



АГРАРЕН УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ
ФАКУЛТЕТ „РАСТИТЕЛНА ЗАЩИТА И АГРОЕКОЛОГИЯ”
КАТ. „МИКРОБИОЛОГИЯ И ЕКОЛОГИЧНИ БИОТЕХНОЛОГИИ“

ИВЕЛИНА ДИМИТРОВА НЕЙКОВА

**ФИТОРЕМЕДИАЦИЯ НА ТЕЖКИ МЕТАЛИ В
ЗАМЪРСЕНА ПОЧВА ЧРЕЗ КОМПСТИ И ПОЛЕЗНИ
МИКРООРГАНИЗМИ ПРИ ЗЕЛЕНЧУКОВИ РАСТЕНИЯ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

Професионално направление 4.4. Науки за Земята
Научна специалност „Екология и опазване на екосистемите“

Научни ръководители:

Доц. д-р Ст. Шилев

Доц. д-р Т. Бабриков

Пловдив, 2022

Дисертационният труд е написан на 200 страници и съдържа 29 таблици и 61 фигури. В списъка на цитираната литература са посочени 508 източника, от които 2 на кирилица и 506 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насрочен за защита от разширен Катедрен съвет на катедра “Микробиология и екологични биотехнологии”, факултет по „Растителна защита и агроекология“, Аграрен университет - Пловдив, проведен на 09.05.2022 г.

Номерацията на разделите, фигурите и таблиците не съответства на тази в дисертацията.

Специализираното научно жури:

Вътрешни членове:

Проф. д-р Виолина Ризова
Доц. д-р Екатерина Вълчева

Външни членове:

Проф. д-р Дилиан Георгиев
Доц. д-р Гана Гечева
Доц. д-р Ивелин Моллов

Публичната защита на дисертацията ще се проведе на 2022 г. от часа в зала №, на Аграрен Университет-Пловдив. Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се на сайта на АУ-Пловдив (<http://www.au-plovdiv.bg>).

Съдържание	3
I. Въведение	5
II. Цел и задачи на дисертационния труд	6
III. Методи и материали	6
3.1. Изолиране на микроорганизми, стимулиращи растежа на зеленчуковите растения	6
3.2. Толерантност към тежки метали (Pb, Cd, Zn)	
3.3. Съдови опити	6
3.4. Статистическа обработка на данните	8
IV. Резултати и обсъждане	8
4.1. Изолиране на микроорганизми толерантни на тежки метали.	8
4.2. Охарактеризиране на изолатите	9
4.2.1. Образуване на индолоцента киселина	9
4.2.2. Образуване на сидерофори	10
4.2.3. Идентифициране на изолатите	10
4.2.3.1. Метаболитно идентифициране чрез системата Biolog	10
4.2.3.2. Молекулярна идентификация посредством 16S рДНК секвенционен анализ.	10
4.2.4. Изпитване способността на изолатите да стимулират покълването на семената и развитието на младите растения	11
4.3. Изследване на промените в системата почва-ризосфера-растение – първи опит.	13
4.3.2. Биометрични показатели на растенията от спанак	13
4.3.3. Натрупване на тежки метали в растенията	16
4.3.4. Анализ на микробните съобщества в почвата.	17
4.3.4.1. Дехидрогеназна активност	17
4.3.4.2. β -глюкозидазна активност	17
4.4. Изследване на промените в системата почва-ризосфера-растение – втори опит.	18
4.4.1. Съдържание на азот и фосфор в неризосферната и ризосферната почва	18
4.4.2. Биодостъпни фракции на Pb, Zn и Cd (ISO 14870)	19
4.4.3. Екстракция на тежки метали	21
4.4.4. Биометрични показатели на растенията от спанак, грах и репички	23
4.4.5. Анализ на микробните съобщества в почвата.	25
4.4.5.1. Дехидрогеназна активност.	25
4.4.5.2. β – глюкозидазна активност	25
4.5. Изследване на промените в системата почва-ризосфера-растение – трети опит.	26
4.5.1. Биодостъпни фракции на Pb, Zn и Cd	26
4.5.2. Екстракция на тежки метали	27
4.5.3. Биометрични показатели на растенията от спанак	29
4.5.4. Анализ на развитието на микробните съобщества в почвата	31
4.5.4.1. Дехидрогеназна активност	31
4.5.4.2. β – глюкозидазна активност	32
4.5.4.3. Промени в метаболитните профили на почвените микробни	

съобщества	32
V. Заключение	34
VI. Изводи	34
VII. Приноси	35
5.1. Научно-приложни приноси	35
5.2. Приложни приноси	35
VIII. Публикации свързани с темата на дисертациония труд	36

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Тежките метали представляват един от най-токсичните и перзистентни замърсители в земеделието, заедно с пестицидите. Продължаващо замърсяване с тях на компонентите на околната среда е трудно за овладяване, предвид стремежът на глобалната икономика, отправен към разрастване на търговията, повишаване благосъстоянието, стандартите и качеството на живот, както и увеличаването на продукцията, предвидена за консумация. Цел и мисия, залегнала в цялостната политика на Европейския съюз е да следи за придържането към изискванията за уеднаквяване условията на конкуренцията в очертавания се единен транснационален пазар. Това ще доведе до производство и потребление на възможно най-екологично чисти стоки и услуги, пощадяване на възобновимите и невъзобновимите природни ресурси и грижа за популациите и природното богатство.

Мониторингът на почвите и земите у нас се извършва на три нива от 15 акредитирани регионални лаборатории на ИАОС. Наблюденията на първо ниво (I ниво-широкомащабен мониторинг) се осъществяват в равномерна мрежа 16x16 km в 397 пункта на всеки 5 г. и са насочени към идентификация актуалното състояние на почвите по няколко основни показатели: 9 тежки метали и металоиди, общ азот, органичен водород, фосфор, рН активна реакция на почвата, нитратен азот, електропроводимост, общ въглерод и устойчиви органични замърсители – 16 ПАХ, 6 РСВ, 15-хлор органични замърсители, обемна плътност.

В резултат на експертните становища се предприемат мерки, отговарящи със своята адекватност и своевременност на текущото състояние. Като най-отчетлив и ползотворен подход, свързан с пречистването на околната среда от наслойването и високата концентрация на тежки метали, е фиторемедиацията. Сред преимуществата, които методът крие, е възможността да бъде прилаган на място, към съответния момент на изследване. Сред недостатъците можем да посочим недостигът на финансови средства, пространствено-времените ограничения (фиторемедиацията у нас е епизодична и едностранчива), необходимостта от комплексен подход в областта, участие в който вземат редица дисциплини като химия, физиология, екология, микробиология и др.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се изследват възможностите за подобряване на растежа и развитието на зеленчукови растения, отглеждани върху замърсена с тежки метали почва, с използване на екологичен подход.

За практическото осъществяване на целта са възложени няколко основни задачи:

1. Изолиране на микроорганизми толерантни на тежки метали;
2. Селектиране на изолати способни да стимулират растежа на зеленчукови култури;
3. Видово идентифициране на изолатите;
4. Проучване развитието на зеленчукови култури върху замърсена почва с използване на компости и селектирани популации полезни микроорганизми;
5. Изследване поведението на тежките метали в замърсената почва с прилагане на компости и подходящи популации полезни микроорганизми;
6. Проучване на промените в микробни съобщества в ризосферата и неризосферата на използваните зеленчукови растения.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1. Изолитране на микроорганизми, стимулиращи растежа на зеленчуковите растения.

С цел поситгане на оптимални резултати и точност на емпиричните изследвания във връзка с изолацията на микроорганизми, стимулиращи растежа на зеленчуковите растения, са иззети почвени проби от ризосферата на следните растителни видове: сем. *Lamiaceae* – *Lamium amplexicaule* (Стъблообхващаща мъртва коприва), сем. *Brassicaceae* – *Capsella bursa pastoris* (Овчарска торбичка), сем. *Geraniaceae* – *Geranium molle* (Нежен здравец), сем. *Valerianaceae* – *Valerianella sp.* (Мотовилка) и сем. *Asteraceae* – *Cirsium sp.* (Магарешки бодил) от района на КЦМ – Пловдив.

След пренасянето на същите в лабораторията на катедра „Микробиология и екологични биотехнологии“ по стандартна методика са направени десетични разреждания в стерилна дестилирана вода. Извършени са посевки върху агаризирана хранителна среда, съдържаща концентрация на: Cd – 2 ppm, Pb – 10 ppm и Zn – 50 ppm.

Морфологичните характеристики на изолатите се изследваха по стандартни методи (Сапунджиева и др., 2010). Образоването на индолоцетна киселина и сидерофори се тества по методите описани от Belimov et al. (2005) и Perez-Miranda et al. (2007), съответно.

3.2. Толерантност към тежки метали (Pb, Cd, Zn).

Различни разтворими соли на тежки метали бяха добавени в колби със свежо приготвен хранителен агар, така че да се постигнат съответните концентрации, а именно: Pb - от 50 до 1100 ppm, Zn - от 100 до 300 ppm и Cd - от 5 до 100 ppm. Това се осъществи след приготвяне на стерилни изходни разтвори (стерилизирани чрез филтруване през пори ϕ 0,22 μ m). Изолатите бяха инокулирани в колби с хранителен бульон (100 ml) за цяла нощ, след което се посяха върху петрита с агар, съдържащ съответните концентрации. Максималната толерантност към тежки метали беше определена въз основа на наличие на растеж след инкубиране при температура от 28 °C за 24 – 48 h.

3.3. Съдови опити.

За целите на опита се използва замърсена с тежки метали почва от района на КЦМ – Пловдив и компост от фирма „Биовет“ Пещера АД, както и семена от спанак *Spinacea oleracea* L. сорт „Матадор“. Подборът не е случаен – предвид особеното и специфично влияние на почвените характеристики и най-вече киселинността на почвата върху подвижността на тежките метали и възможността за абсорбирането им от растенията, районът на КЦМ-Пловдив се явява изключително благодатен за провеждането на научните изследвания.

3.3.1. Първи съдов опит.

Опитът се заложи в три варианта с по три повторения, както следва (табл. 1):

Таблица 1. Опитна постановка.

Вариант	
1	Замърсена почва (100 %)
2	Замърсена почва (75%) + компост (25%, v/v)
3	Замърсена почва + <i>P. fluorescens</i>

Почвата предварително беше почистена от растителни остатъци и камъни. При извеждане на опита се използваха пластмасови сандъчета с вместимост 6000 cm³. Във визираните първи и трети варианти почвата бе поставена директно в сандъчетата, докато

във втори тя предварително бе смесена с компост в съотношение 3:1 (v:v) и престоя така 14 дни.

Семената бяха засети в две редици по дължината на сандъчетата, като тези от трети вариант се третираха предварително със суспензия на *Pseudomonas fluorescens* биотип F. В хода на експерименталните проучвания отново бе потвърдена толерантността на тази бактерия към Pb, Cd, Zn, As, както и качествата ѝ на стимулатор на растежа на растенията, отделяйки в средата индолоцетна киселина и сидерофори.

Не беше установено тази бактерия да притежава ензима АСС-дезаминаза. Популация на *P. fluorescens* беше внесена в почвата на два пъти през вегетацията. Внасянето се извърши в концентрация 10^4 к.о.е./cm³ почва.

3.3.2. Втори съдов опит.

Във втория експеримент се използва замърсена с тежки метали почва от района на КЦМ - Пловдив и компост от фирма „Биовет” Пещера АД, както и семена от спанак (*Spinacea oleracea* L.) сорт „Матадор”, репички (*Raphanus sativus* L.) сорт „Регал” и грах (*Pisum sativum* L.) сорт „Ран 1”. Опитът се изведе във вегетационната къща в три варианта с по три повторения, както следва:

Таблица 2. Втора опитна постановка.

Номер	Вариант
1	Замърсена почва (100 %)
2	Замърсена почва (75%) + компост (25 %, v/v)
3	Замърсена почва (75%) + компост (25 %, v/v) + <i>P. fluorescens</i>

За нуждите и пълнотата на резултатите от опита по време на вегетационния период на растенията бяха поетапно измервани дължината на листата на растенията от спанак, репички и грах, дължината на листната им дръжка и диаметърът на листната розетка.

Извършиха се редица биометрични, физиологични (интензивност на хлорофилната флуоресценция), ензимологични (дехидрогеназна и β-глюкозидазна активност) и химични (рН, ЕС и подвижни форми на тежките метали в почвата; натрупване на тежки метали в растителните тъкани) изследвания.

3.3.3. Трети съдов опит.

Този финален опит се заложи със замърсена с тежки метали почва от КЦМ – Пловдив, компост от „Биовет” – гр. Пещера АД, семена от спанак (*Spinacea oleracea* L.) сорт „Матадор” и различни бактериални изолати, в това число и комбинации от тях. Съотношението на почвата и компостът при всички варианти беше 75%:25% (v:v).

Опитът се изведе във вегетационната къща на катедрата и беше заложен в десет варианта с по три повторения, както следва:

Таблица 3. Трета опитна постановка.

Номер	Варианти
1	Замърсена почва
2	Замърсена почва + компост
3	Замърсена почва + компост + изолати №32, 32', 41, 44
4	Замърсена почва + компост + изолати №32, 32', 44, 44'
5	Замърсена почва + компост + изолат №32
6	Замърсена почва + компост + изолат №32'
7	Замърсена почва + компост + изолат №41

8	Замърсена почва + компост + изолат №41‘
9	Замърсена почва + компост + изолат №44
10	Замърсена почва + компост + изолат №44‘

Почвата бе предварително почистена от растителни остатъци и камъни, като за извеждането на опита в приложение влязоха пластмасови саксии с вместимост 4000 cm³.

В предходни експерименти посочените популации бяха доказано толерантни към Pb, Cd, Zn, както и потвърдено стимулиращи развитието на растенията, отделяйки в средата индолоцетна киселина и сидерофори. Популация на различните бактериални изолати беше внесена в почвата на два пъти през вегетацията. Внасянето се извърши в концентрация 10⁶ к.о.е./cm³ почва.

По време на вегетацията на растенията се прибегна до периодични измервания на дължината на листата, дължината на листната дръжка и диаметъра на листната розетка. През втората половина на месец юни растенията бяха прибрани и подложени на редица изследвания (биометрични, физиологични и химични), подробно и нагледно обяснени по-нататък в настоящия труд.

3.4. Статистическа обработка на данните.

