



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ“

Веселка Йорданова Георгиева

**Изследване характеристиките и биосинтетичния потенциал на
щамове от род *Bacillus* и влиянието им върху развитието на
растителни видове с индустриално значение**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна научна степен
„доктор“

Професионално направление 5.11 Биотехнологии
ДП Технология на биологично активните вещества

Научен ръководител: доц.
д-р Валентин Савов

София, 2022 г.

Дисертацията е написана на 119 печатни страници и включва 26 фигури и 11 таблици. Цитирани са 285 литературни източника.

Изследванията по дисертацията са извършени в катедра „Биотехнология“ при Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Институт по органична химия с Център по фитохимия, към Българска Академия на Науките, 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 07.06.22 г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на _____ от _____ часа в зала _____ Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, бул. „Драган Цанков“ №8.

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



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ

Веселка Йорданова Георгиева

Изследване характеристиките и биосинтетичния потенциал на щамове от род *Bacillus* и влиянието им върху развитието на растителни видове с индустриално значение

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна научна степен
„доктор“

Професионално направление 5.11 Биотехнологии ДП
Технология на биологично активните вещества

Научен ръководител:
доц. д-р Валентин Савов

Рецензенти:

- 1.
- 2.



Изказвам благодарност на научният си ръководител доц. д-р Валентин Савов за подкрепата и съветите при разработването на настоящия дисертационен труд.

Също така изказвам багодарности на цялата катедра „Биотехнология“ за оказаната помощ по време на експерименталната работа и полезните съвети при разработването на настоящия дисертационен труд. Също така, благодаря на доц. д-р Траяна Недева за оказаната помощ и съветите при оформянето и представянето на получените резултати в настоящия дисертационен труд.

Не на последно място искам да благодаря на моето семейство, без чиято подкрепа нямаше да запиша докторантура. Благодаря на моя съпруг – инж. Марио Ванцети за подкрепата и мотивацията в трудни за мен моменти.

Признателна съм на ръководствата на Софийски университет за предоставената ми възможност да осъществя настоящия дисертационен труд.

Благодаря Ви сърдечно!

Съдържание	Стр.
I. Увод	6
II. Експериментална схема	8
III. Цел и задачи	9
IV. Материали и методи	11
V. Резултати и обсъждане.	12
V.1. Морфологично, физиолого-биохимично и молекулярно-генетично охарактеризиране на подбраните щамове от род <i>Bacillus</i> .	12
V.2. Дълбочинно култивиране на подбрани щамове и изследване на основни PGP-активности.	19
V.2.1. Конструирание на подходящи хранителни среди за дълбочинно култивиране на подбраните щамове.	19
V.2.2. Изследване на антимикробната активност на щамове от род <i>Bacillus</i> срещу бактериални патогени и филаментозни гъби.	19
V.2.3. Изследване синтезата на литични ензими от подбраните щамове.	26
V.2.4. Изследване синтезата на индол-оцетна киселина, при развитието на щамове от род <i>Bacillus</i> в подбраните хранителни среди.	28
V.2.5. Изследване на споролацията на щамове от род <i>Bacillus</i> при развитието им в подбраните хранителни среди.	32
V.3. Оптимизиране на условията за дълбочинно култивиране на изследваните щамове от род <i>Bacillus</i> .	35
V.4. Изследване ефекта на безклетъчна супернатанта (CFS) от подбраните щамове и растежните регулатори (GA3 и IAA) върху развитието на технически растителни култури.	42
V.4.1. Изследване ефекта на CFS от изследваните щамове върху семена от къдрава салата (<i>Lactuca sativa</i>).	42
V.4.2. Изследване ефекта на CFS от изследваните щамове върху семена от градински грах (<i>Pisum sativum</i>).	45
V.4.3. Изследване ефекта на растежни регулатори върху семена от градински грах (<i>Pisum sativum</i>).	53
V.5. Изследване ефекта на безклетъчна супернатанта от подбраните щамове и растежни регулатори върху развитието на етерично-маслени растителни култури.	55
V.5.1. Третиране на растения от риган (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>) с клетъчна суспензия от подбраните щамове и с растежни регулатори (GA3 и IAA).	55
V.5.2. Екстракция на суха листна биомаса от риган и газово-хроматографски анализ за съдържанието на тимол в растителните екстракти от риган.	59
VI. Изводи	63
VII. Приноси	64
VIII. Списък на научните публикации	65
IX. Приложения	69

Използвани съкращения и означения:

BABA - DL- β -амино- α -маслена киселина

Bacillus thuringiensis – (Bt)

Bacillus thuringiensis subspecies *israelensis* - (Bti)

Bacillus thuringiensis subspecies *kurstaki* – (Btk)

CAS – продукция на сидерофори върху агарова среда

CFS- безклетъчна супернатанта

Cfu – колонообразуващи единици

CMC- карбоксиметилцелулоза

CS – клетъчна суспензия

DO – разтворен кислород

DSM- Difco sporulation medium

ET - етилен

FeIII- желязни йони

GA3-гиберелинова киселина

GC– Анализ на количественото съдържание на фитохормони в културални течности чрез използваната на Газова хроматография

GLU- глюкоза

HCN - цианиди

IAA – индолицетна киселина IAM- индол-3-ацетамид

ISR- индуцирана системна резистентност от растенията

NBRIP – Хранителна среда за установяване синтезата на фосфатазни ензими Ni - никел

PGP- стимулиране растежа на растенията

PGPR- Подпомагащи растежа и развитието на растенията ризобактерии

PR- протеини водещи до патогенеза

SA- салицилова киселина

SAR – придобита системна резистентност от растенията Trp-триптофан

VIC_s – летливи неорганични съединения

VOC- летливи органични съединения

ACC- 1-аминоциклопропан-1-карбоксилна киселина

BCA - биологичен контролен агент

μ m- микрометра

Сmm- *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Хсv - *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Batch fermentation process- дълбочинно периодично култивиране

КДА – картофно-декстрозен агар

МО- микроорганизми

ХС- Хранителна среда

ХС1- Хранителна среда 1

ХС2- Хранителна среда 2

ХС3- Хранителна среда 3

БАВ- биологично активни вещества

I Увод

Биоземеделителното чрез използването на биоторове подобрява почвеното биоразнообразие и осигурява безопасността и качеството на храните. То се осъществява чрез използването на различни групи микроорганизми (МО), които са включени в групата на подпомагащите растежа на растенията риозбактерии (PGPR). Използването на биоторове повишава съдържанието на микро- и макроелементи в почвата чрез разтварянето на неорганичните фосфати, фиксирането на атмосферният азот, производството на антибиотици, синтезата на фитохормони, които регулират растежа на растенията. Биоторовете, като почвен инокулант допринасят за кръговрата на вещества в почвата и повишават добивите на растителни видове с индустриално значение (Singh et. al., 2020).

Биоторовете са вещества, които съдържат живи микроорганизми, които колонизират ризосферата на растенията и увеличават количеството на хранителни вещества в почвата. Също така, МО синтезират фитохормони, които регулират растежа и развитието на растенията (Bhattacharjee and Dey, 2014).

За търговската употреба на ризобактерии е важно създаването на препарати с дълъг срок на годност (Omer, 2010). Това може да се постигне чрез производството на гранулирани, прахообразни формулировки, микрокапсули и маслено-емулсионни формулировки. Сухите формулировки се предпочитат пред течните, тъй като осигуряват дълъг срок на годност и са по-лесни за съхранение и транспортиране (Omer, 2010). При прахообразните формулировки е препоръчително щам да бъде под формата на спори, за да се повиши срока на годност и ефективността на продукта. Установено е, че представителите на род *Bacillus* продуцират устойчиви на топлина и изсушаване спори, които могат да бъдат включени в състава на нови биоформулировки с дълъг срок на годност (Caesar and Burr, 1991).

Представителите на род *Bacillus* са широко разпространени в ризосферата и тяхната PGP активност е известна от много години (Lyngwi and Joshi, 2014). Видовете, принадлежащи към род *Bacillus* продуцират различни видове извънклетъчни ензими, които осъществяват биоконтрола на различни фитопатогени. Видът *Bacillus subtilis* е широко използван агент за биоконтрол, поради способността му да образува ендоспори и да синтезира различни биологично активни съединения с широк спектър на действие (Omer, 2010).

Представителите на вида *B. thuringiensis* се използват за производството на биопестициди. Установено е, че те са ефективни срещу протозои, нематоди, плоски червеи, акари и насекоми (Boucias and Pendland, 1998).

II. Експериментална схема



III. Цел и задачи:

Целта на дисертационната работа е:

Изследване на морфологичните, физиолого-биохимичните характеристики и биосинтетичния потенциал на ризосферни щамове от род *Bacillus* и доказване на тяхната PGP активност при приложението им върху моделни растения със стопанско значение.

За постигане на поставената цел са формулирани следните задачи:

1. Морфологично, физиолого-биохимично и молекулярно-генетично охарактеризиране на избраните щамове от род *Bacillus*.

2. Дълбочинно култивиране на избрани щамове и изследване на основни PGP-активности.

2.1. *Конструиране на подходящи хранителни среди за дълбочинно култивиране на избраните щамове.*

2.2. *Изследване на антимикробната активност на щамове от род *Bacillus* срещу бактериални патогени и филаментозни гъби.*

2.3. *Изследване синтезата на литични ензими от избраните щамове.*

2.4. *Изследване синтезата на индол-оцетна киселина, при развитието на щамове от род *Bacillus* в избраните хранителни среди.*

2.5. *Изследване на споролацията на щамове от род *Bacillus* при развитието им в избраните хранителни среди.*

3. Оптимизиране на условията за дълбочинно култивиране на изследваните щамове от род *Bacillus*.

4. Изследване ефекта на безклетъчна супернатанта (CFS) от избраните щамове и растежните регулатори (GA3 и IAA) върху развитието на технически растителни култури.

4.1. *Изследване ефекта на CFS от изследваните щамове върху семена от къдрава салата (*Lactuca sativa*).*

4.2. *Изследване ефекта на CFS от изследваните щамове върху семена от градински грах (*Pisum sativum*).*

4.3. *Изследване ефекта на растежни регулатори върху семена от градински грах (*Pisum sativum*).*

5. Изследване ефекта на безклетъчна супернатанта от избраните щамове и растежни регулатори върху развитието на етерично-маслени

растителни култури.

5.1. Третиране на растения от риган (*Origanum vulgare subsp. hirtum*) с клетъчна суспензия от подобрите щамове и с растежни регулатори (GA3 и IAA).

5.2. Екстракция на суха листна биомаса от риган и газово-хроматографски анализ за съдържанието на тимол в растителните екстракти от риган.

IV. Материали и методи

IV.1. Микроорганизми

Обект на изследване в настоящата дисертация са ризосферни бактерии от род *Bacillus*, които са новоизолирани и неидентифицирани щамове от почвени проби, по съвместни проекти между катедра „Биотехнология“ на Биологически факултет към СУ „Св. Климент Охридски“ и фирма РОМБ ООД.

IV.2. Разтвори и буфери.

IV.3. Семена и растения

IV.4. Методи за съхранение на изследваните щамове.

IV.5. Методи за култивиране и контрол на изследваните щамове.

IV.6. Методи за морфологично и физиологично охарактеризиране.

IV.7. Биохимични и асимилационни характеристики.

IV.8. Генетични методи за идентификация на бактериалните щамове.

IV.9. Аналитични методи за определяне на PGP- активности.

IV.10. Методи за изследване ефекта на безклетъчна супернатанта от подобрите щамове върху развитието на технически растителни култури.

IV.11. Изследване на биологичната активност на клетъчна супернатанта от културални течности върху развитието на растения от риган (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*).

IV.12. Обработка на резултатите.

V. Резултати и обсъждане.

Обект на изследване в настоящата дисертация са пет ризосферни щама от род *Bacillus*, изолирани от почвени проби, част от колекцията на катедра “Биотехнология” на Биологически факултет към СУ „Св. Климент Охридски“. Изследователската работа е осъществена по съвместен проект между катедра “Биотехнология” и фирма РОМБ ООД.

V.1. Морфологично, физиолого-биохимично охарактеризиране и молекулярно-генетично идентификация на щамове от род *Bacillus*.

V.1.1. Физиологична характеристика и ензимен профил на изследваните щамове

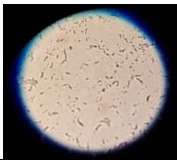
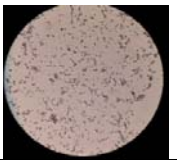
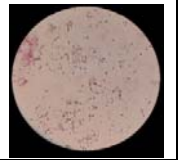
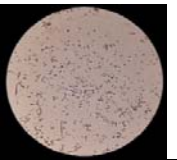
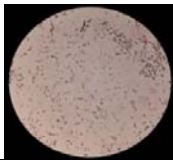
Новоизолираните ризосферни бактерии първоначално са охарактеризирани чрез набор от различни морфолого-физиологични и биохимични тестове. Всичките щамове са Грам (+), каталазо-положителни, спорообразуващи, с пръчковидна форма на клетките и се развиват добре в аеробни условия. Изолатите показват много добър растеж в диапазона 25 – 30 °C на КДА. (Таблица 4).

Групираны са предимно по двойки, като се наблюдават и единични клетки. От всички изследвани щамове при щам 13VR, е установен най-голям размер на клетките. Най-малък размер на клетките е отчетен при щам 9VR. (Таблица 4).

Установено е, че всички щамове са каталазо–положителни и отделят амониеви йони в ХС1. Положителен тест за отделянето на амониеви йони (NH_4^+) е получаването на наситено жълто оцветяване след добавянето на реактив на Неслер към развитите щамове (Таблица 4). При контролата не се наблюдава жълто оцветяване. Наситено жълто оцветяване се наблюдава при всички изследвани щамове на род *Bacillus*. Амониитеви йони са вторичен метаболит от катаболизма на аминокиселините и се отнасят към летливите органични съединения (VICs), синтезирани от микроорганизми, като странични продукти от синтезата на първични метаболити. Амониитеви йони съдържат сяра или азосъединения като: CO_2 , CO , H_2 , HCN , H_2S , NH_3 и HE . Установено е, че те проявяват антагонистична активност срещу фитопатогени като: *A. niger* или *Penicillium italicum*. Също така, те осъществяват бактериалната защита срещу антибиотици. Интересното е, че амоният увеличава устойчивостта на Грам (-) и Грам (+) бактерии към антибиотици (Caulier et. al., 2019). Gao et. al. (2018) показват, че,

VIC_s, продуцирани от щам *B. subtilis* CF-3 в 24-часова супернатанта (24hFL) инхибира растежа на мицела на *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium expansum*, *Monilinia fructicola* и *Alternaria alternata*. Отделянето на амониев и йони в почвата води до повишаване на нейното рН до 9–9,5. Установено е, че алкалната среда инхибира прорастването на спорите на много видове филаментозни фунги и може да намери приложение в биоконтрола на видове филаментозни фунги. (Sebastian et. al., 2021).

Таблица 4. Морфологични и физиолого-биохимични характеристики на изследваните щамове от род *Bacillus*.

Морфологични характеристики	6VR	7VR	8VR	9VR	13VR
размер на клетките	0.6-0.8 µm	0.2 - 0.3 µm	0.8 - 1.0 µm	0.1 - 0.2 µm	1.2 - 2.0 µm
морфология на колонии	сбръчкан изпъкнал конус, бледо жълт цвят, матови	блестящи равни краища, леко изпъкнали, бледо сиви	плоски, безцветни матови	бели, непрозрачни	розови, матови, плоски
образува спори	+	+	+	+	+
форма на клетките	пръчковидна	пръчковидна	пръчковидна	пръчковидна	пръчковидна
Температура на растеж	25-30° C	25-30° C	25-30° C	25-30° C	25-30° C
Оцветяване по Грам	+	+	+	+	+
Снимки след оцветяване по Грам					
Биохимични характеристики	6VR	7VR	8VR	9VR	13VR
Каталазна активност	+	+	+	+	+
Оксидазна активност	-	-	-	-	-
Продукция на амониев и йони (NH ⁺)	+	+	+	+	+

„-“ няма активност; „+“ има активност

Щамове 7VR и 13VR показват сходен фенотип и биохимични характеристики. Щам 13 VR може да се диференцира от щам 7VR по наличието на кристали, видими под фазовоконтрастен микроскоп. Наличието на кристали в клетката е потвърждение, че щам 13VR, принадлежи към вида *B. thuringiensis*. На кристалите се дължи токсичността на тази бактерия към различни насекоми и

този вид може да се използва за биологичен контрол на насекоми от род *Leptidoptera* (Chagas et al., 2015).

Спорите, образувани от представителите на род *Bacillus* са устойчиви на високи температури, радиация и други неблагоприятни условия на околната среда, като запазват жизнеността си за дълъг период от време. (Georgieva et al., 2019). Това ги прави подходящи за включването им в ефективни биопестицидни продукти, както и в продукти, стимулиращи растежа и развитието на растенията (Miljaković et al., 2020; Caulier et al., 2019).

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

Системата за изпитване API 50 CHB е стандартизирана за идентифициране на грам-положителни микроорганизми въз основа на 49 асимилационни теста и база данни (<https://apiweb.biomerieux.com>). Фенотипната идентификация на щамовете е осъществена чрез API 50CHB тест (Biomerieux, Marcy-L'Étoile, FRA) в съответствие с инструкциите на производителя (Таблица 5). Установено, че само шест от изследваните 49 въглеродни източника (D-рибоза, D-глюкоза, D-фруктоза, D-маноза, Ескулин и D-трахелоза) от включените в теста се усвояват от всички изследвани щамове. Получените данни за асимилацията на различни въглеродни източници са обработени със софтуера APIWEB. Получени са следните резултати: щам 6VR е определен с 98% сходство с вида *Bacillus subtilis*, щам 7VR има 26.6 %, сходство с вида *Bacillus cereus*, щам 8VR има 95.7% сходство с вида *Bacillus subtilis*, щам 9VR има 99.9% сходство с вида *Bacillus pumilus* и щам 13VR има 61.0% сходство с вида *Bacillus thuringiensis*. Теста API 50CHB, намира широко приложение при идентифицирането на новоизолирани щамове от род *Bacillus* и е използван от други авторски колективи като: Solichová et al., (2019) и Guo et al., (2020).

Таблица 5. Резултати от биохимични характеристики на петте щама от род *Bacillus* – за асимилация на субстрати (API 50CHB).

Въглеродни източници	6VR	7VR	8VR	9VR	13VR
Control	-	-	-	-	-
Glycerol (GLY)	+	-	+	+	+
Erythritol (ERY)	-	-	-	-	-
D-arabinose.(DARA)	-	-	-	-	-
L-arabinose (LARA)	+	-	+	+	-
D-ribose (RIB)	+	+	+	+	+
D-xylose (DXYL)	+	-	+	+	-
L-xylose (LXYL)	-	-	-	-	-
D-xylose (ADO)	-	-	-	-	-
Methyl-beta-D-xylopyranoside (MDX)	-	-	-	-	-
D-galactose (GAL)	-	-	-	-	-
D-glucose (GLU)	+	+	+	+	+
D-fructose (FRU)	+	+	+	+	+
D-mannose (MNE)	+	+	+	+	+
L-sorbose (SBE)	-	-	-	-	-
L-rhamnose (RHA)	-	-	+	-	-
Dulcitol (DUL)	-	-	-	-	-
Inositol (INO)	+	-	+	-	-
D-mannitol (MAN)	+	-	+	+	-
D-sorbitol (SOR)	+	-	+	-	-
Methyl-alpha-D-mannopyranoside (MDM)	-	-	-	-	-
Methyl-alpha-D-glucopyranoside (MDG)	-	-	+	-	-
N-acetylglucosamine (NAG)	+	+	-	+	+
Amygdalin (AMY)	+	-	+	+	-
Arbutin (ARB)	+	-	-	+	+
Esculin ferric citrate (ESC)	+	+	+	+	+
Salicin (SAL)	+	-	-	+	+
D-cellobiose (CEL)	+	-	-	+	-
D-maltose (MAL)	+	+	+	-	+
D-lactose (bovine origin) (LAC)	-	-	-	-	-
D-melibiose (MEL)	+	-	+	-	-
D-saccharose (sucrose) (SAC)	-	-	+	+	-
D-trehalose (TRE)	+	+	+	+	+
Inulin (INU)	-	-	-	-	-
D-melezitose (MLZ)	-	-	-	-	-
D-raffinose (RAF)	+	-	+	-	-
Amidon (starch) (AMD)	+	-	+	-	+
Glycogen (GLYG)	+	-	+	-	+
Xylitol (XLT)	-	-	-	-	-
Gentiobiose (GEN)	-	-	-	+	-
D-turanose (TUR)	-	-	+	-	-
D-lyxose (LYX)	-	-	-	-	-
D-tagatose (TAG)	-	-	-	+	-
D-fucose (DFUC)	-	-	-	-	-
L-fucose (LFUC)	-	-	-	-	-
D-arabitol (DARL)	-	-	-	-	-
L-arabitol (LARL)	-	-	-	-	-
Potassium gluconate (GNT)	+	-	-	-	-

Potassium 2-ketogluconate (2KG)	-	-	-	-	-
Potassium 5-ketogluconate (5KG)	-	-	-	-	-
Сходство %	98%	26.6%	95.7%	99.9%	61.0%

(+) асимилира; (-) неасимилира

Получените резултати потвърждават принадлежността на щамовете към род *Bacillus*, но видова идентификацията на два от изследваните щамове 7VR и 13VR е с ниска степен на достоверност. Поради тази причина е изследван и ензимния профил на работните щамове чрез тест системата API ZYM. Получените резултатите са представени в Таблица 6.

Таблица 6. Биохимични характеристики на петте щама от род *Bacillus* – ензимни активности (API ZYM).

Ензим	6VR	7VR	8VR	9VR	13VR
Алкална фосфатаза	0,5	1	0	2	0
Естераза	4	4	4	4	3
Естеразо-липаза	3	2	3	3	2
Липаза	0	0	0	0	0
Левцинова.-аминопептидаза	0,5	0,5	0	0	0,5
Валинова-аминопептидаза	0	0,5	0	0	0
Цистеинова-аминопептидаза	0,5	0	0,5	0	0
Трипсин	0	0	0	0	3
Химотрипсин	0	0	0	0,5	0
Кисела фосфатаза	2	4	2	1	1
Фосфохидролаза	1	2	1	1	1
α -галактозидаза	0,5	0	0	0	0
β -галактозидаза	0	0	0	0	0
β -глюкокоронидаза	0	0	0	0	0
α -глюкозидаза	3	0,5	1	2,5	0
β -глюкозидаза	5	0	5	0	0
α -глюкозаминидаза	0	0	0	0	0
α -манозидаза	0	0	0	0	0
α -фукозидаза	0	0	0	0	0

Ензимната активност се определя по следната скала: '0' (липса на ензимна активност) до '5' (максимална ензимна активност).

При щам 6VR и щам 8VR се наблюдава изразена β -глюкозидазна активност.

