

СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“

Биологически факултет

Катедра „Екология и опазване на околната среда“

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен

„доктор“

по професионално направление 4.3. Биологически науки

(Екология и опазване на екосистемите – Екология на микроорганизмите)

МИХАЕЛА РУМЕНОВА АЛЕКСОВА

**Микробиологична оценка на резистентността и
устойчивостта на почви, третирани с фунгицида
азоксистробин**

Научни ръководители:

Доц. д-р Анелия КЕНАРОВА

Доц. д-р Галина РАДЕВА

София, 2019 г.

Дисертационният труд е написан на 227 страници и включва 128 фигури, 17 таблици и 3 приложения (20 фигури). В библиографския списък са цитирани 220 литературни източника.

Експерименталната работа е извършена в катедра „Екология и опазване на околната среда“ към Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“ и секция „Регулация на генната активност“ към Институт по молекулярна биология „Акад. Р. Цанев“, БАН.

Дисертационният труд е обсъден и приет за защита на заседание в разширен състав на катедра „Екология и опазване на околната среда“ към Биологическия факултет, СУ „Св. Климент Охридски“, проведено на 09. 12. 2019 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 2020 г. от часа в Заседателната зала на Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“, бул. „Драган Цанков“ № 8.

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

БАБХ – Българска Агенция по Безопасност на Храните

ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина

ЕС – Европейски съюз

ИАОС - Изпълнителната агенция по околна среда

МЗХ – Министерство на земеделието и храните

МПБ - Месопептонен бульон

рДНК - Рибозомална ДНК

16S рДНК - 16 Svedberg рибозомална ДНК

ARDRA - Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

АТСС - American Type Culture Collection

AWCD – Average Well Color Development

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

BSA - албумин от телешки серум (Bovine Serum Albumin)

ССА – Каноничен корелационен анализ (Canonical Correlation Analysis)

CLPP – Community Level Physiological Profile

DGGE - Denaturing – gradient gel electrophoresis

dNTP – Дезоксирибонуклеотидтрифосфати

EDTA - Етилен диаминоетраацетат

EFSA – European Food Safety Authority

EPA - Environmental Protection Agency

FRAC - Fungicide Resistance Action Committee

INT - i2-p-йодофенил-3-p-нитрофенил-5- фенилтетразолиев хлорид (2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyltetrazolium chloride)

IPTG - Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

ITS - транскрибиран спейсърен участък (Internal Transcriber Spacer)

LB - Luria- Bertani

NCBI – National Center for Biotechnology and Information

NGS - Next – generation sequencing

NMDS - non-metric multidimensional scaling

OD – оптична плътност (optical density)

OTUs - операционно – таксономични единици (operational taxonomic units)

PCA – Principal componential Analysis (принципен компонентен анализ)

PCR - Полимеразна Верижна Реакция (Polymerase Chain Reaction)

pNP - p-нитрофенил

pNPG - p-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид

QoI - Quinone outside Inhibitors

RDP - Ribosomal Database Project

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

RISA - Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

SDHI - сукцинат - дехидрогеназната активност

TBE - Трис-боратен-EDTA

TE – Трис-EDTA

T-RFLP - Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

UV - Ултравioletова светлина

X-gal - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

УВОД

Защитата на земеделските култури от болести и вредители се е превърнала в ключов компонент на съвременното интензивно селско стопанство, чиято цел са високите добиви. Положителната роля на пестицидите в растителната защита е неоспорима, макар да е известно, че те могат да причинят различни нежелани ефекти, като изграждане на резистентност към вредители, замърсяване на околната среда, опасност за здравето на човека, да предизвикат вредни въздействия върху нецелеви групи – флора, фауна и различни видове организми.

Сегашните правила на Европейския съюз (ЕС) за работа с пестициди гарантират, че в ЕС се одобряват само безвредни активни вещества и продукти за растителна защита, които могат да се използват безопасно. Тези правила, също така, насърчават използването на активни вещества с естествен произход и нисък риск, и изискват предприемане на мерки, които да гарантират устойчивата употреба на пестицидите.

Интензивното развитие на земеделието в Р. България е свързано с все по-широко използване на препарати за растителна защита (пестициди), както и торове за увеличаване на селскостопанските добиви от единица обработваема площ. Нарастващото потребление на пестициди, и в частност на фунгициди, увеличава риска от възникване на негативни ефекти върху почвените микробни съобщества и инхибиране на биологичната трансформация на веществата в агроecosystemите.

Един от най-често прилаганите, сравнително нови синтетични препарати е системният фунгицид азоксистробин, принадлежащ към стробилуриновите фунгициди. Азоксистробинът е широкоспектърен фунгицид с действие срещу основните фитопатогени по растенията - представители от типовете *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Deuteromycota* и *Oomycota*. Действието му е насочено към контролиране на широк спектър от гъбични заболявания, включително заболявания като мана, брашнеста мана, гниене на плодовете, ръжда и други. Използва се и при различни култури – зърнени и полски култури, плодове, зеленчуци и други. От друга страна, неселективният характер на механизма на действие на фунгицида предполага инхибиращи ефекти не само върху фитопатогенните гъби, но и върху естествените гъбни обитатели на почвата. Допълнително неговата употреба може да доведе и до промени в нецелевите групи микроорганизми – каквито са например бактериите. Както е известно, почвените микроорганизми са важни за хомеостаза в почвата и имат силно въздействие върху растежа на растенията и

добивите от селскостопанските култури, следователно установяването на ефекта на азоксистробина върху микробните съобщества е от решаващо значение за дългосрочната устойчивост на агроecosистемите.

Научните изследвания върху ефекта на азоксистробина или друг фунгицид от групата на стробилурините се концентрират основно върху селекцията на активни биодеградатори на азоксистробина и промяната във видовото разнообразие на почвените микробни съобщества. В научната литература липсват изследвания, които да прилагат комплексен подход за изучаване ефекта на азоксистробина или друг фунгицид върху почвените микробни съобщества. За да запълни липсващите знания, настоящият дисертационен труд прилага комплексен подход като използва микробиологични, биохимични и молекулярно-генетични методи, за да установи влиянието на азоксистробина върху структурата и функциите на микробните съобщества в два типа почви чрез конструиране на почвени мезокосмоси. Получените резултати показват, че азоксистробинът води до резистентност на бактериалните съобщества към антибиотици, използвани в клиничната практика и оказва въздействие върху ензимната и метаболитна активности, както и върху структурата на микробните съобщества. Силата и продължителността на ефектите са различни и са зависими от дозата и типа на почвата, в която се прилага препаратът. При използването на фунгицида в селскостопанската практика трябва да се обръща внимание на правилната употреба и дозата на прилагане, тъй като азоксистробинът е устойчив в почвата.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертационна работа е да се оцени влиянието на фунгицида азоксистробин, приложен в нарастващи концентрации върху функциите и структурата на микробните съобщества от пясъчлива и глинесто пясъчлива почви съобразно времето на експозиция.

За постигане на целта са поставени следните задачи:

1. Да се определят промените във физико – химичните характеристики на почвата, в резултат от прилагането на азоксистробина
2. Да се определи динамиката на разграждане на азоксистробина в почвените мезокосмоси
3. Да се определи ефектът на въздействие на азоксистробина върху ензимните активности на почвените микробни съобщества
4. Да се определи потенциала на азоксистробина да предизвиква резистентност към използвани в хуманната медицина антибиотици
5. Да се определи въздействието на азоксистробина върху метаболитния профил на почвените бактериални съобщества
6. Да се проследят промените в структурата на почвените микробни съобщества в отговор на нарастващите концентрации на азоксистробина
 - 6.А. Да се определи разнообразието на бактериалните съобщества на базата на промени в профилите на 16S rPHK гена
 - 6.Б. Да се определи разнообразието на гъбните съобщества на базата на вътрешния транскрибиран спейсърен регион (ITS)
7. Да се установят промените в обилието на бактерии на базата на количествено определяне на копията на 16S rPHK гена.
8. Да се определят промените в таксономичния профил на почвените микробни съобщества
 8. А. Конструране на 16S рДНК клонови библиотеки от двата типа почва
 8. Б. Конструране на ITS клонови библиотеки от двата типа почва
9. Сравняване на отговорите на почвените микробни съобщества към въздействието на азоксистробина в зависимост от типа и характеристиките на почвата

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали

1. Хранителни среди
2. Използвани праймери

Методи

1. Пробонабиране

За подготовката на мезокосмосите са избрани почви с различен механичен състав (песъчлива и глинесто песъчлива почви) и липса на замърсяване с тежки метали и пестициди по данни на Изпълнителната агенция по околна среда (ИАОС).

2. Конструирание на почвени мезокосмоси

Конструирани са почвени мезокосмоси със съответната концентрация на фунгицидния препарат Quadris^R, преизчислена спрямо активния компонент азоксистробин (**0.28 mg/kg** (работна доза, отбелязано в работата като Az1); **14.46 mg/kg** (Az2); **28.93 mg/kg** (Az3)). За всеки тип почва (песъчлива (LS) и глинесто песъчлива (CL)) е подготвен и контролен мезокосмос с незамърсена почва (Az0).

От почвените мезокосмоси са взимани почвени проби за анализ на 24-тия час (D1), 30-тия (D30), 60-тия (D60), 90-тия (D90) и 120-тия (D120) ден.

3. Химични анализи

3.1. Механичен състав на почвите

3.2. рН и електропроводимост на почвите

3.3. Съдържание на влага в почвите

3.4. Определяне на остатъчни концентрации на азоксистробин

в почвата

3.5. Концентрация на неорганични йони

3.5.1. Нитратен азот

3.5.2. Амониев азот

3.5.3. Фосфатен фосфор

4. Микробиологични анализи

4.1. Почвени ензимни активности

4.1.1. Дехидрогеназна активност

4.1.2. Бета-глюкозидазна активност

4.1.3. Уреазна активност

4.1.4. Фосфатазна активност

4.1.5. Арилсуфатазна активност

4.2. Метаболитен профил на почвените бактериални съобщества

4.3. Антибиотична резистентност

4.4. Култивиране на биодеградатори на азоксистробина

4.4.1. Бактерии

Култивирането на бактерии от почва е извършено в течна селективна хранителна среда (VL55 (ATCC; N: 2734). За всяка почвена проба са подготвени по две серии от колби: само посев в хранителна среда и посев в хранителна среда със съдържание на азоксистробин (8.98 mg kg^{-1}).

4.4.2. Гъби

Култивирането на гъби е извършено върху твърда селективна хранителна среда (среда на Чапек (CM; ATCC N: 312).

Получените бактериална и гъбна биомаси от култивирането в съответните селективни хранителни среди са използвани за определяне на видовото разнообразие на резистентните видове чрез молекулярно – генетични методи.

5. Молекулярно – генетични анализи за определяне на биоразнообразието в почвените микробни съобщества

5.1. Определяне на биоразнообразието в почвените бактериални съобщества

5.1.1. Екстрахиране на метагеномна ДНК изолирана от бактериална биомаса

5.1.2. PCR амплификация на бактериална метагеномна ДНК

Метагеномните ДНК-и са амплифицирани в подходящи разреждания с използването на двойката бактериални праймери специфичен 16S 8F и универсален 16S 1513R.

5.1.3. ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) анализ на бактериалните съобщества

5.2. Определяне на биоразнообразието в почвените гъбни съобщества

5.2.1. Екстрахиране на метагеномна ДНК изолирана от гъбна биомаса

5.2.2. PCR амплификация на гъбна метагеномна ДНК

Почвените тотални ДНК-и са амплифицирани в подходящи разреждания с използването на двойката праймери ITS1 и ITS4, които амплифицират вътрешния транскрибиран спейсърен участък (ITS) на

гъбния рибозомален ген, както и съседния 5.8S рРНК ген, като получените фрагменти са с дължина около 700 bp (White et al., 1990).

5.2.3. ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) анализ на гъбните съобщества

6. Молекулярно – генетични анализи за определяне на структурата на почвените микробни съобщества

6.1. Екстрахиране на метагеномна ДНК от почва

6.2. Приготвяне на компетентни клетки от щам *E. coli* TOP 10F` (Invitrogen)

6.3. Конструирание на 16S рДНК клонови библиотеки

6.3.1. PCR амплификация на метагеномна ДНК с

бактериални праймери

6.3.2. Клонирание на ДНК фрагмент с TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)

6.3.3. Трансформация в компетентни клетки *E. coli* TOP10F`

6.3.4. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) анализ на 16S рДНК клоновата библиотека

6.3.5. Секвениране и филогенетичен анализ на 16S рДНК последователностите

6.4. Конструирание на ITS клонови библиотеки

6.4.1. PCR амплификация на метагеномна ДНК с двойката праймери ITS1 и ITS4

6.4.2. Клонирание на ДНК фрагмент с TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)

6.4.3. Трансформация в компетентни клетки *E. coli* TOP10F`

6.4.4. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) анализ на ITS клоновата библиотека

6.4.5. Секвениране и филогенетичен анализ на ITS последователностите

7. Определяне на обилието на бактериалните съобщества чрез количествен PCR анализ

8. Статистическа обработка на резултатите

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Съществуват, макар и не много, данни за влиянието на азоксистробина върху почвените микробни съобщества. Според тях поради механизма му на действие, азоксистробинът няма селективен ефект само върху гъбните фитопатогени, а повлиява и редица почвени гъби с благоприятен ефект върху физико-химичния статус на почвата. Допълнително са установени и странични ефекти върху нетаргетни групи организми като бактерии, археи, едноклетъчни и нематоди. Всички тези изследвания съдържат противоречива информация, чието противоречие се диктува от концентрацията на фунгицида и формата под която е въведен в почвата, характеристиката на почвата, начинът на провеждане на изследването и редица други фактори. В настоящото изследване са комбинирани голяма част от тези фактори, за да може да се получи поцялостна картина на ефектите на азоксистробина върху почвените микробни съобщества.

1. Характеристика на средата

Една от хипотезите на изследването е, че азоксистробинът променя средата и това може да повлияе индиректно върху състоянието на почвените микробни съобщества. За да се отчете наличието или отсъствието на подобен ефект са изследвани редица почвени характеристики, които имат съществено значение за физиологията, метаболизма и структурата на почвените микроорганизми.

