва съществено влияние върху развитието на щама, като се усвоява в много ниска степен и остава във високи концентрации – 4,5 mg/ml.



Фиг. 11 Проследяване асимилацията на въглероден източник от изследваните щамове при А) ХС-2 захароза и Б) ХС-3 глюкоза.

В процесите на култивиране при ХС-1 и ХС-3 е отчетена киселинността на средата, която достига до оптималните стойности за развитие на щамовете – рН 7, само при *Ps. putida* 1046. При щам *Pseudomonas* sp. 1S4, *Ps. taiwanensis* Or2 и *Ps. putida* Or5 достига до рН 6, а при *Ps. stutzeri* Rsb22 киселинността не се променя и остава рН 5,5-6. Отчетените резултати за натрупване на биомаса и усвояване на захароза при провеждане на култивирането при ХС-2 (фиг. 10Б и 11А), показват че използваните щамове не метаболизират дизахариди, като по този начин се ограничава броя и естеството на захарите, които може да се използват в биопроцесите (Köhler K. et al., 2014).

Проведените експерименти за избор на подходяща хранителна среда в условията на извършеното култивиране отличиха ХС 3, като среда с потенциал за получаване на високоплътностни култури при щамове *Ps. putida* 1046, *Pseudomonas* sp. 1S4 и *Ps. putida* Or5. Достигната е максимална клетъчна плътност от  $10^9$  cfu/ml при посочените щамове и усвояване на включеният въглероден източник глюкоза до стойности под 1 mg/ml.

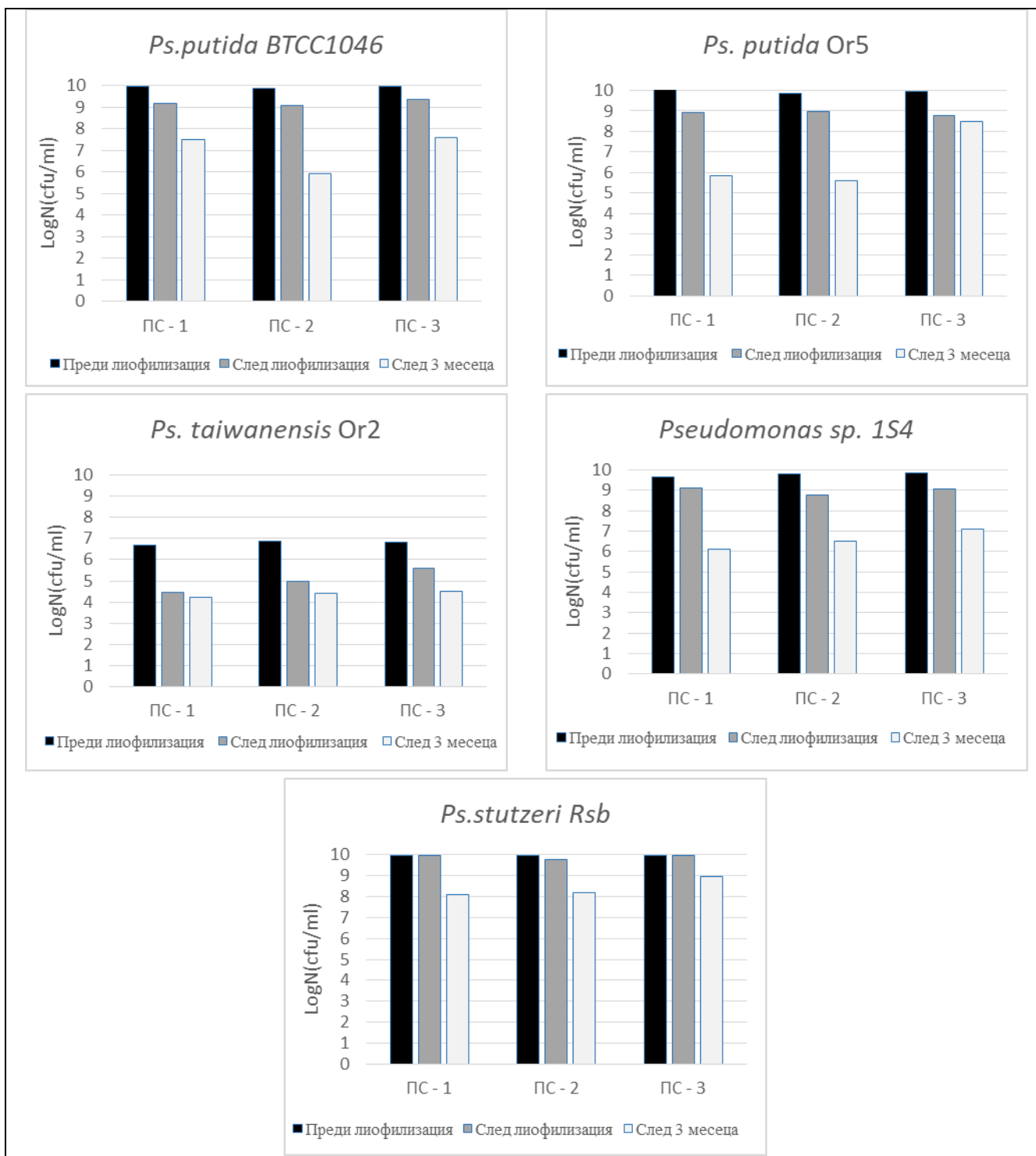
#### 4. Изследване влиянието на различни варианти протекторни среди при лиофилизация за запазване активността на работните щамове.

Запазването на жизнеспособността и активността на биоактивни бактериални култури по време на технологичните процеси като лиофилизация и съхранение, са много важни показатели с оглед на тяхното индустриално приложение. В тази връзка е изследвана преживяемостта на петте ризосферни щама от род *Pseudomonas* при процеса на лиофилизация, както и след период на три месечно съхранение на лиофилизираната култура. По време на лиофилизацията, клетките се намират в екстремни условия, което води до структурни и физиологични промени, а това резултира в намаляване жизнеспособността на много видове. За да се предотвратят или намалят тези нежелани ефекти е необходимо добавянето на протективни субстанции (Zárate et al., 2006). Ето защо проучванията на различни протектори има толкова голямо значение. За целите на експеримента са използвани 48-часови култури от изследваните щамове, култивирани на среда ХС-3 и центрофугирани за концентриране на биомасата. Клетъчната плътност преди лиофилизация на щамовете е от порядъка  $10^9 - 10^{10}$  cfu/ml. Единствено при щам *Ps. taiwanensis* Or2, концентрацията е по-ниска ( $10^6$  cfu/ml) поради по-слабото развитие на щама при ХС-3. Експериментите са проведени с по три различни криопротекторни среди (Фиг. 12).

Резултатите отчетени непосредствено след лиофилизация показват висока преживяемост на щамовете *Ps. putida* ВТСС1046, *Ps. putida* Or5, *Pseudomonas sp.* 1S4 и *Ps. stutzeri* Rsb22, достигащи клетъчна плътност от  $10^8 - 10^9$  CFU/ml и при трите протекторни среди. При *Ps. taiwanensis* Or2 клетъчната плътност е по-ниска, достигаща  $10^5$  cfu/ml.

Рехидратирането на лиофилизираните проби и проследяването на общия брой жизнеспособни микроорганизми след 3 месеца показва висока степен на преживяемост на щамовете на протекторна среда ПС-3. Лيوфилизацията с криопротектори ПС-1 и ПС-2 води до понижаване на порядъка с 3 до 4 пъти при изследваните щамове. При *Ps. taiwanensis* Or2 след три месечно съхранение при ПС-1 и ПС-2 порядъка намалява един път до  $10^4$  CFU/ml, а при ПС-3 порядъка се запазва  $10^5$  CFU/ml.





Фиг. 12 Преживяемост на щамове от род *Pseudomonas* при различни варианти на криопротекторни среди преди лиофилизация, непосредствено след лиофилизация и при съхранение за три месеца.

## 5. Оценка на биологичната активност на културални течности от изследваните щамове върху развитието на тест растения *in vivo*.

### 5.1 Модифицирана моделна схема за изследване на биологична активност на безклетъчна супернатанта от културални течности на изследваните щамове върху развитието на семена от грах (*Pisum sativum*).

За *in vivo* оценяване на въздействието на безклетъчни културални течности съдържащи вторични метаболити следствие от проведено 48 часово култивиране на *Ps. putida* BTCC1046, *Ps. taiwanensis* Or2, *Ps. stutzeri* Rsb 22 и *Pseudomonas sp.* 1S4 върху вегетативното развитие на семена на *Pisum sativum* е използвана експерименталната постановка представена в таблица 11. Грахът е ценна зърнено-бобова култура с висока хранителна стойност, дължаща се на високото съдържание на суров протеин. Притежава способността да обогатява почвата с азот, има кратък вегетационен период и не е много взискателен към температурни и почвени условия. Достъпен и лесен за обработка растителен обект при скринингови анализи за въздействие.

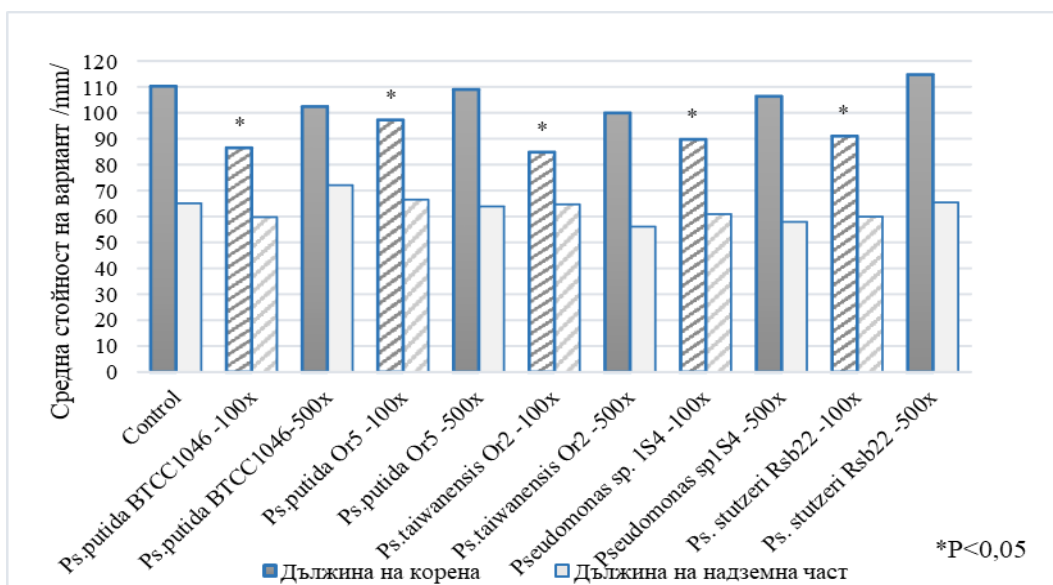
Табл. 11. Моделна експерименталната постановка отразяваща етапите при третиране на семена на *Pisum sativum*.

			
<p>1. Залагане на грахови семена за покълване.</p>		<p>2. Инокулиране на покълналите семена в експериментални съдове с разреждания на безклетъчни супернатанти.</p>	
		 <p>3. Инкубиране при контролиран температурен режим и режим на осветеност.</p>	

Подготвените семена се инкубират при контролиран температурен режим и режим на осветеност в моделна фитокамера. За целите на експеримента са използвани две концентрации на безклетъчните супернатанти от културални течности – една по –висока 100x и една по-ниска 500x на изследваните щамове получени при оптимизирани условия на култивиране. Подбраните концентрации са предварително установени на базата на проведени анализи.

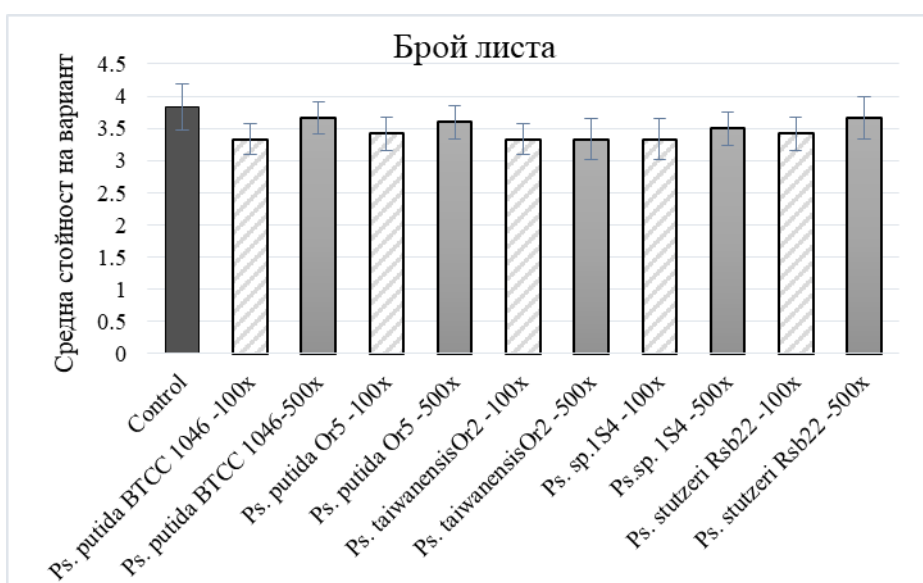
За оценяване на въздействието на *Ps. putida* BTCC1046, *Ps. taiwanensis* Or2, *Ps. stutzeri* Rsb 22 и *Pseudomonas sp.* 1S4 при развитието на семената на *Pisum sativum* са отчетени дължина на стъблото, дължина корена и брой листа, като тези биометрични показатели са сравнени с контрола вода. Всеки от вариантите съдържа 12 растения разпределени в две повторения, а

получените данните са обработени статистически в MS Excel чрез TTEST и представени на фигура 13 и 14.



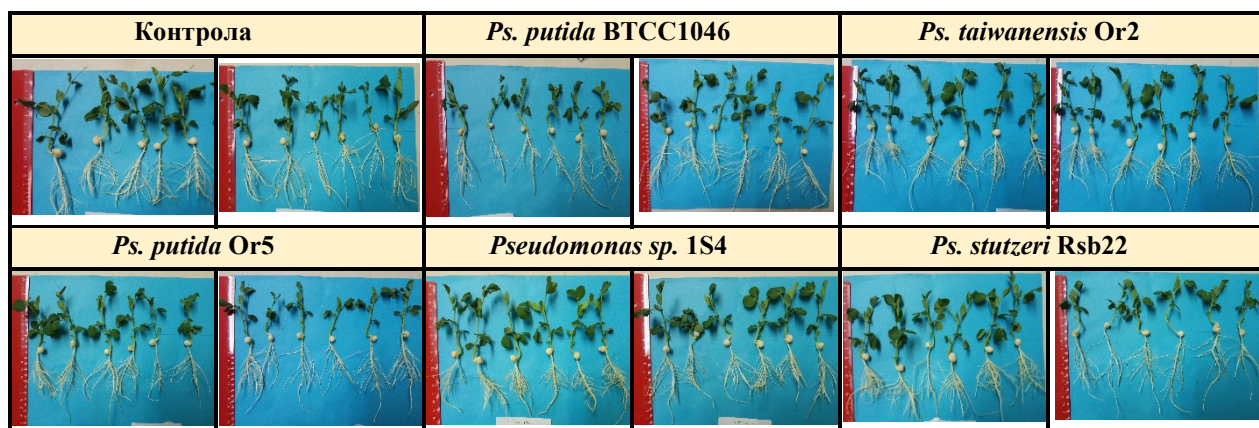
Фиг. 13 Дължина на корен и надземна част при *Pisum sativum* след края на експеримента.

На фиг.13 са представени резултатите, получени след отчитането дължината на корена и надземната част на *Pisum sativum* в рамките на проведения експеримент. Наблюдава се, че при 100x разреждане на безклетъчна супернатанта от изследваните щамове третираните растения не се повлияват положително спрямо контролната проба. При използване на разреждане 500x, резултатите са до 2-3 пъти по високи спрямо по-високата концентрация(100x) и близки до тези на контролата. Не може да се открие доза-ефект, вероятно поради голямата стъпка на разреждане и необходимостта от провеждане на експерименти с включването на допълнителни разреждания.



Фиг. 14. Брой листа при *Pisum sativum* след края на експеримента.

Табл. 12. Вид на растенията *Pisum sativum* в края на експеримента



Данните от извършената количествена оценка на метаболити с фитохормонална активност в културални течности от използваните щамове показаха наличие на ауксини и гибберелини, които имат пряко отношение към развитието на растенията (Табл.6). Получените данни от експеримента показаха по-слабо развитие на растенията третирани с разрежена 100x безклетъчна супернатанта в сравнение с 500x при всички варианти и спрямо контролата. Причината за това може да бъде свързана с наличието на високи концентрации от вторични метаболити, които забавят развитието растението в този етап от растежа. Стойностите за дължина на корена и стъблото, и брой листа при концентрация на разтвора 500x се доближават до контролните и не оказват значителен ефект при *Pisum sativum*. В резултат от проведения експеримент можем да заключим, че са необходими допълнителни изследвания върху синтетичната способност на подобраните щамове и оптимизиране на концентрациите за определяне на оптималната доза - ефект за кълняемостта и развитието на тест растенията.

### 5.2 *In vivo* оценка на ефектите на културални течности от петте щама от род *Pseudomonas* върху развитието на лечебни етеричномаслени растения *Mentha piperita* и *Ocimum basilicum*.