При изследваните щамове 6VR, 8VR, 7VR и 9VR се наблюдава слабо изразена α -галактозидазна активност. За щам 13VR е характерно слабо изразена естеразна и трипсинова ензимна активност. Щам 7VR се отличава с висока естеразна и фосфатазна активност. За щам 9VR е характерна висока естеразна и по-слабо изразена α -глюкозидазна активност. Важно е да се отбележи, че продукцията на фосфатазни и фосфохидролазни ензимни активности от представители на ризосферната микрофлора има пряко значение за превръщането на източниците на органичен фосфор в почвата в разтворима и по-лесно усвоима от растенията форма (Caldwell, 2005; Calvo et al, 2014). От друга страна фосфотриестерите се използват като инсектициди в борбата с различни нематоди (Panda et. al., 2005).

V.1.2.Молекулярно-генетично охарактеризиране на щамове от род *Bacillus*.

Видовата идентификация на всеки нов изолат е важно 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 за секвениране на гена за 16S рДНК и сравнение на получените секвенции със световните бази данни (NCBI). Анализът на 16S рДНК последователности е често използван метод за идентификация на микроорганизми (Naveed et al., 2013, Zahid et al., 2015).

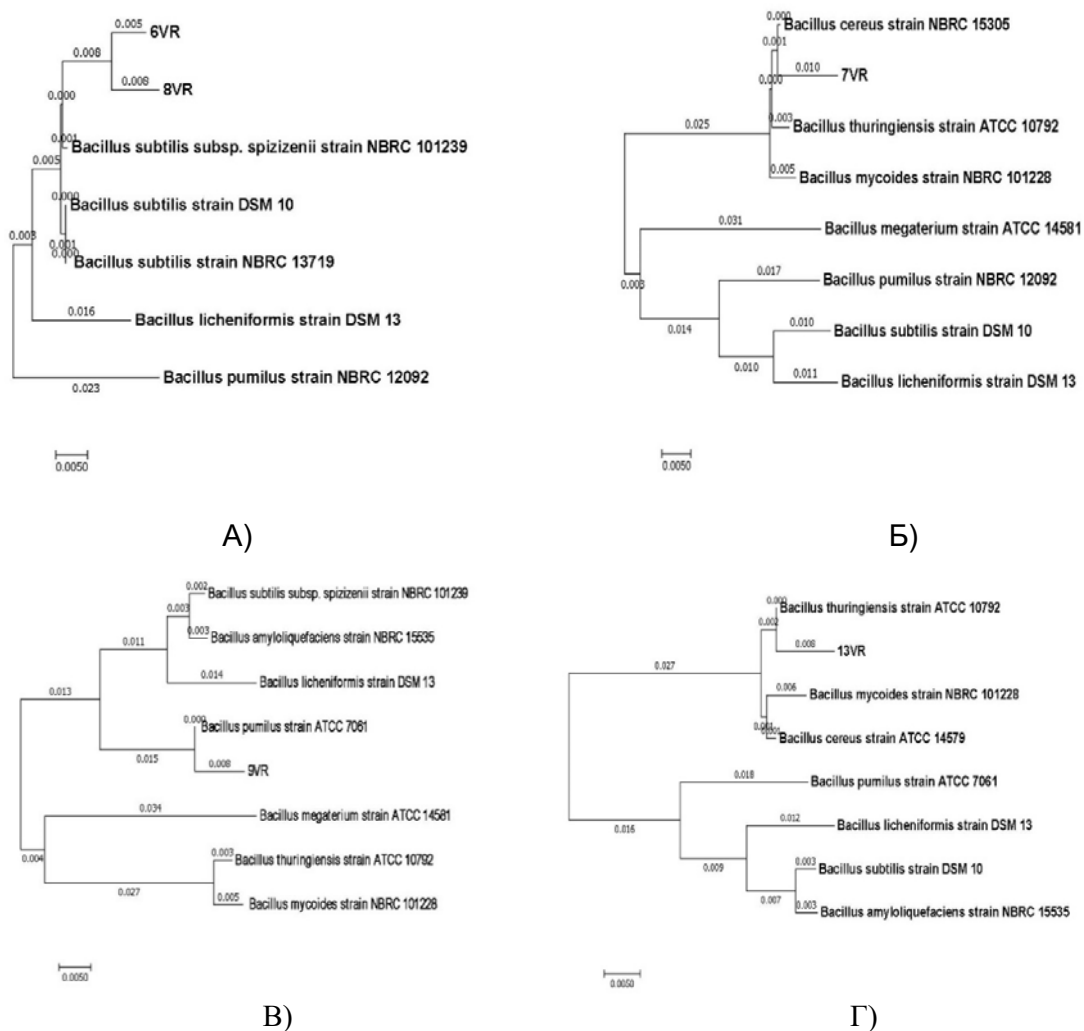
Въз основа на описаната методика в част Материали и методи петте бактериални ризосферни изолата са молекулярно-генетично идентифицирани като получените данни са представени в Таблица 7.

Таблица 7. Молекулярно-генетична идентификация на щамове от род *Bacillus* на базата на секвенционен 16S рДНК анализ.

Щам	Вид	Процент сходство
6VR	<i>Bacillus subtilis</i>	99%
7VR	<i>Bacillus cereus</i>	99%
8VR	<i>Bacillus subtilis</i>	98%
9VR	<i>Bacillus pumilus</i>	98%
13VR	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%

От представените резултати в Таблица 7 се вижда, че два от изследваните

щамата, 6VR и 8VR, са идентифицирани, като *Bacillus subtilis*. Другите щамове принадлежат към три различни вида: 7VR към *Bacillus cereus*, 9VR към *Bacillus pumilus* и 13VR към *Bacillus thuringiensis*. Получените последователности на всеки от петте щамата и подобни последователности от тясно свързани видове от род *Bacillus* са използвани за конструиране на филогенетичното дърво. Филогенетичната принадлежност на петте щамата е представена на Фиг. 2: А) 6VR и 8VR, Б) 7VR, В) 9VR, Г) 13VR.



Фигура 2. Филогенетично дърво на А) *Bacillus subtilis* 6VR и *Bacillus subtilis* 8VR, Б) *Bacillus cereus* 7VR, В) *Bacillus pumilus* 9VR, Г) *Bacillus thuringiensis* 13VR.

Молекулярната характеристика и типизирането на петте ризосферни щамата потвърдиха принадлежността им към видове от род *Bacillus*. Идентификацията на ризосферните щамове *Bacillus subtilis* 6VR, *Bacillus cereus*

7VR, *Bacillus subtilis* 8VR, *Bacillus pumilus* 9VR и *Bacillus thuringiensis* 13VR в настоящото проучване ги прави подходящи за включване им в нови търговски продукти, насърчаващи растежа на растенията и осигуряването на безопасност при тяхната употреба (Georgieva et al., 2019).

V.2. Култивиране на подобрени щамове на клатачен апарат и изследване на основни PGP-активности.

V.2.1. Конструирани на подходящи хранителни среди за дълбочинно култивирне на подобрените щамове.

Narayana et al. (2009) установяват, че глюкозата е един от най-подходящите и лесно усвоими въглеродни източници, използвани за продукцията на IAA. Различни научни колективи са изследвали ефекта на аминокиселини, използвани, като прекурсори за синтезата на индол-оцетна киселина от различни родове ризобактерии. Така е установено, че L-триптофана е основният прекурсор за синтезата на IAA от микроорганизми (Narayana et. al., 2009; Sivasankari, 2016; Wagi, and Ahmed, 2019). Освен L-триптофана те изследват ефекта и на други аминокиселини с по-ниска цена от тази на триптофана, като прекурсори за синтезата на IAA (Narayana et. al, 2009).

В резултат от проведената литературна справка са конструирани три хранителни среди - XC1, XC2 и XC3 за дълбочинно култивиране на работните щамове на клатачен апарат, с цел повишаване количеството на биомасата и увеличаване синтезата на индол-оцетна киселина. Съставът на трите хранителни среди е подробно описан в частта Материали и методи.

V.2.2. Изследване на антимикробната активност на щамове от род *Bacillus* срещу бактериални патогени и филаментозни гъби.

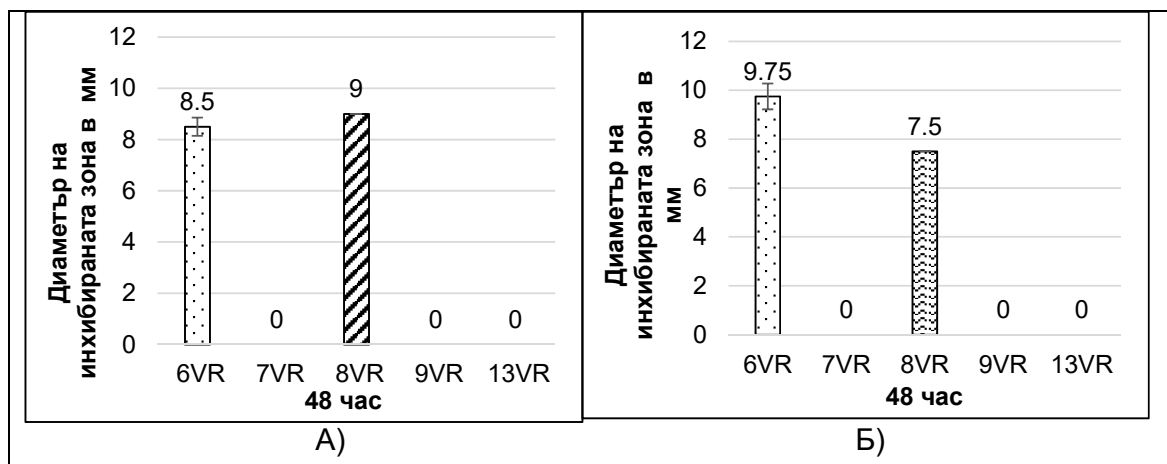
V.2.2.1. Изследване на антибактериалната активност на щамове от род *Bacillus* срещу бактериални патогени.

Растенията са обект на различни заболявания, причинени от бактерии, плесени и вируси, които обитават почвата. Болестите по растенията водят до значителни загуби при добивите на реколтите (Shuping et al., 2017). За изследване на антагонистичната активност на работните щамове срещу бактериални фитопатогени са използвани тест-патогенните бактерии: *Clavibacter*

michiganensis subsp. *michiganensis* BTCC 2425 и *Xanthomonas vesicatoria* BTCC 2427. Фитопатогенът *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* се определя като един от основните причинители на бактериални инфекции по домати, като причинява значителни загуби в добивите (Abo-Elyousr et. al., 2019). *Xanthomonas vesicatoria* причинява т. нар. бактериално петнисто заболяване с образуването на лезии по листата, стеблата и плодовете на пипер и домати, и намалявайки съществено добивите (Kyeon et al., 2016; Kizheva et al., 2011). В литературата съществуват данни, че най-често използваните видове за биологичен контрол срещу *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* BTCC 2425 и *Xanthomonas vesicatoria* BTCC 2427 са представителите на род *Bacillus*, включвайки видовете *B. subtilis* и *B. pumilus* (Milijašević- Marčić et al., 2018). Биоконтролът, осъществяван от представители на род *Bacillus* е в резултат от антибиозата, чрез синтезата на антибиотиците: итурин, сурфактин и фенгицин (Wacon et al., 2015; Sawoy et al., 2011).

Антагонистичната активност е определена чрез използването на метода на дифузия в агар и получените резултати са представени на Фиг. 3 и са визуализирани в Приложение 1. Установено, е че само два от изследваните пет щама от род *Bacillus* проявяват антигонистична активност към *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* BTCC 2425. Щам *Bacillus subtilis* 6VR и *Bacillus subtilis* 8VR демонстрират различна степен на антагонистичен ефект срещу тестваните фитопатогени. Това са щамове *Bacillus subtilis* 6VR и *Bacillus subtilis* 8VR (Фиг. 3). Срещу *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* BTCC 2425 най-висока антагонистична активност е отчетена при щам *B. subtilis* 8VR с 9,0 мм диаметър на инхибираната зона, последван от щам *B. subtilis* 6VR с 8,5 мм (Фиг. 3, Б). Щамове *B. pumilus* 9VR, *B. cereus* 7VR и *B. thuringiensis* 13VR не проявяват антагонистична активност срещу тестваните бактериални фитопатогени. Съществуват голям брой публикации за представителите на род *Bacillus*, потвърждаващи използването на видове от род *Bacillus* за биоконтрол на плесенни и бактериални фитопатогени (Abo-Elyousr et. al., 2019). Jung et. al. (2014) установяват, че изолатът DJA-51, идентифициран като *B. subtilis* проявява антагонистична активност срещу *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ATCC 7429. Това е потвърждение на резултатите, получени в нашето изследване. Търговският препарат Gamair съдържа щам *B. subtilis* M-22, който се използва за контрол на бактериални заболявания по домати, причинени от *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* и *Pseudomonas corrugata*.

(Wang et. al., 2018). Nandi et al. (2018) установяват, че използването на биоформули, съдържащи щамове *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* успешно контролира болестта на тумори по домати, причинена от Сmm. Получените от тях резултати показват, че прилагането на биоформули, съдържащи PGPR в полеви условия, е безопасен и екологичен метод за защита на реколтата от домати срещу развитието на тумори и водят до повишаване на добивите от домати.



Фигура 3. Изследване на антибактериалната активност на *B. subtilis* 6VR, *B. cereus* 7VR, *B. subtilis* 8VR, *B. pumilus* 9VR и *B. thuringiensis* 13VR срещу А) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* BTCC 2425 и Б) *Xanthomonas vesicatoria* BTCC 2427.

Болестта на бактериалните петна по домати засяга както листата, така и плодовете и се причинява от фитопатогена *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Хсв). Използвани са различни стратегии за контрол на бактериалните петна, като използването на химични пестициди, трансгенно устойчиви растения, както и използването на различни родове микроорганизми като агенти на биологичен контрол. Упражняването на биологичен контрол чрез използването на микроорганизми е екологична алтернатива на химичните пестициди. Въз основа на представените данни от други авторски колективи е изследвана антибактериалната активност на петте щамове срещу *Xanthomonas vesicatoria* BTCC 2427. Получените резултати са представени на Фиг. 3, А) и са визуализирани в Приложение 1. Срещу *Xanthomonas vesicatoria* BTCC 2427 най-висока антагонистична активност от изследваните щамове е измерена при щам *B. subtilis* 6VR с 9,75 mm диаметър на лизиралата зона, последван от щам *B. subtilis* 8VR с 7,5 mm (Фиг. 3, А). Получените резултати се потвърждават и от други автори

(Kizheva. et. al., 2020; Chandrasekaran et. al., 2018; Kizheva et al., 2011; Massomo et. al., 2004). Доказано е, че използването на видове от род *Bacillus* за третиране на растителни култури с индустриално значение, значително намалява честотата от възникване на заболяванията, причинени от фитопатогена *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Chandrasekaran et. al., 2018; Licheva et. al. 2011).

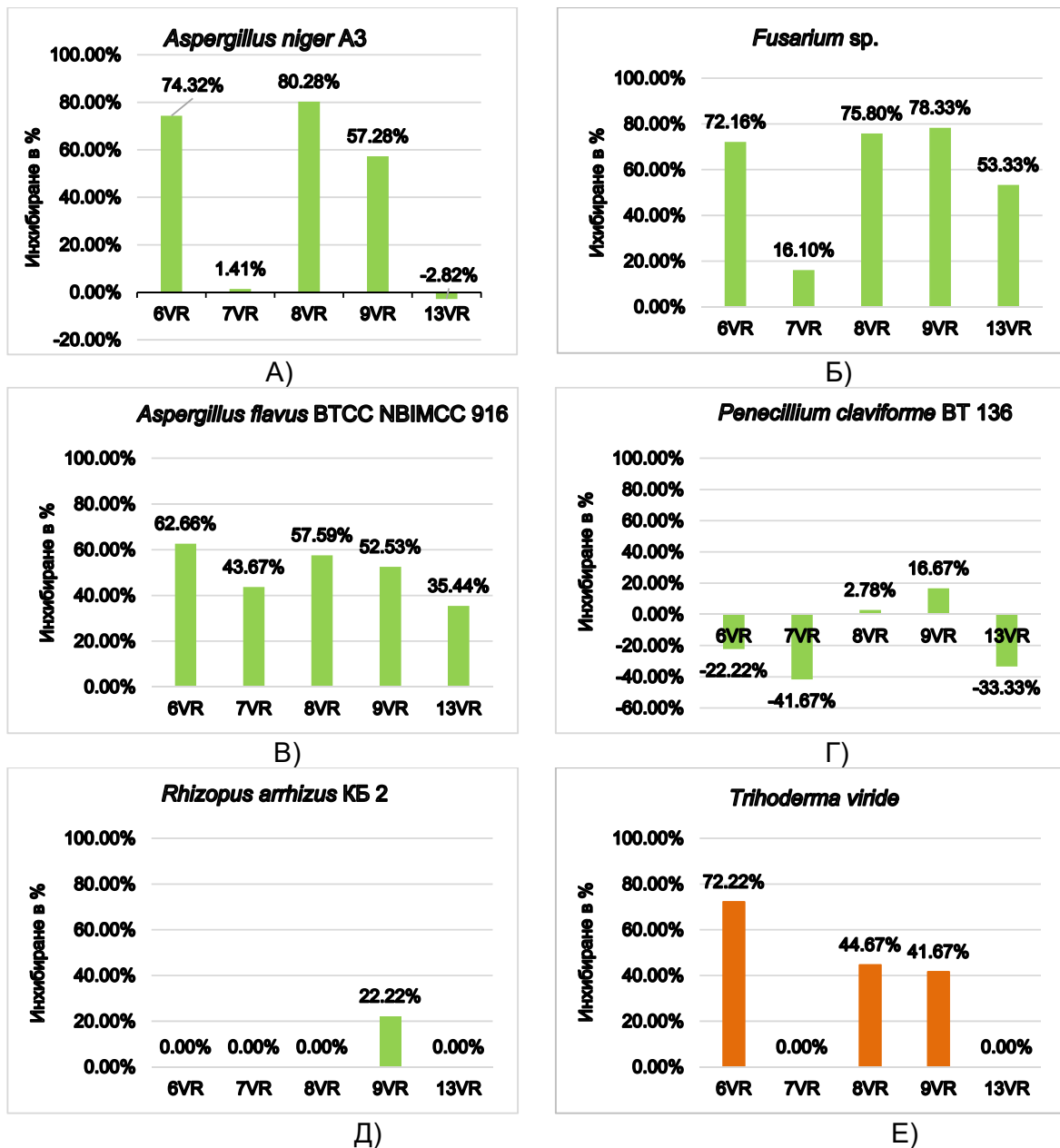
V.2.2.1. Изследване на антигъбната активност на щамове от род *Bacillus* срещу филаментозни гъби.

Представителите на род *Bacillus* синтезират голям брой биологично активни вещества, които инхибират развитието на различни фитопатогенни микроорганизми. Въз основа на тези данни е изследвана антигъбната активност на петте бактериални щамове срещу различни 6 тест-плесени, вредни за растенията и опасни за хранителната верига видове. Проведен е *in vitro* тест срещу микромицети от видове *Fusarium sp.*, *Penicillium claviforme*, *Rhizopus arrchizus* и *Aspergillus flavus*, *Trichoderma viride* с цел определяне инхибиторния ефект на изследваните щамове от род *Bacillus* по отношение развитието на плесенните. Ефектът на инхибиране при шестте тест-микромицетни щамове е определен чрез сравнение на диаметъра на формираните колонии в присъствие на всеки от изследваните щамове с контрола. От получените резултати се вижда, че се наблюдават значими инхибиторни ефекти, които са представени на Фиг. 4.

Установено е, че щам *B. subtilis* 6VR проявява висок процент на инхибиране срещу изследваните микромицети: *Aspergillus niger* АЗ– 74, 32% и *Fusarium sp.*– 72,16%. Също така е доказано, че щам *B. subtilis* 6VR инхибира развитието на *Trichoderma viride* с 72,22% и на *Aspergillus flavus* BTCC NBIMCC 916 с 62,66 %. Изследваният щам не инхибира развитието на *Penicillium claviforme* BT 136 и *Rhizopus arhisus* КБ 2. Получените резултати се потвърждават и от други авторски колективи, изследвали антагонистичната активност на щамове, принадлежащи към вида *Bacillus subtilis* срещу изследваните тест микроорганизми: *A. niger* (Podile et. al. 1996); *F. graminearum* (Zhao et. al., 2014) и *A. flavus* (Gong et. al., 2014; Kumar et. al., 2014). Установено е, че антигъбната активност на вида *B. subtilis* се дължи на производството на итурини, които притежават широк спектър на антибиотична активност (El-Hamshary et al., 2008). Освен антибиотици, представители на вида *B. subtilis* продуцират и летливи вещества, които потискат развитието на фитопатогени, като *Rhizoctonia solani* и *Pythium ultimum* (Kerr, 1999).

Коинокуланти на *T. viride* в комбинация с *B. subtilis*, се прилагат като биоконтролни агенти срещу *Fusarium solani* при семена от домати (Khalil, 2019).

При щам *B. cereus* 7VR е отчетена 43,67% инхибиторна активност срещу *Aspergillus flavus* BTCC NBIMCC 916, представена на Фиг. 4. В). При третирането на *Fusarium* spp. (Фиг. 4), е отчетена 16,10% инхибиторна активност и с 1,41% инхибира развитието на *Aspergillus niger* A3 (Фиг. 4). Щам *B. cereus* 7VR не проявява антагонистична активност срещу развитието на щам *Penicillium claviforme* BT 136 (Фиг. 4 Г) и *Trichoderma viride* (Фиг. 4 Е). Kumar et al. (2014) установяват, че щам *B. cereus* има потенциал като средство за контрол на болестите, причинени от видове *Aspergillus* при фъстъчени ядки (Kumar et. al., 2014). *B. cereus* произвежда азоксибацилин, който проявява антагонистична активност срещу *Aspergillus* spp., бацереутин, активен срещу *Saccharomyces*, *Rhizomucor*, *Fusarium* and *Paecilomyces*, циспентацин, активен срещу *C. albicans* и микоцереин и итурин - антибиотици с антигъбна активност, инхибиращи растежа на *Saccharomyces cerevisiae*. *Bacillus* sp. YM-03709B синтезира YM-47522, активен срещу *Rhodotorula acuta* и *Pichia angusta* (Kerr J. R., 1999). Подобни резултати са докладвани и от други авторски колективи, които доказват инхибиращата активност на щам *Bacillus cereus* срещу представители на род *Fusarium* (Ajillogba et. al., 2013; El-Hamshary et. al., 2008).



Фигура 4. Определяне инхибиращият ефект в % на изследваните щамове от род *Bacillus* срещу развитието на: А) *Aspergillus niger* A3, Б) *Fusarium* sp., В) *Aspergillus flavus* BTCC NBIMCC 916, Г) *Penicillium claviforme* BT 136, Д) *Rhizopus arrhizus* КБ 2 и Е) *Trichoderma viride*.