Данните са обработени посредством програмата “SPSS” for Windows. Използван е вариационен анализ (три варианта) при оценка на натрупването на Pb, Zn и Cd в различните растителни органи при спанак, репички и грах, като са определени средните стойности на показателите и стандартната грешка (отклонение). Приложен е сравнителен многопосочен анализ по Duncan (1955) и йерархичен клъстерен анализ по метода на евклидовото разстояние между отделните групи.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Изолиране на микроорганизми толерантни на тежки метали.

В резултат на първоначалните стъпки по изолиране на микроорганизми от ризосферата на диворастящи растения от замърсения район на КЦМ-Пловдив се оформи колекция от 35 изолата. В допълнение, определянето на толерантността им се извърши по отношение на способността им да се развиват в среда съдържаща различни концентрации на Cd, Pb или Zn. Данните са представени в табл. 4. Резултатите показват толерантност при бактериите изолирани от ризосферата на следните растителни видове растящи свободно в района на КЦМ – Пловдив: *Lamium amplexicaule* (Стъблообхващаща мъртва комприва), *Capsella bursa pastoris* (Овчарска торбичка), *Geranium molle* (Нежен здравец), *Valerianella sp.* (Мотовилка) и *Cirsium sp.* (Магарешки бодил). Видно от таблицата, изолати № 22 и 32 показват толерантност при всички концентрации (1100 mg Pb kg⁻¹, 100 mg Zn kg⁻¹, 100 mg Cd kg⁻¹). Изолати 31' и 44 проявяват еднаква толерантност с тази на изолати 22 и 32 по отношение на Pb и Zn, но по-ниска по отношение на Cd – 70 ppm. . Изолати 12, 31, проявяват висока толерантност по отношение на Pb (1100 ppm), но по-ниска по отношение на Zn и Cd – 100 ppm и 70 ppm съответно. Най-ниска толерантност по отношение на тестваните метали проявява изолат 11 (Pb 500 ppm, Zn 0 ppm и Cd 20 ppm).

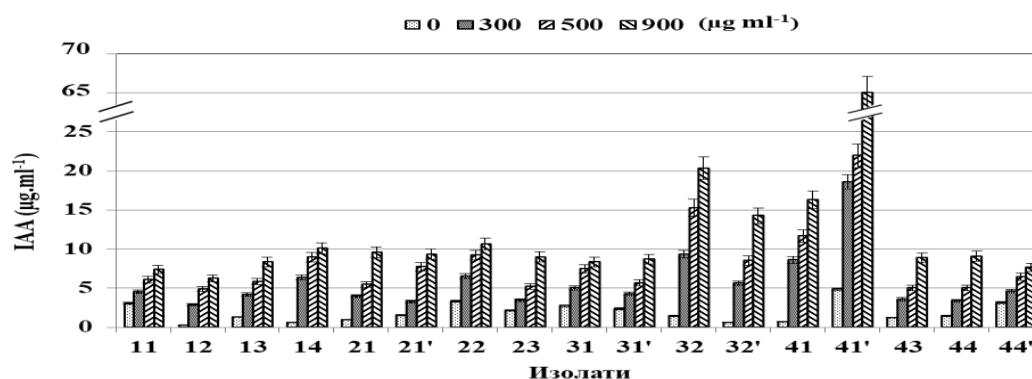
Таблица 4. Толерантност на изолатите към тежките метали.

Изолати	Pb	Zn	Cd
	(mg kg ⁻¹)		
11	500	0	20
12	1100	100	70
13	1100	100	20
14	600	100	20
21	200	0	70
21'	500	100	70
22	1100	200	100
23	600	0	20
31	1100	100	70
31'	1100	200	70
32	1100	100	100
32'	700	100	20
41	500	200	20
41'	500	100	20
43	600	0	20
44	1100	200	70
44'	800	0	70
<i>P. fluorescens</i>	900	100	20

4.2. Охарактеризиране на изолатите.

4.2.1. Образуване на индолецетна киселина.

Образуването на IAA от изолатите в контролния вариант, т.е. без триптофан, беше значително по-слабо изразено в сравнение с вариантите с триптофан, което говори за необходимостта му за образуване на индолецетната киселина (Фиг. 1).



Фигура 1. Образуване на IAA от изолатите 14, 21, 21', 22, 32, 32', 41, 41', 44, 44' в присъствие на различни количества триптофан.

При внасяне на триптофан в средата образуването на IAA се повиши, като беше установена пряка зависимост между увеличаване концентрацията на триптофан и образуването на IAA. По този начин, при 900 µg ml⁻¹ триптофан изолат № 41' (*Bacillus thuringiensis*) образува 64,84 µg IAA mg⁻¹ DW. Изолатите 32, 32' (*P. putida*) и 41 (*Pseudomonas fluorescens*) продуцираха 20,38 µg, 14,28 µg и 16,33 µg IAA mg⁻¹,

съответно. Тези стойности предполагат силен положителен ефект върху образуването на корените на растенията в реални условия.

4.2.2. Образуване на сидерофори.

При нашето проучване се установи промяна на цвета на покривната среда в зоната около микробните колонии от син до жълто-оранжев след период от 30 мин. от прилагането. След прилагане на покривната среда се установи, че изолати 22, 31, 31', 32, 32', 41, 41', 43, 44, 44' образуват сидерофори (Фиг. 2).



Фигура 2. Образуване на сидерофори от изолатите при прилагане на CAS-среда.

4.2.3. Идентифициране на изолатите

4.2.3.1. Метаболитно идентифициране чрез системата Biolog.

След извършеното метаболитно идентифициране се установиха следните резултати: изолатите 32 и 32' са видът *Pseudomonas putida*; изолати 41 и 44' са *Pseudomonas fluorescens*; изолат 41' е *Bacillus thuringiensis*, а изолат 44 е *Pseudomonas synxantha*. Те са определени като неспорообразуващи, докато изолатите 23, 31, 41' се идентифицираха като *Bacillus thuringiensis* и са спорообразуващи.

4.2.3.2. Молекулярна идентификация посредством 16S рДНК секвенционен анализ.

В резултат на молекулярното идентифициране на най-добрите изолати се получиха следните резултати с висока степен на вероятност:

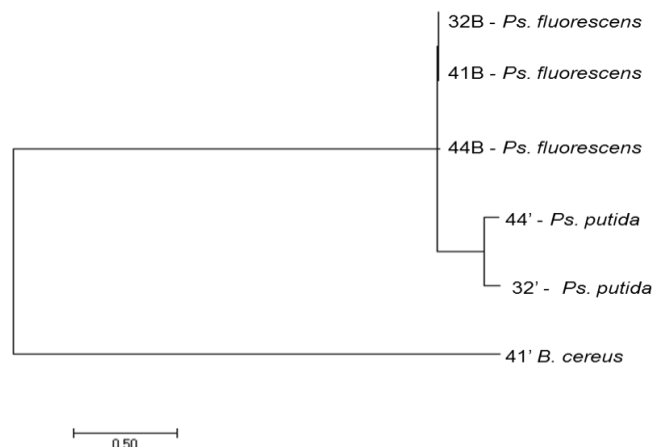
1. 189_50954_Изолат 41' *Bacillus cereus* – 99,56%
2. 190_50955_Изолат 32' *Pseudomonas putida* – 99,53%
3. 191_50956_Изолат 44' *Pseudomonas putida*
4. 192_50957_32B_ *Pseudomonas fluorescens* 16S ribosomal RNA, partial sequence – 99,48%
5. 193_50958_44B *Pseudomonas fluorescens* 16S ribosomal RNA, partial sequence 880 bp – 97,87%
6. 195_50959_41B *Pseudomonas fluorescens* 16S ribosomal RNA, partial sequence 944 bp – 98,52%

Нуклеотидните секвенции на изолатите бяха регистрирани в генбанката на NCBI съответните следните номера (табл. 5).

Таблица 5. Съответствие на изолатите с техните регистрирани секвенциите и номера в генбанката на NCBI.

Изолати	Секвенции	Номера
41'	SUB11494244 seq1	ON557708
32'	SUB11494244 seq	ON557709
44'	SUB11494244 seq3	ON557710
32	SUB11494244 seq4	ON557711
44	SUB11494244 seq5	ON557712
41	SUB11494244 seq6	ON557713

Еволюционната история е представена на фиг. 3.



Фигура 3. Молекулярен филогенетичен анализ по метода на най-голямата вероятност.

Идентифицирането на изолатите не беше еднозначно за всички. При някои изолати се получи разминаване на резултатите, което се отдава на недостатъчно добро изпълнение на методиката на системата Biolog, но и на нейното несъвършенство (Табл. 6).

Таблица 6. Сравнение на резултатите от метаболитното и геномно идентифициране на изолатите.

Изолати	Biolog	DNA
32	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
32'	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
41	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
44'	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
41'	<i>Bacillus thuringiensis/cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
44	<i>Pseudomonas synxantha</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

4.2.4. Изпитване способността на изолатите да стимулират покълването на семената и развитието на младите растения.

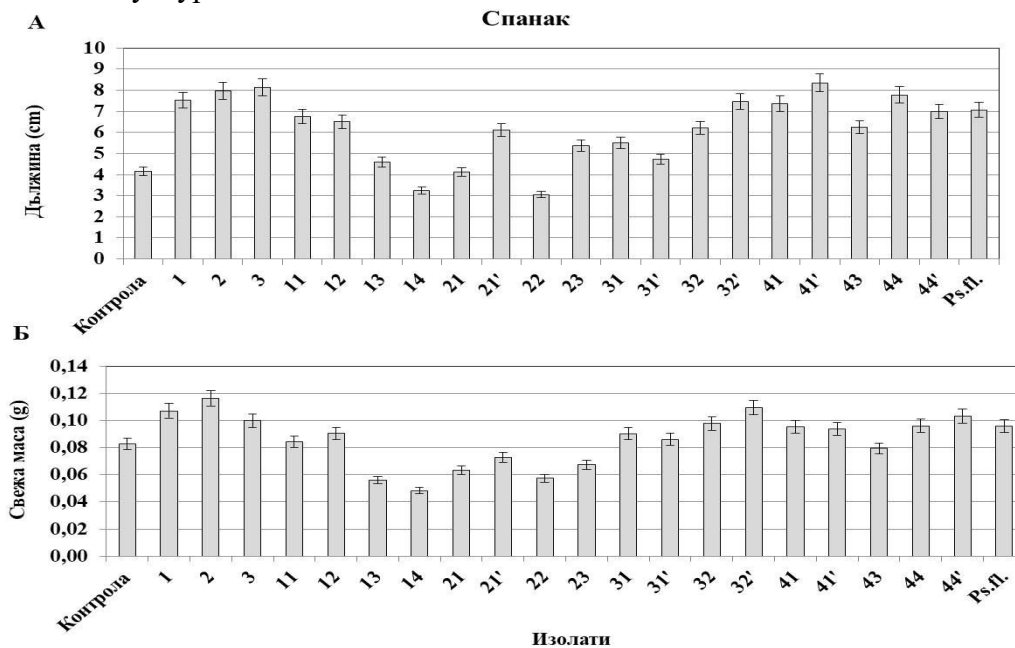
В табл. 7 са представени данни за дължината на новообразуваните коренчета, както и теглото им със семената. По-добри са показателите при изолати 41 и 32. В същото време, тези показатели са по-високи от тези в контролата, съответно с 22% и 43%.

Таблица 7. Дължина на корен и свежа маса на семената от грах.

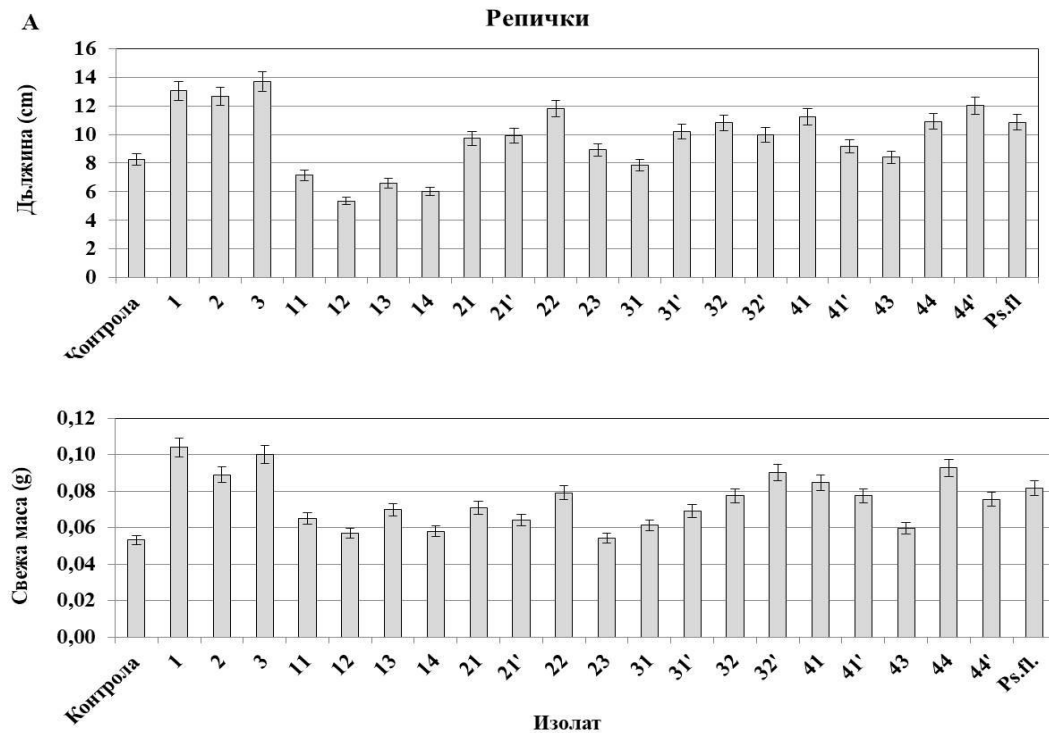
Вариант	Дължина корен (cm)	Свежа маса (g)
Контрол	5,8±0,5	2,9±0,2
41	7,1±0,6	3,2±0,2
32	8,3±0,7	3,6±0,3
44	5,6±0,5	2,8±0,2
41'	6,2±0,4	3,1±0,3

На фигури от 4 до 6 са представени резултатите от изследването на влиянието на популациите на изолатите, изпотани самостоятелно, върху три вида зеленчуци – спанак, репички и грах. Тези видове не са избрани случайно, тъй като те се използват като тест-