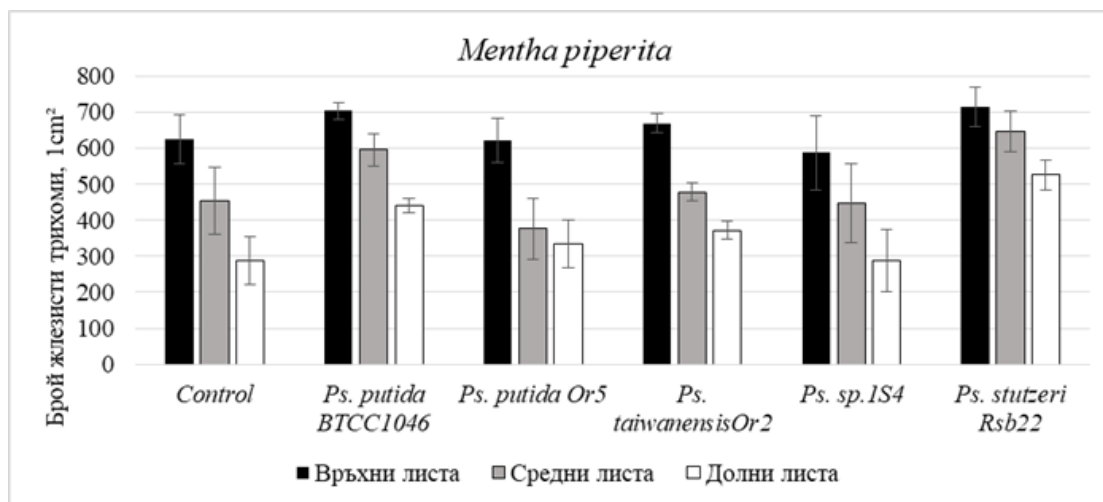
Установено е, че микроорганизмите, стимулиращи растежа на растенията, имат голям потенциал за използване като биоинокуланти за увеличаване на производството при медицински и ароматни растения. Такава стратегия е от съществено значение за намаляване на химическите натоварвания при култивиране на растения и за преминаване към органично производство на билкови продукти (Egamberdieva, D. Et al., 2015).

Проведени са експерименти за оценка ефектите на петте изследвани щама от род *Pseudomonas* върху развитието на лечебни етеричномаслени растения *Mentha piperita* и *Ocimum basilicum*. Растенията от всеки вид са разделени в експериментални групи и са третирани чрез поливане през 10 дни с по 200 ml разрежена активна бактериална суспензия (2ml/l), като продължителността на експеримент при *Ocimum basilicum* е пет седмици, а при *Mentha piperita* е седем седмици. При всяка експериментална група е предвидена контрола и третирани варианти, съответно в по три повторения за *Ocimum basilicum*, и по четири повторения за *Mentha piperita*.

### 5.2.1 Оценка ефектите на петте щама от род *Pseudomonas* върху развитието на етеричномаслено растение *Mentha piperita*.

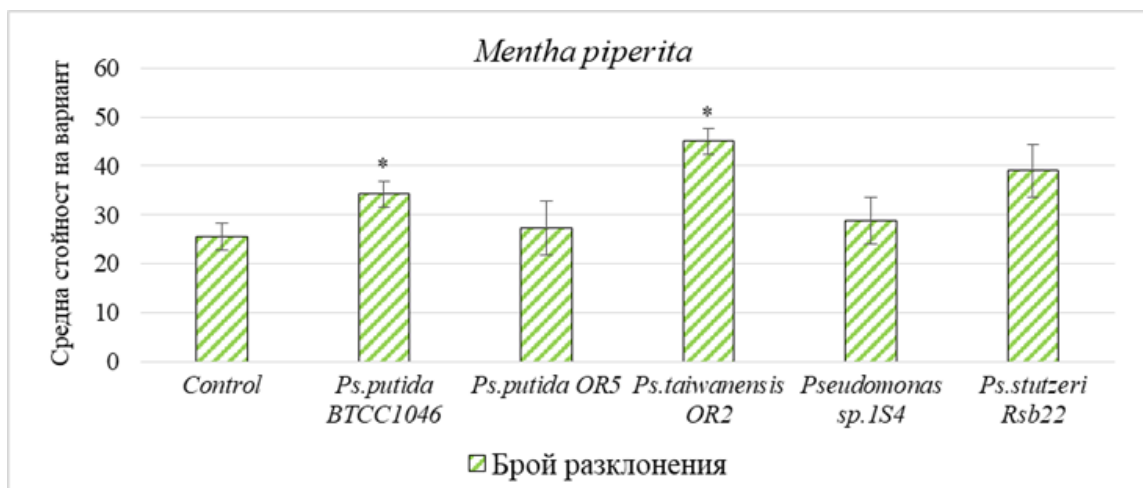
След приключване на периодите на третиране на тестваните растения от *Mentha piperita* е събрана получената растителна биомаса, определени са биометрични показатели и е направена количествена оценка за броя жлезисти трихоми на листен материал (Табл.13). Количеството на трихомите варира в зависимост от разположението на листата, като най-много те са във връхните листа, по-малко в средните и най-малко в долните листа на растението (фиг.14А).

Получените резултати са обработени статистически за оценка на получените разлики в биометричните показатели и брой жлезисти трихоми в MS Excel чрез TTEST. За статистически достоверни ефекти се приемат тези с  $P < 0.05$ .

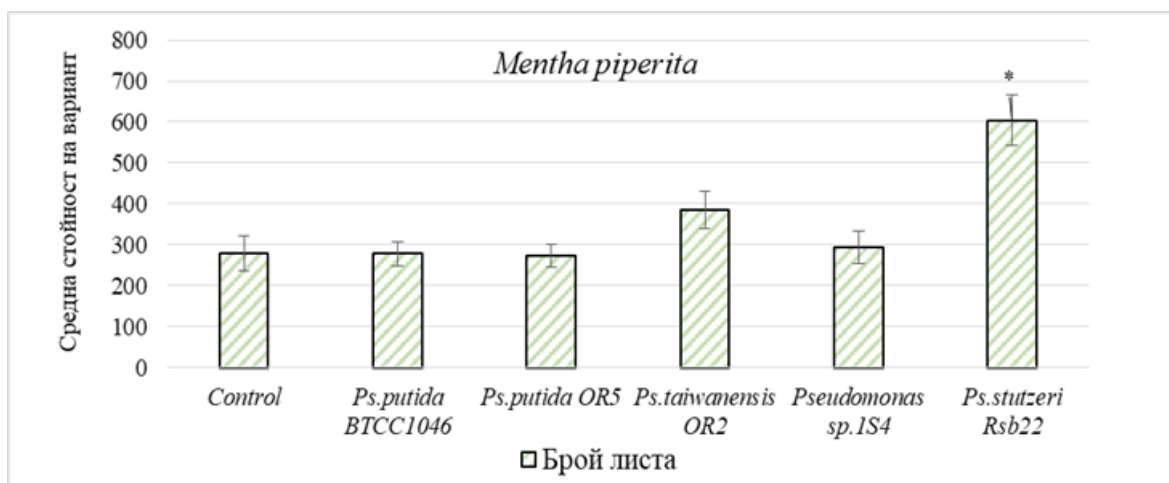


Фиг. 14/А Среден брой жлезисти трихоми на вариант в  $1\text{cm}^2$  при тестване растение Мента.

Наличието на жлезисти трихоми върху въздушните органи играе роля при синтеза и отделянето на природни продукти с висока стойност (Mahmoud and Croteau, 2002; Wagner et al., 2004; Schillmiller et al., 2008). Пелтатните жлезисти трихоми, намиращи се във въздушните органи на вида *Mentha*, са основното място за производство и отделяне на етерично масло (Табл. 14). От получените резултати за брой жлезисти трихоми може да се отбележи, че при растенията третиране с *Ps. taiwanensis* Or2, *Ps. putida* BTCC1046 и *Ps. stutzeri* Rsb22 се наблюдава по-голям брой жлезисти трихоми, както при връхните, така и при средните и долни листа. (Фигура 14/А)



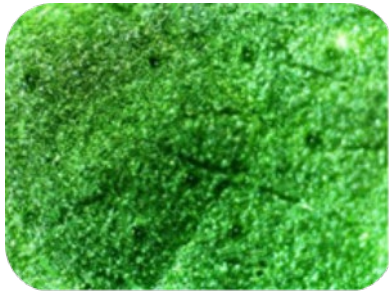
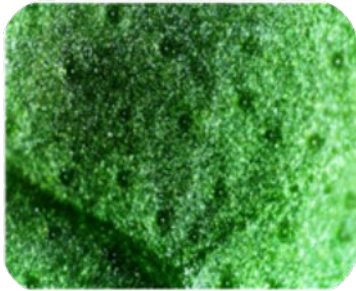
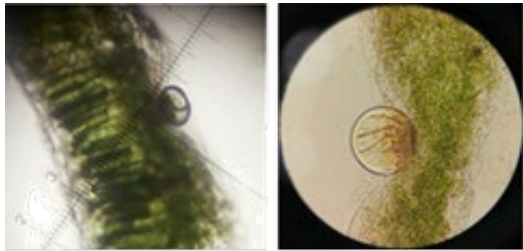
Фиг. 14/Б Среден брой разклонения на надземна част при тест растение Мента.



Фиг. 14/В Среден брой листа на вариант при тест растение Мента.

На базата на направена оценка (при условията на експеримента) по отношение на свежа надземна биомаса и свежа листна биомаса не се установява статистически значим ефект след третиране на *Mentha piperita* с изследваните щамове. Увеличаване на броя на разклоненията на надземната част се наблюдава при растенията третирани с щамове Or2, 1S4 и BTCC1046, като статистически достоверно е увеличението при два от посочените щамове - Or2 и BTCC1046. По отношение увеличен брой листа на едно растение статистически достоверен ефект се наблюдава при третиране с *Ps. stutzeri* Rsb22. При проведен *in vitro* експеримент с ризосферни щамове от род *Pseudomonas*, изолирани от корени на *Mentha*, е установено повишаване в броя на трихомите и биомасата на растението (Santoro et al., 2015).

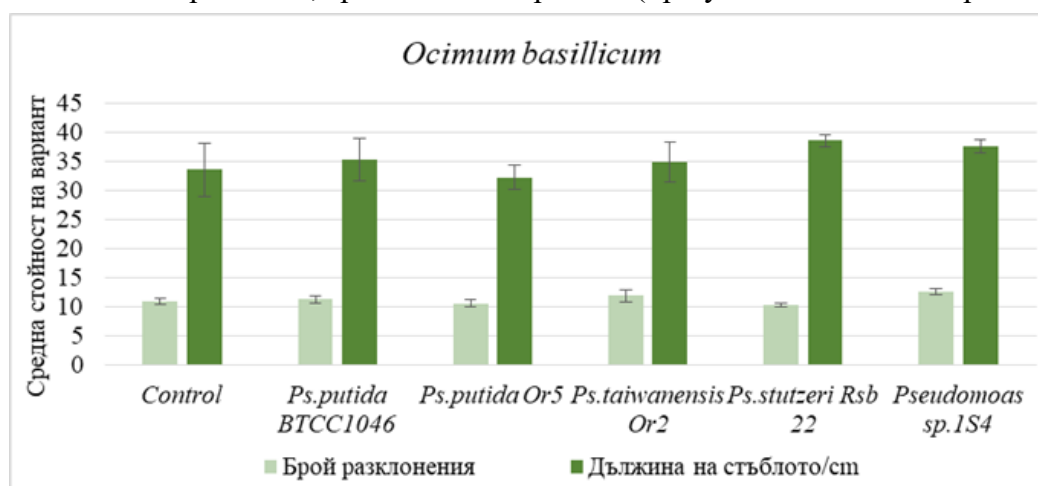
Табл. 13 Микрофотографски снимки на жлезисти трихоми при *Mentha piperita*

Жлезисти трихоми при опитните растения <i>Mentha piperita</i> от проведените експерименти		Микрофотографии на трихоми при <i>Mentha piperita</i> (напречен пререз на лист)
Контролно растение	Растение третирано с <i>Ps. putida</i> BTCC1046	Жлезисти трихоми
		

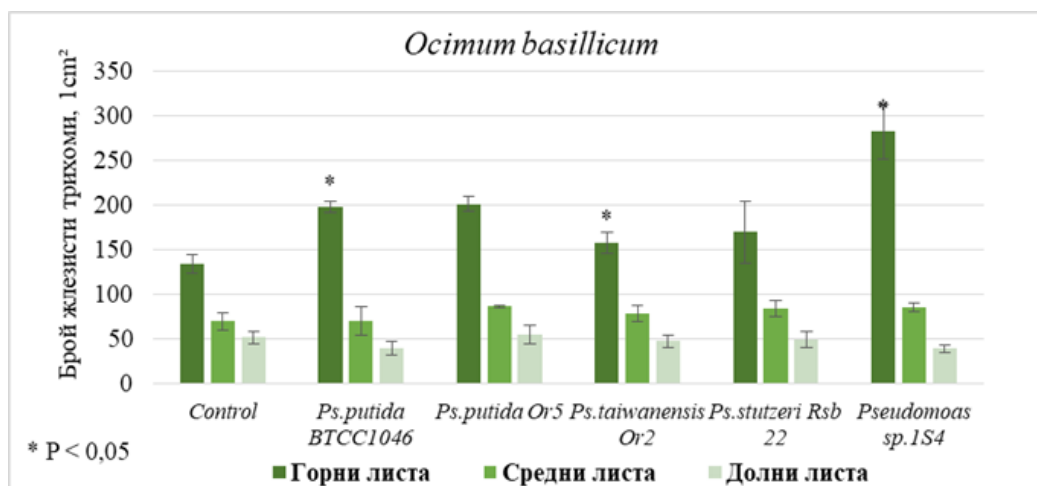
На таблица 14 е представен илюстрационен материал на жлезисти трихоми при *Mentha piperita*. Микроскопските снимки на лист от контролно растение и друго третирано с щам *Ps. putida* BTCC1046 показват видимо по-голям брой жлезисти трихоми при третираното растение. Срезове на листен материал показват в детайли морфологията на трихомите, в които се съдържа етеричното масло.

### 5.2.2 Оценка ефектите на петте щамове от род *Pseudomonas* върху развитието на етеричномаслено растение *Ocimum basilicum*.

На базата на направената оценка по три основни биометрични характеристики може да се направи извода, че статистически значимо изследваните щамове не повлияват третираните растения по отношение на брой разклонения и дължина на надземната част, като се запазват добър вид на всяко растение, сравним с контролите (при условията на експеримента).



Фиг. 15/А Брой разклонения и обща дължина на надземната част на растението



Фиг. 15/Б Среден брой жлезисти трихоми на вариант в 1 cm<sup>2</sup> след края на експеримента.

При резултатите получени за брой жлезисти трихоми (фигура 15Б) може да се отчете със статистическа достоверност, че при връхните листа на растенията третирани с *Pseudomonas putida* Or5, *Pseudomonas putida* BTCC1046 и *Pseudomonas* sp.1S4 се наблюдава около 1,5 до 2 пъти по-голям брой трихоми. При другите два изследвани щамове също се наблюдава повишаване броя на жлезистите трихоми при връхните листа, но тези резултати не са потвърдени като статистически достоверни и това предполага допълнителни експерименти. Разликата в броя на трихомите спрямо контролата вероятно се дължи на отделянето на растежни хормони и / или летливи органични съединения (Glick 2012; Ryu et al. 2004). Такива компоненти, колективно наречени "регулатори на растежа на растенията", са органични вещества, които засягат физиологичните процеси на растенията при изключително ниски концентрации и играят регулаторна роля в растежа и развитието на растенията (Dobbelaere et al. 2003).

При три от изследваните щамове *Ps.putida* BTCC1046, *Ps.putida* Or5 и *Pseudomonas* sp. 1S4 се утановиха активности регулиращи растежа и развитието на растенията, изявен биосинтетичен потенциал и добри културални характеристики. Това наложи подбора им при провеждането на последващи по-мощни експерименти с цел допълнително охарактеризиране и затвърждаване на получените до момента резултати.

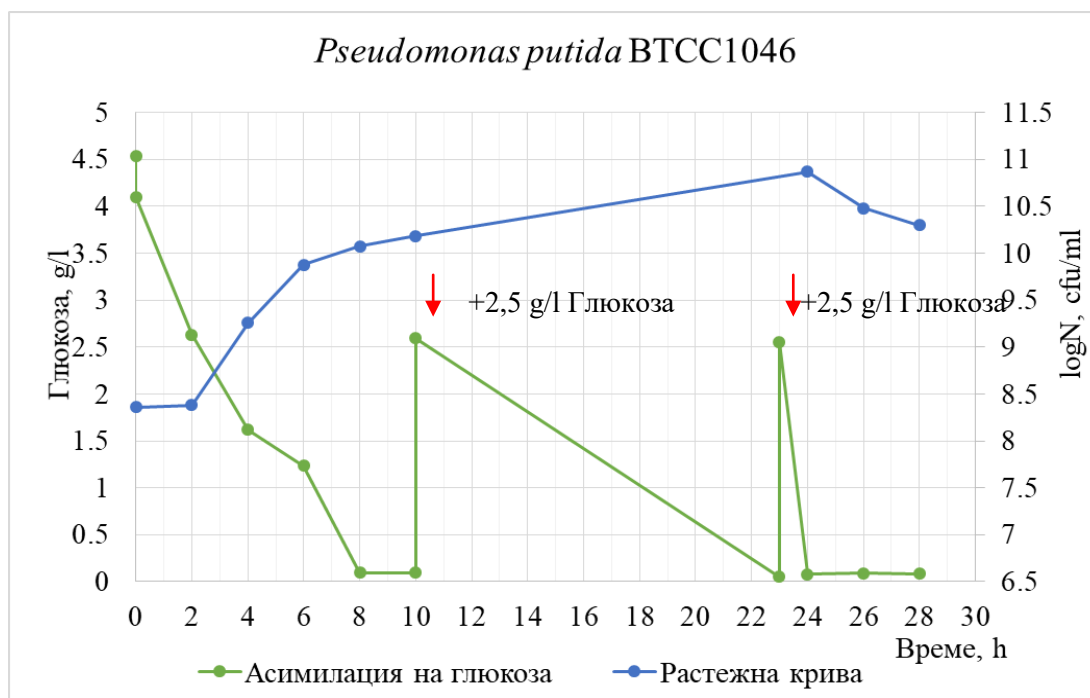
## 6. Мащабиране на култивирането и пост-култивационните процеси.