Установено е, че щам *B. subtilis* 8VR инхибира развитието на *Aspergillus niger* A3 (Фиг. 4 А) с 80,28% на *Aspergillus flavus* BTCC NBIMCC 916 (Фиг. 4 В) с 57,59%, с 75,80% инхибира развитието на *Fusarium* spp (Фиг. 4 Б) и с 2,78% подтиска развитието на *Penicillium claviforme* BT 136 (Фиг. 4 Г). Щам *B. subtilis* 8VR не инхибира развитието на *Trichoderma viride* и *Rhizopus arrhisus* КБ 2. Антибиоти на

Bacillus spp. са наблюдавани в кокултури срещу видове, като *Penicillium* sp, *A. flavus*, *A. niger* и фитопатогени като *A. alternata*, *F. solani*, *F. oxysporum* f.sp *vasinfectum* и *Colletotrichum* sp. (Machado et al., 2010). Бациломицин D, продуциран от щам *Bacillus subtilis* fmbJ проявява висок инхибиторен ефект върху растежа на мицела, споролацията и кълняемостта на спорите на *A. flavus* (Gong et al., 2014). *Fusarium verticillioides* е един от най-често срещаните плесенни патогени в почвата, които инфектират царевицата и други селскостопански култури. Този микроорганизъм води до намаляване на качеството и количеството на добивите, като продуцира вторичните метаболити фумонизини.

Установено е, че щам *B. subtilis* CE1 инхибира развитието на този фитопатоген (Cavaglieri, 2005). Установено е, че щамове на *B. subtilis* синтезират итурин А, бациломицини L, бациломицини D, бацилопептини, ризоктицин А, които проявяват активност срещу *Candida* spp., *Aspergillus* spp. Също така, някои щамове и синтезират микосубтилини, итурин и фенгицин, които инхибират развитието на *Saccharomyces cerevisiae* и *Aspergillus* spp. (Kerr, 1999).

Щам *B. pumilus* 9VR проявява антагонистична активност срещу всички изследвани видове филаментозни фунги. Щам *B. pumilus* 9VR инхибира развитието на *Fusarium* spp. с 78,33% (Фиг. 4 Б), с 57,28% развитието на *Aspergillus niger* A3 (Фиг.4 А), с 52,53 % развитието на *Aspergillus flavus* BTCC NBIMCC 916 (Фиг. 4 В), с 41,67% развитието на *Trichoderma viride* (Фиг. 4 Е), с 16,67% развитието на *Penicillium claviforme* BT 136 (Фиг. 4 Г) и с 22,22 % развитието на *Rhizopus arrhizus* КБ 2 (Фиг. 4 Д). В литературата са публикувани много научни доклади показвайки антигъбната активност на щам *Bacillus pumilus*. Agarry et al. (2005) доказват антагонистичната активност на *Bacillus pumilus* срещу *A. niger*, *A. fumigatus*, *F. moniliforme*, *Rhizoctonia* sp. и *E. coli*. Kerr (1999) доказва, че щам *B. pumilus* проявява антигъбна активност срещу: *Fusarium oxysporum*, *Cylindrocarpon destructans* и *Pythium*.

Щам *B. thuringiensis* 13VR инхибира развитието на *Fusarium* spp. с 53,33% (Фиг. 4 Б) и с 35,44% развитието на *Aspergillus flavus* BTCC NBIMCC 916 (Фиг. 4 В). Срещу *Aspergillus niger* A3 (Фиг. 4 А), *Penicillium claviforme* BT 136 (Фиг. 4 В), *Rhizopus arrhizus* КБ 2 (Фиг. 4 Г) и *Trichoderma viride* (Фиг. 4. Д). Изследваният щам *B. thuringiensis* 13VR не проявява антагонистична активност. В литературата са публикувани много научни доклади, потвърждаващи получените от нас резултати за антигъбната активност на щам *B. thuringiensis* 13VR. Например, Ramírez et al. (2004) доказват антигъбната активност на щам *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*,

която е изследвана върху соеви семена, заразени с различни фитопатогени. Установено е, че изследваният щам инхибира 100% развитието на *S. rolfsii*; от 55% до 82% развитието на *A. terreus*, *A. flavus*, *Nigrospora* sp, *Rhizopus* sp, *A. niger*, *Fusarium* sp, *A. candidus*, *Absidia* sp. и *Helminthosporium* sp; с 45% развитието на *Curvularia* sp; и с 10% развитието на *A. fumigatus*. Също така, Sadfi et. al. (2001) показват потенциала на щамове от вида *Bacillus thuringiensis*, които се използват като средство за биоконтрол на фитопатогени от род *Fusarium*. Антагонистичната активност на род *Bacillus* срещу фитопатогенни предпазват растенията от развитието на различни заболявания (Miljaković et. al. 2020).

V.2.3. Изследване синтезата на литични ензими от подобрите щамове.

Освен установените ензимни активности при изследваните щамове от род *Bacillus* чрез използването на тест системата API ZYM (Biomérieux, Marcy-L'Etoile, FRA) са проведени и допълнителни изследвания за установяване синтезата на допълнителни литични ензимни активности. Литичните ензими имат значение за стимулиране развитието на растенията, като увеличават достъпа на растенията до хранителни вещества, както и като допълнително средство за биоконтрол на различни фитопатогени с индустриално значение. Изследвани са амилазна, хитиназна, целулазна, пектиназна и протеазна ензимни активности.

Литичните ензимни активности на петте щама от род *Bacillus* са установени чрез използването на качествени методи. Синтезираните литични ензими от представителите на род *Bacillus* (α -амилаза, хитиназа, протеаза, целулаза и пектиназа) са един от факторите инхибиращи развитието на микромицетните фитопатогени. Въз основа на тези характеристики са разработени биопестицидни препарати за растителна защита (Radhakrishnan et. al., 2017).

За оценка на амилолитичната активност на изследваните пет щама от род *Bacillus* е използван скринингов метод за качествено й определяне. Получените резултати са представени в Таблица 8. От проведения експеримент е установено, че три от изследваните щамове- 6VR, 8VR и 13VR продуцират амилолитични ензими. Подобни резултати са представени и от други изследователски екипи по отношение на ризосферни щамове на видовете *Bacillus subtilis* и *Bacillus thuringiensis* (Singh et al., 2014; Kalpana et al., 2013; Akcan, 2011; Zufahair et. al., 2016). Амилазите намират широко приложение в хранително-вкусовата, текстилната, хартиената, фармацевтичната промишленост, както и в производството на детергенти (Souza et al., 2010).

Таблица 8. Продукция на литични ензими от изследваните щамове от род *Bacillus*.

Щам	Амилазна активност	Хитиназна активност	Целулазна активност	Пектизна активност	Протеазна активност
6VR	+	+	+	+	+
7VR	-	-	-	-	+
8VR	+	+	+	+	+
9VR	-	-	-	-	+
13VR	+	+	+	+	+

“+ „ положителна реакция; “- „ няма активност

Проучен е биосинтетичния потенциал на петте работни щамове по отношение на синтезата на хитиназни ензими и получените резултати са представени в Таблица 8. Продукцията на хитиназа е установена при три от петте изследвани щамове 6VR, 8VR и 13VR (Таблица 8). Няколко проучвания доказват хитинаната ензимна активност при видовете *B. subtilis* (Singh, 2014; Senol, 2014; Torimiro, 2013; Ahlawat et. al. 2009; Wang et al., 2006;) и *Bacillus thuringiensis* (Sujan et. al., 2018; Tenorio-Sánchez et. al., 2010; Arora et. al., 2003; Liu et. al., 2002).

Освен синтезата на хитиназа е проучен и биосинтетичния потенциал на работните щамове по отношение синтезата на пектинази. Получените резултати са представени на Таблица 8. Три от изследваните щамове (6VR, 8VR и 13VR) от род *Bacillus* продуцират пектиназни ензими. В литературата са описани различни щамове от род *Bacillus*, които се използват, като индустриални продуценти на пектиназа: *B. subtilis* (Torimiro et. al. 2013; Ahlawat et. al. 2009) и *B. thuringiensis* (Sujan et al., 2018).

Установено е, че всички изследвани щамове от род *Bacillus* продуцират протеазни ензими (Таблица 8). В литературата са цитирани следните щамове от род *Bacillus*, които се използват като индустриални продуценти на протеаза: *Bacillus subtilis* (Panta et. al., 2015; Mukhtar et. al., 2013; Soares et al., 2005), *Bacillus cereus* (Nilegaonkar et. al., 2007; Banik et. al., 2004; Ghorbel et al., 2003), *Bacillus pumilus* (Ibrahim et al., 2015) и *B. thuringiensis* (Agasthya et. al., 2013; Hansen et. al., 2000). Също така е установена синтезата на целулазни ензими от щамовете 6VR и 8VR (Таблица 8). В литературата са описани следните публикации за представители на вида *B. subtilis*, които продуцират целулазни ензими (Meng et al.,

2014; Rawat et. al., 2012; Yin et. al., 2010). Целулазите от *B. subtilis* се използват за хидролиза на различни отпадни продукти от дърводобива, като субстрат за производството на биогорива.

В резултат на проведеня експеримент за продукция на литични ензими се установи, че три от изследваните пет ризосферни изолата - *B. subtilis* 6VR, *B. subtilis* 8VR и *B. thuringiensis* 13VR продуцират амилаза, хитиназа, протеаза и пектинана. За разлика от тях, щамовете *B. cereus* 7VR и *B. pumilus* 9VR продуцират само протеаза. Получените резултатите се потвърждават и от други изследователски екипи за продукцията на екстрацелуларни ензими от видове от род *Bacillus*, които са в основата за разработването на биопрепарати, които инхибират развитието на микромицетни фитопатогетни. Khan et al. (2017) и Radhakrishnan et al. (2017) доказват, че литичните ензими синтезирани от представители на род *Bacillus* са ефективно средство за биоконтрол на фитопатогени от род *Fusarium*. Представителите на род *Bacillus* се прикрепят към стените на мицелните клетки и синтезират литични ензими, като хитиназа, протеаза, целулаза, пектиназа и амилаза, които увреждат хифите на филаментозните гъби, което води до промяна в клетъчната структура и функции. Освен литични ензими, представителите на род *Bacillus* синтезират антибиотици, като итурин, фенгицин, миксирин, пумилацидин, сурфактин, които инхибират развитието на фитопатогенните филаментозни гъби в ризосферата. (Radhakrishnan et. al. 2017)

Синтезата на хитиназа и целулаза се използват като допълнително средство за биоконтрол на филаментозни фунги, принадлежащи към родовете Fusarium, Aspergillus и Rhizopus, които са патогени по техническите растителни култури и водят до значително намаляване на добрите. Освен в биоконтрола срещу различни филаментозни фитопатогени, синтезата и секрецията на литични ензими стимулира растежа и развитието на растенията, а литичните ензими участват в кръговрата на веществата в почвата.

V.2.4. Изследване синтезата на индол-оцетна киселина, при развитието на щамовете от род *Bacillus* в трите хранителни среди.

Индол-оцетната киселина (IAA) се отнася към групата на фитохормоните и

е най-широко използваният ауксин. IAA е метаболит, получен по триптофан зависим и от триптофан независими път на биосинтез в бактериите. При триптофан зависимият път на биосинтез, триптофанът се превръща в индол-3-ацетамид (IAM) от триптофан-2-монооксигеназа и IAM се метаболизира до IAA чрез индол-3-ацетамид хидролаза (Mohite B., 2013). Основните фактори, които влияят върху синтазета на IAA са продължителността на ферментацията и добавянето на индуктор в хранителната среда. Установено е, че бактериалните щамове започват да продуцират IAA след 48 час от ферментационния процес. Доказано е от различни авторски колективи, че триптофана е основният предшественик за синтезата на IAA (Bhutani et al., 2018; Harikrishnan et al., 2014; Duca et. al., 2014).

Проведено е 216 часово дълбочинно култивиране в колби с трите хранителни среди инокулирани с изследваните ризосферни щамове. Всяка от трите хранителни среда- XC1, XC2 и XC3 е с обем 150 ml и е посята с 10% бактериална клетъчна суспензия с 10^8 клетки/мл. След посева колбите са поставени на клатачен апарат, заедно с контрола. Продължителността на ферментацията е 216 часа, при температура 30 °C и разбъркване 250 оборота в минута. През определен интервал от време се взимат проби и количествено се определя синтезираното количество на IAA от всеки от изследваните щамове в трите хранителни среди. Основната функция на IAA е да стимулира растежа на корените при растенията (Chagas et al., 2015). В резултат от проведените експерименти са получени резултатите за синтезата на индол-оцетна киселина, представени в Таблица 9 на Фиг. 5 и визуализирани в Приложение 2.

Данните представени в Таблица 9 показват, че петте щама биосинтезират IAA. В настоящото изследване установихме, че добавянето на 8 mg/ml L-триптофан и 8 mg/ml L-аспарагин в средата стимулират синтезата на IAA при всички изследвани щамове от род *Bacillus* в сравнение с контролната хранителна среда 1. Визуализация на получените резултати за синтезата на индол-озетна киселина е представено в Приложение 2.

При развитието на щамове в XC1 най-добър продуцент на IAA е щам *Bacillus thuringiensis* 13VR, който в края на ферментацията продуцира 8, 45 µg/ ml IAA, последван от щам *Bacillus subtilis* 6VR 4, 07 µg/ml и щам *Bacillus subtilis* 8VR с 3,53 µg/ml. Най-слаби продуценти на IAA в XC1 са щамове: *Bacillus pumilus* 9VR (0,95 µg/ml) и *Bacillus cereus* 7VR (0,92 µg/ml) (Таблица 9).

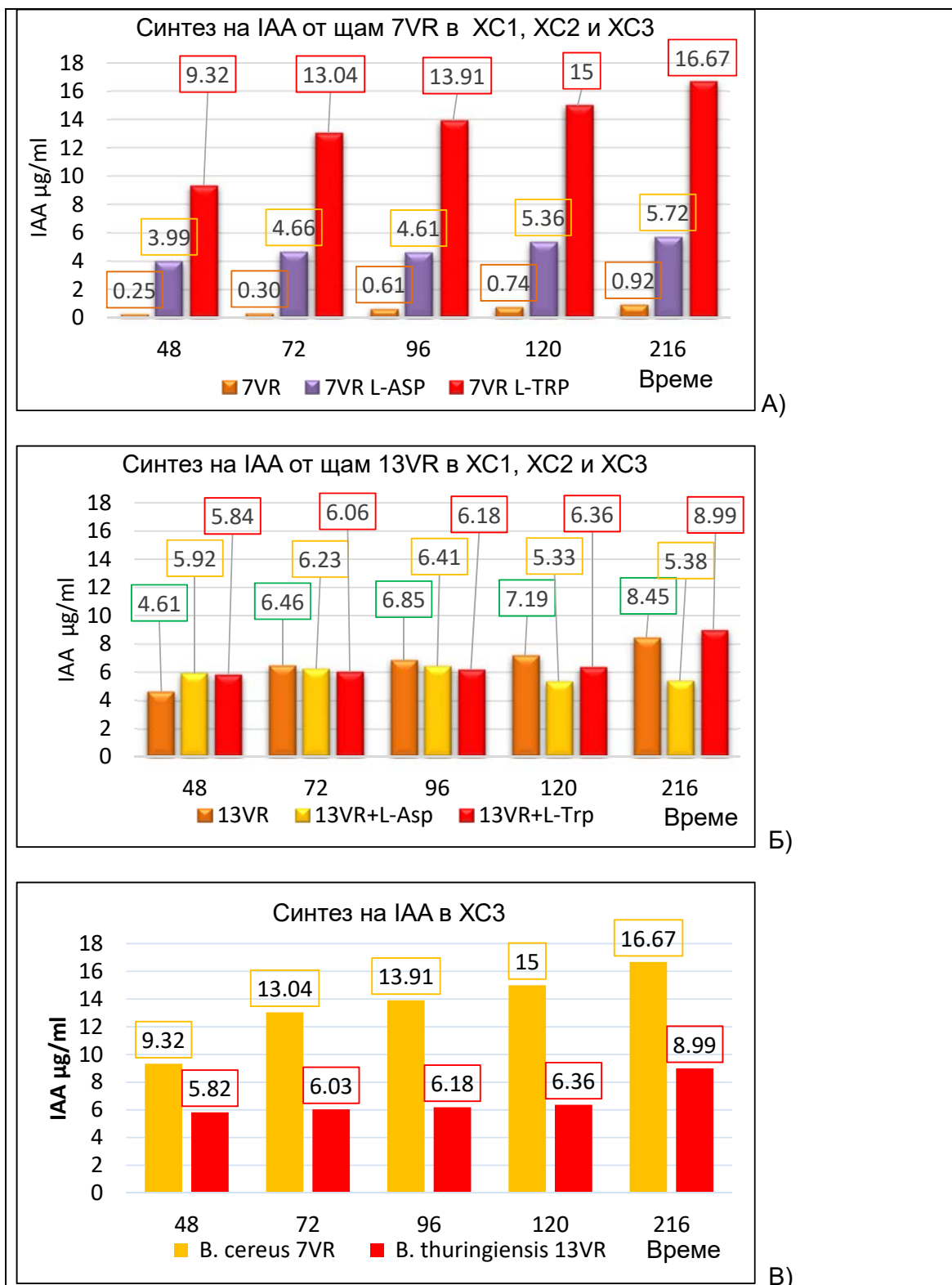
Таблица 9. Количеството на IAA, синтезирана на 120 час и 216 час в трите хранителни среди от изследваните ризосферни щамове от род *Bacillus*.

Щам	XC1		XC2		XC3	
	120ч.	216ч.	120ч.	216ч.	120ч.	216ч.
<i>B. subtilis</i> 6VR	4.12µg	4.07µg	4.02µg	5.36µg	3.96µg	5.48µg
<i>B. cereus</i> 7VR	0.74µg	0.92µg	5.36µg	5.72µg	15.00µg	16.67µg
<i>B. subtilis</i> 8VR	2.29µg	3.53µg	1.93µg	2.13µg	2.37µg	5.28µg
<i>B. pumilus</i> 9VR	0.85µg	0.95µg	1.93µg	2.93µg	2.88µg	3.11µg
<i>B. thuringiensis</i> 13VR	7.19µg	8.45µg	7.33µg	7.48µg	6.36µg	8.99µg

При развитието на щамовете в XC2, като най-добър продуцент на IAA се отличава щам *Bacillus thuringiensis* 13VR, който на 216 час от ферментацията синтезира 7,48 µg/ml IAA, последван от щам *Bacillus cereus* 7VR 5,72 µg/ml и щам *Bacillus subtilis* 6VR с 5,36 µg/ml. Най-слаби продуценти на IAA в XC 2 са щамовете: *Bacillus pumilus* 9VR (2,93 µg/ml) и *Bacillus subtilis* 8VR (2,13 µg/ml) (Таблица 9). В XC3 най-добър продуцент на IAA е щам *Bacillus cereus* 7VR, който в края на ферментацията синтезира 16,67 µg/ml IAA, последван от щам *Bacillus thuringiensis* 13VR 8,99 µg/ml и щам *Bacillus subtilis* 8VR с 5,28 µg/ml. Най-слаби продуценти на IAA в XC2 са щамовете *Bacillus subtilis* 6VR (4,48 µg/ml) и *Bacillus pumilus* 9VR (3,11 µg/ml) (Таблица 9).

На фиг. 5 А) и Б) са преставени резултатите, получени за синтезата на индол-оцетна киселина от 48 час до 216 час в трите хранителни среди за щам *B. cereus* 7VR и за щам *B. thuringiensis* 13VR. От фигурата се вижда, че максимална синтеза на индол-оцетна киселина е отчетена на 216 час от ферментационния процес и в трите изследвани хранителни среди. В сравнение с останалите хранителни среди, при развитието на щамовете в XC3 са отчетени най-висока концентрация на синтезираната индол-оцетна киселина.

На фиг. 5. В) са обобщени резултатите, получени за синтезата на индол-оцетна киселина от щамовете *B. cereus* 7VR и *B. thuringiensis* 13VR В XC3 от 48 до 216 час на ферментационния процес.



Фигура 5. Синтеза на IAA в: А) XC1, XC2 и XC3 на щам *B. cereus* 7VR; Б) XC1, XC2 и XC3 на щам *B. thuringiensis* 13VR и В) Продукция на IAA от щамове *B. cereus* 7VR и *B. thuringiensis* 13VR в XC3.

Според Mirza et al. (2001), производството на IAA при микроорганизмите може да варира между различните видове и щамове от един и същи вид. Gomes et al. (2003) доказват, че видовете *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus pumilus*, изолирани от зеле (*Brassic oleracea*), стимулират растежа и развитието на маруля (*Lactuca sativa*) в оранжерии. Щам *Bacillus cereus* синтезира IAA, зеатин и гибберелини (Karadeniz et al., 2006).

От резултатите представени на Таблица 9 и Фиг. 5 можем да направим следните изводи: най-добър продуцент на IAA в ХС3 е щам *B. cereus* 7VR. Щам *B. thuringiensis* 13VR продуцира почти еднакво количество индол-оцетна киселина и в трите хранителни среди. Компонентния състав на ХС3 стимулира синтеза на индол-оцетна киселина при всички изследвани щамове. Двата щам *B. cereus* 7VR и *B. thuringiensis* 13VR биха могли да се използват като индустриални продуценти на IAA.

V.2.5. Изследване на споролацията на щамове от род *Bacillus* при развитието им в избраните хранителни среди

При условия на стрес от околната среда, като липса на хранителни вещества, представителите на род *Bacillus* са способни да споролират. Образуването на спори е много важна характеристика на представителите на род *Bacillus*.

На Фиг.6. А) са представени резултатите от култивирането на изследваните щамове в ХС1. От фигурата се вижда, че изследваните пет щамове продуцират различно количество спори в различен етап от ферментационния процес. Най-висок брой спори е отчетен от 5-ия порядък и е установен при щам *B. cereus* 7VR на 120 часа от ферментацията. *B. thuringiensis* 13 VR продуцира максимално количество спори на 72 часа от ферментационния процес, като броят им достига 5-ия порядък. При щам *B. subtilis* 8VR максимално количество спори от 3,5-ия порядък е отчетено на 120 часа от ферментацията. Щам *B. pumilus* 9VR, максимален брой спори от 5-ия порядък е отчетен на 72 часа от култивирането. Най-малко количество спори са отчетени при щам *B. subtilis* 6VR от 3-ия порядък на 96 часа от ферментацията.