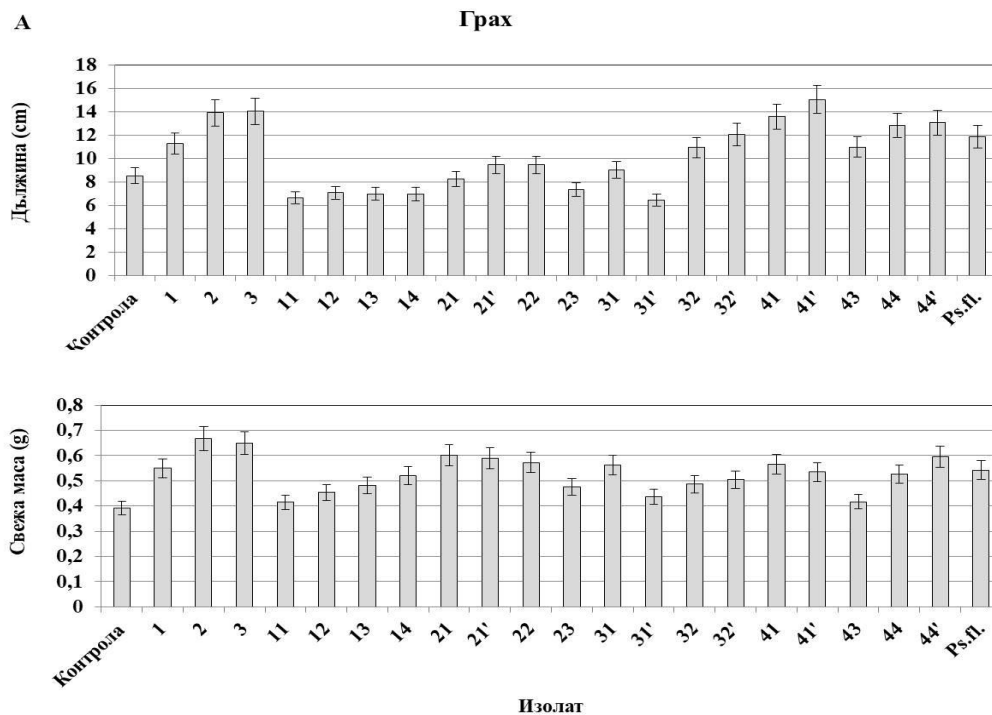
култури за изпитване на ефекта на химични и биологични агенти в земеделието. Видно е, че ефектът е различен при различните изолати, но е последователен за един и същ изолат при различните култури.



Фигура 4. Дължина (А) и свежа маса (Б) на младите растения от спанак след 10 дни култивиране с внасяне на популации на различни изолати изпитани поотделно. Данните показват средната стойност на 10 повторения и стандартната грешка.



Фигура 5. Дължина (А) и свежа маса (Б) на младите растения от репички след 10 дни култивиране с внасяне на популации на различни изолати изпитани поотделно. Данните показват средната стойност на 10 повторения и стандартната грешка.

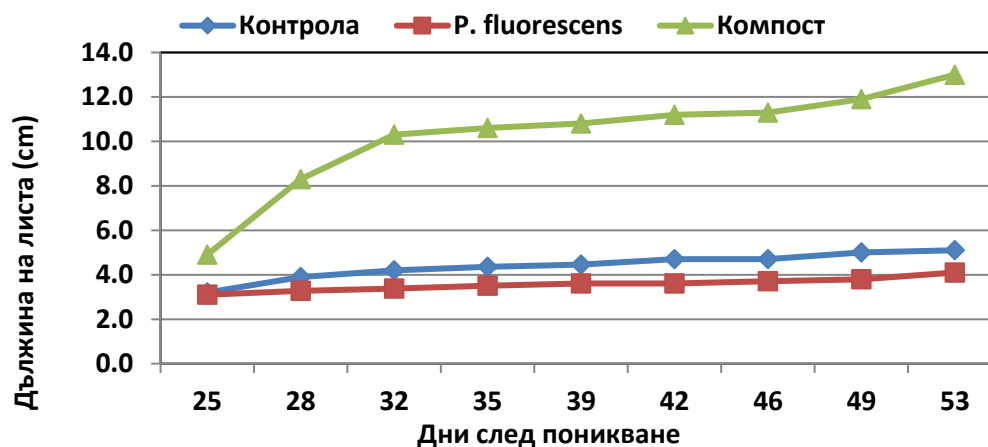


Фигура 6. Дължина (А) и свежа маса (Б) на младите растения от грах след 10 дни култивиране с внасяне на популации на различни изолати изпитани поотделно. Данните показват средната стойност на 10 повторения и стандартната грешка.

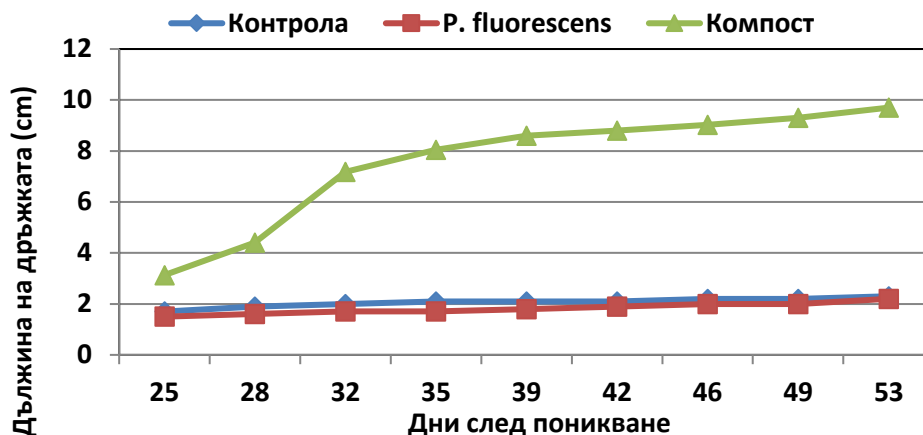
4.3. Изследване на промените в системата почва-ризосфера-растение – първи опит.

4.3.1. Биометрични показатели на растенията от спанак.

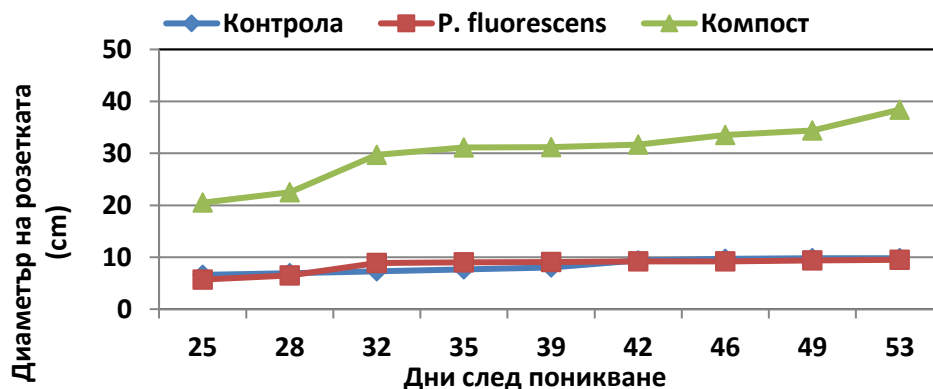
Скоростта на развитие на различните части от спанака е представена на фиг. 7-9.



Фигура 7. Динамика на нарастване дължината на листата на растенията от спанак при различните варианти на опита (средната стойност на три повторения). Стандартната грешка е в рамките на 5 %.

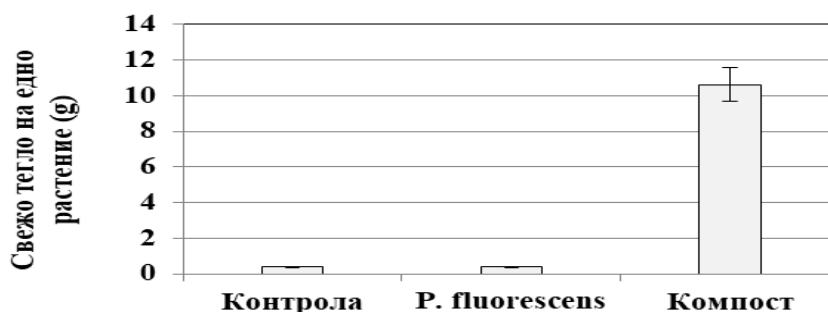


Фигура 8. Динамика на нарастване дължината на дръжката на листата от спанак при различните варианти на опита (средната стойност на три повторения). Стандартната грешка е в рамките на 5 %.



Фигура 9. Динамика на нарастване листната розетка на спанака при различните варианти на опита (средната стойност на три повторения). Стандартната грешка е в рамките на 5 %.

Налице е осезаема разлика в показателите между варианти 1 и 2 и варианта с компост. Забелязва се изключително подобрене в биометричните показатели на растенията от спанак, което затвърждава тезата ни за благоприятното въздействие на компоста и бактериалната дейност върху зеленчуковите култури. Това може да бъде потвърдено както и от последващите опити и извлечените от тях количествени и качествени резултати, така и от измерените тегла на надземната маса на растенията (фиг. 10).



Фигура 10. Свежо тегло на едно растение от спанак при различните варианти на първи съдов опит. Данните изразяват средната стойност на три повторения и стандартната грешка.

Разликата между контролата и третия вариант, в който е внесен компост, е изключително голяма. Във втори вариант не се забелязва статистически значима промяна в свежето тегло на спанака по отношение на контролата, с което може да направим заключението, че тя няма такъв рефлекс, какъвто има компостът.

Горните резултати се потвърждават и от снимките на опитната постановка в края на опита, представени на фиг. 11.



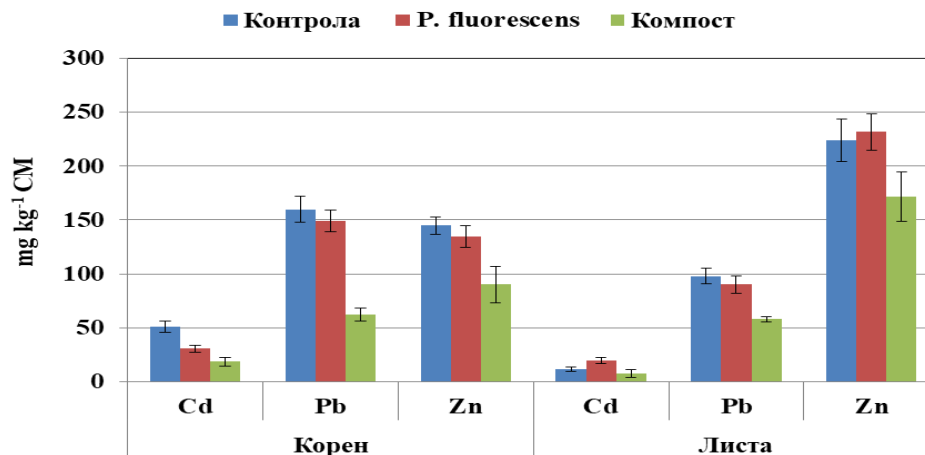
Фигура 11. Снимки на растенията в края на опита.

4.3.2. Натрупване на тежки метали в растенията.

Натрупването в растенията на наличните в почвата тежки метали е представено на фиг. 12. Концентрацията на Cd беше по-висока в корена, като най-високи стойности се установиха при контролата - 51 mg kg^{-1} , а най-ниски при варианта с внесен компост - $18,4 \text{ mg kg}^{-1}$. При Pb се установи, че натрупването му в корена на спанака е в рамките на статистическата грешка при първи и втори варианти (160 и 149 mg kg^{-1}), а най-ниско е при варианта с компост - 62 mg kg^{-1} , което е намаление с 61% и 58%, съответно. При Zn ситуацията беше подобна, но разликата с варианта с компост беше по-малка (38% и 33%, съответно). Това вероятно е резултат от факта, че цинкът е необходим елемент за растежа и развитието на растенията, в частност на спанака.

От друга страна, натрупването на споменатите тежки метали в листната маса на спанака запази подобен тренд, както в корена. Най-слабо натрупване на Cd се установи

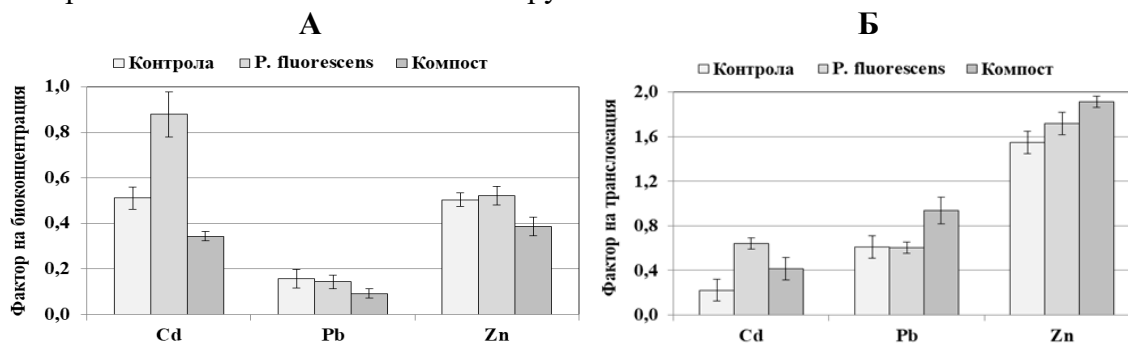
при варианта с компост ($7,67 \text{ mg kg}^{-1}$), а най-високо при варианта с внесена бактериална популация на *P. fluorescens*.



Фигура 12. Натрупване на Cd, Pb и Zn в корена и листата на спанака. Данните показват средната стойност и стандартната грешка (n=3).

По отношение на Pb в листната маса, отново най-ниска концентрация се установи при варианта с компост (58 mg kg^{-1}), докато при другите два варианта стойностите бяха в рамките на стандартната грешка (98 и 90 mg kg^{-1} , съответно). Не се установи разлика между първите два варианта – контрола и варианта с внасяне на бактериална популация (224 и 232 mg kg^{-1} , съответно). Концентрацията на Zn в листата са значително по-ниски – 172 mg kg^{-1} , което е с 23-26% намаление.