### 6.1 Проследяване динамиката на развитие на *Ps.putida* BTCC1046 при дълбочинно култивиране в лабораторен биореактор.

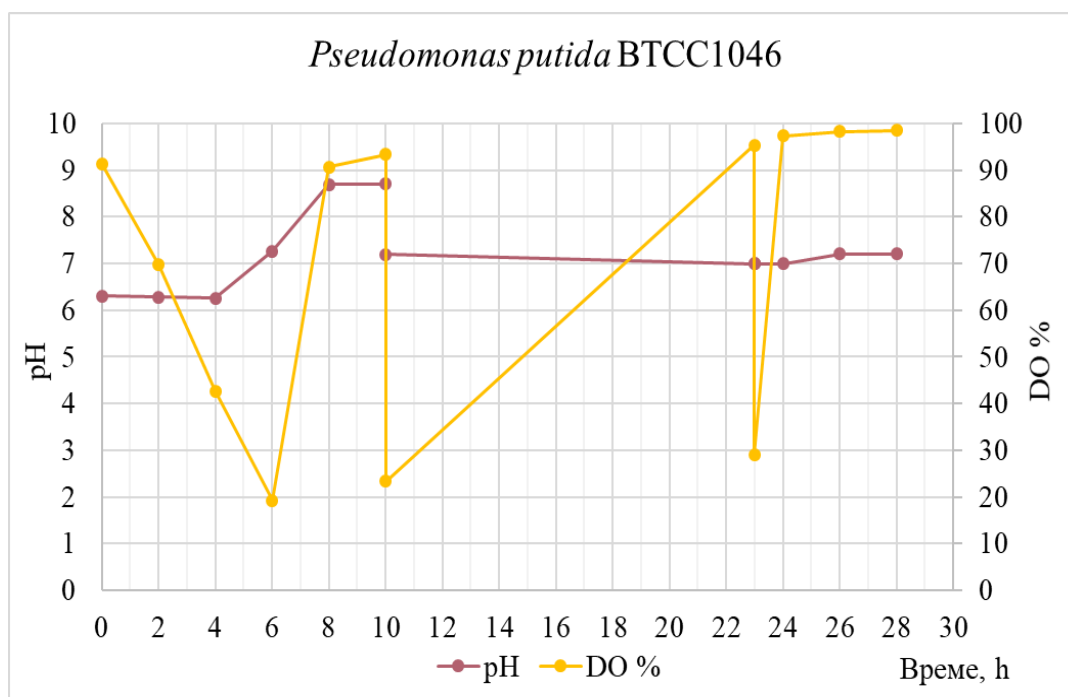
За да се постигне максимален добив на биомаса или биопродукти, ферментационния процес трябва да се провежда при строго контролирани условия на различните физични и химични параметри. При щам *Ps. putida* BTCC1046, като най-перспективен с RGP-потенциал от изследваните щамове, е проведено дълбочинно периодически култивиране с подхранване в биореактор с работен обем 3 литра. Проследяването на растежа на щам *Ps. Putida* BTCC1046 в хранителна среда ХС-3 е извършено с цел постигане на максимално



високи нива на получена свежа биомаса. За проследяване динамиката на развитие, са вземани стерилни проби от по 10 ml по време на процеса на култивирането. Пробите се анализират по отношение на остатъчна концентрация глюкоза и общ брой микроорганизми (cfu/ml). На 10-ти и 23-ти час се осъществяват подхранвания с 2,5 g/l глюкоза поради изчерпване на въглеродния източник. Получените резултати за развитието на щама в ХС-3 като cfu/ml, съответстващи на натрупването на биомаса, както и остатъчна концентрация глюкоза, са представени на фиг. 16. Наблюдава се S-образна крива на бактериален растеж. Фазата на адаптация на щама към хранителната среда е кратка и продължава до 2-ри час. Фазата на усилен растеж трае от 2-ри до 6-ти час, като най-високата постигната производителност на биомаса е  $10^{10}$  CFU/ml за 24 часа. Асимилацията на въглеродният източник глюкоза е бърза и на 8-ми час вече е под 0,5 g/l, като се задържа така до 10-ти час, когато е извършено подхранване с 2,5 g/l допълнително количество глюкоза. Глюкозата е високо разтворима във вода, така че транспорта до клетки и усвояването и не е проблем за микроорганизмите.



Фиг. 16. Динамика на развитие (CFU/ml) и усвояване на C-източник (mg/ml) при дълбочинно култивиране на *Ps. putida* BTCC1046 на ХС-3 в лабораторен биореактор.



Фиг. 17 Проследяване на промените в рН на средата и количеството разтворен кислород при дълбочинно култивиране на *Ps. putida* BTCC1046 на ХС-3 в лабораторен биореактор.

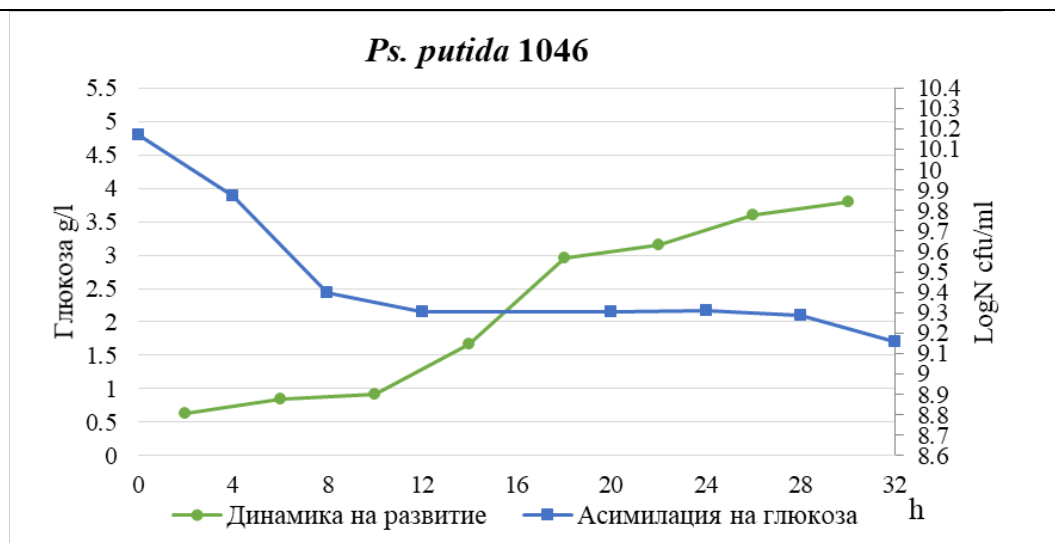
Извършеното подхранване с 2,5 g/l глюкоза на 10-ти час води до понижаване на DO от 90% до под 30%, удължаване на втората преходна фаза и натрупване на биомаса до 23 час от култивирането (фиг. 17). Извършеното второ подхранване на 23-ти час от процеса отново се акумулира от щама за кратко време, след което се наблюдава спад в общия брой. Предполага се, че поради ниските концентрации на кислород в средата, културата започва процес на лизис и ферментацията приключва на ранен етап между 8-ми и 10-ти час от процеса (фигура 16). Експоненциалното хранене с глюкоза, води до удължаване на процеса и постоянна скорост на растеж, проста и често използвана стратегия за култивиране при щамове *Pseudomonas* (Diniz et al., 2004; Poblete-Castro et al., 2014; Sun et al., 2006) и други родове бактерии, като *E. coli* (Kim et al., 2004; Korz et al., 1995; Lee, 1996).

Проследяването на култивирането в биореактора и наблюдаваните промени по време на процеса, ни дадоха информация за провеждане на по-мощно култивиране на подобрени щамове в биореактори използвани за промишлено производство.

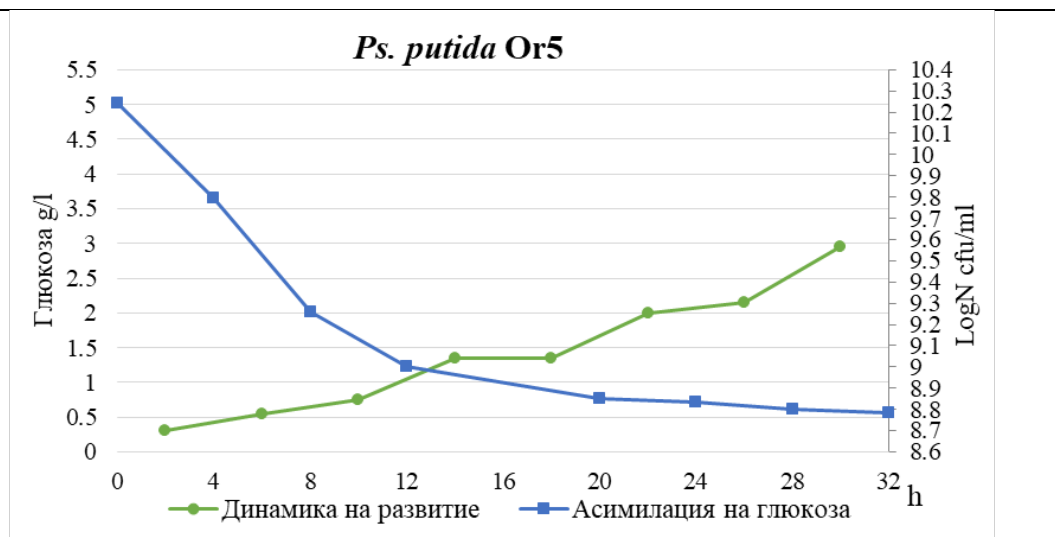
## 6.2 Мащабиране на процеса на култивиране в биореактори с работен обем 30 литра и 200 литра. Запазване на жизнеспособността и биологичната активност на щамовете чрез лиофилизация и разпрашително сушене.

В следващите експерименти са включени три от изследваните щамове с изявени биохимични, асимилационни характеристики и биосинтетичен потенциал. *Ps. putida* BTCC 1046, *Ps. putida* Or5 и *Pseudomonas sp.* IS4 се отличават и с активности отнасящи ги към ризосферните микроорганизми подобряващи растежа и развитието на растенията. Оптимизирането на технологичните процеси за получаване на активни високоплътности

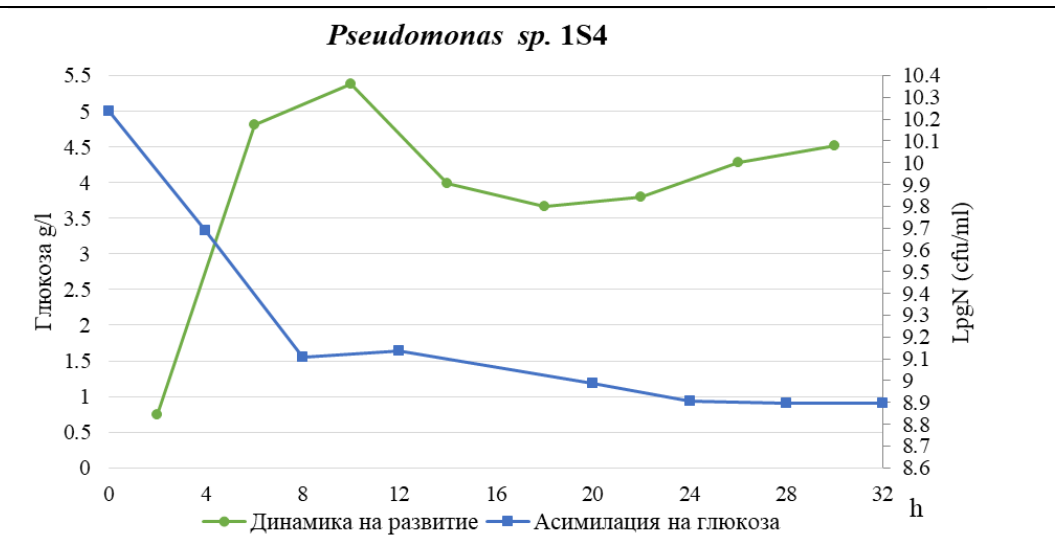
култури от избраните щамове са основата за разработване на нови бактериални биопрепарати с PGP-активности и/или с приложение при биоконтрола в растениевъдството.



Фиг.18 А



Фиг. 18 Б



Фиг. 18 В

Фиг.18  
Проследяване динамиката на развитие (cfu/ml) и усвояването на глюкоза при щам:

А) *Ps. putida* BTCC1046;

Б) *Ps. putida* Or5

и

В) *Ps.sp.1S4*

при култивиране в биореактор с работен обем 200L.

За получаването на голям обем активна биомаса от избраните щамове, култивирането им протича в биореактори, където са проследени основни параметри на процеса - натрупване на биомаса, усвояване на основни източници на растеж и развитие на културата, рН, обороти, поток на въздуха. На всички етапи от култивирането е използвана хранителна среда - ХС-3, приложена в съответен обем. Резултатите са обобщени и са представени на Фигура 18.

Култивирането на трите щама протича при едни и същи условия. В посевния биореактор (с обем 30L) културата достига плътност ( $10^8$  cfu/ml) необходима за протичане на същинската ферментация. Процесът на култивиране в посевния биореактор протича при температура 30°C, рН – 7.0 +/-0.5, обороти на разбъркване 100-120 rpm. След изтичане на времето за култивиране – 24 часа след инокулацията, обема от посевния биореактор се прехвърля чрез стерилна линия към биореактора за протичане на същинската ферментация. Запазват се същите параметри на протичане на процеса. Количеството на активна биомаса при щам *Ps.putida* BTCC1046 достига максимална плътност от  $10^9$  cfu/ml, като не се наблюдават съществени изменения след 8-мия час, когато и основния въглероден източник е почти изчерпан (фиг.17А ) Стойността на рН през целия процес остава сравнително стабилна в порядък от 7 – 7.9. При щам *Ps. putida* Or5 количеството на глюкозата достига концентрации под 1,5 g/l до 12-ти час от процеса на култивиране. До края клетъчната плътност се увеличава, като достига максимални стойности от порядък  $10^9$  cfu/ml. Наблюдава се понижение в стойностите на рН, които до края на процеса са в границите между 6.0 и 7.0.

Проведеното култивиране с щам *Pseudomonas sp.* 1S4, доведе до получаването на високоплътностна култура с порядък  $10^9$  cfu/ml. Отчетените стойности по отношение на асимилацията на глюкоза след 12-ти час показват съдържание от 1g/l глюкоза в средата. Отчетените колебания в стойностите на рН са от 7.3 до 6.5, като се променят през целия процес. Бързото натрупване на биомаса, усвояването на компонентите на хранителната среда и протичането на процесите на култивиране при зададени параметри прави изследваните щамове технологично значими за производствените процеси.

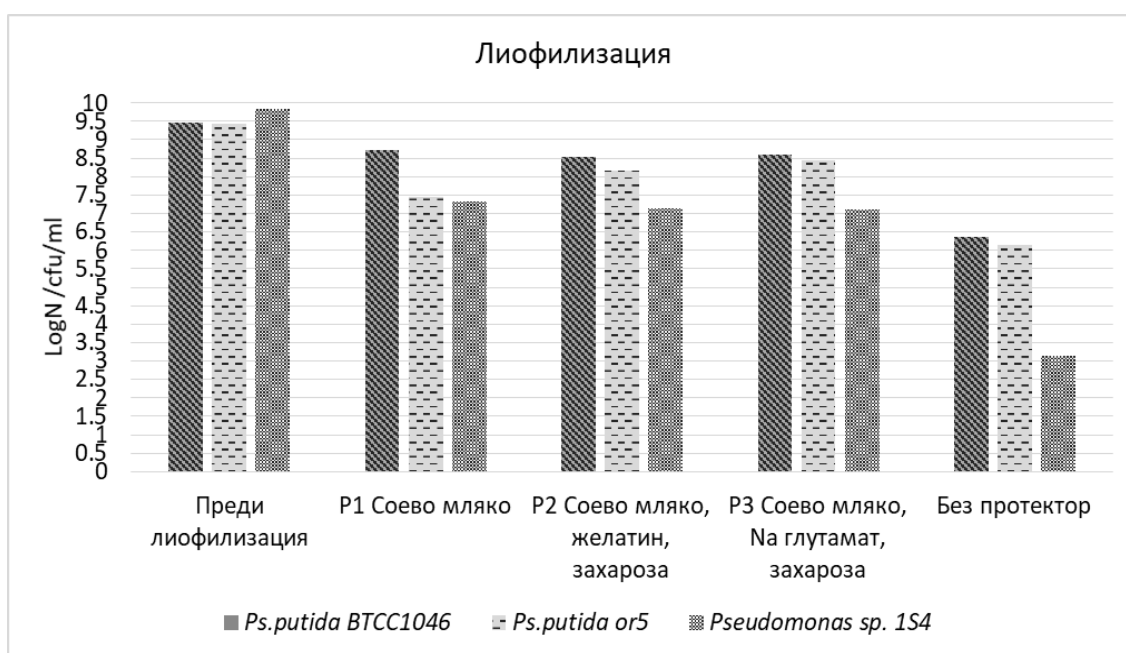
*В резултат от проведените култивирания са получени високоплътностни култури от трите изследвани щама Pseudomonas sp.1S4, Ps.putida BTCC1046 и Ps. putida Or5, които в следствие са подложени на процеси за получаване на сухи моделни препарати със запазени жизнеспособни активни клетки.*

### **6.3 Сравнително изследване за запазване жизнеспособността и биологичната активност на щамове чрез различни протекторни среди при лиофилизация и разпрашително сушене.**

Основна задача при лиофилизирането и разпрашителното сушене е получаване на най-висока преживяемост и съхраняване активността на щамове. За изпълнение на тази експериментална задача е използвана получената клетъчна биомаса от работните щамове *Ps. putida* 1046, *Ps. putida* Or5 и *Pseudomonas sp.* 1S4, в резултат от проведеното култивиране в биореакторите с плътност от  $10^9$  cfu/ml.

### 6.3.1 Лиофилизация

За да затвърдим получените резултати от проведената лиофилизация в лабораторни условия и да получим изсушени клетъчни култури с висока плътност, са използвани три вида протекторни среди, като в случая е проведена и лиофилизация без наличие на криопротектор. (т. Материали и методи). След успешно протичане на процеса е проверена жизнеспособността на всяка от лиофилизираните култури, чрез определяне на брой колонообразуващи единици за 1 ml реконституирана проба. Резултатите са представени на фигура 19.



Фиг.19 Преживяемост на изследваните щамове преди и след лиофилизация.