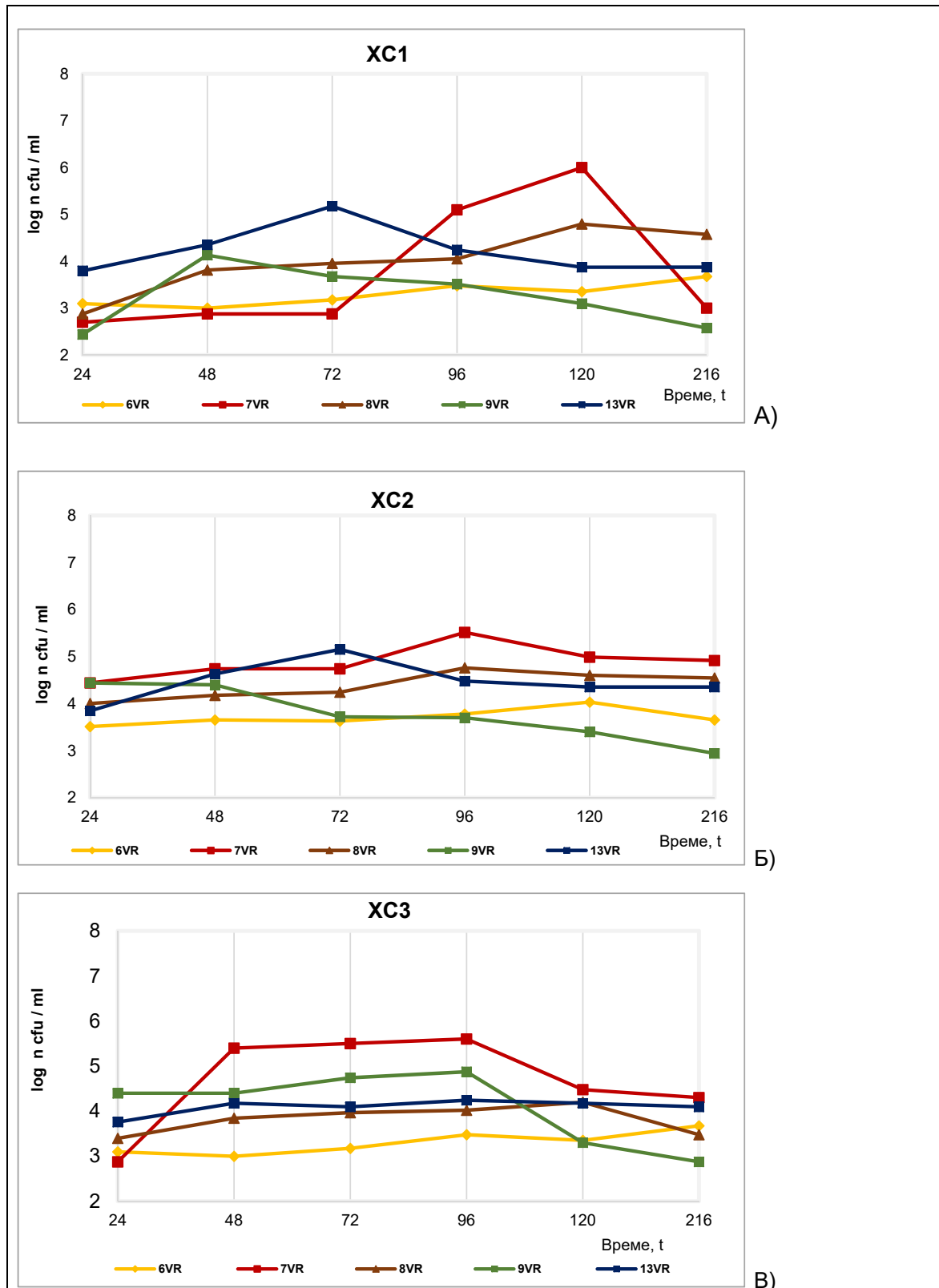
Резултатите от култивирането на изследваните щамове в ХС2 са представени на Фиг. 6. Б). От нея се вижда, че максимално количество спори са отчетени при щам *B. cereus* 7VR от 5-ия порядък на 96 часа от ферментацията.

При щам *B. thuringiensis* 13VR най-голямо количество спори са отчетени на 72 час на ферментацията от 5 порядъка. Щам *B. subtilis* 8VR максимално количество спори е отчетен на 96 час от 4 порядъка. При щам *B. pumilus* 9VR, максимален брой спори е отчетен на 24 час от култивирането, като количество на спорите е 4 порядъка. Най-малко количество спори са отчетени при щам *B. subtilis* 6VR. При този щам количеството спори се е увеличило само с 1 порядък на 120 час от ферментацията.

На Фиг. 6. В) са представени резултатите за броя на спорите при развитието на щамовете в ХС3. От фигурата се вижда, че изследваните пет щамове продуцират различно количество спори по време на ферментацията. Най-висок брой спори е отчетен при щам *B. cereus* 7VR от 6 порядъка на 96 час от ферментацията. Щам *B. pumilus* 9VR, максимален брой спори от 5 порядъка е отчетен на 96 час от култивирането. Щам *B. thuringiensis* 13VR продуцира максимално количество спори на 72 час от ферментационния процес, като броят им достига 4,5 порядъка. При щам *B. subtilis* 8VR максимално количество спори е отчетен на 96 час, с 4 порядъка. Най-малко количество спори са отчетени при щам *B. subtilis* 6VR, като количеството на образуваните спори се увеличава само с половин порядък на 120 час от ферментацията.

При щам B. subtilis 6VR и щам B. subtilis 8VR са установени набор от PGP-активности, като продуциране на литични ензими, изявена антимикуробна активност срещу различни видове филаментозни фунги. Щамовете B. cereus 7VR и B. thuringiensis 13VR синтезират индол-оцетна киселина, като по-този начин стимулират растежа и развитието на растения. Щам B. cereus 7VR продуцира спори с висока концентрация. Спорообразуването е важна характеристика при производството на биопрепарати съдържащи представители на род Bacillus. При изследване динамиката на натрупване на спори от петте изследвани щамове в трите хранителни среди може да се направи заключението, че: щам B. cereus 7VR продуцира максимално количество спори в сравнение с останалите изследвани щамове в ХС1, ХС2 и ХС3. Щам B. thuringiensis 13VR синтезира всички изследвани ензими, които в комбинация с антигъбната активност срещу представители на род Fusarium го прави ефективно средство за биоконтрол срещу този фитопатоген. Важно е да се отбележи, че от всички изследвани щамове само щам B. thuringiensis 13VR не инхибира развитието на Trichoderma viride, което го прави подходящ за

включването му в препарати в комбинация с *Trichoderma viride*.



Фигура 6. Проследяване динамиката на образуване на спори от петте изследвани щамове в 14' (XC 1) А) ,14'+ L аспарагин (XC 2) Б) и 14' + L- триптофан (XC 3) В).

V.3. Оптимизиране на условията на дълбочинно култивиране на изследваните щамове от род *Bacillus*.

С цел оптимизиране условията на култивиране на работните щамове от род *Bacillus* е проведено дълбочинно култивиране на трите новоконструирани хранителни среди. Дълбочинното култивиране е проведено на клатачен апарат с продължителност от 216 часа, при температура 30 °C и разбъркване 250 оборота в минута, като през определени интервали от време са взети и са анализирани проби за определяне на количеството на биомаса, отчетено като брой жизнеспособни клетки на единица обем културална течност и количеството на остатъчните захари в средата.

Получените резултатите от култивирането на щам *Bacillus subtilis* 6VR в XC1, XC2 и XC3 са представени на Фиг. 14. А), Б) и В). Най-висока клетъчна плътност е отчетена от 7,57 клетки/мл при развитието на щама в XC3 (Фиг. 14 В), последвана от XC2 (Фиг.14 Б) с 7,51 клетки/мл. В XC1 щама натрупва най-малко количество биомаса от 6,65 клетки/мл. Фиг. 14. А). По време на култивирането в трите хранителни среди щам *Bacillus subtilis* 6VR асимилира различно количество глюкоза. В XC1– 33%, в XC2- 26,15% и в XC3- 29,17%. В XC2 и XC3 щам *Bacillus subtilis* 6VR образува почти еднакво количество биомаса.

Развитието на щам *Bacillus cereus* 7VR в изследваните хранителни среди е представено на Фиг 15. А), Б) и В). Най-добро развитие на щам *Bacillus cereus* 7VR е отчетено в XC1 с клетъчна плътност от 8,62 клетки/мл (Фиг.15 А), последван от XC3 с 8,0 клетки/мл. В XC2 за щама са измерени 7,69 клетки/мл (Фиг. 15 Б). Най-голямо количество глюкоза щам *Bacillus cereus* 7VR усвоява в XC3-41,45%, последван от XC2 с 37,70% и XC1- 31,6% (Фиг.15 В).

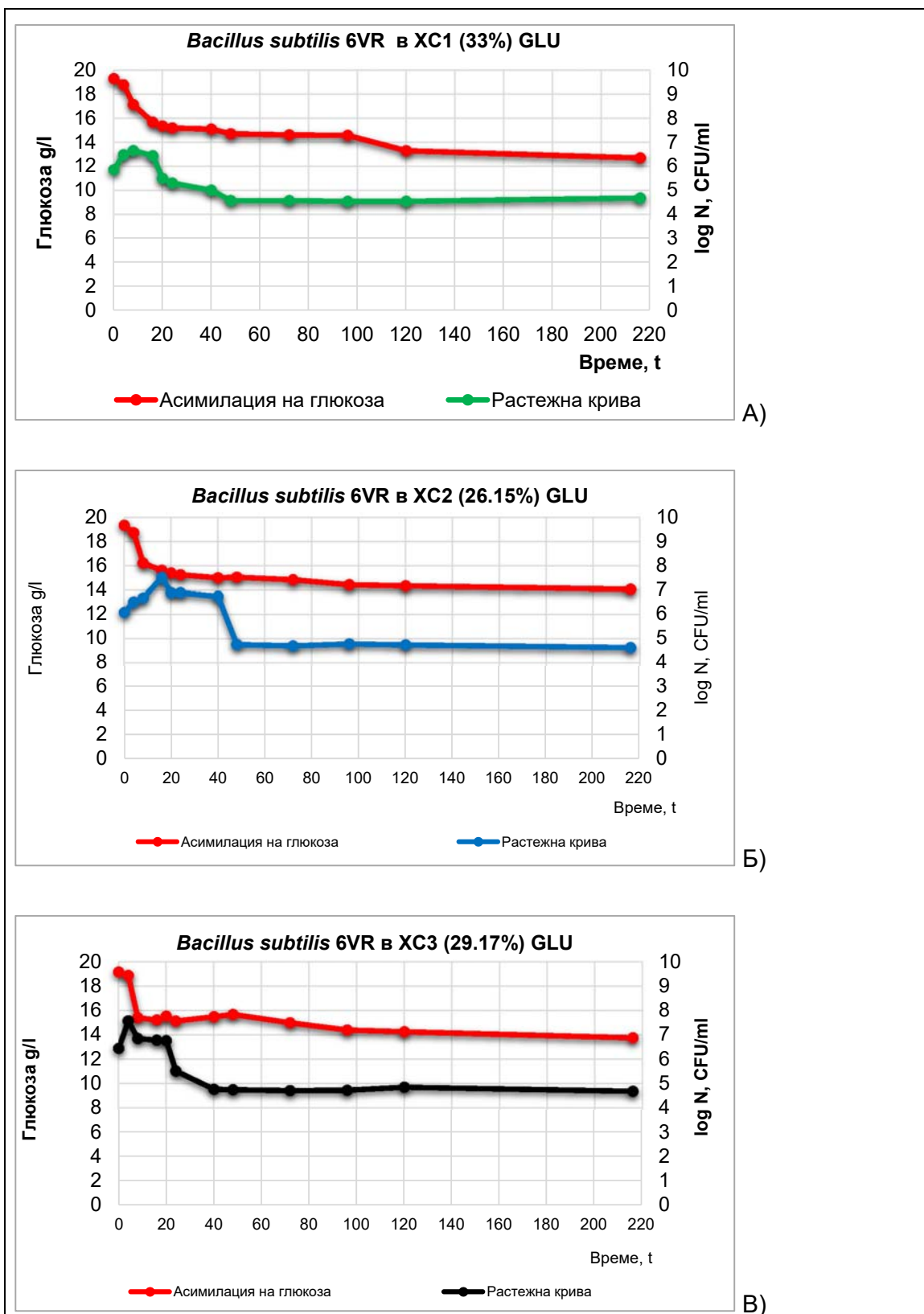
Развитието на щам *Bacillus subtilis* 8VR в изследваните хранителни среди е представено на Фиг.16 А), Б) и В). Развитието на щам *Bacillus subtilis* 8VR в трите хранителни среди е почти еднакво. Най-високо количество биомаса е отчетено в XC2- 7,39 клетки/мл, в XC1- 7,09 клетки/мл и в XC3- 6,69 клетки/мл. Подобно на натрупването на биомаса и асимилацията на въглеродният източник протича по подобен начин. Най-голямо количество глюкоза е усвоено в XC2 – 31,45 % (Фиг.16 Б). Асимилацията на глюкоза от щам *Bacillus subtilis* 8VR в XC1 и XC3 е почти еднакво. Изследваният щам в XC1- асимилира 30,65% от глюкозата (Фиг.16 А), а

в ХС3- 30,50%. (Фиг.16 В).

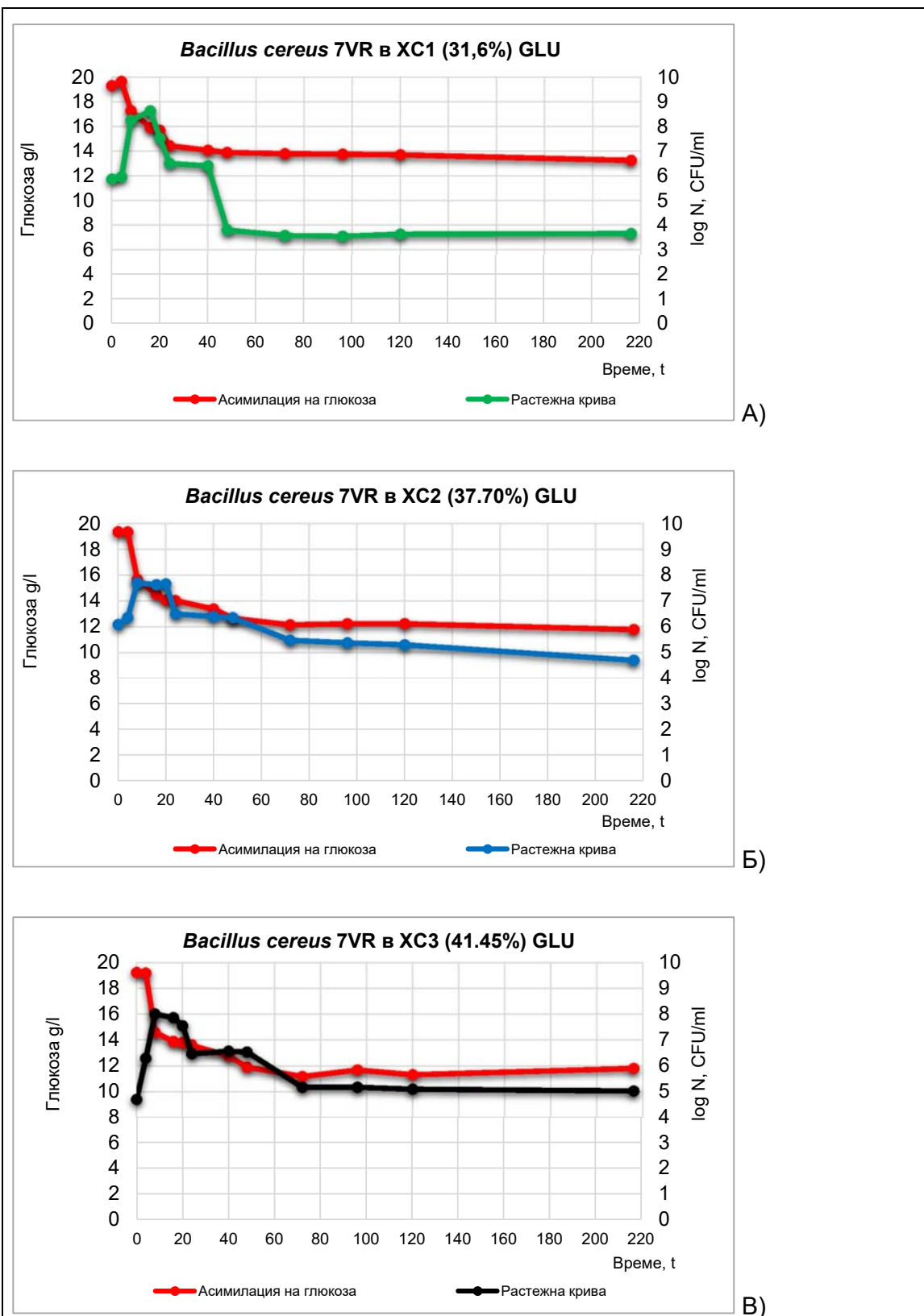
Развитието на щам *Bacillus pumilus* 9VR в трите хранителни среди е представено на Фиг.17 А), Б) и В). Най-голямо количество биомаса е отчетено при развитието на щама в ХС2 с 9,08 клетки/мл (Фиг.17 Б). При развитието на щама в ХС1 и ХС3 количеството на образуваните клетки е почти еднакво. В ХС3 е отчетена клетъчна плътност от 7,79 клетки/мл (Фиг.17 В), а в ХС1-7,65 клетки/мл (Фиг.17 А).

От резултатите, представени на Фиг.18 А), Б) и В) се вижда, че щам *Bacillus thuringiensis* 13VR има най-висока клетъчна плътност в ХС2 от 8,96 клетки/мл, последван от ХС1 с 8,57 клетки/мл и най-ниска клетъчна плътност е измерена в ХС3 от 8,30 клетки/мл. Резултатите, представени на Фиг.18 показват, че изследваният щам усвоява различно количество глюкоза и в трите хранителни среди. В ХС1 щама асимилира 36,65%, докато в хранителните среди с добавен индуктор асимилира почти еднакво количество глюкоза: в ХС2 - 48,85%, а в ХС3 - 47,45%.

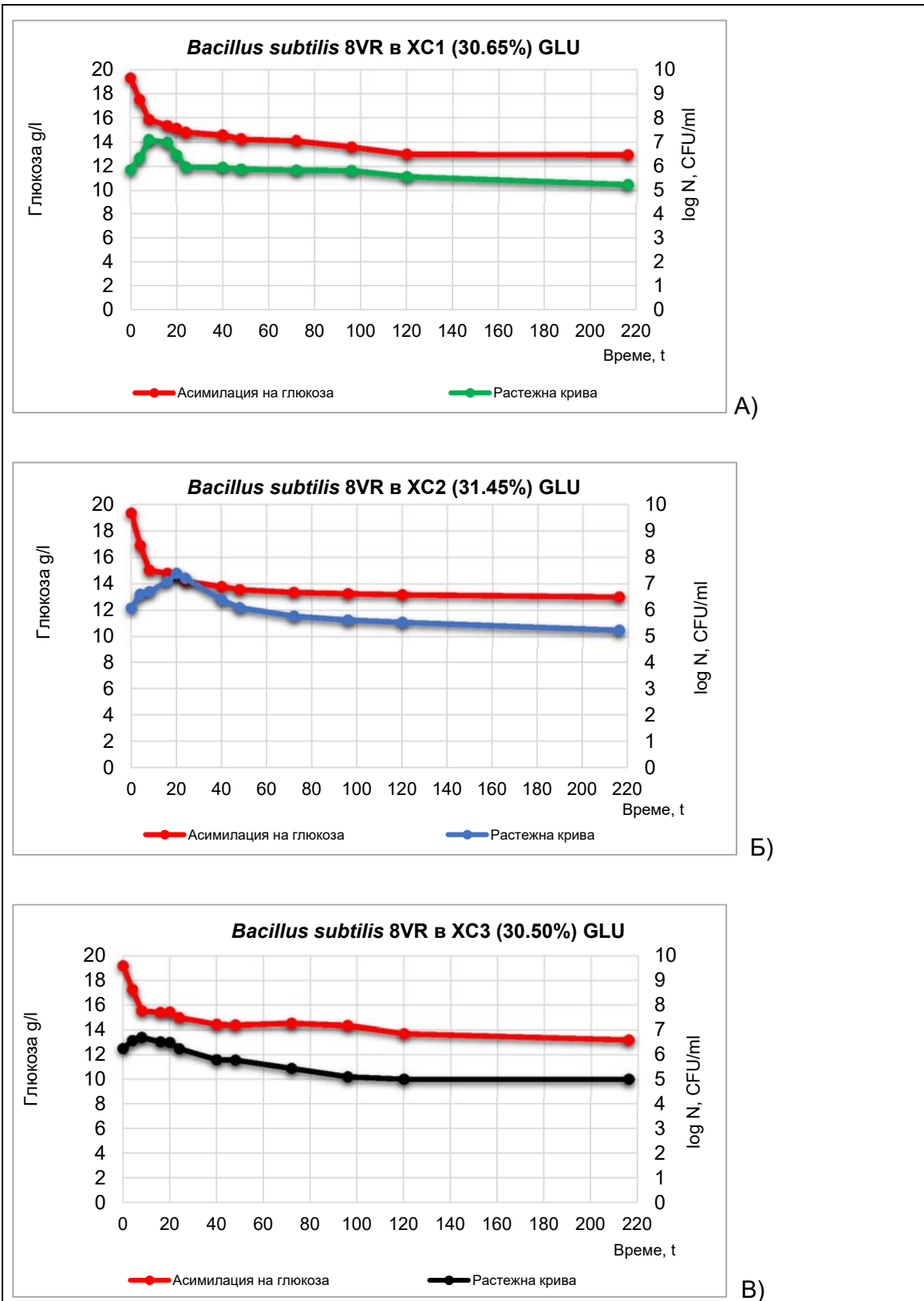
*От представените резултати можем да направим следните изводи: Развитието на културите в трите хранителни среди се отличава с щамова специфичност. Най-голямо количество глюкоза от петте щама в трите хранителни среди асимилира щам *Bacillus thuringiensis* 13VR; Най-голямо количество биомаса в ХС1 образува щам *Bacillus cereus* 7VR, в ХС2 щам *Bacillus pumilus* 9VR, а в ХС3- *Bacillus thuringiensis* 13VR.*



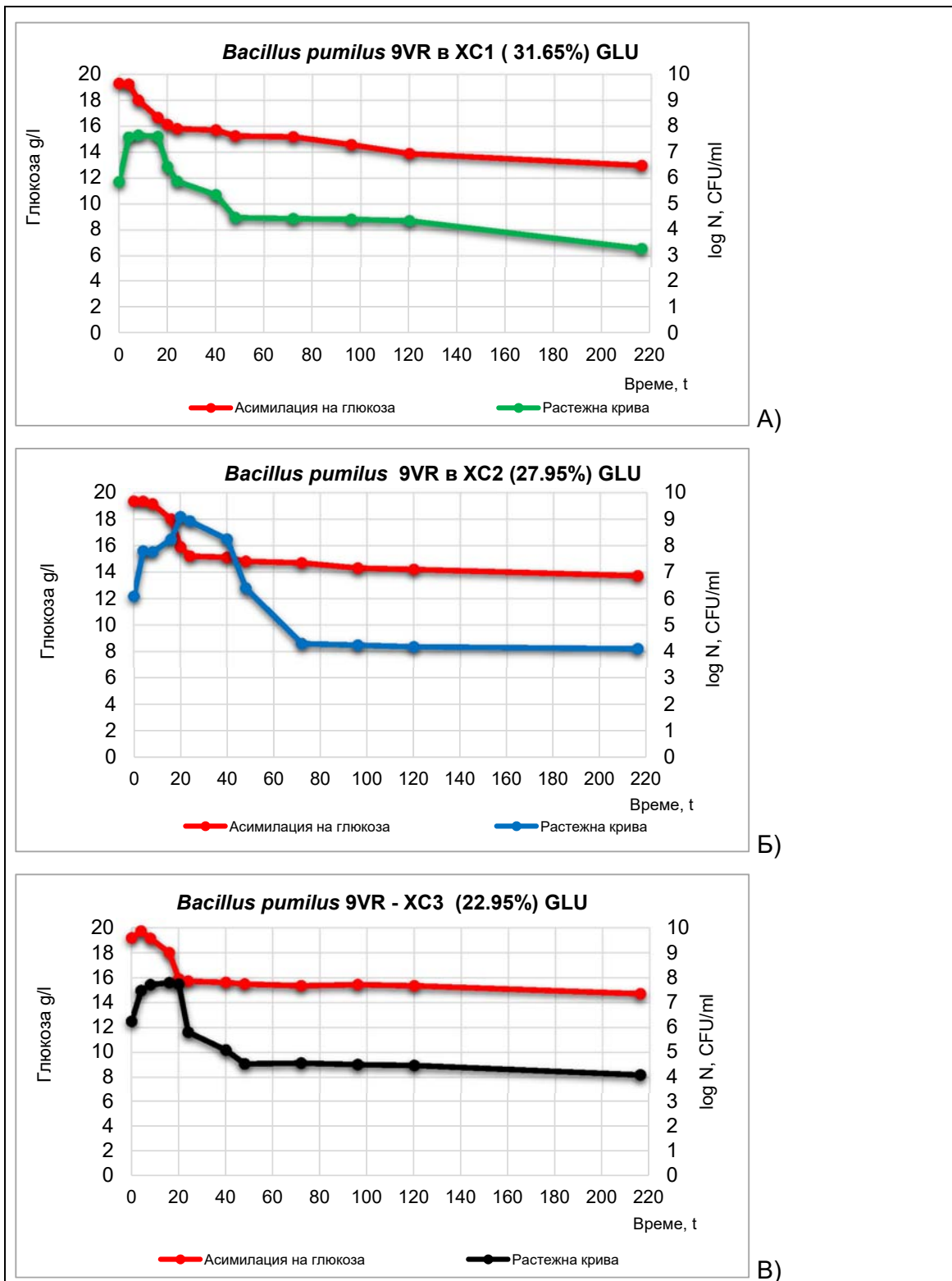
Фигура 14. Дълбочинно култивиране на: А) щам *B. subtilis* 6VR в XC1, Б) щам *B. subtilis* 6VR XC2 и В) щам *B. subtilis* 6VR в XC3.