1.1. Механичен състав на изследваните почви

Определен е механичният състав на изследваните почви, тъй като той е съществен както за съдбата на попадналия в почвата фунгицид, така и за състоянието на почвените микробни съобщества.

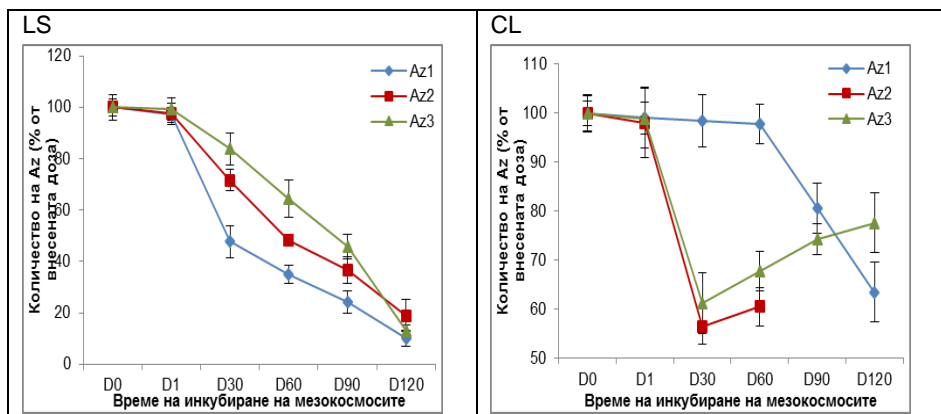
Почвите са определени като пясъчлива - с доминираща фракция от пясъчни частици, и глинесто пясъчлива - с почти равномерно разпределение на трите агрегатни фракции. Предполага се, че тази огромна разлика в механичния състав на почвите ще повлияе ефектите на азоксистробина върху почвените микробните съобщества, както и тяхната способност да компенсират частично или напълно въздействията.

1.2. Остатъчни количества на азоксистробин в почвата

Остатъчните количества на азоксистробин в почвата са определени с цел да се проследят зависимостите между тях и регистрираните реакции отговор на микробните съобщества. Динамиката на остатъчните количества на азоксистробина в почвите в съответствие с използваната доза е представена на фиг. 1.

Резултатите на фиг. 1LS показват, че в песъчливата почва, профилът на разграждане на азоксистробина и при трите използвани концентрации е еднотипен. Остатъчните количества постепенно намаляват във времето, като скоростта на процеса е зависим от приложената доза. По-бавно намаляват във времето високите дози и това е очаквано поради интоксикационния ефект на агрохимикала.

В глинесто песъчливата почва (фиг. 1CL) динамиката на разграждане на азоксистробина на работната доза (Az1) се отличава коренно от тази на останалите две използвани в експеримента дози. При работната доза съдържанието на фунгицида не се променя за много дълъг период - до 60-тия ден. Силно впечатление от резултатите на фиг. 1, прави че при Az2 и Az3 има драстичен спад в периода D1 – D30 и след това започва покачване.



Фиг. 1. Остатъчни количества на азоксистробин в песъчлива (LS) и глинесто песъчлива (CL) почви.

Намаляването на азоксистробина се приема, че се дължи по-скоро на процеси на биологично разграждане, тъй като при лабораторните условия са намалени до минимум фотолизата (култивира се на тъмно), оттока (култивира се в съдове) и изпарението (стаяна температура около 22 – 25 °C). Микробиологичното разграждане е сред основните процеси на разграждане на фунгициди в почвата. Според литературни данни, дори най-стабилните съединения се трансформират от микроорганизмите до по-малко токсични форми (Bending et al., 2007).

За да се оцени устойчивостта на азоксистробина в почвата са изчислени времената за разграждане на азоксистробина с 50% (DT50) и 90% (DT90). Резултатите от анализа показват, че времето за достигане на

DT50 в пясъчлива почва е съответно 38.5 (Az1), 68.0 (Az2) и 86.0 (Az3) дни, докато за 90% намаляване на съдържанието на азоксистробин в почвата са необходими съответно 115.9 (Az1), 191.9 (Az2) и 230.3 (Az3) дни. При изчисляването на DT50 и DT90 в глинесто пясъчлива почва се получиха достоверни резултати само за Az1. Резултатите показаха, че за намаляване на 50% (DT50) на съдържанието в глинесто пясъчливата почва на работната концентрация на азоксистробин (Az1) са необходими 346.6 дни, докато за 90% (DT90) намаляване – 1151.3 дни.

Според EPA (<http://www.epa.gov/pesticides/about/types.html>) времето на полуразпад е мярка за скоростта, с която пестицидът се разгражда в почвата или вода. В зависимост от техния полуживот, за пестицидите се определят различни нива на устойчивост на почвата, вариращи от ниска персистентност (полуживот <30 дни) до много висока устойчивост (полуживот > 100 дни). Резултатите от анализа показват, че азоксистробинът е с много висока устойчивост, дори и при най-ниската изследвана концентрация.

При сравняване на двата типа почви може да се каже, че азоксистробинът, приложен дори в работна концентрация (0.28 mg/kg), е много по – устойчив в глинесто пясъчлива почва. В края на експеримента – на 120-тия ден, количеството на азоксистробин в пясъчливата почва е изчерпано почти на 90%, докато в глинесто пясъчливата почва съдържанието му е повече от 60% от първоначално внесената концентрация в почвата. Резултатите от анализа показват, че времето за разграждане на 50% и 90% на азоксистробин в глинесто пясъчливата почва е приблизително 10 пъти повече, в сравнение с пясъчливата почва.

1.3. Промени в стойностите на почвеното pH

И двата типа почви са с кисело (пясъчлива) до слабо кисело (глинесто пясъчлива) pH. Средната стойност на pH на нетретираната с азоксистробин пясъчлива почва е 5.87 ± 0.42 , а на глинесто пясъчливата - 6.99 ± 0.08 . Добавянето на азоксистробин към пясъчливата почва довежда до намаляване на средните стойности на pH, като ефектът е статистически незначим. При глинесто пясъчливата почва също се регистрира понижаване в стойностите на pH след добавяне на азоксистробин, но ефектът е значително по-слаб. Разликата в стойностите на pH може да се отдаде на по-големия буферен капацитет на глинестата почва, свързан с по-голямото съдържание на мъртва органична материя и бази за свързване на йоните.

1.4. Електропроводимост на почвата

В настоящото изследване, електропроводимостта се използва като косвен показател за оценка на промяната, която протича в почвените разтвори на третираните с азоксистробин почви в сравнение с контролата. Резултатите от сравнителния анализ показват, че средните стойности на електропроводимостта в пясъчливата и глинесто пясъчливата почви, нетретиран с фунгицида, са съответно 1731 $\mu\text{S}/\text{cm}$ и 1821 $\mu\text{S}/\text{cm}$. В третираната с азоксистробин пясъчлива почва електропроводимостта варира от 1591 $\mu\text{S}/\text{cm}$ до 1772 $\mu\text{S}/\text{cm}$, а в глинесто пясъчливата почва – от 1761 $\mu\text{S}/\text{cm}$ до 1816 $\mu\text{S}/\text{cm}$. И при двата типа почви не се регистрират големи отклонения от контролата.

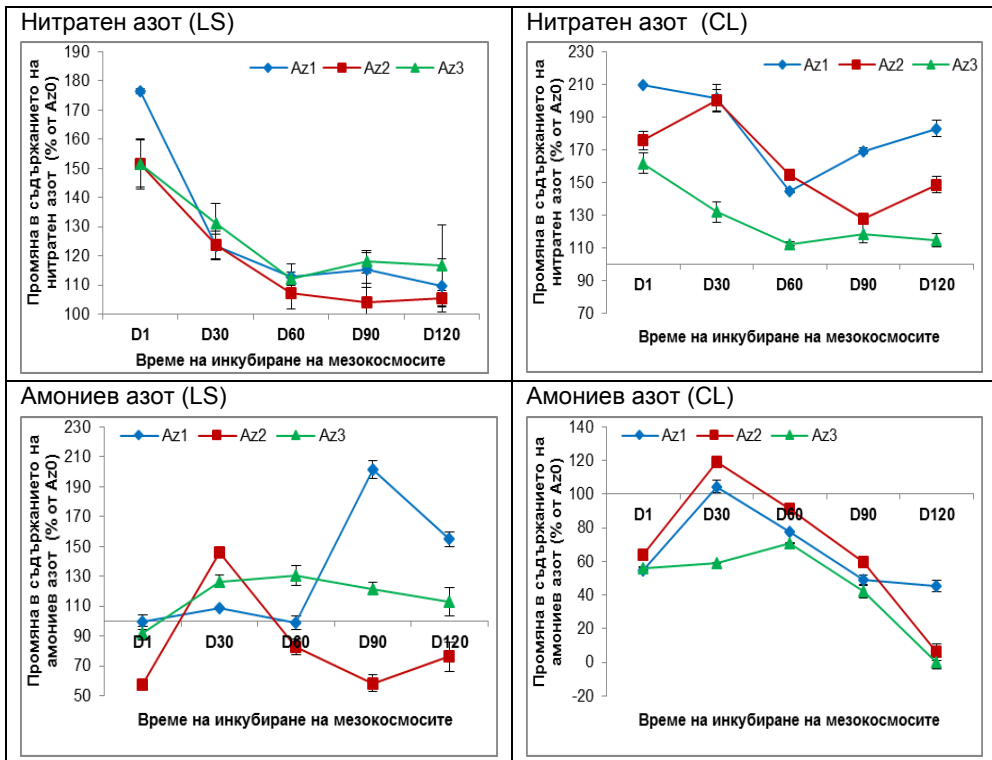
1.5. Съдържание на органичен въглерод и общ азот в почвите

Съдържанието на органичен въглерод в пясъчливата почва в началото на експеримента е 15.7 g/kg, а това в глинесто пясъчливата почва – 23.4 g/kg. Общото количество азот също е по-високо в глинесто пясъчливата почва (2.64 g/kg) в сравнение с пясъчливата почва (1.67 g/kg) и то както органичния въглерод не се променя значимо по време на експеримента. Предполага се, че по-високото количество на органична материя в глинесто пясъчливата почва ще рефлектира върху по-високата сорбция (Singh and Singh, 2010) на азоксистробина и по-ниската му токсичност (Bending et al., 2006). Не са регистрирани значими промени в стойностите на органичния въглерод по време на инкубиране на почвените мезокосмоси.

1.6. Съдържание на неорганичен азот в почвите

От неорганичните форми на азот в почвите е проследено съдържанието на нитратен и амониев азот. Неорганичният азот преобладава под формата на нитрати.

Промените в съдържанието на нитратен и амониев азот по време на инкубиране на мезокосмосите е представено на фиг. 2. като процент от съответната контрола. Резултатите показват, че внасянето на азоксистробин предизвиква повишаване на концентрациите на нитратен азот и в двата типа почви, като най-силно този ефект е изявен при най-ниската концентрация на фунгицида. И при двата типа почви, концентрацията на нитратния азот спада във времето и се доближава до тази на контролните мезокосмоси. В пясъчливата почва няма ясно изразена тенденция в промяната на амониевите йони. В глинесто пясъчливата почва е регистрирана тенденция на намаляване на съдържанието на амониеви йони с удължаване на времето на инкубиране на мезокосмосите.

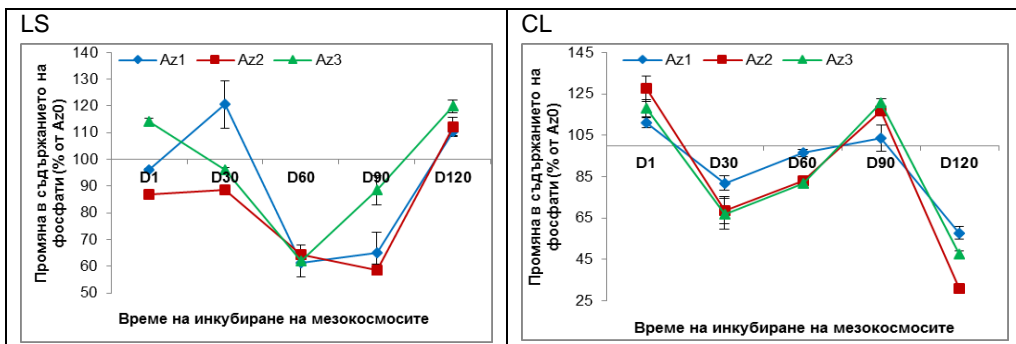


Фиг. 2. Съдържание на нитратен и амониев азот в третираните с Az пясъчлива (LS) и глинесто пясъчлива (CL) почви.

1.7. Съдържание на фосфати в почвите

Фосфорът е вторият важен ключов елемент след азот като минерален хранителен ресурс за почвените микроорганизми и растенията.

Динамиката на фосфатите в двата типа почви е представена на фиг. 3, като съдържание на неорганични фосфати е изчислено като процент спрямо контролата за всеки тип почва. Резултатите показват, че добавянето на азоксистробин към почвите не променя значимо съдържанието на фосфати в тях, както и тенденцията на тяхната промяна в зависимост от приложената доза на фунгицида.



Фиг.3. Съдържание на неорганични фосфати в третираните с Az пясъчлива (LS) и глинесто пясъчлива (CL) почви.

2. Въздействие на азоксистробина върху функционалните характеристики на почвените микробни съобщества

В дисертацията са изследвани някои аспекти на въздействието на азоксистробина върху функциите на почвените микробни съобщества – промени в активността на ензими участващи в кръговрата на веществата, селекция на резистентни бактерии към клинично значими антибиотици (КЗА) и промени в метаболитния профил на почвените бактериални съобщества. Всеки един от тези микробни показатели може да отговори дали азоксистробина проявява токсичност спрямо почвените микроорганизми и до каква степен засяга функционалните характеристики на техните съобщества.