Получените резултати показват намаляване броя на жизнеспособните клетки с до 2 порядъка при лиофилизация на щамовете в присъствие на протекторна среда, и с 3 порядъка без протектор при *Ps. putida* 1046 и *Ps. putida* Or5, което затвърждава получените резултати при лиофилизацията в лабораторни условия. Щам *Pseudomonas sp.* 1S4, се отличава с най-ниска степен на преживяемост, като тук порядъците са от  $10^6$  cfu/ml за среди P1, P2 и P3 и едва  $10^3$  cfu/ml след лиофилизация без протектор. Защитното действие на дизахаридите върху запазване жизнеспособността на микроорганизмите при замразяване се дължи на способността им да хидратират биологични структури, като протеини и мембрани (Crowe J.H. et al., 2001). При проведено изследване с *Ps. chlororaphis*, Johan Palmfeldt et al., 2003 показва, че преди лиофилизация вътре и извънклетъчните концентрации на захароза са сходни, което означава, че захарозата влиза в цитоплазмената матрица преди замразяване на клетките. Щамът не използва захарозата, като източник на въглерод за растеж и не я хидролизира до монозахариди извънклетъчно. Изсушаването на *Pseudomonas sp.* 1S4 чрез замразяване без защитни агенти води до спад с до 4 пъти в сравнение с лиофилизацията с протектор.

От проведения експеримент става ясно, че приложените протекторни среди са подходящи за лиофилизация и на трите използвани щама. От икономическа гледна точка в последващи експерименти или за производствени цели най-изгодна би била лиофилизацията в присъствие на протектор соево мляко (P1).

*Приложената технологична схема за култивиране с натрупване на биомаса в присъствие на ХС 3 и последваща лиофилизация на щамовете с протектор съдържащ соево мляко, представлява технологично решение при мащабиране на процесите с цел получаване на краен продукт за приложение в биологичното земеделие.*

### 6.3.2 Разпрашително сушене

Процесът на разпрашително сушене е приложим в случаите на промишлено производство, където за сравнително кратко време получаваме изсушен и концентриран продукт. В резултат от проведеното разпрашително сушене, където отново присъства протектор представляващ 0,02 % соево мляко, са получени резултати представени в таблица 14.

Табл.14 Преживяемост на изследваните щамове преди и след разпрашително сушене

Разпрашително сушене	<i>Ps. putida</i> BTCC 1046	<i>Ps. putida</i> Or5	<i>Pseudomonas sp.</i> 1S4
Преди разпрашително сушене [Cfu/ml]	2,7x10 <sup>9</sup>	3,3x10 <sup>9</sup>	4,8 x10 <sup>9</sup>
След разпрашително сушене [Cfu/ml]	2,4 x10 <sup>7</sup>	2,4 x10 <sup>5</sup>	1,3 x10 <sup>3</sup>

Проведеното разпрашително сушене на щам *Ps. putida* BTCC1046 показва най-висока степен на преживяемост 10<sup>7</sup> следван от *Ps. putida* Or5 – 10<sup>5</sup>cfu/. Намаление броя на жизнеспособните клетки с до 7 порядъка се наблюдава при *Pseudomonas sp.* 1S4, което прави процеса на рапрашително сушене с много ниска ефективност. Оцеляването на културите след разпрашително сушене обикновено е много по-ниско, отколкото след замразяване и изсушаване, защото клетките са изложени едновременно на топлинен и на дехидрационен стрес. Промяна в параметрите на процеса и повишаване процента на соевото мляко, като протектор, вероятно биха довели до покачване в порядъка на степента на преживяемост.

В заключение на извършената експериментална задача може да затвърдим, че процесът на лиофилизация в присъствието на протекторна среда П1 е ефективен метод за запазване жизнеспособността на клетките за по-голям период от време, и позволява последващото им приложение при тестване на биологичната активност на щамовете върху развитието на растителни култури.

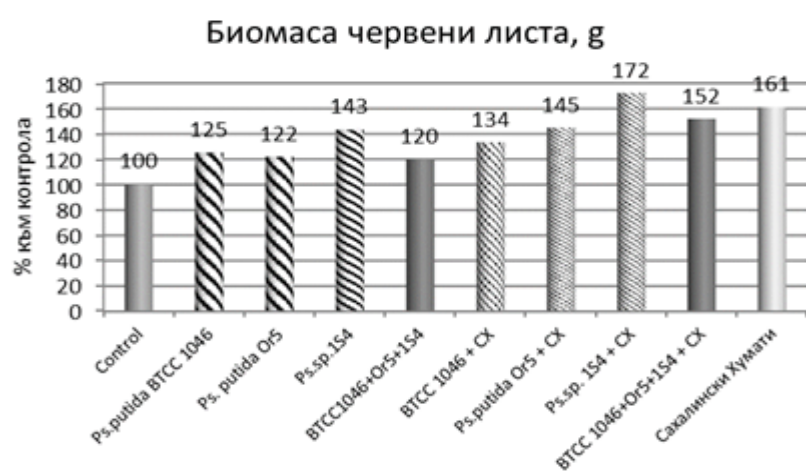
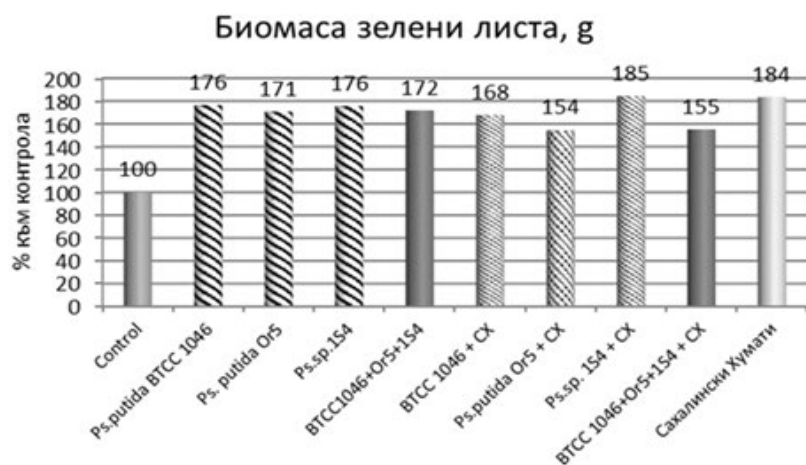
## **7. Проучване влиянието на изследваните щамове *Pseudomonas* самостоятелно и в комбинация с Хуминови субстанции върху тест растения.**

Скрининговите тестове определящи щамовете, като регулатори на растежа и развитието на растенията, изявеният биосинтетичен потенциал и добрите културални характеристики наложиха подбора на три от изследваните щамове, като перспективни PGP – ризобактерии за последващи експерименти в дисертационната работа. Хуминовите вещества представляват макрокомпонентно органично вещество в почвата и водните екосистеми, а така също и в твърдите изкопаеми горива. Освен това те са добър източник на енергия за полезните организми в почвата. Заедно с органичните съединения осигуряват необходимите за почвените микроорганизми енергия и минерални вещества за протичането на метаболитните процеси. (Tikhonov, V et al., 2010). След проведени експерименти с хуминовите вещества в комбинация с бактерии *Pseudomonas* се установи, че те не повлияват растежа на клетките и натрупването на биомаса, а при щамове *Ps. putida* BTCC1046 и *Ps. putida* Or5, се наблюдава стимулиране синтеза на естерази и фосфатази.

За оценка на биологичната активност на щамовете върху развитието на тест растения са използвани култивираните в процеса на мащабиране три щам псевдомонади, в последствие изсушени и концентрирани, като готови субстанции за приложение.

- **Оценка на биологичната активност на Сухи субстанции от щамове *Ps. putida* Or5, *Ps.putida* BTCC1046 и *Pseudomonas sp.1S4* в присъствие на Хуминови вещества върху развитието на *Euforbia pulcherima*.**

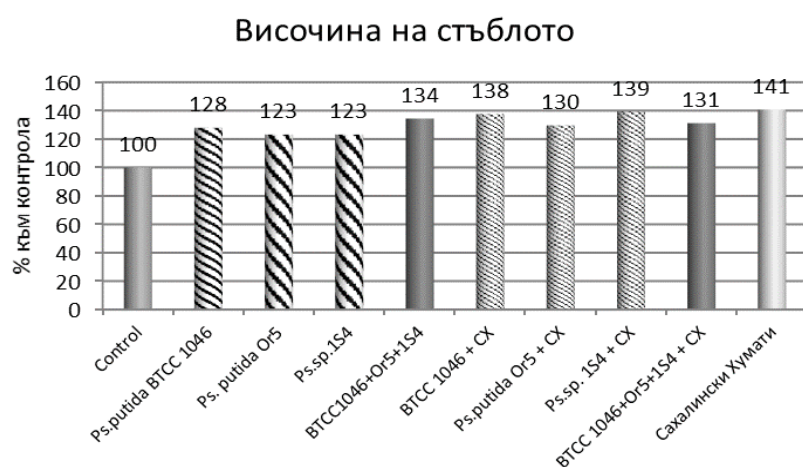
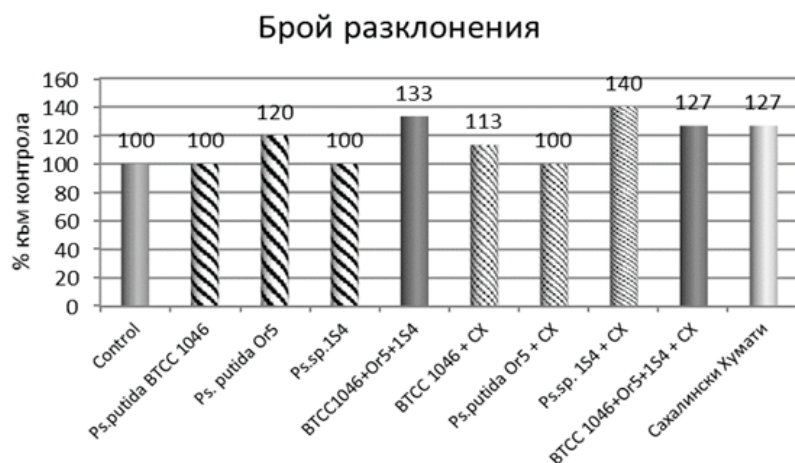
За целите на експеримента са използвани Сахалински хумати, представляващи смес от хуминови и фулво киселини обект на изследване, в предишни разработки. За тест растение е ползван разсад на Коледна звезда - *Euforbia pulcherima* сорт „Милениум. Проведени са експерименти с цел изследване влиянието на щамове *Ps. putida* Or5, *Ps.putida* BTCC1046 и *Pseudomonas sp.1S4* поотделно и в комбинации с Хуминови субстанции върху развитието на *Euforbia pulcherrima* (фиг.23). Експериментите са проведени в отворена хидропонна система със субстрат торфено-почвена смес. Изследваните бактериални щамове са приложени, като сухи субстанции в концентрация 2g/l, а хуминовите вещества (Сахалински хумати) представляват 1% разтвор, приложен в концентрация 2ml/l. Заложени са и контролни варианти, които се поливат с вода. На фигура 20 и 21 са представени графики съдържащи обработени данни за масата на зелени и червени листа, броя разклонения и общата биомаса на надземната част и кореновата система.



Фиг. 20 Влияние на изследваните щамове поотделно и в комбинации с хуминови субстанции върху зелените и червени листа на растение *Euforbia pulherrima*.

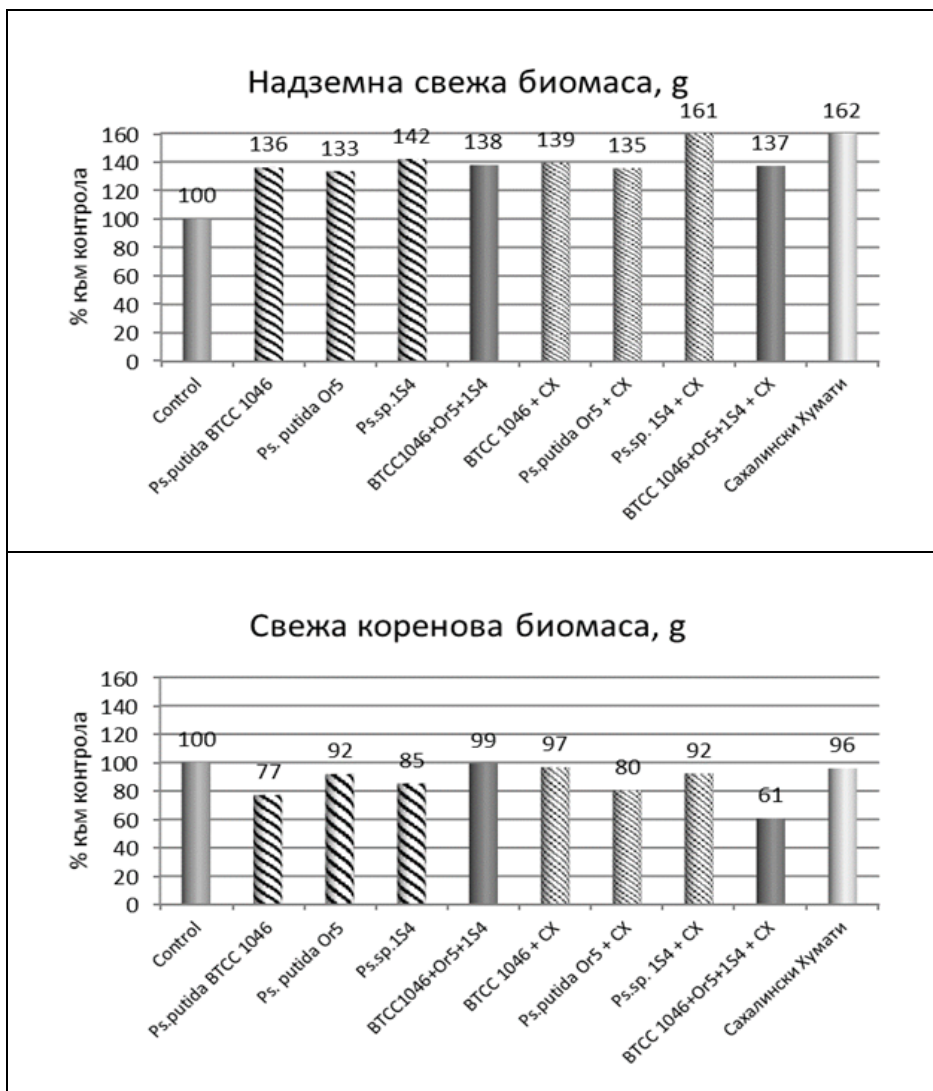
Отчита се увеличаване на биомасата при зелените листа с до 85% и при червените листа с до 72 % при комбинираните с хуминови субстанции варианти в сравнение с контролата. При формирането на червените листа, които са от значение за декоративния вид на растението се наблюдава и понижаване в стойностите на третираните със сухи субстанции от изследваните щамове варианти в сравнение с тези третираните в комбинация със сахалински хумати с около 30%.





Фиг.21 Влияние на изследваните щамове и комбинации с хуминови субстанции върху броя на разклоненията и височината на стъблото.

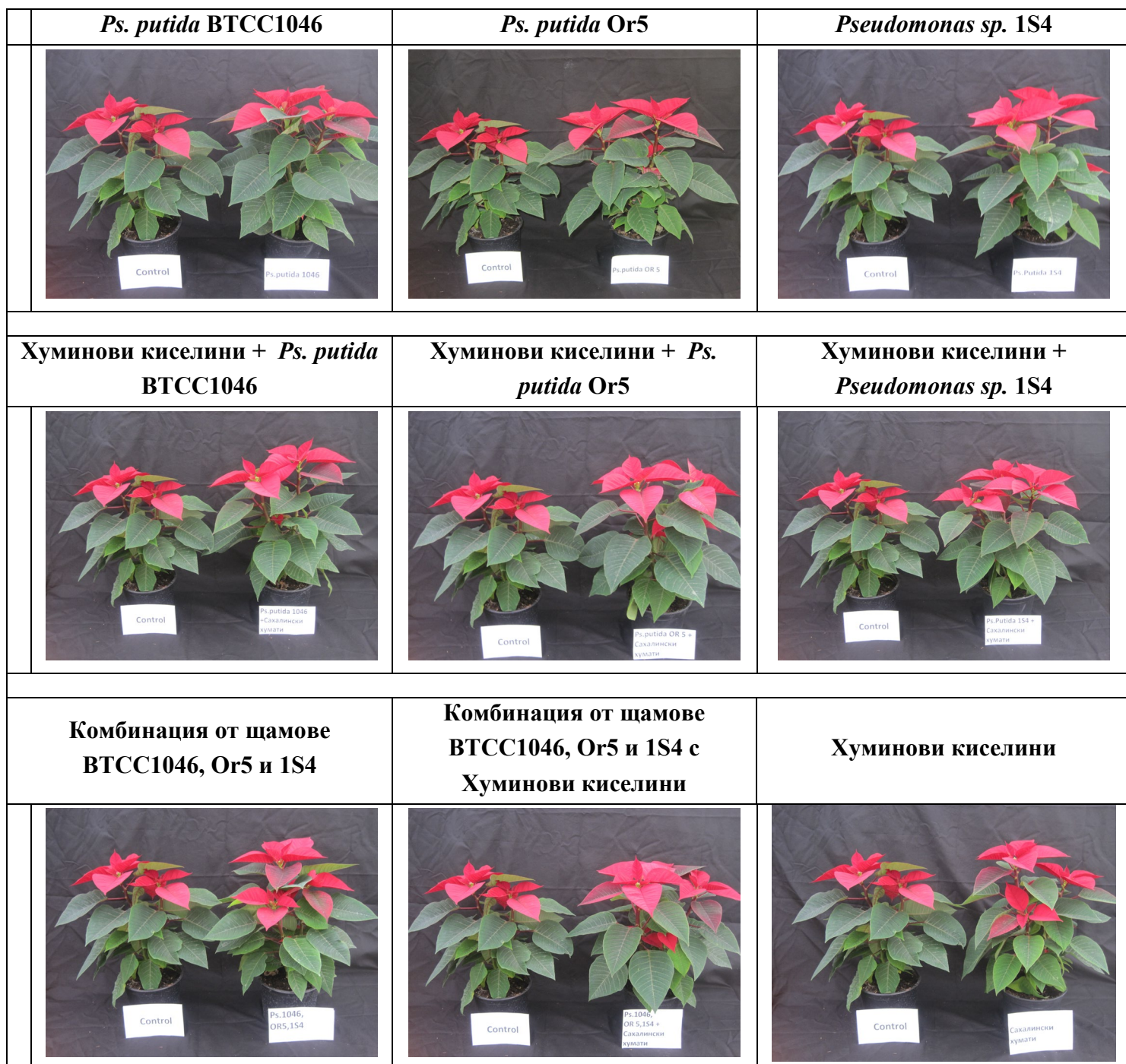
Данните от отчитането на биометричните показатели на фигура 21 и 22 , показват че щам *Pseudomonas sp.* 1S4 в комбинация със сахалински хумати и самостоятелно приложените хумати имат стимулиращо действие върху броя на разклоненията, височината на растението и общата надземна биомаса. Вариантите на щам *Ps.putida* BTCC1046 в комбинация със CX и *Ps. putida* Or5 в комбинация със CX, показват стойности между 30 и 38% по високи от контролата по отношение на височината на стъблото.