В допълнение се направи анализ на спанака сорт Матадор по отношение на натрупването на елементите в растението при различните варианти на опит 1 (фиг. 22 и 23). ФБ показва известни различия по отношение на различните елементи във варианта без добавки. Докато при Cd и Zn беше подобен ($\sim 0,5$), при Pb беше значително по-нисък ($0,16$). Въпреки това ФБ е значително под 1, която говори за слаб потенциал за целенасочено извличане на тежки метали при условията на този опит (фиг. 13). Внасянето на популацията на полезната бактерия доведе до 70% увеличение на ФБ. При внасяне на компоста се наблюдава намаляване на ФБ при трите изследвани тежки метала (Cd, Pb и Zn) спрямо контролата с 32,7%, 40,7% и 25,2%, съответно. В резултат на това можем категорично да кажем, че в случая внасянето на компост категорично води до стабилизиране на почвите и намаляване натрупването на елементите в спанака.

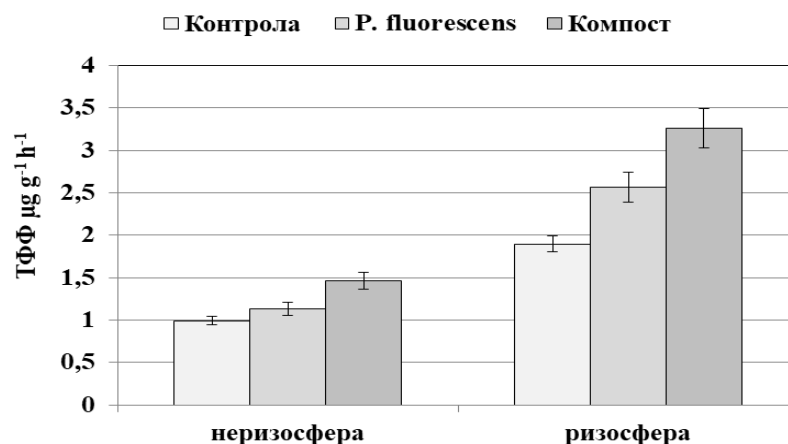


Фигура 13. Фактор на биоконцентрация (А) и фактор на транслокация (Б) на натрупването на Cd, Pb и Zn в листата на спанака. Данните показват средната стойност и стандартната грешка (n=3).

4.3.3. Анализ на микробните съобщества в почвата.

4.3.3.1. Дехидрогеназна активност.

Фиг. 14 представя активността на ензима в края на опита в неризосферна и в ризосферна почва. Ясно се вижда съществена разлика в стойностите на концентрациите на ензима между двете почви. Докато първите два варианта имат концентрация в рамките на стандартната грешка, при внасяне на компоста и след стабилизирането му с почвата, активността на ензима се е повишила. В същото време, концентрациите в ризосферата на контролния вариант са 91,4% по-високи от тези в почвената зона далеч от ризосферата. Също така, внасянето на популацията на *P. fluorescens* и развитието на спанака са довели до увеличаване на дехидрогеназната активност в ризосферата със 125,9%. Най-високи стойности и съществено повишаване на концентрацията на ензима се наблюдаваше и в третия вариант, 122,5%. След 60 дни вегетация, най-висока активност се установи във варианта с внасяне на компост, което е с 30,3% по-висока от тази на контролата и с 21,4% в сравнение с втори вариант.

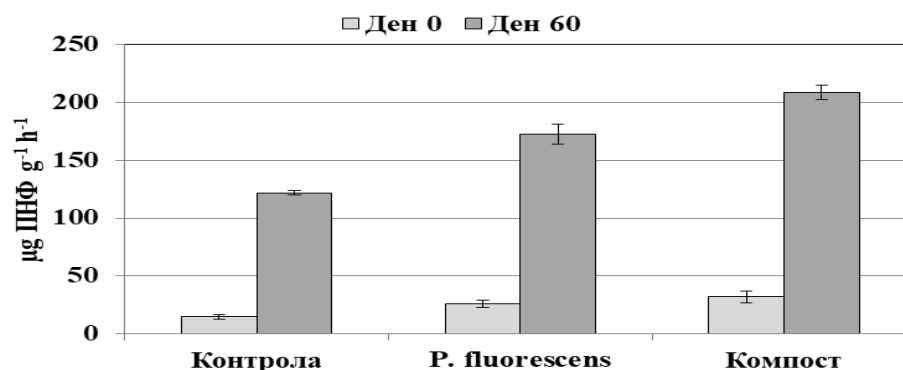


Фигура 14. Почвена дехидрогеназна активност изразена като μg ТФФ g^{-1} почва за 1 час. Данните показват средната стойност на три повторения и стандартната грешка.

4.3.3.2. β -глюкозидазна активност.

Стойностите на β -глюкозидазната активност в различните варианти са сравнително ниски преди покълване на семената и разликата при тях се дължи на стабилизирането на компоста с почвата за 14 дни, което предполага и частично активиране на тези ензими (фиг. 15). В същото време, внасянето на популацията на *P. fluorescens* доведе също до известно повишаване на стойностите на този ензим. В края на развитието на спанака стойностите бяха значително по-високи, резултат от взаимодействието на растенията и микробните популации в ризосферата. При контролния вариант увеличението на показателя е 7,2 пъти, докато при втория и третия увеличението е 5,6 и 5,5 пъти, съответно. Въпреки това, те очаквано са най-високи във варианта с внесен компост, а най-ниски в този само със замърсена почва. Това е така поради по-силно изразената токсичност на тежките метали при варианта само с почва, но също така и поради внасянето на богатия на органика компост, с по-висока концентрация на достъпни елементи, което предполага и свързване на част от тях. Активността на β -глюкозидазата в ризосферата на спанака отглеждан в почвено-компостна смеска е с 20,9% по-висока в

сравнение с тази във варианта с внасяне на бактериалната популация и със 71%, когато се сравнява с контролата.



Фигура 15. Почвена β-глюкозидазна активност при условията на опита. Данните показват средната стойност на три повторения и стандартната грешка (n=3).

4.4. Изследване на промените в системата почва-ризосфера-растение – втори опит.

4.4.1. Съдържание на азот и фосфор в неризосферната и ризосферната почва

Внасянето в почвата на компост или компост и полезна популация бактерии, води до повишаване съдържанието на азот и фосфор в нея. Това може да се докаже и посредством данните от таблица 8.

Таблица 8. Съдържание на азот и фосфор в неризосферната и ризосферната почва в края на опита при различните варианти. Данните показват средната стойност от три повторения.

Варианти	Азот, %	Фосфор, mg/kg
<i>Неризосферна почва</i>		
В-1	0,23	593,69
В-2	0,39	2205,59
В-3	0,26	1730,64

Варианти	Азот, %	Фосфор, mg/kg
<i>Репички</i>		
В-1	0,22	598,56
В-2	0,44	2026,67
В-3	0,41	2547,17
<i>Спанак</i>		
В-1	0,19	667,69
В-2	0,27	1041,8
В-3	0,39	1824,17
<i>Грах</i>		
В-1	0,16	459,50
В-2	0,24	561,15
В-3	0,38	748,21

Получените от нас резултати показват, че общото съдържание азот се влияе от внасянето на компост или компост и *P. fluorescence*. Добавянето им води до повишаване съдържанието на азот и при трите зеленчукови култури. По отношение на репичките съдържанието на азот при втори и трети вариант е с 200% и 186%, съответно, по-високо спрямо вариант 1 (почва без добавки). При спанака съдържанието на азот при втори (компост) и трети вариант (компост + бактериална популация) е съответно със 126% и 205% по-високо спрямо първи вариант. Аналогично е положението и при граха – 150% и 237% съответно по-високо съдържание на азот във втори и трети вариант спрямо първи.

Съдържанието на фосфор в почвата се повлия от добавянето на компост и компост и бактериална популация, като най-ниско беше съдържанието му в контролния вариант както в неризосферната, така и в ризосферната почва и при трите зеленчукови култури. По отношение на неризосферната почва съдържанието на фосфор във втори и трети вариант спрямо първи съответно е 3,71 и 2,92 пъти по-високо. При репичките фосфорното съдържание във втори и трети вариант е с 3,39 и 4,26 пъти съответно по-високо спрямо контролния вариант, а при спанака – 1,56 и 2,73 пъти съответно по-високо съдържание на фосфор във втори и трети вариант спрямо първи. Аналогично е положението и при граха – 1,22 и 1,62 пъти съответно по-високо съдържание на фосфор във втори и трети вариант спрямо първи.

Високата концентрация на достъпни хранителни вещества, която при вариантите с компост и компост и бактериална популация е в пъти по-висока в сравнение с контролния вариант, може да се обясни с три механизма: 1) освобождаване на азот и фосфор, които вече присъстват в достъпна форма в компоста; 2) мобилизиране на азот и фосфор по време на експеримента вследствие добавянето на компост и популацията на *P. fluorescence*; 3) засилване на микробиалната активност в резултат добавянето на компост и бактериална популация.

4.4.2. Биодостъпни фракции на Pb, Zn и Cd (ISO 14870).

В табл. 9 са представени биодостъпните почвени концентрации на Pb, Cd и Zn в неризосферна почва, докато концентрациите от ризосферата на репичките, спанака и граха в края на опита са показани в табл. 17.

Таблица 9. Биодостъпни форми на тежки метали, представени в почвения разтвор на неризосферна почва с или без внасяне на компост или *P. fluorescens* биотип F. Показани са средните стойности на три повторения и стандартната грешка.

	Биодостъпни метали (mg kg ⁻¹)		
	Pb	Zn	Cd
При залагане	16,4	158,1	8,15
1	16,1±2,1	172±5,1	7,85±0,5
2	16,3±1,8	154±7,9	7,6±0,3
3	16,6±1,3	153±4,6	7,3±0,4

Достъпните форми на Zn в края на паралелния опит без растения (неризосферна почва) показаха някои промени в сравнение с началото му. Основните промени бяха наблюдавани в контролата, където имаше увеличение на концентрацията с 8,8% за периода на опита, докато във вариантите с компост нямаше статистически значима разлика. По отношение на Pb, не се установи различие, както между концентрациите в трите варианта, така и с началната. От друга страна, подвижните форми на Cd намаляха във вариантите с компост и с компост и бактериална популация с 6,8% и 10,4%, съответно.

Разглеждайки промените в биодостъпните концентрации на тежките метали в края на опита при различните зеленчукови растения, правят впечатление силно редуцираните концентрации на Zn при всички варианти с репички, както спрямо началните стойности, така и в сравнение с другите растения. Докато началната концентрация беше $158,1 \text{ mg kg}^{-1}$, концентрацията в контролата е с 38% по-ниска, а тези във втори и трети вариант с 49,5% и 56,9% по-ниски, съответно. В противовес, биодостъпният Zn в ризосферата на спанака беше с по-ниска концентрация единствено в трети вариант (4,7%), а при граха във втори и трети (12,2% и 10,6%). При останалите растения и варианти стойностите бяха в рамките на стандартната грешка.

При Pb съществени промени не се установиха. Въпреки това, наблюдаваше се повишаване на достъпните концентрации в контролата при спанака спрямо концентрацията в неризосферната почва ($16,8$ към $16,1 \text{ mg kg}^{-1}$). По-съществена разлика се установи и при внасяне на компост в ризосферата на репичките ($15,4 \text{ mg kg}^{-1}$) спрямо неризосферната почва на втори вариант ($16,3 \text{ mg kg}^{-1}$).

Подвижните форми на Cd при репичките бяха със значително по-ниска концентрация във всички варианти в сравнение с тези на неризосферната почва. Средната концентрация във вариантите с репички беше със 76,4% по-ниска в сравнение с концентрацията в неризосферната почва.

Таблица 10. Биодостъпни форми на тежки метали, представени в почвения разтвор на ризосферата при репички, спанах и грах, отгледани върху замърсена почва с или без внасяне на компост или *P. fluorescens* биотип F. Показани са средните стойности на три повторения и стандартната грешка.

	Биодостъпни метали (mg kg^{-1})		
	Cd	Pb	Zn
Спанак			
B-1	$4,2 \pm 0,5$	$12,0 \pm 0,4$	$50,0 \pm 4$
B-2	$3,55 \pm 0,7$	$12,25 \pm 1,7$	$57,5 \pm 3$
B-3	$3,1 \pm 0,3$	$10,4 \pm 2$	$43,75 \pm 2$
B-4	$3,0 \pm 0,9$	$10,15 \pm 1,8$	$43,8 \pm 2,5$
B-5	$3,65 \pm 0,7$	$10,95 \pm 2,1$	$52,5 \pm 5$
B-6	$4,4 \pm 0,3$	$12,0 \pm 1,2$	$66,25 \pm 4,2$
B-7	$3,2 \pm 0,6$	$11,55 \pm 2,3$	$56,25 \pm 4,9$
B-8	$3,65 \pm 0,7$	$10,45 \pm 1,2$	$43,75 \pm 8$
B-9	$2,7 \pm 0,3$	$10,35 \pm 2,3$	$37,5 \pm 9,1$
B-10	$3,5 \pm 0,6$	$10,3 \pm 1,7$	$41,25 \pm 7,1$

Друго важно сравнение при обсъждане резултатите в настоящия раздел е разликата между различните варианти при един вид растение. В този смисъл, внасянето на компост в почвата при репичките доведе до намаляване на достъпното Pb с 22,77%, а добавянето и на бактериалната популация с 30,5% спрямо контролата и с 14,6% спрямо вариант 2. В допълнение, при спанака и граха не бяха установени статистически доказани различия между вариантите.

Подвижните форми на Cd при репичките бяха със значително по-ниска концентрация във всички варианти в сравнение с тези при другите два вида растения. Средната концентрация при спанака беше със 105%, докато тази при граха беше с 98% по-висока от тази при репичките. Не се установи статистически доказана разлика в концентрациите на

Cd между различните варианти при един растителен вид. Освен това, при неризосферната почва средната концентрация на Cd беше по-ниска в сравнение с тази при спанака и граха. При контролата със спанак стойностите бяха с 12,1% по-високи, а при граха с 10,8%. Подобно беше съотнeshението при вариант 2. При вариант 3 развитието на спанака доведе до по-висока концентрация на подвижните форми на Cd с 23,3%, а отглеждането на грах с 15,1% в сравнение с концентрацията в почвата без растения.

4.4.3. Екстракция на тежки метали.

В Таблица 11 са показани средните стойности на натрупване на Pb, Zn и Cd в листата, стъблата и корените на изследваните растения, оценени по метода на Дънкан. Най-високо съдържание на олово при репичките се установи в растенията от вариант 1 за всички изследвани органи – корени, стъбла и листа. Данните от натрупването във вариант 2 и 3 поставят тези варианти в една група, тъй като стойностите не са статистически различни, но са значително по-ниски от тези във вариант 1. При спанака натрупването на този елемент отново беше най-съществено в първи вариант. В листата то беше над два пъти по-високо от това във варианти 2 и 3. При граха най-ниско натрупване в цялото растение се установи в третия вариант, докато при семената не беше установено натрупване на олово в семената.