2.1. Промени в ензимната активност на почвените микроорганизми

Изследванията на почвените ензими дават информация за степента на биогеохимична трансформация на въглеродните и други хранителни вещества, както и за функциите на микробната съобщества в пространството и времето. Тези анализи много добре могат да покажат наличие на интоксикация в почвените микробни съобщества (гъбни и бактериални) след попадане на различни замърсители в почвата.

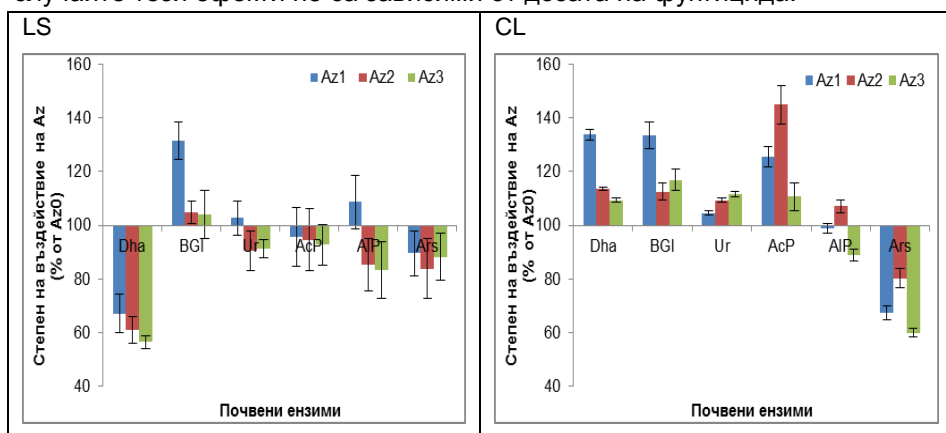
В настоящото изследване са анализирани активностите на почвени ензими, участващи в трансформацията на въглеродни, азотни, фосфорни и серни съединения и е направена оценка на тяхната активност в резултат на въздействие с нарастващи концентрации на азоксистробин.

В пясъчливата почва са регистрирани преобладаващо отрицателни до липса на ефекти на азоксистробина върху почвените ензимни активности (фиг. 4.). При повечето ензими наблюдаваните

ефекти са статистически значими при Az2 и Az3, но дехидрогеназата се инхибира значимо дори и при Az1. Най-силен негативен ефект на азоксистробина, независимо от приложената доза, се регистрира върху почвената дехидрогеназа.

Препоръчаната от производителя доза (0.28 mg/kg) стимулира почвените ензимни активности с изключение на дехидрогеназата, киселата фосфатаза и арилсулфатазата, но стимулирането е статистически значимо (над 30%) единствено при бета-глюкозидазата.

Замърсяването на глинесто пясъчливата почва с азоксистробин предизвиква в по-висока степен стимулиращи ефекти върху почвените ензими, с изключение на арилсулфатазата (фиг. 4.). В повечето от случаите тези ефекти не са зависими от дозата на фунгицида.

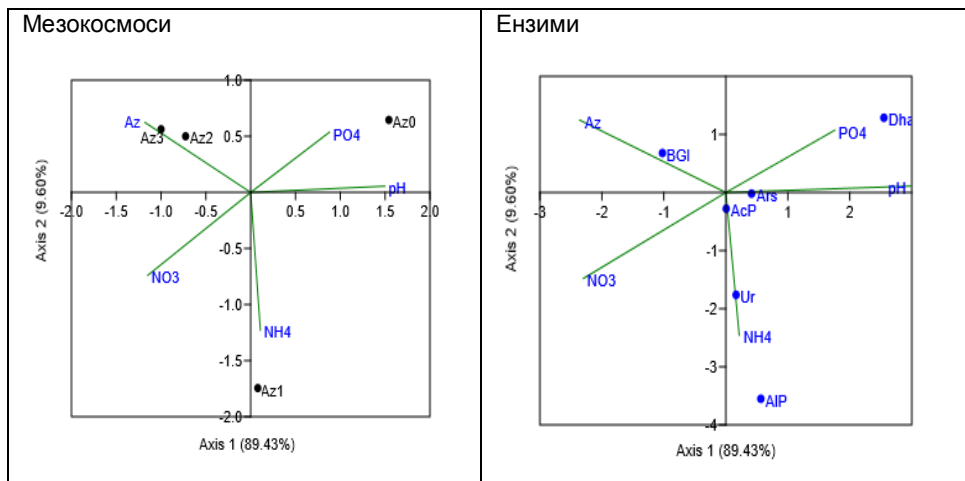


Фиг. 4. Ефекти на азоксистробина (Az1 – Az3) върху ензимна активност на почвените микробни съобщества в пясъчлива (LS) и глинесто пясъчлива (CL) почви.

2.1.1. Влияние на средата върху почвените ензимни активности

Анализирани са потенциалните взаимоотношения между почвената ензимна активност и свойствата на почвата с използване на каноничен корелационен анализ (CCA). За формирането на CCA матрицата са избрани редица почвени параметри (остатъчни количества на Az, pH, концентрация на нитратен и амониев азот, съдържание на фосфати) и ензимни активности (дехидрогеназа, бета-глюкозидаза, кисела фосфатаза, алкална фосфатаза, уреаза и арилсулфатаза).

Резултатите показаха, че 99% от вариацията на ензимните активности в пясъчливата почва може да се обясни чрез избраните променливи (фиг. 5.).



Фиг. 5. ССА на връзките между абиотичните параметри на средата и почвената ензимна активност в пясъчлива почва с нарастващи концентрации на Az.

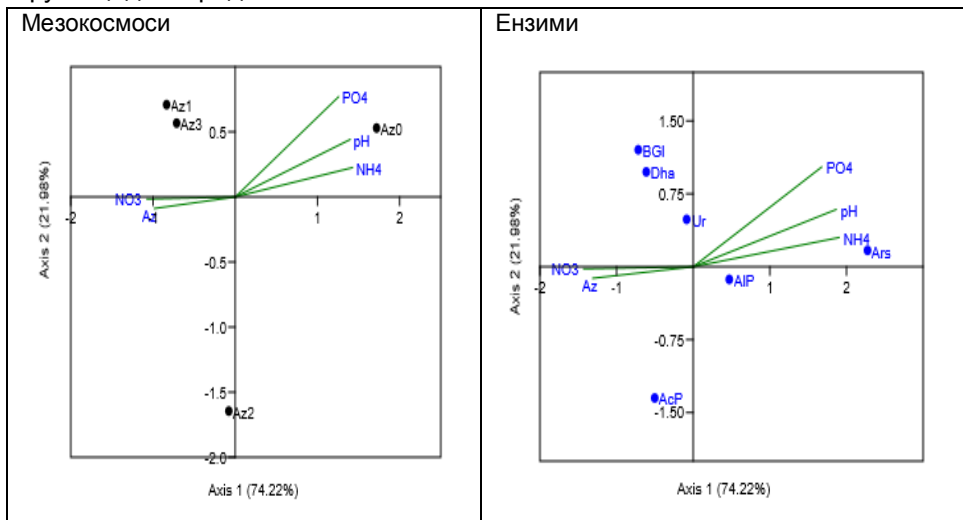
Резултатите от ординационните анализи показват, че определяща за отдиференцирането на контролата от азоксистробин-третираните проби е дехидрогеназната активност, която се повлиява основно от съдържанието на фосфати в средата и стойностите на рН. Отличаващи за Az1 са промените в активностите на алкалната фосфатаза и уреаза и тези промени най-силно корелират със съдържанието на амониеви йони в средата. Определяща за Az2 и Az3 в пясъчливата почва е промяната в активността на бета-глюкозидазата и тя най-тясно корелира с остатъчните количества на азоксистробин в средата.

Като заключение може да се каже, че само при по-високите дози на азоксистробина се отчитат директни ефекти на фунгицида върху състоянието на почвения ензимен комплекс и най-добре тази зависимост се регистрира при бета-глюкозидазата. При препоръчаната от производителя доза на азоксистробина няма отчетен директен ефект на фунгицида, но неговото внасяне в почвата предизвиква промени в концентрацията на свободните неорганични азотни йони и това повлиява активността на почвения ензимен комплекс индиректно.

За оценка на влиянието на средата върху ензимните активности в глинесто пясъчливата почва е използван отново каноничен корелационен анализ (ССА) (фиг. 6.).

Резултатите показват, че определяща за отдиференцирането на контролата в глинесто пясъчлива почва от азоксистробин-третираните проби е арилсуфатазата, която се повлиява от съдържанието на фосфати

и амониевы йони в средата и стойностите на рН. Отличаващи за Az1 и Az3 са промените в активностите на бета – глюкозидазата и дехидрогеназата, докато при Az2 промените в активността на киселата фосфатаза. При азоксистробин – третираните проби в глинесто пещчливата почва няма ясно изразена корелация на промените в ензимната активност с характеристиките на средата и количествата на фунгицида в средата.

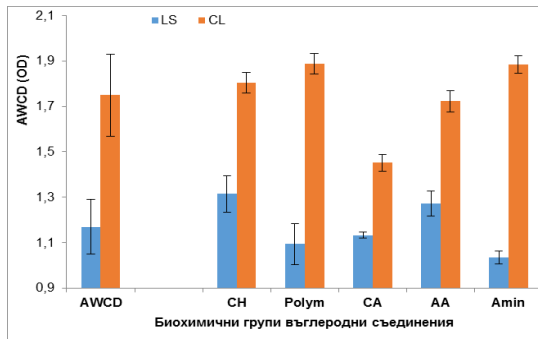


Фиг. 6. ССА на връзките между абиотичните параметри на средата и почвената ензимна активност в глинесто пещчлива почва с нарастващи концентрации на Az.

2.2. Промени в метаболитния профил на почвените бактериални съобщества

2.2.1. Метаболитна активност на нетретираните почвени бактериални съобщества

Средна метаболитна активност служи като индикатор за оценка на способността на почвените бактериални съобщества да метаболизират различни въглеродни източници като източници на енергия и органичен въглерод. Определена е естествената метаболитна активност на бактериалните съобщества от пещчливата и глинесто пещчливата почви (фиг. 7.).



Фиг. 7. Метаболитна активност бактериалните съобщества в пясъчлива (LS) и глинесто пясъчлива (CL) почви.

Средната метаболитна активност на бактериите от пясъчливата почва е с около 34% по-ниска от тази на бактериалните съобщества от глинесто пясъчливата почва. По-високата метаболитна активност в глинесто пясъчливата почва, вероятно, се дължи на по-високото съдържание на органична материя, както и на азот и фосфор в нея в сравнение с това на пясъчливата почва.

2.2.2. Метаболитна активност на третираните с азоксистробин почвени бактериални съобщества

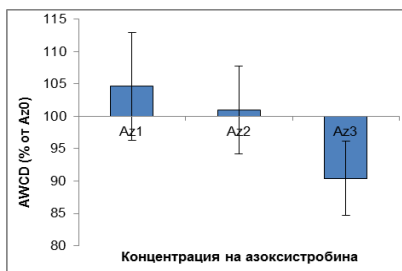
Метаболитната активност на третираните с азоксистробин почвени бактериални съобщества е представена като процент от контролата. Средната метаболитна активност е проследена в динамика в продължение на четири месеца и средните стойности (\pm стандартна грешка) са представени на фиг. 8.

Най-малката концентрация на Az (0.28 mg/kg) предизвиква и в двата типа почви повишаване на метаболитната активност на почвените бактериални съобщества, като ефектът за целия период на изследване е незначим в сравнение с контролата.

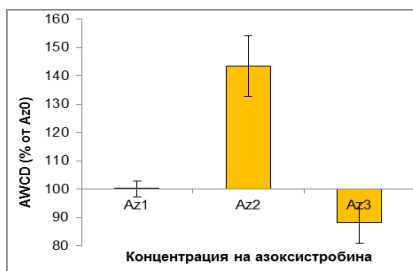
Az2, подобно на Az1, стимулира метаболитната активност на бактериите и в двата типа почви, като този ефект в сравнение с контролата е значим за глинесто пясъчливата и незначим за пясъчливата почва. Най-високата използвана концентрация на фунгицида (28.93 mg/kg) е с отрицателен ефект върху активността на почвените бактериални съобщества.

Като общо, може да се каже че бактериалните съобщества проявяват еднотипен отговор към приложените концентрации на Az и в двата типа почви, но силата на този отговор се повлиява от характеристиките на изследваните почви.

LS



CL



Фиг. 8. Средна метаболитна активност на почвените микробни съобщества в третираны с Az пясъчлива (LS) и глинесто пясъчлива (CL) почви.

2.2.3. Метаболитен профил на третираните с азоксистробин почвени бактериални съобщества

Пясъчлива почва

За да проверим усвояването на кои биохимични групи въглеродни източници има най-голямо отношение към разликите в CLPPs на бактериалните съобщества от пясъчливата почва е извършена процедурата SIMPER (Табл. 1.).

Средното несходство в метаболитните профили (CLPPs) на бактериалните съобщества е 21%, като разликата между тях се дължи предимно на степента на усвояване на Amin, CH и AA при различните концентрации на азоксистробин (табл. 1.). С най-голям принос за разликите между съобществата са субстратите, които могат да бъдат използвани както като източници на въглерод, така и като източници на азот (Amin и AA), а също така и най-лесно достъпните за микроорганизмите източници на енергия (CH).

Табл. 1. SIMPER анализ за приноса на усвояването на биохимичните групи въглеродни източници към общото несходство на CLPPs от мезокосмосите с пясъчлива почва, третирана с нарастващи концентрации на азоксистробин (несходство 21%).

Биохимична група	Средно несходство	Принос към несходството (%)	Кумулативен %
Amin	5.378	26.09	26.09
CH	4.26	20.67	46.76
AA	4.26	20.67	67.42
CA	3.551	17.23	84.65
Polym	3.164	15.35	100

Глинесто пясъчлива почва

За да се установи варирането в усвояването на кои биохимични групи въглеродни източници оказва най-силно влияние върху несходството на бактериалните метаболитни профили е проведен SIMPER анализ и данните са представени в табл. 2.