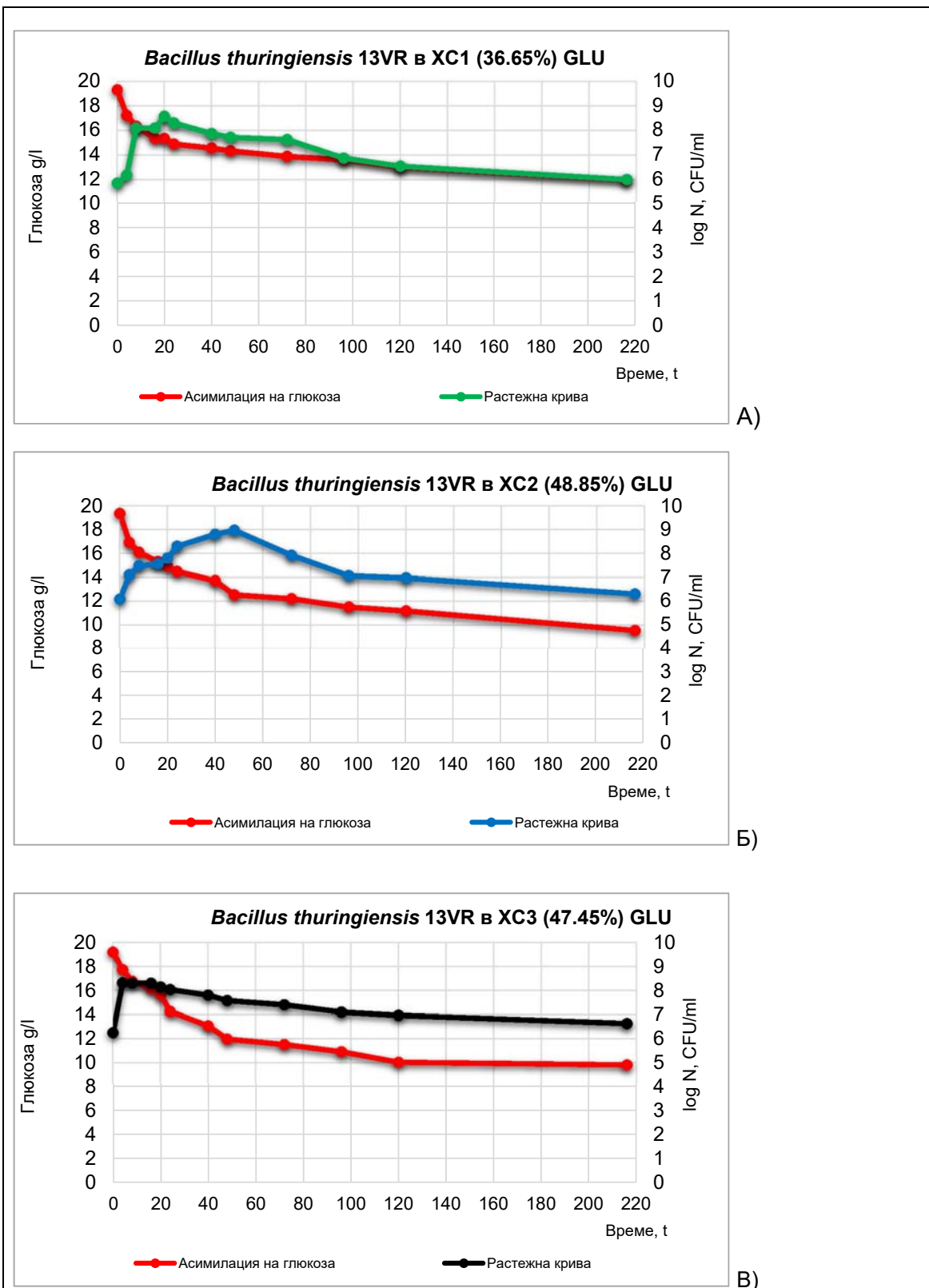
Фигура 15. Дълбочинно култивиране на: А) щам *B. cereus* 7VR в XC1, Б) щам *B. cereus* 7VR в XC2 и В) щам *B. cereus* 7VR в XC3.



Фигура 16. Дълбочинно култивиране на: А) щам *B. subtilis* 8VR в XC1, Б) щам *B. subtilis* 8VR в XC2 и В) щам *B. subtilis* 8VR в XC3.



Фигура 17. Дълбочинно култивиране на: А) щам *B. pumilus* 9VR в XC1, Б) щам *B. pumilus* 9VR в XC2 и В) щам *B. pumilus* 9VR в XC3.



Фигура 18. Дълбочинно култивиране на: А) щам *B. thuringiensis* 13VR в XC1, Б) щам *B. thuringiensis* 13VR в XC2 и В) щам *B. thuringiensis* 13VR в XC3.

V.4. Изследване ефекта на безклетъчна супернатанта от подобрите щамове върху развитието на технически куртури.

V.4.1. Изследване ефекта върху семена от къдрава салата (*Lactuca sativa*)

Производството на инокуланти от представители на ризобактериите използвани при производството на биоторове е начин за ограничаване употребата на химичните торове и пестициди. Освен това, използването на биоинокуланти съдържащи представители на ризобактериите повишава добивите на технически и етерично-маслени култури (Ferreira et al., 2011). Доказано е, че използването на PGPR стимулират растежа на растенията чрез осъществяване на минерализация на хранителните вещества, фосфатна солубилизация и чрез синтезата на растителни хормони, като ауксини и гиберелини (Asghar et al., 2002; Joo et al., 2004).

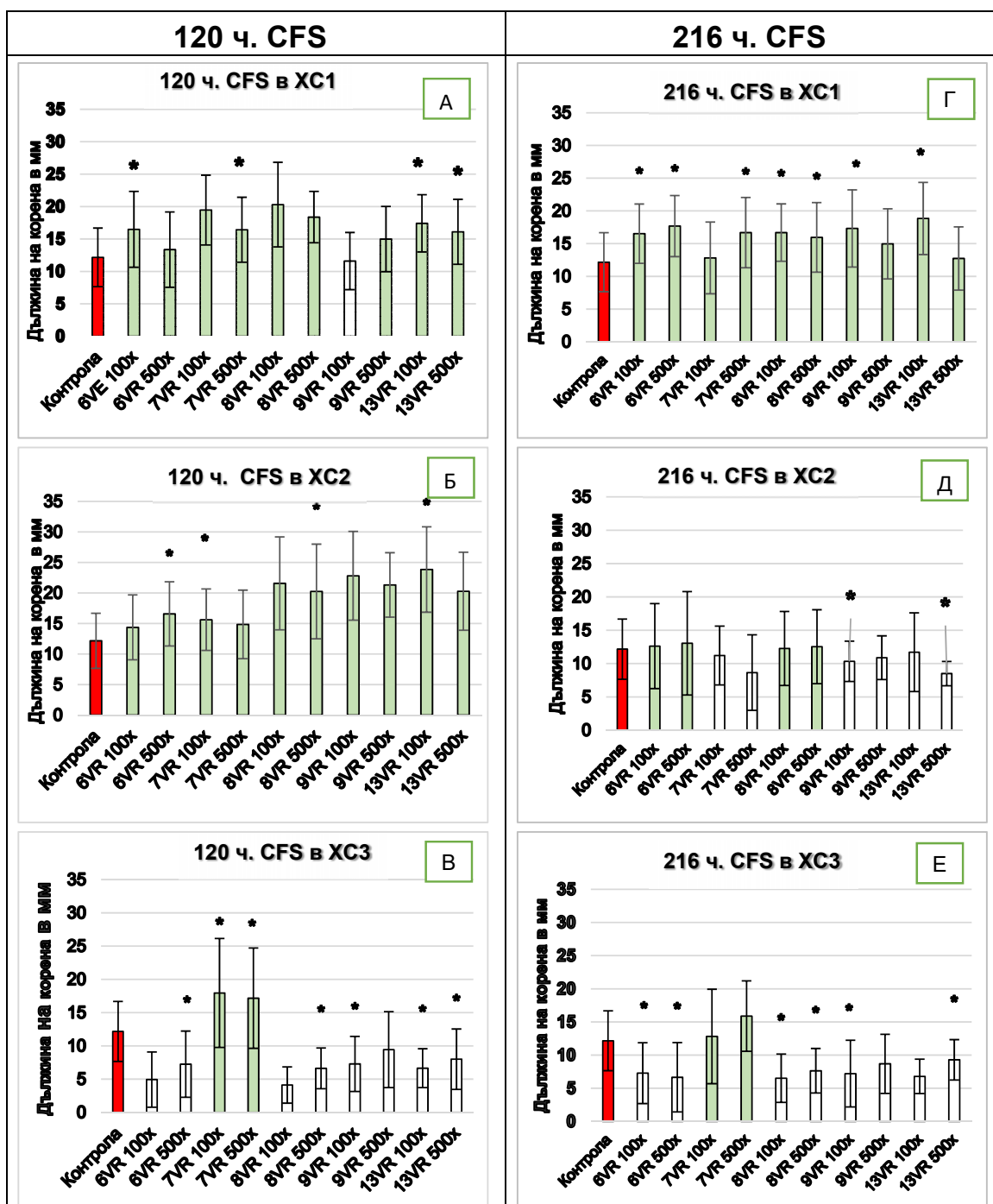
Проучена е биологичната активност на изследваните щамове от род *Bacillus*, чрез третирането на семена на къдрава салата с подходящо разрежена (100x и 500x) безклетъчна супернатанта, получена при развитието на щамовете в трите хранителни среди. Използвана е безклетъчна супернатанта от изследваните изолати е получена при 120 и 216 часова ферментация в XC1, XC2 и XC3. Получените резултати са статистически обработени и са представени на Фиг. 19 А), Б), В), Г), Д) и Е).

От проведените експерименти се установява, че третирането на семената с 100x и 500x разрежена безклетъчна супернатанта от 120 и 216 час, получена при развитието на щамовете в XC1 (Фиг.19 А) и Г) и от 120 час от XC2 (Фиг. 19. Б) стимулират развитието на корена на семената в сравнение с контролната проба. Част от получените резултати са статистически достоверни. Gomes H. D. O и колектив (2013) установяват, че използването на щамове от род *Bacillus*, отнасящи се към видовете *B. pumilus* и *B. thuringiensis* изолирани от ризосферата на зеле стимулират растежа и развитието на къдравата салата (*Lactuca sativa*). Третирането на семената с 120 часова CFS 100x и 500x разрежена получена при развитието на щамовете: *B. subtilis* 6VR, *B. subtilis* 8VR, *B. pumilus* 9VR и щам *B. thuringiensis* 13VR в XC3, намалява дължината на корена на семената на *Lactuca sativa* в сравнение с контролата (Фиг. 19 В). Повишаване на дължината на корена след третирането на семената с 120 CFS 100x и 500x разрежена спрямо

контролата е отчетена при щам *B. cereus* 7VR. Вероятната причина за това инхибиране се дължи на по-високите концентрации на IAA, която е синтезирана от *B. cereus* 7VR в XC3, в сравнение с XC1 и XC2.

На Фиг.19 Д) и Е) са представени резултатите получени при третирането на семена от *Lactuca sativa* с 216 часова CFS (100x и 500x разрежена) от изследваните щамове от род *Bacillus*.

От Фиг. 19 Д) и Е) се вижда, че третирането на семената на къдрава салата с 216 часова CFS от XC2 и XC3 инхибира удължаването на хипокотила при всички изследвани щамове в сравнение с контролата. Понижаване дължината на корена е отчетено и спрямо използването на 120 часова CFS от XC2 и XC3. Потвърждение на получените от нас резултати са публикувани от Barazani et. al., (2000), които доказват, че високите концентрации на L-триптофан, добавен като индуктор на IAA в средата инхибира удължаването на корените на разсада от маруля, поради прекомерна секреция на IAA. Повишаване дължината на корена е наблюдавано при третирането на семената от къдрава салата с използването на 216 часова CFS от XC1. Най-голяма дължина на корена след третиране на семената с CFS от XC1 е отчетена при щам *B. thuringiensis* 13VR 100x разрежена, а най-малка при щам *B. thuringiensis* 13VR 500x. Kasozi et al. (2021) докладват за повишаване на свежата и сухата листна биомаса при растенията на *Lactuca sativa* L. третирани с представители на род *Bacillus*, в сравнение с контролата. Повишаването на свежата и сухата листна биомаса се дължи на по-голямото количество асимилирани нитрати и фосфати при растенията третирани с представители на род *Bacillus*.



Фигура 19. Дължина на корена в мм на семена от *Lactuca sativa* след третирането им с безклетъчна супернатанта получена при 120 часова **А)** XC1, **Б)** XC2, **В)** XC3 и 216 часова ферментация в: **Г)** XC1, **Д)** XC2 и **Е)** XC3; * $p \leq 0,05$.

От получените резултати можем да направим обобщението, че третирането на семената от къдрава салата със 120 часова CFS от XC1 и XC2 и 216 часова CFS от XC1 стимулира развитието на корена спрямо

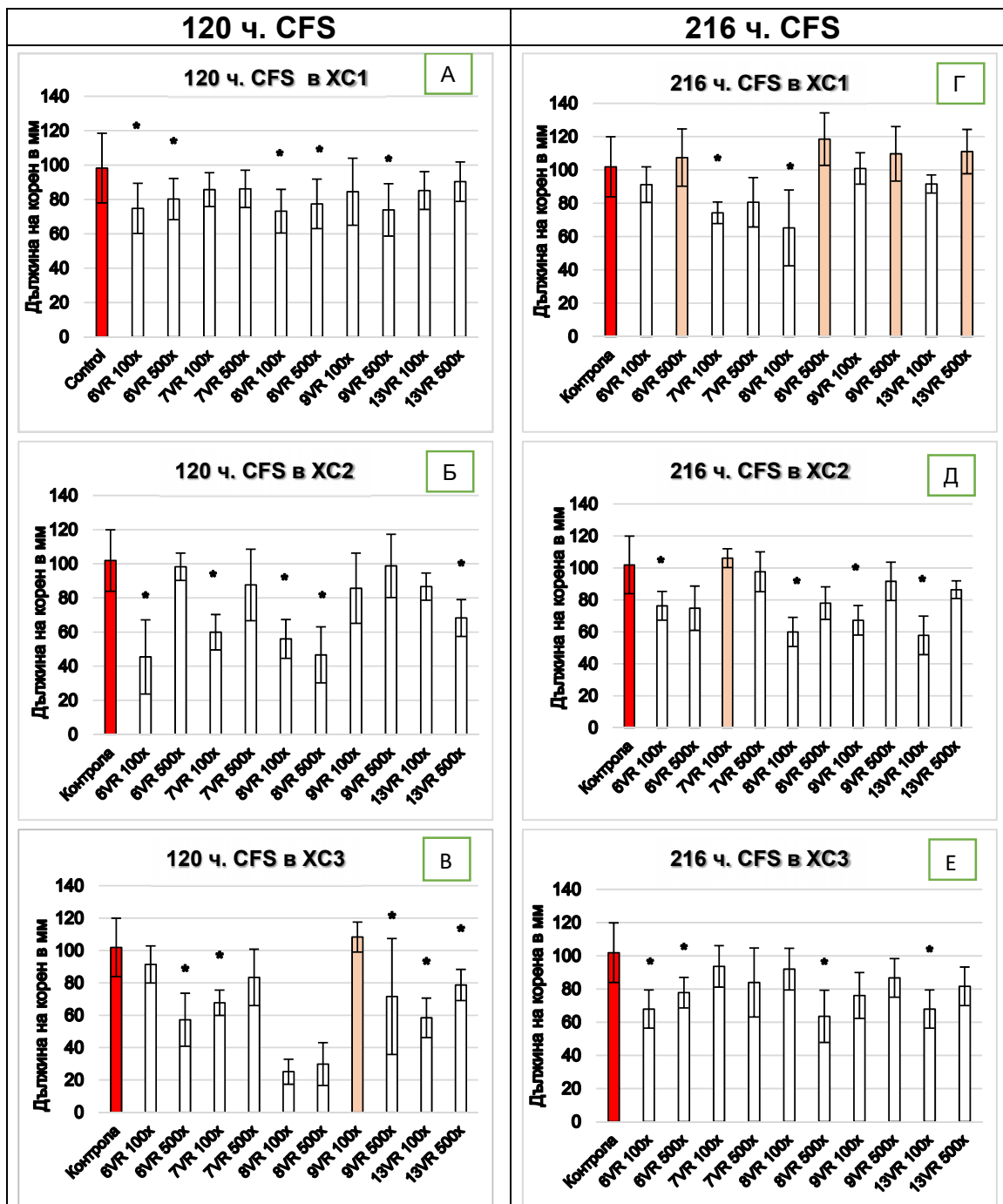
контролата. Синтезата на значителни количества индол-оцетна киселина инхибира кълняемостта на семена от къдрава салата.

V.4.2. Изследване ефекта на щамовете от род *Bacillus* върху семена от градински грах (*Pisum sativum*).

Грахът (*Pisum sativum*) се отнася към бобовите зеленчуци, които са богати на протеини. Грахът е с високо съдържание на тиамин (вит В1), ниацин и фосфор. Заболяването кореново гниене при граха се причинява от *F. solani* и *F. oxysporum*. Установено е, че третирането на семената с щамове на вида *Bacillus subtilis* води до намаляване на честотата на заболяването (Riaz et. al., 2021; Gomes et. al., 2020; Georgieva et al., 2018). Оценка на биологичната активност на безклетъчните супернатанти от работните щамове върху кълняемостта на семена от градински грах (*Pisum sativum*) се извършва при контролиран температурен режим и режим на осветеност в моделна фитокамера. За целите на експеримента са използвани 100x и 500x разредени безклетъчни супернатанти от изследваните щамове. За оценка на въздействието на изследваните щамове върху развитието на семената на *Pisum sativum* са отчетени следните параметри като: дължина на стъблото, дължина на корен, брой разклонения на корена и брой двойки листа. Получените резултати са визуализирани в Приложение 3.

V. 4.2.1. Изследване на ефекта на 120 и 216 часови безклетъчни супернатанти от изследваните щамове в XC1, XC2 и XC3 върху дължината на главният корен на семената от градински грах (*Pisum sativum*).

Третирането на семена на грах с 120 ч. CFS от XC1, XC2 и XC3 от изследваните щамове (Фиг. 20. А, Б и В) показва, че използването и оказва негативен ефект върху дължината на корена на семената на градинският грах, спрямо контролния вариант. От резултатите представени на Фиг. 20. А), Б) и В) се вижда, че третирането на семената от грах с 120 часова безклетъчна супернатанта от изследваните щамове от трите хранителни среди инхибира развитието на корена. Слабо повишаване на дължината на корена, спрямо контролния вариант е отчетено само при третирането на семената с CFS от щам *Bacillus pumilus* 9VR 100x от XC3.



Фигура 20. Дължина на корена в мм на семена от *Pisum sativum* след третирането им с безклетъчна супернатанта получена при 120 **А)** XC1, **Б)** XC2, **В)** XC3 и 216 часова ферментация в: **Г)** XC1, **Д)** XC2 и **Е)** XC3; * $p \leq 0,05$

Третирането на граховите семена с 216 часова CFS от XC1, 500x разрежена повишава дължината на корена спрямо контролата при следните щамове *B. subtilis* 6VR, *B. subtilis* 8VR, *B. pumilus* 9VR и *B. thuringiensis* 13VR (Фиг. 20. Г). При

третирането на семената с CFS от XC2 с изследваните щамове повишаване на дължината на корена е отчетена само при щам *B. cereus* 7VR (Фиг. 20 Д). Резултатите преоставени на Таблица 20 Е) показват, че третирането на семената с CFS от изследваните щамове култивирани в XC3, инхибират дължината на корена. Вероятната причината за получените резултати се дължи на високите концентрации на индол-оцетна киселина синтезирани от изследваните щамове в XC3, които инхибират развитието на главният корен. Тези твърдения са доказани и от други автори, Kukavica et al. (2007), които установяват, че високите концентрации на IAA оказват инхибиращ ефект върху удължаването на корена на граха. Развитието на корените е от съществено значение при растенията, тъй като чрез тях растенията абсорбират хранителни вещества и водата от почвата (Fincheira et. al., 2017).