Фиг.22 Влияние на изследваните щамове и комбинации с хуминови субстанции върху свежата надземна и коренова биомаса при растение *Euforbia*

*pulherrima*.

Данните за свежата коренова биомаса показват стойности близки до контролата, като миксът от *Ps. putida* BTCC1046, *Ps.putida* Or5 и *Pseudomonas sp.* 1S4 и сахалински хумати оказва негативен ефект при развитието на корена (фиг. 22).



Фиг. 23 Декоративен вид на растение *Euforbia pulherima* след края на експеримента при третиране с щамове *Ps. putida* BTCC1046, *Ps. putida* Or5 и *Pseudomonas sp.* 1S4, самостоятелно и в комбинация с Хуминови киселини.

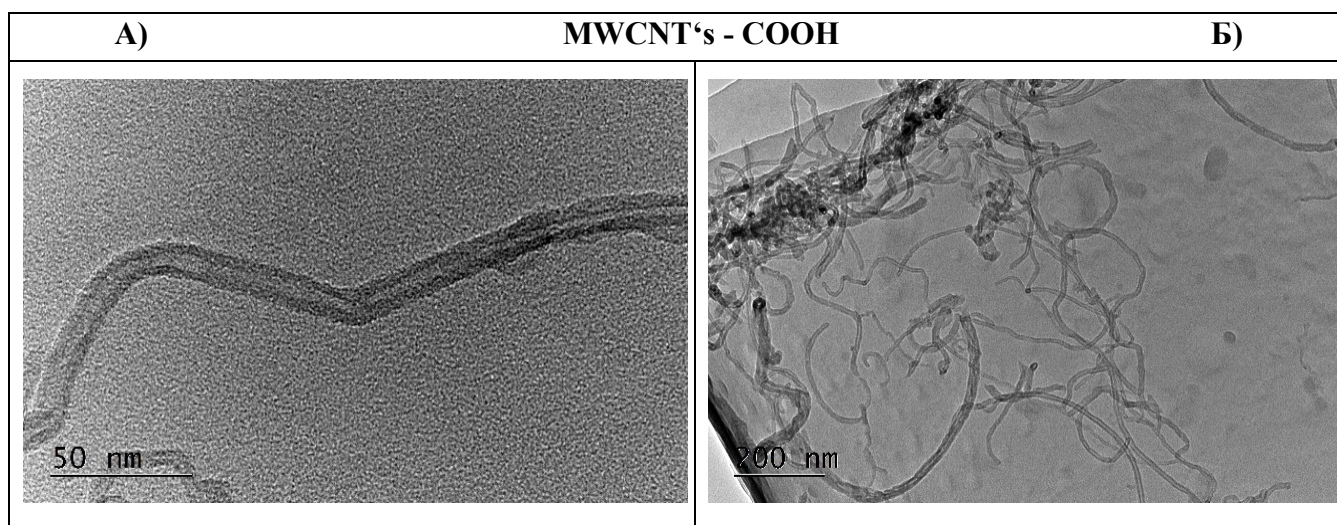
В заключение от проведения експеримент можем да обобщим положителното влияние на хуминовите субстанции в комбинация с тестваните щамове от род *Pseudomonas* върху *Euforbia pulherrima*, като подобряващо декоративния вид на растението.

## 8. Проучване и подбор на наносубстанции от въглеродни нанотръбички и наночастици от метални оксиди, и проследяване на влиянието им върху микроорганизмите.

Проследени са редица проучвания фиксирани върху взаимодействието между наночастиците и микробните популации, съпоставящи физикохимичните свойства на инженерно създадените наночастици и тяхната биологична роля. Изследвания върху екологично приложими видове бактерии, като *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* и други отбелязват ясно, че наночастиците могат да бъдат усвоени и успешно приложими от микроорганизмите в почвата (Suresh et. al., 2013).

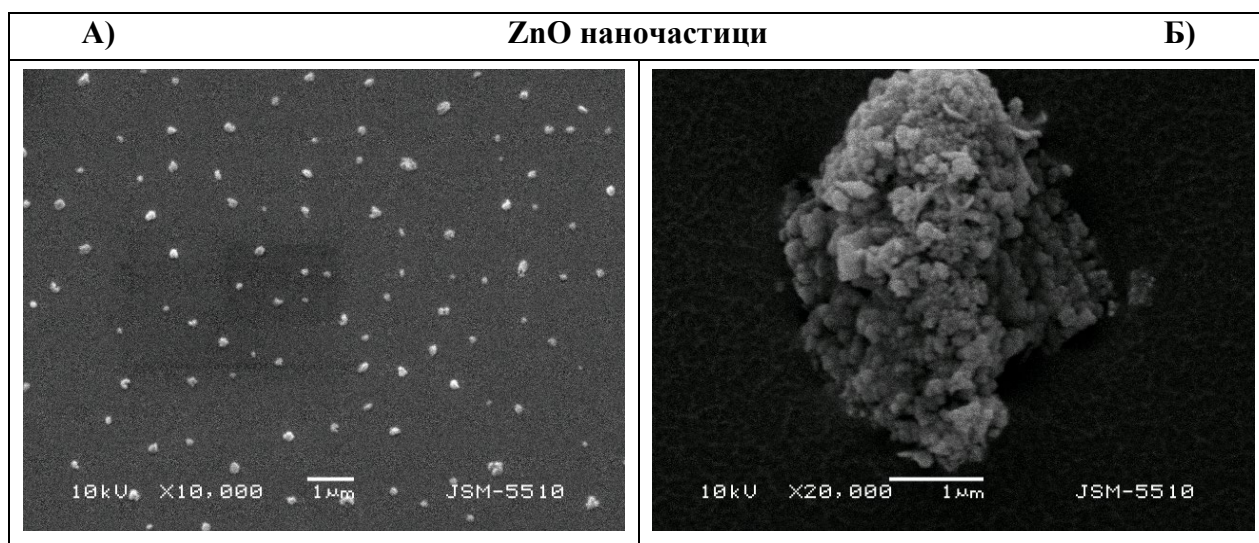
За целите на планираната експериментална работа са използвани въглеродни нанотръбички - MWNTs (MWCNP-COOH), като суха субстанция с размери от 3 до 15 броя стени и дължина 1-10 $\mu\text{m}$  и ZnO наночастици, като суха субстанция със среден размер на частиците 25 nm (PlasmaChem GmbH). Извършени са различни изследвания за изясняване на ефекта на отделни групи наноматериали върху живите системи, като голяма част от тях са посветени на въглеродните нанотръбички и наночастиците от метални оксиди. При MWCNT's експериментите показват влияние върху покълването на семената, докато ефекта на наночастиците от ZnO се проявява върху вегетативното развитие на растенията (Solanki, P et al., 2015).

За определяне на повърхностната структура на използваните наноматериали в работна среда е приложен метод на сканираща електронна микроскопия (SEM) с микроскоп JSM 5510 (Лаборатория SEM при ФХФ на СУ) за ZnO наночастици и сканиращ трансмисионен електронен микроскоп (HR STEM JEOL JEM 2100) за MWNT's. Пробоподготовката и методиката на анализиране са подробно описани в раздел материали и методи. Като резултат от проведените електронномикроскопски наблюдения на наноматериалите в работна среда е получена информация за оптимизиране на протокола за пробоподготовка и наблюдение на следващите проби.



Фиг 24 . ТЕМ изображения на: А) Многостенна нанотръбичка при увеличение 100к; Б) MWCNT's при увеличение 40к.

Изображенията показват изходната форма на изследваните наноматериали, в резултат от проведения протокол за разтваряне и пробоподготовка (Фиг. 24 и 25).

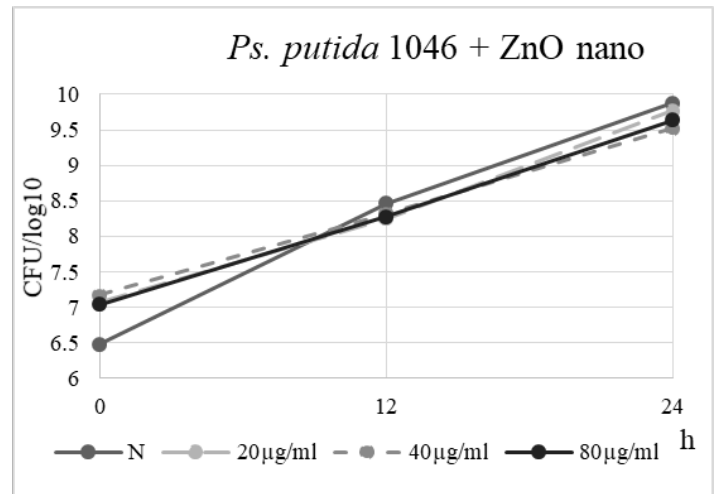
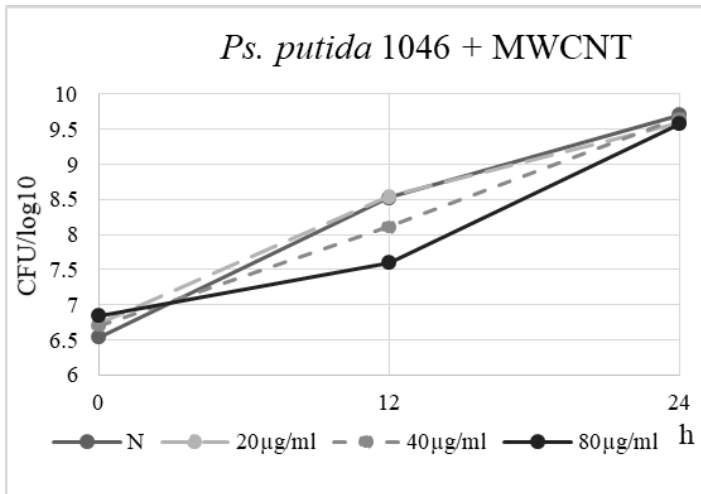


Фигура 25. SEM изображение на: А) ZnO наночастици диспергирани в разтвор; Б) Агломерат от суха субстанция на ZnO наночастици.

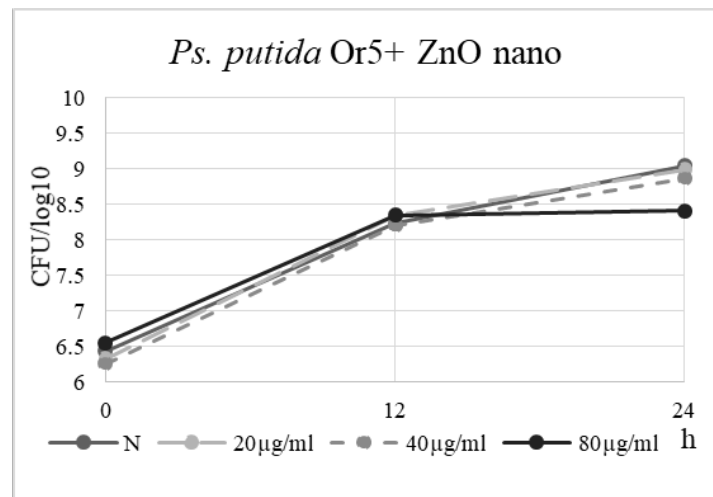
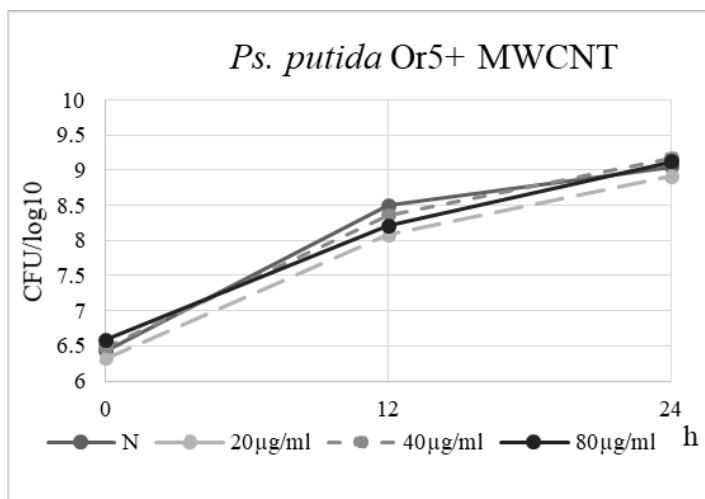
### **8.1 Проследяване влиянието на наноматериалите върху подобрени ризосферни представители от род *Pseudomonas*.**

8.1.1 Провеждане на дълбочинно култивиране на работните щамове в присъствие на наночастици в различни концентрации и сравнителна оценка на динамиката на развитие на културите.

За провеждане на експериментите са използвани три щама, ризосферни представители на род *Pseudomonas* – *Ps. putida* BTCC1046, *Ps. putida* Or5 и *Pseudomonas sp.* 1S4 и хранителна среда за тяхното култивиране - ХС 3, която е целево конструирана за получаване на висока клетъчна плътност при дълбочинно култивиране. За проследяване влиянието на наноматериалите върху динамиката на развитие на работните щамове е проведено дълбочинно култивиране за всеки от трите щама в присъствие на наночастици в различни концентрации. След извършена литературна справка, относно влиянието на различни наноматериали върху жизнената дейност на микроорганизмите, са подбрани три работни концентрации – 20μg, 40μg и 80μg/ml за MWCNTs и ZnO-наночастици (Jones, N et.al., 2008; M. Sheikh Mohamed and D. Sakthi Kumar, 2016). Направена е сравнителна оценка за брой живи клетки (cfu/ml) в процеса на култивиране и е проследено изменението в морфологията на клетките чрез SEM. Получените резултати от процесите на дълбочинно култивиране са представени на фигура 26 – А, Б, В.



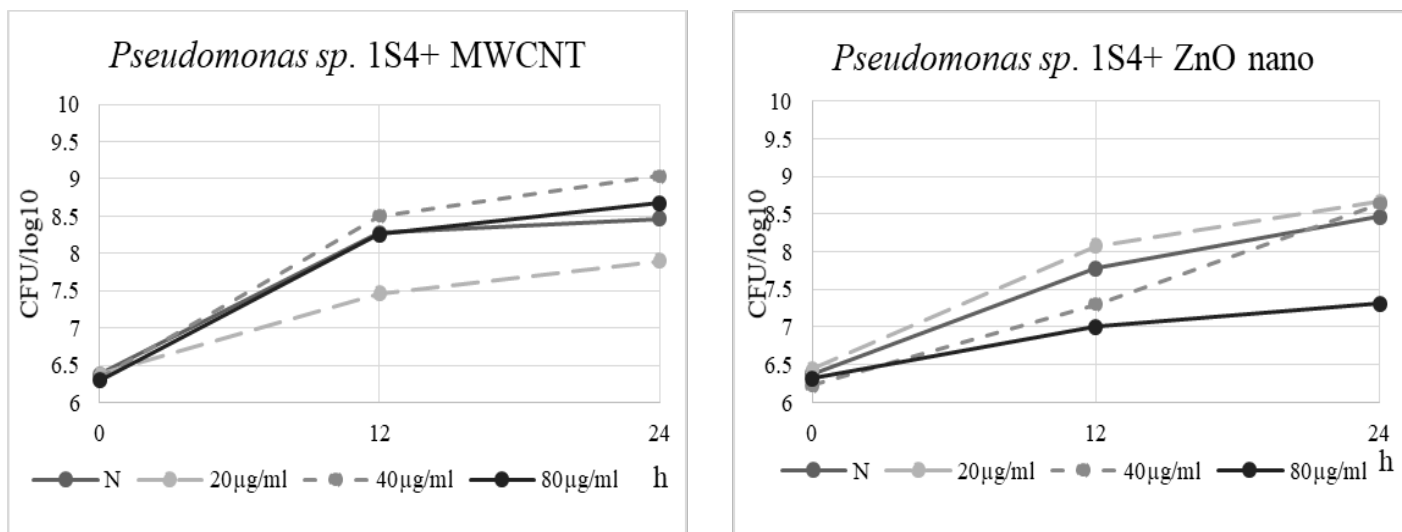
Фиг. 26 А. Проследяване развитието на щам *Ps. putida* BTCC 1046, в присъствие на три работни концентрации на въглеродни нанотръбички и ZnO наночастици. (N – хранителна среда без добавени наночастици)



Фиг. 26 Б. Проследяване развитието на щам *Ps. putida* Or5 в присъствие на три работни концентрации на въглеродни нанотръбички и ZnO наночастици. (N – хранителна среда без добавени наночастици)

За приложение в практиката на бактериални щамове с RGP-потенциал се изисква получаване на жизнеспособни култури с висока клетъчна плътност. След проведеното дълбочинно култивиране с добавяне на наноматериали се установи, че подбраните концентрации не повлияват съществено динамиката на развитие на двата щама *Ps. putida* BTCC 1046 и Or5, като постигнатата клетъчната плътност е съизмерима с тази на контролната среда -  $10^9$  cfu/ml.

При *Pseudomonas sp.* 1S4, се наблюдават разлики от 1 до 2 порядъка по-ниска клетъчна плътност на културата спрямо контролната среда особено при третиране с 80µg/ml ZnO (фиг. 26B).