Табл. 2. SIMPER анализ на биохимичните групи въглеродни източници, допринасящи за различията в метаболитните профили на бактериалните съобщества от глинесто пясъчливата почва, третирани с нарастващи концентрации на азоксисробин

Биохимична група	Средно несходство	Принос към несходството (%)	Кумулативен %
AA	9.456	23.34	23.34
Amin	9.154	22.6	45.94
Polym	7.849	19.38	65.31
CA	7.705	19.02	84.33
CH	6.347	15.67	100

Общото несходство между бактериалните метаболитни профили (CLPPs) от различните мезокосмоси е около 40%. С най-голям принос към разликите в метаболитните профили на почвените бактериални съобщества е усвояването на AA, Amin и Polym. Общият дял на тези биохимични групи в несходството между метаболитните профили и при двата типа почви е около 65%. За разлика от пясъчливата почва, при глинесто пясъчливата почва усвояването на CH е най-слабо вариабилно между профилите и е с най-малък дял в несходството между тях. Делът на усвояването на CH в пясъчливата почва е около 21%, а при глинесто пясъчливата – около 16%.

2.2.4. Влияние на средата върху метаболитната активност и функционално разнообразие на почвените бактериални съобщества

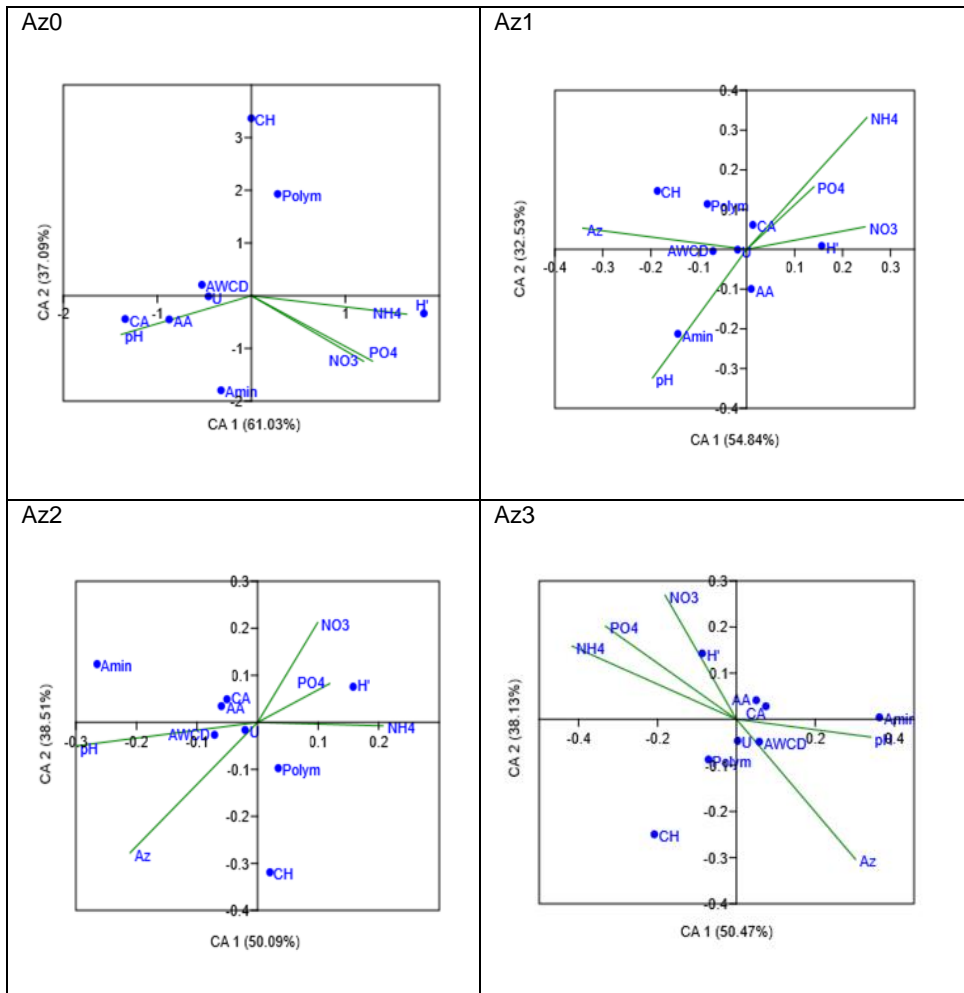
Известно е, че средата модулира както силата на действието на замърсителите върху почвените микроорганизми, така и техния капацитет да реагират на новосъздадените условия.

В изследването са анализирани различни характеристики на почвите и е оценен техния ефект чрез каноничен корелационен анализ върху изявената метаболитна и функционална характеристика на почвените бактериални съобщества от пясъчливата (фиг. 9.) и глинесто пясъчливата (фиг. 10.) почви.

Песъчлива почва

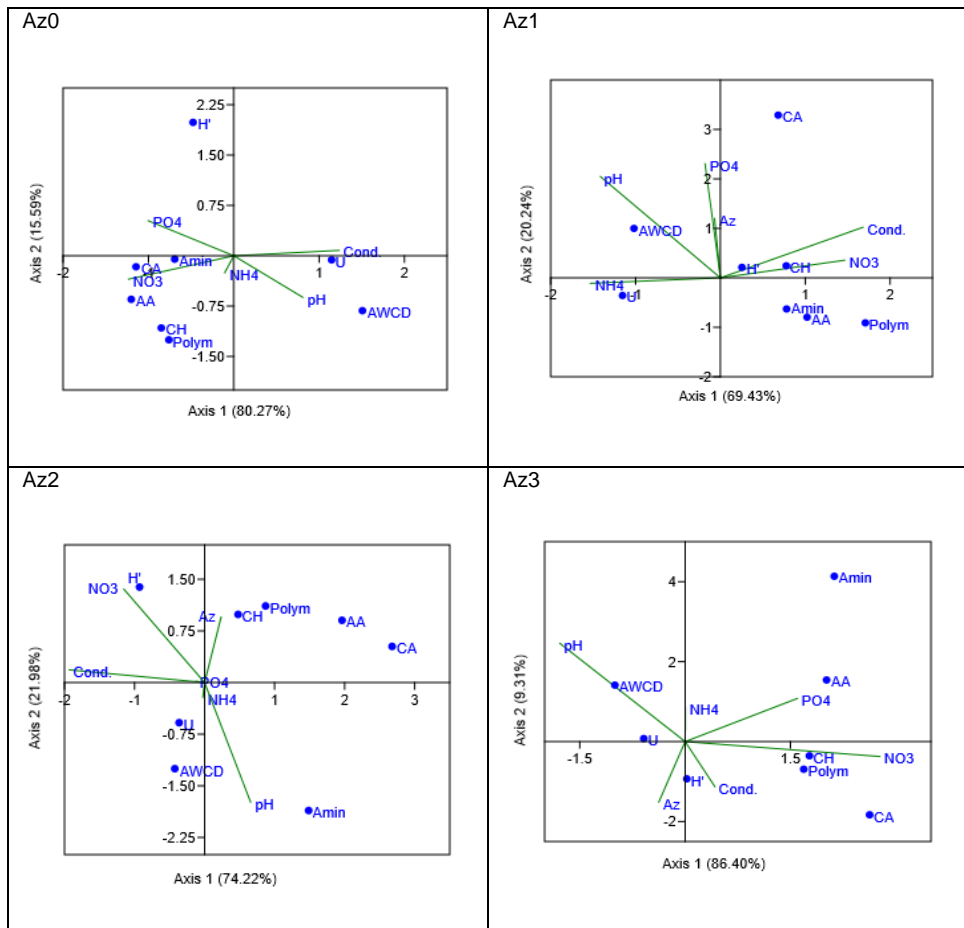
Съобразно групирането на бактериалните характеристики около проекциите на векторите на фиг. 9. могат да се обособят следните основни тенденции, описващи наличие на значима корелация между функционалните бактериални характеристики и факторите на средата:

- С най-висок ефект върху регистрираната средна метаболитна активност (AWCD) в контролата е почвеното рН, а при третираните с азоксисробин проби – рН и остатъчните концентрации на фунгицида.
- Асимилирането на карбоксилни киселини (CA), аминокиселини (AA) и амини/амиди (Amin) се повлиява най-силно от стойностите на рН при азоксисробин третираните и нетретираните проби. Асимилирането на въглеhidрати (CH) и полимери (Polym) не корелира с нито една от анализиранияте почвени характеристики, освен с остатъчните концентрации на азоксисробина при най-ниските нива на замърсяване на почвата (Az1).
- Функционалното разнообразие на почвените бактериални съобщества според Шанон корелира предимно с концентрациите на неорганичен азот и фосфор в почвата, а функционалното разнообразие по Макинтош корелира предимно с остатъчната концентрацията на азоксисробина в почвата и почвеното рН.



Фиг. 9. Влияние на факторите на средата върху способността на бактериалните съобщества от пясъчливата почва да усвоят въглехидрати (CH), полимери (Polym), карбоксилни киселини (CA), аминокиселини (AA) и амини/амиди (Amin).

Глинесто пясъчлива почва



Фиг. 10. Влияние на факторите на средата върху способността на бактериалните съобщества от глинесто пясъчливата почва да усвоят въглехидрати (CH), полимери (Polym), карбоксилни киселини (CA), аминокиселини (AA) и амини/амиди (Amin).

2.3. Селекция на бактериална резистентност към клинично значими антибиотици

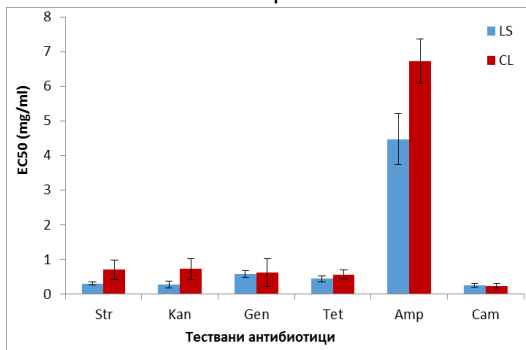
Тъй като съществува пряка връзка между микроорганизмите на околната среда и човешките патогени, в изследването е тествана промяната на резистентността на почвените бактериални съобщества към редица клинично значими антибиотици (КЗА) съобразно концентрацията и времето на експозиция спрямо азоксистрибина.

За оценка на естествената и индуцирана резистентност на почвените бактериални съобщества са тествани антибиотици принадлежащи към групи с различен механизъм на антибактериална активност, както и такива принадлежащи към една и съща група. Целта е да се установи дали съществува вътрегрупова и междугрупова разлика в степента на индуциране на резистентност спрямо КЗА. Резистентността е оценена съобразно стойностите на ефективната антибиотична концентрация, която инхибира растежа на бактериите с 50% (EC50).

2.3.1. Естествена резистентност на почвените микробни съобщества към клинично значими антибиотици

Естествената антибиотична резистентност е закрепена във времето от механизмите на селекция. Този феномен е установен дори и в места, където човешката дейност е минимална или почти липсва. Изследвана е естествената антибиотична резистентност на бактериалните съобщества от пясъчлива и глинесто пясъчлива почва към стрептомицин (Str), канамицин (Kan), гентамицин (Gen), тетрациклин (Tet), ампицилин (Amp) и хлорамфеникол (Cam).

Изчислена е естествената антибиотична резистентност на изследваните почви и е посочена на фиг. 11.



Фиг. 11. Естествена антибиотична резистентност на бактериалните съобщества от пясъчлива (LS) и глинесто пясъчлива (CL) почви.

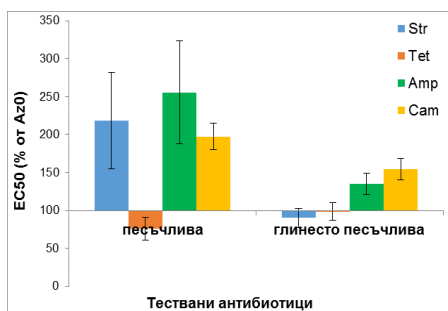
Средната антибиотична резистентност на глинесто пясъчливата почва е по-висока (1.59 mg/ml) в сравнение с тази на пясъчливата почва (1.05 mg/ml). Предполага се, че това се дължи на по-високата запасеност на глинесто пясъчливата почва с хранителен ресурс и по-голямата ѝ буферна способност в сравнение с пясъчливата почва. Най-голямата разлика в резистентността между двете почви се установява при Amp, Str и Kan. Тъй като и Str и Kan принадлежат към групата на аминогликозидите, можем да предположим, че тяхната по-висока

резистентност в глинесто пясъчливата почва е групова характеристика на бактериалните съобщества.

2.3.2. Потенциал на азоксистробина да индуцира резистентност спрямо антибиотици от групи с различен механизъм на действие

Влияние на груповата принадлежност и дозата на антибиотика върху селекцията на резистентност у бактериалните съобщества

Замърсяването на почвите с азоксистробин селектира резистентност в бактериалните съобщества към Str, Amp и Cam в пясъчливата почва, както и към Amp и Cam в глинесто пясъчливата почва (Фиг. 12.).



Фиг. 12. Средна стойност на индуцираната антибиотична резистентност в бактериалните съобщества за времето на култивиране в пясъчлива и глинесто пясъчлива почви.

Средната степен на повишаване на резистентността към КЗА в пясъчливата почва е с 2.2 пъти повече от контролата, а в глинесто пясъчливата почва – с около 45%. Не съществува статистически значима разлика ($p > 0.05$) между индуцираните антибиотични резистентности в почвите по отделно, но такава съществува между двата типа почви.

От друга страна, прилагането на азоксистробин води до слабо (пясъчлива почва) до незначително (глинесто пясъчлива почва) увеличаване на чувствителността на бактериалните съобщества към Tet (пясъчлива и глинесто пясъчлива почви) и Amp (глинесто пясъчлива почва).

Взаимодействието между груповата принадлежност на антибиотика и приложените дози на азоксистробина за селектиране на резистентност в почвените бактериални съобщества е незначимо и при двата типа почви. Всъщност, при по-детайлно проучване на механизма на резистентност се установява, че бактериалните съобщества под

въздействието на азоксистробина повишават резистентността си спрямо антибиотици (Str, Amp и Cam), за които основен механизъм за дезактивиране при микроорганизмите е синтез на деструктуриращи ензими.