По отношение натрупването на Zn в растенията данните са разнопосочни. Цинкът, като елемент необходим на растенията за осъществяване на жизнените процеси се извлича от почвата. Най-силно натрупване се установи при спанака – над два пъти по-високо съдържание в листата във вариант 3 в сравнение със същия вариант при репичките и граха. И при трите култури резултатите за натрупването на Zn в листата са еднопосочни – намаляването на натрупването се извършва от вариант 1 към вариант 3 и резултатите са статистически значими. При корените тенденцията е същата, но отново трябва да се отбележи, че най-високи стойности на натрупване показва спанака. Най-ниски концентрации Zn се установиха в семената при различните варианти.

Натрупването на Cd в растителните части запази посоката, описана за Zn. Най-силно натрупване се установи при спанака, а най-слабо при граха. Имаше ясно изразена закономерност за по-слаба акумулация във вариантите с компост или компост и бактериална популация. Не се установи наличие на Cd в семената.

ФБ при трите растителни вида е представен на табл. 12. По отношение на Cd в контролата, ФБ беше по-голям от 1 и се увеличаваше в следната последователност: репички > спанак > грах (1,49>2,07>2,5). В същото време, той намаляваше при всички растения от първи към трети вариант. При репичките и спанака благодарение на внасянето на добавки ФБ намаля под 1, което е подходящо условие за използването на подхода за стабилизиране на замърсени с Cd почви. ФБ на Pb и Zn беше значително под 1.

ФТ за Cd в контролния вариант на трите растения намаляваше в същата последователност, както при ФБ. В допълнение, внасянето на добавки доведе до намаляването на натрупването на елемента от вариант 1 към вариант 3. При другите елементи не се откри ясна обща тенденция. Най-съществен момент беше увеличаване на ФТ на Zn при спанака с внасяне на добавките, което вероятно се дължи на ролята му при биохимичните процеси.

Таблица 11. Натрупване на тежки метали в растителните тъкани при репички, спанак и грах, отглеждани върху замърсена почва, с или без внасяне на компост или *Pseudomonas fluorescens* биотип F. (средната стойност на три повторения, анализирани чрез многопосочния сравнителен анализ по метода на Дънкан).

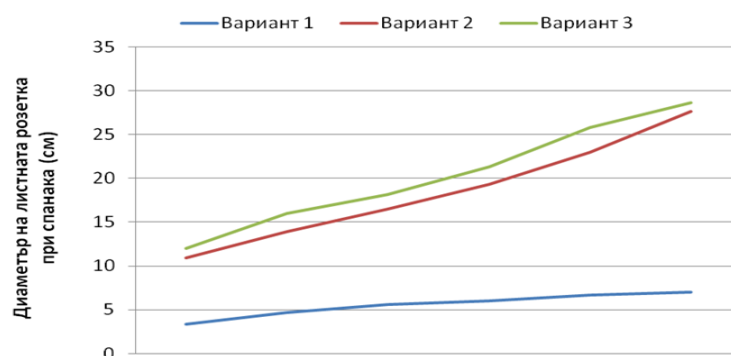
	Cd (mg kg ⁻¹)				Pb (mg kg ⁻¹)				Zn (mg kg ⁻¹)			
	Листа	Стъбла	Корени	Семена	Листа	Стъбла	Корени	Семена	Листа	Стъбла	Корени	Семена
Репички												
Вариант 1	33,2 ^a	24,4 ^a	27,9 ^a	-	64,4 ^a	20,7 ^a	27,8 ^a	-	176,7 ^a	139,1 ^a	100,3 ^a	-
Вариант 2	21,3 ^b	15,2 ^b	13,4 ^b	-	26,3 ^b	11,9 ^b	11,4 ^b	-	135,3 ^b	90,4 ^b	66,6 ^b	-
Вариант 3	19,6 ^b	14,1 ^b	16,1 ^b	-	22,9 ^b	12,4 ^b	10,1 ^b	-	113,3 ^c	122,5 ^a	61,4 ^b	-
Спанак												
Вариант 1	46,1 ^a	42,6 ^a	44,2 ^a	-	104,2 ^a	41,1 ^a	64,9 ^a	-	307,5 ^a	202,3 ^a	319,4 ^a	-
Вариант 2	20,1 ^b	28,4 ^b	22,5 ^c	-	54,9 ^c	32,7 ^{ab}	11,8 ^c	-	278,9 ^b	136,9 ^b	106,9 ^b	-
Вариант 3	19,5 ^b	19,4 ^c	33,6 ^b	-	70,5 ^b	31,9 ^b	24,7 ^b	-	266,7 ^c	120,1 ^c	108,1 ^b	-
Грах												
Вариант 1	55,7 ^a	18,4 ^a	87,6 ^a	0	3,9 ^a	5,1 ^a	61,6 ^a	0	156,8 ^a	104,7 ^a	207,3 ^a	66,9 ^a
Вариант 2	40,1 ^b	12,8 ^b	77,7 ^b	0	2,5 ^b	3,9 ^b	19,2 ^b	0	145,2 ^b	97,2 ^b	191,2 ^b	53,5 ^c
Вариант 3	30,2 ^c	11,5 ^b	59,1 ^c	0	1,9 ^c	3,1 ^b	11,4 ^b	0	112,2 ^c	93,1 ^b	164,4 ^c	60,3 ^b

Таблица 12. Фактор на биоконцентрация и фактор на транслокация на Cd, Pb и Zn при репички, спанак и грах изчислени спрямо листата и стъблата.

	Cd		Pb		Zn	
	ФБ	ФТ	ФБ	ФТ	ФБ	ФТ
Репички						
Вариант 1	1,5	1,2	0,1	2,3	0,4	1,76
Вариант 2	1,0	1,6	0,04	2,3	0,3	2,0
Вариант 3	0,9	1,2	0,03	2,3	0,26	1,85
Спанак						
Вариант 1	2,1	1,0	0,2	1,6	0,7	1,0
Вариант 2	0,9	0,9	0,09	4,7	0,6	2,6
Вариант 3	0,9	0,6	0,11	2,9	0,6	2,47
Грах						
Вариант 1	2,5	0,6	0,01	0,06	0,35	0,75
Вариант 2	1,5	0,5	0,004	0,13	0,33	0,76
Вариант 3	1,5	0,5	0,003	0,17	0,25	0,68

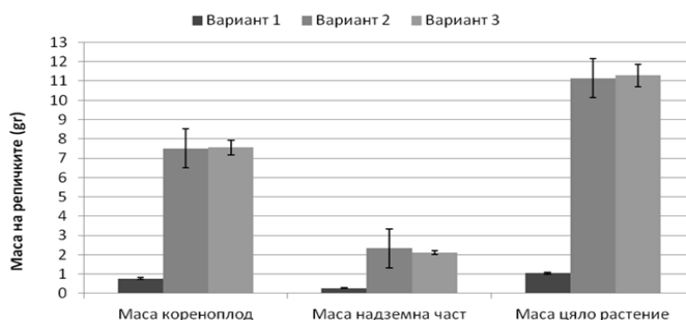
4.4.4. Биометрични показатели на растенията от спанак, грах и репички.

В допълнение на по-горната информация можем да докладваме, че през следващите етапи на проучване на развитието на растенията от спанак при вариант 2 и 3 се формира по-голяма листна розета и бяха с по-бърз темп на растеж и развитие в сравнение с тези от вариант 1 (Фиг. 16).



Фигура 16. Диаметър на листната розетка при спанак (см).

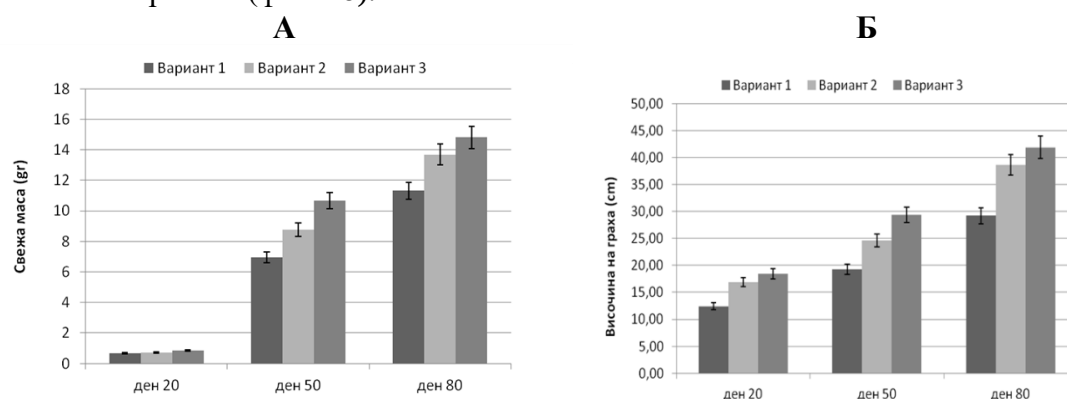
Това навярно се дължи на инхибиращото действие на тежките метали, подтискащо развитието на кореновата система и усвояването на хранителните вещества. Въпреки това, растенията от изследваните варианти успяха да натрупат по-голяма биомаса и да формират по-голяма листна розетка в сравнение с контролата. При нея диаметърът на листната розета достигна едва 6,5 cm, а при растенията от вариант 3 и вариант 2 съответно 28,1 cm и 26,9 cm. Аналогично бе положението и при репичките, които са типичен представител на кореноплодните култури (фиг. 17).



Фигура 17. Маса на кореноплода, надземната част и цялото растение от репички, измерена в края на втори съдов опит. Данните показват средното стойност на три повторения и стандартната грешка.

Поради своя по-кратък вегетационен период и по-бърз темп на растеж и развитие при тях се очерта още по-голяма диференциация между проучените варианти. Растенията от вариант 2 и вариант 3 успяха да преодолеят инхибиращото влияние на тежките метали и да натрупат по-голяма биомаса (до 11,2 g на растение), формирайки по-голям кореноплод в сравнение с контролата. При последната се формира кореноплод с тегло едва 0,76 g.

При растенията от грах не се очерта толкова голяма диференциация между проучваните варианти, както при репичките. Това най-вероятно се дължи, от една страна на видовите и сортови особености на граха, а от друга - на потенциалното влияние на азотфиксиращите бактерии, особено на грудковите бактерии благодарение, на които растенията от граха частично успяха да компенсират подтискащото действие на тежките метали. Въпреки това, растенията от вариант 2 и 3 натрупаха по-голяма биомаса и достигнаха по-голяма височина в сравнение с контролата (фиг. 18).



Фигура 18. Свежа маса(А) и височина на граха (Б) (cm) измерени по време на втори съдов опит. Данните показват средната стойност на три повторения и стандартна грешка.



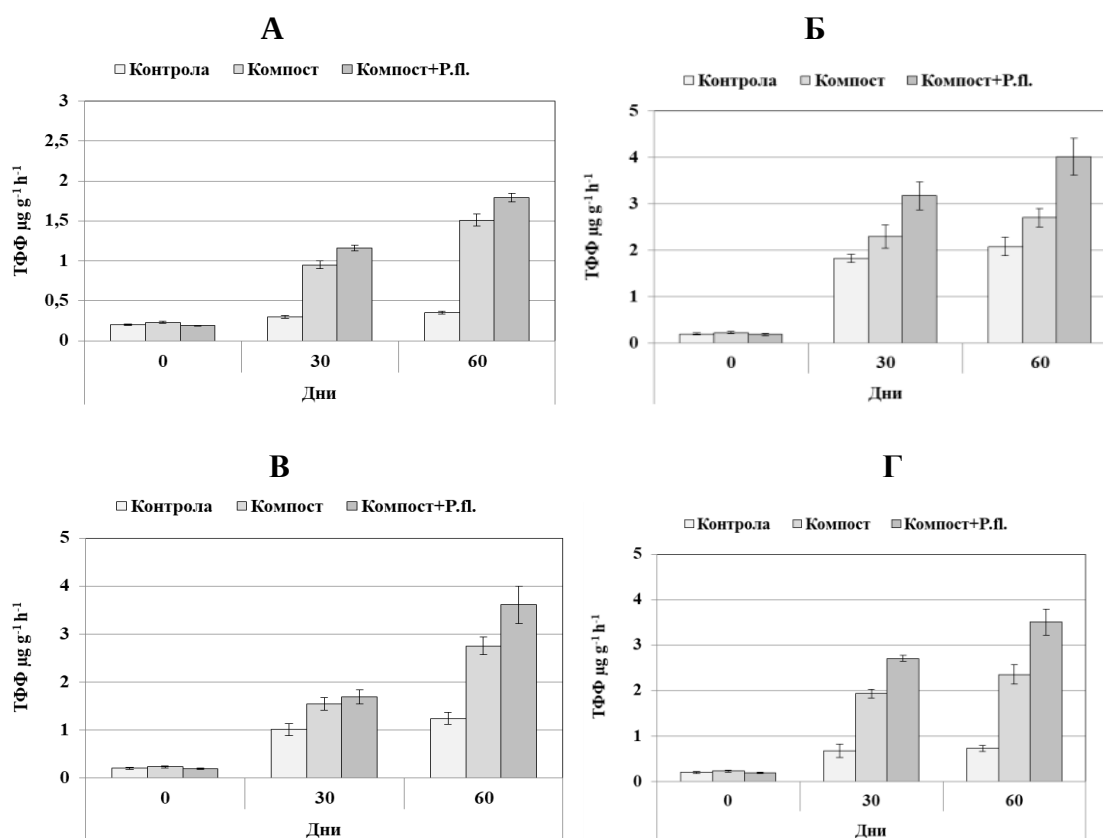
Фигура 19. Снимки на растенията от репички, грах и спанак в края на опита.

Като цяло, наличието на тежки метали оказва силно потискащо действие върху зеленчуковите растения, когато се изпитват самостоятелно. Този ефект беше особено силно изразен при спанака и репичките, където беше наблюдавано силно подтискане на растежа, докато внасянето на компост самостоятелно или в комбинация с популацията на толерантната полезна бактерия *Pseudomonas fluorescens* биотип F имаше много добър резултат по отношение преодоляване на токсичността.

4.4.5. Анализ на микробните съобщества в почвата.

4.4.5.1. Дехидрогеназна активност.