V. 4.2.2. Изследване на ефекта на 120 и 216 часови беклетъчни супернатанти от изследваните щамове от XC1, XC2 и XC3 върху броя на страничните разклонения на корена при семената от градински грах (*Pisum sativum*).

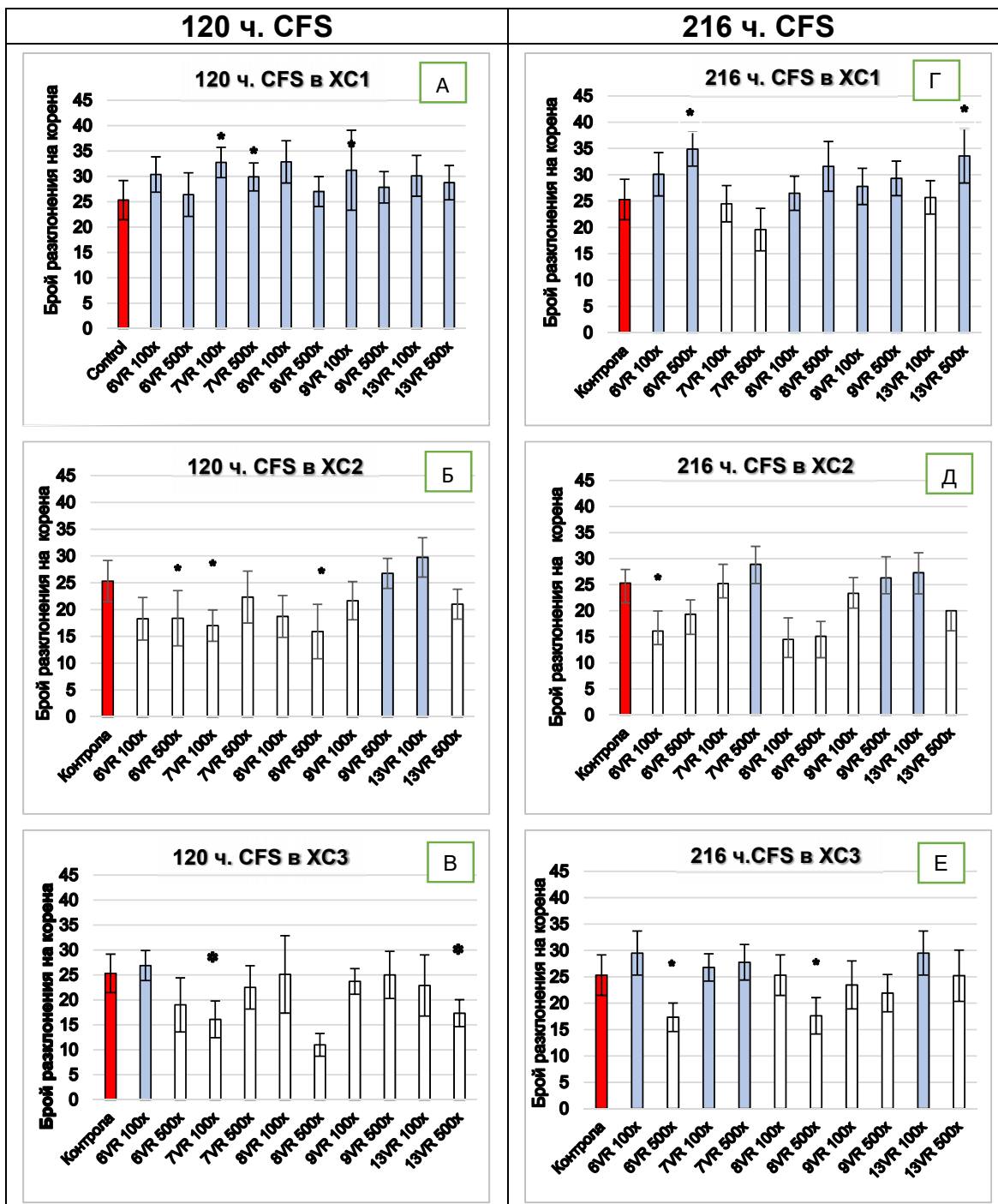
Получените резултати за ефекта на 120 часова и 216 часова CFS от изследваните щамове култивирани в XC1, XC2 и XC3 върху броя на страничните разклонения на главният корен на семената на *Pisum sativum* са представени на Фиг.21. А), Б), В), Г), Д) и Е).

Фиг. 21. А) показва, че третирането на семена на *Pisum sativum* с 120 часова CFS от изследваните щамове култивирани в XC1 води до повишаване на броя на страничните корени на главният корен при всички щамове. Установено е, че третирането на семената с 120 часова CFS от изследваните щамове култивирани в XC2 и XC3 не повишават броя на страничните корени, при следните щамове: *B. subtilis* 6VR, *B. cereus* 7VR *B. subtilis* 8VR представени на Фиг. 21. Б) и В). Слабо повишаване в броя на страничните корени, спрямо контролата е отчетено в XC2 при щамове *Bacillus pumilus* 9VR 500x и *B. thuringiensis* 13VR 100x, а в XC3 при щам *Bacillus subtilis* 6VR 100x. Вероятната причина за инхибирането на страничните корени е добавянето на индуктор към основната среда. Известно е, че дозата ефект на IAA зависи от нейната концентрация. В литературата са описани много доказателства на това твърдение, че високите концентрации на IAA инхибират развитието на страничните корени. Ivanchenko et al., 2010 доказват,

че ефекта на IAA върху кореновата система на *Arabidopsis thaliana* зависи от нейната концентрация. В диапазона от 1.0 до 5.0 nM стимулира растежа на главният корен и страничните корени, а при концентрация до 12.5 nM инхибира образуването на страничните корени. Прилагането на концентрации по-високи от 12.5 nM инхибира развитието, както на главният корен, така и на страничните корени.

При третирането семената с CFS от 216 ч. от XC1 се наблюдава значително повишаване в броя на разклоненията на корена, при четири от петте изследвани щама (Фиг. 21. А). Негативен ефект върху броя на страничните корени третирани с CFS от XC1 е отчетен само при щам *Bacillus cereus* 7VR (100x и 500x). При третирането на граха с CFS от изследваните щамове от 216 час при развитието им в XC2, стимулира развитието на страничните разклонения при щамове *B. cereus* 7VR (500x), *B. pumilus* 9VR (500x) и *B. thuringiensis* 13VR (100x) (Фиг. 21. Д). Третирането на семената на *Pisum sativum* с 216 часова CFS, получена при развитието на щамове в XC3 води до увеличаване на броя на страничните разклонения на корена при следните щамове *B. subtilis* 6VR (100x и 500x), *B. cereus* 7VR (100x и 500x) и *B. thuringiensis* 13VR (100x) (Фиг. 21 Е).

Получените от нас резултати се потвърждават от други авторски колективи, които докладват подобни резултати, при използването на ризобактерии от род *Bacillus*. López-Bucio et al. (2007) установяват, че щам *Bacillus megaterium*, стимулира растежа и развитието на страничните корени при растенията боб (*Phaseolus vulgaris*) и *Arabidopsis thaliana*. Установено е, че инокулацията им с *B. megaterium* инхибира развитието на главният корен, но стимулира развитието на страничните корени. Третирането на растенията с изследвания щам води до увеличаване на броя на страничните корени и стимулира растежа им. Също така, Asari et al. (2017) докладват, че щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5113 повишава броя на страничните корени на *Arabidopsis thaliana*. Щам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5113 синтезира цитокинини и индол-3-оцетна киселина, установено е, че високите концентрации на IAA в средата продуцирани от щам UCMB5113 инхибират растежа на първичния корен на *Arabidopsis thaliana*.



Фигура 21. Брой разклонения на карена на семена от *Pisum sativum* след третирането им с безклетъчна супернатанта получена при 120 А) XC1, Б) XC2, В) XC3 и 216 часова ферментация в: Г) XC1, Д) XC2 и Е) XC3; * $p \leq 0,05$.

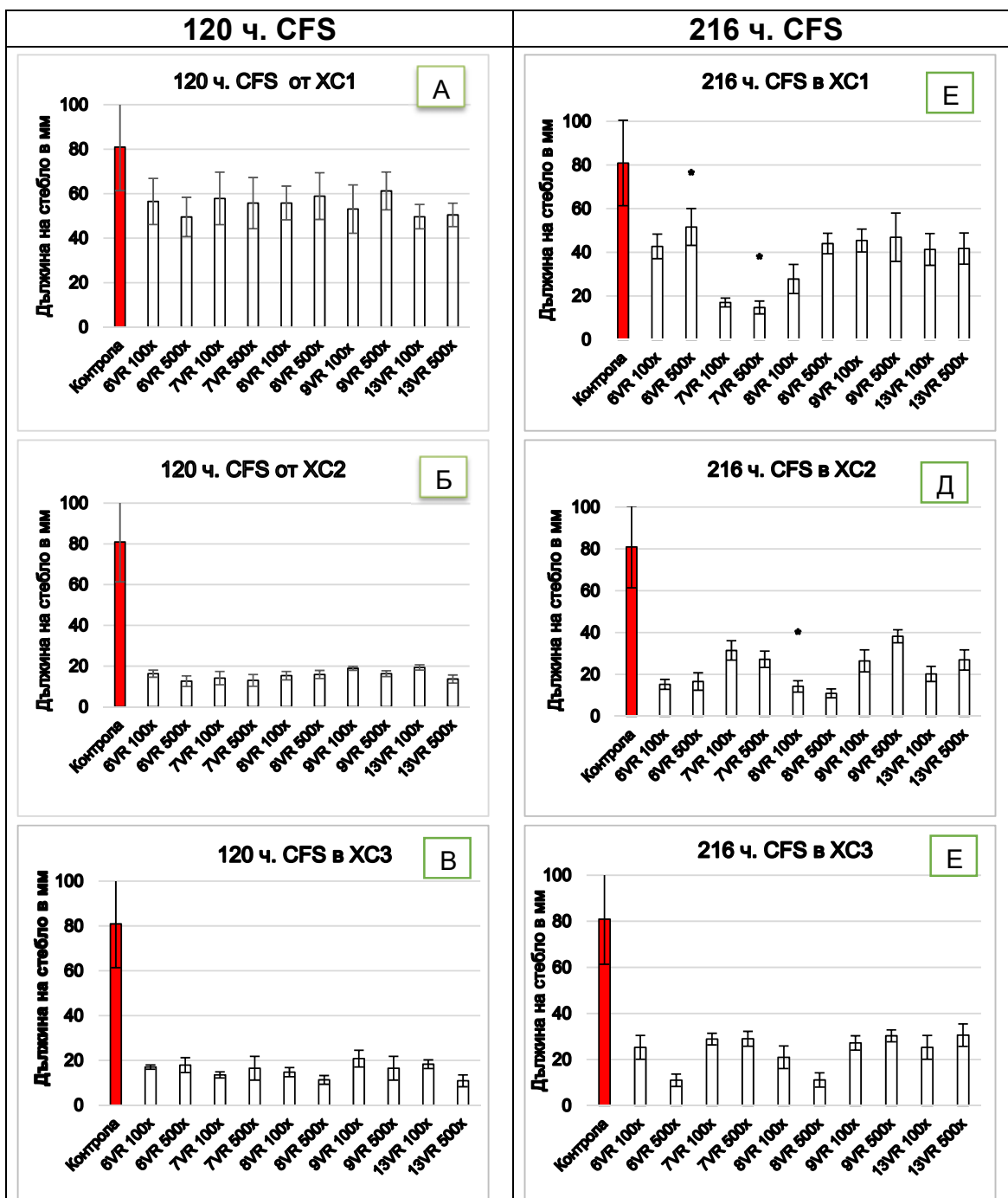
V. 4.2.3. Изследване ефекта на 120 и 216 часови безклетъчни супернатанти от изследваните щамове от XC1, XC2 и XC3 върху дължината на стеблото на семената от градински грах (*Pisum sativum*).

От резултатите, представени на Фиг.22 А), Б), В) Г), Д) и Е) се вижда, че третирането на семена от грах с 120 часова и 216 часова CFS, получена при развитието на щамовете в трите хранителни среди инхибират развитието на стеблото, в сравнение с контролата. Вероятната причината за това е наличието на голямо количество IAA продуцирано от изследваните щамове. Установено е, че наличието на високи концентрации на ауксини в средата инхибират дължината на стеблото. Най-голямо количество IAA от изследваните щамове от род *Bacillus* е синтезирано в ХС3, в която е измерена най-малка дължина на стеблото (Фиг. 22 Е). При третирането на семената от грах със 120 часова CFS от ХС1 е измерена най-голяма дължина на стеблото на граха от трите изследвани хранителни среди, както е измерено и най-малко количество синтезирана IAA от изследваните щамове.

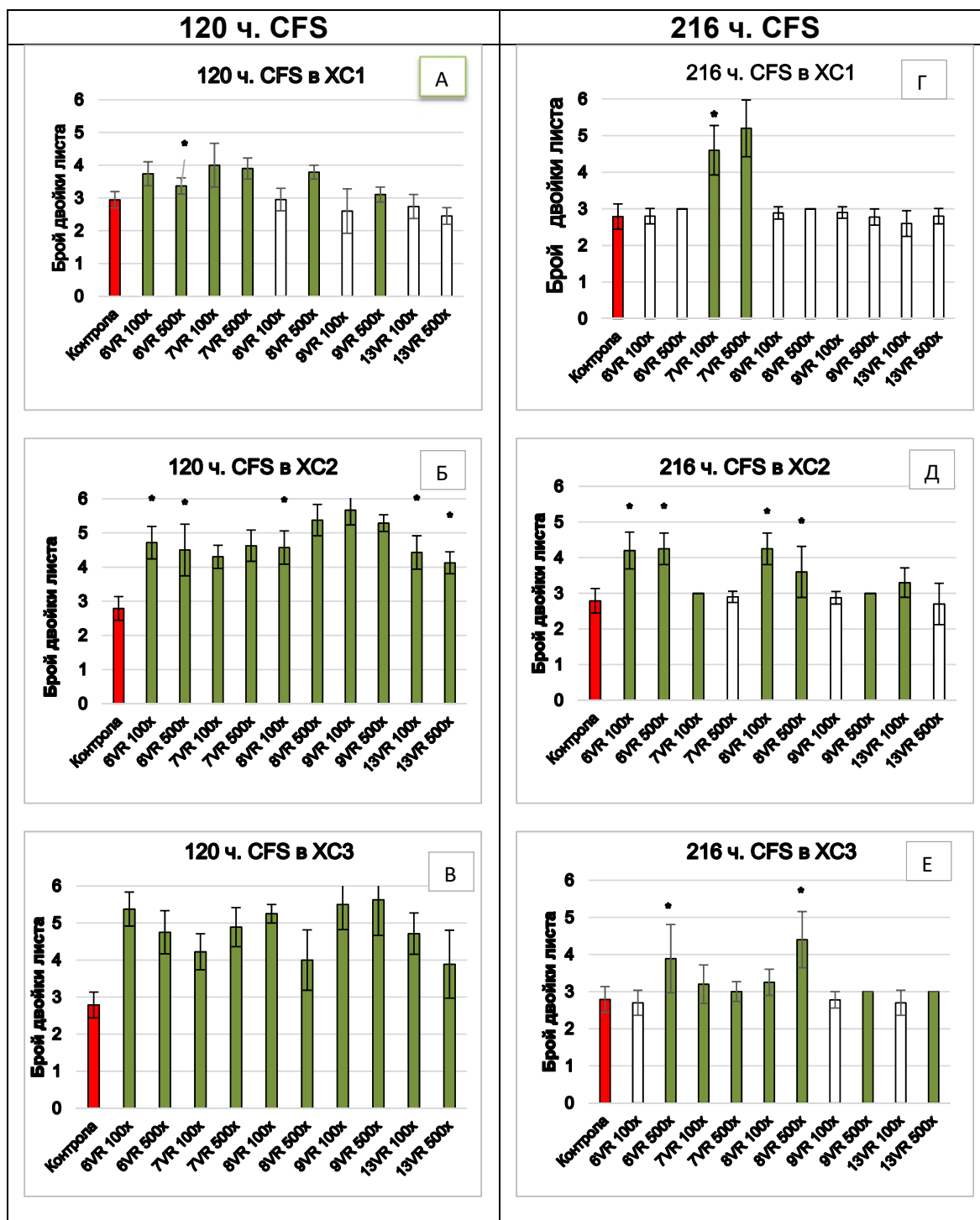
V.4.2.4. Изследване ефекта на 120 и 216 часови беклетъчни супернатанти от изследваните щамове от ХС1, ХС2 и ХС3 върху броя на двойките листа на семената от градински грах (*Pisum sativum*).

Третирането на семена от грах със 120 часова CFS от ХС1 на изследваните щамове от род *Bacillus* стимулира развитието на листата при следните щамове: *B. subtilis* 6VR (100x и 500x), *B. cereus* 7VR (100x и 500x), *B. subtilis* 8VR (500x) и *B. pumilus* 9VR (100x) (Фиг.23. А). Третирането на семената на *Pisum sativum* със 120 часова CFS от ХС2 и ХС3 повишава броя на двойките листа на граха при всички изследвани щамове в сравнение с контролата Фиг. 23 Б) и В).

При използването на CFS от 216 час получена при развитието на щамовете в ХС1, се установява, че повишаване броя на листата в сравнение с контролата е отчетено само при щам *B. cereus* 7VR (100x и 500x), показано на Фиг.23. Г). Третирането на семената с 216 ч. CFS от изследваните щамове култивирани в ХС2 води до значително повишаване на броя на двойките листа при средните щамове: *B. subtilis* 6VR (100x и 500x) и щам *B. subtilis* 8VR (100x). При щам *B. cereus* 7VR (500x), *B. pumilus* 9VR (100x) *B. thuringiensis* 13VR (100x) се наблюдават стойности еднакви с контролата (Фиг. 23. Д)



Фигура 22. Дължина на стъбло на семена от *Pisum sativum* след третирането им с безклетъчна супернатанта получена при 120 А) XC1, Б) XC2, В) XC3 и 216 часова ферментация в: Г) XC1, Д) XC2 и Е) XC3; * $p \leq 0,05$.



Фигура 24. Брой двойки листа на семена от *Pisum sativum* след третирането им с безклетъчна супернатанта получена при 120 **А)** XC1, **Б)** XC2, **В)** XC3 и 216 часова ферментация в: **Г)** XC1, **Д)** XC2 и **Е)** XC3, (b) * $p \leq 0,05$.

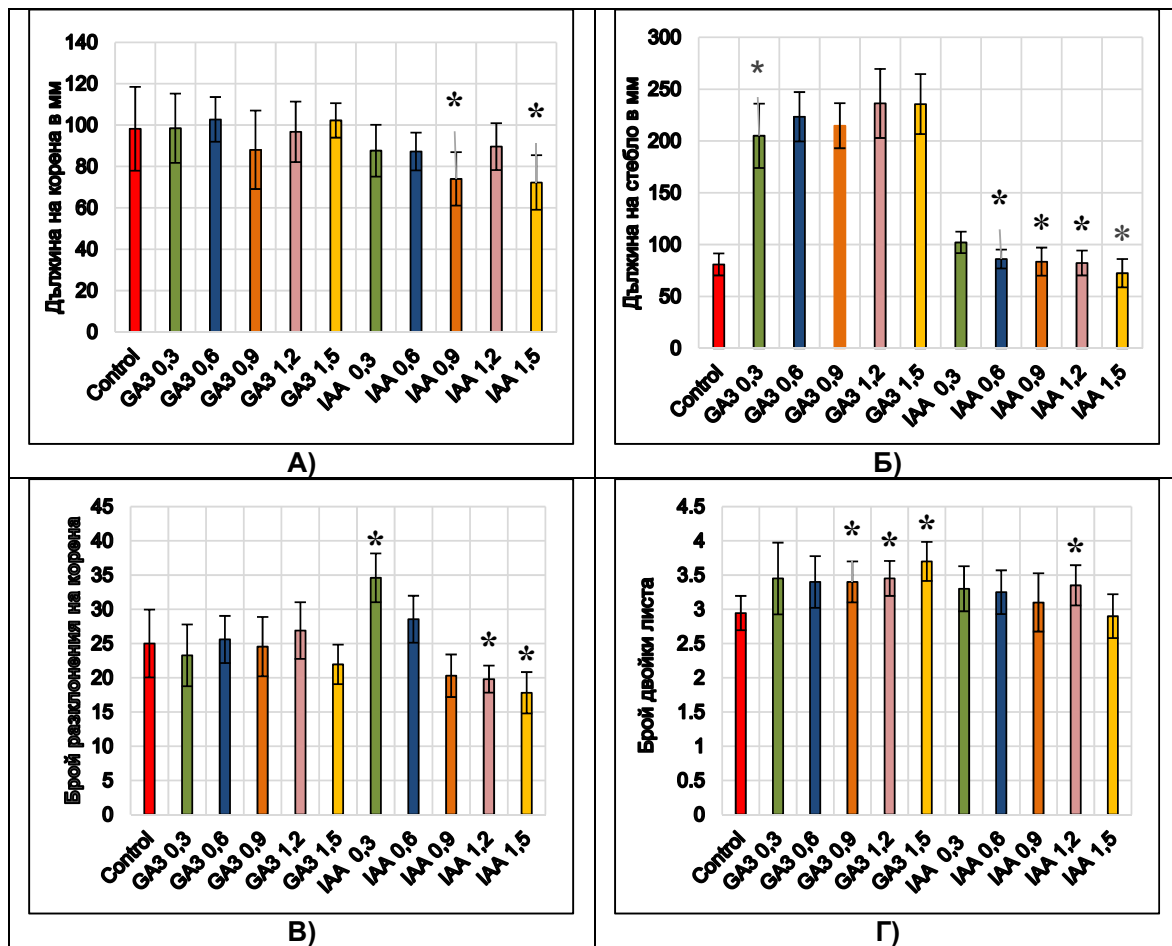
Третирането на семена от грах с 216 часова CFS от щамове култивирани в XC3, води до повишаване на броя на двойките листа при щам *B. subtilis* 6VR 500x,

щам *B. cereus* 7VR (100x и 500x), *B. subtilis* 8VR (100x и 500x), *B. pumilus* 9VR (500x) и *B. thuringiensis* 13VR (500x) (Фиг. 23. Е). Mishra et al. (2009) доказват, че щам *Bacillus thuringiensis*-KR1, който е изолиран от лоза Кудзу (*Pueraria thunbergiana*) стимулира растежа на растенията от градински грах (*Pisum sativum* L.) и леща (*Lens culinaris* L.), когато е съвместно инокулиран с *Rhizobium leguminosarum*-PR1. Коинокулация с *B. thuringiensis*-KR1 води до увеличаване на броя на нодулите, теглото на стеблото, теглото на корена и общата биомаса, чрез инокулацията с ризобактерии.

V.4.3. Изследване ефекта на растежни регулатори (GA3 и IAA) върху семена от градински грах (*Pisum sativum*).