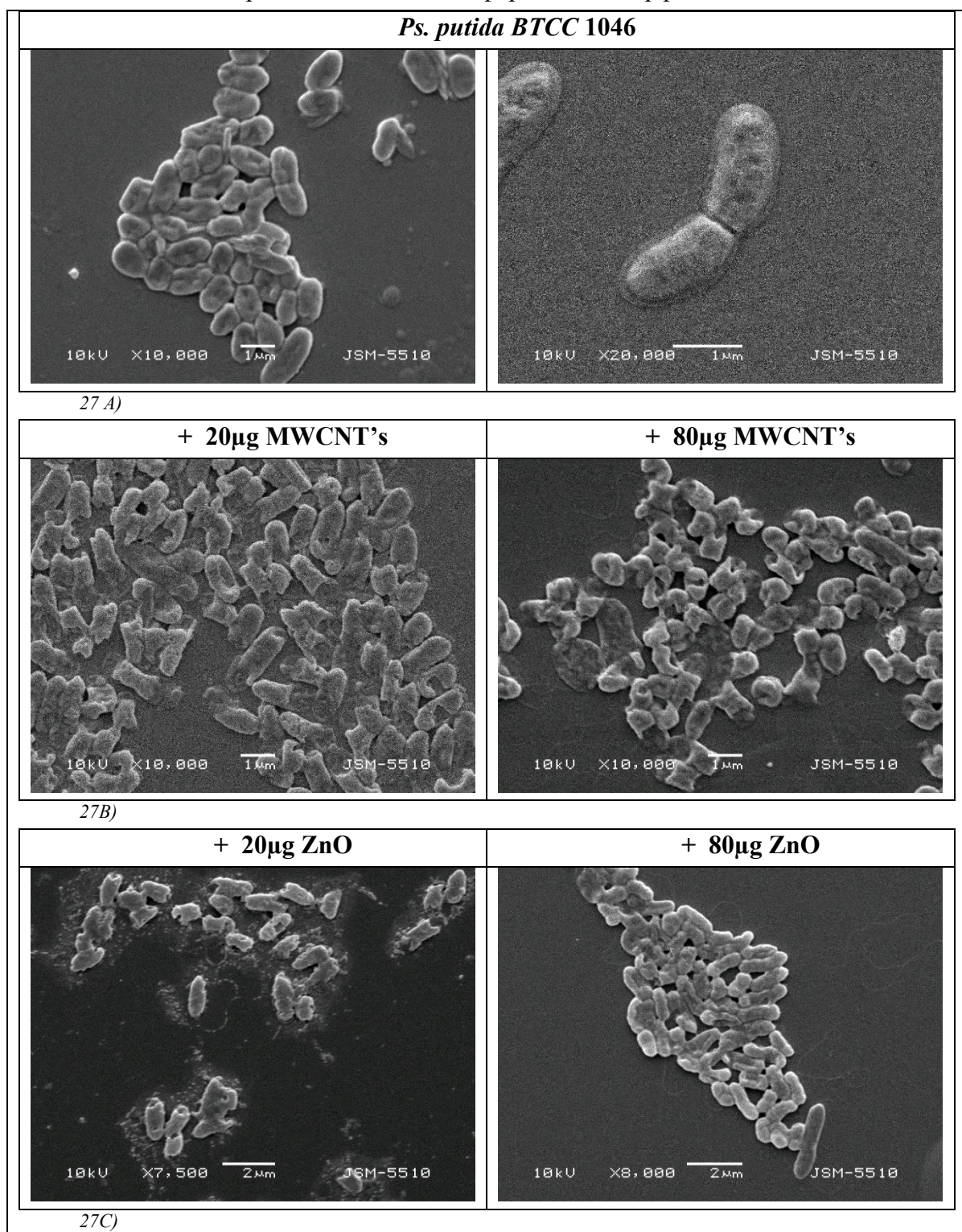
Фиг. 26 В. Проследяване развитието на щам *Pseudomonas sp.* 1S4 в присъствие на три работни концентрации на въглеродни нанотръбички и ZnO наночастици. (N – хранителна среда без добавени наночастици).

Редица изследвания показват неблагоприятни последствия върху почвените микроорганизми при третиране с високи концентрации от наноматериали. При проведен експеримент с MWCNTs прилаган в концентрации 50 и 200 µg/ml в почва, Khodakovskaya et al., 2013 установява, че само високите концентрации понижават броя на микробните клетки. Наночастиците от ZnO имат висока антигъбна активност, но също така поради малките си размери по лесно се усвояват от растенията и благоприятстват цинковия дефицит в почви с калциев карбонат (Duhan et al., 2017). Концентрациите от 60 и 128 µg/ml повлияват клетъчната плътност при денитрифициращия щам *Pseudomonas stutzeri* PCN-1, като понижават стойностите с до 2 порядъка в сравнение с контролата. Въпреки сравнително високия общ брой, третирането с 128µg/ml ZnO наночастици има отрицателен ефект върху аеробната денитрификация на щамата.(Chen, Q. Et al., 2017).

#### 8.1.2 Проследяване на изменения в морфологията на клетките при работните щамове, култивирани в среда с наноматериали чрез сканираща електронна микроскопия.

От получените SEM изображения ясно се установява, че особено при по-високите концентрации на наноматериалите и при трите изследвани щамове се наблюдават добре изразени изменения в морфологията на клетките. При щамове *Ps. putida* BTCC1046 и Or5 добре оформените къси пръчици с овални краища се променят към по-окръглени структури с неправилна форма (фиг 27 и 28), а при щам *Pseudomonas sp.* 1S4 ясно се наблюдава удължаване на клетките и специфично групиране във верижка от по две или повече клетки (фиг.29).

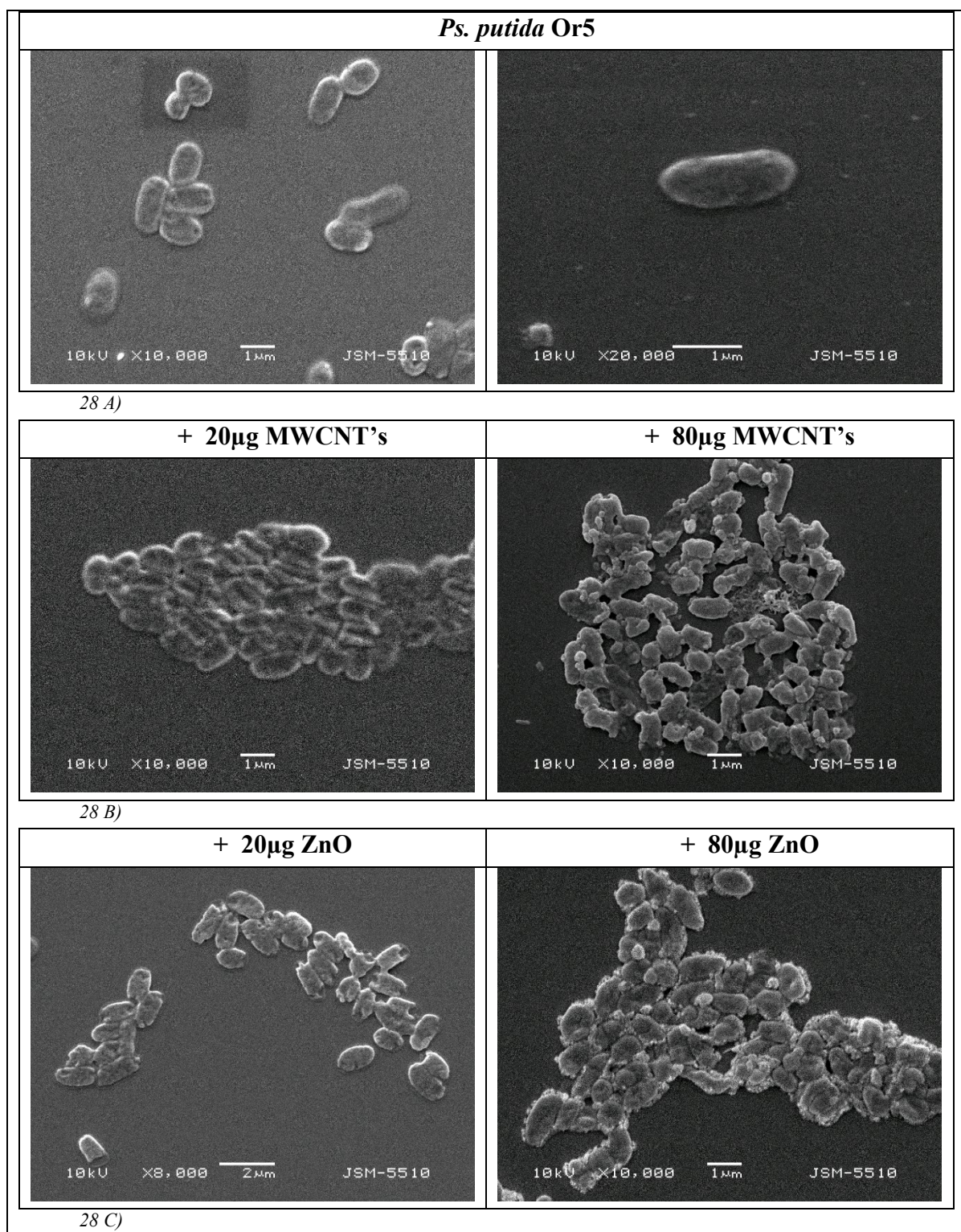
Данните, представени на *фигура 27*, показват морфологични промени в клетките на щам 1046, индуцирани след третиране с 20 и 80  $\mu\text{g/ml}$  MWCNT's. Приложените концентрации водят до свиване на бактериалните клетки и деформации в морфологията.



*Фиг. 27 SEM изображения на щам Ps. putida BTCC1046 след проведено дълбочинно култивиране: А) с хранителна среда XC3. В) XC3 + MWCNTs; С) XC3 + ZnO наночастици*

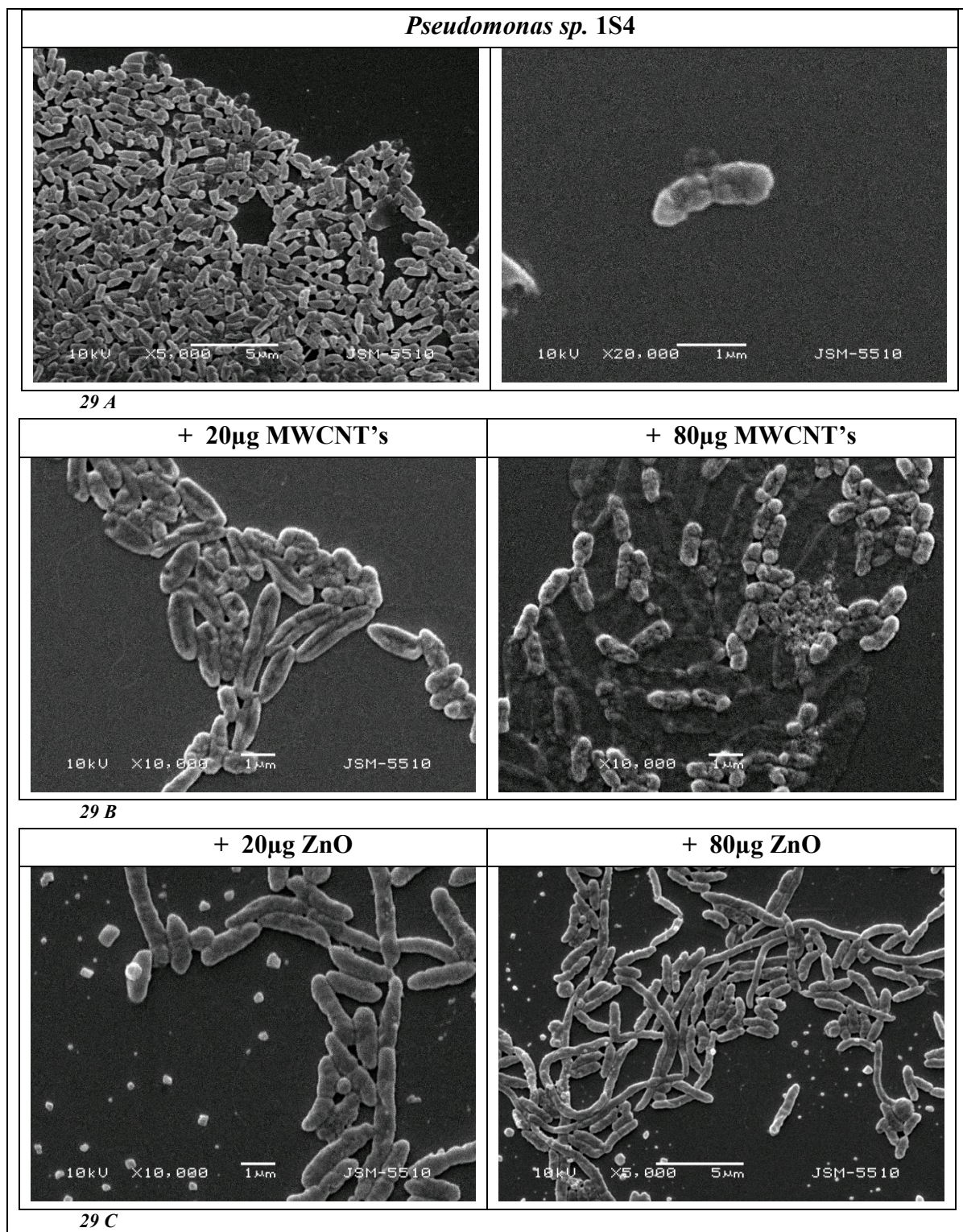


СЕМ изображенията на клетки на щам Or5 (Фиг. 28) показват, промени в морфологията след третиране с 80  $\mu\text{g/ml}$  MWCNT's и ZnO. Необработените клетки са с овална форма и непокътнати клетъчни стени, докато третираните клетки са с малки размери и агрегирани.



Фиг.28 SEM изображения на щам *Ps. putida* Or5 след проведено дълбочинно култивиране: А) с хранителна среда XC3.В) XC3 + MWCNTs; С) XC3 + ZnO наночастици.

Третирането на клетките на щам 1S4 с 20 и 80  $\mu\text{g/ml}$  ZnO наночастици води до удължаване и групиране във верижки. В резултат от култивирането в присъствие на 80  $\mu\text{g/ml}$  MWCNT's се наблюдават изменения в клетъчната морфология.



Фиг. 29. SEM изображения на щам *Pseudomonas sp. 1S4* след проведено дълбочинно култивиране: A) с хранителна среда XC3. B) XC3 + MWCNTs; C) XC3 + ZnO наночастици

Промяната в морфологията на клетките вероятно е резултат от директен контакт на наночастиците с клетъчната мембрана или следствие от защитни механизми на бактериалната клетка.

При взаимодействие с ZnO наночастици потенциалът на бактериалната мембрана се неутрализира, което води до увеличаване на повърхностното напрежение. Над определена концентрация на ZnO наночастици взаимодействията водят до промяна в повърхностното напрежение, което води до деполяризация на мембраната при контакт. В резултат на това, се наблюдават аномални промени в бактериалната мембрана, като разкъсване на мембраната и често образуване на агрегати (Arakha, M., et al., 2015).

## 8.2 *In vitro* оценка на активности на работните щамове в комбинация с наноматериали, като формирани комплексни бионаноформули.

За оценяване на активността на работните щамове беше определен ензимният профил чрез тест системата API ZYM (BioMericux, France). Резултати за всеки щам са представени в таблица.

Табл. 15 Изменения в ензимният профил на щам *Pseudomonas sp. IS4* в резултат от въздействието на ZnO и MWCNTs.

	<i>Ps. chlororaphis</i> <i>IS4</i>	20µg ZnO nano	80µg ZnO nano	20µg MWCNT	80µg MWCNT
Aklaline phosphatase	+	+	-	+	+
Esterase (C-4)	+	+	w	+	w
Esterase lipase (C-8)	+	w	w	+	w
Lipase (C-14)	w	-	-	-	-
Leucine aminopeptidase	+	+	w	+	+
Valine aminopeptidase	w	w	-	+	w
Cystine aminopeptidase	-	-	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-	-
Chymotrypsin	-	-	-	w	-
Acid phosphatase	+	+	+	+	+
Phosphohydrolase	+	+	+	+	+
a-Galactosidase	-	-	-	-	-
b-Galactosidase	-	-	-	-	w
b-Glucuronidase	-	-	-	-	w
a-Glucosidase	-	-	-	-	-
B-Glucosidase	-	-	-	-	-
N-Acetyl-p- glucosaminidase	-	w	w	-	-
a-Mannosidase	-	-	-	-	w
a-Fucosidase	-	-	-	-	-

‘+’ - положителен; ‘-’ – отрицателен ; ‘w’ – слабо положителен;

Табл. 16 Изменения в ензимният профил на щам *Ps.putida 1046* в резултат от въздействието на ZnO и MWCNTs.

	<i>Ps.putida 1046</i>	20µg ZnO nano	80µg ZnO nano	20µg MWCNT	80µg MWCNT
Aklaline phosphatase	+	w	w	+	w
Esterase (C-4)	w	w	w	+	+
Esterase lipase (C-8)	w	w	w	w	w
Lipase (C-14)	-	-	-	-	w
Leucine aminopeptidase	+	+	+	+	+
Valine aminopeptidase	w	w	w	+	w
Cystine aminopeptidase	-	-	-	-	-
Trypsin	-	w	-	w	w
Chymotrypsin	-	-	-	-	-
Acid phosphatase	+	+	+	+	+
Phosphohydrolase	w	+	+	+	+
a-Galactosidase	-	-	-	-	-
b-Galactosidase	-	-	-	-	-
b-Glucuronidase	-	-	-	-	-
a-Glucosidase	-	-	-	-	-
B-Glucosidase	-	-	-	-	-
N-Acetyl-p- glucosaminidase	-	-	-	-	-
a-Mannosidase	-	-	-	-	-
a-Fucosidase	-	-	-	-	-

‘+’- положителен; ‘-’ – отрицателен ; ‘w’ – слабо положителен;

Табл. 17 Изменения в ензимният профил на щам *Ps.putida Or5* в резултат от въздействието на ZnO и MWCNTs.