3. Въздействие на азоксистробина върху структурата на почвените микробни съобщества

Широкоспектърният характер на механизма на действие на фунгицида предполага инхибиращи ефекти не само върху фитопатогенните гъби, но и върху естествените гъбни обитатели на почвата. От друга страна неселективния му характер може да доведе и до промени в нецелевите групи микроорганизми – каквито са например бактериите. Нецелевият ефект на азоксистробин може да бъде резултат от пряката токсичност на съединението или от косвени въздействие, причинени от отстраняването или увеличаването на разпространението на други видове микроорганизми. При по-голяма продължителност на този ефект е възможно да се достигне до дисбаланс на екологичните процеси в засегнатите почви и съответно негативни последици за качеството на почвата и развитието на растителността.

За да се определят възможните ефекти на азоксистробина върху почвените микробни съобщества са избрани два подхода:

А) Определяне на биоразнообразието на култивируемите почвените микробни съобщества. От научната литература е известно, че при култивационните техники се изолират не повече от 1% от състава на микроорганизмите (Hugenholtz et al., 2009), но също така е известно и че изолираните микроорганизми са точно тези видове, които първи реагират на промените в средата и представляват активната част на микробните съобщества (Sait et al., 2002, Vartoukian et al., 2010). Биологичното разнообразие на култивируемите почвените микробни съобщества е определено чрез молекулярно – генетичните анализи. Чрез прилагането на фингърпринтинг техниката ARDRA са проследени настъпващите промени в активната част на микробните съобщества, която първа реагира на промените в средата и чието реструктуриране води до промяна в структурата и на цялото съобщество.

Б) Другият подход е определяне на таксономичното обилие на микроорганизми, изолирани директно от почва чрез култивационно – независими методи – конструиране на клонови библиотеки на базата на рибозомални гени.

3.1. Определяне на биоразнообразието в почвените бактериални съобщества

Определено е разнообразието на бактериите, култивирани в селективна хранителна среда без (Az0, Az1, Az2, Az3) и със съдържание на азоксистробин (Az0_Az, Az1_Az, Az2_Az, Az3_Az). За пясъчлива почва (LS) анализи са проведени на 1-вия (D1), 30-тия (D30), 60-тия (D60), 90-тия (D90) и 120-тия ден (D90), а за глинесто пясъчлива почва (CL) са проследени 30-тия и 120-тия ден от култивиране на почвените мезокосмоси.

3.1.1. Екстрахиране и PCR амплификация на метагеномна ДНК изолирана от бактериална биомаса

Изолирани са 40 броя високомолекулни, пречистени и концентрирани метагеномни ДНК-и от бактериална биомаса от пясъчлива почва (LS) от 1-ви (8 броя), 30-ти (8 броя), 60-ти (8 броя), 90-ти (8 броя) и 120-ти (8 броя) ден от инкубирането на мезокосмосите с и без третиране с азоксистробин. От глинесто пясъчлива почва (CL) са изолирани 16 броя високомолекулни, пречистени и концентрирани ДНК-и от бактериална биомаса от 1-ви (8 броя) и 120-ти (8 броя) ден от инкубирането на мезокосмосите.

Бактериалните метагеномни ДНК-и са амплифицирани в подходящи разреждания спрямо концентрацията им с използването на бактериални праймери – специфичен 16S 8F и универсален 16S 1513R (Weisburg et al., 1991).

3.1.2. ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) анализ на бактериалните съобщества

А. Определяне на бактериалното разнообразие на съобществата от пясъчлива почва

Бактериалното разнообразие на съобществата е определено чрез ARDRA анализ. Получените фингърпринтинги са обработени чрез софтуерна програма GelPro Analyzer и на базата на данните е проведен клъстерен анализ. Клъстерният анализ е извършен с използването на Algorithm - paired group (UPMGA) и Similarity index - Bray-Curtis.

Клъстерирането на 16S рДНК рестрикцияните профили е направено както между контролата, така и между отделните мезокосмоси с нарастваща концентрация на азоксистробин в различните периоди на инкубиране на мезокосмосите. По този начин са проследени: 1) промените в структурата на бактериалните съобщества спрямо дозата и времето на действие на азоксистробина; 2) и възможността им да се

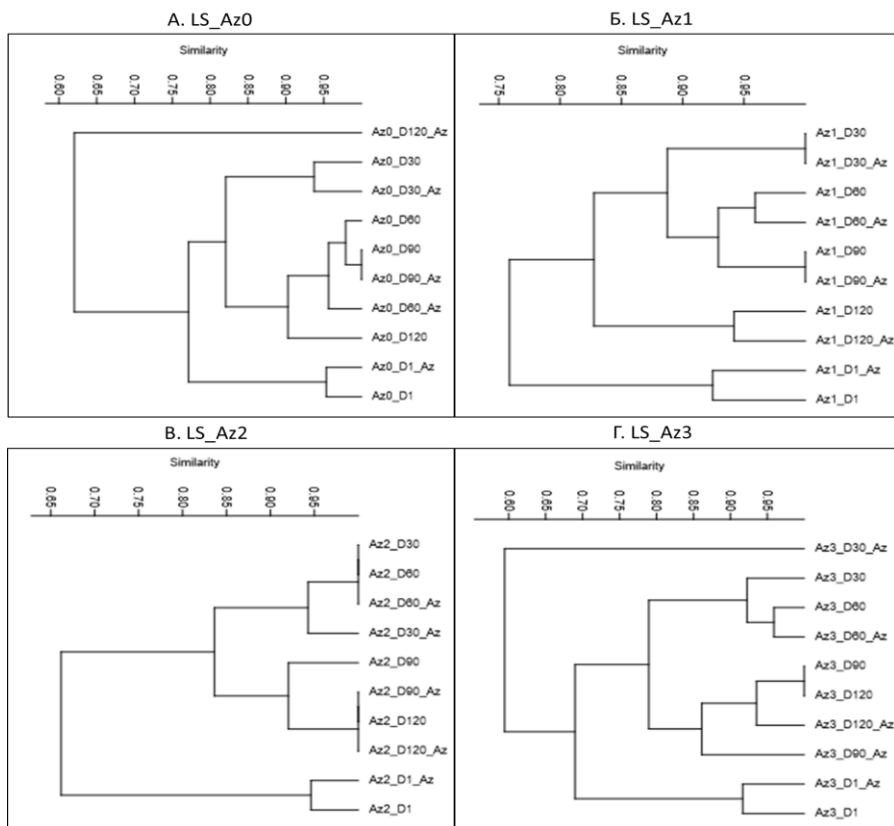
възстановяват и приспособяват към стреса във времето, причинен от третирането с фунгицида, дори в много високи концентрации.

Въпреки големият брой рестрикционни ивици, резултатите от клъстерния анализ показват, че няма статистически достоверна разлика между профилите на бактериалните съобщества при LS_Az0 (фиг.13А) ($F=0.42$; $p=0.93$), LS_Az1 (фиг. 13Б) ($F=1.10$; $p=0.36$), LS_Az2 (фиг. 13В) ($F=1.20$; $p=0.29$). Единствено клъстерният анализ при LS_Az3 (фиг. 13Г) показва статистически достоверна разлика между профилите ($F=2.10$; $p=0.032$).

Клъстерният анализ на 16S рДНК рестрикционните профили показва, че при всички дни на пробвземане съществува много голямо подобие (около 90 – 95%) между LS_Az0, LS_Az1, LS_Az2 и LS_Az3 между пробите, култивирани в среда с азоксисробин и без азоксисробин. Изключение от това подобие се наблюдава при LS_Az0_Az на 120-тия ден с подобие ~62%, и LS_Az3_Az на 30-тия ден (фиг. 13Б), където подобие с останалите профили е ~62%.

Пробите от 1-вия ден при всички концентрации се клъстерират заедно и показват сравнително ниско подобие с профилите от останалите дни. При Az0_D1 и Az1_D1 се регистрира подобие от ~77%, Az2_D1 ~63%, Az3_D1 ~67% в сравнение с 16S рДНК профилите от 30-тия, 60-тия, 90-тия и 120-тия ден от изследването. Изключение се наблюдава само при LS_Az0_D120_Az (~15% сходство) и LS_Az3_D30_Az (~9% сходство).

Прегрупирането на бактериалните съобщества на 30-тия, 60-тия и 90-тия ден може да се дължи на промени в околната среда, като например загинала гъбна и бактериална биомаса, както и започнали процеси на биодеградация на азоксисробина.



Фиг. 13. Клъстерен анализ на бактериалните съобщества от мезокосмоси А) LS_Az0, Б) LS_Az1; В) LS_Az2; Г) LS_Az3, култивирани в хранителна среда с азоксистробин и без азоксистробин на 1-вия, 30-тия, 60-тия, 90-тия и 120-тия ден.

Б. Определяне на бактериалното разнообразие на съобществата от глинесто пясъчлива почва

Бактериалното разнообразие на съобществата от глинесто пясъчлива почва (CL) е определено също чрез фингърпринтинг техниката ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis). Бактериалните съобщества на 30-тия и 120-тия ден имат еднакъв 16S рДНК профил, както в третираните, така и в нетретираните с азоксистробин проби. Поради идентичността им не може да бъде направен сравнителен клъстерен анализ между тях.

В заключение може да се каже, че в структурата на бактериалните съобщества в двата типа почва не настъпват съществени промени, които са свързани с нарастващата доза на азоксистробин. Редица автори също

установяват, че азоксистробинът не оказва съществено влияние върху структурата и биоразнообразието на почвените бактериални съобщества (Bending et al., 2007; Adetutu et al., 2008; Howell et al., 2014), като те обясняват това с механизма му на действие и таргетната му цел – цитохромоксидазата в митохондриалните мембрани на гъбите.

3.2. Определяне на биоразнообразието в почвените гъбни съобщества

3.2.1. Екстрахиране и амплификация на метагеномна ДНК изолирана от гъбна биомаса

Изолирани са високомолекулни, концентрирани и пречистени метагеномни ДНК-и от гъбна биомаса, които са с висока молекулна маса и размер >20 kb. Съотношението на абсорбционните стойности 260 nm/280 nm на изолираните ДНК-и е между 1.6 и 1.8, което е показател за чиста ДНК, подходяща за последващите молекулярно – генетични анализи. Получени са метагеномни ДНК – и от пясъчлива и глинесто пясъчлива почва, както следва:

1) пясъчлива почва (LS) на 1-вия, 30-тия, 60-тия и 90-тия ден: LS_Az0_D1; LS_Az1_D1; LS_Az0_D30; LS_Az1_D30; LS_Az0_D60; LS_Az1_D60; LS_Az0_D90. 2) пясъчливо глинеста почва (CL) на 30-тия и 120-тия ден: CL_Az0_D30; CL_Az1_D30; CL_Az2_D30; CL_Az3_D30; CL_Az0_D120; CL_Az1_D120; CL_Az2_D120; CL_Az3_D120.

3.2.2. ARDRA анализ на гъбните съобщества

За проследяване на промените, които настъпват в структурата и биоразнообразието на гъбните съобщества вследствие от третиране с азоксистробин е използван ARDRA анализ. На базата на получените рестрикционни профили с ендонуклеазата *HaeIII* според молекулното им тегло, е направен клъстерен анализ с използването на Algorithm - paired group (UPMGA) и Similarity index - Bray-Curtis.

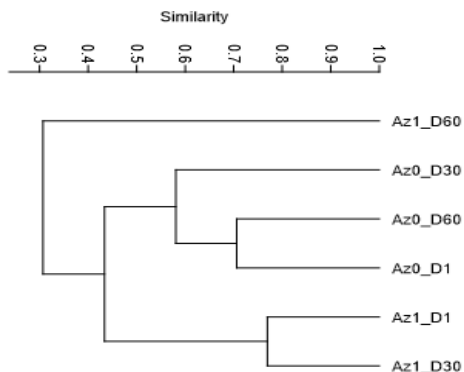
А. Определяне на гъбното разнообразие на почвените съобщества в пясъчлива почва

Резултатите от клъстерния анализ показват, че третирането с азоксистробин променя структурата на гъбните съобщества. Формират се три основни клъстера, както се вижда на фиг. 14.

1) клъстер на гъбните съобщества от нетретираната с азоксистробин проба (LS_Az0_D1; LS_Az0_D30; LS_Az0_D60); 2) клъстер на съобществата от 1 и 30 ден на азоксистробин третираната проба в доза 0.28 mg/kg (LS_Az1_D1; LS_Az1_D30); 3) клъстер на съобществата от 60-тия ден на азоксистробин третираната проба в доза 0.28 mg/kg

(LS_Az1_D60). Az1_D60 се отделя в самостоятелен клъстер, който има най-малко подобие (~ 30%) с останалите клъстери.

Отделянето на третираните с азоксистробин проби в отделни от контролата клъстери е показателно, че дори и най-ниската доза на третиране с азоксистробин (0.28 mg/kg) повлиява структурата на гъбните почвени съобщества. От друга страна, отделянето на LS_Az1_D60 в самостоятелен клъстер може да е показател, че с увеличаване на експозицията към азоксистробина се увеличават негативните ефекти върху структурата на почвените гъбни съобщества.

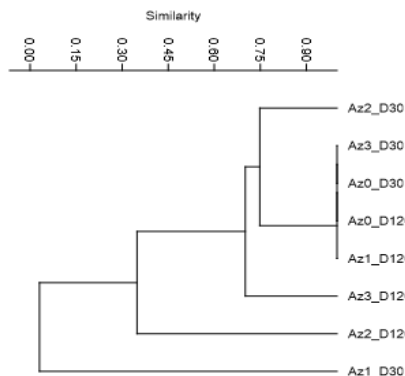


Фиг. 14. Клъстерен анализ на рестрикционните профили на гъбните съобщества от мезокосмос Az0 (D1, D30, D60) и мезокосмос Az1 (D1, D30, D60)

От резултатите от клъстерния анализ може да се направи извода, че негативният ефект на азоксистробин, засягащ структурата на гъбните съобщества в песъчливата почва е с продължителност най-малко 60 дни.