Проведен е експеримент за изследване ефекта от третирането на семена от градински грах с различни концентрации на гибберелинова киселина (GA3) и индол-оцетна киселина. Резултатите са представени на Фиг. 25 и са визуализирани в Приложение 4. По време на експеримента е изследвано промяната в средните параметри: дължина на корен, брой разклонения на корена, дължина на стебло и брой двойки листа. Използвани са следните концентрации за GA3 (0.3, 0.6, 0.9, 1.2 и 1.5 µg/ml) и за IAA (0.3, 0.6, 0.9, 1.2 и 1.5 µg/ml). От фиг.25 А) се вижда, че третирането на семената от грах с концентрация на GA3 от 0.6 µg/ml и с 1.2 µg/ml стимулира удължаването на корена при граха, в сравнение с контролата. За разлика от ауксините, проучванията върху ефектите на GA върху корените на растенията са ограничени, въпреки че съществуват голям брой изследвания за тяхното въздействие върху въздушните органи на растенията (Manjroa, 2001; Tanimoto et. al., 2005; Pandya et al., 2013).

Третирането на семена от грах с концентрация от 0,6 µg/ ml и с 1,6 µg/ ml гибберелинова киселина води до слабо повишаване на броя на страничните разклонения на корена в сравнение с контролата, показани на Фиг. 25.Б). За разлика от гибберелиновата киселина (GA3), третирането на граховите семена с 0,3 µg/ ml и 0,6 µg/ ml IAA води до значително повишаване в броя на страничните разклонения на корена, спрямо контролата. Третирането на семената от грах с концентрации по-високи от 0,6 µg/ ml IAA води до намаляване в броя на страничните корени.



Фигура 25. Дължина на главния корен **А)**, дължина на стебло **Б)**, брой разклонения на корена **В)** и брой двойки листа **Г)** на семена от *Pisum sativum* след третиране им с търговски регулатори на растежа (IAA и GA₃); * p ≤ 0,05.

Резултатите предствени на Фиг. 25 В), показват че третирането на семена от грах със всички изследвани концентрации гибирелинова киселина, водят до значително повишаване дължината на стеблото при граха, в сравнение с котролата. Най-голяма дължина на стеблото е отчетена при използването на гиберелинова киселина с концентрация 1,2 µg/ml. Третирането на семена от грах с различните концентрации на индол-оцетна киселина (IAA) показват, че IAA инхибира удължаването на стеблото, в сравнение със семената третиранни с различни концентрации на гибирелинова киселина. Увеличаване концентрацията на IAA води до понижаване дължината на стеблото. Това се вижда от Фиг. 25 В), където най-голяма дължина на стеблото е отчетено при третирането на семената с 0,3 µg/ml IAA, а най- малка с 1,5 µg/ml IAA.

Резултатите предтавени на Фиг.25 Г), показват че третирането на семена от градински грах с всички изследвани концентрации на гиберелинова киселина и

индол-оцетна киселина водят до повишаване на броя на двойките листа, в сравнение с контролата. Най-голям брой двойки листа е отчетен при третирането на семената с 1,5 µg/ ml GA3 (Georgieva et al., 2021).

От получените резултати след третирането на семената от грах с CFS от изследваните щамове и с растежните регулатори можем да направим следното обобщение. Третирането на семената с 120 часова и 216 часова CFS от изследваните щамове, както и с различните концентрации на растежни регулатори води до слабо повишаване на дължината на корена в сравнение с контролата. Потвърждение на получените от нас резултати за увеличаване броя на страничните корени при използването на 120 часова и 216 часова CFS от изследваните щамове има и от резултатите, получени след третирането на семената от грах с 0,3 µg/ ml и 0,6 µg/ ml IAA. Получените резултати показват, че ниските концентрации на индол-оцетна киселина стимулират развитието на страничните корени.

Третирането на семената с 120 часова и 216 часова CFS от изследваните щамове, както и с различните концентрации на индол-оцетна киселина не стимулират удължаване на стеблото в сравнение с контролата. Тези резултати потвърждават нашата теза, че високите концентрации на индол-оцетна киселина инхибират удължаването на стеблото.

*При използването на CFS от 120 час от XC2 и XC3 при всички изследвани щамове, както и при третирането на семената от грах с различните концентрации на растежните регулатори, водят до повишаване на броя на двойките листа на *Pisum sativum*.*

V.5. Изследване ефекта на безклетъчна супернатанта от подобрите щамове и растежни регулатори върху развитието на етерично-маслени растителни култури

V.5.1. Третиране на растения от риган с клетъчна суспензия от подобрите щамове и с растежни регулатори (GA3 и IAA)

Ароматните растения представляват голям интерес в световен мащаб поради приложението им в областта на медицината, хранително-вкусовата промишленост, козметиката, ароматната промишленост, използването им като

подправки и като декоративни растения. Риганътът се използва и за получаване на етерично масло. В медицината, риганът има антивирусни, антибактериални, антимуtagenни, фунгицидни, нематоцидни, биоцидни и антиоксидантни свойства (Karaboduket al., 2014).

Проведени са *in vivo* експерименти за оценка биологичната активност на щамове от род *Bacillus* върху развитието на етерично-масленото растение риган (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). За провеждане на експериментите е използван разсад от *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, с височина 7 cm засаден в почвено торфена смес. Растенията са групирани в експериментални групи, които са третирани на всеки 7 дни с активна бактериална култура получена при 48 часово дълбочинно култивиране в ХС1 на клатачен апарат. Продължителността на поставения експеримент е шест седмици. При всяка експериментална група е заложена контролна проба, като всеки вариант е от по три повторения. В края на експеримента е събрана получената растителна биомаса и са определени следните биометрични показатели: дължина на стебло (Фиг. 26 А), дължина на корена (Фиг. 26. Б) и брой трихоми на cm^2 (Фиг. 26. В) върху тест растения от риган. Резултатите от проведените експерименти да представени в Фигура 26 и са визуализирани в Приложение 5.

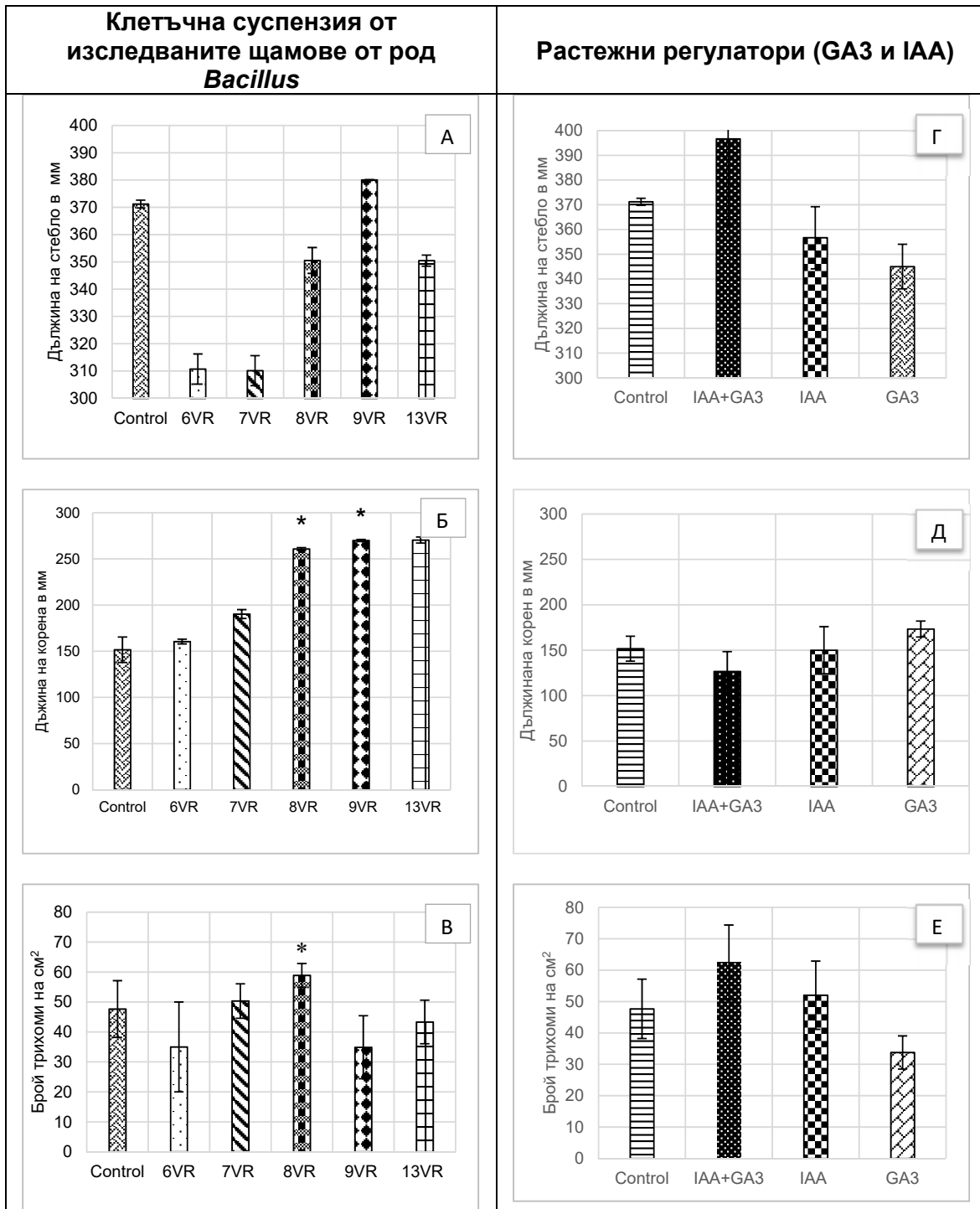
Прилагането на клетъчна суспензия (CS) води до намаляване на средната дължина на стъблото на растенията от риган. Увеличаване на дължината на стъблото в сравнение с контролата се наблюдава при третиране с клетъчна суспензия от щам *B. pumilus* 9VR (Фиг. 26. А). Увеличаване на броя на страничните разклонения на стъблото, спрямо контролата е отчетено при щамове *B. subtilis* 8VR и *Bacillus thuringiensis* 13VR. Растенията, третирани с клетъчна суспензия, показват значително увеличаване на дължината на корена в сравнение с контролата (Фиг. 26 В). Най-висока дължина на корените се наблюдава при растенията, третирани с клетъчна суспензия от щам *B. thuringiensis* 13VR. Най-малка дължина на корена е измерена след третиране на растенията с CS от щам *B. subtilis* 6VR.

Изследван е ефекта на клетъчна суспензия върху броя на трихомите в листата на ригана (Фиг. 26. Г). Увеличаване на броя на трихомите е отчетено след третирането на ригана с CS от щам *B. subtilis* 8VR и щам *B. cereus* 7VR. Най-висок среден брой от 58 трихоми/ cm^2 е отчетен при третирането с CS от щам *B. subtilis* 8VR. Тези резултати са потвърждение на получените от del Rosario et al. (2015),

които доказват, че третирането на щам *B. subtilis* GB03 увеличава трихомната плътност при растения от мента (*Menta piperita*). Също така Singh et al. (2013), доказват, че обработката на семена на босилек от вида *Ocimum basilicum* var. CIM-Saunya с биоинокуланти съдържащи следните видове бактерии: *Pseudomonas monteilii* - щам CRC1, *Cronobacter dublinensis* - щам CRC3 и *Bacillus* spp.-щам AZHGF1 повишават значително добивите от 45 до 56 % на етеричното масло от босилек.

Паралелно с проведенният експеримент за установяване ефекта на клетъчна суспензия на щамове от род *Bacillus* върху развитието на растения от риган, е проведен и втори *in vivo* експеримент за установяване ефекта на растежни регулатори върху развитието на растения от риган. По време на този експеримент са изследвани същите биометрични параметри, като в първият експеримент: дължина на стебло, дължина на корен и брой трихоми на см². Използвани са следните концентрации на растежни регулатори: 600 µg GA3 /250 ml вода; 600 µg IAA /250 ml вода; 300µg GA3+300µg IAA/250 ml вода. Резултатите от проведенният експеримент да представени в Талблица 26 и са визуализирани в Приложение 5.

Резултатите представени на Фиг. 26. Г) показват, че повишаване на дължината на стеблото спрямо контролата е отчетено само при третирането на растенията от риган с комбинацията от растежни регулатори GA3 и IAA. Повишаване дължината на корена в сравнение с контролата е отчетено при третирането на растенията с гибирелинова киселина, представено на фиг. 26. Д). Повишаване в броя на трихомите в сравнение с контролата е отчетено при третирането на растенията от риган с комбинацията от растежни регулатори и при третирането с IAA, представено на Фиг. 26 Е).



Фигура 26. Тестване ефекта на клетъчна суспензия от изследваните щамове от род *Bacillus* и на растежни регулатори върху: А) Дължина на стъбло Б) Брой разклонения на стъбло В) Дължината на корена Г) Брой трихоми на cm^2 върху растения от риган (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*); * $p \leq 0.05$

От проведените експерименти можем да направим средните заключения:

Прилагането на клетъчна суспензия от изследваните щамове води до намаляване на средната дължина на стъблото на растенията. Единственото увеличаване на дължината на стъблото в сравнение с контролата се наблюдава при третирането с CS от щам *B. pumilus* 9VR (Фиг.26.А). Най-силен ефект върху дължината на стъблото на растенията риган е установен след третиране на растенията с комбинация от растежни регулатори (фиг.26.Г). Обратно, при самостоятелното приложение на растежните регулатори се наблюдава намаляване на дължина на стъблото на растенията. При третирането на растенията от риган с клетъчна суспензия (CS) от щамове *B. subtilis* 8VR и *B. cereus* 7VR се наблюдава увеличаване броя на трихомите. Най-висок среден брой от 58 трихома/см² е установен при третирането с клетъчна суспензия (CS) от *B. subtilis* 8VR. Растенията, третирани с индол-оцетна киселина (IAA) и комбинация от растежните регулатори, показват повишаване в броя на трихомите в сравнение с контролата. Третирането с различни концентрации на гиберелинова киселина не повишава броя на трихомите в сравнение с контролата.

V.5.2. Екстракция на суха листна биомаса от риган и газово-хроматографски анализ за съдържание на тимол в растителните екстракти от риган (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*).

Ароматните растения произвеждат органични съединения, които могат участват в защитата на растенията срещу фитопатогенни насекоми, бактерии, микромицети и вируси. Повечето етерични масла от семейство *Lamiaceae* се състоят от монотерпени и сесквитерпени. Тяхната активност се дължи на съдържанието на карвакрол и тимол, които са придружени от р-цимен и ктерпинен, които са основните съставки в ригана (Vokou et al., 1993). Етеричното масло от *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* показва високо съдържание на карвакрол, тимол, с-терпинен и р-цимен, представляващи 73,7%, 92,8% и 87,78% от общото количество

на етеричното масло (Skoufogianni et. al., 2019).

От резултатите, представени в Таблица 10 се вижда, че съдържанието на тимол в метанолните екстракти на листа от *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* варира при различните щамове. Наблюдава се понижаване на концентрацията на тимол при ригана третирани с клетъчна суспензия от изследваните щамове в сравнение с контролата. Вероятната причината за ниските концентрации на тимол в етеричното масло от ригана е резултат от метода на екстракция и влиянието на околната среда и климатичните условия. Faleiro et al. (2005) потвърждават това заключение за променливият състав на етеричното масло на *O. vulgare*. Szczepanik et al. (2018) доказват, че карвакрола и тимола представляват около 78–85% от общият процент масла в ригана и са причината за антимикробна активност на маслото. Карвакрол, тимол, р-цимен и γ-терпинен проявяват бактерицидна активност срещу *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* и *Yersinia enterocolitica* (Szczepanik et. al., 2018). Faleiro et al. (2005) установяват, че етеричните масла от *T. capitata*, така и от *O. vulgare* проявяват антилистерийна активност. Adesemoye et al. (2008) установяват, че използването на PGPB при отглеждането на домати (*Solanum lycopersicum* L), бамбя (*Abelmoschus esculentus*) и спанак (*Amaranthus* sp.) стимулира развитието на плодовете и тяхното узряване.

Таблица 10. Съдържание на основни фенолни съединения в алкохолни екстракти на листа от *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* в края на експеримента след третирането с клетъчна суспензия от изследваните щамове от род *Bacillus*.

Растителни екстракти от <i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	Концентрация на тимол µg/ml
Контрола	25.26
6VR	21.7
7VR	19.68
8VR	21.07
9VR	19.15
13VR	23.32

В резултат от проведеният експеримент се установява, че третирането на растения риган от вида *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* с клетъчна суспензия от *Bacillus subtilis* 8VR повишава броя на трихомите на листата на ригана, но не води до повишаване на концентрацията на тимол

в трихомите на листата на ригана, в сравнение с контролата.

Таблица 11. Основни PGP- активности на изследваните щамове от род *Bacillus*.

Щам	<i>B. subtilis</i> 6VR	<i>B. cereus</i> 7VR	<i>B. subtilis</i> 8VR	<i>B. pumilus</i> 9VR	<i>B. thuringiensis</i> 13VR
Антимикробна активност	Висока активност	Няма активност	Висока активност	Няма активност	Няма активност
Антигъбна активност	Много висока активност	Ниска активност	Висока активност	Висока активност	Ниска активност
Амилазна активност	Има активност	Няма активност	Има активност	Няма активност	Има активност
Протеазна активност	Има активност	Има активност	Има активност	Има активност	Има активност
Хитиназна активност	Има активност	Няма активност	Има активност	Няма активност	Има активност
Целулазна активност	Има активност	Няма активност	Има активност	Няма активност	Има активност
Пектиназна активност	Има активност	Няма активност	Има активност	Няма активност	Има активност
Производство на амониеви йони	Има активност	Има активност	Има активност	Има активност	Има активност
Синтез на индол-оцетна киселина	Има активност	Много висока активност	Има активност	Слаба активност	Висока активност

От резултатите представени в Табл. 11, получени за изследваните щамове от род *Bacillus* можем да направим следното обобщение:

Щамовете *B. subtilis* 6VR и *B. subtilis* 8VR, принадлежащи към вида *B. subtilis*, проявяват всички изследвани PGP-активности. Тези щамове се отличават с висока антимикробна активност и секретират всички изследвани ензимни активности. Наличието на хитиназна и целулазна ензимна активност, допълват потенциалния им спектър на биоконтрол им срещу различни фитопатогени. Щам *B. cereus* 7VR синтезира най-високото измерено количество от 16,67 µg/ml индол-оцетна киселина измерено в ХСЗ, в сравнение с останалите изследвани щамове. Щам *B. pumilus* 9VR се отличава с висока антигъбна активност, като проявява антагонистична активност срещу всички изследвани филamentозни гъби. Щам *B. thuringiensis* 13VR се отличава с

изявена антагонистична активност срещу представители на род *Fusarium* и продуцира значителни количества индол-оцетна киселина в изследваните хранителни среди. Наличието на изследваните PGP-активности при щамове *B. subtilis* 6VR, *B. subtilis* 8VR и *B. thuringiensis* 13VR ги прави подходящи за включването им в биопрепарати, свързани с биоконтрола на различни патогени по техническите растителни култури. Синтезата на значително количество индол-оцетна киселина, измерено при щам *B. cereus* 7VR, го прави подходящ за включването му в биоформули, стимулиращи растежа и развитието на растенията.

VI. ИЗВОДИ

1. Пет новоизолирани щама са морфологично, физиолого-биохимично и молекулярно-генетично охарактеризирани до вид и са установени техни PGP-активности: антагонистична активност срещу бактериални фитопатагени и филаментозни гъби, синтезата на литични ензими, допълваща потенциала им като агенти за биоконтрол към различни патогени, синтезата на индол-оцетна киселина, стимулираща растежа и развитието на растетният, както и образуването на ендоспори с висок титър.

2. Два от изследваните щамове, *Bacillus subtilis* 6VR и *B. subtilis* 8VR, проявяват анатагонистична активност срещу фитопатагенните видове *Clavibacter michiganensis* и *Xanthomonas vesicatoria*. Щам *B. pumilus* проявява активност срещу патогени и/или увреждащи земеделската продукцията филаментозни гъби от родовете *Fusarium* и *Rhizopus*.

3. Установено е, че култивирането на изследваните щамове в новоконструирани хранителни среди XC2 и XC3 повишава клетъчната им плътност и стимулира синтезата на индол-оцетна киселина.

4. Установено е, че щамовете *B. cereus* 7VR и *B. thuringiensis* 13VR продуцират значими количества индол-оцетна киселина в XC3 (16.67 µg/ml и 8.99 µg/ml) на 216 час от ферментационния процес.

5. Доказано е, че добавянето на аминокиселините L-аспарагин в XC2 и L-триптофан в XC3 стимулира спорообразуването на следните щамове: *Bacillus subtilis* 6VR, *Bacillus cereus* 7VR, *Bacillus subtilis* 8VR и *Bacillus pumilus* 9VR в сравнение с контролната хранителна среда (XC1).

6. Определено е, че третирането на семена от *Lactuca sativa* с 120 часова CFS от XC2 и с 216 часова CFS от XC1 от изследваните щамове, стимулира кълняемостта на семената в сравнение с контролата.

7. Доказано е, че третирането на семена от *Pisum sativum* с 120 часова CFS от XC2 и XC3 от изследваните щамове, както и с растежни регулатори (GA3 и IAA) повишава броя на двойките листа в сравнение с контролата.

8. Установено е, че третирането на растения от риган (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) с щамове от род *Bacillus*, повишава броя на трихомите с 11% при щам *B. cereus* 7VR и с 30% при щам *Bacillus subtilis* 8VR, но не повишава съдържанието на тимол в етеричното масло от риган.

VII. ПРИНОСИ

1. Доказани са набор от директни и индиректни механизми за стимулиране растежа и развитието на растенията при щамове *B. subtilis* 6VR, *B. cereus* 7VR, *B. subtilis* 8VR и *B. thuringiensis* 13VR, определящи ги като микроорганизми стимулиращи растежа и развитието на растенията (PGPR).

2. Доказано е, че третирането на семена от градински грах (*Pisum sativum*) с 120 часова безклетъчна супернатанта от трите хранителни среди повишава броя на двойките листа, което ги прави подходящи за приложение при отглеждането на зеленолистни зеленчуци като къдрава салата (*Lactuca sativa*).

3. При третиране на семена от къдрава салата (*Lactuca sativa*), градински грах (*Pisum sativum*) и растения от риган (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) с изследваните щамове се наблюдава повишаване на отчетените биометрични показатели, което е предпоставка за използването им, като подобрители при отглеждането на зеленолистни зеленчуци и етеричномаслени растителни култури.

4. Щам *B. subtilis* 6VR е потенциален компонент на препарати, осъществяващи биоконтрол срещу фитопатогени от род *Fusarium*, в резултат от своята значима антагонистична активност.