	<i>Ps.putida Or5</i>	20µg ZnO nano	80µg ZnO nano	20µg MWCNT	80µg MWCNT
Aklaline phosphatase	-	w	w	+	+
Esterase (C-4)	w	w	+	+	+
Esterase lipase (C-8)	w	w	w	w	+
Lipase (C-14)	-	-	-	-	w
Leucine aminopeptidase	+	+	+	+	+
Valine aminopeptidase	-	-	-	w	w
Cystine aminopeptidase	-	-	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-	-
Chymotrypsin	-	-	-	-	-
Acid phosphatase	w	+	+	+	+
Phosphohydrolase	w	+	+	+	+
a-Galactosidase	-	-	-	-	-
b-Galactosidase	-	-	-	-	-
b-Glucuronidase	-	-	-	-	-
a-Glucosidase	-	-	-	-	-
B-Glucosidase	-	-	-	-	-
N-Acetyl-p- glucosaminidase	-	-	-	-	-
a-Mannosidase	-	-	-	-	-
a-Fucosidase	-	-	-	-	-

‘+’- положителен; ‘-’ – отрицателен ; ‘w’ – слабо положителен;

При развитието на щамове без добавяне на наноматериали в процеса на култивиране при *Ps. putida* BTCC1046 (Табл.16) и *Pseudomonas sp.* 1S4 (Табл. 15) са отчетени изразени

фосфатазни активности (кисела и алкална фосфатаза), докато при *Ps. Putida* Or5 (Табл. 17) само слабо изразена кисела фосфатаза. И при трите щама са отчетени естеразна, естеролипазна, фосфохидролазна и аминоксептидазна активности.

Изменения в ензимният профил на щам *Ps. putida* 1046 се наблюдават при третиране с ZnO наночастици, където се понижава активността на алкалната фосфатаза и естеразата, а тази на фосфохидролазата се повишава. Въглеродните нанотръбички повишават естеразната активност при 20 и 80 µg/ml. При *Ps. putida* Or5, влиянието на наноматериалите и в двете концентрации води до повишаване на активности, като алкалната фосфатаза и естераза.

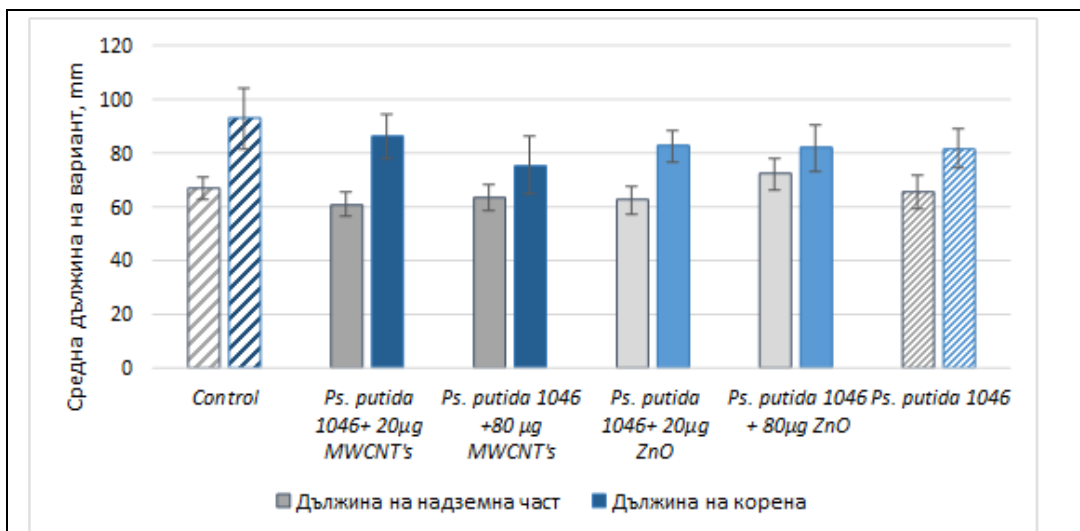
Високите концентрации на ZnO наночастици и MWCNTs, понижават естеразната и естеролипазната активност при щам *Pseudomonas sp.* 1S4. Като цяло не се наблюдават други съществени изменения в ензимният профил в резултат от въздействието на наноматериалите.

Важно е да се отбележи, че излявата на фосфатазни и фосфохидролазни ензимни активности при ризосферната микрофлора има пряко значение за превръщането на източниците на органичен фосфор в почвата, които са от 30 до 80%, в разтворима и по-лесно усвоима от растенията форма (Caldwell, 2005; Calvo et al, 2014).

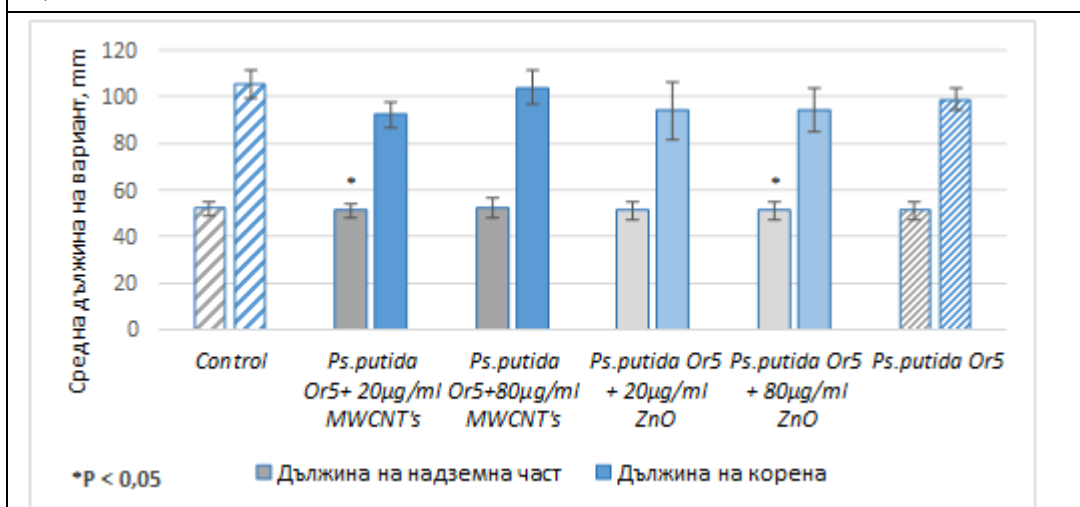
### **8.3 *In situ* и *in vivo* оценка на биологичната активност на работните щамовете и наночастици върху развитието на тест растения.**

#### **8.3.1 *Проследяване ефекта на избраните щамовете от род Pseudomonas по отделно и в комбинация с наноматериали върху развитието на семена от Грах.***

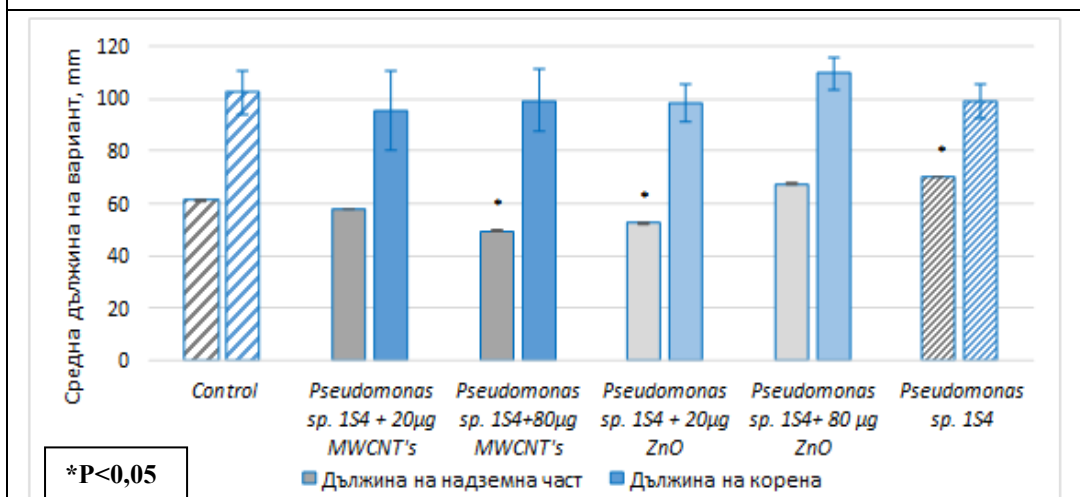
За третиране на семената е подготвена културална течност - 24 часова култура на съответния щам и в комбинация с ZnO наночастици и MWCNTs с концентрация 20 и 80 µg/ml. Проследено е и влиянието на избраните наноматериали по отделно върху развитието на тест растенията. Отчитането на биометричните показатели - височина на стъблото, дължина на корена, брой разклонения на корена и брой листа се извършва на 96-ти час от инокулирането. На база на проведените експерименти и получените резултати се установява, че при изследване влиянието на бактериалните щамовете от род *Pseudomonas* в комбинации с наноматериали върху вегетативното развитие на семена на *Pisum sativum* не се наблюдават статистически значими изменения в биометричните показатели (Фиг. 30). Приложените в концентрации 20 µg/ml и 80 µg/ml наноматериали показват стойности сравними с контролата на този етап от развитието на растението. Причината за това може да бъде нестабилността на наноматериалите във водна среда и бързото образуване на агломерати, които до голяма степен инактивират специфичното им действие.



А)



Б)



В)

Фиг. 30  
Дължина на корен и надземна част при третирани грахови растения с наноматериали в комбинация с А) *Ps. putida* BTCC1046, Б) *Ps. putida* Or5 и В) *Pseudomonas* sp. 1S4 в края на експеримента.

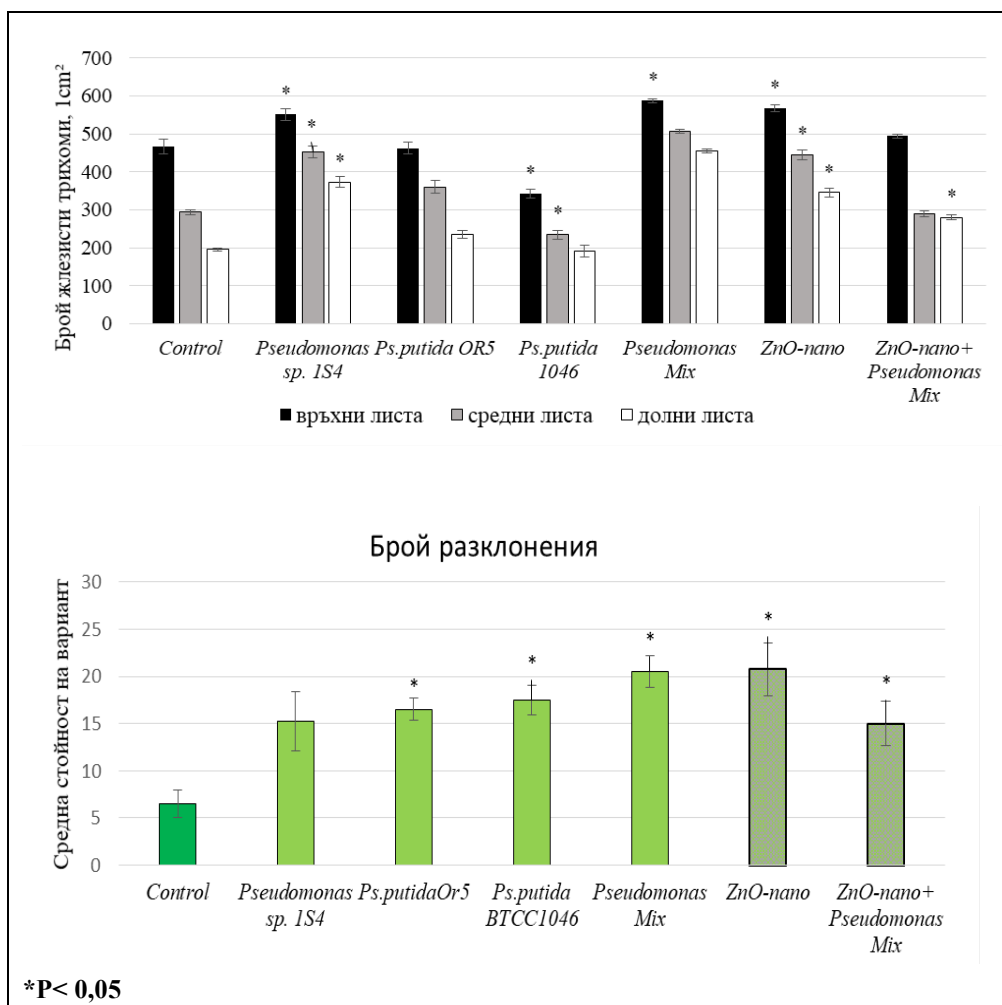
Взаимодействието между наночастиците самостоятелно и в комбинация с RGP-ризобактерии и растенията води до редица физиологични, морфологични и други промени, и тяхното разбиране е важно за ефективното приложение на нанотехнологиите при развитието на растенията.

### **8.3.2. *In vivo* оценка на действието на сухи субстанции от изследваните бактериални щамове в комбинация с наноматериали върху тест растение *Mentha piperita*.**

Съществуват проучвания, които предполагат, че наночастиците, когато се доставят в контролирана безопасна доза, могат да допринесат за насърчаване растежа и добива на растенията. Поглъщането и натрупването на наночастици от ZnO, когато се прилагат при високи концентрации, се възпрепятства, тъй като наночастиците агломерират, което не позволява навлизането им през порите на клетъчните стени. Извършени са различни изследвания за изясняване на ефекта на наночастиците от ZnO върху растежа на различни растения. Прилагайки метода на разпръскване по листата на разсад от нахут е показано, че ниски концентрации на наночастици от ZnO имат положителен ефект върху растежа на растенията и, че натрупването на биомаса се е подобрило. Полевите експерименти потвърждават, че прилагането на наночастици от ZnO при доза, която е 15 пъти по-ниска от препоръчителната доза ZnSO<sub>4</sub>, води до 29,5% по-висок добив от шушулките на нахута (Burman U. Et al., 2013). Сравними положителни ефекти на наночастици от ZnO и CeO<sub>2</sub> са наблюдавани върху качеството на плодовете на краставицата - *Cucumis sativus*. Прилагането на двете разновидности наночастици води до повишено съдържание на нишесте. (Zhao L. et al., 2014).

За проследяване въдействието на ZnO наночастици върху развитието на *Mentha piperita*, е осъществена експерименталната постановка описана в точка 12.4 от раздел материали и методи. Предварително е подготвен разсад на мента, като при образуването на втора двойка листа растенията се инокулират с разтвори на сухи субстанции от лиофилизираните щамове *Ps.putida* BTCC1046, *Ps.putida* Or5 и *Pseudomonas sp.* 1S4 в концентрация 2g/l и ZnO наночастици в концентрация 80 µg/ml. Конструирани са 6 варианта, които включват трите изследвани щама поотделно, комбинация от трите щама (*Pseudomonas mix*), ZnO наночастици и комбинация от трите щама с наноматериал - ZnO наночастици (*ZnO-nano+Pseudomonas mix*). За контрола и поливане между третиранията е използвана вода. Третиранията се извършват на всеки 10 дни, като продължителността на експеримента е до появата на съцветие при растението. В края на експеримента са отчетени брой трихоми, свежа надземна биомаса, суха надземна биомаса и биомаса на сухи листа, суха коренова биомаса. Данните са статистически обработени в MS Excel чрез TTEST. Получените резултати за вегетативното развитие на *Mentha piperita* са представени на фигура 31.

31A)

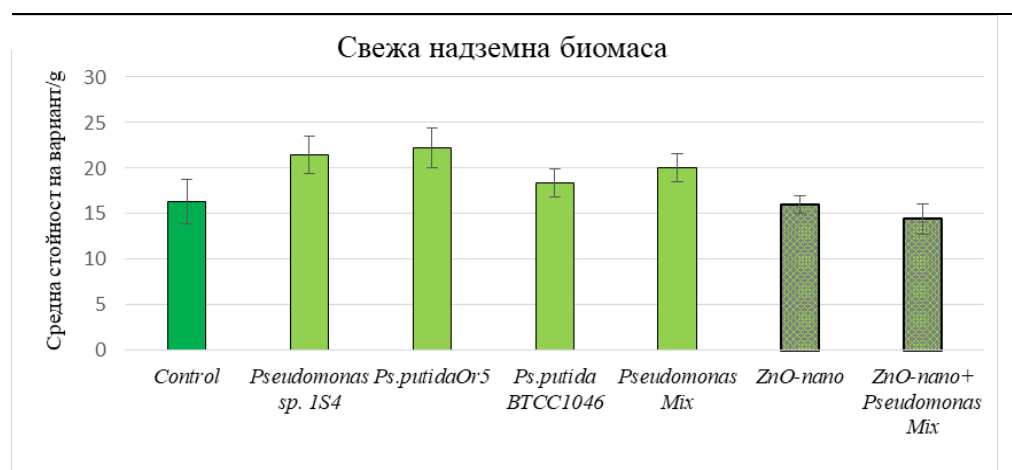


Фиг. 31 Влияние на сухи субстанции от изследваните щамове и наночастици от ZnO върху образуването на жлезисти трихоми А) и броя на разклоненията Б) при *Mentha piperita*.

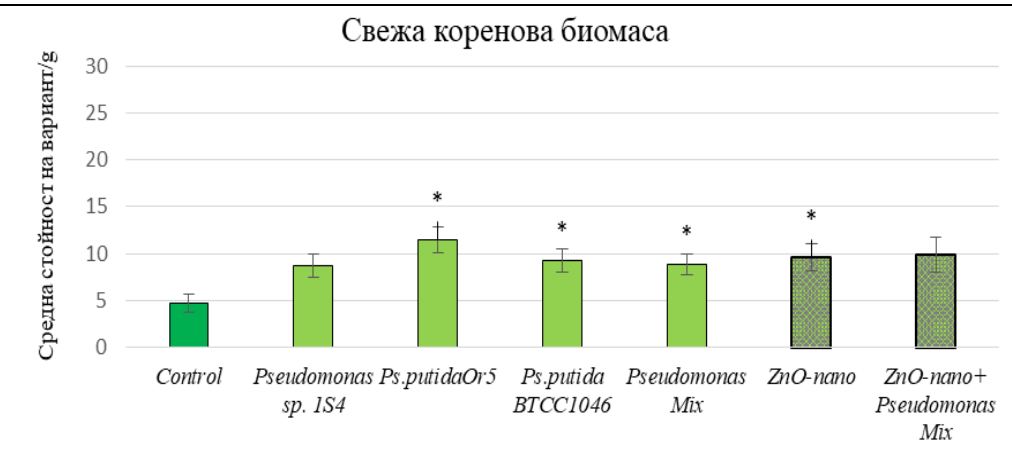
При резултатите получени за брой жлезисти трихоми (фиг. 31А) може да се отчете със статистическа достоверност, че при върхните листа на растенията третирани с *Pseudomonas* микс, *Pseudomonas sp.1S4* и наночастици от ZnO-се наблюдава около 1,5 до 2 пъти по-голям брой трихоми. Статистическа разлика в полза на ZnO наночастици и комбинацията на трите щамове се наблюдава и при броя разклонения. За разлика от прилагането им по отделно, комбинацията от наночастици с щамове от род *Pseudomonas*, показва по ниски стойности и при двата изследвани показателя.