На фигури 20 е представена дехидрогеназната активност в неризосферата и ризосферата на растенията преди сеитба, при 30-ия и 60-ия ден от опита.



Фигура 20. Дехидрогеназна активност в неризосферната почва (А), ризосферата на репички (Б), спанак (В) и грах (Г), изразена като $\mu\text{g TФФ g}^{-1} \text{h}^{-1}$. Данните показват средната стойност на три повторения и стандартната грешка.

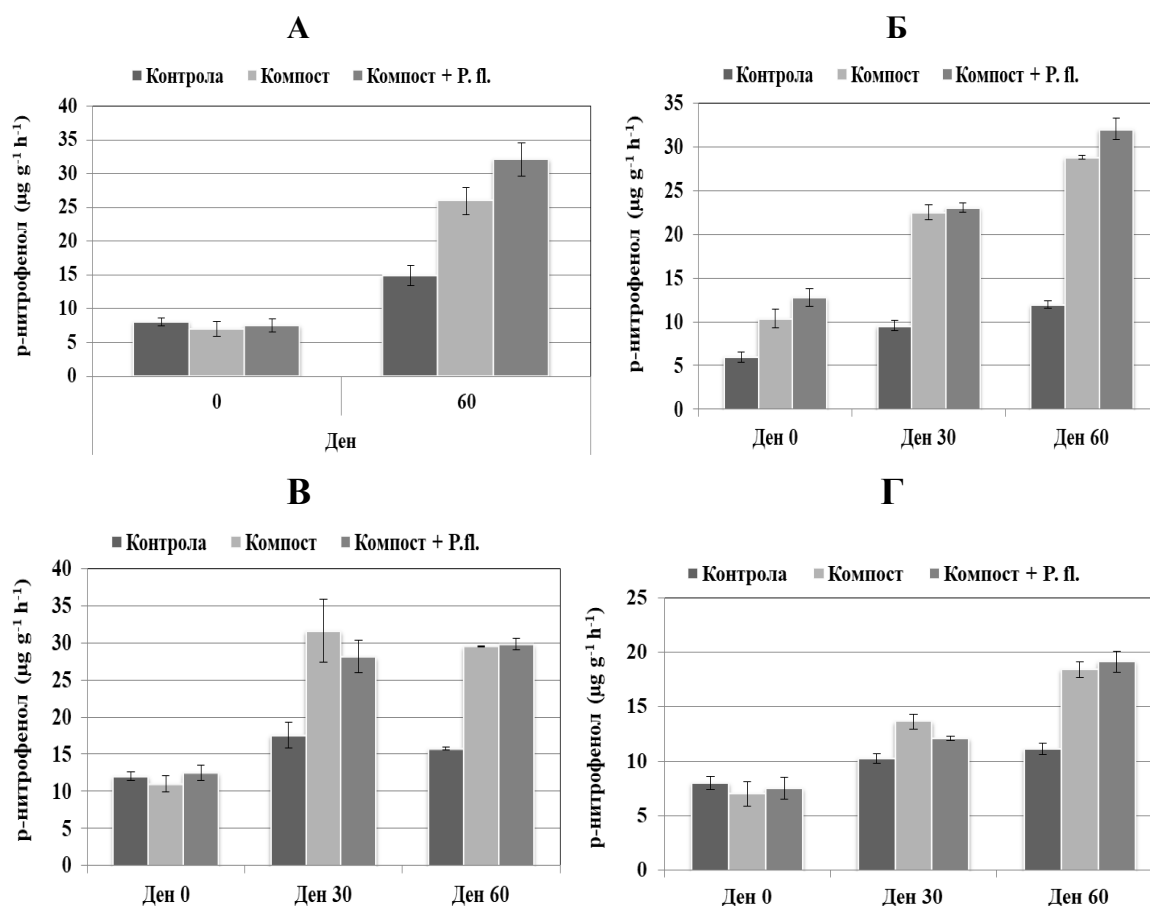
Резултатите показват засилена активност на дехидрогеназите в ризосферната почва на трите култури в сравнение с неризосферната почва. Наблюдавана беше и тенденция на засилване на тази активност при внасянето на добавки (компост с или без бактериалната популация). Това беше очевидно, както при ризосферната почва, така и при неризосферната. Най-съществено увеличение на дехидрогеназната активност беше отчетено в третия вариант и при трите култури.

В този смисъл може да се заключи, че окислително-редукционните процеси, извършвани от микроорганизмите в почвата са по-засилени в ризосферата, отколкото в неризосферата на спанак, репички и граха при отглеждане върху замърсени с тежки метали почви. Освен това, внасянето на компост с или без бактериална популация, толерантна на представените тежки метали, води до допълнително засилване на дехидрогеназната активност поради увеличена концентрация на органична материя и полезна бактериална популация.

4.4.5.2. β – глюкозидазна активност.

Съгласно проведените изследвания (фиг. 21) можем да твърдим, че β -глюкозидазната активност е много подобна в ризосферната и неризосферната почва, особено при вариантите с добавки. От друга страна, имаше значително по-слаба активност в първи вариант в сравнение с втори и трети, което беше добре изразено и при трите зеленчукови култури. Най-голямо

увеличение на активността на ензима β -глюкозидаза се забелязва при спанак и репичките към 30-ия и 60-ия ден във 2-ри и 3-ти варианти. Не се установи съществена разлика между последните два варианта по този показател.



Фигура 21. β -глюкозидазна активност в неризосферната почва (А), в ризосферата на растенията от спанак (Б), репички (В) и грах (Г), изразена като μg р-нитрофенол $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$. Данните показват средната стойност на три повторения и стандартната грешка.

4.5. Изследване на промените в системата почва-ризомсфера-растение – трети опит.

4.5.1. Биодостъпни фракции на Pb, Zn и Cd.

В таблица 13 е представена информацията относно биодостъпните фракции на тежките метали в почвата. Става ясно, че биодостъпните форми на оловото се понижават най-вече във вариант 9 и 10, като във вариантите 3, 4 и 8 стойностите са почти еднакви. Най-силни са концентрациите в първия вариант, но това не е валидно и за трите елемента. Zn показва най-високи стойности във втория вариант, както и в 6-ти, а Cd – в 6-ти и първи. Въпреки че не се установяват съществени за статистическата наука разлики в стойностите, внасянето на компост и други добавки води до намаляването на фракциите, а оттам – до тяхното неблагоприятно въздействие върху почвата и растителните видове.

Таблица 13. Биодостъпни форми на тежките метали представени в почвения разтвор на ризосферата при спанак, отглеждан върху замърсена почва с внасяне на компост и/или популации на бактериални изолати. Данните показват средната стойност на три повторения и стандартната грешка.

	Биодостъпни метали (mg kg^{-1})		
	Cd	Pb	Zn
Спанак			
V-1	4,2 $\pm$ 0,5	12,0 $\pm$ 0,4	50,0 $\pm$ 4
V-2	3,55 $\pm$ 0,7	12,25 $\pm$ 1,7	57,5 $\pm$ 3

B-3	3,1±0,3	10,4±2	43,75±2
B-4	3,0±0,9	10,15±1,8	43,8±2,5
B-5	3,65±0,7	10,95±2,1	52,5±5
B-6	4,4±0,3	12,0±1,2	66,25±4,2
B-7	3,2±0,6	11,55±2,3	56,25±4,9
B-8	3,65±0,7	10,45±1,2	43,75±8
B-9	2,7±0,3	10,35±2,3	37,5±9,1
B-10	3,5±0,6	10,3±1,7	41,25±7,1

4.5.2. Екстракция на тежки метали.

Извършени бяха проучвания на акумулираните в различните органи на наличните в почвата тежки метали – Pb, Zn и Cd. В табличен вид са представени крайните резултати от опита, до които е достигнато по метода на Дънкан (табл. 14) и ФБ (табл. 15).

Осреднените стойности, до които се стигна, демонстрират следното: в групата с най-високо съдържание на Cd със статистически доказани разлики попадат растенията от вариант 1 за всички изследвани органи – корени, стъбла и листа. В групата с най-ниско съдържание на Cd в корени, стъбла и листа са растенията от вариантите 2, 3 и 4 със статистически значими разлики в сравнение с вариант 1. Освен това, концентрацията на металите е почти еднаква както в корените, така и в стъблата във всички варианти, с което се достига до заключението, че кадмият е абсорбиран еднакво добре и равномерно и от подземните органи, и от надземните с акцент листа.

По отношение натрупването на Pb в растенията данните показват, че в групата с най-високо съдържание на Pb е вариант 1 с доказани разлики за всички изследвани органи. Най-ниско съдържание на Pb за всички изследвани органи е установено в растенията от вариантите 2, 3 и 4 със статистически значими разлики в сравнение с вариант 1. Във всички варианти оловото се складира най-много в листата и еднакво – в стъблата и корените.

Натрупването на Zn в растителните органи запази посоката, описана за Cd и Pb. Листата са най-добре наситени с елемента, а най-слабо металът е застъпен във втори и трети вариант, в листата и корена. В групата с най-високо съдържание на Zn попадат растенията от вариант 1 за всички изследвани органи – корени, стъбла и листа с доказани разлики. Вариантите 2 и 3 попадат в групата с най-ниско съдържание на Zn за всички изследвани органи със статистически значими разлики в сравнение с вариант 1.

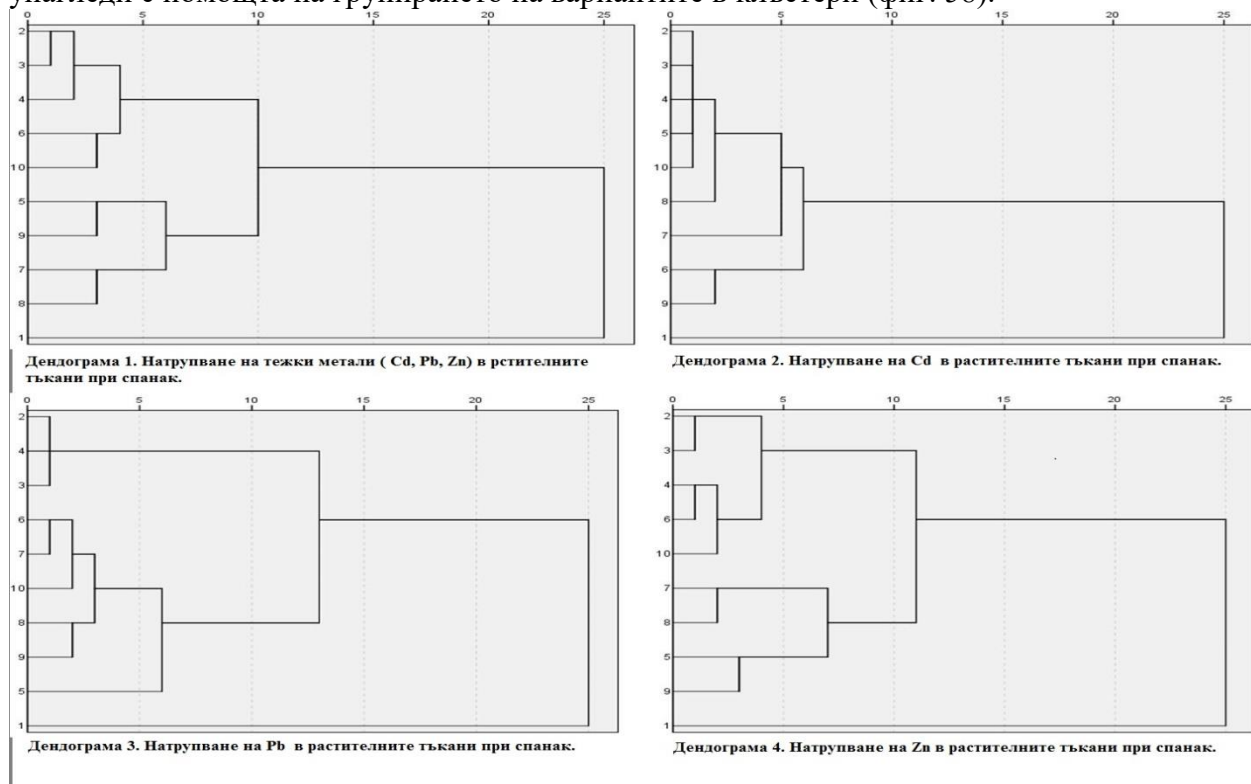
Таблица 14. Натрупване на тежки метали в растителните органи при спанак, отглеждан върху замърсена почва с внасяне на компост или компост и съответната бактериална популация или комбинация от тях. Данните представят средната стойност от три повторения, анализирани чрез многопосочния сравнителен анализ по метода на Дънкан.

Спанак	Cd (mg kg ⁻¹)			Pb (mg kg ⁻¹)			Zn (mg kg ⁻¹)		
	Листа	Стъбла	Корени	Листа	Стъбла	Корени	Листа	Стъбла	Корени
Вариант 1	30,4 a	28,1 a	24,2 a	60,7 a	24,2 ab	26,9 a	296,9 a	133,8 a	125,8 a
Вариант 2	9,4 c	12,3 d	12,3 d	33,3 d	14,3 cd	8,2 e	224,5 f	88,7 e	90,2 f
Вариант 3	14,6 bc	12,5 cd	12,8 cd	32,8d	10,5 d	8,9 de	227,9 f	91,9 e	86,1 f
Вариант 4	10,4 c	12,7 cd	12,7 cd	31,8 d	14,1 cd	9,5 de	232,1 ef	106,2 d	95,1 def
Вариант 5	12,5 bc	14,3 bcd	14,3 bcd	56,5 a	16,6 bcd	11,3 cde	254,4 cd	106,4 d	110,6 cd
Вариант 6	27,3a	16,2 bcd	16,2 bcd	48,3 b	20,1 abc	13,0 cde	230,5 ef	112,8 cd	92,3 ef
Вариант 7	14,4 bc	20,6 bc	20,6 bc	44,5 bc	21,7 abc	12,7 cde	264,4 c	126,4 ab	108,3 cde
Вариант 8	16,7 bc	10,5 d	10,4 d	49,1 b	20,4 abc	20,3 b	282,5 b	120,8 bc	115,1 bc
Вариант 9	21,4 ab	16,7 bcd	16,7 bcd	48,5 b	14,6 cd	16,3 bc	242,4 de	104,3 d	129,5 ab
Вариант 10	40,3 c	20,3 bcd	13,6 bcd	44,3 c	20,3 abc	13,6 cd	242,6 de	120,5 bc	98,4 cdef

Таблица 15. Фактор на биоконцентрация на Cd, Pb и Zn при спанака.