VIII. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ

ПУБЛИКАЦИИ В СПИСАНИЯ, КОИТО НЕ СЕ РЕФЕРИРАТ

1. Annual of Sofia University "St. Kliment Ohridski" Faculty of Biology Book 4 - Scientific Sessions of the Faculty of Biology 2019, volume 104, pp. 368-373 International Scientific Conference "Kliment's Days", Sofia 2018. **"MOLECULAR IDENTIFICATION OF FIVE BACILLUS STRAINS WITH PLANT GROWTH POTENTIAL ABILITIES"**. VESELKA GEORGIEVA, DILYANA NIKOLOVA, YANA EVSTATIEVA.

ПУБЛИКАЦИИ В СПИСАНИЯ, КОИТО СЕ РЕФЕРИРАТ

Agricultural University – Plovdiv AGRICULTURAL SCIENCES Volume 13 Issue 31 2021. **EFFECT OF FIVE BACILLUS STRAINS ON SEED GERMINATION OF PISUM SATIVUM AND PLANT GROWTH OF ORIGANUM VULGARE SUBSP. HIRTUM (OREGANO)**. Veselka Georgieva¹, Ivan Traykov, Dilyana Nikolova, Yana Evstatieva

УЧАСТИЯ НА НАЦИОНАЛНИ НАУЧНИ ФОРУМИ /доклад, постер/:

Yana Evstatieva, Dilyana Nikolova, **Veselka Georgieva**, Valentin Savov OPTIMIZATION OF MEDIUM COMPONENTS FOR BIOMASS PRODUCTION OF PLANT GROWTH-PROMOTING STRAINS FROM BACILLUS GENUS,, Първа национална конференция по Биотехнология – 30 години Биотехнология в България“, 17-18 октомври, 2014.

Dilyana Nikolova, Yana Evstatieva, Svetlana Bratkova, **Veselka Georgieva**, Valentin Savov. "CHARACTERIZATION ON FIVE NEW ISOLATED BACILLUS STAINS AS POTENTIAL PLANT-GROWTH-PROMOTING BACTERIA", Първа национална конференция по Биотехнология – 30 години Биотехнология в България“, 17-18 октомври, 2014.

GEORGIEVA Veselka, EVSTATIEVA Yana, SAVOV Valentin, NIKOLOVA Dilyana, "MOLECULAR IDENTIFICATION ON FIVE BACILLUS STRAINS WITH PLANT GROWTH PROMOTION ABILITIES". ПЪРВИ МЛАДЕЖКИ СЕМИНАР ПО ГЕНЕТИКА, Биологически факултет, СУ, София, България, 24 ноември 2017 г.

Veselka Georgieva, Dilyana Nikolova, Yana Evstatieva. "IN VITRO INVESTIGATION OF THE PRODUCTION OF INDOLE ACETIC ACID BY FIVE BACILLUS STRAINS". Научна конференция "Климентови Дни, 05 ноември 2020 г.

УЧАСТИЯ НА МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ ФОРУМИ /доклад, постер/:

Veselka GEORGIEVA, Yana EVSTATIEVA, Dilyana NIKOLOVA, Teodora GEORGIEVA, Valentin SAVOV, "Investigation of rhizospheric *Bacillus* strains as antifungal agents". International Scientific Symposium "CURRENT TRENDS IN NATURAL SCIENCES" University of Pitesti, Romania 19 – 21 04. 2018 г.

Veselka Georgieva, Dilyana Nikolova, Anita Tosheva, Valentin Savov, Yana Evstatieva, "IN VITRO ASSESSMENT OF PLANT GROWTH PROMOTING OF FIVE BACILLUS STRAINS", INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE "KLIMENT'S DAYS", България/София 2018, 08-09/11 2018

Yana Evstatieva, Dilyana Nikolova, **Veselka Georgieva**, Anita Tosheva, Evaluation of plant growth promoting activity of rhizospheric *Bacillus* strains, International symposium "Power of Microbes in Industry and Environment 2019", Хърватия, 14 – 19.05.2019 г.

Veselka Georgieva, Ivan Traykov, Dilyana Nikolova, Yana Evstatieva, "EFFECT OF FIVE BACILLUS STRAINS ON SEED GERMINATION OF PISUM SATIVUM AND PLANT GROWTH OF ORIGANUM VULGARE SUBSP. HIRTUM (OREGANO)", 75 години Аграрен Университет – Пловдив. Юбилейна научна конференция с международно участие - „Перспективи пред аграрната наука и иновации за устойчиви продоволствени системи“, Пловдив 26 -28 ноември 2020 г.

УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ:

На МОМН /ръководител на проекта, № на проекта, заглавие на проекта

Национална научна програма „Здравословни храни за силна биоикономика и качество на живот“, Министерство на Образованието и Науката – член на екипа от 30.11.2018 г.

На СУ /ръководител на проекта, № на проекта, заглавие на проекта/

Ръководител на проекта – доц. д-р Яна Евстатиева, Номер на договора: 8010-52 от 17.04.2018г., членове: доц. д-р Диляна Николова, редовен докторант **Веселка Георгиева**. Фонд научни изследвания на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, „Изследване биосинтезата на регулаторни метаболити от щамове от род *Bacillus* и влиянието им върху развитието на растителни видове с индустриално значение.“

Изследване характеристиките и биосинтетичния потенциал на щамове от род *Bacillus* и влиянието им върху развитието на растителни видове с индустриално значение

Веселка Йорданова Георгиева

*В настоящата дисертационна работа са охарактеризирани група от значими щамове от род *Bacillus* чрез физиологични, биохимични и молекулярно– генетични методи. Доказването на директните и индиректни активности на работните щамове чрез изследване синтеза на литични ензими, наличието на значими антимикробни активности, продукцията на високи концентрации на индол-оцетна киселина, както и продукцията на спори с висока плътност 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 стимулиране развитието на различни растителни култури и биоконтрола на болестите при растителни видове с индустриално значение. Оптимизиране състава на хранителните среди чрез добавянето на индуктори в тях доведе до получаването на високоплътностни култури и до повишаване биосинтетична активност на щамовете по отношение на вещества с регулаторни свойства. Проведените изследвания насочени към изолиране, охарактеризиране на нови щамове синтезиращи високи концентрации на ауксини, оптимизиране състава на хранителните среди и приложението им върху растения представлява принос за създаването на нови биоформули и тяхното приложение в растениевъдството. Получените резултати при оптимизиране състава на хранителните среди и получаването на високи добиви на ауксини, представляват основа за производството на нови микробиални препарати и приложението им в биологичното земеделие.*


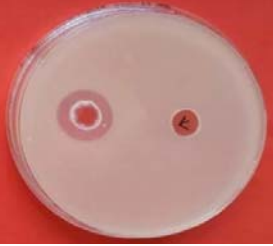








Study of characteristics and biosynthetic potential of *Bacillus* strains and their influence on the development of plant species of industrial importance

Veselka Yordanova Georgieva

In the present dissertation work a group of potentially significant strains of the genus Bacillus are characterized by physiological, biochemical and molecular genetic methods. Demonstration of direct and indirect activities of working strains by studying the synthesis of lytic enzymes, the presence of significant antimicrobial activities, the production of high concentrations of indole-acetic acid and the production of high-density spores led to their identification as rhizobacteria improving development of plants (PGPR). It is "plant growth promoting" - the potential of microorganisms is one of the factors leading to the development of sustainable strategies to stimulate the development of various crops and biocontrol of diseases in plant species of industrial importance. Optimization combines nutrient media with the addition of inducers in them led to the production of high-density cultures and to increase the biosynthetic activity of strains in relation to substances with regulatory properties. The conducted research aimed at isolation, characterization of new strains synthesizing high concentrations of auxins, optimization of the composition of nutrient media and their application on plants is a contribution to the creation of new bioformulas and their application in crop production. The results obtained in optimizing the composition of nutrient media and obtaining high yields of auxins are the basis for the production of new microbial preparations and their applications in organic farming.

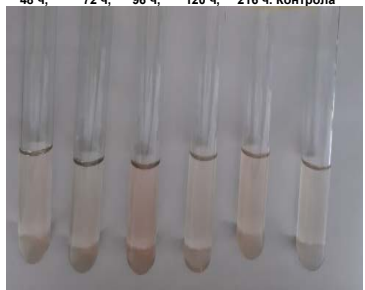

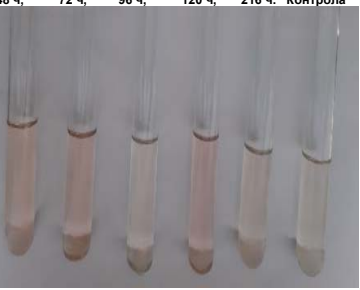



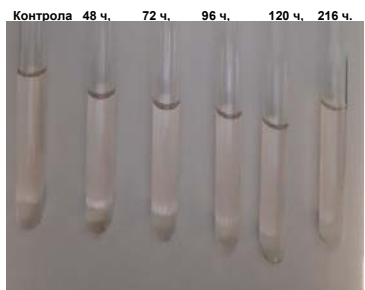
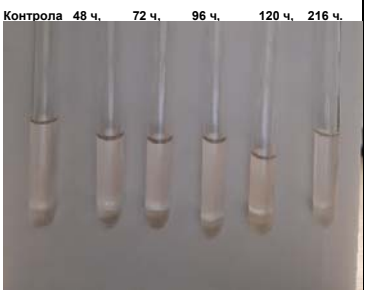
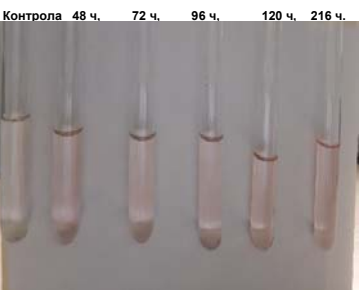
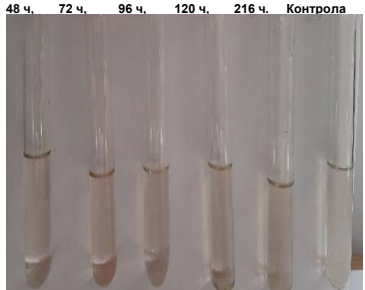
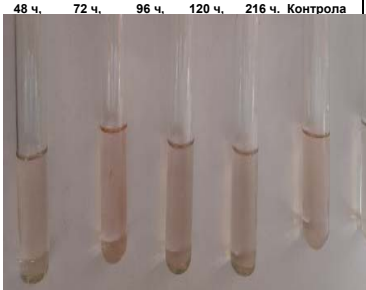
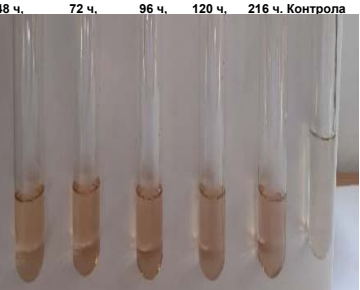
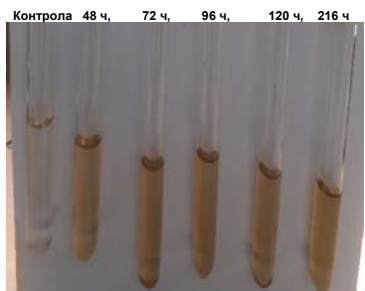
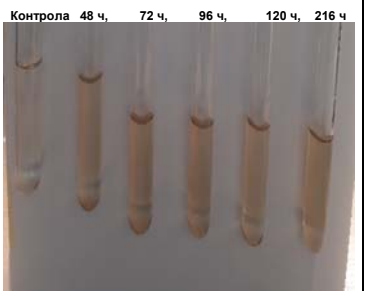
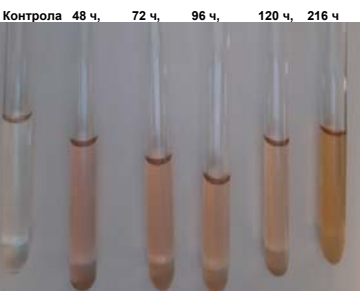
IX. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Щам	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> BTCC 2425	<i>Xanthomonas vesicatoria</i> BTCC 2427
<i>Bacillus subtilis</i> 6VR		
<i>Bacillus cereus</i> 7VR		
<i>Bacillus subtilis</i> 8VR		
<i>Bacillus pumilus</i> 9VR		
<i>Bacillus thuringiensis</i> 13VR		
















Приложение 2

Съдържание на IAA в бактериални филтрати от изследваните щамове от род *Bacillus*.

	XC1	XC2	XC3
<i>Bacillus subtilis</i> 6VR	48 ч., 72 ч., 96 ч., 120 ч., 216 ч. Контрола 	48 ч., 72 ч., 96 ч., 120 ч., 216 ч. Контрола 	48 ч., 72 ч., 96 ч., 120 ч., 216 ч. Контрола 
<i>Bacillus cereus</i> 7VR	48 ч., 72 ч., 96 ч., 120 ч., 216 ч. Контрола 	48 ч., 72 ч., 96 ч., 120 ч., 216 ч. Контрола 	48 ч., 72 ч., 96 ч., 120 ч., 216 ч. Контрола 
<i>Bacillus subtilis</i> 8VR	Контрола 48 ч., 72 ч., 96 ч., 120 ч., 216 ч. 	Контрола 48 ч., 72 ч., 96 ч., 120 ч., 216 ч. 	Контрола 48 ч., 72 ч., 96 ч., 120 ч., 216 ч. 
<i>Bacillus pumilus</i> 9VR	48 ч., 72 ч., 96 ч., 120 ч., 216 ч. Контрола 	48 ч., 72 ч., 96 ч., 120 ч., 216 ч. Контрола 	48 ч., 72 ч., 96 ч., 120 ч., 216 ч. Контрола 
<i>Bacillus thuringiensis</i> 13VR	Контрола 48 ч., 72 ч., 96 ч., 120 ч., 216 ч. 	Контрола 48 ч., 72 ч., 96 ч., 120 ч., 216 ч. 	Контрола 48 ч., 72 ч., 96 ч., 120 ч., 216 ч. 
















Приложение 3

А) Визуализиране ефекта след третирането на семена от грах с 120 ч. 100x CFS от щамове от род *Bacillus*.

Щам	XC1	XC2	XC3
120 ч. CFS 6VR 100x			
120 ч. CFS 7VR 100x			
120 ч. CFS 8VR 100x			
120 ч. CFS 9VR 100x			
120 ч. CFS 13VR 100x			
















Приложение 3

Б) Визуализиране ефекта след третирането на семена от грах с 120 ч.500х разредена CFS от щамове от род *Bacillus*.

Щам	XC1	XC2	XC3
120 ч. CFS 6VR 500x			
120 ч. CFS 7VR 500x			
120 ч. CFS 8VR 500x			
120 ч. CFS 9VR 500x			
120 ч. CFS 13VR 500x			
















Приложение 3

В) Визуализиране ефекта след третирането на семена от грах с 216 ч. 100x разредена CFS от щамовете от род *Bacillus*.

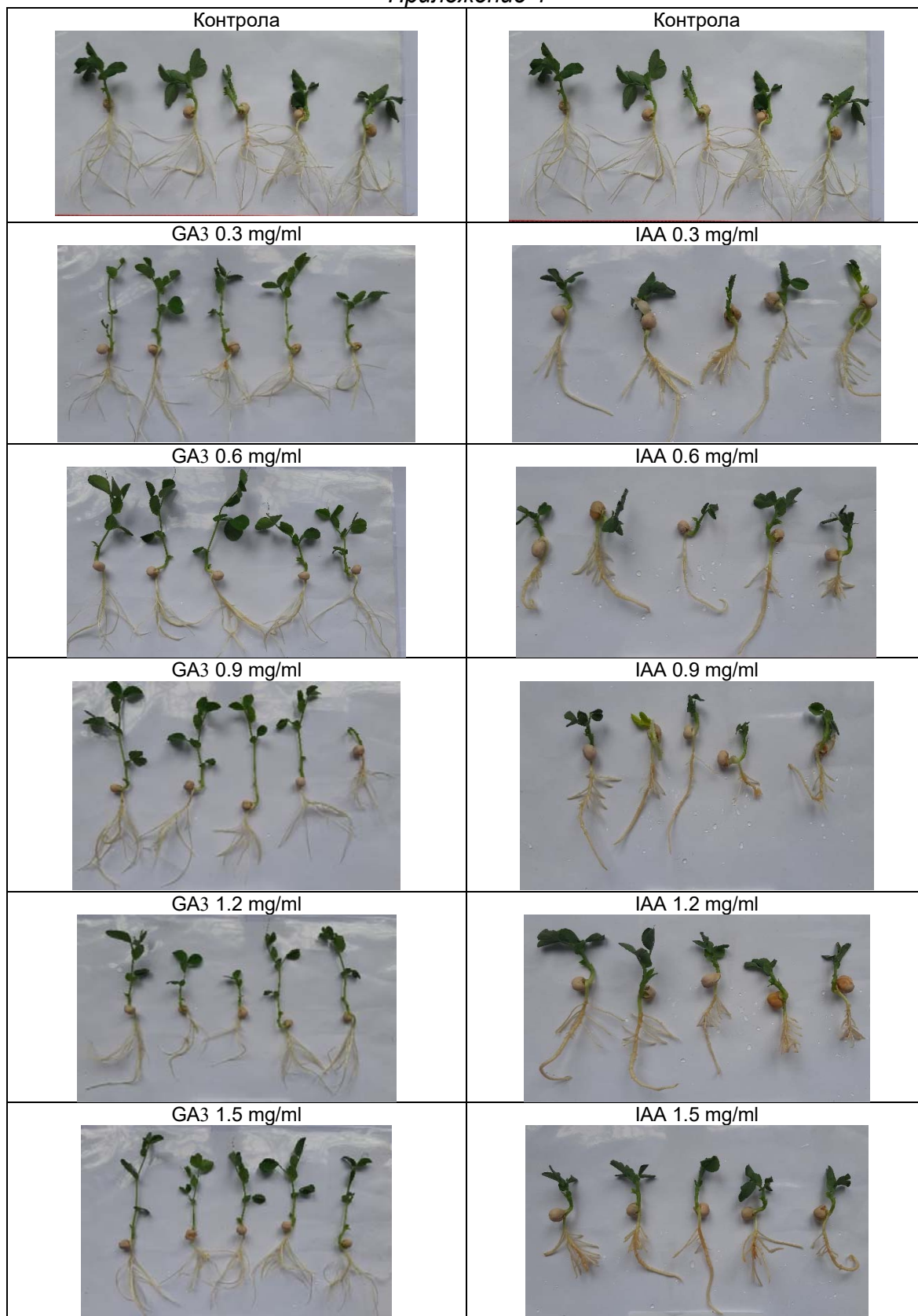
Щам	XC1	XC2	XC3
216 ч. CFS от 6VR 100x			
216 ч. CFS от 7VR 100x			
216 ч. CFS от 8VR 100x			
216 ч. CFS от 9VR 100x			
216 ч. CFS от 13VR 100x			

Приложение 3

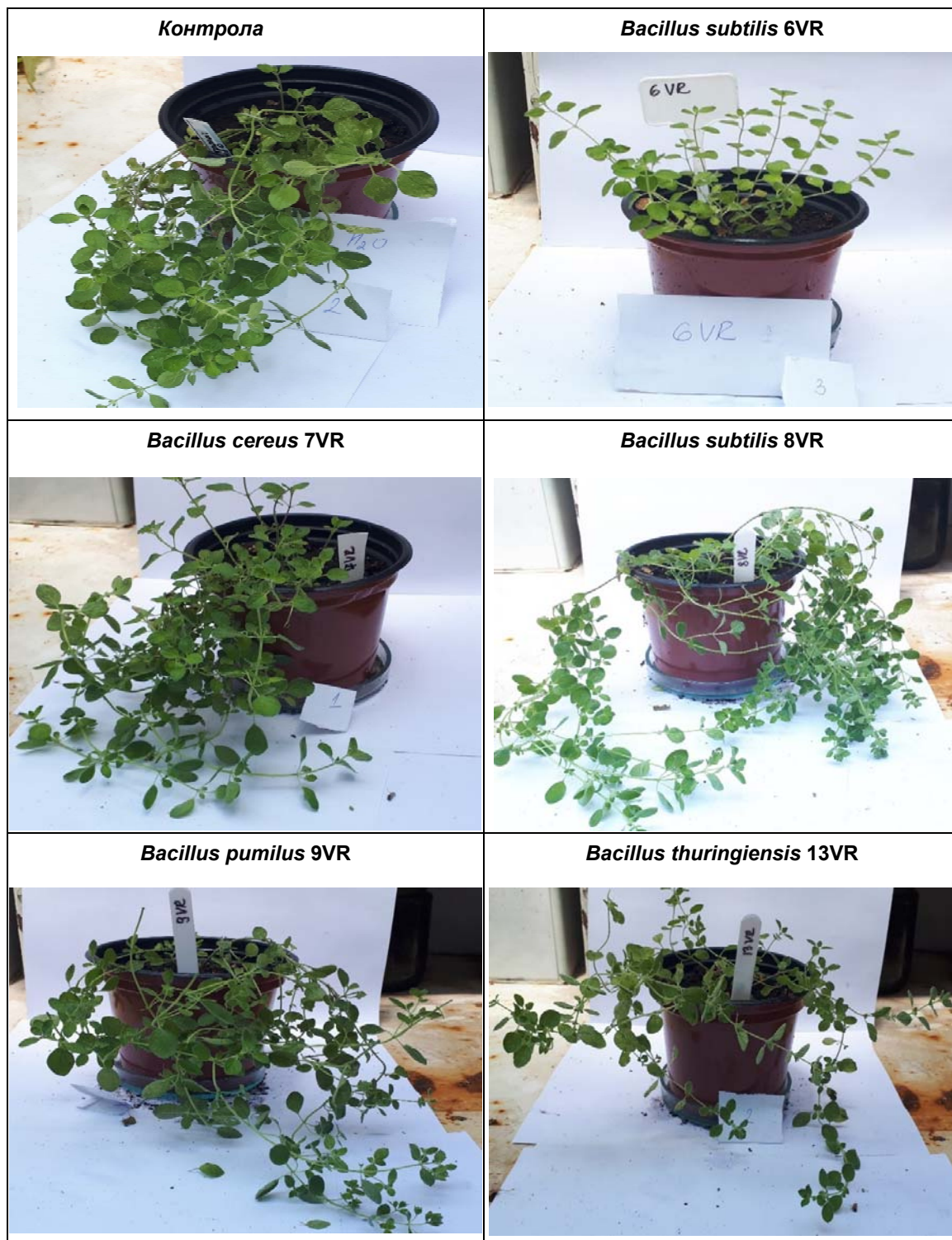
Г) Визуализиране ефекта след третирането на семена от грах с 216 ч. 500x разредена CFS от щамове от род *Bacillus*.

Щам	XC1	XC2	XC3
216 ч. CFS 6VR 500x			
216 ч. CFS 7VR 500x			
216 ч. CFS 8VR 500x			
216 ч. CFS 9VR 500x			
216 ч. CFS 13VR 500x			

Приложение 4



Приложение 5



Приложение 6

Растения от риган третирани с клетъчна суспензия (CS) от щамове от род *Bacillus*



Растения от риган третирани с гиберелинова киселина (GA3) и индол-оцетна киселина (IAA)