Б. Определяне на гъбното разнообразие на почвените съобщества в глинесто песъчлива почва

Клъстерният анализ на рестрикционните профили на гъбните съобщества от глинесто песъчлива почва, отделя CL_Az1_D30 и CL_Az2_D120 от всички останали профили (фиг. 15.). В двете проби се наблюдава най-голямо разнообразие от рестрикционни ивици, което може да се тълкува като увеличаване в биоразнообразието на бактериалните съобщества. Ефектът на увеличаване на биоразнообразието в началните етапи от третиране с азоксистробин (D30), може да се обясни с развитието на г-стратеги, които се развиват първи и с най-голяма численост при условия на стрес.



Фиг. 15. Клъстерен анализ на рестриционните профили гъбните съобщества от глинесто пясъчлива почва

В пробите CL_Az1_D30 и CL_Az2_D120 разнообразието от ивици е най – голямо и те имат най – малко подобие с всички останали проби. Може да се предположи, че негативното влияние на азоксистробина се проявява още на 30-тия ден, дори и при най – ниската приложена концентрация (0.28 mg/kg), като това действие в с продължителност най-малко 120 дни.

От получените резултати може да се направи извода, че азоксистробинът оказва въздействие на гъбните съобщества и при двата типа почви – пясъчлива и глинесто пясъчлива. Редица автори също са установили влияние на азоксистробин върху гъбните съобщества (Bending et al., 2007, Adetutu et al., 2008, Howell et al., 2014).

3.3. Екстрахиране на метагеномна ДНК

Доректно от почвата в мезокосмосите (от 1-ви; 30-ти; 60-ти и 90-ти ден) са изолирани 16 броя метагеномни ДНК-и от пясъчлива почва (LS) и 16 броя метагеномни ДНК-и от глинесто пясъчлива почва.

3.4. Определяне на обилието на бактериите в почвените съобщества чрез количествен PCR

Определено е обилието на почвените бактериални съобщества, изчислено чрез броя копия 16S рДНК чрез количествен PCR анализ (qPCR) в пясъчлива почва и глинесто пясъчлива почва.

А. Обилие на бактериалните съобщества в пясъчлива почва

Резултатите от проведения qPCR анализ показват, че азоксистробинът оказва стимулиращ ефект върху обилието на бактериалните съобщества от пясъчлива почва (LS) на първия ден при най – високите дози на азоксистробин, а именно 14.46 mg/kg (LS_Az2) и 28.93 mg/kg (LS_Az3), съответно. Броят копия на 16S рДНК значително

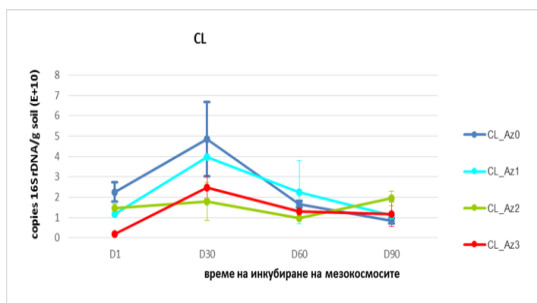
нараства при LS_Az2 – близо два пъти и Az3 – около три пъти в сравнение с нетретираната проба (LS_Az0) и тази с най – ниска концентрация на азоксистробин (LS_Az1). На 30 – тия ден от третирането с азоксистробин бактериалното обилие значително намалява във всички проби и остава ниско и сравнително постоянно до 90 – тия ден (Фиг. 16.).



Фиг. 16. Брой копия на 16S рДНК в пясъчлива почва

Б. Обилие на бактериалните съобщества в глинесто пясъчлива почва

Резултатите от qPCR анализа показват, че азоксистробинът не оказва значителен ефект върху обилието на бактериалните съобщества от глинесто пясъчливата почва (CL), дори и при най – високите дози на третиране.



Фиг. 17. Брой копия на 16S рДНК в глинесто пясъчлива почва

3.5. Конструирание на 16S рДНК клонови библиотеки

Почвените метагеномни ДНК-и от пясъчлива и глинесто пясъчлива почви са амплифицирани в подходящи разреждания с използването на двойката бактериални праймери специфичен 16S 8F и универсален 16S 1513R. Амплифицираните 16S рДНК фрагменти са клонирани в плазмиден вектор Dual promoter pCR II TOPO vector (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) и трансформирани в *E. coli* TOP 10F'. Конструирани са 6 броя 16S рДНК клонови библиотеки от пясъчлива

почва (LS_Az0_D1; LS_Az_2_D1; LS_Az3_D1; LS_Az0_D30; LS_Az2_D30; LS_Az3_D30) и 4 броя 16S рДНК клонови библиотеки от глинесто пясъчлива почва (CL_Az0_D1; CL_Az3_D1; CL_Az0_D30; CL_Az3_D30).

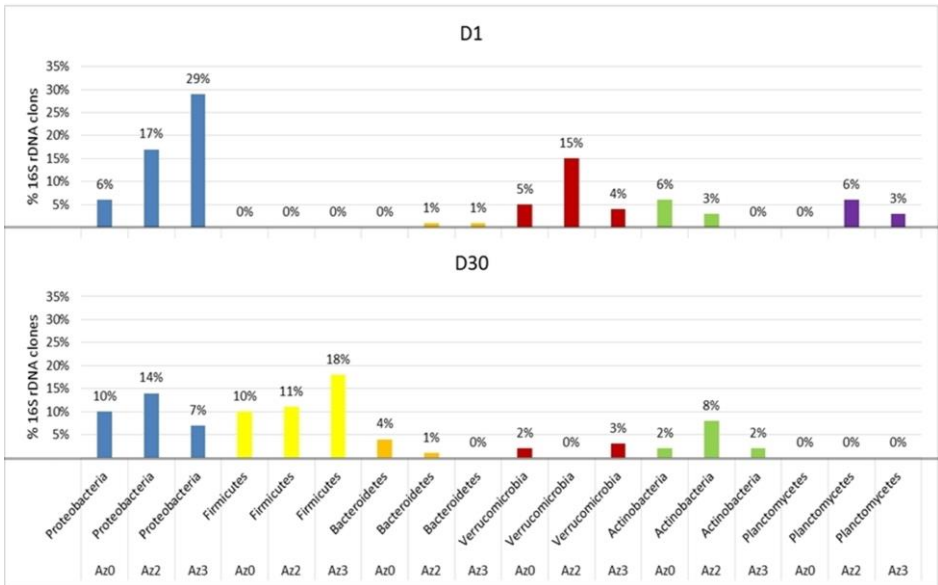
3.5.1. Филогенетичен анализ на 16S рДНК последователностите от пясъчливата и глинесто пясъчливата почва

Нуклеотидните последователности на 16S рДНК клоновете са анализирани с помощта на специализиран софтуер ClustalX2 и е установена филогенетичната им принадлежност и процента на хомология с най-близкия им филогенетичен представител чрез BLASTn в базата данни GenBank.

3.5.2. Таксономично обилие на 16S рДНК клоновете от пясъчливата почва

Таксономичното обилие на 16S рДНК клоновете в нетретираната с азоксистробин проба на 1-вия ден е представено от бактериалните отдели Proteobacteria, Verrucomicrobia и Actinomicrobia в ниска численост – 5-6% (фиг. 18.D1). В третираните с азоксистробин почвени проби се наблюдава по-високо таксономично обилие на ниво отдел, състоящо се от представители на Proteobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Planctomycetes. Actinobacteria са установени в ниско таксономично обилие азоксистробин третираната проба - LS_Az2_D1 (3%), но не и в LS_Az3_D1. И в двете третираните с азоксистробин проби отдел Proteobacteria е доминантен, представен от 17% и 29% в LS_Az2_D1 и LS_Az3_D1, съответно. Представителите на отдел Verrucomicrobia са в по-голяма численост в LS_Az2_D1 (14%), отколкото в контролата и пробата с най-висока доза на третиране.

Резултатите показват, че на 30-тия ден (Фиг. 18.D30) в бактериалните съобщества се появяват представители на отдел Firmicutes в сравнително високо таксономично обилие в третираните с азоксистробин проби и контролата. Доминирането на Proteobacteria от 1-вия ден при пробата, третирана с най-висока доза на азоксистробин (28.93 mg/kg) е заменено от Firmicutes. Представители на бактериалното съобщество от отдел Verrucomicrobia, които присъстват на 1-вия ден в проба LS_Az2_D1 отпадат от съобществото на 30-тия ден. Представители от отдел Planctomycetes не са установени на 30-тия ден при нито една от изследваните проби от пясъчливата почва.



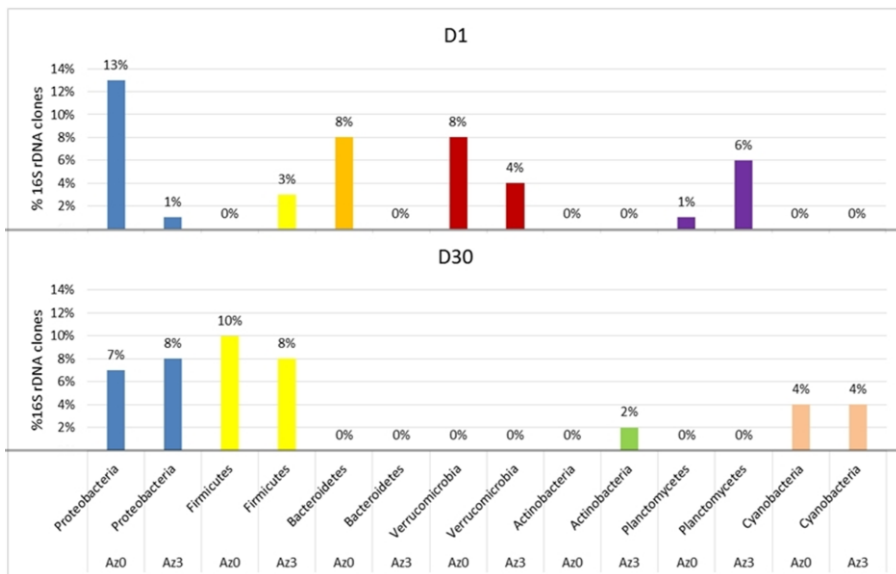
Фиг. 18. Таксономично обилие на 16S рДНК клоновете на ниво отдел в пясъчливата почва на 1-вия (D1) и 30-тия (D30) ден

3.5.3. Таксономично обилие на 16S рДНК клоновете от глинесто пясъчливата почва

На фиг. 19.D1 е посочено таксономичното обилие на 16S рДНК клоновете на 1-вия ден след третиране с азоксистробин. Резултатите показват, че на 1-вия ден в глинесто пясъчливата почва доминантните бактерии на ниво отдел в контролата принадлежат към Proteobacteria (13%), следвани от Verrucomicrobia и Bacteroidetes, представени от 8%, и Planctomycetes, които заемат само 1% от съобществото в изследваната проба. Азоксистробин оказва въздействие върху структурата на бактериалното съобщества на 1-вия ден в глинесто пясъчливата почва, като намалява доминирането на Proteobacteria от 13% на 1% след прилагането на фунгицида в почвата, както и представителите от отдел Verrucomicrobia от 8% на 4%. В третираната с азоксистробин проба (CL_Az3_D1) са установени представители на отдел Firmicutes, за сметка на отпадането на Bacteroidetes от съобществото. Процентното разпределение на Planctomycetes се увеличава от 1% на 6% след прилагането на азоксистробин в почвата (фиг. 35.)

На 30-тия ден се наблюдава промяна в състава на бактериалните съобщества. Бактериалното съобщество в нетретираната с азоксистробин проба (CL_Az0_D30) е представено от Firmicutes (10%),

Proteobacteria (6%), и Cyanobacteria, докато в третираната с азоксистробин проба (CL_Az3_D30), освен всички гореизброени отдели в близки до контролата проценти на разпределение, са установени и представители от отдел Actinobacteria (2%) (фиг. 19.D30.).



Фиг. 19. Таксономично обилие на 16S рДНК клоновете на нито отдел в глинесто пясъчливата почва на 1-вия (D1) и 30-тия (D30) ден

3.6. Конструирани на ITS клонови библиотеки

Конструирани са 4 броя ITS клонови библиотеки от пясъчлива почва (LS_Az0_D1; LS_Az3_D1; LS_Az0_D30; LS_Az3_D30) и 4 броя ITS клонови библиотеки от глинесто пясъчлива почва (CL_Az0_D1; CL_Az3_D1; CL_Az0_D30; CL_Az3_D30).

Клонираният ITS фрагмент (~700 bp), представлява цялото съобщество от видове на домейн Еукарга, съдържащи ITS региона. Получените коректни (рекомбинантни) ITS клонове са с размер ~500 – 900 bp. Всеки фрагмент отговаря на отделен вид от цялото съобщество, което обуславя вариабилността в дължината на клоновете.

3.6.1. Филогенетичен анализ на ITS последователностите от пясъчлива почва и глинесто пясъчлива почва

Нуклеотидните последователности на ITS клоновете са анализирани с помощта на специализиран софтуер ClustalX2 и е установена филогенетичната им принадлежност и процента на хомология

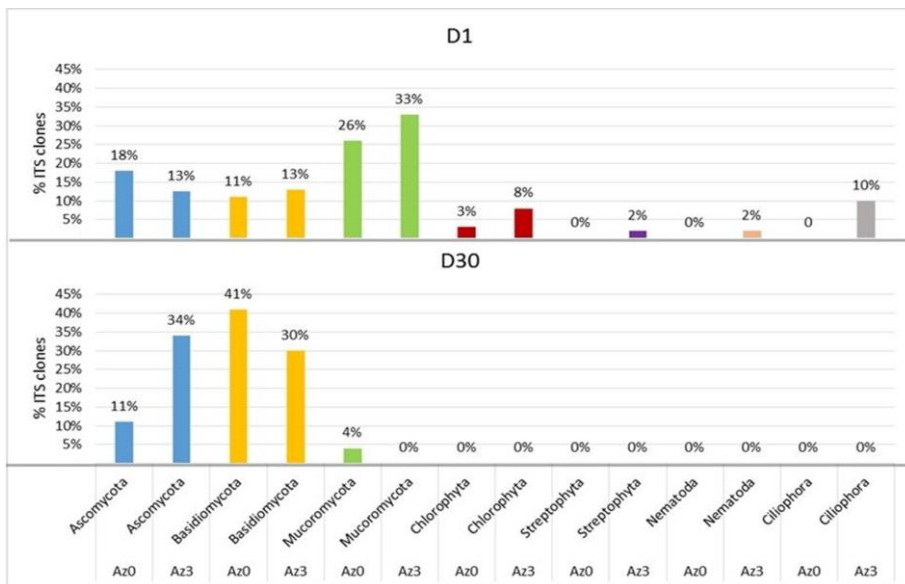
с най-близкия им филогенетичен представител чрез BLASTn в базата данни GenBank.