Спанак	Cd	Pb	Zn
Вариант 1	1,36	0,10	0,67
Вариант 2	0,42	0,05	0,51
Вариант 3	0,65	0,05	0,51
Вариант 4	0,47	0,05	0,52
Вариант 5	0,56	0,09	0,57
Вариант 6	1,22	0,08	0,52
Вариант 7	0,65	0,07	0,60
Вариант 8	0,75	0,08	0,64
Вариант 9	0,96	0,08	0,55
Вариант 10	1,81	0,07	0,55

Проследяването на процесите по складиране и разпределение на тежките метали би могло да се унагледява с помощта на групирането на вариантите в клъстери (фиг. 58).



Фигура 22. Дендограми на натрупване на тежки метали (Pb, Zn, Cd) в растителните органи при спанак, отгледан върху замърсена почва с внасяне на компост и различен бактериален изолат, както и комбинация от тях.

Спанакът, отгледан върху замърсена почва, бива повлияван и акумулира Cd, Pb и Zn с различна скорост и концентрация в отделните си органи и при внасянето на компост и различни бактериални изолати, както и комбинация от последните. Видно е, че на дендограмата вариантите са групирани в 2 клъстера по отношение на всеки един от проучваните елементи.

Първият клъстер е най-многоброен, докато вторият е представен единствено от вариант 1. На дендограма 1 и 4 се забелязва, че първият клъстер е представен от две подгрупи. Първата от тях включва: 2, 3, 4, 6 и 10 вариант, а втората – 5, 7, 8 и 9. Варианти 2 и 3 образуват подгрупа с най-малко дистанционни единици.

От дендограма 2 въз основа акумулацията на Cd се вижда, че вариантите са групирани също в 2 клъстера – най-многоброен клъстер е този, съдържащ вариантите 2, 3, 4, 5, 8 и 10. Втората подгрупа е представена от вариант 7, а третата – 6 и 9.

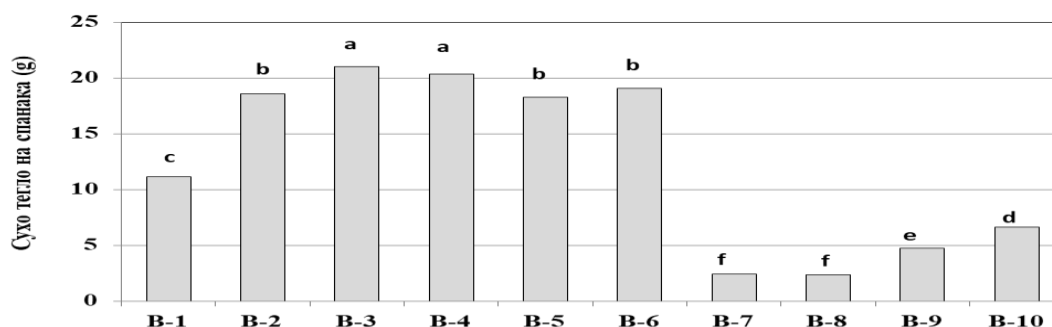
В два клъстера са групирани вариантите и по отношение натрупването на Pb в растителните органи при спанака. От дендограма 3 е видно, че първият клъстер е най-многоброен и е представен в 3 групи. В първа група участие вземат вариантите 2, 3 и 4, а втората подгрупа е представена от варианти 6, 7, 8, 9 и 10. В трета подгрупа е позициониран само вариант 5.

4.5.3. Биометрични показатели на растенията от спанак.

Биометричните изследвания дават възможност количествено да се представят промените в растежа на растенията на спанака. Наблюдават се съществени различия в сухото тегло на растенията при различните варианти (фиг. 23). Най-голяма биомаса беше образувана при варианти от 2 до 6, а най-ниска при варианти от 7 до 10. Растенията в контролата без компост (B-1) се отличиха с по-ниска биомаса в сравнение с растенията от B-2 до B-6. Внасянето на компост допринесе за повишаване на растителната биомаса с 66,8% (B-2). Добавянето на изолати 32 и 32' не оказва съществен ефект върху този показател (B-5 и B-6, съответно), докато комбинирането на изолатите във B-3 и B-4 имаше положителен, статистически доказан ефект върху растенията (13,3% и 9,6%, съответно).

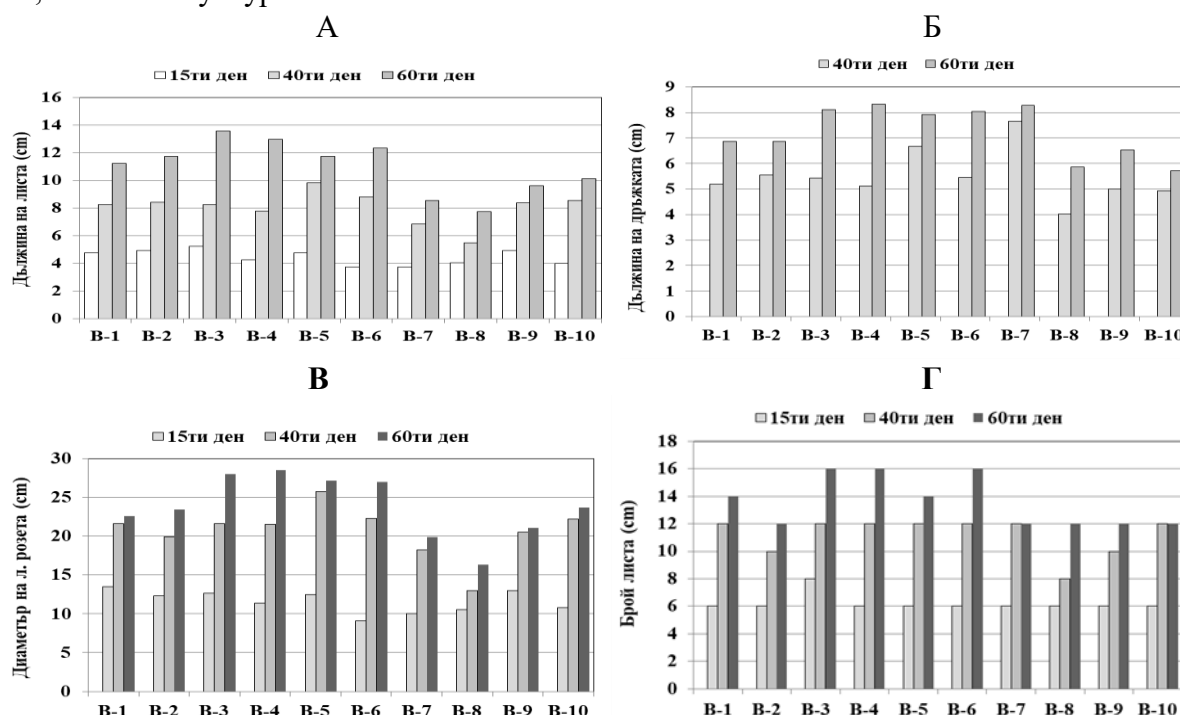
На обратния полюс бяха растенията от варианти от B-7 до B-10. Добавянето на съответните популации доведе до съществено подтискане растежа на спанака спрямо контролата с внесен компост (два изолата *P. fluorescens* и по един от *Bacillus thuringiensis* и *P.*

synxantha). Това е възможно да се дължи и на комбинирания ефект от натрупването на тежки метали и бактериалните популации.



Фигура 23. Сухо тегло на растенията от спанак при различните варианти на опита. Данните представят средната стойност от три повторения, анализирани чрез многопосочния сравнителен анализ по метода на Дънкан.

Изключително богати сведения относно растежа и развитието на зеленчуковите култури, разглеждани в труда, ни дават фиг. 24. В обобщен вариант може да се проследи разликата в дължината на листа, листната дръжка, диаметъра на листната розетка и броя листата в динамика на 15ия, 40ия и 60ия ден. Видно е, че дължината на листата е най-голяма във варианти от 2 до 6 при това – в края на отчетния период. Отново внасянето на компост с или без добавяне на бактериални популации оказва положителен ефект върху развитието на спанака, като тест култура.



Фигура 24. Дължина на листа, дължина на листната дръжка, диаметър на листната розета и брой листа на спанака отглеждан върху замърсена почва с или без внасяне на компост и/или бактериални популации.

Дължината на листната дръжка е най-голяма във варианти от 3 до 7, а най-малка във варианти 8 и 10 за последния период на регистриране. По отношение на дължината на листната розетка, първите четири варианта с добавени бактериални популации са най-открояващи се, а броят на листата е най-голям във варианти 3, 4 и 6. Последният, заедно с теглото на растенията, е един от най-показателните за развитието им биометрични параметри.

С известни колебания в динамиката на растеж се характеризира дължината на дръжката и листата във втория момент на измерване – 26-ти април.

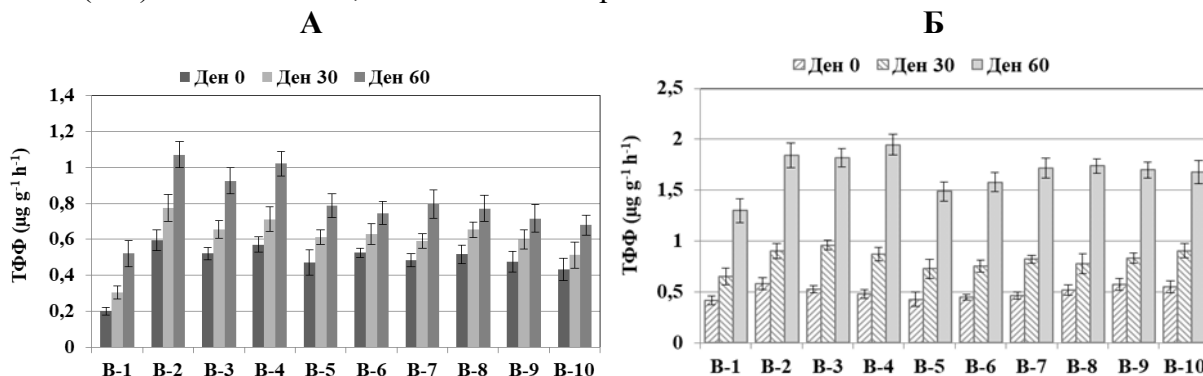


Фигура 25. Снимка на растенията от опитната постановка в края на опита.

4.5.4. Анализ на развитието на микробните съобщества в почвата.

4.5.4.1. Дехидрогеназна активност.

По относително подобен начин стои въпросът с дехидрогеназната активност в ризосферата и неризосферата на растенията от спанак, чието проследяване е извършено в 10 варианта в динамика трикратно в рамките на 60 дни (фиг. 26). И в двете зони активността на тези ензими се повишаваше с течение на опита, като най-висока беше в неговия край – 60и ден. В неризосферата стойностите бяха по-ниски, отколкото в ризосферата, а като правило в контролата (B-1) бяха по-ниски, отколкото във вариантите с добавен компост.



Фигура 26. Дехидрогеназна активност в неризосферната (А) и ризосферната почва (Б) на спанак, изразена като $\mu\text{g TФФ g}^{-1} \text{почва h}^{-1}$. Данните показват средната стойност на три повторения и стандартната грешка.

Диаграмите са в подкрепа на горните твърдения относно активността на дехидрогеназите приоритетно в ризосферната почва на спанак и по-малко – в неризосферната. Отново можем да смятаме, че от хипотетична тенденцията за засилване на тази активност при внасянето на бактериални популации ще стане факт. Най-съществено увеличение на дехидрогеназната активност беше отчетено в втори, трети и четвърти вариант, както в ризосферата, така и в неризосферата.

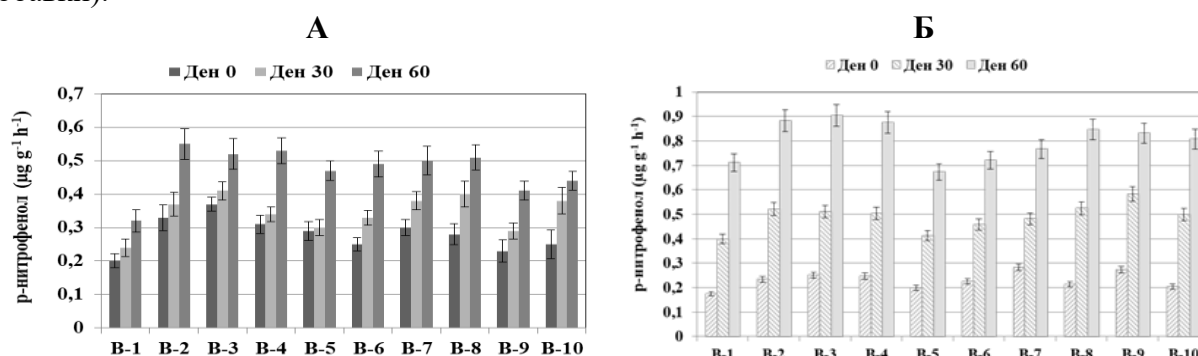
Може да се заключи, че окислително-редукционните процеси извършвани от микроорганизмите в почвата са по-засилени в ризосферата, отколкото в неризосферата на спанак при отглеждане върху замърсени с тежки метали почви. Количественото изражение на повишената активност е с около 80-110%. В допълнение, внасянето на компост и бактериални

популации, толерантни на представените тежки метали, води до допълнително засилване на дехидрогеназната активност.

4.5.4.2. β – глюкозидазна активност.

По-късно, при провеждането на проучване на β -глюкозидазната активност при спанак в 10 варианта и неризосферната почва (фиг. 27) се забелязва, че тя е по-висока в ризосферната почва, а не в неризосферната такава. Разликата между двата типа почва, обаче е по-малка отколкото при дехидрогеназната активност, 70-75%.