32 А)

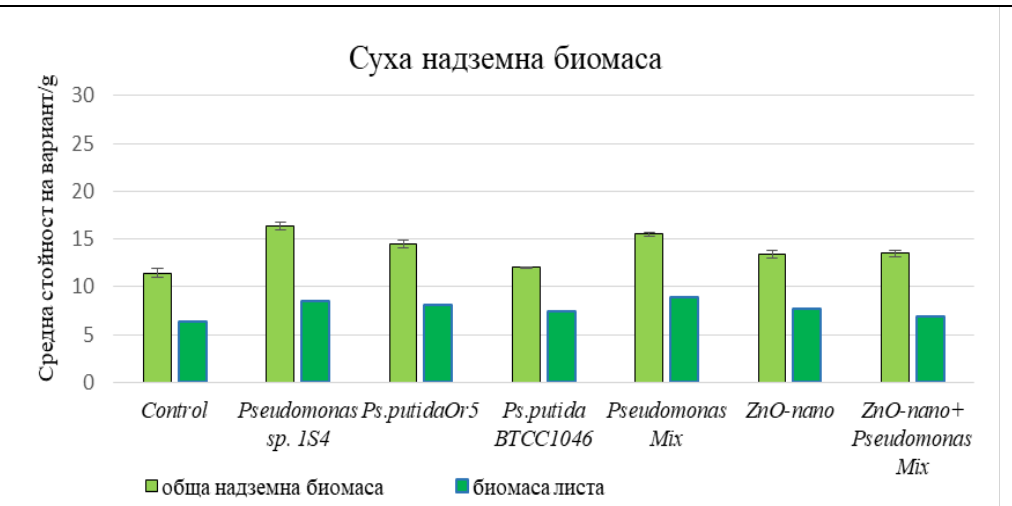


32 Б)



\*P &lt; 0,05

32 В)



Фиг.32 Влияние на сухи субстанции от изследваните щамове и наночастици от ZnO върху надземната и коренова биомаса (А,Б и В) при тест растение *Mentha piperita*.

Данните от измерванията на свежата надземна биомаса (фиг.32 А) показват положителен ефект при вариантите съдържащи изследваните щамове с изключение на тези с добавени наноматериали. Кореновата биомаса е най-добре повлияна при третиране с щам *Ps. putida Or5* (фиг. 32 Б). Отчетените резултати за сухата биомаса на листата показват, че масата им

представлява повече от 50% от общата биомаса на надземната част на растението. В листата на ментата се съдържа основната част от етерично-масления компонент на растението, което ги прави важен параметър за проследяване в настоящето изследване.

### 8.3.3 GC /FID– анализ за съдържание на основни компоненти в екстракти от листа на *Mentha piperita*.

Най-богати на етерично масло са съцветията на ментата (4-6%). В листата то достига до 2,5 % и най-малко в стъблата – 0,3-0,4%. Най-важната съставна част от ментовото масло е ментолът, който достига до 45% в някои сортове. Маслото съдържа в определени количества и ментон, лимонен, цинеол, изоментон, ментофуран, метиалцетат и др., които също се явяват, като активно действащи съставки. (Евстатиева Л., Станев С., 2015 ). За целта на експеримента са приготвени алкохолни екстракти от предварително изсушени листа на *Mentha piperita*, и анализирани чрез газ-хроматографска аналитична апаратура непосредствено след приготвянето им. Резултатите са представени на таблица 19.

Табл. 18 Съдържание на основни ментолни съединения в алкохолни екстракти на листа от *Mentha piperita*, след края на експеримента.

Вариант	Menthone ug/ml	Izomenthone ug/ml	Menthol ug/ml
Контрола	345.469	nd	345.972
<i>Ps. putida</i> 1046	516.649	nd	478.792
<i>Ps. putida</i> Or5	451.938	nd	519.048
<i>Pseudomonas sp.</i> 1S4	526.027	112.045	330.564
<i>Pseudomonas mix</i> (BTCC1046, Or5, 1S4)	433.774	108.808	402.591
ZnO nano	206.612	123.721	320.73
ZnO nano + <i>Pseuodmonas mix</i>	24.655	5.176	17.61

\*nd – не се открива

Данните получени от хроматографският анализ на алкохолен екстракт от *Mentha piperita*, при вариантите третирани с изследваните щамове показват положителен ефект за синтезата на ментолни съединения спрямо контролата. Единствено при щам *Pseudomonas sp.* 1S4, се наблюдава наличие на изоментон, което е отразено в почти същите концентрации и при комбинацията от трите изследвани щама. Получените концентрации на ментолни съединения при вариантите третирани с щам 1S4 и *Pseudomonas mix* са в корелация с установения висок брой жлезисти трихоми (Фиг.29А). С приблизително два пъти намалява

измереното количество на ментолни съединения при третирането с ZnO наночастици и с до 20 пъти (между 5 и 25  $\mu\text{g/ml}$ ) при комбинацията от цинковите наночастици с изследваните щамове. Въпреки сравнителното добро повлияване на вегетативното развитие на растението наночастиците от ZnO, повлияват негативно синтезата на ментолни съединения, във фаза, при която количеството им се очаква да достигне своя максимум. Допълнителни изследвания върху общия етеричномаслен профил на растението са необходими за доказването на токсичния ефект на ZnO наночастици върху тест растението *Mentha piperita*.

## Изводи

1. Изследваните четири ризосферни изолата са охарактеризирани физиолого-биохимично, молекулярно-генетично и са определени, като *Pseudomonas putida* Or5, *Pseudomonas taiwanensis* Or2, *Pseudomonas sp.* 1S4 и *Pseudomonas stutzeri* Rsb22. Потвърдена е видовата идентификация и на щам *Pseudomonas putida* BTCC1046
2. Щамове *Pseudomonas putida* BTCC1046, *Pseudomonas putida* Or5 и *Pseudomonas sp.* 1S4 проявяват важни за стимулиране развитието на растенията активности, като разтваряне на неорганични фосфати, изява на протеолитична и на хитинолитична активности. При двата щамата от вида *Pseudomonas putida* - BTCC1046 и Or5 е установена и способност за синтеза на сидерофори.
3. Два от изследваните щамове *Ps.putida* BTCC1046 и *Ps. taiwanensis* Or2 проявяват антагонистична активност срещу фитопатогенни бактерии от видовете *Clavibacter michiganensis* и *Xanthomonas vesicatoria*. Щам *Pseudomonas sp.* 1S4 проявява изразена антигъбна активност срещу патогенни и/или увреждащи земеделската продукция микроспорици от род *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* и *Rhizopus*.
4. Три от изследваните щамове продуцират в значими количества индол-3-оцетна киселина (IAA) - *Ps. putida* BTCC1046 - 21 µg/ml, щам *Ps. putida* Or5 – 9,05 µg/ml и щам *Ps. taiwanensis* Or2 – 2,07 µg/ml. В културалните течности на всички щамове се откриват метаболити с фитохормонална активност и от групите на гибберелини - гибберелинова киселина (GA3) и гибберелини GA4 и GA7, и цитокинини като N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (CPPU) и trans-Zeatin (TZ).
5. Определени са основни технологични параметри за получаване на активни култури от изследваните щамове с висока клетъчна плътност от 10<sup>9</sup> cfu/ml при култивирне на среда ХС3 и преживяемост в присъствие протекторна среда ПС-3.
6. Изследваните щамове повлияват развитието на тест растение *Ocimum basilicum* като повишават броя на жлезистите трихоми с 1,5 до 2 пъти във връхните листа и увеличават дължината на стъблото
7. Третирането на *Euforbia pulherrima* с моделна комбинация от изследваните щамове и хуминови субстанции води до повишаване с между 20 и 70% при различните биометрични показатели и подобряване на декоративния вид на растенията
8. При култивиране на *Ps.putida* BTCC1046, *Ps.putida* Or5 и *Pseudomonas sp.* 1S4 с наноматериалите MWCNT's и ZnO (80 µg/ml) се наблюдават добре изразени изменения в морфологията на клетките, както и намаляване на клетъчната плътност на културата при щам *Pseudomonas sp.* 1S4.

9. При третираните с наноматериали щамове се наблюдават изменения в ензимния профил, като се отчита понижаване на отделни ензимни активности и повишаване на фосфатазни и фосфохидролазни активности, които са с пряко значение за превръщането на източниците на органичен фосфор в почвата.
10. Количеството на ментолни съединения в екстракти от третирани с 80 µg/ml наночастици от ZnO в растения *Mentha piperita*, се повишава значително спрямо тези от третирани растения с комбинация от наночастици и изследваните щамове

## Приноси

1. Установени са специфични комбинации от свойства и активности при ризосферните щамове *Ps.putida* 1046, *Ps. putida* Or5 и *Pseudomonas sp.* 1S4 свързани с директни и индиректни механизми за стимулиране развитието на растенията, което е предпоставка за включването им като биоагенти в земеделските парки.
2. Доказан е инхибиторният ефект на щамове *Ps. putida* BTCC1046, *Ps. putida* Or5 и *Pseudomonas sp.* 1S4 спрямо фитопатогена *Fusarium*, което ги прави потенциални компоненти за препарати свързани с биоконтрола при растенията.
3. За пръв път е изследвано влиянието на наноматериали – въглеродни нанотръбички и наночастици от цинков оксид върху морфологията, развитието и активността на ризосферни щамове от род *Pseudomonas*.
4. Конструирани са моделни препарати включващи биоактивни щамове от род *Pseudomonas* и хуминови субстанции приложими, като биологични продукти за подобряване растежа и развитието на растенията.
5. Предложено е технологично решение за получаване на бактериални препарати с биоактивни щамове от р. *Pseudomonas*.

## СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ

### Публикации в реферирани научни списания

1. Georgieva, T., Nikolova, D., Evstatieva, Y., Licheva, T., & Savov, V. (2014). Growth characteristics of *Pseudomonas putida* strains and effect of humic substances on cell density during batch cultivation. *Bulgarian J Agricult Sci*, 20, 82-86. [SJR 0.197 \(Q3\)](#)
2. Georgieva, T., Evstatieva, Y., Savov, V., Bratkova, S., & Nikolova, D. (2018). Assessment of plant growth promoting activities of five rhizospheric *Pseudomonas* strains. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 285-292. [SJR 0,497\(Q2\)](#);

### Публикации в сборник

V. Savov, T.Georgieva, Y.Evstatieva, D.Nikolova (2018). Effect of humic substances on bacterial growth of rhizosphere *Pseudomonas* strains and their impact on plants. 19<sup>th</sup> International conference of International Humic Substances Society. Humic substances and their contribution to the climate change mitigation, 317-318.

## УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1.Georgieva T., Evstatieva Y., Nikolova D., Tropcheva R., Savov V., Antifungal activity of plant-growth promoting rhizobacterial strains, 43rd Annual Meeting Of The Plant Growth Regulation Society Of America, Raleigh, North Carolina, USA 2016.

2. Georgieva T., Evstatieva Y., Nikolova D., Tropcheva R., Savov V., Plant-growth promoting bacteria for antifungal biocontrol activities., Първа национална докторантска конференция по Биология, 2016 г., България/Пловдив 2016.

3. Teodora Georgieva, Yana Evstatieva, Dilyana Nikolova, Valentin Savov , Plant growth promoting effects of *Pseudomonas putida* strains, Младежка научна конференция “Климентови дни” 17-18 ноември, 2016 г., София, България 2016.

4.Georgieva T., Metodieva Ts., Again N., Angelova G., Popova T., Chakalov K., Savov V. Comparative study of the efficacy of chemically and biologically extracted humic substances from various materials on the development of Poinsettia, EGU General Assembly 24-28 April 2017, Vienna, Austria.

5. Georgieva T., Evstatieva Y., Nikolova D., Tosheva A.,Savov V. Effects of *Pseudomonas* strains on plant growth promotion and distribution of trichomes in selected aromatic plants – *Ocimum basilicum* and *Mentha piperita*, 4-th Balkan scientific conference on Biology, 1-3November 2017, Plovdiv, Bulgaria.

6. Teodora Georgieva, Nikola Atanasov, Yana Evstatieva, Dilyana Nikolova , Optimization of growth medium for high cell density cultivation of rhizospheric *Pseudomonas* strains, Младежка научна конференция “Климентови дни” 16-17 ноември, 2017,София, България.

7. Georgieva T., Evstatieva Y., Nikolova D., Georgieva V., Savov V. "Study of bacterial rhizosphere strains as biocontrol agents". International Scientific Symposium "Current trends in natural sciences" 19-21 April, 2018, Pitesti, Romania.

8. T. Georgieva, Y. Evstatieva, D. Nikolova, V. Savov. Effect of MWCNT's and ZnO nanoparticles on the growth of PGP-*Pseudomonas strains*. International Scientific Conference "Kliment's Days", 8-9 November 2018, Sofia, Bulgaria.

## **УЧАСТИЕ В ПРОЕКТИ**

1. Проект на MOMH: ДПМ НФ № 01/47 21.04.2017 г. Съфинансиране на международен научен форум на тема: Младежка научна конференция с международно участие "Климентови дни 2017".

2. Проект на СУ (финансиране на докторанти) Договор №80.10-108/ 21.04.2017 г. Проект за научни изследвания на тема: Изследване фитохормоналната активност на ризосферни изолати от род *Pseudomonas*. Ръководител на проекта доц. д-р Диляна Николова.

3. Проект на СУ (финансиране на докторанти) Договор №80-10-53/17.04.2018. Изследване влиянието на наноматериали върху ризосферни представители от род *Pseudomonas* и проследяване на ефекта им при растения. Ръководител на проекта доц. д-р Диляна Николова.

## **ЦИТИРАНИЯ НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ**

### **Цитирана публикация:**

Georgieva, T., Nikolova, D., Evstatieva, Y., Licheva, T., & Savov, V. (2014). Growth characteristics of *Pseudomonas putida* strains and effect of humic substances on cell density during batch cultivation. *Bulgarian J Agricult Sci*, 20, 82-86.

### **Цитирана от:**

Mulakhudair, A. R., Al-Mashhadani, M., Hanotu, J., & Zimmerman, W. (2017). Inactivation combined with cell lysis of *Pseudomonas putida* using a low pressure carbon dioxide microbubble technology. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(8), 1961-1969

### **Цитирана публикация:**

Georgieva, T., Evstatieva, Y., Savov, V., Bratkova, S., & Nikolova, D. (2018). Assessment of plant growth promoting activities of five rhizospheric *Pseudomonas* strains. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 285-292.

### **Цитирана от:**

Singh, S., Kumar, V., Sidhu, G. K., Datta, S., Dhanjal, D. S., Koul, B., ... & Singh, J. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria from heavy metal contaminated soil promote growth attributes of *Pisum sativum* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.

## **Изследване фитохормоналната активност на щамове от род *Pseudomonas* и конструиране на бионаноформули за подобряване продуктивността на растенията.**

***Теодора Владимирова Георгиева***

*В настоящата дисертационна работа е сформирана група от потенциално значими щамове от род *Pseudomonas*, които са охарактеризирани чрез физиологични, биохимични и молекулярно –генетични подходи.. Доказването на директните и индиректни активности на работните щамове чрез изследване на сидерофорна активност, усвояване на неорганични фосфати, антимикробна и антигъбна активности доведе до тяхното определяне, като ризобактерии подобряващи развитието на растенията (PGPR). Именно „plant growth promoting“- потенциала на микроорганизмите е един от факторите насочващи към разработване на устойчиви стратегии за контролиране развитието на различни растителни култури и управлението на почвените системи. Оптимизирането на някои параметри на култивиране доведе до получаване на високоплътностни активни култури и определяне на биосинтетична активност по отношение на вещества с регулаторни свойства. Проведените изследвания насочени към придобиване на нови знания и умения за работа с наноматериали, както и комбинирането им заедно с ризосферни микроорганизми представители на род *Pseudomonas*, и приложението им върху растения представлява принос за развитието на нанобиотехнологиите в растениевъдството. Взаимодействието на наночастиците с растенията води до редица физиологични и морфологични промени, и тяхното разбиране е важно за ефективното използване на нанотехнологиите в селското стопанство. Получените резултати в резултат от проведеното мащабиране на процесите на култивиране и запазване активността на изследваните щамове, представляват основа за развитието на ново технологично решение за производството на комплексни препарати с приложение в биологичното земеделие.*



## **Study of the *Pseudomonas* strains phytohormone production activity and construction of bio-nano formulations for plant growth promoting.**

*Teodora Vladimirova Georgieva*

A group of potentially significant strains of the genus *Pseudomonas* characterized by physiological, biochemical and molecular approaches, has been identified. The demonstration of direct and indirect activities of the working strains through siderophore activity, phosphate solubilisation, antimicrobial and antifungal activities have led to their identification as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). The application of a combination of different strains as bioagents with various plant growth promotion effects is more effective. Therefore, the investigated *Pseudomonas* strains demonstrate the potential to be used in agriculture as bioagents. The optimization of batch cultivation parameters resulted in high cell density of the selected strains. Fed-batch cultures are the standard operating mode for achieving high productivity of different secondary metabolites and bioproducts.

The research conducted to acquire recent knowledge and skills for working with nanomaterials as well as together with rhizosphere *Pseudomonas* strains and their application to plants. The interaction of nanoparticles with plants results in several physiological and morphological changes and their understanding is important for the effective use of nanotechnology in sustainable agriculture.

The results obtained from cultivation processes and the preservation of the activity of the strains studied represent the development of a current technological solution for the production of complex preparations applied in agriculture.