3.6.2. Таксономично обилие на ITS клоновете от песъчлива почва

За проследяване на промените в структурата на гъбните съобщества е сравнено таксономичното обилие в LS_Az0_D1 (нетретирана) и LS_Az3_D1 (третиране в доза 28.93 mg/kg) (фиг. 20.D1.). Доминантния отдел на 1-вия ден в песъчливата почва при нетретираната и третираната с азоксистробин проба е Mucoromycota, представен от 26% и 33%, съответно. Отделите Ascomycota и Basidiomycota са с по – ниско таксономично обилие и при двете проби. Процентното разпределение на отдел Ascomycota намалява, а Basidiomycota се увеличава след третиране с азоксистробин. Ефектът на азоксистробин върху структурата на гъбните съобщества на 1-вия ден след третиране е свързан със стимулиране на представителите на Basidiomycota и Mucoromycota.

Допълнително доказателство за настъпили промени в структурата на почвените съобщества е появата на отделите Streptophyta, Nematoda и Ciliophora и стимулирането на отдел Chlorophyta, чиито представители реагират с увеличаване на обилието си над два пъти в азоксистробин третираната проба. Намалената конкуренция между видовете за хранителен ресурс и местообитание, предизвикана от промяна в съотношението на гъбите в почвеното съобщество, може да обясни стимулирането на развитието на домейн Eukarya.

На фиг. 20.D30 е посочено таксономичното разпределение на ITS клоновете от песъчлива почва на 30 – тия ден на ниво отдел (division). На 30-тия ден таксономичното обилие в клонова библиотека LS_Az0_D30 е представено от отдел Basidiomycota (41%), следван от Ascomycota (11%) и Mucoromycota (4%). Обратното, в третираната проба LS_Az3_D30 Ascomycota (34%) са доминантни, следвани от Basidiomycota (30%), а представителите на отдел Mucoromycota отпадат от гъбното съобщество. Съществената промяна в структурата на гъбните съобщества на 30-тия ден след третиране с азостробин е увеличаване на броя на представителите от Ascomycota, намаляването на Basidiomycota и отпадането на Mucoromycota.



Фиг. 20. Таксономично обилие на ITS клоновете на ниво отдел в песьчливата почва на 1-вия (D1) и 30-тия (D30) ден

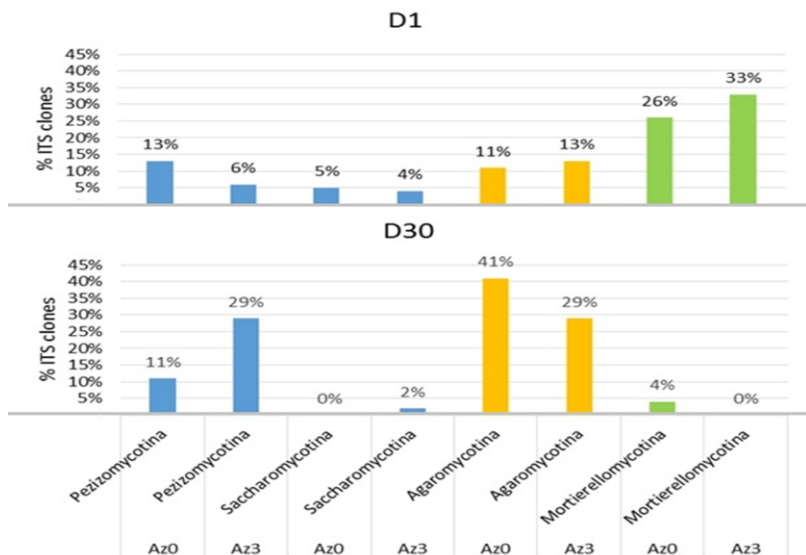
Определено е таксономичното обилие на ниво подтип в гъбните съобщества на 1-вия и 30-тия ден от инкубиране на почвените мезокосмоси и резултатите са представени на фиг. 21.

На ниво подтип (subdivision) в песьчливата почва са представени *Pezizomycotina*, *Saccharomycotina*, *Agaromycotina* и *Mortierellomycotina* в нетретираната и третираната почва с азоксистробин на 1-вия ден. Промените в съобществата на ниво подтип се изразяват в промяна на процентното им преразпределение. Доминиращи в нетретираната и третираната песьчлива почва на 1-вия ден са представителите на подтип *Mortierellomycotina*, съответно с 26% и 21%. След третиране с азоксистробин на 1-вия се наблюдава намаляване на *Pezizomycotina* и *Mortierellomycotina* и увеличаване на *Agaromycotina*. Представителите на *Saccharomycotina* остават сравнително неповлияни от азоксистробина.

На 30-тия ден доминирането на *Mortierellomycotina*, което беше установено на 1-вия ден, е сведено до много ниско таксономично обилие при нетретираната (4%) и третираната (13%) с азоксистробин проба. На 30-тия ден гъбните съобщества в песьчливата почва реагират с увеличаване на *Pezizomycotina* и намаляване на *Agaromycotina* след третиране с азоксистробин, по което се различават от 1-вия ден. В контролата не се открити представители на *Saccharomycotina*, а при

третираната с азоксистробин са представени от много ниско таксономично обилие – 2%.

Резултатите от филогенетичния анализ показват, че представителите на подтип Mortierellomycotina на 1-вия и 30-тия ден в третираната и нетретираната проба се различават по видов състав, но всичките принадлежат към род *Mortierella*. Представители от Agaromycotina в песъчливата почва принадлежат предимно към род *Solicoccozyma* и род *Saitozyma*, както в третираната, така и в нетретираната проба. В подтип Pezizomycotina разнообразието от видове е най – голямо, като впечатление прави присъствието на *Trichoderma hamatum* в нетретираната проба (LS_Az0_D1), *Penicillium* sp. в третираната с азоксистробин проба (LS_Az3_D1) на 1-вия ден, и *Fusarium* sp. в третираната проба (LS_Az3_D30) на 30-тия ден.



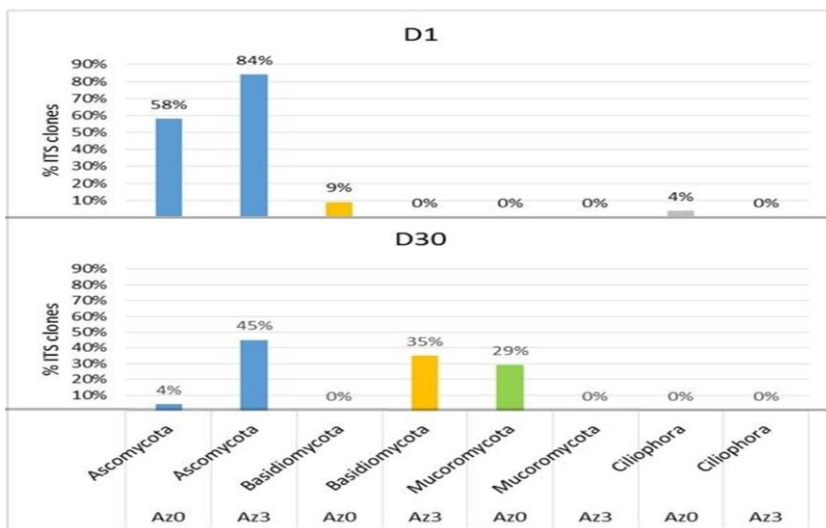
Фиг. 21. Таксономично разпределение на ITS клоновете на ниво подтип (subdivision) в песъчливата почва на 1-вия (D1) и 30-тия (D30) ден

3.6.3. Таксономично обилие на ITS клоновете от глинесто песъчлива почва

За проследяване на промени в структурата на гъбните съобщества в глинесто песъчлива почва е определено таксономичното обилие на ниво отдел на 1-вия ден от инкубиране на почвените мезоокозмоси в CL_Az0_D1 и CL_Az3_D1 и е представено на фиг. 22.D1. В клонова библиотека CL_Az0_D1 Ascomycota е доминиращ, представен от 58%, следван от представители на Basidiomycota в много нисък

процент - 9%. След третиране с азоксистробин на първия ден от инкубиране на почвените мезокосмоси, таксономичното обилие на представителите от тип Ascomycota нараства до 84% и не се установява присъствие на представители от други типове. Представители от отдел Mucoromycota не се откриват и в двете проби.

На 30-тия ден таксономичното обилие в клонова библиотека CL_Az0_D30 е представено от тип Mucoromycota (29%), следван от Ascomycota (4%). Представители от отдел Basidiomycota не са установени в контролата. Интересна е появата на представители от отдел Mucoromycota в контролата на 30-тия ден, която доминира в гъбното съобщество и заема освободената екологична ниша от Ascomycota и Mucoromycota. В третираната с азоксистробин проба CL_Az3_D30 доминантен отдел е Ascomycota (45%), следван от Basidiomycota (35%), а Mucoromycota отпадат от структурата на гъбното съобщество след третиране с азоксистробин. Съществената промяна в структурата на гъбните съобщества на 30-тия ден след третиране с азоксистробин е увеличаване на представителите от отдел Ascomycota.

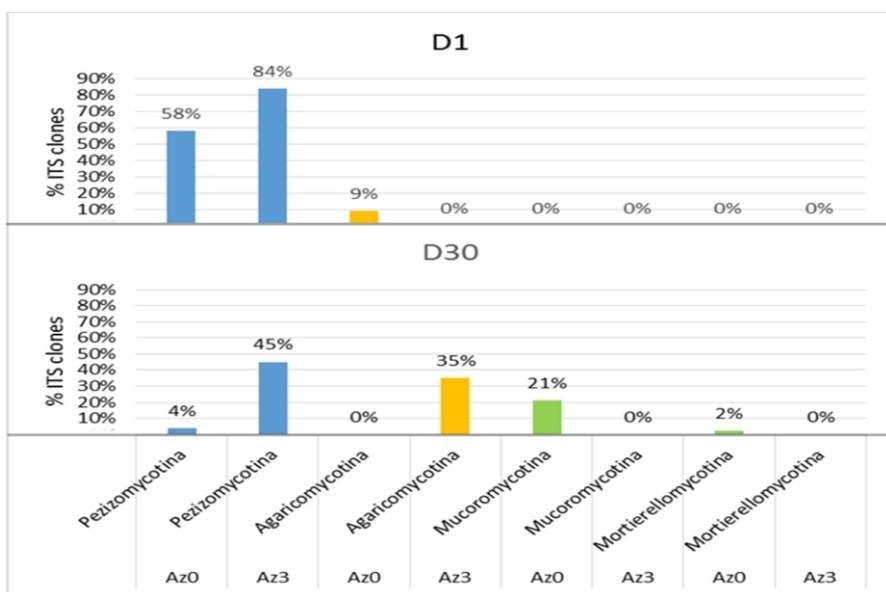


Фиг. 22. Таксономично разпределение на ITS клоновете на ниво тип в глинесто пясъчливата почва на 1-вия (D1) и 30-тия (D30) ден

На фиг. 23.D1. е посочено таксономичното разпределение на ITS клоновете на 1-вия ден в третираната и нетретираната с азоксистробин глинесто пясъчлива почва на ниво подтип (subdivision). Резултатите оказват, че промените в таксономичното обилие на гъбните

съобществата се изразяват в промяна на състава и процентното разпределение на подтиповете в тях. След третиране с азокситробин на 1-вия ден се наблюдава отпадане на Agaricomycotina от отдел Basidiomycota и липсват представители на отдел Mucoromycota, за сметка на Pezizomycotina, чиито представители се увеличават от 58% в нетретираната почва на 84%.

На 30-тия таксономичното обилие е представено на фиг. 23.D30. и показва присъствие на подтиповете Pezizomycotina, Mucoromycotina и Mortierellomycotina в контролата, докато в третираната с азокситробин проба се установяват само Pezizomycotina и Agaricomycotina, но в много висок процент.



Фиг. 23. Таксономично разпределение на ITS клоновете на ниво подтип (subdivision) в глинесто пясъчливата почва на 1-вия (D1) и 30-тия (D30) ден

От получените резултати може да се направи извода, че азокситробинът проявява различен ефект върху структурата на гъбните съобщества в зависимост от типа почва, в който се прилага. Разликата в структурата се изразява в присъствието на различни отдели. В пясъчливата почва на 1-вия ден се срещат отделите Ascomycota, Basidiomycota и Mucoromycota, докато на 30-тия ден Mucoromycota е само в третираната проба. В глинесто пясъчливата почва Ascomycota е само в контролата, а в третираната с азокситробин има и Ascomycota, и

Basidiomycota. Представители на Mucoromycota не се срещат и двете проби на 1-вия ден. На 30-тия ден Ascomycota са разпространени и двете проби, докато Basidiomycota е само в третираната, а Mucoromycota - само в контролата. Промените в структурата на гъбните съобщества в двата типа почви се изразяват, не само в присъствието, но и в процентното разпределение на представителите на ниво отдел и подотдел. Установен е и различен видов състав на гъбите в глинесто пясъчливата и в пясъчливата почва. Повечето представители от глинесто пясъчливата почва са предполагаеми растителни патогени, за разлика от пясъчливата почва, където са в много малка численост. Една от съществените разлики в структурата на гъбното съобщество е присъствието на представители от род *Rhizopus* и *Phoma* само в глинесто пясъчливата почва. Представителите от род *Solicoccozyma* и *Saitozyma* са широко застъпени в пясъчливата почва. *Solicoccozyma* се наблюдават и в глинесто пясъчливата почва, но в много ниско таксономично обилие, докато представители на *Saitozyma* не са установени.