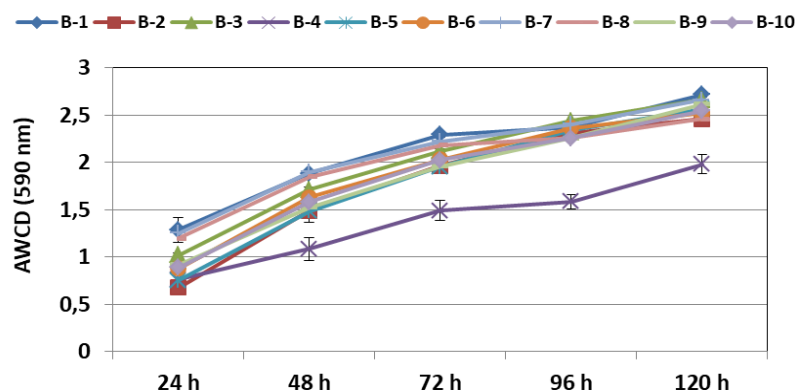
Във вариантите с и без добавени изолати тази ензимната активност се повишава, което си проличава най-ярко във варианти 2 (компост), 3 (комбинация от *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescense* и *Pseudomonas synxantha*) и 4 (комбинация от *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas synxantha* и *Pseudomonas fluorescense*). При пети и шести вариант (изолати *Pseudomonas putida*), β -глюкозидазната активност е понижена до стойностите на контролата (без добавки).



Фигура 27. β -глюкозидазна активност в неризосферната и ризосферната почва, изразена като μg p -нитрофенол g^{-1} почва. Данните показват средната стойност на три повторения и стандартната грешка.

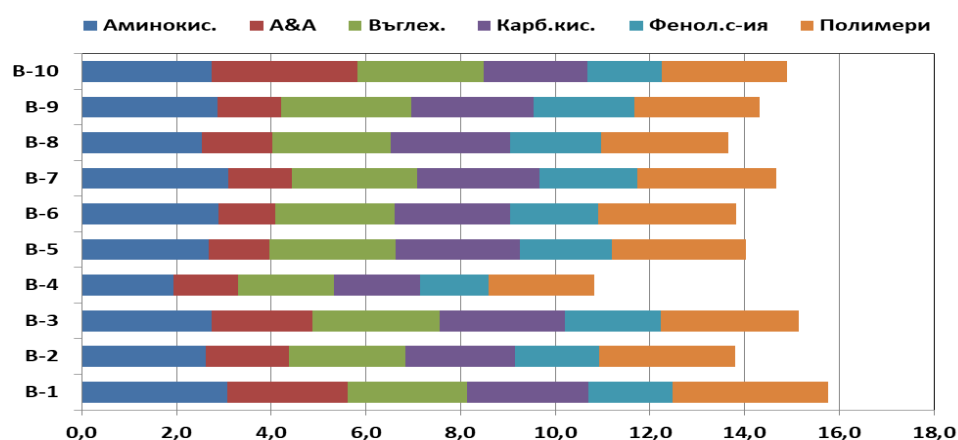
4.5.5. Промени в метаболитните профили на почвените микробни съобщества.

В нашето изследване, по време на третия опит се направи проучване на метаболитните профили на почвените микробни съобщества на ризосферата на спанака. Първоначално проучихме степента на усвояване на всички субстрати, изразено като средна величина от цветната реакция на кладенчетата в края на изследването (120 h). Може да се обобщи, че за петте дни на проучване най-висока степен на усвояване на субстратите се наблюдаваше при контролния вариант (B-1) и при вариант 7 (вносяне на компост и популацията на *P. fluorescens*), а най-ниска степен при вариант 4 (вносяне на компост и комбинация от 4 популации, фиг. 28). В началните етапи на изследването разликата в усвояването на изследваните субстрати беше съществено между различните варианти, което постепенно беше преодоляно. В края на изследването, към 120 h, разликата в оптичната плътност между най-високата (B-1) и най-ниската стойност в групата варианти (B-2) беше под 10% (9,5%). Най-ниска абсолютна стойност се установи при B-4, която беше 72,9% от B-1.



Фигура 28. Динамика в усвояването на различните въглеродни източници на екоплаките в края на опита при 590 nm. Резултатите показват средната стойност от три повторения $\pm$ стандартното отклонение.

Системата Biolog чрез екоплаките позволява групиране на въглеродните източници в съответствие с техните характеристики на 6 групи: аминокиселини, амини и амиди, въглехидрати, карбоксилни киселини, фенолни съединения и полимери. Усвояването на тези групи източници поотделно е представено на фиг. 49 и 50. Най-висока степен на усвояване на тези съединения се наблюдава при контролата (В-1) със сумарна оптична плътност при 590 nm от 15,76, а най-ниско при В-4 (фиг. 28). В допълнение, най-висока степен на усвояване и съответно най-силна цветна реакция при 590 nm се установи за аминокиселините и полимерите, а относително най-ниска при фенолните съединения и амините и амидите (Фиг. 29). При всички групи източници се очерта, че най-слабо усвояване има при В-4. По отношение на аминокиселините, повечето съобществата показаха добра способност да ги усвояват. Същото се наблюдаваше и при фенолните съединения, като освен В-4, по-слаба способност беше наблюдаване и при В-10. При амините и амидите се установи най-голяма диференциация на способността за използването им. Най-високо използване се наблюдаваше при В-10, следван от В-1, В-3 и В-2.



Фигура 29. Усвояване на различните въглеродни източници от екоплаките и тежестта на всеки един от тях изразено в проценти от общата активност при 590 nm. Резултатите показват средната стойност от три повторения.

В таблица 16 са представени основните индекси на метаболитната активност на почвените микробни съобщества. Като цяло стойностите на индекса на разнообразието на Shannon са в рамките от 2,49 до 3,29, което може да се определи като стабилна и балансирана структура на съобществата в хабитата. Въпреки това, в контролния вариант осезаемо се наблюдава намаление на този индекс, както и на индекса на Pielou.

Таблица 16. Основни индекси на метаболитната активност на почвените микробни съобщества при различните варианти на опита. Резултатите показват средната стойност от три повторения $\pm$ стандартната грешка.

Варианти	Индекс на разнообразието на Shannon (H')	Индекс на равномерността на Pielou (E')	Функционално богатство (R')
1	2,49 $\pm$ 0,1	0,76 $\pm$ 0,01	26 $\pm$ 0,2
2	3,15 $\pm$ 0,1	0,97 $\pm$ 0,01	26 $\pm$ 2
3	2,92 $\pm$ 0,1	0,97 $\pm$ 0,00	29 $\pm$ 0,2
4	2,94 $\pm$ 0,05	0,98 $\pm$ 0,01	27 $\pm$ 1,8
5	2,98 $\pm$ 0,07	0,98 $\pm$ 0,01	28 $\pm$ 0,6
6	3,25 $\pm$ 0,1	0,99 $\pm$ 0,00	26 $\pm$ 0,4
7	3,28 $\pm$ 0,1	0,98 $\pm$ 0,01	28 $\pm$ 0,5
8	3,26 $\pm$ 0,1	0,98 $\pm$ 0,00	28 $\pm$ 0,3
9	3,22 $\pm$ 0,1	0,99 $\pm$ 0,00	26 $\pm$ 1,1
10	3,14 $\pm$ 0,1	0,98 $\pm$ 0,00	27 $\pm$ 0,5

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящата дисертация показва, че комбинираният подход е много подходящ при изследване на терени замърсени с тежки метали. Използването на зеленчукови култури заедно с компост и популации на полезни микроорганизми е екологичен подход, комбиниращ рециклиране на биоотпадъци и биотехнологични методи, имащи като резултат намаляване подвижността на замърсителя и стабилизиране на нарушения терен.

Внасянето на компост и полезни популации микроорганизми повлияват почвената реакция, електропроводимостта, концентрацията на разглежданите тежки метали и степента на усвояването им от растенията, както и редица други показатели, по които да отсъдим за състоянието на ризосферната и неризосферната почва *in situ*. Чрез практическото реализиране на задачи като: изолиране на микроорганизми-стимулатори на растежа на зеленчуковите растения, изследване развитието на същите, както и на замърсените почви чрез внасянето на компост и бактерията *P. fluorescens*, успяхме да потвърдим тезата, че намаляване натрупването на тежките метали в растенията с помощта на екологичния подход е напълно възможно, дори препоръчително.

Фиторемедиацията е сред основните подходи, методи и способности, с които се осъществява извличане, задържане или имобилизиране на замърсители от почвата, основавайки се на способността на растителните видове, посредством кореновата им система, да допринесат за възстановяване почвената структура, състав и свойства. В дисертацията бяха проведени редица изследвания с репички, грах и спанак, които показаха ефективността на фиторемедиацията подпомогната с внасяне на полезни популации микроорганизми. Настоящият биотехнологичен подход се явява алтернатива на химичните методи, водещи до допълнително разрушаване на почвената структура и на хумусния слой в частност.

Внасянето на компост и полезни бактериални популации в почвата позволява да се овладее въздействието на достъпните концентрации на Pb, Zn и Cd върху живите организми и в частност върху растенията, което има като резултат възстановяване на агроecosистемите. Пример в това отношение е изследваното многообразие на параметри на развитието на трите зеленчукови култури. Подобрено състояние на растенията подложени на абиотичен стрес е изцяло резултат от внасянето на компост и популациите на полезните бактерии. Допълнителна придадена стойност на този подход е и повишаване концентрацията на органичното вещество в почвата, състоянието на почвените микробни съобщества и като цяло подобряване на почвеното плодородие. Следователно, бъдещите способности за справяне със завишени концентрации на тежки метали в почвите, особено при земеделски терени, трябва да следват указания екологичен подход на прилагане на фиторемедиация подпомогната с полезни микробни популации.

VI. ИЗВОДИ

Въз основа на получените резултати, може да се изведат следните по-важни изводи:

1. Способността на изолираните полезни бактериални популации да стимулират растежа на растенията е в пряка зависимост от толерантността им към наличните в почвата тежки метали и от присъствието на триптофан в средата поради значението му като прекурсор при образуване на индолоцетна киселина.
2. При видовото определяне на бактериални изолати трябва да се използват поне два различни подхода, ако не се прилага молекулярно идентифициране.
3. Развитието на спанака, граха и репичките в замърсените с тежки метали почви има като резултат намаляване на рН и на електропроводимостта в ризосферната зона на растенията.
4. Внасянето на компост води до увеличаване на запасеността на почвите с азот, фосфор и органично вещество.

5. Компостът има по-силен положителен ефект върху развитието на зеленчуковите култури в условията на замърсени почви в сравнение със самостоятелното внасяне на бактериални популации.
6. Скоростта на електронния транспорт в листата се повишава осезаемо при внасяне на компост в почвата.
7. Развитието на зеленчуковите растения без добавки води до мобилизиране на биодостъпни концентрации на тежките метали, докато внасянето на компост ги понижава значително.
8. Внасянето на компост води до съществено намаляване натрупването на тежки метали в биомасата на зеленчуковите култури. Най-силно акумулиране се наблюдава при спанака.
9. Съществува пряка зависимост между концентрацията на тежките метали в почвата и натрупването им в растенията. Тя е най-силно изразена по отношение на кадмия и в по-малка степен при цинка и оловото.
10. Спанакът е подходящ растителен вид за установяване наличието на биодостъпни тежки метали в земеделски почви. Концентрацията на тежките метали в листата е пропорционална на концентрацията им в почвата.
11. Използваният подход с внасяне на компост и популации на полезни бактерии се явява вид фитостабилизация на замърсени с тежки метали почви.
12. Ниските концентрации на Cd и Pb водят да стимулиране на микробната активност, докато високите я намаляват съществено.
13. Активността на ензимите дехидрогеназа и β -глюкозидаза е значително по-висока в ризосферната отколкото в неризосферната почва, а добавянето на компост и полезни популации води допълнителното ѝ стимулиране.
14. Микробни съобщества на замърсени с тежки метали почви са най-активни и добре развити при добавен компост с *P. fluorescens* или с комбинация от изолати, използвайки най-оптимално аминокиселините и полимерите, а най-слабо амините и амидите.

VII. ПРИНОСИ

7.1. Научни приноси

- Извърши се комплексно научно изследване на влиянието на компост и популации на полезни бактерии върху развитието, растежа и натрупването на тежки метали при спанак, грах и репички;
- За първи път в България се извърши проучване на почвените микробни съобщества въз основа на метаболитния им профил при фитостабилизация на замърсени с тежки метали почви.

7.2. Научно-приложни

- Установи се, че внасянето на компост в замърсена с тежки метали почва води до подобряване цялостното състояние на изследваните зеленчукови растения;
- Доказа се, че добавянето на популации на полезни бактерии и компост води до подобряване на почвеното здраве, както в ризосферна, така и неризосферата;
- Демонстрира се подобряване развитието на почвените микробни съобщества и намаляване концентрацията на биодостъпните фракции на тежките метали в резултат на внасяне компост.
- Доказа се приложимостта на екоплаките като подходящ инструмент за охарактеризиране на метаболитния капацитет на микробните съобщества в даден почвен хабитат.

7.3. Приложни приноси.

- Доказа се, че спанакът може успешно да се използва като тест-култура за установяване на замърсяване с тежки метали на земеделските почви.
- Установи се, че използването на качествени органични добавки съвместно с популации на полезни бактерии е подходящ, обещаващ подход за фитостабилизация на почви замърсени с тежки метали.

VIII. Публикации свързани с темата на дисертационния труд

Получените при изследването резултати са докладвани на текущи научни форуми и публикувани в научни издания:

1. Бабрикова Ив., Ст. Шилев, Т. Бабриков (2016). Намаляване натрупването на тежки метали в спанак отглеждан върху замърсена почва с използване на компост и полезни бактерии. Сборник с доклади от „Екология и здраве” 09-10 юни 2016 г., стр. 435-440, ISSN 2367-9530, <http://hst.bg/bulgarian/conference.htm>.
2. Babrikova I., S. Shilev, T. Babrikov. (2016). Compost and PGPR decrease heavy metal availability and toxicity to vegetables. In: (Filcheva, Stefanova, Ilieva eds.). 4th Nat. conf. of BHSS with Int. Participation. 8-10 September, 2016, Sofia, ISBN 978-619-90189-2-7, 285-294.
3. Shilev, S., Azaizeh, H., Vassilev, N., Georgiev, D., Babrikova I. 2019. Interactions in soil-microbe-plant system: adaptation to stressed agriculture. pp.131-171. In: Singh, D.P., Gupta, V.K., Prabha, R. (Eds.) Microbial Interventions in Agriculture and Environment, Volume 1: Research Trends, Priorities and Prospects. Springer Singapore. doi: 10.1007/978-981-13-8391-5.
4. Shilev S, Babrikova I, Babrikov T. 2020. Consortium of plant growth-promoting bacteria improves spinach (*Spinacea oleracea* L.) growth under heavy metal stress conditions. Journal of chemical technology and biotechnology, 96(4), pp. 932-939 <https://doi.org/10.1002/jctb.6077>.