От получените резултати за структурата на гъбните съобщества може да се направи изводът, че съставът на гъбното съобщество в глинесто пясъчливата почва е с ясно изразена доминантност на видове, докато при пясъчливата почва се наблюдава изключително голямо разнообразие от индивидуално срещащи се гъбни видове. Може да се предположи, че предназначението на почвата оказва влияние върху структурата и разнообразието на микробните съобщества. Пясъчливата почва е ливадна, с разнообразна растителност, която е пряко свързана и с микробното разнообразие. Глинесто пясъчливата почва е обработваема, където растителността обикновено е монокултура и е сезонна, което предполага по – беден видов растителен състав. Тази закономерност е потвърдена от редица автори (Wolińska et al., 2017). Разликата във видовия състав на гъбите в двата типа почви може да се обясни и с различната им механична структура. Глинестите частици в почвата оказват силно влияние върху сорбцията на азоксистеробин върху почвените частици и съответно неговата устойчивост и биодостъпност за почвените микробни съобщества (Van Beinum et al., 2005).

Микроорганизмите играят ключова роля в биодеградацията на пестициди в почвената екосистема. Обикновено те се идентифицират като част от микробен консорциум. Микроорганизмите не могат поотделно да минерализират повечето вредни съединения, каквито са пестицидите. Пълната минерализация води до последователно разграждане от консорциум от микроорганизми и включва синергизъм и ко - метаболитни

действия. Следователно използването на пестициди изисква изучаване на тяхното въздействие върху съвкупността от микроорганизми в почвените съобщества, и потенциалните последици от неправилното им приложение. Прилагането на високи дози пестициди в лабораторни експерименти позволява да се идентифицират микробни щамове с висок потенциал за биоремедиацията на почви, замърсени с пестициди (Chen et al., 2011; Jezierska-Tys and Rutkowska 2013; Singh et al., 2014; Bacmaga et al., 2015).

ИЗВОДИ

1. Азоксистробинът проявява много висока устойчивост в почвата, като типа на почвата оказва силно влияние върху скоростта на разграждане. Установена е по-висока устойчивост на фунгицида в глинесто пясъчливата почва.
2. Азоксистробинът оказва различно влияние върху почвените ензимни активности съобразно типа на почвата. В пясъчливата почва са регистрирани преобладаващо отрицателни до липса на ефекти, докато в глинесто пясъчливата почва - в по-висока степен стимулиращи ефекти върху почвените ензими. Най-силен негативен ефект на азоксистробина се регистрира върху почвената дехидрогеназа в пясъчливата и арилсулфатазата в глинесто пясъчливата почва.
3. Азоксистробинът в почвата предизвиква промени в метаболитната активност на почвените бактериални съобщества, като тези промени настъпват дори и при най-ниската концентрация на фунгицида. Промените в метаболитната активност се дължат на:
 - a. различни нива на усвояване на амини, аминокиселини и въглехидрати в азоксистробин-третираните почви в сравнение със съответната контрола.
 - b. стимулирано усвояване на L-серин и понижено усвояване на путресцин в азоксистробин-третираните почви, както и специфични нива на усвояване на други въглеродни източници съобразно типа на почвата.
4. Значимо за разликите в метаболитните профили на бактериалните съобщества от третираните и нетретираните с азоксистробин почви (пясъчлива и глинесто пясъчлива) е времето на експозиция и концентрацията на фунгицида, както и смесения ефект между тях.
5. Ензимната и метаболитна активност на бактериалните съобщества се повлиява основно от концентрацията на азоксистробина в почвата и стойностите на почвеното рН. Усвояването на аминокиселини, амини/амиди и карбоксилни киселини се контролира преимуществено от рН на средата, а усвояването на въглехидрати и полимери – от концентрацията на азоксистробина.

6. Азоксистробинът предизвиква повишена резистентност в почвените бактериални съобщества към антибиотици, използвани в хуманната медицина, за които бактериите са развили като основен механизъм за защита синтез на извънклетъчни лизиращи ензими.
7. Азоксистробинът оказва въздействие върху структурата на гъбните почвени съобщества чрез промяна във видовото разнообразие и процентното съотношение на видовете. По-съществени структурни промени при гъбните съобщества се регистрират на 30-тия ден след третиране на почвите с азоксистробин и те са свързани с увеличаване на относителния дял на Ascomycota (LS и CL), изчезване на Mucoromycota (LS и CL) и намаляване (LS) или увеличаване (CL) на относителния дял на Basidiomycota.
8. Установен е различен видов състав на гъбните съобщества в глинесто пясъчливата и пясъчливата почви. Повечето идентифицирани представители от глинесто пясъчливата почва са фитопатогени, за разлика от пясъчливата почва, където те са в много ниска численост.
9. На базата на сравнението с референтни секвенции от GenBank са идентифицирани нови некултивируеми видове гъби (пет ITS секвенции) и бактерии (двадесет и пет 16S рДНК секвенции) в почвите.
10. Азоксистробинът оказва стимулиращ ефект върху обилието на почвените бактериални съобщества. Оказва промяна и върху тяхната структура на ниво отдел и клас в зависимост от времето на експозия и типа почва.

ПРИНОСИ

1. Проведен е комплексен анализ на микробните съобщества от два типа почви, третирани с азоксистробин, като са приложени класически микробиологични, биохимични и молекулярно-генетични методи за оценка на ефекта на концентрацията и продължителността на въздействие на фунгицида върху тях.
2. За първи път е показано, че азоксистробинът повлиява специфично бактериалните почвени съобщества в зависимост от характеристиките на почвата чрез прилагане на функционален подход (Biolog EcoPlate).
3. За първи път е показано, че азоксистробинът предизвиква резистентност на почвените бактериални съобщества към антибиотици използвани в хуманната медицина.
4. За първи път в България са приложени молекулярно-генетични методи - количествен PCR и конструиране на клонови библиотеки на базата на рибозомалните гени, 16S рPHK гена и ITS рPHK гена, съответно за бактериални и гъбни съобщества, за определяне на въздействието на фунгициди върху тяхната структура.
5. Идентифицирани са пет ITS-секвенции с хомология между 83-97% с референтни секвенции от GenBank, които са нови некултивируеми видове гъби.
6. Идентифицирани са двадесет и пет 16S рДНК секвенции с хомология между 82-97% с референтни секвенции от GenBank, които са нови некултивируеми видове бактерии.

Научни публикации по темата на дисертацията:

1. **Michaella Aleksova**, Anelia Kenarova, Silvena Boteva, Galina Radeva. 2019. AZOXYSTROBIN IMPACT ON A SELECTION OF SOIL BACTERIAL RESISTANCE TO AMYNOGLICOSIDE ANTIBIOTICS. Comptes rendus de l'académie bulgare des sciences. Vol. 72 (10), 1359-1365. IF: 0.321, Q2
2. **Michaella Aleksova**, Anelia Kenarova, Silvena Boteva, Galina Radeva. 2019. INDUCED BACTERIAL ANTIBIOTIC RESISTANCE UNDER THE APPLICATION OF FUNGICIDE AZOXYSTROBIN. Comptes rendus de l'académie bulgare des sciences, vol. 72 (11), 1592-1598. IF: 0.321, Q2

Участие в научни форуми по темата на дисертацията:

1. **Михаела Руменова Алексова**. 2016. Микробиологична оценка на резистентността и устойчивостта на почви, третирани с пестициди. Интердисциплинарен докторантски форум 6-7 април 2016г., гр. София.
2. **Michaella Aleksova**, Silvena Boteva, Anelia Kenarova, Galina Radeva. 2016. Fungicide amendment of agricultural soils selects antibiotic resistant bacteria. . Young Scientific Conference Kliment`s days, 17-18 November 2016, Sofia.
3. **Michaella Aleksova**, Anelia Kenarova, Silvena Boteva, Galina Radeva. Use of soil dehydrogenase activity and pollution induced community tolerance to detect azoxystrobin adverse effects on soil microorganisms. Young Scientific Conference Kliment`s days with International Participation, 16-17 November 2017, Sofia.
4. **Michaella Aleksova**, Jordan Manasiev, Silvena Boteva, Mladen Popov, Anelia Kenarova, Galina Radeva. 2018. Impacts of the fungicide azoxystrobin on soil bacterial communities. 11th Seminar of Ecology with International Participation, 26-27 April 2018, Sofia.
5. Galina Radeva, **Michaella Aleksova**, Silvena Boteva, Anelia Kenarova. 2018. Effect of fungicides on soil microbial communities. 11th Seminar of Ecology with International Participation, 26-27 April 2018, Sofia.
6. Silvena Boteva, Anelia Kenarova, **Michaella Aleksova**, Galina Radeva, Stela Georgieva, Christo Chaney. 2018. Soil enzyme activities under the impact of increasing azoxystrobin concentrations. International scientific conference Kliment`s days, 8 - 9 November 2018, Sofia.
7. **Michaella Aleksova**, Anelia Kenarova, Silvena Boteva, Radina Karastoyanova, Galina Radeva. 2019. Bacterial community response to the

effect of fungicide azoxystrobin in mesocosm experiment, International Seminar of Ecology – 2019, dedicated to 75 years USB and 150 years BAS, 18-19 April 2019, Sofia.

8. **Michaella Aleksova**, Anelia Kenarova, Silvena Boteva, Galina Radeva. 2019. Azoxystrobin effects on bacterial functional profiles in relation to the exposure time and levels of soil pollution, International Seminar of Ecology – 2019, dedicated to 75 years USB and 150 years BAS, 18-19 April 2019, Sofia.
9. **Michaella Aleksova**, Radina Karastoyanova, Anelia Kenarova, Silvena Boteva, Galina Radeva. 2019. Effect of the fungicide azoxystrobin on the fungal community structure in loamy sand soil. Young Scientific Conference Kliment's days, 8 November 2019, Sofia.

Участие в научни проекти по темата на дисертацията:

1. Фонд научни изследвания на СУ, заглавие на проекта „Оценка на въздействието на фунгицидите върху структурата на бактериалните съобщества от обработени почви с използване на моделен фунгицид – азоксистробин”, ръководител на проекта: гл. ас. д-р Силвена Ботева, № 80-10-53/19.04.2017
2. Фонд научни изследвания, заглавие на проекта „Азоксистробин като моделен фунгицид за групата на стробилурините: Екологична оценка на стрес ефектите върху почвената микрофлора”, ръководител на проекта: доц. д-р Анелия Кенарова, ДН 11/6/17
3. Фонд научни изследвания на СУ, заглавие на проекта „Оценка на въздействието на моделен фунгицид – азоксистробин върху ензимната активност на почвените микробни съобщества”, ръководител на проекта гл. ас. д-р Силвена Ботева. N 80-10-7/ 16/4/18

Участия в научни форуми извън темата на дисертацията:

1. **Michaella Aleksova**, Daniel Palov, Radina Karastoyanova, Magdalena Nikolova, Nikolai Dinev, Anelia Kenarova, Silvena Boteva, Roumen Dimitrov, Galina Radeva. 2018. Distribution of soil bacterial abundance along the gradient of heavy metals contamination in the region of Chelopech, Bulgaria. International scientific conference Kliment`s days, 8 - 9 November 2018, Sofia.
2. **Michaella Aleksova**, Milka Elshishka, Mladen Popov, Vlada Peneva, Galina Radeva. 2018. Exploration of Antarctic soil microbiome. International scientific conference Kliment`s days, 8 - 9 November 2018, Sofia.
3. Galina Radeva, Roumen Dimitrov, **Michaella Aleksova**, Daniel Palov, Magdalena Nikolova, Nikolay Dinev, Anelia Kenarova, Silvena Boteva. Influence of long-term contamination with heavy metals on bacteria community structure. International Seminar of Ecology, 18-19 April 2019, Sofia.
4. Daniel Palov, **Michaella Aleksova**, Magdalena Nikolova, Nikolai Dinev, Silvena Boteva, Anelia Kenarova, Roumen Dimitrov, Galina Radeva. Influence of heavy metals on the structure of bacterial communities in long-term contaminated soils in the region of Chelopech, Bulgaria. Young Scientific Conference Kliment`s days, 8 November 2019, Sofia.

Участие в научни проекти извън темата на дисертацията:

1. Фонд научни изследвания на СУ, заглавие на проекта „Изследване на гликозилтрансферази, секретирани от фруктобацили *Lactobacillus kunkeei*“, ръководител на проекта: проф. д-р Пенка Мончева, No 142/12.04.2016
2. Фонд научни изследвания, заглавие на проекта „Микробиомът на почвата като индикатор за биоразнообразие и еволюция на микробни съобщества при трайно замърсяване с тежки метали“, ръководител на проекта: доц. д-р Галина Радева, ДН 11/4/1

Изказвам искрената си благодарност на научните ми ръководители доц. д-р Анелия Кенарова и доц. д-р Галина Радева за гласуваното доверие, за професионалното и коректно отношение, за съветите и помощта при изработването, написването и оформянето на настоящия дисертационен труд. Благодаря Ви за добрите примери и уроци, както в професионален, така и в житейски план!

Благодаря на преподавателите и колегите от „Катедра по екология и опазване на околната среда“ към Биологически факултет, СУ, както и на колегите от секция „Регулация на генната активност“ към Институт по молекулярна биология, БАН, които са ми съдействали в работата.

Благодаря на гл. ас. д-р Силвена Ботева от „Катедра по екология и опазване на околната среда“, към Биологически факултет, СУ за подкрепата, приятелството и съдействието в експерименталната работа.

Благодаря на доц. д-р Христо Чанев от Факултет по химия и фармация, СУ за помощта при измерването на остатъчните концентрации на азоксистрибина в почвата.

Благодаря на семейството и мъжа до мен за търпението, вярата и подкрепата през целия период!